



УДК 547.962.02+577.158.45

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КУР****III. СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ ПОЛНОГО ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА***Шляпников С. В., Мясников А. Н., Мягкова М. А.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Проведен исчерпывающий гидролиз карбоксиметилированной аспартат-амино-трансферазы из цитозоля куриных сердец трипсином. Гидролизат фракционирован гель-хроматографией на сефадексе G-50 и дополнительно разделен комбинацией методов хроматографии и электрофореза. Выделено 46 индивидуальных пептидов, а также свободные лизин и аргинин. Определена аминокислотная последовательность пептидов, которые в сумме содержат 365 остатков аминокислот из полного числа 410, входящих в состав молекулы аспартат-аминотрансферазы.

Предварительные исследования, проведенные в нашей лаборатории [1, 2] (сообщения I, II этой серии), вместе с результатами других авторов [3] показали высокую гомологию первичных структур аспартат-аминотрансфераз (КФ 2.6.1.1), выделенных из цитозоля сердечной мышцы свиньи и кур. Близкое сходство последовательностей аминокислот в двух изоэнзимах позволило с достаточной степенью достоверности расположить по ходу полипептидной цепи пептидные фрагменты, полученные при гидролизе аспартат-аминотрансферазы из сердца кур стафилококковой протеазой, и установить таким образом около 75% структуры исследуемого белка [2]. 32 пептида, выделенные из полученного гидролизата, содержат в сумме 45 остатков лизина и аргинина (полное количество их в белке равно 46), причем 6 из них являются в соответствующих пептидах N-концевыми, 25 расположены в непосредственной близости от N- или C-конца пептида и только 14 включены во внутренние области структуры пептидов.

В этой связи, а также в соответствии с общей стратегией исследования ковалентной структуры аспартат-аминотрансферазы из сердца кур [1] казался целесообразным анализ пептидов полного триптического гидролизата фермента. Результаты этой работы описаны в настоящем сообщении.

Лиофилизированный, денатурированный препарат аспартат-аминотрансферазы плохо растворим в водно-солевых растворах, используемых обычно при трипсинолизе. Поэтому триптическое расщепление предварительно карбоксиметилированного белка проводили в присутствии 2 M мочевины.

Гидролизат хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (сверхтонкий) (рис. 1). Материал фракции I был исключен из дальнейшего рассмотрения, так как в соответствии с анализом N-концевых остатков и данными электрофореза в полиакриламидном геле он, по-видимому, представляет собой исходный, не расщепленный трипсином субстрат.

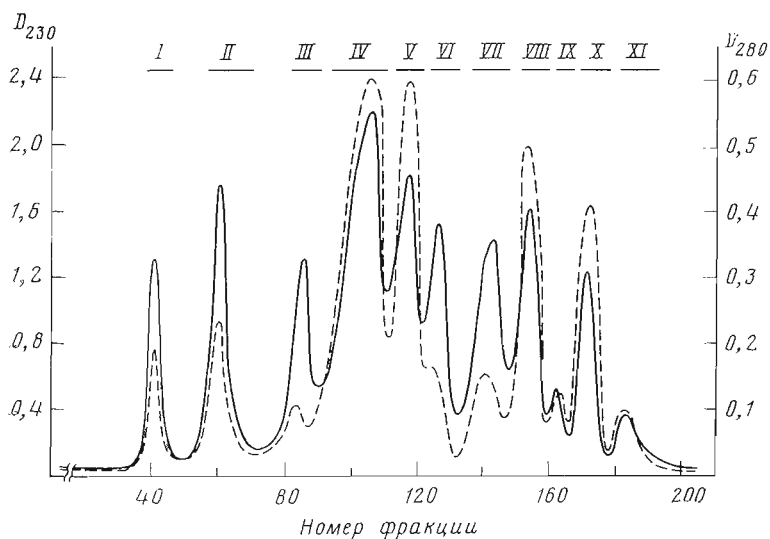


Рис. 1. Разделение триптического гидролизата аспартат-аминотрансферазы на колонке (3×250 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий). Элюция 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатным буфером (рН 8,0) со скоростью 20 мл/ч. Объем фракции до фракции 40 равен 15 мл, далее — 5 мл. Сплошная линия — поглощение при 230 нм, прерывистая — при 280 нм. Здесь и далее на рисунках показаны границы объединения фракций

Фракция II содержала только один пептид — Т-II (табл. 1). Остальные фракции были гетерогенны по пептидному составу, и их подвергали дополнительному разделению.

Пептиды фракций III и IV (см. рис. 1) хроматографировали на колонке с Chromobeads P в градиенте пиридин-ацетатных буферов в идентичных условиях (рис. 2). Индивидуальные пептиды выделены из всех приведенных на рис. 2 фракций, за исключением фракции III-2, которая дополнительно была разделена препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле на два компонента — Т-III-2-1 и Т-III-2-2 с электрофоретической подвижностью (относительно родамина 6Ж), соответственно равной 0,40 и 0,31.

Пептиды фракций V—X (см. рис. 1) выделяли согласно схеме комбинацией методов хроматографии и высоковольтного электрофореза на бумаге.

Фракция XI содержала примерно эквимольное количество аргинина и лизина (выход около 15%), выделение которых потребовало обессоливания от выходящей с этой фракцией мочи и неорганических солей на колонке с дауэксом-50. Последний факт свидетельствует в пользу ранее обсуждавшегося предположения [1] о наличии в исследуемом ферменте сегментов чередующихся основных аминокислотных остатков типа Lys(Arg) — Lys(Arg). Сегменты подобной структуры найдены также в изоэнзиме из сердца свиньи [4, 5]. Таким образом, в триптическом гидролизате аспартат-аминотрансферазы следует ожидать появления вариантов гомологичных пептидов, различающихся как минимум на один остаток лизина или аргинина в N- или C-концевых частях.

