



УДК 577.112.5:591.145.2-365

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НЕЙРОТОКСИНА III
ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*Зыкова Т. А., Винокуров Л. М.*, Козловская Э. П.,
Еляков Г. В.Тихоокеанский институт биоорганической химии
ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток;

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

Установлена аминокислотная последовательность нейротоксина III, выделенного из актинии *Radianthus macrodactylus*. Полипептидная цепь токсина состоит из 48 аминокислотных остатков, в состав которых входит остаток триптофана и шесть остатков цистеина. Для установления его структуры исследовались пептиды, полученные в результате гидролиза токсина трипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой.

В последнее десятилетие токсины из ядов различных животных получили широкое применение в биохимических и физиологических исследованиях. Нейротоксины, выделенные из морских актиний, привлекают особое внимание, поскольку обладают целым рядом преимуществ: их действие высокоспецифично и трудно обратимо, они имеют небольшую молекулярную массу, что облегчает определение их первичной структуры, относительно просто получить их фотоаффинные меченые производные.

Из актинии *Radianthus macrodactylus* выделены четыре нейротоксина (RTX-I — RTX-IV) [1], которые подобно полипептидам из *Anemonia sulcata* избирательно взаимодействуют с тетродочувствительными натриевыми каналами возбудимых мембран [1—3]. Нейротоксин III (RTX-III) замедляет и делает неполной инактивацию натриевого входящего тока, при этом практически не влияя на его активацию. Одним из первых шагов к выяснению механизма действия физиологически активного белка является определение его аминокислотной последовательности. А установление гомологичных структурных элементов среди аналогичных белков других видов актиний [4] может послужить ключом к выявлению наиболее тонких деталей механизма действия данного белка.

В настоящей статье представлены результаты исследования первичной структуры нейротоксина III, полипептидная цепь которого содержит 48 аминокислотных остатков. Белок 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, белок имеет молекулярную массу 5100 ± 100 [1], его аминокислотный состав представлен в табл. 1.

Методом электролитического восстановления с последующей идентификацией свободных SH-групп в белке определены шесть остатков цистеина. Однако после карбоксиметилирования по данным аминокислотного анализа в молекуле токсина обнаружено лишь пять остатков карбоксиметилцистеина, что свидетельствует либо о неполном восстановлении дисульфидных связей, либо о неполном карбоксиметилировании сульфгидрильных групп после восстановления. Дальнейшая работа проводилась на не полностью карбоксиметилированном белке.

N-Концевой аминокислотой в токсине является глицин. Наличие одного остатка триптофана определено после гидролиза полипептида метансульфоновой кислотой. Последовательность 27 N-концевых аминокислотных остатков и остатков в положениях 31, 33, 34 и 37 была установлена

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе RTX-III трипсином (Т) и стафилококковой глутаминовой протеиназой (Sp)

