



УДК 577.152:31\*273.01:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНОЙ  
РИБОНУКЛЕАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM*  
*BREVICOMPACTUM* \*

М

Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Методом автоматической деградации по Эдману интактного S-карбоксиметилированного белка и смеси продуктов его протеолитического расщепления по остаткам Arg, Lys и Glu, с привлечением результатов по исследованию кинетики протеолиза белка под действием карбоксипептидазы Y, проведено определение первичной структуры внеклеточной гуанилспецифичной РНКазы гриба *Penicillium brevicompactum*. РНКазы содержит 102 аминокислотных остатка: 7 Asp, 7 Asn, 9 Thr, 11 Ser, 4 Glu, 1 Gln, 4 Pro, 10 Gly, 11 Ala, 4 Cys, 7 Val, 4 Ile, 3 Leu, 9 Tyr, 5 Phe, 2 Lys, 3 His, 1 Arg ( $M_r$  10 801). Установлено, что четыре полуцистиновых остатка РНКазы *P. brevicompactum* образуют попарно две дисульфидные связи.  $\text{Cys}^2$  Cys<sup>10</sup>, Cys<sup>6</sup> Cys<sup>101</sup>.

Несмотря на большое число работ, посвященных изучению первичных структур белков, всякий раз, сталкиваясь с необходимостью определения аминокислотной последовательности какого-либо нового белка, экспериментатор решает задачу выбора оптимальной стратегии исследования. Это неизбежно требует некоторой предварительной информации о структуре, свойствах и отличительных особенностях поведения анализируемого объекта. Задача в значительной степени упрощается в случае расшифровки первичных структур белков, относящихся к одному гомологичному семейству, когда сравнительный анализ структур гомологов позволяет с той или иной степенью приближения прогнозировать перспективность выбираемой методологии проведения эксперимента.

Одной из существенных особенностей определения первичной структуры белков, для которых известны гомологи с уже установленной аминокислотной последовательностью, является возможность использования гомологичного сходства для определения положения фрагментов исследуемого белка в его полипептидной цепи и в некоторых случаях — при установлении структуры исследуемых пептидов. Вместе с тем очевидно, что возможность корректного использования данных по первичной структуре родственных белков при исследовании аминокислотной последовательности новых представителей той же группы качественно зависит от степени их гомологии. Перечисленные соображения являются оправданными в настоящей работе при рассмотрении вопросов стратегии и тактики определения ковалентной структуры внеклеточной гуанилспецифичной РНКазы гриба *Penicillium brevicompactum* (КФ 3.1.27.3).

Из более чем 10 высокоочищенных гуанилспецифичных РНКаз грибов наиболее изученный представитель — продуцируемая *Aspergillus oryzae* РНКазы T<sub>1</sub>. Известна первичная структура РНКазы T<sub>1</sub>, методом рентгеноструктурного анализа исследована пространственная структура ее комплекса с гуанозин-2'-фосфатом [2, 3]. Недавно изучена аминокислотная последовательность другой гуанилспецифичной РНКазы — РНКазы *Asp. clavatus*, или С<sub>2</sub>, и ее трехмерная структура, свидетельствующие о высокой инвариантности макромолекул РНКаз грибов [4, 5].

Очевидность гомологии РНКазы *P. brevicompactum* с РНКазами T<sub>1</sub> и С<sub>2</sub> фактически следует из сравнения аминокислотных составов трех фер-

\* Результаты настоящей работы сообщались на VI Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов [1].

Аминокислотный состав РНКаз T<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> и *P. brevicompactum* (*P. b.*),  
моль/моль белка

Амино-кислота	РНКазы T <sub>1</sub> [2]	РНКазы C <sub>2</sub> [4]	РНКазы <i>P. b.</i> *	Амино-кислота	РНКазы T <sub>1</sub> [2]	РНКазы C <sub>2</sub> [4]	РНКазы <i>P. b.</i> *
Lys	1	—	2	Gly	12	15	10
His	3	3	3	Ala	7	9	11
Arg	1	4	1	Cys	4	4	4
Asp	6	7	7	Val	8	6	7
Asn	9	6	7	Met	—	—	—
Thr	6	4	9	Ile	2	2	4
Ser	15	13	11	Leu	3	4	3
Glu	6	4	4	Tyr	9	10	9
Gln	3	4	1	Phe	4	4	5
Pro	4	4	4	Trp	1	1	—

\* См. рис. 1.

ментов (табл. 1). Для исследования первичной структуры РНКазы *P. brevicompactum* существенно отсутствие в последней остатков Trp и Met, наличие одного остатка Arg и двух остатков Lys, а также совпадение в трех белках содержания полуцистеиновых остатков и остатков Pro. Значительное сходство РНКазы *P. brevicompactum* с другими РНКазами грибов и бактерий выявляется при изучении структуры активных центров ферментов: присутствие в активном центре как минимум трех функционально важных остатков — Glu, Arg и His [6, 7]. С точки зрения стратегии анализа аминокислотной последовательности РНКазы *P. brevicompactum* представляет интерес локализация в полипептидной цепи фермента остатков Glu и Arg, которые могут быть потенциальными кандидатами в качестве центров расщепления полипептидной цепи белка соответствующими специфичными протеиназами. Важно, что консервативные остатки активного центра РНКаз грибов (Glu и Arg) расположены соответственно в средней части молекулы белка и в его С-концевой части; кроме того, в молекуле РНКазы *P. brevicompactum* содержится лишь один остаток Arg, который, по-видимому, аналогичен по функции остатку Arg<sup>77</sup> в РНКазе T<sub>1</sub> и семействе гомологичных внеклеточных РНКаз микроорганизмов.

