



УДК 547.962; 615.779.931

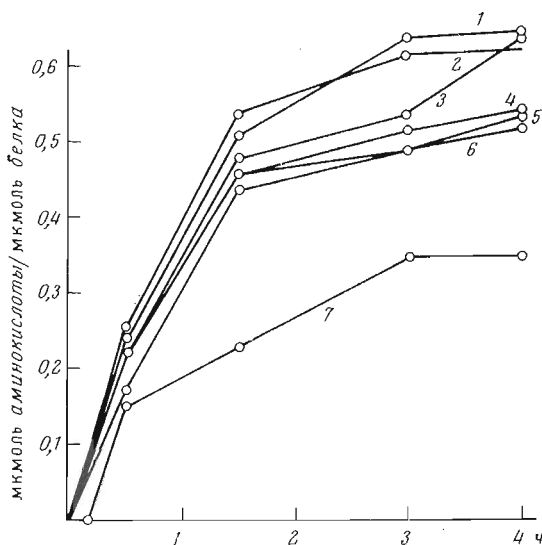
АКТИНОКСАНТИН.

III. ХАРАКТЕРИСТИКА N- И C-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ*Черес Б. З., Чупова Л. А., Решетов П. Д.,
Хохлов А. С.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На основании данных по спектрофотометрическому титрованию нативного и восстановленного актиноксантина *n*-хлормеркурибензоатом и реактивом Эллмана показано, что антибиотик не содержит SH-групп и содержит две дисульфидные связи. Методом Эдмана установлена частичная структура N-концевого фрагмента Ala-Pro-Ala-Phe-(X)-Val-(X)-Pro-Ala-(X)-Gly-Leu-(X). Методом гидразиолиза, ферментативного гидролиза карбоксипептидазой А и введением тритиевой метки в C-концевую аминокислоту актиноксантина установлен состав его C-концевого фрагмента His(Thr, Ala, Val, Leu, Phe)Gly.

Ранее мы сообщали о выделении антибиотика белковой природы — актиноксантина, обладающего высокой антибактериальной и противоопухолевой активностью [1,2]. Был установлен его аминокислотный состав, молекулярный вес, определена N-концевая аминокислота. В ходе дальнейших исследований получены данные, свидетельствующие о том, что актиноксантин построен из одной полипептидной цепи, содержащей две дисульфидные связи, а также охарактеризованы его N- и C-концевые фрагменты.

Одной из важнейших характеристик вновь исследуемого белка является число дисульфидных или сульфгидрильных групп, поскольку от этого часто зависит как стратегия определения первичной структуры, так и подход к изучению механизма действия. В связи с этим нами было предпринято спектрофотометрическое титрование нативного актиноксантина двумя наиболее специфическими реагентами на SH-группу — *n*-хлормеркурибензоатом и реактивом Эллмана. Было показано, что даже при длительном воздействии на нативный белок денатурирующих агентов (8M мочевины или 6 M хлоргидрата гуанидина и 1%-ного додецилсульфата натрия) при нормальной и повышенной температуре не наблюдается прироста оптической плотности при 250 и 412 нм соответственно. Кроме того, при длительном алкилировании нативного белка ¹⁴C-иодацетамидом и ¹⁴C-этиленмином в продуктах реакции не обнаружено радиоактивной метки и карбоксиметил- или аминоэтилцистеина (после кислотного гидролиза). Однако, при длительном восстановлении актиноксантина NaBH₄ и титровании восстановленного продукта реактивом Эллмана обнаружен прирост оптической плотности при 412 нм, соответствующий 4 моль цис-



Динамика отщепления свободных аминокислот при обработке карбоксиметиллактиноксантина карбоксипептидазой А: 1 — глицин, 2 — лейцин, 3 — аланин, 4 — треонин, 5 — фенилаланин, 6 — валин, 7 — гистидин

теина. Аминокислотный состав восстановленного и S-алкилированного актиноксантина соответствовал аминокислотному составу нативного белка [2].

N-Концевую последовательность актиноксантина определяли по методу Эдмана в модификации Грея и Хартли [3] (4 стадии), а также прямым методом Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоиновых производных (12 стадий) [4]. На основании полученных данных частичное строение N-концевого фрагмента можно представить следующим образом: Ala-Pro-Ala-Phe-(x)-Val-(x)-Pro-Ala-(x)-Gly-Leu-(x).

