



УДК 547.963.04

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ЛЕГГЕМОГЛОБИНОВ I И II ИЗ КЛУБЕНЬКОВ ЖЕЛТОГО
ЛЮПИНА *Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаров М. И.,
Фейгина М. Ю.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Установлена полная аминокислотная последовательность леггемоглобинов I и II из клубеньков желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) путем фрагментации белков рядом ферментов (трипсин, химотрипсин, термолитсин). Структура триптических, химотриптических и термолитических пептидов определена деградацией по методу Эдмана и с помощью карбоксипептидаз А и В.

В предыдущем сообщении [3] описан метод выделения леггемоглобинов I и II из клубеньков желтого люпина *Lupinus luteus* L., приведены данные аминокислотного анализа и определена N-концевая аминокислотная последовательность обоих белков. Настоящая работа посвящена выделению и установлению аминокислотной последовательности пептидов триптического гидролизата леггемоглобинов I и II, химотриптического гидролизата леггемоглобина I, а также пептидов термолитического гидролизата смеси компонентов.

Леггемоглобины I и II являются чрезвычайно гидрофобными белками, поэтому до энзиматического гидролиза апопротенины подвергали тепловой денатурации при pH 8,0. Однако даже в этом случае часть белка не гидролизуетея и остается в осадке, который отделяли и отбрасывали.

Поскольку леггемоглобин I содержит 15 остатков лизина и один остаток аргинина, в качестве первого этапа определения его аминокислотной последовательности белок гидролизовали трипсином.

Растворимые пептиды триптического гидролизата разделяли на катионите аминокс А-6 с помощью летучих пиридин-ацетатных буферов (рис. 1а). Из 10 полученных фракций 8 представляли собой индивидуальные пептиды. Из двух фракций (Т-11, Т-15 и Т-10, Т-12), каждая из которых содержала смесь двух пептидов, хроматографией и электрофорезом на бумаге были получены три гомогенных пептида (Т-10, Т-11 и Т-12) и свободный лизин Т-15. Выделение свободного лизина свидетельствует о наличии в белке по крайней мере одной связи Lys — Lys. Пептид Т-3 сильно сорбируется смолой и элюировался лишь 0,5 М аммиаком. В целом из растворимой фракции триптического гидролизата было выделено 12 пеп-

* Краткие сообщения см. в работах [1, 2]. Принятые сокращения: Lb — леггемоглобин; Т, С, Th — обозначения пептидов триптического, химотриптического и термолитического гидролиза соответственно, Pth — фенилтиогидантоципроизводное.

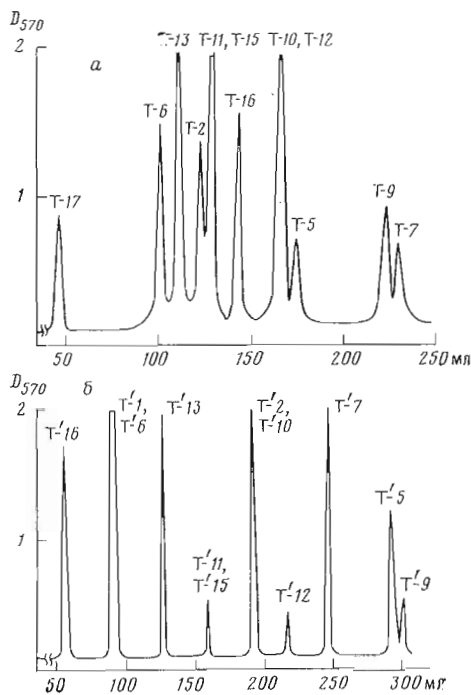


Рис. 1. Разделение растворимых триптических пептидов леггемоглобинов I (а) и II (б) на катионите аминокс А-6 (здесь и далее указали пептиды, выделенные из каждой фракции)

двигательных пептидов, аминокислотный состав которых приведен в табл. 1.

Из нерастворимой фракции, которая образуется при подкислении реакционной смеси после гидролиза, хроматографией на целлюлозе DE-32 в 8 М мочевины в градиенте хлористого натрия (рис. 2а) были выделены пептиды Т-8 и Т-(13+14). Пептид Т-(13+14) содержит два остатка лизина, один из которых соседствует с остатком аспарагиновой кислоты (Asp-Lys-Trp), чем, по-видимому, и объясняется его устойчивость к атаке ферментом. В пользу этого предположения говорит тот факт, что в леггемоглобине II аспарагиновая кислота заменена на аланин и гидролиз по связи Lys-Trp проходит нормально.

Структуру большинства пептидов определяли деградацией по методу Эдмана, их аминокислотная последовательность приведена в табл. 2. Для установления строения трех больших пептидов, Т-6, Т-8 и Т-(13+14), потребовался дополнительный ферментативный гидролиз. Результаты гидролиза и полная аминокислотная последовательность перечисленных пептидов приведены в табл. 3-5.

Таким образом, из триптического гидролизата леггемоглобина I было выделено 14 пептидов. Пептиды Т-1 и Т-4, занимающие в аминокислотной последовательности белка позиции 1-12 и 29-41 соответственно, как это выяснилось в последующем при реконструкции его полипептидной цепи, выделить не удалось. Структура и положение первого пептида были определены путем прямого анализа N-концевой последовательности шпиктальной цепи белка с помощью секвенатора, когда была четко определена последовательность 24 аминокислотных остатков [3], включающая пептид Т-1 (Gly-Val-Leu-Thr-Asp-Val-Gln-Val-Ala-Leu-Val-Lys). Это дало возможность расставить пептиды Т-1 и Т-2 в нужной последовательности.

Пептид Т-4 был локализован следующим образом. Вначале белок обрабатывали янтарным ангидридом, после чего подвергали кратковременному гидролизу трипсином по единственному остатку аргинина при соотноше-

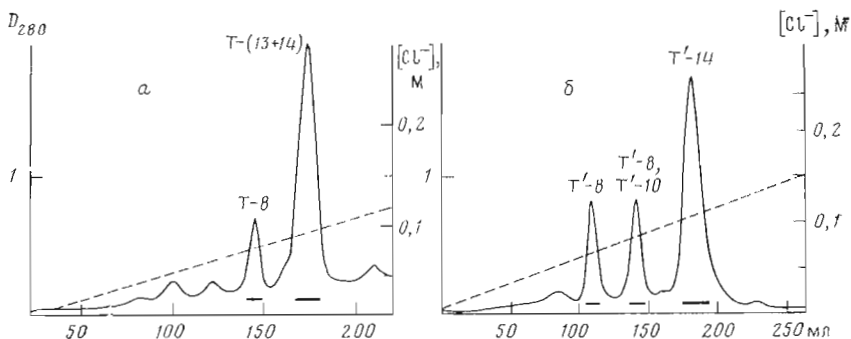


Рис. 2. Разделение нерастворимых триптических пептидов леггемоглобинов I (а) и II (б) на DEAE-целлюлозе

нии фермента к субстрату 1:150. Образовавшуюся смесь двух фрагментов без разделения подвергали деградации по Эдману с помощью секвенатора (см. схему). Таким путем удалось найти положение пептида Т-4, установить его структуру (Phe-Phe-Thr-Leu-Val-Leu-Glu-Ile-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys), а также проанализировать аминокислотную последовательность фрагмента 28—153 вплоть до 58-го остатка (всего 30 остатков), благодаря чему был определен порядок расположения пептидов Т-4, Т-5 и Т-6 в полипептидной цепи белка.

