



УДК 577.112.5:577.152.344.042:593.65

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ТРИПСИНОВОГО
ИНГИБИТОРА IV ИЗ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*Зыкова Т. А., Винокуров Л. М.*, Маркова Л. Ф.*,
Козловская Э. П., Еляков Г. Б.Тихоокеанский институт биоорганической химии
ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток;

* Институт белка Академии наук СССР, г. Пуццино-на-Оке

Исследована аминокислотная последовательность ингибитора IV трипсина, выделенного из актинии *Radianthus macrodactylus*. Полипептидная цепь ингибитора состоит из 56 аминокислотных остатков. В ней содержатся 6 остатков цистеина и отсутствует триптофан. Для установления его структуры исследовались пептиды, полученные в результате гидролиза ингибитора трипсином, химотрипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой.

При выделении токсинов из актинии *Anemonia sulcata* Вандерер с сотр. [1] обнаружили, что семь полипептидов являются ингибиторами протеолитической активности. Из актинии *Stoichactis sp.* Мебс и Швайер выделили три ингибитора трипсина и химотрипсина и исследовали их физико-химические свойства [2]. Эти полипептиды содержат 50–60 аминокислотных остатков, их молекулярная масса составляет 5500–6200. В молекулах этих токсинов отсутствует триптофан и содержатся 6 остатков цистеина, которые образуют три дисульфидные связи. В 1981 г. была установлена первичная структура ингибитора 511 из актинии *A. sulcata* [3], которая имеет большой процент гомологии со структурой ингибиторов змей и млекопитающих. Исследования первичных структур ингибиторов, выделенных из различных источников, играют важную роль, так как позволяют пайти структурные особенности, обуславливающие видовую специфичность биологического действия.

Данная работа посвящена установлению аминокислотной последовательности ингибитора трипсина — полипептида IV, полученного при выделении нейротоксинов из актинии *Radianthus macrodactylus*. Полипептидная цепь ингибитора IV (J_n -IV) состоит из 56 аминокислотных остатков, включая 6 остатков цистеина, что при отсутствии свободных сульфгидрильных групп свидетельствует о наличии трех дисульфидных связей. Токсин был гомогенным по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и по определению N-концевой аминокислотной последовательности. По данным гель-фильтрации на пластинке в тонком слое [4] сефадекса G-75 (сверхтонкий), молекулярная масса ингибитора равна 6000 ± 100 , его аминокислотный состав представлен в табл. 1. Константа ингибирования им трипсина составляет $1,0 \cdot 10^{-6}$ М.

Аминокислотный анализ карбоксиметилированного белка обнаружил наличие 6 остатков карбоксиметилцистеина (табл. 1). Нами установлено, что N-концевым аминокислотным остатком является глицин, а C-концевым — аланин. При секвенировании автоматическим твердофазным методом Эдмана определена последовательность 25 N-концевых аминокислотных остатков (схема 1).

Для получения отдельных фрагментов белок, содержащий по 3 остатка лизина и аргинина, был расщеплен трипсином. В результате разделения продуктов гидролиза обращенно-фазовой хроматографией на колонке Ultrasphere ODS было выделено 5 триптических пептидов (Т) (рис. 1). Структура пептидов Т-5 и Т-2 определена дансильным методом Эдмана.

Аминокислотный состав ингибитора J_n-IV и пептидов, полученных при его гидролизе трипсином (Т), химотрипсином (Ch) и стафилококковой глутаминовой протеиназой (Sp)

