



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 9 * 1993

УДК 577.152.312*71:577.112.5

© 1993 А. А. Дементьев, В. М. Орлов, С. В. Шляпников

ПОЛНАЯ ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ БАКТЕРИИ

Bacillus thuringiensis

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

Расшифрована полная первичная структура внеклеточной низкомолекулярной рибонуклеазы *Bacillus thuringiensis*. В работе использовали автоматическую деградацию по Эдману и масс-спектрометрический анализ индивидуальных пептидов, полученных после расщепления белка бромцианом и стафилококковой протеиназой. Выделение и очистку пептидов проводили методами электрофореза в ПААГ в присутствии мочевины в кислых условиях и обращенно-фазовой хроматографией. Фермент состоит из 109 остатков аминокислот (Asp 8, Asn 6, Thr 6, Ser 10, Glu 3, Gln 1, Pro 3, Gly 9, Ala 12, Val 7, Ile 7, Leu 7, Түг 7, Phe 4, His 1, Arg 10, Тгр 3 и Lys 5) и имеет молекулярную массу 12 182 Да. Найдено единственное отличие структуры исследуемого фермента от первичной структуры внеклеточной РНКазы бактерии *B. intermedius*.

Внеклеточные рибонуклеазы микроорганизмов (КФ 3.1.27) осуществляют гидролиз полинуклеотидных цепей РНК по двухстадийному механизму с промежуточным образованием олигонуклеотид-2', 3'-циклофосфатов и последующим их расщеплением до соответствующих производных 3'-фосфорной кислоты. РНКазы образуют гомологичное семейство ферментов про- и эукариотического происхождения и различаются между собой отдельными элементами структуры, субстратной специфичностью и рядом каталитических и физико-химических свойств.

Среди циклизующих эукариотических микробных РНКаз наиболее изучены РНКазы микроскопических грибов [1—4], насчитывающие более 10 ферментов, для которых определены аминокислотные последовательности, а в ряде случаев и пространственные структуры и исследован детальный механизм ферментативного катализа. Внеклеточные циклизующие РНКазы бактериального происхождения в этом отношении изучены в существенно меньшей степени и ограничены двумя РНКазами подгруппы стрептомицетов — *Streptomyces aureofaciens* [5], *S. erythreus* [6] — и двумя РНКазами бацилл — *B. amyloliquefaciens* (РНКаза *Ba*, барназа) [7], *B. intermedius* (РНКаза *Bi*, биназа) [8].

РНКазы *Ba* и *Bi* близки по функциональным параметрам и являются низкомолекулярными щелочными белками с молекулярной массой ~12,5 кДа. РНКазы

Сокращения: РНКазы *Ba*, *Bi* и *Bth* — РНКазы *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. intermedius* и *B. thuringiensis* соответственно. СВ- и SP-пептиды — продукты гидролиза РНКаз бромцианом и стафилококковой протеиназой.

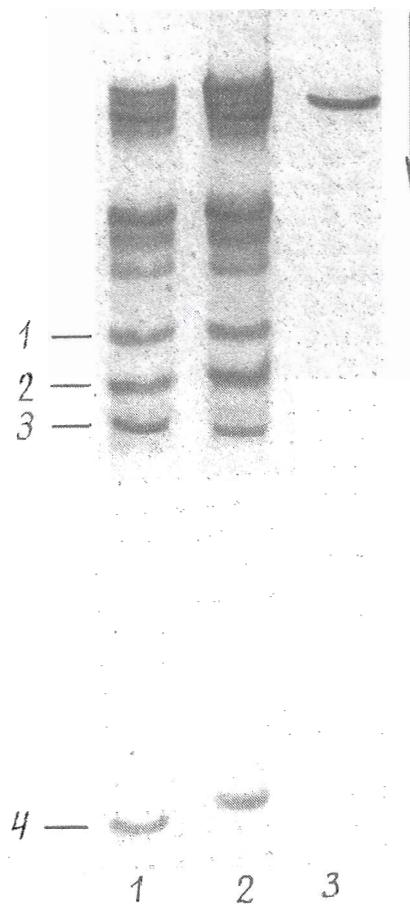


Рис. 1. Электрофорограмма бромциановых гидролизатов РНКаз *Bth* (1) и *Bi* (2). 3 — интактная РНКаза *Bth*. Электрофорез в пластинах ($0,5 \times 130 \times 170$ мм) 20% ПЛАГ в присутствии 6 М мочевины при рН 3,2. Слева показаны положения СВ-пептидов РНКаз

