



УДК 547.96

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА α -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*

III. ПЕПТИДЫ ТЕРМОЛИТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА

Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В.,
Модянов Н. Н., Липкин В. М.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Проведен гидролиз α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* В термолизином. С целью специфического выделения из гидролизата лизин- и аргининсодержащих пептидов был использован препарат белка, полученный из бактерий, выращенных на среде, содержащей [^{14}C] лизин и аргинин. В результате было выделено 37 пептидов и определена их аминокислотная последовательность.

В предыдущих статьях сообщалось о выделении и установлении аминокислотной последовательности пептидов, полученных при гидролизе α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* В трипсином и протеазой из *Staphylococcus aureus* (Sp-пептиды) [1, 2]. Для получения недостающих перекрытий между пептидами триптического гидролиза был проведен гидролиз α -субъединицы термолизином. Поскольку в данном случае наибольший интерес представляли пептиды, содержащие остатки лизина и аргинина, был использован препарат белка, радиоактивно меченый ^{14}C только по этим аминокислотам, который получался из бактерий, выращенных на среде с мечеными лизином и аргинином.

Гидролиз α -субъединицы термолизином проводился при pH 8,0 и соотношении фермент — субстрат 1 : 50 (по весу). Для первоначального фракционирования образовавшейся смеси пептидов использовалась хроматография на катионите PA-35 с размером зерна 17 мкм, содержащем 8% шшивок. Выбор такой смолы обуславливался тем, что при термолитическом гидролизе образуется большое число относительно мелких пептидов. Кривая разделения пептидов представлена на рис. 1. Измерение радиоактивности объединенных фракций с помощью сцинтилляционного счетчика позволило обнаружить фракции, в состав которых входили лизин- или аргининсодержащие пептиды. Анализ состава этих фракций проводился хроматографией в тонком слое целлюлозы. Как видно из рис. 2, при хроматографии на целлюлозе было получено хорошее разрешение, поэтому для выделения пептидов из всех фракций (кроме фракции 24, которая оказалась гомогенным пептидом Th-24-1) была использована бумажная хроматография. Обнаружение пептидов на бумаге осуществлялось с помощью автордиографии, что позволило избирательно и с минимальными потерями выделить искомые пептиды. На всю работу было израсходовано

