



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*

V. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА

Алахов Ю. Б., Винокуров Л. М., Довгас Н. В.,
Мотуз Л. И.*Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.*

Исследована аминокислотная последовательность С-концевого домена фактора элонгации G. Полипептидная цепь домена состоит из 228 аминокислотных остатков, не содержит остатков триптофана и цистеина. Для установления его структуры исследовались пептиды, полученные в результате гидролиза фрагмента стафилококковой глутаминовой протеиназой, бромцианового расщепления и триптического гидролиза фрагмента, модифицированного малеиновым ангидридом, а также пептиды, полученные после гидролизиров бромциановых пептидов химотрипсином, термолизином и трипсином.

Ранее было показано, что мягкий протеолитический гидролиз фактора элонгации G приводит к образованию ограниченного количества фрагментов 2—4 (см. рис. 1). Образующиеся при гидролизе фрагменты T₂ и T₅ полностью охватывают молекулу G-фактора: фрагмент T₂ с M_r 56 000 является его N-концевой частью, а фрагмент T₅ с M_r 25 000 — С-концевой частью. В терминах общей упаковки полипептидной цепи эти фрагменты представляют собой индивидуальные структурные единицы или домены молекулы G-фактора [5]. При модификации тирозиновых остатков в G-факторе [6] тетранитрометаном и подом был сделан вывод, что С-концевой домен содержит участок, взаимодействующий с рибосомой.

Методом поляризационной флуоресценции показано [7], что релаксационные свойства двух остатков триптофана, расположенных на поверхности в N-концевом домене T₂, существенным образом зависят как от присутствия С-концевого домена, так и от связывания нуклеотидов в нуклеотидсвязывающем участке, расположенном во фрагменте T₂. Сделано предположение, что при взаимодействии G-фактора с GTP его N- и С-концевые части образуют общий участок, взаимодействующий с рибосомой, который исчезает после гидролиза GTP в составе комплекса EF-G·GTP·рибосома, в результате чего фактор теряет сродство к рибосоме.

В настоящей статье представлены результаты исследования первичной структуры фрагмента T₅, полипептидная цепь которого содержит 228 аминокислотных остатков и не содержит остатков триптофана и цистеина. G-фактор и фрагмент T₅ были выделены по методу, описанному в сообщении [2]. Белок и фрагмент были гомогенны по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и по определению N-концевой аминокислотной последовательности. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия фрагмент T₅ имеет M_r 25 000, его аминокислотный состав приведен в табл. 1.

N-концевая аминокислотная последовательность фрагмента T₅ была определена на жидкофазном секвенаторе до положения 32 (см. рис. 2). С помощью карбоксипептидаз А и В найдено, что С-концевым остатком фрагмента является аргинин.

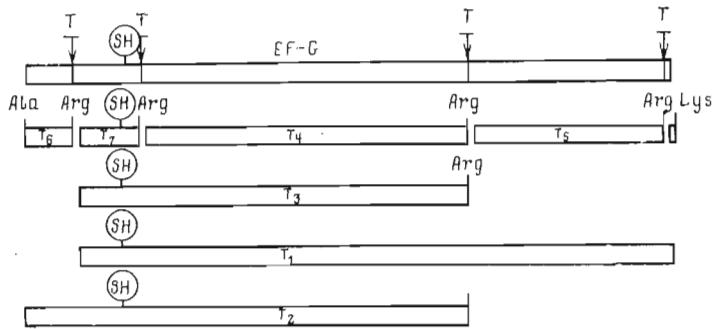


Рис. 1. Расположение фрагментов, полученных при ограниченном трипсинолизе в полипептидной цепи G-фактора

По данным аминокислотного анализа, фрагмент содержит 6 остатков метионина (см. табл. 1), поэтому в качестве основного метода расщепления был выбран бромциановый.

Поскольку фрагмент T_5 имеет M_r 25 000, предположили, что пептиды бромцианового расщепления будут в основном достаточно велики, чтобы можно было широко использовать автоматический метод для установления их структуры и, таким образом, за сравнительно короткое время получить основную информацию о строении полипептидной цепи фрагмента.

Расщепление фрагмента бромцианом проводили в стандартных условиях. Полученная смесь пептидов была малеинирована и подвергнута гель-фильтрации на колонке с биогеом P-10. Всего было получено 8 единичных фракций, которые далее обессоливались на колонке с сефадексом G-25. Из каждой фракции отбирали пробы, в которых удаляли малеинильные защитные группы и определяли N-концевые аминокислотные остатки. Оказалось, что только одна фракция содержала чистый пептид CBV-2. Первые фракции представляли собой смеси крупных фрагментов полипептидной цепи с не полностью расщепленными по остаткам