Стратегия расшифровки структуры выделенных в работе индивидуальных пептидов основывалась на данных их аминокислотного анализа, приведенных в табл. 1, определении аминокислотной последовательности пептидов ручным вариантом метода Эдмана в дансильной модификации [6] и использовании экзопептидаз [7, 8], качественных реакций [9] при идентификации характеристических остатков аминокислот (табл. 2, 3). В отдельных случаях, рассмотренных ниже, проводилось дополнительное

Аминокислотный состав и характеристики пептидов

Пептид	Аминокислота											
	Cys	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu
T-II	1,1	5,2	2,5	1,5	4,0	3,6	3,0	3,5		0,6	1,8	4,3
T-III-1		2,1		0,9	4,1	2,3	3,5	1,2	0,9		1,9	4,7
T-III-2-1	0,7	2,9	2,8	1,1	2,1	3,9	1,1	2,8			1,7	1,0
T-III-2-2		3,2	3,5	1,5	1,9	1,8	4,3			0,9	2,1	2,9
T-IV-1		1,9		0,8	2,2		2,2			0,7		3,6
T-IV-2		2,2		0,7	1,3	0,8	1,1	2,9			1,8	1,1
T-IV-3		1,9		0,9	1,0	1,0	1,3	3,1			1,7	0,9
T-IV-4		8,2	2,9	3,5	1,2	1,8	2,4	2,1	3,0	0,7	0,9	
T-IV-5		7,8	2,7	3,3	1,0	1,9	2,1	2,0	3,2	0,8	1,0	
T-IV-6		7,1	2,9	3,2	1,1	1,9	2,3	2,3	2,9	0,7		
T-IV-7		4,3		0,7	2,0		1,9		3,4			0,9
T-IV-8		7,0	2,6	3,0	1,0	2,1	2,1	2,0	2,9	0,9		
T-IV-9		3,4	0,7	0,8	0,8		1,3	1,1				1,2
T-V-1-1		3,3			2,0				0,9			
T-V-1-2		2,1		0,9	1,0		1,2					
T-V-2		1,0	0,9		2,1		1,1	1,9	2,4			1,1
T-V-3			2,5	0,7	2,0	1,1		2,1	0,9		0,8	1,9
T-VI-1-1			0,8	0,7	1,1			1,1	1,0		0,9	
T-VI-2-1	0,7	1,1	1,7				1,0			0,8	1,1	1,0
T-VI-2-2				0,7	2,1				0,8	0,8		0,7
T-VI-3-1			0,8	0,9	1,1		5,3		1,9	1,1		2,0
T-VI-3-2		1,0		0,8			2,1		2,5			0,9
T-VII-1-1		1,1		0,9				1,1		0,9		
T-VII-1-2		1,3					2,1	1,2	1,7			0,9
T-VII-1-3					1,3							1,0
T-VII-2-1		2,0						1,0	1,0			1,0
T-VII-3-1						2,0		2,1	1,9			0,9
T-VII-4-1			2,1						1,0			
T-VII-4-2-1					1,0			2,1	0,9	0,8	1,0	
T-VII-4-3					1,1		1,2			1,2	1,1	0,9
T-VII-4-4				0,9			1,0	1,1		0,9	1,0	0,9
T-VIII-1-1-1					1,0						1,0	
T-VIII-1-2-1		2,2							1,1			
T-VIII-1-2-2		1,2									1,1	
T-VIII-1-2-3		2,2			1,2		1,3					1,0
T-VIII-1-2-4		1,1	0,7					1,2				0,9
T-VIII-1-3				0,7	0,9							1,0
T-VIII-1-4					1,2							
T-VIII-1-5		0,9						2,0	1,0			
T-VIII-2-1		1,2	1,6	1,5	1,0	1,9	1,1	1,1				
T-VIII-3-1									0,8	0,7		
T-VIII-4-1-1		1,2					2,2	1,1	2,0			1,2
T-VIII-4-1-2										0,8	1,1	
T-IX-1-1-1		1,1		0,8				1,9				
T-IX-2-1									0,9		0,9	
T-X-1-1		1,1						2,1				
T-X-2-1			0,9									
T-X-3-1				0,8								
T-II-AP-1 **	0,9	4,2	1,8	1,5	2,9	1,8	3,4	3,1		1,0	1,7	4,8
T-II-AP-2		1,1	0,9	1,0	2,1							

* БХ в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 15 : 3 : 12).

