



УДК 547.962.02

РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК L3

III. ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА L3 РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*

*Муринов А. В., Муранова Т. А., Маркова Л. Ф.,
Обчинников Ю. А.*

Институт белка Академии наук СССР, Пущино, Московская область

Определена полная аминокислотная последовательность белка L3 рибосом *Escherichia coli** (M 22232). Полипептидная цепь состоит из 209 аминокислотных остатков, в положении 150 содержит остаток метилированной аминокислоты N⁵-метилглутамина (MGln). При исследовании структуры белок гидролизовали трипсином [1], химотрипсином, термолизином [2], протеазой *Staphylococcus aureus*, а также подвергали ограниченному гидролизу трипсином по остаткам лизина после модификации белка малоновым диальдегидом и ограниченному гидролизу трипсином по остаткам аргинина после модификации белка маленовым ангидридом. Маленированный белок гидролизовали также химотрипсином, а отдельные фрагменты триптического гидролизата маленированного белка — термолизином.

В настоящее время во многих лабораториях ведутся интенсивные исследования структуры и функции рибосом, а также отдельных структурных элементов этих рибонуклеопротеидных частиц. В связи с этим представляет большой интерес изучение функции рибосомных белков, их топографии, взаимодействия с РНК. При этом особую важность приобретает знание их первичной структуры. В нашей лаборатории были определены полные аминокислотные последовательности рибосомных белков L25, L10, L32 [4–6]. В развитие этих исследований нами предпринято изучение первичной структуры одного из самых больших белков 70S-рибосом — белка L3. Он входит в число РНК-связывающих белков 50S-субчастицы [7, 8]. Установлено, что белок L3 специфически и независимо от других белков связывается с 3'-концевым 11S-фрагментом 23S-РНК [9, 10]. Важно подчеркнуть также, что белок L3 — один из нескольких, которые, как было показано при помощи бифункционального реагента, сшиваются с фактором элонгации Tu [11]. Эксперименты Хэмпла и Ниерхауза дают возможность предположить, что белок L3 участвует в образовании пептидилтрансферазного центра 70S-рибосом [12]. С. Н. Чанг и Ф. Н. Чанг обнаружили в белке L3 остаток метилированной аминокислоты [13], который был идентифицирован Дж. Лхоестом и Ч. Колсоном как N⁵-метилглутамин [14].

Настоящая работа посвящена определению полной аминокислотной последовательности рибосомного белка L3, включая идентификацию и локализацию остатка N⁵-метилглутамина. Белок выделяли из 70S-рибосом

* Предварительные сообщения опубликованы в работах [1–3].

по методу, разработанному ранее [15]. Существенно, что при ионообменной хроматографии суммарного 70S-рибосомного белка на CM-целлюлозе в описанных условиях белок L3 всегда элюируется с колонки в смеси с белками L11, S2. Белки L3, L11 имеют одинаковую изоэлектрическую точку 9,7 [16], а присутствие белка S2 (изоэлектрическая точка 6,7 [16]) во фракциях, содержащих белки L3 и L11 возможно, говорит о том, что либо белок L3, либо L11, либо они вместе образуют комплекс с белком S2, достаточно устойчивый в условиях разделения.

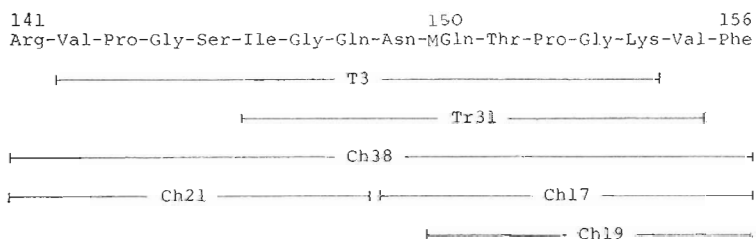
При изучении первичной структуры белка L3 было использовано несколько типов ферментативного гидролиза полипептидной цепи. Исследование полученных фрагментов показало, что аминокислотная последовательность белка содержит ряд повторяющихся и симметрично построенных участков. Это несколько затруднило работу и потребовало дополнительной проверки некоторых результатов. Первоначально белок гидролизовали трипсином [1]. Для получения перекрытий между триптических фрагментами был осуществлен гидролиз белка химотрипсином и термолитином [2]. Данные, полученные в результате проведенного исследования, позволили представить аминокислотную последовательность белка в виде 7 крупных фрагментов, с общим количеством аминокислотных остатков 200 [2]. Таким образом, была получена большая часть информации о первичной структуре исследуемого белка. При этом все аминокислотные последовательности были подтверждены как минимум тремя независимыми методами.

При аминокислотном анализе ряда пептидов триптического, химотриптического и термолитического гидролизатов (T3, Tr31, Ch38, Ch17, Ch19), входящих в последовательность, представленную на схеме 1, кроме пиков,

Схема 1

Фрагмент полипептидной цепи белка L3, включающий пептиды, содержащие остаток N⁵-метилглутамина (M⁵Gln)

T3 — триптический пептид; Tr31 — термолитический пептид; Ch — химотриптические пептиды. Данные о пептидах приведены в сообщении [2]



соответствующих обычным аминокислотам, был обнаружен пик M (рис. 1а), регистрирующий вещество сильноосновного характера. Время выхода этого вещества с ионообменной колонки при аминокислотном анализе соответствовало времени выхода триптофана, но неизвестное вещество не могло быть идентифицировано как триптофан, поскольку перечисленные выше пептиды не содержали его, что было установлено при помощи реактива Эрлиха. На основании работы Дж. Лхоеста и Ч. Колсона [14] мы предположили, что это метиламин, который образуется в условиях кислотного гидролиза пептидов, содержащих остаток N⁵-метилглутамина. Чтобы подтвердить это предположение, хлоргидрат метиламина подвергли ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе (рис. 1б). Время выхода метиламина точно соответствовало времени выхода неизвестного вещества. Из схемы 1 видно, что единственным остатком глутамина, входящим в состав всех вышеперечисленных пептидов,

