



УДК 577.152.31*271'1

© 1993 г. А. А. Дементьев, Г. П. Моисеев, С. В. Шляпников

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ВНЕКЛЕТОЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ *Bacillus circulans*

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Ключевые слова: рибонуклеазы; белки, первичная структура.

Проведено сравнительное изучение структур индивидуальных пептидов, полученных при гидролизе РНКаз *Bacillus circulans* и *B. amyloliquefaciens* Glu-специфичной стафилококковой протеиназой, методами масс-спектрометрического анализа и автоматического секвенирования по Эдману. Установлена полная аминокислотная последовательность РНКазы *B. circulans*. Обнаружены локальные замены остатков Gln¹⁵, Gly⁶⁵ и Gln¹⁰⁴ в РНКазе *B. amyloliquefaciens* соответственно остатками Leu, Ala и Lys в РНКазе *B. circulans*. Исследованы каталитические свойства РНКазы *B. circulans* в реакциях трансэтерификации поли- и олигонуклеотидов.

Внеклеточные РНКазы микроорганизмов образуют гомологичное семейство белков про- и эукариотического происхождения, которые по ряду функциональных и структурных характеристик подразделяются на три подгруппы ферментов — РНКазы микроскопических грибов, РНКазы стрептомицетов и РНКазы бацилл [1]. Широкое видовое распространение бациллярных РНКаз, их небольшая молекулярная масса, высокая стабильность и простота выделения в высокоочищенном состоянии в препаративных количествах создают предпосылки для эффективного изучения процессов молекулярной эволюции этих ферментов и анализа корреляции их структуры и свойств.

Наиболее изученными представителями внеклеточных РНКаз бацилл (КФ 3.1.27.1) являются РНКазы *Bacillus amyloliquefaciens* (РНКазы *Ba*), *B. intermedius* (РНКазы *Bi*) и *B. thuringiensis* (РНКазы *Bth*). Определены аминокислотные последовательности РНКаз *Ba*, *Bi* и *Bth* [2–5], а для РНКаз *Ba* и *Bi* проведено исследование пространственных структур ферментов и их комплексов с квазисубстратами [6]. РНКазы *Bi* и *Bth* идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением локальной замены остатка Thr¹⁰⁶ в РНКазе *Bi* на Ala¹⁰⁶ в РНКазе *Bth*, уровень структурного сходства РНКаз *Bi* и *Bth* с РНКазой *Ba* составляет 83% [2–5].

Недавно нами выделен высокоактивный продуцент внеклеточной РНКазы, который по ряду морфологических и биохимических признаков идентифицирован как вид *B. circulans* [7], и разработана процедура очистки фермента (РНКазы *Bci*) из культуральной жидкости в препаративных количествах [8]. В настоящей

Сокращения: РНКазы *Bci*, *Ba*, *Bi* и *Bth* — РНКазы *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. intermedius* и *B. thuringiensis* соответственно. Номенклатура пептидов: SP-пептиды — продукты протеолиза РНКаз стафилококковой протеиназой, SP-СВ-пептиды — продукты расщепления SP-пептидов бромцианом.

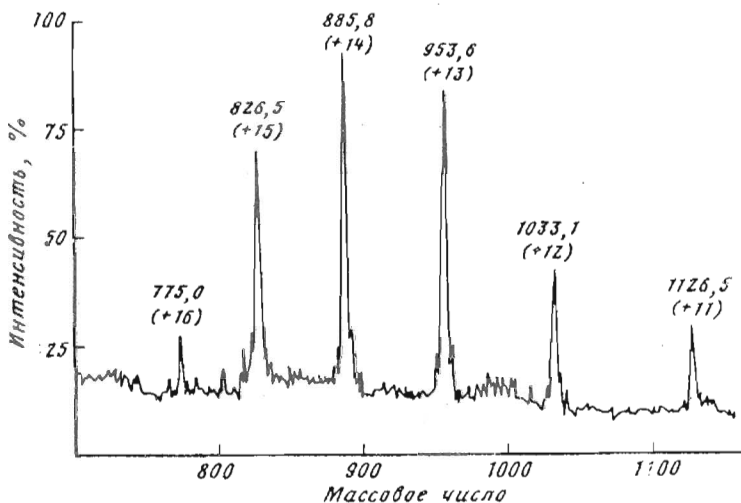


Рис. 1. Анализ молекулярной массы РНКазы *Vci* методом «electrospray»-масс-спектрометрии. Сверху указаны массовые числа и заряд (в скобках) квазимолекулярных ионов

