



УДК 577.112.5:577.152.361\*3'13

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  
ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДСВЯЗЫВАЮЩЕЙ  
СУБЪЕДИНИЦЫ  $H^+$ -АТФ-азы *STREPTOCOCCUS FAECALIS*

Кочергинская С. А., Шахнаров М. И., Алданова Н. А.,  
Модянов Н. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Установлена полная аминокислотная последовательность дициклогексилкарбодимид (DCC)-связывающей субъединицы протонной аденозинтрифосфатазы гликолизирующей бактерии *Streptococcus faecalis*. Белок из суббактериальных частиц выделяли экстракцией смесью хлороформа и метанола с последующей очисткой гелефильтрацией на сефадексе LH-60 и биогеле Р-30. При установлении первичной структуры использовано расщепление бромцианом, гидроксиламином, гидролиз трипсином и частичный кислотный гидролиз. Смесью фрагментов разделяли гелефильтрацией на биогеле Р-10 и высокоэффективной жидкостной хроматографией на обращенной фазе. Строение пептидов определено главным образом с использованием 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата. Полипептидная цепь белка ( $M_r$  7291) состоит из 71 аминокислотного остатка, обладает всеми характерными особенностями структурной организации аналогичных субъединиц других  $H^+$ -АТФ-аз и проявляет наибольшую степень гомологии с соответствующей субъединицей термофильной бактерии PS-3. Инактивация  $H^+$ -АТФ-азы DCC обусловлена модификацией остатка Glu<sup>94</sup> полипептидной цепи белка.

Центральную роль в трансформации энергии в мембранах бактерий, митохондрий и хлоропластов играют протонные аденозинтрифосфатазы — обратимые электрогенные протонные насосы, которые создают на мембранах электрохимический градиент ионов водорода или синтезируют АТФ за счет энергии этого градиента. Молекулы этих ферментов имеют весьма сложную структурную организацию. Они состоят из двух основных компонентов: водорастворимой каталитической части (фактор  $F_1$ ) и внутримембранного сектора (фактор  $F_0$ ). Фактор  $F_1$ , расположенный на внутренней стороне цитоплазматической мембраны бактерий, непосредственно осуществляет гидролиз или синтез АТФ. Роль фактора  $F_0$  заключается в создании трансмембранного протонпроводящего канала.  $H^+$ -АТФ-азы ингибируются N,N'-дициклогексилкарбодимидом, подавляющим протонную проводимость мембранной части. Мишенью действия DCC является олигомер главного компонента фактора  $F_0$  — относительно низкомолекулярной ( $M_r$  8000) гидрофобной субъединицы, непосредственно участвующей в транслокации протонов [1—3].

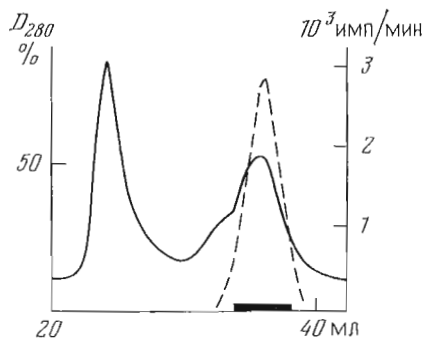
В настоящее время определена первичная структура DCC-связывающих субъединиц нескольких  $H^+$ -АТФ-аз и обнаружена выраженная гомология как в общем характере организации полипептидных цепей этих белков, так и в положениях некоторых консервативных аминокислотных остатков [2, 4]. Информация, полученная при сравнительном анализе структур DCC-связывающих субъединиц, выделенных из различных филогенетически далеких видов, открывает путь к выяснению принципов функционирования и пространственной организации одного из простейших белковых протонных каналов.

Ранее нами была опубликована аминокислотная последовательность DCC-связывающей субъединицы  $H^+$ -АТФ-азы гликолизирующей бактерии *Streptococcus faecalis* (КФ 3.6.1.3) [5]. Настоящее сообщение посвящено детальному изложению отдельных этапов исследования.

При определенных условиях DCC-связывающая субъединица  $H^+$ -АТФ-азы способна растворяться в органических растворителях (по-

Принятые сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид.

