



УДК 547.963.4

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЛЕГГЕМОГЛОБИНА II
ИЗ КЛУБЕНЬКОВ ЖЕЛТОГО ЛЮПИНА (*LUPINUS LUTEUS* L.)Егоров Ц. А., Казаков В. Ю., Шахпаронов М. И.,
Фейгина М. Ю., Костецкий П. В.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Определена полная аминокислотная последовательность леггемоглобина II из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus* L.), который состоит из 153 остатков и отличается от леггемоглобина I люпина заменой 20 аминокислот. Принимая во внимание, что бобовые растения возникли примерно 100 млн. лет назад, рассчитано, что оба компонента леггемоглобина люпина дивергировали от общего предшественника не более 20 млн. лет назад, а леггемоглобины сои и фасоли разошлись не более 32 млн. лет назад. Рассчитано, что леггемоглобины в ходе эволюции изменялись примерно на 1% за 1,3 млн. лет.

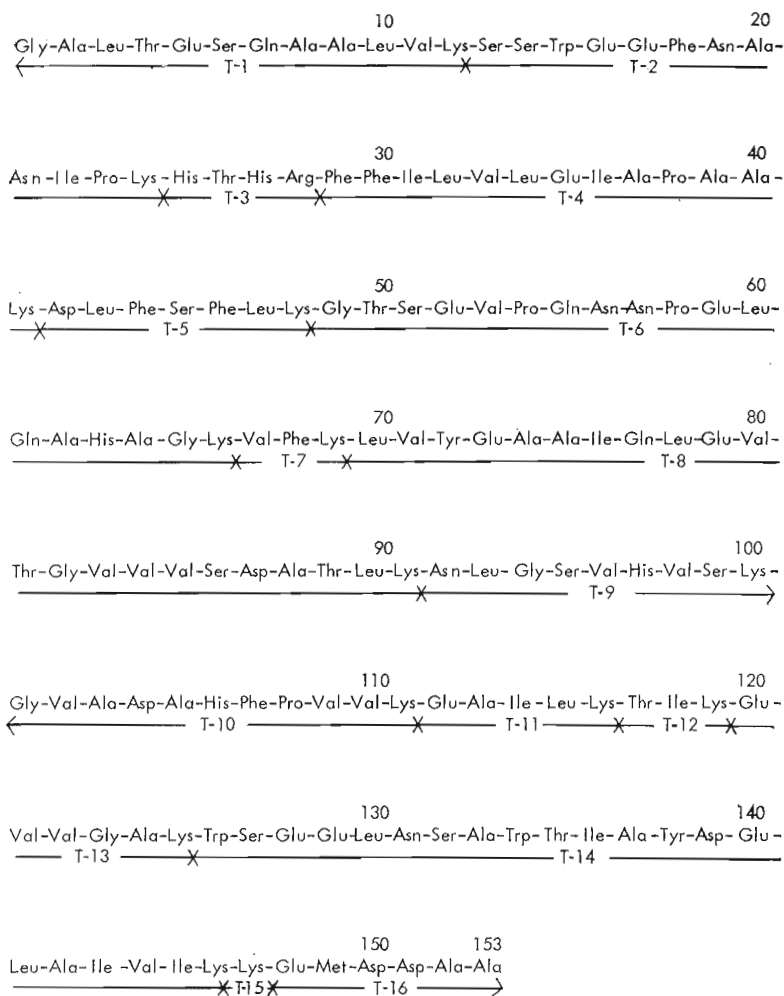
Наличие полиморфных форм белков — явление, достаточно распространенное в природе. Особенно ярко оно выражено среди гемоглобинов животного происхождения, когда в крови одного индивидуума присутствует два или более типа молекул данного белка (компонентов), которые различаются по аминокислотной последовательности [1]. Сходная картина наблюдается и для леггемоглобина — гемопротейда растительного происхождения, похожего по своей химической структуре на миоглобин. В ряде бобовых растений обнаружено как минимум два компонента леггемоглобина [2—8]. Роль этих компонентов как в случае гемоглобина, так и в случае леггемоглобина остается неизвестной, хотя в каждом случае высказываются различные предположения [9, 10].