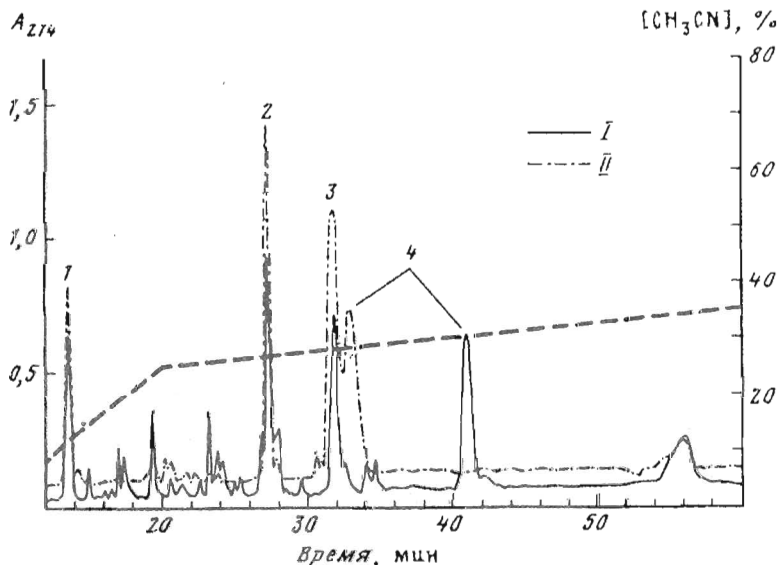


Рис. 2. Пептидные карты продуктов гидролиза РНКаз *Vci* (I) и *Va* (II) стафилококковой протеиназой V8. ВЭЖХ гидролизатов (0,3 мг) на колонке (0,4 × 10 см) Авароге RP-300, С-8. Элюция градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте со скоростью 0,7 мл/мин. Сверху указаны номера пептидов

работе представлены результаты определения полной первичной структуры РНКазы *Vci* и исследованы ее некоторые каталитические свойства в реакциях гидролиза поли- и олигонуклеотидов.

При расшифровке аминокислотной последовательности РНКазы *Vci* мы исходили из предположения о высоком уровне сходства в ряду внеклеточных РНКаз бацилл, что позволяло ограничиться анализом структур индивидуальных пептидов одного гидролизата, полученного при расщеплении РНКазы Glu-специфичной стафилококковой протеиназой. Структуру пептидов устанавливали методами масс-спектрометрии и автоматической деградацией по Эдману.