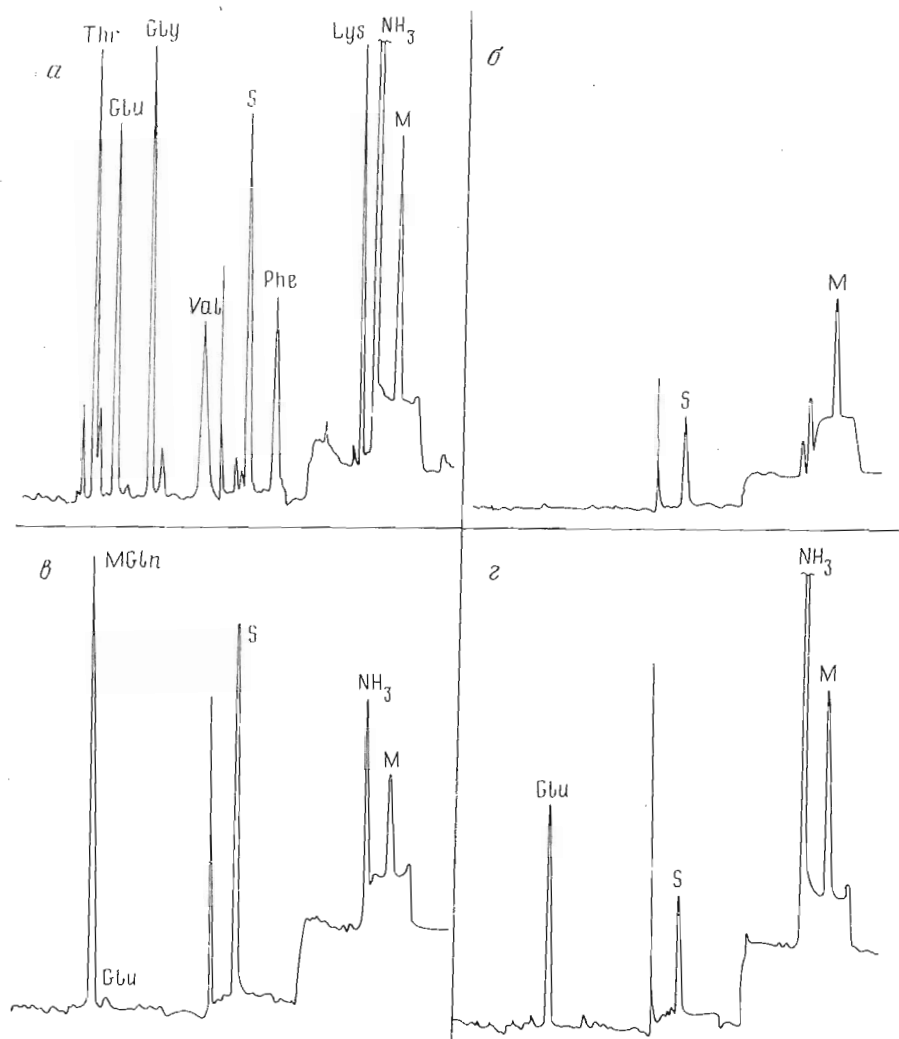


Рис. 1. Профили элюирования, полученные при аминокислотном анализе: *a* — кислотного гидролизата одного из пептидов, содержащих остаток N⁵-метилглутамина (Ch 19); *б* — метиламина; *в* — N⁵-метилглутамина; *г* — кислотного гидролизата N⁵-метилглутамина. М — пик, соответствующий метиламину, S — внутренний стандарт

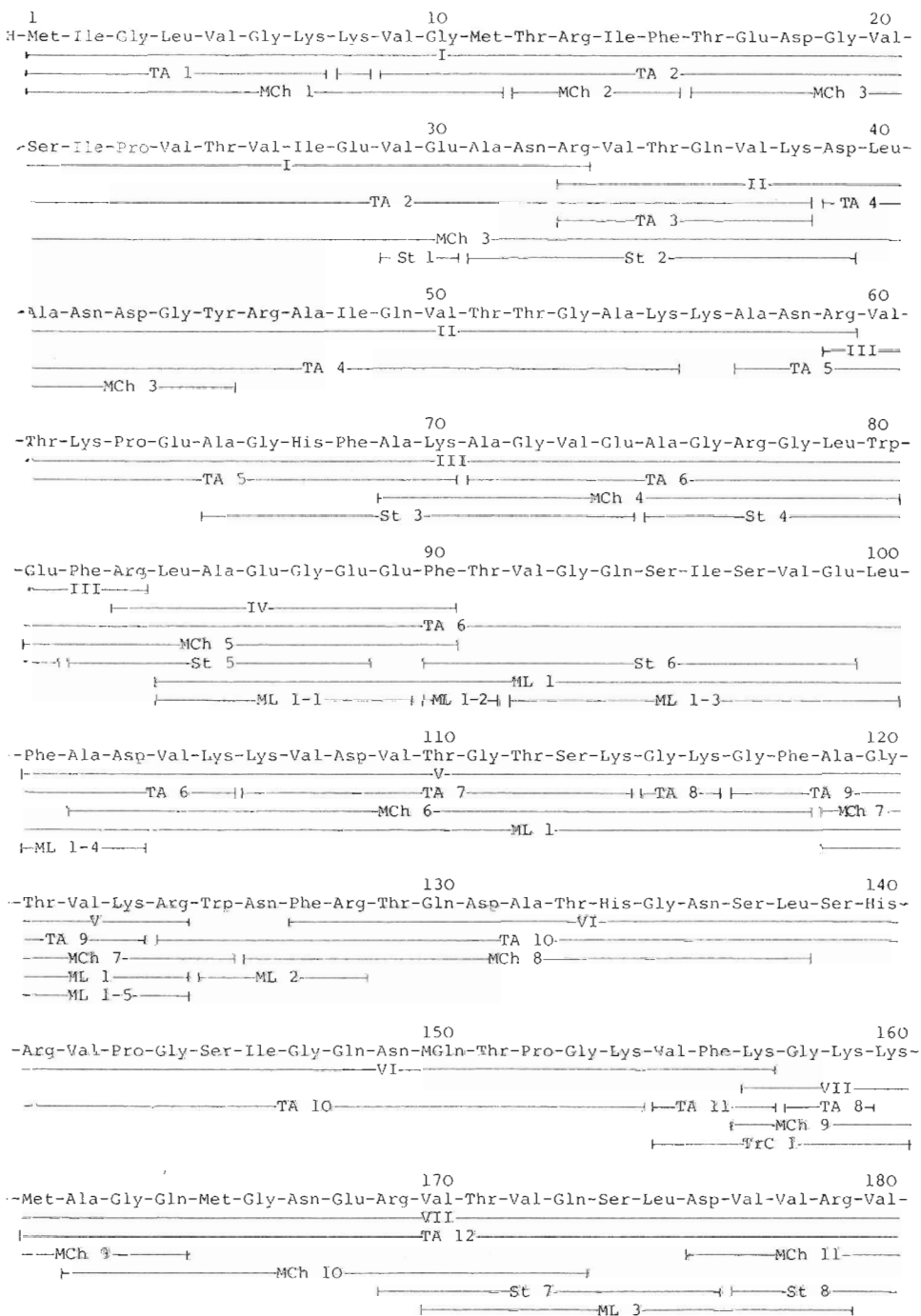
является остаток в положении 150. Пептид Ch21, включающий N-концевые последовательности пептидов T3, Ch38, Tr31 и содержащий еще один остаток глутамина, входящий в их состав, не давал пик, соответствующий метиламину, при аминокислотном анализе. Для идентификации остатка N⁵-метилглутамина использовали тиазолионы аминокислот, полученные при определении аминокислотных последовательностей пептидов, дающих пик метиламина при анализе их аминокислотного состава. Кислотные гидролизаты тиазолионов подвергли аминокислотному анализу; при наличии метиламина тиазолионы превращали в фенилтиогидантоины соответствующих аминокислот и исследовали с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля, используя в качестве стандарта Pth-производное N⁵-метилглутамина, синтезированного по методу Н. Лихтенштейна [17]. Это Pth-производное при ТСХ имело такую же подвижность, как и Pth-производное остатка 150 (рис. 2), окраска пятен после проявления хроматограммы нингидрином также была идентична. Кислотный гидролизат синтезированного N⁵-метилглутамина при аминокислотном анализе дает пики,

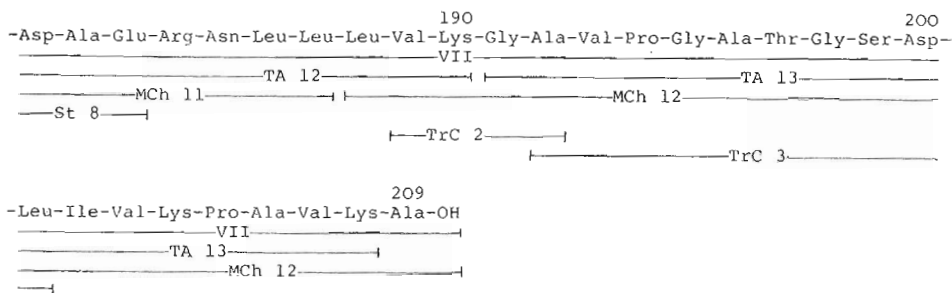
Схема 2

Аминокислотная последовательность рибосомного белка L3 *Escherichia coli*

Римскими цифрами обозначены фрагменты, аминокислотные последовательности которых приведены в предыдущем сообщении [2]

TA — триптические пептиды модифицированного по остаткам аргинина белка L3; ML — триптические пептиды маленинированного белка L3; TrC, ML1-1 — ML1-5 — термолитические пептиды, полученные при расщеплении триптических фрагментов маленинированного белка; MCh — химотриптические пептиды маленинированного белка L3; St — пептиды, полученные при расщеплении белка L3 протеазой *St. aureus*



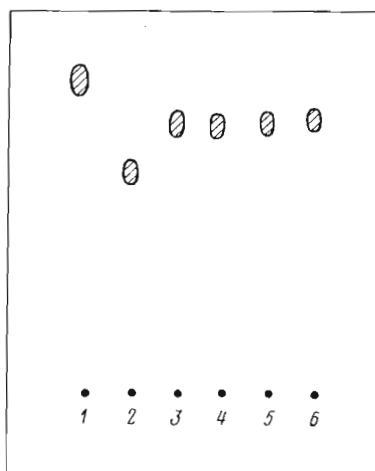


соответствующие глутаминовой кислоте и метиламину (рис. 1а). Это согласуется с данными, полученными при аминокислотном анализе пептидов, содержащих остаток 150.

