



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.962.02

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ФАКТОРА  
ЭЛОНГАЦИИ G ИЗ *E. COLI*

Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Довгас Н. В.,  
Винокуров Л. М., Бундулис Ю. П., Бундуле М. А.,  
Козлов В. П., Овчинников Ю. А.

*Институт белка Академии наук СССР, г. Пущино, Московская область*

В бактериальной белоксинтезирующей системе известны три растворимых белка, участвующих в синтезе полипептидных цепей на рибосоме на этапе элонгации. Один из них, фактор элонгации G (EF-G), катализирует GTP-зависимую транслокацию комплекса пептидил-тРНК-мРНК из участка А в участок Р на рибосоме с освобождением дезацилированной тРНК из участка Р и выходом ее из рибосомы [1].

EF-G представляет собой белок, состоящий из одной полипептидной цепи с  $M \sim 80\ 000$ . Исследование такого большого белка традиционными методами, используемыми при установлении первичной структуры, нам не казалось наиболее оптимальным. Поэтому при выборе стратегии структурного анализа в качестве первого этапа исследования был использован метод ограниченного протеинолиза, который позволяет расщепить молекулу белка на небольшое количество крупных фрагментов, относительно устойчивых к дальнейшему действию протеиназы. Ранее было показано, что фактор EF-G при мягком триптическом гидролизе распадается на пять фрагментов [2-4], четыре из которых ( $T_1 - T_4$ ) (номенклатура фрагментов см. в работе [3]) полностью охватывают полипептидную цепь белка. Таким образом, исследование первичной структуры EF-G свелось к определению структуры этих четырех фрагментов и нахождению пептидов, объединяющих фрагменты ограниченного трипсинолиза в одну полипептидную цепь.

Из данных аминокислотного анализа и определения молекулярного веса пептидных фрагментов — продуктов триптического гидролиза — можно было сделать вывод, что при ограниченном трипсинолизе не происходит отщепления сколько-нибудь значительных участков полипептидной цепи, не входящих в состав этих фрагментов [3]. В то же время при исследовании бромцианового гидролизата EF-G был выделен ряд пептидов, выяснение структуры которых позволило объединить в одну полипептидную цепь все фрагменты ограниченного трипсинолиза. Оказалось, что между фрагментами ограниченного трипсинолиза действительно нет никаких вставок, т. е. трипсин производит точечные разрывы полипептидной цепи EF-G [4].

Фрагмент  $T_6$  является N-концевым, вслед за ним по цепи располагается фрагмент  $T_7$ , который содержит функционально важный остаток цистеина. В районе этого фрагмента расположен GTP-связывающий уча-