содержат соответственно 110 и 109 остатков аминокислот и характеризуются высококонсервативными первичными структурами, различающимися лишь в 18 позициях аминокислотной последовательности [7—9]. Настоящие данные ставят вопрос об общем уровне сходства и различий первичных структур внеклеточных РНКаз, секрецируемых различными систематическими группами бацилл, поиска новых продуцентов соответствующих ферментов и исследования процессов их эволюции на молекулярном уровне.

Ранее в нашей лаборатории был проведен анализ секреции РНКаз некоторыми штаммами *B. thuringiensis* и один из них, вариант *subtoxicus* B-388, использован в качестве источника внеклеточной РНКазы *Bth* [9]. Разработана процедура выделения индивидуального ферmenta, РНКаза *Bth* структурно и функционально подобна РНКазам *Ba* и *Bi*, но отличается от них некоторыми катализитическими и физико-химическими свойствами. Одно из существенных различий ферментов связано с более низкой термостабильностью РНКазы *Bth* [9].

В настоящей статье описано определение полной аминокислотной последовательности РНКазы *Bth*, что позволяет конкретизировать в деталях взаимосвязь структуры и свойств данного белка.

Таблица 1

Масс-спектрометрический анализ пептидов

РНКаз *Bth* и *Bi*

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидов СВ-4

РНКаз *Bth* и *Bi*

Пептид	Молекулярная масса пептидов		Положение в цепи РНКазы <i>Bi</i>
	РНКаза <i>Bth</i>	РНКаза <i>Bi</i>	
СВ-1	4117	4112	1—34
СВ-2	2896	2901	71—93
СВ-3	3695	3688	35—70
СВ-4	2126	2159	94—109
SP-1	1477	1474	60—72
SP-2	1638	1634	44—59
SP-3	3079	3085	44—72
SP-4	3635	3629	12—43
SP-5	4402	4436	73—109
SP-6	4729	4719	1—43

Аминокислота	РНКаза <i>Bth</i>	РНКаза <i>Bi</i> [8]
Asx	0,8(1)	1
Thr	2,6(3)	4
Ala	2,1(2)	1
Ile	1,3(2)	2
Leu	0,7(1)	1
Tyr	1,5*(2)	2
Phe	1,0(1)	1
Lys	1,2(1)	1
His	0,8(1)	1
Arg	1,9(2)	2

*Тир определяли в форме 3-бромтирозина.

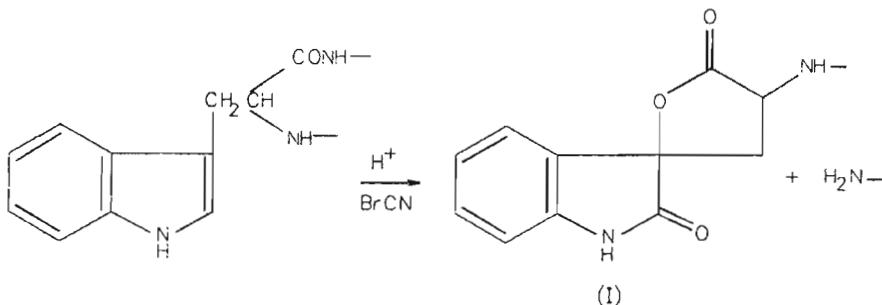
Согласно результатам предварительного секвенирования белка, РНКазы *Bth* и *Bi* имеют одинаковую аминокислотную последовательность длиной в 25 аминокислотных остатков в N-концевой области [9]. В молекуле РНКазы *Bth*, так же как и в РНКазе *Bi*, содержатся три остатка триптофана (в РНКазе *Bi*: Trp³⁴, Trp⁷⁰ и Trp⁹³), по-видимому, три остатка глутаминовой кислоты (в РНКазе *Bi*: Glu⁴³, Glu⁵⁹ и Glu⁷²) и отсутствуют остатки метионина и цистеина. Поэтому при исследовании полной аминокислотной последовательности РНКазы *Bth* мы использовали расщепление белка бромцианом и стафилококковой протеиназой в условиях специфического гидролиза соответственно по карбоксильным группам остатков Trp и Glu [10, 11] с последующим выделением индивидуальных пептидов и установлением их структур.

