



УДК 577.152.34*236'1:577.112.5

© 1994 И. А. Сурова, Л. П. Ревина, В. В. Янонис,
Л. А. Колесникова, В. М. Степанов

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СЕРИНОВОЙ
ПРОТЕИНАЗЫ *Bacillus amyloliquefaciens*
III. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПЕПТИДОВ,
ПОЛУЧЕННЫХ ГИДРОЛИЗОМ Glu, Asp-СПЕЦИФИЧНОЙ ПРОТЕИНАЗОЙ.
РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРОТЕИНАЗЫ

ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Ключевые слова: сериновая протеиназа, структура первичная, *Bacillus amyloliquefaciens*.

Проведен гидролиз внутриклеточной сериновой протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* Glu, Asp-специфичной протеиназой *Thermoactinomyces species* и изучена структура полученных пептидов. Дополнительно проведен триптический гидролиз протеиназы. Сопоставление полученных пептидов с изученными ранее пептидами триптического и химотриптического гидролизатов протеиназы позволило реконструировать ее полную аминокислотную последовательность. Сравнительный анализ первичных структур исследуемой протеиназы и родственных сериновых протеиназ показал, что совпадение аминокислотных остатков составляет: с внутриклеточной сериновой протеиназой *B. subtilis* — 88, с субтилизином BPN' — 46%.

В результате изучения триптического [1] и химотриптического [2] гидролизатов внутриклеточной сериновой протеиназы *B. amyloliquefaciens* (ВСП *Bam*) и сопоставления последовательностей полученных пептидов были установлены большие участки последовательности ВСП, однако оставались неясными расположение многих пептидов в цепи ВСП и отдельные участки ее структуры.

Для дальнейшего изучения структуры ВСП был проведен гидролиз Glu, Asp-специфичной протеиназой *Thermoactinomyces species* (протеиназа Th) в условиях, когда расщепление пептидной цепи проходит предпочтительно по остаткам глутаминовой кислоты. Гидролизат разделен на колонке с сульфокатионитом Chromobeads. С помощью ТСХ в полученных пробах выявлены 33 фракции. Результаты определения аминокислотного состава, N-концевых аминокислот и ТСХ показали, что некоторые из них (например, 9—6, 18, 24, 30) содержали сложные смеси пептидов или следовые количества вещества и далее не изучались. Остальные фракции были разделены с помощью ВЭЖХ, определен аминокислотный состав полученных пептидов и изучена их структура (табл. 1, 2). Как и в предыдущей работе [2], при изучении структуры пептидов DAVITC/PITC-метод использовали преимущественно в тех случаях, когда в состав пептидов

Аминокислотный состав пептидов, полученных в результате расщепления ВСП Glu, Asp-специфичной протеиназой

АМИНО- КИСЛОТА	Пептид										
	G1-2	G2-1	G2-2	G3-1	G3-2	G3-3	G3-4	G17-1	G19-1	G20-1	G21-1
Asp	2,2(2)		2,1(2)	2,0(2)	1,0(1)		2,0(2)		5,9(6)		
Thr		0,9(1)				1,0(1)			2,0(2)		
Ser		1,8(2)	2,7(3)		1,1(1)	1,9(2)		3,9(4)	3,7(4)		
Glu	2,0(2)	3,0(3)	1,9(2)	1,0(1)	1,0(1)	3,1(3)	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)	0,9(1)	1,1(1)
Pro	1,1(1)		1,7(2)		1,0(1)				0,9(1)	0,8(1)	
Gly			2,2(2)	1,9(2)			1,1(1)	1,0(1)	6,3(6)	1,1(1)	
Ala		0,9(1)	1,1(1)		2,0(2)	1,0(1)	1,0(1)	2,0(2)	4,0(4)	1,0(1)	1,0(1)
Val	1,1(1)		0,9(1)				0,9(1)	3,5(4) ^{2*}	1,8(2)	0,7(1) ^{2*}	0,9(1)
Met			0,5(1) *					0,8(1)			
Ile			0,7(2) ^{2*}				1,9(3) ^{2*}		1,9(2)	1,5(2) ^{2*}	
Leu	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)		0,8(1)	1,0(1)			0,9(1)		0,9(1)
Tyr					1,5(2) *		0,8(1)		1,1(1)		
Phe		1,0(1)				0,9(1)			1,9(2)		
His								0,9(1)		1,8(2)	
Lys			0,8(1)			0,9(1)					
Arg		1,0(1)				0,9(1)		0,9(1)			
Всего а. о.	7	10	18	5	9	10	11	15	32	9	4

Таблица 1а (продолжение)

Аминокислота	Пептид												
	G21-2	G21-3	G21-4	G23-3	G26-1	G27-1	G28-1	G28-2	G29-1	G31-1	G31-2		
Asp		1,0(1)	1,8(2)	4,0(4)						3,7(4)	9,1(9)		
Thr		1,8(2)	3,0(3)	1,9(2)		0,9(1)	0,9(1)	1,0(1)		1,0(1)	2,3(2)		
Ser		2,0(2)	2,9(3)	1,1(1)	1,0(1)	2,0(2)	0,9(1)	1,8(2)		1,0(1)	1,0(1)		
Glu	0,9(1)	2,0(2)	0,9(1)	1,1(1)	1,0(1)		1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)		1,2(1)		
Pro	1,1(1)		2,1(2)	1,8(2)							1,0(1)		
Gly	1,2(1)	3,8(4)	4,2(4)	2,3(2)	1,1(1)					3,9(4)	6,8(7)		
Ala	1,1(1)	1,0(1)	4,0(4)	3,0(3)							1,9(2)		
Val	0,6(1) ^{2*}	1,3(2) ^{2*}	0,9(1)	0,6(1) ^{2*}							1,9(2)		
Met			0,3(1) [*]	0,2(1) [*]						0,9(2) ^{2*}	2,6(4) ^{2*}		
Ile	1,5(2) ^{2*}	0,4(1) ^{2*}	1,3(2) ^{2*}	1,0(1)	0,6(1) ^{2*}								
Leu		2,9(3)	4,2(6) ^{2*}	5,4(6) ^{2*}	1,4(2) ^{2*}		0,9(1)	0,9(1)	1,0(1)		3,0(3)		
Tyr		0,6(1) [*]	0,8(1)	0,9(1)									
Phe				0,9(1)				1,0(1)		0,9(1)	1,7(2)		
His			2,0(2)								1,0(1)		
Lys	1,9(2)	1,8(2)	2,8(3)	1,0(1)	0,8(1)				1,0(1)	1,8(2)	6,6(7)		
Arg						1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		0,9(1)	1,0(1)		
Trp											1,0(1) ^{3*}		
Всего а. о.	9	19	35	26	6	4	5	7	3	16	44		

* Заниженное количество Трг и Met в составе пептида объясняется разрушением их при гидролизе.

