



УДК 547.962

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА LIV-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
ИЗ *E. COLI*Овчинников Ю. А., Алданова Н. А., Гринкевич В. А.,
Арзамасова Н. М., Мороз Н. Н., Назимов И. В.Институт биоорганической химии им. М. М. Шелыгина Академии наук СССР,
Москва

В последние годы из периплазматического пространства бактериальных клеток выделена новая группа белков, специфически связывающих различные низкомолекулярные субстраты. Ряд данных свидетельствует о том, что эти белки принимают участие в активном транспорте метаболитов через клеточную мембрану, по крайней мере на первой стадии процесса — стадии рецепции [1—3].

К представителям этого класса соединений относится белок из *E. coli*, образующий комплекс с Leu, Ile, Val (LIV-белок) [4, 5]. Механизм функционирования белка в клетке и химические основы специфического комплексообразования пока не вполне ясны.

Одним из необходимых этапов в решении этой проблемы является изучение первичной структуры белка с последующей локализацией функционально важных групп и участков его молекулы.

Настоящая работа посвящена определению полной первичной структуры LIV-связывающего белка. LIV-белок выделялся из штамма K-12 *E. coli* по методу [6]. Молекула белка состоит из одной полипептидной цепи с M 36 000 и содержит два остатка цистеина, которые, по-видимому, образуют дисульфидный мостик.

В качестве начального этапа изучения строения белка был выбран исчерпывающий гидролиз его карбоксиметильного производного (KM-LIV-белок) трипсином. Триптический гидролиз прошел достаточно специфично, только один из выделенных пептидов образовался за счет аномального разрыва пептидной связи (281—282), не отвечающего специфичности фермента. Из триптического гидролизата выделены все пептиды, входящие в состав молекулы белка.

Для нахождения перекрытий между триптическими пептидами применена методология расщепления полипептидной цепи белка на крупные фрагменты с целью установления их строения автоматической деградацией на секвенаторе [7]. Проведено расщепление бромцианом (5 остатков Met в молекуле), триптический гидролиз по остаткам аргинина (7-Arg-), ограниченный кислотный гидролиз по связям аспартил—пролил [8].

Процесс реконструкции полипептидной цепи белка из фрагментов представлен на рис. 1. Из бромцианового гидролизата выделено 6 пептидов M_1 — M_6 . N-Концевой фрагмент содержал плохо расщепляемую бромцианом связь Met—Ser (11—12), вследствие чего пептид M_1 был

