



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 2 * №12 * 1976

УДК 547.962.1 : 541.6

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА СТУРИНА В — ПРОТАМИНА ИЗ КАСПИЙСКОГО ОСЕТРА

**Юликова Е. П., Евсеенко Л. К., Баратова Л. А.,
Белянова Л. П., Рыбин В. К., Силаев А. Б.**

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

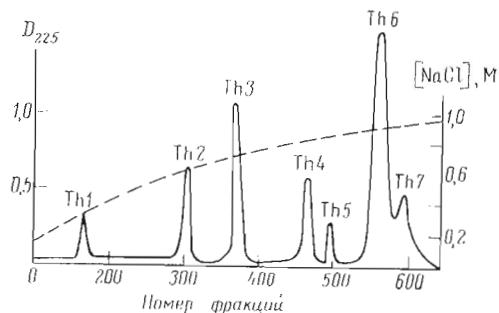
Автоматическим методом Эдмана в сочетании с анализом термолизиновых пептидов установлена полная аминокислотная последовательность стурина В — протамина из каспийского осетра.

Стурин В является одним из протаминов, выделенных нами из молок каспийского осетра *Acipenser güldenstadii* [1]. Ранее с помощью гидролиза трипсином, лейцинаминопептидазой и карбоксипептидазой В была определена частичная аминокислотная последовательность стурина В [2]. В настоящем сообщении приводятся результаты установления полной аминокислотной последовательности белка, полученные с помощью автоматического метода Эдмана в сочетании с анализом термолизиновых пептидов.

Хотя в последние годы метод автоматического определения последовательности аминокислот получил самое широкое распространение при изучении строения различных белков, в том числе ряда гистонов [3, 4] и белка из спермы быка [5], для исследования первичной структуры протаминов из рыб он не применялся. Было интересно выяснить возможность использования этого метода для изучения столь высокоосновного белка, как стурин В.

Исследование N-концевой последовательности стурина В и некоторых его термолизиновых пептидов проводили в секвенаторе фирмы «Beckman», используя стандартные белковую и пептидную программы.

На целой молекуле белка было произведено 26 циклов отщепления, причем опыт был проведен дважды. В первом опыте для установления N-концевой последовательности стурина В использовали белковую программу, во втором после проведения 18 циклов отщепления белковую программу заменяли пептидной. Но однозначная идентификация отщепляемых фенилтиогидантинов аминокислот как в первом, так и во втором опыте оказалась возможной лишь до 20-го цикла расщепления (см. схему). Выход аланина (N-концевая аминокислота) составил лишь 62% теоретического. При анализе хлорбутановой фракции 11-го цикла отщепления нами были обнаружены фенилтиогидантинны как глутамина, так и глутаминовой кислоты. Появление последнего, по-видимому, результат частичного дезаминирования глутамина в ходе реакции Эдмана. Весьма показательно, что после 11-го цикла отщепления выходы фенилтиогидантинов аминокислот резко упали. Подобное отмечали и другие авторы [6]. Наблюдаемый



Хроматография термолизинового гидролизата стурина В на СМ-сепадексе С-25

заканчивается через 10 ч и расщеплению подвергаются все пептидные связи, образованные аминогруппами серина, глицина и гистидина. При сокращении времени гидролиза до 6 ч связь Arg²⁴-Gly²⁵ расщепилась неполностью, что позволило получить более крупный пептид Th4, представляющий собой С-концевой фрагмент белка (см. схему).

Фракционирование смеси пептидов проводили на СМ-сепадексе С-25 в 0,05 М фосфатном буфере (pH 6,2) с использованием градиента концентрации NaCl (рисунок). Однородными оказались все фракции, за исключением Th3, которая была разделена гель-фильтрацией на биогеле Р-2 на пептиды Th 3-а и Th 3-б. Таким образом, в индивидуальном состоянии нами было выделено 8 пептидов. Применение СМ-сепадекса С-25 для разделения термолизиновых пептидов стурина В оказалось весьма эффективным. Нам удалось разделить не только пептиды с разным числом остатков аргинина (Th 1 — Th 4), но и пептиды, содержащие одинаковое количество аргинина и различающиеся между собой только одной аминокислотой (см. таблицу).

