



УДК 577.112.5:591.145.2-365

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НЕЙРОТОКСИНА II ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
Академии наук СССР, Владивосток

Установлена аминокислотная последовательность нейротоксина II, выделенного из актинии *Radianthus macrodactylus*. Полипептидная цепь токсина состоит из 48 аминокислотных остатков, включая шесть остатков цистеина. Для установления его структуры исследовались пептиды, полученные в результате гидролиза токсина трипсином и глутаминовой протеиназой из *Staphylococcus aureus*.

Из актинии *Radianthus macrodactylus* выделены пять нейротоксинов (RTX-I — RTX-V) [1], которые подобно полипептидам из актинии *Ane-
monia sulcata* избирательно воздействуют на натриевые каналы электро-
возбудимых мембран [2, 3]. Для RTX-II, самого активного для млеко-
питающих токсина, определена полная аминокислотная последователь-
ность [4].

В настоящей работе представлены результаты исследования амино-
кислотной последовательности нейротоксина RTX-I-. Гомогенность белка
доказана методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии
додецилсульфата натрия и по определению N-концевой аминокислот-
ной последовательности. Аминокислотный состав токсина представлен
в табл. 1.

Для установления аминокислотной последовательности токсина про-
водилось восстановление его дисульфидных связей β-меркаптоэтанолом и
карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных группы моно-
подуксусной кислотой. Обессоливание СМ-токсина осуществляли на
полихроме 1. По данным аминокислотного анализа, в молекуле токсина
определено шесть остатков карбоксиметилцистеина (табл. 1).

Аминокислотный состав СМ-RTX-II и пептидов, полученных при гидролизе

Аминокислота	RTX-II	Sp-1	Sp-2	Sp-2-1	Sp-3
Cys(Cm)	5,7(6)	1,7(2)	1,1(1)	0,8(1)	2,7(3)
Asx	6,2(6)	3,8(4)	1,7(2)	1,5(2)	
Thr	5,1(5)	3,6(4)			0,6(1)
Ser	2,7(3)	0,8(1)	0,9(1)		0,5(1)
Glx	3,2(3)	0,9(1)	1,7(2)	0,9(1)	
Pro	2,2(2)	1,2(1)			1,1(1)
Gly	3,2(3)	3,4(3)			
Ala	4,3(4)	0,6(1)	0,5(1)	0,7(1)	2,2(2)
Val	3,1(3)	0,9(1)			1,7(2)
Phe	2,2(2)	0,7(1)	0,7(1)	0,6(1)	
Ile	1,2(1)	0,5(1)			
Leu	1,3(1)				0,6(1)
Tyr	0,9(1)				1,1(1)
Lys	4,8(5)	1,2(1)			3,5(4)
Arg	2,2(2)	0,9(1)			0,6(1)
Trp*	1		+		
Всего остатков	48	22	9	6	17
N-Концевой остаток	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys

* Триптофан в RTX-II определяли методом УФ-спектроскопии, в остальных случаях —

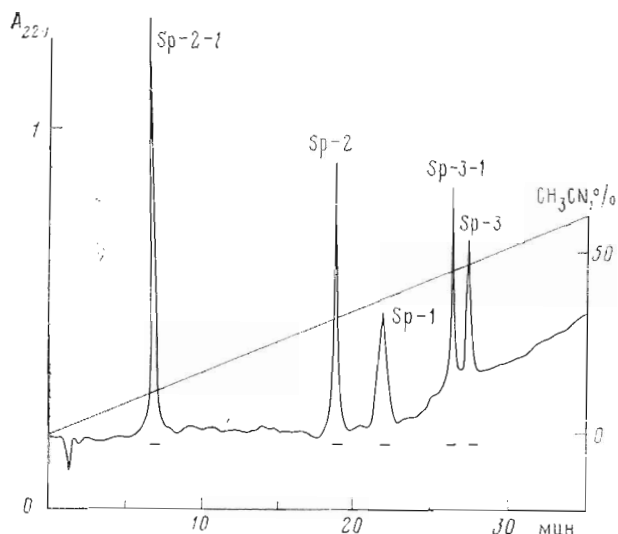


Рис. 1. Разделение гидролизата CM-RTX-II глутаминовой протеиназой из *St. aureus* на колонке Separon Si \times C₁₈ (4,6 \times 150 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0—80%) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере, рН 4,5. Скорость элюции 2 мл/мин. Отмечены отбираемые фракции

N-концевой аминокислотой в токсине является глицин, C-концевой — лизин. Последовательность первых 18 аминокислотных остатков в молекуле карбоксиметилированного токсина (CM-RTX-II) была установлена автоматическим методом Эдмана на твердофазном секвенаторе.

