



УДК 577.112.5

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА OSCP — БЕЛКА,
ПРИДАЮЩЕГО МИТОХОНДРИАЛЬНОМУ Н⁺-АТФ-АЗНОМУ
КОМПЛЕКСУ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ОЛИГОМИЦИНУ**

I. ТРИПТИЧЕСКИЕ И БРОМЦИАНОВЫЕ ПЕПТИДЫ

*Гринкевич В. А., Трубецкая О. Е., Чертова Е. Н.,
Муравьева Т. И., Алданова Н. А., Модянов Н. Н.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведено расщепление препарата OSCP* трипсином и бромцианом. Образовавшиеся смеси пептидов разделены на индивидуальные компоненты с помощью комбинации различных видов хроматографии, включающих в себя гель-фильтрацию, ионообменную, бумажную и высокоэффективную жидкостную хроматографию на обращенной фазе (ВЭЖХ). В результате были выделены 31 триптический пептид и 9 из 10 фрагментов бромцианового расщепления молекулы белка. На основании результатов, полученных при определении аминокислотной последовательности выделенных пептидов, установлен порядок расположения бромциановых фрагментов в полипептидной цепи, позволивший представить «архитектуру» молекулы белка в целом. При этом найдены перекрытия для 16 триптических пептидов в N-концевом блоке и 8 в C-концевой части молекулы.

Протонные аденозинтрифосфатазы бактерий, хлоропластов и митохондрий являются обратимыми протонными насосами, которые генерируют электрохимический градиент протонов ($\Delta\mu_{H^+}$) на мембранах или синтезируют АТФ, используя энергию этого градиента. Молекулы Н⁺-АТФ-азы состоят из двух секторов: периферического (F_1), катализирующего гидролиз и синтез АТФ, и мембранного (F_0), непосредственно участвующего в транслокации протонов через мембрану. Каждый из этих секторов имеет сложную структурную организацию. Пять субъединиц (α , β , γ , δ , ϵ) входят в состав F_1 . Сектор F_0 бактерий [1] образуют три субъединицы (a , b , c), в то время как мембранный сектор митохондрий содержит ряд дополнительных компонентов, одним из которых является белок, придающий АТФ-азному комплексу чувствительность к ингибитору — олигомицину (OSCP). Этот белок участвует в сопряжении F_1 и F_0 , приводящем к образованию полного, чувствительного к олигомицину АТФ-азного комплекса [2].

С целью выяснения локализации OSCP в комплексе и его взаимодействия с другими субъединицами в процессе функционирования фермента в качестве начального этапа исследования нами установлена аминокислотная последовательность OSCP из Н⁺-АТФ-азы митохондрий сердца быка [3]. Настоящее сообщение является первым из серии, посвященной детальному изложению отдельных этапов этой работы.

OSCP выделяли из митохондрий сердца быка по методике [4] с некоторыми модификациями на последней стадии очистки. Молекула белка состоит из одной полипептидной цепи, ее N-концевым аминокислотным остатком является фенилаланин. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, молекулярная масса белка равна 21 000 Да. Аминокислотный состав белка, рассчитанный на указанную молекулярную массу, приведен в табл. 1. Молекула OSCP содержит в сумме 30 остатков аргинина и лизина. Высокое содержание основных аминокислот сделало целесообразным в качестве перво-

* OSCP — oligomycin sensitivity conferring protein, или белок, придающий митохондриальному Н⁺-АТФ-азному комплексу чувствительность к олигомицину.

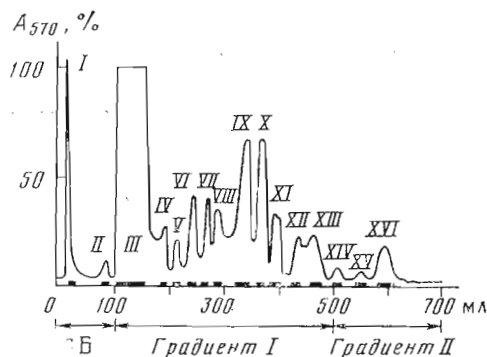


Рис. 1. Разделение пептидов триптического гидролизата карбоксиметилированного OSCP ионообменной хроматографией на колонке (0,6×60 см) с катионитом AG-50w×4. Состав стартового буфера (СБ) и градиентов I и II описан в «Экспер. части». Прямоугольниками на оси абсцисс здесь и на других рисунках обозначены границы объединения фракций

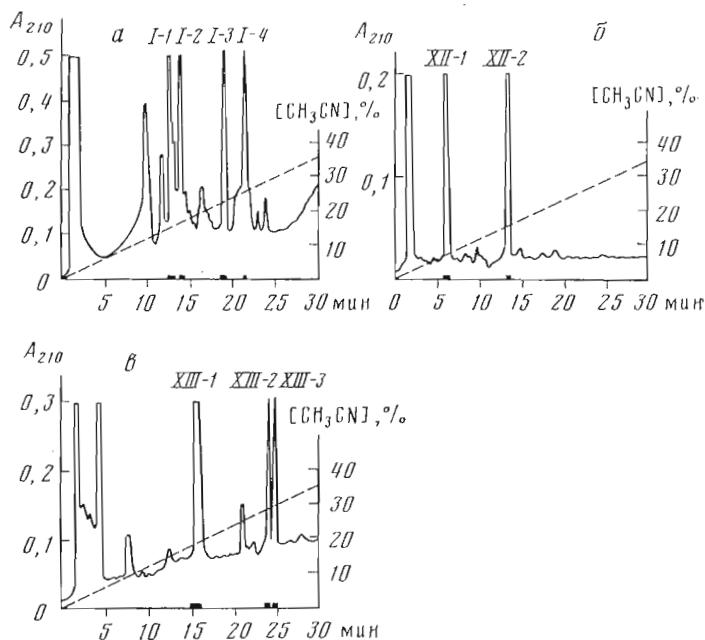


Рис. 2. Разделение фракций I (а), XII (б), XIII (в) триптического гидролизата (см. рис. 1) с помощью ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с носителем Silasorb C₁₈ в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ CH₃COONH₄. Скорость элюции 1 мл/мин. Здесь и далее пунктирная линия обозначает изменение концентрации ацетонитрила

го этапа исследования структуры проведение исчерпывающего гидролиза OSCP трипсином.

