БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 5 * №12 * 1979

УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА LIV-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ *E. COLI*

II.* БРОМЦИАНОВЫЕ ПЕПТИДЫ

Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Гринкевич Х. А., Акименко З. А., Мороз И. Н., Назимов И. В., Алданова Н. А.

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

Проведено расщепление карбоксиметилированного препарата LIV-связывающего белка *E. coli* бромцианом. Методами гель-фильтрации, хроматографии на DEAE-целлюлозе и на бумаге выделено в индивидуальном состоянии 5 из 6 образовавшихся фрагментов. Установлен порядок расположения бромциановых пептидов в цепи белка. Автоматической деградацией и классической техникой определено полное строение трех пептидов и частичная структура остальных бромциановых фрагментов.

В предыдущем сообщении было описано выделение и определение аминокислотной последовательности триптических пептидов Leu, Ile, Val-связывающего белка (LIV-белок) [1]. На следующем этапе изучения первичной структуры белка для нахождения перекрытий между триптическими пептидами была применена методология специфического расщепления молекулы белка на крупные фрагменты с последующим анализом их строения автоматическим методом. Предметом настоящего сообщения является выделение и установление частичной структуры бромциановых пептидов LIV-белка.

Молекула LIV-белка содержит 5 остатков метионина, и, следовательно, при расщеплении бромцианом должно было образоваться 6 фрагментов, потенциально являющихся удобными объектами для автоматической деградации.

Обработку карбоксиметилированного препарата белка (СМ-белок) бромцианом проводили в 75% HCOOH в обычных условиях [2]. Из данных по структуре триптических метионинсодержащих пептидов следовало [1], что бромциановые фрагменты белка должны содержать в качестве N-концевых аминокислотных остатков глутаминовую кислоту, серин, изолейцин и глицин (3 пептида). При анализе дансильным методом N-концевых остатков смеси бромциановых фрагментов были идентифицированы только указанные аминокислоты.

Поскольку обычно крупные пептиды проявляют повышенную склонность к агрегации, для выбора оптимальных условий разделения полу-

* Сообщение I см. [1].

Таблица 1

Аминокислотный состав бромциановых пептидов СМ-LIV-белка

Аминокислота	II-1	II-2(II-3)	V	VI-1	VI-2
Asp	10,00(10)	11,94(12)	5,34(5)	1,33(1)	
Thr	7,24(7)	3,63(4)	3,00(3)		1,00(1)
Ser	2,40(2)	6,59(7)			
Glu	13,30(13)	9,36(9)	1,79(2)	1,29(1)	3,28(3)
Pro	4,88(5)	5,81(6)	0,69(1)		
Gly	11,03(11)	6,40(6)	5,38(5)	0,80(1)	1,98(2)
Ala	12,27(12)	13,10(13)	3,24(3)	1,99(2)	2,98(3)
Val *	6,56(7)	8,32(8)	1,03(1)	2,60(3)	
Hse	0,42(1)	0,36(1)		0,38(1)	0,43(1)
Ile *	7,28(7)	3,91(4)		0,60(1)	0,94(1)
Leu *	9,19(9)	7,07(7)	1,69(2)		1,80(2)
Tyr	5,69(6)	2,63(3)			
Phe	3,65(4)	1,20(1)	2,69(3)		0,94(1)
His	1,83(2)		0,94(1)		
Lys	9,31(9)	8,10(8)	3,00(3)	0,98(1)	1,13(1)
Arg	4,92(5)				1,62(2)
Trp **		0,62(1)	1,63(2)		
Число остатков	110	90	31	11	17
N-Концевая аминокислота	Ile	Gly	Gly	Glu	Gly
Выход, %	75	62	67	35	55

* Результаты 72-часового гидролиза.
** Определено после гидролиза метансульфоновой кислотой.

