



УДК 547.962.02+577.158.45

**ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ  
АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КУР****II\*. СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ БЕЛКА  
СТАФИЛОКОККОВОЙ ПРОТЕАЗОЙ****Мясников А. Н., Шляпников С. В.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Проведен гидролиз карбоксиметилированной, цитракоцилированной аспартат-аминотрансферазы из сердца кур стафилококковой протеазой. Комбинацией гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на бумаге, а также электрофореза в полиакриламидном геле выделено 32 индивидуальных пептида. Структура пептидов установлена дансильным микровариантом метода Эдмана и с помощью аминопептидазы М. В сумме проанализированные пептиды составляют 79% всей полипептидной цепи белка.

Аспартат-аминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) из сердца кур, по предварительным данным [1], обладает высокой степенью гомологии относительно изофермента из сердца свиньи, что существенно облегчает идентификацию пептидных фрагментов, получаемых при специфическом ферментолитическом расщеплении белка, и определение их положения в полипептидной цепи. Эти соображения в значительной степени предопределили подход к установлению первичной структуры изучаемого фермента, в основу которого положено два базовых расщепления белка, а именно исчерпывающий гидролиз стафилококковой протеазой и трипсином.

В настоящей работе проводится анализ гидролизата аспартат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой (экстрацеллюлярная протеаза микроорганизма *Staphylococcus aureus* V8).

Стафилококковая протеаза — фермент, сравнительно недавно вошедший в практику работ по определению первичной структуры белков. Согласно опубликованным данным [2], стафилококковая протеаза гидролизует в первую очередь пептидные связи, образованные остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот, причем специфичность ее существенно зависит от условий гидролиза.

По данным аминокислотного анализа (сообщение I данной серии), цитоплазматическая аспартат-аминотрансфераза (цААТ) из сердца кур содержит в сумме 81 остаток Asx и Glx [1]. Если степень амидирования этих остатков в данном ферменте примерно такая же, как в изоферменте из сердца свиньи [3, 4], то, учитывая возможность расщепления пептидных связей как типа Glu-X, так и типа Asp-X, а также ограничения, накладываемые на действие протеазы близостью расщепляемой связи к C- или N-концу пептида [5], следует ожидать появления при гидролизе

\* Сообщение I см. [1].

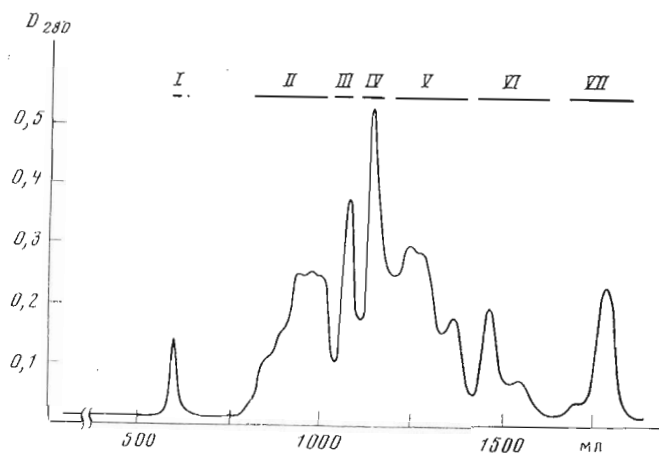


Рис. 1. Гель-фильтрация смеси пептидов, полученной при гидролизе аспартат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой на колонке (3,5×225 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий). Элюция со скоростью 15 мл/ч 0,1 М триэтиламмоний-бикарбонатным буфером, pH 8,3. Здесь и далее на рисунках отмечены границы объединения фракций

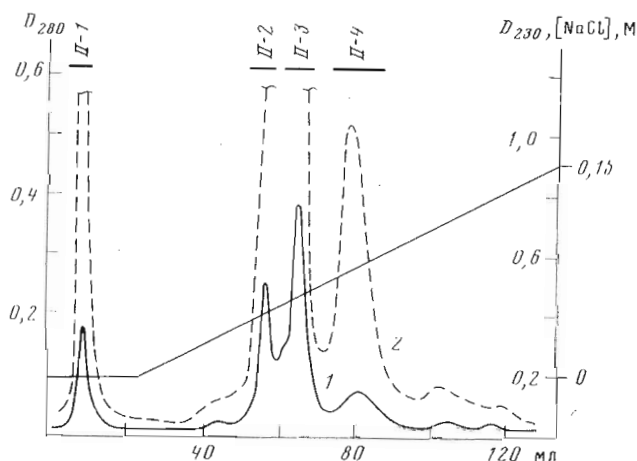


Рис. 2. Хроматография фракции II (см. рис. 1) на колонке (0,8×20 см) CM-целлюлозы CM-32 в 0,02 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,5. Элюция градиентом концентрации NaCl. Контроль по поглощению при 280 (1) и 230 нм (2)

белка стафилококковой протеазой 30—40 пептидов средней длиной около 12 аминокислотных остатков. Такой размер пептидов является оптимальным при определении последовательности аминокислот ручным вариантом метода Эдмана.

Стафилококковая протеаза, как выяснилось в ходе предварительных экспериментов, плохо гидролизует суспензию карбоксиметилированного белка. Поэтому для придания растворимости в условиях ферментативного расщепления белок был дополнительно модифицирован цитраконилированием. Наличие цитраконилированных  $\epsilon$ -аминогрупп в препарате аспартат-аминотрансферазы однозначно определяет щелочные условия проведения протеолиза стафилококковой протеазой. Вместе с тем в литературе существуют противоречивые данные по зависимости специфичности стафилококковой протеазы от состава буфера, применяемого при гидролизе.

