



УДК 577.152.31*273'1 : 577.323.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ
PENICILLIUM CHRYSOGENUM 152A МЕТОДОМ
ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НЕФРАКЦИОНИРОВАННЫХ ПЕПТИДНЫХ
ГИДРОЛИЗАТОВ

Шляпников С. В., Безбородова С. И. *, Куликов В. А.,
Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

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

Проведен анализ первичной структуры гуанилспецифичной РНКазы *Penicillium chrysogenum* 152A по данным автоматической эдмановской деградации двух нефракционированных пептидных гидролизатов белка, полученных под действием стафилококковой протеиназы и трипсина. Эти данные вместе с результатами определения структур N- и C-концевых участков белка позволили установить полную аминокислотную последовательность РНКазы *P. chrysogenum*. РНКаза содержит 102 аминокислотных остатка: 2 His, 3 Arg, 7 Asp, 8 Asn, 5 Thr, 11 Ser, 4 Glu, 2 Gln, 4 Pro, 11 Gly, 13 Ala, 4 Cys, 8 Val, 3 Ile, 3 Leu, 9 Tyr, 5 Phe (M_r 10 747). Проведено сравнение структур гуанилспецифичных РНКаз грибов и выявлены области максимальной гомологии и вариабельности. Рассчитана вторичная структура РНКазы *P. chrysogenum*.

РНКазы микроорганизмов, объединяющие семейства РНКаз про- и эукариотического происхождения, вместе с панкреатическими РНКазами представляют собой две хорошо известные группы ферментов, подобных по функции, но различающихся структурой и специфичностью к основаниям нуклеотидов на 3'-конце гидролизуемой фосфодиэфирной связи. В настоящее время определена аминокислотная последовательность и прослежена молекулярная эволюция гомологичной серии более 36 панкреатических РНКаз [1, 2]. Для РНКаз микроорганизмов число ферментов с установленной первичной структурой более ограничено. В частности, в случае РНКаз грибов известны первичные структуры РНКазы T₁ из *Aspergillus oryzae* [3], РНКазы C₂ из *Asp. clavatus* [4], РНКазы M₂ из *Asp. sailtoi* [5], РНКазы U₂ из *Ustilago sphaerogena* [6], РНКазы Pb₁ из *Penicillium brevicompactum* [7] и РНКазы F₁ из *Fusarium moniliforme* [8]. Для некоторых из них проводятся исследования третичной структуры [9–11], необходимые, с одной стороны, для подтверждения и анализа степени взаимного родства РНКаз, с другой — для изучения молекулярной эволюции РНКаз, установления их взаимосвязи с РНКазами бактерий и актиномицетов и понимания структурных основ, механизма и специфичности ферментативного катализа.

В настоящей работе представлены результаты определения первичной структуры внеклеточной гуанилспецифичной РНКазы микроскопического гриба *Penicillium chrysogenum*, штамм 152A (РНКазы Pch₁; КФ 3.1.27.3).

Принцип расшифровки первичной структуры РНКазы Pch₁ исключает одну из наименее эффективных стадий всего процесса исследования — выделение индивидуальных пептидов. В основе принципа лежит методология анализа продуктов эдмановской деградации смесей пептидных фрагментов белка [7, 12–14], сформулированная применительно к исследованию аминокислотных последовательностей белков в общем виде Греем [15]. В настоящей работе проводится автоматическая деградация

Аминокислотный состав гуанилспецифичных РНКаз грибов, моль/моль белка

Аминокислота	РНКазы Pb_1 [7]	РНКазы Pch_1 [19]	Аминокислота	РНКазы Pb_1 [7]	РНКазы Pch_1 [19]	Аминокислота	РНКазы Pb_1 [7]	РНКазы Pch_1 [19]
Lys	2	1(0)	Glu	4	6*(4)	Met	0	0(0)
His	3	2(2)	Gln	1	6*(2)	Ile	4	2(3)
Arg	1	3(3)	Pro	4	4(4)	Leu	3	3(3)
Asp	7	15*(7)	Gly	10	11(11)	Tyr	9	9(9)
Asn	7	15*(8)	Ala	11	13(13)	Phe	5	5(5)
Thr	9	5(5)	Cys	4	4(4)	Trp	0	0(0)
Ser	11	13(11)	Val	7	8(8)			

* Суммарное содержание кислоты и амида. В скобках приведены данные настоящей работы (см. ниже рис. 3).

Таблица 2

Анализ продуктов эдмановской деградации СМ-РНКазы Pch_1

Цикл деградации	Аминокислота	Выход, нмоль	Методы идентификации	Цикл деградации	Аминокислота	Выход, нмоль	Методы идентификации
1	Ala	40	Г, А, Х	5	Thr	25	А, Г, Х
2	Cys(Cm)	30	А, Г, Х	6	Cys(Cm)	28	А, Г, Х
3	Ala	38	Г, А, Х	7	Gly	31	Г, А, Х
4	Ala	39	Г, А, Х	8	Ser	25	А, Г, Х

Примечание. Выход аминокислот приведен по первому из перечисленных методов идентификации: А — аминокислотный анализ, Г — газовая хроматография, Х — хроматография в тонком слое.

по Эдману двух нефракционированных смесей пептидов, полученных при гидролизе РНКазы стафилококковой протеиназой и трипсином.

Исходной предпосылкой при выборе стратегии определения аминокислотной последовательности РНКазы Pch_1 являлась ее несомненная гомология с другими филогенетически родственными гуанилспецифичными РНКазами грибов, в первую очередь с РНКазой *Penicillium brevicompactum* Pb_1 , что подтверждается близостью аминокислотных составов ферментов (табл. 1), сходством структуры активных центров и механизма функционирования [16—18].

Исследование кинетики гидролиза S-карбоксиметилированной РНКазы Pch_1 (СМ-РНКазы) под действием карбоксипептидазы Y (рис. 1) свидетельствует о С-концевой аминокислотной последовательности белка — Phe-Val-Ala-Cys(Cm)-Asp. В РНКазе Pb_1 С-концевым остатком является Thr [7]. Очевидное различие в РНКазах пенициллов прослеживается в содержании в белках остатков His, Thr и Ile и, что особенно важно для дальнейшего рассмотрения, остатков Arg и Lys.