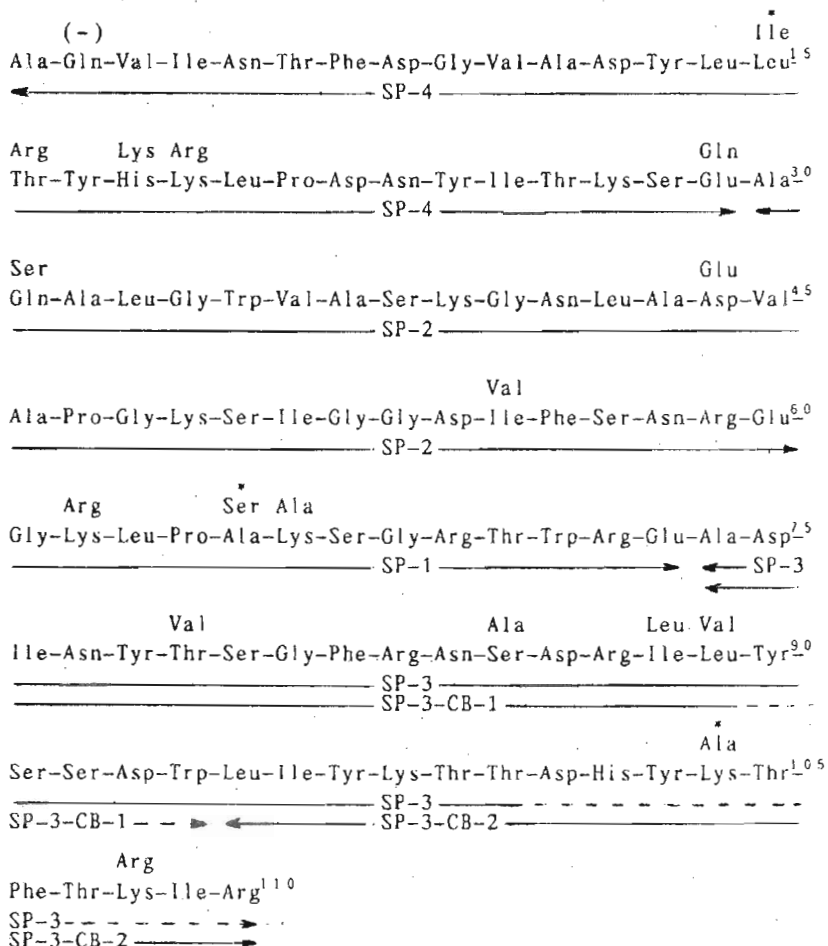


Рис. 3. Аминокислотная последовательность РНКазы *Bci*. Сверху приведены остатки РНКазы *Bi*, отличные от РНКазы *Bci*. В позиции 2 РНКазы *Bi* введена делеция. Звездочкой показаны места различий РНКаз *Bci* и *Ba* — в последней соответственно Gln¹⁵, Gly⁶⁵ и Gln¹⁰⁴. Снизу отмечены локализация пептидов и участки структуры (сплошные линии), расшифрованные методом автоматической деградации по Эдману

Согласно данным масс-спектрометрии, относительная молекулярная масса (M_r) РНКазы *Bci* составляет 12 384 а.е.м. (рис. 1) и по этому параметру наиболее близка РНКазе *Ba* (M_r 12 386). Относительные молекулярные массы РНКаз *Ba*, *Bi* и *Bth*, выведенные из аминокислотных последовательностей белков, равны соответственно 12 383, 12 212 и 12 182 а.е.м. РНКазы *Bci* и *Ba* имеют одинаковую N-концевую аминокислотную последовательность, за исключением единственной замены Gln¹⁵ в РНКазе *Ba* на остаток Leu¹⁵ в РНКазе *Bci* [8]. Сравнение РНКаз *Ba* и *Bi* выявляет в N-концевом локусе белков протяженностью 20 остатков наличие пяти аминокислотных замен [2—4].

Предварительное исследование гидролитического расщепления бациллярных РНКаз под действием стафилококковой протеиназы свидетельствует о различной устойчивости белков к протеолизу [8]. Так, РНКазы *Ba* не гидролизуются протеиназой в оптимальных для проявления специфичности фермента условиях [9] и расщепляется лишь при использовании калий-фосфатного буфера, pH 7,5, при 50° С — температуре, близкой к температуре денатурации белка. РНКазы *Bci* и *Ba* в этом отношении менее стабильны и эффективно гидролизуются протеиназой при 37° С.