Таблица 1

Аминокислотный состав пептидов бромцианового расщепления фрагмента T_5

	T_5	CBV-1	CBV-2	CBV-3	CBV-4	CBV-5	CBV-6	CBV-7
Asp	18(16)	4,1(4)	5,2(5)	2,2(2)	2,8(3)			2,0(2)
Thr	9(8)	1,9(2)			1,8(2)	1,0(1)	2,9(3)	
Ser	12(12)	1,0(1)	1,2(1)	4,0(4)	0,9(1)	1,8(2)	2,0(2)	1,0(1)
Glu	33(32)	8,2(8)	6,2(6)	3,2(3)	4,2(4)	5,7(6)	1,2(1)	4,2(4)
Pro	14(13)	1,1(1)	6,7(7)	1,7(2)	0,8(1)	1,2(1)		1,1(1)
Gly	26(24)	6,0(6)	8,1(8)	3,4(3)	3,0(3)	2,2(2)	2,1(2)	
Ala	21(18)	3,0(3)	3,2(3)	5,2(5)		1,1(1)	2,1(2)	3,9(4)
Val	25(22)	6,6(7)	3,8(4)	3,1(3)	3,2(3)	3,1(3)		1,7(2)
Met/Hse	6(6)	* (1)	* (1)	* (1)	* (1)	* (1)	* (1)	
Pic	12(12)	1,9(2)	4,6(5)	2,1(2)	0,9(1)	1,1(1)		0,8(1)
Leu	16(14)		3,1(3)	4,6(5)	1,1(1)	2,1(2)	2,0(2)	1,1(1)
Tyr	9(10)	1,7(2)	3,7(4)	0,7(1)			1,7(2)	1,0(1)
Phe	7(8)	0,8(1)	1,1(1)	4,0(4)			1,0(1)	1,1(1)
His	5(5)	1,9(2)		1,7(2)		0,9(1)		
Lys	22(18)	4,0(4)	4,1(4)	4,6(5)	1,2(1)	2,0(2)	1,0(1)	1,0(1)
Arg	11(10)	3,0(3)		1,2(1)	3,2(3)		1,8(2)	1,0(1)
Количество остатков	(228)	(47)	(52)	(43)	(24)	(23)	(19)	(20)
N-Концевой аминокислотный остаток	Glu	Glu	Tyr	Gly	Lys	Leu	Phe	Glu

* Не определялся.

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ БРОМЦИАНОВОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ФРАГМЕНТА T₅

ШИФР ПЕПТИДА	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
CBV-1	<chem>GLU-PHE-ASN-VAL-GLU-ALA-ASN-VAL-GLY-LYS-PRO-GLN-VAL-ALA-TYR-ARG-GLU-THR-ILE-</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T2}}$
	<chem>ARG-GLN-LYS-VAL-THR-ASP-VAL-GLU-GLY-LYS-HIS-ALA-LYS-GLN-SER-GLY-GLY-ARG-GLY-</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T5}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T6}}$
	<chem>GLN-TYR-GLY-HIS-VAL-VAL-ILE-ASP-MET</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-T7}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-SP1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-SP2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-SP3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-1-SP4}}$
CBV-2	<chem>TYR-PRO-LEU-GLU-PRO-GLY-SER-ASN-PRO-LYS-GLY-TYR-GLU-PHE-ILE-ASN-ASP-ILE-LYS-</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T2}}$
	<chem>GLY-GLY-VAL-ILE-PRO-GLY-GLU-TYR-ILE-PRO-ALA-VAL-ASP-LYS-GLY-ILE-GLN-GLU-GLN-</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T4}}$
	<chem>LEU-LYS-ALA-GLY-PRO-LEU-ALA-GLY-TYR-PRO-VAL-VAL-ASP-MET</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T5}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-CH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-CH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-CH3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-CH4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-CH5}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-2-T5}}$
CBV-3	<chem>GLY-VAL-ARG-LEU-HIS-PHE-GLY-SER-TYR-LYS-ASP-VAL-ASP-SER-SER-GLU-LEU-ALA-PHE-</chem> <chem>HIS-LEU-ALA-ALA-SER-ILE-ALA-PHE-LYS-GLU-GLY-PHE-LYS-LYS-ALA-LYS-PRO-VAL-LEU-</chem> <chem>LEU-GLU-PRO-ILE-MET</chem>
CBV-4	<chem>LYS-VAL-GLU-VAL-GLU-THR-PRO-GLU-GLN-ASN-THR-GLY-ASP-VAL-ILE-GLY-ASP-LEU-SER-</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-4-CH1}}$
	<chem>ARG-ARG-ARG-GLY-MET</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-4-CH2}}$
CBV-5	<chem>LEU-LYS-GLY-GLN-GLN-SER-GLU-VAL-THR-GLY-VAL-LYS-ILE-HIS-ALA-GLN-VAL-PRO-LEU-</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T3}}$
	<chem>SER-GLU-GLN-MET</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T3}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-5-T3}}$
CBV-6	<chem>PHE-GLY-TYR-ALA-THR-GLN-LEU-ARG-SER-LEU-THR-LYS-GLY-ARG-ALA-SER-TYR-THR-MET</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH5}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH5}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH5}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH5}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH3}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH4}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-6-CH5}}$
CBV-7	<chem>GLU-PHE-LEU-LYS-TYR-ASP-GLU-ALA-PRO-SER-ASN-VAL-ALA-GLN-ALA-VAL-ILE-GLU-ALA-ARG</chem> $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH3}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH3}}$
	 $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH1}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH2}}$ $\overbrace{\hspace{10em}}^{\text{CBV-7-TH3}}$

* Т – пептиды триптического гидролиза; Ch – пептиды химотриптического гидролиза; Th – пептиды термолитического гидролиза. Остальные условные обозначения см. подпись к рис. 2.