Аминокислота	J _n -IV	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	Ch-1	Ch-2	Ch-5	Ch-8	Sp-4
Cys (Cm)	5,7(6)	0,5(1)	0,5(1)		2,6(3)	0,5(1)	2,0(2)			1,7(2)	1,5(2)
Asp	2,6(3)			0,8(1)	2,4(2)			1,6(2)			
Thr	2,5(3)		0,5(1)	1,1(1)	1,0(1)		0,9(1)				
Ser	2,6(3)	1,2(2)		1,2(1)	1,4(1)		1,3(1)		0,7(1)		
Glu	3,7(4)	1,3(1)		1,0(1)	2,3(2)		1,3(1)		1,5(2)		
Pro	3,8(4)	0,7(1)	2,2(2)		1,4(1)		2,4(2)	1,4(1)			
Gly	5,7(6)	1,3(1)	0,5(1)	1,4(1)	3,4(3)		2,1(2)		1,4(1)		
Ala	3,6(4)		0,5(1)		1,4(1)	2,1(2)	0,95(1)			3,4(3)	3,3(3)
Val	2,8(3)		1,7(2)		0,7(1)		1,5(2)		1,4(1)		
Ile	2,7(3)	0,5(1)			1,0(1)	0,6(1)	0,9(1)			1,05(1)	1,0(1)
Leu	1,7(2)	0,8(1)			1,4(1)		0,8(1)		0,8(1)		1,2(1)
Tyr	3,6(4)		0,6(1)	0,9(1)	1,5(2)		0,7(1)		0,5(1)		
His	0,8(1)				1,4(1)					1,4(1)	1,2(1)
Phe	3,8(4)		0,9(1)	1,6(2)	1,1(1)			1,7(2)			
Lys	2,6(3)	0,5(1)		0,7(1)	0,75(1)		0,99(1)		0,9(1)		0,5(1)
Arg	2,7(3)		1,0(1)		0,5(1)	0,9(1)		0,6(1)		2,2(2)	1,8(2)
Всего остатков	56	8	11	9	23	5	16	4	10	9	11
N-Концевая	Gly	Gly	Val	Phe	Cys	Ala	Gly	Phe	Gly	His	Lys

Таблица 2

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при расщеплении ингибитора IV из *Radianthus macrodactylus* трипсином, химотрипсином и глутаминовой протеиназой

Пептид	Аминокислотная последовательность
T-1	Gly * - Ser - Ile - Cys - Leu - Glu - Pro - Lys → → → → → → →
T-2	Val - Val - Gly - Pro - Cys - Thr - Ala - Tyr - Phe - Pro - Arg → → → → → → → → → → →
T-3	Phe - Tyr - Phe - Asp - Ser - Glu - Thr - Gly - Lys → → → → → → →
T-4	Cys - Thr - Pro - Phe - Ile - Tyr - Gly - Gly - Cys - Glu - Gly - Asn - (Ser, Tyr, Val, Asp, Glu, Lys, Leu, His, Ala, Cys, Arg) → → → → → → → → → → → → →
T-5	Ala - Ile - Cys - Arg - Ala → → → → →
Ch-1	Gly - Ser - Ile - Cys - Leu - Glu → → → → → →
Ch-2	Phe - Pro - Arg - Phe → → → →
Ch-3	Phe * - Asp - Ser - Glu - Thr - Gly - Lys - Cys - Thr - Pro - Phe → → → → → → → → → → →
Ch-4	Ile - Tyr - Gly - Gly - Cys → → → → →
Ch-5	Glu * - Gly - Asn - Ser - Tyr - Val - Asp - Glu - Lys → → → → → → → →
Ch-6	Glu - Gly - Asn - Ser - Tyr → → → → →
Ch-8	His - Ala - Cys - Arg - Ala - Ile - Cys - Arg - Ala → → → → → → → →
Sp-4	Lys - Leu - His - Ala - Cys → → → → →

* Аминокислоты, определенные N-концевым дансильным методом.

