



УДК 577 (152.1'43+112.5)

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

20S, 22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА
P-450 ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКАII*. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ
ПРИ ГИДРОЛИЗЕ ФРАГМЕНТА Φ_1 ПРОТЕИНАЗОЙ ИЗ
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS**Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б.,
Лапко А. Г., Куркина Н. С., Кириллова Н. М.,
Ахрем А. А.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Осуществлен гидролиз фрагмента Φ_1 , образующегося в результате ограниченного триптического гидролиза нативной молекулы цитохрома P-450, протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Из гидролизата выделены 24 пептида, охватывающие всю полипептидную цепь фрагмента Φ_1 ; изучена их аминокислотная последовательность. Полученные данные в совокупности с информацией по строению химотриптических пептидов цитохрома P-450 и триптических пептидов фрагмента Φ_1 , полученной ранее, позволили осуществить реконструкцию крупных пептидных блоков фрагмента Φ_1 , включающих в себя 252 аминокислотных остатка.

Ранее нами описана структура пептидов исчерпывающего химотриптического гидролиза молекулы холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 [1]. Последующая стратегия определения первичной структуры цитохрома P-450 состояла в исследовании строения индивидуальных фрагментов Φ_1 (M_r 30 000) и Φ_2 (M_r 27 000), полученных в результате разделения продуктов ограниченного триптического гидролиза нативного гемопропротеида с помощью ковалентной хроматографии на активированной тиопропилсефарозе [2]. Такой подход помимо упрощения работы, связанной с выделением продуктов из ферментативных или химических гидролизатов исследуемого гемопропротеида, позволял группировать ранее изученные пептиды химотриптического гидролиза белка по отдельным фрагментам Φ_1 и Φ_2 , что обеспечивало целенаправленный выбор последующего типа гидролиза для получения перекрывающихся пептидов.

Для фрагментов Φ_1 и Φ_2 , являющихся индивидуальными доменами нативной молекулы цитохрома P-450, были определены аминокислотные составы, а также N- и C-концевые аминокислотные остатки и был сделан вывод, что фрагмент Φ_1 является N-концевой частью, а фрагмент Φ_2 — C-концевой частью полипептидной цепи цитохрома P-450 [2–4]. Из данных аминокислотного анализа и определения молекулярных масс фрагментов Φ_1 и Φ_2 можно было предположить, что при ограниченном трипсинолизе не происходит отщепления сколько-нибудь значительных участков полипептидной цепи белка, не входящих в состав этих фрагментов.

С целью изучения аминокислотной последовательности фрагмента Φ_1 первоначально был проведен его исчерпывающий гидролиз трипсином, из продуктов которого выделено и установлено строение 27 гомогенных пептидов [4]. В состав неперекрывающихся триптических пептидов входило 135 аминокислотных остатков, что составляет ~50% аминокислотного состава фрагмента Φ_1 . Продолжением работы является исследование продуктов, полученных при гидролизе его стафилококковой глутаминспецифичной протеиназой.

* Сообщение I см. [1].

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе маленированного фрагмента СМ-Ф₁ цитохрома Р-450 протеиназой из *St. aureus*

Аминокислота	Ф ₁ *	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Cys (Cm)	0,52 (1)							
Asp	22,17 (22)		3,30 (3)		1,15 (1)	0,88 (1)		1,02 (1)
Thr	11,08 (11)	1,80 (2)						
Ser	12,32 (12)	1,86 (2)	1,12 (1)	0,94 (1)			0,94 (1)	
Glu	30,14 (30)	1,34 (1)	1,07 (1)	1,93 (2)	2,12 (2)	1,30 (1)	1,20 (1)	1,14 (1)
Pro	17,62 (18)	1,75 (2)	2,01 (2)		1,00 (1)		1,00 (1)	
Gly	13,73 (14)		2,23 (2)	1,12 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)		
Ala	10,94 (11)							1,07 (1)
Val	14,38 (14)						0,79 (1)	0,99 (1)
Met	3,86 (4)							
Ile	14,37 (14)	1,00 (1)	0,94 (1)	1,78 (2)	0,62 (1)		1,73 (2)	
Leu	22,05 (22)		2,04 (2)			1,70 (2)		0,91 (1)
Tyr	13,11 (13)	0,90 (1)	0,82 (1)		1,50 (2)		0,60 (1)	
Phe	17,27 (17)		1,00 (1)	1,06 (1)	0,93 (1)			1,80 (2)
His	8,41 (8)		0,94 (1)	1,80 (2)			0,93 (1)	
Lys	18,26 (18)	0,94 (1)		0,62 (1)	0,82 (1)	0,72 (1)		2,00 (2)
Arg	15,02 (15)	1,00 (1)	1,00 (1)	2,00 (2)	1,00 (1)			
Trp	6,04 (6)		1,81 (2)					
Число остатков	250	11	18	12	11	6	8	9
N-Концевая	Ile	Ile	Ile	Lys	Asx	Lys	Ser	Asx
Выход, %		4	11	25	42	27	25	32

* Аминокислотный состав фрагмента Ф₁ уточнен по сравнению с данными работы [2] в пересчете на M_r 29 800, определенную из данных структурного анализа.

Аминокислота	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
Cys (Cm)								
Asp		2,08 (2)	1,00 (1)		2,79 (3)	1,37 (1)	1,00 (1)	0,97 (1)
Thr		1,07 (1)	0,97 (1)					0,85 (1)
Ser	1,16 (1)	1,27 (1)			0,78 (1)	2,04 (2)		0,82 (1)
Glu	1,00 (1)	1,44 (1)	1,00 (1)	1,03 (1)	1,11 (1)	3,38 (3)	1,10 (1)	1,10 (1)
Pro	1,00 (1)	2,78 (3)		0,85 (1)	1,96 (2)			
Gly	1,21 (1)	2,01 (2)				3,40 (3)		1,00 (1)
Ala		1,32 (1)		1,00 (1)	1,00 (1)		1,00 (1)	
Val		1,17 (1)	1,64 (2)	0,89 (1)	1,11 (1)	1,96 (2)		0,95 (1)
Met				0,54 (1)				0,60 (1)
Ile		1,61 (2)			1,89 (2)	2,01 (2)		0,97 (1)
Leu		1,90 (2)	0,97 (1)		2,00 (2)	2,18 (2)	1,00 (1)	
Tyr	0,92 (1)	3,63 (4)						
Phe		1,20 (1)			1,05 (1)	1,94 (2)	2,52 (3)	1,00 (1)
His		0,94 (1)				0,91 (1)	0,74 (1)	
Lys		4,96 (5)			0,82 (1)	4,44 (4)		
Arg		1,82 (2)	0,90 (1)			1,00 (1)		
Trp		1,58 (2)						
Число остатков	5	31	7	5	15	23	8	9
N-Концевая	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Phe	Asp	Ser
Выход, %	32	16	23	20	41	32	36	10

