



УДК 577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА OSCP-БЕЛКА,  
ПРИДАЮЩЕГО МИТОХОНДРИАЛЬНОМУ  $H^+$ -АТФ-азному  
КОМПЛЕКСУ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ОЛИГОМИЦИНУ

II\*. ГИДРОЛИЗ OSCP ПРОТЕИНАЗОЙ ИЗ *STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS* И РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКА

Гринкевич В. А., Трубецкая О. Е., Белогрудов Г. И.,  
Ильина Е. Ф., Адамова Н. А., Модяков Н. Н.

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

Проведен гидролиз OSCP митохондрий сердца быка протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Методами гель-фильтрации и ВЭЖХ выделены все индивидуальные пептиды. Структурный анализ полученных пептидов позволил установить порядок расположения всех бромциановых фрагментов и, таким образом, завершить реконструкцию полипептидной цепи белка. Сравнительный структурный анализ выявил существование определенной гомологии между первичными структурами OSCP,  $\delta$ - и  $\beta$ -субъединицами  $H^+$ -АТФ-азы *E. coli*, играющими важную роль во взаимодействии каталитической и протонировывающей частей бактериального фермента.

В предыдущем сообщении [1] описано установление частичной структуры OSCP, одной из субъединиц  $H^+$ -АТФ-азного комплекса митохондрий сердца быка, на основе анализа аминокислотной последовательности триптических и бромциановых пептидов.

Для завершения реконструкции полипептидной цепи был проведен гидролиз карбоксиметилированного препарата белка протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8. Первичное разделение гидролизата осуществлялось с помощью гель-фильтрации на биогеле Р-10 (рис. 1), при этом были получены четыре объединенные фракции, каждая из которых представляла собой смесь двух и более пептидов. Выделение гомогенных пептидов из каждой фракции осуществлялось с помощью ВЭЖХ на колонках с носителями Nucleosil 7 C8 для фракций I и II и Nucleosil 7 C18 для фракций III и IV, содержащих более мелкие пептиды. В серии аналитических экспериментов были найдены оптимальные условия фракционирования, позволившие разделить на индивидуальные компоненты все фракции гидролизата (рис. 2а—г). В общей сложности было выделено 11 индивидуальных пептидов, образовавшихся в результате гидролиза OSCP протеиназой из *St. aureus*.

Распределение пептидов по фракциям, их аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки приведены в таблице. Некоторые пептиды с одинаковым аминокислотным составом при хроматографии на колонке с образцовой фазой элюировались при различных концентрациях ацетонитрила. Причиной, вызывающей аномальное поведение пептидов, по-видимому, следует считать их частичную модификацию, происходящую спонтанно в процессе выделения и очистки. Так, в случае пептида S-3 (рис. 2, фр. IV-1, IV-2) было показано, что пептидный материал, выходящий при меньшей концентрации ацетонитрила, имеет в ка-

\* Сообщение I см. [1]. Сокращение: OSCP — oligomycin sensitivity conferring protein, или белок, придающий митохондриальному  $H^+$ -АТФ-азному комплексу чувствительность к олигомицину.

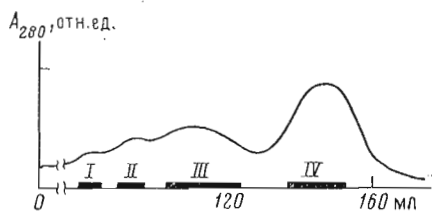


Рис. 1. Хроматография пептидов, полученных при гидролизе OSCP протеиназой из *St. aureus* V8, на колонке (1,5 × 100 см) с биогелем Р-10, уравновешенным 50% НСООН. Скорость элюции 5 мл/ч. Здесь и далее прямоугольниками на оси абсцисс обозначены границы объединения фракций