Стратегия расшифровки первичной структуры РНКазы Pch_1 в настоящей работе предусматривает применение максимально формализованного подхода, при котором предварительная информация о структуре белка используется в минимальной степени. Тем не менее, поскольку в основе метода лежит анализ пептидных смесей, полученных при гидролизе РНКазы трипсином и стафилококковой протеиназой, локализация в первичной структуре белка остатков Arg и Lys, так же как и остатков Glu, представляет существенный интерес.

Согласно предварительным (неопубликованным) данным С. И. Безбородовой, предполагалось, что аминокислотная последовательность 10 N-концевых остатков РНКазы Pch_1 идентична РНКазе Pb_1 , за исключением единственной замены остатка Thr⁸ РНКазы Pb_1 остатком Lys⁸ в РНКазе Pch_1 . Поэтому для получения более простой смеси пептидов про-

Выход, нмоль

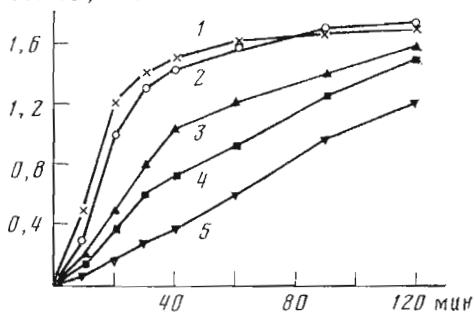


Рис. 1. Кинетика гидролиза SM-РНКаза Pch_1 карбоксипептидазой Y. Условия: 0,05 М этилморфолин-ацетат, 1% додецилсульфат натрия, pH 5,5; соотношение фермент — субстрат 1 : 100. 1 — Asp, 2 — Cys(Cm), 3 — Ala, 4 — Val, 5 — Phe

теолиз РНКаза трипсином проводили в реакционной ячейке секвенатора на препарате SM-белка, предварительно подвергнутом восьми полным циклам автоматической деградации по Эдману, — дез-(1-8)-РНКаза. Результаты секвенирования интактного белка (табл. 2) однозначно позволяют идентифицировать на 8-м цикле эдмановской деградации остаток Ser⁸.

При протеолизе SM-РНКаза Pch_1 стафилококковой протеиназой в данном случае учитывалась специфичность фермента, опробованная ранее на РНКаза Pb_1 [7]. Для повышения выхода пептидов гидролиз РНКаза Pch_1 стафилококковой протеиназой сравнительно с РНКазой Pb_1 (для РНКаза Pb_1 выход пептидов варьировал от 40 до 100%) проводили в более жестких условиях при соотношении фермента к субстрату 1 : 30 (для РНКаза Pb_1 1 : 50 [7]).

Результаты автоматического секвенирования пептидных гидролизатов РНКаза и дез-(1-8)-РНКаза Pch_1 представлены в табл. 3.

В триптическом гидролизате дез-(1-8)-РНКаза Pch_1 эдмановской деградации подвергаются четыре пептидные цепи, что соответствует наличию в белке трех остатков Arg, идентифицированных на 14, 20 и 33-м циклах секвенирования. Средний постадийный выход при эдмановской деградации белка и продуктов триптического расщепления дез-(1-8)-РНКаза (по результатам анализа стабильных фенилтиогидантоиновых производных аминокислот) составляет ~97% (рис. 2). Анализ абсолютного выхода аминокислот свидетельствует вместе с тем о практически количественном гидролизе полипептидной цепи дез-(1-8)-РНКаза трипсином. Этот факт подтверждается также последовательным сокращением набора секвенируемых пептидов в составе исследуемой смеси после отщепления С-концевых остатков Arg. В то же время уменьшение числа секвенируемых пептидов на 1, 6, 9—11 и 22-й стадиях эдмановской деградации представляется какжающимся, так как, по данным количественного анализа, во всех перечисленных случаях наблюдается двукратный (в цикле 11, по-видимому, трехкратный) выход какой-либо из аминокислот (табл. 3, рис. 2).

Таким образом, при проведении эдмановской деградации интактного белка и последующем секвенировании триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКаза Pch_1 удается идентифицировать 101 аминокислотный остаток, что, с привлечением данных протеолиза РНКаза карбоксипептидазой Y (С-концевой остаток Asp¹⁰²), охватывает всю полипептидную цепь фермента, состоящую из 102 остатков аминокислот.

РНКаза Pch_1 содержит четыре остатка Glu, идентифицированных на 3, 13, 15 и 31-м циклах секвенирования триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКаза. Предполагая абсолютную специфичность стафилококковой протеиназы к остаткам Glu, мы ожидали, что соответствующий гидролизат РНКаза Pch_1 , как и в случае РНКаза Pb_1 [7], должен содержать не более пяти пептидов. Однако эдмановская деградация смеси пептидов, полученных при протеолизе РНКаза Pch_1 , показывает, что состав гидролизата более сложен (табл. 3). Анализ фенилтиогидантоиновых производ-

* Остаток Lys в первичной структуре РНКаза Pch_1 не обнаружен.