| Аминокислота | RTX-III | T-1 | T-1-2 | T-3 | T-3-1 | T-4 | Sp-3 | Sp-4 | Sp-5 |
|--------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Cys(Cm) | 4,7(5) | 0,6(1) | 1,7(2) | 1,4(1) | 2,8(3) | 1,8(2) | | 0,6(1) | 1,7(2) |
| Asp | 4,9(5) | 0,9(1) | 3,2(3) | 2,3(2) | 2,4(2) | | | | |
| Thr | 2,4(2) | | 2,4(2) | 1,9(2) | | | | | |
| Ser | 2,0(2) | | | 1,5(2) | 2,2(2) | | | 2,3(3) | |
| Glu | 4,3(4) | | 1,4(1) | 2,3(2) | 2,7(3) | 1,4(1) | 1,3(1) | 1,2(1) | |
| Pro | 2,7(3) | | 1,4(1) | 0,9(1) | 1,7(2) | 0,8(1) | | 1,0(1) | |
| Gly | 4,9(5) | 1,4(1) | 2,3(2) | 3,4(3) | 2,7(3) | | 1,1(1) | | |
| Ala | 2,9(3) | | 1,3(1) | 2,5(3) | 2,4(2) | | | 1,7(2) | |
| Val | 1,9(2) | | 1,0(1) | 1,0(1) | 0,5(1) | | | | |
| Ile | 0,9(1) | | | | 0,7(1) | 1,0(1) | | 1,3(1) | |
| Leu | 1,9(1) | | | 2,4(2) | 1,5(2) | | | | |
| Tyr | 4,6(5) | | 1,0(1) | 1,9(2) | 3,5(4) | 1,8(2) | | 2,1(2) | |
| Lys | 4,7(5) | 0,9(1) | 1,3(1) | 1,3(1) | 1,2(1) | 0,6(1) | | 1,1(1) | |
| Arg | 2,4(2) | | 1,3(1) | | 0,7(1) | 1,1(1) | | | 2,7(3) |
| Trp | (1) * | | (1) ** | | (1) ** | | (1) ** | | 0,9(1) |
| Всего остатков | 47 | 4 | 13 | 18 | 32 | 13 | 3 | 11 | 6 |
| N-Концевой остаток | Gly | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys | Gly | Lys | Cys |

* Определялся после гидролиза с метансульфоновой кислотой.

** Определялся по спектру флуоресценции.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при гидролизе RTX-III трипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой

| Пептид | Аминокислотная последовательность |
|--------|--|
| T-1 | Gly-Asn-Cys-Lys |
| T-1-2 | Gly-Asn-Cys-Lys-Cys-Asp-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Val-Arg |
| T-3 | Thr *-Ala-Pro-Leu-Thr-Gly-Tyr-Val-Asp-Leu-Gly-Tyr-Cys-(Asp ₁ , Glu ₂ , Gly ₁) **-Lys |
| T-3-1 | Thr *-Ala-Pro-Leu-Thr-Gly-Tyr-Val-Asp-Leu-Gly-Tyr-Cys-Asn-Glu-Gly-Trp-Glu-(Cys ₂ , Ser ₂ , Ala ₂ , Glu ₁ , Pro ₁ , Ile ₁ , Tyr ₂ , Arg ₁ , Lys ₂) ** |
| T-4 | Cys *-Ala-Ser-Tyr-Tyr-Ser-Pro-Ile-Ala-Glu-Cys-Cys-Arg-Lys |
| Sp-3 | Gly-Trp-Glu |
| Sp-4 | Lys-Cys-Ala-Ser-Tyr- |
| Sp-5 | Cys-Cys-Arg-Lys-Lys-Lys |

* Аминокислоты, определенные N-концевым дансильным методом.

** Данные аминокислотного анализа. Остальные обозначения см. в подписи к схеме 1.

на молекуле карбоксиметилированного токсина автоматическим твердофазным методом Эдмана после иммобилизации на аминопропилстекле *n*-фенилендизотиоцианатным методом (DITC) (схема 1).

По данным аминокислотного анализа, белок содержит два остатка аргинина и пять остатков лизина (табл. 1), поэтому в качестве основного метода расщепления был выбран триптический. Поскольку токсин III имеет M_r 5200 и содержит пять остатков лизина, предположили, что для