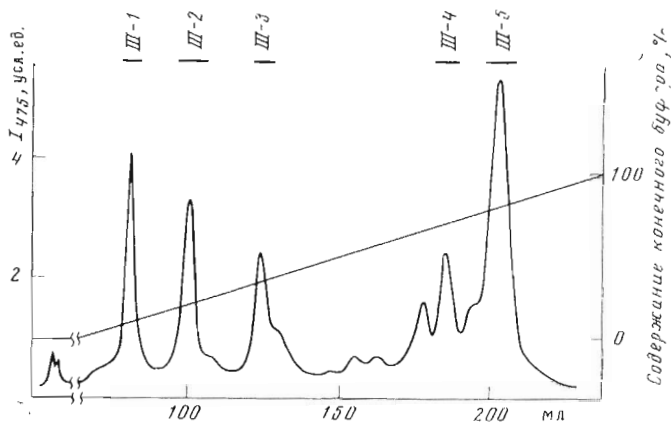


Рис. 3. Хроматография фракции III (см. рис. 1) на колонке (0,6×50 см) с ионообменной смолой Chromobeads P. Стартовый буфер — 0,05 М пиридин-формат (рН 2,4), содержащий 30% пропанола. Элюция линейным градиентом от стартового буфера к 2,0 М пиридин-ацетатному буферу (рН 5,2), содержащему 30% пропанола. Скорость элюции 15 мл/ч, температура колонки 55°С, контроль элюата см. «Экспериментальную часть»

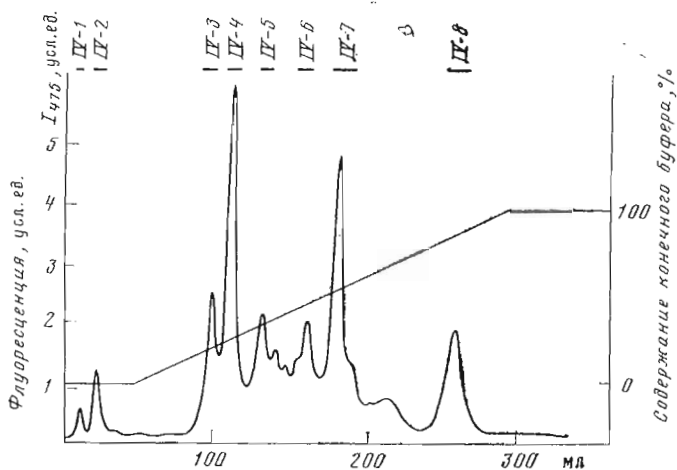


Рис. 4. Хроматография фракции IV (см. рис. 1) на ионообменной смоле Chromobeads P. Условия см. подпись к рис. 3

Так, согласно результатам Хумара и Драпо [2], использование аммоний-бикарбонатного буфера (рН 7,8) приводит в основном к расщеплению пептидных связей типа Glu-X, в то время как в калий-фосфатном буфере (рН 7,8) фермент гидролизует пептидные связи также и типа Asp-X. Другие авторы [5] приходят к выводу, что замена бикарбонатного буфера фосфатным не изменяет специфичности фермента, а лишь увеличивает его активность. Анализ этих данных показывает, что в любом случае применение фосфатного буфера максимально удовлетворяет требованию исчерпывающего протеолиза аспартат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой. На этом основании гидролиз белка проведен нами в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 8,0.

Полученную после гидролиза смесь пептидов разделяли хроматографией на колонке с сефадексом G-50 (сверхтонкий) (рис. 1). Объединенные фракции после лиофилизации подвергали децитраконилированию. Фрак-

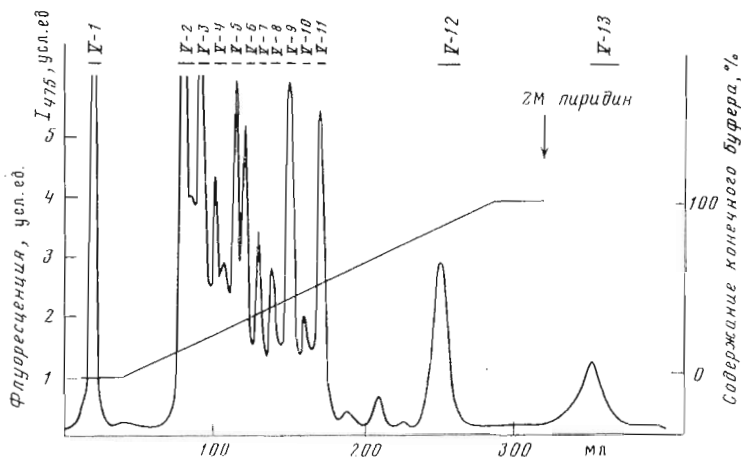


Рис. 5. Хроматография фракции V (см: рис. 1) на колонке с ионообменной смолой Chromobeads P. Условия см. подпись к рис. 3. По окончании градиента колонку промывали 2 М пиридином

ция VII, содержащая неорганические соли, была дополнительно обессолена на ионообменной смоле AG-50X4.

По данным определения N-концевых аминокислот, а также электрофореза в полиакриламидном геле, фракция I не содержала существенных количеств индивидуальных пептидов и представляла собой, по-видимому, смесь продуктов неполного расщепления белка.

Фракцию II хроматографировали на колонке с СМ-целлюлозой (рис. 2). Согласно результатам N-концевого анализа, субфракция II-1 состояла из смеси относительно малых количеств нескольких пептидов. Попытка их разделения с помощью хроматографии на DEAE-целлюлозе успехом не увенчалась.

Отрицательные результаты аналитических опытов по разделению пептидных смесей II-2, II-3 и II-4 хроматографией на бумаге и DEAE-целлюлозе заставили нас обратиться к нетрадиционной для данного типа работ технике разделения пептидов препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле. Предлагаемый нами вариант этого метода включает в себя разделение пептидов в полиакриламидном геле высокой концентрации (20–30%) в буферной системе «1 М уксусная кислота – 7 М мочевины» [6], обнаружение их с помощью обычно используемых для этих целей красителей и электрофоретическую элюцию в модификации Бердникова и др. [7]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности данной техники разделения пептидов. Нижний предел количества пептида, достаточный для его успешного выделения, составил в наших опытах ~20 нмоль. Отметим также, что использовавшийся нами полуколичественный метод контроля, основанный на определении N-концевых аминокислотных остатков, не позволил заметить сколько-нибудь существенных потерь пептидного материала в ходе разделения. Применение этого метода к трем обсуждаемым субфракциям привело к получению гомогенных пептидов Sp-II-2-1, Sp-II-2-2, Sp-II-2-3, Sp-II-3-1, Sp-II-4-1 и Sp-II-4-2.