Рис. 1. Выделение ДСС-связывающего белка на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте. Черными прямоугольниками на оси абсцисс здесь и далее обозначены границы объединения фракций. Сплошная линия — поглощение при 280 нм, пунктирная — радиоактивность. Колонка 1,5×100 см, скорость элюирования 2,5 мл/ч



этому ее обычно называют протеолипидом). Эта особенность белка, а также возможность введения в него с помощью [<sup>14</sup>C]DCC специфической радиоактивной метки позволили разработать методику выделения белка из полного АТР-азного комплекса и бактериальных мембранных препаратов. Первоначально ДСС-связывающая субъединица *S. faecalis* была получена путем экстракции нейтральной смесью хлороформа и метанола (2:1) из полного, предварительно модифицированного [<sup>14</sup>C]DCC АТР-азного комплекса, выделенного по методу [6]. Гомогенность препарата была доказана с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и анализом N-концевой аминокислотной последовательности. Как и в случае других бактериальных протеолипидов, N-концевым остатком белка является формилметионин, обнаруживаемый в виде метионина после обработки белка раствором HCl в метаноле [7].

В структурных исследованиях был использован препарат белка, выделенный аналогичной экстракцией непосредственно из суббактериальных частиц *S. faecalis* по методике Филлингейма [8]. В отличие от всех ранее изученных объектов полученный экстракт *S. faecalis* содержал не один, а два протеолипида примерно в равных количествах. Попытки разделения этих белков ионообменной хроматографией в органических растворителях не увенчались успехом. Гомогенные препараты ДСС-связывающего белка удалось получить последовательной гель-фильтрацией на сефадексе LH-60 в смеси хлороформ — метанол — бензол — H<sub>2</sub>O (45,75:45,75:1:7,5) и на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте (рис. 1).

Чрезвычайно низкая растворимость ДСС-связывающей субъединицы *S. faecalis* в водных растворах и водно-органических смесях резко ограничила выбор методов первоначальной фрагментации ее полипептидной цепи. Основная информация о структуре была получена при анализе продуктов химического расщепления белка, в первую очередь расщепления бромцианом по остаткам метионина.

По данным аминокислотного анализа (табл. 1), белок содержит пять остатков метионина, в том числе N-концевой формилметионин. Следовательно, в результате действия бромциана должно было образоваться пять фрагментов и формилгомосерин. Расщепление белка бромцианом проводили в стандартных условиях. Исходная смесь бромциановых пептидов первоначально была разделена гель-фильтрацией на биогеле Р-10 в 80% муравьиной кислоте. Фракции, содержащие пептидный материал, были охарактеризованы определением N-концевых аминокислотных остатков и объединены (рис. 2). Радиоактивная метка была обнаружена только во фракции В-1.

Фракции В-I и В-III содержали индивидуальные пептиды, фракции В-II и В-IV представляли собой смеси двух пептидов, которые удалось разделить благодаря их различной гидрофобности дробным осаждением из 80% муравьиной кислоты; при добавлении воды (концентрация HCOOH менее 10%) пептиды В-II-2 и В-IV-2 оставались в растворе, а пептиды В-II-1 и В-IV-1 выпадали в осадок и были отделены центрифугированием.

С помощью аминокислотного анализа кислотного гидролизата фракции В-V был обнаружен только гомосерин; масс-спектрометрически в этой фракции был идентифицирован формилгомосерин, что подтвердило сде-

Аминокислотный состав DCC-связывающей субъединицы *S. faecalis* и пептидов, полученных при расщеплении белка бромцианом (В) и гидроксиламинном (N) В скобках указаны величины, полученные на основании определения аминокислотной последовательности