В соответствии с аминокислотным анализом на 30 оставшихся неидентифицированных аминокислотных остатков в RTX-II приходилось 5 основных аминокислот (один аргинин, четыре лизина) и три остатка глутаминовой кислоты. По аналогии с RTX-III [4] можно было предположить, что основные аминокислоты находятся также в C-концевом фрагменте молекулы, поэтому первый тип гидролиза CM-RTX-II, выбранный нами, был гидролиз глутаминовой протеиназой из *Staphylococcus aureus* по остаткам глутаминовой кислоты. Расщепление токсина проведено в стандартных условиях. В результате разделения продуктов гидролиза обращенно-фазовой хроматографией на колонке Separon Si \times

Таблица 1

стафилококковой глутаминовой протеиназой (Sp) и трипсином (T)

Sp-3-1	T-1	T-2	T-3	T-3-1	T-4
2,7(3)	0,9(1)	1,2(1)	1,2(1)	3,9(4)	2,7(3)
0,7(1)	0,8(1)	3,7(4)	2,2(2)	2,2(2)	
1,7(2)			2,7(3)	3,7(4)	0,8(1)
0,8(1)			1,8(2)	2,8(3)	0,9(1)
1,2(1)		0,8(1)	2,5(3)	2,9(3)	
	1,1(1)	1,2(1)	1,3(1)	1,1(1)	1,1(1)
1,8(2)			1,5(2)	1,2(1)	
2,1(2)		0,7(1)	1,5(2)	3,8(4)	1,8(2)
			1,8(2)	1,7(2)	1,7(2)
			0,6(1)	1,8(2)	
0,3(1)			0,6(1)	0,6(1)	0,6(1)
1,3(1)			0,6(1)	0,6(1)	
3,7(4)	1,2(1)		1,2(1)	1,2(1)	1,1(1)
1,2(1)		1,2(1)	1,2(1)	3,7(4)	2,8(3)
+			+	1,2(1)	1,2(1)
20	4	9	+	+	
Ser	Gly	Gys	19	3,5	16
			Thr	Thr	Cys

качественной реакцией по Эрлиху.

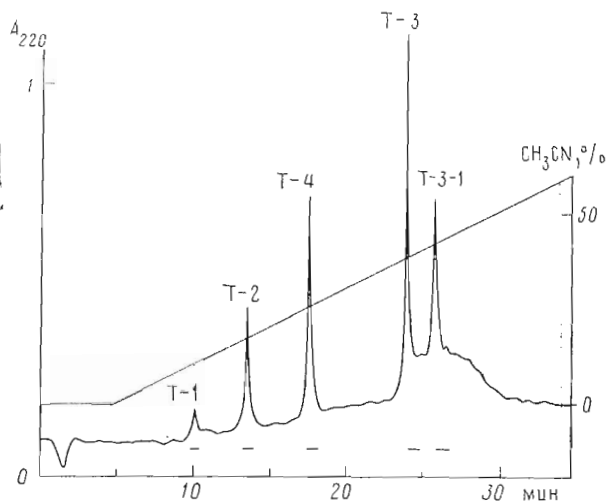


Рис. 2. Разделение триптического гидролизата CM-RTX-II на колонке Ultrasphere ODS (4,6 × 150 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0—60%) в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 1,1 мл/мин

× C₁₈ было выделено пять пептидов (рис. 1). Все пептиды были выделены в достаточном для исследования количестве. Судя по аминокислотному составу (табл. 1), пептид Sp-1 является N-концевым. Структура пептидов Sp-3 и Sp-3-1 была определена автоматическим жидкофазным методом Эдмана, структура Sp-2 и Sp-2-1 — ручным методом Эдмана (дансильный вариант) (табл. 2).