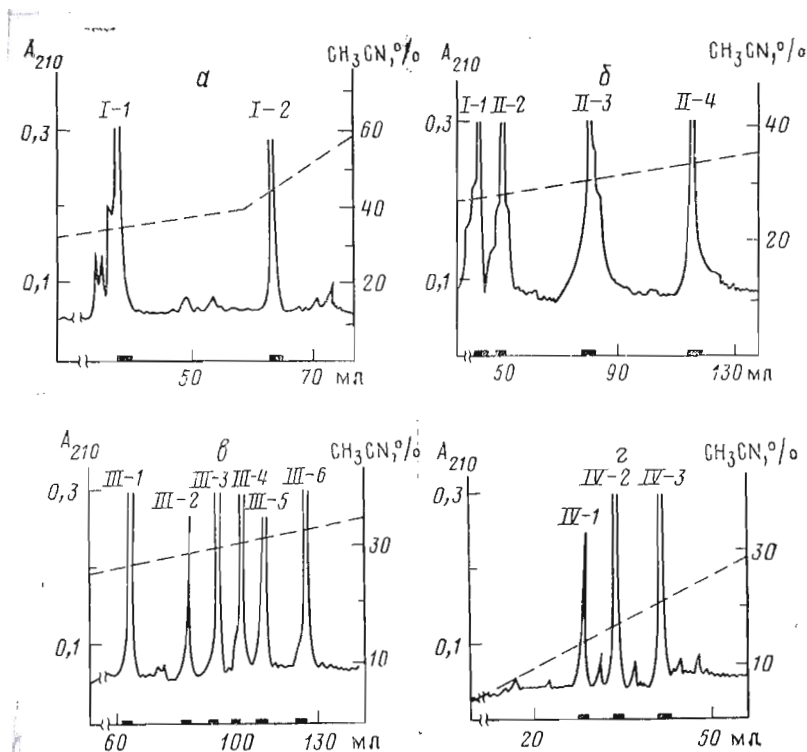


Рис. 2. Разделение фракций I (а), II (б), III (в), IV (г) (рис. 1) с помощью ВЭЖХ на колонке (0,46 × 25 см) с носителем Nucleosil 7 С 8 (а, б), Nucleosil 7 С 18 (в, г) в градиенте ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте, рН 2,0. Скорость элюции 2 мл/мин. Штриховой линией показано изменение концентрации ацетонитрила

честве N-концевого остатка глутамин, а второй пик (IV-2) соответствует тому же пептиду с N-концевой пироглутаминовой кислотой. Необычное поведение при хроматографии пептидов S-9 (рис. 2, фр. III-2, III-5) и S-10 (рис. 2, фр. II-1, II-2), по-видимому, объясняется частичным окислением содержащихся в каждом из них двух остатков метионина.

Исследование структуры триптических и бромциановых пептидов OSCP, проведенное ранее [1], позволило представить молекулу белка в виде двух блоков: N-концевого, включающего полные аминокислотные последовательности бромциановых фрагментов В-1 — В-3 и частичную (фрагмента В-4), и С-концевого, в состав которого входят пептиды В-5 — В-8 (В-IV-1, В-V, В-VI-2, В-VI-1 по номенклатуре работы [1]) (рис. 3). Таким образом, для завершения реконструкции полипептидной цепи белка не было необходимости в определении полной структуры всех пептидов, полученных при гидролизе глутаминовой протеиназой. Для локализации большинства пептидов в молекуле OSCP было достаточно данных по их аминокислотному составу и N-концевым аминокислотам, и только в не-