метионина связями, остальные фракции содержали в основном по два пептида. Дальнейшее разделение фракций проводилось на колонке с QAE-сефадексом А-25. Таким образом, были выделены все 7 бромциановых пептидов (табл. 1 и 2).

Для разделения бромцианового гидролизата была также использована обратнoфазная хроматография (аналитический вариант) на колонке с лихросорбом RP-8 в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 3 и 4). Последний метод позволил выделить все пептиды, кроме пептида CBV-3, который в следовых количествах входил в состав нескольких фракций. При предварительной модификации смеси пептидов малеиновым ангидридом все пептиды, включая и CBV-3, были выделены в гомогенном виде за одну стадию (рис. 3).

Первичная характеристика пептидов (табл. 1) показала, что остатки метионина в полипептидной цепи фрагмента расположены сравнительно равномерно, так как полученные пептиды содержали от 20 до 50 аминокислотных остатков. Все пептиды, кроме CBV-3, были выделены в достаточном для исследования количестве. После выделения пептидов в чистом

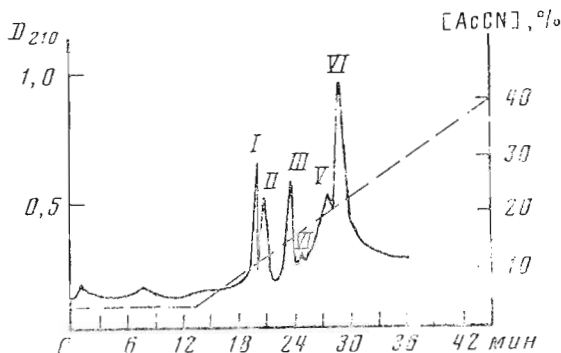


Рис. 3. Разделение продуктов расщепления бромцианом фрагмента T_5 на колонке «Lichrosorb» RP-18 ($4,6 \times 250$ мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (5–50%) в 10 мМ CH_3COONH_4 , pH 6,0. Скорость элюирования 1 мл/мин. Пик I соответствует пептиду CBV-4, II – CBV-5, III – CBV-7, IV – CBV-6, V – CBV-1, VI – CBV-2

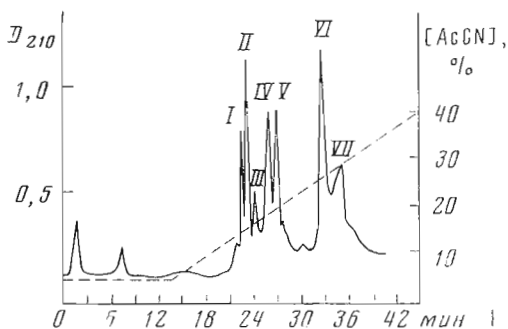


Рис. 4. Разделение малеинированных продуктов расщепления бромцианом фрагмента T_5 на колонке «Lichrosorb» RP-18. Условия аналогичны разделению на рис. 3. Пик I соответствует пептиду CBV-4, II – CBV-5, III – CBV-6, IV – CBV-7, V – CBV-1, VI – CBV-2, VII – CBV-3

виде с них были удалены малеинильные защитные группы и для каждого пептида была исследована N-концевая аминокислотная последовательность (автоматическим или ручным методом Эдмана) (табл. 2).

Использование автоматического метода Эдмана в случае пептида CBV-1 позволило установить последовательность 29 аминокислотных остатков. Для определения полной структуры пептида CBV-1 его гидролизвали трипсином (пептиды CBV-1-T) и стафилококковой глутаминовой протеиназой (пептиды CBV-1-SP); полученные продукты разделяли на пластинках с тонким слоем целлюлозы (для пептидов CBV-1-T см. рис. 5a). Структуру выделенных пептидов устанавливали ручным методом Эдмана (в дансильной модификации) (табл. 2). В сумме данные, полученные при изучении N-концевой аминокислотной последовательности фрагмента T_5 , а также исследование структуры триптических пептидов CBV-1 и пептидов, полученных после гидролиза CBV-1 стафилококковой глутаминовой протеиназой, позволили установить полную структуру пептида CBV-1 (см. табл. 2).