Изучение первичной структуры выделенных пептидов осуществляли сочетанием известных методов. Строение пептидов Th 1, Th 2, Th 3-а и

Аминокислотный состав и строение термолизиновых пептидов стурина В

Пептид	Аминокислотный состав	N-Концевая аминокислота	C-Концевая аминокислота	Строение пептида
Th 1	Gly ₁ , Arg ₂	Gly	Arg	Gly-Arg-Arg
Th 2	Gly ₁ , Arg ₄	Gly	Arg	Gly-Arg-Arg-Arg-Arg
Th 3-а	Ala ₁ , Arg ₅ , Ser ₁	Ala	Ser	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser
Th 3-б	Ala ₁ , Arg ₅	Ala	Arg	Ala-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
Th 4	Gly ₂ , Arg ₆	Gly	Arg	Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Arg-Arg
Th 5	Ser ₂ , Glu ₁ , Pro ₁ , Arg ₈	Ser	Arg	Ser-Ser-Arg-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
Th 6	Ser ₂ , Glu ₁ , Pro ₁ , Arg ₈ , His ₁	Ser	His	Ser-Ser-Arg-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His
Th 7	Ser ₁ , Glu ₁ , Pro ₁ , Arg ₈ , His ₁	Ser	His	Ser-Arg-Pro-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-His

N-Концевые аминокислоты в пептидах Th 5, Th 6, Th 7 были установлены данным методом, в остальных пептидах — методом динитрофенилирования. C-Концевые аминокислоты в пептидах Th 3-а, Th 6 и Th 7 определяли с помощью карбоксипептидазы А, в остальных — с помощью карбоксипептидазы В. Жирным шрифтом выделена последовательность, установленная автоматическим методом Эдмана.

нами низкий выход производного пролина обычен и объясняется проведением стадии карбамилирования данного цикла при температуре, не являющейся оптимальной для пролина [7].

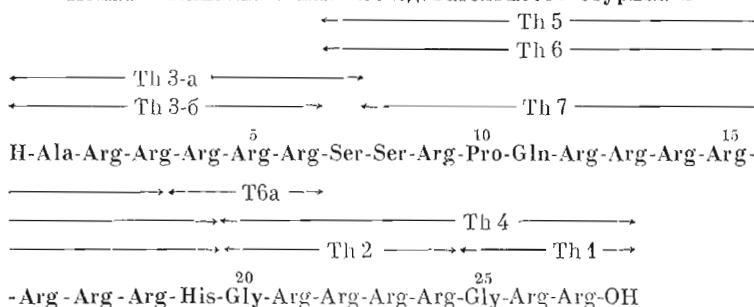
Для установления полной аминокислотной последовательности стурина В необходимо было выяснить расположение аминокислот на его С-концевом участке. С этой целью мы провели гидролиз белка термолизином.

Ранее было показано [8], что гидролиз стурина В термолизином

Th 3-б однозначно вытекало из данных аминокислотного состава и N- и C-концевого анализа. Аминокислотную последовательность пептида Th 6 определяли автоматическим методом Эдмана с использованием пептидной программы. Последовательность пептидов Th 5 и Th 7 была выяснена в результате сравнения данных аминокислотного анализа, N- и C-концевых аминокислот этих пептидов со строением пептида Th 6.

При реконструкции молекулы стурина В наибольшую сложность представляло определение числа остатков аргинина в центральной части молекулы (между остатками глутамина и гистидина) и расстановка блоков аргинина на C-концевом участке.

Полная аминокислотная последовательность стурина В



Th — термолизиповые пептиды, Т — трптический пептид. Жирным шрифтом выделена последовательность, определенная на целом белке автоматическим методом Эдмана.

На основании данных по аминокислотному составу термолизиновых пептидов, полученных ранее, мы предположили, что центральный кластер аргинина в стурине В состоит из 6 остатков. Однако при исследовании N-концевой последовательности стурина В автоматическим методом Эдмана аргинин был обнаружен в 7 последовательных циклах отщепления (остатки 12—18). Для уточнения величины центрального кластера мы провели определение аминокислотного состава выделенных в настоящей работе пептидов Th 5, Th 6 и Th 7 с использованием в качестве внутреннего стандарта лизина. Оказалось, что все пептиды содержат по 8 остатков аргинина (см. таблицу). Таким образом, аргинин занимает положения 12—18, а не 12—17, как сообщалось ранее [8].