Анализ продуктов эдмановской деградации пептидных гидролизатов СМ-РНКазы Pch₁ и дез-(1-8)-СМ-РНКазы Pch₁

Циклы деградации	Выход аминокислот, ммоль														
	Гидролизат дез-(1-8)-РНКазы трипсином				Гидролизат РНКазы стафилококковой протеиназой										
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	
1	Val 56Г	Asn 18А	Ser 24А	Ala 62Г	Leu 49Г	Tyr 18Г	Gly 20Г	Phe 21Г	(Ala/Tyr) 14Г	Leu 9Г	Ala 1Б	Leu 18Г	Phe 46Г	Tyr 32Г	Gly 4Г
2	Cys(Cm) 20А	Tyr 23Г	Gly 20Г	Cys(Cm) 1, X 41Г	Gly 15Г	Tyr 6Г	Arg A, X	Phe 31Г	Gly 45Г	Ala 10Г	Cys 2Б	Tyr 19Г	Pro 17Г	Arg 33Г	Phe 5Г
3	Tyr 29Г	Glu 27А	Ala 25Г	Ala 41Г	Tyr 10Г	Ser 1, X 48Г	Asn X	Asp 40А	Tyr 16Г	Gly 14Г	Ala 3Б	Ser 20Г	Ile 18Г	Asn 4Г	Asp 6Г
4	Thr 14А	Gly 19Г	Val 25Г	Ala 47Г	Asp 8А	Tyr 48Г	Phe 25Г	Leu 17Г	Asp 17Г	Val 12Г	Ala 4Б	Ala 21Г	Leu 19Г	Tyr 2Г	Phe 7Г
5	Ser 18А	Phe 17Г	Tyr 19Г	Thr 45А	Leu 13А	Asn 3А	Glu 10А	Pro 19Г	Leu 18Г	Ile 13Г	Thr 5Б	Asn 22Г	Arg 20Г	Glu 3Г	Pro 8Г
6	Ser 40А	Asp 35А	Asn X	Cys(Cm) 1, X 33Г	Tyr 8Г	Asp 5А	Val 26Г	Ser 1, X 2А	Tyr 19Г	Thr 14Г	Cys 6Б	Asp 23Г	(Ser/Val) 1Г	(Ser/Val) 9Г	(Ser/Val) 9Г
7	Ala 22Г	Phe 16Г	Gly 14Г	Gly 33Г	Ser 20А	Asp 6А	His A	Thr 3А	(Ser/Gly) 20Г	His 15Г	Gly 7Б	Asp 24Г	Gly 2Г	Ser 10Г	Ser 10Г
8	Ile 18Г	Pro 19Г	Asn 15А	Ser 1, X 52Г	Ala 32Г	Val 7Г	Gly 19А	Thr 3А	Ala 21Г	Thr 16Г	Ser 8Б	Val 25Г	Ala 3Г	Gly 11Г	Gly 11Г
9	Ser 40А	Val 22Г	Leu 16Г	Val 52Г	Asn 7А	Ser 4А	Thr 10А	Gly 4Г	Asn 22Г	Gly 17Г	Gly (Val/Ser/Asn) 1Г	Ser (Thr/Val/Gly) 26Г	Ser (Thr/Val/Gly) 4Г	(Thr/Val) 12Г	(Thr/Val) 12Г

Таблица 3 (продолжение)

Цикл деградации	Выход аминокислот, нмоль													
	Гидролизат дез-(1-8)-РНКазы трипсином					Гидролизат РНКазы стафилококковой протеиназой								
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)							
10	Ala 33Г	Ser 1Г, X	Pro 14Г	Cys(Cm) 1Г, X	Asp 15А	Asn X	Tyr 25Г	Ala 5Г	Asp 23Г	Ala 18Г	Cys 2Г	Asn 27Г	Tyr 5Г	(Tyr/Asp) 13Г
11	Ala 46Г	Gly 10Г		Tyr 36Г	Asp 11А	Ser 11А			Asp 24Г	(Tyr/Ser) 19Г	Tyr 3Г	Tyr 28Г	(Ser/Asp) 6Г	Tyr 14Г
12	Gln 10А	Thr 10А	Ala 18Г	Thr 9А	Val 10Г	Pro 4Г	Glu 5А	Gly 19А	Val 25Г	Gly 20Г	Thr 4Г	Pro 29Г	Gly 7Г	Glu 15Г
13	Glu 15А	Tyr 18Г	Asp 15А	Ser 15А	His А	Asn 14А	Phe 5Г		Ser 26Г	Asn 21Г	(Ser/Phe) 5Г	His 30Г	Asn 8Г	Phe 16Г
14	Ala 19Г	Tyr 14Г	Arg А, X	Ser 24А	Asn 16А	Glu 2А	Pro 4Г		Asn 27Г	Asn 22Г	(Ser/Asn) 6Г	Glu 31Г	Ser 9Г	Pro 17Г
15	Gly 7Г	Gln 12А	His А, X	Ala 25Г	Tyr 6Г	Pro 10Г	Phe 3Г	Ile 6Г	Tyr 28Г	Phe 23Г	Ala 7Г		Pro 10Г	Ile 18Г
16	Tyr 13Г	Phe 12Г	Thr 8А	Ile 22А	Pro 8Г	Gly 11А	Val 2Г	Leu 4А	Pro 29Г	Val 24Г	Ile 8Г		Gly 11Г	Leu 19Г
17	Asp 10А	Pro 9Г	Gly 8Г	Ser 1Г, X	His А	Ala 16Г	Arg А		His 30Г	Ala 25Г	Ser 9Г		Ala 12Г	Arg 20Г
18	Leu 12А	Ile 8А	Ala 9Г	Ala 18Г	Gln 3А	Asp 15А	Cys(Cm) 1Г, X	Ser 1Г, X	Glu 31Г	Cys 26Г	Ala 10Г		Asp 13Г	Ser 1Г
19	Tyr 7Г	Leu 10Г	Ser 7А	Ala 14Г	Tyr 3А	Arg А	Gly 3Г		Tyr 32Г		Ala 11Г		Arg 14Г	Gly 2Г
20	Ser 11А	Arg А	Gly 8Г	Gln 3А	Arg А	Val 14Г	Ala 3Г		Arg 33Г		Gln 12Г		Val 1Г	Ala 3Г
21	Ala 12Г	Asn 8А		Glu 2А	Asn 2А	Val 19Г			(Asn/Val) 1Г		Gln 13Г		Val 2Г	(Asn/Val) 4Г
22	Asn 13А			Phe 11Г	Tyr 3А				Tyr 2Г				(Tyr/Phe) 3Г	(Tyr/Phe) 5Г

Таблица 3 (окончание)

