



УДК 577.152.121:577.112.5

© 1990 г.

В. О. Попов, И. А. Шумилин, Т. Б. Устинникова,
В. С. Ламзин, Ц. А. Егоров*

NAD-ЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* sp. 101

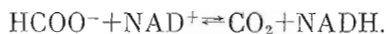
I. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва;

* Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР, Москва

Установлена первичная структура NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101. Фермент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит 393 аминокислотных остатка и имеет молекулярную массу 43,1 кДа. Для определения аминокислотной последовательности использовались следующие способы фрагментации белка: бромцианом по остаткам метионина, эндопротеиназой Lys-C по остаткам лизина, эндопротеиназой Glu-C по остаткам глутаминовой кислоты, а также триптический гидролиз. Соответствующие пептиды были выделены в гомогенном состоянии сочетанием методов гельпроникающей и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Строение пептидов определялось секвенированием на газофазном секвенаторе.

NAD-зависимая формиатдегидрогеназа метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (КФ 1.2.1.2) катализирует окисление иона формиата до CO_2 , в ходе которого осуществляется перенос гидрид-иона от субстрата к молекуле кофермента:



Для этого фермента накоплен значительный объем структурной и биохимической информации: выяснен кинетический механизм действия [1–3]; проведено картирование активного центра, идентифицированы аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании субстратов и в катализе [4–7]; выявлены конформационные изменения, происходящие в молекуле фермента в процессе катализа [8].

Целью данной серии статей является установление первичной и пространственной структуры бактериальной формиатдегидрогеназы и анализ сходства и различий данного фермента с ранее исследованными NAD-зависимыми дегидрогеназами.

Сообщение I посвящено выяснению полной аминокислотной последовательности NAD-зависимой формиатдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101. Ранее нами уже были определены N-концевая аминокислотная последовательность формиатдегидрогеназы, структура цистеинсодержащих триптических фрагментов и локализован существенный остаток цистеина, определяющий каталитические свойства и стабильность фермента [9, 10].

При проведении структурных исследований NAD-зависимой формиатдегидрогеназы была выбрана стандартная стратегия, заключающаяся в расщеплении полипептидной цепи на крупные участки с последующей фрагментацией на более мелкие пептиды и установлении их аминокислотной последовательности.

Результаты аминокислотного анализа формиатдегидрогеназы свидетельствовали [1], что субъединица фермента содержит семь остатков метионина при общей длине полипептидной цепи около 380 аминокислот. При условии достаточно равномерного распределения метиониновых

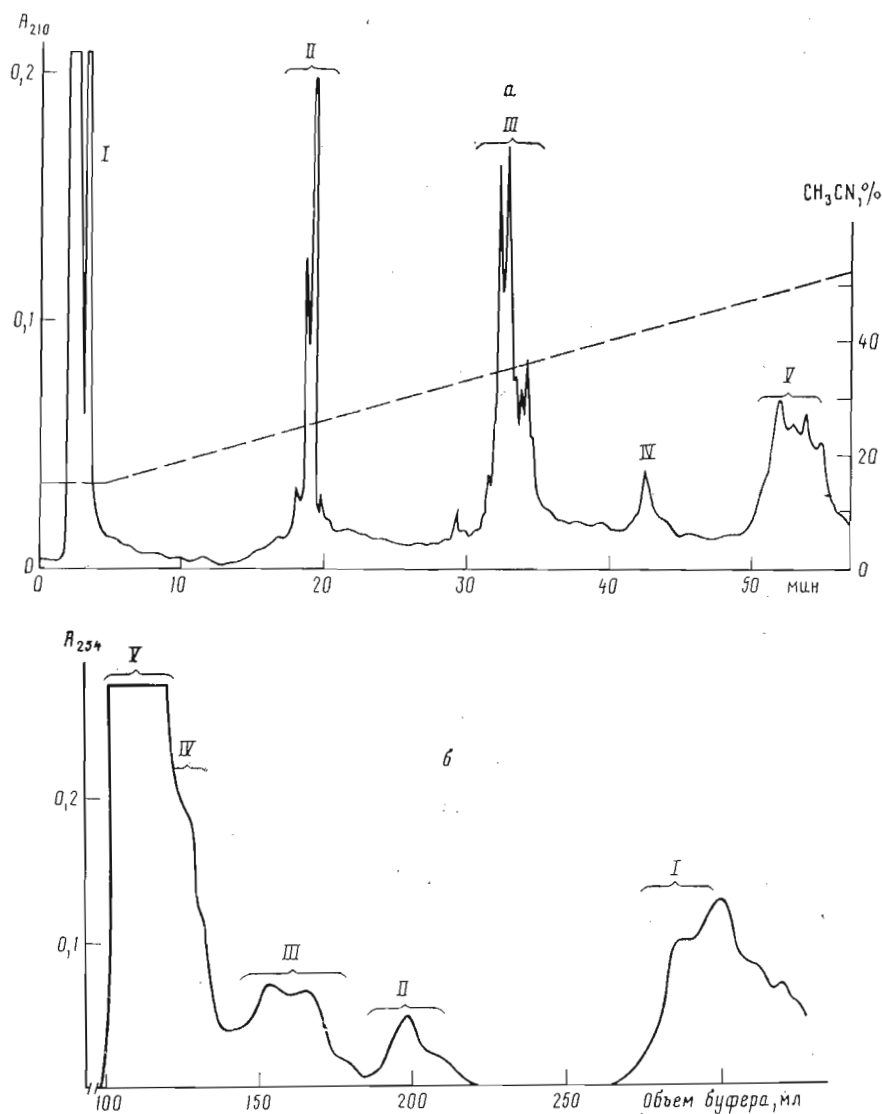


Рис. 1. Хроматограммы смеси пептидов, полученных в результате бромцианового гидролиза формиатдегидрогеназы с винилпиридилированными остатками цистеина. Цифрами обозначены группы пептидов, различающиеся по размеру и гидрофобности (см. текст); а — обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке C_8 (Aquapore RP-300, $4,6 \times 220$ мм, с аналогичной предколонкой $4,6 \times 15$ мм, Brownlee Lab, США) в градиенте концентрации ацетонитрила, скорость 0,8 мл/мин; б — гелипроникающая хроматография на колонке ($2,5 \times 90$ см) с биогелем Р-10 в смеси уксусная кислота — метанол, 2 : 3, скорость 10 мл/ч