Пептиды бромцианового расщепления РНКаз *Bth* и *Bi* получены при разделении гидролизатов белков препартивным электрофорезом в полиакриламидном геле при pH 3,2 в присутствии 6 М мочевины [12].

Пептидные карты BrCN-гидролизатов РНКазы *Bth* и биназы качественно весьма схожи (рис. 1). Единственным их различием является положение пептида, обладающего наибольшей электрофоретической подвижностью (пептид СВ-4).

Данные масс-спектрометрического анализа (табл. 1, рис. 2), а также сходство структур СВ-пептидов РНКаз *Bth* и *Bi*, подтвержденное результатами секвенирования при автоматической деградации по методу Эдмана (рис. 3), свидетельствуют о том, что пептиды СВ-1 — СВ-4, расположенные в нижней части полиакриламидного геля (рис. 1), представляют собой продукты исчерпывающего расщепления молекул по остаткам триптофана. Пептиды в верхней части геля являются, по-видимому, продуктами неполного гидролиза данных белков. Экспериментально найденные величины молекулярных масс пептидов СВ-1 — СВ-3 РНКазы *Bth* неотличимы в пределах ошибки от молекулярных масс аналогичных пептидов РНКазы *Bi* (табл. 1) и совпадают с теоретическими значениями молекулярных масс для фрагментов биназы 1—34, 71—93 и 35—70 соответственно [8, 9], с учетом модификации в условиях окислительного бромирования бромцианом внутренних остатков тирозина преимущественно до 3-бромтирозина и C-конце-

вого остатка триптофана до N-ацилдиоксоиндолилаланинлактонового производного (I) [13] (схема).



В то же время молекулярные массы С-концевых пептидов CB-4 РНКаз *Bth* и *Bi* различаются между собой в соответствии с экспериментом на 33 а.е.м. (табл. 1, рис. 2). По данным эдмановской деградации, различие структур двух белков в исследуемом локусе локализовано в положении полипептидной цепи 106, где Thr РНКазы *Bi* заменен в РНКазе *Bth* остатком Ala (рис. 3).

Анализ аминокислотного состава показывает наличие в С-концевом пептиде РНКазы *Bth* трех остатков Thr и двух остатков Ala, тогда как аналогичный фрагмент РНКазы *Bi* содержит четыре остатка Thr и один остаток Ala (табл. 2). Оба соответствующих фрагмента РНКаз содержат два остатка Arg, один из которых является С-концевым остатком РНКазы *Bi*. Полученные результаты согласуются друг с другом и позволяют расшифровать полную

