



УДК 577.156.2.07

**ВЫДЕЛЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ
ИЗ *BACILLUS SUBTILIS* АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ
НА ГРАМИЦИДИН-S-СЕФАРОЗЕ 4В**

*Изотова Л. С., Городецкий Д. И., Янонис В. В.,
Баратова Л. А., Белянова Л. П., Тилохина Е. А.,
Стронгин А. Я., Степанов В. М.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Разработан метод аффинной хроматографии внутриклеточной сериновой протеиназы из *Bacillus subtilis* на грамицидин-S-сефарозе 4В, позволивший выделить набор молекулярных форм фермента. Две молекулярные формы фермента — Glu-ВСП-А и Glu-ВСП-В (минорная форма), различные по электрофоретической подвижности, идентичны по аминокислотному составу и N-концевой последовательности, имея на N-конце остаток глутаминовой кислоты. Автоматическим секвенированием по Эдману определены 50 аминокислотных остатков N-концевой последовательности внутриклеточной протеиназы. При этом выявлена еще одна молекулярная форма протеиназы — Asp-ВСП-А, отличающаяся от двух других удлинением в три аминокислотных остатка с N-конца и имеющая остаток аспарагина на N-конце. N-Концевая последовательность внутриклеточной сериновой протеиназы *B. subtilis* гомологична внеклеточной сериновой протеиназе — субтилизину. Это указывает на наличие дублированного структурного гена в геноме *B. subtilis*. Существование нескольких форм внутриклеточной сериновой протеиназы может быть объяснено ее посттрансляционной модификацией.

В последние годы для выделения и очистки сериновых протеиназ используется аффинная хроматография на сорбентах, полученных присоединением к активированной сефарозе арильных [1], пептидных [2, 3] или белковых [4] лигандов. В нашей лаборатории предложено использовать в качестве лиганда для аффинной хроматографии антибиотик грамицидин-S-циклодекапептид, в молекуле которого преобладают остатки гидрофобных аминокислот, способные специфически взаимодействовать с ферментом. Грамицидин-S-сефароза была успешно использована для очистки карбоксильных [5] и металлопротеиназ [6].

В настоящей работе описано использование грамицидин-S-сефарозы для очистки внутриклеточной сериновой протеиназы *Bacillus subtilis* (ВСП), которое существенно упростило получение фермента и позволило выделить еще одну его молекулярную форму.

В зависимости от соотношения количеств бромциана и грамицидина S, взятых для получения грамицидин-S-сефарозы, сорбент обычно содержит от 0,35 до 2,75 мкмоль лиганда на 1 мл влажного геля, причем результаты хроматографии кислых и металлопротеиназ сильно зависят от содержания грамицидина S в аффинном сорбенте [5, 6]. В наших опытах обычно использовали сорбент, содержащий 1 мкмоль грамицидина S на 1 мл влаж-

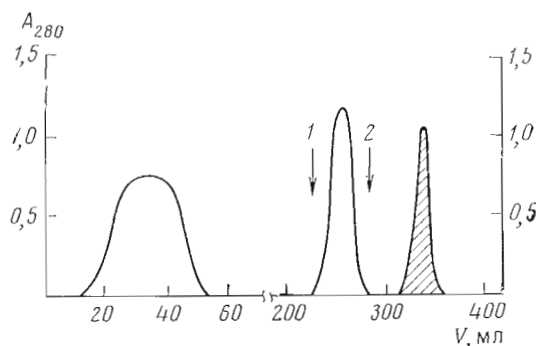


Рис. 1. Профиль разделения на грамицидин-S-сефарозе 4В образца ВСП, полученного после хроматографии на DEAE-целлюлозе. Колонка (2 × 35 см) уравновешена 50 мМ Трис-HCl-буфером (рН 8,5), содержащим 1 мМ CaCl₂. Стрелками отмечено начало промывок колонки: 1 — 1 М NaCl в том же буфере; 2 — 1 М NaCl + 25% изопропанол в том же буфере. Заштрихован пик, содержащий активные фракции

ного геля. Понижение содержания лиганда до 0,6 мкмоль/мл или повышение до 2,7 мкмоль/мл не отражалось существенно на ходе хроматографии.