** AP — расщепление по связи Asp—Pro.

триптического гидролизата аспарат-аминотрансферазы

Аминокислота						Всего остатков	E _{Arg} при pH		R*Arg	Выход, %	N-Концевая аминокислота	
Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp		6.5	3.5				
0,6	1,9	2,0	2,1		+	40				40	Gly	
	1,1	1,1	0,9	1,0		26				30	Lys	
	2,0	1,0	1,9		+	27				2	Ala	
	2,2	1,0	1,1			28				5	Leu	
		1,0				13				25	Gly	
		1,0				13				10	Ile	
		1,0		1,1		14				32	Ile	
	1,7	2,0	1,0	0,9	1,0	+	35			4	Trp	
	1,6	2,1	1,1	0,8	1,0	+	35			6	Trp	
	1,8	1,9	1,0	0,9		+	32			2	Trp	
1,6		1,0		0,9		16				13	Val	
	2,0	1,0	1,0		+	32				4	Trp	
	1,1	1,0		1,9		13				20	Leu	
		1,0		1,0		7		0,25	0,4	13	Asp	
		1,0		1,0		7		0,33	0,4	6	Glu	
		1,0		1,0	0,8	13	0,1		2,0	19	Thr	
		1,1	1,0		+	16			3,0	32	Ile	
		1,0		1,1		8		0,76	1,3	33	Ser	
		1,0				9	0,16	0,38	1,8	29	Ile	
		1,0				7	0,16	0,57	1,8	42	Val	
0,7		1,0		1,0		14		0,48	1,9	37	Val	
		1,0				9		0,67	1,9	17	Val	
				1,0		5	0,16	0,5	1,2	25	Thr	
				1,0		9	0,33	0,64	1,2	4	Val	
		1,0				3	0,16	0,72	1,2	2	Leu	
	0,8	1,0				7	0,16	0,49	1,7	52	Asp	
		1,0				8		0,6	1,9	54	Ala	
	0,9		1,0			4		0,08	2,3	17	-	
			1,0			7		0,3	2,3	23	-	
				1,0		7	0,15	0,53	2,3	43	Ile	
0,9	0,9		1,2	1,0		9		0,75	2,3	20	His	
1,0				1,0		2	0,16	0,37	1,68	30	Ile	
		1,0				4	0,16	0,47	0,6	12	Asp	
						3	0,16	0,47	1,43	11	Asp	
	0,8	0,9			1,0	8	0,16	0,47	1,88	10	Asp	
		1,1			1,0	6	0,16	0,47	2,07	14	Leu	
					1,0	4	0,16	0,66		55	Ser	
			1,0			2	0,16	0,79		45	Glu	
					1,0	+	6	0,16	0,85		4	Asp
					1,0	0,8	12	0,31		1,2	30	Thr
					1,0		5	0,42		2,35	63	Val
1,1		1,0		1,0		10	0,57		1,7	4	Lys	
0,8				1,0		3	0,57		1,85	7	Met	
				1,0		5	0,5		0,65	83	Ala	
				1,0		3		0,8	0,89	52	Ile	
	0,8		1,0		+	6	0,17	0,5	2,2	28	Tyr	
	0,9					3	0,52	0,73	1,6	31	Thr	
					1,0		2	0,73	0,95	40	Ser	
		2,1	1,0	1,9			33				Gly	
		1,0				+	7				Pro	

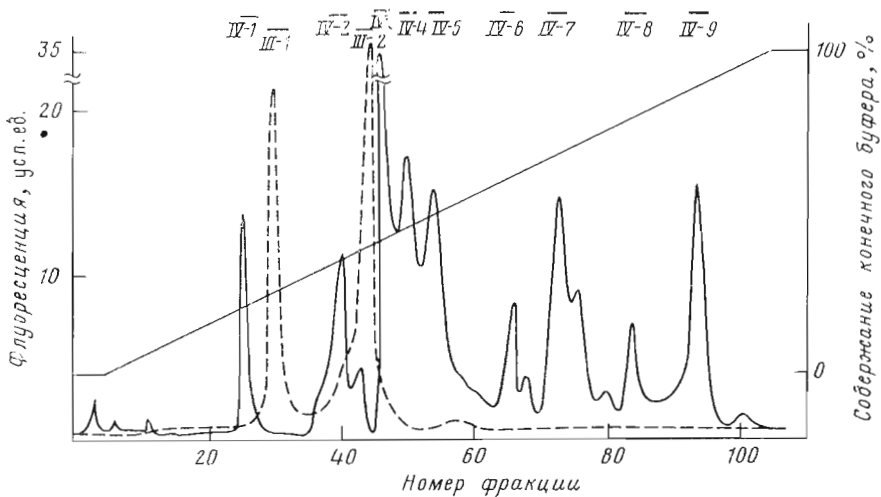


Рис. 2. Ионнообменная хроматография фракции III (пунктир) и фракции IV (сплошная линия) триптического гидролизата аспаргат-аминотрансферазы. Разделение проводили на колонке (0,6×50 см) с катионообменной смолой Chromobeads P при 55° С. Элюция линейным градиентом от 0,05 М пиридин-форматного буфера (рН 2,4) к 2,0 М пиридин-ацетатному буферу (рН 5,2) со скоростью 10 мл/ч. Объем фракции 1,2 мл. Контроль по реакции с флуорескаминем [2]

расщепление пептида с последующим разделением и анализом полученных продуктов.

Пептид T-II (T-III-2-1, T-IV-1). 13 циклов деградации пептида по методу Эдмана дали структуру N-концевой части пептида, представленную в табл. 2. Совместная обработка пептида карбоксипептидазами А и В сопровождается отщеплением лизина и триптофана. В соответствии с установленной последовательностью аминокислот и аминокислотным анализом этот пептид представляет собой негидролизованный по связи Lys—Ala вариант двух более коротких фрагментов — T-III-2-1 и T-IV-1. Исчерпывающий гидролиз последнего из них, отвечающего N-концевой части исходного пептида, показывает, что он содержит один остаток аспарагиновой кислоты и по одному остатку глутаминовой кислоты и глутамина. Кинетика расщепления пептида T-IV-1 карбоксипептидазой С (табл. 3) однозначно фиксирует один остаток глутаминовой кислоты в положении 178*.

Пептид T-III-2-1 содержит 27 аминокислотных остатков; идентификация 21 из них осуществлена при ступенчатом расщеплении по методу Эдмана. С-Концевые остатки лизина и триптофана отщепляются при гидролизе пептида карбоксипептидазой В. Полное установление структуры пептида потребовало дополнительной его фрагментации, для чего был выбран ограниченный кислый гидролиз в условиях повышенной лабильности связи Asp—Pro [10]. Количество пептида T-III-2-1 не позволило с достаточной надежностью провести выделение искомого фрагмента, поэтому в качестве объекта расщепления использовали более крупный пептид T-II. Пептидную смесь после гидролиза T-II хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Профиль элюции представлен на рис. 3. По данным N-концевого анализа и аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, объединенные фракции II-AP-1 и II-AP-2 содержали индивидуальные фрагменты исходного пептида, гидролизованного по связи Asp—Pro. Из результатов определения аминокислотного состава этих пептидов (табл. 1) следует, что пептид T-II-AP-1 соответствует участку 167—199

* Здесь и далее нумерация остатков полипептидной цепи аспаргат-аминотрансферазы из сердца кур проводится согласно аминокислотной последовательности свиного изофермента [4, 5].

