



УДК 577.412.5:591.145.2

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НЕЙРОТОКСИНОВ
IV И V ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
Академии наук СССР, Владивосток

Методом автоматической деградации установлены аминокислотные последовательности выделенных из актинии *Radianthus macrodactylus* нейротоксинов RTX-IV и RTX-V, содержащих 48 и 47 аминокислотных остатков соответственно. Для идентификации триптофана-30 в токсине RTX-IV исследовались пептиды, полученные в результате гидролиза токсина трипсином и химотрипсином. Анализ аминокислотных последовательностей анемотоксинов позволил отнести RTX-IV и RTX-V к новому структурному классу и показал, что С-концевой положительный заряд и остаток тирозина в положении 25 важны для токсической активности полипептидов морских анемонов.

Морские анемоны продуцируют ряд нейротоксинов с молекулярной массой ~5 кДа, которые обладают широким спектром биологической активности [1-6]: кардиостимулирующей, кардиотоксической, нейротоксической, оказывают действие на нервно-мышечную передачу в скелетных и гладких мышцах.

Эти токсины используют при исследовании молекулярных механизмов нервного возбуждения [7, 8]. Кроме того, они могут найти применение в медицине при лечении сердечной недостаточности, для исследования и лечения дистрофии скелетных мышц [9]. В связи с вышесказанным изучение их структуры и функции представляет большой интерес.

Ранее нами была установлена аминокислотная последовательность RTX-III из *Radianthus macrodactylus* [10], который вместе с токсинами Sh-NI из *Stoichactis helianthus* [11] и Rp-II из *R. paumotensis* [12] образует новый структурный класс анемотоксинов [13].

Настоящая работа посвящена установлению аминокислотной последовательности еще двух полипептидов из *R. macrodactylus* — RTX-IV и RTX-V, которые оказывают паралитическое действие на мышечной в дозах 40 и 350 мкг/кг соответственно. Токсины RTX-IV и RTX-V выделены по методу [13]. Полипептиды гомогенны по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, их аминокислотный состав представлен в таблице. Для установления аминокислотной последовательности токсинов проводилось восстановление их дисульфидных связей и карбоксиметилирование образовавшихся сульфгидрильных групп монодуксусной кислотой. Обессоливание карбоксиметилированных токсинов (СМ-токсинов) осуществляли на полихrome I. Аминокислотным анализом в молекулах токсинов определено по шесть остатков карбоксиметилцистеина.

Методом УФ-спектрометрии определено, что RTX-IV и RTX-V содержат по одному остатку триптофана, по четыре остатка тирозина и не содержат остатков фенилаланина.

N-Концевая аминокислота обоих полипептидов — глицин, а С-концевая — лизин.

Последовательность 46 аминокислотных остатков в СМ-RTX-V была установлена автоматическим жидкофазным методом Эдмана (схема 1). Полипептидная цепь токсина-V состоит из 47 аминокислотных остатков (см. таблицу). В ее состав входят 4 остатка лизина; с помощью секвенатора установлено положение трех из них (Lys⁴, Lys³², Lys⁴⁶). Отсюда следует С-концевое положение четвертого остатка лизина (Lys⁴⁷), что

**Аминокислотный состав карбоксиметилированных RTX-IV и RTX-V
и пептидов *, полученных при гидролизе CM-RTX-IV трипсином (Т)
и химотрипсином (Ch)**