Разделения пептидов фракции III достигали с помощью хроматографии на колонке с катионообменником Chromobeads P (рис. 3). Из пяти полученных субфракций четыре (III-2 – III-5) содержали индивидуальные пептиды. Попытки разделения сложной пептидной смеси III-1 путем гель-фильтрации на колонке с биогелем P-6 и хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой оказались безрезультатными.

Фракцию IV хроматографировали на колонке с ионообменной смолой Chromobeads P в тех же условиях, что и фракцию III (рис. 4). При этом

были получены гомогенные пептидные фрагменты Sp-IV-1, Sp-IV-2, Sp-IV-4, Sp-IV-6, Sp-IV-7, Sp-IV-8. Выход пептидов Sp-IV-2, Sp-IV-6, Sp-IV-7 и Sp-IV-8 был относительно невелик и составлял 4, 3, 15 и 6% соответственно. Разделение субфракций IV-3 и IV-5 методом бумажной хроматографии привело к выделению фрагментов Sp-IV-3-1 и Sp-IV-5-1 (выход последнего равнялся 3,5%).

При хроматографии на колонке с катионитом Chromobeads P фракция V была разделена на 13 субфракций (рис. 5), из которых 5 (V-3, V-9, V-11, V-12 и V-13) содержали индивидуальные пептиды. При этом пептиды субфракций V-9, V-11 и V-12, по данным N-концевого и аминокислотного анализа, были идентичны ранее выделенным пептидам Sp-IV-6, Sp-IV-7 и Sp-IV-8, однако выход их из фракции V был существенно выше (65, 31 и 50% соответственно). Субфракция V-4 не содержала заметных количеств пептидного материала. Появление пика на хроматограмме обусловлено, по-видимому, присутствием примесей в триэтиламмоний-бикарбонатном буфере, применявшемся на предыдущей стадии очистки. С помощью электрофореза на бумаге при pH 3,5 из соответствующих субфракций были выделены пептиды Sp-V-6-1, Sp-V-7-1, Sp-V-7-2 и Sp-V-8-1. Пептиды Sp-V-1-1, Sp-V-1-2, Sp-V-5-1 и Sp-V-10-1 очищены хроматографией на бумаге, причем анализ пептидов Sp-V-1-2 и Sp-V-6-1 доказал их идентичность пептидам Sp-IV-2 и Sp-IV-5-1 (выход этих пептидов из фракции V равен 66 и 47% соответственно). Применение гель-фильтрации на сефадексе G-25 позволило выделить из субфракции V-2 гомогенный пептид Sp-V-2-1 (рис. 6). Еще три индивидуальных пептида (Sp-V-2-2-1, Sp-V-2-2-2 и Sp-V-2-2-3) получены с помощью электрофореза на бумаге при pH 3,5 из субфракции V-2-2.

Электрофоретическое разделение на бумаге фракций VI и VII при pH 3,5 позволило получить пептиды Sp-VI-1 и Sp-VII-1.

Таким образом из смеси продуктов протеолитического расщепления цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур стафилококковой протеазой выделено в общей сложности 32 индивидуальных пептидных фрагмента. Результаты определения их аминокислотного состава, N-концевых аминокислотных остатков, а также величины хроматографической и электрофоретической подвижности приведены в табл. 1.

Структуру полученных фрагментов устанавливали дансильным вариантом метода Эдмана [8]. Для подтверждения положения триптофановых остатков использовали гидролиз Dns-пептидов метансульфоновой кислотой [9]. Амиды дикарбоновых аминокислот определяли после гидролиза пептидов аминопептидазой M, причем для пептидов, содержащих одновременно остатки дикарбоновой аминокислоты и ее амида, проводили количественные оценки их содержания в частичных гидролизатах. В остальных случаях применяли условия, приводящие к полному гидролизу пептида. Аминокислоты идентифицировали в виде Dns-производных (табл. 2).

Применение вышеперечисленных методов позволило непосредственно установить полную структуру пептидов: Sp-III-2, Sp-III-5, Sp-IV-2, Sp-IV-3-1, Sp-IV-4, Sp-IV-5-1, Sp-IV-6, Sp-IV-7, Sp-IV-8, Sp-V-2-1, Sp-V-2-2-1, Sp-V-2-2-2, Sp-V-3, Sp-V-7-1, Sp-V-5-1, Sp-V-7-2, Sp-V-8-1, Sp-V-10-1, Sp-V-13, Sp-VI-1 и Sp-VII-1 (табл. 3). Полная или частичная последова-

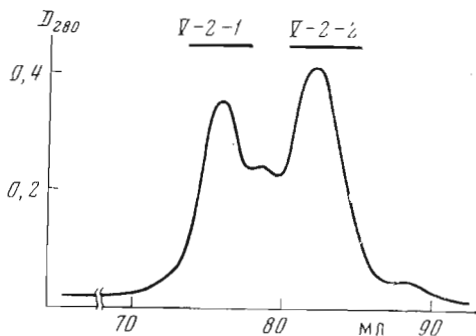


Рис. 6. Разделение субфракции V-2 (см. рис. 5) на колонке (1×180 см) с сефадексом G-25 (сверхтонкий). Элюция 0,1 M триэтиламмоний-бикарбонатным буфером (pH 8,3) со скоростью 2,5 мл/ч

Аминокислотный состав и некоторые характеристики пептидов, полученных при гидролизе аспаргат-аминотрансферазы стафилококковой протеазы