Первоначальное разделение гидролизата осуществлялось ионообменной хроматографией на катионите AG-50w×4 в градиенте концентрации и рН пиридин-ацетатного буфера (рис. 1). В результате было получено 16 объединенных фракций. Анализ с помощью хроматографии в тонком слое целлюлозы показал, что фракции II, III, XIV и XVI представляют собой индивидуальные пептиды, остальные содержат смесь двух и более фрагментов.

Индивидуальные пептиды из фракций IV, VI–VIII, X, XI, XV были получены с помощью препаративной нисходящей хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода (15 : 10 : 3 : 12). Для разделения фракций I, XII, XIII применялась ВЭЖХ на обращенной фазе (Silasorb C₁₈) (рис. 2), а в случае многокомпонентных

фракций V и IX были использованы оба метода. Так, хроматографией на бумаге из фракции V были получены три подфракции, две из которых (V-1, V-3) представляли собой гомогенные пептиды, а третья (V-2) состояла из смеси двух пептидов, которые удалось разделить при помощи ВЭЖХ. Аналогично из фракции IX были получены пять подфракций, одна из которых (IX-5) содержала два пептида; для ее разделения также использовалась ВЭЖХ.

Данные о распределении триптических пептидов по фракциям, их аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки приведены в табл. 2. Большинство пептидов сконцентрировано в четко разделяемых фракциях. Некоторые пептиды с идентичным аминокислотным составом были выделены из соседних фракций гидролизата. Выход идентичных по составу пептидов T-III и T-XI-2 в сравнительно далеко отстоящих друг от друга фракциях обусловлен частичным превращением N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту, а в случае пептидов T-VI-2 и

Таблица 1

Аминокислотный состав карбоксиметилированного OSCP

Аминокислота	Количество остатков	Аминокислота	Количество остатков
Cys(См)	0,81(1)	Met	6,62(7)
Asp	10,96(11)	Ile	10,64(11)
Thr	12,02(12)	Leu	22,72(23)
Ser	16,45(16)	Tyr	3,58(4)
Glu	20,32(20)	Phe	4,30(4)
Pro	7,86(8)	His	1,12(1)
Gly	10,43(10)	Lys	20,58(21)
Ala	14,92(15)	Arg	9,42(9)
Val	14,68(15)	Trp	—
Всего остатков	188		
N-Концевая	Phe		

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидов триптического гидролизата карбоксиметилированного OSCP

Аминокислота	T-I-1	T-I-2	T-I-3	T-I-4	T-II	T-III, T-IV-1, T-XI-2	T-IV-2, T-V-2-1	T-IV-3, T-V-3
Cys(См)	0,67(1)	—	—	—	—	—	—	—
Asp	1,29(1)	1,33(1)	1,30(1)	2,91(3)	—	1,08(1)	1,02(1)	1,03(1)
Thr	4,55(5)	—	1,86(2)	1,04(1)	—	—	0,98(1)	—
Ser	1,35(1)	1,28(1)	1,32(1)	2,08(2)	—	—	2,00(2)	0,81(1)
Glu	3,22(3)	—	—	1,31(1)	1,22(1)	3,63(4)	—	—
Pro	1,03(1)	1,21(1)	0,97(1)	0,92(1)	—	—	—	1,11(1)
Gly	1,21(1)	1,89(2)	—	1,22(1)	—	—	—	—
Ala	2,78(3)	—	1,86(2)	1,12(1)	—	—	1,02(1)	2,01(2)
Val	1,83(2)	0,89(1)	0,68(1)	—	—	1,02(1)	—	0,75(1)
Met	—	1,67(2)	—	—	—	—	0,56(1)	0,54(1)
Ile	—	2,66(3)	0,65(1)	1,12(1)	0,67(1)	—	—	—
Leu	2,75(3)	—	1,25(1)	4,15(4)	0,91(1)	0,98(1)	0,92(1)	2,07(2)
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	0,75(1)
Phe	—	—	1,06(1)	1,14(1)	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	0,96(1)	—	—	—	—	2,00(2)	0,90(1)	0,93(1)
Arg	—	0,86(1)	—	0,97(1)	—	—	—	—
Всего остатков	22	12	11	17	3	9	8	11
N-Концевая	Gly	Ile	Leu	Phe	Gln	Gln	Ser	Met

Таблица 2 (продолжение)

Амино-кислота	T-V-1	T-V-2-2	T-VI-1	T-VI-2, T-VIII-4	T-VII-1, T-VIII-3	T-VII-2	T-VIII-1	T-VIII-2, T-IX-3
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp	—	1,38(1)	—	1,25(1)	—	—	—	—
Thr	—	2,61(3)	—	—	—	—	—	—
Ser	—	3,28(3)	—	1,12(1)	—	—	—	—
Glu	3,20(3)	—	—	—	1,10(1)	0,99(1)	1,08(1)	1,02(1)
Pro	—	1,00(1)	—	—	—	—	0,98(1)	—
Gly	—	—	—	—	0,99(1)	1,04(1)	—	1,08(1)
Ala	—	2,07(2)	—	1,12(1)	—	—	—	—
Val	1,05(1)	1,61(2)	—	1,00(1)	1,10(1)	0,61(1)	—	—
Met	—	1,32(2)	—	0,62(1)	—	—	—	—
Ile	—	0,52(1)	—	—	—	0,65(1)	—	0,87(1)
Leu	0,85(1)	1,00(1)	—	—	0,96(1)	0,76(1)	—	—
Tyr	—	—	—	0,55(1)	—	—	—	—
Phe	—	1,02(1)	—	—	—	—	—	—
His	—	0,92(1)	—	—	—	—	—	—
Lys	1,00(1)	—	1,00(1)	0,90(1)	0,94(1)	0,98(1)	0,94(1)	1,03(1)
Arg	—	0,97(1)	—	—	—	—	—	—
Всего остатков	6	19	1	7	5	6	3	4
N-Концевая	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu	Ile