остатков по аминокислотной цепи расщепление по ним могло бы дать восемь более или менее крупных фрагментов, удобных для установления их структуры. В связи с этим в качестве расщепляющего агента первоначально был выбран бромциан.

Расщепление формиатдегидрогеназы бромцианом

Расщепление белка бромцианом проводили в 70% муравьиной кислоте в стандартных условиях. Поскольку формиатдегидрогеназа характеризуется высоким содержанием цистеина — шесть остатков на субъединицу [1, 9, 10], во избежание осложнений, связанных с окислением SH-группы и последующей агрегацией белка в растворе, для расщепления использовали препараты формиатдегидрогеназы с остатками цистеина, винилпиридилированными в денатурирующих условиях [11].

Результаты аминокислотного анализа некоторых бромциановой пептидов бактериальной деградации *

Аминокислотный остаток	M-1	M-2	M-3	M-4	M-4A	M-5	M-5A	M-6	M-7	M-8
D/N	19,37(19)	3,79(4)	3,14(3)	2,00(2)	2,00(2)	6,73(6-7)	6,66(5-7)	1,06(1)	1,77(2)	22,31(22)
T	9,70(10)	0,16(0)	2,90(3)	1,91(2)	1,91(2)	2,86(3)	2,47(2-3)	0,11(0)	6,38(6)	11,57(11-12)
S	10,63(10-11)	2,59(2-3)	1,43(1-2)	0,05(0)	0,06(0)	1,56(1-2)	1,11(1)	0,03(0)	3,01(3)	16,79(17)
E/Q	13,21(13)	2,29(2)	3,92(4)	2,08(2)	2,11(2)	3,72(3-4)	3,62(3-4)	0,09(0)	7,54(7-8)	13,57(13-14)
P	11,18(11)	1,18(1)	2,01(2)	2,92(3)	2,98(3)	4,38(4)	3,90(4)	0,96(1)	2,51(1-2)	12,12(12)
G	11,56(11-12)	2,10(2)	3,20(3)	0,19(0)	0,13(0)	5,79(6)	5,04(5)	1,09(1)	8,68(7-8)	15,24(15)
A	11,95(12)	3,84(4)	4,14(4)	0,09(0)	0,10(0)	6,70(7)	7,99(8)	0,08(0)	7,65(7-8)	19,80(20)
C	0,16(0)	0,51(1)	0,16(0)	1,27(1)	0,97(1)	0,28(0)	0,24(0)	0,02(0)	0,16(0)	3,09(3)
V	14,03(14)	1,88(2)	3,34(3)	2,16(2)	2,15(2)	2,76(3)	2,41(2-3)	0,10(0)	1,42(1-2)	16,38(16)
M	0,06(0)	0,58(0-1)	0,21(0)	0,65(1)	0,63(1)	0,49(1)	0,42(1)	0,87(1)	0,21(0)	1,57(2)
I	6,58(6-7)	1,69(1-2)	1,00(1)	0,12(0)	0,09(0)	1,47(1-2)	1,63(1-2)	0,11(0)	3,87(4)	8,00(8)
L	15,51(15-16)	3,69(3-4)	5,00(5)	2,01(2)	1,96(2)	5,00(5)	5,00(5)	0,08(0)	4,74(5)	22,31(22)
Y	5,86(6)	1,84(2)	1,32(1)	0,85(1)	0,84(1)	1,72(2)	2,01(2)	0,93(1)	6,83(7)	6,83(7)
F	4,17(4)	0,41(0-1)	2,12(2)	0,23(0)	0,19(0)	2,16(2)	2,10(2)	0,06(0)	3,78(4)	4,76(5)
H	4,00(4)	1,85(2)	2,38(2)	1,99(2)	2,09(2)	1,26(1)	1,11(1)	0,11(0)	2,00(2)	7,82(8)
K	8,99(9)	1,00(1)	0,94(1)	0,07(0)	0,11(0)	3,59(3-4)	3,75(4)	0,04(0)	0,27(0)	9,23(9)
R	5,81(6)	1,99(2)	4,53(4-5)	0,06(0)	0,09(0)	5,78(6)	6,32(6)	0,05(0)	4,81(5)	11,36(11)
Всего	150-154	29-34	39-41	18	18	54-59	53-58	5	57-62	200-203

* В скобках указано предполагаемое содержание аминокислоты в пептиде.