Цикл деградации	Выход аминокислот, нмоль		Последовательность аминокислот в пептидах гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой						
	Гидролизат дез-(1-8)-РНКазы трипсином		Гидролизат РНКазы стафилококковой протеиназой						
			(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)
23	Asp 9A	Phe 7Г	Asn 10A				Asn 4Г		
24	Asp 10A	Val 6Г	Gly 8A				Gly 5Г		
25	Val 8Г	Ala 7Г	Asn 7A				Asn 6Г		
26	Ser Г, X	Cys (Cm) Г, X	Asp 8A				Asp 7Г		
27	Asn 2A		Gln 5A				Gln 8Г		
28	Tyr 6Г		Leu 6Г				Leu 9Г		
29	Pro 4Г		Ala 4Г				Ala 10Г		
30	His A, X		Gly 3Г				Gly 11Г		
31	Glu 2A		Val 4Г				Val 12Г		
32	Tyr 3A		Ile 2A				Ile 13Г		
33	Arg A, X								

Примечание. Выход аминокислот (за вычетом фона) определен по приведенному методу идентификации (см. табл. 2). Цифры с буквами Т и В обозначают номера циклов эдмановской деградации триптического (Т) гидролизата дез-(1-8)-РНКазы и интактного белка (В), сопоставленного с данным циклом секвенирования гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой. Величина аминокислотного фона для каждой из аминокислот представляла собой сумму двух параметров: а) общего «химического шума», принятого равным при идентификации методами А и Г соответственно 4 и 2 нмоль; б) фона «остаточных» аминокислот, составляющего 10% от количества соответствующей аминокислоты, определенного в предшествующем цикле секвенирования.

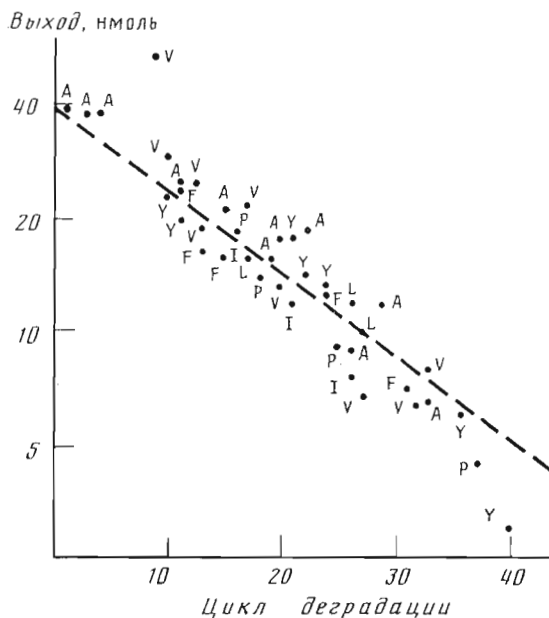


Рис. 2. Выход аминокислот при эдмановской деградации СМ-РНКазы Pch_1 (циклы 1, 3, 4) и триптического гидролизата дез-(1-8)-СМ-РНКазы Pch_1 . Использован однобуквенный код аминокислот

ных аминокислот на 2, 3 и 5-й стадиях секвенирования гидролизата РНКазы Pch_1 стафилококковой протеиназой свидетельствует о наличии в гидролизате как минимум семи пептидов. В этой связи представляет интерес анализ N-концевых аминокислот в пептидном гидролизате. Сопоставление аминокислот, идентифицированных на 1-м цикле эдмановской деградации гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой, с аминокислотами, найденными в составе 4, 14, 16 и 32-го циклов секвенирования триптического гидролизата дез-(1-8)-белка, показывает, что среди пяти N-концевых аминокислот пептидов гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой только остатки Leu отсутствуют на стадиях секвенирования триптического гидролизата, следующих за Glu-содержащими стадиями. Отсюда очевидно наличие дополнительного расщепления стафилококковой протеиназой полипептидной цепи РНКазы Pch_1 как минимум по N-концевым связям остатков Leu.

РНКаза Pch_1 содержит три остатка Leu, которые идентифицированы при эдмановской деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы на стадиях 9, 18 и 19. Среди связей РНКазы Pch_1 типа X-Leu, где X может быть Ile, Asn, Gln или Pro (см. 8-й цикл деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы), с одной стороны, Asp, Pro или Gly — с другой (цикл 17), и Leu, Ile или Ala (цикл 18) — с третьей, наиболее вероятным представляется гидролиз протеиназой связей Asp-Leu и Asn/Gln-Leu (последней особенно в том случае, если соответствующие остатки аминокислот частично дезамидированы) [20–24].

Вместе с тем при эдмановской деградации гидролизата РНКазы Pch_1 стафилококковой протеиназой обнаружено шесть остатков Arg (циклы 2, 5, 16, 17, 19 и 20) и пять остатков Glu (циклы 5, 12, 14, 18 и 21), что является, по-видимому, следствием неполного локального расщепления полипептидной цепи белка и сопровождается существенной дисперсией в величинах выхода производных аминокислот.

Исходя из представленных результатов, алгоритм расшифровки аминокислотной последовательности РНКазы Pch_1 включал анализ состава и количественного содержания фенилтиоимидантоиловых производных аминокислот на последовательных стадиях эдмановской деградации пептидного гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой сравнитель-

но с таким же анализом для соответственно следующих друг за другом циклов деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-белка, которые непосредственно примыкают к Glu-содержащим циклам: 1-й цикл эдмановской деградации гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой сравнивался с 4, 14, 16 и 32-м циклами секвенирования триптического гидролизата, 2-й — соответственно с 5, 15, 17 и 33-м и т. д. При этом при анализе аминокислотного состава первых 8 циклов эдмановской деградации гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой привлекаются также соответствующие данные N-концевой аминокислотной последовательности белка, полученные при 8 циклах секвенирования intactной СМ-РНКазы. В дальнейшем структура N-концевого пептида РНКазы вытекает из сравнительного рассмотрения аминокислотных составов 9-го цикла секвенирования гидролизата белка стафилококковой протеиназой относительно 1-го цикла деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы соответственно 10/2, 11/3... После идентификации в составе исследуемой стадии эдмановской деградации гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой остатков Arg в анализ последующей стадии дополнительно включаются данные секвенирования триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы, начиная с 1-го цикла деградации.