Число ионов

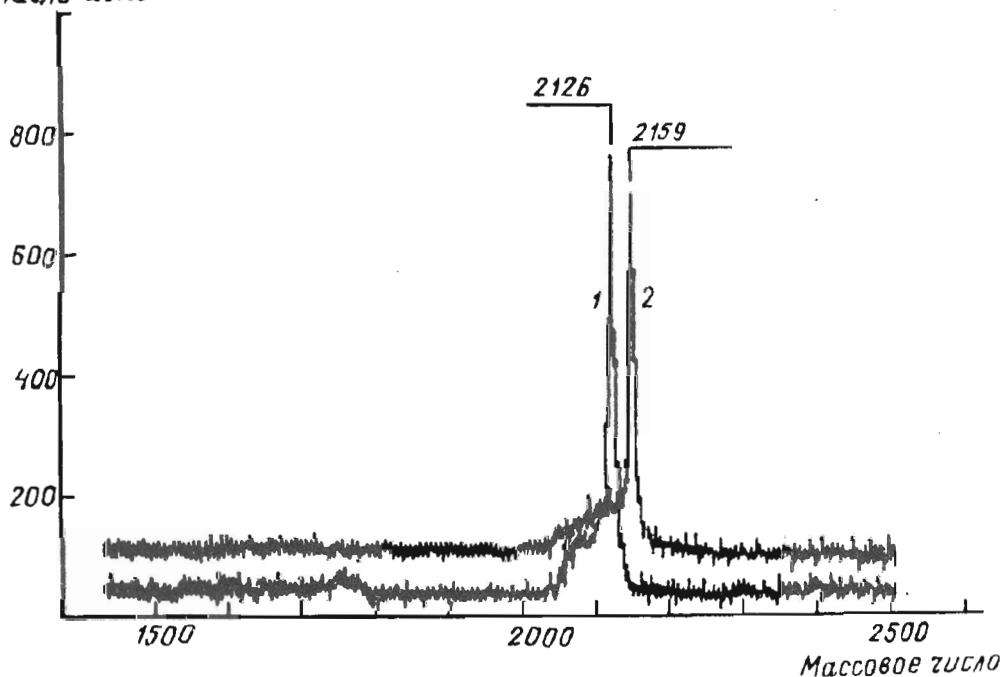


Рис. 2. Масс-спектрометрический анализ пептидов CB-4 РНКаз *Bth* (1) и *Bi* (2)