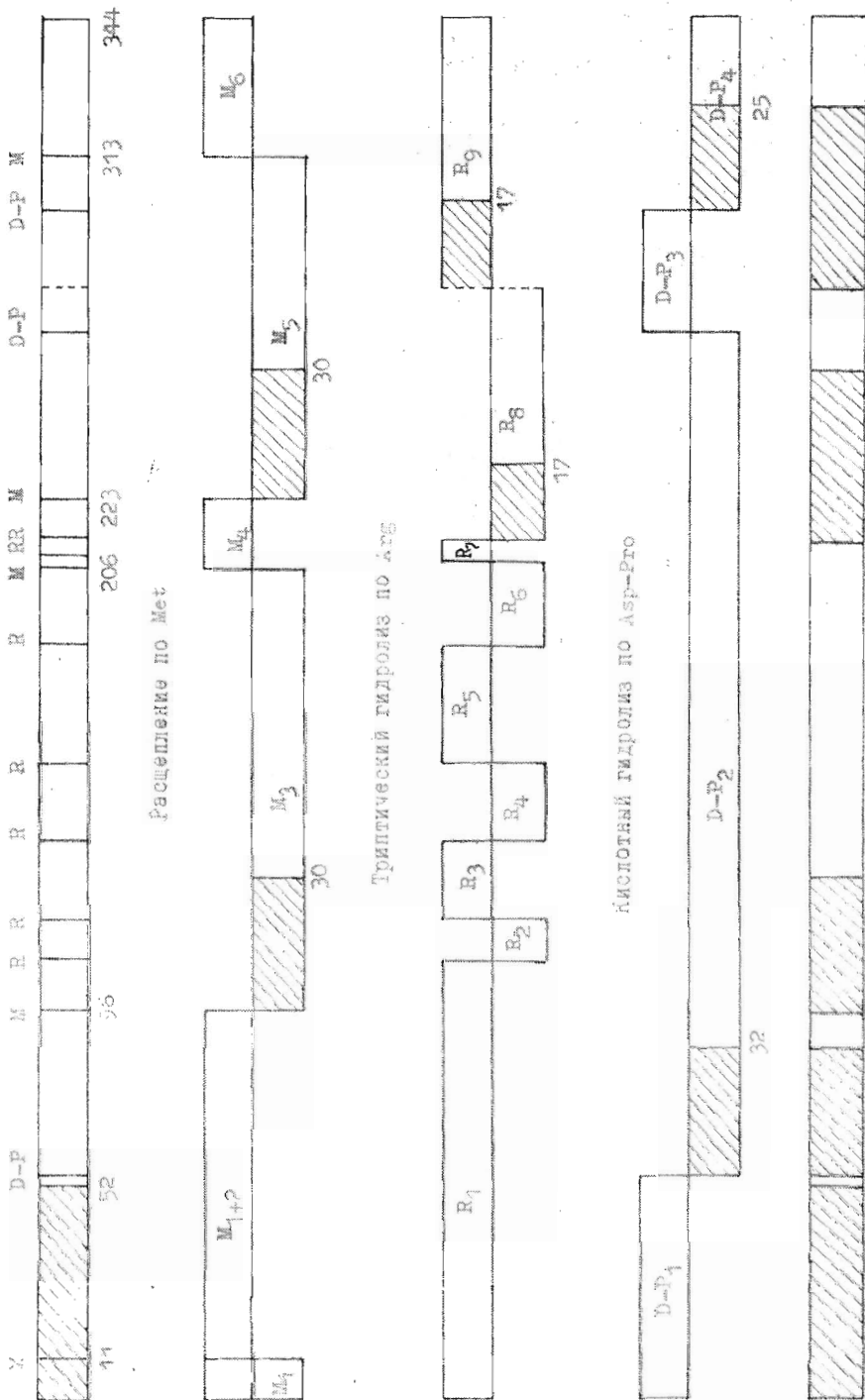


Рис. 1. Схема реконструкции молекулы I IV-белка из фрагментов. Зашированы участки структуры, установленные автоматической деградацией. Обозначения аминокислотных остатков даны в однобуквенном коде

Glu-Asp-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Val-Gly-Ala-Met-Ser-Gly-Pro-Val-Ala-Gln-Tyr-Gly-Asp-²⁰
 Gln-Glu-Phe-Thr-Gly-Ala-Glu-Gln-Ala-Val-Ala-Asp-Ile-Asn-Ala-Lys-Gly-Gly-Ile-Lys-⁴⁰
 Gly-Asn-Lys-Leu-Gln-Ile-Val-Lys-Tyr-Asp-Asp-Ala-Cys-Asp-Pro-Lys-Gln-Ala-Val-Ala-⁶⁰
 Val-Ala-Asn-Lys-Val-Val-Asn-Asp-Gly-Ile-Lys-Tyr-Val-Ile-Gly-His-Leu-Cys-Ser-Ser-⁸⁰
 Ser-Thr-Gln-Pro-Ala-Ser-Asp-Ile-Tyr-Glu-Asp-Glu-Gly-Ile-Leu-Met-Ile-Thr-Pro-Ala-¹⁰⁰
 Ala-Thr-Ala-Pro-Glu-Leu-Thr-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gln-Leu-Ile-Leu-Arg-Thr-Thr-Gly-Leu-¹²⁰
 Asp-Ser-Asp-Gln-Gly-Pro-Thr-Ala-Ala-Lys-Tyr-Ile-Leu-Glu-Lys-Val-Lys-Pro-Gln-Arg-¹⁴⁰
 Ile-Ala-Ile-Val-His-Asp-Lys-Gln-Gln-Tyr-Gly-Glu-Gly-Leu-Ala-Arg-Ala-Val-Gln-Asp-¹⁶⁰
 Gly-Leu-Lys-Lys-Gly-Asn-Ala-Asn-Val-Val-Phe-Phe-Asp-Gly-Ile-Thr-Ala-Gly-Glu-Lys-¹⁸⁰
 Asp-Phe-Ser-Thr-Leu-Val-Ala-Arg-Leu-Lys-Lys-Glu-Asn-Ile-Asp-Phe-Val-Tyr-Tyr-Gly-²⁰⁰
 Gly-Tyr-His-Pro-Glu-Met-Gly-Gln-Ile-Leu-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Lys-Thr-²²⁰
 Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-Val-Ala-Asn-Val-Ser-Leu-Ser-Asn-Ile-Ala-Gly-Glu-Ser-²⁴⁰
 Ala-Glu-Gly-Leu-Leu-Val-Thr-Lys-Pro-Lys-Asn-Tyr-Asp-Gln-Val-Pro-Ala-Asn-Lys-Pro-²⁶⁰
 Ile-Val-Ala-Asp-Ile-Lys-Ala-Lys-Lys-Gln-Asp-Pro-Ser-Gly-Ala-Phe-Val-Trp-Thr-Thr-²⁸⁰
 Tyr-Ala-Ala-Leu-Gln-Ser-Leu-Gln-Ala-Gly-Leu-Asn-Gln-Ser-Asp-Asp-Pro-Ala-Glu-Ile-³⁰⁰
 Ala-Lys-Tyr-Leu-Lys-Ala-Asn-Ser-Val-Asp-Thr-Val-Met-Gly-Pro-Leu-Thr-Trp-Asp-Glu-³²⁰
 Lys-Gly-Asp-Leu-Lys-Gly-Phe-Glu-Phe-Gly-Val-Phe-Asp-Trp-His-Ala-Asn-Gly-Thr-Ala-³⁴⁰
 Thr-Ala-Asp-Lys