Таблица 2

N- и С-концевые последовательности бромциановых пептидов

Пептид	Порядок расположения в цепи белка	N-Концевая последовательность	С-Концевая последовательность **
VI-1	M_1	Glu-Asp-Ile-Lys *	–
II-7	$M_{1+2}+M_2$	Glu-Asp-Ile-Lys Ser-Gly-Pro-Val	Gly-Ile-Leu-Hse (25% 50% 56% 40%)
II-1	M_3	Ile-Thr-Pro-Ala	His-Pro-Glu-Hse (34% 35% 36% 30%)
VI-2	M_4	Gly-Glu-Ile-Leu	Thr-Gln-Phe-Hse (100% 52% 50%)
II-2(II-3)	M_5	Gly-Pro-Glu-Gly	Thr-Val-Hse (42% 67% 49%)
V	M_6	Gly-Pro-Leu-Thr	Lys

* Здесь и далее стрелками (→) обозначены стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоинов и Dns-производных аминокислот.
** В скобках приведены результаты гидролиза пептидов карбоксипептидазой А (для пептида M_3 — карбоксипептидазой С).

ченной смеси фрагментов были опробованы различные варианты фракционирования с применением детергентов и предварительного цитраконилирования пептидов смеси, однако избежать полностью агрегации не удалось.

Первоначальное фракционирование смеси проводилось на сефадексе G-50 (рис. 1). Во фракции I находились агрегаты всех крупных фрагментов белка, и в дальнейшем из нее были выделены дополнительные количества бромциановых пептидов, содержавшихся в других фракциях (см. ниже). Фракция II, по данным электрофореза в полиакриламидном геле,

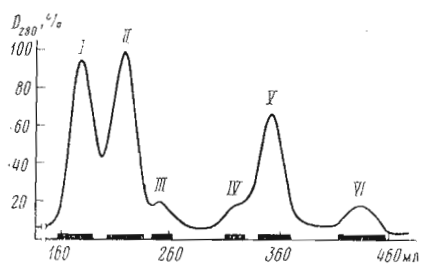


Рис. 1. Хроматография исходной смеси бромциановых пептидов СМ-LIV-белка на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-50 в 10% HCOOH. Прямоугольники на оси абсцисс — объединенные фракции

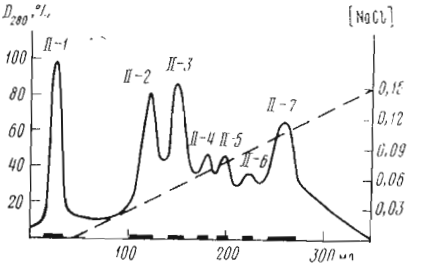


Рис. 2. Хроматография фракции II (рис. 1) на колонке с DEAE-целлюлозой DE-32 в 0,003 М трис-HCl-буфере, pH 8,1, в 6 М растворе мочевины. Пунктирная линия — изменение концентрации NaCl. Прямоугольники на оси абсцисс — объединенные фракции

состояла из смеси 4 пептидов. Фракции III и IV содержали небольшие количества неспецифических пептидов и дальнейшей очистке не подвергались. Фракция V, по данным N-концевого анализа и хроматографическому поведению, представляла собой индивидуальный пептид. В состав низкомолекулярной фракции VI входили два пептида (VI-1 и VI-2), которые были разделены хроматографией на бумаге.

Для разделения фракции II на индивидуальные компоненты была использована хроматография на DEAE-целлюлозе (рис. 2). Фракция II-1 содержала индивидуальное соединение.

Пептиды фракций II-2 и II-3, судя по результатам N-концевого анализа и данным аминокислотного состава, были идентичны. Причиной распределения этого пептида при ионообменной хроматографии по двум близким фракциям может быть частичное дезаминирование амидов дикарбоновых кислот в условиях бромцианового расщепления и наличие двух форм С-концевых аминокислотных остатков — гомосерина и гомосерин-лактона.

Фракции II-4, II-5 и II-6 содержали незначительные количества пептидного материала и в дальнейшем не исследовались.

Фракция II-7 состояла из смеси двух пептидов в примерно равных соотношениях (N-концевые аминокислоты — глутаминовая кислота и серин). Разделить их различными методами фракционирования не удалось.