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22
Cys (Cm)					0,37 (1)		
Asp		1,00 (1)	1,00 (1)	1,22 (1)	2,16 (2)	0,99 (1)	
Thr		0,80 (1)		1,10 (1)	2,18 (2)	0,94 (1)	1,00 (1)
Ser				1,02 (1)			
Glu	1,70 (2)	1,20 (1)	1,07 (1)	1,43 (1)		1,00 (1)	1,28 (1)
Pro		1,00 (1)		2,96 (3)			
Gly	1,00 (1)						
Ala			1,00 (1)	1,00 (1)	2,06 (2)	0,97 (1)	
Val		0,72 (1)		2,58 (3)	0,97 (1)		
Met	0,53 (1)			0,56 (1)			
Ile			0,70 (1)			0,93 (1)	
Leu	1,83 (2)			1,75 (2)	2,23 (2)		
Tyr				0,84 (1)	1,02 (1)		0,74 (1)
Phe			0,69 (1)	0,95 (1)	1,10 (1)	0,92 (1)	
His				0,69 (1)	0,92 (1)		
Lys			0,80 (1)	1,09 (1)	1,37 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Arg	0,79 (1)				2,84 (3)		
Trp					1,52 (2)		
Число остатков	7	5	6	18	19	7	4
N-Концевая	Arg	Thr	Ala	Ala	Leu	Thr	Lys
Выход, %	30	12	12	17	3	9	20

Аминокислота	G23	G24	Аминокислота	G23	G24
Cys (Cm)			Phe	0,85 (1)	
Asp	1,11 (1)		His		
Thr			Lys		
Ser			Arg	0,97 (1)	1,87 (2)
Glu	1,00 (1)		Trp		
Pro			Число остатков	7	3
Gly			N-Концевая	Ile	Leu
Ala			Выход, %	36	6
Val					
Met					
Ile	0,80 (1)				
Leu	1,00 (1)	1,00 (1)			
Tyr	0,75 (1)				

Выбор данного типа гидролиза был обусловлен наличием во фрагменте Φ_1 большого числа остатков глутаминовой кислоты (табл. 1), что позволяло надеяться на получение сравнительно небольших пептидов. Специфичность протеиназы из *Staphylococcus aureus* в нашем случае имела важное значение для реконструкции полипептидной цепи фрагмента Φ_1 , поскольку большинство пептидных связей, гидролизующих трипсином и химотрипсином, располагались рядом и не позволяли получить достоверные перекрывающиеся пептиды. В то же время расположение остатков глутаминовой кислоты в большинстве пептидов предполагало образование фрагментов, объединяющих пептиды химотриптического гидролиза цитохрома P-450, входящие в состав фрагмента Φ_1 , и пептиды триптического гидролиза фрагмента Φ_1 .

По предварительным данным [3], фрагмент Φ_1 содержит одну свободную сульфгидрильную группу и является гемсодержащим. Поэтому перед структурным анализом фрагмент Φ_1 после удаления протогема IX [5] карбоксиметилировали [6]. Электрофоретический анализ хода гидролиза суспензии карбоксиметилированного фрагмента Φ_1 (СМ- Φ_1) протеиназой из *St. aureus* показал, что независимо от применяемого буфера (были ис-

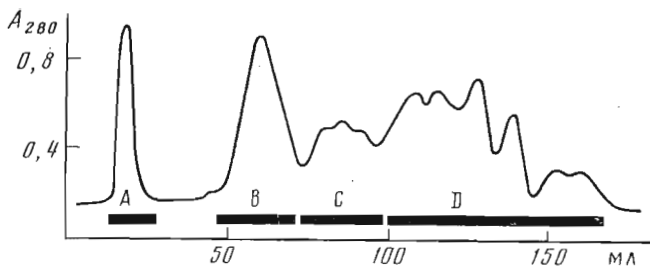


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных при гидролизе малеинированного фрагмента Φ_1 протеиназой из *St. aureus*, на колонке ($1,5 \times 100$ см) с биогелем P-30 в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,8. Здесь и далее прямоугольники на оси абсцисс — границы объединения фракций

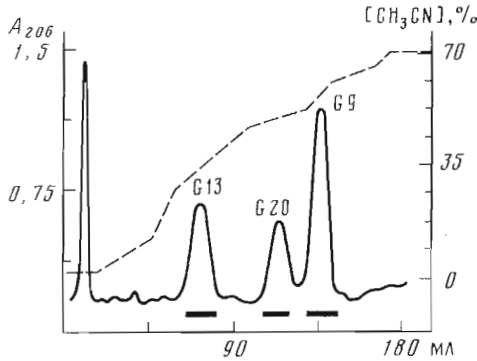


Рис. 2. Разделение фракции В (рис. 1) на колонке ($0,8 \times 25$ см) с носителем Servachrom Si 100 C₈ Polyol в градиенте ацетонитрила в 0,05% трифторуксусной кислоте

пользованы 0,1 М аммоний-бикарбонатный буфер (pH 8,0), 0,1 М калий-фосфатный буфер (pH 7,8) и 0,1 М аммоний-ацетатный буфер (pH 4,0)) расщепление пептидных связей протекает незначительно и исходный фрагмент обнаруживается в гидролизате даже после инкубации его с ферментом в течение 52 ч при фермент-субстратном соотношении 1:30.

Модификация СМ- Φ_1 малеиновым ангидридом приводила к повышению растворимости фрагмента и заметному возрастанию скорости гидролиза. Поэтому расщеплению протеиназой из *St. aureus* СМ- Φ_1 (pH 7,8, 37° С, 24 ч) был подвергнут СМ- Φ_1 , модифицированный малеиновым ангидридом.

На начальном этапе полученный гидролизат СМ- Φ_1 разделяли гель-фильтрацией на биогеле P-30 (рис. 1). В результате были получены четыре фракции: А, В, С и D.