Для получения недостающих перекрытий между полученными фрагментами [2] (см. схему 2) и подтверждения ряда последовательностей было проведено несколько специфических гидролизом белка. В данном случае задача по разделению гидролизатов облегчалась тем, что не было необходимости тотального выделения всех пептидов. Требовалось выделить только пептиды, содержащие недостающую информацию о структуре белка. В связи с тем что на С-конце четырех из полученных ранее фрагментов [2] находился остаток аргинина, казалось целесообразным провести ограниченный гидролиз полипептидной цепи трипсином по остаткам лизина, предварительно подвергнув остатки аргинина модификации малоновым диальдегидом.

Гидролиз проводили в стандартных условиях. Один из фрагментов гидролизата (ТА 6), нерастворимый при щелочных значениях рН, отделили от растворимых пептидов центрифугированием и очистили гель-фильтрацией на сефадексе G-50, уравновешенном 40% уксусной кислотой (рис. 3). Его аминокислотный состав и аминокислотная последовательность представлены в табл. 1, 2. При разделении растворимой части гидролизата с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-50 в присутствии мочевины получены 9 фракций (рис. 4), для каждой из которых был проведен анализ N-концевых аминокислотных остатков входящих в нее пептидов. При этом оказалось, что фракции 2, 3, 5, 6 содержали индивидуальные пептиды ТА 6, ТА 12, ТА 4, ТА 13 соответственно, что было подтверждено также их аминокислотным анализом (табл. 1) и определением их аминокислотных последовательностей с N-конца (табл. 2). Фракции 7—9 состояли из нескольких пептидных компонентов и были подвергнуты высо-

Рис. 2. Хроматографии фенилтиогидантоинов аминокислот в тонком слое силикагеля. На рисунке обозначены нингидринположительные пятна, соответствующие фенилтиогидантоинам глутаминовой кислоты (1), глутамина (2), N⁵-метилглутамина (3), Prh-производным остатка 150, входящего в состав пептидов Tr 31, Ch 17 и Ch 19 (схема 1) (4—6)



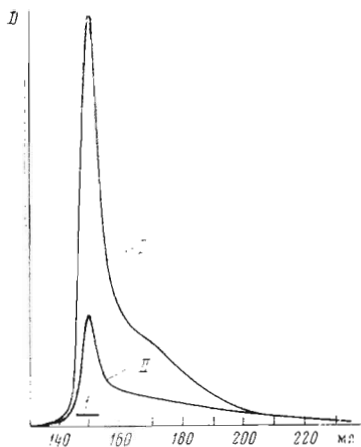


Рис. 3

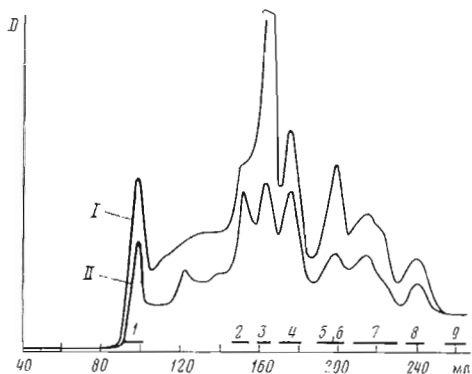


Рис. 4

Рис. 3. Разделение нерастворимой при щелочных значениях pH части триптического гидролизата модифицированного по остаткам аргинина белка L3 на сефадексе G-50, уравновешенном 40% уксусной кислотой (здесь и на рис. 4-7 сефадекс superfine; колонка 1,5×200 см): поглощение элюата при 320 (I) и 260 нм (II). Отмечена объединенная фракция, отбираемая для исследования пептида ТА6

Рис. 4. Разделение растворимой при щелочных значениях pH части триптического гидролизата модифицированного по остаткам аргинина белка L3 на сефадексе G-50, уравновешенном 6 М мочевиной в 0,01% бикарбонате аммония: поглощение при 320 (I) и 260 нм (II); здесь и далее отмечены объединенные фракции

ковольтному электрофорезу на бумаге, в результате чего из фракции 7 были выделены пептиды ТА 5, ТА 7, из фракции 8 — пептиды ТА 1, ТА 3, ТА 9, из фракции 9 — пептиды ТА 8, ТА 11.

После определения их аминокислотных последовательностей (табл. 2) оказалось, что пептид ТА 5 дает основание соединить фрагменты II и III (схема 2) в единую полипептидную цепь. Фракция 4 содержала пептиды, N-концевыми аминокислотными остатками которых были валин и модифицированный остаток аргинина, принадлежащие пептидам ТА 2 и ТА 10 соответственно. В связи с тем что разделение этих фрагментов вызвало затруднения, а N-концевая часть фрагмента ТА 2 была к этому времени уже известна, оказалось целесообразным определение N-концевой аминокислотной последовательности фрагмента ТА 10 на смеси. При этом было получено перекрытие между фрагментами V и VI, включая не выделенный ранее триптический пептид Trp-Asn-Phe-Arg.

Таким образом, в результате ограниченного гидролиза белка L3 по остаткам лизина из гидролизата были выделены 13 фрагментов, причем в гидролизате не обнаружены продукты расщепления по остаткам аргинина, что говорит о полной его модификации; в то же время был выделен пептид ТА 3, образовавшийся в результате расщепления связи Asn-Arg.

С целью определения структуры одного из триптических пептидов (Т 35), а также получения некоторых перекрытий был осуществлен ограниченный гидролиз белка трипсином по остаткам аргинина после предварительной модификации лизиновых остатков малеиновым ангидридом. Гидролизат разделяли гель-хроматографией на сефадексе G-50 при щелочном значении pH (рис. 5). Для каждой из 10 объединенных фракций определили N-концевые аминокислотные остатки входящих в ее состав пептидов и исследовали при помощи ТСХ на целлюлозе. При этом выяснилось, что фракции 3, 7, 10 содержали соответственно практически чистые пептиды ML 1, ML 3, ML 2, аминокислотный состав которых приведен в табл. 3. Фрагмент ML 1, состоящий из 41 аминокислотного остатка и включающий триптический пептид Т 35 [1], оказался удобным объектом для

Таблица 1

Характеристика триглицерических пептидов модифицированного по остаткам аргинина рибосомного белка L3