Схема 1

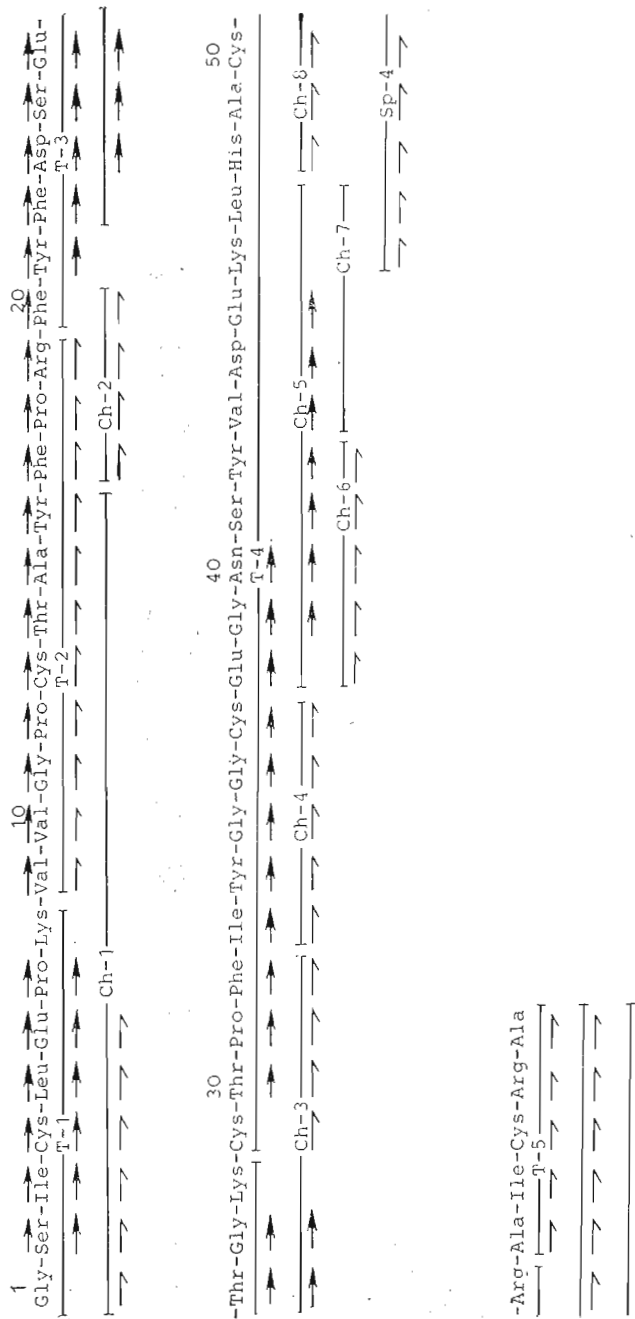


Схема 1. Аминокислотная по-
 следовательность трипсиново-
 го ингибитора I_n-IV. Здесь и
 далее последовательность
 аминокислот, определенная
 дансильным методом Эдмана
 (→) и автоматическим твер-
 дофазным методом Эдмана
 (⇨)

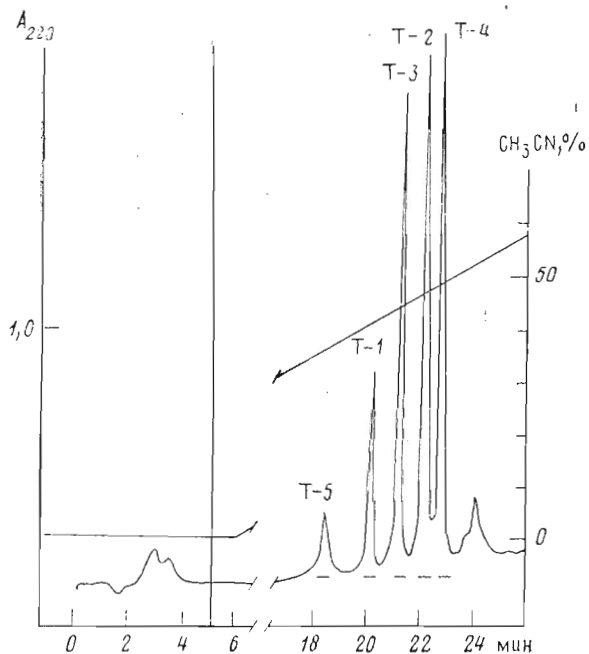


Рис. 1. Высокоэффективная жидкостная хроматография пептидов триптического гидролизата ингибитора J_n -IV на колонке Ultrasphere ODS (4,5×150 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0→64%, общий объем 24,2 мл) в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты. Скорость элюции 1,1 мл/мин. Отмечены границы объединения фракций