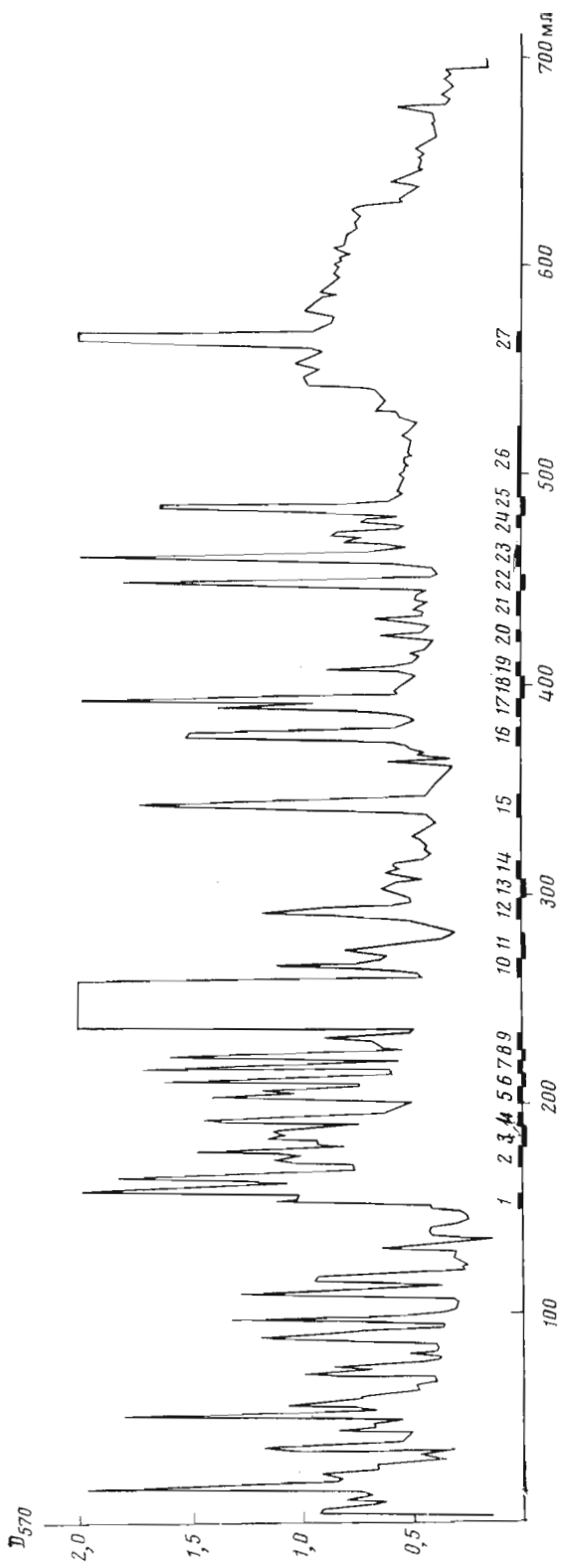


Рис. 1. Разделение термолabile пептидов α -субъединицы РНК-полимеразы на катионите РА-35. Черными прямоугольниками на оси абсцисс отмечены объединенные фракции, содержащие радиоактивность

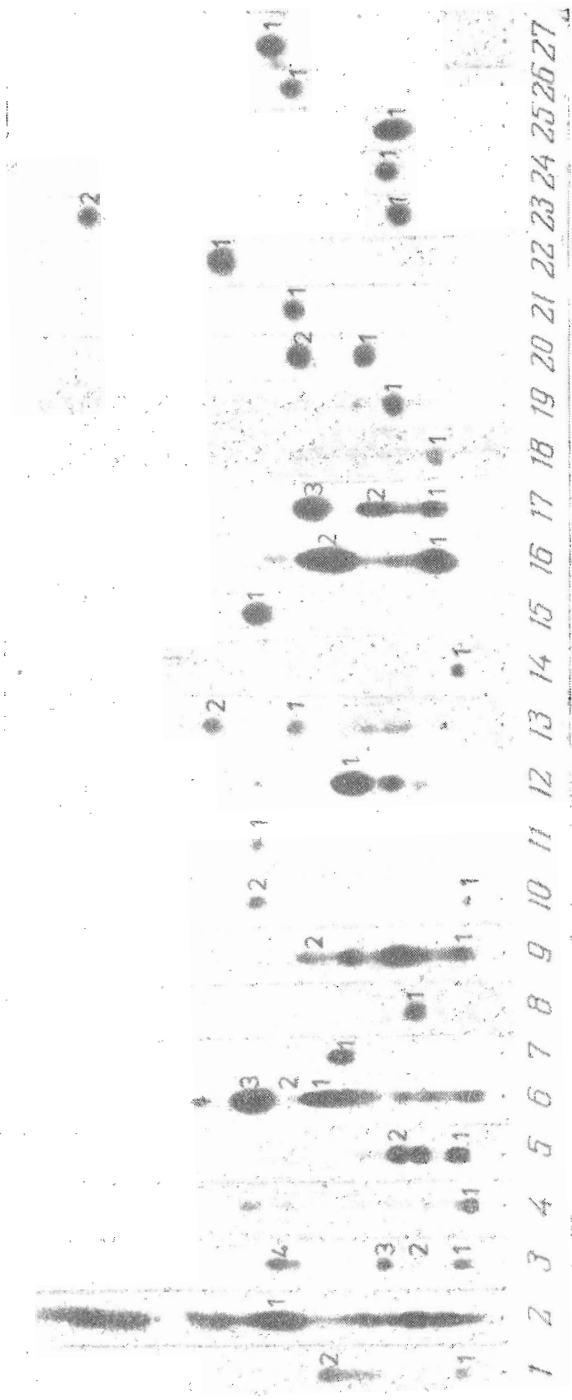


Рис. 2. Анализ состава объединенных фракций термолитического гидролизата α -субъединицы РНК-полимеразы хроматографией в тонком слое целлюлозы в системе 1. Цифрами 1—4 отмечены пептиды, обнаруживаемые с помощью автордиографии

Таблица 1

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе α -субъединицы термолизинном