При определении N-концевой последовательности пептида CBV-2 на жидкофазном секвенаторе удалось идентифицировать только первые 12 остатков (табл. 2). Увеличение количества образца и изменение программы работы секвенатора не улучшили результатов. Во всех случаях пептид быстро вымывался из реактора. Поэтому пептид CBV-2 был подвергнут твердофазной автоматической деградации по Эдману на аминоэтиламинопропилстекле с использованием гомосеринлактонового метода присоединения к нерастворимой матрице. Однако при использовании стандартной программы работы секвенатора было обнаружено неспеци-

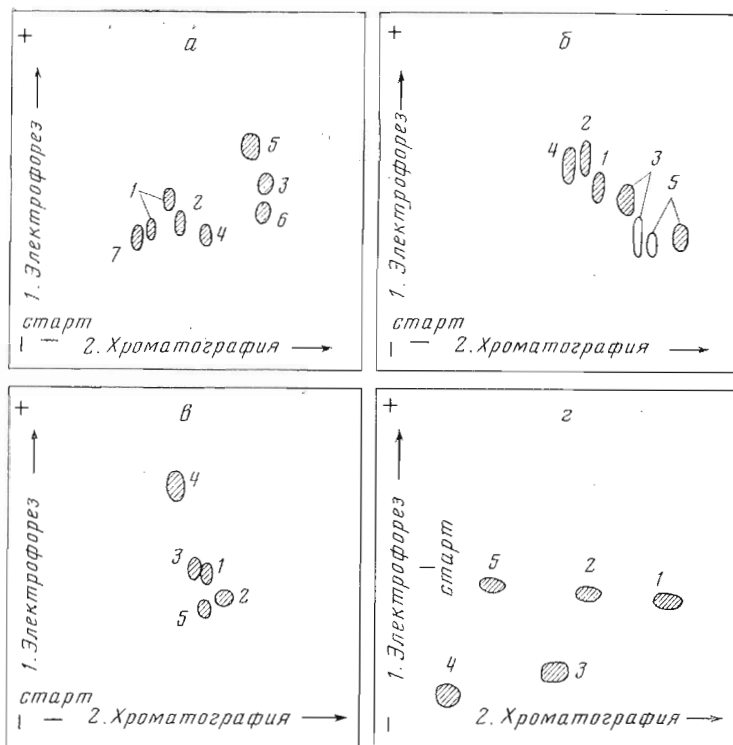


Рис. 5. Микропрепаративное разделение продуктов триптического гидролиза пептидов СВV-1 (а) и СВV-2 (б) и химотриптического гидролиза пептидов СВV-2 (в) и СВV-6 (г) методом пептидных карт на пластинках (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы. Электрофорез в буфере пиридин – уксусная кислота – вода (10 : 100 : 890), рН 3,6; 800 В, 1 ч (а); в буфере муравьиная кислота – уксусная кислота (20 : 80 : 900), рН 1,9; 800 В, 1 ч (б, в); в буфере 10% пиридин – уксусная кислота, рН 6,5; 800 В, 45 мин (г). Хроматография в системе *n*-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода (1 : 1 : 1 : 1), рН 5,4. Цифры обозначают номера соответствующих триптических и химотриптических пептидов

фическое расщепление пептида в процессе деградации. Оказалось, что расщепление обусловлено особенностями структуры пептида СВV-2 и происходит на стадии обработки трифторуксусной кислотой при недостаточном полном удалении воды из колонки. Увеличение времени промывки колонки дихлорэтаном в 2,5 раза по сравнению со стандартной программой позволило избежать гидролитического расщепления и установить последовательность до 25-го остатка (табл. 2). Для определения последовательности С-концевого участка пептид СВV-2 гидролизировали стафилококковой глутаминовой протеиназой и С-концевой пептид непосредственно в гидролизате избирательно связывали с аминоэтиламинопропилстеклом через гомосеринлактон и подвергали твердофазной деградации по Эдману (табл. 2).

Для подтверждения полученных данных и установления структуры неизвестных участков пептид СВV-2 гидролизировали трипсином (пептиды СВV-2-Т) и химотрипсином (пептиды СВV-2-Сh). Гидролизаты разделяли на пластинках с тонким слоем целлюлозы (рис. 5б, в). Структура выделенных пептидов устанавливалась ручным методом Эдмана (в дансилевой модификации) (табл. 2).