Масс-спектрометрический анализ пептидов РНКаз *Vci* и *Va*

Пептид	Молекулярная масса пептидов (M_r)		Положение в цепи РНКазы <i>Va</i>
	РНКазы <i>Vci</i>	РНКазы <i>Va</i>	
SP-1	1485	1471	61—73
SP-2	3123	3130	30—60
SP-3	4499	4506	74—100
SP-4	3333	3349	1—29
SP-3-CB-1	2657	—	74—94
SP-3-CB-2	2187	—	95—110

Примечание. Молекулярные массы определены с точностью 0,3%. В пептидах VcCN-гидролизата остатки Trp и Trp модифицированы соответственно до 3-бромтирозина и N-ацил-диоксииндолилаланилактона [10].

Пептидное картирование гидролизатов РНКаз при электрофоретическом анализе продуктов расщепления белков стафилококковой протеиназой (SP-пептиды) в ПААГ [8] подтверждает общее сходство структур РНКаз *Vci* и *Va*. Индивидуальные пептиды гидролизатов двух белков выделены с использованием метода обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Хроматографические профили элюции гидролизатов РНКаз *Vci* и *Va* качественно совпадают (рис. 2). Характерным и принципиальным их отличием является положение на хроматограмме пептидов SP-4. Наличие четырех основных компонентов в гидролизатах белков соответствует их ожидаемому количеству, исходя из специфичности гидролиза пептидных связей стафилококковой протеиназой и содержания в белках трех остатков глутаминовой кислоты — в РНКазе *Va*: Glu²⁹, Glu⁶⁰ и Glu⁷³. Позиции двух последних остатков инвариантны для всех бациллярных РНКаз, а в РНКазе *Vci* третий остаток глутаминовой кислоты расположен в 44-м положении полипептидной цепи (см. рис. 3) [2—5].

Масс-спектрометрический анализ молекулярных масс SP-пептидов РНКазы *Vci*, результаты их полного или частичного секвенирования и сопоставление полученных данных с данными о структуре соответствующих фрагментов РНКазы *Va* показывают (табл. 1, рис. 3), что пептиды SP-1 — SP-4 представляют собой продукты специфического гидролиза белка стафилококковой протеиназой по трем остаткам глутаминовых кислот и вместе с тем позволяют локализовать взаимное расположение пептидов вдоль полипептидной цепи белка. Полные аминокислотные последовательности пептидов SP-4, SP-2 и SP-1, состыкованных друг с другом остатками Glu²⁹ и Glu⁶⁰, а также частичная структура примыкающего к ним С-концевого пептида SP-3 реконструируют значительную часть полипептидной цепи РНКазы *Vci*, включающую 100 аминокислотных остатков.

Недостающая информация для установления полной первичной структуры РНКазы *Vci* получена из результатов автоматической эдмановской деградации нефракционированных продуктов расщепления бромцианом С-концевого пептида SP-3 (SP-СВ-пептиды, табл. 1, 2). При специфическом гидролизе пептида бромцианом в результате разрыва пептидной связи по карбоксильной группе Trp⁹⁴ секвенированию подвергаются две полипептидные цепи: Ala/Leu-Asp/Le-Ile/Tyr-Asn/Lys-Tyr/Thr-Thr/Thr-Ser/Asp-Gly/His-Phe/Tyr-Arg/Lys-Asn/Thr-Ser/Phe-Asp/Thr-Arg/Lys-Ile/Ile-Leu/Arg..., характеризующие собой соответственно частичную и полную структуру пептидов SP-3-CB-1/SP-3-CB-2 (табл. 2). Анализ данных секвенирования с учетом ранее расшифрованной структуры N-концевой части пептида SP-3 (остатки 74—100, рис. 3) позволяет вывести полную структуру

Анализ продуктов бромцианового расщепления пептида SP-3 РНКазы *Vci* методом автоматической деградации по Эдману

Цикл деградации	Аминокислота (выход, пмоль)	
	пептид SP-3-СВ-1	пептид SP-3-СВ-2
1	Ala (190)	Leu (160)
2	Asp (122)	Ile (121)
3	Ile (155)	Tyr* (—)
4	Asn (103)	Lys (102)
5	Tyr* (—)	Thr (53)
6	Thr** (132)	Thr** (132)
7	Ser (95)	Asp (81)
8	Gly (62)	His (25)
9	Phe (87)	Tyr* (—)
10	Arg (43)	Lys (57)
11	Asn (51)	Thr (35)
12	Ser (28)	Phe (51)
13	Asp (30)	Thr (27)
14	Arg (22)	Lys (21)
15	Ile** (55)	Ile** (55)
16	Leu (34)	Arg (11)
Положение в цепи РНКазы	74—94	95—110

* Остатки, для которых выход соответствующих производных количественно не определялся [5].