**Аминокислотный состав пептидов \*, образовавшихся при гидролизе  
OSCP протеиназой из *St. aureus* V8**

Аминокислота	I-1 [S-4]	I-2 [S-(5+6)]	II-1, II-2 [S-10]	II-3, III-4 [S-8]	II-4 [S-6]	III-1 [S-2]
Cys(Cm)	—	0,50(1)	—	—	0,66(1)	—
Asp	2,13(2)	4,61(5)	1,23(1)	—	2,79(3)	1,18(1)
Thr	1,11(1)	6,42(7)	1,21(1)	0,70(1)	5,50(6)	1,01(1)
Ser	3,93(4)	6,50(6)	2,10(2)	1,40(1)	3,60(4)	2,08(2)
Glu	3,15(3)	3,49(3)	2,38(2)	2,40(2)	2,17(2)	2,34(2)
Pro	1,95(2)	2,60(3)	—	—	1,78(2)	—
Gly	1,45(1)	2,50(2)	—	1,50(1)	2,24(2)	1,41(1)
Ala	3,06(3)	4,95(5)	2,19(2)	—	3,71(4)	3,94(4)
Val	3,47(4)	3,95(4)	1,16(1)	1,98(2)	3,51(4)	—
Met	1,38(2)	1,41(2)	2,03(2)	—	1,62(2)	—
Ile	0,73(1)	1,58(2)	1,89(2)	—	0,66(1)	—
Leu	5,47(6)	5,50(6)	1,54(2)	4,53(5)	1,96(2)	2,02(2)
Tyr	0,85(1)	—	0,80(1)	—	—	1,29(2)
Phe	—	1,67(2)	—	1,10(1)	1,08(1)	—
His	—	1,05(1)	—	—	0,84(1)	—
Lys	5,51(6)	0,94(1)	3,57(4)	4,56(5)	—	1,65(2)
Arg	1,84(2)	1,95(2)	1,90(2)	—	1,86(2)	1,06(1)
Число остатков	38	52	22	18	37	18
N-Концевая	Leu	Lys	Lys	Leu	Asn	Gly
Выход, %	60	25	35	30	10	35

Аминокислота	III-2, III-5 [S-9]	III-3 [S-1]	III-6 [S-5]	IV-1, IV-2 [S-3]	IV-3 [S-7]
Cys(Cm)	—	—	—	—	—
Asp	1,29(1)	—	1,96(2)	—	—
Thr	—	—	1,02(1)	—	1,86(2)
Ser	1,41(1)	—	2,09(2)	—	—
Glu	1,50(1)	2,02(2)	1,42(1)	3,13(3)	1,07(1)
Pro	1,00(1)	1,80(2)	0,95(1)	—	—
Gly	3,51(3)	1,40(1)	—	—	—
Ala	—	1,07(1)	1,25(1)	—	0,97(1)
Val	1,62(2)	1,61(2)	—	1,00(1)	—
Met	1,48(2)	—	—	—	—
Ile	3,34(4)	1,72(2)	0,95(1)	—	—
Leu	—	1,30(1)	3,59(4)	—	0,91(1)
Tyr	—	0,62(1)	—	—	—
Phe	—	0,92(1)	1,01(1)	—	—
His	—	—	—	—	—
Lys	0,98(1)	0,74(1)	0,75(1)	0,86(1)	—
Arg	1,19(1)	0,94(1)	—	—	—
Число остатков	17	15	15	5	5
N-Концевая	Val	Phe	Lys	Gln	Ala
Выход, %	20	40	33	30	35

\* В квадратных скобках приведено обозначение пептидов в соответствии с их расположением в полипептидной OSCP.

которых случаях (пептиды S-4, S-6, S-8, S-9) необходимо было определение их частичной или полной аминокислотной последовательности.

Результаты, полученные при автоматической деградации пептидов S-4 и S-6, подтвердили стыковку бромциановых фрагментов B-1 — B-2 и B-3 — B-4 соответственно (рис. 3).

Информация, необходимая для завершения реконструкции полипептидной цепи белка, была получена при исследовании структуры пептидов S-8 и S-9. Определение автоматическим методом аминокислотной последовательности пептида S-8 и N-концевой последовательности S-9 позволило завершить установление строения фрагмента B-4 и соединить его с C-концевым блоком пептидов B-5 — B-8 (рис. 3).

