



УДК 577.112.5 : 575.8

© 1991 г.

Г. И. Барам, М. А. Грачев, Н. Г. Маликов,
И. В. Назимов*, В. В. Шемякин

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МИОГЛОБИНА БАЙКАЛЬСКОЙ НЕРПЫ

Лимнологический институт СО АН СССР, Иркутск;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Аминокислотная последовательность миоглобина байкальской нерпы *Phoca sibirica*, определенная секвенированием по Эдману целого белка и разделенных микроколочной жидкостной хроматографией продуктов его расщепления бромцианом и протеиназами, оказалась идентичной аминокислотным последовательностям миоглобинов обыкновенного тюленя *Phoca vitulina largha* и серого тюленя *Halechoerus gryphus*. Это позволяет говорить о близком родстве указанных животных и о том, что они отделились от общего предка в последние 7 млн. лет.

Важным звеном в экосистеме озера Байкал является нерпа (*Phoca sibirica*). Происхождение этого животного до настоящего времени остается неясным. Существуют две основные гипотезы, которые связывают происхождение байкальской нерпы с разными периодами геологической истории. По первой из них байкальская нерпа считается реликтом позднего миоцена (около 20 млн. лет назад), проникшим в пра-Байкал из Северного Ледовитого океана [1]. Согласно второй гипотезе, которая представляется нам гораздо более правдоподобной [2], нерпа проникла в Байкал в период последних великих оледенений в плейстоцене (20—150 тыс. лет назад), когда сибирские реки были зажуржены ледяным щитом, а на пространствах Западной и Восточной Сибири существовали огромные пресноводные озера [3]. Из этих озер сток был направлен на запад в Аральское, Каспийское и Черное моря, связанные друг с другом постоянными либо временными водотоками. Ранее была предпринята попытка прояснить вопрос происхождения байкальской нерпы с помощью биохимического подхода [4]. Данные сравнительного исследования электрофоретической подвижности гемоглобинов близких животных показали, что байкальская нерпа наиболее близка к дальневосточному тюленю (*Phoca vitulina largha*), и позволили предположить, что видообразование всех обыкновенных тюленей произошло в пределах 9—18 млн. лет назад.

В настоящей работе для выяснения степени родства байкальской нерпы с другими тюленями применен метод молекулярной филогении, основанный на сравнении первичных структур миоглобинов [5].

Найденная в настоящей работе первичная структура миоглобина байкальской нерпы показана на рис. 1. Прямым секвенированием белка была установлена последовательность первых 43 аминокислотных остатков. Автоматическое секвенирование бромциановых пептидов В1 и В2 (рис. 2, данные рехроматографии не показаны) позволило определить последовательности аминокислотных остатков 132—152 и 56—96. Секвенирование триптических пептидов Т1, Т2 и Т3 (рис. 3) дало последовательности на участках 97—102, 103—108 и 148—153 соответственно. Секвенирование пептидов G1 и G2, полученных путем гидролиза белка эндопротеиназой Glu-C (глутаминовая протеиназа) по остаткам глутаминовой кислоты (хроматограмма гидролизата показана на рис. 4), дало структуры участков 86—97 и 123—133. Секвенирование пептида L1 (рис. 5), полученного путем гидролиза белка протеиназой Lys-C (лизинспецифическая протеиназа) по остаткам

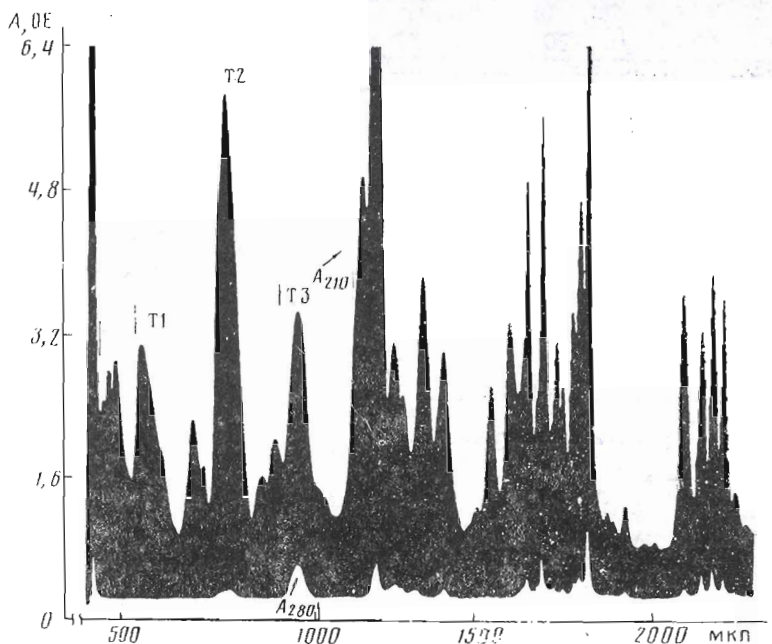


Рис. 3. Разделение продуктов триптического гидролиза миоглобина байкальской нерпы. Условия разделения как на рис. 2