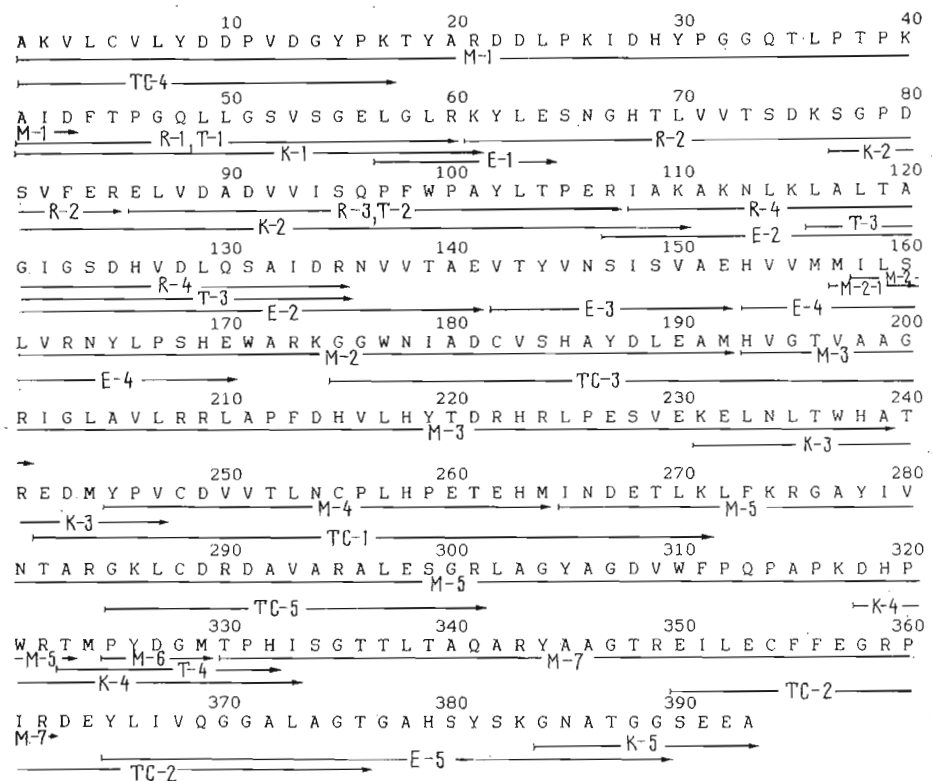


Рис. 2. Аминокислотная последовательность форматдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101. Приведены пептиды, необходимые для реконструкции полипептидной цепи, полученные после расщепления белка бромцианом (M), после гидролиза по остаткам аргинина N-концевого бромцианового пептида M-1 с модифицированными аминогруппами (R), после гидролиза эндопротеиназой Lys-C по остаткам лизина (K) и эндопротеиназой Glu-C по остаткам глутаминовой кислоты (E), после триптического гидролиза (T) и ранее определенные цистеинсодержащие триптические пептиды (TC) [10]

Пептиды, полученные в результате расщепления белка бромцианом, после разделения методами обращенно-фазовой или гелепроникающей ВЭЖХ, располагаются группами (I—V) в соответствии с их размерами и гидрофобностью (рис. 1).

Всего в препаративных количествах сочетанием методов геле-фильтрации и 2—3-кратной обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C_8 в гомогенном состоянии было выделено около 20 бромциановых фрагментов; в частности, из группы пиков I выделен пептид M-6, II — M-4, III — M-2, M-2-1, M-3, M-5, M-7, IV — M-1, а из группы V — пептид M-8. В табл. 1 приведены результаты аминокислотного анализа некоторых из них. Идентичность аминокислотного состава некоторых выделенных пептидов (см., например, M-4 и M-4A, M-5 и M-5A) показывает, что существование значительного числа пептидных фрагментов, различающихся по своему хроматографическому поведению, связано не с неспецифическим расщеплением, а, по-видимому, с неполной изомеризацией гомосеринлактона в гомосерин. Кроме того, из результатов аминокислотного анализа следует, что пептиды пятой группы (см., например, M-8) представляют собой продукты частичного расщепления, содержащие более одного остатка метионина.

Прямое секвенирование бромциановых фрагментов (рис. 2) форматдегидрогеназы позволило определить полную структуру трех пептидов: M-2, M-4 и M-6, состоящих из 35, 20 и 5 аминокислот соответственно. Практически до конца были секвенированы пептиды M-3 и M-5. Наиболее крупный из выделенных фрагментов бромцианового гидролиза (M-1)

оказался N-концевым пептидом, что было установлено по идентичности N-концевых последовательностей данного пептида и нативного белка. Отсутствие в составе пептида М-7 остатка метионина позволяло предположить, что этот пептид является С-концевым фрагментом формиатдегидрогеназы.

Таким образом, в результате бромцианового гидролиза формиатдегидрогеназы была определена полная или частичная структура всего семи пептидов, в то время как наличие в составе белка семи остатков метионина предполагало присутствие восьми фрагментов. Этот факт в сочетании с обнаружением минорного пептида М-2-1, представляющего собой пептид М-2 с добавлением одного остатка метионина, позволял предполагать наличие в структуре белка последовательности Met-Met, что и было подтверждено дальнейшими исследованиями.

Триптический гидролиз формиатдегидрогеназы

В предыдущих работах методом ковалентной хроматографии на тиоловых носителях были выделены и секвенированы все цистеинсодержащие триптические пептиды формиатдегидрогеназы (ТС-1 — ТС-5) [9, 10]. Это позволило установить порядок следования двух бромциановых фрагментов белка (М-2 — М-3) и значительно удлинить последовательность пептида М-7 (рис. 2). Не содержащие остатков цистеина триптические пептиды формиатдегидрогеназы ранее охарактеризованы не были.

На рис. 3 представлена хроматограмма растворимой фракции триптического гидролизата формиатдегидрогеназы, предварительно иммобилизованной в денатурирующих условиях на тиопропил-сефарозе 6В (таким образом, отброшены пептиды, содержащие цистеин). Большинство бесцистеиновых пептидов было выделено в индивидуальном состоянии и секвенировано, что дало возможность в предварительном порядке состыковать три бромциановых фрагмента формиатдегидрогеназы: М-5-М-6-М-7. Кроме того, была определена аминокислотная последовательность нескольких достаточно крупных триптических пептидов, принадлежащих N-концевому бромциановому фрагменту белка (рис. 2).

