



УДК 577.152.1'13:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

20S, 22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА
P-450 ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКАIII *. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ
ГИДРОЛИЗЕ ФРАГМЕНТА Ф₂ ПРОТЕИНАЗОЙ
ИЗ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Чащин В. Л., Адамович Т. Б., Ланко В. Н.,
Буркина Н. С., Ланко А. Г., Кириллова Н. М.,
Ахрем А. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Проведено изучение первичной структуры фрагмента Ф₂, образующегося в результате ограниченного гидролиза нативной молекулы цитохрома P-450 трипсином. Осуществлен гидролиз фрагмента Ф₂ протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Из гидролизата выделено 18 гомогенных пептидов, охватывающих всю полипептидную цепь фрагмента. Установлена полная аминокислотная последовательность 16 пептидов и частичная — 2. Полученные данные в совокупности с результатами изучения структуры химо триптических пептидов цитохрома P-450 и триптических пептидов фрагмента Ф₂ позволили осуществить реконструкцию шести пептидных блоков фрагмента Ф₂, включающих в себя 203 аминокислотных остатка.

Ограниченный гидролиз нативного цитохрома P-450 трипсином приводит к образованию двух фрагментов — Ф₁ (M_r 30 000) и Ф₂ (M_r 27 000) [2]. Нами установлено, что ограниченный трипсинолиз цитохрома P-450 происходит в результате преимущественного гидролиза двух пептидных связей,

локализованных во фрагменте Gln-Asp-Leu-Arg-Arg-Lys-Thr-Glu-Phe-Arg-Asn, включающем в себя пептид C-XXX-1, образующийся при исчерпывающем химо триптическом гидролизе цитохрома P-450 [3]. В предыдущем сообщении [1] приведены данные по изучению аминокислотной последовательности пептидов, полученных при гидролизе фрагмента Ф₁ протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Результатом исследования явилось установление частичной аминокислотной последовательности фрагмента Ф₁, представляющего N-концевую часть белка.

Настоящая работа посвящена изучению первичной структуры фрагмента Ф₂, являющегося C-концевой частью полипептидной цепи цитохрома P-450.

Фрагмент Ф₂ представляет собой смесь трех полипептидных цепей, различающихся лишь N-концевой частью и содержащих в качестве N-концевых аминокислотные остатки Lys, Thr и Asn [4]. Их образование можно объяснить отщеплением от исходного фрагмента с N-концевой последовательностью Lys-Thr-Glu-Phe-Arg-Asn остатка лизина и тетрапептида.

Для установления аминокислотной последовательности фрагмента Ф₂ был проведен его исчерпывающий триптический гидролиз [5]. Из триптического гидролизата были выделены и охарактеризованы 18 пептидов, содержащих более 50% аминокислотных остатков, входящих в состав фрагмента Ф₂ [5]. В качестве следующего этапа изучения первичной структуры фрагмента Ф₂ был выбран гидролиз стафилококковой глутаминспецифичной протеиназой с целью выделения пептидов, перекрывающих триптические пептиды фрагмента Ф₂ и химо триптические пептиды цитохрома P-450. Как и в случае фрагмента Ф₁, гидролиз карбоксиметилированного

* Сообщение II см. [1]. Принятые сокращения: Dns — дансил, Pth — фенилтиогидантоин.

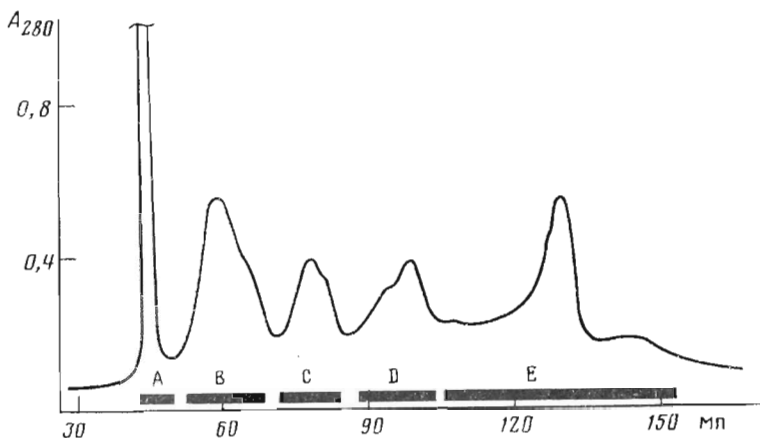


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных при гидролизе малеинированного фрагмента-СМ Φ_2 протеиназой из *St. aureus* на колонке (1,5×100 см) с биогеелем Р-30 в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 7,8. Здесь и далее прямоугольниками отмечены границы объединения фракций

фрагмента Φ_2 (СМ- Φ_2) протеиназой из *St. aureus* проводили на малеинированном препарате, поскольку добиться достаточной глубины расщепления СМ- Φ_2 вследствие его низкой растворимости не удалось.

Гидролизат СМ- Φ_2 первоначально разделяли на колонке с биогеелем Р-30 (рис. 1). В результате было получено пять фракций: А, В, С, D и Е. Фракция А содержала незначительное количество пептидного материала и далее не исследовалась. Фракция В содержала 53-членный пептид G12 с N-концевым остатком валина. Фракция С представляла собой смесь в основном двух пептидов с N-концевыми остатками метионина и глицина. После их разделения на биоэле Р-6 были получены три фракции (С-I — С-III) (рис. 2). Из фракции С-I после дополнительной хроматографии на биоэле Р-30 в 80% муравьиной кислоте был выделен в индивидуальном состоянии пептид G15*. Разделение фракции С-II на сервахроме Si 100 С8 позволило получить пептид G8+9. Фракция С-III содержала небольшие количества пептидов G4 и G10, которые были выделены ионообменной хроматографией из фракции D.