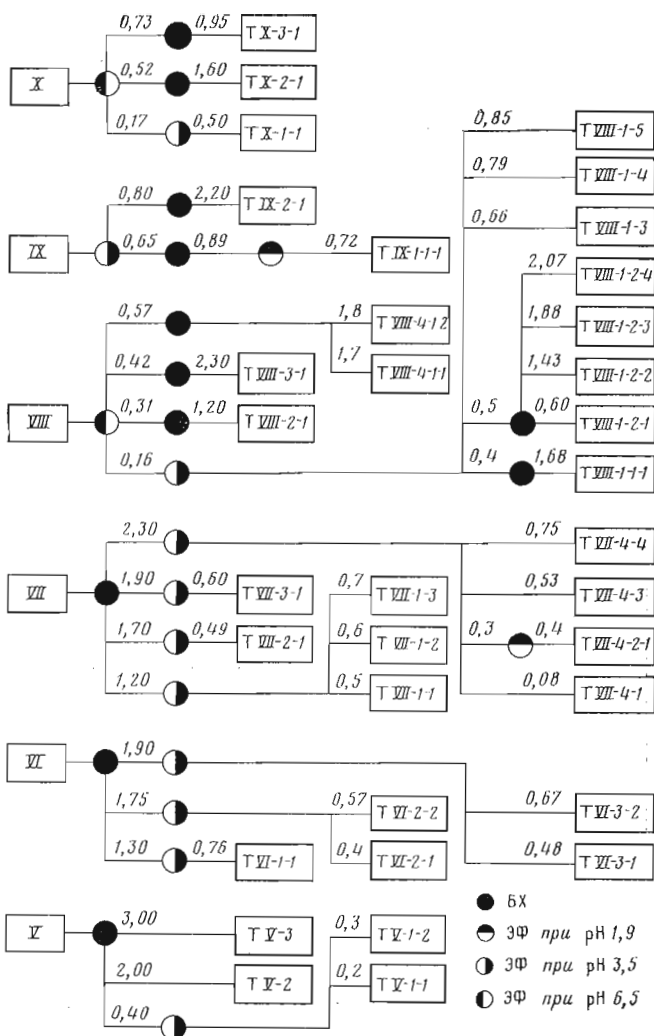


Схема разделения пептидов фракций V–X (см. рис. 1) триптического гидролизата аспарат-аминотрансферазы. Цифры на линиях показывают подвижность пептидов относительно аргинина

полипептидной цепи фермента, а T-II-AP-2 является C-концевым (200–206) фрагментом пептида T-II. Определение аминокислотной последовательности и полный ферментативный гидролиз пептида T-II-AP-2 аминопептидазой M показали структуру аспарат-аминотрансферазы в нерасшифрованном ранес районе 201–204 полипептидной цепи (табл. 2) и вместе с данными по кинетике расщепления экзопептидазами пептида T-II-AP-1 (табл. 2, 3) позволили установить положение амидированных и кислых форм аспарагиновых и глутаминовых остатков и окончательно доказать структуру полипептидной цепи белка в районе 167–206.

Пептид T-III-1. 16 циклов эдмановской деградации и гидролиз карбоксипептидазами A и B позволили представить структуру пептида в форме, приведенной в табл. 2. Исчерпывающий гидролиз пептида аминопептидазой M показывает, что все остатки Asx амидированы, тогда как из четырех остатков Glx только один находится в амидированной форме. Согласно кинетике расщепления пептида аминопептидазой M, остаток Gln занимает в полипептидной цепи аспарат-аминотрансферазы положение 58.

**Структура пептидов триптического гидролизата цитоплазматической
аспаргат-аминотрансферазы из сердца кур**

Пептид	Структура	Положение в пептидной цепи аспаргат-аминотрансферазы из сердца свиньи [4, 5]
T-II	Gly-Leu-Asx-Leu-Glx-Gly-Leu-Leu-Ser-Asx-Met-Glx- Lys-Ala-(Pro, Glx, Phe, Ser, Ile, Phe, Ile, Leu, His, Ala, Cys, Ala, His, Asx, Pro, Thr, Gly, Thr, Asx, Pro, Thr, Pro, Asx, Glx)-Trp-Lys ** ← ←	167-206
T-III-1	Lys-Val-Glu-Gln-Leu-Ile-Ala-Gly-Asn-Gly-Ser-Leu-Asn- His-Glu-Tyr-Leu-(Pro, Ile, Leu, Gly, Leu, Pro, Glu)- Phe-Arg ↗ ↘ ↖ ↙	55-80
T-III-2-1	Ala-Pro-Glu-Phe-Ser-Ile-Phe-Ile-Leu-His-Ala-Cys-Ala- His-Asx-Pro-Thr-Gly-Thr-Asx-Pro-(Thr, Pro, Asx, Glx)-Trp-Lys ** ← ←	180-206
T-III-2-2	Leu-Glu-Ser-Leu-Gly-Thr-Pro-Gly-Thr-(Trp, Asx, His, Ile, Thr, Asx, Glx, Ile, Gly, Met, Phe, Ser, Phe, Thr, Gly, Leu, Asx, Pro)-Lys ←	341-368
T-IV-1	Gly-Leu-Asp-Leu-Gln-Gly-Leu-Leu-Ser-Asp-Met-Glu- Lys ↗ ↘ ↖ ↙	167-179
T-IV-2	Ile-Ala-Leu-Gly-Asp-Asp-Ser-Pro-Ala-Ile-Ala-Gln-Lys ↗ ↘	86-98
T-IV-3	Ile-(Ala, Leu, Gly, Asx, Asx, Ser, Pro, Ala)-Ile-Ala-Gln- Lys-Arg ← ← ←	86-99
T-IV-5	Trp-Tyr-Asn-Gly-Asn-Asn-Asn-(Thr, Ala, Thr, Pro, Val, Tyr, Val, Ser, Ser, Pro, Thr, Trp, Glx, Asx, His, Asx, Ser, Val, Phe, Met, Asx, Ala, Gly)-Phe-Lys-Asp-Ile-Arg ← ←	122-156
T-IV-7	Val-Gly-Asn-Leu-Ser-Val-Val-Gly-Lys-Asx-Glx-Asx-Asn- Val-Gln-Arg ↗ ↘ ↖ ↙	267-282
T-IV-8	Trp-Tyr-Asx-Gly-Asx-(Asx, Asx, Thr, Ala, Thr, Pro, Val, Tyr, Val, Ser, Ser, Pro, Thr, Trp, Glx, Asx, His, Asx, Ser, Val, Phe, Met, Asx)-Ala-Gly-Phe-Lys ← ← ← ←	122-153
T-IV-9	Leu-Thr-Ala-Asx-Phe-Arg-Glx-Asx-Gly-Asx-Ser-Arg-Lys	20-32
T-V-1-1	Asp-Glu-Asp-Asn-Val-Gln-Arg * ↗ ↘ ↖ ↙	276-282
T-V-1-2	Glu-Asp-Gly-Asp-Ser-Arg-Lys ↗ ↘	26-32
T-V-2	Thr-Asp-Glu-Gly-Gln-Pro-Trp-Val-Leu-Pro-Val-Val-Arg * ↗ ↘	42-54
T-V-3	Ile-Val-Ala-Thr-Thr-Leu-Thr-Ser-Pro-Gln-Leu-Phe-Ala- Glu-Trp-Lys * ↗ ↘ ↖ ↙	305-320
T-VI-1-1	Ser-Ile-His-Glu-Ala-Val-Thr-Lys ↗ ↘	403-410
T-VI-2-1	Ile-Asn-Met-Cys-Gly-Leu-Thr-Thr-Lys **	387-395
T-VI-2-2	Val-Leu-Ser-Gln-Met-Glu-Lys ↗ ↘	283-289
T-VI-3-1	Val-Gly-Ser-Val-Gln-Gly-Leu-Gly-Gly-Thr-Gly-Ala-Leu- Arg ↗ ↘	100-113