В целом гидролиз OSCP глутаминовой протеиназой прошел достаточно специфично. Все пептиды, кроме S-10, содержат в качестве C-концевого остатка глутаминовую кислоту. В соответствии со специфичностью действия фермента связи Glu-Pro (48—49), Glu-Val-Pro (115—117) не подверг-

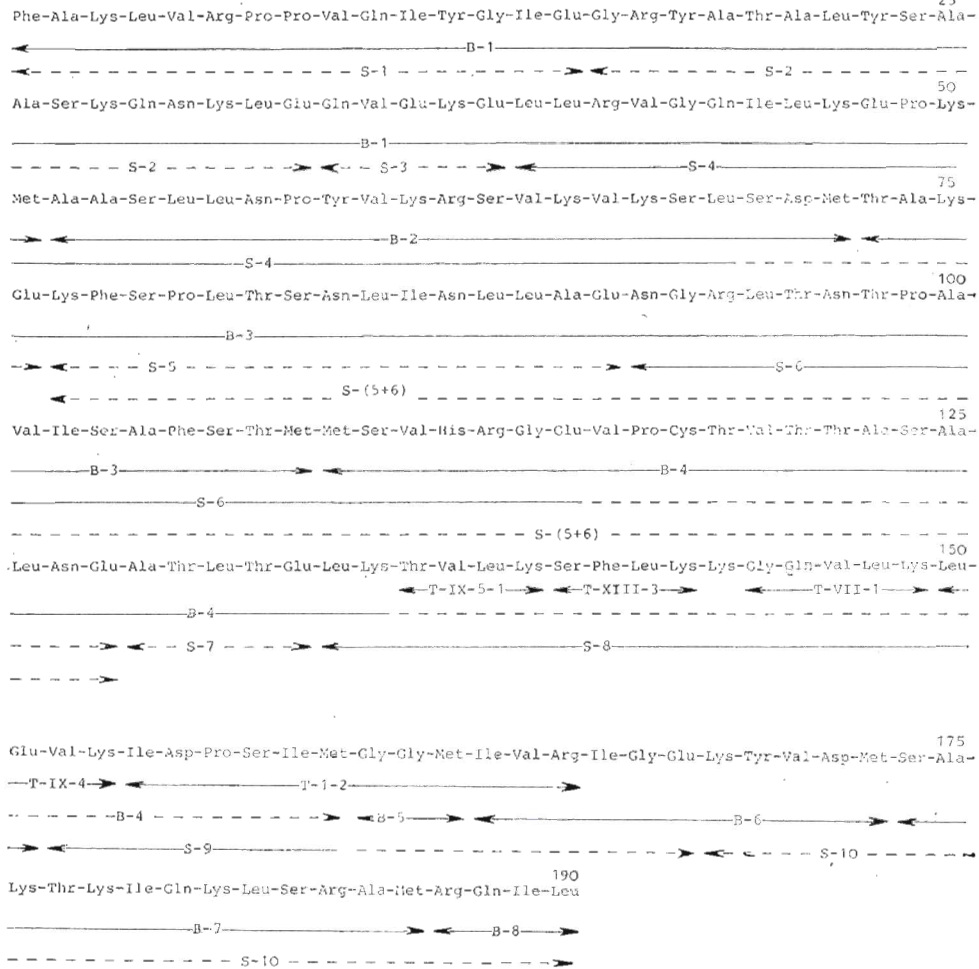


Рис. 3. Первичная структура OSCP, выделенного из митохондрий сердца быка. Т — трипептические пептиды, В — бромциановые пептиды, S — пептиды, полученные при гидролизе OSCP протеиназой из *St. aureus*. Неидентифицированные последовательности подчеркнуты штриховой линией

лись гидролизу. В последовательности Glu-Lys-Glu-Leu (36—39) гидролиз прошел только по второму остатку глутаминовой кислоты. В результате неполного расщепления связи Glu-Asn (91—92) образовался пептид S-(5 + 6) (рис. 3). Пептиды S-1 — S-10 в сумме составляют полипептидную цепь молекулы белка.

На рис. 3 представлена первичная структура молекулы OSCP. Белок содержит 190 аминокислотных остатков (*M* 20 967 Да) и имеет следующий аминокислотный состав: Asp — 3, Asn — 7, Thr — 13, Ser — 16, Glu — 12, Gln — 7, Gly — 9, Pro — 8, Ala — 16, Met — 8, Val — 16, Cys — 1, Ile — 11, Leu — 23, Tyr — 5, Phe — 4, His — 1, Lys — 21, Arg — 9.

