



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АСПЕРГИЛЛОПЕПСИНА А —
КАРБОКСИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS*
AWAMORI

I. ВЫДЕЛЕНИЕ. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

*Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сурова И. А.,
Резина Л. П., Котлова Е. К., Немцова Е. Р.,
Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Баратова Л. А.,
Белянова Л. П., Степанов В. М.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва*

Описано выделение аспергиллопепсина А, карбоксильной протеиназы, из поверхностной культуры микроскопического гриба *Aspergillus awamori*. Хроматографией на акрилексе Р-10, амниосилохроме С-80 и бацитрацин-сефарозе 4В фермент получен с выходом по активности 52% и степенью очистки 360 раз. Проведен триптический гидролиз аспергиллопепсина А. N-концевая последовательность триптических пептидов определена автоматическим методом Эдмана и методом Эдмана в сочетании с дансильрованием, С-концевая — гидролизом карбоксипептидазами А и В. Установлена последовательность 169 аминокислотных остатков, входящих в триптические пептиды аспергиллопепсина А.

Карбоксильные протеиназы, образующие один из четырех главных классов протеолитических ферментов, характеризуются присутствием двух карбоксильных групп в активном центре. Наиболее изучены карбоксильные протеиназы желудочного сока животных — пепсин и химозин. В микроскопических грибах найдены многочисленные аналоги пепсина [1]. Анализ пространственных структур карбоксильных протеиназ из *Penicillium janthinellum* [2], *Rhizopus chinensis* [3] и *Endothia parasitica* [3] и их сравнение с пространственной структурой свиного пепсина [4] показали, что функциональному родству этих ферментов соответствует общность их пространственной организации. Установлена первичная структура карбоксильной протеиназы из *Penicillium janthinellum* [2], гомологичная первичной структуре свиного пепсина (31,7% совпадающих аминокислотных остатков). Известны фрагменты аминокислотной последовательности карбоксильных протеиназ из *Rhizopus chinensis* [5] и *Aspergillus foetidus* [6], однако имеющихся данных о первичной структуре грибных карбоксильных протеиназ еще недостаточно для выявления связи между структурой и функцией, а также эволюционных соотношений в ряду этих ферментов. Нами исследована первичная структура карбоксильной протеиназы микроскопического гриба *Aspergillus awamori*, названной аспергиллопепсин А [7, 8]. Настоящее сообщение является первым из серии работ,

посвященных анализу аминокислотной последовательности аспергиллопепсина А.

Аспергиллопепсин А содержит 328 аминокислотных остатков и по аминокислотному составу близок другим карбоксильным протеиназам, в особенности ферментам из грибов рода *Aspergillus* [6]. Оптимум действия аспергиллопепсина А по расщеплению казеина и гемоглобина находится при рН 2,3—2,6. Фермент ингибируется N-диазоацетил-N'-динитрофенилэтилендиамином [9] и 1,2-эпокси-3 (n-нитрофенокси)пропаном [10]. Последовательность, которая содержит остаток Asp-215*, реагирующий с диазоацетильным ингибитором, совпадает с соответствующим участком пенициллопепсина и гомологична соответствующей последовательности свиного пепсина:

	215	
свиной пепсин А	Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser-Leu	[11]
пенициллопепсин	Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Thr-Leu	[2]
аспергиллопепсин А	Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Thr-Leu	

Последовательность аспергиллопепсина А, содержащая другой функционально важный остаток — Asp-32, гомологична соответствующим фрагментам свиного пепсина и пенициллопепсина:

	32	
свиной пепсин А	Thr-Val-Ile-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser	[11]
пенициллопепсин	Asn-Leu-Asn-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser	[2]
аспергиллопепсин А	His-Leu-Asx-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser	

Таким образом, вышеприведенные данные подтверждают принадлежность аспергиллопепсина А семейству пепсинов.

Принимая во внимание значительное сходство первичных структур свиного пепсина и наиболее изученного к началу данного исследования фермента микроскопических грибов — пенициллопепсина, следовало ожидать, что гомологичными окажутся и последовательности аспергиллопепсина А и свиного пепсина и тем более пенициллопепсина. Это предположение подтвердилось уже на первых шагах анализа первичной структуры аспергиллопепсина А. Гомология была использована для расстановки ряда пептидов в последовательности аспергиллопепсина А.

Аспергиллопепсин А подобно другим карбоксильным протеиназам грибов не содержит остатков метионина, поэтому для фрагментации его молекулы были применены только ферментативные методы. Поскольку аспергиллопепсин А содержит 15 остатков лизина и 2 остатка аргинина (табл. 1), можно было ожидать, что анализ последовательности триптических пептидов даст существенную информацию о первичной структуре фермента. В последующих сообщениях будут изложены результаты исследования пептидов, образующихся при расщеплении аспергиллопепсина А и его фрагментов химотрипсином, термолизином и эластазой.

Выделение аспергиллопепсина А. Ранее в нашей лаборатории для выделения этого фермента использовались методы, основанные на применении ряда сорбентов, в том числе аминосилохрома С-80 и грамицидин-S-сефарозы 4В [12]. В развитие этих исследований мы разработали схему выделения аспергиллопепсина А, включающую (табл. 2): 1) высаливание сульфатом аммония (80% насыщения); 2) гель-фильтрацию на акрилексе Р-10; 3) хроматографию на аминосилохроме С-80; 4) аффинную хроматографию на бацитрацин-сефарозе 4В [13].

Применение акрилекса Р-10 на ранних стадиях очистки грибных протеиназ удобно тем, что его полиамидная матрица устойчива к действию содержащихся в исходном препарате декстраназ, которые расщепляют сефадексы. Гель-фильтрация на акрилексе Р-10 позволяет отделить значительное количество пигмента, белки с большим молекулярным весом и

* Здесь и далее нумерация остатков аспергиллопепсина А дается по последовательности свиного пепсина.