Тривиальная схема определения первичной структуры белков включает в себя селективную фрагментацию полипептидной цепи и выделение серии индивидуальных пептидов с последующим установлением их структуры и реконструкцией исходной аминокислотной последовательности на основании обобщения данных анализа структур перекрывающихся по ходу цепи пептидных фрагментов. Именно таким образом были установлены известные в настоящее время первичные структуры РНКаз грибов и бактерий [2, 4, 8–12]. Вместе с тем подобная стратегия анализа аминокислотной последовательности для низкомолекулярных и гомологичных белков, какими являются РНКазы микроорганизмов и к которым принадлежит РНКазы *P. brevicompactum*, представляется нам нерациональной.

При определении первичной структуры РНКазы *P. brevicompactum* в настоящей работе мы, принимая во внимание гомологичность этого фермента РНКазе T<sub>1</sub>, а также инвариантность локализации в структуре гуанилспецифичных РНКаз некоторых существенных для функционирования фермента аминокислотных остатков (по крайней мере остатков Arg и Glu), исключили наиболее трудоемкую стадию в исследовании структуры белков — стадию фракционирования и очистки пептидов и ограничились в основном анализом N-концевых аминокислотных последовательностей методом автоматического секвенирования интактного (восстановленного и карбоксиметилированного) белка и продуктов его селективной протеолитической дегградации без разделения пептидных гидролизатов.

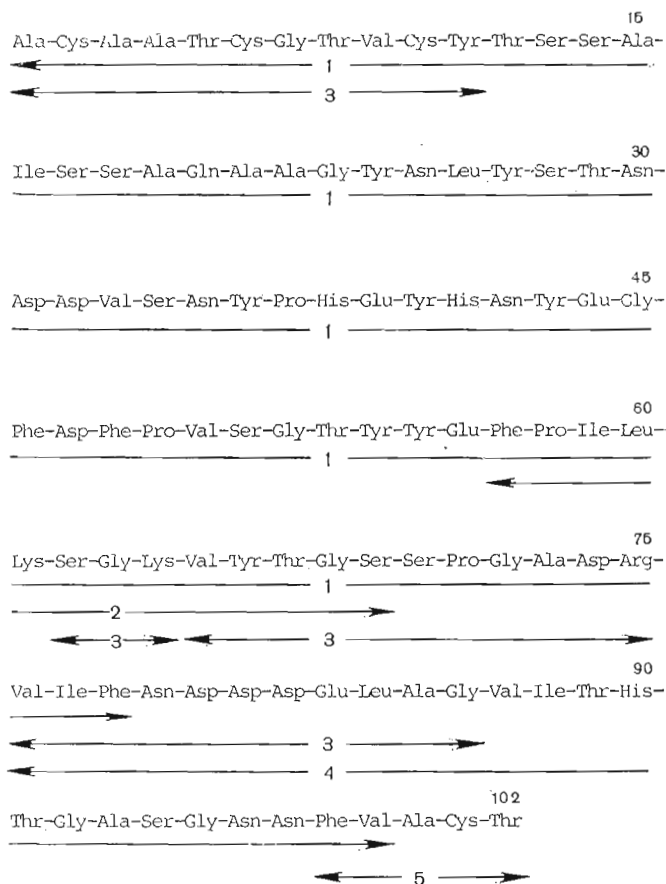


Рис. 1. Аминокислотная последовательность РНКазы *P. brevicompactum*. Отмечены структуры, определенные при секвенировании S-карбоксиметилированного белка (1), смеси продуктов его протеолиза стафилококковой протеиназой (2) и полного (3) и ограниченного (4) трипсинолиза, а также при анализе кинетики расщепления РНКазы карбоксипептидазой Y (5)

Предварительное секвенирование восстановленной S-карбоксиметилированной РНКазы *P. brevicompactum* в соответствии с практически неизменной стандартной 0,1 М квадрольной программой позволило идентифицировать 50 N-концевых аминокислотных остатков белка (рис. 1). Эффективность процесса автоматического секвенирования, определяемая критерием среднего постадийного выхода продуктов ступенчатой деградации полипептидной цепи белка, составляла 95%. Характерным при этом было резкое падение выхода на 37-м и 49-м циклах отщепления — выход на этих стадиях не превышал 80%. Это приводило к существенному увеличению аминокислотного фона на последующих этапах деградации, что сопровождалось соответственно уменьшением относительного содержания основного пептидного материала и в результате ограничивало возможность дальнейшей однозначной интерпретации аминокислотной последовательности РНКазы.

Согласно полученным данным, в 37-м и 49-м положениях полипептидной цепи РНКазы расположены остатки Pro. Снижение выхода продуктов на этих циклах эдмановской деградации, по-видимому, связано с неполнотой реакции отщепления анилинпиазолиноновых производных пролина под действием гептафтормасляной кислоты [13]. Наши предварительные эксперименты показали, что только двукратная обработка фенолтиокарбамилпроизводных пептидов, содержащих в качестве N-концевого аминокислотного остатка остаток Pro, гептафтормасляной кислотой в стандартизованных условиях автоматической деградации приводит к ко-