Хроматография фракции D, представляющей собой сложную смесь пептидов, на колонке с аминоксом 50W×4 позволила получить в индивидуальном состоянии пептиды G1, G1-1, G3, G4, G9, G10, G11 (рис. 3). Однако при этом не удалось выделить пептид с N-концевым остатком лейцина, который содержался в исходной фракции D. Сочетание гель-фильтрации на биоэле Р-6 с последующей хроматографией на сервахроме позволило в дополнение к ранее выделенным из фракции D пептидам получить 12-членный пептид G13 с N-концевым остатком лейцина (рис. 4).

Для разделения небольших по молекулярной массе пептидов фракции Е использовали ионообменную хроматографию на аминоксе 50W×4 (рис. 5), в результате которой были выделены индивидуальные пептиды G1-2, G2, G3, G5, G6, G7, G8, G14. Каждый из метионинсодержащих пептидов (G2 и G6) элюировался двумя отдельными пиками, что, вероятно, связано с частичным окислением остатков метионина в процессе выделения пептидов.

Гомогенность всех полученных пептидов оценивалась с помощью N-концевого аминокислотного анализа (дансильным методом).

Таким образом, из продуктов гидролиза фрагмента Φ_2 протеиназой из *St. aureus* удалось выделить в гомогенном состоянии 18 пептидов, аминокислотный состав которых представлен в табл. 1.

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали в основном по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-произ-

* Нумерация пептидов соответствует порядку их расположения в первичной структуре фрагмента Φ_2 .

Рис. 2. Разделение фракции С (рис. 1) на колонке (1,2×100 см) с биогеом Р 6 в 50% уксусной кислоте

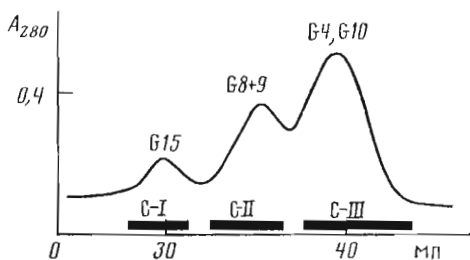


Рис. 2

Рис. 3. Разделение фракции D (рис. 1) на колонке (0,6×35 см) с аминоксом 50 W×4 в градиенте концентрации (0,1–2,0 М) пиридин-ацетата и pH (2,7–5,0) (см. «Экспер. часть»). Пунктиром показано изменение содержания буфера Б в буфере А

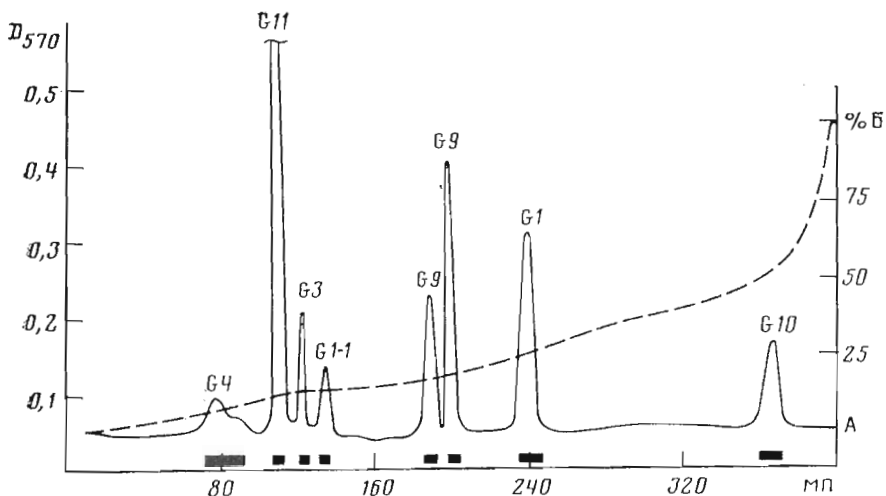


Рис. 3

водных. Для определения остатков Asn, Asp, Gln и Glu использовали методику Розо [6], а в некоторых случаях — ферментативный гидролиз с помощью аминопептидазы с последующим аминокислотным анализом полученной смеси. С-Концевую аминокислотную последовательность отдельных пептидов устанавливали с помощью карбоксипептидаз А и Y.

Результаты определения аминокислотных последовательностей ряда коротких пептидов приведены в табл. 2. Аминокислотная последовательность более длинных пептидов, для установления структуры которых потребовались дополнительные гидролизы, описана ниже.

Пептид G1. Ручным методом Эдмана (в дансильной модификации) удалось определить последовательность 12 аминокислотных остатков с N-конца пептида, за исключением аминокислотного остатка в положении 10. Для установления полной структуры пептид был гидролизован химотрипсином, и после разделения полученного гидролизата методом пептидных карт на пластинках с тонким слоем целлюлозы были выделены 3 пептида (табл. 3). При определении их строения оказалось, что пептид G1-C-1 является N-концевым участком пептида G1, а пептид G1-C-3, содержащий глутаминовую кислоту на C-конце, — C-концевым участком. Наличие карбоксиметилцистеина в 10-м положении с N-конца пептида G1 было установлено в результате определения аминокислотной последовательности пептида G1-C-2. Строение пептида G1-2 (см. табл. 2), являющегося продуктом неспецифического расщепления протеиназой из *St. aureus* связи Cys(Cm)-Leu во фрагменте Φ_2 , подтвердило полную аминокислотную последовательность пептида G1.