Аминокислотный состав аспергиллопепсина А и пептидов, образующихся при 2-часовом гидролизе трипсином

Аминокислота	Аспергиллопепсин А	T,0	T,3	T,6-1	T,6-2
Lys	14,7 (15)	2 (2)	—	1,0 (1)	
His	3,4 (3)	—	0,85 (1)		
Arg	1,9 (2)	—	0,85 (1)		
Asp	37,6 (38)	15,8 (16)	4,04 (4)		
Thr	30,5 (31)	11,8 (12)	2,1 (2)		
Ser	38,8 (39)	18,2 (18)	4,74 (5)		
Glu	29,7 (30)	10,8 (11)	2,45 (2)		1,0 (1)
Pro	18,1 (18)	4,8 (5)	1,45 (1)	1,0 (1)	
Gly	35,2 (35)	17,4 (17)	1,7 (1) ^{3*}	1,1 (1)	1,1 (1)
Ala	23,2 (23)	8,6 (9)	1,4 (1)	1,0 (1)	2,7 (3)
1/2Cys	— (2) *	—	—	—	—
Val	23,2 (23)	4,8 (5)	1,0 (1)	1,2 (1)	
Met	—	—	—	—	—
Ile	14,1 (14)	9,6 (10)	—	—	—
Leu	19,5 (20)	7,0 (7)	3,8 (4)		1,3 (1)
Tyr	16,3 (16)	11,4 (12)	—	—	—
Phe	16,0 (16)	6,4 (6)	2,0 (2)		1,1 (1)
Trp	— (3) ^{2*}	—	(1) ^{4*}		—
Всего остатков	328	130	26	5	7
Выход, %/нм		55/8000	21/3000	5/250	5/250

* Определяли в виде карбоксиметилцистеина в гидролизате карбоксиметилированного аспергиллопепсина А (на 1 остаток аргинина — 0,85 остатка карбоксиметилцистеина).

^{2*} Триптофан определяли по методу Опиенской — Блаут [22].

^{3*} По данным установления последовательности автоматическим методом Эдмана пептид содержит один остаток глицина.

^{4*} Триптофан определен автоматическим методом Эдмана.

Таблица 2

Выделение аспергиллопепсина А из поверхностной культуры *Aspergillus awamori*

Стадии очистки	Удельная активность, ед. акт./ОЕ	Суммарная активность, ед. акт.	Очистка, n раз	Выход по активности, %
1. Исходный материал (170 мл концентр. экстракта)	0,007	1000	—	100
2. Осаждение сульфатом аммония (80% насыщения) *				
3. Гель-фильтрация на акрилексе Р-10	0,28	640	40	64
4. Хроматография на аминокислохроме С-80	1,7	750	240	75
5. Хроматография на бацитрадин-сефарозе	2,5	515	360	52

* На этой стадии очистки активность аспергиллопепсина А по гемоглобину не определялась.

низкомолекулярные примеси. Ионообменная хроматография на аминокислохроме С-80 (макропористом кремнеземе, содержащем ковалентно присоединенные аминоксильные группы), предложенная для очистки пепсина [14], использовалась нами ранее для выделения аспергиллопепсина А [8]. В этих опытах фермент сорбировали на аминокислохроме С-80 при рН 5,2 и элюировали (при рН 2,9—3,0) 0,001 М соляной кислотой, однако в таких условиях не удалось добиться значительной очистки фермента, что, по-видимому, объясняется меньшей устойчивостью грибных карбоксильных протеиназ в кислой области рН по сравнению с пепсином. Учитывая это, в настоящей работе мы элюировали сорбированный на аминокислохроме

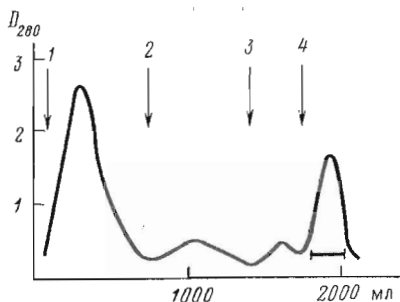


Рис. 1

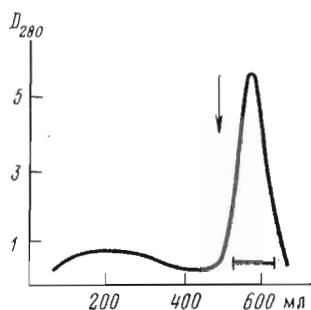


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография аспергиллопепсина А на аминосилохроме С-80 (колонка 2,5×35 см). Стрелками показано начало элюции цитратными буферами: 1 — 0,01 М, рН 5,7; 2 — 0,1 М, рН 5,7; 3 — 0,1 М, рН 4,2; 4 — 0,3 М, рН 4,2; отмечена выделяемая фракция

Рис. 2. Хроматография аспергиллопепсина А на бацитрацин-сефарозе (колонка 2,5×7 см). Стрелкой показано начало элюции 20% изопропиловым спиртом в 0,1 М цитратном буфере, рН 4,1, содержащем 1 М NaCl. Отмечена выделяемая фракция

аспергиллопепсин А при большем значении рН и большей ионной силе раствора, применяя 0,3 М цитратный буфер, рН 4,2. В результате удалось отделить основные и нейтральные белки, а также пигменты; при этом удельная активность препарата возросла в 6 раз (см. рис. 1, табл. 2). Нужно отметить, что применение аминосилохрома на этой стадии исключает опасность расщепления сорбента целлюлазами, содержащимися в препарате, которые активно атакуют ионообменники на целлюлозной основе. Последней стадией очистки была хроматография на бацитрацин-сефарозе 4В (рис. 2), в ходе которой фермент был очищен в 1,5 раза. Предложенная схема позволила получить фермент с выходом 52% и достигнуть очистки в 360 раз.