Сложностью получения в чистом виде компонентов, пригодных для структурных исследований, по всей вероятности, и объясняется то, что до сих пор известна структура лишь одного компонента леггемоглобина сои [11] и одного компонента леггемоглобина фасоли [8]. Структура леггемоглобина кормовых бобов [12], по-видимому, изучена на смеси компонентов, так как в 14 позициях полипептидной цепи данного белка найдено по два различных аминокислотных остатка.

Ранее нами была определена первичная структура первого компонента леггемоглобина желтого люпина, названного нами «леггемоглобин I» [13]. В настоящей работе установлена полная аминокислотная последовательность второго компонента этого белка — леггемоглобина II, трехмерная структура которого была установлена с разрешением 5 Å [14].

Белок выделяли и очищали как описано ранее [13]. Для определения аминокислотной последовательности леггемоглобина II использовали следующие типы фрагментации белка: исчерпывающий гидролиз трипсином,

Сокращение: Lb — леггемоглобин.



С х е м а 1. Аминокислотная последовательность леггемоглобина II из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus* L.)

специфический гидролиз трипсином по единственному остатку аргинина в данной полипептидной цепи и гидролиз химотрипсином. N-Концевую последовательность белка определяли с помощью секвенсера модели 890С (Beckman, США). Пептиды разделяли и очищали на колонках, а также электрофорезом и хроматографией на бумаге.

Из триптического гидролизата леггемоглобина II были выделены практически все пептиды, за исключением пептида Т-4 (см. схему 1), который плохо растворим и трудно поддается очистке. Однако аминокислотная последовательность данного участка полипептидной цепи была четко определена путем анализа N-концевой последовательности белка вплоть до остатка 35, а также путем анализа аминокислотной последовательности большого фрагмента, начинающегося с остатка Phe²⁹. Этот фрагмент был получен следующим образом: белок сукцинилировали и после удаления солей гель-хроматографией подвергали гидролизу трипсином (соотношение фермент — субстрат 1 : 150, 37°, 90 мин); полученную смесь, не разделяя, анализировали на секвенсере. Таким путем удалось идентифицировать 43 остатка, т. е. вплоть до остатка Val⁷¹. Этот прием в сочетании с автоматической техникой позволил определить почти половину структуры полипептидной цепи белка. Изучение структуры пептидов, полученных при гидролизе белка трипсином и химотрипсином, позволило полностью опреде-