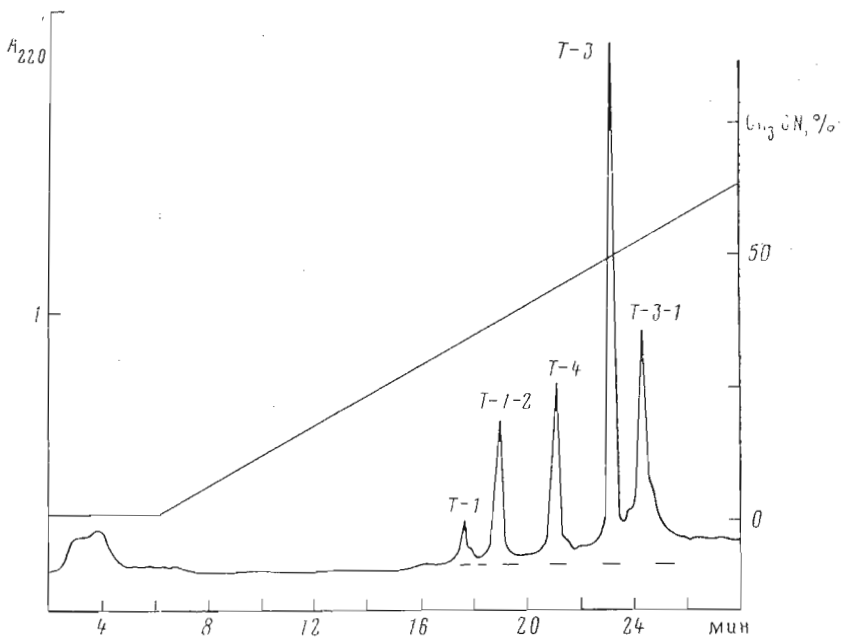


Рис. 1. Высокоэффективная жидкостная хроматография триптического гидролизата токсина RTX-III на колонке Ultrasphere ODS (4,6×150 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0–64%, общий объем 24,2 мл) в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 1,1 мл/мин. Отмечены отбираемые фракции

установления структуры его триптических пептидов можно широко использовать автоматический твердофазный метод, при котором пептид связывается с носителем через ϵ -аминогруппу лизина.

Расщепление токсина трипсином проведено в стандартных условиях. В результате разделения продуктов гидролиза обращенно-фазовой хроматографией на колонке Ultrasphere ODS было выделено пять гомогенных фракций (рис. 1), из которых отбирали пробы для определения N-концевого аминокислотного остатка и аминокислотного состава (табл. 1).

Первичная характеристика пептидов (табл. 1) показала, что все полученные фрагменты содержат остатки лизина. Все пептиды, кроме пептида Т-2, были выделены в достаточном для исследования количестве. Пептид Т-2 обнаружен в следовых количествах, и структура его не определялась. Аминокислотная последовательность остальных триптических пептидов определялась автоматическим или ручным методом Эдмана (табл. 2). Использование автоматического метода Эдмана в случае пептидов Т-3 и Т-4 позволило установить последовательность 13, а в случае пептида Т-3-1 — 18 аминокислотных остатков. Структура пептидов Т-1 и Т-1-2 установлена ручным методом Эдмана.

C-Концевой аминокислотой токсина является лизин. Попытки определения C-концевой аминокислотной последовательности с помощью карбоксипептидазы Y не дали положительного эффекта. Поскольку в C-концевой части молекулы токсина III находятся два остатка цистеина, а белок не полностью карбоксиметилирован, можно предположить, что наличие сульфгидрильных групп ингибирует карбоксипептидазную активность.

Для установления последовательности C-концевого участка токсина, а также для более надежного перекрытия пептидов Т-3 и Т-4 токсин был расщеплен стафилококковой глутаминовой протеиназой по остаткам глутаминовой кислоты. Половина полученного гидролизата разделена обращенно-фазовой хроматографией в условиях выделения триптических пептидов (рис. 2). После определения N-концевых аминокислотных остатков из всех полученных фракций были отобраны фракции, содержащие индивидуальные пептиды Sp-3 и Sp-4. Структура обоих пептидов была