2* Заниженное количество гидрофобных аминокислот объясняется плохой гидролизуемостью связей между ними.

3* Трг определяли с помощью метансульфоновой кислоты.

Аминокислотный состав триптических пептидов, полученных в результате расщепления ВСП трипсином (Т') и специфичной протеиназой (G)

Аминокислота	Пептид			
	Т'6	Т'21	Т'28	Т'48
Asp	0,9(1)	2,9(3)		2,9(3)
Ser	2,8(3)	0,9(1)	0,8(1)	0,7(3)
Thr	0,9(1)	0,9(1)	0,8(1)	0,9(1)
Glu	1,0(1)		1,9(2)	2,0(2)
Pro		0,8(1)	0,8(1)	1,6(2)
Gly	1,0(1)	1,0(1)		2,2(2)
Ala	1,0(1)	0,8(1)	1,8(2)	3,0(3)
Val		1,4(2) *		2,4(3) *
Mct				0,7(1)
Ile		0,8(1)		1,4(2) *
Leu		1,5(2) *	1,0(1)	1,9(2)
Tyr			1,8(2)	
Phe	1,0(1)			
His		0,9(1)		
Lys	1,0(1)	1,0(1)		2,0(2)
Arg				
Cys(Cm)		0,6(1)		
Всего а. о.	9	16	10	26

* См. примечание ²* к табл. 1а.

входили дикарбоновые аминокислоты, так как этот метод позволяет идентифицировать как сами аминокислоты, так и их амиды. Дансильный вариант метода Эдмана чаще применяли в тех случаях, когда пептиды содержали кластеры гидрофобных аминокислот или серин и треонин.

Анализ полученных последовательностей показал, что для реконструкции всей молекулы ВСП требуются дополнительные данные. Поэтому был проведен повторный гидролиз ВСП трипсином, а гидролизат, в отличие от вышеописанного, был разделен с помощью ВЭЖХ (см. табл. 1, 2).

Порядок расположения пептидов показан в табл. 3, полная аминокислотная последовательность ВСП — в табл. 4.

Далее рассмотрены пептиды, существенные для определения последовательности ВСП: так называемые «мостиковые» пептиды, пептиды, уточняющие или подтверждающие результаты секвенирования 53-членной последовательности ВСП [3], и пептиды с неизвестной ранее последовательностью.

Пептид G1-2 занимает в цепи ВСП положение 1—7. Положение 1 вместо аспарагина, определенного при секвенировании ВСП, в соответствии с данными изучения пептида G1-2 занимает аспарагиновая кислота. В положении 3 находится остаток аспарагина, не установленный при секвенировании ВСП автоматическим методом. Нам представляется, что результаты изучения последовательности отдельных пептидов более достоверны, чем результаты секвенирования целого белка. Поэтому структура участка 1—7 молекулы ВСП, вероятно, соответствует структуре пептида G1-2 (см. табл. 3, А).

Пептид G2-1 в N-концевой области перекрывается последовательностью пептидов T6-1 [1] и C31 [2], в C-концевой — последовательностью химотриптиче-

Пептиды, полученные в результате расщепления ВСП Glu,Asp-специфичной протеиназой (G) и трипсином T'

Пептид	Аминокислотная последовательность
G1-2	<u>Asn-Val-Asn-Glu-Leu-Pro-Glu</u>
G1-3	<u>Ile-Asp-Leu-Val</u> -(Glx, Pro, Gly, Ala)
G2-1	<u>Gln-Ala-Ser-Phe-Gln-Arg-Thr-Leu-Ser-Glu</u>
G2-2	<u>Gln-Lys-Ala-Asp-Ile-Ile-Ser-Met-Ser-Leu-Gly</u> -(Asx, Ser, Glx, Pro, Gly, Val)
G3-1	<u>Gly-Asp-Gly-Asp-Glu</u>
G3-2	<u>Leu-Ser-Tyr-Pro-Ala-Ala-Tyr-Asn-Glu</u>
G3-3	<u>Gln-Ala-Ser-Phe-Gln-Arg-Thr-Leu-Ser-Glu</u>
G3-4	<u>Trp-Ile-Ile-Asn-Gly-Ile-Asn-Tyr-Ala-Val-Glu</u>
G17-1	<u>Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ser-Val-Ser-Val-Ala</u> -(Ser ₂ , Glx, Lys, Arg)
G19-1	<u>Asp-Ala-Phe-Ser-Asp-Tyr-Asn-Gly-His-Gly-Thr-His-Val-Ser-Gly</u> -(Asx ₃ , Ser ₂ , Thr, Glx, Pro, Gly ₃ , Ala ₃ , Val, Ile ₂)
G20-1	<u>Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Lys-Ala-Pro-Glu</u>
G21-1	<u>Val-Tyr-Ala-Gln</u>
G21-2	<u>Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Lys-Ala-Pro-Glu</u>
G21-3	<u>Ala-Ser-Leu-Leu-Ile-Val-Lys-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Asp-Gly-Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu</u>
G21-4	<u>Asn-Ile-Leu-Ser-Thr-Leu-Pro-Asn-His-Lys-Tyr-Gly-Lys-Leu-Thr-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ala-Pro-His-Val-Ser-Gly-Ala-Leu-Ala-Leu-Ile</u> -(Glx, Gly, Leu, Lys)
G23-3	<u>Thr-Leu-Pro-Leu-Asp-Ile-Ala-Lys-Thr-Leu-Ala-Gly-Asn-Gly-Phe-Leu-Tyr-Leu-Asp-Ala-Pro</u> -(Asx, Glx, Met, Val, Leu)

ского пептида С16-1 [2]. Структура участка ВСП, из которого были выделены вышеприведенные пептиды, показана в табл. 3 (D, 240—260).

Пептид G2-2 является «мостиком» между последовательностями пептидов С3-2 и С3-5 [2]. Последовательность соответствующего трем пептидам участка ВСП приведена в табл. 3 (A, 124—141).