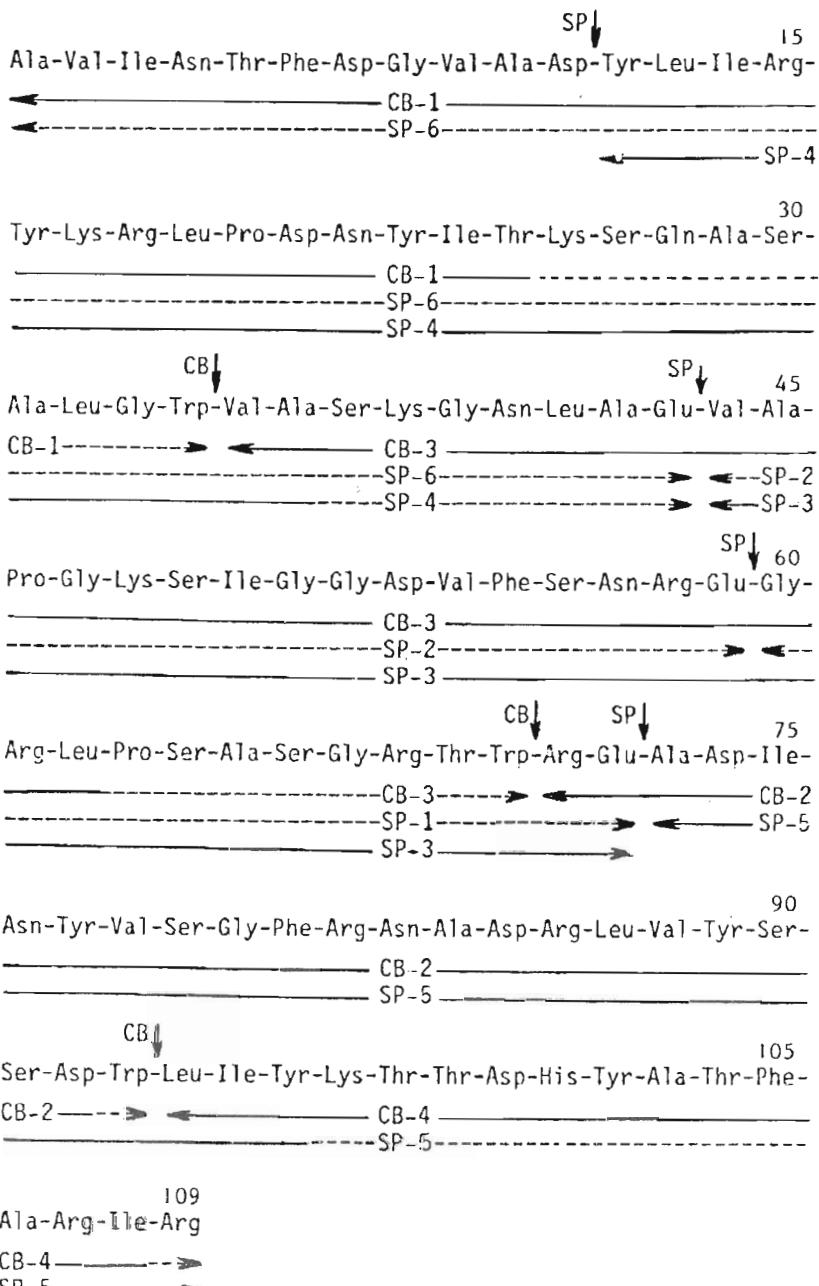


Рис. 3. Первичная структура РНКазы *Bth*. Сверху обозначены места расщепления полипептидной цепи РНКазы бромцианом (СВ) и стафилококковой протеиназой (СП). Сплошными линиями со стрелками отмечены аминокислотные последовательности пептидов, расшифрованные методом автоматической деградации по Эдману

аминокислотную последовательность пептида CB-4 РНКазы *Bth*, С-концевым остатком которого является, как и в случае РНКазы *Bi*, остаток Arg (см. табл. 1, 2 и рис. 2, 3).

Дополнительная информация для реконструкции полной первичной структуры РНКазы *Bth* получена при определении аминокислотных последовательностей

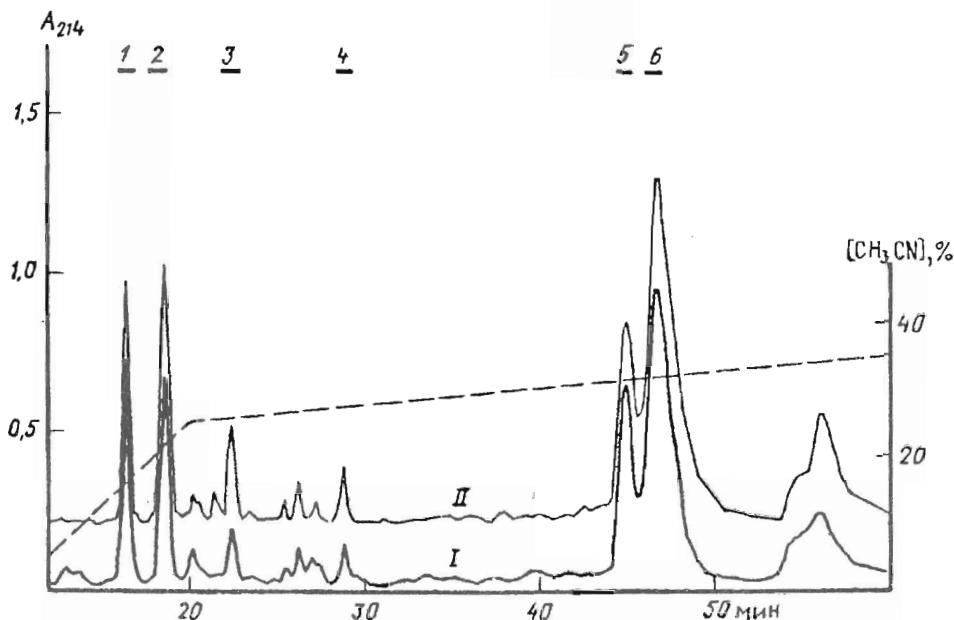


Рис. 4. Пептидные карты РНКаз *Bth* (I) и *Bi* (II) после их расщепления протеиназой V8. ВЭЖХ гидролизатов (0,5 мг) на колонке (0,4×10 см) Aquapore RP-300 C-8. Элюция в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте со скоростью 0,7 мл/мин. Сверху — номера SP-пептидов

отдельных индивидуальных пептидов, выделенных методом обращенно-фазовой хроматографии из смеси полипептидных фрагментов после гидролиза белка стафилококковой протеиназой V8.