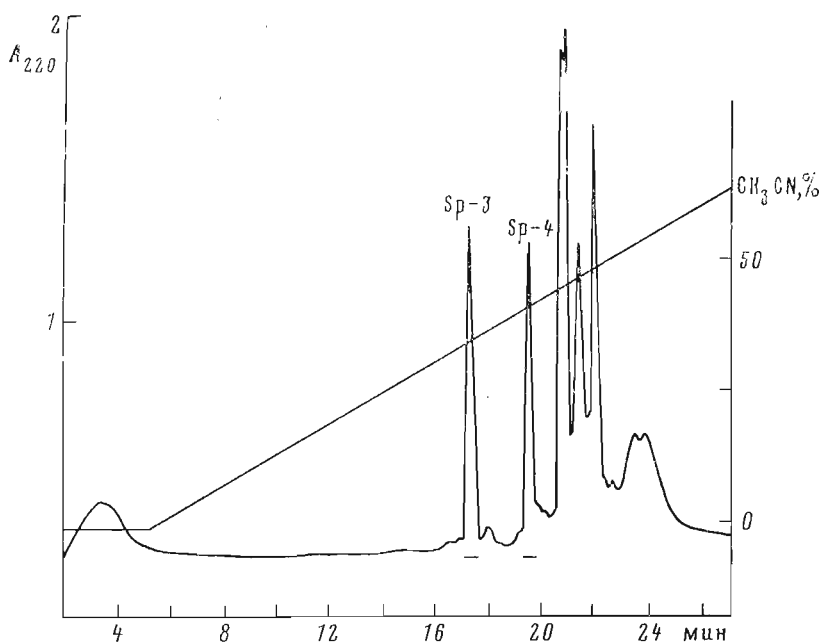


Рис. 2. Хроматография гидролизата RTX-III глутаминовой протеиназой (условия разделения см. рис. 1)

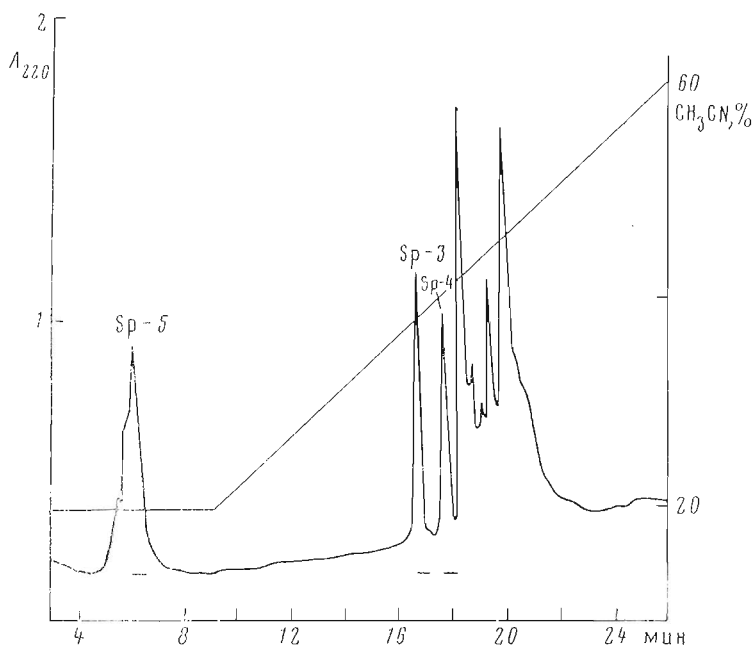


Рис. 3. Разделение гидролизата RTX-III глутаминовой протеиназой на колонке Ultrasphere ODS (4,6×150 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (20—60%, общий объем 17,6 мл) в 0,03 М ацетат-аммонийном буфере, pH 6,5. Скорость элюции 1,1 мл/мин. Отмечены отбираемые фракции

установлена ручным методом Эдмана (табл. 2). Наличие триптофана в пептиде Sp-3 было подтверждено данными флуоресценции.

Поскольку в указанных выше условиях С-концевой пептид выделен не был, вторая часть гидролизата разделена обращенно-фазовой хроматографией в аммоний-ацетатном буфере, pH 6,5 (рис. 3). Из всех полученных фракций отбирали пробы для определения N-концевых аминокислотных остатков. С-Концевой пептид Sp-5 был найден во фракции, вы-

Биологическая активность * токсинов из *A. sulcata*, *Ant. xanthogrammica* и *R. macrodactylus*

| АТХ-I | АТХ-II | АТХ-V | АР-С | АР-А | РТХ-III | РТХ-II |
|-------|--------|-------|------|------|---------|--------|
| 4000 | 100 | 19 | 8 | 66 | 2,5 | 1600 |

* Эксперименты на мышах. Приведена LD₅₀, мкг/кг.