Аминокислота	Белок	В-I	В-II-1	В-II-2	В-III	В-IV-1	В-IV-2	N-I	N-II
Met	4,26(5)	—	—	0,11	—	—	—	2,35(3)	1,62(2)
Asp	2,06(2)	—	1,0(1)	—	—	1,21(1)	—	—	2,29(2)
Thr	3,16(3)	—	0,86(1)	1,73(2)	1,74(2)	—	—	3,08(3)	—
Ser	2,11(2)	—	1,55(1)	0,93(1)	0,95(1)	—	—	1,74(2)	—
Hse	—	—	0,60(1)	1,33(2)	0,65(1)	0,60(1)	0,58(1)	—	—
Glu	5,84(6)	1,08(1)	1,99(2)	2,88(3)	1,05(1)	—	1,98(2)	6,34(6)	—
Pro	2,05(2)	0,92(1)	—	1,08(1)	—	—	1,07(1)	1,95(2)	—
Gly	8,85(9)	2,01(2)	5,10(6)	1,10(1)	1,09(1)	—	—	5,25(5)	4,09(4)
Ala	11,61(12)	3,65(4)	2,95(3)	1,12(1)	—	3,72(4)	1,05(1)	5,16(5)	6,57(7)
Val	6,35(8)	6,93(7)	0,80(1)	—	—	—	—	7,58(8)	—
Ile	9,20(10)	3,29(4)	2,4(3)	—	—	2,51(3)	—	5,76(6)	3,73(4)
Leu	5,17(5)	3,78(4)	—	0,96(1)	1,03(1)	—	—	5,02(5)	—
Tyr	1,58(2)	—	0,74(1)	—	—	0,80(1)	—	—	1,82(2)
Phe	2,11(2)	1,74(2)	—	—	—	—	—	1,62(2)	—
Lys	1,14(1)	—	0,96(1)	—	—	—	—	0,90(1)	—
Arg	1,79(2)	—	—	2,06(2)	1,02(1)	—	1,03(1)	2,14(2)	—
Число остатков	71	25	21	14	8	10	6	50	21
N-Концевая аминокислота	Form-Met	Phe	Gly	Ala	Ser	Asp	Ala	Gly	Form-Met

Таблица 2

## Аминокислотная последовательность пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность
В-II-2	Ala-Arg-Gln-Pro-Glu-Met-Ser-Gly-(Glu, Leu, Arg, Thr <sub>2</sub> )-Hse
В-III	Ser-Gly-Gln-Leu-Arg-Thr-Thr-Hse
В-IV-1	Asn-Tyr-Ile-Ala-Ala-Ala-Ile-Ala-Ile-Hse
В-IV-2	Ala-Arg-Gln-Pro-Glu-Hse

данное ранее предположение о формилировании в белке аминогруппы N-концевого остатка метионина.

Результаты аминокислотного анализа выделенных бромциановых пептидов приведены в табл. 1.

Аминокислотная последовательность короткого гидрофобного и относительно гидрофильных пептидов (табл. 2) определялась методом Эдмана в дансильном варианте [9, 10]. Остатки дикарбоновых кислот и их амиды были идентифицированы в виде фенилтиогидантоинов [11].

Пептид В-II-2, судя по аминокислотному составу и частичной аминокислотной последовательности, представлял собой сумму пептидов В-III и В-IV-2. Он образовался с пезначительным выходом в результате неполного расщепления связи Met-Ser.

Для изучения структуры крупных гидрофобных фрагментов, низкая растворимость которых ограничивала применение классического метода Эдмана, была применена и оказалась очень эффективной его новая модификация [12] с использованием цветного производного фенилизотиоцианата — 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата (ДАВИТС).

Пептид В-II-1. Gly-Ala-Ala-Ile-Gly-Ala-Gly-Tyr-Gly-Asn-Gly-Gln-Val-Ile-Ser-Lys-Thr-Ile-Glu-Gly-Hse

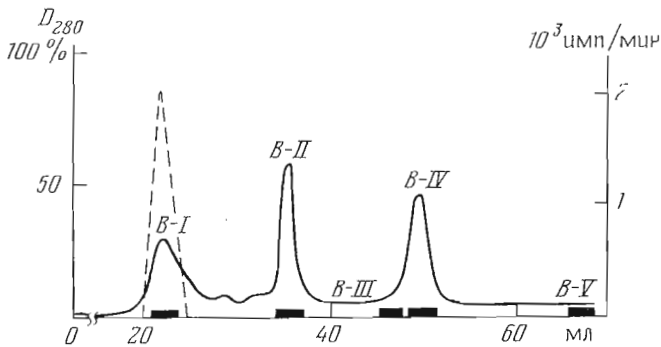


Рис. 2. Разделение бромциановых пептидов DCC-связывающего белка на биогеле P-10 в 80% муравьиной кислоте. Колонка 1×100 см, скорость элюирования 1,2 мл/ч

Последовательность 15 аминокислотных остатков найдена деградацией по методу [12]. С-Концевая последовательность была определена при анализе фрагмента *N-I*, полученного при расщеплении белка по связи Asn-Gly, локализованной в этом пептиде (см. ниже).