Ранее было показано, что леггемоглобины I и II весьма близки друг другу по аминокислотному составу и незначительно различаются по аминокислотной последовательности [1, 2]. Как и ожидалось, при гидролизе леггемоглобина II трипсином был получен набор пептидов, сходный с набором пептидов триптического гидролизата леггемоглобина I.

Гидролиз, выделение и очистку пептидов леггемоглобина II проводили так же, как описано выше для леггемоглобина I. На рис. 1б и 2б приведены кривые разделения смеси пептидов, а в табл. 6—10 — аминокислотный состав и структура выделенных пептидов. Из растворимой части гидролизата было выделено 12 пептидов (табл. 6, 7), из нерастворимой части — два пептида (табл. 6). Как и в случае леггемоглобина I, для установления структуры пептидов Т'-6, Т'-8 и Т'-14 потребовался дополнительный энзиматический гидролиз (табл. 8—10).

В случае леггемоглобина I не удалось выделить только пептид Т'-4. Его структура была определена путем специфического гидролиза белка трипсином по единственному остатку Arg²⁸ (см. выше) с последующим анализом аминокислотной последовательности образовавшегося фрагмента 28—153, который начинается с пептида Т'-4 (Phe-Phe-Ile-Leu-Val-Leu-Gln-Ile-Ala-Pro-Ala-Ala-Lys). Всего проанализировано 43 остатка, начиная с остатка Phe²⁹, что дало возможность одновременно определить и порядок чередования триптических пептидов Т'-4, Т'-5, Т'-6, Т'-7 и Т'-8.

Сравнение структуры триптических пептидов леггемоглобинов I и II показывает, что четыре пептида (Т'-5, Т'-7, Т'-11, Т'-12) одинаковы в обоих белках, а остальные различаются заменой от одной до четырех аминокислотных остатков. Кроме того, леггемоглобин II содержит в своем составе на один остаток лизина меньше, в результате чего в продуктах его триптического гидролиза обнаруживается на один пептид меньше. Как выяснилось в последующих исследованиях (см. ниже), замена остатка Lys¹⁵⁰ в леггемоглобине I на остаток Asp¹⁵⁰ в леггемоглобине II приводит к образованию пептида Т'-16, который является С-концевым в полипептидной цепи белка.

В результате изучения продуктов исчерпывающего и специфического гидролиза леггемоглобинов I и II трипсином и анализа их N-концевой последовательности удалось расставить в нужной последовательности 5 пеп-

Аминокислотный состав триптических пептидов леггемоглобина I*

Аминокислота	Растворимые пептиды													Нерастворимые пептиды	
	T-2	T-3	T-5	T-6	T-7	T-9	T-10	T-11	T-12	T-13	T-15	T-16	T-17	T-8	T-(13+14)
Asp	1,99(2)	0,91(1)	1,12(1)	2,98(3)	-	-	1,02(1)	-	-	1,02(1)	-	-	1,00(1)	1,98(2)	3,11(3)
Thr	-	0,82(1)	0,16	-	-	-	-	-	0,85(1)	-	-	-	-	1,76(2)	1,81(2)
Ser	1,94(2)	-	1,12(1)	1,93(2)	0,15	3,09(3)	-	-	-	-	-	-	-	1,06(1)	1,33(1)
Glu	2,20(2)	0,15	-	3,16(3)	0,14	-	-	1,04(1)	-	1,04(1)	-	1,12(1)	-	2,97(3)	4,12(4)
Pro	0,96(1)	-	-	2,01(2)	-	-	1,02(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gly	0,27	0,27	0,21	2,04(2)	0,18	1,18(1)	1,05(1)	-	-	1,04(1)	-	0,17	-	1,05(1)	1,03(1)
Ala	1,14(1)	0,12	0,25	2,11(2)	-	1,81(2)	1,04(1)	1,03(1)	-	0,17	-	0,22	2,00(2)	5,31(5)	2,76(3)
Val**	-	-	-	1,06(1)	1,02(1)	-	3,88(4)	-	-	1,81(2)	-	-	-	1,95(2)	1,62(2)
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,81(1)	-	-	-
Ile**	0,88(1)	-	-	-	-	-	-	0,92(1)	1,06(1)	-	-	-	-	0,83(1)	3,47(4)
Leu	-	-	1,89(2)	1,01(1)	-	0,95(1)	-	0,94(1)	-	-	-	-	-	3,18(3)	1,67(2)
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97(1)	0,78(1)
Phe	1,78(2)	-	1,74(2)	-	1,00(1)	-	0,96(1)	-	-	-	-	-	-	0,53	-
His	-	1,18(1)	-	0,89(1)	-	0,90(1)	1,02(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	1,06(1)	0,24	1,10(1)	1,00(1)	0,97(1)	1,07(1)	1,02(1)	1,00(1)	1,08(1)	0,91(1)	1,00(1)	1,07(1)	-	1,05(1)	1,85(2)
Arg	-	1,07(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(2)
Число остатков	12	4	7	18	3	9	11	5	3	6	1	3	3	22	27
Выход, %	21	5	6	48	22	29	26	43	29	21	12	38	24	30	40

* Примеси ниже 10% в состав пептидов не включены. ** Для расчета использовали данные 96-часового гидролиза. ** Определили качественно с помощью реактива Эрлиха.

Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролиза леггемоглобина I

Пептид	Аминокислотная последовательность *
T-2	Ser-Ser-Phe-Glu-Glu-Phe-Asn-Ala-Asn-Ile-Pro-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-3	Asn-Thr-His-Arg $\xrightarrow{\quad}$
T-5	Asp-Leu-Phe-Ser-Phe-Leu-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-7	Val-Phe-Lys $\xrightarrow{\quad}$
T-9	Ser-Leu-Gly-Ser-Val-His-Val-Ser-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-10	Gly-Val-Val-Asp-Ala-His-Phe-Pro-Val-Val-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-11	Glu-Ala-Ile-Leu-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-12	Thr-Ile-Lys $\xrightarrow{\quad}$
T-13	Glu-Val-Val-Gly-Asp-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-15	Lys
T-16	Glu-Met-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
T-17	Asp-Ala-Ala $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$

* Здесь и далее стрелками показаны стадии деградации пептидов по методу Эдмана с идентификацией Pth- (\rightarrow) и Dns- (\sim) производных аминокислот.