Аминокислота	Пептиды *									
	Th-1-1	Th-1-2	Th-2-1	Th-3-1	Th-3-4	Th-4-1	Th-5-1	Th-5-2		
Asp	1,13(1)	4,14(1)		1,98(2)	1,28(1)		1,08(1)	1,10(1)		
Thr	0,97(1)	0,97(1)		0,92(1)	4,05(1)	0,89(1)	1,05(1)	0,82(1)		
Ser	2,08(2)	4,29(1)	2,35(2)	2,34(2)	1,01(1)	1,05(1)	3,12(3)	1,08(1)		
Glu			1,42(1)	1,00(1)		1,43(1)	1,02(1)			
Pro			1,25(1)	1,39(1)						
Gly										
Ala	0,95(1)			1,87(2) **						
Val										
Met										
Ile		0,82(1)		1,85(2) **	1,70(2)		0,52(1)	0,51(1)		
Leu		0,87(1)	1,89(2) **							
Tyr										
Phe										
His										
Lys										
Arg	0,87(1)	0,91(1)	1,03(1)	1,56(2)	0,92(1)	0,91(1)	0,54(1)	0,99(1)		
Число остатков	6	6	7	14	6	5	9	5		
N-Концевая аминокислота	Val	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu		
Выход, %	33	25	4,8	16	4,0	24	46	11		

Аминокислота	Пептиды											
	Th-6-1	Th-6-3	Th-7-1	Th-8-1	Th-9-1	Th-9-2	Th-10-1	Th-10-2	Th-11-1			
Asp	1,20(1)	1,09(1)		1,04(1)	1,20(1)			1,22(1)		Th-10-1	Th-10-2	Th-11-1
Thr								1,06(1)				
Ser	5,35(5)			1,04(1)	5,31(5)			1,44(1)				1,34(1)
Glu	3,11(3)		1,15(1)		2,62(3)			1,18(1)				1,09(1)
Pro												1,05(1)
Gly				1,19(1)				1,09(1)				
Ala			1,99(2)									
Val	1,86(2)				1,92(2)			1,89(2)				0,96(1)
Met												
Ile	0,81(1)											
Leu	0,83(1)		0,85(1)	0,74(1)								
Tyr												0,48(1)
Phe	0,97(1)							0,54(1)				
His												
Lys	2,00(2)		1,01(1)	0,97(1)	2,00(2)			0,84(1)				0,89(1)
Arg	0,86(1)				0,86(1)							
Число остатков	17	4	5	5	15	6		1,61(2)				6
N-Концевая аминокислота	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Ala					Tyr
Выход, %	11	18	37	20	4	14	4					23

АМИНОКИСЛОТА	Пептиды											
	Th-12-1	Th-13-1	Th-13-2	Th-14-1	Th-16-1	Th-16-2	Th-17-1					
Asp				4,18(1)		4,18(1)				4,18(1)		
Thr				4,16(1)								4,05(1)
Ser			4,27(1)				2,17(2)					
Glu	1,15(1)											
Pro												1,06(1)
Gly	1,15(1)	1,10(1)	4,29(1)									1,02(1)
Ala			1,05(1)				4,15(1)		4,03(1)			
Val			0,79(1)				0,70(1)					
Met												
Ile												
Leu	0,80(1)	0,82(1)	0,76(1)							0,84(1)		
Tyr												
Phe												
His												
Lys									0,97(1)			
Arg	0,90(1)	1,11(1)	0,85(1)	1,67(2)						0,98(1)		0,88(1)
Число остатков	4	4	6	8	2	3	4					
N-Концевая аминокислота	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Leu						Ala
Выход, %	24	3,6	20	4,8	41	35						21

АМИНОКИСЛОТА	ПЕПТИДЫ														
	Th-17-2	Th-17-3	Th-18-1	Th-19-1	Th-20-1	Th-20-2	Th-21-1								
Asp															
Thr			0,94(1)												
Ser			2,04(2)												
Glu	1,21(1)									1,12(1)					
Pro	1,00(1)														
Gly		1,28(1)													1,05(1)
Ala			1,13(1)	1,99(2)											
Val	0,86(1) **		0,86(1)						0,99(1)						
Met															
Ile	0,84(1) **														
Leu		0,65(1)									0,89(1)				0,91(1)
Tyr															
Phe			0,76(1)												
His	0,56(1)														
Lys	0,93(1)	1,07(1)	1,02(1)												
Arg															
Число остатков	6	3	7	3	0,87(1)	4,04(1)	3	2	3	3	2	3	3	3	3
N-Концевая аминокислота	Ile	Leu	Val	Ala	Val	Ile	Val	Ile	Val	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile
Выход, %	12	34	7	9	44	24	44	24	44	44	24	24	24	24	24

Аминокислота	Пептиды									
	Th-22-1	Th-23-1	Th-23-2	Th-24-1	Th-25-1	Th-26-1	Th-27-1			
Asp										
Thr		1,03(1)								
Ser					1,05(1)					
Glu										
Pro	1,22(1)									
Gly			1,46(1)		1,13(1)					
Ala										
Val				1,00(1)		1,03(1)				
Met										
Ile			0,97(1)				0,87(1)			
Leu	0,80(1)		1,01(1)		0,80(1)					
Tyr										
Phe										
His										
Lys										
Arg	0,95(1)	0,97(1)	0,86(1)	1,00(1)	2,02(2)	0,97(1)	1,00(1)			
Число остатков	3	2	4	2	5	2	2			
N-Концевая	Leu	Thr	Ile	Ala	Leu	Val	Met			
аминокислота										
Выход, %	32	28	26	26	36	36	39			

* Примеси менее 0,2 аминокислотного остатка в таблицу не включены.
 ** Результаты гидролиза в течение 72 ч.