Фракция А, элюировавшаяся в объеме, близком к свободному объему колонки, содержала незначительное количество пептидного материала и далее не исследовалась. Разделение фракции В, содержавшей в основном два пептида с N-концевыми остатками фенилаланина и аргинина, проводилось обращенно-фазовой хроматографией на носителе Servachrom Si 100 C₈ (рис. 2). В результате были выделены в чистом виде пептиды G9, G13 и в небольшом количестве пептид G20*. Эти пептиды также были получены в индивидуальном состоянии хроматографией на Sp-сефадексе С-25 в градиенте pH и концентрации аммоний-формиатных буферов, однако при этом выход основных пептидов (G9 и особенно G20) был значительно ниже, чем при хроматографии на Servachrom Si 100 C₈.

Для дальнейшего разделения пептидов фракции С применялась гель-фильтрация на колонке с биогелем P-6 в 50% уксусной кислоте (рис. 3).

* Пептидам даны номера, соответствующие их порядку расположения в полипептидной цепи Φ_1 .

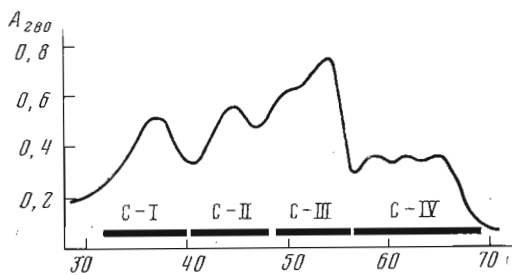


Рис. 3

Рис. 3. Разделение фракции С (рис. 1) на колонке (1,2×100 см) с биогеелем Р-6 в 50% уксусной кислоте

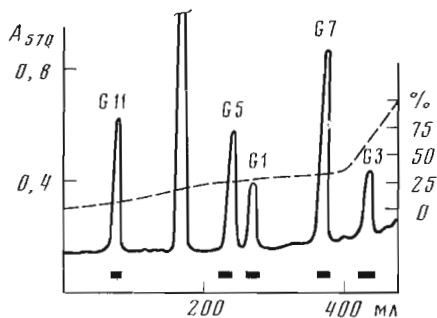


Рис. 4

Рис. 4. Разделение фракции С-IV (рис. 3) на колонке (0,6×35 см) с аминоксом 50W×4 в градиенте концентрации (0,1–2,0 М) пиридин-ацетата и рН (2,7–5,0) (см. «Экспер. часть»). Пунктиром показано изменение содержания буфера В в буфере А

Рис. 5. Разделение фракции D (рис. 1) на колонке (1,5×160 см) с биогеелем Р-4 в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 7,8

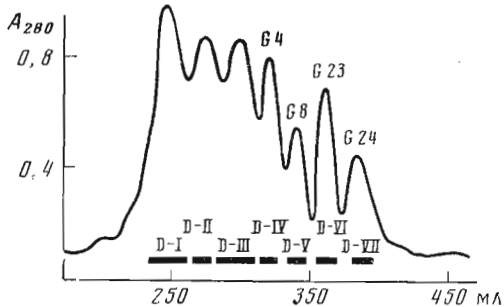


Рис. 5

В результате получены четыре фракции (С-I – С-IV). Фракция С-I содержала в основном пептид G-20, который был выделен в индивидуальном состоянии после дополнительной очистки на колонке с Servachrom Si 100 C_s. Во фракции С-II содержались два пептида с N-концевыми остатками аланина. Их разделение было достигнуто ионообменной хроматографией на аминоксе 50W×4 (пептиды G12 и G19). Фракция С-III представляла собой смесь двух пептидов, которые были разделены хроматографией на Servachrom Si 100 C_s (пептиды G19 и G2). Следует отметить аномальный порядок элюирования пептидов G12 и G2 (15 и 18 аминокислотных остатков соответственно) при гель-фильтрации на биогеле Р-6 в 50% уксусной кислоте. Для разделения фракции С-IV была использована хроматография на аминоксе 50W×4 (рис. 4), в результате которой в чистом виде были получены пептиды G1, G3, G5, G7, G11.

Предварительное разделение небольших по молекулярной массе пептидов, содержащихся во фракции D, было проведено на колонке с биогеелем Р-4 (рис. 5). В результате были получены семь фракций, четыре из которых содержали индивидуальные пептиды G4, G8, G23, G24. Для выделения пептидов из фракций D-I, D-II и D-III было проведено их разделение на колонке с аминоксом 5W×4 (рис. 6–8), что позволило получить в гомогенном состоянии пептиды G6, G10, G14, G15, G16 и G22. Пептиды G11 и G17, G18 и G21 были получены в чистом виде после дополнительной хроматографии соответствующих фракций в тонком слое целлюлозы.

Гомогенность всех полученных пептидов контролировали определением N-концевых аминокислот дансильным методом.

В результате разделения гидролизата СМ-Ф₁ в чистом виде выделены 24 пептида, аминокислотный состав которых приведен в табл. 1. Аминокислотные последовательности почти всех пептидов определяли ручным вариантом метода Эдмана (в дансильной модификации). N-Концевая аминокислотная последовательность пептидов G2, G13, G14 и G21 определялась методом Эдмана с использованием окрашенного реагента — 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата (DABITC). N-Концевую аминокислотную последовательность пептида G9 устанавливали автоматическим методом Эдмана. Ковалентное связывание пептида с носителем осуществляли диизотиоцианатным методом через ε-аминогруппы остатков лизина.

Для определения структуры некоторых крупных пептидов потребова-

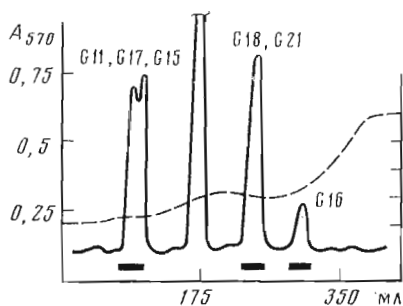


Рис. 6

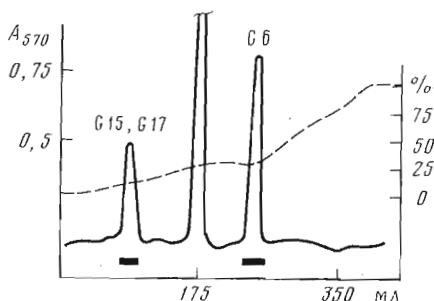


Рис. 7

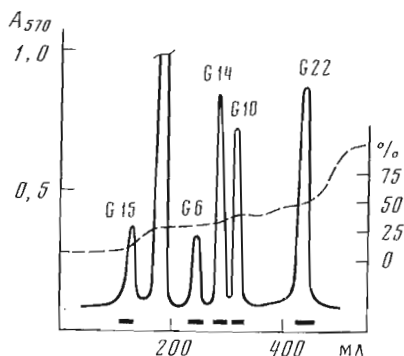


Рис. 8

Рис. 6. Разделение фракции D-I (рис. 5) на аминоксе 50W×4. Условия разделения см. подпись к рис. 4

