



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 1 * № 7 * 1975

УДК:615.779.931 : 547.962

АКТИНОКСАНТИН

V. ПЕПТИДЫ ТЕРМОЛИТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА АКТИНОКСАНТИНА *

*Решетов П. Д., Жигис Л. С., Столченко И. А.,
Хохлов А. С.*

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

Из термолитического гидролизата S-карбоксиметилактиноксантина выделено восемь неперекрывающихся пептидов, отвечающих в сумме 103 аминокислотным остаткам. Определена полная или частичная последовательность этих пептидов. При сопоставлении строения изученных пептидов с ранее охарактеризованными фрагментами [1] уточнена аминокислотная последовательность некоторых участков полипептидной цепи и реконструирован 40-членный C-концевой фрагмент актиноксантина.

В ходе определения первичной структуры актиноксантина был выполнен химотриптический гидролиз S-карбоксиметил и S-аминоэтилпроизводных белка и установлено строение 10 неперекрывающихся фрагментов, отвечающих в сумме его аминокислотному составу [1].

С целью получения данных, необходимых для распределения этих фрагментов в полипептидной цепи был проведен мягкий гидролиз (соотношение фермент — субстрат, 1 : 1000, 37°, 1 ч) КМА термолизином [2, 3]. Гидролизат разделяли на катионные аминекс AG 50W × 2 в системе экспоненциальных градиентов. Полученные фракции (см. рисунок) дополнительного очищали с использованием БХ и ЭФ. Был выделен 21 индивидуальный пептид (табл. 1). Строение полученных пептидов определяли полностью или частично при сопоставлении с 10 ключевыми фрагментами химотриптического гидролизата [1]. Ниже рассматривается доказательство строения полученных пептидов.

Пептиды Th-1 и Th-1a

Ala-Pro-Ala

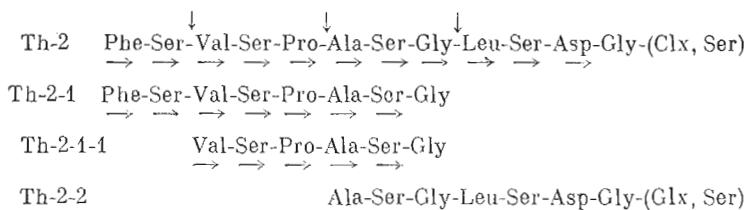
Ala-Pro-Ala-Phe
→

Наряду с пептидом Th-1, продуктом специфического гидролиза КМА термолизином, был выделен пептид Th-1a — продукт неспецифического гидролиза. После 1-й стадии деградации по Эдману пептида Th-1a в остаточном пептиде по сравнению с исходным найдено:

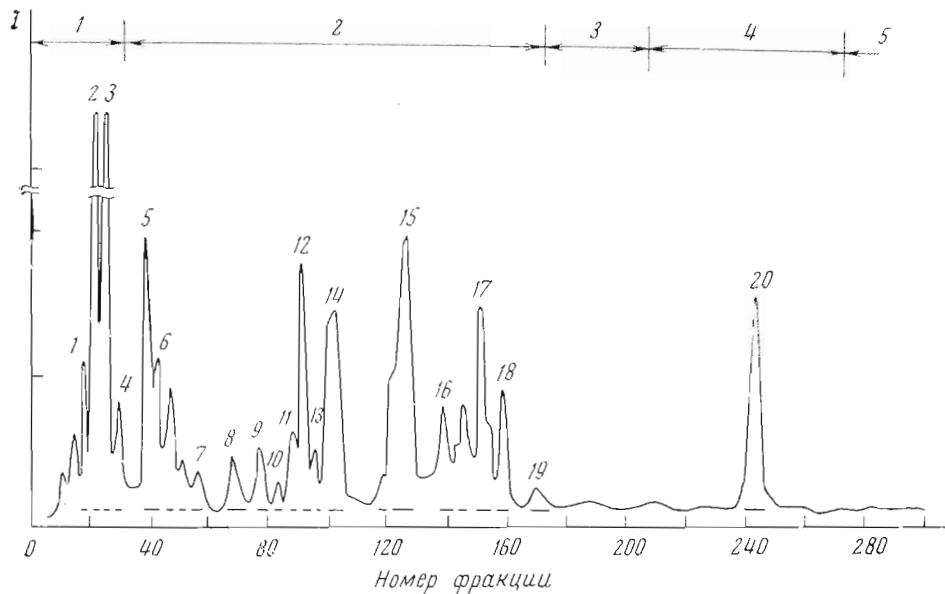
	Pro	Ala	Phe
Th-1a	0,72	1,79	1,00
1-Th-1a	0,65	1,00	1,00