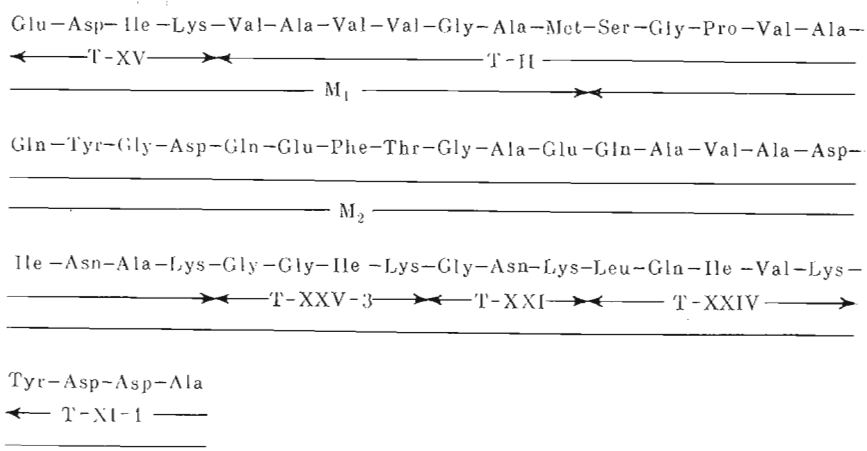
Из фракции I (рис. 1) при повторной хроматографии на сефадексе G-75 и целлюлозе DE-32 были выделены дополнительные количества пептидов, по данным N-концевого анализа и аминокислотному составу, идентичных пептидам II-1, II-2, II-7 и V. Аминокислотный состав индивидуальных пептидов всех фракций представлен в табл. 1.

Для всех выделенных пептидов были определены N-концевые аминокислотные последовательности деградацией по методу Эдмана и С-концевые последовательности с помощью карбоксипептидаз А и С (табл. 2).

Автоматической деградацией на секвенаторе была установлена последовательность 52 аминокислотных остатков LIV-белка. Сопоставление данных, приведенных в табл. 2, с известной структурой триптических метионинсодержащих пептидов [1] и N-концевой последовательностью белка позволило сделать вывод о порядке расположения бромциановых пептидов в молекуле LIV-белка.

Так, очевидно, что пептид VI-1 является N-концевым в молекуле и имеет приведенную ниже структуру (M_1) *. Один из пептидов фракции II-7 (N-концевая последовательность: Ser-Gly-Pro-Val-) занимает второе положение в пептидной цепи (M_2), другой пептид этой фракции (N-кон-

* Обозначение пептидов в порядке их расположения в цепи белка.

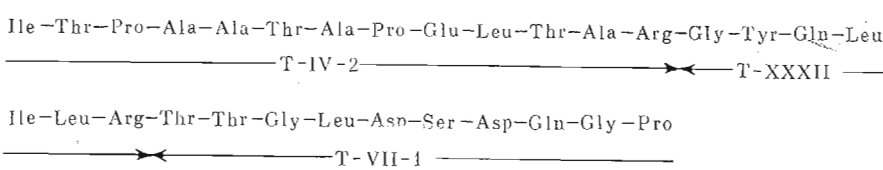


цевая последовательность: Glu-Asp-Ile-Lys) образовался за счет неполноты расщепления бромцианом связи Met—Ser (11—12) и является суммой пептидов M_1 и M_2 (M_{1+2}). По молекулярному весу и заряду он близок к пептиду M_2 и вследствие этого не был отделен от последнего. Оба пептида имеют идентичную С-концевую последовательность (табл. 2), совпадающую с частью последовательности триптического пептида T-IV-2 (-Gly-Ile-Leu-Met-Ile-Thr-Pro-Ala-). Отсюда следует, что пептид II-1 непосредственно соединяется с пептидом M_2 и занимает следующее положение в цепи (M_3). Данные, полученные при обработке пептида M_3 карбоксипептидазой С (табл. 2), находятся в хорошем соответствии с частью последовательности триптического пептида T-XXX-2 (-Gly-Tyr-His-Pro-Glu-Met-Gly-Gln-Ile-Leu-), соединяющего бромциановые пептиды M_3 и VI-2 (M_4).