Пептид G1-1. Данные по аминокислотному составу и N-концевой аминокислотной последовательности пептида G1-1 показали, что он представляет собой пептид G1, укороченный на 2 аминокислотных остатка с N-конца (см. табл. 3). Таким образом, пептид G1-1 является N-концевой частью

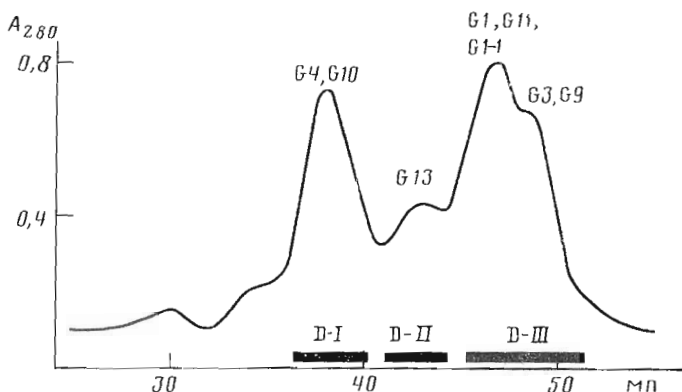


Рис. 4. Гель-фильтрация фракции D (рис. 1) на колонке (1,2×106 см) с биогелем Р-6 в 50% уксусной кислоте

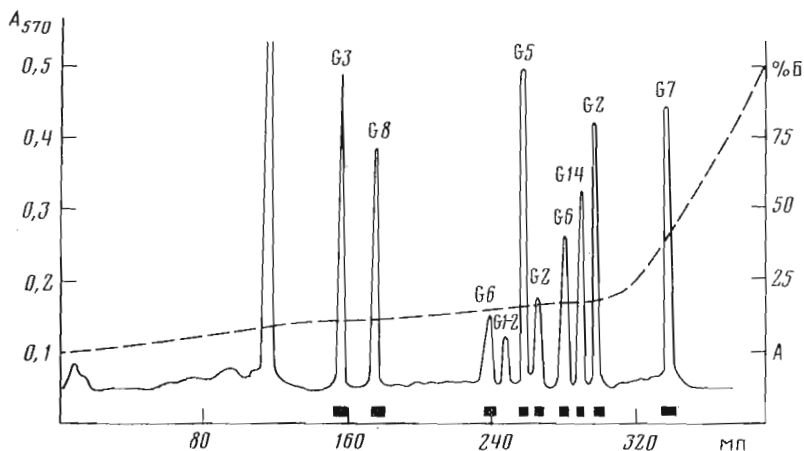


Рис. 5. Разделение фракции E (рис. 1) на колонке (0,6×35 см) с аминоксом 50 W×4 в градиенте концентрации (0,1–2,0 М) пиридинацетата и рН (2,7–5,0) (см. «Экспер. часть»). Пунктиром показано изменение содержания буфера Б в буфере А

одной из трех полипептидных цепей фрагмента Φ_2 , образующихся при ограниченном трипсинолизе нативного цитохрома Р-450.

Пептид G4. N-Концевую аминокислотную последовательность пептида G4, включающую в себя 12 аминокислотных остатков и совпадающую с C-концевой частью пептида Т-II-1 фрагмента Φ_2 [5], установили ручным вариантом метода Эдмана. Для определения полной структуры пептид был подвергнут гидролизу химотрипсином. При разделении химотриптического гидролизата на колонке с сервахромом Si 100 C8 были выделены все три пептида, составляющие пептид G4. При определении структуры пептида G4-C-1 по методу Эдмана, как и в случае пептида G4, не удалось идентифицировать аминокислотный остаток в 9-м положении. Исследование аминокислотных последовательностей пептидов G4-C-2 и G4-C-3, совпадающих со структурой химотриптических пептидов С-XVII и С-XXXIII-5 цитохрома Р-450 [3], позволило установить аминокислотную последовательность пептида G4.

Пептид G11 и G12. Данные пептиды были выделены с низким выходом. Используя метод Эдмана в дансильной модификации, удалось установить лишь их N-концевые аминокислотные последовательности (см. табл. 3). С помощью карбоксипептидазы А на С-конце пептида G11 был определен остаток глутамина. Так как N-концевая аминокислотная последовательность пептида G11 совпадала с C-концевой частью триптического пептида Т-II-3 фрагмента Φ_2 [5], была предложена частичная структура данного пептида. Изучение структуры пептида G12 было затруднено тем, что

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе фрагмента Φ_2 цитохрома P-450 протеиназой из *St aureus*

Аминокислота	Φ_2	G1	G1-1	G1-2	G2	G3	G4
Cys(Cm)	1,89 (2)	0,58 (1)	0,58 (1)				
Asp	22,01 (22)	0,93 (1)	0,93 (1)			1,94 (2)	1,12 (1)
Thr	12,14 (12)					0,92 (1)	2,55 (3)
Ser	11,47 (11)	0,96 (1)	0,96 (1)	0,78 (1)			0,99 (1)
Glu	25,21 (25)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,20 (1)	2,15 (2)
Pro	12,14 (12)	1,00 (1)	1,00 (1)				
Gly	11,20 (11)	0,98 (1)	0,98 (1)				2,03 (2)
Ala	12,28 (12)					1,08 (1)	1,00 (1)
Val	14,67 (15)					0,96 (1)	1,07 (1)
Met	10,81 (11)				0,71 (1)		1,99 (2)
Ile	13,57 (14)	0,84 (1)	0,84 (1)			1,05 (1)	
Leu	27,57 (28)	2,68 (3)	2,68 (3)	1,72 (2)	1,82 (2)		3,36 (3)
Tyr	6,40 (6)	1,70 (2)	1,70 (2)				0,77 (1)
Phe	11,20 (11)	0,94 (1)					
His	5,33 (5)						0,74 (1)
Lys	12,94 (13)	1,01 (1)	1,01 (1)	0,98 (1)	0,90 (1)	1,00 (1)	
Arg	13,34 (13)	1,04 (1)					
Trp	2,93 (3)						0,86 (1)
Число остатков	226	15	13	5	5	8	19
N-Концевая		Phe	Asn	Leu	Lys	Asp	Met
Выход, %		14	13	1,6	18	21	23