Амино-кислота	T-IX-1	T-IX-2	T-IX-4	T-IX-5-1	T-IX-5-2, T-X-4	T-X-1	T-X-2	T-X-3
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp	—	—	—	—	—	—	—	—
Thr	—	—	—	0,99(1)	0,86(1)	0,87(1)	—	—
Ser	—	—	—	—	1,81(2)	—	—	1,01(1)
Glu	1,01(1)	—	1,13(1)	—	—	—	1,04(1)	—
Pro	—	—	—	—	—	—	—	—
Gly	—	—	—	—	—	—	—	—
Ala	—	—	—	—	3,83(4)	—	—	—
Val	—	—	1,03(1)	1,10(1)	—	—	—	0,96(1)
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	—	—	—	0,85(1)	—
Leu	—	—	1,11(1)	1,00(1)	1,04(1)	—	—	—
Tyr	—	—	—	—	1,85(2)	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1,06(1)	—	0,96(1)	1,07(1)	1,00(1)	1,12(1)	1,11(1)	1,04(1)
Arg	—	1,00(1)	—	—	—	—	—	—
Всего остатков	2	1	4	4	11	2	3	3
N-Концевая	Glu	Arg	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Ser

T-VIII-4, T-XI-1 и T-XIV,— по-видимому, различной степенью окисления остатков метионина, входящих в их состав.

N-Концевая аминокислотная последовательность пептидов устанавливалась методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных производных (Dns) и фенилтиогидантоинов (Pth); второй вариант применялся при анализе пептидов, содержащих дикарбоновые аминокислоты и их амиды. С-Концевая последовательность белка и некоторых пептидов определялась с помощью карбоксипептидазы Y. В табл. 3 приведены триптические пептиды, строение которых было установлено этими методами.

Таблица 2 (окончание)

Аминокислота	T-XI-3	T-XI-4	T-XII-1	T-XII-2, T-XIII-2	T-XIII-1	T-XIII-3	T-XIV, T-XI-1	T-XV-1	T-XVI, T-XV-2
Cys(Cm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thr	—	—	—	—	—	—	—	1,05(1)	—
Ser	—	—	1,32(1)	—	—	1,23(1)	—	—	—
Glu	—	0,99(1)	—	2,12(2)	—	—	—	1,11(1)	2,19(2)
Pro	—	—	—	0,99(1)	—	—	—	—	1,68(2)
Gly	—	—	—	1,31(1)	—	—	—	—	2,25(2)
Ala	—	—	—	—	1,08(1)	—	1,05(1)	—	—
Val	0,96(1)	—	—	0,75(1)	—	—	—	—	1,65(2)
Met	—	—	—	—	—	—	0,61(1)	—	—
Ile	—	—	—	0,85(1)	—	—	—	1,03(1)	1,65(2)
Leu	—	2,00(2)	0,90(1)	0,95(1)	—	0,97(1)	—	—	0,78(1)
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—	0,56(1)
Phe	—	—	—	—	1,07(1)	1,05(1)	—	—	—
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1,04(1)	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	—	1,01(1)	0,98(1)	1,76(2)	0,98(1)	0,98(1)	—	2,11(2)	—
Всего остатков	2	4	3	9	3	4	3	5	14
N-Концевая	Val	Glu	Leu	Val	Phe	Ser	Ala	Thr	Leu

Таблица 3

Аминокислотная последовательность триптических пептидов OSCP

Пептиды	Аминокислотная последовательность
T-I-2	Ile-Asp-Pro-Ser-Ile-Met-Gly-Gly-Met-Ile-Val-Arg
T-I-3	Leu-Thr-Asn-Thr-Pro-Ala-Val-Ile-Ser-Ala-Phe
T-I-4	Phe-Ser-Pro-Leu-Thr-Ser-Asn-Leu-Ile-Asn-Leu-Leu-Ala-Glu-Asn-Gly-Arg
T-II	Gln-Ile-Leu
T-III	Gln-Asn-Lys-Leu-Glu-Gln-Val-Glu-Lys
T-IV-2	Ser-Leu-Ser-Asp-Met-Thr-Ala-Lys
T-IV-3	Met-Ala-Ala-Ser-Leu-Leu-Asn-Pro-Tyr-Val-Lys
T-V-1	Leu-Glu-Gln-Val-Glu-Lys
T-V-2-2	Leu-Thr-Asn-Thr-Pro-Ala-Val-Ile-Ser-Ala-Phe-(Thr, 2 Ser, Val, 2 Met, His)-Arg
T-VI-1	Lys
T-VI-2	Tyr-Val-Asp-Met-Ser-Ala-Lys
T-VII-1	Gly-Gln-Val-Leu-Lys
T-VII-2	Val-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys
T-VIII-1	Glu-Pro-Lys
T-VIII-2	Ile-Gly-Glu-Lys
T-IX-1	Glu-Lys
T-IX-2	Arg
T-IX-4	Leu-Glu-Val-Lys
T-IX-5-1	Thr-Val-Leu-Lys
T-IX-5-2	Tyr-Ala-Thr-Ala-Leu-Tyr-Ser-Ala-Ala-Ser-Lys
T-X-1	Thr-Lys
T-X-2	Ile-Gln-Lys
T-X-3	Ser-Val-Lys
T-XI-3	Val-Lys
T-XI-4	Glu-Leu-Leu-Arg
T-XII-1	Leu-Ser-Arg
T-XII-2	Val-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Glu-Pro-Lys
T-XIII-1	Phe-Ala-Lys
T-XIII-3	Ser-Phe-Leu-Lys
T-XIV	Ala-Met-Arg
T-XV-1	Thr-Lys-Ile-Gln-Lys
T-XVI	Leu-Val-Arg-Pro-Pro-Val-Gln-Ile-Tyr-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg

Определение аминокислотной последовательности пептида Т-1-1.