Гомогенность аспергиллопепсина А была подтверждена наличием только одной полосы при электрофорезе в полиакриламидном геле при рН 5,5, а также определением N-концевой последовательности автоматическим методом Эдмана. Этим методом была определена последовательность 41 аминокислотного остатка с N-конца фермента (см. табл. 3). Следует отметить, что идентификация остатков Thr-16 и Pro-17 требует дополнительного подтверждения, положение остатков Lys-22 и His-28 установлено при анализе пептидов С10-2 и С26-1 химотриптического гидролизата аспергиллопепсина А (см. сообщение II).

Гидролиз трипсином. Триптический гидролиз инактивированного фенолом аспергиллопепсина А проводился в течение 2 и 4 ч*. Необходимость 4-часового гидролиза обусловлена тем, что после действия фермента в течение 2 ч в гидролизате сохраняются крупные пептиды, продукты неполного расщепления, которые следовало подвергнуть дальнейшей фрагментации.

Пептиды, образующиеся при 2-часовом гидролизе трипсином. При подкислении 2-часового триптического гидролизата выпал осадок, который отделяли центрифугированием. Из осадка последовательной хроматографией на сефадексах G-50 и G-150 был выделен высокомолекулярный пептид T₁₀ (рис. 3).

Растворимую часть гидролиза фракционировали на сефадексе G-50 (рис. 4). В результате была выделена фракция, содержащая пептид T₁₃. Остальные фракции представляли собой сложные смеси пептидов и в дальнейшем не исследовались. Пептид T₁₃, состоящий из 26 аминокислотных остатков (табл. 1), был очищен последовательной хроматографией на

* Фракции и пептиды, выделенные после 2-часового гидролиза трипсином, обозначаются T₁..., а после 4-часового — T₂...

N-Концевая последовательность аспергиллопепсина А и аминокислотные последовательности пептидов (2-часовой гидролиз трипсином)

Аспергиллопепсин А	Ser-Lys-Gly-Ser-Ala-Val-Thr-Thr-Pro-Gln-Asn-Asn-Asp- Glu-Glu-Tyr-Leu-Thr-Pro-Val-Thr-Val-Gly-Lys-Ser- Thr-Leu-His-Leu-Asx-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala-Asx- Leu-Trp-Val-Phe-
T ₁₃	Ser-Thr-Leu-His-Leu-Asx-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala- Asx-Leu-Trp-Val-Phe-Ser-Asp-Glu-Leu-Pro-Ser-Ser- Glu-Arg
T ₁₆₋₁	Ala-Val-Gly-Pro-Lys
T ₁₆₋₂	Leu-Gly-Phe-Ala-Ala-Gln-Ala

→ последовательность определена автоматическим методом Эдмана, ↗ последовательность определена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием, ↘ гидролиз карбоксипептидазой А, < гидролиз карбоксипептидазой В.

сефадексах G-50 и G-25 (рис. 5). Аминокислотная последовательность этого пептида была в основном определена автоматическим методом Эдмана, С-концевой аргинин — гидролизом карбоксипептидазой В. Сравнение N-концевых последовательностей аспергиллопепсина А и пептида T₁₃ (табл. 3) показывает, что участок аспергиллопепсина А полностью совпадает с последовательностью 1—17 пептида T₁₃. Пептид T₁₃ занимает в структуре аспергиллопепсина А положение Ser-23 — Arg-50, причем для сохранения гомологии приходится допустить, как и в случае пенициллопепсина, делецию остатков 25—26. Присутствие остатка гистидина в положении 4 пептида T₁₁ (His-28 в молекуле аспергиллопепсина А) показано при анализе пептида С26-1 из химотриптического гидролизата аспергиллопепсина А (см. сообщение II).

Кроме пептида T₁₃ из растворимой фракции триптического гидролизата электрофорезом и хроматографией на бумаге были выделены низкомолекулярные пептиды T₁₆₋₁ и T₁₆₋₂. Последовательность аминокислотных остатков этих пептидов была определена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием (табл. 3).

Пептид T₁₀ содержит 130 аминокислотных остатков, в том числе 2 остатка лизина. По данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, молекулярный вес пептида около 12 000. N-Концевое положение в нем занимает тирозин, оба остатка лизина легко отщепляются карбоксипептидазой В. Это может объясняться присутствием в этом пептиде С-концевой последовательности Lys-Lys или же тем, что пептид T₁₀ состоит из двух цепей, связанных дисульфидным мостиком, каждая из которых имеет N-концевой остаток тирозина и С-концевой остаток лизина.

Для получения коротких фрагментов пептид был гидролизован химотрипсином, гидролизат разделяли на сульфополистирольном катионите Хромобедз. В результате фракционирования было выделено 8 химотриптических пептидов, их очистку проводили электрофорезом и хроматографией на бумаге. N-Концевая последовательность выделенных пептидов определялась методом Эдмана в сочетании с дансильрованием, С-концевая — гидролизом карбоксипептидазой А. Данные аминокислотного состава и последовательность химотриптических пептидов приведены в табл. 4 и 5.

Пептид T₁₀-С5-2, состоящий из 10 аминокислотных остатков, содержит 5 остатков серина. Три из них идентифицированы в положениях 1, 5 и 8, следовательно, два других занимают положения 6 и 7 (см. табл. 5).