	5	10	15	20	25	30	35	40																																	
ПРЕДОК ЛЮПИНА	G	A	L	T	E	X	Q	X	A	L	V	K	S	S	X	E	E	F	N	A	N	I	R	K	X	T	H	R	F	F	T	L	V	L	E	I	A	R	A	A	
Lb I ЛЮПИНА	C	V	L	T	D	V	Q	V	A	L	V	K	S	S	P	E	E	F	N	A	N	I	R	K	N	T	H	R	F	F	T	L	V	L	E	I	A	R	G	A	
Lb II ЛЮПИНА	G	A	L	T	E	S	Q	A	A	L	V	K	S	S	W	E	E	F	N	A	N	I	R	K	H	T	H	R	F	F	I	L	V	L	E	I	A	R	A	A	
ПРЕДОК СОИ	G	A	R	T	E	K	Q	E	A	L	V	N	S	S	X	E	A	F	K	A	N	I	R	Q	Y	S	V	V	F	Y	T	S	I	L	E	K	A	R	A	A	
Lb ФАСОЛИ	G	A	R	T	E	K	Q	E	A	L	V	N	S	S	W	E	A	F	E	G	N	I	R	Q	Y	S	V	V	E	Y	T	S	I	L	E	K	A	R	A	A	
Lb СОИ	V	A	R	T	E	K	Q	D	A	L	V	S	S	S	F	E	A	F	K	A	N	I	R	Q	Y	S	V	V	F	Y	T	S	I	L	E	K	A	R	A	A	
	45	50	55	60	65	70	75	80																																	
ПРЕДОК ЛЮПИНА	K	D	L	F	S	F	L	K	G	S	S	E	V	P	Q	N	N	P	E	L	Q	A	N	A	G	K	V	F	K	L	V	Y	E	A	A	I	Q	L	E	V	
Lb I ЛЮПИНА	K	D	L	F	S	F	L	K	G	S	S	E	V	P	Q	N	N	P	D	L	Q	A	N	A	G	K	V	F	K	L	T	Y	R	A	A	I	Q	L	E	V	
Lb II ЛЮПИНА	K	D	L	F	S	F	L	K	G	T	S	E	V	P	Q	N	N	P	E	L	Q	A	N	A	G	K	V	F	K	L	V	Y	E	A	A	I	Q	L	E	V	
ПРЕДОК СОИ	K	D	L	F	S	F	L	A	N	G	-	-	V	D	P	T	N	R	K	L	T	A	N	A	E	K	L	F	X	L	V	P	D	S	A	X	Q	L	K	A	
Lb ФАСОЛИ	K	N	L	F	S	F	L	A	N	G	-	-	V	D	P	T	N	R	K	L	T	A	N	A	E	S	L	F	O	L	V	R	D	S	A	A	Q	L	R	A	
Lb СОИ	K	D	L	F	S	F	L	A	N	G	-	-	V	D	P	T	N	R	K	L	T	O	N	A	E	K	L	F	A	L	V	R	D	S	A	G	Q	L	K	A	
	85	90	95	100	105	110	115	120																																	
ПРЕДОК ЛЮПИНА	N	G	A	V	V	S	D	A	T	L	K	X	L	G	S	V	M	V	S	K	G	V	A	D	A	N	F	P	V	V	K	E	A	I	L	K	T	I	K	E	
Lb I ЛЮПИНА	N	G	A	V	A	S	D	A	T	L	K	S	L	G	S	V	H	V	S	K	G	V	V	D	A	N	F	P	V	V	K	E	A	I	L	K	T	I	K	E	
Lb II ЛЮПИНА	T	G	V	V	V	S	D	A	T	L	K	N	L	O	S	V	H	V	S	K	G	V	A	D	A	N	F	P	V	V	K	E	A	I	L	K	T	I	K	E	
ПРЕДОК СОИ	N	G	A	V	V	A	D	A	A	-	-	-	L	G	S	V	H	A	Q	E	G	V	X	N	A	Q	V	L	V	V	E	E	A	L	L	K	T	I	K	R	
Lb ФАСОЛИ	N	G	A	V	V	A	D	A	A	-	-	-	L	G	S	I	H	S	Q	K	G	V	S	E	D	Q	F	L	V	V	X	E	E	A	L	L	K	T	L	K	Q
Lb СОИ	S	G	T	V	V	A	D	A	A	-	-	-	L	G	S	V	H	A	Q	K	A	V	T	N	H	E	F	I	V	V	K	E	A	L	L	K	T	I	K	A	
	125	130	135	140	145	150																																			
ПРЕДОК ЛЮПИНА	V	V	G	D	K	W	S	E	E	L	N	T	A	W	T	I	A	Y	D	E	L	A	I	Y	T	Y	K	K	E	M	A	D	A	A							
Lb I ЛЮПИНА	V	V	G	D	K	W	S	E	E	L	N	T	A	W	T	I	A	Y	D	E	L	A	I	Y	I	K	K	E	M	K	D	A	A								
Lb II ЛЮПИНА	V	V	G	A	K	W	S	E	E	L	N	S	A	N	T	I	A	Y	D	E	L	A	I	Y	I	K	K	E	M	D	D	A	A								
ПРЕДОК СОИ	A	V	G	D	K	W	S	D	E	L	S	T	A	W	E	X	A	Y	D	E	L	A	A	A	I	K	K	E	X	A	-	-	-								
Lb ФАСОЛИ	A	V	G	D	K	W	T	D	Q	L	S	T	A	L	E	L	A	Y	D	E	L	A	A	A	I	K	K	A	Y	A	-	-	-								
Lb СОИ	A	V	G	D	K	W	S	D	E	L	S	R	A	W	E	V	A	Y	D	E	L	A	A	A	I	K	K	A	-	-	-	-									

Схема 2. Аминокислотные последовательности леггемоглобинов I и II люпина, фасоли (компонент Lb₂) [12] и сои (компонент Lb₁) [11] и их предшественников, при выводе аминокислотной последовательности которых принимался во внимание генетический код. Символом X в молекулах предшественников обозначены аминокислотные остатки, характер которых невозможно определить. С — Ф — предшественник леггемоглобинов сои и фасоли. А — Ala, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr. Lb — леггемоглобин. * — остаток изолейцина, найденный нами в пептиде триптического гидролизата суммарного препарата леггемоглобина сои, который использовался для сравнительного анализа методом пептидных карт

лечь аминокислотную последовательность леггемоглобина II, которая показана на схеме 1.