Методы анализа		Результаты анализа									
Жидкофазный секвенатор Дегградация по методу Эдмана смеси пептидов	Gly-Glu-Val-Pro-Cys(Cm)-Thr-Val-Thr-Thr-Ala-Ser-Ala-Leu-Asn-Glu-Ala-Thr-Leu-Thr Gly-Glu-Val-Pro-Cys(Cm)-Thr-Val										
		Ala-Thr-Leu-Thr-Glu-Leu-Lys									
Строение	Gly-Glu-Val-Pro-Cys(Cm)-Thr-Val-Thr-Thr-Ala-Ser-Ala-Leu-Asn-Glu-Ala-Thr-Leu-Thr-Glu-Leu-Lys										

Таблица 5

Аминокислота	Аминокислотный состав выделенных бромцановых пептидов OSCP *									
	B-II-1	B-II-2 (B-1)	B-III-1	B-III-2 (B-3)	B-IV-1	B-IV-2 (B-2)	B-V	B-VI-1	B-VI-2	
Asp	5,68(6)	1,21(1)	1,10(1)	3,84(4)	—	2,34(2)	1,01(1)	—	—	
Thr	4,66(5)	1,20(1)	0,94(1)	4,86(5)	1,06(1)	—	—	—	—	
Ser	8,30(8)	2,20(2)	2,25(2)	4,34(4)	2,24(2)	4,14(4)	—	—	—	
Hse	1,12(2)	0,46(1)	1,12(2)	0,56(1)	0,48(1)	0,52(1)	0,47(1)	0,42(1)	—	
Glu	2,03(2)	9,04(9)	2,31(2)	2,03(2)	1,39(1)	—	1,41(1)	—	1,27(1)	
Pro	2,80(3)	3,22(3)	—	1,71(2)	—	0,99(1)	—	—	—	
Gly	1,31(1)	3,32(3)	1,25(1)	1,40(1)	—	—	1,34(1)	2,34(2)	—	
Ala	5,81(6)	5,20(5)	2,05(2)	3,80(4)	2,23(2)	2,20(2)	—	—	—	
Val	3,65(4)	4,26(4)	1,83(2)	0,80(1)	—	3,01(3)	1,68(2)	—	—	
Ile	1,64(2)	2,58(3)	2,96(3)	1,94(2)	0,97(1)	—	1,87(2)	—	0,98(1)	
Leu	7,85(8)	6,28(6)	1,28(1)	4,65(5)	4,12(1)	3,00(3)	—	—	1,02(1)	
Tyr	0,98(1)	2,61(3)	0,56(1)	—	—	0,91(1)	0,44(1)	—	—	
Phe	1,73(2)	1,16(1)	—	1,70(2)	—	—	—	—	—	
His	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Lys	4,61(5)	6,11(6)	3,62(4)	1,97(2)	2,81(3)	2,82(3)	0,95(1)	—	—	
Arg	2,11(2)	3,24(3)	1,76(2)	0,91(1)	1,26(1)	0,97(1)	0,97(1)	—	0,95(1)	
Всего остатков	57	51	24	36	13	21	11	3	4	

N-Концевая	Ala	Phe	Ile	Thr	Ser	Ala	Ile	Gly	Arg

* В столбцах приведена маркировка пептидов в порядке расположения в полипептидной цепи.

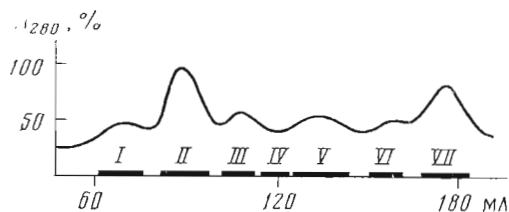


Рис. 3. Фракционирование смеси бромциановых пептидов OSCP на биогеле Р-10 в 30% НСООН. Колонка 1,5×100 см, скорость элюции 5 мл/ч

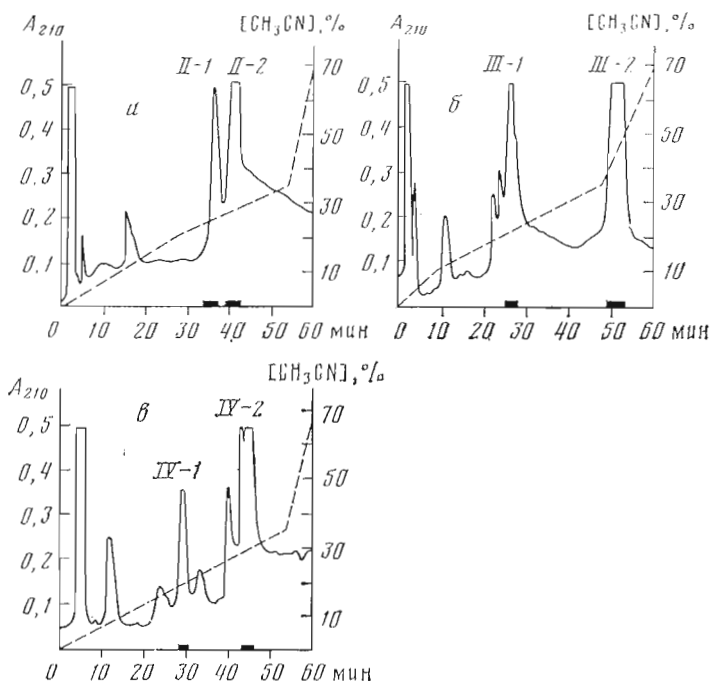


Рис. 4. Разделение фракций II (а), III (б), IV (в) бромцианового расщепления (см. рис. 3) с помощью ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с носителем Silasorb C₈ в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 2 мл/мин

Пептид Т-II не содержит остатков лизина и аргинина, и его С-концевой аминокислотой, так же как и целой молекулы белка, является лейцин. Отсюда было сделано заключение, что этот пептид занимает С-концевое положение в молекуле белка.

