



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 9 * № 8 * 1983

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.31*273:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РИБОНУКЛЕАЗЫ C₂ *ASPERGILLUS CLAVATUS*

Безбородова С. И., Ходова О. М., Степанов В. М.

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

Рибонуклеаза C₂ *Aspergillus clavatus* является гуанилспецифичной РНКазой (КФ 3.1.27.3), родственной рибонуклеазе T₁ *Asp. oryzae* [1]. Недавно проведено кристаллографическое изучение пространственной структуры РНКазы C₂ с разрешением в 5 Å [2]. Для дальнейшего исследования фермента необходимо определение его первичной структуры.

РНКазу C₂ выделяли из фильтрата культуральной жидкости трехступенчатой культуры *Asp. clavatus* и очищали до гомогенного состояния, используя опубликованный ранее способ очистки [3] с некоторыми модификациями.

Фермент карбоксиметилировали после восстановления в 8 М мочевине или 8 М хлоргидрате гуанидина [4]. Избыток реагентов, денатурант и низкомолекулярные продукты реакции удаляли гель-фильтрацией или исчерпывающим диализом.

СМ-РНКазу гидролизовали трипсином (Serva, ФРГ) при 40° С 4 ч в 0,06 М ТЕАВ, pH 8,05, и отношении фермент — субстрат 1 : 25, затем гидролизат лиофильно высушили. Из трипсинового гидролизата выделили пептиды хроматографией на хромобедре при 37° С и на QAE-сепадексе А-50 при 20° С, а также ТСХ на целлюлозе в системе пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота, 10 : 15 : 12 : 3.

Аминокислотный состав белка и пептидов определяли на анализаторе Durrum D-500 после гидролиза в 5,7 н. HCl в течение 24 ч при 106° С.

С-Концевые аминокислоты анализировали с помощью карбоксипептидаз А, В, Y (Worthington, США; Олайне). N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом [5].

I	5	10	15
Asp-Cys-Asp-Tyr-Thr-Cys-Gly-Ser-His-Cys-Tyr-Ser-Ala-Ser-Ala-			
20	25	30	
-Val-Ser-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Gly-Tyr-Gln-Leu-Glu-Ser-Ala-Gly-			
35	40	45	
-Gln-Ser-Val-Gly-Arg-Ser-Arg-Tyr-Pro-His-Gln-Tyr-Arg-Asn-Tyr-			
50	55	60	
-Glu-Gly-Phe-Asn-Phe-Pro-Val-Ser-Gly-Asn-Tyr-Tyr-Glu-Trp-Pro-			
65	70	75	
-Ile-Leu-Ser-Ser-Gly-Ser-Thr-Tyr-Asn-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-			
80	85	90	
-Asp-Arg-Val-Val-Phe-Asn-Asp-Asn-Asp-Glu-Leu-Ala-Gly-Leu-Ile-			
95	100		
-Thr-His-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Asp-Gly-Phe-Val-Ala-Cys-Tyr			