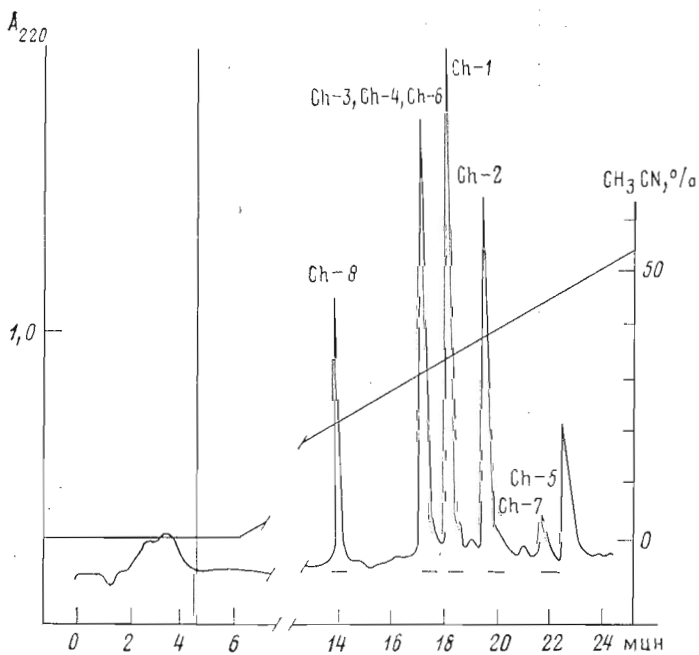


Рис. 2. Деление пептидов химотриптического гидролизата ингибитора J_n -IV (условия разделения см. рис. 1). Отмечены границы объединения фракций

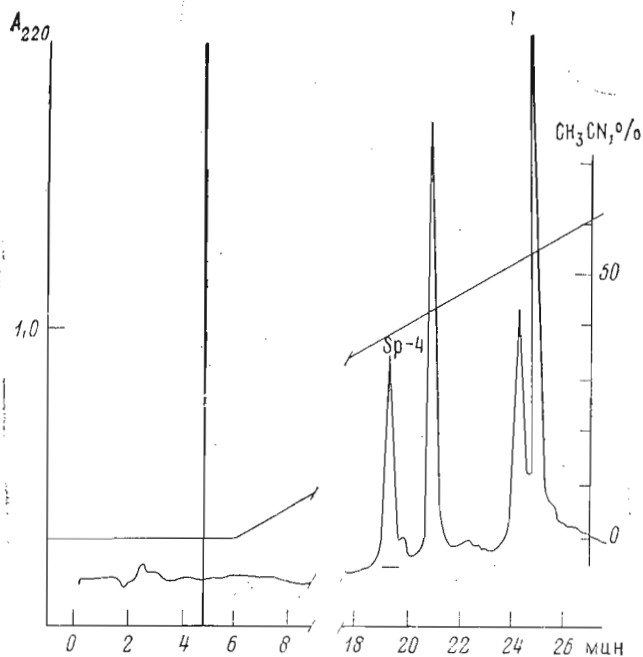


Рис. 3. Деление пептидов гидролизата ингибитора J_n -IV стафилококковой глутаминовой протеиназой (условия разделения см. рис. 1). Отмечены границы объединения фракции

Аминокислотная последовательность пептидов, содержащих остатки лизина, определялась автоматическим твердофазным методом Эдмана после их ковалентного связывания диизотиоцианатным методом с аминопропил-стеклом. Последовательность пептидов Т-1 и Т-3 определена полностью, а для пептида Т-4 определена последовательность 13 N-концевых аминокислот (табл. 2). Чтобы установить последовательности С-концевых участков триптического пептида Т-4 и самого ингибитора J_n -IV и подтвердить положение пептидов Т-3 и Т-4 в структуре, белок гидролизовали химотрипсином. При выделении химотриптических пептидов на колонке Ultrasphere ODS было получено 4 гомогенных пептида: Ch-1, Ch-2, Ch-5 и Ch-8 (рис. 2). Кроме того, была получена фракция, содержащая смесь пептидов Ch-3, Ch-4 и Ch-6, один из которых (Ch-3) был перекрывающим для пептидов Т-3 и Т-4. Пептиды данной фракции без разделения были ковалентно связаны с аминопропилстеклом. После отщепления первой аминокислоты по реакции Эдмана пептиды Ch-4 и Ch-6, не содержащие остатков лизина, были удалены с реакционной колонки трифторуксусной кислотой. N-Концевая последовательность связанного с аминопропилстеклом пептида Ch-3 до остатка лизина была определена автоматическим, а после остатка лизина — ручным методом Эдмана.