Пептид Т-V-2-2 из-за практически полного неспецифического расщепления трипсином связи Phe-X был выделен в незначительных количествах, что не позволило установить его полную аминокислотную последовательность. N-Концевому фрагменту этого пептида соответствует пептид Т-I-3, его С-концевой фрагмент не был выделен.

Данные по определению аминокислотной последовательности пептида Т-I-1 суммированы в табл. 4. Автоматической деградацией на жидкофазном секвенаторе была определена последовательность 19 аминокислотных остатков. Для установления полной структуры пептид Т-I-1 был подвергнут гидролизу протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Образовавшаяся смесь двух фрагментов анализировалась по методу Эдмана с идентификацией Dns- и Pth-производных, что позволило определить С-концевую последовательность пептида Т-I-1 и, таким образом, реконструировать его полную структуру.

В целом триптический гидролиз OSCP прошел достаточно специфично. Все пептиды, кроме Т-I-3 и Т-II, содержали в качестве С-концевых остат-

ков Arg и Lys. Выделенные триптические пептиды, за исключением продуктов неспецифического гидролиза и неполного расщепления некоторых связей (пептиды Т-III, Т-XII-2, Т-XV-1), содержат в общей сложности 190 аминокислотных остатков. Как показало последующее определение полной аминокислотной последовательности OSCP, из триптического гидролизата были выделены все пептиды, составляющие молекулу белка.

На следующем этапе изучения первичной структуры OSCP для нахождения перекрытий между триптическими пептидами было проведено расщепление молекулы белка на крупные фрагменты по остаткам метионина. Обработку восстановленного β-меркаптоэтанолом белка бромцианом осуществляли в 70% HCOOH в обычных условиях. Первоначально смесь образовавшихся фрагментов фракционировали на биогеле Р-10, при этом было получено семь объединенных фракций (рис. 3).

Фракция V, по данным N-концевого анализа, содержала гомогенный пептид В-V и дальнейшей очистки не требовала. Во фракции VII были идентифицированы свободные гомосерин и гомосеринлактон, что указывало на наличие в молекуле белка связи метионид — метионин. Для выделения пептидов из фракции VI использовали ВЭЖХ на обращенной фазе Silasorb C₁₈, а из фракций II—IV, содержащих сравнительно более вы-

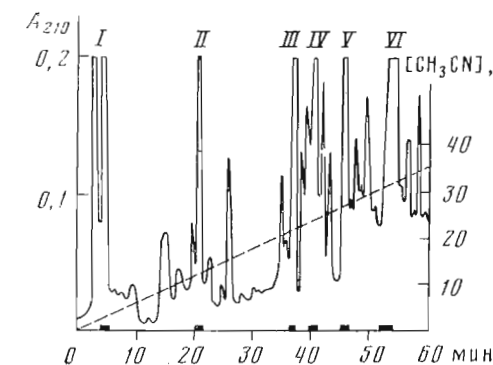


Рис. 5. Разделение продуктов расщепления фрагмента В-1 протеиназой из *St. aureus* при помощи ВЭЖХ. Условия разделения как на рис. 2

сокомолекулярные пептиды, — ВЭЖХ на колонке с носителем Silasorb C₈. На рис. 4 показано разделение указанных фракций. Фракция I содержала пераццеленный белок и агрегаты крупных фрагментов. Выделить гомогенные пептиды из этой фракции не удалось.

Распределение пептидов по фракциям, их аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки представлены в табл. 5.

Таблица 6

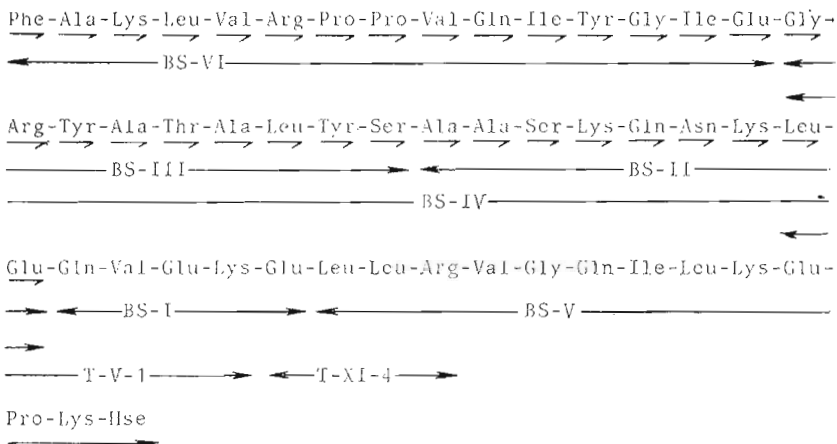
Аминокислотный состав пептидов, образовавшихся в результате расщепления фрагмента В-I протеиназой из *St. aureus*