Аминокислота	G5	G6	G7	G8	G9	G8+9	G10
Cys(Cm)							
Asp	1,00 (1)		1,00 (1)	1,00 (1)		1,00 (1)	
Thr							1,98 (2)
Ser	0,98 (1)			0,96 (1)	0,94 (1)	1,90 (2)	0,94 (1)
Glu	2,15 (2)	2,00 (2)	2,06 (2)	1,21 (1)	1,00 (1)	2,21 (2)	2,00 (2)
Pro					1,00 (1)	1,00 (1)	2,07 (2)
Gly				1,02 (1)		1,02 (1)	
Ala	1,12 (1)		1,90 (2)		1,10 (1)	1,10 (1)	
Val	1,00 (1)		0,89 (1)		1,07 (1)	1,07 (1)	1,03 (1)
Met	0,98 (1)	0,87 (1)		0,93 (1)	0,78 (1)	1,85 (2)	
Ile				1,00 (1)	0,84 (1)	1,84 (2)	1,07 (1)
Leu	1,24 (1)	1,10 (1)	1,06 (1)	1,10 (1)	1,94 (2)	3,06 (3)	2,84 (3)
Tyr							0,86 (1)
Phe							
His							0,93 (1)
Lys				0,98 (1)	1,87 (2)	2,88 (3)	
Arg	0,97 (1)	1,00 (1)	1,94 (2)				1,96 (2)
Trp							
Число остатков	9	5	9	8	11	19	16
N-Концевая	Met	Met	Val	Gly	Met	Gly	Thr
Выход, %	21	18	20	12	10	16	15

после снятия малеинильной защиты пептид имел очень низкую растворимость в водных буферах. В результате гидролиза суспензии пептида трипсином и разделения полученной смеси пептидов хроматографией на колонке с сервахромом Si 100 C8 были выделены лишь 2 пептида, аминокислотные последовательности которых совпадали со структурой пептидов T-V-4 и T-VIII фрагмента Φ_2 [5]. Полную аминокислотную последовательность пептида G12 установить не удалось вследствие недостатка пептидного материала.

Пептид G15. При определении последовательности ручным методом Эдмана (в дансильном варианте) после первого цикла деградации, в ре-

Аминокислота	G11	G12	G13	G14	G15
Cys(Cm)		0,64(1)			
Asp	2,14(2)	6,03(6)		0,83(1)	5,65(6)
Thr	0,94(1)	0,97(1)	0,94(1)		1,68(2)
Ser	1,26(1)	3,16(3)			
Glu	2,31(2)	2,49(2)	2,10(2)	1,14(1)	3,38(3)
Pro	1,00(1)	3,00(3)			4,89(5)
Gly		5,40(5)			1,19(1)
Ala	1,04(1)	3,86(4)			1,05(1)
Val	1,80(2)	2,60(3)		1,00(1)	1,80(2)
Met		0,82(1)	0,82(1)		0,64(1)
Pe	1,16(1)	2,52(3)	1,84(2)		3,59(4)
Leu	3,59(4)	3,06(3)	3,86(4)		2,89(3)
Tyr	0,90(1)	0,91(1)			
Phe		4,60(5)	1,00(1)	1,00(1)	3,54(4)
His		0,94(1)	0,85(1)		0,76(1)
Lys	1,00(1)	3,14(3)		0,98(1)	1,32(1)
Arg		6,07(6)			1,00(1)
Trp		1,89(2)			
Число остатков	17	53	12	5	35
N-Концевая	Ser	Val	Leu	Asn	Met
Выход, %	3,5	5	16	10	19

зультате которого был идентифицирован глутамин, дальнейший анализ оказался невозможным, так как остаток глутамина превратился в пироглутаминовую кислоту. С целью превращения пироглутаминовой кислоты в глутаминовую остаток пептида обрабатывали как описано нами ранее [1], а затем определяли его аминокислотную последовательность. В результате было идентифицировано 7 N-концевых аминокислотных остатков. Для установления полной структуры пептид был гидролизован химотрипсином и термолизинном. Полученные смеси пептидов были разделены высокоэффективной хроматографией на колонке с Ultrasphere ODS в градиенте ацетонитрила в 0,05% трифторуксусной кислоте.

Данные, полученные при исследовании структуры всех выделенных пептидов (см. табл. 3), позволили установить полную аминокислотную последовательность пептида G15.

Анализ структуры изученных пептидов показал, что гидролиз малсинированного CM-Ф₂ протеиназой из *St. aureus* прошел в соответствии со специфичностью фермента. Наблюдалось расщепление 13 из 15 связей, образованных остатками глутаминовой кислоты. Не гидролизовались лишь связи Glu-Glu (пептид G6) и Glu-Met (пептид G13), что объясняется расположением этих связей вблизи N-конца пептида G13 и C-конца пептида G6. Кроме того, имело место расщепление двух пептидных связей, образованных остатками глутамина. Гидролиз связи Gln-Met в пептиде G8+9 привел к образованию пептидов G8 и G9. В случае пептида G11 в качестве C-концевой аминокислоты также был идентифицирован глутамин.

Неожиданным с точки зрения специфичности протеиназы из *St. aureus* явился гидролиз пептидной связи Cys(Cm)-Leu, в результате которого был получен с небольшим выходом пептид G1-2.

В отличие от фрагмента Ф₁ во фрагменте Ф₂ не обнаружено расщепления стафилококковой глутаминспецифичной протеиназой пептидных связей, образованных α-карбоксыльными группами аспарагиновой кислоты.