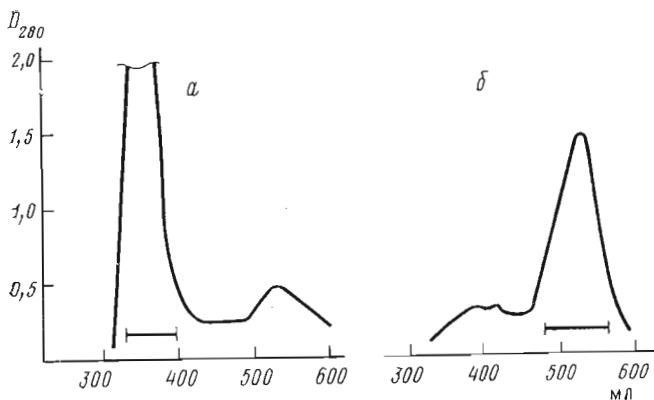


Рис. 3. Хроматография осадка, полученного при подкислении 2-часового триптического гидролизата, на сефадексах G-50 (а) и G-150 (б), уравновешенных 6 М мочевиной, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер, pH 9 (колодка 3×150 см). Отмечена фракция, содержащая пептид T₁₀

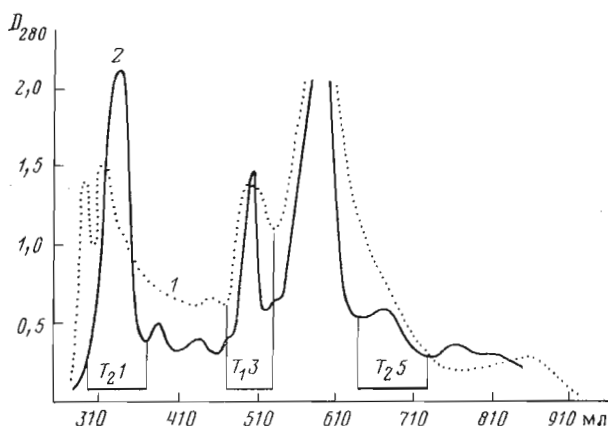


Рис. 4. Хроматография растворимой части триптического гидролизата инактивированного фенолом аспергиллопепсина А на сефадексе G-50, уравновешенном 6 М мочевиной, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер, pH 9 (колодка 3×150 см). 1 — 2-часовой гидролиз, 2 — 4-часовой гидролиз

Полная последовательность пептида T₁₀-C8-1, состоящего из 10 аминокислотных остатков, была определена при анализе пептида C12-4, выделенного из химотриптического гидролизата аспергиллопепсина А (см. сообщение II).

Таким образом, исследование продуктов 2-часового триптического гидролиза (с учетом N-концевой последовательности аспергиллопепсина А) позволило установить последовательность 118 аминокислотных остатков.

Пептиды, образующиеся при 4-часовом гидролизе трипсином. При подкислении инкубационной смеси после 4-часового триптического гидролиза осадок не образовался. Разделение гидролизата проводили на сефадексе G-50 в 6 М мочевины (рис. 4). Из фракции T₂₁ хроматографией на сефадексах G-50 и G-150 в 6 М мочевины выделен пептид T₂₁₋₂. По данным электрофореза в полиакриламидном теле в присутствии додецилсульфата натрия и меркаптоэтанол, молекулярный вес пептида составляет 8000—10 000. Как показал аминокислотный анализ, пептид содержит остатки цистеина. По-видимому, пептид T₂₁₋₂ является фрагментом пептида T₁₀, образовавшимся при более длительном триптическом гидролизе, и соответствует участку аспергиллопепсина, содержащему цистиновый мостик.

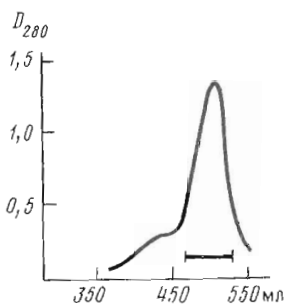


Рис. 5

Рис. 5. Хроматография фракции, содержащей пептид Т₁₃, на сефадексе G-50, уравновешенном 6 М мочевиной, содержащей 0,5 М триэтиламинкарбонатный буфер, pH 9 (колонка 3×150 см). Отмечен пептид Т₁₃

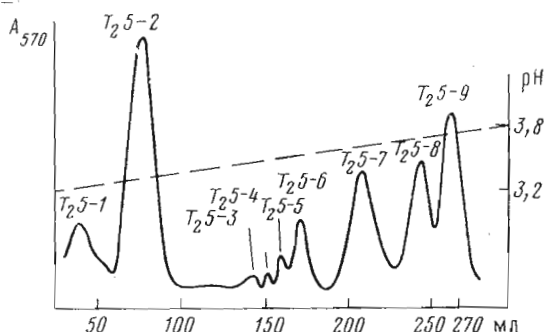


Рис. 6

Рис. 6. Хроматография фракции Т₂₅ на катионите Хромобедз (колонка 0,6×90 см) в градиенте pH и концентрации пиридин-ацетатного буфера

Фракцию Т₂₅ разделяли на Хромобедзе (рис. 6). Фракции Т₂₅₋₆, Т₂₅₋₈ и Т₂₅₋₉, по данным аминокислотного анализа и определения N-концевой последовательности, представляли собой гомогенные пептиды, фракции Т₂₅₋₃, Т₂₅₋₅ и Т₂₅₋₇ были получены с низкими выходами и далее не исследовались. Из фракций Т₂₅₋₁, Т₂₅₋₂ и Т₂₅₋₄ пептиды были выделены хроматографией на бумаге. Данные об аминокислотном составе и последовательности пептидов представлены в табл. 6 и 7.

Пептид Т₂₅₋₁₋₃, выделенный из фракции Т₂₅₋₁, содержит 8 аминокислотных остатков. N-Концевую аминокислоту не удалось определить дансильрованием или отщепить методом Эдмана. Возможно, это положение занимает пироглутаминовая кислота. Карбоксипептидаза В отщепила остаток лизина, карбоксипептидаза А, добавленная после действия карбоксипептидазы В, отщепила 1,8 остатка серина (или глутамина) и 2 остатка аланина.