Пеп- тид	Аминокислотный состав														N-Количество аминокис- лота	Количество атомов ами- ногрупп	Выход, % моль	Номер фрак- ции (рис. 4)			
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His					Lys	Arg*	Trp
	ТА 1						1,85 (2)			4,0 (1)	0,38 (1)	0,92 (4)	1,0 (1)							1,04 (1)	
ТА 3		1,0 (1)		1,21 (1)					1,63 (2)						1,15 (1)	0,87 (4)		Arg	6	16,2	8
ТА 4	2,54 (3)	1,63 (2)		1,45 (1)		2,36 (2)	2,72 (3)		0,54 (1)	1,0 (4)		1,09 (1)			1,09 (1)	0,90 (1)		Asp	17	8,1	5
ТА 5	1,0 (1)	1,0 (4)		1,42 (1)	1,0 (1)	1,36 (4)	2,54 (3)		0,67 (1)					0,82 (1)	1,73 (2)	0,61 (1)		Ala	14	8,0	7
ТА 6	1,32 (1)	1,32 (1)	2,42 (2)	6,57 (7)		5,42 (5)	3,70 (4)		3,92 (4)	1,32 (4)		3,03 (3)		2,57 (3)	1,60 (1)	2,0 (2)		Ala	35	42,1	2
ТА 7	1,09 (1)	1,72 (2)	1,0 (1)			1,18 (1)			2,0 (2)						2,48 (2)			Lys	9	34,2	7
ТА 8						1,0 (1)									1,46 (1)			Gly	2	2,0	9
ТА 9		1,0 (1)				1,93 (2)	1,06 (1)		1,06 (1)						1,18 (1)			Gly	7	27,5	8
ТА 11									1,0 (1)					0,78 (1)	1,0 (1)			Val	3	8,0	9
ТА 12	3,65 (4)	1,38 (1)	1,12 (1)	3,62 (4)		2,09 (2)	1,60 (2)		5,44 (6)	0,56 (2)		3,62 (4)			1,0 (1)	2,56 (3)		Met	30	24,3	3
ТА 13	1,25 (1)	1,25 (1)	1,50 (1)		2,0 (2)	3,25 (3)	3,0 (3)		2,60 (3)	1,0 (4)	1,25 (1)				2,0 (2)			Gly	18	14,1	6

* При аминокислотном анализе количество остатков Arg в пептидах определяли по сумме площадей пиков, соответствующих продуктам кислотного гидролиза пептида [18].

**Аминокислотные последовательности триптических пептидов
модифицированного по остаткам аргинина белка L3 ***

Пептид	Аминокислотная последовательность	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
ТА 1	Met-Ile-Gly-Leu-Val-Gly-Lys	7
ТА 2	Val-Gly-Met-Thr-Arg-Ile-Phe-Thr-Glu-Asp-Gly-Val-Ser-Ile-Pro-Val-Thr-Val-Ile-Glu-Val-Glu-Ala-Asn-Arg-Val-Thr-Gln-Val-Lys	30
ТА 3	Arg-Val-Thr-Gln-Val-Lys	6
ТА 4	Asp-Leu-Ala-Asn-Asp-Gly-Tyr-Arg-Ala-Ile-Gln-Val-Thr-Thr-Gly-Ala-Lys	17
ТА 5	Ala-Asa-Arg-Val-Thr-Lys-Pro-Glu-Ala-Gly-His-Phe-Ala-Lys	14
ТА 6	Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Gly-Arg-Gly-Leu-Trp-Glu-Phe-Arg-Leu-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe-Thr-Val-Gly-Gln-Ser-Ile-Ser-Val-Glu-Leu-Phe-Ala-Asp-Val-Lys	35
ТА 7	Lys-Val-Asp-Val-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys	9
ТА 8	Gly-Lys	2
ТА 9	Gly-Phe-Ala-Gly-Thr-Val-Lys	7
ТА 10	Arg-Trp-Asn-Phe-Arg-Thr-Gln-Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn-Ser-Leu-Ser-His-Arg-Val-Pro-Gly-Ser-Ile-Gly-Gln-Asn-MGln-Thr-Pro-Gly-Lys	31
ТА 11	Val-Phe-Lys	3
ТА 12	Met-Ala-Gly-Gln-Met-Gly-Asn-Glu-Arg-Val-Thr-Val-Gln-Ser-Leu-Asp-Val-Val-Arg-Val-Asp-Ala-Glu-Arg-Asn-Leu-Leu-Leu-Val-Lys	30
ТА 13	Gly-Ala-Val-Pro-Gly-Ala-Thr-Gly-Ser-Asp-Leu-Ile-Val-Lys-Pro-Ala-Val-Lys	18

* Здесь и далее стрелки под строкой обозначают аминокислотные последовательности, определенные методом Эдмана в модификации Р. Чена.

автоматической деградации по Эдману на секвенаторе, что позволило определить последовательность из 20 аминокислотных остатков с N-конца этого фрагмента (табл. 4). Таким образом, была определена структура триптического пептида Т 35 и одновременно получено перекрытие между фрагментами IV и V (схема 2). Как оказалось, аминокислотная последовательность пептида Т 35 включала фрагмент IV, термолитические пептиды Tr 28, Tr 13, Tr 9, Tr 32 [2] и N-концевую часть фрагмента V.

Для более точной идентификации одного из остатков серина, входящих в состав последовательности, определенной при помощи секвенатора, фрагмент ML 1 гидролизали термолизином в течение 2 ч. После разделения гидролизата при помощи высоковольтного электрофореза на бумаге был выделен пептид ML 1-3, позволивший точно идентифицировать интересующий нас остаток (табл. 5, 6) Выше говорилось о том, что фракция 10, полученная при разделении триптического гидролизата малеинированного белка, содержала чистый пептид ML 2. Он подтверждал последовательность Trp-Asn-Phe-Arg, определенную ранее на смеси триптических фрагментов модифицированного по остаткам аргинина белка L3. При исследовании пептида ML 2 методом хроматографии в тонком слое целлюлозы было обнаружено, что предварительная обработка хроматограммы нингид-

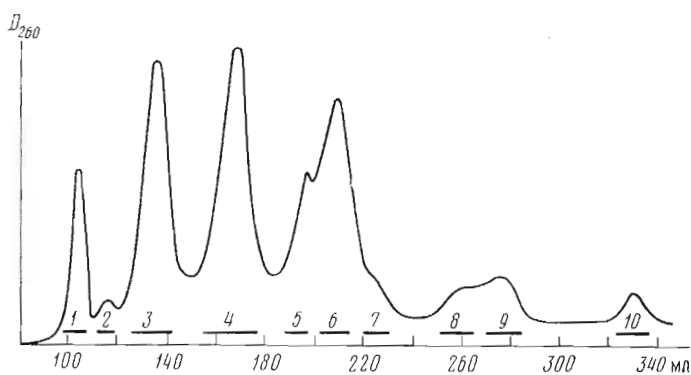


Рис. 5. Разделение триптического гидролизата модифицированного по остаткам лизина белка L3 на сефадексе G-50, уравновешенном 0,02 М бикарбонатом аммония

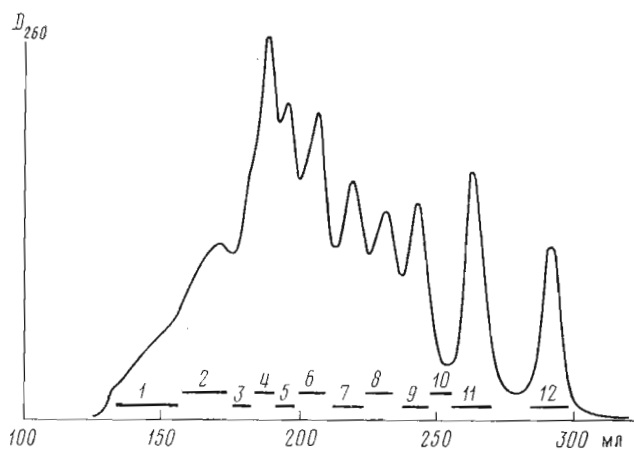


Рис. 6. Разделение химотриптического гидролизата модифицированного белка L3 на сефадексе G-50, уравновешенном 0,02 М бикарбонатом аммония

рином препятствует появлению характерной для триптофана окраски при опрыскивании пятна реактивом Эрлиха. Соответствующая окраска наблюдалась только в том случае, когда этот реактив использовали для проявления не обработанной нингидрином пластинки.