Структура N-концевого бромцианового фрагмента белка

Неравномерность распределения остатков метионина по полипептидной цепи формиатдегидрогеназы поставила задачу определения структуры весьма длинного (около 160 аминокислотных остатков) N-концевого бромцианового пептида М-1, что потребовало его расщепления на более мелкие фрагменты. Данные аминокислотного анализа пептида М-1 свидетельствуют об относительно высоком содержании в нем остатков лизина по сравнению с остатками аргинина (табл. 1). Таким образом, специфическое расщепление пептида М-1 по остаткам аргинина позволило бы получить фрагменты длиной 20—30 остатков, удобные для секвенирования.

Для осуществления этого плана был проведен триптический гидролиз N-концевого бромцианового пептида, у которого предварительно модифицировали янтарным ангидридом ε-аминогруппы остатков лизина (а также N-концевую аминогруппу). Из-за плохой растворимости гидролизуемого пептида реакцию проводили в 4 М растворе мочевины.

На рис. 4 представлена хроматограмма триптических пептидов бромцианового фрагмента М-1 после их разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке С₈. Несмотря на небольшой выход триптических пептидов (около 400 пмоль), связанный прежде всего с плохой растворимостью N-концевого бромцианового фрагмента, удалось определить секвенированием структуру четырех важных пептидов (R-1 — R-4) длиной от 20 до 28 аминокислотных остатков (рис. 2) и получить перекрытие с определенным прямым секвенированием N-концевым участком пептида М-1.

Структура пептидов R-1 и R-3 совпадала со структурой пептидов T-1 и T-2, выделенных ранее из тотального триптического гидролизата фор-

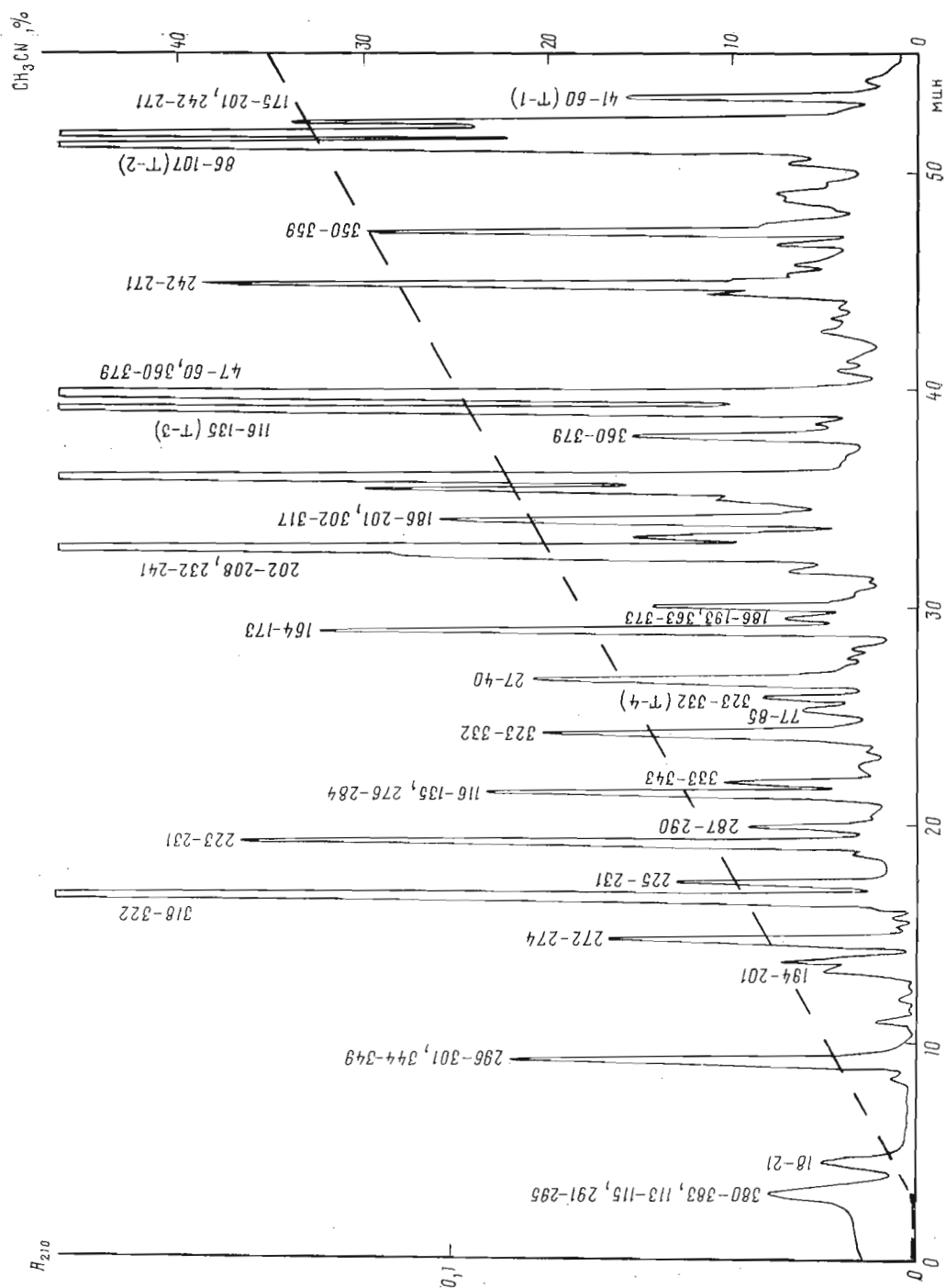


Рис. 3. Хроматограмма смеси растворимых пептидов формиадегидрогеназы, полученных после триптического гидролиза белка, иммобилизованного на тиопротил-сефарозе 6В (условия хроматографии см. в подписи к рис. 1а). Пептиды T-1 — T-4 представлены на рис. 2, остальные идентифицированы по результатам аминокислотного анализа или непосредственного сиквенса, цифрами указано их положение в последовательности белка.