Пептид Т₂₅₋₄₋₁ содержит 9 аминокислотных остатков и примесь глицина и аланина. Методом Эдмана в сочетании с дансильрованием определена последовательность 1-3 и 5-6. Полная последовательность пептида Т₂₅₋₄₋₁ установлена при анализе пептидов С7-3-1 и С17-4-1, выделенных из химотриптического гидролизата аспергиллопепсина А (см. сообщение II).

Пептид Т₂₅₋₆ содержит 13 аминокислотных остатков. Методом Эдмана в сочетании с дансильрованием установлена последовательность остатков 1-6. Образующийся после отщепления остаточный пептид богат гидрофобными аминокислотами, чем объясняются его потери при экстракции бензолом и вследствие этого невозможность дальнейшего исследования методом Эдмана. Последовательность 11-13 была определена гидролизом карбоксипептидазами А и В. Для уточнения последовательности пептид Т₂₅₋₆ расщепляли химотрипсином, гидролизат разделяли электрофорезом на бумаге. Пептид Т_{25-6С2} содержит аминокислоты, входящие в последовательность 1-6 пептида Т₂₅₋₆ и, кроме того, остаток лейцина. Следовательно, расщепление химотрипсином прошло по остатку лейцина, занимающему положение 7. Поскольку в условиях электрофореза по Оффорду пептид Т_{25-6С2} нейтрален, положение 2 в нем занимает остаток глутамина, а положение 4 в пептиде — остаток аспарагина. Полная последовательность пептида Т₂₅₋₆ установлена при анализе пептида С10-4, выделенного из химотриптического гидролизата аспергиллопепсина А (см. сообщение II).

Пептид Т₂₅₋₈ содержит 10 аминокислотных остатков. Для идентификации дикарбоновых аминокислот по Оффорду пептид был расщеплен химотрипсином, гидролизат разделили электрофорезом на бумаге при

Аминокислотный состав пептидов химотриптического гидролизата пептида T₁₀

Амино-кислота	Пептид							
	T ₁₀ -C2-1	T ₁₀ -C3-2	T ₁₀ -C5-1	T ₁₀ -C5-2	T ₁₀ -C8-1	T ₁₀ -C10	T ₁₀ -C11	T ₁₀ -C12
Asp	1,7(2)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	2,1(2)		1,0(1)	
Thr		2,4(2)			0,9(1)	2,0(2)		
Ser	1,9(2)	1,0(1)	2,0(2)	5,1(5)	2,0(2)	1,2(1)	0,3	
Glu	3,8(4)		1,2(1)		1,1(1)			
Pro								
Gly	2,9(3)	1,0(1)	3,8(4)	2,0(2)	1,1(1)	1,3(1)		
Ala	1,9(2)	1,9(2)			1,0(1)			
Val	1,0(1)							
Ile		0,9(1)	0,8(1)	0,9(1)		1,0(1)	0,9(1)	
Leu		0,9(1)	1,7(2)					1,0(1)
Tyr	0,8(1)				0,6(1)	1,6(2)	1,3(1)	
Phe				0,9(1)				
His								
Lys								0,9
Trp					1,0(1)			
Arg								
Число остатков	14	9	11	10	10	7	3	2
Выход, %/нм	3,8/100	19,3/500	6,2/160	11,6/300	4,6/120	39,7/1000	17,1/440	15,5/400

Таблица 5

Аминокислотные последовательности пептидов химотриптического гидролиза пептида T₁₀

T ₁₀ -C10	Tyr-Thr-Gly-Ser-Ile-Thr-Tyr ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
T ₁₀ -C11	Tyr-Ile-Asn ↘ ↘ ↘
T ₁₀ -C12	Leu-Lys ↘ ↘
T ₁₀ -C2-1	Ser-Glx-Val-Ser-Gly-(Ala ₂ , Glx ₃ , Asx ₂ , Gly ₂)-Tyr ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
T ₁₀ -C3-2	Ser-Ala-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Thr-Leu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
T ₁₀ -C5-1	Gly-Gly-Ile-Gln-Ser-Asn-Ser-Gly-Leu-Gly-Leu ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
T ₁₀ -C5-2	Ser-Ile-Gly-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Phe ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘
T ₁₀ -C8-1	Thr-Asp-Ala-Asp-(Ser, Ser, Glx)-Gly-Tyr-Trp ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘ ↘

pH 2,2. Состав пептида T₂₅-8C1, нейтрального в условиях электрофореза по Оффорду, совпадает с последовательностью 1—5 пептида T₂₅-8. Таким образом, в положении 2 этого пептида стоит глутамин. Пептид T₂₅-8, содержащий остаток лизина, при электрофорезе по Оффорду нейтрален; следовательно, положение 7 в нем занимает аспарагиновая кислота.

Пептид T₂₅-9 содержит 14 аминокислотных остатков. Методом Эдмана в сочетании с дансильрованием определены остатки 1—2 и 4—13, остатки 11—13 установлены гидролизом карбоксипептидазой А после отщепления С-концевого лизина карбоксипептидазой В. Остаток 3 не идентифицирован дансильрованием. Поскольку в состав пептида T₂₅-9 входит гистидин, по-видимому, он и занимает положение 3. Делением химотриптического гидролизата пептида электрофорезом на бумаге при pH 5,6 получены пептиды T₂₅-9C1 и T₂₅-9C2. Пептид T₂₅-9C1 содержит аминокислоты, соответствующие последовательности 1—6 пептида T₂₅-9, в том числе остатки гистидина и тирозина; следовательно, расщепление химотрипси-