Поскольку в состав N-концевых аминокислотных остатков пептидов гидролизата РНКазы *Pch*, стафилококковой протеиназой входит остаток Leu, отсутствующий в составе смеси фенилтиогидантоиновых производных аминокислот при эдмановской деградации триптических пептидов на стадиях 4, 14, 16 и 32, в анализ структуры пептидов гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой на 1-м цикле секвенирования включены также производные аминокислот, идентифицированные на двух Leu-содержащих стадиях деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы, а именно на стадиях 9 и 18, на 2-м — 10 и 19 и т. д. В соответствии с общим числом пептидов, входящих в состав гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой, а также полагая маловероятным гидролиз РНКазы *Pch*, стафилококковой протеиназой по связям Leu-, Ile- или Ala-Leu (циклы 18 и 19 деградации триптических пептидов дез-(1-8)-РНКазы), при совместном исследовании структур пептидов двух гидролизатов РНКазы (см. табл. 3) исключен анализ аминокислот на 1/19 и последующих циклах секвенирования гидролизатов белка стафилококковой протеиназой и трипсином.

Дополнительная информация, необходимая для расшифровки первичной структуры РНКазы *Pch*, вытекает из рассмотрения С-концевой аминокислотной последовательности белка (см. рис. 1).

Результаты анализа структур пептидов, полученных при гидролизе РНКазы *Pch*, стафилококковой протеиназой, суммированы в табл. 3. Прежде всего следует отметить, что пептиды (III) и (II) представляют собой соответственно N- и С-концевые фрагменты белка. В свою очередь, как вытекает из данных исследования кинетики гидролиза РНКазы карбоксипептидазой Y (рис. 4), С-концевым остатком пептида (II) является неидентифицированный при эдмановской деградации двух пептидных гидролизатов белка остаток Asp¹⁰², непосредственно следующий за остатком Cys¹⁰¹ (циклы 18/26 деградации гидролизатов стафилококковой протеиназой и трипсином).

Обращает на себя внимание перекрывание структур некоторых пептидов: пептиды (IV) и (VI) дублируют частично аминокислотную последовательность пептида (I), пептид (VII) — пептида (V), а пептид (V) — пептида (II). Перекрывание структур само по себе обеспечивает стыковку пептидов при реконструкции аминокислотной последовательности белка. Так, очевидно, что с учетом взаимного частичного перекрывания структур пептид (VII) в полипептидной цепи белка предшествует пептиду (V) и далее С-концевому пептиду РНКазы — пептиду (II). Вместе с тем отсутствие совпадений в «рамках считывания» первичных структур пептидов гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой, задаваемых локализацией «ренерных» остатков аминокислот (Glu и Leu) при секвенировании триптического гидролизата дез-(1-8)-белка, достаточно

для определения взаимного порядка расположения всех пептидов: (III) — (I), (IV)/(VI) — (VII)/(V)/(II).

Определение структур пептидов гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой позволяет более детально проследить и конкретизировать на данном примере специфичность протеиназы. Из шести пептидных связей, расщепляемых в молекуле РНКазы *Pch*₁ стафилококковой протеиназой, только две связи остатков Glu гидролизуются с практически количественным выходом: Glu²¹-Ala²² и Glu⁴⁴-Gly⁴⁵. Аминокислотная последовательность пептидов (I) и (VII) наряду с наличием пептидов (VI) и (V) свидетельствует о неполном расщеплении в белке связей Glu³⁹-Tyr¹⁰ и Glu⁵³-Phe⁵⁷. Ориентировочная оценка степени гидролиза составляет в последних двух случаях ~60%. Гидролиз аналогичных связей стафилококковой протеиназой в РНКазе *Pb*₁ при меньшем фермент-субстратном отношении протекает лишь на 40% [7]. Подобный эффект, по-видимому, является следствием ингибирования гидролиза стафилококковой протеиназой объемистыми остатками гидрофобных аминокислот, которые непосредственно участвуют в образовании гидролизуемой пептидной связи. Альтернативное объяснение может быть связано с близостью к гидролизуемым связям остатков Pro (особенно остатка Pro⁵⁸) или положительно заряженных остатков His³⁸ и Arg⁴¹ [20–24].

Совместный анализ аминокислотных последовательностей пептидов (I)/(IV) и (V)/(II) показывает минорное расщепление стафилококковой протеиназой связей Asp²⁵-Leu²⁶ и Gln⁸³-Leu⁸⁴ (пептиды (IV) и (II)), причем если способность протеиназы к гидролизу пептидных связей со стороны карбоксильной группы остатков Asp описана в литературе [21, 23], то при расщеплении связи Gln-Leu наиболее вероятно предположение о частичном дезамидировании остатка Gln⁸³ в исходном препарате белка.

Согласно данным табл. 3, лишь структуры пептидов (IV) и (VI) однозначно вытекают из сравнительного анализа продуктов эдмановской деградации интактного белка и двух исследуемых гидролизатов. В то же время идентификация аминокислот в некоторых позициях первичной структуры пептидов затруднена, и возможно несколько вариантов. Интерпретация результатов в таких случаях предполагает проведение количественного анализа аминокислот, идентифицированных в первичных структурах всех пептидов гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой на одноименной стадии секвенирования триптического гидролизата дез-(1-8)-белка (см. табл. 3). В частности, исследование структур пептидов (I) и (VI) на 21-м и 3-м циклах эдмановской деградации, так же как пептидов (V) и (VII) на 6-м и 18-циклах секвенирования (1-й цикл эдмановской деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы), позволяет исключить неопределенность в идентификации аминокислот в позициях 21 и 6 пептидов (I) и (V) (Asn и Ser соответственно). Эти результаты вместе с данными 20-го цикла секвенирования для пептида (V) и количественным анализом аминокислот 1-го цикла эдмановской деградации триптического гидролизата дез-(1-8)-РНКазы, в свою очередь, обеспечивают очевидную приоритетность остатка Val в позиции 9 пептида (III) при ранее неоднозначной интерпретации (Val/Ser/Asn).