Структура химотриптического пептида Ch-5 определена на твердофазном секвенаторе APS-250, а пептидов Ch-1, Ch-2 и Ch-8 — ручным методом Эдмана в дансильном варианте. Химотриптический пептид Ch-7 выделен в следовых количествах, и структура его не определялась (см. схему 1).

Для получения перекрываний триптических пептидов Т-4 и Т-5, а также химотриптических пептидов Ch-5 и Ch-8 белок гидролизовали стафилококковой глутаминовой протеиназой. После разделения продуктов гидролиза получен пептид Sp-4 (рис. 3), аминокислотная последовательность которого была установлена ручным методом Эдмана в дансильном варианте.

Таким образом, в результате описанного выше исследования установлена полная аминокислотная последовательность ингибитора IV трипсина. Точная молекулярная масса белка равна 6165, его полипептидная цепь состоит из 56 аминокислотных остатков.

Схема 2

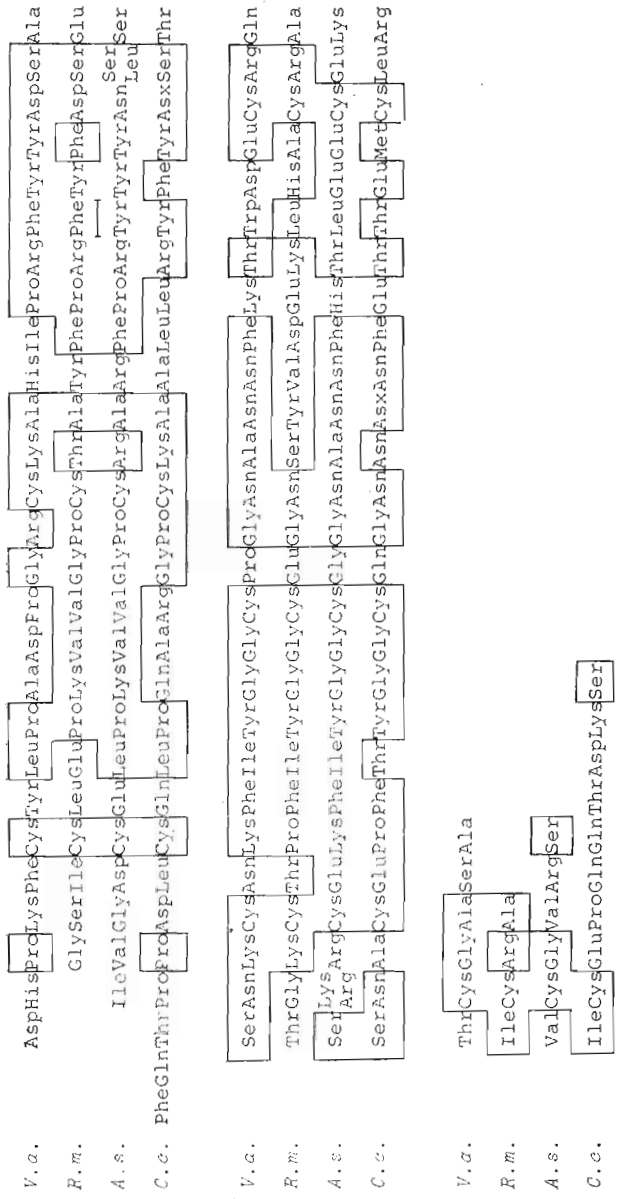


Схема 2. Аминокислотные последовательности ингибиторов актиний 511 *A. sulcata* (A. s.) и J_π-IV *R. macrodactylus* (R. m.), ингибитора I гадоки *Vipera am.* (V. a.) и ингибитора *Cow colostrum* (C. c.). В рамки взяты гомологичные последовательности