Выделение аспергиллопепсина А. Аспергиллопепсин А выделяли из сгущенного экстракта поверхностной культуры *Aspergillus awamori*, полученного с Вышневолоцкого завода ферментных препаратов. 170 мл сгущенного экстракта разбавляли в 2 раза водой и высаливали сульфатом аммония (80% насыщения). Смесь оставляли на 20 ч при 4°С, затем центрифугировали при 2000 об/мин. Осадок растворяли в 0,001 М CH_3COOH и хроматографировали на акрилексе Р-10 (колонка 5×100 см); фракцию, содержащую карбоксильную протеиназу, лиофилизovali. Исходный экстракт содержал 1000 ед. акт., получено 800 мг препарата с уд. акт. 0,8 ед./мг (0,28 ед. акт./ОЕ). Полученный препарат (800 мг) растворяли в 50 мл 0,01 М цитратного буфера (рН 5,7) и наносили на колонку (2,5×35 см) с аминосилохромом С-80. Колонку промывали цитратными буферами (0,01 М, рН 5,7; 0,1 М, рН 5,7; 0,1 М, рН 4,2) до тех пор, пока D_{280} в промывных водах не снижалось до 0,04. Аспергиллопепсин А элюировали 0,3 М цитратным буфером (рН 4,2), элюат (750 ед. акт.) наносили на колонку (2,5×8 см) с бацитрацин-сефарозой, уравновешенную 0,1 М цитратным буфером (рН 4,2), и промывали этим же буфером. Фермент элюировали 20% раствором изопропилового спирта в 1 М NaCl, содержащим 0,1 М цитратный буфер (рН 4,2), элюат обессоливали на сефадексе G-50. Выход аспергиллопепсина А по активности 52%, удельная активность 2,5 ед. акт./ОЕ (см. табл. 1, рис. 1 и 2). Всего из 8 л исходного сгущенного экстракта получено 3 г фермента.

Определение протеолитической активности проводили по методу [6]. Электрофорез аспергиллопепсина А в 12,5% полиакриламидном геле проводили в алалин-какодилатном буфере (рН 5,5) по методу [15].

Денатурация аспергиллопепсина А. 1 г аспергиллопепсина А растворяли при перемешивании в 100 мл смеси фенол — вода (90/10 по объему), фермент осаждали 10-кратным объемом охлажденного ацетона, отфильтровывали, промывали 3 раза охлажденным ацетоном, затем абс. эфиром, осадок высушивали в вакуум-эксикаторе.

Гидролиз трипсином (2 ч), разделение фракций, выделение пептидов. К раствору 500 мг денатурированного фенолом аспергиллопепсина А в 150 мл 0,05 М триэтиламинкарбонатного буфера (рН 8,2) добавляли 5 мг трипсина в 5 мл этого же буфера. Гидролиз вели 2 ч при 37°С, затем раствор подкисляли 50% CH_3COOH до рН 5. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, затем снова растворяли в 50 мл 0,05 М триэтиламинкарбонатного буфера (рН 8,2), подкисляли 50% CH_3COOH до рН 4,5, осадок отделяли центрифугированием, супернатанты объединяли.

Осадок, содержащий пептид T_{10} , растворяли в 10 мл 6 М мочевины, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер (рН 9), нерастворившуюся часть отделяли центрифугированием, раствор наносили на сефадекс G-50 (колонка 3×150 см), уравновешенный 6 М мочевиной, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер (рН 9), элюцию вели этим же раствором, обессоливали на сефадексе G-25 ср (колонка 5×60 см), лиофилизovali. Пептид T_{10} растворяли в 5 мл 6 М мочевины, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер (рН 9), и наносили на колонку с сефадексом G-150 (3×150 см), уравновешенную тем же раствором, им же вели элюцию (рис. 3). Пептид T_{10} обессоливали на сефадексе G-25 (колонка 5×60 см) и лиофилизovali.

Растворимую часть гидролизата лиофилизovali, растворяли в 10 мл 6 М мочевины, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер (рН 9), и наносили на колонку с сефадексом G-50 (3×150 см), уравновешенную тем же раствором; им же проводили элюцию. Фракции обессоливали на сефадексе G-25 ср. (колонка 5×60 см) и лиофилизovali. Фракцию, содержащую пептид T_{13} , растворяли в 5 мл 6 М мочевины, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер (рН 9), и наносили на колонку (3×150 см) с сефадексом G-50, уравновешенную тем же раствором; им же проводили элюцию. Фракцию элюата, содержащую пептид T_{13} ,

обессоливали на сефадексе G-25 ср (колонка 2,5×100 см), лиофилизовали. Пептид T_{1,3} растворяли в 5 мл 6 М мочевины, содержащей 0,05 М триэтиламинкарбонатный буфер (рН 9), наносили на колонку (3×150 см) с сефадексом G-25 ср, уравновешенную тем же раствором; им же проводили элюцию, обессоливали на сефадексе G-25 ср, лиофилизовали.

Выделение пептидов T_{1,6-1} и T_{1,6-2}. 80 мг растворимой части 2-часового гидролизата подвергали электрофорезу при рН 5,6, напряжении 1000 В в течение 4 ч. Фракцию, содержащую смесь пептидов T_{1,6-1} и T_{1,6-2}, выделяли и подвергали повторному электрофорезу в тех же условиях. Пептиды T_{1,6-1} и T_{1,6-2} элюировали и хроматографировали на бумаге Ватман ЗММ в системе пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3, объемные соотношения). Пептиды элюировали смесью, использовавшейся для хроматографии.

Гидролиз трипсина (4 ч). К раствору 300 мг денатурированного фенолом аспергиллопепсина А в 90 мл 0,05 М триэтиламинкарбонатного буфера (рН 8), добавляли 3 мг трипсина в 3 мл этого же буфера. Гидролиз вели 2 ч при 37° С, затем добавляли еще 3 мг трипсина в 3 мл этого же буфера, гидролиз вели еще 2 ч при 37° С. Раствор подкисляли 50% СН₃СООН до рН 5 и лиофилизовали. Хроматографию проводили в условиях, описанных для разделения растворимой части 2-часового триптического гидролизата (см. рис. 4).