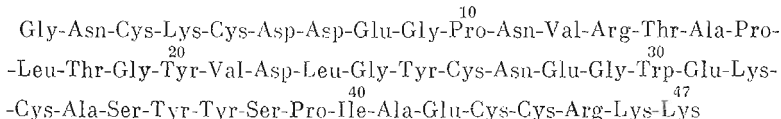
Аминокислота	RTX-V	RTX-IV	T-3	Ch-4	Ch-5
Cys(Cm)	5,6(6)	5,5(6)	0,9(1)	0,7(1)	0,6(1)
Asx	6,6(7)	5,7(6)	2,8(3)	1,2(4)	2,2(2)
Thr	2,1(2)	2,2(2)	2,0(2)	—	1,1(1)
Ser	2,2(2)	2,0(2)	—	—	—
Glx	2,8(3)	3,7(4)	0,7(1)	0,9(1)	1,1(1)
Pro	3,1(3)	2,9(3)	3,0(4)	—	—
Gly	5,2(5)	5,1(5)	2,7(3)	1,6(2)	2,8(3)
Ala	3,1(3)	3,3(3)	0,9(1)	—	—
Val	2,0(2)	2,1(2)	1,1(1)	—	1,3(1)
Ile	1,2(1)	1,1(1)	—	—	—
Leu	2,1(2)	2,3(2)	2,2(2)	—	0,9(1)
Tyr	3,7(4)	3,8(4)	1,9(2)	0,8(1)	1,7(2)
Lys	3,5(4)	4,7(5)	0,6(1)	—	—
Arg	2,4(2)	2,1(2)	—	—	—
Trp**	(1)	(1)	1	1	1
Всего остатков	47	48	19	7	13
N-Концевая	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr

* Приведен аминокислотный состав только тех пептидов, данные о структуре которых были необходимы для реконструкций молекулы RTX-IV.

** Триптофан обнаруживали по Эрлиху или определяли спектрофотометрически (в скобках).

подтверждает данные С-концевого анализа. Молекула RTX-V содержит один остаток триптофана и 6 остатков цистеина, что при отсутствии свободных сульфгидрильных групп свидетельствует о наличии трех внутримолекулярных дисульфидных связей.

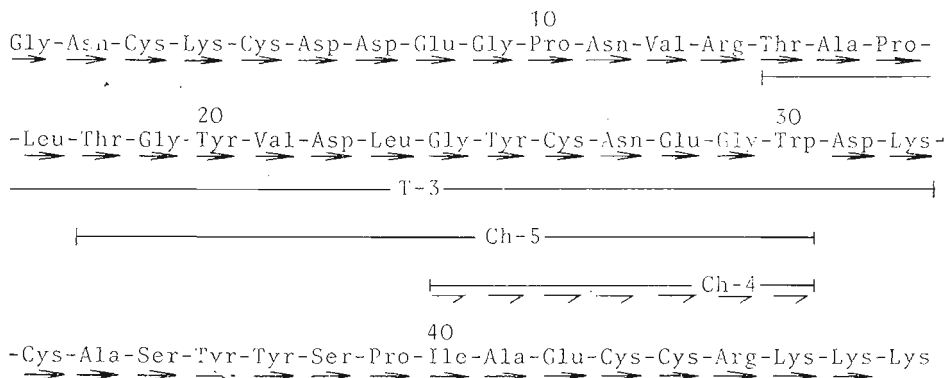
Схема 1



Аминокислотная последовательность токсина RTX-V, определенная автоматическим жидкофазным методом Эдмана (46 а. о.)

Аминокислотная последовательность CM-RTX-IV до 47 аминокислотного остатка также была определена автоматическим жидкофазным методом Эдмана, за исключением остатка в положении 30 (схема 2). Остаток Lys⁴⁸ был идентифицирован аналогично остатку Lys⁴⁷ RTX-V. Для иден-

Схема 2



Аминокислотная последовательность токсина RTX-IV, определенная автоматическим жидкофазным (→) и ручным (←) методами Эдмана. Т и Ch — пептиды триптического и химотриптического расщеплений