N-Концевая последовательность пептидов СВV-4, СВV-5 и СВV-6 была установлена ручным методом Эдмана до положений 21, 15 и 15 соответственно, а структура пептида СВV-7 была установлена полностью. Для определения полной структуры этих пептидов были проведены дополнительные ферментативные гидролизы. Пептид СВV-4 гидролизировался химотрипсином, гидролизат разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в аммиачной воде, рН 9,5. Продукты триптического гидролиза пептида

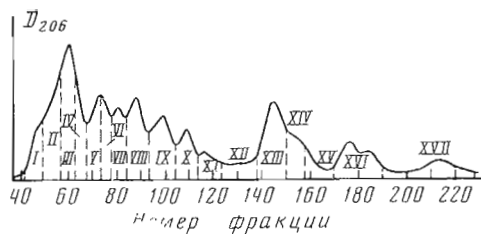


Рис. 6. Гель-фильтрация продуктов триптического гидролиза модифицированного фрагмента T_5 на колонке (2,5×180 см) с биогелем Р-10, уравновешенным буфером 20 мМ трис-НСl, рН 7,8, с 6 М мочевиной. Скорость элюирования 6 мл/ч, объем фракций 3 мл

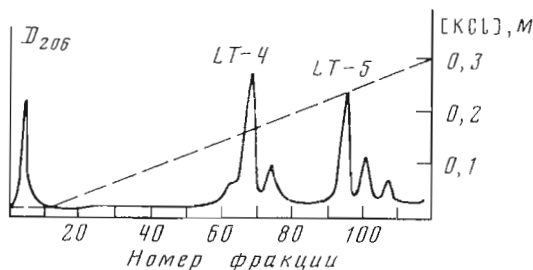


Рис. 7. Хроматография фракции II (рис. 6) на колонке с QAE-сефадексом А-25 (1×8 см), уравновешенной буфером 10 мМ трис-НСl, рН 7,8, с 6 М мочевиной, в градиенте концентрации KCl. Скорость элюирования 10 мл/ч, объем фракций 4 мл

CBV-5, химотриптического гидролиза пептида CBV-6 (рис. 5а) и термолитического гидролиза пептида CBV-7 разделяли на пластинках с тонким слоем целлюлозы. Структура выделенных пептидов устанавливалась ручным методом Эдмана.

В результате были установлены аминокислотные последовательности шести пептидов бромцианового расщепления фрагмента T_5 . Пептид CBV-3 во всех случаях выделялся с очень низким выходом, и поэтому его структура не была установлена полностью.

Из табл. 1 видно, что фрагмент T_5 содержит 10 остатков аргинина; три из них расположены в виде кластера в пептиде CBV-4 (табл. 2), один является С-концевым. Модифицированный фрагмент T_5 гидролизовали трипсином и смесь пептидов (без удаления малинильной защитной группы) разделяли на колонке с биогелем Р-10 (рис. 6). Объединенные фракции I—XVII обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в аммиачной воде, рН 9,5.

Все фракции, за исключением фракции VIII, содержащей чистый пептид LT-8, оказались неоднородными. Дальнейшее разделение фракций I—VII и IX проводили на колонке с QAE-сефадексом А-25. На рис. 7 для примера приведен профиль разделения фракции II, из которой были выделены два самых крупных триптических пептида — LT-4 и LT-5 (см. табл. 3). Малинильные защитные группы удалялись после выделения пептидов в чистом виде. Фракции X—XVI после снятия защитных групп разделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге при рН 3,6. В результате были выделены низкомолекулярные пептиды — LT-1, LT-2, LT-3, LT-4а и LT-7 (табл. 3). Пептиды LT-1 — LT-8 охватывали весь фрагмент, пептид LT-4а был получен в результате неспецифического расщепления связи Leu-Lys (положение 86—87, см. рис. 1). N-Концевая последовательность пептида LT-4 была установлена автоматическим методом на жидкофазном секвенаторе до положения 23, что позволило объединить пептиды CBV-1 и CBV-2. Пептид LT-4а объединил пептиды CBV-2 и CBV-3. N-Концевая последовательность пептида LT-5 была установлена