Аминокислотная последовательность пептидов термолитического гидролиза пептида T-6

Пептид	Аминокислотная последовательность
Gh-(T-6)-1	Gly-Ser-Ser-Glu-Val-Pro-Gln-Asn-Asx-Pro-Asx $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
Th-(T-6)-2	Leu-Gln $\xrightarrow{\quad}$
Th-(T-6)-3	Ala-His $\xrightarrow{\quad}$
Th-(T-6)-4	Ala-Gly-Lys $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
Строение пептида T-6	Gly-Ser-Ser-Glu-Val-Pro-Gln-Asn-Asn*-Pro-Asp*-Leu-Gln-Ala-His-Ala-Gly-Lys

* Доказано путем анализа на секвенаторе фрагмента белка, полученного при специфическом гидролизе леггемоглобина I по остатку аргинина (см. текст).

тидов для леггемоглобина I (T-1 (1-12), T-2 (13-24), T-4 (29-41), T-5 (42-48) и T-6 (49-55)) и 8 пептидов для леггемоглобина II (T'-1 (1-12), T'-2 (13-24), T'-3 (25-28), T'-4 (29-41), T'-5 (42-48), T'-6 (49-66), T'-7 (67-69) и T'-8 (70-91)) (схема).

Очевидно, что для определения порядка расположения остальных триптических пептидов этих белков необходим другой тип фрагментации их полипептидных цепей. Предварительные опыты по расщеплению бромцианом показали, что единственный остаток метионина в каждом из этих

Таблица 4
Аминокислотная последовательность пептидов химотриптического гидролиза пептида Т-8

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-(Т-8)-1	Leu-Thr-Tyr- →
C-(Т-8)-2	Glu-Ala-Ala-Ile-Gln-Leu →
C-(Т-8)-3	Glu-Val-Asn-Gly-Ala-Val-Ala-Ser-Asp-Ala-Thr-Leu → → → → → → → → → → → → →
C-(Т-8)-4	Glu-Val-Asn-Gly-Ala-Val-Ala-Ser-Asp-Ala-Thr-Leu-Lys → → → → → → → → → → → → →
C-(Т-8)-5	Leu-Thr-Tyr-Glu-Ala-Ala-Ile-Gln-Leu-Glu-Val-Ala-Ser-Asp-Ala-Thr-Leu-Lys → → → → → → → → → → → → →

Таблица 5
Аминокислотная последовательность пептидов химотриптического гидролиза пептида Т-(13+14)

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-[Т-(13+14)]-1	Gly-Val-Val-Gly-Asp-Lys-Trp → → → → → → →
C-[Т-(13+14)]-2	Ser-Glu-Gln-Leu-Asn-Thr-Ala-Trp → → → → → → → → → → →
C-[Т-(13+14)]-3	Thr-Ile-Ala-Tyr → → → →
C-[Т-(13+14)]-4	Asp-Glu-Leu → → →
C-[Т-(13+14)]-5	Ala-Ile-Ile-Ile-Lys → → → → →
Строение пептида Т-(13+14)	Glu-Val-Val-Gly-Asp-Lys-Trp-Ser-Glu-Gln-Leu-Asn-Thr-Ala-Trp-Thr-Ile-Ala-Tyr-Asp-Glu-Leu-Ala-Ile-Ile-Ile-Lys →

Аминокислотный состав триптических пептидов леггемоглобина II *

Аминокислота	Растворимые пептиды														Нерастворимые пептиды	
	T-1	T-2	T-3	T-5	T-6	T-7	T-9	T-10	T-11	T-12	T-13	T-15	T-16	T-8	T-14	
Asp	-	2,00(2)	-	1,03(1)	2,07(2)	-	1,01(1)	1,16(1)	-	-	-	0,11	2,01(2)	1,36(1)	1,84(2)	
Thr	0,92(1)	-	0,89(1)	-	0,98(1)	-	-	-	-	0,89(1)	-	-	-	2,35(2)	0,85(1)	
Ser	0,94(1)	1,76(2)	-	1,08(1)	1,13(1)	-	1,94(2)	0,14	0,12	-	-	0,17	-	1,13(1)	1,73(2)	
Glu	2,09(2)	1,94(2)	-	-	3,70(4)	-	-	0,14	1,10(1)	-	1,00(1)	0,17	1,00(1)	3,03(3)	3,24(3)	
Pro	-	0,95(1)	-	-	1,93(2)	-	-	1,01(1)	-	-	-	-	-	-	-	
Gly	1,14(1)	0,22	-	-	2,18(2)	-	0,99(1)	1,21(1)	0,12	-	0,97(1)	0,22	-	1,79(2)	-	
Ala	2,76(3)	0,98(1)	-	-	1,78(2)	-	-	1,81(2)	0,94(1)	-	0,99(1)	-	1,51(2)	2,81(3)	2,88(3)	
Val	0,97(1)	-	-	-	1,10(1)	0,89(1)	1,89(2)	2,40(3)	-	-	1,08(1)	-	0,88(1)	3,89(5)	0,96(1)	
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	0,95(1)	-	-	-	-	-	-	
Ile	-	0,85(1)	-	-	-	-	-	-	0,94(1)	1,01(1)	-	-	-	0,86(1)	1,85(3)	
Leu	1,97(2)	-	-	1,83(2)	0,90(1)	-	1,01(1)	-	-	-	-	-	-	2,38(2)	-	
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75(1)	
Phe	-	0,82(1)	-	1,80(2)	-	0,96(1)	-	1,00(1)	-	-	-	-	-	-	-	
His	-	-	1,68(2)	-	-	-	0,69(1)	1,01(1)	-	-	-	-	-	-	-	
Lys	1,02(1)	1,05(1)	-	1,08(1)	1,02(1)	1,15(1)	0,99(1)	1,00(1)	1,07(1)	1,10(1)	1,04(1)	1,00(1)	-	1,25(1)	0,78(1)	
Arg	-	-	1,08(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Грр	-	(1)	-	-	-	3	-	-	5	3	6	-	-	-	(2)	
Число остатков	12	12	4	7	18	3	9	11	5	3	6	1	6	22	21	
Выход, %	30	19	5	19	18	6	54	29	25	33	47	25	20	30	30	

* Прямеси ниже 10% в состав пептидов не включены.