** Остатки, для которых выход не дифференцирован для отдельных пептидов.

пептида SP-3-СВ-2 (остатки 95—110, табл. 2), а вместе с тем и С-концевую аминокислотную последовательность РНКазы *Vci*.

Реконструированная полипептидная цепь РНКазы *Vci* (рис. 3) содержит 110 остатков аминокислот: Asp 9, Asn 6, Thr 9, Ser 9, Glu 3, Gln 2, Pro 3, Gly 9, Ala 9, Val 4, Ile 8, Leu 8, Tyr 7, Phe 4, His 2, Arg 6, Lys 9 и Trp 3. Согласно данным аминокислотной последовательности, РНКазы имеет относительную молекулярную массу M_r 12 382, что совпадает с экспериментально найденным значением массы белка, равным 12 384 а.е.м. (рис. 1). Различия структур РНКаз *Vci* и *Va* локализованы в трех позициях аминокислотной последовательности: остаток Leu¹⁵ в РНКазе *Vci* заменен в РНКазе *Va* на остаток Gln¹⁵, а остатки Ala⁶⁵ и Lys¹⁰⁴ заменены в РНКазе *Va* соответственно остатками Gly и Gln. При сопоставлении первичных структур РНКаз *Vci* и *Vi* (рис. 3) обнаруживается 18 аминокислотных замен, не затрагивающих функционально важные участки ферментов [6].

Следует отметить эффект точечных мутаций РНКаз *Vci* и *Va* на хроматографические и электрофоретические свойства продуктов Glu-специфического протеолиза белков. Так, замена в РНКазе *Va* сравнительно с РНКазой *Vci* остатка Gln¹⁵ на Leu¹⁵ существенно увеличивает время элюции пептида SP-4 РНКазы *Vci* при обращенно-фазовой хроматографии (см. рис. 2), в то время как замены остатков Gly⁶⁵ и Gln¹⁰⁴ РНКазы *Va* остатками Ala⁶⁵ и Lys¹⁰⁴ в РНКазе *Vci* практически не изменяют гидрофобность пептидов SP-1 и SP-3. Вместе с тем последние две замены вносят заметные различия в электрофоретические свойства соответствующих пептидных фрагментов двух белков, что и проявляется в их отличной подвижности на ПААГ-электрофореграммах при кислых значениях pH [8].

РНКазы *Vci* подобно РНКазам *Va*, *Vi* и *Vth* относится к классу циклизующих

Кинетические параметры реакций трансэтерификации поли- и олигонуклеотидов РНКазы *Bci*, *Ba*, *Bth* и *Bi*

РНКазы	Субстрат	$k_{кат}$, с ⁻¹	$K_m \cdot 10^4$, М	$k_{кат}/K_m$, М ⁻¹ · с ⁻¹
<i>Bci</i>	poly(I)	870	0,9	$1,0 \cdot 10^7$
	poly(A)	7,8	1,6	$4,9 \cdot 10^4$
	ГрС	0,1	5,3	190
<i>Ba</i> [11]	poly(I)	1200	1,1	$1,1 \cdot 10^7$
	poly(A)	16	4,4	$3,6 \cdot 10^4$
	ГрС	0,5	33	160
<i>Bth</i> [4]	poly(I)	170	0,1	$1,7 \cdot 10^7$
	poly(A)	58	3,2	$1,8 \cdot 10^5$
	poly(U)	2,4	83	$2,9 \cdot 10^2$
	ГрС	0,5	2,3	$2,2 \cdot 10^3$
<i>Bi</i> [4]	poly(I)	150	0,2	$7,5 \cdot 10^6$
	poly(A)	77	4,0	$1,9 \cdot 10^5$
	poly(U)	2,0	50	$4,0 \cdot 10^2$
	ГрС	1,2	2,0	$6,0 \cdot 10^3$