Пептиды ограниченного триптического гидролиза фрагмента T₅ *

Пептид	Аминокислотная последовательность	Число остатков **
LT-1	Glu-Phe-Asn-Val-Glu-Ala-Asn-Val-Gly-Lys-Pro-Gln-Val-Ala-Tyr-Arg	15(15)
LT-2	Glu-Thr-Ile-Arg	4(4)
LT-3	Gln-Lys-Val-Thr-Asp-Val-Glu-Gly-Lys-His-Ala-Lys-Gln-Ser-Gly-Gly-Arg	17(7)
LT-4	Gly-Gln-Tyr-Gly-His-Val-Val-Ile-Asp-Met-Tyr-Pro-Leu-Glu-Pro-Gly-Ser-Asn-Pro-Lys-Gly-Tyr-Glu-Phe-Ile-Asn-Asp-Ile-Lys-Gly-Gly-Val-Ile-Pro-Gly-Glu-Tyr-Ile-Pro-Ala-Val-Asp-Lys-Gly-Ile-Gln-Glu-Gln-Leu-Lys-Ala-Gly-Pro-Leu-Ala-Gly-Tyr-Pro-Val-Val-Asp-Met-Gly-Val-Arg	54(23)
LT-4a	Lys-Ala-Gly-Pro-Leu-Ala-Gly-Tyr-Pro-Val-Val-Asp-Met-Gly-Val-Arg	16(16)
LT-5	Leu-His-Phe-Gly-Ser-Tyr-Lys-Asp-Val-Asp-Ser- ←—————→ LT-5-Th1 Ser-Glu-Leu-Ala-Phe-Tis-Leu-Ala-Ala-Ser-Ile- ←—————→ ←—————→ LT-5-Th1 LT-5-Th2 Ala-Phe-Lys-Glu-Gly-Phe-Lys-Lys-Ala-Lys-Pro- ←—————→ LT-5-Th3 Val-Leu-Leu-Glu-Pro-Ile-Met-Lys-Val-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Glu-Gln-Asn-Thr-Gly-Asp-Val-Ile-Gly-Asp-Leu-Ser-Arg	60(27)
LT-6	Gly-Met-Leu-Lys-Gly-Gln-Gln-Ser-Glu-Val-Thr-Gly-Val-Lys-Ile-His-Ala-Gln-Val-Pro-Leu-Ser-Glu-Gln-Met-Phe-Gly-Tyr-Ala-Thr-Gln-Leu-Arg	33(10)
LT-7	Ser-Leu-Thr-Lys-Gly-Arg	6(6)
LT-8	Ala-Ser-Tyr-Thr-Met-Glu-Phe-Leu-Lys-Tyr-Asp-Glu-Ala-Pro-Ser-Asn-Val-Ala-Gln-Ala-Val-Ile-Glu-Ala-Arg	25(8)

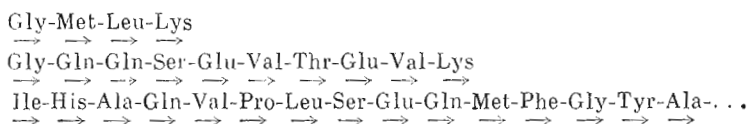
* → и — см. подпись к рис. 2.

** В скобках указано число аминокислотных остатков, определенных на целом фрагменте.

на твердофазном секвенаторе до положения 27 (использовался динитроцианатный метод связывания образца с носителем) (табл. 3). Для подтверждения полученных данных пептид LT-5 был гидролизован термолизином. Растворимая часть продуктов гидролиза разделялась на колонке с сульфополистирольным катионом Chromobeads (тип P). Выделенные пептиды LT-5-Th1, LT-5-Th2, LT-5-Th3 подтвердили данные, полученные автоматическим методом Эдмана; также были идентифицированы остатки в положениях 21 и 25 в пептиде LT-5 (см. табл. 3).

N-Концевая последовательность пептида LT-6 была установлена ручным методом Эдмана до положения 10 (см. табл. 3), что дало возможность объединить пептиды CBV-4 и CBV-5 (см. рис. 2). Из аминокислотного состава пептида LT-6 было известно, что он содержит два остатка метионина, два остатка лизина и один остаток аргинина, который по условиям гидролиза должен быть C-концевым. Зная структуру пептида CBV-5 и расположение лизиновых остатков (2 и 12, см. табл. 2), мы провели гидролиз пептида LT-6 трипсином и смесь пептидов без разделений

подвергли деградации ручным методом Эдмана.



Полученные результаты позволили объединить пептиды CBV-5 и CBV-6. N-Концевая последовательность пептида LT-8 была установлена ручным методом Эдмана до положения 8, что позволило соединить пептиды CBV-6 и CBV-7.

Из совокупности данных, полученных при исследовании продуктов двух типов гидролиза фрагмента T₅, оставалась невыясненной только последовательность участка полипептидной цепи в положении 130–142 (см. рис. 1).

Для получения недостающих данных и установления полной структуры фрагмент T₅ был гидролизован стафилококковой глутаминовой протеиназой. Гидролизат разделяли на колонке с биогеом P-10, объединенные фракции разделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге. В результате было выделено около 20 пептидов (пептиды SP) и установлена их структура (рис. 1). Аминокислотная последовательность пептида SP-6 была установлена на твердофазном сенсаторе (использовался диизотиоцианатный метод связывания образца с носителем). Следует отметить, что остатки в положениях 3, 4 и 6 в пептиде SP-6 были идентифицированы как фенилтиогидантоинлизин. Возможно, эти остатки лизина не связывались ковалентно с носителем из-за стерических затруднений. На 15-м цикле деградации с колонки был элюирован остаток пептида SP-6, уже не связанный с носителем и идентифицированный как Val-Glu, что дало возможность установить структуру пептида SP-6 полностью (см. схему).

Таким образом, исследование структуры пептидов, полученных в результате расщепления фрагмента T₅ или его фрагментов бромцианом, трипсином, стафилококковой глутаминовой протеиназой, химотрипсином и термолизинном, позволило установить полную аминокислотную последовательность C-концевого домена фактора элонгации G. Полипептидная цепь фрагмента состоит из 228 аминокислотных остатков и имеет точную молекулярную массу 25011,8.