Аминокислота	Sp-II-2-1	Sp-II-2-2	Sp-II-2-3	Sp-II-3-1	Sp-II-4-1	Sp-II-4-2	Sp-III-2	Sp-III-3	Sp-III-4	Sp-III-5	Sp-IV-1	Sp-IV-2
Cys*						0,9						
Asp	2,6	1,3	3,8	1,3	3,2	3,3	1,8	1,2	3,1	1,8	1,1	
Thr	3,5	1,2	1,0	4,7	1,0	1,8		0,9			1,0	
Ser	1,7	1,1	1,1	2,8	2,6	1,1	1,7		1,0	1,0	1,0	
Glu	2,7	1,2	1,0	3,0	3,0	3,0	1,9	1,0	1,0	1,1	3,1	1,1
Pro	2,0	3,2		3,0	1,0			2,6			1,0	2,0
Gly	3,7	0,5	2,9	1,2	6,5	2,2	2,3		2,1	2,0	2,0	1,0
Ala		6,5	1,2	3,2	6,9	1,2	2,2	3,8				
Val	1,2	2,9	1,7	1,7	2,0			2,8	2,7	2,8	0,9	
Met	0,8					2,1					0,8	
Ile	1,9	1,1		2,0	3,0	2,0					1,0	
Leu	1,9	1,2	1,1	2,1	3,1	2,8	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	0,8
Tyr			0,5			1,0	0,9					1,0
Phe				1,0	1,0		1,0	1,7			2,0	
Lys	2,0	3,0	1,0	1,0	1,1	2,1	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	
His	0,8					0,9						
Arg		1,8	1,9	2,0	4,0	1,0		1,9	1,0	1,0		
Trp**	+			+								
Всего остатков	29	25	18	30	39	22	14	19	13	12	16	9
$E_{Arg}$ (pH 3,5)											1,9	1,7
$R_{Arg}$												1,9
$R_R^{***}$	0,4	0,5	0,7	0,6	0,4	0,6						
Выход, %	3	3	5	30	15	24	15	3	5	35	8	70
N-Концевая аминокислота	Ser	—	Asp	Lys	Phe	Lys	Ser	Ala	Arg	Arg	—	Tyr

Аминокислота	Sp-IV-3-1	Sp-IV-4	Sp-IV-5-1	Sp-IV-6	Sp-IV-7	Sp-IV-8	Sp-V-1-1	Sp-V-2-1	Sp-V-2-2-1	Sp-V-2-2-2	Sp-V-2-2-3
Cys*	0,7										
Asp	2,0							2,0	2,0	1,2	1,8
Thr			1,0								2,9
Ser	1,7						1,0	0,9	0,9	0,9	1,0
Glu	2,2	2,0	1,0	1,2	1,0	1,1	2,1	2,8		2,3	1,0
Pro		2,1				1,0				1,1	1,1
Gly	1,2	1,2									2,3
Ala	1,0		1,1			1,0	1,1				
Val		3,6	0,8			1,0			1,9	1,0	
Met				1,0				1,0	0,9		
Ile			0,9	1,0		1,0	0,8				0,8
Leu	2,1	1,0					1,9	1,1		1,0	1,0
Tyr	0,7			1,0		0,9					
Phe	2,8									0,9	1,0
Lys	1,1	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0					
His						0,7	0,8				
Arg		1,0						0,9			
Trp*		+									+
Всего остатков	16	13	6	5	4	8	12	11	5	7	13
$E_{Arg}$ (pH 3,5)			0,7						0,1	0,2	0,3
$R_{Arg}$		1,7	1,6					0,8			
$R_R^{***}$											
Выход, %	3	11	50	70	45	56	16	28	2	1	5
N-Концевая аминокислота	Leu	Gly	Ala	Tyr	Lys	Tyr	—	Asp	Ser	Ser	Ser

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	Sp-V-3	Sp-V-5-1	Sp-V-7-1	Sp-V-7-2	Sp-V-8-1	Sp-V-10-1	Sp-V-13	Sp-VI-1	Sp-VII-1	Sp-II-2-1- -Cb-1
Cys*										
Asp		2,8		1,0	1,3	1,0			1,0	2,2
Thr				0,7					1,0	0,9
Ser		1,1	1,2		1,4		1,0	1,0		
Glu	1,0		1,0	1,1	1,0		1,1	1,0		1,1
Pro										
Gly	1,0			1,2		1,2				1,0
Ala			1,8	1,2		1,0				
Val		1,0	1,9	0,8	0,9		1,0			
Met		0,8			1,0		0,9			0,6
Ile									1,0	1,9
Leu					1,5		1,8	2,0		
Tyr			0,9	0,7					2,0	
Phe	1,0	0,9	0,9			1,0				0,8
Lys						1,0				
His		0,8								0,9
Arg			1,0	1,1	2,0		2,0	2,0	2,0	
Trp**			+							
Всего остатков	3	8	10	8	9	5	8	6	8	10
$E_{Arg}$ (рН 3,5)			0,3	0,4	0,6			0,8	0,6	0,4
$R_{Arg}$		1,2				1,6				
$R_R^{***}$										
Выход, %	35	3	3	1	1	10	50	63	70	1
N-Концевая аминокислота	Gly	Asp	Ala	Val	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Asp

\* Цистеин во всех пептидах присутствует в форме S-карбоксиметилцистеина.

\*\* Триптофан в пептидах идентифицировали с помощью качественной реакции на бумаге.

\*\*\*  $R_R$  — подвижность при электрофорезе в полиакриламидном геле относительно родамина Ж.

тельность аминокислотных остатков остальных пептидов установлена следующим образом.

*Пептиды Sp-II-2-1, Sp-IV-1 и Sp-V-2-2-3.* N-Концевые аминокислотные последовательности пептидов Sp-II-2-1 и Sp-V-2-2-3 идентичны (табл. 3), а сравнение аминокислотных анализов всех трех пептидов (табл. 1) приводит к заключению, что пептид Sp-II-2-1 является суммой пептидов Sp-IV-1 и Sp-V-2-2-3. Исследование структуры пептида Sp-IV-1 осложнялось тем, что его N-конец оказался заблокирован. Наличие в 14-м положении пептида Sp-II-2-1 остатка Glx указывало на то, что блокирующей группой является остаток пироглутаминовой кислоты. Обработка пептида Sp-IV-1 пироглутамат-аминопептидазой привела к отщеплению пироглутаминовой кислоты с образованием укороченного пептида, структура которого установлена вышеописанными методами. Положение остатка гистидина и состояние амидирования остатков дикарбоновых аминокислот в положении 9, 13 и 14 пептида Sp-II-2-1 выясняли после выделения электрофорезом на бумаге при рН 3,5 и анализа фрагмента Sp-II-2-1-Ch-1, полученного при химотриптическом гидролизе пептида Sp-II-2-1 (табл. 1–3).