Аминокислотная последовательность пептидов триптического гидролиза леггемоглобина II

Пептид	Аминокислотная последовательность
T'-1	Gly-Ala-Leu-Thr-Glu-Ser-Gln-Ala-Ala-Leu-Val-Lys → → → → → → → → → → →
T'-2	Ser-Ser-Trp-Glu-Glu-Phe-Asn-Ala-Asn-Ile-Pro-Lys → → → → → → → → → → →
T'-3	His-Thr-His-Arg → → →
T'-5	Asp-Leu-Phe-Ser-Phe-Leu-Lys → → → → → →
T'-7	Val-Phe-Lys → →
T'-9	Asn-Leu-Gly-Ser-Val-His-Val-Ser-Lys → → → → → → →
T'-10	Gly-Val-Ala-Asp-Ala-His-Phe-Pro-Val-Val-Lys → → → → → → → → →
T'-11	Glu-Ala-Ile-Leu-Lys → → → →
T'-12	Thr-Ile-Lys → →
T'-13	Glu-Val-Val-Gly-Ala-Lys → → → → →
T'-15	Lys →
T'-16	Glu-Met-Asp-Asp-Ala-Ala → → → → →

Таблица 8

Аминокислотная последовательность пептидов термолитического гидролиза пептида T'-6

Пептид	Аминокислотная последовательность
Th'(T'-6)-1	Gly-Thr-Ser-Glu-Val-Pro-Gln-Asn-Asx-Pro-Glx → → → → → → → → → → →
Th'(T'-6)-2	Leu-Gln → →
Th'(T'-6)-3	Ala-His → →
Th'(T'-6)-4	Ala-Gly-Lys → → →
Строение пептида T'-6	Gly-Thr-Ser-Glu-Val-Pro-Gln-Asn-Asn *-Pro-Asp *-Leu-Gln *-Ala-His-Ala-Gly-Lys

* Доказано путем анализа на секвенаторе фрагмента белка, полученного при специфическом гидролизе леггемоглобина II по остатку аргинина (см. текст).

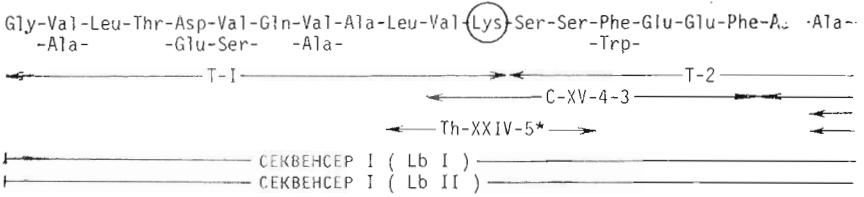
белков находится, вероятно, вблизи С-конца цепи, так как в продуктах их расщепления кроме большого N-концевого фрагмента в каждом случае обнаруживается по одному короткому пептиду следующего строения:

LbI : Lys-Asp-Ala-Ala

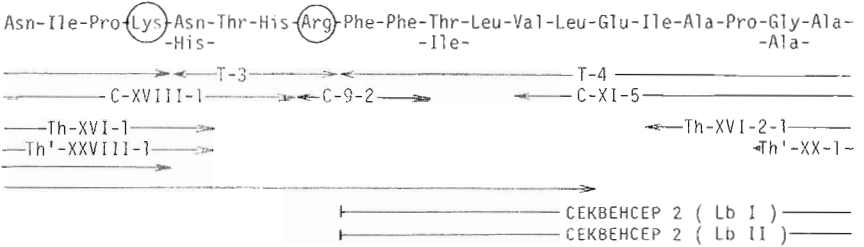
LbII : Asp-Asp-Ala-Ala

В связи с этим был предпринят гидролиз леггемоглобина I химотрипсином. Кривая разделения химотриптических пептидов на катионите аминокс А-6 показана на рис. 3. После очистки хроматографией и электрофорезом на бумаге удалось выделить в гомогенном состоянии 20 пептидов.

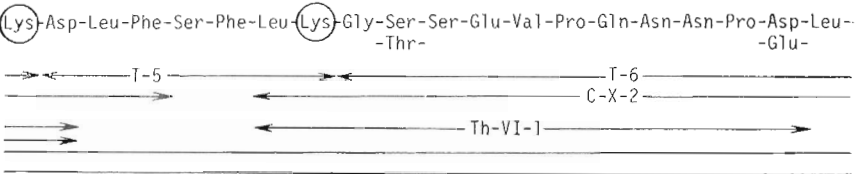
I



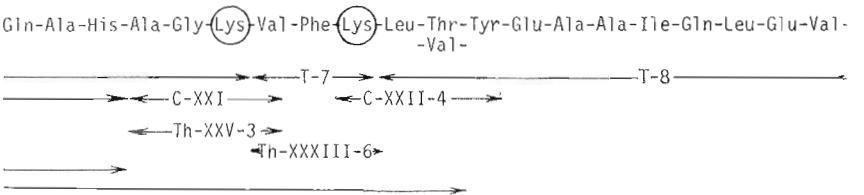
2I



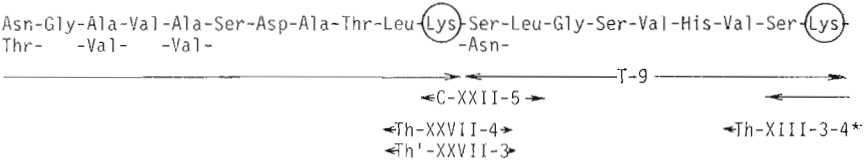
4I



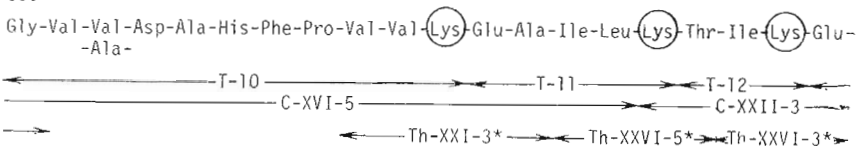
6I



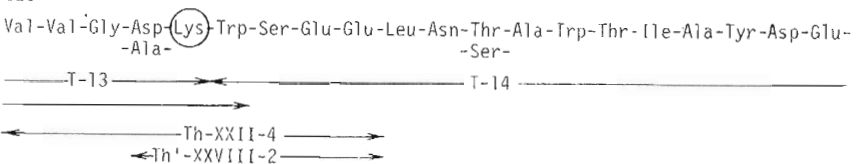
8I

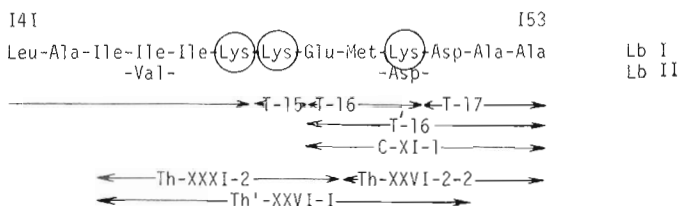


10I



12I





Полная аминокислотная последовательность леггемоглобинов I и II. T, C, Th — пептиды, относящиеся к LbI; Th' — пептиды, относящиеся к LbII; Th* — пептиды, относящиеся к обоим леггемоглобинам. Секвенатор I — результаты анализа N-концевой последовательности полипептидных цепей LbI и LbII на секвенаторе, секвенатор II — после специфического гидролиза по остатку Arg²⁸

Структуру пептидов, перечисленных в табл. 11, определяли деградацией по Эдману. Структура остальных пептидов определялась как описано ниже.