* Сообщение IV см. [1] в этом же номере журнала, стр. 928 — 939.

Пептид Th-2



Помимо пептида Th-2 из суммарного гидролизата выделен ряд его фрагментов — продуктов специфического и неспецифического гидролиза термолизином. Места дополнительного гидролиза указаны вертикальными



Хроматографическое разделение термопептидов КМА на колонке с аминеком AG 50 × 2 в системе экспоненциальных градиентов пиридин-ацетатных буферов. Скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 2,5 мл (I — интенсивность флуоресценции)

стрелками. Строение Th-2 установлено при деградации по Эдману суммарного фрагмента, а также составляющих его пептидов (Th-2-1, Th-2-1-1, Th-2-2).

Строение Th-2-1-1 определено с помощью деградации по Эдману. После пятого шага в качестве остаточной аминокислоты идентифицирован глицин (в виде Dns-производного).

Аналогичным образом после семи стадий деградации по Эдману определено строение Th-2-1, в качестве остаточной аминокислоты также идентифицирован глицин. На основании этих данных сделан вывод о том, что Th-2-1-1 является частью Th-2-1.

Частичное строение Th-2 было установлено после 11 стадий деградации по Эдману, а также на основании анализа его фрагментов: Th-2-1 и Th-2-1-1. C-концевые аминокислоты пептида Th-2 оказались устойчивыми к действию карбоксипептидазы A.

Пептид Th-2-2, составляющий C-концевую часть пептида Th-2, был выделен с низким выходом, недостаточным для определения полной последовательности. Его структура установлена по данным аминокислотного состава, по определению N-концевого аминокислотного остатка и результатам определения последовательности пептида Th-2.

Таблица 1

Характеристика пептидов термолитического гидролизата КМА

Номер	Аминокислотный состав										Данные о выделении			
	Gm-Gys	Asp	Bur	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	His
Гл-1	0,96 (1)	0,96 (1)	3,40 (4)	0,94 (1)	0,72 (1)	0,80 (1)	2,00 (2)	1,00 (1)	1,07 (1)	1,00 (1)	0,85 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	0,23
Гл-2	2,10 (2)	1,40 (1)	2,10 (2)	0,55 (1)	0,55 (1)	1,09 (1)	1,08 (1)	1,09 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	0,65 (1)	0,68 (1)	0,47	
Гл-2-4-1	2,00 (2)	1,78 (3)	1,00 (1)	0,83 (1)	0,93 (1)	0,88 (1)	0,86 (1)	1,44 (1)	0,85 (1)	1,07 (1)	0,78 (1)	0,78 (1)	0,46	
Гл-2-2	1,40 (1)	0,93 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,73 (2)	0,78 (1)	0,78 (1)	1,93 (2)	1,93 (2)	0,29	
Гл-3	0,88 (1)	0,88 (1)	0,88 (1)	0,88 (1)	0,88 (1)	0,88 (1)	0,88 (1)	2,83 (3)	2,83 (3)	0,90 (4)	1,00 (4)	1,00 (4)	0,03	
Гл-3-1	0,88 (1)	2,06 (2)	1,00 (1)	2,59 (3)	1,88 (2)	1,72 (2)	0,29							
Гл-3-2	2,10 (2)	1,90 (2)	1,17 (1)	1,72 (2)	1,55 (2)	2,20 (2)	4,00 (5)	2,20 (2)	4,00 (5)	1,10 (1)	0,76 (1)	0,76 (1)	0,46	
Гл-3-3	1,66 (2)	2,10 (2)	1,90 (2)	1,17 (1)	1,72 (2)	1,55 (2)	2,20 (2)	2,20 (2)	4,00 (5)	1,10 (1)	0,76 (1)	1,55 (1)	0,32	
Гл-3-4	1,44 (1)	2,10 (2)	1,90 (2)	1,17 (1)	1,72 (2)	1,55 (2)	2,20 (2)	2,20 (2)	4,00 (5)	1,10 (1)	0,76 (1)	1,55 (1)	0,73	
Гл-4	1,44 (1)	2,10 (2)	1,90 (2)	1,17 (1)	1,72 (2)	1,55 (2)	2,20 (2)	2,20 (2)	4,00 (5)	1,10 (1)	0,76 (1)	1,55 (1)	0,46	

