БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 15 * № 1 * 1989

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5:577.150.3

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОРИЕНТОТОКСИНОВ I И II ИЗ ЯДА ШЕРШНЯ *VESPA ORIENTALIS*

Корнеев А. С., Салихов Ш. И., Туйчибаев М. У.

Институт биоорганической химии Академии наук УзССР, Ташкент

Ориентотоксин I, токсин пресинаптического действия, обладающий лизофосфолипазной активностью (ОРТ-I), и ориентотоксин II, высокотоксичная фосфолипаза A_2 (ОРТ-II), были выделены из яда большого шершня *Vespa orientalis* по ранее описанному методу [1, 2] с модификацией на последней стадии очистки, где была применена ионообменная ВЭЖХ на колонке TSK 535 CM. Полученные препараты ориентотоксинов представляли собой электрофоретически гомогенные белки с молекулярной массой 16 и 17,5 кДа. Их аминокислотный состав приведен в таблице. Несмотря на различие по функциональной активности, ОРТ-I и ОРТ-II являются структурными гомологами, так как определенная для них методом автоматической жидкообразной деградации по Эдману N-концевая последовательность аминокислот показала полную идентичность 46 N-концевых аминокислотных остатков. Анализ С-концевой последовательности аминокислот при помощи карбоксипептидазы Y свидетельствовал об идентичности четырех С-концевых аминокислот. Методом пептидных карт на целлюлозе MN-300 было показано, что триптические гидролизаты ОРТ-I и ОРТ-II различаются четырьмя пептидами, а пептидные карты гидролизаторов ОРТ-I и ОРТ-II, полученных при расщеплении протеиназой из *Staphylococcus aureus*, различаются тремя пептидами. Учитывая, что содержание ОРТ-I в яде шершня в 20 раз меньше, чем ОРТ-II, представлялось целесообразным на первом этапе изучить структуру ОРТ-II.

Восстановленную и карбоксиметилированную молекулу ОРТ-II расщепляли бромцианом по остаткам метионина. Из полученной смеси пептидов были выделены два низкомолекулярных пептида B_1 и B_2 и определена их структура твердофазным секвенированием после их связывания с APG-стеклом через остаток гомосеринлактона [3]. Остальные пептиды бромцианового расщепления выделить не удалось вследствие их сильной агрегации. Восстановленный и карбоксиметилированный ОРТ-II практически нерастворим в условиях проведения ферментативного гид-

Аминокислота	ОРТ-I	ОРТ-II	Аминокислота	ОРТ-I	ОРТ-II
Cys	5,77(6)	5,69(6)	Met	2,64(3)	2,57(3)
Asp	16,87(17)	15,95(16)	Ile	10,98(11)	8,92(9)
Thr	10,06(10)	9,12(9)	Leu	10,04(10)	8,07(8)
Ser	7,94(8)	7,02(7)	Tyr	7,85(8)	5,97(6)
Glu	11,13(11)	10,08(10)	Phe	6,07(6)	5,11(5)
Pro	6,90(7)	6,94(7)	His	4,18(4)	4,21(4)
Gly	10,10(10)	9,14(9)	Lys	12,84(13)	9,88(10)
Ala	9,08(9)	9,96(10)	Arg	3,89(4)	4,95(5)
Val	11,09(11)	9,12(9)	Trp	(2)	(2)
Всего остатков				152	139
N-Концевая				Phe	Phe

ролиза, поэтому трипсином и протеиназой из *St. aureus* расщепляли нативную молекулу ОРТ-II. Полученные пептидные смеси восстанавливали дитиотреитом и разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонках Ultrasphere-ODS и Nucleosil-ODS в градиенте концентрации смеси ацетонитрила и этанола (70 : 30).

В результате из триптического гидролизата ОРТ-II было выделено 14 индивидуальных пептидов, а из протеиназного гидролизата — 13 пептидов, что хорошо согласуется с данными пептидных карт и аминокислотным анализом ОРТ-II. Структура полученных пептидов определялась при помощи автоматического жидкофазного секвенирования с использованием полибрена [4] и методом твердофазного секвенирования с ковалентной посадкой пептидов на APG-стекло *p*-фенилендиизотиоцианатным методом [5]. В случае необходимости определялась С-концевая последовательность пептидов при помощи карбоксипептидазы Y с последующим аминокислотным анализом продуктов гидролиза [6]. В результате была установлена структура всех выделенных пептидов, что в совокупности с данными, полученными при анализе N-концевой последовательности, и данными о структуре бромциановых пептидов позволило реконструировать полипептидную цепь ОРТ-II (схема 1).