Для получения перекрытия Sp-пептидов CM-RTX-II гидролизовали трипсином. Разделение продуктов триптического гидролиза проводили на колонке Ultrasphere ODS (рис. 2). Во всех полученных T-пептидах был определен N-концевой аминокислотный остаток и аминокислотный состав (табл. 1). Последовательность первых 17 аминокислотных остатков в пептиде T-3 была определена автоматическим жидкофазным методом Эдмана (табл. 2). Это позволило завершить установление аминокислотной последовательности пептида Sp-1 и найти перекрытие между пептидами Sp-1—Sp-3. Аминокислотная последовательность остальных триптических пептидов не определялась. Их положение в полипептидной цепи молекулы установлено на основании данных их N-концевого анализа и аминокислотного состава (табл. 1, рис. 3).

Таким образом, исследование структуры пептидов, полученных в результате расщепления нейротоксина II трипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой, позволило установить его полную амино-

Таблица 2

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при гидролизе CM-PTX-II трипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой

Пептид	Аминокислотная последовательность *
Sp-3-1	Ser-Trp-Glu-Lys-Cys-Leu-Ala-Val-Tyr-Thr-Val-Pro-Ala-Ser-Cys-Cys-Arg-Lys-(Lys ₂)
Sp-3	Lys-Cys-Leu-Ala-Val-Tyr-Thr-Val-Pro-Ala-Ser-Cys-Cys-Arg-Lys-(Lys ₂)
Sp-2	Phe-Ala-Asn-Cys-Asn-Glu-Ser-Trp-Glu
Sp-2-1	Phe-Ala-Asn-Cys-Asn-Glu
T-3	Thr-Ala-Thr-Phe-Thr-Gly-Ser-Ile-Glu-Phe-Ala-Asn-Cys-Asn-Glu-Ser-Trp-(Glu ₁₁ , Lys ₄)

* Указанные последовательности пептидов Sp-3-1, Sp-3 и T-3 определены автоматическим жидкофазным методом, а пептидов Sp-2 и Sp-2-1 — ручным методом Эдмана. Подчеркнуты аминокислоты, определяемые дансильным методом.

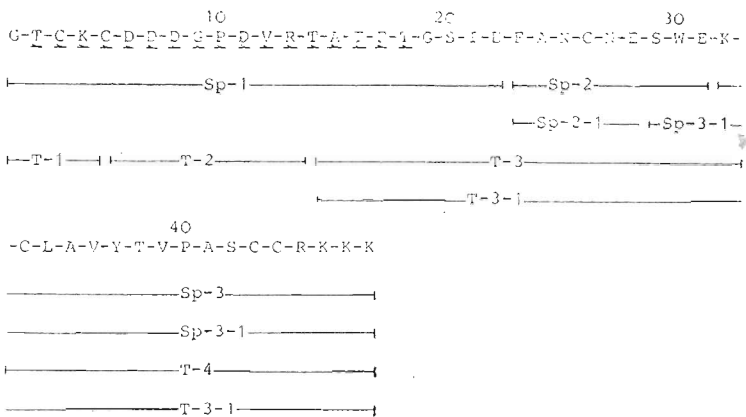


Рис. 3. Аминокислотная последовательность токсина RTX-II. Триптические пептиды (Т), пептиды, образовавшиеся при гидролизе прогенназой из *St. aureus* (Sp). Последовательность, определенная автоматическим твердофазным методом Эдмана (—)

		LD ₅₀ на мышак (мкг/кг)
RTX-III	GNCCKDDEGHYVRTAPLTGTVDLGYCNEGWEKCASYVTSPIAECCRRKK	25
Sh-N1	NAKCKDDEGPDIRTAPLTGTVDLGSCNAGWEKCASYVTIPIADCCRRK	15000
Rp-II	AKCKCDDDDGPDVRSATFTGTVDFINCNENEGWEKCAVYVTPVASCCRRKK	3000
RTX-II	CTCKCDDDDGPDVRTATFTGSIIDFNENEGWEKCAVYVTVVASCRRKKK	3630