Так как фрагмент VI [2] заканчивался остатком лизина, вероятно являющимся одновременно и N-концевым остатком фрагмента VII, триптический гидролизат модифицированного по остаткам лизина белка должен был содержать пептид, несущий перекрытие между этими фрагментами. Анализ фракций, полученных в результате гель-хроматографии гидролизата на сефадексе, показал, что фракция 4 (рис. 5) представляет собой смесь двух пептидов, одним из которых, возможно, является искомым. Эту смесь пептидов без разделения гидролизовали термолизином. Из гидролизата методом высоковольтного электрофореза на бумаге был выделен пептид TrC 1 (табл. 5, 6), позволяющий соединить фрагменты VI и VII в единую полипептидную цепь (схема 2).

Из-за плохой растворимости белка L3 при pH 8,0 его гидролиз химотрипсином проводили в суспензии, что требовало значительного увеличения времени гидролиза. Это способствовало нежелательному расщеплению таких связей, как Asn-Arg, Lys-Arg. Малеинированный белок гораздо

Таблица 3

Характеристика триплических пептидов модифицированного по остаткам лизина белка L3

Пеп- тид	Аминокислотный состав													N-концевая аминокис- лота	Код-во ос- татков ами- ноацетил- в пептиде	Выход, %	Номер фран- шизы				
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe					His	Lys	Arg	Trp
ML 1	2,50 (2)	3,54 (4)	2,69 (3)	5,46 (5)		5,50 (6)	3,53 (3)	5,69 (6)		1,18 (1)	2,25 (2)		2,75 (3)		4,40 (5)	1,0 (1)		Leu	41	60,5	3
ML 2	1,0 (1)												1,17 (1)			1,0 (1)		Trp	4	10,1	10
ML 3	1,28 (1)	1,08 (1)	1,01 (1)	1,25 (1)			3,48 (4)				0,95 (1)					1,0 (1)		Val	10	20,0	7

Таблица 4

Аминокислотные последовательности триплических пептидов модифицированного по остаткам лизина рибосомного белка L3 *

Пептид	Аминокислотная последовательность
ML 1	Leu-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe-Thr-Val-Gly-Gln-Ser-Ile-Ser-Val-Gln-Leu-Phe-Ala-Asp-Val
ML 2	Lys-Lys-Val-Asp-Val-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys-Gly-Lys-Gly-Phe-Ala-Gly-Thr-Val-Lys-Arg
ML 3	Trp-Asn-Phe-Arg Val-Thr-Val-Gln-Ser-Leu-Asp-Val-Val-Arg

* Стрелки над строкой — аминокислотные последовательности, определенные автоматической тетрадацией по Эдману при помощи севенатора.

Таблица 5

Характеристика термолитических пептидов, полученных при расщеплении триптических фрагментов модифицированного по остаткам лизина белка L-3

Пептид	Аминокислотный состав														Выход, %				
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His		Lys	Arg	Trp	
ML 1-1				3,31 (3)		1,25 (1)	4,0 (1)				0,92 (1)							Leu 6	16,8
ML 1-2		1,0 (1)											0,92 (1)					Phe 2	20,2
ML 1-3			1,65 (2)	2,19 (2)		1,0 (1)		1,40 (2)		1,07 (1)	0,76 (1)							Val 9	12,3
ML 1-4	1,20 (1)													0,75 (1)				Phe 3	14,5
ML 1-5		1,02 (1)				1,26 (1)	1,0 (1)	0,66 (1)										Ala 6	8,8
TrC 1						1,0 (1)		0,50 (1)					1,0 (1)		1,05 (1)	2,44 (3)	1,0 (1)	Val 6	20,2
TrC 2						0,81 (1)	0,84 (1)	1,12 (1)										Val 4	50,0
TrC 3	1,42 (1)	4,12 (1)	1,0 (1)		0,99 (1)	2,07 (2)	1,51 (2)	0,67 (1)			0,80 (1)							Ala 10	5,0

Аминокислотные последовательности пептидов, полученных при гидролизе термолизином пептида ML-1 и смеси фрагментов (TrC), выделенной из триптического гидролизата модифицированного по остаткам лизина рибосомного белка L3

Пептид	Аминокислотная последовательность
ML 1-1	<u>Leu-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu</u>
ML 1-2	<u>Phe-Thr</u>
ML 1-3	<u>Val-Gly-Gln-Ser-Ile-Ser-Val-Glu-Leu</u>
ML 1-4	<u>Phe-Ala-Asp</u>
ML 1-5	<u>Ala-Gly-Thr-Val-Lys-Arg</u>
TrC 1	<u>Val-Phe-Lys-Gly-Lys-Lys</u>
TrC 2	<u>Val-Lys-Gly-Ala</u>
TrC 3	<u>Ala-Val-Pro-Gly-Ala-Thr-Gly-Ser-Asp-Leu</u>

лучше растворим при щелочных значениях pH, что дало возможность провести расщепление белка химотрипсином, значительно уменьшив время по сравнению с гидролизом немодифицированного белка. Это позволило избежать разрывов полипептидной цепи белка в некоторых точках и обеспечило получение более крупных фрагментов. Методом гель-фильтрации на сефадексе G-50 гидролизат разделили на 12 объединенных фракций (рис 6), которые проанализировали при помощи тонкослойной хроматографии на целлюлозе, и определили N-концевые аминокислотные остатки входящих в них пептидов. Фракция 2 содержала гомогенный пептид MCh 3, включающий перекрытие между фрагментами I и II (схема 2), фракция 11 — пептид MCh 4. Остальные представляли собой смеси нескольких пептидов и были подвергнуты высоковольтному электрофорезу на бумаге, в результате чего из фракции 4 были выделены пептиды MCh 6 и MCh 12, из фракции 8 — пептиды MCh 1, MCh 9, MCh 11, из фракции 9 — пептиды MCh 5, MCh 8, MCh 10, из фракции 12 — пептиды MCh 2 и MCh 7. Аминокислотный состав и аминокислотные последовательности выделенных пептидов представлены соответственно в табл. 7 и 8. Среди них особенно важен пептид MCh 9, подтверждающий перекрытие между фрагментами VI и VII (схема 2). При гидролизе в двух случаях оказалась нерасщепленной связь Phe-Arg, что способствовало образованию пептида MCh 5, позволяющего соединить фрагменты III, IV, а также пептида MCh 8, который вместе с MCh 7 подтверждал последовательность Trp-Asn-Phe-Arg, определенную на смеси фрагментов TA 2 и TA 10.

Для более четкого подтверждения перекрытия между фрагментами I и II [2] был осуществлен гидролиз белка L3 протеазой *Staphylococcus aureus* при pH 8,0 в течение 37 ч. Поскольку при pH 8,0 белок нерастворим, с целью получения равномерной суспензии перед началом гидролиза белок растворили в воде, подкисленной уксусной кислотой до pH 3,0, а затем постепенно довели pH до значения 8,0 раствором аммиака. Гидролизат подвергли гель-хроматографии на сефадексе G-50 при pH 9,0 (рис. 7) с последующим разделением полученных фракций методом высоковольтного электрофореза на бумаге. При этом был выделен ряд пептидов, в том числе пептид St 2, позволяющий соединить фрагменты I и II (табл. 9, 10, схема 2).