В предыдущей работе [7] была описана очистка ВСП с помощью хроматографии на DEAE-целлюлозе, ультрагеле АсА-34 и диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Поскольку при диск-электрофорезе активность ВСП по хромогенному субстрату *n*-нитроанилиду бензилоксикарбонил-аланил-аланил-лейцина снижалась в 2—3 раза, перед этой стадией очистки фермент приходилось ингибировать 1 мМ фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ), что затрудняло последующее изучение ферментных свойств ВСП. Использование аффинной хроматографии не только упростило общую схему выделения ВСП, но и позволило получить высокоактивные чистые препараты фермента, пригодные для дальнейших энзимологических исследований.

При нанесении на колонку образцов ВСП, полученных при хроматографии на DEAE-целлюлозе, фермент легко связывался с грамицидин-S-сефарозой и элюировался лишь под действием 1 М NaCl в 25% изопропаноле (рис. 1), давая высокоактивные образцы ВСП, гомогенные по данным диск-электрофореза (рис. 2, табл. 1).

Специфическое связывание с аффинным сорбентом кислых молекул ВСП (изоэлектрическая точка 4,3), по-видимому, обусловлено вкладом как ионных, так и гидрофобных взаимодействий соответствующих участков

Таблица 1

Очистка внутриклеточной сериновой протеиназы *B. subtilis*

Стадия	Уд. активность *		Степень очистки, <i>n</i> раз	Выход по белку, мг	Выход по активности ВСП, %
	исходн.	получ.			
Хроматография на DEAE-целлюлозе «грубого» фермента	0,8	4,0	5	60	55
Хроматография на грамицидин-S-сефарозе фракций, полученных после DEAE-целлюлозы	4,0	18,0	4,5	12,5	93
Двукратная хроматография на грамицидин-S-сефарозе «грубого» фермента	0,8	18,1	23	26	70

* Мкмоль *n*-нитроанилина, образовавшегося на 1 мг белка за 1 мин. Субстрат — Z-Ala-Ala-Leu-pNa.

макромолекулы с остатками гидрофобных и основных аминокислот, входящих в состав грамицидина S. Поэтому для элюции ВСП требуется совместное действие высокой ионной силы (1 M NaCl подавляет ионные взаимодействия фермента с сорбентом) и 25% изопропилового спирта, ослабляющего гидрофобные взаимодействия ВСП с грамицидином S.

В случаях, когда для очистки брались препараты «грубого» фермента, полученные при осаждении сульфатом аммония в интервале 55—80% насыщения, при хроматографии на грамицидин-S-сефарозе фермент не связывался сорбентом прочно, а элюировался при промывании колонки исходным буфером, лишь несколько задерживаясь по отношению к пигментам и балластным белкам (рис. 3). При повторной хроматографии активных функций в условиях, когда нагрузка на колонку не превышала 1 мг суммарного белка на 1 мл геля, профиль разделения был таким же, как и в опытах с предварительно очищенным на DEAE-целлюлозе препаратом (рис. 1). Очевидно, присутствие значительных количеств балластных белков ухудшает связывание ВСП грамицидин-S-сефарозой, поскольку они могут конкурировать с лигандом за связывание фермента.

При двукратной хроматографии на грамицидин-S-сефарозе удается достичь такой же степени очистки ВСП, как за три стадии очистки по прежней методике (хроматография на DEAE-целлюлозе, гель-фильтрация через ультрагель АсА-34, препаративный диск-электрофорез ингибированного образца), и получить высокоактивный препарат фермента (табл. 1).

При проверке на гомогенность диск-электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле образцы ВСП, полученные на грамицидин-S-сефарозе непосредственно из «грубого» фермента, давали две полосы, каждая из которых обладала ферментативной активностью по синтетическому хромогенному субстрату (рис. 2). Главный компонент (сокращенно ВСП-А) имел R_f 0,7, и его содержание было равно 70—80%. Минорный компонент, обозначенный как ВСП-Б, имел R_f 0,6. После разделения этих компонентов препаративным диск-электрофорезом, сравнения их аминокислотных составов и N-концевой последовательности оказалось, что они идентичны по этим параметрам. По-видимому, минорный компонент, обладающий меньшей электрофоретической подвижностью, представляет собой молекулярную форму ВСП, которая теряется при хроматографии на DEAE-целлюлозе. Это связано с тем, что для дальнейшей очистки после DEAE-целлюлозы брались только центральные фракции активного пика. Не исключено, что ВСП-Б является продуктом посттрансляционной модификации ВСП-А или наоборот. Также, однако, нельзя полностью исключить, что в последовательности ВСП-Б, удаленной от N-конца, имеется незначительное число замен по сравнению с последовательностью ВСП-А. Это может приводить к изменению электрофоретической подвижности, не отражаясь существенно на результатах аминокислотного анализа.