Рис. 7. Разделение пептидов фракции D-II (рис. 5) на аминоксе 50W×4 (см. подпись к рис. 4)

Рис. 8. Разделение фракции D-III (рис. 5) на аминоксе 50W×4 (см. подпись к рис. 4)

лись их дополнительные гидролизы. При изучении аминокислотной последовательности таких пептидов использовались ранее полученные данные по структуре химотриптических пептидов цитохрома P-450 и триптических пептидов фрагмента Φ_1 (структуры последних приведены в работах [1, 4]). Аминокислотные последовательности исследованных пептидов представлены в табл. 2.

Ниже приведено описание установления структуры некоторых выделенных пептидов.

Пептид G2. Структуру пептида изучали, используя реагент DABITC *. Установленная аминокислотная последовательность первых девяти аминокислотных остатков (табл. 3) включила большую часть химотриптического пептида Ch-V [1] **. Для установления полного строения пептида был проведен его ограниченный кислотный гидролиз по остаткам аспарагиновой кислоты и аспарагина с последующим анализом смеси трех пептидов методом Эдмана в дансильной модификации. Полученные данные в совокупности с данными по N-концевой аминокислотной последовательности цитохрома P-450 и по структуре химотриптического пептида Ch-XIII-2 [1] и триптического пептида T-X [4] позволили установить структуру пептида G2.

Пептид G3. После определения N-концевой аминокислотной последовательности (см. табл. 3) пептид был расщеплен трипсином в стандартных условиях и из гидролизата методом пептидных карт в тонком слое целлюлозы были выделены три пептида. В результате определения их структуры установлено, что пептид G3-T-1 является N-концевым; пептид G3-T-3, не содержащий остатков лизина и аргинина, — C-концевым, а пептид G3-T-2 расположен между ними. Для подтверждения строения пептид G3 был подвергнут гидролизу химотрипсином. При этом образовалась смесь двух пептидов с N-концевыми остатками лизина и аргинина. Анализ полученной смеси подтвердил C-концевую последовательность пептида G3.

* 4-N,N-Диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат.

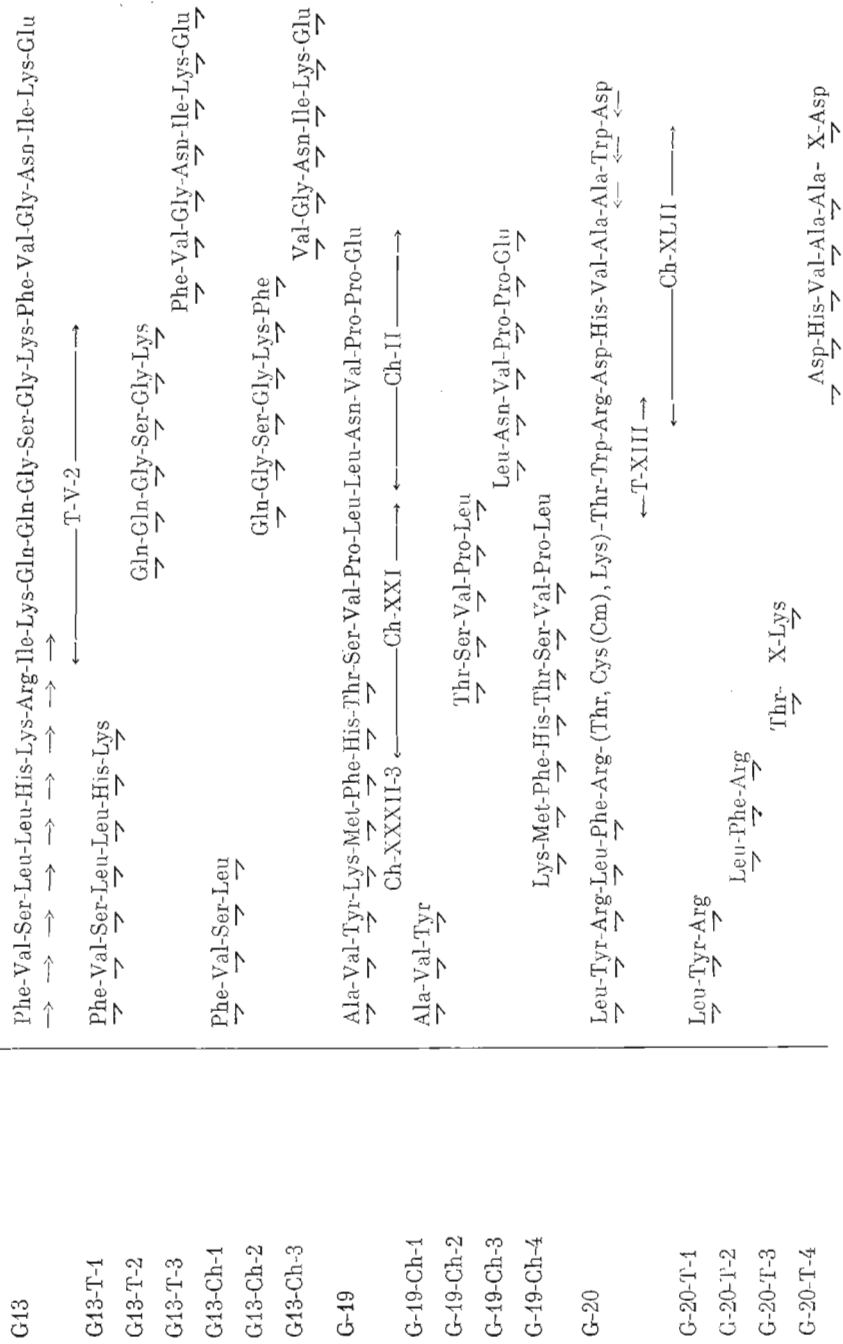
** В работе [1] пептид C-V; обозначения остальных пептидов химотриптического гидролиза цитохрома [1] изменены соответственно.