Анализ продуктов эдмановской деградации Сп-РНКазы *P. brevicompactum*\*

Номер цикла	Аминокислота	Выход, нмоль	Методы идентификации	Номер цикла	Аминокислота	Выход, нмоль	Методы идентификации
1	Ala	256,4	A, Г, T	40	Tyr	43,7	A, Г, T
2	Cys	169,1	A, Г, T	41	His	20,9	A, T
3	Ala	203,4	Г, A, T	42	Asn	19,8	A, T
4	Ala	223,4	Г, A, T	43	Tyr	40,7	Г, A, T
5	Thr	271,0	A, Г, T	44	Glu	19,4	A, T
6	Cys	140,2	A, Г, T	45	Gly	32,8	A, T, Г
7	Gly	126,4	A, Г, T	46	Phe	30,8	Г, A, T
8	Thr	234,8	A, Г, T	47	Asp	14,9	A, T
9	Val	138,6	A, Г, T	48	Phe	28,9	Г, A, T
10	Cys	105,1	A, Г, T	49	Pro	16,7	Г, T
11	Tyr	139,2	A, Г, T	50	Val	13,6	Г, A, T
12	Thr	182,6	A, Г, T	51	Ser	10,7	A, T
13	Ser	68,6	A, Г, T	52	Gly	14,8	A, T
14	Ser	64,6	A, Г, T	53	Thr	9,8	A, T
15	Ala	140,1	Г, A, T	54	Tyr	16,6	Г, A, T
16	Ile	88,7	Г, A, T	55	Tyr	19,0	Г, A, T
17	Ser	68,3	A, Г, T	56	Glu	8,5	A, T
18	Ser	77,8	A, Г, T	57	Phe	15,7	A, T, Г
19	Ala	77,0	Г, A, T	58	Pro	7,6	Г, T
20	Gln	55,9	A, T	59	Ile	8,3	Г, A
21	Ala	88,5	Г, A, T	60	Leu	7,1	Г, A
22	Ala	121,4	Г, A, T	61	—	—	A, Г
23	Gly	93,0	Г, A, T	62	—	—	A, Г
24	Tyr	91,9	A, Г, T	63	Gly	7,9	A
25	Asn	33,8	A, T	64	—	—	A, Г
26	Leu	61,6	A, Г, T	65	Val	6,9	Г, A
27	Tyr	86,7	A, Г, T	66	Tyr	5,7	A
28	Ser	44,6	A, T, Г	67	—	—	A, Г
29	Thr	94,5	A, T, Г	68	Gly	6,6	A
30	Asn	27,6	A, T	69	—	—	A, Г
31	Asp	35,1	A, T	70	—	—	A, Г
32	Asp	39,8	A, T	71	Pro	3,2	Г
33	Val	53,2	Г, A, T	72	Gly	4,0	A
34	Ser	37,0	A, T	73	Ala	3,1	A, Г
35	Asn	26,1	A, T	74	Asx	2,2	A
36	Tyr	52,1	A, Г, T	75	Arg	1,7	A
37	Pro	27,5	Г, T	76	Val	2,7	Г, A
38	His	19,4	A, T	77	Ile	3,1	Г, A
39	Glu	24,5	A, T	78	Phe	2,8	Г, A

\* Выход аминокислот определен по первому из перечисленных методов идентификации: А — аминокислотный анализ, Г — ГЖХ, Т — ТСХ. Производные Cys(Cm), Ser, Thr, Ile, Gln, Asp определяли при аминокислотном анализе в виде Ala, Ala, α-Abu, Ile + Ile, Glu и Asp соответственно.

личественному расщеплению соответствующей пептидной связи и элиминированию остатков Pro с высоким выходом. Выход N-концевого остатка Pro при автоматической деградации по Эдману с использованием двукратной обработки производного пептида гентафтормасляной кислотой увеличивается примерно на 15%.

Локализация двух остатков Pro в первичной структуре РНКазы *P. brevicompactum* открывает возможность повышения эффективности автоматической деградации белка, более полного определения аминокислотной последовательности его N-концевой части и, в частности, определения положения и идентификации в полипептидной цепи фермента аминокислотных остатков, которые могли бы обеспечить проведение направленного селективного протеолиза молекулы. В этой связи следует также отметить, что полученные данные позволили локализовать в первичной структуре РНКазы три (из четырех) остатка полуцистина (Cys<sup>2</sup>, Cys<sup>6</sup> и Cys<sup>10</sup>) и два (из четырех) остатка Glu (Glu<sup>39</sup> и Glu<sup>44</sup>).

Результаты повторного секвенирования S-карбоксиметилированной РНКазы, проведенного в присутствии полибрена с использованием на 37-й и 49-й стадиях деградации двух последовательных циклов отщепле-

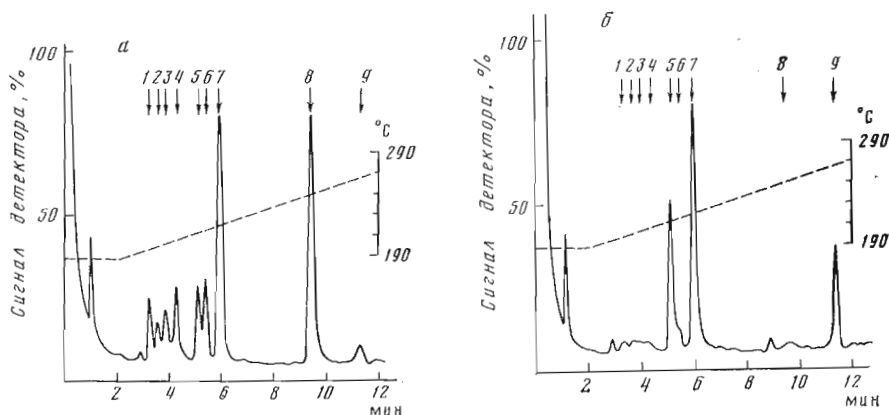


Рис. 2. ГЖХ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на 48-й (а) и 49-й (б) стадиях эдмановской деградации S-карбоксиметилированного белка (после 48-й стадии деградации реакционная смесь была обработана флуорескаминном). 1 — Ala, 2 — Cys(Cm)/Ser, 3 — Gly, 4 — Val, 5 — Pro/Thr, 6 — Leu/Ile, 7 — Nle (внутренний стандарт 27,3 нмоль), 8 — Phe, 9 — неидентифицированный пик