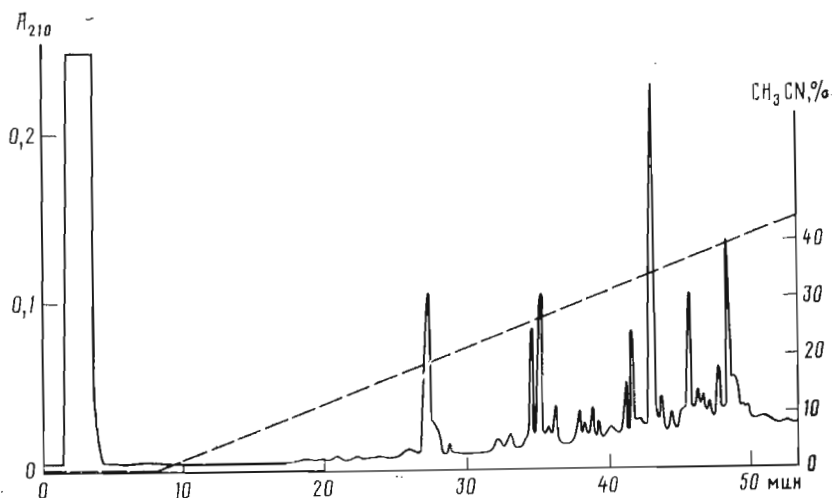


Рис. 4. Хроматограмма смеси пептидов, полученных после триптического гидролиза N-концевого бромцианового фрагмента формиадегидрогеназы с модифицированными остатками лизина (условия хроматографии см. в подписи к рис. 1а)

миатдегидрогеназы. Следует отметить, что расщепление по остаткам аргинина прошло с хорошей селективностью. Из продуктов неспецифического гидролиза в достаточно больших количествах обнаружен лишь пептид R-1 (остатки 41–60 по последовательности фермента).

Для определения порядка следования секвенированных фрагментов необходимо было провести расщепление пептида M-1 каким-либо другим способом. В связи с этим следующим шагом, предпринятым для определения структуры N-концевого бромцианового фрагмента, было расщепление эндопротеиназой Lys-C, которая специфически гидролизует пептиды по остаткам лизина [12]. Исследуемый фрагмент растворим только в присутствии достаточно высоких концентраций детергентов, ферментативный гидролиз в таких условиях не может быть проведен достаточно эффективно. Кроме того, необходимо было выяснить строение других неизвестных участков полипептидной цепи. По этим причинам было решено проводить расщепление нативной формиадегидрогеназы.

Расщепление формиадегидрогеназы эндопротеиназой Lys-C

Из известной в общих чертах структуры C-концевой части молекулы белка следовало, что получаемые расщеплением по остаткам лизина цистеинсодержащие пептиды, не представляющие интереса, имеют большой размер. При условии их отделения из исследования исключались бы значительные по величине уже известные фрагменты полипептидной цепи.

Для этого белок перед расщеплением был иммобилизован по SH-группам остатков цистеина на тиопропил-сефарозе 6В. Пептиды, содержащиеся после гидролиза эндопротеиназой Lys-C в растворимой фракции (предположительно не содержащие остатков цистеина), были выделены в индивидуальном состоянии сочетанием методов ВЭЖХ (гельпроникающая и обращенно-фазовая хроматография).

Расщепление формиадегидрогеназы, иммобилизованной на тиопропил-сефарозе, эндопротеиназой Lys-C по остаткам лизина протекает с высокой специфичностью — среди исследованных пептидов отсутствовали фрагменты неспецифического гидролиза. Следует отметить, что после проведения расщепления в растворимой фракции наряду с пептидами, не содержащими цистеин, оказались и цистеиновые, что, видимо, явилось следствием недостаточности взятого количества носителя для полной иммобилизации белка.

В индивидуальном состоянии был выделен и секвенирован ряд пептидов. Определение структуры пептидов K-1 и K-2 (рис. 2) позволило

установить порядок следования пептидов R-1 — R-4 и сконструировать последовательность бромцианового фрагмента M-1 на протяжении 135 аминокислотных остатков. Пептид K-3 позволил состыковать бромциановые пептиды M-3 и M-4, а пептид K-4 подтвердил порядок следования фрагментов M-5 — M-7. Кроме того, среди полученных пептидов был обнаружен декапептид K-5, который как оказалось впоследствии, является С-концевым фрагментом формиатдегидрогеназы.

К сожалению, ни в случае триптического гидролиза, ни при расщеплении белка эндопротеиназой Lys-C по остаткам лизина не были обнаружены пептиды, которые обеспечили бы перекрывание N-концевого бромцианового фрагмента с пептидом M-2. Одним из возможных объяснений потери данных пептидов может являться их недостаточная растворимость из-за исключительно высокой гидрофобности участка аминокислотной последовательности формиатдегидрогеназы в районе Asn-136 — Val-162. 17 из 27 аминокислот на этом участке представляют собой остатки валина (8), лейцина (2), изолейцина (2), аланина (2), метионина (2), тирозина (1).