Аминокислотная последовательность пептидов термолитического гидролиза α -субъединицы, являющихся фрагментами триптических или Sp-пептидов

Термолитический пептид	Аминокислотная последовательность *	Триптический или Sp-пептид
Th-3-1	Ile-Thr-His-Asx-Gly-Asx-Val-Glx-Ile (Val, Lys, Pro, Glx, His) → → → → → → → →	T-X-1
Th-5-1	Ile-His-Ser-Glx (Glx, Asx, Glx, Arg, Pro) → → → →	T-XVIII-1
Th-6-3	Leu-Asx-Lys-Leu → → → →	Sp-XI-1
Th-10-2	Tyr-Ser-Pro-Val-Glx-Arg → → → → →	T-VII-4
Th-13-1	Leu-Gly-Met-Arg → → → →	T-XVIII-5
Th-13-2	Val-Leu-Ala-Ser-Arg-Gly → → → → →	Sp-XXI-2
Th-16-1	Ala-Lys → →	T-X-2
Th-16-2	Leu-Arg-Asx → → →	Sp-XVII-1
Th-17-1	Ala-Ser-Arg-Gly → → → →	Sp-XXI-2
Th-17-2	Ile-Val-Lys-Pro-Gln-His ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒ ⇒	T-X-1
Th-17-3	Leu-Lys-Gly → → →	Sp-XXIV-2
Th-18-1	Val-Ser-Ser-Thr (His, Ala, Lys) → → → →	T-X-2
Th-19-1	Ala-Ala-Arg → → →	T-XIII-3
Th-20-1	Val-Arg-Ser → → →	Sp-XVII-2
Th-20-2	Ile-Lys → →	T-XVII-4
Th-21-1	Ile-Gly-Arg → → →	T-XVIII-1
Th-22-1	Leu-Arg-Pro → → →	T-XI-3
Th-23-1	Thr-Arg → →	T-XIII-2
Th-23-2	Ile-Gly-Arg-Leu → → → →	Sp-XII-1
Th-24-1	Ala-Arg → →	T-XIII-3
Th-25-1	Leu-Gly-Lys-Lys-Ser → → → → →	Sp-XXV-1
Th-26-1	Val-Arg → →	T-XVI-4
Th-27-1	Met-Arg → →	T-X-1 T-XVIII-5

* Стрелками показаны стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией ФТГ (→), ДНС (⇒), ФТГ и ДНС (⇒⇒) производных (в табл. 2 и 3).

0,5 мкмоль белка. Пептиды Th-2-1 и Th-3-4 были получены в чистом виде после дополнительной очистки с помощью электрофореза на бумаге при pH 1,9.

Всего из термолитического гидролизата было выделено 37 пептидов. Исчерпывающие данные о распределении пептидов по фракциям, их аминокислотный состав, N-концевые аминокислотные остатки и выход приведены в табл. 1. Практически все пептиды элюировались с ионообменной колонки в виде узких зон и собирались в одной фракции. Все выделенные пептиды, по данным аминокислотного анализа, содержали как минимум по одному остатку лизина или аргинина.

Таблица 3

Аминокислотная последовательность пептидов термолитического гидролиза α -субъединицы, содержащих в середине пептидной цепи остаток лизина или аргинина