Аминокислота	BS-I	BS-II	BS-III	BS-IV	BS-V	BS-VI
Asp	—	1,14(1)	—	1,20(1)	—	—
Thr	—	—	1,01(1)	1,11(1)	—	—
Ser	—	1,19(1)	1,15(1)	2,21(2)	—	—
Hse	—	—	—	—	0,56(1)	—
Glu	3,18(3)	1,75(2)	—	2,12(2)	2,14(2)	1,91(2)
Pro	—	—	—	—	1,09(1)	1,82(2)
Gly	—	—	1,20(1)	1,31(1)	1,21(1)	1,22(1)
Ala	—	2,04(2)	2,17(2)	3,96(4)	—	1,13(1)
Val	1,00(1)	—	—	—	0,89(1)	1,68(2)
Ile	—	—	—	—	0,97(1)	1,69(2)
Leu	—	0,78(1)	1,05(1)	1,76(2)	2,66(3)	1,13(1)
Tyr	—	—	1,45(2)	1,55(2)	—	0,63(1)
Phe	—	—	—	—	—	0,85(1)
His	—	—	—	—	—	—
Lys	1,07(1)	1,76(2)	—	1,72(2)	1,83(2)	0,91(1)
Arg	—	—	1,01(1)	1,10(1)	0,87(1)	1,01(1)
Всего остатков	5	9	9	18	13	15
N-Концевая	Gln	Ala	Gly	Gly	Leu	Phe

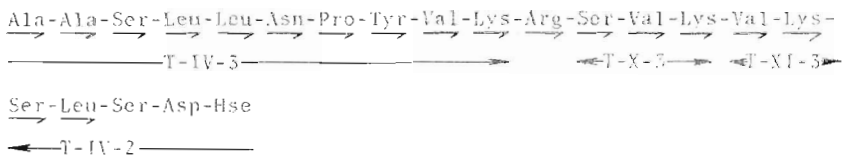
**Бромциановые пептиды, структура которых была установлена прямой
деградацией по методу Эдмана**

Пептиды	Аминокислотная последовательность
B-IV-1	Ser-Ala-Lys-Thr-Lys-Ile-Gln-Lys-Leu-Ser-Arg-Ala-Hse
B-V	Ile-Val-Arg-Ile-Gly-Glu-Lys-Tyr-Val-Asp-Hse
B-VI-1	Gly-Gly-Hse
B-VI-2	Arg-Gln-Ile-Leu

При автоматической деградации молекулы OSCP была установлена последовательность 33 аминокислотных остатков. Определение N-концевой последовательности пептида B-II-2 показало, что он является N-концевым в молекуле белка (B-1) *. Для получения недостающей информации фрагмент B-1 был подвергнут гидролизу протеиназой из *St. aureus* в стандартных условиях. Разделение гидролизата осуществлялось с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 5). Аминокислотный состав и N-концевые аминокислоты выделенных пептидов представлены в табл. 6. Пептиды BS-III и BS-II образовались в результате неспецифического расщепления связи Ser-Ala протеиназой из *St. aureus*. Результаты определения аминокислотной последовательности пептидов BS-I и BS-V в совокупности с данными по структуре триптических пептидов T-V-1 и T-XI-4 позволили завершить установление строения фрагмента B-1 **.



При автоматической деградации пептида B-IV-2 на жидкофазном секвенаторе была определена последовательность 18 аминокислотных остатков, найден порядок расположения четырех триптических пептидов и таким образом выяснена полная структура пептида B-IV-2:



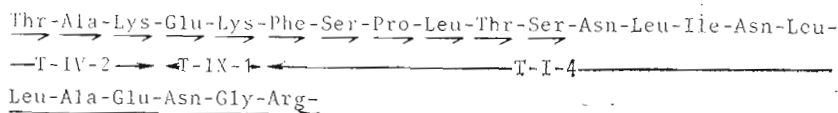
Из триптического гидролизата OSCP был выделен только пептид T-IV-3, содержащий в качестве N-концевой аминокислоты остаток метионина, а фрагмент B-1 имеет C-концевую последовательность -Pro-Lys-Hse. Это послужило основанием для предположения, что бром-

* Нумерация в соответствии с порядком расположения бромциановых пептидов в полипептидной цепи белка.

** Здесь и далее стрелками (→) обозначены стадии деградации на секвенаторе.

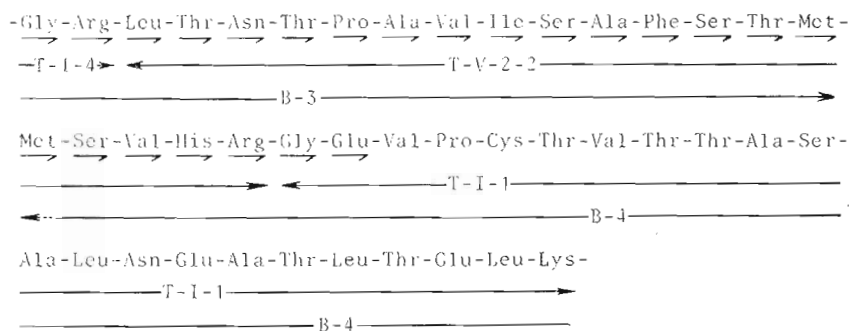
циановый фрагмент В-IV-2 следует в молекуле непосредственно за В-I: В-I→В-IV-2 (В-2).

При анализе на секвенаторе структуры пептида В-III-2 была установлена последовательность расположения в полипептидной цепи белка трех триптических пептидов:



Метионинсодержащий триптический пептид Т-IV-2 соединяет бромциановые фрагменты В-2 и В-III-2 (В-3).