РНКазы гидролизуют фосфодиэфирные связи РНК, поли- и олигорибонуклеотидов до соответствующих производных 3'-фосфорной кислоты с промежуточным образованием нуклеозид-2',3'-циклофосфатов [4, 11]. РНКазы гуанилспецифичны по отношению к низкомолекулярным субстратам и не расщепляют циклофосфаты аденозина, уридина и цитозина. При переходе к высокомолекулярным субстратам все бактериальные РНКазы, в том числе РНКазы *Bci*, теряют свою гуаниловую специфичность и с заметной скоростью катализируют расщепление не только poly(I), но и poly(A) и poly(U), хотя эффективность их гидролиза poly(I) существенно выше (табл. 3), т. е., строго говоря, РНКазы в этом случае скорее гуанилпредпочтительны.

Сравнение кинетических констант реакций трансэтерификации поли- и олигорибонуклеотидов бактериальными РНКазы показывает, что по каталитическим свойствам РНКазы *Bci* приближается к РНКазе *Ba*. Наибольшее различие РНКазы *Bci/Ba* и РНКазы *Bi/Bth* наблюдается при гидролизе динуклеозидфосфатов, в частности ГрС (см. табл. 3).

Высокая структурно-функциональная близость внеклеточных РНКазы бактерий разных таксономических групп, несмотря на значительные межвидовые различия генотипов микроорганизмов внутри рода *Bacillus* [12], отражает консервативный характер дивергентного процесса эволюции ферментов от общего предшественника.

Экспериментальная часть

Внеклеточную РНКазу *Bci* получали из фильтрата культуральной жидкости бактерий *B. circulans* (штамм ВСФ 247, коллекции Центра «Биоинженерия» РАН) по методике, описанной в работе [8]. Препарат РНКазы *Ba* любезно предоставлен К. И. Пановым (ИМБ РАН) и дополнительно очищен до гомогенного состояния при обращенно-фазовой хроматографии согласно работе [8].

Молекулярные массы РНКазы определяли методом «electrospray» — масс-спектрометрии [13] на времяпролетном масс-спектрометре (ФИНЭПХФ, г. Черноголовка) с точностью 0,04%. Регистрацию спектров вели в течение 5 мин при ускоряющем напряжении на источнике 200 В и скорости подачи образца 5 мкл/мин. Белок растворяли в смеси (1 : 1) 1% уксусной кислоты и ацетонитрила до концентрации 0,1 мМ.

Масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на времяпролетном масс-спектрометре с плазменной ионизацией анализируемого вещества продуктами распада ядер калифорния-252 (ПО «Электрон», Украина) [14]. Раствор пептида (0,1—0,2 нмоль) в 20 мкл воды наносили на подложку из слоя нитроцеллюлозы на твердом диске, высушивали и диск помещали в область ионизации. Точность определения массы составляет 0,3% при ускоряющем напряжении на пробе +15 кВ и суммарном распаде источника 150 000.

Протеолиз РНКаз стафилококковой протеиназой V8 (Pierce, США, 500—700 ед. акт./мг) осуществляли в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,5, при 37° С в течение 7 ч при однократном добавлении фермента в отношении к субстрату 1 : 50. Выделение пептидов, их расщепление бромцианом, а также расшифровку аминокислотных последовательностей проводили как опубликовано в работе [5]. Выход аминокислоты на определенной стадии секвенирования при автоматической деградации по методу Эдмана рассчитывали из отношения площади пика ее фенилтиогидантоиновой производной к площади пика соответствующего стандарта без учета фона «остаточных» продуктов секвенирования.