Таблица 2 (продолжение)

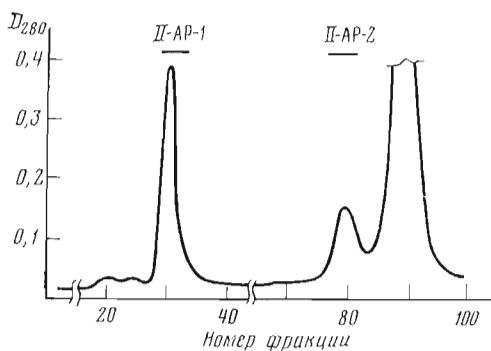
Пептид	Структура	Положение в пептидной цепи аспарат-амино-трансферазы из сердца свиньи [4, 5]
T-IV-3-2	Val-Gly- <u>Asn</u> -Leu-Ser-Val-Val-Gly-Lys	267-275
T-VII-1-1	Thr-Met-Ala-Asp-Arg *	325-329
T-VII-1-2	Val-Asn-Leu-Gly-Val-Gly-Ala-Tyr-Arg *	33-41
T-VII-1-3	Leu-Glu-Lys *	233-235
T-VII-2-1	<u>Asn</u> - <u>Leu</u> - <u>Asp</u> - <u>Tyr</u> - <u>Val</u> - <u>Ala</u> - <u>Lys</u> *	396-402
T-VII-3-2	Ala-Pro-Pro-Val-Ala-Val-Phe-Lys	12-19
T-VII-4-1	<Gln- <u>Val</u> - <u>Glu</u> - <u>Tyr</u> **	369-372
T-VII-4-2-1	<Gln- <u>Ile</u> - <u>Ala</u> - <u>Ala</u> - <u>Val</u> - <u>Met</u> - <u>Lys</u> **	207-213
T-VII-4-3	Ile-Gly-Ala-Glu-Phe-Leu-Arg *	114-121
T-VII-4-4	His-Ile-Tyr-Leu-Met-Ala-Ser-Gly-Arg	378-386
T-VIII-1-1-1	Ile-Gln *	411-412
T-VIII-1-2-1	Asp-Asn-Val-Lys *	321-324
T-VIII-1-2-2	Asp-Ile-Arg *	154-156
T-VIII-1-2-3	Asn-Phe-Gly-Leu-Tyr- <u>Asn</u> - <u>Glu</u> -Arg	259-266
T-VIII-1-2-4	Leu-Thr-Ala- <u>Asp</u> -Phe-Arg	20-25
T-VIII-1-3	Ser-Glu-Leu-Arg *	335-338
T-VIII-1-4	Glu-Lys *	376-377
T-VIII-2-1	Thr-Thr-Trp-Ser-Asn-Pro-Pro-Ser-Gln-Gly-Ala-Arg *	293-304
T-VIII-3-1	Val-Leu-Leu-Met-Arg	330-334
T-VIII-1-5	Asp-Ala-Trp-Ala-Val-Arg *	236-241
T-VIII-4-1-1	Lys-Val-Asx-Leu-Gly-Val-Gly-Ala-Tyr-Arg	32-41
T-VIII-4-1-2	Met-Ile-Lys	373-375
T-IX-1-1-1	Ala-Asn-Ala-Ser-Arg *	81-85
T-IX-2-1	Ile-Val-Arg	290-292
T-X-1-1	Tyr-Trp-Asp-Ala-Ala-Lys *	160-165
T-X-2-1	Thr-Tyr-Arg	157-159
T-X-3-1	Ser-Arg	339-340
T-II-AP-1	Gly-(Leu, Asx, Leu, Glx, Gly, Leu, Leu, Ser, Asx, Met, Glx, Lys, Ala, Pro, Glx, Phe, Ser, Ile, Phe, Ile, Leu, His, Ala, Cys) <u>Ala</u> - <u>His</u> - <u>Asn</u> - <u>Pro</u> - <u>Thr</u> - <u>Gly</u> - <u>Thr</u> - <u>Asp</u> **	167-199
T-II-AP-2	Pro-Thr-Pro-Asp- <u>Glu</u> - <u>Trp</u> -Lys	200-206

Примечание. Положение остатков установлено с помощью метода Эдмана, а также при исследовании полного гидролизата пептида аминоксипептидазой М (→), при исследовании кинетики гидролиза пептида экзопептидазами (табл. 3): АРМ или LАР(→), СРА и/или СРВ (←), СРС (∟). Аминокислотная последовательность участков пептидов, заключенных в скобки, в данной работе не устанавливалась. Структура этих участков реконструирована по данным аминокислотного анализа и результатам исследования пептидов других гидролизатов.