Аналогичное решение неопределенностей при идентификации аминокислотных остатков в пептидах (III) (Ser в циклах 13 и 14), (VII) (Thr/9, Tyr/10, Val/21, Tyr/22), (II) (Ser/11), (I) (Ala/1, Ser/7) и (V) (Val/9, Ser/11, Phe/22) приводит к однозначной расшифровке полной первичной структуры белка (рис. 3).

Оценка настоящего метода анализа аминокислотной последовательности РНКазы *Pch*₁ показывает рациональность выбранной стратегии, позволяющей установить первичную структуру белка в минимально сжатые сроки с использованием минимального количества белка. Решение поставленной задачи, по-видимому, облегчалось сравнительной простотой объекта исследования, что открывало возможность проведения анализа без применения вычислительной техники и обеспечивало также высокую эффективность процесса автоматического секвенирования пептидных смесей при наличии низкого артефактного фона.



Рис. 3. Аминокислотная последовательность гуанилсепцифичной РНКазы *Pch₁*. Вертикальные стрелки — места расщепления белка стафилококковой протеиназой. I—VII — установленные структуры пептидов гидролизата РНКазы стафилококковой протеиназой; VIII — данные исследований кинетики гидролиза РНКазы карбоксипептидазой Y

РНКазы	10	20	30	40	50	
<i>Pch</i> ₁	ACAATCGSV	CYTSSA	ISAAQELAGY	DLYSANDDV-SN-YPHLYRN	YEGFDFFVSGTYIEFP	
<i>Pb</i> ₁	ACAATCGTV	CVYTSSA	ISSAQAAGYN	LYSTNDLV-SN-YPHEIHN	YEGFDFFVSGTYIEFP	
<i>T</i> ₁	ACDYTCGS	NCYSSSD	VSTAQAAGY	QLHEDGETVGS	NSYPHKYNNYEGFDFFVSSPPYIEWP	
<i>C</i> ₂	DCDYTCGS	HCYSASAM	SDAQSAQY	QLESAGQSVGR	SRYPHQYRN	YEGFNFPPVSGNYIEWP
<i>F</i> ₁	ESATTCGS	TNYSASQV	RAANAACQ	YYQNDD	SAGSTTYPH	TYNNYEGFDFFVVDGPYQIEFP

	60	70	80	90	100
<i>Pch</i> ₁	ILRSCAVY	SCNSPGAD	RVVFNGND	QLAGVITHT	GASGNMFVACD
<i>Pb</i> ₁	ILKSGKVY	YGSSPGAD	RVVFNDDEL	LAGVITHT	GASGNMFVACT
<i>T</i> ₁	ILSSGDVY	SGPGSGAD	RVVFENNQ	LAGVITHT	GASGNMFVECT
<i>C</i> ₂	ILSSGSTY	NGGPGAD	RVVFNDNDEL	AGLITHT	GASGDFVACY
<i>F</i> ₁	IKSGG	VYTGSPGAD	RVVINTNCE	YAGAITHT	GASGNMFVCCSNTG

Рис. 4. Сравнение первичных структур гуанилсепцифичных РНКаз грибов. Для получения максимальной гомологии в аминокислотные последовательности РНКаз *Pch₁*, *Pb₁* и *F₁* введены делеции (прочерк). Инвариантные остатки, включая консервативные замены, заключены в рамки. Приведена нумерация остатков по первичной структуре РНКазы *Pch₁*

Перспективность применения подобной методики к анализу первичных структур других белков определяется в первую очередь выбором способов селективной фрагментации полипептидной цепи. Критерием рациональности того или иного типа расщепления белка является в конечном итоге суммарное число необходимых для анализа всей структуры стадий деградаций по Эдману. Современное развитие метода эдмановской деградации, его приборное и технологическое оснащение, наконец, автоматизация всего процесса с привлечением высокочувствительного анализа аминокислот жидкостной хроматографией и машинной обработкой

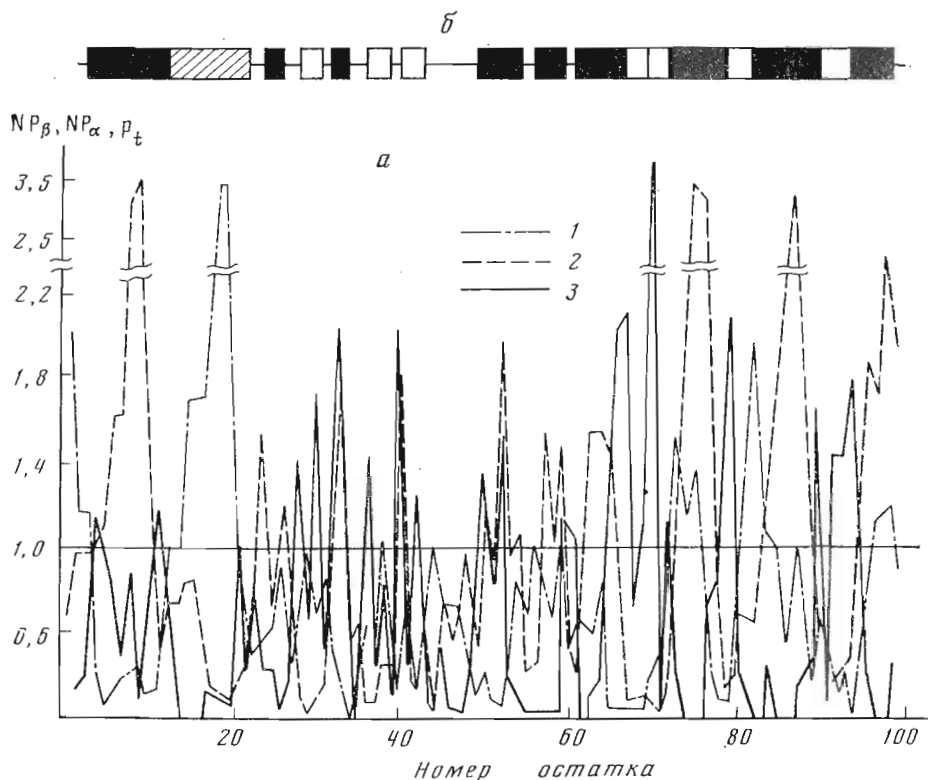


Рис. 5. Расчет вторичной структуры РНКазы *Pch*₁. а — произведения конформационных потенциалов (NP_α , NP_β) аминокислотных остатков (1 — α -спираль, 2 — β -структура) и вероятности β -поворотов (3 — p_t) в тетрапептидах РНКазы *Pch*₁. Горизонтальная линия определяет граничные условия предсказания элементов упорядоченной структуры. б — локализация в полипептидной цепи РНКазы β -поворотов, β -структур и α -спиралей (соответственно светлые, зачерненные и заштрихованные участки), предсказываемая расчетным методом