Пептид C-I: Glu-Val-Asn-Gly-(Ala, Val, Ser, Asp, Ala)-Thr-Leu. Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Pth-производных аминокислот была найдена N-концевая аминокислотная последовательность этого пептида. Карбоксипептидаза А отщепляет за 4 ч 100% лейцина, 98% треонина. Полученные результаты по определению частичной структуры пептида и данные аминокислотного анализа показали, что пептид C-1 является частью триптического пептида T-8 и совпадает с пептидом, полученным ранее при химотриптическом гидролизе пептида T-8.

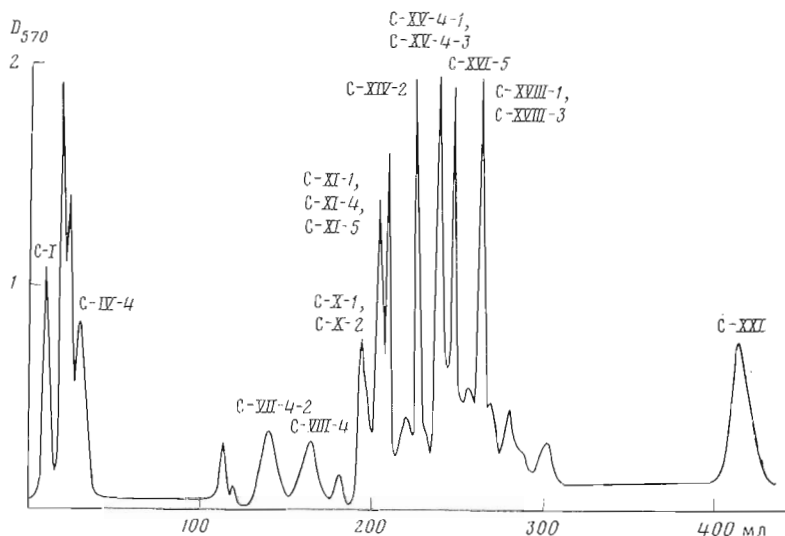


Рис. 3. Разделение химотриптических пептидов леггемоглобина I на катионите аминокс А-6

Пептид C-X-1: Lys-Gly-Ser-Ser-Glu-Val-Pro-(Glx, Asx, Asx, Pro, Asx, Leu, Glx, Ala, His). Данные аминокислотного анализа и определение N-концевой аминокислотной последовательности по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот показали, что пептид C-X-1 является частью триптического пептида T-6 (49—66), причем с N-конца пептид увеличен по сравнению с триптическим пептидом на одну аминокислоту — лизин.

Пептид C-X-2: Leu-Lys-Gly-Ser-Ser-Glx-Val-Pro-(Glx, Asx, Asx, Pro, Asx, Leu, Glx, Ala, His). Определение N-концевой последовательности и данные аминокислотного анализа показали, что пептид C-X-2 отличается от пептида C-X-1 на одну аминокислоту — N-концевой лейцин.

Пептид C-XI-5: Val-Leu-Glu-Ile-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Asp-Leu-Phe. Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Pth- и Dns-производных

Аминокислотная последовательность пептидов химогритрического гидролиза пептида Т-8

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-(Т'-8)-1	Leu-Val-Tyr →
C-(Т'-8)-2	Glu-Ala-Ala-Ile-Gln-Leu →
C-(Т'-8)-3	Glu-Val-Thr-Gly-Val-Val-Val-Ser-Asp-Ala-Thr-Leu →
C-(Т'-8)-4	→ → → → → → → → → → → →
C-(Т'-8)-5	Glu-Val-Thr-Gly-Val-Val-Val-Ser-Asp-Ala-Thr-Leu-Lys →
Строение пептида Т'-8	Leu-Val-Tyr-Glu-Ala-Ile-Gln-Leu-Glu-Val-Thr-Gly-Val-Val-Ser-Asp-Ala-Thr-Leu-Lys

Аминокислотная последовательность пептидов химогритрического гидролиза пептида Т'-14

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-(Т-14)-1	Trp
C-(Т-14)-2	Ser-Glu-Glu-Leu-Asn-Ser-Ala-Trp →
C-(Т-14)-3	Thr-Ile-Ala-Tyr →
C-(Т-14)-4	Asp-Glu-Leu →
C-(Т-14)-5	Ala-Ile-Val-Ile-Lys →
Строение пептида Т'-14	Trp-Ser-Glu-Glu-Leu-Asn-Ser-Ala-Trp-Thr-Ile-Ala-Tyr-Asp-Glu-Leu-Ala-Ile-Val-Ile-Lys

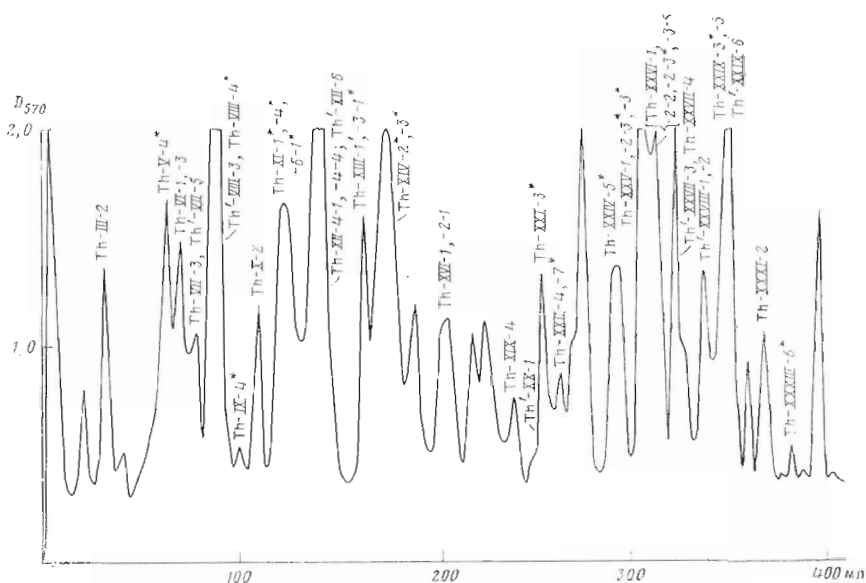


Рис. 4. Разделение термолитических пептидов смеси леггемоглобинов I (Th) и II (Th') на катионите аминокислот Л-6 (* — пептиды, относящиеся к обоим компонентам смеси)

аминокислот была установлена N-концевая последовательность, включающая 9 остатков. Карбоксипептидаза А (2 ч, 37°С) отщепляет с С-конца пептида 100% фенилаланина, 97% лейцина. На смеси пептидов, полученных после расщепления пептида С-ХI-5 трипсином, было пройдено три шага по методу Эдмана, что дало возможность установить полное строение пептида.