Для завершения реконструкции полипептидной цепи фрагмента В-3 было предпринято расщепление сукцинизированного препарата белка гидроксиламином [5] по связи Asn—Gly, содержащейся в этом пептиде. Образовавшаяся смесь двух фрагментов, один из которых содержал блокированную α-аминогруппу, подвергалась деградации на секвенаторе. Установлена такая аминокислотная последовательность:

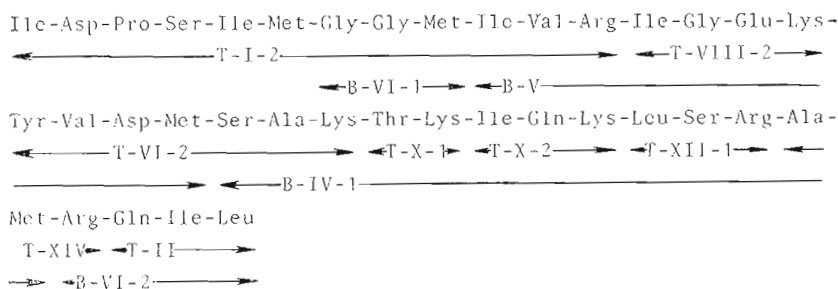


Полученные данные позволили завершить установление структуры триптического пептида Т-V-2-2, определить С-концевую последовательность фрагмента В-3 и частичную структуру бромцианового пептида В-4. Фрагмент В-4 содержался во фракции I. Как уже указывалось выше, разделить на индивидуальные компоненты эту фракцию методами гель-фильтрации и ВЭЖХ не удалось. Идентификация пептида В-4 была затруднена вследствие гетерогенности его N-концевой последовательности

↓ ↓
Met-Met-Ser).

Пептиды В-IV-1, В-V, В-VI-1, В-VI-2 содержали от 3 до 13 аминокислотных остатков, их структура была установлена по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns- и Pth-производных (табл. 7).

Сравнительный анализ структуры бромциановых пептидов (табл. 7) и соответствующих метионинсодержащих триптических пептидов позволил объединить в один блок восемь триптических пептидов и провести, таким образом, реконструкцию С-концевой части молекулы белка:



По данным аминокислотного анализа (табл. 5) и определения N-концевой последовательности, было установлено, что пептиды В-II-1 и В-III-1 образовались в результате неполного расщепления связей Met-Thr и Met-Ser соответственно. Пептид В-II-1 является суммой пептидов В-2 и В-3, а В-III-1 — В-V и В-IV-1.

Таким образом, из смеси продуктов расщепления OSCP бромцианом выделены в индивидуальном состоянии 9 из 10 образовавшихся фрагментов. Установлен порядок их расположения в полипептидной цепи, позволивший представить «архитектуру» молекулы белка в целом. При этом найдены перекрытия для 16 триптических пептидов в N-концевом блоке и 8 — в C-концевой части молекулы. В общей сложности в два блока объединены 172 аминокислотных остатка, составляющих большую часть молекулы OSCP.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин и карбоксипептидаза Y (Worthington, США), протеиназа из *St. aureus* (Miles, Англия), бромциан (Pierce, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), биогель Р-10 и катионообменная смола AG-50w×4 (Bio-Rad, США), сефадексы (Pharmacia, Швеция), моноподуксусная кислота (Merck, ФРГ), целлюлоза для ТСХ (Schleicher und Schüll, ФРГ).

Выделение OSCP. Митохондрии из бычьих сердец выделяли по методике [6]. Субмитохондриальные частицы готовили озвучиванием при помощи ультразвукового дезинтегратора (MSE, Англия) по методике [7]. OSCP выделяли из субмитохондриальных частиц по методу [4] с некоторыми модификациями на последней стадии очистки. Белковый осадок растворяли в 8 мл 4 М мочевины, 15 мМ трис-HCl (pH 8,0) и наносили на колонку (1,5×20 см) с CM-сефадексом С-25, уравновешенным буфером, содержащим 15 мМ трис-HCl, pH 8,0. Белок с колонки смывали градиентом NaCl от 0 до 0,3 М. Градиент создавали при помощи прибора Ultrog-rad (LKB, Швеция) (1 ч — от 0 до 0,15 М NaCl, 7 ч — от 0,15 до 0,3 М NaCl), скорость элюции 25 мл/ч. Наличие OSCP во фракциях коллектора и границы объединения фракций контролировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методике [8], а также определением специфической биологической активности OSCP [9]. Для анализа брали не более 50 мкл из каждой второй пробирки. После обессоливания объединенной фракции, содержащей OSCP на сефадексе G-25, уравновешенном разбавленным раствором NH₄OH, определяли N-концевую аминокислоту белка по методу [10].

Карбоксиметилирование OSCP осуществляли моноподуксусной кислотой по методу [11].

Триптический гидролиз карбоксиметилированного белка. 500 нмоль лиофилизованного карбоксиметилированного препарата белка растворяли в 30 мл 6 М мочевины, раствор анализовали против 0,1 М NH₄HCO₃ (pH 8,3). К свежевывапшему осадку белка добавляли трипсин. Весовое соотношение фермента к субстрату 1:50. Смесь выдерживали 4 ч при 37° С под азотом и лиофилизовали.

Хроматография триптического гидролизата на катионите AG-50w×4. Колонку размером 0,6×60 см (Hitachi, Япония), термостатированную при 37° С, заполняли смолой, уравновешенной стартовым буфером (0,2 М пиридин-ацетат, pH 3,1). Лиофилизованный пептидный материал растворяли в 7 мл стартового буфера и наносили на колонку под давлением азота 1,5–2 атм. Разделение проводили при скорости элюции 40 мл/ч. Подачу растворов осуществляли насосом МЦ-300 (Ково, СССР). Сначала через колонку пропускали 100 мл стартового буфера. Градиент I получали пропуская через смеситель, содержащий 60 мл стартового буфера, 400 мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера, pH 5,0, для получения градиента II через смеситель пропускали 200 мл 2 М пиридин-ацетатного буфера, pH 5,0. Детектирование пептидов осуществляли по реакции с нингидрином с помощью автоматического пептидного анализатора (Technicon, США).

По результатам анализа фракции объединяли и упаривали на роторном испарителе до объема 0,5–1 мл.

Хроматографию на бумаге для препаративного разделения некоторых триптических пептидов проводили как в работе [12].