Рис. 1. Аминокислотная последовательность РНКазы C₂

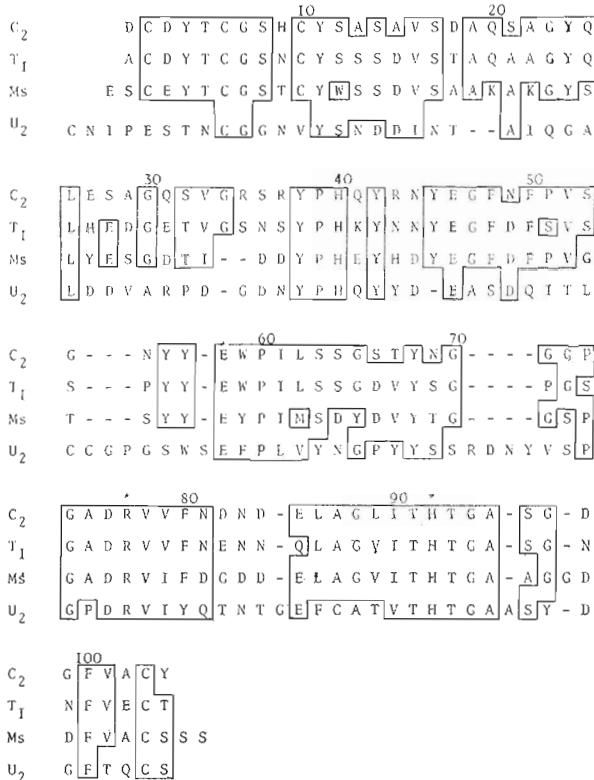


Рис. 2. Сравнение первичных структур РНКаз грибов. Гомологичные последовательности, включая консервативные замены, взяты в рамочки. Знаком «—» отмечены делеции, звездочкой — остатки аминокислот активного центра фермента

Последовательность 50 остатков СМ-РНКазы C_2 с N-конца определили автоматическим методом Эдмана на секвенаторе Beckman, модель 890 [6]. 34-членный пептид $Gly^{47}-Arg^{77}$ и C-концевой пептид $Val^{78}-Tyr^{104}$ в 27 остатков анализировали на том же приборе с полибреном [7].

На рис. 1 приведена полная аминокислотная последовательность РНКазы C_2 . Из сравнения последовательности аминокислот РНКазы C_2 с первичными структурами других рибонуклеаз грибов: гуанил-РНКазы T_1 , *Asp. oryzae* [8], неспецифичной РНКазы Ms *Asp. saitoi* [9] и пуринаспецифичной РНКазы U_2 *Ustilago spaerogena* [10] (рис. 2) — видно, что у рассматриваемых белков инвариантны все остатки цистеина (2, 6, 10, 103), фенилаланина (48, 50, 80, 100), большинство остатков тирозина (4, 11, 24, 38, 42, 45, 56, 57, 68), глицина (7, 23, 30, 47, 70, 74, 88, 94, 97) и ряд других остатков. Основная часть наблюдаемых замен химически нейтральна. Общая степень гомологии РНКаз аспергиллов превышает 70%, тогда как РНКаза U_2 имеет лишь $\sim 40\%$ гомологичных с ними участков. Наиболее консервативны аминокислотные последовательности, формирующие активные центры этих ферментов. Все сравнимые РНКазы принадлежат к одному семейству белков, вероятно включающему в себя и рибонуклеазы бактерий [11].

ЛИТЕРАТУРА

- Безбородова С. И., Безбородов А. М. В кн.: Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979, с. 92–130.
- Поляков К. М., Тищенко Г. И., Безбородова С. И. Вайштейн Б. Е. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 2, с. 342–346.
- Безбородова С. И., Белецкая О. П., Грищенко В. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 9, с. 1556–1566.
- Crestfield M., Moore S., Stein W. H. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622–627.
- Hartley B. C. Biochem. J., 1970, v. 119, № 5, p. 805–822.

6. Edman P., Begg G. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 1, p. 80–91.
7. Tarr G. E., Beecher J. F., Bell M., McKean D. J. Anal. Biochem., 1978, v. 84, № 2, p. 622–627.
8. Takahashi K. J. Biochem., 1971, v. 70, № 4, p. 617–634.
9. Watanabe H., Ohgi K., Irie M. J. Biochem., 1982, v. 91, № 5, p. 1495–1509.
10. Sato S., Uchida T. Biochem. J., 1975, v. 145, № 2, p. 353–360.
11. Mauguen Y., Hartley R. W., Dodson E. J., Dodson G. G., Bricogne G., Chotia S., Jack A. Nature, 1982, v. 297, № 5862, p. 162–164.

Поступила в редакцию
23.III.1983

PRIMARY STRUCTURE OF RIBONUCLEASE C₂ FROM *ASPERGILLUS CLAVATUS*

BEZBORODOVA S. I., KHODOVA O. M., STEPANOV V. M.

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

The complete amino acid sequence has been determined for RNase C₂, a guanyl specific ribonuclease of molecular mass about 11 000. A sequence comparison for RNase C₂ and low molecular weight RNases revealed that they belong to the same protein family.