ходящей сразу же за свободным объемом колонки. Так как данный пептид имеет большой заряд, он практически не сорбируется на колонке. Структура пептида Sp-5 была определена ручным методом Эдмана.

Таким образом, исследование структуры пептидов, полученных в результате расщепления токсина III трипсином и стафилококковой глутаминовой протеиназой, позволило установить его полную аминокислотную последовательность. Полипептидная цепь нейротоксина III состоит из 48 аминокислотных остатков и имеет точную молекулярную массу 5380.

Сопоставление аминокислотной последовательности токсина RTX-III (схема 2) с аминокислотными последовательностями нейротоксинов из других актиний (АТХ-I, АТХ-II, АТХ-V из *Anemonia sulcata*, АР-А и АР-С из *Anthopleura xanthogrammica*) показало, что, хотя степень гомологии токсина RTX-III с приведенными токсинами невелика (37–39%), в их строении имеется значительное сходство. Аналогично этим токсинам полипептид RTX-III имеет участки, построенные из гидрофобных аминокислот. Как и все известные токсины морских анемонов, он содержит шесть остатков цистеина, положения которых совпадают с положением цистеина в данных токсинах. В его состав также не входят такие аминокислоты, как метионин и фенилаланин. Подобно токсину АТХ-V молекула RTX-III не содержит остатков глутамина. Особо следует отметить аналогию в расположении аргинина в положении 13 и аспарагиновой кислоты в положении 7. Известно, что остаток аргинина в положении 14 важен как для связывания токсина АТХ-II с Na-каналами синапсомозга крысы, так и для проявления токсичности [5]; подобные результаты были получены и для нейропептида RTX-III [6]*.

Гомология структур токсинов из *A. sulcata* и *Ant. xanthogrammica* очень высока (65–95%), в то время как аминокислотная последовательность токсина RTX-III значительно отличается от них. Это различие, вероятно, и определяет его более высокую биологическую активность на мышах: активность RTX-III (LD₅₀ 2,5 мкг/кг) в 3 и 7,5 раза выше, чем у полипептидов АР-С и АТХ-V [7] соответственно. С другой стороны, активность RTX-II из *R. macrodactylus* (LD₅₀ 1600 мкг/кг) значительно ниже активности RTX-III, хотя они имеют близкий аминокислотный состав и высокий процент совпадения аминокислотных остатков в N-концевых частях полипептидов (табл. 3).

Таким образом, показана далекая гомология первичной структуры нейротоксина RTX-III, обладающего наиболее высокой биологической активностью на мышах, со структурами известных нейротоксинов из морских анемонов. Дальнейшее изучение первичной структуры нейротоксинов из *R. macrodactylus* и других анемонов позволит решить важные вопросы связи между структурой и функцией нейротоксинов, выделить структурные элементы, обуславливающие их специфическую активность.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Worthington, США), стафилококковую протеиназу (Mannheim, Англия), реактивы для автоматического метода Эдмана (Beckman, США), β-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), полихром I

* Ранее нейротоксин RTX-III как наиболее активный из четырех нейротоксинов, выделенных из *R. macrodactylus*, был обозначен нейротоксин-I.