Таблица 11

Аминокислотная последовательность пептидов
химотриптического гидролиза леггемоглобина I

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-III-3	Glu-Ala-Ala-Ile-Gln → → → →
C-IV-4	Glu-Ala-Ala-Ile-Gln-Leu → → → → →
C-VII-4-2	Thr-Ile-Ala-Tyr-Asp-Glu-Leu → → → → →
C-VIII-4	Ser-Glu-Glu-Leu-Asn-Thr-Ala-Trp → → → → →
C-XI-1	Glu-Met-Lys-Asp-Ala-Ala → → → →
C-XI-4	Glu-Ile-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Asp-Leu-Phe → → → → →
C-XIV-2	Lys-Asp-Ala-Ala → → →
C-XV-4-2	Thr-Tyr → →
C-XV-4-3	Val-Lys-Ser-Ser-Phe-Glu-Glu-Phe → → → → →
C-XVIII-1	Asn-Ala-Asn-Ile-Pro-Lys-Asn-Thr-His → → → → →
C-XVIII-3	Gly-Ser-Val-His-Val → → → →
C-XXI	Ala-Gly-Lys-Val → → →
C-XXII-3	Lys-Thr → →
C-XXII-4	Lys-Leu-Thr-Tyr → → → →
C-XXII-5	Lys-Ser-Leu → → →

Аминокислотная последовательность пептидов термолитического гидролиза смеси леггемоглобинов I и II

Пептид	Аминокислотная последовательность
Th-III-2	Leu-Thr-Asp-Val-Gln → → → → →
Th-V-4 *	Leu-Val-Leu-Glu → → → →
Th-VI-1	Leu-Lys-Gly-Ser-Ser-Glu-Val-Pro-Gln-Asn-Asn-Pro-Asp → → → → → → → → → → → →
Th-VI-3	Leu-Thr-Asp → → →
Th-VII-3	Val-Ala-Asp → → →
Th'-VII-5	Ile-Ala-Pro → → →
Th'-VIII-3	Val-Thr-Gly → → →
Th-VIII-4 *	Leu-Gly-Ser → → →
Th-IX-4 *	Ile-Ala-Tyr-Asp-Glu → → → → →
Th-X-2	Ser-Phe-Glu-Glu → → → →
Th-XI-1 *	Gly-Ala → →
Th-XI-4 *	Leu-Gln → →
Th-XI-6-1	Leu-Thr-Tyr-Glu → → → →
Th-XI-6-2 *	Val-Val-Gly → → →
Th-XII-4-1	Phe-Glu-Glu → → →
Th-XII-4-4	Gly-Val → →
Th'-XII-6	Leu-Thr-Glu → → →
Th-XIII-1 *	Phe-Asn → →
Th-XIII-3-1 *	Val-Ser-Lys-Gly → → → →
Th-XIV-2 *	Phe-Ser-Phe → → →
Th-XIV-3 *	Phe-Ser → →
Th-XVI-1	Ala-Asn-Ile-Pro-Lys-Asp → → → → →
Th-XVI-2-1	Ile-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Asp → → → → → →
Th-XIX-4	Val-Asp-Ala-His-Phe-Pro → → → → →
Th'-XX-1	Ala-Ala-Lys-Asp → → → →
Th-XXI-3 *	Val-Val-Lys-Glu-Ala → → → → →
Th-XXII-4	Val-Val-Gly-Asp-Lys-Trp-Ser-Glu-Glu → → → → → → → → →
Th-XXII-7 *	Ala-Trp-Thr → → →
Th-XXIV-5 *	Leu-Val-Lys-Ser-Ser → → → → →
Th'-XXV-1	Ala-Gly-Lys → → →
Th-XXV-2-3 *	Ala-His → →
Th-XXV-3 *	Ala-Gly-Lys-Val → → → →
Th-XXVI-2-2	Met-Lys-Asp → → →
Th-XXVI-2-3 *	Val-Lys-Ser-Ser → → → →

Пептид	Аминокислотная последовательность
Th-XXVI-3 *	Ile-Lys-Glu → → →
Th-XXVI-5 *	Ile-Leu-Lys-Thr → → →
Th'-XXVII-3	Leu-Lys-Asn → → →
Th-XXVII-4	Leu-Lys-Ser → → →
Th'-XXVIII-1	Ala-Asn-Ile-Pro-Lys-His → → → → →
Th'-XXVIII-2	Ala-Lys-Trp-Ser-Glu-Glu → → → → →
Th-XXIX-3 *	Leu-Lys-Gly → → →
Th-XXIX-5 *	Val-Val-Gly-Asp-Lys → → → → →
Th'-XXIX-6	Ala-His-Phe-Pro → → →
Th-XXXI-2	Ile-Ile-Ile-Lys-Lys-Glu → → → → →
Th-XXXIII-6 *	Val-Phe-Lys → → →

* Пептиды, относящиеся к обоим компонентам леггемоглобина.

Пептид C-XVI-5: Ser-Lys-Gly-Val-Val-Asp-Ala-His-Phe-Pro-Val-Val-Lys-Glu-Ala-Ile-Leu. Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Pth- и Dns-производных аминокислот было пройдено 13 шагов. Карбоксипептидаза А (4 ч, 37° С) отщепляет с С-конца пептида 100% лейцина, 95% изолейцина. На смеси пептидов, полученных после расщепления C-XVI-5 трипсином, было пройдено три шага по методу Эдмана, что дало возможность установить полное строение пептида.