Таблица 1 (продолжение)

Пептид Th-3

Th-3	Val-Ser-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Glu-Thr-Tyr-Tyr
Th-3-1	Val-Ser-Gly
Th-3-2	Ala-Ala-Ala-Gly-Glu-Thr-Tyr-Tyr
Th-3-3	Val-Ser-Val-Ser
Th-3-4	Val-Ser

Строение пептида Th-3, так же как и строение его фрагментов Th-3-1 и Th-3-2, установлено деградацией по методу Эдмана. После двух стадий деградации Th-3-1 остаточная аминокислота (глицин) идентифицирована в виде Dns-производного. Строение Th-3-2 установлено после проведения 7 стадий деградации по Эдману. Остаток глутаминовой кислоты идентифицирован в виде Pth-производного при выполнении комбинированной методики (см. [1]). Процесс деградации контролировали, определяя аминокислотный состав остаточного пептида после 3-й и 7-й стадий по сравнению с исходным пептидом

	Thr	Glu	Gly	Ala	Tyr
Th-3-2	0,88	1,00	1,00	2,59	1,88
3-Th-3-2	0,75	1,00	0,75	0,25	2,00
7-Th-3-2	—	—	—	—	1,00

Строение пептида Th-3 определено методом деградации по Эдману (10 стадий). В остаточных пептидах после 8, 10 стадий по сравнению с исходным найдено:

	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Tyr
Th-3	0,93	0,83	1,00	1,73	2,83	0,90	1,93
8-Th-3	1,00	—	—	—	—	—	2,00
10-Th-3	—	—	—	—	—	—	1,00

Остаток глутаминовой кислоты идентифицирован в виде Pth-производного при выполнении комбинированной методики.

С помощью карбоксипептидазы А для пептидов Th-3 и Th-3-2 в качестве С-концевой аминокислоты идентифицирован тирозин (табл. 2).

Таблица 2

Определение С-концевой цепеледовательности пептидов с помощью карбоксипептидазы А

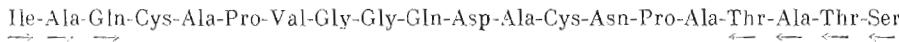
Пептид	Время гидролиза, ч	Аминокислота	Выход, мкмоль/мкмоль пептида	Пептид	Время гидролиза, ч	Аминокислота	Выход, мкмоль/мкмоль пептида
Th-3	1—3	Tyr	1,00	Th-6	3	Asn	0,87
Th-3-2	1—3	Tyr	1,00			Gly	1,09
Th-4	1,5	Ser	1,00			Leu	1,98
		Thr	1,57			His	1,00
		Ala	0,80	Th-6-1	3	Gly	0,90
Th-5	1,5	Ser	1,00			Leu	0,96
		Ala	1,22			His	1,00
		Gly	0,39				

Кроме рассмотренных выше пептидов из термолитического гидролизата выделены пептиды Th-3-3 и Th-3-4, которые на основании данных хроматического гидролиза актиноксантина [4] перекрываются с пептидом Th-3.

Строение Th-3-3 установлено деградацией по Эдману; после трех стадий в качестве остаточной аминокислоты идентифицирован серин (в виде

Dns-производного). После 1-й стадии деградации по Эдману пептида Th-3-4 в виде Dns-производного также идентифицирован серин.