На схеме 2 приведены полные аминокислотные последовательности ингибиторов протеиназ из актиний *A. sulcata* и *R. macrodactylus*, из гадюки *Vipera ammodytes* [5] и трипсинового ингибитора из *Cow colostrum* [6]. Необходимо отметить высокую гомологию первичных структур между такими далекими типами, как кишечнополостные, пресмыкающиеся и млекопитающие. Видимо, в процессе эволюции структурные участки, отвечающие за ингибирующую активность данного класса соединений, практически не претерпевали каких-либо существенных изменений. Процент совпадения положений аминокислотных остатков для ингибиторов 511 и J_n -IV составляет 50%. Гомология ингибитора J_n -IV с ингибиторами высших классов животных такого же порядка. Размеры полипептидных звеньев между остатками цистеинов одинаковы. Размеры N- и C-концевых участков увеличиваются в ряду от ингибиторов кишечнополостных к ингибиторам млекопитающих, процент идентичных аминокислот в этих участках невелик. Видимо, эти части молекулы наименее консервативны.

Следует отметить большой процент гомологии (44%) участков 5—39 для ингибиторов 511 и J_n -IV из актиний. Ранее было показано, что структура участка 5—39 ингибитора 511 из *A. sulcata* имеет большой процент идентичных аминокислот с участком панкреатического бычьего ингибитора, ответственным за ингибирующую активность [7]. В свою очередь известно, что в активный центр ингибитора 511 входит один остаток аргинина [8]. Участок 5—39 у ингибитора J_n -IV содержит только один остаток аргинина, положение которого совпадает с положением одного из четырех остатков аргинина, входящих в соответствующий фрагмент ингибитора 511. Это положение аргинина также совпадает с положением аргинина в ингибиторах из *Vipera am.* и *Cow colostrum* (см. схему 2). На этом основании можно предположить, что остаток аргинина именно в этом положении является функционально важным для активности данного класса ингибиторов.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Worthington, США), химотрипсин (Worthington, США), стафилококковую протеиназу (Mannheim, Англия), реактивы для автоматического метода Эдмана (Beckman, США), β -меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), полихром I (г. Олайне, СССР). Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч. Выделение ингибитора IV проводили по методу [1].

Карбоксиметилирование белка [9]. 85 нмоль токсина растворяли в 3 мл 0,4 М трис-хлоридного буфера (pH 8,6), содержащего 8 М мочевины и 0,2 мМ EDTA. К полученному раствору добавляли 50 мкл β -меркаптоэтанол. Смесь оставляли на ночь в темноте при 18° С. Затем добавляли 280 мг моноодиуксусной кислоты в 1 н. растворе NaOH, выдерживали 30 мин (pH ~ 8,0), после чего белок обессоливали на затемненной колонке с полихромом I.

Аминокислотный анализ. Образцы белка или пептида (2,5—3 нмоль) гидролизovali 24 ч при 110° С в заполненных азотом ампулах 5,7 н. HCl (50 мкл). Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина. Содержание триптофана определяли после гидролиза с метансульфоновой кислотой [10].

N-Концевые аминокислоты определяли по методу [11]. Dns-производные аминокислот идентифицировали двумерной тонкослойной хроматографией на пластинках (5×5 см) с закрепленным силикагелем [12] или на полиамидных пластинках (3×3 см) [13].

Идентификацию амидов аспарагиновой аминокислоты проводили по методу [14].

C-Концевые аминокислотные остатки определяли с карбоксипептидазой Y по методу [15].

Аминокислотную последовательность в пептидах (5—10 нмоль) устанавливали методом Эдмана в дансильной модификации по стандартной методике [16, 17].

Автоматическое определение *N*-концевой последовательности осуществляли на твердофазном секвенаторе модели 240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное связывание белка (30 нмоль) и пептидов (5–20 нмоль) с носителем проводили диизотиоцианатным методом [18] через ϵ -аминогруппу лизина. Отщепленные фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали высокоэффективной хроматографией на хроматографе Hewlett-Packard 1084 А с колонкой Ultrasphere ODS (4,6×250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации метанола (33–55%) в 0,008 М калий-фосфатном буфере, рН 4,8.

Триптический гидролиз токсина. 35 нмоль белка растворяли в 0,3 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,0), добавляли трипсин (1:50) двумя порциями с интервалом в 4 ч, инкубировали при 37° С. Гидролиз останавливали ледяной уксусной кислотой (0,1 мл) и раствор замораживали. Пептиды разделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке Ultrasphere ODS (4,6×150 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0–64%) в 0,1% водной трифторуксусной кислоте, рН 2,2.