Таким образом, в результате расщепления CM-Ф₂ протеиназой из *St. aureus* и разделения образовавшейся смеси фрагментов выделены 18 пептидов, для 16 из которых установлена полная аминокислотная последовательность. Полученные результаты наряду с данными по аминокислотной последовательности триптических пептидов фрагмента Ф₂ и химотриптических пептидов цитохрома P-450 позволили локализовать поло-

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных при гидролизе фрагмента Φ_2 протеиназой из *St. aureus**

Пептид	Аминокислотная последовательность
G1-2	Leu-Leu-Lys-Ser-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad}$
G2	Lys-Met-Leu-Leu-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad}$
G3	Asp-Val-Lys-Ala-Asn-Ile-Thr-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad}$
G5	Met-Ala-Arg-Ser-Leu-Asn-Val-Gln-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad}$
G6	Met-Leu-Arg-Glu-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad}$
G7	Val-Leu-Asn-Ala-Arg-Arg-Gln-Ala-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad}$
G8	Gly-Asp-Ile-Ser-Lys-Met-Leu-Gln $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad}$
G9	Met-Val-Pro-Ileu-Leu-Lys-Ala-Ser-Ile-Lys-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad}$
G8+9	Gly-Asp-Ile-Ser-Lys-Met-Leu-Gln-Met-Val-Pro-Leu-Leu-Lys-Ala-Ser-Ile- Lys-Glu
G10	Thr-Leu-Arg-Leu-His-Pro-Ile-Ser-Val-Thr-Leu-Glx-Arg-Tyr-Pro-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad}$
G13	Leu-Glu-Met-Thr-Leu-Phe-Leu-Ile-His-Ile-Leu-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad} \overleftarrow{\quad}$
G14	Asn-Phe-Lys-Val-Glu $\overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad} \overrightarrow{\quad}$

* $\overrightarrow{\quad}$ — определение аминокислотной последовательности ручным вариантом метода Эдмана (в дансильной модификации); $\overleftarrow{\quad}$ — определение аминокислотной последовательности автоматическим методом Эдмана; $\overrightarrow{\quad}$ — определение N-концевой аминокислотной последовательности с помощью аминоклептидазы; $\overleftarrow{\quad}$ — определение C-концевой аминокислотной последовательности с помощью карбоксипептидазы Y; $\overleftarrow{\quad}$ — определение G-концевой аминокислотной последовательности с помощью карбоксипептидазы A.

жение ряда пептидных блоков фрагмента Φ_2 (схема 1), объединяющих в своем составе 203 аминокислотных остатка.

Наши данные по частичной аминокислотной последовательности фрагмента Φ_2 полностью совпали с недавно опубликованными результатами, выведенными на основании изучения нуклеотидной последовательности участка гена, кодирующего митохондриальный холестерингидроксилирующий цитохром P-450 [7].

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин, химоитрипсин, термолизин, карбоксипептидаза А (Serva, ФРГ), протеиназа из *St. aureus*, карбоксипептидаза Y (Pierce, США), пептидаза (Sigma, США), биогели Р-6, Р-30 (-400 меш), катионообменная смола Aminex 50W×4 (Bio-Rad, США), Servachrom Si 100 C8 (5 мкм, Serva, ФРГ), реактивы для автоматического метода Эдмана (Fluka, Швейцария), β -меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), хлоргидрат гуанидина (Serva, ФРГ), Dns-хлорид, Dns-аминокислоты (Serva, ФРГ), Pth-аминокислоты (Pierce, США). Ацетонитрил для ВЭЖХ перегоняли над KMnO_4 и P_2O_5 . Моноiodуксусную кислоту дважды перекристаллизовывали из гептана непосредственно перед использованием. Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч.

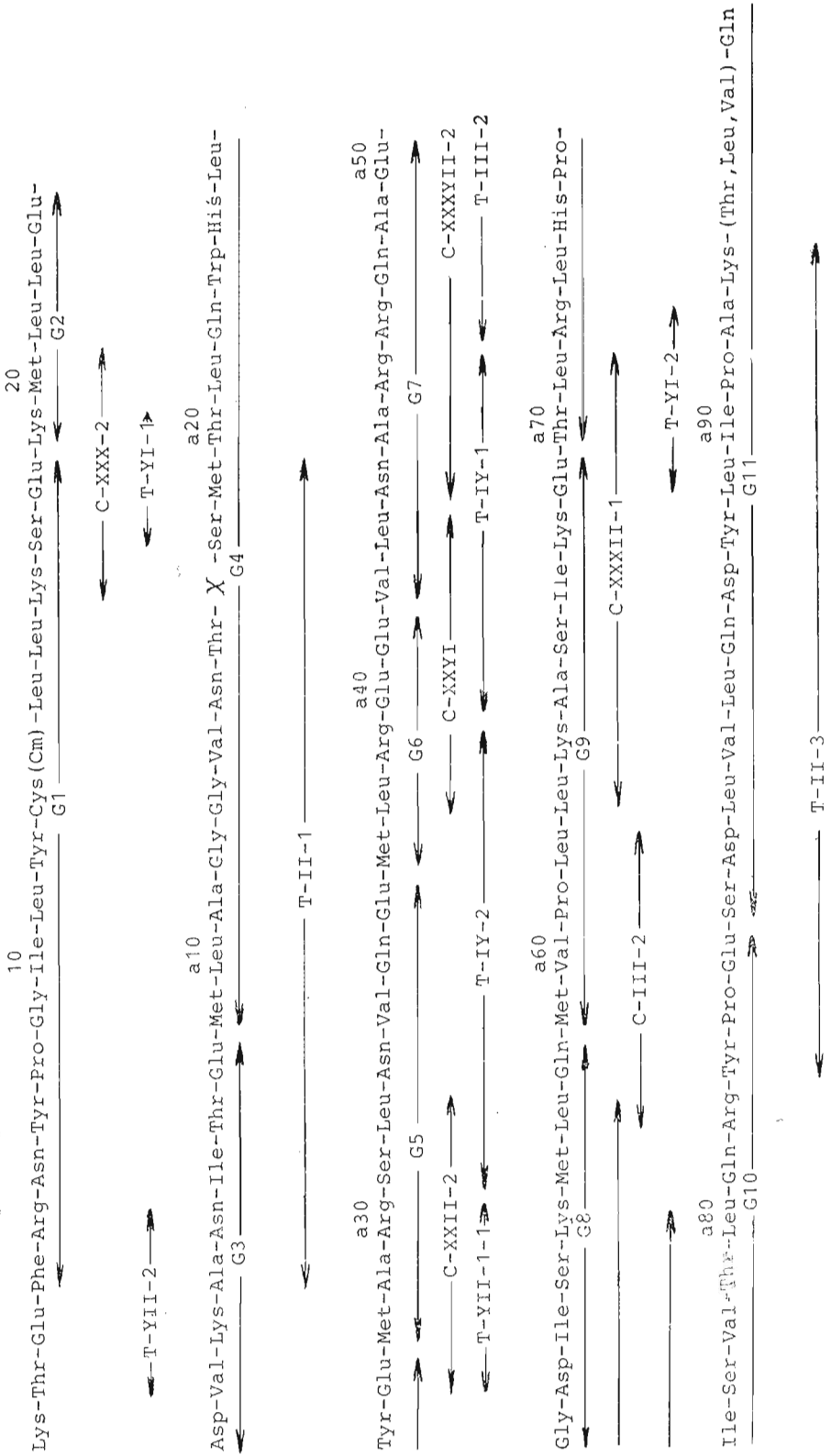
Выделение фрагмента Φ_2 цитохрома P-450 ковалентной хроматографией на активированной тиопропилсефарозе описано в работе [2]. Карбоксиметилирование и малеинирование фрагмента Φ_2 проводили так же, как и в случае фрагмента Φ_1 [1].