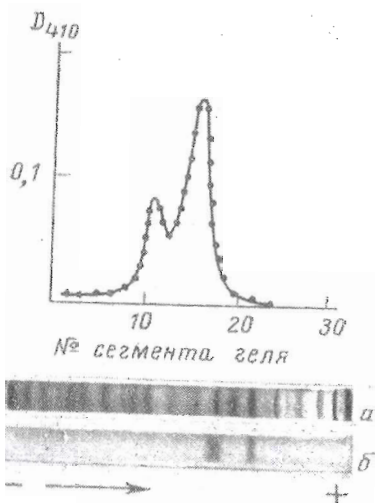


Рис. 2. Диск-электрофорез в 10% полиакриламидном геле: а — препарат ВСП после фракционирования сульфатом аммония («грубый» фермент); б — препарат ВСП, очищенный двукратной хроматографией на грамицидин-S-сефарозе 4В; в — локализация активности ВСП после инкубации сегментов геля (1,5 мм) в 0,5 мл 50 мМ Трис-HCl-буфера (pH 8,5), содержащего 1 мМ CaCl₂ и 0,05 мг хромогенного субстрата. В 10% геле ВСП-А и ВСП-Б имеют R_f 0,5 и 0,4 соответственно

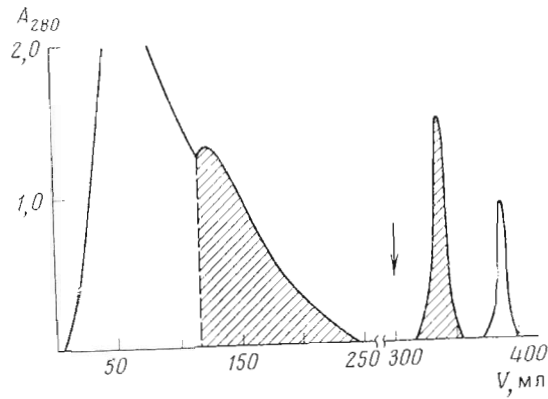


Рис. 3. Профиль разделения на грамицидин-S-сефарозе 4В «грубого» фермента. Стрелкой отмечено начало промывки колонки 1 М NaCl. Активные фракции заштрихованы. Размер колонки и буфер такой же, как в подписи к рис. 1

Как видно из табл. 2, аминокислотный состав ВСП отличается повышенным содержанием остатков Glx, Lys, Phe и пониженным содержанием Val по сравнению с составом известных секреторных субтилизинов. В табл. 3 приведены N-концевые последовательности секреторных субтилизинов BPN' и Carlsberg, а также последовательность ВСП, определенная автоматическим секвенированием по Эдману (в предыдущей работе сообщалось об установлении последовательности 19 N-концевых остатков ВСП [7]). По сравнению с представленными внеклеточными субтилизинами ВСП-А и ВСП-Б короче на два аминокислотных остатка с N-конца. Из 46 идентифицированных остатков ВСП 24 совпадали с соответствующими остатками субтилизина BPN' и 29 — с соответствующими остатками субтилизина Carlsberg, в то время как количество совпадений по аналогичным положениям этих двух субтилизинов составляло 26. Особенно консервативен

Таблица 2

Аминокислотный состав ВСП и секреторных субтилизинов

Аминокислота	ВСП	Субтилизины				
		BPN' [8]	221 [9]	Carlsberg [8]	Amylosacch.* [8]	Pfizer [10]
Lys	20	41	6	9	8	11
His	6	6	8	5	6	4
Arg	6	2	8	4	4	4
Asx	36	28	29	28	25	28
Thr	13	13	18	19	17	17
Ser	25	37	23	32	41	31
Glx	33	15	16	12	15	15
Pro	13	14	16	9	13	14
Gly	36	33	39	35	33	29
Ala	32	37	45	41	35	32
Val	19	30	27	31	25	22
Met	5-6	5	4	5	4	5
Ile	13	13	9	10	16	9
Leu	25	15	22	16	15	13
Tyr	7	10	9	13	12	9
Phe	7	3	2	4	4	4
Trp	**	3	3	1	3	**
Сумма	296	275	283	274	275	247

* Amylosacch.— Amylosacchariticus.