ния анилинтиазиолиновых производных, представлены в табл. 2. Для снижения interfering с основным анализируемым материалом примесного пептидного фона после 48 этапов автоматической деградации перед Pro<sup>49</sup> реакционная смесь в ячейке секвенатора обработана флуорескаминном [14], блокирующим N-концевые первичные аминогруппы остаточных примесных продуктов, и секвенирование основной полипептидной цепи, в которой остаток Pro является N-концевым, продолжено до 78-го цикла включительно.

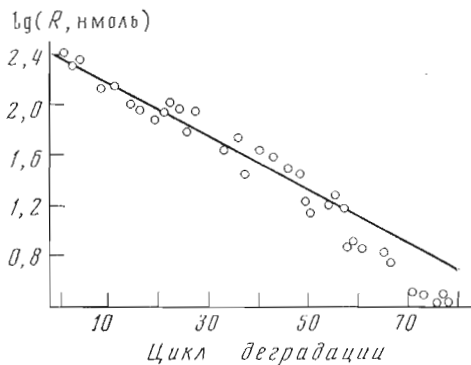
На рис. 2 продемонстрировано влияние модификации флуорескаминном на общий фон остаточных продуктов в ходе эдмановского расщепления РНКазы.

Значительное уменьшение фона остаточных аминокислот в ходе дальнейшего секвенирования белка после промежуточной обработки пептидной смеси флуорескаминном вместе с отсутствием сколько-нибудь существенной модификации собственно анализируемого фрагмента РНКазы (рис. 3) позволяет при среднем постадийном выходе эдмановской деградации 97% дополнительно подтвердить ранее установленную аминокислотную последовательность в N-концевом 50-членном сегменте полипептидной цепи белка и наряду с этим однозначно идентифицировать в первичной структуре фермента еще 15 остатков аминокислот (см. табл. 2 и рис. 1).

Наличие остатков Pro<sup>58</sup> и Pro<sup>71</sup> вызывает заметное падение выхода продуктов реакции на соответствующих циклах деградации РНКазы (см. рис. 3, табл. 2), затрудняющее на последних стадиях процесса корректную интерпретацию результатов секвенирования с использованием применяемых в работе методов анализа. К таковым, в частности, относится метод ТСХ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот, требующий достаточно больших количеств анализируемого и дефицитного на этих стадиях автоматической деградации материала. Определенные трудности анализа некоторых производных аминокислот методом ГЖХ (Ser, Thr, Asn, Gln, Glu, Asp, Arg, His, Gly, Lys, Cys(Cm)), а также неоднозначность в идентификации производных Cys(Cm), Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln методом аминокислотного анализа после конверсии соответствующих производных в исходные продукты (см. раздел «Экспериментальная часть» и примечание к табл. 2) также создают некоторую проблему при интерпретации экспериментальных данных.

С нашей точки зрения, для корректной идентификации продуктов автоматической эдмановской деградации полипептида с применением перечисленных методов анализа необходимо совпадение результатов, полученных как минимум двумя независимыми методами, причем идентификация может считаться достаточно однозначной при условии двукратного

Рис. 3. Постадийный выход ( $R$ ) продуктов автоматической эдмановской деградации РНКазы *P. brevicompactum*. Прямая, характеризующая величину среднего постадийного выхода, получена нормализацией методом наименьших квадратов приведенных значений выходов продуктов деградации на стадиях 1–57



превышения количества определяемой аминокислоты над соответствующим аминокислотным фоном. Отсюда отчасти следует, что данные табл. 2 о локализации в полипептидной цепи РНКазы *P. brevicompactum* остатков Gly<sup>63</sup>, Tyr<sup>66</sup>, Gly<sup>68</sup>, Pro<sup>71</sup>, Gly<sup>72</sup>, Asp/Asn<sup>74</sup> и Arg<sup>75</sup> не более чем ориентировочные и требуют подтверждения.

Тем не менее на этом этапе исследования важно место, занимаемое в полипептидной цепи РНКазы единственным имеющимся в ее структуре остатком Arg (по-видимому, Arg<sup>75</sup>), а также последовательность аминокислот вблизи остатка Glu активного центра РНКазы *P. brevicompactum* — Glu<sup>56</sup>.

Первичная структура С-концевой трети молекулы РНКазы *P. brevicompactum* определена на основании данных автоматического секвенирования пептидной смеси, полученной при гидролизе трипсином S-карбоксиметилированного и сукцинилированного белка (табл. 3).

Наличие только одной полипептидной цепи, деградируемой в ходе эдмановского расщепления, является доказательством количественной модификации N-концевой α-аминогруппы белка и ε-аминогрупп Lys-остатков янтарным ангидридом и вместе с тем показывает высокую специфичность триптического протеолиза РНКазы, поскольку в молекуле белка наблюдается расщепление только одной Arg<sup>75</sup>—Val<sup>76</sup>-связи.