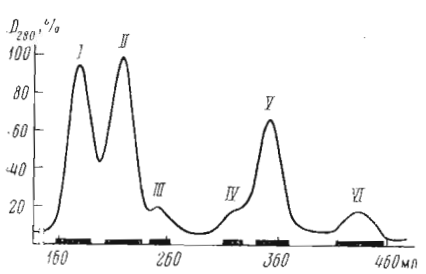
На основании такого рода рассуждений можно сделать заключение, что триптические пептиды T-V (-Thr-Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-) и T-XI-3 (-Asp-Thr-Val-Met-Gly-Pro-Leu-Thr-) соединяют бромциановые фрагменты M_4 и II-2 (M_5) и M_5 и V (M_6) соответственно. С-концевое положение пептида M_6 дополнительно подтверждается отсутствием гомосерина в его составе, С-концевой аминокислотой этого фрагмента, так же как и LIV-белка, является лизин.

При определении N-концевой последовательности LIV-белка на секвенаторе было выяснено полное строение бромцианового пептида M_1 и частичное (41 аминокислота) — пептида M_2. Одновременно установлена полная структура триптического пептида T-II [1] и найдены перекрытия между триптическими пептидами T-XV, T-II, T-XXV-3, T-XXI, T-XXIV и T-XI-1.

При автоматической деградации пептида M_3 получена информация о последовательности 30 аминокислот и установлено соединение триптических пептидов T-IV-2, T-XXXII и T-VII-1.



Строение пептида M_4 было определено традиционными методами. Деградацией по методу Эдмана было идентифицировано 11 аминокислотных остатков и найдены перекрытия между триптическими пептидами T-XXX-2, T-IX-2 и T-XXII. Данные о С-концевой последовательности пептида M_4 получены с помощью карбоксипептидазы А (табл. 2).



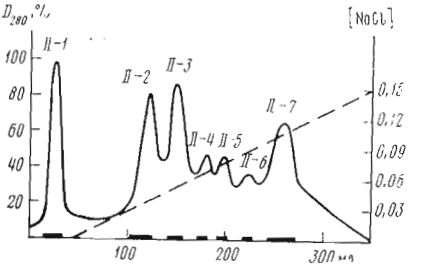


Рис. 1. Хроматография исходной смеси бромциановых пептидов CM-LIV-белка на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-50 в 10% HCOOH. Прямоугольники на оси абсцисс — объединенные фракции

Рис. 2. Хроматография фракции II (рис. 1) на колонке с DEAE-целлюлозой DE-32 в 0,003 М трис-HCl-буфере, pH 8,1, в 6 М растворе мочевины. Пунктирная линия — изменение концентрации NaCl. Прямоугольники на оси абсцисс — объединенные фракции

состояла из смеси 4 пептидов. Фракции III и IV содержали небольшие количества неспецифических пептидов и дальнейшей очистке не подвергались. Фракция V, по данным N-концевого анализа и хроматографическому поведению, представляла собой индивидуальный пептид. В состав низкомолекулярной фракции VI входили два пептида (VI-1 и VI-2), которые были разделены хроматографией на бумаге.

Для разделения фракции II на индивидуальные компоненты была использована хроматография на DEAE-целлюлозе (рис. 2). Фракция II-1 содержала индивидуальное соединение.

Пептиды фракций II-2 и II-3, судя по результатам N-концевого анализа и данным аминокислотного состава, были идентичны. Причиной распределения этого пептида при ионообменной хроматографии по двум близким фракциям может быть частичное дезаминирование амидов дикарбоновых кислот в условиях бромцианового расщепления и наличие двух форм С-концевых аминокислотных остатков — гомосерина и гомосерин-лактона.

Фракции II-4, II-5 и II-6 содержали незначительные количества пептидного материала и в дальнейшем не исследовались.

Фракция II-7 состояла из смеси двух пептидов в примерно равных соотношениях (N-концевые аминокислоты — глутаминовая кислота и серин). Разделить их различными методами фракционирования не удалось.