результатов позволяют надеяться на успешную адаптацию предложенной методологии в дальнейших исследованиях первичных структур белков.

РНКазы *Pch*₁ содержит 102 аминокислотных остатка (M_r 10 747) и подобна другим внеклеточным гуанилспецифичным РНКазам грибов; все они обладают четко выявленной гомологией в последовательности аминокислот (рис. 4) *. РНКазы содержат по четыре полуцистинных остатка, причем если в РНКазе аскомицетов все остатки цистеина (Cys^2 , Cys^6 , Cys^{10} и Cys^{101}) инвариантны, то в случае РНКазы *F*₁ консервативными являются лишь остатки Cys^6 и Cys^{101} , тогда как два других остатка цистеина РНКазы *F*₁ (Cys^{24} и Cys^{82}) заменены в гомологичных белках соответственно остатками Тир или Асп/Асн.

В РНКазе *Pb*₁, *T*₁ и *C*₂ остатки Cys^2 и Cys^{10} , а также Cys^6 и Cys^{101} связаны попарно дисульфидными связями [7, 9–11], которые по-видимому, можно уверенно прогнозировать для РНКазы *Pch*₁. Подобная связь, очевидно, существует и между остатками Cys^6 и Cys^{101} РНКазы *F*₁, что в таком случае предполагает функциональную уникальность Cys^6 — Cys^{101} дисульфидного мостика в гуанилспецифичных РНКазе грибов. Здесь уместно отметить существенно большую сравнительно со связью Cys^2 — Cys^{10} РНКазы *T*₁ стабильность связи S—S между остатками Cys^6 и Cys^{101} к восстанавливающим агентам и необходимость ее для поддержания каталитически активной конформации фермента [25].

Другие наиболее протяженные консервативные участки аминокислотных последовательностей гуанилспецифичных РНКаз грибов включают

* Здесь и далее нумерация всех РНКаз проводится по первичной структуре РНКазы *Pch*₁.

в себя остатки His³⁸, Tyr⁴⁰, Asn⁴², Tyr⁴³, Glu⁵⁶, Arg⁷⁵ и His⁹⁰ активного центра РНКазы [9–11]. Вариабельность остатка 41 в четырех сравниваемых РНКазах свидетельствует в пользу того, что при специфическом «узнавании» гуанилового основания нуклеотида ферментами, обеспечиваемом взаимодействием NH-группы остатка 41 полипептидной цепи белка с О6-атомом субстрата [10–11], структура бокового радикала остатка 41 не является критичной.

Уровень гомологии РНКазы *Pch*₁ с РНКазами *Pb*₁, *T*₁, *C*₂ и *F*₁ составляет соответственно 86, 70, 65 и 57%.

Расчет вторичной структуры РНКазы *Pch*₁ по методу Чоу и Фасмана [26] позволяет дифференцировать в структуре белка несколько коротких элементов β-структуры, в основном в С-концевой половине молекулы, несколько β-поворотов и один α-спиральный участок (рис. 5). Принимая во внимание наличие в РНКазе *Pch*₁ двух внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys²—Cys¹⁰ и Cys⁶—Cys¹⁰¹), ограничивающих, по-видимому, вероятность прогнозирования β-структуры в N- и С-концевых локусах фермента, расчетные предсказания вторичной структуры белка коррелируют в целом с результатами рентгеноструктурного анализа РНКаз *T*₁ и *C*₂ [9–11].

Расчет вторичных структур гуанилспецифичных РНКаз грибов наряду с данными рентгеноструктурных исследований предполагает в то же время характерное структурное отличие РНКаз пенициллов от РНКаз аспергиллов, заключающееся в размере α-спирального участка в концевом сегменте молекул. Согласно результатам расчета, α-спираль РНКазы *Pch*₁, так же как и РНКазы *Pb*₁, существенно короче аналогичной α-спирали в РНКазах *C*₂ и *T*₁ [27]. Кристаллографический анализ РНКазы *Pb*₁, проводимый в настоящее время, позволит в дальнейшем подтвердить или опровергнуть расчетные данные.

Экспериментальная часть

РНКазы *Pch*₁ выделена из гриба *P. chrysogenum*, штамм 152А [19], восстановлена и карбоксиметилирована согласно работе [28].

Протеолиз РНКазы стафилококковой протеиназой V8 и трипсином проводили в 0,1 М этилморфолин-ацетатном буфере, pH 8,1, при 37°С в течение 8 и 4 ч и конечном весовом соотношении фермент — субстрат 1:30 и 1:50 соответственно. В последнем случае протеолиз проводили в реакционной ячейке секвенатора на препарате РНКазы, предварительно подвергнутом восьми полным циклам автоматической эдмановской деградации. Ферменты добавляли двумя равными порциями через 2 ч. Гидролизаты высушивали в ячейке секвенатора. Кинетика гидролиза РНКазы карбоксипептидазой Y прослеживалась при анализе аликвот реакционной смеси (0,5 М этилморфолин-ацетат, pH 5,5, в присутствии 1% додецилсульфата натрия; соотношение фермент — субстрат 1:100) на аминокислотном анализаторе LC 7000 (Biotronik, ФРГ).