Последовательность пептида G3-2 в С-концевой области перекрывается последовательностью пептида С9-1 [2], полученного в результате гидролиза связи -Tyr-Asn- данного участка ВСП, структура которого представлена в табл. 3 (С, 173—206).

Пептид G3-4. С- Концевая последовательность четырех остатков подтверждена с помощью гидролиза карбоксипептидазой А при разных значениях рН. С-Концевой остаток глутаминовой кислоты был отщеплен при рН 5,6. Далее при рН 8,5 был отщеплен остаток валина, затем аланина и тирозина. Последовательность пептида перекрывается с N-конца последовательностью пептида Т13-1 [1], а с С-конца — последовательностью пептида С3-2 [2], с которого начинается 28-членная последовательность (см. описание пептида G2-2). Таким образом, ус-

G26-1	<u>Leu-Ile-Lys-Gly-Leu-Glu</u>
G28-2	<u>Phe-Gln-Arg-Thr-Leu-Ser-Glu</u>
G29-1	<u>Leu-Lys-Glu</u>
G31-1	<u>Arg-Ile-Ile-Gly-Gly-Lys-Asn-Phe-Thr-Asp-Asp-Asp</u> -(Glx, Gly ₂ , Lys)
G31-2	<u>Leu-Trp-Ala-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-Lys-Asp-Ile-Lys-Ile-Ala-</u> <u>Val-Leu-Asp</u> -(Asx ₇ , Thr ₂ , Ser, Glx, Pro, Gly ₅ , Val, Ile ₂ , Leu, Phe, His, Lys ₃ , Arg)
T'6	<u>Ser-Ser-Glu-Phe-Ser-Asn-Ala-Gly-Lys</u>
T'21	<u>Ile-Ala-Val-Leu-Asp-Thr-Gly-CmCys</u> -(Asp ₂ , Ser, Pro, Val, Leu, His, Lys)
T'28	<u>Thr-Glu-Glu-Leu-Ser-Tyr-Pro-Ala-Ala-Tyr-Asn</u>
T'48	<u>Ala-Asp-Ile-Ile-Ser-Met</u> -(Asp ₂ , Ser, Pro ₂ , Glu ₂ , Pro ₂ , Gly ₂ , Ala, Val ₂ , Leu ₂ , Lys)- <u>Ala-Val-Lys</u>

Определена методом Эдмана (—) , методом Эдмана в
дансильном варианте (—>), методом DABITC/PITC (—>),
с помощью твердофазного секвенатора (—>), гидролизом карбокси-
пептидазами А (СрА) и В (СрВ) (←)

тановлена 38-членная структура соответствующего названным пептидам участка ВСП (табл. 3, А, 111—148).

Пептид G19-1. N-Концевая последовательность пептида перекрывается С-концевой последовательностью химотриптического пептида C22-1 [2]. Последние из определенных остатков пептида G19-1 -Val-Ser-Gly- соответствуют N-концевой последовательности химотриптических пептидов C1-2 и C1-4, входящих в известную 24-членную структуру [2]. Следовательно, можно считать установленной структуру участка ВСП из 44 аминокислотных остатков (табл. 3, А, 54—97).

Пептид G21-1. В N-концевой области его последовательность перекрывается последовательностью пептида C16-1, входящего в известную структуру из 21 аминокислотного остатка (см. описание пептида G2-1), в С-концевой — последовательностью пептида T21-2 [1], с которой начинается структура участка ВСП из 14 аминокислотных остатков. «Мостиковый» пептид G21-1 объединяет обе последовательности в структуру из 35 аминокислотных остатков (табл. 3, D, 240—274).

Пептид G21-3 содержит 19 аминокислот. С помощью твердофазного секвенатора установлена частичная N-концевая последовательность: Ala-Ser-Xaa-Xaa-Ile-Val-. Для установления полной структуры пептид гидролизовали трипсином, гидролизат разделили с помощью ВЭЖХ. Далее полученные пептиды G21-3-T1, G21-3-T2, G21-3-T3 и G21-3-T4 секвенировали вручную методом Эдмана. Структура пептидов:

G21-3-T1: Tyr-Glu,

G21-3-T2: Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Asp-Gly-Ser-Gly-Lys,

G21-3-T3: Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Asp-Gly-Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu,

G21-3-T4: Ala-Ser-Leu-Leu-Ile-Val-Lys.

Очевидно, что пептид G21-3-T4 представляет собой N-концевую последова-

Участок В

144 150 155
 Glu-Ala-Val-Thr-Asn-Ala-Val-Lys-Val-Gly-Ser-Leu-Val-Val-Cys-Ala-
 ← T11-1 → ← C7-1 → ← C6-1 → ← C3-1 →

160 165 170 173
 Ala-Gly-Asn-Glu-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-Arg-Thr-Glu-Glu-Leu-(Ser, Ala,
 ← C7-1 → ← C3-1 → ← C6-1 → ← T'28 →
 Thr-Glu-Glu-Leu-Ser-Tyr-

Ala, Pro, Tyr, Tyr)
 ← C3-1 →
 Pro-Ala-Ala-Tyr
 ← T'28 →

Участок С

173 180 185
 Leu-Ser-Tyr-Pro-Ala-Ala-Tyr-Asn-Glu-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ser-Val-
 ← C3-2 → ← C9-1 →

189 190 195 197
 Ser-Val-Ala-Arg-Lys-Ser-Ser-Glu-Phe-(Asx, Asx, Ser, Glx, Gly,
 ← C24-2 → ← C9-1 → ← T'6 →
 Ser-Ser-Glu-Phe-Ser-Asn-Ala-Gly-Lys

Ala, Ile, Leu, Lys)

Участок D

198 200 205 210
 Ser-Asn-Ala-Gly-Lys-Glu-Ile-Asp-Leu-Val-Ala-Pro-Gly-Glu-Asn-Ile-
 ← C1-3 → ← T9-1 → ← C21-4 →

214 215 220 225
 Leu-Ser-Thr-Leu-Pro-Asn-His-Lys-Tyr-Gly-Lys-Leu-Thr-Gly-Thr-Ser-
 ← T9-1 → ← C46-1 → ← G21-4 → ← C38-1 →

230 235 240 245
 Met-Ala-Ala-Pro-His-Val-Ser-Gly-Ala-Leu-Ala-Leu-Ile-Lys-Gly-Leu-
 C38-1 → ← C30-1 → ← G21-4 → ← C31 → ← T6-1 →