Пептид	Аминокислотная последовательность
Th-1-1	Val-Glu-Gln-Arg-Thr-Asp → → → → →
Th-1-2	Leu-Thr-Glx-Ile-Lys-Asx → → → → →
Th-2-1	Leu-Glx-Pro-Leu-Glx-Arg-Gly → → → → →
Th-3-4	Leu-Leu-Lys-Thr-Pro-Asx → → → → →
Th-4-1	Ser-Thr-Lys-Glu-Gly → → → → →
Th-5-2	Leu-Lys-Thr-Pro-Asn → → → → →
Th-6-1	Val-Arg-Glx-Pro-Glx-Val-Lys-Glx-Glx-Lys-Pro- → → → → → → → → → (Glx, Phe, Asx, Pro, Ile, Leu)
Th-7-1	Leu-Lys-Ala-Glx-Ala → → → → →
Th-8-1	Leu-Asn-Lys-Ser-Gly ⇒ ⇒ ⇒ → →
Th-9-1	Val-Arg-Glx-Pro-Glx-Val-Lys-Glx-Glx- → → → → → → → → → (Lys, Pro, Glx, Phe, Asx, Pro)
Th-9-2	Tyr-Sep-Thr-Lys-Glu-Gly → → → → →
Th-10-1	Ala-Ala-Arg-Val-Glx-Glx-Arg-Thr-Asx → → → → → → → → →
Th-12-1	Leu-Glx-Arg-Gly → → → → →
Th-14-1	Ala-Arg-Val-Glx-Glx-Arg-Thr-Asx → → → → → → → → →

Аминокислотная последовательность всех пептидов термолитического гидролиза определялась по методу Эдмана, как описано ранее [1]. В табл. 2 приведены пептиды термолитического гидролиза, являющиеся фрагментами изученных ранее триптических [1] и Sp-пептидов [2]. Определение структуры этих пептидов позволило подтвердить полученные ранее результаты. В табл. 3 представлены пептиды термолитического гидролиза, содержащие в середине пептидной цепи остатки лизина или аргинина и перекрывающие триптические пептиды. Из них наиболее ценную информацию содержат пептиды Th-3-4, Th-6-1, Th-8-1, Th-9-2 и Th-10-1, которые позволили соединить между собой 11 триптических пептидов: T-VII-3 и T-X-4-2; T-IX-1 и T-XI-3; T-III-3 и T-X-1; T-IV-1 и T-XXIII-1; T-XIII-3, T-XI-1-1 и T-VII-1-1 соответственно. Остатки лизина и аргинина в пептидах Th-1-2, Th-2-1 и Th-7-1 расположены рядом с N- или C-концевыми аминокислотными остатками, в результате чего эти пептиды не дают однозначных перекрытий между пептидами триптического гидролиза. Однако в этих случаях перекрытия были получены другими способами [3]. Остальные пептиды, приведенные в табл. 3 (Th-1-1, Th-4-1, Th-5-2, Th-9-1, Th-12-1 и Th-14-1), являются фрагментами термолитических пептидов, описанных выше (Th-10-1, Th-9-2, Th-3-4, Th-6-1 и Th-2-1).

Гидролиз α -субъединицы под действием термолизина прошел в полном соответствии со специфичностью действия фермента [4,5]. Большинство пептидов имели в качестве N-концевой аминокислоты остатки гидрофобных (Leu, Val, Ile, Ala, Met) или ароматических (Tyr) аминокислот. Только у двух пептидов, Th-4-1 и Th-23-1, N-концевыми аминокислотами были остатки серина и треонина.

Изученные в настоящей работе пептиды содержали в общей сложности 29 (14 + 15) остатков лизина и аргинина из 39 (16 + 23), входящих в состав α -субъединицы РНК-полимеразы [3, 6]. Следовательно, в состав невыделенных пептидов входило 10 (2 + 8) остатков лизина и аргинина. Определение первичной структуры α -субъединицы [3, 6] показало, что 8 из этих аминокислотных остатков располагаются в полипептидной цепи α -субъединицы попарно в следующих последовательностях: Leu-Lys-Pro-Arg-Leu, Leu-Arg-Arg-Ile, Val-Gln-Arg-Gly-Arg-Gly-Tyr, Ile-Arg-Arg-Ala. При гидролизе термолизином из соответствующих участков полипептидной цепи α -субъединицы образовались сильноосновные пептиды, обладающие повышенным сродством к катиониту, которые, очевидно, не удалось элюировать с колонки.

Результаты настоящей работы показывают перспективность использования радиоактивно меченных препаратов белка по остаткам определенных аминокислот для целенаправленного выделения пептидов, содержащих эти аминокислотные остатки.

Экспериментальная часть

Бактериальную массу выращивали, как описано ранее [7], в объеме 400 мл с добавлением 2 мКи [^{14}C] лизина (330 мКи/ммоль) и 2 мКи [^{14}C] аргинина (324 мКи/ммоль) (Amersham, Англия). Разрушение клеток, осаждение РНК-полимеразы антителами и выделение α -субъединицы из иммунопреципитата проводили как описано в работе [7]. Общая радиоактивность полученной α -субъединицы — $10 \cdot 10^6$ имп/мин.