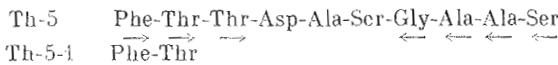
Пептид Th-4



При гидролизе лейцинаминопептидазой получены данные о N-концевой последовательности. Выход изолейцина, аланина и глутамина (18 ч) составил соответственно 1; 0,65 и 0,32 мкмоль на 1 мкмоль пептида. Указанная выше C-концевая последовательность доказана с помощью карбоксипептидазы А (см. табл. 2).

На основании полученных данных, а также по характерному аминокислотному составу (в частности, по наличию единственного в актино-ксантине остатка изолейцина) пептид Th-4 очень близок описанному ранее фрагменту Ch-4 [1], отличаясь от него лишь отсутствием C-концевого остатка фенилаланина. Поэтому для Th-4 принятая указанная последовательность.

Пептид Th-5



Строение Th-5 было определено частично по результатам определения N- и C-концевой последовательностей. После 3-й стадии деградации по Эдману в остаточном пептиде по сравнению с исходным найдено:

	Asp	Thr	Ser	Gly	Ala	Phe
Th-5	1,10	1,60	2,10	1,20	2,50	0,70
3-Th-5	0,90	0,36	1,80	1,26	2,57	—

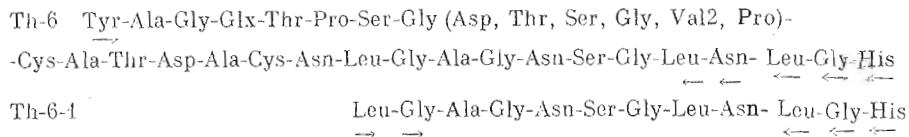
Приведенная выше последовательность С-концевого тетрапептида получена с помощью гидролиза карбоксипептидазой А (см. табл. 2).

По аминокислотному составу и результатам определения частичной последовательности пептид Th-5 очень близок фрагменту Ch-5 [1]



отличаясь от последнего положением остатка фенилаланина. На этом основании для Th-5 принятая указанная последовательность аминокислот.

Пептид Th-6



Строение Th-6 и его фрагмента Th-6-1 определено частично.

Указанная C-концевая последовательность предложена на основании результатов гидролиза карбоксипептидазой А обоих пептидов (см. табл. 2).

Поскольку при гидролизе Th-6-1 карбоксипептидазой А обнаружен гистидин, пептид Th-6-1 можно считать C-концевым фрагментом Th-6. После двух стадий деградации по Эдману Th-6-1 в остаточном пептиде по сравнению с исходным найдено:

	Asp	Ser	Gly	Ala	Leu	His
Th-6-1	2,03	4,03	3,60	4,37	2,01	0,72
2-Th-6-1	1,96	1,20	3,23	4,20	1,64	0,74

Эти данные свидетельствуют о том, что Th-6-1 входит в состав ранее описанного пептида Ch-9 [1]. На этом основании для Th-6-1 принятая ука-

Таблица 3

Фрагменты полипептидной цепи актиноксантина, реконструированные на основе пептидов термолитического гидролизата

Пептид	Последовательность
Th-1	Ala-Pro-Ala
Th-2	Phe-Ser-Val-Ser-Pro-Ala-Ser-Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-(Glx, Ser)
Th-3	Val-Ser-Gly-Ala-Ala-Ala-Gly-Glu-Thr-Tyr-Tyr
Th-4	Ile-Ala-Gln-Cys-Ala-Pro-Val-Gly-Gly-Gln-Asp-Ala-Cys-Asn-Pro-Ala-Thr-Ala-Thr-Ser
Th-5	Phe-Thr-Thr-Asp-Ala-Ser-Gly-Ala-Ala-Ser
Th-6	Tyr-Ala-Gly-Glx-Thr-Pro-Ser-Gly-(Asp, Thr, Ser, Pro, Gly, Val2)-Cys-Ala-Thr-Asp-Ala-Cys-Asn-Leu-Gly-Ala-Gly-Asn-Ser-Gly-Leu-Asn-Leu-Gly-His
Th-7	Val-Ala-Leu-Thr-Phe-Gly
Th-8	Phe-Ser-Phe

занная последовательность. N-концевая последовательность Th-6 Тир-Ala... определена деградацией по Эдману.