Кинетику ферментативных реакций трансэтерификации субстратов РНКазами прослеживали спектрофотометрическим методом [15] в 0,2 М натрий-цитратном буфере, pH 6,2, при 25° С.

Авторы выражают благодарность Ц. А. Егорову и А. Х. Мусолямову (ИМБ РАН) за проведение автоматического секвенирования и А. А. Шевченко (ИАП РАН) за получение масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shlyapnikov S. V., Dementiev A. A., Bezborodova S. I. // Sequence Studies on Microbial RNases. Proc. 1st Inter. Meeting «Structure and Chemistry of Ribonuclease»/Eds Pavlovsky A., Polyakov K. M.: Acad. Sci. of the USSR, 1989. P. 232—241.
2. Hartley R. W., Barker E. A. // Nature New Biol. 1972. V. 235. № 53. P. 15—16.
3. Aphanasenko G. A., Dudkin S. M., Kaminit L. B., Leshchinskaya I. B., Severin E. S. // FEBS Lett. 1979. V. 97. № 1. P. 77—80.
4. Дементьев А. А., Рябченко Н. Ф., Протасевич И. И., Гольшин П. Н., Степанов А. И., Орлов В. М., Пустобаев В. Н., Макаров А. А., Моисеев Г. П., Карпейский М. Я., Кирпичников М. П., Шляпников С. В. // Молекулярн. биология. 1992. Т. 26. № 6. С. 1338—1349.
5. Дементьев А. А., Орлов В. М., Шляпников С. В. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. № 9. С. 853—861.
6. Hill C., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsuo Y., Nakamura K., Borisov S., Tishenko G., Polyakov K., Pavlovsky A. // Trends Biochem. Sci. 1983. V. 8. № 10. С. 364—369.
7. Гольшин П. Н., Комбарова С. П., Рябченко Н. Ф., Воробьева Е. А., Соина В. С., Дементьев А. А., Шляпников С. В. // Прикл. биохимия и микробиол. 1993. Т. 29. № 6.
8. Дементьев А. А., Гольшин П. Н., Рябченко Н. Ф., Пустобаев В. Н., Шляпников С. В. // Биохимия. 1993. Т. 58. № 8. С. 1265—1272.
9. Houmard J., Drapeau G. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 12. P. 3506—3509.
10. Savige W. E., Fontana A. // Meth. Enzymol. 1977. V. 47. P. 459—469.
11. Струминская Н. К., Изайловский В. Л., Дементьев А. А., Моисеев Г. П., Федосов Ю. В., Яковлев Г. И. // Биол. науки. 1992. № 2. С. 41—44.
12. Seki T., Chung C.-K., Mikami H., Oshima Y. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1978. V. 28. № 2. P. 182—189.
13. Henry K. D., Quinn J. P., McLafferty F. W. // J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 14. P. 5447—5449.
14. Torgerson D. F., Skowronski R. P., Macfarlane R. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. № 2. P. 616—621.
15. Яковлев Г. И., Чепурнова Н. К., Моисеев Г. П., Бочаров А. А., Лопатнев С. В. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 338—343.

A. A. Dementiev, G. P. Moiseyev, S. V. Shlyapnikov

**PRIMARY STRUCTURE AND CATALYTIC PROPERTIES
OF *Bacillus circulans* EXTRACELLULAR RIBONUCLEASE**

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A comparative research of individual peptide structures obtained after hydrolysing of *Bacillus circulans* and *B. amyloliquefaciens* RNases by the Glu-specific staphylococcal protease was carried out by means of mass-spectrometry and Edman degradation methods. A complete amino acid sequence of *B. circulans* RNase was determined. Gln¹⁵, Gly⁶⁵ and Gln¹⁰⁴ residues in *B. amyloliquefaciens* RNase were found to be substituted by Leu, Ala and Lys residues in *B. circulans* RNase, respectively. Catalytic properties of the *B. circulans* RNase in transesterification reactions with poly- and oligonucleotides as substrates were investigated.