Гидролиз стафилококковой глутаминовой протеиназой. 20 нмоль белка растворяли в 0,2 мл 0,2 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,0, добавляли стафилококковую глутаминовую протеиназу (1:20), инкубировали 8 ч при 37° С. Гидролиз останавливали ледяной уксусной кислотой (0,1 мл) и раствор замораживали. Пептиды разделяли обращенно-фазовой хроматографией в условиях выделения триптических пептидов.

Свободные сульфгидрильные группы определяли по методу Элмана [19].

Определение дисульфидных связей проводили методом электролитического восстановления [20].

Химотриптический гидролиз осуществляли в условиях триптического гидролиза (см. выше).

Ингибиторную активность J_n -IV определяли по методу [21].

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института белка (г. Пушкино) д-ру хим. н. Ю. Б. Алахову за внимание к данной работе и А. И. Васину за определение аминокислотного состава белка и пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wunderer G., Beress L., Machleidt W., Fritz H. In: Methods in Enzymol./Ed. Lorand L. N. Y.—San Francisco—L.: Acad. Press, 1967, XLV, Part B, p. 881–888.
2. Mels D., Gebauer E. Toxicon, 1980, v. 18, № 1, p. 97–106.
3. Wunderer G., Machleidt W., Fritz H. In: Methods in Enzymol./Ed. Lorand L. N. Y.—L.: Acad. Press, 1981, v. 80, p. 816–820.
4. Andrews P. Biochem. J., 1965, v. 96, № 3, p. 595–606.
5. Riltonja A., Meloun B., Gubensek F. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 748, p. 429–435.
6. Cechova D. In: Methods in Enzymol./Ed. Lorand L. N. Y.—San Francisco.—L.: Acad. Press, 1976, XLV, Part B, p. 806–813.
7. Kassel B., Radicevic M., Ansfield M. I., Laskowski M. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1965, v. 18, № 2, p. 255–258.
8. Fritz H., Brey B., Beress L. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1972, B. 353, № 1, S. 19–30.
9. Crestjild A. M., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622–627.
10. Moore S. In: Chemistry and biology of peptides/Ed. Meienhofer J. Michigan: Ed. Ann. Arbor Publishers, 1972, p. 629–653.
11. Gray W. R. In: Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 129–151.
12. Беленький Б. Г., Ганкина Е. С., Нестеров В. В. Докл. АН СССР, 1967, т. 172, № 1, с. 91–93.
13. Woods K. R., Wang K. T. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 133, № 2, p. 369–370.
14. Roseau G., Pantel R. J. Chromatogr., 1969, v. 44, № 2, p. 392–395.
15. Hayashi R. In: Methods in Enzymol./Ed. Lorand L. N. Y.—San Francisco—L.: Acad. Press, 1967, XLV, Part B, p. 568–587.
16. Gray W. R., Hartley B. S. Biochem. J., 1963, v. 89, № 2, p. 379–380.
17. Bruton C. I., Hartley B. S. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 165–178.
18. Laursen R. H., Horn M. I., Bonner A. G. FEBS Lett., 1972, v. 21, № 1, p. 67–72.
19. Ellman G. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70–75.
20. Dohan I. S., Woodward G. E. J. Biol. Chem., 1939, v. 129, № 1, p. 393–403.

AMINO-ACID SEQUENCE OF TRYPSIN INHIBITOR IV FROM *RADIANTHUS*
MACRODACTYLUS

ZYKOVA T. A., VINOKUROV L. M.*, MARKOVA L. F.*,
KOZLOVSKAYA E. P., ELYAKOV G. B.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Center,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok;*
* *Institute
of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

Amino-acid sequence of trypsin inhibitor IV isolated from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* was determined. The polypeptide chain of the inhibitor consists of 56 amino acid residues. It contains 6 cysteine and no tryptophan residues. In order to establish the inhibitor structure, the peptide obtained after its digestion with trypsin, chymotrypsin, and staphylococcal protease were investigated.