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при гидролизе
фрагмента Ф₁ протеиназой из *St. aureus*

Пептид	Аминокислотная последовательность *
G1	Ile-Ser-Thr-Lys-Thr-Pro-Arg-Pro-Tyr-Ser-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G2	Ile-Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Trp-Leu-Asn-Leu-Tyr-His-Phe-Trp-Arg-Glu → → → → → → → → → →
G3	Lys-Gly-Ser-Gln-Arg-Ile-His-Phe-Arg-His-Ile-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G4	Asn-Phe-Gln-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ile-Tyr-Arg-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G5	Lys-Leu-Gly-Asn-Leu-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G6	Ser-Val-Tyr-Ile-Ile-His-Pro-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G7	Asn-Val-Ala-Lys-Leu-Phe-Lys-Phe-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G8	Gly-Ser-Tyr-Pro-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G9	Arg-Tyr-Asp-Ile-Pro-Pro-Trp-Leu-Ala-Tyr-His-Arg-Tyr-Tyr-Gln-Lys-Pro- Ile-Gly-Val-Leu-Phe-Lys-Lys-Ser-Gly-Thr-Trp-Lys-Lys-Asp
G10	Arg-Val-Val-Leu-Asn-Thr-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G11	Val-Met-Ala-Pro-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G12	Ala-Ile-Lys-Asn-Phe-Ile-Pro-Leu-Leu-Asn-Pro-Val-Ser-Gln-Asp
G13	Phe-Val-Ser-Leu-Leu-His-Lys-Arg-Ile-Lys-Gln-Gln-Gly-Ser-Gly-Lys-Phe-Val- Gly-Asn-Ile-Lys-Glu → → → → → → → → → →
G14	Asp-Leu-Phe-His-Phe-Ala-Phe-Glu → → → → → → → →
G15	Ser-Ile-Thr-Asn-Val-Met-Phe-Gly-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G16	Arg-Leu-Gly-Met-Leu-Glu-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G17	Thr-Val-Asn-Pro-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G18	Ala-Gln-Lys-Phe-Ile-Asp ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G19	Ala-Val-Tyr-Lys-Met-Phe-His-Thr-Ser-Val-Pro-Leu-Leu-Asn-Val-Pro-Pro-Glu
G20	Leu-Tyr-Arg-Leu-Phe-Arg-(Thr, Cys(Cm), Lys)-Thr-Trp-Arg-Asp-His-Val- Ala-Ala-Trp-Asp
G21	Thr-Ile-Phe-Asn-Lys-Ala-Glu → → → → → → → →
G22	Lys-Tyr-Thr-Glu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G23	Ile-Phe-Tyr-Gln-Asp-Leu-Arg ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
G24	Leu-Arg-Arg ↘ ↘ ↘ ↘

* Определение аминокислотной последовательности осуществлялось ручным вариантом метода Эдмана в дансильной модификации (↘), с реагентом DABITC (→), автоматическим методом (—).

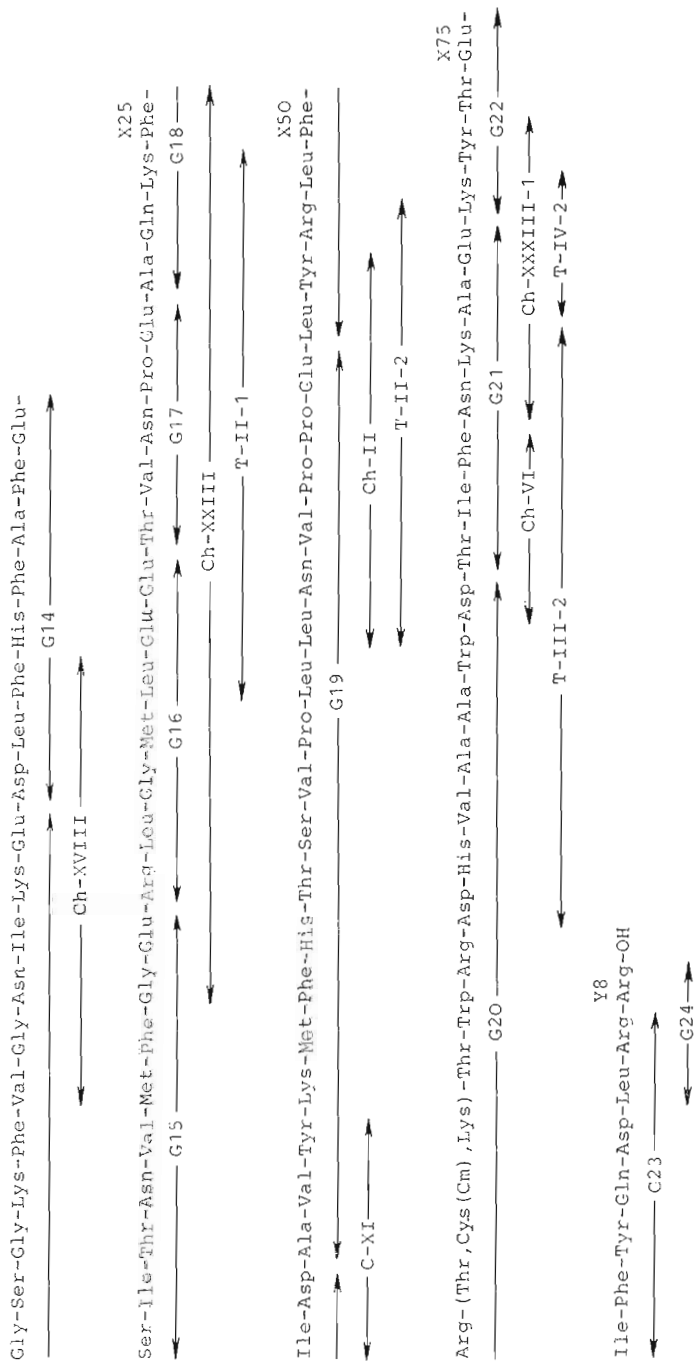
Анализируемый пептид	Результаты анализа
G2	$\begin{array}{l} \text{Ile-Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Gly-Trp-Leu-Asn-Leu-Tyr-His-Phe-Trp-Arg-Glu} \\ \text{Ch-V} \rightarrow \quad \rightarrow \quad \rightarrow \quad \rightarrow \quad \leftarrow \text{Ch-XIII-2} \rightarrow \quad \leftarrow \text{Т-X} \rightarrow \\ \text{Ile-Pro-Ser-Pro-Gly} \end{array}$
Смесь пептидов ограни- ченного кислотного гид- ролиза	$\text{Gly- X-Leu} \rightarrow$ $\text{Leu-Tyr-His-Phe- X-Arg-Glu} \rightarrow \rightarrow$
G3	$\text{Lys-Gly-Ser-Gln-Arg-Ile-His-Phe-Agr-His-Ile-Glu}$
G3-T-1	$\text{Lys-Gly-Ser-Gln-Arg} \rightarrow$
G3-T-2	$\text{Ile-His-Phe-Arg} \rightarrow$
G3-T-3	$\text{His-Ile-Glu} \rightarrow$
G3-Ch-1	$\text{Lys-Gly-Ser-Gln-Arg-Ile-His-Phe} \rightarrow$
G3-Ch-2	$\text{Arg-His-Ile-Glu} \rightarrow$
G9	$\text{Arg-Tyr-Asp-Ile-Pro-Pro-Trp-Leu-Ala-Tyr-His-Arg-Tyr-Tyr-Gln-Lys-Pro-Ile-Gly-Val-Leu-Phe-Lys-Lys-Ser-Gly-Thr-Trp-Lys-Lys-Asp}$ $\leftarrow \text{Ch-XLV} \rightarrow$
G9-T-1	$\text{Arg-Tyr-Asp-Ile-Pro-Pro- X-Leu-Ala-Tyr-His-Arg} \rightarrow$
G9-T-2	$\text{Tyr-Tyr-Gln-Lys-Pro-Ile-Gly-Val-Leu-Phe-Lys}$
G9-T-3	$\text{Lys-Ser-Gly-Thr- X-Lys-Lys-Asp} \rightarrow$
G-12	$\text{Ala-Ile-Lys-Asn-Phe-Ile-Pro-Leu-Leu-Asn-Pro-Val-Ser-Gln-Asp}$
G12-Ch-1	$\text{Ala-Ile- X-Asn-Phe} \rightarrow$
G12-Ch-2	$\text{Ile-Pro-Leu} \rightarrow$
G12-Ch-3	$\text{Leu-Asn-Pro-Val-Ser-Gln-Asp} \rightarrow$