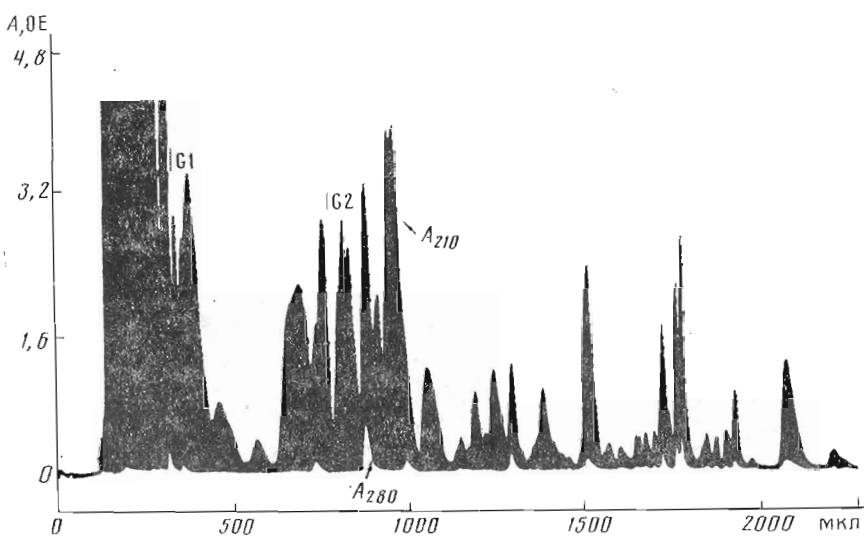


Рис. 4. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза миоглобина байкальской нерпы эндпротеиназой Glu-C. Условия разделения как на рис. 2

тельностью миоглобина *Phoca vitulina largha*, установленной путем расшифровки структуры белка [6], и миоглобина *Halichoerus gryphus*, установленной путем расшифровки структуры гена [7].

По данным исследований [8], средняя скорость эволюции миоглобина равняется одной аминокислотной замене за 7 млн. лет. Полученные нами результаты, а также последние данные по геологической истории Восточной Сибири [3] и Байкала [9] позволяют предположить, что наиболее вероятное время вселения нерпы в Байкал — плейстоцен. Возможно, тюлени были вытеснены льдом с севера в Великие сибирские озера [3] и затем расселились из них в Байкал, Каспий, в озера и реки Западной Европы, а затем, по мере таяния льдов, проникли в Байкальское и Северное моря. Нерпа способна мигрировать по озерам и рекам на расстояния в сотни километров [10]. Очевидно, что наличие единого пресноводного бассейна,

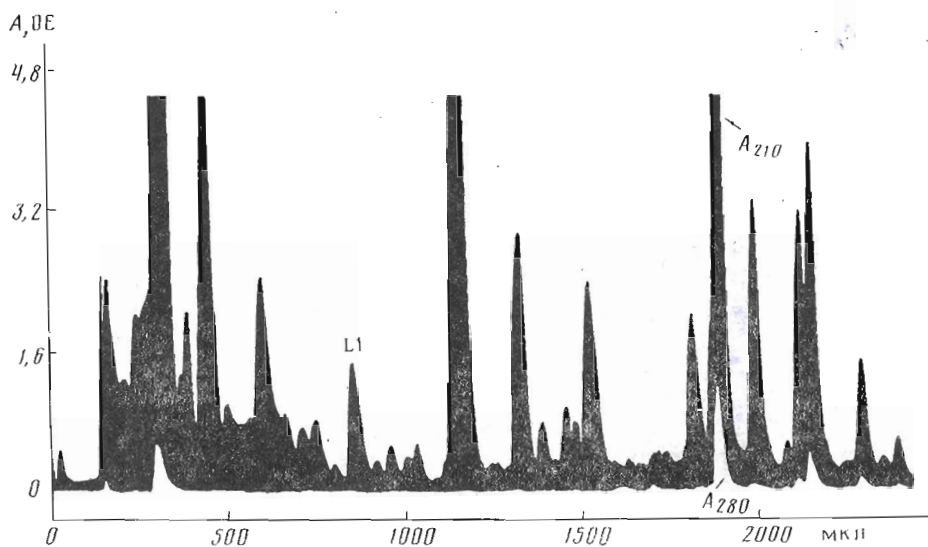


Рис. 5. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза миоглобина байкальской нерпы эндопроотеиназой Lys-C. Условия разделения как на рис. 2