Экспериментальная часть

В работе использованы сефадексы QAE A-25, G-25 (Pharmacia, Швеция); биогель P-10, катионообменная смола Chromobeads (тип P, Technicon, Ирландия), Lichrosorb, реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Bio-Rad Lab., США); трипсин, α -химотрипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США); термолизин, бромциан (Serva, ФРГ); стафилококковая глутаминовая протеиназа (Miles Lab., Англия); реактивы для автоматического метода Эдмана и фенилтиогидантоины аминокислот, флуорескамин (Pierce, США); пластинки с тонким слоем целлюлозы (Merck, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Аминокислотный анализ. Образец фрагмента или пептида (0,5–1 нмоль) гидролизовали в 40 мкл 5,7 н. HCl при 105° С 24, 48 или 72 ч. Ампулы заполняли азотом, вакуумировали и запаивали. Анализы после тщательного высушивания образцов проводили на анализаторе Durrum D-500 (Durrum Instrument Corp., США).

Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков. N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом [8]. Dns-производные аминокислот идентифицировались двумерной (тонкослойной) хроматографией на пластинках с силикагелем (5×5 см). C-Концевые аминокислоты определяли с помощью карбоксипептидаз А и В [9].

Расщепление фрагмента T₅ бромцианом. К раствору 50 мг (2 мкмоль) фрагмента в 5 мл 70% муравьиной кислоты добавляли 250 мг свежевозог-

нанного бромциана и оставляли на 24 ч в темном месте при 20° С. Затем реакционную смесь разбавляли водой до 50 мл и лиофильно высушивали. Полученную смесь пептидов малеинировали (см. ниже) и разделяли гель-фильтрацией на колонке с биогелем Р-10 в трис-НСl-буфере, рН 7,8, содержащем 6 М хлоридат гуанидина. Выделенные фракции обессоливали на колонке (1×100 см) с сефадексом G-25 в аммиачной воде. Фракции, содержащие смеси пептидов, разделяли на колонке с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,01 М трис-НСl-буфером, рН 8,0, содержащим 6 М мочевины в градиенте концентрации KCl (0,0–0,3 М).

Триптический гидролиз фрагмента T₅ после блокирования остатков лизина. Для защиты свободных аминокрупп 25 мг (1 мкмоль) фрагмента T₅ растворяли в 5 мл 0,5 М натрий-боратного буфера, рН 9,5, содержащего 7 М мочевины. К раствору добавляли порциями при перемешивании измельченный малеиновый ангидрид (30-кратный избыток в расчете на каждую аминокруппу). Реакцию проводили при 20° С в течение 1 ч, рН реакционной среды поддерживали в интервале 9,0–9,5 добавлением 2 М раствора NaOH [10]. После завершения реакции смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в аммиачной воде, рН 9,5, и лиофильно высушивали. Остаток растворяли в 5 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,1, и добавляли 0,5 мг трипсина двумя порциями. Раствор инкубировали при 37° С 6 ч и лиофильно высушивали. Первичное разделение смеси пептидов проводили на колонке с биогелем Р-10 (рис. 6). Полученные фракции разделяли на колонке с QAE-сефадексом А-25 (рис. 7) или высоковольтным электрофорезом (4500 В, 1,5 ч) на бумаге Whatman 3 ММ в буфере пиридин – СН₃СООН – Н₂О (10 : 100 : 890), рН 3,6.

Триптический гидролиз бромциановых пептидов. 80 нмоль соответствующего пептида растворяли в 0,2 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,1, добавляли трипсин (1 : 50) двумя порциями (через 2 ч), инкубировали при 37° С еще 4 ч и лиофилизировали.

Продукты триптического гидролиза разделяли на пластинках с тонким слоем целлюлозы (см., например, рис. 5а, б).

Гидролиз стафилококковой глутаминовой протеиназой. 25 мг (1 мкмоль) фрагмента T₅, 80 нмоль пептида СВV-1 или 100 нмоль пептида СВV-2 растворяли в 5 мл или 200 мкл 0,1 М NH₄НСО₃, рН 7,8, соответственно, добавляли протеиназу (1 : 50) и инкубировали при 37° С 20 ч. Гидролизат лиофильно высушивали.

Гидролизат фрагмента T₅ предварительно разделяли на колонке с био-гелем Р-10 в аммиачной воде, рН 9,5. Полученные фракции разделяли высоковольтным электрофорезом (4500 В, 1,5 ч) на бумаге в буфере пиридин – СН₃СООН – Н₂О (10 : 100 : 890), рН 3,6.

Пептиды, полученные при гидролизе пептида СВV-1, разделяли на пластинках (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы. В первом направлении проводили электрофорез (800 В, 45 мин) в буфере 10% пиридин-ацетат, рН 6,5; во втором направлении – хроматографию в системе *n*-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода (1 : 1 : 1 : 1), рН 5,4. Флуорескамин-положительные пятна элюировали 70% муравьиной кислотой.