Таким образом, в результате проделанной работы получена полная аминокислотная последовательность белка L3, представленная на схеме. Полипептидная цепь состоит из 209 аминокислотных остатков и имеет следующий аминокислотный состав: Asp 9, Asn 8, Thr 16, Ser 9, Glu 12,

Характеристика химотриптических пептидов модифицированного по остаткам лизина белка L3

Пептид	Аминокислотный состав													N-Концевые аминокислоты	Кол-во остатков амин-кислот в пептиде	Выход, %	Номер фракции (рис. 7)				
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe					His	Lys	Arg	Trp
MCh 1						2,55 (3)		1,71 (2)	1,15 (2)	0,96 (1)	1,0 (1)				1,82 (2)			Met	11	4,0	8
MCh 2		1,01 (1)								0,96 (1)						1,02 (1)		Thr	4	9,3	12
MCh 3	4,82 (5)	2,30 (3)	0,90 (1)	1,07 (4)	1,25 (1)	2,70 (2)	2,28 (2)	5,14 (6)		1,81 (2)	1,24 (1)	0,30 (1)	1,0 (1)		1,50 (1)			Thr	30	50,0	2
MCh 4				1,30 (1)		2,59 (3)	2,58 (3)	1,13 (1)			1,13 (1)				0,88 (1)			Ala	12	45,0	11
MCh 5				3,78 (4)		1,28 (1)	0,98 (1)			1,04 (1)			1,71 (2)					Glu	10	11,3	9
MCh 6	1,93 (2)	1,80 (2)	0,95 (1)			3,06 (3)	1,14 (1)	3,22 (3)					1,0 (1)		3,53 (4)			Ala	17	9,0	4
MCh 7		0,99 (1)				1,41 (1)	1,06 (1)	1,12 (1)							1,10 (1)	0,98 (1)		Ala	7	16,9	12
MCh 8	2,71 (3)	1,95 (2)	1,12 (1)	1,54 (1)		1,44 (1)	1,12 (1)			1,0 (1)			0,70 (1)	0,80 (1)				Asn	13	1,8	9
MCh 9						1,65 (1)	0,75 (1)								2,50 (3)			Lys	8	5,1	8
MCh 10	1,13 (1)	1,01 (1)	3,0 (3)			2,0 (2)	1,0 (1)	1,69 (2)										Ala	12	2,1	9
MCh 11	2,58 (3)		1,43 (1)			1,30 (1)	1,30 (1)	3,08 (3)			2,08 (2)							Asp	12	5,6	8
MCh 12	1,10 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)		2,41 (2)	3,03 (3)	3,72 (4)	3,73 (4)		0,73 (1)	1,72 (2)				2,78 (3)			Leu	22	8,1	4

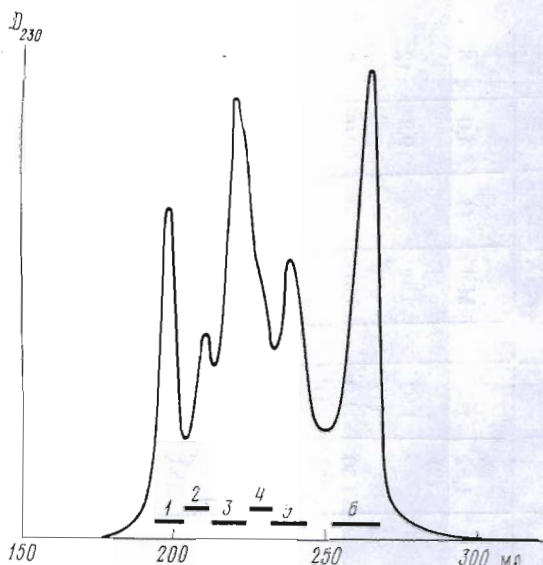


Рис. 7. Разделение пептидов, полученных при расщеплении белка L3 протеазой *Staphylococcus aureus* на сефадексе G-50, уравновешенном 0,1% раствором аммиака

Gln 7, MGln 1, Pro 6, Gly 26, Ala 19, Val 28, Met 4, Ile 8, Leu 11, Tyr 1, Phe 8, His 3, Lys 19, Trp 2, Arg 12. Молекулярный вес белка равен 22232, с чем согласуется величина 23000, определенная методом высокоскоростной равновесной седиментации [19]. Для аминокислотной последовательности белка L3 характерно попарное расположение остатков лизина друг с другом или остатком аргинина (7—8, 55—56, 105—106, 123—124, 159—160). Обнаружены также спаренные остатки таких аминокислот, как Thr (51—52), Glu (88—89), Val (177—178), в одном месте остаток Leu повторяется 3 раза (186—188). Центральная часть полипептидной цепи (участок последовательности 68—127) обогащена остатками ароматических аминокислот. Здесь находятся 6 из 8 остатков фенилаланина и оба остатка триптофана. В С-концевой части молекулы наблюдается повышенное содержание остатков гидрофобных аминокислот, таких, как Val, Leu, Ile, Ala (всего 20 остатков из 40 на участке 170—209). Одной из особенностей белка L3 является наличие остатка N⁵-метилглутамина, который входит в состав триады амидов Gln-Asp-MGln (148—150). Необходимо отметить присутствие в полипептидной цепи 10 пар одинаковых или почти одинаковых последовательностей, представленных в табл. 11. Сочетания Val-Thr и Val-Lys встречаются по 6 раз. Характерной чертой аминокислотной последовательности белка L3 являются симметрично построенные участки, приведенные в табл. 12.

Экспериментальная часть

Выделение белка L3. Рибосомы *Escherichia coli* обрабатывали 67% уксусной кислотой [20] и получали суммарный рибосомный белок, который далее разделяли при помощи ионообменной хроматографии на CM-целлюлозе (CM-32, Whatman, Англия) в условиях, описанных ранее [15]. Для очистки белка использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-100 и ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе (DE-32, Whatman, Англия) в условиях, описанных там же. Идентификацию белка и определение его чистоты проводили с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле [21].

**Аминокислотные последовательности химотриптических пептидов
модифицированного по остаткам лизина белка L3**

Пептид	Аминокислотная последовательность
MCh 1	Met-Ile-Gly-Leu-Val-Gly-Lys-Lys-Val-Gly-Met
MCh 2	Thr-Arg-Ile-Phe
MCh 3	Thr-Glu-Asp-Gly-Val-Ser-Ile-Pro-Val-Thr-Val-Ile-Glu-Val-Glu-Ala-Asn-Arg-Val-Thr-Gln-Val-Lys-Asp-Leu-Ala-Asn-Asp-Gly-Tyr
MCh 4	Ala-Lys-Ala-Gly-Val-Glu-Ala-Gly-Arg-Gly-Leu-Trp
MCh 5	<u>Glu-Phe-Arg-Leu-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu-Phe</u>
MCh 6	<u>Ala-Asp-Val-Lys-Lys-Val-Asp-Val-Thr-Gly-Thr-Ser-Lys-Gly-Lys-Gly-Phe</u>
MCh 7	<u>Ala-Gly-Thr-Val-Lys-Arg-Trp</u>
MCh 8	<u>Asn-Phe-Arg-Thr-Gln-Asp-Ala-Thr-His-Gly-Asn-Ser-Leu</u>
MCh 9	<u>Lys-Gly-Lys-Lys-Met-Ala-Gly-Gln</u>
MCh 10	Ala-Gly-Gln-Met-Gly-Asn-Glu-Arg-Val-Thr-Val-Gln
MCh 11	Asp-Val-Val-Arg-Val-Asp-Ala-Glu-Arg-Asn-Leu-Leu
MCh 12	Leu-Val-Lys-Gly-Ala-Val-Pro-Gly-Ala-Thr-Gly-Ser-Asp-Leu-Ile-Val-Lys-Pro-Ala-Val-Lys-Ala

Модификация аргининовых остатков рибосомного белка L3 малоновым диальдегидом [18]. К 2 мл концентрированной соляной кислоты при 4° и постоянном перемешивании прибавляли 20 мг (~0,9 мкмоль) лиофилизованного белка. К раствору белка прибавляли 175 мкл (460 мкмоль) малонового диальдегида в виде тетраэтоксипропана (50-кратный мольный избыток по отношению к общему количеству аргинина в белке). Реакцию проводили в описанных условиях [18]. Реакционную смесь диализовали 3 раза против 2 л аммиачного раствора (рН 9,3), содержащего 6 М мочевины, затем 4 раза против этого же раствора, но без мочевины. Общее время диализа 24 ч. Полученную суспензию лиофилизовали.

