



УДК 547.962.02:577.152.34'236.01

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АСПЕРГИЛЛОПЕПСИНА  
А — АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS*  
*AWAMORI*

## III \*. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЭЛАСТАЗНЫХ ПЕПТИДОВ

*Остославская В. И., Ревина Л. П., Котлова Е. К.,  
Сурова И. А., Левин Е. Д., Тимохина Е. А.,  
Степанов В. М.*

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Окисленный надмуравьиной кислотой фрагмент T<sub>2</sub>1-2, образовавшийся в результате 4-часового гидролиза аспергиллопепсина А трипсином, расщепляли эластазой (20 ч при 37° С и рН 8,3). После хроматографии на сульфополистирольном катионите хромобедз в градиенте пиридин-ацетатного буфера было получено 30 фракций, из которых выделено 23 пептида. Анализ продуктов эластазного гидролизата позволил установить структуру пептидов, содержащих в сумме 85 аминокислотных остатков.

В предыдущих сообщениях описаны результаты исследования химо-триптических и триптических пептидов аспергиллопепсина А (КФ 3.4.23.6) [1, 2].

Данное сообщение посвящено изучению одного из пептидов, образовавшихся в результате 4-часового триптического гидролиза аспергиллопепсина А. В состав фрагмента T<sub>2</sub>1-2, состоящего из 115 аминокислотных остатков, входит один остаток цистеина. Гидролиз окисленного надмуравьиной кислотой фрагмента T<sub>2</sub>1-2 эластазой проводили при 37° С и рН 8,3 в течение 20 ч. Гидролизат хроматографировали на сульфополистирольном катионите хромобедз (рис. 1). Было получено 30 фракций (E1—E30). Для выделения и очистки индивидуальных пептидов использовали хроматографию и электрофорез на бумаге, а также высокоэффективную жидкостную хроматографию. Аминокислотный состав исходного пептида T<sub>2</sub>1-2, а также пептидов, выделенных из эластазного гидролизата, приведен в табл. 1 \*\*.

Для установления строения пептидов мы использовали метод Эдмана (везде дансиальной модификации), гидролиз карбоксипептидазами А и В, метод Оффорда [3] (табл. 2). Далее описаны результаты исследования структуры некоторых пептидов и их особенности.

*Пептиды E1-13-9 и E1-13-10*, исходя из аминокислотного состава, можно считать фрагментами пептида E1-21.

*Пептид E5-2* содержит пять аминокислотных остатков. Методом Эдмана определены остатки в положениях 1—3 (Ala-Asp-Thr). Сравнивая эти данные, а также аминокислотный состав пептида E5-2 с полученными ранее результатами исследования пептидов T<sub>1</sub>0-C3-2 (положения 4—8) [2] и C3-4 (положения 4—8) [1], мы пришли к выводу, что строение пептида E5-2 таково: Ala-Asp-Thr-Gly-Thr.

*Пептид E8-2-2* состоит из пяти аминокислотных остатков. Методом Эдмана установлены аминокислотные остатки в положениях 1—3, что

\* Сообщение II см. [1]. Наименование «карбоксильные протеиназы» изменено на «аспартильные протеиназы» соответственно рекомендациям Nomenclature Committee of the International Union of Biochem. (Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, p. 423—435).

\*\* Маркировка пептидов отражает номера фракций, в которых они содержались, полученных на определенных стадиях очистки.