Таким образом, химотриптические пептиды дополнительно к предыдущим исследованиям позволили расставить большинство триптических пептидов леггемоглобина I (схема). Не строго доказанным осталось расположение в пептидной цепи пептидов Т-3 (25—28), Т-9 (92—100), Т-15 (147) и Т-4 (29—41), хотя последний, вероятнее всего, следует за пептидом Т-3, как и в леггемоглобине II, где этот участок полипептидной цепи проанализирован с помощью секвенатора (см. схему). Дополнительным аргументом в пользу этого служит целенаправленное выделение из продуктов химотриптического гидролизата леггемоглобина I аргининсодержащих пептидов следующего строения: Arg-Phe (С-9-1) и Arg-Phe-Phe (С-9-2). По-видимому, в силу основного и гидрофобного характера этих пептидов они не были выделены при разделении химотриптического гидролизата леггемоглобина I на колонке. Их удалось выделить путем хроматографии и электрофореза на бумаге с идентификацией с помощью цветной реакции по Сакагучи.

Судя по структуре триптических пептидов леггемоглобина II, которые в большинстве мало отличаются от соответствующих пептидов леггемоглобина I, гидролиз леггемоглобина II мог дать мало информации для реконструкции его полипептидной цепи. Поэтому, учитывая сходство этих белков, нами был предпринят гидролиз смеси леггемоглобинов термолизинном. Продукты гидролиза, как и в предыдущих случаях, разделяли на аминексе А-6 с помощью летучих пиридин-ацетатных буферов (рис. 4). В результате последующей очистки полученных фракций хроматографией и электрофорезом на бумаге удалось выделить 45 пептидов, структура которых приведена в табл. 12. С помощью этих пептидов удалось выяснить последовательность пептидов Т-3 (25—28), Т-9 (92—100), Т-15 (147) и Т-4 (29—

44) в случае леггемоглобина I и пептидов Т-9 (92—100), Т-10 (101—111), Т-11 (112—116), Т-12 (117—119), Т-13 (120—125), Т-14 (126—146), Т-15 (147) и Т-16 (148—153) в случае леггемоглобина II и окончательно реконструировать полипептидные цепи обоих белков (схема).

Как видно из схемы, оба компонента леггемоглобина желтого люпина состоят из 153 аминокислотных остатков и отличаются друг от друга заменой 20 остатков. Эти замены, по всей вероятности, не затрагивают существенных аминокислот и аминокислот, взаимодействующих с гемом.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсиц, химотрипсиц, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), аминекс А-6 (Bio-Rad, США), анионообменную целлюлозу DE-32 (Whatman, Англия), трис-НСl (Koch-Light, Англия), уксусную кислоту, пиридин, *n*-бутанол, хлористый натрий марки х.ч. Мочевину предварительно деионизовали на смешанном катионите AG 501-X8 (D) (Bio-Rad, США), все растворители перегоняли непосредственно перед использованием.

Получение глобина. Выделение леггемоглобинов I и II и отделение гема описано в предыдущей работе [3].

Гидролиз леггемоглобинов I и II трипсином. Раствор, содержащий 16 мг лиофилизованного препарата белка, переносили в термостатированную ячейку и денатурировали нагреванием при 90° С в течение 5 мин, рН 8. Затем ячейку немедленно охлаждали и термостатировали при 37° С. Гидролиз вели на автотитраторе в атмосфере азота при рН 8,3 в присутствии 0,16 мг трипсина, поддерживая рН среды 2% раствором триэтиламина. Через 5 ч после начала опыта негидролизированный белок отделяли центрифугированием и отбрасывали, раствор подкисляли 1 н. НСl до рН 4,5. Образовавшийся при подкислении осадок, содержащий нерастворимые пептиды, отделяли центрифугированием и промывали 3 раза по 2 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 4,5. Объединенную надосадочную жидкость лиофилизовали (фракция растворимых пептидов).

Разделение растворимых триптических пептидов. Растворимую фракцию триптического гидролизата леггемоглобинов I и II разделяли на аминекс А-6 с размером зерна 17,5 мкм. Колонку (0,6×60 см), термостатированную при 40° С, заполняли смолой, уравновешенной 0,2 М пиридин-ацетатным буфером, рН 3,1 (буфер А). Лиофилизованный препарат триптического гидролизата растворяли в 1 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 2,5, и наносили на колонку под давлением азота. Элюирование проводили со скоростью 10 мл/ч с помощью насоса МЦ-300 (Ково, СССР) при давлении 10—12 кг/см². Через 3 ч после начала опыта элюирование продолжали с помощью экспоненциального градиента рН и концентрации пиридина. Для этого в смеситель, снабженный магнитной мешалкой, помещали 35 мл буфера А, куда подавали буфер В (0,5 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0) — градиент I. Через 6 ч буфер В заменяли на буфер В (2,0 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0) — градиент II — и продолжали элюирование еще в течение 15 ч. Затем через колонку пропускали только буфер В и окончательно колонку промывали 1 М NH₄ОН. Собирали фракции объемом 1 мл. Для обнаружения пептидов использовали автоматический анализатор (Technicon, США), приспособленный для проведения нингидринной реакции с отбором пробы для анализа объемом 25 мкл. По данным такого анализа фракции объединяли и упаривали на роторном испарителе. Для оценки состава объединенных фракций ¹/₁₀₀ часть каждой фракции хроматографировали в тонком слое целлюлозы в системе I (*n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 5 : 3 : 10 : 12). Хроматограммы проявляли 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

Таким же образом разделяли растворимые триптические пептиды леггемоглобина II. Окончательно пептиды очищали с помощью нисходящей

хроматографии на бумаге Ватман 3М в течение 18 ч в системе I. Детекцию пептидов на бумаге проводили с помощью нингидриной реакции.

Разделение и очистка нерастворимых триптических пептидов. Нерастворимую часть триптического гидролизата леггемоглобина растворяли в 0,5 М трис-НСI-буфере, рН 8,4, в 8 М мочевице и разделяли на анионообменной целлюлозе DE-32. Колонку (1,5×20 см) заполняли целлюлозой, уравновешенной 0,005 М трис-НСI-буфером, рН 8,4, в 8 М мочевице. Элюирование проводили со скоростью 20 мл/ч. Через 1 ч элюирование осуществляли с помощью линейного градиента хлористого натрия с увеличением молярности последнего до 0,3 М (объем камер по 125 мл). Обнаружение пептидов осуществляли с помощью ультрафиолетового детектора Uvicord II (LKB, Швеция) при длине волны 280 нм. Собирали фракции объемом 2 мл. Затем фракции объединяли, обессоливали путем гель-фильтрации на сефадекс G-25 (тонкий) в 0,5 М водном аммиаке и упаривали на роторном испарителе.

Таким же образом разделяли нерастворимые триптические пептиды леггемоглобина II.