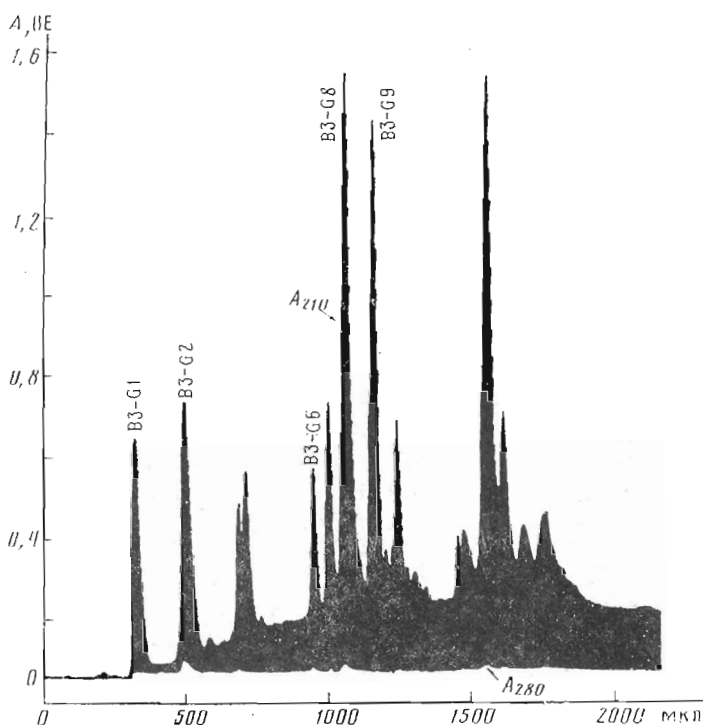


Рис. 6. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза бромцианового пептида B3 эндопроотеиназой Glu-C. Условия разделения как на рис. 2

связывавшего в период оледенений Байкал и Каспий, препятствовало репродуктивной изоляции популяций тюленей.

Данные настоящей работы не дают возможность окончательно подтвердить изложенную гипотезу. Для этого требуется, по-видимому, анализ митохондриальных ДНК тюленей, позволяющий датировать происхождение «молодых видов». Такое исследование представляется тем более интересным, что расселение тюленей могло происходить в то же время, что и расселение современного человека [11]. Археологические данные показывают, что на прибайкальских стоянках древнего человека возраста 20 тыс. лет кости нерп отсутствуют, но зато обильно встречаются на стоян-

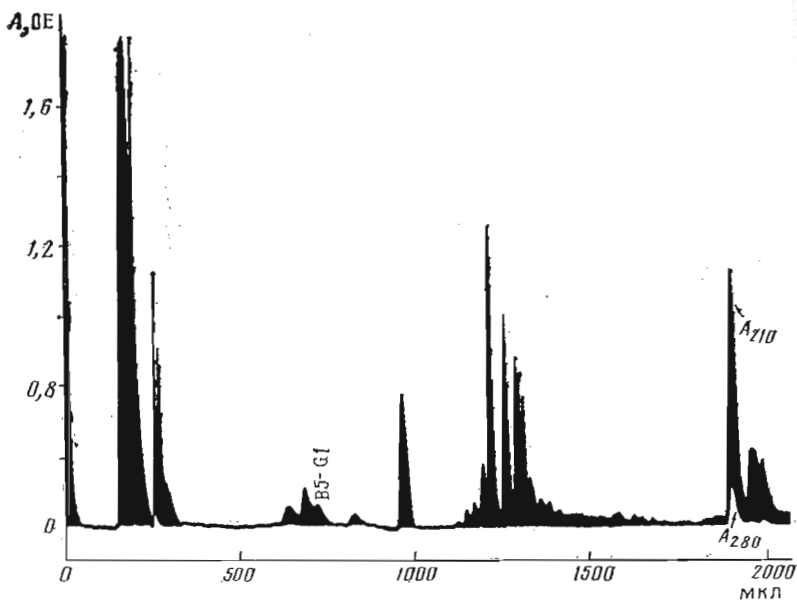


Рис. 7. Разделение пептидов, полученных в результате гидролиза бромцианового пептида В6 эндопроотеиназой Glu-C. Условия разделения как на рис. 2

ках возраста 10 и менее тысяч лет [12]. Определение последовательностей митохондриальных ДНК тюленей будет предметом наших дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

Миоглобин выделяли из сердечной мышцы байкальской нерпы. Выделение осуществляли по [13] сочетанием методов осаждения сульфатом аммония и хроматографии на CM-сефадексе. Гем удаляли обработкой белка подкисленным ацетоном (конц. HCl — ацетон, 1,5 : 98,5) при -15°C . Осадок освобожденного от гема белка собирали центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали. Белок был гомогенным по данным электрофореза в полиакриламидном геле.¹

Бромциановое расщепление. К белку, растворенному в 0,1 М HCl в концентрации 0,5 мг/мл, добавляли бромциан до концентрации 0,6 мг/мл, гидролиз проводили в течение 12 ч. Гидролизат лиофилизovali, растворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте и хроматографировали.