* Состояние амидирования остатков дикарбоновых аминокислот пептидов установлено при рассмотрении их электрофоретических подвижностей.

** Цистеин в пептидах идентифицирован в виде Cys(Cm), определение остатка пироглутаминовой кислоты — см. текст.

Рис. 3. Хроматография ограниченного по связи Asp-Pro кислотного гидролизата пептида Т-II на колонке (0,8×175 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий). Элюция 5% уксусной кислотой, содержащей 8 М мочевины, со скоростью 2 мл/ч; объем фракции 1 мл



Следует отметить, что структура данного пептида не установлена полностью и это в значительной степени связано с резким падением выхода продуктов на последних шагах эдмановской деградации. Структура пептида включает в себя связь Asn—Gly, легко претерпевающую в условиях ступенчатого расщепления циклизацию с образованием имидной связи или α - β -перегруппировку пептидной связи [11]. Отсюда резкое снижение выхода Dns-производных аминокислот, наблюдающееся с 9-го цикла деградации, и связанная с этим неоднозначность интерпретации результатов.

Пептид T-VIII-2-1. Амидированная форма остатков Asx и Glx вытекает кислотных остатков идентифицировано в N-концевой его части, включая остаток глутаминовой кислоты 342, найденный при изучении кинетики гидролиза аминокептидазой М.

Пептиды T-IV-2 и T-IV-3 — дублирующие друг друга пептиды, различающиеся структурой С-концевой части. С-Концевая последовательность определена при изучении кинетики расщепления пептида карбоксипептидазами А и В (табл. 3). Исчерпывающий протеолиз пептида аминокептидазой М подтверждает наличие глутамин и свидетельствует о присутствии двух остатков аспарагиновой кислоты.

Пептид T-IV-4 (T-IV-5) и T-IV-6 (T-IV-8). Пептиды T-IV-5 и T-IV-8, как и в ранее рассмотренном случае, имеют различия в С-концевой последовательности аминокислот ввиду ограниченной скорости расщепления связи Lys—Asp. Низкий выход пептидов и сложность определения их аминокислотной последовательности, которая является следствием недалеко отстоящей от N-конца пептида связи Asn—Gly, позволили установить лишь ограниченную часть структуры пептидов и с помощью аминокептидазы М локализовать в ней остатки аспарагина в положениях 124, 126, 127 и 128, а с помощью карбоксипептидазы А — аспарагиновую кислоту 154. Пептиды T-IV-4 и T-IV-6 представляют собой, согласно аминокислотному анализу, по-видимому, частично дезамидированные производные соответствующих пептидов T-IV-5 и T-IV-8 и выделены с меньшим выходом.

Пептид T-IV-7 (T-IV-3-2 и T-V-1-1). Анализ последовательности аминокислот показывает, что пептид T-IV-7 представляет собой сумму пептидов T-IV-3-2 и T-V-1-1 и включает остатки 267—282. Кинетика ферментативного расщепления (табл. 3) показывает, что остатками 269 и 279 является аспарагин, а 281 — глутамин. Исчерпывающий аминокептидазный гидролизат пептида T-IV-3-2 не содержит дикарбоновых аминокислот. Пептид T-V-1-1 по электрофоретической подвижности является кислым и при полном гидролизе аминокептидазой М показывает присутствие как амидированных, так и кислых форм дикарбоновых аминокислот, причем соотношение Asp—Asn составляет 2 : 1, в то время как соотношение Glu—Gln равно 1. Гидролиз смесью карбоксипептидаз А и В этого пептида подтвердил ранее полученные данные [2], согласно которым остатками 279 и 281 являются соответственно аспарагин и глутамин. Таким образом, положения 276—278 полипептидной цепи аспарат-амино-

трансферазы занимают последовательно остатки аспарагиновой, глутаминовой и снова аспарагиновой кислот.

Пептид T-IV-9 (T-V-1-2 и T-VIII-1-2-4). Пептид T-IV-9 суммирует фрагменты T-V-1-2 и T-VIII-1-2-4. Установленная последовательность исходного пептида и его составляющих, отсутствие амидов дикарбоновых кислот в полных ферментативных гидролизатах и данные по электрофоретической подвижности полностью доказывают структуру этого района пептидной цепи белка.

Пептид T-V-2. Местоположение остатков дикарбоновых кислот и амидов установлено при рассмотрении электрофоретических параметров исходного пептида (табл. 1) и пептида, прошедшего три цикла деградации по Эдману ($E_{\Delta_{\text{гг}}}(\text{pH } 6,5) = 0,31$). Кислые свойства пептида T-V-2 предполагают наличие в нем как минимум двух остатков дикарбоновых кислот. В то же время модифицированный вариант этого пептида, не содержащий трех N-концевых аминокислот, является основным, и поэтому остаток Glx-46 представляет собой глутамин. Отсюда непосредственно вытекает, что 2-м и 3-м остатками в пептиде T-V-2 являются соответственно аспарагиновая и глутаминовая кислоты.

Пептид T-V-3. Кислая и амидированная форма глутаминовых остатков расположены в соответствии с данными кинетики расщепления карбоксипептидазами и анализом электрофоретической подвижности пептида (табл. 1, 3).