** Не определяли.

N-Концевые последовательности ВСП и секреторных субтилизинов [8]
 ВСП—молекулярная форма Glu-ВСП-А, BPN'—субтилизин BPN', CAR—субтилизин Carlsberg

BPN*	Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Tyr	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Pro
CAR	Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly	Ile	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp
ВСП		¹ Glu	Leu		Pro	Glu	Gly	Ile	Gln	Val	¹⁰ Ile	Lys	Ala	Pro
BPN'	Ala	Leu	His	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Val	Lys	Val
CAR	Lys	Val	Gln	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Val	Lys	Val
ВСП	Gln	Leu	Trp	Ala	Gln	Gly	Phe	²⁰ Lys	Gly	Ser	Asp	Ile	Lys	Ile
BPN'	Ala	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	His	Pro	Asn	Leu
CAR	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	His	Pro	Asn	Leu
ВСП	Ala	Val	Leu	³⁰ Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Val	X	X	Pro	Asn	⁴⁰ Leu
BPN'	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Pro	Ser			
CAR	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Ala	Gly			
ВСП	Asp	X	X	Gly	Gly	—**	X	Phe	Val	Ala	⁵⁰ Gly			

* По N-концевой последовательности субтилизин А-50 [7], выделенный из того же штамма *B. subtilis* А-50, что и ВСП, полностью идентичен субтилизину BPN'.

** По сравнению с секреторными субтилизинами этот остаток в последовательности ВСП, видимо, делегирован. X — неидентифицированные остатки. Жирным шрифтом выделены остатки аспарагиновой кислоты активного центра субтилизинов и соответствующий им остаток аспарагиновой кислоты ВСП.

участок, окружающий остаток Asp³² активного центра субтилизинов (Asp³⁰ у ВСП-А). Гомология N-концевых последовательностей этих белков позволяет предположить, что соответствующие им структурные гены возникли в результате дупликации их эволюционного предшественника. По-видимому, это первый пример наличия дублированных генов в бактериальном геноме, подтвержденный структурными данными. Не исключено, что именно ВСП является эволюционным предшественником секреторных субтилизинов. Наличие двух родственных структурных генов в геноме *B. subtilis*, способных обмениваться генетической информацией за счет рекомбинации, может в известной степени объяснить значительную дивергенцию известных типов субтилизинов.

Необходимо отметить, что при секвенировании образцов ВСП-А наряду с основной цепью была идентифицирована минорная цепь, которая была длиннее на три остатка с N-конца — Asn-Val-X-ВСП-А. Эта форма, обозначенная как Asn-ВСП-А, не отличается от главного компонента (Glu-ВСП-А) ни по электрофоретической подвижности, ни по молекулярному весу. Ее возникновение связано, скорее всего, с ограниченным протеолизом белка — предшественника ВСП либо с последовательным отщеплением, например аминопептидазой, N-концевых аминокислот Asn-ВСП-А, приводящим к появлению Glu-ВСП-А.

Таким образом, возникновение всех молекулярных форм ВСП может быть объяснено посттрансляционной модификацией.

Экспериментальная часть

Использовали грамицидин S производства Красноярского завода мед-препаратов, дважды перекристаллизованный из этанола; сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция); ФМСФ, бромциан, Трис-НСI (Serva, ФРГ).

Штамм *Bacillus subtilis* А-50 выращивали, как описано в работе [7]. После ультразвукового разрушения клеточной оболочки, отделения нуклеиновых кислот и осаждения сульфатом аммония «грубого» фермента [7] белок наносили на колонку (2 × 35 см) с грамицидин-S-сефарозой, уравновешенной 0,01 М Трис-НСI-буфером (рН 8,5), содержащим 0,001 М CaCl₂. В некоторых опытах перед проведением аффинной хроматографии образцы подвергали ионообменному разделению на ДЕАЕ-целлюлозе [7]. Элюцию с грамицидин-S-сефарозы проводили тем же Трис-НСI-буфером, а также приготовленными на его основе 1 М NaCl и 1 М NaCl с добавлением 25% изопропанола. Фракции, содержащие протеолитическую активность, повторно хроматографировали на грамицидин-S-сефарозе в аналогичных условиях.

Для получения иммобилизованного грамицидина S 300 г сефарозы 4В в 450 мл 5 М калий-фосфатного буфера (рН 11,8) активировали по методу Пората [11] раствором 25 г бромциана в 15 мл свеженерегнанного ацетонитрила при 7° в течение 10 мин, после чего прибавляли раствор 7 г грамицидина S в смеси 210 мл ДМФА и 70 мл 0,1 н. NaHCO₃. Смесь перемешивали 20 ч при комнатной температуре, отфильтровывали сорбент и промывали его на колонке 50% раствором ДМФА в 0,1 н. NaHCO₃, 50% ДМФА и водой, а перед опытом — всеми растворами, которые в данном опыте использовались для элюции фермента. Содержание лиганда в грамицидин-S-сефарозе определяли аминокислотным анализом солянокислого гидролизата сорбента.