Недавно нами было показано [14], что РНКаза *Bi* и ее гомологи весьма устойчивы к действию стафилококковой протеиназы и не расщепляются ферментом в буферных растворах с оптимальным для протеиназы значением рН при 37° С, в которых, как правило, гидролизуются пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков глутаминовых кислот [11]. Поэтому в настоящей работе гидролиз РНКаз проводили при 50° С — температуре, близкой к температуре их плавления ($t_m = 56,5$ и $53,7$ ° С для РНКаз *Bi* и *Bth* [9]), в калий-fosfatном буфере, в котором, согласно литературным данным [15], фермент проявляет максимальную активность.

Профили элюции исследуемых гидролизатов РНКаз *Bth* и *Bi* при схожих условиях ВЭЖХ в целом совпадают друг с другом (рис. 4) и содержат по четыре основных компонента, две из которых представлены парой отдельных пиков в начальной области хроматографии (SP-1 и SP-2), а две остальные — не полностью разрешенными пиками в конечном участке градиента концентрации ацетонитрила (SP-5 и SP-6). Эти результаты соответствуют ожидаемому количеству пептидных фрагментов РНКазы *Bi*, исходя из специфичности гидролиза стафилококковой протеиназой полипептидных связей и наличия в белке трех остатков глутаминовой кислоты [8, 11]. Принимая во внимание полное подобие ВЭЖХ-пептидных карт РНКаз *Bth* и *Bi*, следует предположить, что в молекуле РНКазы *Bth* также содержатся только три остатка Glu, причем все они локализованы в тех же местах полипептидной цепи, что и в РНКазе *Bi*. В пользу такого предположения говорят и данные о структурах бромциановых пептидов РНКазы *Bth*.

Масс-спектрометрический анализ молекулярных масс SP-пептидов РНКазы *Bth*, результаты их частичного или полного секвенирования автоматическим методом Эдмана и сопоставление полученных данных с соответствующими структурами фрагментов РНКазы *Bi* показывают (табл. 1, рис. 3), что пептиды SP-1,

SP-2, SP-5 и SP-6 представляют собой продукты исчерпывающего протеолиза белка по остаткам Glu. Два последних пептида — это соответственно C- и N-концевые фрагменты РНКазы с положением в полипептидной цепи белка 73—109 и 1—43. Пептиды SP-1 (остатки 60—72) и SP-2 (остатки 44—59) локализованы в центральной области РНКазы и примыкают соответственно к C- и N-концевым локусам молекулы.

В свою очередь пептид SP-3 (остатки 44—72) содержит внутренний остаток Glu⁵⁹ и является, таким образом, продуктом неполного расщепления РНКазы, тогда как пептид SP-4 (остатки 12—43) представляет собой продукт неспецифического гидролиза молекулы по связи Asp¹¹-Tyr¹².

Молекулярные массы SP-пептидов РНКаз *Bth* и *Bi* совпадают в пределах ошибки эксперимента и в последнем случае соответствуют их теоретическим значениям, выведенным из аминокислотной последовательности белка. Единственное исключение — отличие молекулярных масс пептидов SP-5 РНКаз на 34 а.е.м.— согласуется с ранее локализованной при изучении структур BrCN-пептидов заменой остатка Thr¹⁰⁶ РНКазы *Bi* на Ala в РНКазе *Bth* (табл. 1, рис. 3).

Расшифрованные аминокислотные последовательности SP-пептидов РНКазы *Bth* совместно с установленными ранее структурами пептидов BrCN-расщепления белка обеспечивают полную реконструкцию его аминокислотной последовательности (рис. 3). РНКаза *Bth* содержит 109 остатков аминокислот (Asp 8, Asn 6, Thr 6, Ser 10, Glu 3, Gln 1, Pro 3, Gly 9, Ala 12, Val 7, Ile 7, Leu 7, Tyr 7, Phe 4, His 1, Arg 10, Trp 3 и Lys 5) и имеет молекулярную массу 12 182 Да. В отличие от РНКазы *Bi* 106-м остатком РНКазы *Bth* является остаток Ala. Эта единственная природная мутация двух белков — причина меньшей термоустойчивости РНКазы *Bth* по сравнению с РНКазой *Bi* (температура денатурации РНКазы *Bth* на 2,8° С ниже, чем у биназы) и заметных различий значений калориметрических энталпий денатурации белков [9].