Леггемоглобин II отличается от леггемоглобина I люпина заменой 20 аминокислот (схема 2). Оба компонента леггемоглобина люпина гораздо больше отличаются от леггемоглобинов сои и фасоли (схема 2). Их полипептидные цепи длиннее полипептидных цепей последних на 10 и 8 аминокислотных остатков соответственно. В целом леггемоглобин I люпина отличается от леггемоглобинов фасоли и сои заменой 79 аминокислот в каждом случае, а леггемоглобин II — заменой 76 и 73 аминокислот соответственно.

Используя метод нахождения аминокислотной последовательности предшественников близкородственных белков [15], мы вывели аминокислотную последовательность предшественников леггемоглобина люпина и леггемоглобинов фасоли и сои (схема 2), на основании чего построено эволюционное древо семейств леггемоглобинов (рисунок). Особенность это-

Матрица различий между аминокислотными последовательностями леггемоглобинов *

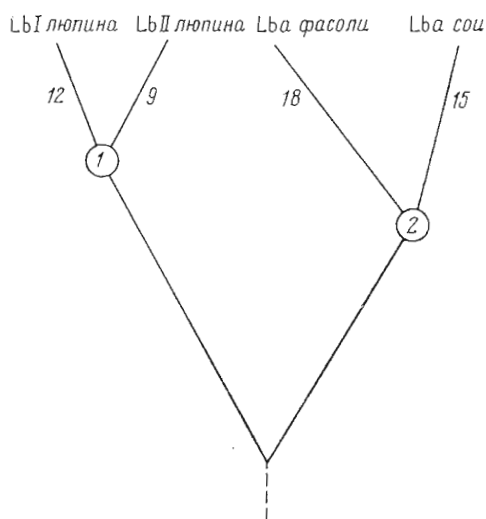
	ЛbI люпина	ЛbII люпина	Лba фасоли	Лbo сои
ЛbI люпина	—	15	78	74
ЛbII люпина	14	—	74	70
Лba фасоли	54	52	—	24
Лbo сои	52	50	22	—

* Делеции в аминокислотных последовательностях учитывались при расчетах, причем делеция рассматривалась в виде новой («21-й») аминокислоты.

го дерева состоит в том, что каждая пара сравниваемых белков отличается от своего предшественника примерно равным количеством замен (12/9 и 15/18). Это согласуется с предположением, что в процессе эволюции близкородственные белки изменялись примерно одинаково [16—19].

На основании эволюционного дерева можно рассчитать среднюю скорость изменения леггемоглобинов. В таблице приведены различия между аминокислотными последовательностями леггемоглобинов в расчете на 100 остатков. В нижней левой части таблицы представлены мутационные расстояния между сравниваемыми леггемоглобинами в виде числа аминокислотных замен на 100 остатков последовательности. В верхней правой части таблицы приведены исправленные мутационные расстояния,

Эволюционное дерево леггемоглобинов. 1 и 2 — предполагаемые предшественники леггемоглобинов люпина, фасоли и сои соответственно. Числа, указанные на ответвлениях дерева, обозначают число аминокислотных замен между белком и его предшественником. Длины ответвлений пропорциональны данным числам. Последовательности предшественника люпина (1) и предшественника фасоли и сои (2) различаются 53 аминокислотными заменами



учитывающие возможность нескольких замен в одной позиции полипептидной цепи [17]. Усредняя исправленные расстояния для четырех пар наиболее различающихся белков и учитывая, что бобовые растения возникли в эпоху верхнего мела [20, 21], т. е. не позднее 100 млн. лет назад [22], можно рассчитать скорость накопления аминокислотных замен в леггемоглобинах. При этом оказывается, что исследованные леггемоглобины изменялись на 1% не более чем за 1,3 млн. лет. Это значит, что в ходе эволюции леггемоглобины эволюционировали в 4—5 раз быстрее гемоглобинов животных и в этом отношении незначительно уступают только фибринопептидам [17]. В соответствии с найденной скоростью эволюции леггемоглобинов возраст предшественника леггемоглобина люпина составляет не более 20 млн. лет, а возраст предшественника леггемоглобинов сои и фасоли — не более 32 млн. лет.