*Пептиды Sp-II-2-2 и Sp-III-3.* Пептид Sp-II-2-2 имеет заблокированный N-конец, причем обработка пироглутамат-аминопептидазой не приводит к появлению свободной  $\alpha$ -аминогруппы. Вместе с тем сопоставление аминокислотного состава пептида Sp-II-2-2 со структурой и составом пептида Sp-III-3, а также N-концевого химотриптического пептида белка и пептида TC-II-8-1, описанных в предыдущем сообщении [1], дает возможность сделать вывод о том, что пептид Sp-III-3 является частью пептида Sp-II-2-2. Одновременное появление в гидролизате пептидов Sp-II-2-2 и Sp-III-3



Таблица 2

## Кинетика гидролиза пептидов аминокептидазой М

Пептид	Время гидролиза	Соотношение фермент — субстрат, мкг/нмоль	Количество отщепленной аминокислоты, %				
			Asp	Asn	Glu	Gln	His
Sp-III-2	30 мин	0,05	4	11	6	80	
Sp-III-5	30 »	0,05	10	79	10		
Sp-IV-3-1	30 »	0,05		14		66	
Sp-IV-4	10 »	0,05			2	62	
Sp-V-2-1	5 »	0,05	35	15		2	
	12 ч	0,5	105	91	97	180	
Sp-V-2-2-2	30 мин	0,05			15	60	
Sp-V-5-1	15 »	0,05	21	167			86
Sp-II-2-1-Ch-1	15 »	0,05		40			18
	12 ч	0,5	109	103		86	94

обусловлено неполным расщеплением стафилококковой протеазой связи Ala-Ala (положение 6 и 7 пептида Sp-II-2-2).

*Пептиды Sp-II-2-3 и Sp-V-7-2.* Фрагмент Sp-V-7-2 является продуктом частичного гидролиза связи Gly-Val (положения 10–11 пептида Sp-II-2-3). Это следует из результатов аминокислотного анализа данной пары пептидов, а также из данных по определению N-концевой последовательности пептида Sp-II-2-3.

*Пептиды Sp-II-3-1 и Sp-V-2-2-2.* Деградация по Эдману дала возможность установить последовательность 11 аминокислотных остатков в N-концевой части пептида Sp-II-3-1. Аминокислотные составы двух этих пептидов, а также данные по структуре участка 298–318 пептидной цепи аспаргат-аминотрансферазы из сердца свиньи [3, 4] свидетельствуют о том, что пептид Sp-V-2-2-2 соответствует C-концевому участку пептида Sp-II-3-1.

*Пептид Sp-II-4-1.* Частичная структура этого пептида установлена с помощью 12 циклов деградации по методу Эдмана.

*Пептид Sp-II-4-2.* Строение N-концевой части этого пептида устанавливали методом Эдмана. Положение остатка гистидина подтверждали частичным гидролизом пептида аминокептидазой М (0,05 мкг/нмоль, 20 мин: Lys — 80%, His — 30%, Pe — 9%, Tyr — 9%, Leu — 10%).

*Пептиды Sp-III-4 и Sp-III-5.* N-Концевые последовательности этих двух пептидов одинаковы. Аминокислотные составы также совпадают, за исключением того, что пептид Sp-III-4 содержит на один остаток аспарагиновой кислоты больше, чем пептид Sp-III-5. Очевидно, что этот остаток находится на C-конце пептида Sp-III-4.

*Пептид Sp-IV-5-1.* Сравнение структуры пептида со структурой C-концевой части куриной аспаргат-аминотрансферазы [1], а также с C-концевой последовательностью фермента из сердца свиньи [3, 4] приводит к заключению, что этот пептид должен быть в белке C-концевым. Вместе с тем гидролиз пептида аминокептидазой М показывает, что его C-концевым остатком является глутаминовая кислота, а не глутамин, как следовало бы ожидать на основании вышеперечисленных данных. Такое противоречие можно объяснить, предположив, что C-концевой остаток глутамина в этом фрагменте претерпел очень интенсивное (выход пептида 50%) дезамидирование, вероятно, в кислых условиях снятия цитраконовой защиты.

*Пептид Sp-V-1-1.*  $\alpha$ -Аминогруппа N-концевого остатка пептида блокирована. После отщепления N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты пироглутамат-аминокептидазой структуру укороченного пептида устанавливали методом Эдмана. Необходимо отметить резкое падение выхода Dns-аминокислот после пятого цикла деградации, которое объясняется присутствием в пептиде группировки Asn-Gly. При гидролизе пептида