*Пептид-B-I.* Phe-ile-Gly-Val-Ala-Leu-Val-Glu-Ala-Val-Pro-Ile-Leu-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Leu-Ile-Leu-Val-Phe-Ala-Val.

Деградацией по указанному выше методу была определена частичная последовательность (15 аминокислотных остатков) этого пептида. При этом было показано, что вся радиоактивная метка, обусловленная модификацией пептида [ $^{14}\text{C}$ ]DCC, отщепляется на восьмой стадии деградации. Таким образом, DCC взаимодействует с единственным в пептиде *B-I* остатком глутаминовой кислоты.

Определение полной аминокислотной последовательности чрезвычайно гидрофобного 25-членного пептида *B-I* вызвало наибольшие затруднения. Пептид вследствие его исключительно низкой растворимости даже в присутствии детергентов и в водно-органических смесях не подвергался гидролизу ни одним из использованных ферментов (химотрипсин, протеиназа из *St. aureus*, термоллизин). Только пепсин в 10% муравьиной кислоте (pH ~2,0) вызывал частичное расщепление пептида *B-I* по связям Gly<sup>3</sup>-Val<sup>4</sup> и Leu<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>, которое протекало с незначительным выходом и не давало новой информации о его структуре.

Отсутствие остатка гомосерина в аминокислотном составе пептида *B-I* позволило предположить, что он является С-концевым пептидом DCC-связывающего белка. Как белок, так и пептид *B-I* были абсолютно устойчивы к действию карбоксипептидаз А, В и У. Поэтому их С-концевой аминокислотный остаток (Val) был определен методом гидразинолиза по Акабори [13].

Попытки иммобилизации пептида *B-I* на аминопропилстекле карбодимидным методом для установления его структуры на твердофазном секвенаторе также не увенчались успехом из-за его низкой растворимости. Аналогичные трудности были отмечены ранее при изучении структуры гидрофобных пептидов из DCC-связывающих белков других источников [14, 15].

Для получения информации, необходимой для установления аминокислотной последовательности С-концевого участка пептида *B-I*, нами был использован метод ограниченного кислотного гидролиза. Традиционные условия гидролиза (5,7 н. HCl, 100°С, >30 мин) [16] оказались неэффективными, поскольку в этих условиях основная масса пептидного материала выпадала в осадок и практически не подвергалась гидролизу. В результате серии экспериментов были найдены оптимальные условия ограниченного кислотного гидролиза, при которых пептид оставался в растворе, и, следовательно, выход продуктов гидролиза был существенно выше: 98% HCOOH — 12 н. HCl (1:1), 110°С. Экспозиция в течение 30 мин оказалась достаточной для получения набора всех фрагментов, необходимых