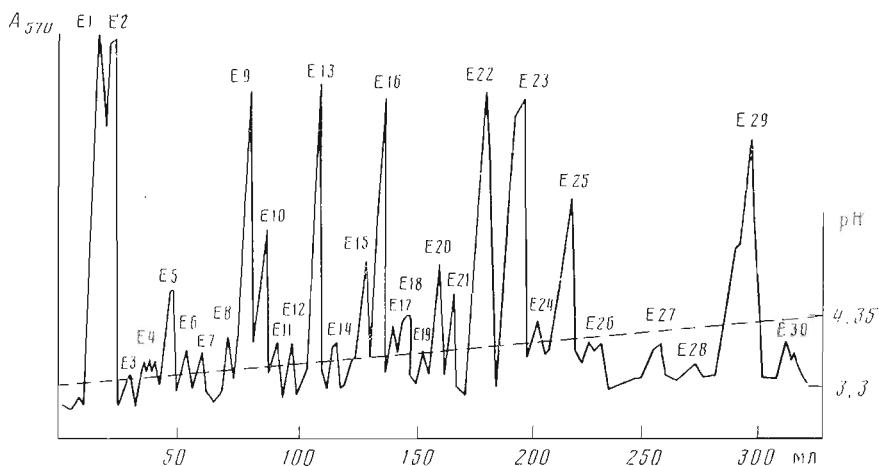


Рис. 1. Хроматография эластазного гидролизата окисленного триптического фрагмента T<sub>1</sub>-2 аспергиллопепсина А на хромобедзе (колонка 0,6×90 см) в градиенте рН и концентрации пиридин-ацетатного буфера (0,2 М, рН 3,1–2 М, рН 5)

привело к структуре *Leu-Gly-Asp-Ser-Ser*, совпадающей со структурой фрагментов пептидов T<sub>1</sub>O-C5-2 (остатки 2–6) 2 и C3-5 (остатки 9–13) [1].

*Пептид E9-1* состоит из четырех аминокислотных остатков. Последовательность трех из них (*Leu-Asx-Gly*) определили методом Эдмана, и, следовательно, (табл. 1), С-концевой аминокислотой пептида E9-1 является серин. При электрофорезе по Оффорду пептид нейтрален; таким образом, второе положение в нем занимает аспарагин. Структура пептида: *Leu-Asn-Gly-Ser*.

*Пептид E9-3* содержит семь аминокислотных остатков. С помощью метода Эдмана установлено, что пептид имеет последовательность *Leu-Leu-Asx-Asx-Glx-Ile-Val*. Пептид гидролизовали карбоксипептидазой А, которая за 1 ч от 10 пмоль пептида отщепила (по данным аминокислотного анализа) 7,5 пмоль валина; были замечены и следы изолейцина. Через 3,5 ч в инкубационной среде методом дансильирования были обнаружены валин и изолейцин. Электрофорез по Оффорду выявил присутствие в пептиде E9-3 трех свободных карбоксильных групп (табл. 1). Следовательно, положения 3 и 4 занимают остатки аспарагиновой кислоты, а в положении 5 находится остаток глутаминовой кислоты. По-видимому, замедленное отщепление остатка изолейцина карбоксипептидазой А обусловлено тем, что ему предшествует остаток глутаминовой кислоты.

*Пептид E13-1-3-1* содержит четыре аминокислотных остатка. Методом дансильирования был определен N-концевой серин. По аминокислотному составу пептид совпадает с фрагментами ранее полученных пептидов. Так, положения 5–8 в триптическом пептиде T<sub>1</sub>O-C8-1 [2] занимают остатки (*Ser, Ser, Glx*)-*Gly*, а положения 5–8 в химотриптическом пептиде C12-4 [1] — остатки *Ser-Ser-Glx-Gly*. Сравнив эти данные с результатами изучения пептида E13-1-3-1, мы пришли к выводу, что он является частью пептидов T<sub>1</sub>O-C8-1 и C12-4. Результаты электрофореза по Оффорду пептида C12-4 позволяют считать, что пептид E13-1-3-1 имеет строение *Ser-Ser-Glu-Gly*.

*Пептид E14-2*. В состав его входят восемь аминокислотных остатков. Остатки 1–3 и 5–6 определены отщеплением по Эдману, а остатки 7–8 — с помощью карбоксипептидазы А. Остатки дикарбоновых аминокислот идентифицировали электрофорезом по Оффорду. Структура пептида E14-2 была подтверждена при анализе пептида E23-2 (см. табл. 2), оказавшегося его частью (остатки 5–8). Структура пептида: *Glu-Glu-Ala-Asp-Gly-Gly-Tyr-Val*.