Высокая консервативность аминокислотных последовательностей внеклеточных низкомолекулярных РНКаз бацилл, несмотря на значительную межвидовую дивергенцию микроорганизмов, очевидно, отражает завершенность эволюционного процесса структурной адаптации данного класса ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали стафилококковую протеиназу V8 (Pierce, США, 500—700 ед. акт./мг), бромциан (Pierce, США).

Внеклеточную РНКазу *Bth* (КФ 3.1.27.1) из фильтрата культуральной жидкости бактерии *B. thuringiensis* (вариант *subtoxicus* штамма B-388) выделяли по методике, описанной в работе [9]. Коммерческий препарат РНКазы *Bi* (Экспериментальный завод медицинских препаратов Института органического синтеза, Латвия) дополнитель но очищали до гомогенного состояния методом обращенно-фазовой хроматографии согласно работе [9].

Расщепление белков BrCN проводили в 1,5 мл смеси (1:1) гептафтормасляной и 88% муравьиной кислот без доступа света при комнатной температуре в течение 24 ч и молярном соотношении реагента и субстрата 1000:1 [10]. Реагент и растворители отгоняли в токе азота, осадок разбавляли в 5 мл воды и высушивали лиофильно.

Протеолиз РНКаз стафилококковой протеиназой V8 осуществляли в 0,2 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,5, при 50° С в течение 7 ч и конечном соотношении фермент—субстрат 1:30. Протеиназу добавляли равными порциями через 1, 2, 3 и 5 ч с момента начала протеолиза.

Выделение и очистку пептидов из BrCN-гидролизатов белков проводили с помощью препартивного электрофореза в пластинках (1,5×140×170 мм) 20% полиакриламидного геля в присутствии 6 М мочевины и 0,9 М уксусной кислоты [12]. На гель наносили ~2 мг гидролизата белка. Окрашенные полосы после обработки геля в течение 3 мин кумасси голубым R-250 вырезали и гомогени-

зировали в центрифужных пробирках. Пептиды экстрагировали дважды 2 ч 2 мЛ 5% уксусной кислоты при постоянном перемешивании, экстракты объединяли и обессоливали на колонке (1×24 см) с сефадексом G-15, уравновешенным 0,05% трифтормуксусной кислотой.

Индивидуальные пептиды РНКаз после их расщепления протеиназой V8 получали с помощью обращенно-фазовой хроматографии исследуемых гидролизатов (~0,5 мг) на колонке (0,4×10 см) Aquapore RP-300 C-8 с использованием хроматографа фирмы Gilson (Франция). Элюцию пептидов вели со скоростью 0,7 мл/мин градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% трифтормуксусной кислоте.

Аминокислотный состав пептидов определяли на анализаторе Biotronik LC-2000 (Германия). Пептиды гидролизовали 24 ч 5,7 н. HCl при 105°С. Тут количественно определяли в форме 3-бромтироцина, который элюировался перед пиком Lys [10, 13].

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали методом автоматической деградации по Эдману на газофазном секвенаторе фирмы Knauer (модель 816, Германия), сопряженном с хроматографом фирмы Applied Biosystems (модель 120A PTH-Analyzer, США). При идентификации фенилтиогидантонов (Pth) аминокислот использовали градиентную систему, как описано в работе [16], в которой Pth-производное бромтироцина элюировалось одним пиком сразу же после фенилтиогидантонина Val.

Масс-спектры пептидов получали на времязпролетном масс-спектрометре с плазменно-ионизационной десорбцией анализируемого вещества продуктами распада ядер калифорния-252 (производственное объединение «Электрон», Украина) [17]. 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 квазимолекулярных ионов — 0,3% при ускоряющем напряжении на пробе +15 кВ и суммарном количестве распадов источника 150 000.