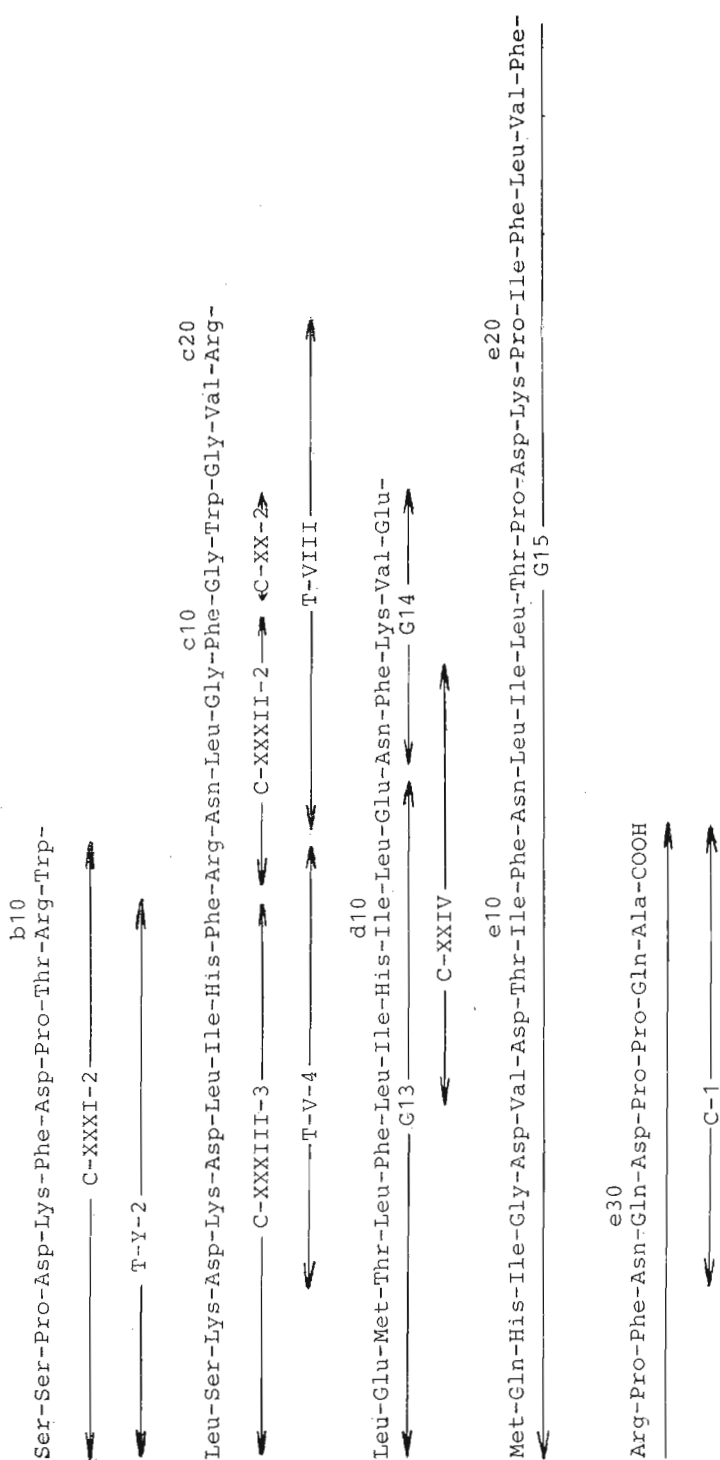
Гидролиз малеинированного СМ- Φ_2 протеиназой из *St. aureus*. 2,2 мкмоль СМ- Φ_2 гидролизовали протеиназой из *St. aureus* 24 ч при 37°С