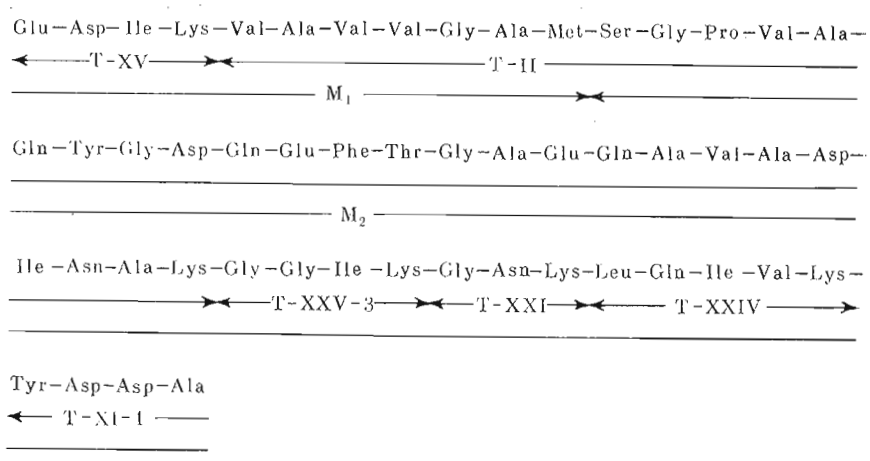
Из фракции I (рис. 1) при повторной хроматографии на сефадексе G-75 и целлюлозе DE-32 были выделены дополнительные количества пептидов, по данным N-концевого анализа и аминокислотному составу, идентичных пептидам II-1, II-2, II-7 и V. Аминокислотный состав индивидуальных пептидов всех фракций представлен в табл. 1.

Для всех выделенных пептидов были определены N-концевые аминокислотные последовательности деградацией по методу Эдмана и С-концевые последовательности с помощью карбоксипептидаз А и С (табл. 2).

Автоматической деградацией на секвенаторе была установлена последовательность 52 аминокислотных остатков LIV-белка. Сопоставление данных, приведенных в табл. 2, с известной структурой триптических метионинсодержащих пептидов [1] и N-концевой последовательностью белка позволило сделать вывод о порядке расположения бромциановых пептидов в молекуле LIV-белка.

Так, очевидно, что пептид VI-1 является N-концевым в молекуле и имеет приведенную ниже структуру (M_1) *. Один из пептидов фракции II-7 (N-концевая последовательность: Ser-Gly-Pro-Val-) занимает второе положение в пептидной цепи (M_2), другой пептид этой фракции (N-кон-

* Обозначение пептидов в порядке их расположения в цепи белка.

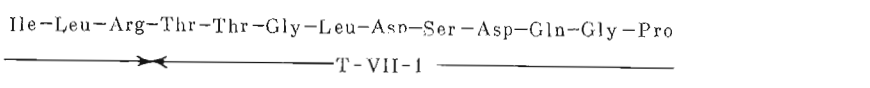


цевая последовательность: Glu-Asp-Ile-Lys) образовался за счет неполноты расщепления бромцианом связи Met—Ser (11—12) и является суммой пептидов M_1 и M_2 (M_{1+2}). По молекулярному весу и заряду он близок к пептиду M_2 и вследствие этого не был отделен от последнего. Оба пептида имеют идентичную С-концевую последовательность (табл. 2), совпадающую с частью последовательности триптического пептида T-IV-2 (-Gly-Ile-Leu-Met-Ile-Thr-Pro-Ala-). Отсюда следует, что пептид II-1 непосредственно соединяется с пептидом M_2 и занимает следующее положение в цепи (M_3). Данные, полученные при обработке пептида M_3 карбоксипептидазой С (табл. 2), находятся в хорошем соответствии с частью последовательности триптического пептида T-XXX-2 (-Gly-Tyr-His-Pro-Glu-Met-Gly-Gln-Ile-Leu-), соединяющего бромциановые пептиды M_3 и VI-2 (M_4).

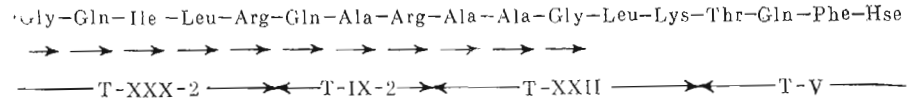
На основании такого рода рассуждений можно сделать заключение, что триптические пептиды T-V (-Thr-Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-) и T-XI-3 (-Asp-Thr-Val-Met-Gly-Pro-Leu-Thr-) соединяют бромциановые фрагменты M_4 и II-2 (M_5) и M_5 и V (M_6) соответственно. С-концевое положение пептида M_6 дополнительно подтверждается отсутствием гомосерина в его составе, С-концевой аминокислотой этого фрагмента, так же как и LIV-белка, является лизин.