*Пептид E14-4* содержит четыре аминокислотных остатка. По аминокислотному составу и N-концевому остатку этот пептид совпадает с фраг-

Таблица 1  
Аминокислотный состав фрагмента Т<sub>3</sub>1-2 и индивидуальных пептидов, выделенных из эластазного гидролизата окисленного фрагмента Т<sub>3</sub>1-2

Аминокислота	Пептид												
	Т <sub>3</sub> 1-2	Е1-21	Е1-22	Е1-13-9	Е1-13-10	Е2-1-2	Е5-2	Е3-2-2	Е9-1	Е9-3	Е-13-1-3-1	Е14-2	Е14-4
Asp	14,1(14)	1,03(1)	1,1(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,8(1)	0,8(1)	2,2(2)	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)
Thr	10,9(11)	2,2(2)	2,9(3)	1,9(2)	1,3(1)	2,0(2)	2,0(2)	1,8(2)	1,0(1)	1,2(2)	2,2(2)	2,0(2)	1,1(1)
Ser	16,3(16)	1,9(2)	1,2(1)	0,9(1)	1,2(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,8(2)	1,0(1)	1,2(1)	1,0(1)	2,0(2)	1,1(1)
Glu	9,7(10)	1,2(1)	2,4(2)	1,3(1)	1,3(1)	0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	2,1(2)	2,0(2)
Pro	4,4(4)	1,03(1)	1,9(2)	1,3(1)	2,0(2)	0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)	0,7(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)
Gly	15,3(15)	1,9(2)	0,8(1)	0,8(1)	0,8(1)	0,8(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,6(1)	1,0(1)	1,1(1)	2,0(2)
Ala	8,6(9)	0,8(1)	1,2(1)	1,3(1)	0,8(1)	0,8(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	2,0(2)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)
Val	4,0(4)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Ile	8,1(8)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Leu	5,5(6)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Tyr	7,8(8)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Phe	6,1(6)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Lys	1,5(2)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Cys	1,35(2)	1,2(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	1,0(1)	0,75(1)	1,0(1)	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**	0,3(1)**
Cys-SO <sub>3</sub> H	115	12	9	7	7	5	5	5	4	7	4	8	4
Число остатков*													
Выход, % (нмоль)			12	7	7	6	18	2,4	2,9	5,8	0,96	10	1,9
			(1000)		(500)		(1500)	(200)	(250)	(500)	(80)	(900)	(160)

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	Пептид										
	Е14-5	Е17-1	Е18-3-2	Е20-1	Е20-2	Е21-2	Е22-1	Е23-2	Е23-3	Е-29-1-2	Е30-0-2
Asp	1,0(1)										
Thr		0,9(1) 1,0(1)	0,9(1) 1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)		1,0(1)			1,01(1)	0,95(1)
Ser											
Glu											
Pro											
Gly	1,2(1)	1,0(1)		1,0(1)	0,9(1) 1,0(1)	1,0(1)		1,9(2) 1,3(1)			1,0(1)
Ala											
Val	1,0(1)		1,1(1)		1,0(1)	1,0(1)			1,0(1)		
Ile	0,9(1)										
Leu	1,0(1)	0,66(1)			1,0(1)	1,1(1)					
Tyr			0,9(1)	1,0(1)	1,1(1)		1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,8(1)
Phe											
Lys										0,94(1)	0,97(1)
Cys											
Cys-SO <sub>3</sub> H	5	4	4	3	5	2	4	4	2	3	4
Число остатков											
Выход, % (наоль)	2,3 (200)	2,4 (200)	2,4 (200)	1,45 (120)	2,9 (240)	20 (1750)	14,4 (1200)	1,5 (130)	21 (1800)	3 (250)	3 (250)

\* Триптофан не определен.

\*\* Повышенное содержание тирозина в пептиде Е14-2 обусловлено разрушением его при кислотном гидролизе.

Пептиды, образовавшиеся при гидролизе эластазой окисленного фрагмента T<sub>2</sub>1-2 \*