246 250 255 260
 Glu-Gln-Ala-Ser-Phe-Gln-Arg-Thr-Leu-Ser-Glu-Ala-Glu-Val-Tyr-Ala-
 G21-4 → ← T6-1 → ← C31 → ← G2-1 → ← C16-1 → ← T21-2 →
 ← G21-1 →

262 265 270 275
 Gln-Leu-Val-Arg-Arg-Thr-Leu-Pro-Leu-Asp-Ile-Ala-Lys-Thr-Leu-Ala-
 G21-1 → ← T21-2 → ← C50 → ← T11-2 → ← G23-3 →

278 280 285 290
 Gly-Asn-Gly-Phe-Leu-Tyr-Leu-Asp-Ala-Pro-Asp-Val-Leu-Met-Glu-Lys-
 ← T10-2 → ← C3-3 → ← C32-1 →
 ← G23-3 →

294 295 297
 Ala-Glu-Gln-Ala-(Asx, Ser, Glx, Gly₂, Ala, Phe, Ile, Lys)-Leu
 ← C3-3 → ← C32-1 → ← T10-2 →

Аминокислотные последовательности субтилизина BPN' и внутриклеточных сериновых протеиназ *Bsu* и *Bam*

Met-Asn-Gly-Glu-Ile-Arg-Leu-Ile-Pro-Tyr-Val-Thr-Asn-Glu-Gln-Ile-Met-

I Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Val-Ser-Gln-Ile-Lys-Ala-Pro-Ala

II Asp-Val-Asn-Glu-Leu-Pro-Glu-Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Lys-Ala-Pro-Glu-
I 5 10 15

III Asp-Val-Asn-Glu-Leu-Pro-Glu-Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Lys-Ala-Pro-Glu-
←—————участок А—————

I Leu-His-Ser-Gln-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ser-Asv-Val-Lys-Val-Ala-Val-Ile-

II Asn-Trp-Ala-Lys-Gly-Val-Lys-Gly-Lys-Asn-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Leu-
I7 20 25 30

III Leu-Trp-Ala-Lys-Gly-Phe-Lys-Gly-Lys-Asp-Ile-Lys-Ile-Ala-Val-Leu
—————участок А—————

I Asp*Ser-Gly-Ile-Asp-Ser-Ser-His-Pro-Asp-Leu-Lys - - Val-Ala-

II Asp*Thr-Gly-Cys-Asp-Thr-Ser-His-Pro-Asp-Leu-Lys-Asn-Gln-Ile-Ile-
33 35 40 45

III Asp*Thr-Gly-Cys-Asp-Val-Ser-His-Pro-Asn-Leu-Lys-Asn-Arg-Ile-Ile-
—————участок А—————

I Gly-Gly-Ala-Ser-Met-Val - - - Pro-Ser-Glu-Thr-Pro-Asn-Phe-

II Gly-Gly-Lys-Asn-Phe-Ser-Asp-Asp-Asp-Gly-Gly-Lys-Glu-Asp-Ala-Ile-
49 50 55 60

III Gly-Gly-Lys-Asn-Phe-Thr-Asp-Asp-Asp-Gly-Gly-Lys-Glu-Asp-Ala-Phe-
—————участок А—————

I Gln*Asp-Asp-Asn-Ser-His-Gly-Thr-His-Val-Ala-Gly-Thr-Val-Ala-Ala-

II Ser-Asp-Tyr-Asn-Gly-His*Gly-Thr-His-Val-Ala-Gly-Thr-Ile-Ala-Ala-
65 70 75 80

III Ser-Asp-Tyr-Asn-Gly-His*Gly-Thr-His-Val-Ser-Gly-Thr-Ile-Ala-Ala-
—————участок А—————

Примечания: I, II, III — аминокислотные последовательности субтилизина BPN', ВСП *Bsu* и ВСП *Bam* соответственно. Звездочкой отмечены аминокислоты активного центра. Первая строка из 17 аминокислотных остатков (подчеркнуты) — пептид предшественника ВСП *Bsu* [6], отщепляющийся при активации фермента.

с которой начинается 38-членная последовательность (см. описание пептида G3-4). Структура фрагмента ВСП из 95 аминокислотных остатков, установленная в результате анализа этих данных, приведена в табл. 3 (А, 54—148).

Пептид G21-4 включает в себя последовательности триптического пептида T23-1 [1], химотриптических C30-1, C38-1, C46-1 [2] и перекрывается с N-конца последовательностью пептида T9-1, входящего в известную 25-членную структуру [2]. С С-конца он перекрывается пептидом C31, входящим в 35-членную структуру, установленную при обсуждении пептида G21-1. Последовательность 77 аминокислотных остатков, полученная при анализе этих данных, представлена в табл. 3 (D, 198—274).