Расщепление формиатдегидрогеназы по остаткам глутаминовой кислоты

С целью поиска пептидов, обеспечивающих определение полной аминокислотной последовательности формиатдегидрогеназы, было предпринято расщепление белка по остаткам глутаминовой кислоты с помощью эндопротеиназы Glu-C [12]. Гидролизу, так же как и в случае расщепления по остаткам лизина, подвергали фермент, предварительно иммобилизованный по остаткам цистеина на тиопропил-сефарозе 6В. Схема выделения растворимых продуктов гидролиза включала в себя фракционирование смеси пептидов методами ВЭЖХ (гельпроникающая с последующей обращенно-фазовой).

Определение структуры пептида E-5 позволило восполнить недостающие фрагменты пептида M-7 и завершить реконструкцию С-концевого участка формиатдегидрогеназы (рис. 2).

Четыре пептида — E-1 — E-4 — принадлежат к N-концевому фрагменту белка. Пептид E-2 удлиняет на 6 аминокислотных остатков пептид R-4, а пептид E-4 на 5 остатков наращивает бромциановый фрагмент M-2 (рис. 2). Следует отметить, что в пептиде E-4 действительно присутствует последовательность Met-Met, объясняющая наличие лишь семи фрагментов бромцианового расщепления.

Согласно нашим предположениям, пептид E-3 должен находиться между фрагментами E-2 и E-4. Данный вывод о порядке расположения пептидов по ходу следования полипептидной цепи в молекуле белка полностью согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа, в процессе которого было проведено встраивание аминокислотной последовательности фермента в его пространственную структуру (следующая статья в данной серии). Следует отметить и хорошее совпадение данных аминокислотного анализа бромцианового фрагмента M-1 (табл. 1) с результатами, полученными на основе определения его последовательности (рис. 2, остатки 1—156).

Таким образом, для определения полной аминокислотной последовательности формиатдегидрогеназы потребовалось в общей сложности провести расщепление полипептидной цепи белка четырьмя различными способами: бромцианом по остаткам метионина, эндопротеиназой Lys-C по остаткам лизина, эндопротеиназой Glu-C по остаткам глутаминовой кислоты, триптическим гидролизом, а также привлечь данные по пространственной структуре белка.

Гомология бактериального фермента с формиатдегидрогеназами из других источников

Ферменты, окисляющие формиат, присутствуют у микроорганизмов многих таксономических групп [13]. Они также найдены у высших растений [14—17] и животных [18, 19].

Корреляционный анализ аминокислотного состава (коэффициенты $S\Delta Q$ *)
NAD-зависимых форматдегидрогеназ по [23]

	<i>Pseudomonas</i> sp. 101	<i>Pichia</i> <i>pastoris</i> IFP	<i>Pichia</i> <i>pastoris</i> NRRL	<i>Pisum</i> <i>sativum</i>
<i>P. pastoris</i> IFP	68 *	17 * 36 * 39 *		
<i>P. pastoris</i> NRRL	56			
<i>Pisum sativum</i>	58 *			
<i>Methanobacterium formicicum</i>	78	64 *	43	38 *

* $S\Delta Q = \sum_j (x_{i,j} - x_{k,j})^2$; x_j — содержание аминокислоты j (число остатков на 100); i, k — индексы белков. * — не учтены остатки триптофана.

Представляет интерес проследить гомологию среди форматдегидрогеназ из различных источников на уровне их аминокислотных последовательностей и брутто-состава.

К настоящему времени известна последовательность лишь одной форматдегидрогеназы из метаногенной археобактерии *Methanobacterium formicicum* [20], относящейся к классу NAD-независимых железосеросодержащих ферментов. Аминокислотный состав известен для двух NAD-зависимых форматдегидрогеназ дрожжей [21, 22] и одного фермента высших растений [15].

В табл. 2 представлены результаты корреляционного анализа аминокислотного состава форматдегидрогеназ из различных источников в соответствии с подходом Маршалониса и Вельтмана [23]. Согласно статистическому анализу, проведенному для более чем 5000 белков, два белка считаются родственными, если коэффициент $S\Delta Q$ для них меньше 100.

Сопоставление аминокислотного состава форматдегидрогеназы позволяет говорить об их определенной близости. Как и ожидалось, наиболее высокую степень корреляции обнаруживают форматдегидрогеназы из двух штаммов *Pichia pastoris* ($S\Delta Q=17$). Однако анализ данных табл. 2 указывает на родство между собой и других ферментов из столь эволюционно отдаленных источников, как бактерии, дрожжи и высшие растения ($S\Delta Q=36-78$ в зависимости от типа учитываемых аминокислотных остатков).

Рассмотрение табл. 2 позволяет выделить в ней три группы белков. В первую входят форматдегидрогеназы дрожжей и высших растений, проявляющие близкородственное отношение ($S\Delta Q=17-39$). Ко второй и третьей группе могут быть отнесены ферменты из *Pseudomonas* и *M. formicicum*, которые характеризуются коэффициентами корреляции ≥ 40 как относительно друг друга, так и относительно белков первой группы. Хотя величины коэффициентов $S\Delta Q$ для форматдегидрогеназы метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 выше, чем для белков из дрожжей и высших растений, в целом результаты корреляционного анализа подтверждают представления о сходстве этого фермента с NAD-зависимыми форматдегидрогеназами эукариот и находятся в соответствии с ранее отмеченным фактом, что по своим физико-химическим свойствам данный фермент ближе к белкам эукариот, чем к другим известным бактериальным форматдегидрогеназам.