Разделение пептидов на смоле Хромобедз. К 6 мл пиридин-ацетатного буфера (рН 3,1) добавляли по каплям муравьиную кислоту до рН 2,5, в этой смеси растворяли фракцию Т²⁵, полученную после хроматографии 4-часового триптического гидролизата. Нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием, раствор наносили под давлением аргона на колонку со смолой Хромобедз (0,6×90 см). Хроматографию вели при 37° С в градиенте пиридин-ацетатного буфера (0,2 М, рН 3,1 — 2 М, рН 5, объем смеси 700 мл). После того как рН элюата достигал 4,5, в верхний сосуд помещали 2 М пиридин и по достижении рН 6,8 элюцию вели непосредственно 2 М пиридином. Собирали фракции по 2 мл. Для выявления пептидсодержащих фракций использовали пептидный анализатор АА-II фирмы «Technicon» (Ирландия), отбирая для анализа из каждой фракции 100 мкл. В качестве стандарта применяли 0,5 мМ водный раствор тетраглицина. Компоненты реакционной смеси готовили по методике [16].

Гидролиз химотрипсина пептида T_{1,0}. 33,6 мг (2,6 мкмоль) пептида растворяли в 11 мл триэтиламинкарбонатного буфера (рН 8,7), добавляли 0,33 мг химотрипсина в 0,16 мл этого же буфера, гидролиз вели 3 ч при 37° С. Затем раствор подкисляли 50% СН₃СООН до рН 4 и лиофилизовали. Разделение пептидов на смоле Хромобедз проводили как описано выше.

Анализ фракций. Аликвоты фракций, полученных после хроматографии на смоле Хромобедз, упаривали досуха на роторном испарителе и гидролизовали дважды перегнанной над SnCl₂ соляной кислотой в течение 24 ч при 105° С, гидролизаты упаривали в вакуум-эксикаторе. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе «Dugum» D-500. Каждую фракцию хроматографировали в тонком слое микрокристаллической целлюлозы фирмы «Serva» в системе пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3), аналитический электрофорез фракций вели 2—4 ч в пиридин-ацетатном буфере, рН 5,7 (5 мл пиридина, 1 мл СН₃СООН, 494 мл воды), на бумаге Ватман 1 при 1000 В.

Очистка пептидов. Пептиды после хроматографии на смоле Хромобедз очищали хроматографией и электрофорезом на бумаге Ватман 3 ММ, промытой водой (наносили около 50 нм пептида на 1 см бумаги). Для хроматографии использовали систему пиридин — бутанол — вода — уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3). Электрофорез проводили 2—4 ч при рН 5,7 (пиридин-ацетатный буфер: 5 мл пиридина, 1 мл СН₃СООН, 494 мл воды) и напряжении 1000 В, а также 2—4 ч при рН 2,2 (4 мл НСООН, 29 мл

CH₃COOH, 967 мл воды) и напряжении 900 В. Пептиды элюировали 50% пиридином или смесью, использовавшейся для хроматографии.

Определение С-концевых аминокислот. Для приготовления рабочего раствора 20–40 мкл суспензии карбоксипептидазы А смешивали с 3 мл охлажденного раствора 0,1 М NaCl, к этому раствору при перемешивании добавляли 0,05 М NaOH до pH 10. Содержание карбоксипептидазы А в 1 мл раствора определяли, считая, что 0,1% раствор фермента имеет D_{280} 2,5. 50 нм пептида растворяли в 0,5 мл 0,05 М триэтиламинкарбонатного буфера (pH 7,8), добавляли раствор карбоксипептидазы А (фермент-субстратное соотношение 1:50) и смесь инкубировали при 30° С, отбирая пробы по 0,1 мл через 5, 15, 30 мин, 1 и 20 ч. Гидролиз прекращали, добавляя каплю 5,7 М HCl. Аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе фирмы «Durrum» D-500. Для приготовления рабочего раствора карбоксипептидазы В 8 мкл карбоксипептидазы В смешивали с 2,5 мл 0,1 М триэтиламинкарбонатного буфера (pH 7,8) и 0,5 мл 5 мМ раствора CoCl₂. 50 нм пептида растворяли в 0,5–1 мл триэтиламинкарбонатного буфера (pH 7,8) и добавляли 0,1 мл раствора карбоксипептидазы В, гидролиз вели 1 ч при 35° С; прекращали, добавляя каплю 5,7 М HCl. Аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе фирмы «Durrum» D-500.

Определение N-концевых аминокислот методом дансилирования [17, 18]. Пептид растворяли в 50% пиридине, аликвоту, содержащую 2–5 нмоль пептида, переносили в ампулу 5×40 мм и упаривали на ротационном испарителе. К остатку добавляли 50 мкл раствора 0,2 М бикарбоната натрия и 50 мкл раствора дансилхлорида в ацетоне (2,5 мг/мл). Смесью выдерживали 15–25 мин при 45° С (до обесцвечивания раствора), затем упаривали в вакууме, добавляли 2 капли 5,7 М HCl и гидролизовали 16 ч при 105° С. При определении Dns-Ser и Dns-Thr гидролиз вели 4 и 16 ч, а при определении гидрофобных аминокислот — 40 ч. Гидролизаты упаривали в вакууме, остаток растворяли в ацетоне или 50% пиридине. Dns-аминокислоты идентифицировали хроматографией на полнанамидных пленках [18] в трех системах растворителей в двух направлениях:

- 1) муравьиная кислота — вода (0,16:9,84) — I направление,
- 2) бензол — уксусная кислота (9:1) — II направление,
- 3) этилацетат — уксусная кислота — метанол (10:0,5:0,5) — II направление.