Пептид	Строение
E1-21	Ser-Asp-Thr-Pro-(Ser, Thr, Cys, Phe, Gly <sub>2</sub> , Ile, Glx)
E1-22	Cys-Ser-Thr-Thr-Pro-Pro-Asx-Phe-Thr $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E1-13-9	Asp, Thr <sub>2</sub> , Pro, Ser, Cys, Phe
E1-13-10	Ser(Thr, Cys, Phe, Gly <sub>2</sub> , Ile) $\xrightarrow{\quad}$
E2-1-2	Asp-Gly-Ala-(Glu, Ser) $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E5-2	Ala-Asp-Thr-Gly-Thr $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E8-2-2	Ile-Gly-Asp-Ser-Ser $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E9-1	Leu-Asn-Gly-Ser $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E9-3	Leu-Leu-Asp-Asp-Glu-Ile-Val $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E13-1-3-1	Ser-Ser-Glu-Gly $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E14-2	Glu-Glu-Ala-Asp-Gly-Gly-Tyr-Val $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E14-4	Ser-Ala-Ile-Ala $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E14-5	Ile-Val-Leu-Asn-Gly $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E17-1	Tyr-Thr-Gly-Ser $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E18-3-2	Tyr-Thr-Asn-Ala $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E20-1	Gly-Phe-Ser $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E20-2	Gly-Phe-Ser-Ala-Ile $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E21-2	Ala-Ile $\xrightarrow{\quad}$
E22-1	Phe-Ser $\xrightarrow{\quad}$
E23-2	Gly-Gly-Tyr-Val $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E23-3	Leu-Ile $\xrightarrow{\quad}$
E29-1-2	Asp-Tyr-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
E30-0-2	Gly-Asp-Tyr-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$

\* Показаны последовательности, определенные методом Эдмана в данной модификации (→), с помощью карбоксипептидазы А (←), В (↖) и лейцинаминопептидазы (↗).

ментом ранее исследованного пептида T<sub>1</sub>O-C3-2, имеющего строение Ser-Ala-Ile-Ala [2].

Пептид E14-5 состоит из пяти аминокислотных остатков. Последовательность остатков 1-4 Ile-Val-Leu-Asx в нем определена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием. Следовательно, С-концевое положение занимает глицин и пептид имеет структуру Ile-Val-Leu-Asx-Gly. Поскольку участкам 3-5 этого пептида совпадает с участком 1-3 пептида E9-1 (см. выше), имеющего строение Asn-Gly-Ser, можно сделать вывод, что в положении 4 пептида E14-5 находится аспарагин.

Пептид E17-1 состоит из четырех аминокислотных остатков. Методом Эдмана идентифицированы остатки 1-3. С учетом этих данных и результатов аминокислотного анализа установлено строение этого пептида: Tyr-Thr-Gly-Ser.

Пептид E20-1 содержит три аминокислотных остатка; N-концевой аминокислотой, по данным дансильрования, является глицин. Сравнивая

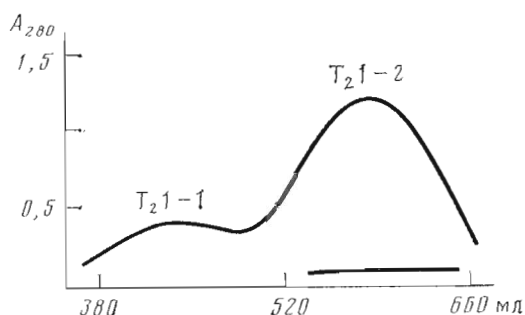


Рис. 2. Выделение фрагмента  $T_{21-2}$  с помощью хроматографии фракции  $T_{21}$  на сефадексе G-150 (колонка  $3 \times 150$  см) в 6 М мочевины и триэтиламин-карбонатном буфере, pH 8,5. Отмечена выделяемая фракция

пептиды E20-1, E20-2 и E22-1, мы пришли к выводу, что пептид E20-1 представляет собой фрагмент (остатки 1–3) пептида E20-2 и включает в себя пептид E22-1 (остатки 2–3 пептида E20-1). Следовательно, пептид E20-1 имеет структуру Gly-Phe-Ser.

Пептид E21-2 содержит два аминокислотных остатка. N-Концевой аланин определен дансилированием, и, следовательно, пептид имеет структуру Ala-Phe, которая совпадает с фрагментом 2–3 ранее изученного пептида  $T_{10-C3-2}$  [2].

Таким образом, исследованы 23 пептида из эластазного гидролизата окисленного триптического фрагмента  $T_{21-2}$  аспергиллопепсина А. В результате проведенной работы установлена структура пептидов, содержащих в сумме 85 аминокислотных остатков (без учета остатков, образующих пептиды, являющиеся фрагментами более крупных пептидов).

### Экспериментальная часть

В работе использовали эластазу (КФ 3.4.21.11, Serva, ФРГ), карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), фениллизотиоцианат, дансилхлорид (Fluka, Швейцария), смолу Chromobeds P,2-1-01-18(A)  $T_{215-03-58-04}$  (Ирландия).