На основании аминокислотного состава Th-6, его N-концевой последовательности и строения C-концевого фрагмента Th-6-1 можно считать, что Th-6 включает тирозин, Ch-8 и часть Ch-9 (см. ниже). Поэтому для Th-6 принята указанная последовательность.

Фрагмент Th-7

Th-7	Val-Ala-Leu-Thr-Phe-Gly
Tb-7-1	Val-Ala
Th-7-2	Leu-Thr
Th-7-3	Phe-Gly
Th-7-4	Val-Ala-Leu-Thr
Th-7-5	Leu-Thr-Phe-Gly

Строение дипептидов Th-7-1, Th-7-2 и Th-7-3 вытекает из аминокислотного состава и определения N-концевых аминокислот.

После 1-й стадии деградации по Эдману Th-7-5 в остаточном пептиде по сравнению с исходным найдено:

	Thr	Gly	Leu	Phe
Th-7-5	0,90	1,03	0,90	0,79
1-Th-7-5	0,80	1,06	—	0,80

Таким образом, остаточный пептид Thr-Phe-Gly соответствует пептиду Ch-10, выделенному из химотриптического гидролизата актиноксантина [1]. Строение пептида Th-7-4 вытекает из сопоставления с пептидами Th-7-1 и Th-7-2. Суммарный фрагмент Th-7 реконструирован на основании строения пептидов Th-7-1 — Th-7-5.

Таким образом, в результате гидролиза КМА термолизином и анализа полученных пептидов установлено строение восьми неперекрывающихся фрагментов, отвечающих в сумме 103 аминокислотным остаткам (табл. 3). При попообменной хроматографии оказался утерянным лишь тетрапептид Val-Arg-Lys-Ser, соответствующий N-концевому фрагменту Ch-7.

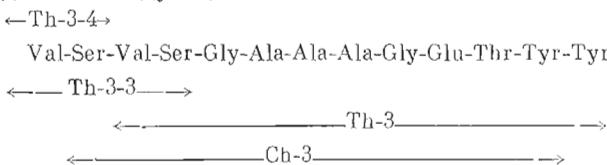
Далее рассматривается значение полученных пептидов для реконструкции полипептидной цепи актиноксантина.

Th-1 является частью N-концевого пептида Ch-1 [1] и представляет собой N-концевую последовательность актиноксантина с 1-го по 3-й остаток.

Строение Th-2 подтверждает ранее установленную N-концевую последовательность актиноксантине с 1-го по 12-й остаток [4] и позволяет продолжить ее до Ser 17:

Ala-Pro-Ala-Phe-Ser-Val-Ser-Pro-Ala-Ser-Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Gln-Ser

Th-3 по аминокислотному составу, N-концевой последовательности и окружению C-концевого остатка тирозина близок пептиду Ch-3 [1]. Отличие их видно из следующей схемы:

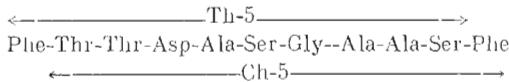


Пептид Ch-3 был выделен с низким выходом, поэтому ранее была установлена его частичная N-концевая последовательность Ser-Val-Ser... С-концевой остаток тирозина в пептиде Ch-3 может принадлежать только последовательности -Thr-Tyr-Tyr, так как 3-й остаток тирозина, имеющийся в актиноксантине, локализован в пептиде Ch-8 (Val-Arg-Lys-Ser-Tyr). Таким образом, на основании строения пептида Th-3 пептиду Ch-3 можно присвоить вышеуказанную последовательность.