В заключение авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за внимание и поддержку этой работы, а также Г. Я. Жизневской и ее сотрудникам за помощь при выделении белка и И. В. Назимову за анализ последовательности аминокислот на секвенсере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kitchen H. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **241**, 12—24.
2. Ellfolk N. (1960) *Acta chem. scand.*, **14**, 609—616.
3. Broughton W. J., Dilworth M. J. (1971) *Biochem. J.*, **125**, 1075—1080.
4. Thorogodd E. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, PC267—271.
5. Broughton W. J., Dilworth M. J. (1973) *Biochem. et biophys. acta*, **317**, 266—276.
6. Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., Ливанова Г. И. (1967) *Докл. АН СССР*, **177**, 1229—1231.
7. Мелик-Саркисян С. С., Яровенко В. В., Шапошников Г. Л., Владзиевская Л. П., Кретович В. Л. (1974) *Биохимия*, **39**, 711—718.
8. Lehtovaara P., Ellfolk N. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 577—584.
9. Riggs A. (1976) *Fed. Proc.*, **35**, 2115—2118.
10. Fushman W. H., Barton C. R., Stein M. M., Thompson J. T., Willet R. M. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **68**, 387—392.
11. Ellfolk N., Sievers G. (1971) *Acta chem. scand.*, **25**, 3532—3534.
12. Richardson M., Dilworth M. J., Scawen M. D. (1975) *FEBS Lett.*, **51**, 33—37.
13. Егоров Ц. А., Фейгина М. Ю., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Миталева С. И., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 125—128.
14. Вайнштейн Б. К., Аратонян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. И., Павловский А. Г., Гребенко А. И., Конарева Н. В. (1974) *Кристаллография*, **19**, 971—979.
15. Dayhoff M. O. (1972) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, pp. 7—16, National Biomedical Research Foundation, Washington.
16. Kimura M. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1181—1188.
17. Dickerson R. E. (1971) *J. Mol. Evol.*, **1**, 26—45.
18. Nei M., Chakraborty R. (1976) *J. Mol. Evol.*, **7**, 313—323.
19. Zuckerkandl E. (1976) *J. Mol. Evol.*, **7**, 269—311.
20. Gundersen A. (1950) *Families of Dicotyledons*, Waltham, Mass, *Chronica Botanica Co.*
21. Основы палеонтологии. Голосеменные и покрытосеменные (ред. А. Л. Тахтаджан) (1963) с. 543—546, Гос. научно-технич. изд-во лит. по геологии и охраны недр., М.
22. Афанасьев Г. Д., Зыков С. И. (1975) *Геохронологическая шкала паперозов в свете новых значений постоянных распада*, «Наука», М.

Поступила в редакцию
26.VIII.1977

THE COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF LEGHEMOGLOBIN II FROM YELLOW LUPIN (*LUPINUS LUTEUS* L.)

EGOROV Ts. A., KAZAKOV V. K., SHAKHPARONOV M. I.,
FEIGINA M. Yu., KOSTETSKY P. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The complete amino acid sequence of leghemoglobin II from the root nodules of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) which consists of 153 residues and differs from leghemoglobin I of lupin in 20 amino acids has been determined. Taking into account that leguminous plants had appeared about 100 million years ago it is calculated that both components of lupin leghemoglobin diverged from the common precursor not more than 20 million years ago, whereas leghemoglobin of soy bean (Lb a) and kidney bean (Lb a) diverged not more than 32 million years ago. It is calculated that leghemoglobin had been changing to about 1% per 1.3 million years in the course of evolution.