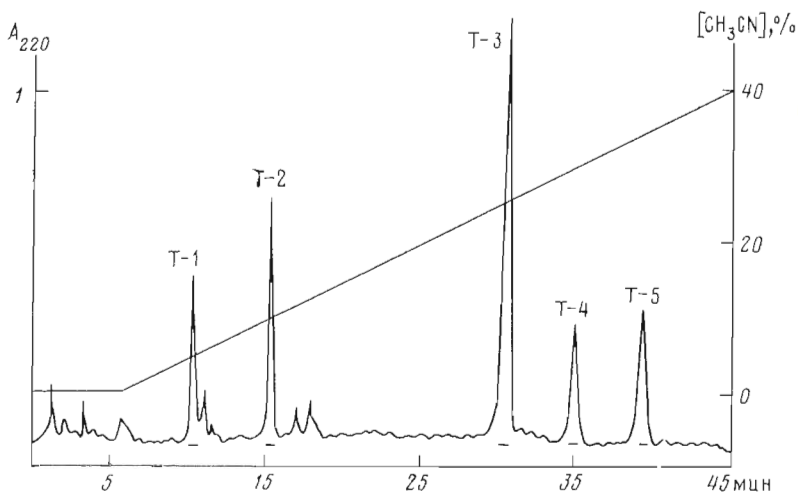


Рис. 1. Высокоэффективная жидкостная хроматография триптического гидролизата токсина SM-RTX-IV на колонке (4,6×250 мм) Zorbax C₈ в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила (0–50% за 60 мин). Скорость элюции 1,1 мл/мин

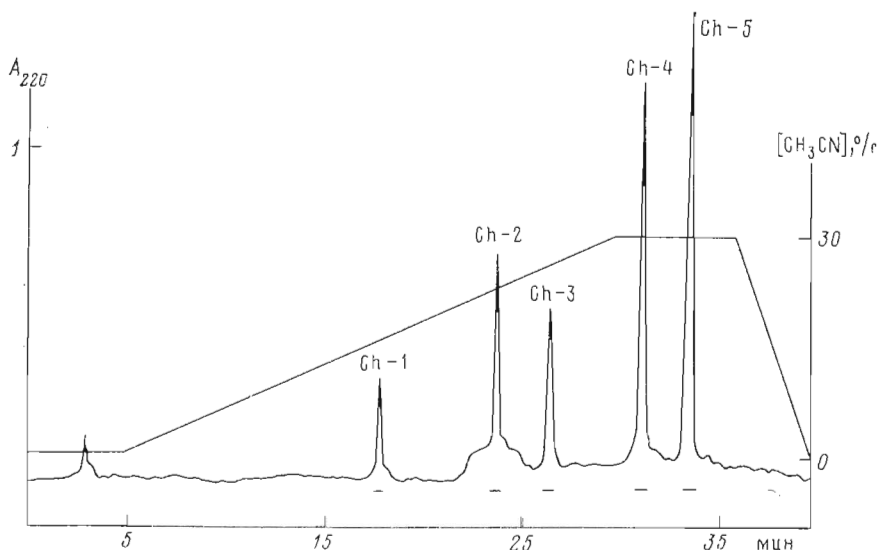


Рис. 2. Высокоэффективная жидкостная хроматография химотриптического гидролизата пептида Т-3 (рис. 1) на колонке (4,6×150 мм, 5 мкм) Ultrasphere ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 1,1 мл/мин

тификации остатка в 30-м положении SM-RTX-IV гидролизовали трипсином. Расщепление проводили в стандартных условиях.

В результате разделения продуктов гидролиза обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Zorbax C₈ был выделен пептид Т-3 (рис. 1), который при окрашивании реактивом Эрлиха дал положительную реакцию на триптофан (см. таблицу).

После определения аминокислотного состава триптический пептид Т-3 гидролизовали химотрипсином и продукты расщепления разделяли высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Ultrasphere ODS (рис. 2). Химотриптические пептиды Ch-4 и Ch-5 содержали триптофан (см. таблицу). После аминокислотного анализа выделенных пептидов для установления структуры ручным методом Эдмана был выбран более короткий пептид Ch-4. Его последовательность, включая триптофан-30, была определена ручным методом Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоновых производных. Это позволило установить полную аминокис-

лотную последовательность токсина-IV, полипептидная цепь которого состоит из 48 аминокислотных остатков.

На схеме 3 приведены известные в настоящее время аминокислотные последовательности анемотоксинов с молекулярной массой ~5 кДа. Среди них можно выделить два структурных класса. К первому относятся нейротоксины *A. sulcata*, *A. xanthogrammica*, *A. elegantissima*, *A. fuscoviridis*, ко второму — *R. macrodactylus*, *R. paumotensis*, *S. helianthus*. Степень гомологии внутри каждого класса достигает очень высокого уровня (98%), тогда как между этими классами степень гомологии не более 40%.