* Обозначения типов гидролиза $\rightarrow, \rightarrow, \rightarrow$ см. табл. 2; \leftarrow — определение G-концевой аминокислотной последовательности с помощью карбоксипептидазы У. Целлуды химотриптического гидролиза — Ch, триптического гидролиза — Т.



Частичная аминокислотная последовательность фрагмента Φ_1 цитохрома P-450. Полипептидные блоки, входящие во фрагмент Φ_1 , пронумерованы с N-конца каждого. Аминокислотные остатки 2-го и 3-го блоков обозначены префиксами X и Y. Показаны пептиды, полученные при гидролизе фрагмента Φ_1 протеиназой из *St. aureus* (G), при химографическом гидролизе цитохрома P-450 [1] (Ch) и при триплическом гидролизе фрагмента Φ_1 [4] (Г)



Пептид G9. По данным аминокислотного анализа, пептид G9, образующийся вследствие неспецифического гидролиза пептидной связи Asp—Arg, содержит пять остатков лизина. Для определения N-концевой последовательности был использован автоматический твердофазный метод Эдмана с ковалентным связыванием пептида с матрицей по ε-аминогруппам лизина. Таким образом, удалось установить последовательность первых 14 аминокислотных остатков. Для определения полной аминокислотной последовательности пептид подвергался гидролизу трипсином и полученный гидролизат был разделен хроматографией на Servachrom Si 100 C₈ с градиентом ацетонитрила в 0,05% трифторуксусной кислоте. В результате разделения были получены три пептида и определены их аминокислотные последовательности (см. табл. 3). В процессе ручной деградации пептида G9-T-2 по методу Эдмана (в дансильном варианте) наблюдалось превращение остатка глутамина в пироглутаминовую кислоту в 3-м положении с N-конца пептида, что делало невозможным дальнейший анализ. Вследствие этого оставшийся пептид после первого цикла деградации подвергали обессоливанию с последующей обработкой 1 н. раствором HCl в метаноле [7], что позволило идентифицировать остаток глутаминовой кислоты на втором шаге и продолжить определение аминокислотной последовательности пептида G9-T-2.

Перекрытие пептидов G9-T-2 и G9-T-3 было доказано с помощью химотриптического пептида Ch-XLV [1] и, таким образом, установлена структура пептида G9.

Пептид G12. Деградацией по методу Эдмана была найдена N-концевая аминокислотная последовательность пептида (табл. 3), которая совпадала с C-концевой частью химотриптических пептидов Ch-XII и Ch-IV цитохрома P-450 [1]. Пептид G12 был гидролизован химотрипсином. Смесь фрагментов разделялась хроматографией на колонке с аминоксом A-5, в результате которой были выделены три пептида и определены их аминокислотные последовательности. На основании полученных данных была выяснена структура пептида G12.

Пептид G13. N-Концевая аминокислотная последовательность пептида установлена по методу Эдмана с использованием реагента DABITC (см. табл. 3). Для получения дополнительной информации были проведены триптический и химотриптический гидролиз пептида. Из химотриптического гидролизата хроматографией на колонке с аминоксом A-5 были получены три гомогенных пептида, а из триптического гидролизата обращенно-фазовой хроматографией были выделены в индивидуальном состоянии также три пептида. Изучение строения полученных триптических и химотриптических фрагментов пептида G13 в совокупности с результатами определения его N-концевой аминокислотной последовательности и данными по структуре пептида T-V-2 из триптического гидролизата CM-Ф₁ [4] позволило установить полную аминокислотную последовательность пептида G13.

Пептид G19. N-Концевая последовательность первых восьми аминокислотных остатков определялась по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот (табл. 3). Для установления полной структуры пептид был гидролизован химотрипсином. В результате разделения полученной смеси фрагментов хроматографией на колонке с аминоксом A-5 были выделены четыре пептида. На основании данных по их структуре была установлена полная аминокислотная последовательность пептида G19, объединяющего следующие химотриптические пептиды: Ch-VII-1, совпадающий с N-концевой частью пептида G19, Ch-XXXII-3, Ch-XXI и Ch-II, включающий его C-концевую часть.

Пептид G20 образуется с небольшим выходом (~3%) в результате неспецифического гидролиза пептидной связи Asp—Thr. Методом Эдмана были идентифицированы пять первых аминокислотных остатков пептида (табл. 3). Далее пептид был подвергнут триптическому гидролизу. Полученный гидролизат разделяли гель-фильтрацией на биогеле P-4 и 30% уксусной кислоте с последующей очисткой некоторых фракций методом хроматографии в тонком слое целлюлозы. Были выделены четыре пептида

и установлена их структура, что в совокупности с полученной ранее информацией позволило определить частичную аминокислотную последовательность пептида G20.