Рис. 2. Полная первичная структура LIV-связывающего белка

выделен с незначительным выходом, а фрагменты M_2 и M_{1+2} разделить не удалось. Анализ N- и C-концевых последовательностей фрагментов $M_1 - M_6$ и данные по структуре триптических метионинсодержащих пептидов позволили установить порядок их расположения в полипептидной цепи и таким образом определить архитектуру молекулы в целом. N-Концевая последовательность белка (52 аминокислотных остатка) установлена на секвенаторе, при этом были найдены перекрытия 6 триптических пептидов. Автоматической деградацией на фрагментах M_3 и M_5 идентифицировано по 30 аминокислот, что позволило соединить 5 триптических пептидов. Строение фрагмента M_1 (17 аминокислотных остатков) установлено ручной деградацией по методу Эдмана [9]. Фрагмент M_6 , содержащий 31 аминокислоту, гидролизировался дополнительно стафилококковой протеазой.

Триптический гидролизат малеилированного КМ-белка (М-КМ) содержал 9 пептидов, один из них образовался за счет неспецифического расщепления связи 281—282. Фрагменты $R_2 - R_7$ представляли собой

сравнительно небольшие пептиды (от 3 до 32 аминокислотных остатков), их строение определялось ручными методами деградации, для пептидов R₃ и R₅ был применен гидролиз химотрипсином и термолизинном соответственно.

Для получения перекрытий между аргининовыми блоками R₂ — R₆ проведен химотриптический гидролиз бромцианового фрагмента M₃ с целенаправленным выделением аргининсодержащих пептидов. Результаты определения аминокислотной последовательности этих пептидов в совокупности с данными, полученными при автоматической деградации бромцианового фрагмента M₃, позволили однозначно расставить блоки R₂ — R₆ и таким образом установить полную структуру пептида M₃.

Данные по структуре бромциановых пептидов и пептидов триптического гидролиза M-ЦМ-белка позволили определить локализацию связей аспартил—пролил, являющихся точками селективного расщепления пептидной цепи в мягких кислых условиях. Таких связей в молекуле LIV-белка три, и расположены они таким образом, что образующиеся при гидролизе фрагменты дают ценную структурную информацию. Необходимо отметить, что в процессе кислотного гидролиза произошло частичное расщепление связей аспартил—глицил (3 в молекуле белка), усложнившее состав гидролизата. Автоматической и ручной деградацией фрагментов D — P₄ и D — P₃ найдено перекрытие трех триптических пептидов и значительно сужена неизвестная последовательность бромцианового пептида M₃. Недостающая информация о строении этого пептида получена при расщеплении его термолизинном. С помощью секвенатора на фрагменте D — P₂ определена последовательность 32 аминокислотных остатков, что позволило полностью установить строение бромцианового пептида M_{1,2}.

Молекула LIV-белка состоит из 344 аминокислотных остатков (M 36 770) и имеет следующий аминокислотный состав: Asp — 26, Asn — 14, Thr — 18, Ser — 14, Glu — 17, Gln — 20, Pro — 15, Gly — 34, Ala — 43, Met — 5, Val — 27, Cys — 2, Ile — 20, Leu — 23, Tyr — 13, Phe — 10, His — 4, Lys — 29, Arg — 7, Trp — 3.

Интересная особенность структуры — локализация всех остатков аргинина в центральной части молекулы и расположение остатков триптофана в С-концевой области.

LIV-белок является первым представителем периплазматических белков, участвующих в транспорте аминокислот, для которого установлена полная первичная структура.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oxender D. L. (1972) *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 777—814.
2. Oxender D. L., Quay S. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **264**, 358—372.
3. Антонов В. К. (1970) *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 823—837.
4. Piperno J. R., Oxender D. L. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5732—5734.
5. Anraku Y. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3116—3122.
6. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Глюндман Л. М., Крылова Ю. И. (1973) *Биохимия*, **38**, 1294—1297.
7. Edman P., Begg J. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80—91.
8. Fraser K. J., Poulsen K., Haber R. (1972) *Biochem.*, **11**, 4974—4977.
9. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова П. А., Линкин В. М., Смирнов Ю. В., Лотапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3—21.

Поступила в редакцию
9.11.1977

THE PRIMARY STRUCTURE OF LIV-BINDING PROTEIN FROM *E. COLI*

OVCHINNIKOV Yu. A., ALDANOVA N. A., GRINKEVICH V. A., ARZAMAZOVA N. M.,
MOROZ I. N., NAZIMOV I. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

The complete amino acid sequence of periplasmic protein from *E. coli*, selectively binding of branched aliphatic amino acids, such as leucine, isoleucine, valine (LIV-protein) has been established. The following procedures have been used: exhaustive tryptic hydrolysis and splitting of the protein molecule into large fragments at Met and Arg residues and Asp-Pro bonds with subsequent determination of their structure by automatic degradation. The LIV-protein molecule consists of 344 amino acid residues.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20/1-1977 г. Т-03778 Подписано к печати 3/III-1977 г. Тираж 830 экз.
Зак. 1769 Формат бумаги 70×108¹/₁₆ Усл. печ. л. 12,6 + 1 вкл. Бум. л. 4¹/₂ Уч.-изд. л. 13,4

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10