Сопоставление пептидов Th-3-3, Th-3-4 и Th-3 указывает на то, что пептид Th-3-4 предшествует пептиду Th-3. Таким образом, можно считать установленной структуру указанного 13-членного фрагмента и найденным положение всех трех остатков тирозина. Наличие последовательности Тир-Тир-Тир- в этом фрагменте объясняет присутствие свободного тирозина в химотриптическом гидролизате [1].

Th-4 по аминокислотному составу и строению очень близок пептиду Ch-4, от которого отличается лишь отсутствием C-концевого остатка фенилаланина.

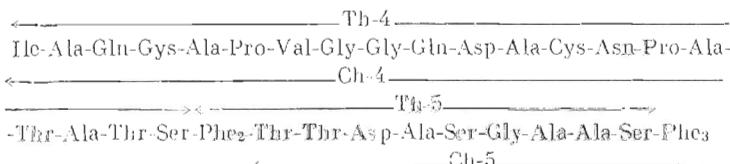
Th-5 близок пептиду Ch-5 и отличается от него лишь положением остатка фенилаланина. Сопоставление этих пептидов позволяет реконструировать фрагмент



Следует подчеркнуть, что из пяти остатков фенилаланина, имеющихся в актиноксантине, три локализованы в полипептидной цепи следующим образом:

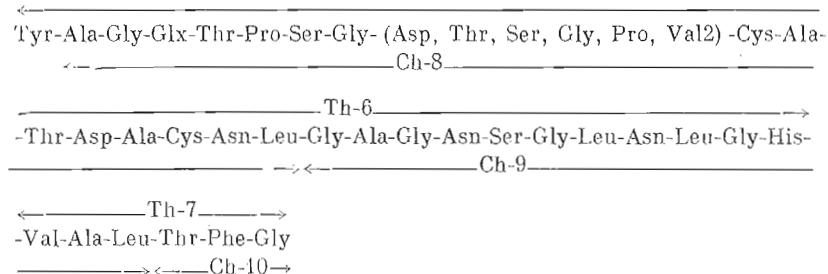
N-концевой фрагмент [4] Ala-Pro-Ala-Phe₁-Ser-Val-...; C-концевой фрагмент [1] ...-Thr-Phe₅-Gly; Ch-6 [1] Ser—Phe₂

Сопоставление аминокислотной последовательности фрагмента Th-5 [1] с этими данными позволяет локализовать Phe₂ и Phe₃ и на таком основании предположить наличие последовательности Ch-4—Ch-5:



Ранее была установлена С-концевая последовательность актиноксантине (17 остатков), в которую входит пептид Ch-9, содержащий единственный в молекуле антибиотика остаток гистидина [1]. Пептид Th-6 также содержит остаток гистидина, откуда следует, что он находится в С-концевой области полипептидной цепи и обеспечивает перекрывание Ch-8 и Ch-9. В то же время фрагмент Th-7 обеспечивает перекрывание Ch-9 и Ch-10. Эти факты позволяют реконструировать С-концевой фрагмент актиноксантине.

на, включающий 40 аминокислотных остатков:



Экспериментальная часть

Актиноксантин выделяли по методике, ранее разработанной в нашей лаборатории [5, 6]. Восстановление β -меркаптоэтанолом и алкилирование йодоуксусной кислотой проводили по стандартной методике [1].

КМА (70 мг, 5,8 мкмоль) растворяли в 100 мл 0,2 М N-этилморфолин-ацетатного буфера (рН 7) в присутствии ионов кальция (0,002 М) и добавляли термолизин (Worthington Biochem. Corp.) в соотношении фермент — субстрат 1 : 1000. Гидролиз проводили 1 ч при 37°. Реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой до рН 2 и лиофилизовали.