При определении N-концевой последовательности LIV-белка на секвенаторе было выяснено полное строение бромцианового пептида M_1 и частичное (41 аминокислота) — пептида M_2. Одновременно установлена полная структура триптического пептида T-II [1] и найдены перекрытия между триптическими пептидами T-XV, T-II, T-XXV-3, T-XXI, T-XXIV и T-XI-1.

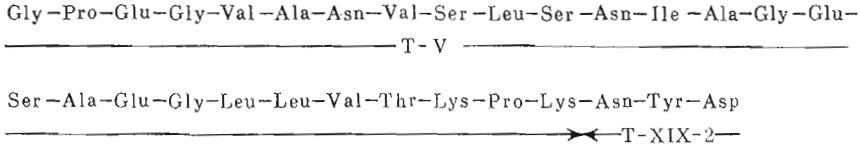
При автоматической деградации пептида M_3 получена информация о последовательности 30 аминокислот и установлено соединение триптических пептидов T-IV-2, T-XXXII и T-VII-1.



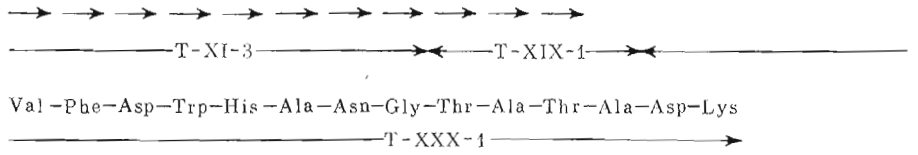
Строение пептида M_4 было определено традиционными методами. Деградацией по методу Эдмана было идентифицировано 11 аминокислотных остатков и найдены перекрытия между триптическими пептидами T-XXX-2, T-IX-2 и T-XXII. Данные о С-концевой последовательности пептида M_4 получены с помощью карбоксипептидазы А (табл. 2).



N-Концевая последовательность пептида M_5 (30 аминокислот) определена на секвенаторе, при этом установлено, что триптический пептид T-V соединяется с пептидом T-XIX-2.



Частичная структура пептида M_6 определена деградацией по методу Эдмана, при этом найдено соединение триптических пептидов T-XI-3 и T-XIX-1. Ранее было показано, что С-концевое положение в молекуле LIV-белка занимает триптический пептид T-XXX-1 [1]. Учитывая этот факт и данные аминокислотного состава пептида M_6, его полную структуру можно было представить следующим образом:



Для подтверждения предложенной структуры был проведен гидролиз пептида M_6 стафилококковой протеазой (точки расщепления указаны стрелками). При деградации полученной смеси компонентов по Эдману на каждой из 7 стадий идентифицированы аминокислоты, отнесение которых к одному из трех ожидаемых фрагментов было однозначным:

1	2	3	4	5	6	7	
Gly	Pro	Leu	Thr	Trp	Asp	Glu	(I)
Lys	Gly	Asp	Leu	Lys	Gly	Phe	(II)
Phe	Gly	Val	Phe	Asp	Trp	His	(III)

Таким образом, из бромцианового гидролизата LIV-белка выделено в индивидуальном состоянии 5 из 6 образующихся фрагментов. Установлен порядок их расположения в полипептидной цепи белка, позволивший представить «архитектуру» молекулы в целом.

Автоматической деградацией определена полная структура фрагмента M_1 и частичная — фрагментов M_2, M_3, M_5 (суммарно 101 аминокислотный остаток), при этом найдены перекрытия 11 триптических пептидов. Классическими методами установлено полное строение пептидов M_4 (17 аминокислот) и M_6 (31 аминокислота), что позволило соединить 7 триптических пептидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали карбоксипептидазу А (Worthington, США), карбоксипептидазу С (Roth, ФРГ), протеазу из *Staphylococcus aureus* (Miles, Англия).

Карбоксиметилирование LIV-белка проводили по методу [3].

Расщепление СМ-белка бромцианом. 5 мкмоль СМ-LIV-белка растворяли в 12 мл 70% HCOOH и добавляли к раствору 270 мг (100-кратный избыток) бромциана. Смесь оставляли на 20 ч при 20° С, затем разбавляли в 10 раз дистиллированной водой и лиофилизовали.