Пептиды T-VI-1-1 и T-VI-3-1. Аминопептидазный гидролизат пептида T-V-1-1 содержит глутаминовую аминокислоту, а гидролизат пептида T-VI-3-1 — глутамин.

Пептид T-VI-2-2. Нейтральный по электрофоретической подвижности при pH 6,5 пептид содержит по одному остатку глутамин и глутаминовой кислоты. Положение их в пептидной цепи установлено при анализе кинетики экзопептидазного расщепления.

Пептиды T-VI-2-1, T-VII-1-1, T-VII-1-3, T-VII-4-3, T-VIII-1-1-1, T-VIII-1-3, T-VIII-1-4, T-VIII-1-2-2 и T-X-1-1. Остатки 234 в пептиде T-VII-1-3, 117 — в T-VII-4-3, 336 — в T-VIII-1-3 и N-концевой остаток в дипептиде T-VIII-1-4 представляют собой глутаминовые кислоты; остатки 155 в пептиде T-VIII-1-2-2, 236 — в T-VIII-1-5, 328 — в T-VII-1-1 и 160 — в T-X-1-1 — аспарагиновые кислоты; остаток 412 в пептиде T-VIII-1-1-1 — глутамин и остаток 388 в пептиде T-IV-2-1 — аспарагин, что следует из нейтральных свойств пептидов при электрофорезе при pH 6,5.

Пептид T-VII-1-2 (T-VIII-4-1-1) — гомологичные пептиды, различающиеся остатком лизина. Первый из них обладает электрофоретическими свойствами основного характера при нейтральном значении pH, из чего следует, что остатком в положении 34 является аспарагин.

Пептид T-VII-2-1 содержит два остатка Asx, один из которых, согласно электрофоретической подвижности пептида, представляет собой амид, а другой — кислоту. Лейцинаминопептидаза при кратковременной инкубации освобождает из N-концевой части пептида только аспарагин и лейцин, а при большей степени гидролиза аспарагиновую кислоту и т. д., показывая, таким образом, последовательность искомым остатков в пептидной цепи.

Структура пептида T-VII-3-2, так же как T-VII-4-4, T-VIII-3-1, T-VIII-4-1-2, T-IX-2-1, T-X-2-1 и T-X-3-1, непосредственно вытекает из результатов аминокислотного анализа и определения последовательности, без привлечения дополнительных данных.

Пептиды T-VII-4-1 и T-VII-4-2-1 не имеют свободной α -аминогруппы. В состав обоих пептидов входит остаток глутаминовой кислоты (амида), что дает возможность предположить его наличие в N-концевой части пептидов и циклизацию на одной из стадий выделения пептидов. Структура пептидов доказывается при рассмотрении кинетики гидролиза пептидов

карбоксипептидазами, а также при определении последовательности аминокислот, после обработки пептидов пироглутамат-аминопептидазой.

Пептид T-VIII-1-2-1. Отнесение первых остатков пептида к кислой и амидированной формам осуществлялось после проведения цикла отщепления N-концевой аминокислоты при анализе электрофоретических подвижностей исходного и укороченного пептидов. Так как исходный тетрапептид при pH 6,5 нейтрален, а трипептид носит основной характер ($E_{Arg}(pH\ 6,5)=0,6$), очевидно, что N-концевым остатком пептида T-VIII-1-2-1 является аспарагиновая кислота, а вторым от N-конца остатком — аспарагин.

Пептид T-VIII-1-2-3. Исчерпывающий гидролиз пептида аминокептидазой M свидетельствует о присутствии двух остатков аспарагина и одного остатка глутаминовой кислоты, что согласуется с электрофоретической подвижностью пептида.

Пептид T-VIII-2-1. Амидированная форма остатков Asx и Glx вытекает из основного характера пептида при pH 6,5.

Пептид T-IX-1-1-1. Гомолог этого же пептида, но в дезамидированной форме выделен с меньшим выходом (~10%) из фракции VIII ($E_{Arg}(pH\ 6,5)=0,16$, $E_{Arg}(pH\ 3,5)=0,37$, $R_{Arg}=1,1$).

Таким образом, из триптического гидролизата цитоплазматической аспаргат-аминотрансферазы из сердца кур выделено и охарактеризовано 46 пептидов, не считая лизина и аргинина, которые включают 365 остатков полипептидной цепи молекулы из полного их числа, составляющего 440. Установлена полная структура всех пептидов, за исключением T-III-2-2 и T-IV-5, для которых проведено определение только частичной последовательности аминокислот. Анализ приведенных данных показывает, что большая часть пептидных фрагментов трипсинолиза белка является результатом специфического гидролиза молекулы по остаткам лизина и аргинина. Гидролизат включает 9 пептидов, охарактеризованных ранее при триптическом протеолизе цитракоплизированного белка [1]. Некоторое число дополнительных фрагментов получено также вследствие ограниченного расщепления связей, образованных остатками лизина и аргинина с дикарбоновыми кислотами и связей типа $Lys(Arg)-Lys(Arg)$. Вместе с тем следует отметить один случай неполного расщепления трипсином связи $Lys^{179}-Ala^{180}$, по-видимому, в результате стерических препятствий и наличия остатка Pro^{181} , а также присутствие в гидролизате «химотриптического» пептида T-VII-4-1, содержащего в качестве C-концевой аминокислоты тирозин. Протеолиз связи 372—373 приводит к появлению пептида T-VIII-4-1-2. Пептид T-VIII-1-1-1 не имеет в составе остатков основных аминокислот и является C-концевым в молекуле аспаргат-аминотрансферазы. Не укладывается в рамки известной специфичности трипсина гидролиз связи $Asn^{232}-Leu^{233}$, подтверждаемый наличием трипептида T-VII-1-3. Кроме того, исследование данного гидролизата осложнялось в ряде случаев частичным дезамидированием остатков аспарагина и глутамина, приводящим к появлению множественных форм одного и того же фрагмента пептидной цепи. Последнее (в некоторых случаях) появляется в обнаружении подобных пептидов в разных предварительно разделенных и существенно различающихся между собой фракциях.