Структура пептидов, строение которых определяется с помощью дополнительных гидролизом

Пептид	Аминокислотная последовательность
G1	Phe-Arg-Asn-Tyr-Pro-Gly-Ile-Leu-Tyr-Cys(Cm)-Leu-Leu-Lys-Ser-Glu
G1-C-1	Phe-Arg-Asn-Tyr-Pro-Gly-Ile-Leu-Tyr
G1-C-2	Cys(Cm)-Leu-Leu
G1-C-3	Lys-Ser-Glu
G1-1	Asn-Tyr-Pro-Gly-Ile-Leu-Tyr-Cys(Cm)-Leu-Leu-Lys-Ser-Glu
G4	Met-Leu-Ala-Gly-Gly-Val-Asn-Thr-X-Ser-Met-Thr-Leu-Gln-Trp-His-Leu-Tyr-Glu ← T-II-1 → C-XVII ← C-XXXIII-5 →
G4-C-1	Met-Leu-Ala-Gly-Gly-Val-Asn-Thr-X-Ser-Met
G4-C-2	Thr-Leu-Gln-Trp ← T-II-1 → C-XVII ← C-XXXIII-5 →
G4-C-3	His-Leu-Tyr-Glu
G11	Ser-Asp-Leu-Val-Leu-Gln-Asp-Tyr-Leu-Ile-Pro-Ala-Lys-(Thr, Leu, Phe)-Gln ← T-II-3 →

Пептид	Амнокислотная последовательность
G12	Val-Ala-Ile-(Cys(Cm)), Aspe, Thr, Set ₃ , Glu, Pro ₃ , Gly ₅ , Ala ₂ , Val ₂ , Met, Ile, Leu ₃ , Tyr, Phe ₅ , His, Lys ₃ , Arg ₆ , Trp ₂)-Ile-Ala-Glu
G15	Met-Gln-His-Ile-Gly-Asp-Val-Asp-Thr-Ile-Phe-Asn-Leu-Ile-Leu-Thr-Pro-Asp-Lys-Pro-Ile-Phe-Leu-Val-Phe-Arg-Pro-Phe-Asn-Gln-Asp-Pro-Gln-Ala
G15-C-1	Met-Gln-His-Ile-Gly-Asx-Val-Asx-Thr-Ile-Phe
G15-C-2	Asn-Leu-Ile-Leu-Thr-Pro-Asx-X-Pro-Ile-Phe-Leu
G15-C-3	Val-Phe-Arg-Pro-Phe
G15-C-4	Asn-Gln-Asp-Pro-Gln-Ala
G15-Th-1	Met-Gln-His-Ile-Gly-Asp
G15-Th-2	Val-Asp-Thr
G15-Th-3	Ile-Phe-Asn-Leu-Ile
G15-Th-4	Leu-Thr-Pro-Asp-Lys-Pro-Ile
G15-Th-5	Phe-Leu-Val
G15-Th-6	Phe-Arg-Pro
G15-Th-7	Phe-Asx-Glx-Asx-Pro-Pro-Gln-Ala





Частичная аминокислотная последовательность фрагмента Φ_2 цитохрома P-450. Полипептидные блоки, входящие во фрагмент Φ_2 , пронумерованы с N-конца каждого. Аминокислотные остатки 2-5 блоков обозначены префиксами a, b, c, d, e, G, C, T — пептиды, полученные при гидролизе фрагмента Φ_2 протеиназой из *St. aureus*; при химотриптическом гидролизе цитохрома P-450; при триптическом гидролизе фрагмента Φ_2 соответственно.

при соотношении фермент — субстрат 1 : 30 (по весу). Гидролиз останавливали лиофилизацией. Разделение гидролизата проводили на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30. Скорость элюирования 2,4 мл/ч (рис. 1).

Для удаления малеинильной защитной группы пептидный материал инкубировали 24 ч при 37° С в 50% уксусной кислоте.

Разделение пептидов фракции С после предварительного демалеинирования проводили на колонке (1,2×100 см) с биогелем Р-6 в 50% уксусной кислоте (рис. 2). Скорость элюирования 1,2 мл/ч. Фракцию С-I подвергали дополнительной гель-фильтрации на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте (колонка 1,5×100 см). Скорость элюирования 2,2 мл/ч.

Фракцию С-II разделяли на колонке (0,6×25 см) с сервахромом Si 100 С8 в градиенте концентрации ацетонитрила (0—90%) в 0,05% трифторуксусной кислоте. Скорость элюирования 25 мл/ч, время изменения градиента 5 ч.

Разделение пептидов фракций D и E. Ионообменную хроматографию пептидов фракций D и E осуществляли на пептидном анализаторе [3], используя колодку (0,6×35 см) с амцексом 50W×4. Пептиды элюировали летучими пиридин-ацетатными буферами (буфер А — 0,1 М, рН 2,7; буфер Б — 2,0 М, рН 5,0). Скорость элюирования 20 мл/ч, температура рубашки колонки 45° С.

Гель-фильтрацию фракции D проводили в 50% уксусной кислоте на колонке (1,2×100 см) с биогелем Р-6 (рис. 4). Пептид G13 получен хроматографией фракции D-II на колонке с сервахромом Si 100 С8 в условиях, аналогичных разделению фракции С-II.

Гидролиз пептидов G1, G4 химотрипсином. 0,2 мкмоль пептида растворяли в 1,2 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,3, и добавляли химотрипсин в фермент-субстратном соотношении 1 : 50 (по весу). Гидролиз осуществляли в течение 4 ч, затем гидролизат лиофильно высушивали и разделяли.