Смесь пептидов растворяли в 2 мл воды, подкисляли 2н. HCl до рН 2, нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием. Раствор вносили на колонку ($0,9 \times 90$ см) с катионитом аминекс AG 50W \times 2; пептиды фракционировали в системе экспоненциальных градиентов пиридин-ацетатных буферов: 75 мл 0,2 М, рН 3 (1); 500 мл 0,2 М, рН 3—500 мл 0,5 М, рН 5 (2); 500 мл 0,5 М, рН 5—240 мл 2М, рН 5(3); 150 мл 2М, рН 5 (4); 100 мл 2М пиридина (5) (см. рисунок). Для определения пептидов из фракций объемом 2,5 мл отбирали аликвоты по 0,1 мл и упаривали их досуха. После конденсации пептидов с нингидрином и фенилацетальдегидом флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi» MPF-3 (Япония) ($\lambda_{возб}$ 390 нм, $\lambda_{исп}$ 490 нм). При таком методе анализа нижний предел чувствительности соответствовал 10^{-3} — 10^{-4} мкмоль.

Профиль элюции показан на рисунке. Гомогенность полученных фракций (1—20) проверяли с помощью высоковольтного ЭФ (рН 3,5; 75 В/см, 40 мин) и хроматографии в системе бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (15 : 10 : 3 : 12) на бумаге FN-12 («Filtrak», ГДР). Дополнительную очистку пептидов проводили на бумаге в тех же условиях. Получили 21 индивидуальный пептид (см. табл. 1).

Аминокислотный состав пептидов (0,005—0,01 мкмоль) определяли после гидролиза 6н. HCl при 110° в течение 24 ч на аминокислотном анализаторе B10-CAI 201 (США). N-концевые аминокислоты определяли по методу Грэя и Хартли в виде Dns-производных [7]. ТСХ проводили на силикагеле КСК (пластинки 6 × 6 см) в системах, рекомендованных в работе [8]. В анализ брали 0,005—0,01 мкмоль пептидов.

Гидролиз карбоксипептидазой А (Worthington Biochem. Corp., США) (рН 8,5; 37°) и лейцинаминопептидазой («Serva», ФРГ) проводили в тех же условиях по стандартным методикам [9, 10]. Количественный анализ свободных аминокислот (0,005—0,02 мкмоль) проводили на анализаторе аминокислот B10-CAI 201.

Определение аминокислотной последовательности пептидов (0,05—0,2 мкмоль) проводили по методу Эдмана [11, 12]. Для анализа дикарбоновых аминокислот и их амидов применяли комбинированную методику (см. сообщение IV). В отдельных случаях для контроля за ходом деградации определяли аминокислотный состав остаточного пептида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чупова Л. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С. (1975) Биоорганическая химия, 1, 928—939.
2. Жигис Л. С., Решетов, П. Д., Стояченко И. А., Чупова Л. А., Хохлов А. С. (1974) III Всесоюзный симпозиум по химии пептидов и белков (Киев), Тезисы докладов, стр. 46.
3. Решетов П. Д., Чупова Л. А., Черчес Б. З., Стояченко И. А., Жигис Л. С., Хохлов А. С. (1974) III Всесоюзный симпозиум по химии пептидов и белков (Киев), Тезисы докладов, стр. 124.
4. Черчес Б. З., Чупова Л. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С. (1975) Биоорганическая химия, 1, 688—690.
5. 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—763.
6. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Prokoptzeva T. A., Kolodiskaja T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Phomina I. P. (1970) J. Antibiot., 62, 541—544.
7. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., 89, 59p.
8. Spivak V. A., Sherbukhin V. V., Orlov V. W., Varshavsky Ya. M. (1971) Anal. Biochem., 39, 271—281.
9. Ambler R. P. (1967). Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., XI, 155—166.
10. Light A. L. (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., XI, 417—420.
11. Gray W. R. (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), Academic Press, N. Y., XI, 469—475.
12. Schroeder W. A. (1967) Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W. ed.) Academic Press, N. Y., XI, 445—461.

Поступила в редакцию
3.I.1975

ACTINOXANTHIN. V. THERMOLYTIC PEPTIDES OF ACTINOXANTHIN

RESHETOV P. D., GJIGIS L. S., STOYACHENKO I. A.,
KHOKHLOV A. S.

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

From the thermolytic digest of S-carboxymethylated actinoxanthin, eight non-overlapping peptides which account for 103 amino acid residues were isolated and their total or partial sequence determined. Comparison with the previously determined fragments led to the structure of a 40-residue C-terminal peptide.