В соответствии с приведенными результатами постадийный выход при определении аминокислотной последовательности С-концевого фрагмента РНКазы составляет на первых 18 циклах деградации 95% и резко снижается далее, по-видимому, за счет постепенного вымывания анализируемого олигопептида.

Дополнительная и завершающая информация о структуре С-концевой аминокислотной последовательности РНКазы вытекает из данных количественного анализа продуктов протеолиза белка под действием карбоксипептидазы Y. При инкубации Cm-РНКазы с карбоксипептидазой в течение 20 мин происходит практически количественное отщепление от белка остатка Thr, а также остатков Cys(Cm), Ala, Val и Phe в соотношении 1,0 : 0,7 : 0,5 : 0,3 : 0,1, что свидетельствует о наличии С-концевой последовательности -Phe-Val-Ala-Cys-Thr и, таким образом, одновременно обеспечивает перекрытие структур двух секвенируемых участков С-концевой трети молекулы белка.

Сегмент РНКазы 76–102 включает в себя остаток His<sup>90</sup> активного центра фермента; в нем же установлено положение существенных для дальнейшего рассмотрения остатков Glu<sup>56</sup> и Cys<sup>101</sup>.

Возвращаясь вновь к анализу не идентифицированной ранее аминокислотной последовательности центральной части молекулы РНКазы *P. brevicompactum* и к поиску целенаправленной методологии ее исследования, мы считали целесообразным проведение исчерпывающего триптического протеолиза белка и/или гидролиза белка Glu-специфичной протеиназой. Действительно, с одной стороны, по-видимому, где-то в двух из шести (см. табл. 2) неидентифицированных позиций первичной структуры РНКазы локализованы два остатка Lys белка, что при наличии полученной предварительно информации о близрасположенной аминокислотной последовательности открывает возможность сравнительно простой интер-

Анализ продуктов эдмановской деградации триптического гидролизата  
сукцинизированной Сm-РНКазы *P. brevicompactum* \*

Номер цикла	Аминокислота	Выход, ммоль	Методы идентификации	Положение в цепи РНКазы
1	Val	106,2	Г, А, Т	76
2	Ile	136,8	Г, А, Т	77
3	Phe	149,0	Г, А, Т	78
4	Asn	45,1	А, Т	79
5	Asp	51,2	А, Т	80
6	Asp	48,3	А, Т	81
7	Asp	56,7	А, Т	82
8	Glu	24,8	А, Т	83
9	Leu	69,1	Г, А, Т	84
10	Ala	70,0	Г, А, Т	85
11	Gly	60,4	А, Г, Т	86
12	Val	66,7	Г, А, Т	87
13	Ile	61,6	Г, А	88
14	Thr	20,5	А, Т	89
15	His	15,4	А, Т	90
16	Thr	18,8	А, Т	91
17	Gly	77,3	А, Г, Т	92
18	Ala	60,9	Г, А, Т	93
19	Ser	15,1	А, Т	94
20	Gly	19,0	Г, А, Т	95
21	Asn	10,0	А, Т	96
22	Asn	8,5	А, Т	97
23	Phe	11,8	Г, А, Т	98
24	Val	10,2	Г, А, Т	99

\* См. примечание к табл. 2.

претации результатов секвенирования даже на смеси пептидов триптического гидролизата РНКазы. С другой стороны, известна локализация в структуре всех четырех остатков Glu, поэтому тактика секвенирования соответствующей пептидной смеси может быть оправдана и в случае специфического расщепления белка стафилококковой протеиназой. Кроме того, в непосредственной близости от представляющего интерес с этой точки зрения остатка Glu<sup>56</sup> расположен остаток Pro<sup>58</sup>, что позволяет, очевидно, использовать на соответствующей стадии эдмановской деградации ранее описанный принцип необратимой ковалентной химической модификации флуорескаминном аминогрупп пептидов, интерферирующих при секвенировании с основным анализируемым материалом.

Данные автоматического секвенирования смеси пептидов полного триптического расщепления РНКазы (табл. 4) показывают, что эдмановской деградации подвергаются четыре пептидные цепи, две из которых представляют собой соответственно N- и C-концевые фрагменты белка (см. рис. 1).

Если, согласно специфичности действия трипсина, предположить, что одним из остатков Lys РНКазы *P. brevicompactum* является остаток Lys<sup>61</sup>, то аминокислотная последовательность РНКазы в районе 61—75 иллюстрируется соответственно структурами 3-членного (62—64) и 11-членного (65—75) пептидов (табл. 4).

Идентификация аминокислот на последовательных стадиях автоматической деградации по Эдману смеси триптических пептидов, за исключением неабсолютной корректности соотнесения остатков Gly<sup>63</sup> и Tyr<sup>66</sup> соответствующим позициям в первичной структуре, практически однозначна (см. также табл. 2). Однако, учитывая вышесказанное о локализации остатка Lys<sup>61</sup> и низкий выход в процессе секвенирования остатка Lys<sup>64</sup>, мы дополнительно провели исследование аминокислотной последовательности смеси пептидов, полученных при гидролизе РНКазы *P. brevicompactum* стафилококковой протеиназой.

Анализ N-концевых аминокислотных остатков в пептидном гидролизате РНКазы стафилококковой протеиназой после первого цикла автома-

Анализ продуктов эдмановской деградации и нечерпывающего триптического гидролизата См-РНКазы *P. brevicornis*.\*.