С-Концевой фрагмент пептида СВV-2 непосредственно в гидролизате избирательно связывали аминоэтиламинопропилстеклом (через гомо-серинлактон) и подвергали твердофазной деградации по Эдману.

Гидролиз химотрипсином бромциановых пептидов. 70–80 нмоль пептида растворяли в 200 мкл 0,1 М NH₄НСО₃, рН 8,4, добавляли химотрипсин (1 : 100) и инкубировали 3 ч при 37° С. Лиофильно высушенные пептиды разделяли на пластинках с тонким слоем целлюлозы.

Гидролиз термוליзином пептидов СВV-7 и LT-5. 80–100 нмоль пептида в 200 мкл 0,1 М NH₄НСО₃, рН 8,1, инкубировали с термוליзином (1 : 100) при 37° С 1 ч и лиофильно высушивали.

Пептиды, полученные при гидролизе СВV-7, разделяли на пластинках с тонким слоем целлюлозы.

Растворимую часть продуктов гидролиза пептида LT-5 разделяли на колонке (0,6×40 см) с катионитом Chromobeads (тип Р) в градиенте концентрации пиридина в уксусной кислоте (0,1 М, рН 2,8–2,0 М, рН 5,5,

по 6 мл каждого раствора). Скорость элюирования 20 мл/ч, температура колонки 40° С. Детектирование пептидов в элюате проводили, измеряя флуоресценцию продуктов реакции с *o*-фталевым диальдегидом на проточном флуориметре (непрерывно отбиралась 1/20 часть элюата).

Установление аминокислотной последовательности в пептидах методом Эдмана (в дансильной модификации) проводили как описано в работе [10].

Определение аминокислотной последовательности автоматическим методом проводили на секвенаторе (модель 890 С, Beckman, США), используя диметилаллилзаминную программу, а также на твердофазном секвенаторе APS-240 (Rank-Hilger). Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали на жидкостном хроматографе высокого давления (Хьюлетт-Паккард 1080 А хроматограф) на колонке Spherisorb RP-18 (5 мкм) в натрий-фосфатном буфере с использованием метанолевого градиента, а также тонкослойной хроматографией на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fluka, Швейцария).

Для удаления малеинильной защиты образец инкубировали в 50% уксусной кислоте 24 ч при 37° С и обессоливали.

Выделение пептидов с пластинок тонким слоем целлюлозы. Пластинки тщательно высушивали, опрыскивали 5% раствором пиридина в ацетоне, затем 0,003% раствором флуорескамина в ацетоне. Целлюлозу с флуорескамин-положительными пятнами при облучении ультрафиолетовым светом при длине волны 365 нм переносили в полиэтиленовую ампулу и экстрагировали 3 раза 50% водным пиридином или 70% муравьиной кислотой. Экстракты высушивали, растворяли в 100 мкл воды, 10 мкл отбирали для аминокислотного анализа, остаток использовали для деградации по Эдману.

Авторы выражают благодарность руководителю работы академику Ю. А. Овчинникову за постоянную помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мотуз Л. П., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 814–827.
2. *Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 17, p. 3922–3926.
3. *Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1333–1345.
4. *Алахов Ю. Б., Стенгревиц О. А., Бундулис Ю. П., Мотуз Л. П., Винокуров Л. М.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 330–339.
5. *Alakhov Yu. B., Stengrevics O. A., Filimonov V. V., Venyaminov S. Yu.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, p. 585–591.
6. *Alakhov Yu. B., Zalite I. K., Kashparov I. A.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 105, p. 531–538.
7. *Кашпаров И. А., Семисогнов Г. В., Алахов Ю. Б.* Биохимия, 1981, т. 46, с. 1488–1498.
8. *Gray W. R.* In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. New York – London: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 124–138.
9. *Ambler R. P.* In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. New York – London: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 443–454.
10. *Butler P. J. G., Hartley B. S.* In: Methods in Enzymology / Ed. Hirs C. H. W. New York – London: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 191–199.
11. *Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301–1313.

Поступила в редакцию 19.VII.1982

PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR G FROM *ESCHERICHIA COLI*. V. AMINO ACID SEQUENCE OF THE C-TERMINAL DOMAIN

АЛАХОВ Ю. Б., ВИНОКУРОВ Л. М., DOVGAS N. V., МОТУЗ Л. П.

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

The amino acid sequence of the C-terminal domain of the elongation factor G (EF-G) has been studied. The polypeptide chain of the domain consists of 228 amino acid residues, and contains no tryptophan or cysteine residues. To determine its structure, the peptides obtained as a result of the fragment digestion by staphylococcal glutamic protease, cyanogen bromide cleavage, and tryptic hydrolysis of the fragment modified by maleic anhydride have been analyzed, as well as peptides obtained after hydrolyses of cyanogen bromide fragments with chymotrypsin, thermolysin and trypsin.