**Выделение и очистка пептида  $T_{21-2}$ .** После 4-часового расщепления 680 мг аспергиллопепсина А трипсином (12 мг) [2] гидролизат ( $T_2$ ) хроматографировали на сефадексе G-50 (колонка  $150 \times 3$  см), уравновешенном 6 М мочевиной в триэтиламин-карбонатном буфере, pH 8,5, и элюировали тем же буфером. Выход фракции  $T_{21}$  на этой стадии составил 170 мг. Рехроматографию осуществили аналогичным образом и получили 130 мг  $T_{21}$ . После лиофильной сушки эту фракцию подвергли хроматографии на сефадексе G-150 (в тех же условиях, что и в случае использования сефадекса G-50) (рис. 2). Выход фрагмента  $T_{21-2}$  — 110 мг (6,6 мкмоль). N-Концевой кислотой этого пептида является тирозин (есть незначительная примесь серина).

**Окисление пептида  $T_{21-2}$ .** Пептид (91 мг, 5,5 мкмоль) обрабатывали при перемешивании ( $0^\circ\text{C}$ ) 60 мл надмуравьиной кислоты, приготовленной из 54 мл 99%  $\text{HCOOH}$  и 6 мл 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Через 18 ч к реакционной смеси добавили 180 мл воды и смесь дважды лиофилизовали.

**Гидролиз окисленного пептида  $T_{21-2}$  эластазой.** К раствору 91 мг (5,5 мкмоль) окисленного фрагмента  $T_{21-2}$  в 25 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера (pH 8,3) добавили 2,4 мг эластазы в 1,2 мл воды и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  (соотношение фермент — субстрат 1 : 37). Через 20 ч (после отделения осадка центрифугированием) раствор подкислили 50%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до pH 4,0 и лиофилизовали.

**Выделение пептидов на хромобедзе** проводили как описано ранее [2].

Пептиды E1-21, E1-13-9, E1-13-10 выделяли, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию в условиях [4]. Колонка «Spherisorb»

ODS 5 M (25 см × 4,6 мм) — прибор фирмы LDC (США). При хроматографии применяли градиент от 5 до 90% раствора В в растворе А (раствор А — 0,05%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в воде; раствор В — 80%  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Скорость элюции 0,5 мл/мин.

*Исследование строения пептидов.* Очистку пептидов, определение С- и N-концевых аминокислот методом дансильирования, определение последовательности аминокислот методом Эдмана в сочетании с дансильированием проводили как описано ранее [1, 2].

Полиамидные пленки готовили по методике [5].

Остатки дикарбоновых аминокислот и их амидов идентифицировали электрофорезом при рН 6,5 по методу Оффорда [3].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Котлова Е. К., Остославская В. И., Ревина Л. П., Ковалева Г. Г., Сурова И. А., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 58—67.
2. Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сурова И. А., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Немцова Е. Р., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Барагова Л. А., Велянова Л. П., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1765—1777.
3. Offord R. E. Nature, 1966, v. 211, № 5049, p. 591—595.
4. Rivier J., McClintock R. J. Chromatogr., 1983, v. 268, p. 112—115.
5. Решетов П. Д., Честухина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. Химия природы. соедин., 1971, № 1, с. 66—68.

Поступила в редакцию  
5.VI.1985

### THE PRIMARY STRUCTURE OF ASPERGILLOPEPSIN A, AN ASPARTIC PROTEINASE FROM *ASPERGILLUS AWAMORI*. III. AMINO ACID SEQUENCES OF ELASTASE PEPTIDES

OSTOSLAVSKAYA V. I., REVINA L. P., KOTLOVA E. K.,  
SUROVA I. A., LEVIN E. D., TIMOKHINA E. A., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

Peptide fragment T<sub>2</sub> 1-2 formed by 4-hr digestion of aspergillopepsin A with trypsin was oxidized with performic acid and hydrolyzed with elastase (substrate — enzyme ratio 37 : 1) at pH 8,3 and 37° C. Twenty-three peptides were isolated after ion-exchange chromatography on a sulfopolystyrene resin using a gradient of the pyridine-acetate buffer. Analysis of the elastase peptides led to a set of partial sequences comprising 85 amino acid residues.