1	Выход аминокислот на последовательных циклах деградации, нмоль										R **, %	Положе- ние в цепи РНКазы
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Ala 72,5 Г, А, Т	Cys 69,8 А, Г, Т	Ala 74,8 Г, А, Т	Ala 66,1 Г, А, Т	Thr 54,4 А, Г, Т	Cys 112,1 А, Г, Г	Gly 57,7 А, Т, Г	Thr 72,8 А, Г, Т	Val 43,7 Г, А, Т	Cys 60,5 А, Т	Tyr 33,9 Г, А, Т	95%	1-11
Ser 165,6 А, Т, Г	Gly 32,1 А, Г, Т	Lys 9,8 А, Т	Gly 69,8 А, Т, Г	Ser 52,4 А, Т	Ser 112,1 А, Г, Т	Pro 40,9 Г, Т	Gly 47,4 А, Г, Т	Ala 48,3 Г, А, Т	Asp 47,2 А, Т	Arg 9,4 А, Т	94%	62-64
Val 157,4 Г, А, Т	Tyr 84,8 Г, А, Т	Thr 59,0 А, Т, Г	Asn 21,5 А, Т	Asp 20,8 А, Т	Asp 21,8 А, Т	Asp 19,7 А, Т	Glu 29,9 А, Т	Leu 28,8 Г, А, Т	Ala 36,8 Г, А, Т	Gly 32,8 А, Т	92%	76-87

\* См. примечания к табл. 2.

\*\* R — средний последний выход продуктов при автоматической деградации.



Анализ продуктов эдмановской деградации смеси пептидов, полученных при протеолизе Сm-РНКаза *P. brevicompactum* стафилококковой протеиназой после проведения одного цикла отщепления и обработки флуорескаминном \*

Номер цикла	Аминокислота	Выход, нмоль	Методы идентификации	Положение в цепи РНКаза
2	Pro	17,0	Г, Т	58
3	Ile	18,0	Г, А, Т	59
4	Leu	11,6	Г, А, Т	60
5	Lys	7,8	А, Т	61
6	Ser	9,1	А, Т	62
7	Gly	10,5	А, Г, Т	63
8	Lys	9,2	А, Т	64
9	Val	20,4	Г, А, Т	65
10	Tyr	19,1	Г, А, Т	66
11	Thr	10,5	А, Т	67
12	Gly	10,4	А, Т	68
13	Ser	8,3	А, Т	69

\* См. примечание к табл. 2.

тического секвенирования показал наличие остатков Ala, Gly, Leu, Tyr и Phe в соотношении 1,0 : 0,6 : 0,6 : 0,4 : 0,4, свидетельствуя, таким образом, в первом приближении о высокой специфичности протеолиза РНКаза *P. brevicompactum*, который, по-видимому, ограничен в конкретном случае пептидными связями, образованными остатками Glu<sup>39</sup>, Glu<sup>44</sup>, Glu<sup>56</sup> и Glu<sup>83</sup>, и незначительно зависит от их локального микроокружения. Эффективность протеолиза составляла 40–60%.

Результаты последующей эдмановской деградации смеси пептидов после обработки ее в реакционной ячейке секвенатора на данной стадии реакции флуорескаминном приведены в табл. 5. Анализ продуктов 12 последовательных циклов деградации подтверждает справедливость ранее выведенной аминокислотной последовательности полипептидной цепи РНКаза в участке 57–69 и одновременно свидетельствует о корректности предварительных выводов, касающихся специфичности гидролиза РНКаза стафилококковой протеиназой, исключая, в частности, потенциальную возможность протеолиза белка по связи Asp<sup>47</sup>–Phe<sup>48</sup>.

Полученные данные завершают работу по определению первичной структуры РНКаза *P. brevicompactum*. Фермент представляет собой белок с молекулярной массой 10 801 и содержит 102 аминокислотных остатка (рис. 1), в том числе четыре остатка полуцистина. Вместе с тем, согласно результатам титрования нативного или денатурированного под действием 8 М мочевины или 1% додецилсульфата натрия белка дитиобиснитробензойной кислотой, РНКаза *P. brevicompactum* не содержит свободных сульфгидрильных групп, что предполагает наличие в молекуле двух дисульфидных связей, по-видимому, подобно РНКазе T<sub>1</sub> [2].

Как правило, для локализации S–S-связей в белках необходимо выделение соответствующих индивидуальных пептидов. Однако расположение трех из четырех остатков Cys РНКаза *P. brevicompactum* в N-концевой части молекулы белка позволяет сохранить принятую в работе логику исследования первичной структуры фермента, основанную на использовании автоматической эдмановской деградации белка или продуктов его протеолиза без выделения пептидных фрагментов.

Локализация дисульфидных связей в РНКазе *P. brevicompactum* установлена в ходе анализа продуктов автоматической эдмановской деградации интактного немодифицированного белка с использованием радиоактивного фенил[<sup>14</sup>C]изотиоцианата в качестве реагента в реакции конденсации на 2-м или 6-м циклах деградации.