Все анемотоксины содержат по 6 остатков цистеина, положение

Схема 3

		LD ₅₀ на мышях (мкг/кг) 3800
ATX-I	G _A A _P C L C K S D G F N T I R G N S M S G T I W V F G C P S G W N N C E G R A I I G Y C C K Q	
ATX-II	G V P C L C D S D G P S V R G N T L S G I I W L A G C P S G W H N C K K H G P T I G W C C K Q	100
AS _V	G V P C L C D S D G P S V R G N T L S G I I W L A G C P S G W H N C K K H G P T I G W C C K Q	19
AP-C	G V P C L C D S D G P S V R G N T L S G I L W L A G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K Q	
AP-A	G V S C L C D S D G P S V R G N T L S G T L W L Y P S G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K Q	66
AP-B	G V P C L C D S D G P R P R G N T L S G I I W F Y P S G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K K	8
AFT-I	G V A C L C D S D G F N T I R G N T L S G T I W L A G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K Q	98
AFT-II	G G V P C L C D S D G P S V R G N T L S G I I W L A G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K Q	450
Rp-II	A S C K C D D D G P D V R S A T F T G I V D F W N C N E G W E K C T A V Y T P V A S C C R K K K	3600
RTX-I	A S C K C D D D G P D V R T A T F T G S V . . .	3000
RTX-II	G T C K C D D D G P D V R T A T F T G S I E F A N C N E S W E K C L A V Y T V P A S C C R K K K	3650
RTX-III	G N C K C D D E G F Y V R T A P L T G Y V D L G Y C N E G W E K C A S Y Y S P I A E C C R K K K	25
RTX-IV	G N C K C D D E G F N V R T A P L T G Y V D L G Y C N E G W E K C A S Y Y S P I A E C C R K K K	40
RTX-V	G N C K C D D E G F N V R T A P L T G Y V D L G Y C N E G W D K C A S Y Y S P I A E C C R K K	350
Sh-NI	A A C K C D D E G P D I R T A P L T G T V D L G S C N A G W E K C A S Y Y T I I A D C C R K	> 15000

Аминокислотная последовательность и токсичность двух структурных классов анемотоксинов: ATX-I, ATX-II, AS_V — из *Anemonia sulcata* [14]; AP-C из *Anthopleura elegantissima*; AP-A, AP-B из *Anth. xanthogrammica* [15]; AFT-I, AFT-II из *Anth. fuscoviridis* [16]; Sh-NI из *Stoichactis helianthus* [11] и Rp-II из *R. paumotensis* [12]; RTX-II, RTX-III [17, 10], RTX-IV, RTX-V, RTX-I (частичная последовательность) из *R. macrodactylus*. В рамки взяты гомологичные последовательности

которых сохраняется для обоих классов. Для всех токсинов характерно присутствие заряженных полярных групп в N- и C-концевых участках молекулы, а также наличие гидрофобных участков в середине последовательностей. Особо следует отметить аналогию в расположении аспарагиновой кислоты в положениях 6 и 8 (в этом положении возможна консервативная замена на глутаминовую кислоту) и аргинина-13. Известно, что эти остатки функционально важны для ATX-II [18].

Для токсинов второй группы характерно увеличение положительного заряда в C-концевом участке молекулы и некоторое усиление отрицательного заряда в N-концевом участке. Среди части токсинов этой группы прослеживается взаимосвязь: уменьшение количества остатков лизина на C-конце ведет к понижению активности для мышей. LD₅₀ для RTX-V (на C-конце 2 остатка лизина) по отношению к LD₅₀ для RTX-IV и RTX-III ниже в 8—14 раз, а активность Sh-NI (на C-конце один остаток лизина) по отношению к RTX-IV ниже в ~400 раз. Увеличение положительного заряда на C-конце, возможно, повышает способность токсинов связываться с рецептором. Так, замена C-концевого глутаминна на лизин в токсине первой группы AP-B и серин-12 на аргинин, по-видимому, приводит к увеличению константы связывания токсина с натриевым

каналом синапсом мозга крыс в 4 раза по сравнению с AP-A [19]. Высокая активность AS_v, вероятно, связана с отсутствием С-концевого глутамина и заменой глицина на остаток лизина в положении 38. Из всех токсинов первой группы высокоактивные AS_v и AP-B имеют наиболее высокое содержание лизина — по 3 остатка. Если активность двух последних, как рассматривалось выше, может быть связана с увеличением положительного заряда на С-конце, то более высокая токсичность AP-A (LD₅₀=66 мкг/кг) по сравнению с другими токсинами первой группы, видимо, связана с наличием тирозина-25.