Модификацию лизиновых остатков рибосомного белка L3 малеиновым ангидридом (25 мг белка) проводили в стандартных условиях [22]. Модифицированный белок обессоливали гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (колонка 2,5×60 см), уравновешенном 0,5% NH₄HCO₃ (рН 8,0), после чего белок лиофилизовали.

Ферментативные гидролизы. Ограниченный гидролиз трипсином по остаткам лизина (20 мг белка) проводили при 37°, рН 7,9, в 0,2 М NH₄HCO₃ в течение 24 ч. Соотношение фрагмент — субстрат 1 : 50 (по весу). Осадок, выпавший во время гидролиза, отделяли от растворимой части центрифугированием при 6000 об/мин на центрифуге К-23 (Janetzkі, ГДР) в течение 10 мин. Растворимую часть лиофилизовали.

Ограниченный гидролиз трипсином по остаткам аргинина (25 мг белка) проводили в тех же условиях в течение 12 ч.

Гидролиз химотрипсином малеинированного белка (25 мг) проводили при 37°, рН 8,0 в 0,2 М NH₄HCO₃ в течение 3 ч при соотношении фермент — субстрат 1 : 100 (по весу). По окончании гидролиза смесь подкисляли ледяной уксусной кислотой до рН 3,0 и лиофилизовали.

Расщепление термолизинном фрагментов ограниченного гидролиза трипсином по аргинину осуществляли в тех же условиях, что и гидролиз химотрипсином, но в течение 2 ч.

При гидролизе протеазой *St. aureus* V8 (Miles laboratories, Англия) белок (20 мг) сначала растворяли в 6 мл воды, подкисленной уксусной кислотой до рН 3,0, затем раствором аммиака доводили рН до значения 8,0. При этом образовывалась равномерная суспензия. Гидролиз про-

Таблица 9

Характеристика пептидов, полученных в результате гидролиза белка L3 протеазой *Staphylococcus aureus*

Пептид	Аминокислотный состав														N-Концевая аминокислота	Код-в-ос-татов ами-нонислот в пептиде	Выход, %	Номер фрак-ции (рис. 8)			
	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His					Lys	Arg	Trp
St 1				1,40 (1)				1,0 (1)										Val	2	18,0	6
St 2	1,80 (2)	1,0 (1)		1,20 (1)			1,06 (1)	1,93 (2)							1,06 (1)	0,93 (1)		Ala	9	5,9	3
St 3				1,34 (1)			1,60 (2)	1,38 (1)					1,0 (1)	1,42 (1)	0,90 (1)			Ala	10	29,6	3
St 4				1,25 (1)			1,56 (2)	1,06 (1)			1,0 (1)					1,21 (1)		Ala	7	13,1	6
St 5				1,62 (2)			0,87 (1)	1,25 (1)			1,25 (1)		1,0 (1)			1,25 (1)		Phe	7	3,9	6
St 6			2,0 (2)	2,50 (2)			1,25 (1)	1,50 (1)					0,60 (1)					Phe	10	1,8	1
St 7	1,25 (1)	1,42 (1)	0,90 (1)	1,49 (1)			2,16 (2)	2,16 (2)			4,14 (1)					4,0 (1)		Arg	8	6,0	3
St 8	1,17 (1)			1,32 (1)			1,26 (1)	2,57 (3)								1,0 (1)		Val	7	12,5	1

Таблица 10

Аминокислотные последовательности пептидов,
полученных при гидролизе белка L3 протеазой
Staphylococcus aureus

Пептид	Аминокислотная последовательность
St 1	Val-Glu
St 2	<u>Ala-Asn-Arg-Val-Thr-Gln-Val-Lys-Asp</u>
St 3	<u>Ala-Gly-His-Phe-Ala-Lys-Ala-Gly-Val-Glu</u>
St 4	Ala-Gly-Arg-Gly-Leu-Trp-Glu
St 5	<u>Phe-Arg-Leu-Ala-Glu-Gly-Glu</u>
St 6	<u>Phe-Thr-Val-Gly-Gln-Ser-Ile-Ser-Val-Glu</u>
St 7	Arg-Val-Thr-Val-Gln-Ser-Leu-Asp
St 8	<u>Val-Val-Arg-Val-Asp-Ala-Glu</u>

Таблица 11

Участки аминокислотной последовательности белка L3,
повторяющиеся в полипептидной цепи 2 и более раз

Аминокислотная последовательность	Положение в полипептидной цепи согласно общей нумерации остатков
Gly-Lys-Lys	6-8, 158-160
Lys-Lys-Val	7-10, 105-107
Val-Thr-Val	24-26, 170-172
Ala-Asn-Arg-Val-Thr	31-35, 57-61
Arg-Val-Thr	33-35, 59-61, 169-171
Glu-Ala-Gly	64-66, 74-76
{ Trp-Glu-Phe-Arg	80-83
{ Trp-Asn-Phe-Arg	125-128
Lys-Gly-Lys	114-116, 157-159
Val-Pro-Gly	142-144, 193-195
{ Leu-Leu-Val-Lys	187-190
{ Leu-Ile-Val-Lys	201-204

Таблица 12

Симметрично построенные участки полипептидной цепи
белка L3

Аминокислотная последовательность	Положение в полипептидной цепи согласно общей нумерации остатков
Val-Thr-Val	24-26, 170-172
Glu-Val-Glu	28-30
Ala-Lys-Lys-Ala	54-57
Ala-Lys-Ala	69-71
Gly-Arg-Gly	76-78
Glu-Gly-Glu	86-88
Ser-Ile-Ser	95-97
Asp-Val-Lys-Lys-Val-Asp	103-108
Thr-Gly-Thr	110-112
Lys-Gly-Lys	114-116, 157-159
Gly-Lys-Gly	115-117
Ser-Leu-Ser	137-139
Val-Arg-Val	178-180

водили при 37° в течение 35 ч при соотношении фермент — субстрат 1 : 30. По окончании гидролиза смесь лиофилизovali.

Выделение пептидов. Для разделения ферментативных гидролизатов использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-50 superfine (Pharmacia, Швеция), колонка 1,5×200 см, скорость элюции 5 мл/ч, объем фракции 2 мл. При необходимости обессоливание фракций проводили на сефадексе G-25 fine (Pharmacia, Швеция), уравновешенном 0,1% раствором аммиака (рН 9,0). Объединенные фракции упаривали на роторном испарителе до объема 3—4 мл и хранили при пониженной температуре. Для разделения растворимой при щелочных значениях рН части триптического гидролизата модифицированного по остаткам аргинина белка L3 сефадекс уравновешивали раствором 6 М мочевины в 0,01% NH_4HCO_3 , в случае нерастворимой части использовали раствор 40% уксусной кислоты. Гель-фильтрацию триптического и химотриптического гидролизатов маленированного белка проводили на сефадексе G-50, уравновешенном 0,02 М NH_4HCO_3 . Разделение гидролизата, полученного при расщеплении белка протеазой *St. aureus*, осуществляли в 0,1% растворе аммиака (рН 10,3).

Для ТСХ использовали целлюлозу марки Whatman № 300, пластинки 9,4×8,4 см. ТСХ пептидов проводили в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (1 : 1 : 1 : 0,18), рН 5,4. Пептиды обнаруживали опрыскиванием пластин 0,4% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием до 40°. Для обнаружения Trp-содержащих пептидов пластинки опрыскивали реактивом Эрлиха [23].

Препаративное разделение смесей пептидов на бумаге проводили методом высоковольтного электрофореза при рН 3,5, напряжении 4000 В (70 В/см), в системе пиридин — уксусная кислота — вода (1 : 10 : 89) в течение 45 мин. Пептиды обнаруживали при помощи нингидрина и элюировали с бумаги 10% уксусной кислотой или 1% аммиаком.