I	Gly-Lys-Tyr-Pro-Ser-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ala-Val-Asp-Ser-Ser-Asn	
II	Ala-Ala-Tyr-Asn-Glu-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Arg	
	177 180 185 190	
III	Ala-Ala-Tyr-Asn-Glu-Val-Ile-Ala-Val-Gly-Ser-Val-Ser-Val-Ala-Arg	
	участок B	
	→ T'28	
	← G3-2	участок C
I	Gln-Arg-Ala-Ser-Phe-Ser-Ser-Val-Gly-Pro-Glu-Leu-Asp-Val-Met-Ala	
II	Glu-Leu-Ser-Glu-Phe-Ser-Asn-Ala-Asn-Lys-Glu-Ile-Asp-Leu-Val-Ala	
	193 195 200 205	
III	Lys-Ser-Ser-Glu-Phe-Ser-Asn-Ala-Gly-Lys-Glu-Ile-Asp-Leu-Val-Ala	
	участок C	участок D
	← T'6	
I	Pro-Gly-Val-Ser-Ile-Gln-Ser-Thr-Leu-Pro-Gly-Asn-Lys-Tyr-Gly-Ala	
II	Pro-Gly-Glu-Asn-Ile-Leu-Ser-Thr-Leu-Pro-Asn-Lys-Lys-Tyr-Gly-Lys	
	209 210 215 220	
III	Pro-Gly-Glu-Asn-Ile-Leu-Ser-Thr-Leu-Pro-Asn-His-Lys-Tyr-Gly-Lys	
	участок D	
I	Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser [*] Met-Ala-Ser-Pro-His-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala	
II	Leu-Thr-Gly-Thr-Ser [*] Met-Ala-Ala-Pro-His-Val-Ser-Gly-Ala-Leu-Ala	
	225 230 235 240	
III	Leu-Thr-Gly-Thr-Ser ^h Met-Ala-Ala-Pro-His-Val-Ser-Gly-Ala-Leu-Ala	
	участок D	
I	Leu-Ile-Leu-Ser-Lys-His-Pro-Asn - - - - - Trp-Thr-Asn	
II	Leu-Ile-Lys-Ser-Tyr-Glu-Glu-Glu-Ser-Phe-Gln-Arg-Lys-Leu-Ser-Glu	
	241 245 250 255	
III	Leu-Ile-Lys-Gly-Leu-Glu-Gln-Ala-Ser-Phe-Gln-Arg-Thr-Leu-Ser-Glu	
	участок D	
I	Thr-Gln-Val-Arg-Ser-Ser-Leu-Gln-Asn-Thr-Thr - - - - -	
II	Ser-Glu-Val-Phe-Ala-Gln-Leu-Ile-Arg-Arg-Thr-Leu-Pro-Leu-Asp-Ile	
	257 260 265 270	
III	Ala-Glu-Val-Tyr-Ala-Gln-Leu-Val-Arg-Arg-Thr-Leu-Pro-Leu-Asp-Ile	
	участок D	
I	- - - Thr-Lys-Leu-Gly-Asp-Ser-Phe-Tyr-Tyr-Gly-Lys-Gly-Leu-Ile	
II	Ala-Lys-Thr-Leu-Ala-Gly-Asn-Gly-Phe-Leu-Tyr-Leu-Thr-Ala-Pro-Asp	
	273 275 280 285	
III	Ala-Lys-Thr-Leu-Ala-Gly-Asn-Gly-Phe-Leu-Tyr-Leu-Asp-Ala-Pro-Asp	
	участок D	
I	Asn - Val-Gln-Ala-Ala-Ala-Gln	
II	Glu-Leu-Ala-Glu-Lys-Ala-Glu-Gln-Ser-His-Leu-Leu-Thr-Leu	
	289 290 295 297	
III	Val-Leu-Met-Glu-Lys-Ala-Glu-Gln-Ala	
	участок D	

перекрывается последовательностью пептида С22-1, с которой начинается известная 95-членная последовательность (см. описание пептида G21-3). Следовательно, становится известной структура участка ВСП из 103 аминокислотных остатков (табл. 3, А, 46—148).

Пептид G31-2, судя по результатам аминокислотного анализа (см. табл. 1), содержит более 40 аминокислот. Из-за его низкого выхода методом автоматического секвенирования удалось установить лишь 17-членную N-концевую последовательность (табл. 2). В данном анализе пептид ковалентно связывали с сорбентом (аминопропилстеклом) по ϵ -аминогруппе остатков лизина, которые в результате этого при секвенировании не определяются и, таким образом, выявлены в положениях 4, 7, 9 и 12. Данные согласуются с результатами автоматического секвенирования ВСП [3], в соответствии с которыми пептид G31-2 занимает в цепи ВСП положение 17—61 (табл. 3, А, 17—61). Пептиды T25-1, T27, T28, T15-1 [1], C44-1 [2] и G31-1 выделены из участка ВСП, соответствующего N-концевой последовательности пептида G31-2 (табл. 3, А, 17—61).

Вышеприведенные данные позволяют заключить, что гидролиз ВСП Glu, Asp-специфичной протеиназой Th прошел достаточно специфично: в 85% случаев — по связям, образованным α -карбоксильными группами остатков глутаминовой кислоты. Наблюдались единичные случаи расщепления по α -карбоксамидным связям глутамин (пептид G21-1), аланина (пептиды G8-2, G33-1), серина (пептид G28-2 образован в результате расщепления связи Ser-Phe пептида G2-1 — см. табл. 2). Как и при гидролизе химотрипсином, была расщеплена необычная для этих ферментов пептидная связь Arg(265)—Arg(266).

Изучение структуры пептидов, полученных в результате гидролиза ВСП Glu, Asp-специфичной протеиназой Th, привело к установлению последовательности, в сумме составляющей 243 аминокислотных остатка. Сопоставление результатов исследования структуры пептидов трех гидролизатов (описанного в данной статье, триптического [1] и химотриптического [2]) позволило установить структуру четырех участков ВСП: А из 148 аминокислотных остатков; В, С и D, содержащих 36, 34 и 108 аминокислотных остатков соответственно (см. табл. 3), что в сумме составляет 326 остатков. По данным аминокислотного анализа [1], ВСП содержит около 300 аминокислотных остатков. Поэтому можно считать, что в результате изучения структуры пептидов трех гидролизатов найдены все аминокислотные остатки, составляющие структуру ВСП, а последовательности четырех вышеописанных участков перекрываются. Поскольку их С-концевые последовательности не установлены, был проведен гидролиз трипсином восстановленной и карбоксиметилированной ВСП, гидролизат разделен с помощью ВЭЖХ и выделены «мостиковые» пептиды, необходимые для расстановки участков А—D в цепи ВСП. Кроме того, был выделен еще один пептид, содержащий цистеин. (Ранее [1] триптический гидролизат разделяли с помощью электрофореза и хроматографии на бумаге, и соответствующие пептиды выделить не удалось.) Описание пептидов приводится ниже.

Пептид T'6 перекрывается с N-конца пептидом С24-2 и, значит, продолжает последовательность пептида С9-1 [2], представляющего собой С-концевую область участка С. С С-конца пептид T'6 перекрывается пептидом С1-3, который является N-концевым пептидом участка D (табл. 3, С, D).

Пептид T'21 содержит карбоксиметилцистеин. Судя по аминокислотному составу (табл. 1) и N-концевой аминокислоте, определенной дансированием, пептид в цепи ВСП занимает положение 29—44 (табл. 3, А). Однако при автоматическом секвенировании протеиназы [3] в этой области ВСП цистеин не был найден. При определении структуры пептида методом дансирования оказалось, что положение 8 занимает остаток карбоксиметилцистеина. Следовательно, положение 36 в цепи ВСП занимает остаток цистеина (табл. 3, А), а не изолейцина [3].

Последовательность пептида T'28 перекрывается с N-конца последовательно-

стью пептида С7-1 [2] и, значит, соответствует С-концевой области пептида С3-1 и участка В (табл. 3, В). С С-конца пептид Т'28 перекрывается пептидом G3-2, представляющим собой N-концевую область участка С (табл. 3, С).