Препарат нативной РНКаза подвергается качественно «нормальному» секвенированию подобно S-алкилированному белку с той отличительной особенностью, что заметно уменьшается постадийный выход продуктов и

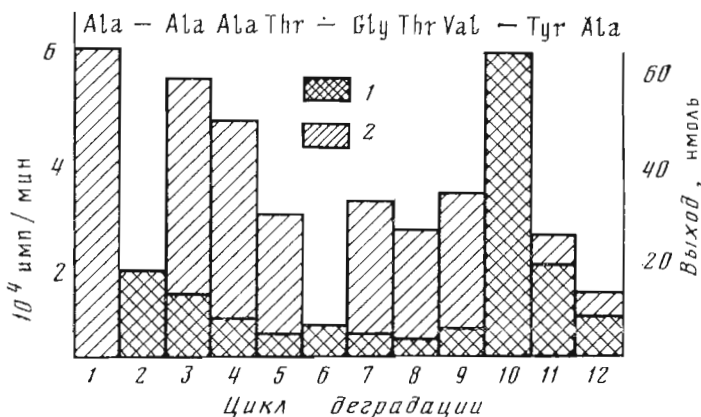


Рис. 4. Автоматическая деградация интактной немодифицированной РНКазы *P. brevicompactum*. 1, 2 — радиоактивность и выход аминокислот на циклах деградации соответственно

продукты на стадиях деградации 2, 6 и 10 не идентифицируются используемыми в работе методами (рис. 4). После проведения на интактном белке одного полного цикла автоматической эдмановской деградации в реакционную ячейку секвенатора вводили фенил[<sup>14</sup>C]изотиоцианат и секвенирование затем продолжали по стандартной программе. Анализ фракций отщепленных анилинтиазолиновых производных аминокислот показал, что основная часть радиоактивно меченого материала появляется на 10-м цикле ступенчатой деградации белка (рис. 4). Аналогично в случае проведения пяти циклов «нормального» секвенирования и введения фенил[<sup>14</sup>C]изотиоцианата на 6-м цикле эдмановской деградации в отщепленных фракциях 1—12 радиоактивности не обнаружено. Эти факты однозначно свидетельствуют о наличии в РНКазе дисульфидных связей Cys<sup>2</sup>—Cys<sup>10</sup> и Cys<sup>6</sup>—Cys<sup>101</sup>.

Мы полагаем, что применение предложенного в настоящей работе или в той или иной степени модифицированного подхода к анализу аминокислотной последовательности и локализации S—S-связей РНКазы *P. brevicompactum* является оправданным при изучении структур других представителей гемологичных РНКаз микроорганизмов, по крайней мере гуанилспецифичных РНКаз грибов. Сравнительный анализ структур гуанилспецифичных РНКаз грибов будет представлен в отдельном сообщении.

### Экспериментальная часть

В работе использовали ТРСЖ-обработанный трипсин (Worthington, США), карбоксипептидазу Y (Pierce, США), стафилококковую протеиназу (Miles, Англия), флуорескамин (Fluka, ФРГ), полибреи (Aldrich, ФРГ), фенил[<sup>14</sup>C]изотиоцианат (125 мкКи, Amersham, Англия), N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (Pierce, США). Реактивы и растворители для автоматической деградации по методу Эдмана — фенилизотиоцианат, гептан, 0,1 М квадроэльный буфер, гептафтормасляная кислота, бензол, этилацетат, хлорбутан соответствовали квалификации Sequenal grade (Beckman, США). Все растворители, отвечающие маркам х.ч. или ос.ч. (Союзреактив), перед употреблением очищали.

РНКазу, свободную от солей и фосфата, выделяли из гриба *P. brevicompactum* как описано в работе [15].

Карбоксиметилирование РНКазы *P. brevicompactum* проводили в 0,5 М трис-НСl-буфере, рН 8,5 содержащем 5 мМ EDTA и 6 М гуанидинхлорид. Предварительно белок восстанавливали 2 ч 10-кратным мольным избытком дитиотрейта. Алкилирование проводили в течение 30 мин под азотом, используя двукратный избыток иодуксусной кислоты по отноше-

нию к дитиотренту. Реакционную смесь диализовали против воды и лиофильно высушивали.

*Сукцинилирование Ст-РНКазы P. brevicompactum* проводили в 0,3 М  $\text{NaHCO}_3$ , рН 9,0, в присутствии 6 М гуанидинхлорида, используя 500-кратный избыток янтарного ангидрида относительно аминокрупп белка рН в ходе реакции поддерживали в течение 30 мин добавлением 0,2 М  $\text{NaOH}$ .

*Протеолиз Ст-РНКазы P. brevicompactum* стафилококковой протеиназой, карбоксипептидазой Y или трипсином (в последнем случае был использован также сукцинилированный препарат белка) проводили в 0,1 М этилморфолинацетатном буфере соответственно при рН 7,8; 5,5 и 8,0, температуре 37° С и соотношении ферментов к субстрату 1 : 50. Время гидролиза стафилококковой протеиназой — 9 ч, трипсином — 4 ч.

Кинетику расщепления белка карбоксипептидазой прослеживали при анализе аликвот реакционной смеси на анализаторе Biotronik LC7000 (ФРГ).

*Автоматическую деградацию по Эдману* проводили на секвенаторе Beckman 890С в соответствии с 0,1 М квадрольной программой № 122 974, в которой уменьшено время экстракции этилацетатом (300 с) и увеличено время высушивания препарата перед реакцией отщепления (300 с).

При анализе пептидных гидролизатов и в случае 78-стадийной деградации РНКазы деградацию проводили с использованием полибрена [16]. Первому циклу деградации предшествовал «нулевой» цикл — без добавления фенилизотиоцианата. На определенных стадиях процесс автоматической деградации прерывали и проводили двукратную обработку пептидных смесей в реакционной ячейке секвенатора флуорескампимом [14].