Получение характеристик C-концевого фрагмента актиноксантина потребовало более детальных исследований. При гидролизе актиноксантина [5] в реакционной смеси были найдены глицин, аспарагиновая кислота, серин и аланин с выходами 88, 45, 19 и 7% соответственно. Столь высокое содержание в продуктах реакции аспарагиновой кислоты, по-видимому, связано с высокой лабильностью α , β -дигидрида, образующегося из аспарагина, не связанного с C-концевым фрагментом актиноксантина [6].

Динамика гидролиза карбоксиметиллактиноксантина карбоксипептидазой А [7] приведена на рисунке, из которого видно, что в продуктах реакции присутствуют семь свободных аминокислот, шесть из которых найдены приблизительно в эквимольных количествах уже через 10 мин инкубации. Из них глицин отщепляется, как известно, с наименьшей скоростью. Поскольку в данном случае скорость освобождения глицина определяет общую динамику гидролиза C-концевого фрагмента, есть основания считать, что глицин является C-концевой аминокислотой актиноксантина.

Для окончательного суждения о C-концевой аминокислоте был использован метод, основанный на введении тритиевой метки в C-концевую аминокислоту [8] и гидролизе меченого белка карбоксипептидазой А [9]. При этом аминокислоты C-концевого фрагмента полипептидной цепи аминоэтиллактиноксантина характеризовались следующим уровнем включения тритиевой метки (число импульсов за 2 мин): Thr — 313, Gly — 5101, Ala — 73, Val — 50, Leu — 25, Phe — 81 (Фон — 28). Эти дан-

ные указывают на то, что С-концевой аминокислотой актиноксантина действительно является глицин.

Из всего вышеизложенного следует, что состав С-концевого фрагмента актиноксантина можно представить следующим образом: His/Thr, Ala, Val, Leu, Phe/Gly

ЛИТЕРАТУРА

1. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Prokoptzeva T. A., Koloditskaja T. A., Smirnov V. V. (1969) *J. Antibiot.*, **22** 541—544.
2. Хохлов А. С., Черчес Б. З., Решетов П. Д., Смирнова Г. М., Колодицкая Т. А., Сорокина И. Б., Прокопцева Т. А., Рябова И. Д., Смирнов В. В., Навашин С. М., Фомина И. П. (1970). *Изв. АН СССР, Сер. биол.*, № 5, 755—762.
3. Gray W. R. (1967) in *Methods in Enzymology*, v. 11, p. 469—475. Academic press, N. Y.
4. Schroeder W. A. (1967) in *Methods in Enzymology*, v. 11, p. 445—461, Academic Press, N. Y.
5. Braun V., Schroeder W. A. (1967) *Arch Biochem. and Biophys.*, **118**, 241—252.
6. Fraenkel-Conrat H., Tsung C. M. (1967) in *Methods in Enzymology*, v. 11, p. 151—155 Academic Press, N. Y.
7. Ambler R. P. (1967) in *Methods in Enzymology*, v. 11 p. 155—166. Academic Press, N. Y.
8. Matsuo H., Fujimoto, Y., Tatsuno T. (1966) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **22**, 69—74.
9. Hsich W. T., Gundersen L. E., Vestling C. S. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **43** 69—75.

Поступила в редакцию
4.XII.1974

ACTINOXANTHINE. III. CHARACTERISATION OF THE N— AND C—TERMINAL FRAGMENTS. DETERMINATION OF THE NUMBER OF DISULFIDE BONDS

CHERCHES B. Z., CHUPOVA L. A., RESHETOV P. D.,
KHOKHLOV A. S.

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

Spectrophotometric titration of native and reduced actinoxanthine has shown that it contains no SH-groups and possesses two disulfide bonds. Partial amino acid sequence of the N-terminal fragment Ala-Pro-Ala-Phe-(X)-Val-(X)-Pro-Ala-(X)-Gly-Leu(X) was determined by Edman degradation. The composition of the C-terminal fragment His (Thr, Ala, Val, Leu, Phe)Gly was determined by means of hydrazinolysis, carboxypeptidase digestion and labelling with ^3H .