H<sup>+</sup>-АТФ-азы прокариот и эукариот имеют сходную структурную организацию. Они состоят из каталитической части (F<sub>1</sub>) и мембранного сектора (F<sub>0</sub>), представляющих собой сложные субъединичные комплексы. Как впервые было обнаружено Уолкером [2], структура OSCP из H<sup>+</sup>-АТФ-азы митохондрий сердца быка гомологична структуре δ-субъединицы F<sub>1</sub> из H<sup>+</sup>-АТФ-азы *E. coli*. Это заключение было сделано на основании сравнения аминокислотной последовательности N- и С-концевых участков OSCP [3] с первичной структурой δ-субъединицы [4] и затем было подтверждено нами анализом полной аминокислотной последовательности OSCP (рис. 4). Следует отметить, что гомология особенно ярко выражена в центральной и С-концевой частях обеих молекул [5]. Интересно, что оба

F A K L V R P P V Q I Y G I E G R \* Y A T A L Y S A A S K Q N K L E Q V E K E L  
 M S E F I T V A R P Y A K A A F D F A V E H Q S V E R W Q D M L  
  
 L R V G Q I L K E P K M A A S L L N P Y V K R S V K V K S L S D M T A K E K F S  
 A G A A E V T K N I Q M A E \* L L S G A L A P E T L A E S F I A V C G \* E Q L D  
  
 P L T S N L I N L L A E N G R L T N T P A V I S A F S T M M S V H R G E V P C T  
 E N G Q X L L R Y M A E N G R L N A L P D V L E Q F I H L R A V S E A T A E V D  
  
 V T F A S A L N E A T L T E L K T V L K S F L K K G Q V L K L E V K I D P S I M  
 V I S A A A L S E Q Q L A K I S A A M E \* \* K R L S R K V K L N C K I D K S V M  
  
 G G M I V R I G E K Y V D M S A K T K I Q K L S R A M R Q I L  
 A C V I I R A G D M V I D G S V R G R L E R L A D V L Q S

Рис. 4. Сравнение первичной структуры OSCP из митохондрий сердца быка (верхние строчки) и  $\delta$ -субъединицы  $H^+$ -АТФ-азы *E. coli* [5]. Гомологичные последовательности взяты в рамки

1-42 F A K L V R P P V Q I Y G I E G R Y A T A L Y S A A S K Q N K L E Q V E K E L L R V  
 105-144 F S T M M S V H R G E V P C T V T T A S A L N E A T L T E L K \* \* T V L K E F L K K  
  
 43-80 G Q I L R E P K M A A S L L N P Y V K R S V K V K S L S D M T A K E K F S P  
 145-181 G D V L K L E V K I D P S I H G C M I V R I C E K Y V D M S A K T K I Q K  
  
 81-104 L T S N L I N L L A E N G R L T N T P A V I S A  
 182-190 L S R A M R Q I L

Рис. 5. Участки повторяющихся последовательностей в молекуле OSCP [11]

1-38 F A K L V R P P V Q I Y G I E G R Y A T A L Y S A A S K Q N K L E Q V E K E  
 21-57 C M K Y V W P P L \* M A A I E K R Q K E I A D G L A S A E R A N K D L D L A  
  
 39-75 L L R V G Q I L K E P K \* M A A S L L N P Y V K R S V K V K S L S D M T A K  
 58-95 K A S A T D Q L K K A K A E A Q V I I E Q A N K R R S Q I L D E A K A E A E  
  
 76-94 \* E K F S P L T S N L I N L L A E N G R  
 96-115 Q E R T K I V A Q A Q A E I E A E R K R

Рис. 6. Сравнение первичной структуры OSCP из митохондрий сердца быка (верхние строчки) и субъединицы  $b$   $H^+$ -АТФ-азы *E. coli* [11] (нижние строчки)

эти белки имеют ряд сходных функций. Как известно,  $\delta$ -субъединица входит в состав каталитической части  $F_1$   $H^+$ -АТФ-азного комплекса *E. coli*, а OSCP является субъединицей мембранного сектора  $F_0$  митохондрий. Однако OSCP может образовывать стабильный комплекс также и с  $F_1$  митохондрий. Этот комплекс можно либо экстрагировать из мембраны целиком [6], либо получить при совместной инкубации очищенных  $F_1$  быка и OSCP [7].