В случае использования фенил[ $^{14}\text{C}$ ]изотиоцианата программу автоматического секвенирования останавливали на стадии реакции сочетания. Раствор фенил[ $^{14}\text{C}$ ]изотиоцианата в гептане вводили в реакционную ячейку секвенатора, после чего программу деградации продолжали до стадии высушивания реакционной смеси (стадия 35 программы № 122 974, Beckman). Очередной цикл деградации начинали с первой стадии стандартной программы.

*Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот* осуществляли на пластинках (6,5×6,5 см) Kieselgel F<sub>254</sub>, проводя хромато-обратного гидролиза производных 5 н. НI при 150° С в течение 4 ч [17]. В последнем случае аминокислоты детектировали с использованием нингидрина или *o*-фталевого дигальдегида.

ГЖХ проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5710А (США) с использованием стеклянных колонок (120×0,2 см) с 10% SP-400 на хромосорбе W в следующем температурном режиме: начальная и конечная температура колоночного термостата 190 и 290° С соответственно, температурный градиент 8° С/мин. Анализ Ser, Thr, Asp, Asn, Glu и Glu проводили в форме триметилсилильных производных, полученных при обработке образца N, O-бис(триметилсилил)ацетамидом [18].

Одномерную ТСХ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли на пластинках (6,5×6,5 см) Kieselgel F<sub>254</sub>, проводя хроматографирование последовательно в трех системах: два раза в смеси  $\text{CHCl}_3$ — $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (25 : 0,3) и один раз в  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$  (18 : 1) и  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  (4 : 1). Фенилтиогидантоиновые производные аргинина и гистидина разделяли в системе  $\text{CHCl}_3$ — $\text{CH}_3\text{OH}$ — $\text{HCO}_2\text{H}$  (6 : 4 : 1).

*Конверсию анилинтиазолиновых производных аминокислот*, полученных в ходе автоматической деградации, проводили в 1 н.  $\text{HCl}$  при 80° С в течение 10 мин с последующей трехкратной экстракцией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот этилацетатом.

Выход фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на отдельных стадиях эдмановской деградации оценивали при нормировании экспериментально найденных количеств соответствующих аминокислот относительно внутреннего стандарта — фенилтиогидантоинового производного норлейцина. Последний вводился во фракции анилинтиазолинонов, подвергаемых конверсии.

Радиоактивность просчитывали в толуоловом сцинтиллаторе на спектрометре Intertechnique SL-30 (Франция).

Авторы выражают благодарность В. В. Петухову за составление программ обчета экспериментальных данных и технические консультации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Куликов В. А., Шляпников С. В., Яковлев Г. И. VI Всесоюз. симпоз. «Химия белков и пептидов». Тез. докл. Рига, 1983, с. 65.
2. Takahashi K. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 10, p. 4117-4119.
3. Heinemann U., Saenger W. Nature, 1982, v. 299, № 5878, p. 27-31.
4. Безбородова С. И., Ходова О. М., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1136-1138.
5. Поляков К. М., Вагин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн Б. К. Докл. АН СССР, 1983, т. 273, № 6, с. 1383-1386.
6. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И., Ботт В., Ежов В. А., Приходько А. Г. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1335-1347.
7. Hill G., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsuo Y., Nakamura K., Tischenko G., Polyakov K., Povlovsky A. Trends in Biochem. Sci., 1983, v. 8, № 10, p. 364-369.
8. Hartley R. W., Barker E. A. Nature New Biol., 1972, v. 235, № 53, p. 15-16.
9. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. Б., Северин Е. С., Голубенко И. А. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 187-202.
10. Watanabe H., Ohgi K., Irie M. J. Biochem., 1982, v. 91, № 5, p. 1495-1509.
11. Sato S., Uchida T. Biochem. J., 1975, v. 145, № 2, p. 353-360.
12. Yoshida N., Sasaki A., Rashid M. A., Otsuka H. FEBS Lett., 1976, v. 64, № 1, p. 122-125.
13. Tarr G. E. Methods in Enzymol., 1977, v. 47, pt E, p. 335-357.
14. Bhowm A. S., Bennet J. C., Morgan P. H., Mole J. E. Anal. Biochem., 1981, v. 112, № 1, p. 158-162.
15. Безбородова С. И., Суходольская Г. В., Гуляева В. И., Ильина Т. В. Прикл. биохим. и микробиол., 1974, т. 10, № 3, с. 432-437.
16. Klapper D. G., Wilde III C. E., Capra J. D. Anal. Biochem., 1978, v. 85, № 1, p. 126-131.
17. Smithies O., Gibson D., Fanning E. M., Goodfiesh R. M., Gilman J. G., Ballantyne D. L. Biochemistry, 1974, v. 10, № 26, p. 4912-4921.
18. Pisano J. J., Bronzert T. J. J. Biol. Chem., 1969, v. 224, № 20, p. 5597-5607.

Поступила в редакцию  
4.IX.1984

#### PRIMARY STRUCTURE OF GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE FROM *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM* FUNGI

KULIKOV V. A., SHLYAPNIKOV S. V., YAKOVLEV G. I.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The RNase amino acid sequence has been determined using automated Edman degradation of S-carboxymethylated enzyme and of the mixtures of peptides obtained on the RNase digestion by staphylococcal protease and trypsin. C-Terminal sequence of the enzyme was established on the basis of kinetic analysis of the RNase hydrolysis by carboxypeptidase Y. The position of the RNase disulfide bridges was determined: Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>10</sup> and Cys<sup>6</sup>-Cys<sup>101</sup>. RNase *P. brevicompactum* molecule consists of a single polypeptide chain and contains 102 amino acid residues,  $M_r$  10 801.