Рис. 4. Аминокислотная последовательность анемонотоксинов RTX-III из *R. macrodactylus* [4]; Rp-II из *R. paumotensis* [5]; Sh-N1 из *Stoichactis helianthus* [6] и RTX-II и их токсичность. В рамки взяты идентичные аминокислотные остатки. Нумерация аминокислотных остатков по токсину RTX-III

кислотную последовательность (рис. 3). Полипептидная цепь нейротоксина II состоит из 48 аминокислотных остатков, в состав которых входят шесть остатков цистеина. С-Концевая последовательность -Lys-Lys-Lys выведена на основании данных аминокислотного состава RTX-II и пептидов Sp-3 и T-4 и сравнительного структурного анализа RTX-II и гомологичных ему токсинов (рис. 4).

Степень гомологии внутри группы малоактивных для мышей токсинов RTX-II, Rp-II и Sh-N1 составляет ~ 80%. Сопоставление структур этих токсинов со структурой высокоактивного RTX-III (LD₅₀ = 25 мкг/кг) показало, что степень гомологии их высока — 75%. Интерес представляют замены аминокислот в положениях 11, 20, 25 на остаток тирозина в RTX-III. Видимо, присутствие тирозина в этих положениях существенно для проявления биологической активности.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Worthington, США), глутаминовую протеиназу из *St. aureus* (Mannheim, Англия), реактивы для автоматического метода Эдмана (Beckman, США), β-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), полихром 1 (г. Олайте, СССР). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Методы определения аминокислотного состава, аминокислотной последовательности автоматическим твердофазным методом и ручным методом в дансильном варианте, ферментативного гидролиза белков описаны ранее [4].

Содержание ароматических аминокислотных остатков определяли по второй производной УФ-спектров белков в растворе 6 М гуанидингидрохлорида согласно [7]. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Cary 219 (Varian, Англия) в кварцевых кюветах толщиной 1 см; ширина щели 1 и 2 мм.

Качественное определение триптофана проводили по реакции Эрлиха [8].

Определение аминокислотной последовательности пептидов автоматическим твердофазным методом Эдмана осуществляли на секвенаторе Beckman 890С (США) по программе, описанной в работе [9]. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли высокоэффективной хроматографией на хроматографе Du Pont Instruments (США) на колонке (4,6 × 250 мм) Zorbax C₁₈ в 35% ацетонитриле

в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,5 (стабилизированный 2 мт этилацетата, 2 мл хлористого метилена, 0,5 мл дихлорэтана на 1 л исходного буфера), ГТХ на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5710 А по методу [10] и с помощью ТСХ [11].

Разделение триптических пептидов проводили высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Ultrasphere ODS (см. рис. 2).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию пептидов, полученных при гидролизе глутаминовой протеиназой из *St. aureus*, проводили на колонке Serapon S1 \times \times C₁₈ (см. рис. 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зыкова Т. А. Исследование первичной структуры биологически активных пептидов актинии *Radianthus macrodactylus*: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток: ТИБОХ, 1986.
2. Catterall W. A. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1980. V. 20. P. 15—43.
3. Alsen C. // Fed. Proc. 1983. V. 42. № 1. P. 101—108.
4. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 302—310.
5. Wemmer D. E., Kumar N. V., Metrione R. M., Lazdunski M., Drobny G., Kallenbach N. R. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6842—6849.
6. Ket W. R., Dunn B. M., Parten B., Price D. // Abst. Toxicol. 1985. V. 23. № 4. P. 580.
7. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438—444.
8. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 330—339.
9. Hunkapiller M. W., Hood L. E. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 11. P. 2124—2133.
10. Pisano J. J., Bronzert T. J. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 20. P. 5597—5607.
11. Sjoquist J. // Biochim. et biophys. acta. 1960. V. 41. № 1. P. 20—25.

Поступила в редакцию

9.XII.1987

После доработки

22.II.1988

AMINO ACID SEQUENCE OF NEUROTOXIN II FROM THE SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

ZYKOVA T. A., KOZLOVSKAYA E. P., ELYAKOV G. B.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Amino acid sequence of neurotoxin II isolated from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* was determined by analysis of peptides obtained after its digestion with trypsin and staphylococcal proteinase. It is shown that the polypeptide chain of the toxin consists of 48 amino acid residues, including six cysteines.