N-Концевая последовательность пептида Т'48 совпадает с последовательностью пептида G2-2, входящего в С-концевую область участка А (табл. 3, А); С-концевая — с последовательностью трех С-концевых остатков пептида Т11-1, представляющего собой N-концевую область участка В (табл. 3, В).

Полученные данные позволяют реконструировать первичную структуру молекулы ВСП следующим образом.

В соответствии с данными секвенирования ВСП [3] N-концевая последовательность представлена последовательностью участка А (табл. 3, А). При сравнении N-концевой последовательности участка В, представленной пептидом Т11-1, с аминокислотным составом С-концевой области участка А очевидно, что они перекрываются и что пептид Т11-1 получен в результате гидролиза трипсином связи $\text{Lys}^{143}\text{-Glu}^{144}$, а пептид С3-5 — гидролиза химотрипсином связи $\text{Asn}^{148}\text{-Ala}^{149}$ (табл. 3, А, В). Перекрывание участков А и В подтверждает и наличие «мостикового» пептида Т'48, N-концевая шестичленная последовательность которого соответствует остаткам 126—131 участка А, а трехчленная С-концевая — остаткам 149—151 участка В. Таким образом, начиная со 144-го остатка участка А в полипептидной цепи ВСП *Bam* расположен участок В. С-Концевая область участка В перекрывается триптическим пептидом Т'28, последовательность которого начиная с 3-го остатка — лейцина полностью соответствует N-концевой последовательности участка С, представленной пептидом G3-2, образованным в результате расщепления Glu, Asp -специфичной протеиназой связи $\text{Glu}^{172}\text{-Leu}^{173}$. Следовательно, участок С соответствует последовательности в цепи ВСП *Bam*, начинающейся с Leu^{173} . Анализ последовательности пептида Т'6 показывает, что с N-конца он перекрывается пептидами Т21-1 и С24-2, представляющими собой С-концевую область участка С, а с С-конца — пептидом С1-3, с которого начинается последовательность участка D. Пептид Т'6 получен в результате расщепления трипсином связи $\text{Lys}^{193}\text{-Ser}^{194}$. Таким образом, участок D соответствует С-концевой области последовательности ВСП и начинается с остатка Ser^{198} . Расположение участков А—D в цепи ВСП показано в табл. 4.

Следует отметить, что наличие в С-концевой структуре ВСП аминокислотных остатков, представленных в скобках, как и С-концевого лейцина (табл. 3, D, пептид Т10-2, 282—307), вызывает сомнение, поскольку при определении последовательности пептида Т10-2 с помощью твердофазного секвенатора параллельно с ней прослеживались еще две структуры. Вероятно, эти примесные пептиды — причина появления в составе Т10-2 «лишних» аминокислот. Это предположение подтверждается и отсутствием в двух последних гидролизатах [2], как и в повторном трипсиновом, каких-либо пептидов, соответствующих С-концевой последовательности с таким аминокислотным составом. Скорее всего С-концевая последовательность представлена пептидом С32-1, заканчивающимся С-концевым остатком Ala^{297} , что согласуется с результатами анализа аминокислотного состава ВСП *Bam* [1].

Итак, реконструирована аминокислотная последовательность ВСП *Bam*, состоящая из 297 аминокислотных остатков (табл. 4).

Следует напомнить, что ВСП *Bam* представлена двумя молекулярными формами — с R_f 0,6 (минорная) и 0,7 (главная), которые, как было выявлено при секвенировании белка [3], отличаются N-концевым трипептидным удлинением (Asp-Val-Asn). Наличие двух различающихся по длине полипептидных цепей, как предполагалось ранее, может быть объяснено неоднозначностью активации предшественника протеиназы [4], что согласуется с данными Koide и сопр. [5]. Реконструированная этими авторами по нуклеотидной последовательности гена первичная структура ВСП *B. subtilis* (ВСП *Bsu*) длиннее на 17 аминокислотных остатков с N-конца, чем установленные ранее N-концевые последовательности

ВСП разных видов бацилл [4]. Авторы предполагают, что данная структура относится к проферменту ВСП *Bsu*, который далее подвергается посттрансляционному процессингу с отщеплением 17 или 20 аминокислотных остатков с образованием двух молекулярных форм фермента. К такому же выводу — о синтезе неактивного предшественника ВСП — пришли Vand и сотр. [6] и Ruppen с сотр. [7], причем последние авторы показали, что синтез профермента начинается сразу по окончании экспоненциальной фазы роста клеток, т. е. в первые минуты процесса споруляции, в то время как активный фермент появляется только через 4 ч.

Сравнение первичных структур ВСП *Vam* и *Bsu* [5] выявляет некоторые различия между ними (табл. 4). Так, наблюдаются замены 36 из 297 аминокислотных остатков ВСП *Vam*, что соответствует совпадению 88% аминокислотных остатков при сопоставлении структур этих протеиназ (17-членная N-концевая последовательность, относящаяся к проферменту, не учитывается). В трех случаях (остатки 26, 42, 105 ВСП *Vam*) это замены дикарбоновых кислот (амидов) на соответствующие амиды (дикарбоновые кислоты), в 16 — замены гидрофильных (гидрофобных) остатков на гидрофобные (гидрофильные). Остальные замены консервативны, они не затрагивают последовательностей, включающих аминокислоты активного центра (Asp^{33} , His^{70} , Ser^{229}).

Кроме вышеприведенных различий следует отметить отсутствие в последовательности ВСП *Vam* пентапептида в С-концевой области, присутствующего у ВСП *Bsu*.

При сравнении первичных структур ВСП *Vam* и субтилизина BPN' (табл. 4) можно отметить совпадение 46% аминокислотных остатков, что соответствует проценту совпадения остатков в 50-членных N-концевых последовательностях соответствующих ферментов [4]. Наиболее близки участки, содержащие аминокислоты активного центра, однако и здесь наблюдаются консервативные замены: Ser^{33} рядом с Asp^{32} субтилизина на Thr у ВСП *Vam*, Ser^{63} рядом с His^{64} субтилизина на Gly у ВСП *Vam*. Кроме того, аминокислотная последовательность ВСП *Vam* содержит на 22 аминокислотных остатка больше, чем субтилизин BPN': она длиннее на один остаток с N- и С-концов и имеет вставки из одного (остатки 106, 169, 290), двух (остатки 45, 46), трех (остатки 55—57), пяти (остатки 249—253) и семи (остатки 268—274) аминокислотных остатков. Субтилизины других типов и из других источников, например Carlsberg [8], Novo [9], DY [10], также несут делеции 21—22 аминокислотных остатков по сравнению с ВСП *Vam*.