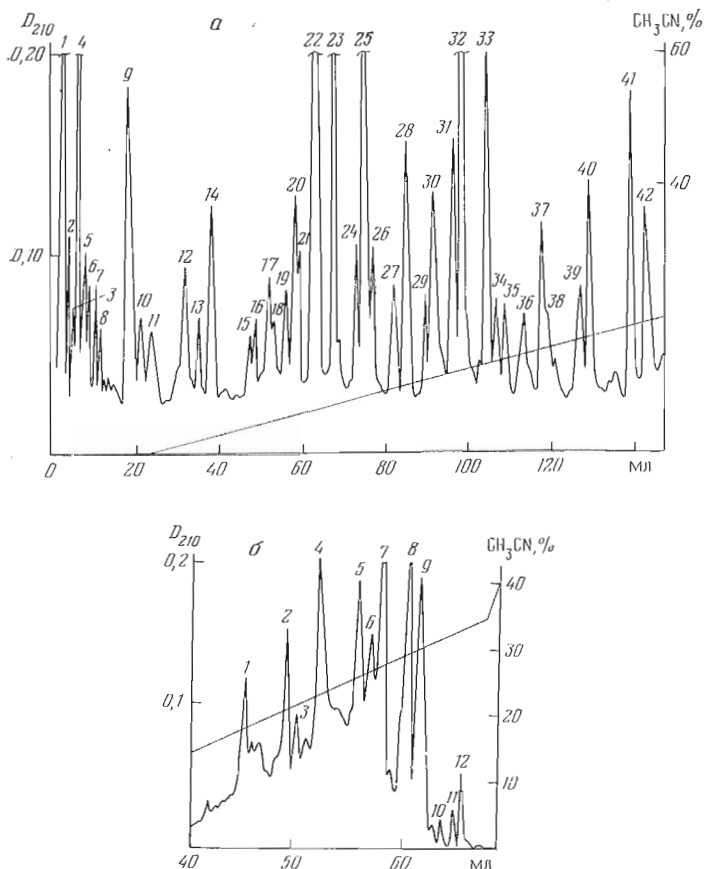


Рис. 3. Разделение фрагментов ограниченного кислотного гидролиза бромцианового пептида B-I: *a* – хроматография пептидов, растворимых в стартовом буфере (0,01 M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH 5,65) на колонке Zorbax ODS в градиенте ацетонитрила (0–35%); *б* – хроматографии пептидов из осадка на колонке Zorbax C8, уравновешенной 0,1% трифторуксусной кислотой в градиенте ацетонитрила (0–50%)

для реконструкции полной аминокислотной последовательности пептида B-I.

Полученную смесь пептидов разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе. Пептиды, составившие первую группу, были растворимы в стартовом 0,01 M аммоний-ацетатном буфере, pH 5,65, и подвергались хроматографии на колонке Zorbax ODS в том же буфере с градиентом концентрации ацетонитрила. Пептиды второй группы, нерастворимые в стартовом буфере, разделяли на колонке Zorbax C8 в 0,1% трифторуксусной кислоте с градиентом концентрации ацетонитрила (рис. 3а и б). В общей сложности было проанализировано более 50 фракций, которые содержали пептидные фрагменты длиной от одного до семи аминокислотных остатков. Их структура была установлена деградацией по методу Эдмана в дансильном варианте. Схема определения полной аминокислотной последовательности пептида B-I представлена на рис. 4. На ней приведены только те фрагменты, которые были необходимы для установления полной структуры пептида B-I.

Таким образом, были выделены все бромциановые пептиды, установлена полная структура пяти пептидов и частичная — одного.

Схема реконструкции полипептидной цепи белка представлена на рис. 5. Анализ N-концевой последовательности деформированного образца белка, иммобилизованного по  $\epsilon$ -аминогруппе остатка лизина [17], на твердофазном секвенаторе позволил объединить в один блок бромциановые фрагменты B-V, B-IV-1 и B-II-1.



аминокислотные остатки. К ним относятся: Arg<sup>34</sup> (единственный основной консервативный остаток), Gln<sup>35</sup>, Pro<sup>36</sup> из центральной полярной области, Ala<sup>51</sup>, Glu<sup>54</sup> (единственный кислый консервативный остаток), Ala<sup>55</sup>, Phe<sup>68</sup> в С-концевом гидрофобном фрагменте, а также локализованные в N-концевом гидрофобном фрагменте остатки Gly в положениях 16, 18, 20 и 31. Наибольшую степень гомологии этот белок проявляет с соответствующей субъединицей из H<sup>+</sup>-АТФ-азы термофильной бактерии PS-3 (ср. [15])—41 положение в полипептидной цепи занято идентичными остатками. Гомология с другими протеолипидами в N- и С-концевой областях белка отсутствует; по-видимому, эти участки могут отражать видовую специфичность белков либо они не являются функционально важными.

В установленной аминокислотной последовательности ДСС-связывающей субъединицы *S. faecalis* наблюдается характерная для всех ранее изученных протеолипидов кластеризация гидрофильных и гидрофобных остатков аминокислот в определенных участках полипептидной цепи. N-Концевой участок белка вплоть до остатка Ile<sup>25</sup> является очень гидрофобным и содержит лишь три незаряженных полярных аминокислотных остатка. Второй гидрофобный участок, содержащий 26 аминокислот, образует С-концевую область белка (положения 46—71). В середине этого фрагмента локализован функционально важный остаток Glu<sup>54</sup>, который является мишенью действия ингибитора (ДСС). В 20-членном центральном фрагменте белка сконцентрированы 12 гидрофильных остатков.

Особенности структурной организации всех ДСС-связывающих белков (высокая степень гомологии, кластеризация гидрофобных и гидрофильных остатков) позволяют предположить вполне определенную укладку полипептидной цепи внутри мембраны: гидрофобные сегменты пересекают липидный бислой, в то время как полярный сегмент либо экспонирован в водную фазу, либо участвует в специфических контактах с другими субъединицами АТФ-азного комплекса.