Автоматическую деградацию по Эдману проводили на секвенаторе Beckman 890С (США) в соответствии с модифицированной 0,1 М квадратной программой с полибренном, предварительно подвергнутому пяти циклам секвенирования [7].

Идентификацию производных аминокислот осуществляли методами газожидкостной [29] и тонкослойной хроматографий [30], а также аминокислотным анализом после обратного гидролиза производных 6 н. HCl при 150°С в течение 24 ч. Продукты эдмановской деградации конвертировали в 4 н. HCl [31]. Фенилтиогидантоин норлейцина вводили в качестве внутреннего стандарта при количественном анализе выхода продуктов автоматического секвенирования.

В работе использовали реагенты и растворители для эдмановской деградации фирмы Beckman.

Предсказание вторичной структуры РНКазы *Pch*₁ проводили по модифицированному методу Дюфтона и Хайдера [32] согласно численным значениям конформационных параметров аминокислотных остатков Чоу и Фасмана [26]. Алгоритм предсказания описан ранее [27].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lenstra J. A., Hofsteenge J. J., Beintema J. J.* J. Mol. Biol., 1977, v. 109, № 2, p. 183-193.
2. *Beintema J. J., Gastra W., Lenstra J. A., Welling G. W., Fitch W. M.* J. Mol. Evol., 1977, v. 10, № 1, p. 49-71.
3. *Takahashi K. J.* Biol. Chem., 1965, v. 240, № 10, p. 4117-4119.
4. *Безбородова С. И., Ходова О. М., Степанов В. М.* Биорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1136-1138.
5. *Watanabe H., Ohgi K., Irie M. J.* Biochem., 1982, v. 91, № 5, p. 1495-1509.
6. *Sato S., Uchida T.* Biochem. J., 1975, v. 145, № 2, p. 353-360.
7. *Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. Н.* Биорган. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 334-345.
8. *Hirabayashi J., Yoshida H.* Biochem. Internat., 1983, v. 7, № 2, p. 255-262.
9. *Поляков К. М., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн Б. К.* Докл. АН СССР, 1983, т. 273, № 6, с. 1383-1386.
10. *Hill G., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsui Y., Nakamura K., Borisov V., Tischenko G., Polyakov K., Pavlovsky S.* Trends in Biochem. Sci., 1983, v. 8, № 10, p. 364-369.
11. *Heinemann U., Saenger W.* Naturc., 1982, v. 299, № 2872, p. 27-31.
12. *Spies J., Rivier J., Thorner M., Vale W.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 24, p. 6037-6040.
13. *Heinemann F. S., Ozols J. J.* Biol. Chem., 1982, v. 257, № 24, p. 14988-14999.
14. *Липкин В. М., Алданова Н. А., Фейгина М. Ю., Жукулина Е. Б., Виноградова Е. И.* Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 410-413.
15. *Gray W. R.* Nature, 1968, v. 220, № 5174, p. 1300-1304.
16. *Yakovlev G. I., Karpeisky M. Yu., Bezborodova S. I., Beletskaja O. P., Sakharovskiy V. G.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 75-85.
17. *Карпейский М. Я., Яковлев Г. Н., Ботт В., Ежов В. А., Приходько А. Г.* Биорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1335-1347.
18. *Безбородова С. И., Безбородова А. М.* В кн.: Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979, с. 92-145.
19. *Безбородова С. И., Белецкая О. П., Грищенко В. М.* Биохимия, 1977, т. 42, № 9, с. 1556-1566.
20. *Houmard J., Drapeau G. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 12, p. 3506-3509.
21. *Austen B. M., Smith E. L.* Biochem and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 72, № 2, p. 411-417.
22. *Drapeau G. R., Boily Y., Houmard J. I.* Biol. Chem., 1972, v. 247, № 20, p. 6720-6726.
23. *Мясников А. Н., Шляпников С. В.* Биорган. химия, 1980, т. 6, № 4, с. 529-541.
24. *Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Потапенко Н. А.* Биорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 180-196.
25. *Hayakawa S., Takahashi K. J.* Biochem., 1973, v. 74, № 6, p. 1075-1081.
26. *Chou P. Y., Fasman G. D.* Adv. Enzymol., 1978, v. 47, p. 45-148.
27. *Шляпников С. В., Куликов В. А., Яковлев Г. Н.* Биорган. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 346-357.
28. *Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. J.* Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
29. *Pisano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B.* Anal. Biochem., 1972, v. 45, № 1, p. 43-59.
30. *Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М.* Биорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301-1313.
31. *Edman P., Begg G.* Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 1, p. 80-91.
32. *Duflon M. J., Hider R. C. J.* Mol. Biol., 1977, v. 115, № 2, p. 177-193.

Поступила в редакцию
14.VI.1985

DETERMINATION OF THE COMPLETE PRIMARY STRUCTURE OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* 152 A GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE BY EXPRESS ANALYSIS OF AMINO ACID SEQUENCES OF UNFRACTIONATED PEPTIDE HYDROLYSATES

SHLYAPNIKOV S. V., BEZBORODOVA S. I. *, KULIKOV V. A., YAKOVLEV G. I.
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; * Institute of Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms, Moscow

The primary structure of the *Penicillium chrysogenum* 152 A guanyl-specific RNase has been analyzed basing on the automatic Edman degradation of two unfractionated peptide hydrolysates produced under the action of staphylococcal protease and trypsin. The obtained results, in combination with the sequencing of the N- and C-terminal portions, have allowed determination of the complete amino acid sequence for *P. chrysogenum* RNase. The enzyme has M_r 10747 and consists of 102 amino acid residues: 2 His, 3 Arg, 7 Asp, 8 Asn, 5 Thr, 11 Ser, 4 Glu, 2 Gln, 4 Pro, 11 Gly, 13 Ala, 4 Cys, 8 Val, 3 Ile, 3 Leu, 9 Tyr, and 5 Phe. A primary structure comparison for guanyl-specific RNases from fungi has been carried out and the highly homologous or variable regions have been mapped. The secondary structure of *P. chrysogenum* RNase has been calculated.