Определение последовательности аминокислот методом Эдмана в сочетании с дансилированием [17,18]. 50–100 нмоль пептида растворяли в 0,4 мл 50% пиридина, отбирали 0,04 мл и к раствору пептида добавляли 0,04 мл 50% пиридина и 0,4 мл 5% раствора абс. фенилизотиоцианата в абс. пиридине. Смесью оставляли на 1 ч при 45° С, периодически помешивая. Далее прибавляли 0,4 мл воды и экстрагировали 4 раза бензолом, насыщенным водой. Слои разделяли центрифугированием. Водный раствор упаривали в вакууме при 40° С, остаток для удаления пиридина 2–3 раза упаривали с водой, высушивали 30 мин в пистолете Фишера при 60° С, затем к сухому остатку добавляли 0,4 мл перегнанной трифторуксусной кислоты, раствор оставляли на 30 мин при 45° С, упаривали в вакууме, остаток помещали в вакуум-эксикатор над плавленым КОН на 1 ч. Далее к остатку добавляли 0,36 мл 50% пиридина, 0,04 мл раствора отбирали на дансилирование и повторяли все стадии обработки. Идентификацию некоторых аминокислот проводили субстративным методом Эдмана, для чего после отщепления трудно идентифицируемой аминокислоты (аргинин, гистидин) в виде тиазолинона аликвоту оставшегося пептида гидролизовали 5,7 М HCl и определяли аминокислотный состав.

N-Концевые последовательности аспергиллопепсина А и пептида Т,3 определяли автоматическим методом Эдмана на секвенаторе «Beckman», модель 890 [19].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и меркаптоэтанолол проводили по методу [20].

Идентификацию остатков дикарбоновых аминокислот и их аминов проводили электрофорезом при рН 6,5 по методу Оффорда [21].

Триптофан в аспергиллопепсине А определяли по методу [22].

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобарева Л. С., Степанов В. М. (1978) сб.: Успехи биологической химии, т. 19, с. 83-105, «Наука», М.
2. Hsu I-Nan, Delbaere L. T. J., James M. N. J., Hofmann T. (1977) Nature, 266, 140-145.
3. Subramanian E., Swan I. D. A., Liu Mamie, Davies D. R., Jenkins J. A., Tickle I. J., Blundell T. L. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 556-559.
4. Andreeva N. S., Gustchina A. E. (1979) Biochem. and Biophys. Res. Commun, 87, 32-42.
5. Sepulveda P., Jackson K. W., Tang J. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun, 63, 1106-1112.
6. Остославская В. И., Котлова Е. К., Степанов В. М., Руденская Г. Н., Баратова Л. А., Белянова Л. П. (1979) Биоорг. химия, 5, 595-603.
7. Лобарева Л. С., Ковалева Г. Г., Шиманская М. П., Степанов В. М. (1972) Биохимия, 37, 198-208.
8. Ковалева Г. Г., Юсупова М. П., Лысогорская Е. Н., Баландина Г. Н., Степанов В. М. (1977) Биохимия, 42, 534-538.
9. Kovaleva G. G., Shimanskaya M. P., Stepanov V. M. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun, 49, 1075-1081.
10. Исаева Г. Г., Шиманская М. П., Беляев С. В. (1973) в сб.: Химия протеолитических ферментов, с. 117-118, Вильнюс.
11. Tang J., Sepulveda P., Marciszyn J., Chen K.C.S., Huang W.-Y., Tao N., Liu D., Lanier J. P. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, pt 1, 3437-3439.
12. Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Лавренова Г. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 831-835.
13. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Янонис В. В., Остославская В. И., Гончар М. В., Котлова Е. К., Стронгин А. Я. (1978) Биоорг. химия, 4, 1256-1263.
14. Соловьева Т. А., Беляев С. В., Степанов В. М. (1977) Химия природн. соедин., 398-403.
15. Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1974) Химия природн. соедин., 226-229.
16. Lin K. D., Deutsch H. F. (1973) Analyt. Biochem., 56, 155-164.
17. Hartley B. S. (1970) Biochem. J., 119, 805-822.
18. Решетов П. Д., Честухина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. (1971) Химия природн. соедин., 66-68.
19. Edmann P., Begg G. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80-91.
20. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
21. Offord R. E. (1966) Nature, 211, 591-595.
22. Opienska-Blaut J., Charezynski M., Berbec H. (1963) Anal. Biochem., 6, 69-72.

Поступила в редакцию

6.II.1980

После доработки

4.IV.1980

THE PRIMARY STRUCTURE OF ASPERGILLOPEPSIN A — A CARBOXYLIC PROTEINASE FROM *ASPERGILLUS AWAMORI*. 1. ISOLATION, AMINO ACID SEQUENCES OF TRYPTIC PEPTIDES

KOVALEVA G. G., OSTOSLAVSKAYA V. I., SUROVA I. A.,
REVINA L. P., KOTLOVA E. K., NEMTSOVA E. R.,
LEVIN E. D., TIMOKHINA E. A., BARATOVA L. A.,
BELYANOVA L. P., STEPANOV V. M.

*Institute for Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms, Moscow*

Pure aspergillopepsin A — a carboxylic proteinase — was isolated from the surface culture of microscop fungi *Aspergillus awamori*. Successive chromatography on Acrylex P-10, aminosilochrom S-80 and bacitracin-Sepharose 4B gave 360-fold purification of the enzyme with the yield of 52%. The enzyme was subjected to tryptic digestion. The N-terminal sequences of tryptic peptides were determined either by autorated Edman procedure, or by Edman degradation combined with dansylation. Carboxypeptidases A and B were used to establish the C-terminal sequences. In total, the amino acid sequences were determined for 169 residues contained in tryptic peptides of aspergillopepsin A.