Достаточно неожиданно выглядит неплохая корреляция в случае форматдегидрогеназы метаногенных бактерий *M. formicicum* — фермента с принципиально другой структурой, субстратной специфичностью и механизмом действия, чем NAD-зависимые форматдегидрогеназы [20].

Несмотря на очевидную близость аминокислотного состава, для некоторых отдельных аминокислотных остатков среди форматдегидрогеназ наблюдаются весьма существенные различия, которые должны отражаться на физико-химических свойствах белков, например их стабильности. В частности, содержание цистеина варьирует от всего лишь двух остатков

на субъединицу у *Candida methylica* [24] до трех у *P. pastoris* [21, 22] и достигает шести у *Pseudomonas* sp. 101 и *Pisum sativum* [15].

Экспериментальная часть

В работе использованы янтарный ангидрид, EDTA, бикарбонат аммония (Sigma, США), NAD, гидроксид калия, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, TEMED (Reanal, Венгрия), бромциан, SDS, Кумасси G-250 (Serva, ФРГ), гуанидингидрохлорид, трифторуксусная кислота (Pierce, США), меркаптоэтанол (Koch-Light, Англия), ацетонитрил (Merck, ФРГ), эндопротеиназа Lys-C, эндопротеиназа Glu-C (Boehringer, ФРГ), трипсин, обработанный L-1-тозиламино-2-фенилэтилхлорметилкетон (Worthington, США), реактивы для секвенатора фирмы Applied Biosystems (США), реактивы для аминокислотного анализатора фирмы LKB (Швеция), отечественные реактивы: дигидрофосфат калия, муравьиная кислота, соляная кислота (ос. ч.), мочевины, формиат натрия, сульфат аммония (х. ч.), метанол, абсолютный диоксан. Вода, применявшаяся в работе, после дистилляции проходила очистку на системе Milli-Q (Millipore, США).

Выделение бактериальной формиатдегидрогеназы. Формиатдегидрогеназу выделяли из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 методом, описанным ранее [1] и модифицированным введением стадии гидрофобной хроматографии на октил-сефарозе. Полученные препараты были гомогенны согласно результатам электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Выделение и очистка пептидов. Последней стадией очистки всех исследовавшихся пептидов была обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке с привитой фазой C₈ (Aquapore RP-300, 4,6×220 мм, с аналогичной предколонкой 4,6×15 мм, Brownlee Lab, США) в градиенте концентрации ацетонитрила (скорость 0,8 мл/мин). При необходимости производилась рехроматография.

Кроме того, пептиды, полученные в результате расщепления бромцианом, сначала фракционировали методом гельпроникающей хроматографии на колонке с биогелем P-10 (2,5×90 см, 10 мл/ч), используя в качестве элюирующей фазы смесь уксусная кислота — метанол, 2 : 3.

Полученные в результате расщепления иммобилизованной формиатдегидрогеназы эндопротеиназой Lys-C и эндопротеиназой Glu-C пептиды растворимых фракций предварительно фракционировали с помощью гельпроникающей ВЭЖХ на колонке TSK-2000 SW в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты на скорости 0,4 мл/мин.

ВЭЖХ проводили на жидкостных хроматографах фирм Altex (США) и Gilson (Франция), оборудованных спектрофотометрическими детекторами с переменной длиной волны. Детектировали пептиды по поглощению при 210 и 254 нм.

Расщепление формиатдегидрогеназы бромцианом. К винилпиридилированному по методике [11] белку (около 0,5 мкмоль), растворенному в 70% муравьиной кислоте, добавляли 300-кратный мольный избыток бромциана и выдерживали 12 ч в темноте при 20° С. Затем смесь разбавляли в 10 раз водой и лиофилизировали. Осадок растворяли в минимальном количестве 40% водной трифторуксусной кислоты и выделяли пептиды сочетанием методов гельпроникающей хроматографии и обращенно-фазовой ВЭЖХ (см. выше).

Иммобилизация формиатдегидрогеназы на тиопропил-сефарозе 6В. Концентрированный раствор (10 мг/мл) 0,1–0,5 мкмоль формиатдегидрогеназы добавляли к носителю, уравновешенному 6 М раствором гуанидингидрохлорида в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,6, содержащем 0,01 М EDTA. Объем носителя составлял 50% объема раствора белка. Иммобилизацию вели при перемешивании в атмосфере аргона в течение 6 ч. По окончании иммобилизации надосадочную жидкость отбирали, конъюгат промывали 6 М раствором гуанидингидрохлорида и уравновешивали буфером.

Ферментативный гидролиз формиатдегидрогеназы, иммобилизованной на тиопропил-сефарозе 6В. Ферментативный гидролиз иммобилизованной формиатдегидрогеназы осуществляли при помощи препаратов, имеющих коммерческие названия «эндопротеиназа Lys-C» и «эндопротеиназа Glu-C», а также трипсином. Расщепление проводили в схожих условиях: в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8,0, при перемешивании в течение 24 ч (трипсином — 8 ч). Объем геля составлял 50% объема реакционной смеси. Температура поддерживалась равной 35–38° С. Соотношение фермента и субстрата в случае эндопротеиназы Lys-C и трипсина составляло 1 : 100, а в случае эндопротеиназы Glu-C — 1 : 50. Контроль за протеканием реакции осуществляли при помощи гельпроникающей ВЭЖХ в описанных выше условиях.

По окончании расщепления промывали носитель с иммобилизованными на нем пептидами 6 М раствором гуанидингидрохлорида в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, полученный элюат использовали для выделения и характеристики пептидов, не содержащих остатков цистеина. Иммобилизованные на носителе цистеинсодержащие пептиды не исследовались.