## Структура пептидов, выделенных после гидролиза аспаргат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой

Пептид	Структура	Положение в белковой цепи свиной ЦААТ [3, 4]
Sp-II-2-1	Ser-Leu-Gly-Thr-Pro-Gly-Thr-Trp-Asx-His-Ile-Thr-Asx-Glx-Ile-(Gly, Met, Phe, Ser, Phe, Thr, Gly, Leu, Asx, Pro, Lys, Glx, Val, Glx)	343-371
Sp-II-2-2	(Ac-Ala, Ala, Ser, Ile, Phe, Ala, Ala, Val, Pro, Arg, Ala, Pro, Pro, Val, Ala, Val, Phe, Lys, Leu, Thr, Ala, Asx, Phe, Arg, Glx)	2-26
Sp-II-2-3	Asx-Gly-Asx-Ser-Arg-Lys-Val-Asx-Leu-Gly-Val-Gly-(Ala, Tyr, Arg, Thr, Asx, Glx)	27-44
Sp-II-3-1	Lys-Ile-Val-Arg-Thr-Thr-Trp-Ser-Asx-Pro-Pro-(Ser, Glx, Gly, Ala, Arg, Ile, Val, Ala, Thr, Thr, Leu, Thr, Ser, Pro, Glx, Leu, Phe, Ala, Glx)	289-318
Sp-II-4-1	Phe-Arg-Ala-Asx-Ala-Ser-Arg-Ile-Ala-Leu-Gly-Asx-Asx-(Ser, Pro, Ala, Ile, Ala, Glx, Lys, Arg, Val, Gly, Ser, Val, Glx, Gly, Leu, Gly, Gly, Thr, Gly, Ala, Leu, Arg, Ile, Gly, Ala, Glx)	79-117
Sp-II-4-2	Lys-His-Ile-Tyr-Leu-Met-Ala-Ser-Gly-Arg-Ile-(Asx, Met, Cys, Gly, Leu, Thr, Thr, Lys, Asx, Leu, Asx) *	377-398
Sp-III-2	Ser-Ala-Tyr-Gln-Gly-Phe-Ala-Ser-Gly-Asn-Leu-Glu-Lys-Asp	223-236
Sp-III-3	Ala-Val-Pro-Arg-Ala-Pro-Pro-Val-Ala-Val-Phe-Lys-Leu-Thr-Ala-(Asx, Phe, Arg, Glx)	8-26
Sp-III-4	Arg-Val-Gly-Asx-Leu-Ser-Val-Val-Gly-Lys-(Asx, Glx, Asx)	266-278
Sp-III-5	Arg-Val-Gly-Asn-Leu-Ser-Val-Val-Gly-Lys-Asp-Glu	266-277
Sp-IV-1	<Gln-Ile-Gly-Met-Phe-Ser-Phe-Thr-Gly-Leu-Asn-Pro-Lys-Glx-Val-Glx *	356-371
Sp-IV-2	Tyr-Leu-Pro-Ile-Leu-Gly-Leu-Pro-Glu	70-78
Sp-IV-3-1	Leu-Phe-Cys-Ala-Gln-Ser-Phe-Ser-Lys-Asn-Phe-Gly-Leu-Tyr-Asn-Glu	250-265
Sp-IV-4	Gly-Gln-Pro-Trp-Val-Leu-Pro-Val-Val-Arg-Lys-Val-Glu	45-57
Sp-IV-5-1	Ala-Val-Thr-Lys-Ile-Glu	407-412
Sp-IV-6	Tyr-Met-Ile-Lys-Glu	372-376
Sp-IV-7	Lys-Ala-Pro-Glu	179-182
Sp-IV-8	Tyr-Val-Ala-Lys-Ser-Ile-His-Glu	399-406
Sp-V-1-1	<Gln-Leu-Ile-Ala-Gly-Asn-Gly-Ser-Leu-Asn-His-Glu *	58-69
Sp-V-2-1	Asp-Asn-Val-Gln-Arg-Val-Leu-Ser-Gln-Met-Glu	278-288
Sp-V-2-2-1	Ser-Val-Phe-Met-Asp	145-149
Sp-V-2-2-2	Ser-Pro-Gln-Leu-Phe-Ala-Glu	312-318

Пептид	Структура	Положение в белковой цепи свиной ЦААТ [3, 4]
Sp-V-2-2-3	Ser-Leu-Gly-Thr-Pro-Gly-Thr-Trp-Asx-His-Ile- Thr-Asx	343-355
Sp-V-3	Gly-Phe-Glu	247-249
Sp-V-5-1	Asn-His-Asn-Ser-Val-Phe-Met-Asp	141-149
Sp-V-7-1	Ala-Trp-Ala-Val-Arg-Tyr-Phe-Val-Ser-Glu	237-246
Sp-V-7-2	Val-Gly-Ala-Tyr-Arg-Thr-Asp-Glu	37-44
Sp-V-8-1	Asp-Arg-Val-Leu-Leu-Met-Arg-Ser-Glu	328-336
Sp-V-10-1	Ala-Gly-Phe-Lys-Asp	150-154
Sp-V-13	Arg-Val-Leu-Leu-Met-Arg-Ser-Glu	329-336
Sp-VI-1	Leu-Arg-Ser-Arg-Leu-Glu	337-342
Sp-VII-1	Ile-Arg-Thr-Tyr-Arg-Tyr-Trp-Asp	155-162
Sp-II-2-1-Ch-1	Asn-His-Ile-Thr-Asp-Gln-Ile-(Gly, Met, Phe)	351-360

Примечание. Положение аминокислотных остатков установлено с помощью метода Эдмана в Dns-модификации (исключение составляет аминокислотная последовательность, заключенная в скобки). Заключенная в скобки последовательность пептидов реконструирована по данным аминокислотного анализа и результатам исследования пептидов других гидролизатов [2]. Идентификация аминокислотных остатков, проведенная на основании анализа полного гидролизата пептида аминоклонидазой М, показана знаком «→», а при изучении кинетики гидролиза аминоклонидазой М «↔». \* Цистеин в пептидах идентифицировали в виде S-карбоксиметилпроизводного; идентификацию остатка пироглутаминовой кислоты см. в тексте.

аминопептидазой в условиях, обычно приводящих к полному расщеплению пептидов такого размера, также наблюдалось значительное занижение выхода аминокислот, расположенных за остатком глицина в пятом положении этого фермента. Такая устойчивость пептида к действию аминоклонидазы и расщеплению по методу Эдмана согласуется с представлениями об особых свойствах связей между остатками аспарагина и глицина [10], приводящих к циклизации с образованием имидной связи или  $\alpha,\beta$ -перегруппировке.

Таким образом, из 32 пептидов, выделенных после гидролиза цитоплазматической аспарат-аминотрансферазы из сердца кур стафилококковой протеазой, для 22 была установлена полная, а для 10 пептидов частичная аминокислотная последовательность. В большинстве случаев установление лишь частичной структуры выделенного пептида не было связано с ограничениями, накладываемыми количеством полученного материала, а обусловлено тем фактом, что строение соответствующих областей белка легче было установить при исследовании фрагментов исчерпывающего триптического протеолиза белка (см. сообщение III). Роль крупных пептидов данного гидролизата сводилась в этих случаях к обеспечению «стыковки» триптических пептидов фермента, которая могла быть проведена на основании вышеприведенных неполных данных.