Схема 2

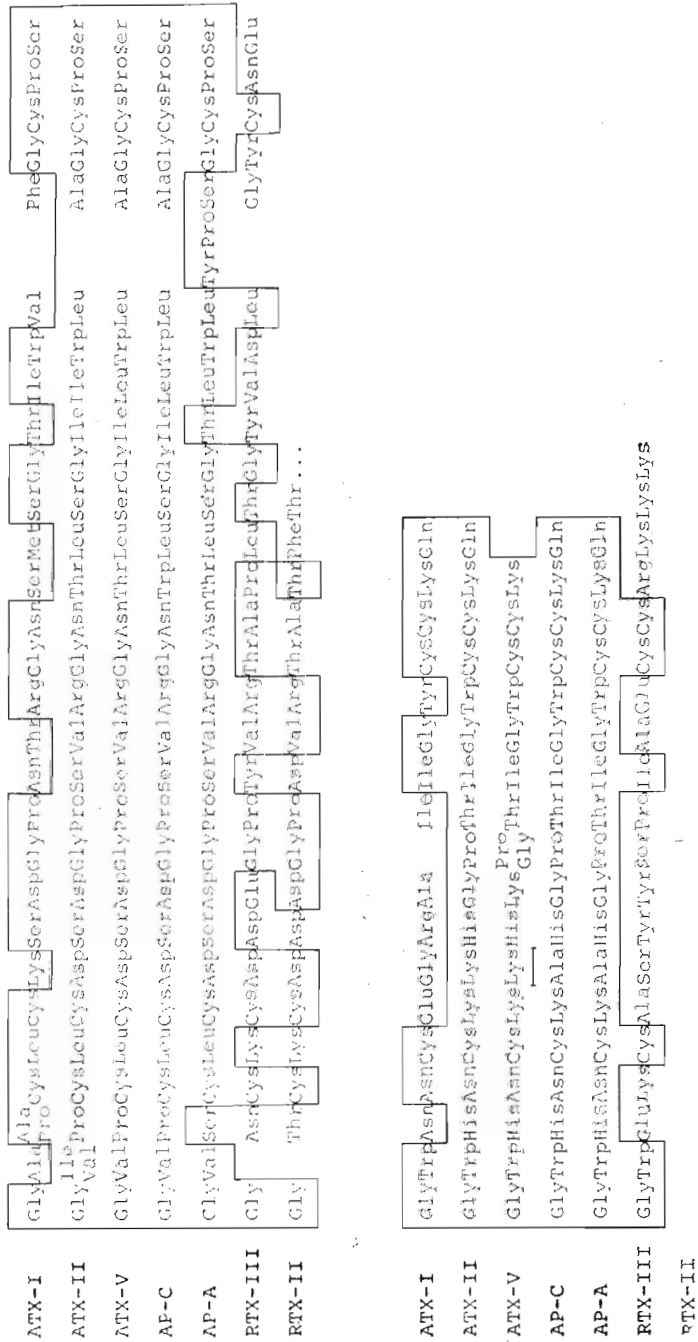


Схема 2. Первичная структура токсина RTX-I, ATX-II, ATX-V из *A. sulcata*, AP-C и AP-A из *Ant. xanthogrammica* [7] и RTX-III и частичная аминокислотная последовательность токсина RTX-II. В рамки взяты гомологичные участки

(г. Олайне, СССР). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Выделение токсина III проводили по методу [3].

Карбоксиметилирование белка [8]. 85 нмоль токсина растворяли в 3 мл 0,4 М трис-НСl-буфера, рН 8,6, содержащего 8 М мочевины и 0,2 мМ EDTA. К полученному раствору добавляли 50 мкл β-меркаптоэтанола. Смесь оставляли на 20 ч в темноте при 18°С. Затем добавляли 280 мг монохлоруксусной кислоты в 1 мл 1 н. NaOH, выдерживали 30 мин (рН~8,0) и обессоливали на затемненной колонке с полихромом I.

Аминокислотный анализ. Образцы белка или пептида (2,5–3 нмоль) гидролизовали 5,7 н. HCl (50 мкл) 24 ч при 110°С в ампулах, заполненных азотом. Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина. Триптофан определяли после гидролиза образца с метансульфоновой кислотой [9].

N-Концевые аминокислоты определяли по методу [10]. Dns-производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках (5×5 см) с закрепленным слоем силикагеля [11] или на полиамидных пластинках (3×3 см) [12].