Первичная структура фактора элонгации G

A-R-T-T-P-I-A-R-Y-R-N-I-G-I-S-A-H-I-D-A-G-K-T-T-T-T-Q-R-I-L-  
 F-Y-T-G-V-N-H-K-I-G-E-V-H-D-G-A-A-T-M-D-W-M-E-Q-E-Q-E-R-G-I-  
 T-I-T-S-A-A-T-T-A-F-W-S-G-M-A-K-Q-Y-E-P-H-R-I-N-I-I-D-T-P-G-  
 H-V-D-F-T-I-E-V-E-R-S-M-R-V-L-D-G-A-V-M-V-Y-C-A-V-G-G-V-Q-P-  
 Q-S-E-T-V-W-R-Q-A-N-K-Y-K-V-P-R-I-A-F-V-N-K-M-D-R-M-G-A-N-F-  
 L-K-V-V-N-Q-I-K-T-R-L-G-A-N-P-V-P-L-Q-L-A-I-G-A-E-E-H-F-T-G-  
 V-V-D-L-V-K-M-K-A-I-N-W-N-D-A-D-Q-G-V-T-F-E-Y-E-D-I-P-A-D-M-  
 V-E-L-A-N-E-W-H-Q-N-L-I-E-S-A-A-E-A-S-E-E-L-N-E-K-Y-L-G-G-E-  
 E-L-T-E-A-E-I-K-G-A-L-R-Q-R-V-L-N-N-E-I-I-L-V-T-C-G-S-A-F-K-  
 N-K-G-V-Q-A-M-L-D-A-V-I-D-A-L-P-S-P-V-D-V-P... (H-A-S-D-D-E-  
 P-F-S-A-L-A-F-K, I-A-T-D-P-F-V-G-L-F-N-L-T, S-C-V-V-N-S-G-D-T-  
 V-L..W-T-S-V-S-F-X-A-N-V-R-I-V-Q-M-H-A-N-K-R-E-E-I-K-E-V-R-  
 A-G-D-I-A-A-A-I-G-L-K-D-V-T-T-G-D-C-L-C-D-P-D-A-P-I-I-L-E-R-  
 M-G-S-F-R-V-W-T-D-E-E-S-N-Q-T-I-I-A-G-M-G-E-L-H-L-D-I-I-V-D-  
 R-M-E-F-P-E-P-V-I-S-I-A-V-E-P-K-T-K-A-D-Q-E-K-M-G-L-A-L-G-R-  
 L-A-K-E-D-P-S-F-E-R ( $X_n$ ) -M-K-R-E-F-N-V-E-A-N-V-G-K-P-Q-V-A-  
 Y-R-E-T-I-R-Q-K-V-T-D-V-E-G-K-H-A-K-Q-S-C-G-R-G-Q-Y-G-H-V-V-  
 I-D-M-Y-P-L-E-P-G-S-N-P-K-G-Y-E-F-I-N-D-I-K-G-G-V-I-P-G-E-Y-  
 I-P-A-V-D-K-G-I-Q-E-Q-L-K-A-G-P-L-A-G-Y-P-V-V-D-M-G-V-R-L-H-  
 F-G-S-Y-K-D-V-D-S-S-E-L-A-F-H-L-A-A-S-I-A-F-K-E-G-F-K-K-A-K-  
 P-V-L-L-E-P-I-M-K-V-E-V-E-T-P-E-Q-N-T-G-D-V-I-G-D-L-S-R-R-R-  
 G-M-L-K-G-Q-Q-S-E-V-T-G-V-K-I-H-A-Q-V-P-L-S-E-Q-M-F-G-Y-A-T-  
 Q-L-R-S-L-T-K-G-R-A-S-Y-T-M-E-F-L-K-Y-D-E-A-P-S-N-V-A-Q-A-V-  
 I-E-A-R-G-K

$X_n$  - 10-15 аминокислотных остатков.

\* A — Ala, B — Asx, C — Cys, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly,  
 H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln,  
 R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr, Z — Glx.

сток [5]. За фрагментом  $T_7$  располагается фрагмент  $T_4$  и, наконец, сле-  
 дует фрагмент  $T_5$ , представляющий собой С-концевую часть молекулы  
 EF-G.

Исследование структуры фрагментов  $T_5 - T_7$  оказалось достаточно  
 простым ввиду их сравнительно небольшого молекулярного веса. Молеку-  
 лярная масса фрагмента  $T_6$  равна 6500,  $T_7 - 7500$  и  $T_5 - 25\ 000$ . С по-  
 мощью традиционных химических и энзиматических методов расщепле-  
 ния полипептидной цепи были установлены полностью первичные струк-  
 туры фрагментов  $T_6$  [4],  $T_7$  [6, 7] и  $T_5$ , в сумме охватывающие свыше  
 350 аминокислотных остатков.

Ранее нами было показано [3], что все фрагменты ограниченного  
 трипсинолиза EF-G в качестве С-концевого аминокислотного остатка

имеют аргинин, в то время как С-концевым аминокислотным остатком фактора G является лизин. При изучении продуктов расщепления бромцианом целой молекулы EF-G был выделен пептид, имеющий последовательность, полностью аналогичную С-концевому бромциановому пептиду фрагмента T<sub>3</sub>, но отличающийся от последнего на два аминокислотных остатка с С-конца: Gly-Lys. На этом основании был сделан вывод, что при ограниченном трипсинолизе EF-G происходит отщепление С-концевого дипептида.