Количество белка определяли по УФ-поглощению при 280 нм на спектрофотометре СФ-16А, а протеолитическую активность ВСП — по ранее описанной методике [7] с помощью синтетического хромогенного пептидного субстрата — *n*-нитроанилида бензилоксикарбонил-аланил-аланил-лейцина.

Аминокислотный анализ солянокислых гидролизатов (105°, 24 и 72 ч) белка проводили на анализаторах ВС-201 (ЛКВ, Швеция; Durrum D-500, США). Метионин определяли как метионинсульфон.

Диск-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [12], определяя *R_f* белков относительно положения маркера — бромфенолового синего. Полосы, соответствующие активным фракциям, вырезали и экстрагировали белок 0,1 М NaCl, отделяя полиакриламид фильтрованием, после чего экстракт диализовали против воды.

Определение N-концевой последовательности ВСП, денатурированной фенолом, проводили на секвенаторе аминокислот (Beckman-890, США). После каждого цикла отщепления фенолтиогидаптоины аминокислот идентифицировали газовой хроматографией, тонкослойной хроматографией и аминокислотным анализом [13, 14].

Авторы выражают благодарность Л. М. Ермаковой за помощь в выращивании клеток *B. subtilis*, Л. А. Люблинской — за синтез хромогенного пептидного субстрата, И. А. Кузнецовой и Л. Н. Кудрявцевой — за действие в проведении некоторых экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stevenson K. J., Landman A. (1971) Can. J. Biochem., 49, 119—126.
2. Fujiwara K., Tsuru D. (1974) J. Biochem., 76, 883—886.
3. Fujiwara K., Osue K., Tsuru D. (1975) J. Biochem., 77, 739—743.
4. Nakayama T., Munoz L., Doi R. H. (1977) Anal. Biochem., 78, 165—170.
5. Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Ларенова Г. И. (1977) Биоорганическая химия, 3, 831—835.

6. Багацова Т. И., Ластоведская Л. В., Стронгин А. Я., Люблинская Л. А., Степанов В. М. (1976) Биохимия, **41**, 2229—2237.
7. Stepanov V. M., Strongin A. Ya., Izotova L. S., Abramov Z. T., Belyanova L. P., Baratova L. A., Luyblinskaya L. A., Ermakova L. M. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **298**—305.
8. Kurihara M., Markland F. S., Smith E. L. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 5619—5631.
9. Nakamura K., Matsushima A., Horikoshi K. (1973) Agr. Biol. Chem., **37**, 1261—1267.
10. Munnelly K. P., Kapoor A. (1976) Int. J. Peptide and Protein Res., **8**, 141—153.
11. Porath G., Aspberg K., Drevin H., Axen R. (1973) J. Chromatogr., **86**, 53—58.
12. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404—427.
13. Hermodson N. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Walsh K. A. (1972) Biochemistry, **11**, 4493—4502.
14. Pisano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B. (1972) Anal. Biochem., **45**, 43—59.

Поступила в редакцию
29.VII.1977

ISOLATION OF *BACILLUS SUBTILIS* INTRACELLULAR SERINE PROTEASE BY GRAMICIDIN-S-SEPHAROSE 4B AFFINITY CHROMATOGRAPHY

IZOTOVA L. S., GORODETSKY D. I., YANONIS V. V.,
BARATOVA L. A., BELYANOVA L. P., TIMOKHINA E. A.,
STRONGIN A. Ya., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms, Moscow*

Intracellular serine protease was isolated from *Bacillus subtilis* A-50 using gramicidin-S-Sepharose 4B affinity chromatography. Several active molecular forms of this enzyme were revealed. Two of them (Glu-ISP-A and ISP-B) with N-terminal Glu had different electrophoretic mobility. The third form (Asn-ISP-A) differed from the other ones by having an N-terminal extension composed of three residues. Using automated Edman degradation a 50-residue N-terminal sequence of intracellular protease was determined. It proved to be homologous with the N-terminal sequence of a subtilisin — secretory serine protease of the same species. These data indicate the presence of the duplicated structural genes for serine proteases in *B. subtilis* genome. It is suggested that the appearance of intracellular serine protease molecular forms might originate as a result of post-translational modification.