Модификация аминокрупп N-концевого бромцианового пептида янтарным ангидридом. Лиофилизированный N-концевой бромциановый пептид М-1 (около 20 нмоль) растворяли в 0,2 М боратном буфере, pH 10,0, и при охлаждении добавляли раствор янтарного ангидрида в абсолютном диоксане (50-кратный мольный избыток по отношению к аминокруппам пептида). Через 2 ч реакцию, проходившую при 20° С, останавливали добавлением соляной кислоты. После обессоливания модифицированный пептид подвергали триптическому гидролизу.

Триптический гидролиз N-концевого бромцианового пептида, модифицированного янтарным ангидридом, проводили в трис-гидрохлоридном буфере, pH 8,0, содержащем 4 М мочевины, при 35–37° С в течение 15 ч. Соотношение трипсина и субстрата составляло 1 : 100. Контроль за протеканием реакции осуществляли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ, как описано выше.

Аминокислотный анализ и секвенирование пептидов. Для определения аминокислотного состава пептиды подвергались полному гидролизу 6 н. HCl при 110° С в течение 20 ч в вакууме. Анализ проводили на приборе модели 4151 Alpha Plus (LKB, Швеция).

Секвенирование пептидов проводили на газофазном секвенаторе модели 470 А, работающем совместно с анализатором ФТГ-производных аминокислот модели 120 А (Applied Biosystems, США).

Авторы выражают признательность фирме Applied Biosystems и лично г-ну В. Вужичу за предоставление на апробацию газофазного секвенатора. Авторы признательны А. Х. Мусолямову (ИОГен АН СССР) за помощь при выполнении аминокислотных анализов. Авторы благодарят А. М. Егорова (МГУ им. М. В. Ломоносова) за поддержку в проведении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egorov A. M., Avilova T. V., Dikov A. M., Popov V. O., Rodionov Yu. V., Berezin I. V. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 569–576.
2. Egorov A. M., Popov V. O., Rodionov Yu. V. // J. Solid-Phase Biochem. 1980. V. 5. № 1. P. 19–33.
3. Тишков В. И., Егоров А. М., Попов В. О. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 7. С. 1172–1180.
4. Попов В. О., Егоров А. М. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 2. С. 207–213.
5. Egorov A. M., Tishkov V. I., Popov V. O. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 659. № 1. P. 141–149.
6. Egorov A. M., Tishkov V. I., Daynichenko V. V., Popov V. O. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 709. № 1. P. 8–12.
7. Тишков В. И., Егоров А. М., Попов В. О. // Биоорган. химия. 1984. Т. 9. № 10. С. 1341–1347.
8. Ламзин В. С., Асадчиков В. Е., Попов В. О., Егоров А. М., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 4. С. 1011–1014.
9. Устинникова Т. Б., Попов В. О., Егоров А. М. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 905–909.
10. Устинникова Т. Б., Попов В. О., Егоров А. М., Егоров Ц. А. // Биополимеры и клетка. 1986. Т. 2. № 4. С. 129–135.

11. Fullmer C. S. // *Analyt. Biochem.* 1984. V. 142. № 2. P. 336-339.
12. Boehringer-Mannheim biochemicals catalogue (1987/88). P. 113.
13. Родионов Ю. В. // *Успехи микробиологии.* 1981. № 16. С. 104-138.
14. Peacock D., Boulter D. // *Biochem. J.* 1970. V. 120. № 4. P. 763-769.
15. Ohyama T., Yamazaki I. // *J. Biochem. (Tokyo).* 1974. V. 75. № 6. P. 1257-1263.
16. Uotila L., Koivusalo M. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1979. V. 196. № 1. P. 33-45.
17. Farinelli M. P., Fry D. W., Richardson K. E. // *Plant. Physiol.* 1983. V. 73. P. 858-859.
18. Mathews M. B., Vennesland B. // *J. Biol. Chem.* 1950. V. 186. № 3. P. 667-682.
19. Stritmatter P., Ball E. G. // *J. Cellular Comp. Physiol.* 1954. V. 43. № 1. P. 57-78.
20. Shuber A. P., Orr E. C., Rechny M. A., Schendel P. F., May H. D., Shauer N. L., Ferry J. G. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 28. P. 12942-12947.
21. Hou C. T., Patel R. N., Laskin A. I., Barnabe N. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1982. V. 216. № 1. P. 296-305.
22. Allais J., Louktibi A., Barrati J. // *Agric. Biol. Chem.* 1983. V. 47. № 11. P. 2547-2554.
23. Marchalonis J. J., Weltman J. K. // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1971. V. 38B. P. 609-625.
24. Avilova T. V., Egorova O. A., Ioanesyan L. S., Egorov A. M. // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 152. № 3. P. 657-662.

Поступила в редакцию

4.IV.1989

После доработки

31.X.1989

V. O. POPOV, I. A. SHUMILIN, T. B. USTINNIKOVA,
V. S. LAMZIN, Ts. A. EGOROV *

NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE FROM METHYLOTROPHIC BACTERIUM *PSEUDOMONAS* sp. 101. I. AMINO ACID SEQUENCE

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;*

** N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The primary structure of NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101 is determined. The enzyme is composed of two identical subunits, each comprising 393 amino acid residues, and has a molecular weight of 43.1 kD. To elucidate the protein's amino acid sequence, four types of digestion were used: cyanogen bromide cleavage at methionine residues, endoproteinase Lys-C digestion at lysine residues, endoproteinase Glu-C cleavage at glutamic acid residues, and tryptic digestion. The peptides obtained were purified to homogeneity and characterized.