Характерной особенностью структуры токсинов второй группы является также отсутствие остатков гистидина и наличие вместо них часто остатков тирозина. Представляет интерес и тот факт, что RTX-III и RTX-IV из *R. macrodactylus* и Sh-NI из *S. helianthus*, имея очень высокую степень гомологии (88%), значительно различаются по активности. Первые высокотоксичны для мышей (LD₅₀=25–40 мкг/кг), тогда как последний практически не токсичен для млекопитающих (LD₅₀>15 000 мкг/кг). При сравнении аминокислотных последовательностей, за исключением консервативных замен валин-12 → изолейцин-12; серин-38 → треонин-38; глутаминовая кислота-42 → аспарагиновая кислота-42, интерес представляют замены в положениях 11, 20, 25 (Asp, Thr, Ser соответственно) в Sh-NI на остатки тирозина в RTX-III. Сравнимые значения активностей RTX-III и RTX-IV показали, что замена Tyr-11 на Asn-11 не является функционально важной. Поэтому можно предположить, что замена остатков хотя бы в одном из положений (20 и 25) на тирозин приводит к усилению токсической функции полипептидов для млекопитающих. Следует отметить, что у высокотоксичных для мышей полипептидов первой группы AP-A и AP-B остаток тирозина появляется в положении 25. RTX-II из *R. macrodactylus* и R_p-II из *R. raumotensis* не содержат в положении 20 и 25 остатков тирозина, и активность их для мышей очень низкая.

Таким образом, при рассмотрении анемотоксинов обеих групп можно предположить, что наличие на С-конце молекулы остатка (или остатков) лизина и остатка тирозина в положении 25 имеет функционально важное значение для данных полипептидов. Доказать справедливость вышесказанных предположений можно только методом химической модификации этих остатков в токсинах.

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру биол. наук Ш. И. Салихову и А. С. Корнееву за техническую помощь при установлении аминокислотной последовательности пептидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин и химотрипсин (Worthington, США), реактивы для автоматического метода Эдмана (Beckman, США), β-меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), полихром I (г. Олайне, СССР). Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч.

Выделение токсина IV и V проводили по методу [13].

Карбоксиметилирование белков (85 нмоль) осуществляли по методу [10] и обессоливали на затемненной колонке с полихромом I.

Аминокислотный анализ белка или пептида (2,5–3 нмоль) проводили по методу [14] на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистерна.

Содержание ароматических аминокислотных остатков определяли по вторым производным УФ-спектров белков в растворе 6 M гуанидингидрохлорида согласно [20]. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Cary 219 (Varian, Англия) в кварцевых кюветах толщиной 1 см; ширина щели 1 и 2 нм.

Триптофан обнаруживали по методу Эрлиха [21].

N-Концевые аминокислоты определяли по методу [22]. Давильные производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках (5×5 см) с закрепленным слоем силикагеля [23].

Идентификацию амидов аспарагиновой аминокислоты проводили по методу [24].

С-Концевые аминокислотные остатки определяли с карбоксипептидазой V по методу [25].

Установление аминокислотной последовательности ручным методом Эдмана с идентификацией феинилтиогидантоиновых производных на силикагелевых пластинках проводили по методу [26].

Автоматическое определение N-концевой последовательности СМ-токсина осуществляли на секвенаторе Вескман 890С (США) по программе, аналогичной описанной в работе [27]. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли с помощью ВЭЖХ на хроматографе Du Pont Instruments (США) с колонкой (4,6×250 мм) Zorbax C₁₈ в 35% ацетонитриле в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,5 (для стабилизации к 1 л раствора добавляли 2 мл этилацетата, 2 мл хлористого метилена, 0,5 мл дихлорэтана), ГЖХ на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5710А по методу [28] и с помощью ТСХ [26].