Для H<sup>+</sup>-АТФ-аз *E. coli*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* установлена структура мутантных форм ДСС-связывающих субъединиц, что позволило выяснить роль отдельных аминокислотных остатков в формировании центров связывания ДСС и олигомицина [19—21]. Результаты настоящей работы создают возможность проведения такого рода исследований и для мутантного штамма *S. faecalis*, H<sup>+</sup>-АТФ-аза которого обладает повышенной устойчивостью к действию ДСС [22].

### Экспериментальная часть

В работе использовали ДНКазу и лизоцим (Олайне), трипсин, химо-трипсин, пепсин, карбоксипептидазы А, В и Y (Worthington, США).

Препарат [<sup>14</sup>C]ДСС был синтезирован из 0,0117 г [<sup>14</sup>C]мочевины отечественного производства (уд. акт. 27,5 Ки/моль).

Радиоактивность фракций определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark II (Nuclear Chicago, США), сцинтиллятор Unisolv I (Koch-Light, Англия).

Детекцию пептидов осуществляли с помощью ультрафиолетового детектора Uvicord II (ЛКВ, Швеция) при 280 нм. В работе использовали твердофазный секвенатор А.P.S.-240 Automatic Solid-Phase Sequencer (Rank Hilger, Англия).

Аминокислотный состав определяли после кислотного гидролиза (5,7 н. HCl) при 110°С в течение 24, 72 и 120 ч на автоматическом анализаторе Durrum D-500. Определение N-концевых аминокислот в виде Dns-производных проводили по методу Грея [9]. Дегградацию пептидов проводили по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде их Dns- [10], Pth- [11] и DАВТН-производных [12].

Бактериальную массу выращивали по методу [6]. Суббактериальные частицы готовили по методу [23]. АТФ-азный комплекс выделяли как описано в [6]. Концентрацию белка определяли методом Лоури [24].

Деформирование препаратов белка проводили, как описано в работе [7], инкубацией в смеси метанол—12 н. HCl (120:1) в течение 4 ч при 37°С.

*Выделение DCC-связывающего белка.* Суббактериальные частицы (13 г белка) суспендировали в 600 мл 10 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,1 мМ дитиотреит, добавляли  $1 \cdot 10^{-2}$  М [<sup>14</sup>C]DCC в 6 мл абсолютного этанола, инкубировали 18–20 ч при непрерывном перемешивании при 4° С, после чего меченые суббактериальные частицы осаждали центрифугированием (1 ч, 35 000 g). Осадок, трижды промытый буфером для инкубации, суспендировали в 220 мл Н<sub>2</sub>О и проводили выделение [<sup>14</sup>C]DCC-связывающего белка по методу [8]. Полученный в результате осаждения эфиром осадок растворяли в минимальном количестве смеси хлороформа и метанола (2:1), супернатант наносили на колонку с сефадексом LH-60 (2,5×100 см), уравновешенным смесью хлороформ – метанол – Н<sub>2</sub>О – бензол (45,75:45,75:7,5:1) и элюировали со скоростью 9 мл/ч. Фракции, содержащие радиоактивную метку, объединяли, упаривали на роторном испарителе, растворяли в смеси СНCl<sub>3</sub> – метанол – НСООН (2:1:1), осаждали эфиром. Осадок растворяли в 80% НСООН и хроматографировали на колонке с биогелем Р-30 в 80% НСООН (колонка 1,5×100 см, скорость элюирования 2,5 мл/ч) (см. рис. 1). Гомогенность белка из второго пика (выход ~10 мг), содержащего радиоактивную метку, была доказана определением его N-концевой аминокислотной последовательности после деформилирования.

*Расщепление DCC-связывающего белка бромцианом.* 4 мг белка, меченного [<sup>14</sup>C]DCC, растворяли в 0,8 мл 98% муравьиной кислоты, содержащей 1,25 М ВгСN, добавляли 0,2 мл Н<sub>2</sub>О и инкубировали 18–20 ч при 20° С. Затем смесь пептидов упаривали на роторном испарителе при 40–50° С, растворяли в 0,8 мл 98% муравьиной кислоты, добавляли 0,2 мл Н<sub>2</sub>О и наносили на колонку (1×100 см) с биогелем Р-10, уравновешенным 80% муравьиной кислотой (рис. 2). Элюирование вели со скоростью 2 мл/ч.