Аминокислотные последовательности пептидов, полученных после расщепления аспарат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой, в сумме составляют 79% всей аминокислотной последовательности белка. Все охарактеризованные фрагменты удалось на основании гомологии со свиным изоэнзимом расположить по длине полипептидной цепи белка (табл. 2). Сравнение структур исследованных пептидов с соответствующими

ми участками полипептидной цепи аспарат-аминотрансферазы из сердца свиньи подтверждает ранее сделанный вывод о высокой степени сходства куриного и свиного ферментов.

Специфичность стафилококковой протеазы при гидролизе аспарат-аминотрансферазы согласуется с заключением Хумара и Драно [2] о способности этой протеазы эффективно гидролизовать в фосфатном буфере пептидные связи, образованные карбоксильной группой остатков как глутаминовой, так и аспарагиновой кислот. Анализ случаев, в которых связи этого типа оказались устойчивыми к действию протеазы (некоторые данные по состоянию амидирования остатков дикарбоновых аминокислот заимствованы из сообщения III данной серии), приводит к следующей схеме действия стафилококковой протеазы на белковые субстраты: быстрый гидролиз пептидных связей рядом с остатками глутаминовой кислоты с более медленным расщеплением пептидных связей, образованных аспарагиновой кислотой.

При этом, как уже отмечалось ранее [5], те связи Asp-X, которые находятся рядом с N- или C-концом образовавшихся пептидов, оказываются устойчивыми к действию протеазы. В отдельных случаях вследствие локальных особенностей структуры пептидной цепи доминирование гидролиза по связям Glu-X над гидролизом по рядом расположенным связям Asp-X может ослабляться или не проявляться совсем. Характерный пример в этой связи представляет собой пара пептидов Sp-III-4 и Sp-III-5 (табл. 2), различающихся на один остаток аспарагиновой кислоты (выход пептида Sp-III-5 в 7 раз превышает выход пептида Sp-III-4), а также пептид Sp-III-2, содержащий нерасщепленную связь Glu-Lys рядом с C-концом (выход пептида 15%). В то же время важно отметить, что подавляющее большинство связей Asp-X и Glu-X, свободных от этого ограничения, расщепляются практически полностью, о чем свидетельствуют высокие выходы многих пептидов, а также отсутствие фрагментов с нерасщепленными связями. Интересно также, что в качестве X может находиться не природный остаток цитракониллизина (пептиды Sp-II-3-1, Sp-II-4-2 и Sp-IV-7).

Отсутствие гидролиза в последовательности ...-Gly-Asp-Asp-Ser-Pro... (пептид Sp-II-4-1) согласуется с ранее сделанными выводами об устойчивости связей типа Asp(Glu)-X-Pro и Asp-Asp к действию протеазы [11].

Незначительное расщепление связей, не укладывающихся в рамки общей схемы специфичности стафилококковой протеазы Ala-Ala, Asn-Ser, Thr-Ser, Gly-Val, Ala-Asp (выход соответствующих пептидов составил 3, 1, 5, 1 и 1%), может быть обусловлено либо побочным действием самого фермента, либо присутствием следовых количеств примесной протеазы. Практически все отмеченные неспецифические разрывы приходится на пептидные связи, образованные остатками с небольшим размером бокового радикала.

### Экспериментальная часть

Выделение аспарат-аминотрансферазы из сердца кур, ее карбоксиметилирование и цитраконилирование, а также разделение пептидов методами ионообменной хроматографии на смоле Chromobeads P, хроматографии (в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12) и электрофореза на бумаге, аминокислотный анализ пептидов и определение их аминокислотной последовательности дансылым микровариантом метода Эдмана проводили как описано в сообщении I настоящей серии [1].

Гидролиз карбоксиметилированной, цитраконилированной аспарат-аминотрансферазы стафилококковой протеазой (КФ 3.4.92.—) (Miles, Англия) проводили 16 ч в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 8,0) при концентрации цитраконилированной аспарат-аминотрансферазы 10 мг/мл и температуре 37° С. Протеазу добавляли двумя равными порциями через 4 ч до конечного соотношения фермент — субстрат 1 : 30. По окончании

гидролиза смесь пептидов непосредственно наносили на колонку с сефадексом G-50 (рис. 1).

*Гидролиз пептидов аминопептидазой М (КФ 3.4.11.2)* (Boehringer, ФРГ) проводили в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере (рН 7,0) при концентрации пептида примерно 1 нмоль/мкл и 20° С. Реакцию останавливали высушиванием в вакууме. Анализ гидролизатов осуществляли дансильным микрометодом, как описано ранее [1].

*Химотриптический гидролиз пептида Sp-II-2-1.* 200 нмоль пептида растворяли в 200 мкл 1% бикарбоната аммония и обрабатывали 10 мкг химотрипсина (КФ 3.4.21.1) (Worthington, США) в течение 4 ч при 37° С. Гидролизат непосредственно наносили на бумагу для электрофоретического разделения.

*Гидролиз пептидов пироглутамат-аминопептидазой* (Boehringer, ФРГ; КФ 3.4.11.8) проводили в 0,02 М N-этилморфолин-ацетатном буфере (рН 7,5), содержащем 1 мМ β-меркаптоэтанол и 1 мМ EDTA [12], при соотношении фермент — субстрат 1 мкг/нмоль в течение 6 ч при 20° С.