При анализе первичной структуры пептидов, полученных в результате гидролиза СМ-Ф₁ протеиназой из *St. aureus*, было показано, что расщепились в основном связи, образованные α-карбоксильными группами остатков глутаминовой кислоты. Наблюдалось расщепление связи, образованной остатком глутаминовой кислоты в последовательности Glu-Phe-Pro, которая, по данным некоторых авторов [8], относительно устойчива к гидролизу. В результате были выделены пептиды G1 и G2 с достаточно высоким выходом (см. табл. 1). Пять из 10 пептидных связей фрагмента Ф₁, образованных α-карбоксильными группами аспарагиновой кислоты, гидролизовались протеиназой из *St. aureus* с заметной скоростью. Несколько неожиданным явилось расщепление пептидной связи Lys-Asp-Arg, которая обычно устойчива к гидролизу [8, 9]. Из связей, образованных остатками аспарагиновой кислоты и алифатическими аминокислотами, большинство расщеплялось практически полностью. С меньшим выходом гидролизовалась связь Gln-Asp-Leu с отщеплением пептида G24 (Leu-Arg-Arg), который наряду с пептидом G23 содержит на С-конце остаток аргинина и, следовательно, является С-концевым во фрагменте Ф₁. Доказательством правильности этого предположения служит С-концевая последовательность фрагмента Ф₁, определенная с помощью карбоксипептидазы Y: -(Phe, Tyr, Gln)-Asp-Leu-Arg.

Таким образом, в результате расщепления СМ-Ф₁ протеиназой из *St. aureus* и разделения образовавшейся смеси фрагментов были выделены и охарактеризованы 24 пептида, составляющие полипептидную цепь фрагмента Ф₁; для 23 из них установлена полная первичная структура, а для пептида G20 — частичная. Основная информация о перекрывании пептидов была получена в результате использования данных по структуре химотриптических пептидов цитохрома Р-450 [1], а также триптических пептидов СМ-Ф₁ [4]. Частичная аминокислотная последовательность фрагмента Ф₁, включающая в себя 252 аминокислотных остатка, представлена на схеме.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин (Serva, ФРГ), протеиназа из *St. aureus*, карбоксипептидаза Y (Pierce, США), биогели Р-4, Р-6, Р-30, катионообменные смолы Aminex А-5, Aminex 50W×4 (Bio-Rad, США), обращенно-фазный сорбент Servachrom Si 100 С₈, Polyol (10 мкм, Serva, ФРГ), пластинки (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы Whatman N300 (Англия) DAVITC, реактивы для автоматического метода Эдмана (Fluka, Швейцария), β-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), хлоридат гуанидина (Merck, ФРГ), Dns-хлорид, Dns-аминокислоты (Serva, ФРГ), фенилтиогидантоины аминокислот (Pierce, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Моноиодуксусную кислоту дважды перекристаллизовывали из гексана непосредственно перед использованием.

Фрагмент Ф₁ выделяли методом ковалентной хроматографии на активированной тиопропилсефарозе, как описано в работе [2], удаляли протогем по известной методике [5] и карбоксиметилировали моноиодуксусной кислотой в присутствии 8 М хлоридата гуанидина.

Малеинирование СМ-Ф₁. К раствору 2,0 мкмоль СМ-Ф₁ в 20 мл 0,2 М натрий-боратного буфера, рН 9,0, содержащего 6 М хлоридат гуанидина, постепенно добавляли 150 мг малеинового ангидрида при 0° С, поддерживая рН реакционной среды в пределах 8,9—9,0 добавлением необходимого количества 5 н. NaOH. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 0° С, а затем диализовали против 0,01% водного раствора аммиака и лиофильно высушивали.

Гидролиз малеинированного СМ-Ф₁ протеиназой из *St. aureus*. 1,8 мкмоль малеинированного СМ-Ф₁ растворяли в 4 мл 0,05 М NH₄HCO₃

и выдерживали 20 мин на водяной бане при 95° С. После охлаждения к раствору фрагмента добавляли 6 мл 0,3 М NH_4HCO_3 , рН 7,8, а затем 1,8 мг протеиназы из *St. aureus* (фермент-субстратное соотношение 1 : 30 (по весу)). Гидролиз осуществляли в течение 24 ч при 37° С. По окончании опыта гидролизат лиофильно высушивали, растворяли в 1,6 мл 0,2 М NH_4HCO_3 (рН 7,8) и подвергали хроматографическому разделению на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30 (рис. 1). Скорость элюирования 2,4 мл/ч. Полученные фракции А — D лиофилизovali.

Разделение пептидов фракции В. Пептидный материал фракции В демаленировали, инкубируя в 50% уксусной кислоте 24 ч при 37° С, и разделяли на колонке (0,8×25 см) с носителем Servachrom Si 100 С₈ в градиенте концентраций ацетонитрила от 0 до 70% в 0,05% трифторуксусной кислоте при скорости элюирования 40 мл/ч (рис. 2).

Разделение пептидов фракции С после предварительного демаленирования проводили на колонке (1,2×100 см) с биогелем Р-6 в 50% уксусной кислоте со скоростью элюирования 1,2 мл/ч (рис. 3). Пептид G20 из фракции С-I выделяли хроматографией на Servachrom Si 100 С₈ в условиях, аналогичных разделению фракции В. Фракции С-II и С-IV разделяли на пептидном анализаторе, описанном нами в работе [1], на колонке (0,6×35 см) с аминексом 50W×4 в градиенте концентраций и рН пиридин-ацетатных буферов (буфер А — 0,01 М, рН 2,7; буфер Б — 2,0 М, рН 5,0) (рис. 4). Скорость элюирования 20 мл/ч при давлении 70–90 атм. Температура рубашки колонки 45° С. Разделение фракции С-III осуществляли как описано для фракции В.

Разделение пептидов фракции D осуществляли гель-фильтрацией на колонке (1,5×160 см) с биогелем Р-4 в 0,2 М NH_4HCO_3 (рН 7,8) со скоростью элюирования 3 мл/ч (рис. 5). Полученные фракции D-I, D-II, D-III после их демаленирования подвергали ионообменной хроматографии на колонке (0,6×35 см) с аминексом 50W×4 на пептидном анализаторе (рис. 6–8). Отдельные фракции после ионообменной хроматографии разделяли на пластинках (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы в системе С.