Место триптических пептидов в первичной структуре аспаргат-аминотрансферазы, как правило, определяется при анализе последовательности аминокислот гомологичного фермента из сердца свиньи. В некоторых случаях, однако, особенно при рассмотрении ди- и трипептидов, положение в структуре не может быть предсказано однозначно и требует привлечения данных другой специфической фрагментации молекулы. Исследованные пептиды позволили объединить результаты, полученные при протеолитическом расщеплении аспаргат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой, а также дополнили данные ограниченного триптического гидролиза белка по остаткам аргинина [1, 2]. Сумма пептидов двух гидроли-

затов охватывает всю молекулу аспарат-аминотрансферазы, за исключением двух участков в районе 130-го и 214-го остатков. Изучение структуры этих районов будет описано в следующем сообщении.

Экспериментальная часть

В работе использовали ТРСК-обработанный трипсин (КФ 3.4.21.4) с уд. акт. 271 ед/мг (lot 36C895). Аспарат-аминотрансферазу выделяли из цитозоля сердца кур по методу «А» Кочкиной и др. [12]. Условия разделения пептидов хроматографией и электрофорезом на бумаге, аминокислотный анализ, качественные реакции на бумаге, а также определение структуры пептидов деградацией по Эдману и с помощью карбоксипептидаз А, В, С и лейцинаминопептидазы описаны в сообщении I [1], препаративный и аналитический электрофорез в полиакриламидном геле, а также гидролиз пептидов аминопептидазой М и пироглутамат-аминопептидазой — в сообщении II [2].

Карбоксиметилирование белка осуществляли согласно опубликованной ранее методике [1] с той разницей, что диализ карбоксиметилированного белка проводили в 0,1 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере (рН 8,0), содержащем 2 М мочевины. В конце диализа мелкодисперсную суспензию белка концентрировали с помощью полиэтиленгликоля 400 000 до 5 мл.

Триптический гидролиз карбоксиметилированного белка проводили в 0,1 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере (рН 8,3), содержащем 2 М мочевины. Трипсин добавляли двумя равными порциями через 4 ч до конечного соотношения фермент — субстрат 1 : 50. Общее время гидролиза при 37° С составляло 16 ч. Реакцию останавливали добавлением 100-кратного мольного (по отношению к трипсину) избытка динизопропилфторфосфата.

Ионообменная хроматография. Для хроматографии на катионообменной смоле Chromobeads Р использовали условия, описанные ранее [1]. Детекцию пептидов в элюате осуществляли по реакции с флуорескаминном [2].

Ограниченный кислотный гидролиз пептида Т-II по связи Asp—Pro проводили в 10% растворе уксусной кислоты, доведенном пиридином до рН 2,5 и содержащем 7 М солянокислый гуанидил [10]. После инкубации в течение 100 ч при 37° С гидролизат непосредственно наносили на колонку с сефадексом G-50 (рис. 4). Объединенные фракции II-AP-1 и II-AP-2 обессоливали на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-15 элюцией 10% уксусной кислотой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мясников А. Н., Мягкова М. А., Шляпников С. В., Орлов В. М., Торчинский Ю. М., Севериц Е. С. (1980) *Биоорг. химия*, **6**, 348–358.
2. Мясников А. Н., Шляпников С. В. (1980) *Биоорг. химия*, **6**, 529–544.
3. Егоров Ц. А., Шахпаров М. И., Демидкина Т. В., Торчинский Ю. М. (1977) *Биохимия*, **42**, 2253–2257.
4. Ovchinnikov Yu. A., Egorov S. A., Aldanova N. A., Feigina M. Yu., Abdulaev N. G., Grishin E. V., Kiselev A. P., Modyanov N. N., Braunstein A. E., Polyansky O. L., Nosikov V. V. (1973) *FEBS Lett.*, **29**, 31–34.
5. Doonan S., Doonan H. L., Panford R., Vernon C. A., Walter J. M., Bossa F., Barra D., Carloni M., Fasella P., Riva F., Walton P. L. (1974) *FEBS Lett.*, **38**, 229–233.
6. Bruton C. J., Hartley B. S. (1970) *J. Mol. Biol.*, **52**, 165–178.
7. Potts J. T. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. W. II., ed), vol. XI, pp. 648–664.
8. Tschesche H., Kupfer S. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 33–36.
9. Eastley C. W. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **107**, 386–388.
10. Fraser K. J., Poulsen K., Haber E. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4974–4977.
11. Weber K., Konigsberg W. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3563–3568.
12. Кочкина В. М., Азарян А. В., Механик М. Л., Закомырдина Л. Н., Синицина П. И., Болотина Н. А., Егоров Ц. А., Торчинский Ю. М. (1978) *Биохимия*, **43**, 1478–1484.

13. Nakai N., Lai C. Y., Horecer B. L. (1974) *Anal. Biochem.*, **58**, 563-570.
14. Арутюян А. А., Шляпников С. В., Северин Е. С. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1188-1196.

Поступила в редакцию
4.IX.1979

**PRIMARY STRUCTURE OF CYTOPLASMIC ASPARTATE AMINOTRANSFERASE
FROM CHICKEN HEART. III. THE STRUCTURE OF TRYPTIC PEPTIDES**

SHLYAPNIKOV S. V., MYASNIKOV A. N., MYAGKOVA M. A.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Cytoplasmic aspartate aminotransferase from chicken heart was carboxymethylated and cleaved with trypsin. Peptides were isolated by a combination of gel filtration, ion exchange chromatography as well as by paper chromatography and electrophoresis. The structure of peptides was determined by dansyl Edman procedure and with the aid of various exopeptidases.