Аминокислотный анализ. Пробы пептидов (5 нмоль) гидролизovali 5,6 н. HCl в течение 24 ч при 110° в вакуумированных ампулах. Для кислотного гидролиза тиазолинонов аминокислот этилацетатные экстракты, полученные при деградации пептидов ручным методом, высушивали в токе азота, добавляли 50 мкл 5,6 н. HCl и инкубировали в вакуумированных ампулах в течение 24 ч при 135°. Аминокислотный анализ гидролизатов проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

Определение аминокислотных последовательностей пептидов. Для определения аминокислотных последовательностей пептидов методом Эдмана в модификации Р. Чена [24] 5—10 нмоль пептида высушивали в стеклянной пробирке, растворяли в 50 мкл воды, добавляли 50 мкл 5% раствора фенилизотиоцианата в пиридине и термостатировали в атмосфере азота при 45° в течение 1 ч. После этого образец высушивали 30 мин при 60° в вакууме. К остатку добавляли 100 мкл трифторуксусной кислоты и выдерживали 30 мин при 45° в атмосфере азота, после чего образец опять высушивали 15 мин при 60° в вакууме, растворяли в 50 мкл воды и экстрагировали 3 раза по 200 мкл этилацетатом. Экстракты объединяли и хранили при —10°. Из водной фазы отбирали аликвоту для определения N-концевого аминокислотного остатка дансильным методом.

Определение аминокислотной последовательности пептида МЛ 3 проводили автоматической деградацией по Эдману на секвенаторе фирмы Beckman (США), модель 890 С, используя диметилаллиламинную программу. Идентификацию Pth-производных аминокислот осуществляли с помощью ТСХ на пластинках 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля, методом газовой хроматографии на хроматографе Hewlett-Packard (США) (носитель SP-400), а также аминокислотным анализом их кислотных гидролизатов.

Определение N-концевых аминокислотных остатков. 2—5 нмоль сухого пептида растворяли в 10—20 мкл 0,1 н. раствора NaHCO_3 , прибавляли

10–20 мкл раствора дансилхлорида в ацетоне (3 мг/мл) и инкубировали 30 мин при 45°. К остатку добавляли 20 мкл 5,6 н. HCl и гидролизовали 4 ч при 110° в вакуумированных ампулах. Идентификацию Dns-производных аминокислот проводили методом двумерной ТСХ на пластинках 6×6 см с закрепленным слоем силикагеля [25, 26]. Перед нанесением на пластинку высушенный гидролизат растворяли в 10 мкл абсолютного ацетона.

Определение амидов и триптофана. Этилацетатные экстракты, полученные при деградации пептидов ручным методом и содержащие тиазолиноны отщепленных аминокислот, высушивали в токе азота, к остатку добавляли 200 мкл 1 н. HCl и инкубировали 5 мин при 80°. Затем полученные Pth-производные аминокислот экстрагировали из водной фазы 3 раза по 200 мкл этилацетата и идентифицировали ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля. Системы для ТСХ: хлороформ (2 раза); хлороформ — метанол (9 : 1); хлороформ — уксусная кислота (8 : 2). Пластинки опрыскивали 1% раствором нингидрина в абсолютном этаноле, содержащем коллидин (95 : 5), и термостатировали при 110° в течение 3 мин.

Синтез N⁵-метилглутамин проводили по методу Н. Лихтенштейна [17] из L(+)-глутаминовой кислоты и метиламина. Pth-производное N⁵-метилглутамин получали так же, как и Pth-производные аминокислот при определении последовательностей пептидов, для ТСХ на силикагеле использовали те же системы.

Авторы выражают глубокую благодарность Т. Г. Муравьевой за работу суммарного рибосомного белка, Л. А. Кривошевой за помощь при выделении белка L3, Л. П. Волюшкиной за выполнение двумерного электрофореза в полиакриламидном геле и Л. М. Винокурову за определение N-концевой аминокислотной последовательности одного из фрагментов с помощью секвенсатора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муранов А. В., Муранова Т. А., Маркова Л. Ф. (1978) Биоорган. химия, **4**, 293–301.
2. Муранова Т. А., Муранов А. В., Маркова Л. Ф. (1978) Биоорган. химия, **4**, 1197–1212.
3. Muranova T. A., Muranov A. V., Markova L. F., Ovchinnikov Yu. A. (1978) FEBS Lett., **96**, 301–305.
4. Dovgas N. V., Markova L. F., Mednikova T. A., Vinokurov L. M., Alakhov Yu. B., Ovchinnikov Yu. A. (1975) FEBS Lett., **53**, 351–354.
5. Dovgas N. V., Vinokurov L. M., Velmoga I. S., Alakhov Yu. B., Ovchinnikov Yu. A. (1976) FEBS Lett., **67**, 58–61.
6. Винокуров Л. М., Алахов Ю. Б., Голов Е. А., Овчинников Ю. А. (1976) Биоорган. химия, **2**, 1013–1017.
7. Garrett R. A., Müller S., Spierer P., Zimmermann R. A. (1974) J. Mol. Biol., **68**, 553–557.
8. Spierer P., Zimmermann R. A., Mackie G. A. (1975) Eur. J. Biochem., **52**, 459–468.
9. Chen-Schmeisser U., Garrett R. (1976) Eur. J. Biochem., **69**, 401–410.
10. Giri L., Tam M. F., Hill W. E. (1976) Biochemistry, **15**, 5188–5192.
11. Fabian U. (1976) FEBS Lett., **71**, 256–260.
12. Stöffler G., Wittmann H. G. (1977) in: Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Weissbach H., Pestka S., eds), pp. 181, 182, Acad. Press, New York — San Francisco — London.
13. Chang C. N., Chang F. N. (1975) Biochemistry, **14**, 468–477.
14. Lhoest J., Colson Ch. (1977) Molec. gen. Genet., **154**, 175–180.
15. Алахов Ю. Б., Медникова Т. А., Могуз Л. П., Маркова Л. Ф., Довгас Н. В., Кашаров И. А., Овчинников Ю. А. (1975) Биоорган. химия, **1**, 581–587.
16. Kaltschmidt E. (1971) Anal. Biochem., **43**, 25–31.
17. Lichtenstein N. (1942) J. Amer. Chem. Soc., **64**, 1021–1022.
18. Муранов А. В., Модянов Н. Н. (1978) Биоорган. химия, **5**, 210–216.
19. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **67**, 1909–1913.
20. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1972) Biochemie, **54**, 167–175.
21. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) Anal. Biochem., **36**, 401–412.

22. Butler P. I. G., Hartley B. S. (1972) in: *Methods in Enzymology*, vol. XXV, p. 191, Acad. Press, New York — London.
23. Reddi K. K., Kodicek E. (1953) *Biochem. J.*, 53, 286.
24. Chen R. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 873—886.
25. Белевский Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) *Докл. АН СССР*, 172, 91—93.
26. Белевский Б. Г., Ганкина Э. С., Прявишников С. Р., Эрастов Д. П. (1967) *Молекулярн. биология*, 1, 184—189.

Поступила в редакцию
1. II. 1979

RIBOSOMAL PROTEIN L3. III. COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF PROTEIN L3 OF *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES

MURANOV A. V., MURANOVA T. A., MARKOVA L. F., OVCHINNIKOV Yu. A.

Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

The complete amino acid sequence of protein L3 of *Escherichia coli* ribosomes is determined. The polypeptide chain (molecular weight 22 232) consists of 209 amino acid residues, position 150 being occupied by the residue of methylated amino acid, N⁵-methylglutamine. For structural studies, the protein was hydrolyzed by trypsin, chymotrypsin, thermolysin and *Staphylococcus aureus* protease. It was also subjected to limited hydrolysis by trypsin at lysine residues after modification with malonic dialdehyde and to limited hydrolysis by trypsin at arginine residues after modification with maleic anhydride. The maleylated protein was hydrolyzed by chymotrypsin, some tryptic fragments of maleylated protein were hydrolyzed by thermolysin.