Химотриптический гидролизат пептида G1 разделяли методом пептидных карт на пластинках (20×20 см) с толким слоем целлюлозы Whatman N 300 (Англия). Электрофорез проводили в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,4, в течение 60 мин в приборе с жидкостным охлаждением (Savant, США) при напряжении 800 В, а хроматографию — в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 12) (система С). Пептиды обнаруживали по реакции с флуорескаминол.

Химотриптический гидролизат пептида G4 хроматографировали на колонке (0,8×35 см) с сервахромом Si 100 С8 в градиенте ацетонитрила (0—80%) в 0,05% трифторуксусной кислоте.

Триптический гидролиз пептида G12. 0,8 мкмоль пептида G12 суспендировали в 1,5 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,3, и добавляли трипсин тремя равными порциями (через 2 и 4 ч) до соотношения 1 : 30 (по весу). Гидролиз проводили 24 ч при 37° С. Гидролизат лиофилизировали, растворяли в 50% муравьиной кислоте и разделяли на колонке (0,8×35 см) с сервахромом Si 100 С8 в условиях, описанных для разделения фракции С-II.

Химотриптический гидролиз пептида G15. 0,2 мкмоль пептида растворяли в 1,5 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,2, и гидролизовали химотрипсином при 37° С в течение 16 ч (фермент-субстратное соотношение 1 : 50 (по весу)). Гидролиз останавливали лиофилизацией.

Термолитический гидролиз пептида G15. 0,15 мкмоль пептида растворяли в 1,4 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8,2. Гидролиз проводили при 37° С в течение 5 ч при фермент-субстратном соотношении 1 : 30 (по весу), а затем гидролизат лиофильно высушивали.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию химотриптического и термолитического гидролизатов пептида G15 проводили на хроматографе Altex, модель 344 (Altex, США) с проточным спектрофотометром Altex, модель 160. При разделении использовали колодку (0,46×25 см) с носителем Ultrasphere ODS, 5 мкм. Гидролизаты разделяли в градиенте концентрации ацетонитрила (0—70% для химотриптического и 0—45% для термолитического гидролизата) в 0,05% трифторуксусной кислоте, время изменения градиента 60 мин.

Аминокислотный анализ фрагмента F_2 и пептидов (условия гидролиза см. [3]) выполняли на аминокислотных анализаторах LKB 3201 (LKB, Швеция) и Biotronik LC 2000 (Biotronik, ФРГ).

Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков. N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом [8], а также с помощью пептидазы (Sigma, США), обладающей аминопептидазной активностью. 0,002–0,004 мкмоль пептида растворяли в 20 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 7,1, и инкубировали 20–30 мин при 37° С с 5 мкг пептидазы, растворенной в том же буфере. Реакцию останавливали подкислением реакционной смеси 50% уксусной кислотой до рН 3,0. После высушивания смесь исследовали на аминокислотном анализаторе. Определение C-концевых аминокислот проводили с помощью карбоксипептидаз А [9] и Y [10].

Установление аминокислотной последовательности пептидов методом Эдмана (в дансильной модификации) осуществляли согласно методике [11]. Для идентификации Dns-производных аминокислот использовали тонкослойную хроматографию на силикагеле и на полиамидных пластинках F 1700 (Schleier und Schüll, ФРГ).

Определение аминокислотной последовательности автоматическим методом проводили на твердофазном секвенаторе модели APS-240 (Rank Hilger, Англия), как описано в работе [1].

Авторы выражают благодарность Н. А. Лобанову (Институт биоорганической химии АН БССР) за установление аминокислотной последовательности с помощью твердофазного секвенатора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чащин В. Л., Лапко В. П., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Курпина Н. С., Ахрем А. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 4, с. 455–470.
2. Чащин В. Л., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Ахрем А. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1690–1692.
3. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Курпина Н. С., Ахрем А. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1307–1320.
4. Chashchin V. L., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M., Lapko V. N., Adamovich T. B., Berikbaeva T. M., Akhrem A. A. Biochem. et biophys. acta, 1984, v. 791, № 3, p. 375–383.
5. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Курпина Н. С., Кирilloва Н. М., Ахрем А. А. Вестн АН БССР. Сер. хим. наук. 1985, № 3.
6. Roseau G., Pantel P. J. Chromatogr., 1969, v. 44, № 2, p. 392–395.
7. Morohashi K., Fujii-Kuriyama Y., Okada Y., Sogawa K., Hirose T., Inajama S., Omura T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 15, p. 4647–4651.
8. Gray W. R. In: Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 124–138.
9. Ambler R. P. Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972, v. XXV, p. 143–154.
10. Hayashi R. In: Methods in Enzymol./Ed. Hirs C. H. W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1977, v. XLVII, p. 84–93.
11. Bruton C. J., Hartly B. C. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 165–178.

Поступила в редакцию

19.XII.1984

После доработки

5.II.1985

PRIMARY STRUCTURE OF 20S. 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING CYTOCHROME P-450 FROM BOVINE ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA. III. STRUCTURAL INVESTIGATION OF PEPTIDES OBTAINED UPON HYDROLYSIS OF F_2 FRAGMENT WITH PROTEINASE FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

CHASHCHIN V. L., ADAMOVICH T. B., LAPKO V. N.,
KUPRINA N. S., LAPKO A. G., KIRILLOVA N. M., AKHREM A. A.
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the
Byelorussian SSR, Minsk

Primary structure of F_2 fragment resulting from limited trypsinolysis of the native cytochrome P-450 has been investigated. Hydrolysis of F_2 fragment with proteinase from *Staphylococcus aureus* afforded 18 homogeneous peptides covering the whole polipeptide chain of the fragment. Complete amino acid sequences were established for 16 peptides, two peptides being elucidated partially. The above data in combination with structural study of chymotryptic peptides of cytochrome P-450 and tryptic peptides of F_2 fragment led to reconstitution of six peptide blocks of F_2 fragment comprising 203 amino acid residues.