Аминокислотную последовательность пептида Th 4, C-концевого фрагмента белка, устанавливали с помощью автоматического метода Эдмана и гидролиза карбоксипептидазой В. Установленная структура (см. таблицу и схему) доказывает, что на C-конце стурина В располагается блок из 2 остатков аргинина, а не из 4, как сообщалось в [8].

Расхождение данных объясняется тем, что в предыдущей работе [8] C-концевой фрагмент полностью расщепился на составляющие его пептиды GlyArg₂ и GlyArg₄. Расстановка аминокислот в этих пептидах была сделана на основании данных гидролиза стурина В карбоксипептидазой В [2], согласно которым от 1 мкмоль белка отщеплялось около 4 остатков аргинина. Завышенное количество аргинина, по-видимому, следствие неудовлетворительного качества фермента, его способности расщеплять нейтральные субстраты и высокого содержания аргинина в белке.

Таким образом, определение N-концевой последовательности стурина В в сочетании с результатами анализа термолизиновых пептидов позволило нам с перекрыванием в одну аминокислоту (Gly-20) установить полную аминокислотную последовательность белка. Пептид His-Gly-Arg, выделенный нами ранее [2] из трипсинового гидролизата стурина В (пептид Т6а на схеме), обеспечивает более надежное перекрывание в этом районе полипептидной цепи.

Первичная структура стурина В построена по общим для всех протаминов принципам. Остатки аргинина в нем группируются в блоки, которые

локализуются в тех же участках молекулы, что и в других протаминах. Наиболее ярко проявляется сходство N-концевой последовательности стурина В с аналогичными участками пептидных цепей других протаминов. Здесь располагается последовательность Ser-Ser-Arg-Pro-Gln-, в которой остаток аргинина, связанный с пролином, окружен остатками нейтральных аминокислот. Существенной особенностью стурина В является наличие в центральной части молекулы кластера из 7 остатков аргинина (остатки 12–18), более крупного, чем в других протаминах. Кроме того, полипептидная цепь стурина В несколько короче, чем у других протаминов.

Экспериментальная часть

Стурин В получали по методу, описанному нами ранее [1]. Термолизин (КФ 3.4.4) был получен от фирмы Sigma. Активность фермента определяли по казеину [9]. В работе использовались карбоксипептидаза В из поджелудочной железы свиньи (КФ 3.4.2.2) фирмы Serva и карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) фирмы Sigma, обработанные диизопропилфторфосфатом. Активность карбоксипептидаз определяли по методу, описанному в [10].

Гидролиз стурина В термолизином и фракционирование пептидов. 200 мг белка растворяли в 20 мл 0,02 М три-НCl-буфера (рН 8,0), содержащего 0,005 М CaCl₂, и добавляли 2 мг термолизина в соотношении фермент — субстрат 1 : 100. Реакционную смесь инкубировали 6 ч при 37°. Гидролиз останавливали 10-минутным нагреванием раствора на кипящей водяной бане.

Реакционную смесь растворяли в 3 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,2) и наносили на колонку (2 × 50 см), заполненную СМ-сефадексом C-25 и уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили при комнатной температуре, используя экспоненциальный градиент концентрации NaCl от 0,1 до 1 М. Скорость элюции 16 мл/ч, объем смесителя 500 мл, объем отбираемых проб 3 мл. За ходом элюции следили по поглощению при 225 нм и с помощью реакции Сакагуши [11] в модификации Сатаке [12].

Определение чистоты пептидов. Пептиды обессоливали на катионите амберлит CG-50 в H⁺-форме. Гомогенность пептидов проверяли электрофорезом на бумаге в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,6) и гель-фильтрацией на биогеле P-2 в 0,02 н. HCl на колонке (1 × 150 см) при скорости элюции 6 мл/ч.

Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе Hitachi KLA-3B. Гидролиз проводили в стандартных условиях. При определении числа остатков аргинина в пептидах в качестве внутреннего свидетеля использовали лизин.

N-Концевой анализ. Динитрофенилирование пептидов проводили по методу Сэндкера [13]. Динитрофениламинокислоты идентифицировали тонкослойной хроматографией на силикагеле G в системах хлороформ — метиловый спирт — лед, уксусная кислота (95 : 5 : 1) и n-бутанол — 25% амиак (80 : 20) [14]. Дансилирование пептидов осуществляли по методу Грэя [15]. Дансилипроизводные аминокислоты идентифицировали двумерной хроматографией [16].