Гидролиз α -субъединицы термолизином. К радиоактивно меченной α -субъединице добавляли 0,5 мкмоль немеченого белка в 3 мл водного NH_3 , раствор прогревали при 90° в течение 5 мин и термостатировали при 37° , добавляли NH_4HCO_3 до 0,1 н. (рН 8,0) и 0,4 мг термолизина (Cal-Biochem, США). Через 4 ч гидролизат замораживали и лиофилизировали.

Разделение термолитического гидролизата на катионите. Пептиды термолитического гидролиза разделяли на сильнокислом катионите РА-35 (Beckman, США). Подготовка смолы, колонки, получение градиента рН и концентрации буферов описаны ранее [1, 8]. Условия разделения: колонка $0,6 \times 60$ см, скорость элюирования 9 мл/ч, объем смеси 90 мл, объем фракций 1,5 мл, колонка термостатировалась при 50° . Гидролизат растворяли в 3,8 мл 30% уксусной кислоты и наносили на колонку под давлением азота. Элюцию пептидов с колонки проводили в системе экспоненциальных градиентов пиридин-ацетатных буферов, как описано в работе [1]: 27 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 3,1 (буфер 1), 108 мл градиента буфер 2 — буфер 3 (0,2 М пиридин-ацетат, рН 4,2), 216 мл градиента буфер 3 — буфер 4 (0,5 М пиридин-ацетат, рН 5,0), 216 мл градиента буфер 4 — буфер 5 (2,0 М пиридин-ацетат, рН 5,0), 45 мл буфера 4, 30 мл 2 М пиридина и 80 мл 1 М аммиака. Пептиды в элюате обнаруживали по реакции с нингидрином, проводимой на пептидном анализаторе (Technicon, США). На анализ отбирали по 20 мкл из каждой фракции. Радиоактивность объединенных фракций определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark II (Nuclear Chicago, США), сцинтиллятор Unisolv 1 (Koch-Light, Англия). Фракции, содержащие радиоактивность, анализировали с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы в системе 1 (пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12). Пептиды обнаруживали путем обработки пластинок 0,2% раствором нингидрина в ацетоне и с помощью автордиографии [7].

Разделение и очистка пептидов с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге. Разделение радиоактивных пептидов из объединенных фракций проводили с использованием хроматографии на бумаге Ватман 3 в системе 1. Детекцию пептидов на бумаге осуществляли с помощью авто-

радиографии в течение 2—3 сут. Элюцию пептидов с бумаги проводили 10% уксусной кислотой. Пептиды Th-2-1 и Th-3-4 после бумажной хроматографии были очищены высоковольтным электрофорезом на бумаге при рН 1,9 и напряжении 4000 В (30 мин).

Методы определения аминокислотного состава и аминокислотной последовательности пептидов описаны ранее [1, 8, 9].

Приносим глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные замечания и помощь при выполнении этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 158-179.
2. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Потапенко Н. А. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 180-196.
3. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V. (1977) *FEBS Letters*, **76**, 108-111.
4. Matsubara H. (1966) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **24**, 427-430.
5. Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Слободян Л. Н., Кравченко З. Б., Митрофанова Х. А., Абдулаев Н. Г., Чащин В. Л., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1975) *Биохимия*, **40**, 802-807.
6. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 283-286.
7. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Кочергинская С. А., Чертов О. Ю., Никифоров В. Г., Лебедев А. Н. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 1174-1181.
8. Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Егоров Ц. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Модянов Н. Н. (1972) *Биохимия*, **37**, 451-460.
9. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3-21.

Поступила в редакцию
11.VII.1977

После доработки
23.VIII.1977

THE PRIMARY STRUCTURE OF α -SUBUNIT OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FROM *E. COLI*. III. THE THERMOLYTIC PEPTIDES

CHERTOV O. Yu., KHOKHRYAKOV V. S., TYURIN V. V.,
MODYANOV N. N., LIPKIN V. M.

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

The α -subunit of RNA polymerase from *E. coli* B was subjected to hydrolysis with thermolysin. As the main purpose was the isolation of Lys- and Arg-containing peptides, a protein preparation was used which has been obtained from bacteria grown on a medium containing [14 C] Lys and Arg. The separation of peptide fractions was monitored by autoradiographic assay and yielded Lys- and Arg-containing peptides selectively and with minimum losses. The amino acid sequence of 37 isolated peptides was established.