С целью идентификации субъединиц  $F_1$ , образующих ближайшее окружение OSCP при его взаимодействии с  $F_1$  в растворе, нами получен фотоактивируемый аналог белка направленной модификацией остатка  $S_{118}$  [8, 9]. Анализ продуктов фотоиндуцируемых сшивок показал наличие контактов OSCP с  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицами фермента, что в целом согласуется с результатами работы [10]. С учетом молекулярных размеров фотоактивируемой метки расстояние между цистеинсодержащей областью

OSCP и этими субъединицами при их взаимодействии с  $F_1$  в растворе не превышает 10 А.

Ранее нами было показано, что OSCP содержит два участка повторяющихся последовательностей, соединенных остатками 90—104 (рис. 5). Из 90 остатков 39 идентичны или замещены на консервативные. Этот факт, по-видимому, указывает на дубликацию исходного гена OSCP в процессе эволюции [11]. Сходный анализ  $\delta$ -субъединицы каталитической части  $F_1$  *E. coli* (данные не приводятся) показал отсутствие в ней повторяющихся последовательностей.

Была обнаружена также определенная гомология между OSCP и субъединицей b мембранного сектора  $F_0$   $H^+$ -АТФ-азы *E. coli* (рис. 6) [11]. Наиболее четко она прослеживается между повторяющейся последовательностью OSCP и центральной областью субъединицы b (остатки 21—115). Аналогично субъединице b, OSCP в  $H^+$ -АТФ-азном комплексе митохондрий сердца быка контактирует с субъединицами  $\alpha$  и  $\beta$  каталитической части  $F_1$ , а также с полипептидом 25 кДа мембранного сектора  $F_0$  [12]. Однако в отличие от субъединицы b модификация  $H^+$ -АТФ-азного комплекса фотоактивируемым липофильным реагентом 3-(трифторметил)-3-(*m*-[ $^{125}I$ ]иодфенил)диазирином ([ $^{125}I$ ]-TID) не привела к включению метки в OSCP, что указывает на отсутствие непосредственного контакта белка с липидной частью мембраны (данные будут приведены отдельно).

Мы надеемся, что полученные результаты по установлению первичной структуры OSCP позволят в дальнейшем более детально изучить топографию OSCP в  $H^+$ -АТФ-азном комплексе митохондрий.

Большую поддержку в проведении работ этого цикла оказал акад. Ю. А. Овчинников.

### Экспериментальная часть

В работе использовали протеиназу из *St. aureus* V8 (Miles, Англия), ацетонитрил (Merck, ФРГ), биогель P-10 (Bio-Rad, США), трифторуксусную кислоту (Pierce, США), ацетат аммония (Sigma, США).

*Гидролиз OSCP протеиназой из St. aureus* V8. 300 нмоль предварительно карбоксиметилированного препарата белка [1] растворяли в 40 мл 6 М мочевины, раствор диализовали против 0,2 М  $NH_4HCO_3$  (pH 7,9). К свежевыпавшему осадку добавляли глутаминовую протеиназу. Весовое соотношение фермента к субстрату 1 : 50. Смесь выдерживали 22 ч при 37° С под азотом, образовавшийся небольшой крупнодисперсный осадок, не содержащий белка, отделяли центрифугированием на центрифуге при 8000 об/мин, супернатант лиофилизировали и использовали для дальнейших исследований.

*Фракционирование смеси образовавшихся пептидов* проводили на колонке с биоге-лем P-2 (рис. 1). Контроль за выходом пептидов осуществляли с помощью детектора Uvicord-II (ЛКВ, Швеция) при 280 нм. Фракции объединяли согласно спектрофотометрическим данным, упаривали на роторном испарителе до 0,5 мл.