Для получения перекрытий между фрагментами ограниченного трипсинолиза и выяснения структуры фрагмента T<sub>4</sub>, представляющего собой среднюю часть полипептидной цепи белка с M 41 000, исследовались продукты бромцианового расщепления целой молекулы EF-G. В результате были выделены все 24 бромциановых пептида, в том числе 13 пептидов, составляющих структуру фрагмента T<sub>4</sub><sup>\*</sup>. Таким образом, исследование структуры фрагмента T<sub>4</sub> свелось к выяснению аминокислотной последовательности 13 бромциановых пептидов и нахождению перекрытий между ними. Для получения перекрывающихся пептидов был использован гидролиз фрагмента T<sub>4</sub> трипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой.

Приведенные данные позволили представить частичную структуру фактора элонгации G. Его полипептидная цепь содержит свыше 700 аминокислотных остатков (схема).

Отдельные участки полученной аминокислотной последовательности недавно были подтверждены при изучении нуклеотидной последовательности гена, кодирующего EF-G. В частности, при изучении *str*-оперона *E. coli* была установлена нуклеотидная последовательность, соответствующая 92 аминокислотным остаткам с N-конца EF-G [8], а при выяснении нуклеотидной последовательности гена *tuf A*, кодирующего фактор элонгации Tu, была установлена структура участка гена *fus*, кодирующего С-концевую часть фактора EF-G из 20 аминокислотных остатков [9]. В обоих случаях наблюдается полное совпадение аминокислотных последовательностей, установленных прямым методом и выведенных на основании исследования структуры ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nishizuka Y., Lipmann F. Comparison of guanosine triphosphate split and polypeptide synthesis with a purified *E. coli* system.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 55, № 1, p. 212–219.
2. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. Limited trypsinolysis of native *Escherichia coli* elongation factor G.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 17, p. 3922–3926.
3. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. Первичная структура фактора элонгации EF-G из *E. coli*. I. Характеристика фрагментов ограниченного трипсинолиза нативного EF-G.— Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1333–1345.
4. Мотуз Л. П., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б. Первичная структура фактора элонгации G из *Escherichia coli*. IV. N-концевая аминокислотная последовательность, включающая GTP-связывающий участок.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 814–827.
5. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. The GTP-binding center of elongation factor G is located in its N-terminal domain.— FEBS Lett., 1978, v. 85, № 2, p. 283–286.
6. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevics O. A., Ovchinnikov Yu. A. The primary structure of elongation factor G from *Escherichia coli*. Amino acid sequence of the region containing the GTP-binding center.— FEBS Lett., 1978, v. 85, № 2, p. 287–290.
7. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Первичная структура фактора элонгации G из *Escherichia coli*. II. Аминокислотная последовательность участка, содержащего GTP-связывающий центр.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301–1313.

\* Подробный анализ бромциановых пептидов будет опубликован в отдельном сообщении.

8. Post L. E., Nomura M. DNA sequences from the *str* operon of *Escherichia coli*.—  
J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 10, p. 4660–4666.
9. Yokota T., Sugisaki H., Takanami M., Kaziro Y. Препринт статьи «The Nucleotide  
Sequence of *E. coli* *tuf* A», 1980.

Поступила в редакцию  
21.1.1981

## STUDY ON THE PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR G FROM *E. COLI*

ALAKHOV Yu. B., MOTUZ L. P., DOVGAS N. V., VINOKUROV L. M.,  
BUNDULIS Yu. P., BUNDULE M. A., KOZLOV V. P., OVCHINNIKOV Yu. A.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

The primary structure of the elongation factor G (EF-G) from *E. coli* has been studied. The polypeptide chain of EF-G contains more than 700 amino acid residues. The analysis utilized a limited proteolysis which cleaved the molecule into four fragments with the molecular mass of 6500, 7500, 41 000 and 25 000. To align these fragments into one polypeptide chain the products of the cyanogen bromide cleavage of the EF-G were studied.