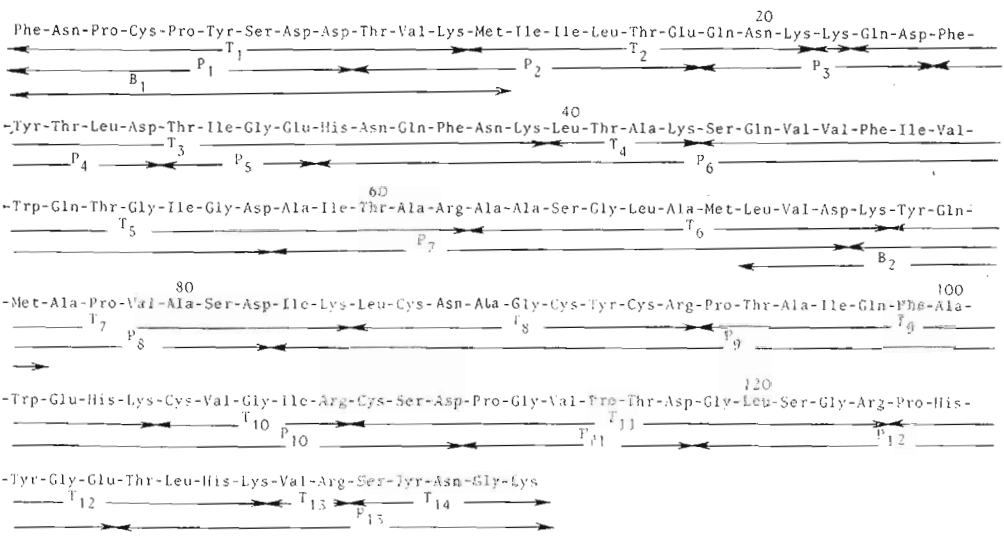

Схема. 1. Аминокислотная последовательность ориентотоксина II из яда большого шершня *Vespa orientalis*. Пептиды триптического гидролиза (Т), бромциановые фрагменты (В), пептиды, полученные при гидролизе протеиназой из *St. aureus* (Р)

При изучении аминокислотной последовательности ОРТ-I мы воспользовались данными о структуре ОРТ-II. Исчерпывающий триптический гидролиз и гидролиз протеиназой из *St. aureus* нативной молекулы ОРТ-I проводили в тех же условиях, что и для ОРТ-II, проводя параллельно в качестве контроля гидролиз ОРТ-II. Полученные пептидные смеси ОРТ-I разделяли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ в тех же самых условиях, что и для ОРТ-II, определяя время удерживания пептидов ОРТ-I и сравнивая его с временами удерживания пептидов ОРТ-II, т. е. используя принцип пептидных карт методом ВЭЖХ. Было получено 15 триптических и 14 протеиназных пептидов в индивидуальном виде, что хорошо согласуется с данными аминокислотного анализа. При этом 4 триптических и 3 протеиназных пептида ОРТ-I отличались своими хроматографическими характеристиками от соответствующих пептидов ОРТ-II.

Методами автоматического секвенирования и анализом С-концевой последовательности при помощи карбоксипептидазы Y была определена полная первичная структура этих пептидов. Идентичность остальных пептидов ОРТ-I с соответствующими им пептидами ОРТ-II была пока-

зана анализом их N- и C-концевых аминокислотных остатков и полным аминокислотным анализом. На основании полученных данных была предложена аминокислотная последовательность полипептидной цепи ОРТ-I (схема 2).

Схема 2. Аминокислотная последовательность ориентотоксина I из яда большого шершня *Vespa orientalis*. Обозначения пептидов такие же, как и на схеме 1

Как видно из схемы 2, полипептидная цепь ориентотоксина I отличается от полипептидной цепи ориентотоксина II двумя гидрофобными кластерами в позициях 64—70 и 101—108. Кроме того, сравнение аминокислотных последовательностей ОРТ-I и ОРТ-II с последовательностями известных фосфолипаз (не приведено) показывает, что по своей первичной структуре ориентотоксины I и II значительно отличаются как от фосфолипазы A_2 из яда пчелы *Apis mellifera* [7], так и от высокотоксических фосфолипаз A_2 из других источников [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Туйчибаев М. У., Ташмухамедов Б. А., Готгильф Л. И., Магазаник Г. И.* // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 318—322.
2. *Туйчибаев М. У., Якубов И. Т., Рахимов М. М., Ташмухамедов Б. А.* // Биохимия. 1984. Т. 49. № 11. С. 1546—1555.
3. *Horn M. J., Laursen R. A.* // FEBS Lett. 1973. V. 36. № 2. P. 285—288.
4. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.* // Biochemistry. 1978. V. 17. № 11. P. 2124—2133.
5. *Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G.* // FEBS Lett. 1972. V. 21. № 1. P. 67—72.
6. *Hayashi R.* // Meth. Enzymol. 1977. V. XLVII E. P. 84—97.
7. *Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrell R. C., Vernon C. A.* // FEBS Lett. 1971. V. 17. № 1. P. 39—40.
8. *Verheij H. M., Slotboom A. J., de Haas G. H.* // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1981. V. 91. P. 91—203.

Поступило в редакцию
25.IV.1988

AMINO ACID SEQUENCE OF ORIENTOTOXIN I AND ORIENTOTOXIN II FROM THE HORNET *VESPA ORIENTALIS* VENOM

KORNEEV A. S., SALIKHOV Sh. I., TUYCHIBAEV M. U.

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Orientotoxin I, a neurotoxin of presynaptic effect having a lysophospholipase activity, and orientotoxin II, a highly toxic phospholipase A_2, were isolated from the hornet *Vespa orientalis* venom, and their primary structures were determined. Despite eir different functional activity, orientotoxin I and II proved to be structural homologues, differing significantly in the amino acid sequence from well-known toxic phospholipases from other sources.