Триптический и химотриптический гидролизы СМ-полипептидов осуществляли по методу [29]. Триптические и химотриптические пептиды СМ-RTX-IV разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (см. рис. 1 и 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Alsen C. // Fed. Proc. 1983. V. 42. № 1. P. 101–108.
2. Beres L. // Pure Appl. Chem. 1982. V. 54. № 10. P. 1981–1994.
3. Schweitz H., Vincent J. P., Barhanin J., Frelin C., Linden B., Hugues M., Lazdunski M. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 18. P. 5245–5252.
4. Alsen C., Harris J. B., Tesseraux I. // Brit. J. Pharmacol. 1981. V. 74. № 1. P. 61–71.
5. Eracleben C., Rathmayer W. // Toxicon. 1984. V. 22. № 3. P. 387–399.
6. Байдан Л. В., Козловская Э. П., Еляков Г. Б., Тишкин С. М., Шуба М. Ф. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. № 4. С. 1000–1002.
7. Catterall W. A. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1980. V. 20. P. 15–43.
8. Ходоров Б. И. // Нейрофизиология. 1980. Т. 12. № 3. С. 317–331.
9. Yamazaki S., Kano M. // Exp. Neurol. 1981. V. 74. № 2. P. 408–418.
10. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорг. химии. 1985. Т. 11. № 3. С. 302–310.
11. Kem W. R., Dunn B. M., Parten B., Price D. // Abst. Toxicon. 1985. V. 23. № 4. P. 580.
12. Wemmer D. E., Kumar N. V., Meltrione R. M., Lazdunski M., Drobny G., Kallenbach N. R. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6842–6849.
13. Зыкова Т. А. Исследование первичной структуры биологически активных пептидов актинии *Radianthus macrodactylus*: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток: ТИБОХ, 1986.
14. Scheffer J.-J., Tsugita A., Linden G., Schweitz H., Lazdunski M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. № 1. P. 272–278.
15. Reimer N. S., Yasunobu C. L., Yasunobu K. T., Norton T. R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 15. P. 8690–8693.
16. Sunahara S., Mizumoto K., Tenma K., Kaniya H. // Toxicon. 1987. V. 25. № 2. P. 211–219.
17. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // VII Всес. симп. по химии белков и пептидов. Тез. докл. Таллин, 1987. С. 56–67.
18. Barhanin J., Hughes M., Schweitz H., Vincent J.-P., Lazdunski M. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 11. P. 5764–5769.
19. Frelin C., Vigne P., Schweitz H., Lazdunski M. // Mol. Pharmacol. 1984. V. 26. № 1. P. 70–74.
20. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438–444.
21. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 330–339.
22. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 139–151.
23. Геаленький Б. Г., Ганкина Е. С., Песерев В. В. // Докл. АН СССР. 1967. Т. 172. № 1. С. 91–93.
24. Roseau G., Pantel R. // J. Chromatogr. 1969. V. 44. № 2. P. 393–395.
25. Hayachi R. // Meth. Enzymol. 1976. V. 45. Part B. P. 568–587.
26. Sjoquist J. // Biochim. et biophys. acta. 1960. V. 41. № 1. P. 20–25.
27. Hunkapiller M. W., Hood L. E. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 11. P. 2124–2133.
28. Pisano J. J., Bronzert T. J. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 20. P. 5597–5607.
29. Smyth D. G. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 214–231.

Поступила в редакцию
16.III.1988

AMINO ACID SEQUENCE OF NEUROTOXINS IV AND V OF THE SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

ZKOVA T. A., KOZLOVSKAYA E. P., ELYAKOV G. B.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Amino acid sequences of neurotoxins RTX-IV and RTX-V isolated from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* were determined by the automated Edman degradation; their polypeptide chains consist of 48 and 47 amino acid residues, respectively. For identification of tryptophan-30 in toxin RTX-IV, its trypsin and chymotrypsin digests were investigated. Amino acid sequences of the above toxins show that they belong to a new structural class and that C-terminal positive charge and tyrosine-25 are important for toxic activity of sea anemone polypeptides.