C-Концевой анализ. C-Концевые аминокислоты в пептидах определяли с помощью карбоксипептидаз А и В. 0,1 мкмоль пептида растворяли в 1 мл 0,05 М три-НCl-буфера (рН 8,05), содержащего 0,25 М NaCl, и добавляли фермент в соотношении 1 : 100. Инкубацию проводили при 37°. Отщепляемые аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе фирмы Hitachi, модель KLA-3B.

N-Концевые последовательности определяли в секвенаторе фирмы Beckman, модель 890, с реакционной ячейкой, модифицированной по схеме модели 890 С, используя стандартные белковую (050972) и пептидную (051073) программы.

Все реактивы, а также стандарты фенилтиогидантоинов аминокислот были получены от фирмы Beckman. В качестве летучего буфера при анализе пептидов использовали диметилаллиламин. К *n*-хлорбутану, экстрагирующему тиазолиноны из реакционного сосуда, добавляли дитиотреитол в количестве 10^{-4} моль/мл [17]. Превращение тиазолинонов в соответствующие фенилтиогидантоины аминокислот проводили в стандартных условиях [18]. Фенилтиогидантоины аминокислот и их триметилсилильные производные анализировали методом ГЖХ по Пизано и Бронзерту [19] на газовом хроматографе GC-45 фирмы Beckman. В некоторых случаях идентификацию подтверждали тонкослойной хроматографией [20]. Фенилтиогидантоины основных аминокислот гидролизовали до свободных аминокислот [21] 6 н. HCl, содержащей 0,2% 2-меркаптоэтанола, и анализировали на аминокислотном анализаторе.

ЛИТЕРАТУРА

- Юликова Е. П., Евсеенко Л. К., Буланов В. В., Силаев А. Б. (1972) Химия природн. соедин., 779—783.
- Евсеенко Л. К., Юликова Е. П., Силаев А. Б. (1975) Химия природн. соедин., 778—785.
- Olson M. O. J., Jordan J., Busch H. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 50—55.
- Brand W. F., Von Holt C. (1974) Eur. J. Biochem., 45, 419—429.
- Coelingh J. P., Monfoort C. H., Rozijn T. H., Leuven J. A. G., Schiphof R., Stein-Parvé E. P., Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A. (1972) Biochim. et biophys. acta, 285, 1—14.
- Putnam F. W., Whitley E. J., Paul C., Davidson J. M. (1973) Biochemistry, 12, 3763—3780.
- Hermansson M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Walsh K. A. (1972) Biochemistry, 11, 4493—4502.
- Юликова Е. П., Евсеенко Л. К., Рыбин В. К., Силаев А. Б. (1975) Химия природн. соедин., 817—818.
- Matsubara H. (1970) in Methods in Enzymology (Perlman G. E., Lorand L., eds.), vol. XIX, pp. 642—651, Acad. Press, N. Y.—London.
- Люблинская Л. А., Баганова Т. И., Пасхина Т. С., Степанов В. М. (1973) Биохимия, 38, 790—795.
- Sakaguchi S. (1950) J. Biochem., 37, 231—236.
- Satake K., Luck J. (1958) Bull. Soc. Chem. Biol., 40, 1743.
- Sanger F. (1945) Biochem. J., 39, 507—515.
- Бреннер М., Нидервизер А., Патаки Г. (1965) в сб. Хроматография в тонких слоях (под ред. Э. Шталя), с. 418—420, «Мир», М.
- Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., 89, 59 р.
- Беленъкий Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, 172, 91—93.
- Hermansson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A. (1970) Federat. Proc., 29, 728.
- Edman P., Begg G. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80—91.
- Pizano J. J., Bronzert T. J., Brewer H. B. (1972) Anal. Biochem., 45, 43—59.
- Jepsson J. O., Sjoquist J. (1972) Anal. Biochem., 18, 264—269.
- Africa B., Carpenter F. H. (1966) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 24, 113—119.

Поступила в редакцию
12.III.1976

После доработки
24.V.1976

THE PRIMARY STRUCTURE OF STURINE B, A PROTAMINE FROM CASPIAN STURGEON

YULIKOVA E. P., EVSEENKO L. K., BARATOVA L. A.,
BELYANOVA L. P., RYBIN V. K., SILAEV A. B.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

The complete amino acid sequence of sturine B, a protamine from Caspian sturgeon *Acipenser güldenstadii*, has been established by Edman degradation and conventional analysis of thermolytic peptides.