*Определение N-концевого триптофана в пептидах* проводили по методике Фленгсруда [9] с незначительными модификациями. 0,5–1 нмоль Dns-пептида гидролизовали 6 ч при 105° С в 10 мкл 4 М метансульфоновой кислоты, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола (Pierce, США). Метансульфоновую кислоту нейтрализовали 10 мкл 4 М аммиака и экстрагировали 50 мкл этилацетата. Органическую фазу высушивали и Dns-аминокислоты хроматографировали на полиамидных пластинках в стандартных системах, используемых нами для разделения Dns-аминокислот (направление 1: муравьиная кислота — пропанол — вода, 2 : 5 : 100; направление 2: бензол — бутанол — уксусная кислота, 90 : 5 : 10 [13]).

*Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле.* Разделение пептидов проводили на пластинках 20×15×0,3 см 20% полиакриламидного геля (соотношение акриламид — N,N'-бисметиленакриламид, 40 : 1) в присутствии 1 М уксусной кислоты и 7 М мочевины [10]. Электрофорез осуществляли в приборе с вертикальным расположением пластины без принудительного охлаждения при напряжении 300 В до тех пор, пока краситель (родамин 6Ж) не приближался к нижнему краю пластины. Гели прокрашивали 5–10 мин 0,5% раствором кумасси ярко-синего (BDH, Англия) в 6% уксусной кислоте и отмывали 15–30 мин в 6% уксусной кислоте. Окрашенные зоны вырезали. Описанная ниже техника элюции была предложена В. А. Бердниковым [7] и использовалась нами с незначительными модификациями. Вырезанные полосы разрезали на куски длиной примерно 5 см и помещали в прибор, состоящий из двух диализных мешков, снабженных платиновыми электродами и помещенных под слой вазелинового масла. Один из мешков заполняли 1 М уксусной кислотой (анод), другой — тем же раствором, содержащим 10% тетраметилэтилендиамина (катод). Элюируемые полосы приводили в контакт с анодом и накрывали полосой специально приготовленного «промежуточного» 10% полиакриламидного геля, содержащего 1 М уксусную кислоту, 10% тетраметилэтилендиамина и 7 М мочевины, таким образом, чтобы второй конец «промежуточной» полосы касался катода. При подключении напряжения (примерно 100 В) на границе двух буферных систем образовывалась узкая, хорошо видимая зона, в которой постепенно концентрировался весь пептидный материал, содержащийся в элюируемой полосе. После смещения границы на 3–5 см полосу «промежуточного» геля обрезали непосредственно перед зоной концентрирования и на пути тока помещали стеклянный капилляр (4×25 мм), заполненный катодным буфером. При продолжении электрофореза элюируемый материал переходил в капилляр. Для отделения окрашенных примесей неустановленной природы использовали гель-фильтрацию на колонках (0,5×40 см) с сефадексом G-15 в 10% уксусной кислоте.

Апатитический электрофорез пептидов проводили в тонких блоках полиакриламидного геля (20×15×0,1 см) в аналогичной системе.

*Контроль содержания пептидов в элюатах при ионообменной хроматографии в пиридин-ацетатных буферах* (рис. 3–5). Аликвоты (50 мкл) из каждой фракции смешивали с 2 мл 0,5 М натрий-боратного буфера (рН 8,5) и обрабатывали при энергичном перемешивании 150 мкл раствора флуорескамина (Serva, ФРГ) в абсолютном ацетоне (0,3 мг/мл). Флуоресценцию измеряли при 475 нм на спектрофлуориметре MPS-2A (Hitachi, Япония), длина волны возбуждающего света 390 нм.

Авторы выражают глубокую благодарность С. Н. Борисовой за предоставление использованной в данной работе цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур; К. В. Спянову за проведение аминокислотных анализов, Т. К. Ивановой за помощь при подготовке рукописи к печати и Л. А. Якубову за консультации при проведении препаративного электрофореза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мясников А. Н., Мягкова М. А., Шляпников С. В., Орлов В. М., Торчинский Ю. М., Северин Е. С. (1980) *Биоорг. химия*, **6**, 348–358.
2. Houmard J., Drapeau G. R. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3506–3509.
3. Ovchinnikov Yu. A., Egorov C. A., Aldanova N. A., Feigina M. Yu., Abdulaev N. G., Grishin E. V., Kiselev A. P., Modyanov N. N., Braunstein A. E., Polyanovsky O. L., Nosikov V. V. (1973) *FEBS Lett.*, **29**, 31–34.
4. Doonan S., Doonan H. J., Hanford R., Vernon C. A., Walter J. M., Bossa F., Barra D., Carloni M., Faslla P., Riva F., Walton P. L. (1974) *FEBS Lett.*, **32**, 291–294.
5. Austen B. M., Smith E. L. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **72**, 411–417.
6. Panyim S., Chalkley R. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **130**, 337–346.
7. Бердников В. А., Злочевский В. А. (1974) в сб.: *Тр. Всес. семинара «Электрофорез в полиакриламидном геле»*, с. 107–109, М.
8. Bruton C. J., Hartley B. S. (1970) *J. Mol. Biol.*, **52**, 165–178.
9. Flengsrud R. (1976) *Anal. Biochem.*, **76**, 547–550.
10. Bornstein P. (1970) *Biochemistry*, **9**, 2408–2417.
11. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Потанинко Н. А. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 180–196.
12. Podell D. N., Abraham G. N. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **81**, 176–185.
13. Арутюнян А. А., Шляпников С. В., Северин Е. С. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1188–1196.

Поступила в редакцию  
21.VIII.1979

#### PRIMARY STRUCTURE OF CYTOPLASMIC ASPARTATE AMINOTRANSFERASE FROM CHICKEN HEART. II. THE STRUCTURE OF PEPTIDES ISOLATED FROM THE STAPHYLOCOCCAL PROTEASE DIGEST OF THE PROTEIN

MYASNIKOV A. N., SHLYAPNIKOV S. V.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Cytoplasmic aspartate aminotransferase from chicken heart was hydrolyzed with staphylococcal protease after carboxymethylation and citraconylation. By a combination of gel filtration, ion exchange and paper chromatography, and polyacrylamide gel electrophoresis 32 individual peptides were isolated. Their structure was determined using mainly a microversion of the dansyl-Edman technique and aminopeptidase M digestion. In total of analyzed peptides correspond to 79% of the enzyme amino acid sequence.