Фракции В-I и В-III содержали индивидуальные пептиды. Выделение индивидуальных пептидов из фракций В-II и В-IV, каждая из которых содержала по два пептида, проводили дробным осаждением из 80% муравьиной кислоты: при добавлении воды до концентрации НСООН <10% пептиды В-II-2 и В-IV-2 оставались в растворе, а пептиды В-II-1 и В-IV-1 выпадали в осадок и были отделены центрифугированием.

*Расщепление DCC-связывающего белка гидроксиламином.* 3 мг DCC-связывающего белка растворяли в 200 мкл 80% муравьиной кислоты и оттитровывали LiOH до рН 9,5. Суспензию выдерживали при 45° С в течение 5 ч, после чего добавляли 1 М NH<sub>2</sub>OH·НСl в 1,5 мл раствора, содержащего 6 М гуанидин·НСl, рН раствора доводили до 9,5 насыщенным раствором LiOH. Смесь инкубировали 48 ч при 45° С в атмосфере азота при перемешивании, затем вторично добавляли такое же количество NH<sub>2</sub>OH·НСl (рН 9,5) и инкубировали еще 48 ч. Смесь полученных пептидов хроматографировали на колонке (1×100 см) с биогелем Р-10 в 80% муравьиной кислоте, скорость элюции 1,2 мл/ч.

*Триптический гидролиз DCC-связывающего белка.* Белок, растворенный в 80% муравьиной кислоте, осаждали добавлением Н<sub>2</sub>О, центрифугировали, многократно промытый водой осадок суспендировали в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 8,3, подвергали обработке ультразвуком. Гидролиз вели в термостатированной ячейке при 37° С в течение 16 ч при нагрузке фермент – субстрат 1:10 (по весу). Осадок отделяли центрифугированием, несколько раз промывали аммоний-бикарбонатным буфером и водой и подвергали деградации по методу Эдмана без разделения фрагментов.

*Ограниченный кислотный гидролиз бромцианового пептида В-I.* Пептид В-I (100 нмоль) растворяли в 1 мл 98% НСООН, осторожно по каплям добавляли 1 мл 12 н. НСl. Гидролиз проводили в запаянной вакуумированной ампуле в течение 30 мин при 110° С. Для разделения гидролизата использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе модель «850» (Du Pont Instruments, США). Упаренный на роторном испарителе гидролизат суспендировали в 100 мкл стартового буфера (0,01 М СН<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, рН 5,65), осадок отделяли центрифугирова-



нием. Супернатант наносили на колонку Zorbax ODS (4,6×250 мм), уравновешенную стартовым буфером, элюировали этим буфером с линейным градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 35% в течение 120 мин со скоростью 2 мл/мин. Детекцию пептидов в элюате проводили при 210 нм. Элюирование пептидов закончилось при концентрации ацетонитрила 20% (рис. 3а). Осадок промывали несколько раз 100 мкл стартового буфера, растворяли в 100 мкл 98% HCOOH и наносили на колонку Zorbax C8 (4,6×250 мм), уравновешенную 0,1% трифторуксусной кислотой. Элюирование проводили 0,1% раствором трифторуксусной кислоты с линейным градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 35% в течение 60 мин, далее от 35 до 70% ацетонитрила в течение 15 мин со скоростью 0,8 мл/мин. Пептиды элюировались с колонки в интервале 15–35% ацетонитрила (рис. 3б).