Следует отметить значительно большее количество дикарбоновых кислот в молекуле ВСП *Vam* (40 остатков) по сравнению с субтилизином (15 остатков), что приводит к значительно более низкому значению pI ВСП *Vam*, чем у субтилизинов. Вероятно, боковые цепи этих аминокислот образуют гроздь функциональных остатков, связывающих ионы Ca^{2+} , роль которого, по-видимому, заключается в стабилизации пространственной структуры протеиназы и нейтрализации высокого отрицательного заряда при физиологических значениях pH. Этим объясняется строгая зависимость стабильности ВСП от ионов Ca^{2+} в отличие от менее выраженной у субтилизинов.

ВСП *Vam*, содержащая два остатка цистеина, является в отличие от субтилизина тиолзависимым ферментом: ее активность подавляется ионами Hg^{2+} . Отсутствие цистеина характерно почти для всех известных к настоящему времени субтилизинов. Исключение составляет подсемейство тиолзависимых субтилизинов, к которым относят термитазу, выделенную из *Thermoactinomyces vulgaris* [11], щелочные протеиназы из *Bacillus thuringiensis* [12], *Bacillus cereus* [13], а также протеиназу К из гриба *Tritirachium album* [14] и термомиколлин из *Malbranchea pulchella* [15]. Субтилизин Sfericase из *B. sphaericus* [16] также является тиолзависимым ферментом, однако по своим свойствам он так значительно отличается от субтилизинов, что, возможно, не относится к их семейству.

В то же время значительная степень идентичности аминокислотных остатков

(46%) внутриклеточной (ВСП *Bam*) и внеклеточной (субтилизин BPN') сериновых протеиназ одного вида бактерий подтверждает, что в их геноме существуют два различных, но близкородственных структурных гена, появившихся, вероятно, в результате дупликации общего гена-предшественника [4].

Более высокая, чем у субтилизинов, степень структурной идентичности у ВСП различных видов бактерий, показанная ранее при сравнении их 50-членных N-концевых последовательностей [4], подтвердилась при сравнении полных аминокислотных последовательностей ВСП *Bam* и *Bsu*. Так, если степень идентичности аминокислотных остатков между субтилизинами Carlsberg и BPN' [17], субтилизинами DY и Novo [18] составляет 67%, то между ВСП *Bam* и *Bsu* она равна 88%.

Относительно функциональной роли ВСП существуют противоречивые мнения. Поскольку эта протеиназа появляется во время споруляции бактерий, можно было предполагать, что она является главным ферментом, способствующим спорообразованию, и, следовательно, играет определяющую роль в интенсивном обороте белка в клетке [19—22], скорость которого достигает иногда 20% от общего клеточного белка за 1 ч [23]. Cheng и Aronson [22] считают, что ВСП могут принимать участие в процессинге белков, необходимых для оболочки спор. Было найдено, что мутанты, дефектные по ВСП, имеют низкий уровень белкового оборота [20], а спорообразование либо отсутствует [24], либо задерживается, причем образующиеся немногочисленные споры дефектны по оболочке [25].

Этим работам противоречат более поздние исследования. Так, Koide и соотр. [5] ввели в неспорулирующий и дефицитный по ВСП мутант *B. subtilis* (S87) ген, кодирующий ВСП, однако при наличии нормального уровня активности ВСП в клетке споруляции не наблюдалось. Авторы считают, что мутант S87, как и в работе [20], имеет дополнительный генетический дефект, обуславливающий отсутствие споруляции, а ВСП не играет определяющей роли в процессе спорообразования, но может поставлять аминокислоты, участвуя в деградации клеточных белков.

Vand и соотр. [6] обнаружили, что и исходный штамм *B. subtilis*, и полученный ими мутантный штамм, дефицитный по ВСП, одинаково способны к споруляции, а скорость белкового обмена различается лишь незначительно: у исходного штамма она составляет 13% в 1 ч, а у мутантного — 10% в 1 ч. Авторы делают вывод, что роль ВСП в процессе споруляции сводится к деградации небольшой группы «специфических белков», причем при отсутствии ВСП эту роль могут играть другие протеиназы.

Таким образом, существуют полярные точки зрения относительно роли ВСП в процессе споруляции. Учитывая уникальную димерную организацию молекулы ВСП, стерически ограничивающую ее специфичность и защищающую нативные белки от случайного протеолиза, можно предположить, что ее роль заключается в ограниченном протеолизе некоторых нативных и гидролизе денатурированных белков в клетке во время спорообразования.

Экспериментальная часть

В работе использовали: трипсин (Serva, ФРГ); карбоксипептидазы А и В (Worthington, США); дансилхлорид, фенилизотиоцианат (PITC) (Fluka, Швейцария); диметиламиноазобензизотиоцианат (DABITC) (Aldrich, США); ионообменную смолу Chromobeads P, 2-1-01-18(A)₂, 15-03-58-04 (Ирландия). В работе использовали *Glu*, Asp-специфичную протеиназу *Thermoactinomyces species*, любезно предоставленную научным сотрудником нашей лаборатории О. В. Мосоловой [26].

Гидролиз ВСП *Glu*, Asp-специфичной протеиназой *Thermoactinomyces species*. Восстановленную и карбоксиметилированную [27] ВСП (70 мг) растворяли в 15 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера, pH 8,5, добавляли 1,5 мл раствора фермента (концентрация 0,5 мг/мл) и оставляли на 4 ч при 37° С.

Далее раствор замораживали и лиофилизовали. Фракционирование продуктов гидролиза проводили на смоле Chromobeads в условиях, описанных ранее [28].

Гидролиз ВСП трипсином. Восстановленную и карбоксиметилированную [27] протейназу (12 мг) растворяли в 3 мл 0,05 М триэтиламин-карбонатного буфера, рН 8,0, добавляли 0,6 мг трипсина в 0,2 мл того же буфера и оставляли при перемешивании на 2 ч при 37° С. Затем к раствору добавляли такое же количество фермента и оставляли в тех же условиях еще на 2 ч. Раствор замораживали и лиофилизовали. Разделение продуктов гидролиза проводили с помощью ВЭЖХ на препаративной колонке Zorbax BioSeries PER RR1 (6,2×8 мм), С 8 (Du Pont, США).