Ограниченный кислотный гидролиз пептида G2. Пептид (0,04 мкмоль) суспендировали в 0,2 мл 0,05 н. HCl и инкубировали 16 ч в вакуумированной ампуле при 110° С.

Гидролиз пептидов G12, G13, G19 химотрипсином. Пептид (0,2 мкмоль) растворяли в 1,2 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,3, добавляли химотрипсин в фермент-субстратном соотношении 1 : 50 (по весу) и инкубировали 4 ч при 37° С. Гидролизат лиофилизovali и разделяли на пептидном анализаторе на колонке (0,6×25 см) с аминексом А-5 в градиенте рН и концентраций пиридин-ацетатных буферов, как описано для фракции С-IV, со скоростью элюирования 24 мл/ч.

Триптический гидролиз пептидов G19 и G13. Пептид (0,25 мкмоль) суспендировали в 1,6 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,3, затем добавляли трипсин в соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу) и выдерживали при 37° С в течение 16 и 8 ч (для пептидов G9 и G13 соответственно). Гидролиз останавливали лиофилизацией. Полученную смесь пептидов разделяли на колонке (0,8×25 см) с Servachrom Si 100 С₈ как описано выше.

Триптический гидролиз пептида G20. К 0,1 мкмоль пептида в 1,0 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,3, добавляли трипсин в соотношении 1 : 100 (по весу) и гидролизovali 4 ч при 37° С. Гидролизат хроматографировали на колонке (0,8×130 см) с биогелем Р-4 в 30% уксусной кислоте с последующим разделением некоторых фракций методом пептидных карт на пластинках с тонким слоем целлюлозы. Первоначально проводили электрофорез в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5, при напряжении 1000 В в течение 1 ч, а во втором направлении — хроматографию в системе С.

Химотриптический гидролиз пептида G3. Пептид (0,030 мкмоль) в 0,2 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,3, инкубировали 4 ч при 37° С с химотрипсином при соотношении 1 : 50 (по весу). Гидролизат лиофильно высуши-

вали и подвергали деградации по методу Эдмана без предварительного разделения. Расщепление пептида G3 трипсином проводили в стандартных условиях (соотношение фермент — субстрат 1 : 50, 37° С, 4 ч). Гидролизат разделяли методом пептидных карт в тонком слое целлюлозы.

Аминокислотный анализ фрагмента Ф₁ и пептидов (условия гидролиза см. [1]) выполняли на аминокислотных анализаторах LKB 3201 (LKB, Швеция) и Biotronik LC 2000 (Biotronik, ФРГ).

N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом, описанным в работе [10], C-концевые — с помощью карбоксипептидазы Y [11].

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных, как описано в сообщении [12]. Для определения амидов глутаминовой и аспарагиновой кислот использовали методику Розо [13]. Деградацию пептидов по методу Эдмана с помощью реагента DABITC осуществляли по методу [14]. Для идентификации Dns- и 4-N,N-диметиламинобензол-4'-тиогидантоиновых производных аминокислот использовали хроматографию в тонком слое силикагеля и на полиамидных пластинках F 1700 (Schleicher und Schüll, ФРГ).

Автоматический метод Эдмана. Определение N-концевой аминокислотной последовательности проводили на твердофазном секвенаторе модели HPS-240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное присоединение 0,080 мкмоль пептида G9 к аминопропилстеклу осуществляли через ε-аминогруппы лизина с помощью *n*-фенилендиизотиоцианатного метода. Идентификацию Pth-производных аминокислот проводили хроматографией на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ), а также с помощью обратного гидролиза Pth-аминокислот в свободные аминокислоты 5,7 н. HCl с добавкой 0,1% SnCl₂ при 150° С в течение 4 ч и их анализа на аминокислотном анализаторе.

Авторы выражают благодарность Н. А. Лобанову за установление аминокислотной последовательности с помощью твердофазного секвенатора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Куприна Н. С., Ахрем А. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1307—1320.
2. Чащин В. Л., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Ахрем А. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1690—1692.
3. Akhrem A. A., Vasilevsky V. I., Adamovich T. B., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450. Amsterdam: North-Holland Biomed. Press, 1980, p. 57—64.
4. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Тимошенкова С. Д., Лапко А. Г., Ахрем А. А. Вестн АН БССР, сер. хим. наук, 1984, № 3, с. 89—97.
5. Strittmatter P. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 8, p. 2492—2497.
6. Crestfield A. M., Moore S., Stein V. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622—627.
7. Kawasaki I., Itano H. A. Anal. Biochem., 1972, v. 48, № 2, p. 546—556.
8. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Хозряков В. С., Тюрин В. В., Потопенко Н. А. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 180—195.
9. Липкин В. М., Макарова И. А., Гринкевич В. А., Азапкина И. Г., Потопенко Н. А., Тележинская И. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 747—775.
10. Gray W. R. In: Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. New York — London: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 121—138.
11. Hayashi R. In: Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. New York — London: Acad. Press, 1977, v. XLVII, p. 84—93.
12. Bruton C. J., Hartly B. C. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 165—178.
13. Roseau G., Pantel P. J. Chromatogr., 1969, v. 44, № 2, p. 392—395.
14. Chang J. Y., Braner D., Wittman-Liebold B. FEBS Lett., 1978, v. 93, № 2, p. 205—214.

Поступила в редакцию
12.IX.1984

PRIMARY STRUCTURE OF 20S, 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING
CYTOCHROME P-450 FROM BOVINE ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA.
II. STRUCTURAL INVESTIGATION OF THE PEPTIDES OBTAINED
ON HYDROLYSIS OF FRAGMENT F₁ WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
PROTEASE

CHASHCHIN V. L., LAPKO V. N., ADAMOVICH T. B., LAPKO A. G.,
KUPRINA N. S., KIRILLOVA N. M., AKHREM A. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk*

The fragment F₁ resulting from the limited tryptic hydrolysis of the native molecule of cytochrome P-450 has been digested with *Staphylococcus aureus* protease. 24 peptides, covering the whole polypeptide chain of fragment F₁, are isolated from the hydrolysate. Analysis of their amino acid sequence in combination with the earlier data on the structure of cytochrome P-450 chymotryptic peptides and fragment F₁ tryptic peptides permitted to carry out a reconstruction of large peptide blocks of fragment F₁ that comprise 252 amino acid residues.