*Гидразинолиз.* К 50 нмоль DCC-связывающего белка или бромцианового пептида В-I (после упаривания муравьиной кислоты) добавляли 50 мкл безводного гидразина. Гидразинолиз вели в вакуумированной запаянной ампуле в течение 8 ч при 105°С [13], после чего содержимое ампулы упаривали. Гидразиды аминокислот экстрагировали свежеперегнанным бензальдегидом, добавляя 30 мкл бензальдегида и 30 мкл H<sub>2</sub>O. Бензальдегидный слой удаляли, водный слой дважды экстрагировали бензолом для удаления бензальдегида. С-Концевую аминокислоту в водном слое определяли в виде Dns-производного.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные замечания при обсуждении данной работы, а также О. С. Решетовой и Л. М. Винокурову за участие в отдельных этапах работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Fillingame R. H.* Current Topics in Bioenergetics, 1981, v. 11, p. 35–106.
2. *Sebald W., Hoppe J.* Current Topics in Bioenergetics, 1981, v. 12, p. 1–64.
3. *Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Modyanov N. N.* Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., 1982, v. 11, p. 445–463.
4. *Hoppe J., Sebald W.* In: Chemiosmotic Proton Cycles / Eds Hinckle P., Skulachev V. P. Reading, Mass: Addison-Wesley, 1981, p. 449–458.
5. *Кочергинская С. А., Шахпаронов М. П., Алданова Н. А., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.* Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1569–1571.
6. *Бабиков А. В., Васильев Р. Г.* Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 119–125.
7. *Sheehan J. C., Yang D. H. J.* Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 5, p. 1154–1158.
8. *Beechey R. B., Linnett P. E., Fillingame R. H.* Methods in Enzymol., 1979, v. 55, p. 426–433.
9. *Gray W. R.* Methods in Enzymol., 1967, v. 11, p. 469–475.
10. *Беленький Б. Г., Галкина Э. С., Некрепов В. В.* Докл. АН СССР, 1967, т. 172, № 1, с. 91–93.
11. *Chen R.* Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem., 1976, B. 357, № 6, S. 873–886.
12. *Chang I. Y.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 578, № 1, p. 175–187.
13. *Fraenkel-Conrat H., Tsung C. M.* Methods in Enzymol., 1967, v. 11, p. 151–155.
14. *Sebald W., Wachter E.* FEBS Lett., 1980, v. 122, № 2, p. 307–311.
15. *Hoppe J., Sebald W.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 107, № 1, p. 57–65.
16. *Light A.* Methods in Enzymol., 1967, v. 11, p. 417–420.
17. *Laursen R. A., Horn M. J., Bohnner A. G.* FEBS Lett., 1972, v. 21, № 1, p. 67.
18. *Bornstein P.* Biochemistry, 1970, v. 9, № 12, p. 2408–2420.
19. *Hoppe J., Schairer H. U., Sebald W.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 112, №-1, p. 17–24.
20. *Sebald W., Hoppe J., Wachter E.* In: Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport / Eds Quagliariello E. et al. Amsterdam: Elsevier – North Holland, 1979, p. 63–74.
21. *Sebald W., Wachter E., Tzagoloff A.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 100, № 2, p. 599–607.
22. *Leimgraber R. M., Jensen C., Abrams A. J.* Bacteriol., 1981, v. 147, № 2, p. 363–372.
23. *Горнева Г. А., Скопинская С. И., Демин В. В., Рябова И. Д.* Биохимия, 1976, т. 41, № 6, с. 1033–1037.
24. *Lowry O. H., Rosenbrouch N. J., Farr A. L., Randall R. J. J.* Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.

Поступила в редакцию:  
7.XII.1982

THE PRIMARY STRUCTURE OF THE DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE-BINDING  
SUBUNIT FROM *STREPTOCOCCUS FAECALIS* H<sup>+</sup>-ATPASE

KOCHERGINSKAYA S. A., SHAKHPARONOV M. I., ALDANOVA N. A.,  
MODYANOV N. N.

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

The complete amino acid sequence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC)-binding subunit of proton adenosine triphosphatase from glycolysing bacteria *Streptococcus faecalis* was established. Isolation of the protein from subbacterial particles was carried out by using extraction with a chloroform / methanol mixture and following gel-filtration on Sephadex LH-60 and Bio-gel P-30. To establish the primary structure, use was made of cyanogen bromide and hydroxylamine cleavages, trypsin and partial acid hydrolyses. Separation of the peptide fragments obtained from cyanogen bromide and hydroxylamine cleavages and partial acid hydrolysis was performed by gel-filtration on Bio-gel P-10 and reversed-phase HPLC. Peptide structures were determined mainly with the aid of 4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate. The polypeptide chain of the protein consists of 71 amino acid residues (mol. wt. 7294). The primary structure of the protein from *S. faecalis* shares all common features of the structural organization of other H<sup>+</sup>-ATPase DCC-binding subunits and shows a high degree of homology with the corresponding subunit of thermophilic bacterium PS-3. Inactivation of H<sup>+</sup>-ATPase with DCC was due to modification of Glu<sup>54</sup> of the polypeptide chain.