Идентификацию амидов аспарагиновой аминокислоты проводили по методу [13].

C-Концевые аминокислотные остатки определяли карбоксипептидазой Y по методу, описанному в работе [14].

Установление аминокислотной последовательности пептидов (5–10 нмоль) ручным методом Эдмана (дансильная модификация) осуществляли по стандартной методике [15, 16].

Автоматическое определение N-концевой последовательности проводили на твердофазном секвенаторе модели APS-240 (Rank Hilger, Англия). Ковалентное связывание белка (30 нмоль) и пептидов (5–20 нмоль) с носителем осуществляли диизотиоцианатным методом [17] через ε-аминогруппу лизина. Отщепленные фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали высокоэффективной хроматографией на хроматографе Hewlett-Packard 1084 A с колонкой Ultrasphere ODS (4,6×250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации метанола (33–55%) в 0,008 М калийфосфатном 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) и 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% 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) и 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 (см. выше), а также в градиенте концентрации ацетонитрила (20–60%) в 0,03 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6,5, содержащем 20% ацетонитрила.

Определение свободных сульфгидрильных групп проводили по методу Элмана [18].

Содержание дисульфидных связей определяли методом электролитического восстановления [19].

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Zykova T. A., Monastyrnaja M. M., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B. Abst. IV USSR - FRG Symp. Chem. Pept. and Prot. Tubingen, 1982.
2. Bergman C., Dubois J. M., Rojas E., Rathmayer W. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 455, № 1, p. 173-184.
3. Romey G., Abila J. P., Schweitz H., Wunderer G., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 11, p. 4055-4059.
4. Scheffler J. J., Tsugita A., Linden G., Schweitz H., Lazdunski M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 107, № 1, p. 272-278.
5. Barhanin J., Hugues M., Schweitz H., Vincent J. P., Lazdunski M. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 11, p. 5764-5769.
6. Kozlovskaja E. P., Vozhova H. I., Elyakov G. B. Chem. Pept. Prot., 1982, v. 1, p. 279-387.
7. Schweitz H., Vincent J. P., Barhanin J., Frelin C., Linden G., Hugues M., Lazdunski M. Biochemistry, 1981, v. 20, № 18, p. 5245-5252.
8. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
9. Moore S. In: Chemistry and biology of peptides/Ed. Meinhofer G. Michigan: Ann. Arbor Publishers, 1972, p. 629-653.
10. Gray W. R. In: Methods in Enzymol./Ed. Hors C. H. W. N. Y.-London: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 139-151.
11. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Некрепов В. В. Докл. АН СССР, 1967, т. 172, № 1, с. 91-93.
12. Woods K. R., Wang K. T. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 133, № 2, p. 369-370.
13. Roseau G., Pantel R. J. Chromatogr., 1969, v. 44, № 2, p. 392-395.
14. Hayashi R. In: Methods in Enzymol./Ed. Lorand L. N. Y.-San Francisco - London: Acad. Press, 1967, v. 45, Part B, p. 568-587.
15. Gray W. R., Hartley B. S. Biochem. J., 1963, v. 89, № 2, p. 379-380.
16. Bruton C. J., Hartley B. S. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 165-178.
17. Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G. FEBS Lett., 1972, v. 21, № 1, p. 67.
18. Ellman G. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70.
19. Dohan J. S., Woodward G. E. J. Biol. Chem., 1939, v. 129, № 1, p. 393-403.

Поступила в редакцию
2.VII.1984

AMINO-ACID SEQUENCE OF NEUROTOXIN III FROM THE SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

ZYKOVA T. A., VINOKUROV L. M.*, 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 neurotoxin III isolated from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* was determined. The polypeptide chain of the toxin consists of 48 amino acid residues, among them one tryptophan and six cysteines. To establish the neurotoxin structure, the peptides obtained after its digestion by trypsin and staphylococcal proteinase were investigated.