Высокоэффективную жидкостную хроматографию осуществляли на колонках с обращенной фазой Silasorb C₈ или Silasorb C₁₈ (Lachema, ЧССР). ~50 нмоль образца наносили на колонку в виде раствора в исходном буфере (0,1% трифторуксусная кислота, pH 2,0, или 10 mM CH₃COONH₄, pH 5,6). Объем образца не превышал 0,2 мл. Элюцию пептидов осуществляли градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (pH 2,0) или 10 mM CH₃COONH₄ (pH 5,6). Пептиды детектировали спектрофотометрически (λ 210 нм). Для подбора оптимальных условий разделения проводили аналитические опыты, используя 1–2 нмоль пептидного материала.

Расщепление OSCP бромцианом. 300 нмоль предварительно восстановленного β -меркаптоэтанола, диализованного и лиофилизованного препарата белка растворяли в 1,5 мл 70% HCOOH и наносили на колонку (2,5×45 см) с сефадексом G-25 (грубый), уравновешенным тем же раствором кислоты. К полученному после обессоливания раствору белка добавляли 500-кратный мольный избыток бромциана (в расчете на метионин) и инкубировали в темноте в течение 20 ч при 20° С. Раствор упаривали до 1 мл, разбавляли H₂O и лиофилизовали.

Фракционирование смеси бромциановых пептидов на биогеле Р-10 проводили на колонке (1,5×100 см), предварительно уравновешенной 30% HCOOH при скорости элюции 5 мл/ч. Контроль за выходом пептидов вели с помощью детектора Uvicord II (ЛКВ, Швеция) при 280 нм. Фракции объединяли согласно спектрофотометрическим данным, упаривали на роторном испарителе до объема 0,5 мл.

Гидролиз пептидов В-1 и Т-1-1 протеиназой из St. aureus. 50 нмоль лиофильного препарата пептида растворяли в 3 мл 0,2 М NH₄HCO₃, pH 8,3, добавляли фермент в отношении к субстрату 1 : 50 по весу. Реакционную смесь выдерживали 4 ч при 37° С и лиофилизовали.

Определение N-концевых аминокислотных остатков и деградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-Pth-производных осуществляли как в работе [12].

Автоматическую деградацию белка и пептидов осуществляли на секвенаторе 890С (Beckman, США) по программе № 102 974. Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот проводили методами ВЭЖХ [13] и масс-спектрометрией [14].

С-Концевую аминокислотную последовательность белка и некоторых пептидов определяли с помощью карбоксипептидазы Y [15] с последующим анализом гидролизата на анализаторе D-500 (Durrum, США).

Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном анализаторе D-500.

Настоящая работа является частью структурно-функциональных исследований митохондриальной H⁺-АТФ-азы, проводимых отделом химии белка Института биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР совместно с лабораторией профессора Л. Эрнстера (Аррениусовская лаборатория Стокгольмского университета, Швеция).

Авторы выражают глубокую благодарность академику Ю. А. Овчинникову за ценные советы и постоянное внимание к данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Senior A. E., Wise J. G. J. Membrane Biol., 1983, v. 73, № 2, p. 105–124.
2. MacLennan D. H., Tzagoloff A. Biochemistry, 1968, v. 7, № 4, p. 1603–1610.
3. Ovchinnikov Y. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Trubetskaya O. E., Nazimov I. V., Hundal T., Ernster L. FEBS Lett., 1984, v. 166, № 1, p. 19–22.
4. Russel L. K., Kirkley S. A., Kleyman T. R., Chan S. H. P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 73, № 2, p. 434–443.
5. Bornstein P. Biochemistry, 1970, v. 9, № 12, p. 2408–2412.

6. Crane G., Green D. *Biochim. et biophys. acta*, 1956, v. 22, № 3, p. 475-481.
7. Senior A. E. *Bioenerg.*, 1974, v. 2, № 1, p. 141-150.
8. Laemly U. K. *Nature*, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
9. Sandri G., Wojczak L., Ernster L. In: *Vectorial reactions in electron and ion transport in mitochondria and bacteria* / Eds Palmieri F. et al. N. Y.: Elsevier / North-Holland Biomedical Press, 1981, p. 197-207.
10. Grey W. R. In: *Methods in Enzymology* / Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.-L.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 139-151.
11. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. J. *Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
12. Гринкевич В. А., Арзамасова Н. М., Погаченко Н. А., Гринкевич Х. А., Красченко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 12, с. 1757-1774.
13. Hawke D., Yuan P.-M., Chively J. E. *Anal. Biochem.*, 1982, v. 120, № 2, p. 302-311.
14. Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А., Розынов Б. В. *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 2, с. 192-199.
15. Ambler R. P. In: *Methods in Enzymology* / Eds Colowich S. P., Kaplan N. O. N. Y.-San Francisco - L.: Acad. Press, 1972, v. XXV B, p. 143-154, 262-272.

Поступила в редакцию
15.X.1984

**PRIMARY STRUCTURE OF THE OLIGOMYCIN SENSITIVITY CONFERRING
PROTEIN (OSCP) OF H⁺-ATPase COMPLEX FROM BEEF HEART
MITOCHONDRIA. I. TRYPTIC AND CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES**

GRINKEVICH V. A., TRUBETSKAYA O. E., CHERTOVA E. N.,
MURAVIYOVA T. I., ALDANOVA N. A., MODYANOV N. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Trypsin and cyanogen bromide were used for cleavage of the OSCP preparations. The peptide mixtures thus formed were separated into individual components by a combination of various chromatographic procedures: gel filtration, ion exchange and paper chromatography, as well as reversed-phase HPLC. As a result, 31 tryptic peptides and 9 out of 10 possible cyanogen bromide peptides were isolated. Determination of the amino acid sequences of these peptides allowed the alignment of cyanogen bromide fragments in the polypeptide chain that shed light on the «architecture» of the protein molecule as a whole. It also afforded the overlappings for tryptic peptides, 16 in the N-terminal and 8 in the C-terminal portions of the molecule.