Фракционирование смеси бромциановых пептидов на сефадексе G-50f проводили на колонке (2,5×100 см), предварительно уравновешенной 10% HCOOH, при скорости элюирования 20 мл/ч. Контроль за выходом пептидов вели с помощью детектора Uvicord II (LKB, Швеция) при 280 нм. Фракции объединяли согласно спектрофотометрическим данным и лиофилизовали.

Разделение пептидов фракции II ионообменной хроматографией. Пептиды фракции II растворяли в 0,003 М трис-HCl-буфере, pH 8,1, в 6 М мочевине и с помощью перистальтического насоса наносили на колонку с целлюлозой DE-32, уравновешенную этим же буфером. Колонку промывали стартовым буфером, а затем элюировали пептиды линейным градиентом NaCl (0,0–0,2) в том же буфере. Контроль за выходом пептидов с колонки проводили при 280 нм. Фракции элюата обессоливали на сефадексе G-25 и лиофилизовали.

Степень чистоты пептидов контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [4] и хроматографии на пластинках с тонким слоем целлюлозы в системе: пиридин — уксусная кислота — бутанол — вода, 10:3:15:12. Эта же система применялась для препаративного разделения на бумаге фракции VI.

Автоматическую деградацию белка и пептидов осуществляли на секвенаторе 890 C (Beckman, США) по программам № 122 974 и 102 974 соответственно. Для анализа использовали 0,1—0,25 мкмоль образца. Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот проводили методами тонкослойной хроматографии [5], газожидкостной хроматографии (ГЖХ), масс-спектрометрии (МС) и аминокислотным анализом гидролизатов фенилтиогидантоинов. ГЖХ осуществляли на хроматографе GC-65 (Beckman, США) по методу [6], МС-анализ — на масс-спектрометре LKB 9000 (LKB, Швеция) по методике [7]. Гидролизаты фенилтиогидантоинов аминокислот 47% HI [8] анализировали на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США).

Определение N-концевых аминокислот и деградацию пептидов по методу Эдмана проводили как описано в предыдущем сообщении [1].

С-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и С с последующим анализом гидролизата на аминокислотном анализаторе [1].

Гидролиз пептида M_6 стафилококковой протеазой. К 0,1 мкмоль пептида в 0,2 мл 0,1 М NH_4HCO_3 добавляли фермент (5% по весу) и выдерживали 4 ч при 37° С. Раствор лиофилизовали.

Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-500 (см. [1]).

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к настоящей работе и ценные замечания в ходе обсуждения результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Потапенко Н. А., Гринкевич Х. А., Кравченко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. (1979) Биоорган. химия, 5, 1757–1774.
2. Steers E., Graven G. P., Anfinsen C. B., Bethune J. L., (1965) J. Biol. Chem., 240, 2478–2484.
3. Hirs C., Moore S., Stein W. H. (1956) J. Biol. Chem., 219, 623–642.
4. Swank R. T., Munkres K. D. (1971) Analyt. Biochem., 39, 462–477.
5. Pataki G. (1964) Chimia, 18, 23–34.
6. Pisano J. J., Bronzert T. Y. (1969) J. Biol. Chem., 244, 5597–5607.
7. Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А., Розынов Б. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 192–199.
8. Inglis A. S., Nicholls P. W., Roxburgh C. M. (1971) Austral. J. Biol. Sci., 24, 1247–1250.

Поступила в редакцию
22.V.1979

THE PRIMARY STRUCTURE OF LIV-BINDING PROTEIN FROM *E. COLI*. II. CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES

GRINKEVICH V. A., ARZAMAZOVA N. M., GRINKEVICH Kh. A., AKIMENKO Z. A., MOROZ I. N., NAZIMOV I. V., ALDANOVA N. A.

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

The splitting of carboxymethylated Leu, Ile, Val(LIV)-binding protein from *E. coli* by cyanogen bromide was performed. By means of gel-filtration, DEAE-chromatography and paper chromatography, five individual peptides out of six formed on cleavage were isolated. The arrangement of the obtained peptides in the polypeptide chain of the protein was established. By automated degradation and classical technique the total structure of three peptides and partial amino acid sequences of the other three fragments were determined.