Идентификацию пептидсодержащих фракций проводили с помощью ТСХ на пластинках с целлюлозой (Whatman, США).

Пептиды очищали с помощью ВЭЖХ на приборе LDC (США) на колонке С₁₈ (4,6×250 мм) по методике, описанной ранее [2].

Аминокислотный анализ (5,7 н. НСl, 105°С, 24 ч) проводили на анализаторе Biotronik LC 5001 (ФРГ).

Структуру пептидов изучали методом Эдмана [29] и методом Эдмана в разных модификациях: в дансильном варианте [28], методом DABITC/PITC [30] и с помощью твердофазного секвенатора Rank Hilger (Англия) по методике, описанной ранее [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сузова И. А., Яношс В. В., Ревина Л. П., Левин Е. Д., Степанов В. М. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 783—789.
2. Сузова И. А., Яношс В. В., Ревина Л. П., Остославская В. И., Колесникова Л. А., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Степанов В. М. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. № 4. С. 382—392.
3. Stepanov V. M., Strongin A. Ya., Izotova L. S., Abramov Z. T., Belianova L. P., Baratova L. A., Lyublinskaya L. A., Ermakova L. M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 77. № 1. P. 397—403.
4. Стронгин А. Я., Степанов В. М. // Биохимия. 1981. Т. 46. Вып. 8. С. 1347—1363.
5. Yoshinavo K., Akira N., Takeshi U., Teruhiko B. // J. Bacteriol. 1986. V. 187. № 1. P. 110—116.
6. Band L., Henner D. J., Ruppen M. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 1. P. 444—446.
7. Ruppen M. E., Van Alstine G. L., Band L. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 1. P. 136—140.
8. Smith E. L., Delange K. J., Ewans W. H., London M., Markland F. S. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 2184—2191.
9. Markland F. S., Smith E. L. // The Enzymes. New York—London: Acad. Press, 1971. V. 3. P. 561—608.
10. Genov N., Shopova M., Boteva R., Jori G., Ricchelli F. // Biochem. J. 1982. V. 207. P. 193—200.
11. Behnke U., Schalinatus E., Ruttloff H., Hohne W. E., Frommel C. // Acta biol. et med. Germ. 1978. V. 37. № 8. P. 1185—1192.
12. Stepanov V. M., Chestukhina G. G., Rudenskaya G. N., Epremyan A. S., Osterman A. L., Khodova O. M., Belyanova L. P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 100. № 3. P. 1680—1687.
13. Честухина Г. Г., Эпремян А. С., Гайда А. В., Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1649—1658.
14. Jany K. D., Mayer B. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1985. V. 366. P. 485—492.
15. Gaupher G. M., Stevenson K. J. // Methods Enzymol. 1976. V. 45. P. 414—433.
16. Yoshida K., Hidaka H., Miyado S., Shibata U., Saito K., Yamada Y. // Agr. Biol. and Chem. 1977. V. 41. P. 745—755.
17. Peters K., Pauli D., Hache H., Boteva R. N., Genov N. C., Fittkau S. // Current Microbiol. 1989. V. 18. P. 171—177.
18. Nedkov P., Oberthur W., Braunitzer G. // Physiol. Chem. Hoppe-Seyler. 1983. V. 364. P. 1537—1540.
19. Szulmajster J., Keruer E. // Spores VI. 1975. American Society for Microbiology. Washington. DC. P. 271—278.
20. Kerjan P., Keruer E., Szulmajster J. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 98. P. 353—362.
21. Cheng Y. E., Aronson A. I. // Arch. Microbiol. 1977. V. 115. P. 61—66.
22. Cheng Y. E., Aronson A. I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 1254—1258.
23. Spundich J., Kornberg A. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 4600—4605.

24. Hageman J. H., Carlton B. C.//J. Bacteriol. 1973. V. 114. P. 612—617.
25. Stelma G. N., Aronson A. I., Fitz-James P.//J. Bacteriol. 1978. V. 134. P. 1157—1170.
26. Мосолова О. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Цаплина И. А., Ходова О. М.//Биохимия. 1987. Т. 52. С. 414—421.
27. Ваганова Т. И., Левин Е. Д., Степанов В. М.//Биохимия. 1964. Т. 29. С. 1070—1075.
28. Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сузова И. А., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Немцова Е. Р., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М.//Биоорганич. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1765—1777.
29. Tarr G. E.//Anal. Biochem. 1981. V. 111. P. 27—32.
30. Chang J. Y.//Methods Enzymol. 1983. V. 91. P. 455—466.

Поступила в редакцию
13.II.1993

После доработки
8.II.1994

I. A. Surova, L. P. Revina, V. V. Yanonis,
L. A. Kolesnikova, V. M. Stepanov

THE PRIMARY STRUCTURE OF THE *Bacillus*
amyloliquefaciens INTRACELLULAR SERINE PROTEINASE
III. AMINO ACID SEQUENCES OF PEPTIDES FROM
THE Glu,Asp-SPECIFIED PROTEINASE HYDROLYSATE.
RECONSTRUCTION OF THE INTRACELLULAR SERINE PROTEINASE
PRIMARY STRUCTURE

*All-Union Research Institute of Genetics and Selection
of Industrial Microorganisms, Moscow*

Key words: serine proteinase, primary structure, *Bacillus amyloliquefaciens*.

Glu,Asp-specified protease hydrolysate of intracellular serine proteinase (ISP) was separated by ion-exchange chromatography on a sulphocationite resin followed by HPLC to yield 30 individual peptides. Their sequences, spanning to 243 amino acid residues, were determined by the manual Edman procedure. Four overlapping fragments were reconstructed by comparing their sequences with those of tryptic and chymotryptic peptides. To arrange these fragment in the proteinase polypeptide chain and to reconstruct the enzyme's total sequence, additional peptides were isolated from the tryptic hydrolysate and analysed. Primary structure of ISP, corresponding to 297 amino acid residues, was reconstructed. Its comparison with related serine proteinases revealed the following levels of homology: with *Bacillus subtilis* intracellular serine proteinase, 88%; with secretory subtilisin BPN' produced by *B. amyloliquefaciens*, 46%.