ВЭЖХ осуществляли на колонках с обращенной фазой Nucleosil 7 C8 и Nucleosil 7 C18 (Macherey-Nagel, ФРГ) (рис. 2).

*Определение N-концевых аминокислотных остатков* и аминокислотного состава, автоматическую деградацию пептидов по методу Эдмана проводили как описано в работе [1].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гринкевич В. А., Трубетцкая О. Е., Чертова Е. Н., Муравьева Т. И., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. // Биорган. химия, 1985. Т. 11. № 3. С. 321—333.
2. Walker J. E., Runswick M. J., Saraste M. // FEBS Lett. 1982. V. 146. № 2. P. 393—396.
3. Grinkevich V. A., Modyanov N. N., Ovchinnikov Yu. A., Hundal T., Ernster L. // EBEC Reports. Lyon: LBTM—CNRS Edition. 1982. V. 2. P. 83.
4. Gay N. J., Walker J. E. // Nucl. Acids. Res. 1981. V. 9. № 16. P. 3919—3926.
5. Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Kostetsky P. V., Trubetskaya O. E., Modyanov N. N., Hundal T., Ernster L. //  $H^+$ -АТФазе (АТФ synthase): structure, function, biogenesis the  $F_0F_1$  complex of coupling membranes. / Eds Papa S., Altendorf K., Ernster L., Packer L., Bari: ICSU Press and Adriatica Ed., 1984. P. 155—162.
6. Van de Stadt R. J., Kraaiipoel R. J., Van Dam K. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 267. № 1. P. 25—36.
7. Hundal T., Ernster L. // Membrane Bioenergetic. / Eds Lee C. P., Schatz G., Ernster L. Addison—Wesley: Reading M A., 1979. P. 429—445.
8. Гринкевич В. А., Белогордов Г. И., Гришин А. В., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. // 5-й СССР—ФРГ симпозиум по химии пептидов и белков. Тез. докл. Одесса. М: ИВХ им. М. М. Шемякина, 1985. С. 20—21.

9. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Belogradov G. I., Hundal T., Norling B., Sandri G., Wojtczak L., Ernster L. // Achievements and perspective of mitochondrial research. V. 1. / Eds Quagliariello E., Slater E. S., Palmieri F., Saccone C., Kroon A. M. Amsterdam: Elsevier, 1985. P. 223—236.
10. Dupuis A., Vignais P. V. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 129. № 3. P. 819—825.
11. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Kostetsky P. V., Trubetskaya O. E., Hundal T., Ernster L. // FEBS Lett. 1984. V. 175. № 1. P. 109—112.
12. Archinard P., Godinot C., Comte J., Gautheron D. C. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 11. P. 3397—3404.

Поступила в редакцию  
22.XII.1987

**PRIMARY STRUCTURE  
OF THE OLIGOMYCIN SENSITIVITY CONFERRING PROTEIN  
OF MITOCHONDRIAL H<sup>+</sup>-ATPase COMPLEX. II.  
THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* V8 PROTEINASE HYDROLYSIS OF  
OSCP AND RECONSTRUCTION OF THE AMINO ACID SEQUENCE**

GRINKEVICH V. A., TRUBETSKAYA O. E., BELOGRUDOV G. I.,  
ILJINA E. F., ALDANOVA N. A., MODYANOV N. N.

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

Hydrolysis of OSCP of bovine heart mitochondria by proteinase from *Staphylococcus aureus* V8 was followed by isolation of all individual peptides by means of gel-filtration and HPLC. Structural analysis of the peptides allowed to arrange BrCN-fragments and to reconstruct the complete amino acid sequence of the protein. Comparative structural analysis revealed existence of a certain homology between OSCP and  $\delta$ - and  $\beta$ -subunits of the *E. coli* H<sup>+</sup>-ATPase, which are necessary for interaction of catalytic and proton-conducting parts of the bacterial enzyme.