Авторы выражают благодарность Ц. А. Егорову (ИМБ РАН) за ценные критические замечания, высказанные в ходе проведения работы, А. Х. Мусолямову (ИМБ РАН) за проведение автоматического секвенирования полипептидных фрагментов и В. Н. Пустобаеву (ИМБ РАН) за получение масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi R./J. Biochem. 1985. V. 98. № 3. P. 815—817.
2. Bezburodova S. I., Khodova O. M., Stepanov V. M./FEBS Lett. 1983. V. 159. № 12. P. 256—258.
3. Hirabayashi J., Yoshida H./Biochem. Internat. 1983. V. 7. № 2. P. 255—262.
4. Shlyapnikov S. V., Dement'ev A. A., Bezburodova S. I./Sequence Studies on Microbial RNases. Proc. 1st Inter. Meeting «Structure and Chemistry of Ribonucleases»/Eds Pavlovsky A., Polyakov K. M.: Acad. Sci. of the USSR, 1989. P. 232—241.
5. Шляпников С. В., Ботт В., Куликов В. А., Дементьев А. А., Зелинка Я./Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 760—772.
6. Yoshida N., Sasaki A., Rashid M. A., Otsuka H./FEBS Lett. 1976. V. 64. № 1. P. 122—125.
7. Hartley R. W., Barker E. A./Nature New Biol. 1972. V. 235. № 53. P. 15—16.
8. Aphanasenko G. A., Dudkin S. M., Kamirin L. V., Leshchinskaya I. B., Severin E. S./FEBS Lett. 1979. V. 97. № 1. P. 77—80.
9. Дементьев А. А., Рябченко Н. Ф., Протасевич И. И., Гольшин П. Н., Степанов А. И., Облов В. М., Пустобаев В. Н., Макаров А. А., Мусеев Г. Г., Карпейский М. Я., Кирпичников М. П., Шляпников С. В./Молекулярная биология. 1992. Т. 26. № 6. С. 1338—1349.
10. Ozols J., Gerard C./J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 17. P. 5986—5989.
11. Houmard J., Drapeau G. R./Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 12. P. 3506—3509.
12. Panyim S., Chalkley R./Arch. Biochem. and Biophys. 1969. V. 130. № 1—2. P. 337—346.
13. Savidge W. E., Fontana A./Meth. Enzymol. 1977. V. 47. P. 459—469.

14. Дементьев А. А., Гольшин И. И., Рыбченко И. Ф., Пустобаев В. И., Шляпников С. В. // Биохимия. 1993. Т. 58. № 8. С. 1265—1272.
15. Austen B. M., Smith E. L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 72. № 2. P. 411—417.
16. Hankapiller M. W., Hood L. E. // Meth. Enzymol. 1983. V. 91. P. 486—493.
17. Torgerson D. F., Skowronski R. P., Macfarlane R. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. № 2. P. 616—621.

Поступила в редакцию
17.III.1993

A. A. Dementiev, V. M. Orlov, S. V. Shlyapnikov

COMPLETE PRIMARY STRUCTURE OF AN EXTRACELLULAR
RIBONUCLEASE OF *Bacillus thuringiensis*

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

Complete primary structure of an extracellular low molecular mass ribonuclease of *Bacillus thuringiensis* was determined using Edman degradation and mass-spectrometry analysis of individual peptides obtained after hydrolysis of the protein by cyanogen bromide and staphylococcal protease. The peptides were isolated and purified by HPLC and denaturing PAGE. The enzyme consists of 109 amino acid residues (Asp 8, Asn 6, Thr 6, Ser 10, Glu 3, Gln 1, Pro 3, Gly 9, Ala 12, Val 7, Ile 7, Leu 7, Tyr 7, Phe 4, His 1, Arg 10, Trp 3 and Lys 5) and has a molecular weight of 12182 Da. A single difference was detected between primary structures of the enzyme and an extracellular ribonuclease of *B. intermedius*.