Ферментативный гидролиз белка и пептидов (5 мг/мл) осуществляли в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере (pH 8,3) в течение 24 ч при 37°C трипсином (Sigma, США), [E] 0,1 мг/мл, эндопроотеиназами Glu-C и Lys-C (Boehringer, ФРГ). [E] 0,1 и 0,05 мг/мл соответственно.

Разделение пептидов осуществляли на хроматографе «Милихром» (отечественное производство) методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии на сорбенте Nucleosil 5-C18 на колонках размером 2×64 мм по [14] с фотометрическим детектированием при 210 и 280 нм. В качестве элюента использовали градиент ацетонитрила (от 0 до 50%) в 0,1% трифторуксусной кислоте (см. подпись к рис. 2). Рехроматографию выделенных пептидов проводили в том же растворителе, но с более пологим градиентом ацетонитрила; повторную хроматографию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 50%) в 0,1 М растворе бикарбоната аммония, pH 7,8.

Аминокислотный анализ белка и пептидов (данные не приводятся) был любезно выполнен Ю. В. Смирновым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва) на приборе «Pico Tag» (Waters, США).

Секвенирование белка и пептидов осуществляли на газофазном секваторе 477А и Pth-анализаторе 120А фирмы «Applied Biosystems» (США); на секвенирование пептиды отбирали по данным аминокислотного анализа.

Авторы выражают благодарность В. Л. Зорину за любезно предоставленный материал для выделения белка, Г. А. Гришиной за помощь в определении структуры некоторых пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manning T. H. // J. Mammalogy. 1943. V. 24. № 1. P. 47—58.
2. McLaren J. A. // Amer. J. Sci. 1960. V. 258. № 1. P. 47—65.
3. Гросвальд М. Г., Глазовский А. Ф. Взаимодействие оледенений с океаном: палеогеографические аспекты. М.: АН СССР ВИНТИ, 1988. Серия «Палеогеография». Т. 5. С. 13—20.
4. Богданов Л. В., Пастухов В. Д. Морфо-физиологическое и экологическое исследование байкальской нерпы. Новосибирск: Наука, 1982. С. 7—12.
5. Fitch W. M., Margoliash E. // Science. 1967. V. 155. № 3760. P. 279—284.
6. Romera-Herrera A. G., Lehmann F. R. S., Joysey K. A., Friday A. E. // Philos. Trans. Roy. Soc. London. 1978. V. 283. № 995. P. 61—163.
7. Blanchetot A., Wilson A. S., Wood B., Jeffereys A. // Nature. 1983. V. 301. № 5909. P. 732—734.
8. Dayhoff M. O. Atlas of Protein Sequences and Structures. München: Silverspringer, 1972. V. 7. P. 41—42.
9. Кононов Е. Е., Мац В. Д. // Изв. вузов. Геология и разведка. 1986. Т. 1. № 6. С. 91—98.
10. Гурова Л. А., Пастухов В. Д. Питательные и пищевые взаимоотношения целангических рыб и нерпы Байкала. Новосибирск: Наука, 1974. С. 125—126.
11. Cann R. L., Stoneking M., Wilson A. C. // Nature. 1987. V. 325. № 6099. P. 31—36.
12. Горюнова О. И., Савельев Н. А. // Стратиграфия, палеогеография, археология юга Средней Сибири. Новосибирск: Наука, 1990. С. 125—131.
13. Harper K. D., Brandshaw R. A., Hartzell C. R., Gurd F. R. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 4. P. 683—689.
14. Baram G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. A., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 1. P. 69—90.

Поступила в редакцию
14.XII.1990

G. I. BARAM, M. A. GRACHEV, N. G. MALIKOV, I. V. NAZIMOV *,
V. V. SHEMYAKIN

SEQUENCE OF MYOGLOBIN OF THE SEAL OF LAKE BAIKAL

Limnological Institute, Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR, Irkutsk;

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

The primary structure of myoglobin of the seal of Lake Baikal (East Siberia) *Phoca siberica*, determined by sequencing the whole protein and peptides obtained by the cyanogen bromide or proteinase cleavage and separated by the microcolumn liquid chromatography, was found to be identical to the primary structures of myoglobins of the harbour seal *Phoca vitulina largha* and the grey seal *Haloheros gryphus*. It suggests that these species separated from a common ancestor less than seven million years ago.