Специфический гидролиз леггемоглобинов I и II трипсином по остатку аргинина. Белок (5 мг) суспензировали в 1 мл 1 М натрий-фосфатного буфера, рН 9,0, после чего добавляли сухой хлоргидрат гуанидина до растворения белка. Затем к полученному раствору небольшими порциями при перемешивании добавляли янтарный ангидрид (100-кратный избыток по отношению ко всем аминок группам белка), поддерживая рН среды около 9 на рН-стате 1 н. NaOH. Затем избыток реагента и низкомолекулярные продукты реакции отделяли гель-фильтрацией на колонке размером 1×45 см с сефадексом G-25 (тонкий). Элюирование вели аммиачной водой (рН 8), выделенный белок лиофилизировали. Затем его растворяли в воде, доведя рН среды до 8,3 триэтиламино, и после добавления трипсина (соотношение фермент — субстрат 1 : 150) поддерживали рН среды на рН-стате 2% раствором триэтиламина. Гидролиз вели при 37° С в течение 90 мин. По окончании гидролиза смесь лиофилизировали, растворяли в 0,3 мл воды, отбирали аликвоту для аминокислотного анализа с целью определения количества белка и подвергали деградации по Эдману на секвенаторе модели 890 С (Beckman, США) по стандартной белковой программе 072172. Тиазолиновые производные после каждого цикла отщепления превращали в соответствующие фенилтиогидантоины, выдерживая 10 мин при 80° С в 1 н. растворе HCl, содержащей 0,1% дитиотреита. Идентификацию Pth-аминокислот осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии [4], масс-спектрометрии [5], а также путем аминокислотного анализа после гидролиза Pth-аминокислот III до свободных аминокислот [6].

Гидролиз леггемоглобина I химотрипсином. Раствор, содержащий 16 мг лиофилизованного препарата белка, переносили в термостатированную ячейку. Перед добавлением химотрипсина белок денатурировали нагреванием при 90° С в течение 5 мин. Затем ячейку немедленно охлаждали и термостатировали при 37° С. Гидролиз вели на автотитраторе в атмосфере азота при рН 8,3 в присутствии 0,32 мг химотрипсина, поддерживая рН среды 2% раствором триэтиламина. Через 5 ч после начала опыта гидролиз останавливали, подкисляя среду 1 н. HCl до рН 2,5. Раствор лиофилизировали.

Разделение химотриптических пептидов. Пептиды химотриптического гидролизата леггемоглобина I люпина разделяли на катионите аминокс А-6. Колонку (0,9×100 см) заполняли смолой при 40° С и уравновешивали 0,025 М пиридин-ацетатным буфером, рН 3,98. Лиофилизованый препарат химотриптического гидролизата растворяли в 1 мл 0,025 М пиридин-ацетатного буфера, рН 3,98, и наносили на колонку под давлением азота. Элюирование проводили со скоростью 40 мл/ч с помощью насоса МЦ-300 (Ково, ЧССР) при давлении 12–15 кг/см². Для разделения пептидов использовали экспоненциальный градиент пиридин-ацетатных буферов.

с помощью градиентного устройства, состоящего из трех сообщающихся цилиндров равного диаметра. Первый цилиндр заполняли 150 мл буфера А (0,05 М пиридин-ацетатный буфер, рН 3,98), а два последующих — буфером В (0,1 М пиридин-ацетатный буфер, рН 3,98) по 150 мл в каждый цилиндр. Таким путем получали первый тип градиента (градиент I). Через 9 ч после начала анализа буфер А заменяли на буфер В (200 мл), а во второй и третий цилиндры помещали по 200 мл буфера В (1,05 М пиридин-ацетатный буфер, рН 6,12) — градиент II — и продолжали элюирование еще 13,5 ч. Затем первый цилиндр заполняли 50 мл буфера В, а во второй и третий цилиндры добавляли по 50 мл буфера Г (2,1 М пиридин-ацетатный буфер, рН 6,12) — градиент III. Окончательно колонку промывали 1 л. NH_4OH . Собирали фракции объемом по 3 мл. Пептиды обнаруживали и очищали как описано выше.

Гидролиз леггемоглобина термוליзином. Раствор, содержащий 50 мг лиофилизованного препарата белка (смесь леггемоглобинов I и II), переносили в термостатированную ячейку и денатурировали нагреванием при 90°C в течение 5 мин. Затем ячейку немедленно охлаждали и термостатировали при 37°C . Гидролиз вели на автотитраторе в атмосфере азота при рН 8,3 в присутствии 0,75 мг термוליзина, поддерживая рН среды 2% раствором триэтиламина. Через 5 ч после начала опыта гидролиз останавливали подкислением среды до рН 2,5 1 л. HCl . Раствор лиофилизовали.

Разделение термолитических пептидов. Пептиды термолитического гидролизата леггемоглобина люпина разделяли на катионите аминекс А-6 на колонке (0,6×60 см), уравновешенной при 40°C 0,2 М пиридин-ацетатным буфером, рН 3,1 (буфер А). Лиофилизованный препарат термолитического гидролизата растворяли в 3 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, рН 2,5, и наносили на колонку под давлением азота. Элюирование проводили со скоростью 20 мл/ч с помощью насоса МЦ-300 (Ково, ЧССР) при давлении 12–15 кг/см². Через 2 ч после начала опыта элюирование продолжали с помощью экспоненциального градиента рН и концентрации пиридина. Для этого в смеситель, снабженный магнитной мешалкой, помещали 250 мл буфера А, куда подавали буфер В (0,5 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0) — градиент I. Через 7,5 ч буфер В заменяли на буфер В (2,0 М пиридин-ацетатный буфер, рН 5,0) — градиент II — и продолжали элюирование еще в течение 4,5 ч. Затем через колонку пропускали только буфер В и окончательно колонку промывали 1 л. NH_4OH . Пептиды обнаруживали и очищали как описано выше.

Аминокислотный анализ пептидов выполняли как описано в работе [7]. Обычно около 10 нмоль пептида гидролизовали 5,7 л. HCl в течение 24 и 96 ч при 110°C . Затем пробы упаривали, разбавляли 0,2 л. натрий-цитратным буфером, рН 2,2, центрифугировали и анализировали на модифицированном анализаторе типа 3201 (ЛКВ, Швеция) или на анализаторе типа D-500 (Dugum, США). Количество лейцина, изолейцина и валина определяли по данным 96-часового гидролиза. Триптофан определяли качественно с помощью реактива Эрлиха.

Определение структуры пептидов. Структуру пептидов определяли деградацией по модифицированному методу Эдмана [8], а в ряде случаев с помощью субстративного варианта этого метода с идентификацией N-концевой аминокислоты остаточного пептида в виде Dns-производного [9].

S-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и В. Для определения структуры больших пептидов последние дополнительно гидролизовали рядом ферментов.

Авторы выражают признательность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес и обсуждение результатов этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Ц. А., Фейгина М. Ю., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Миталева С. И., Овчинников Ю. А. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 125-128.
2. Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Фейгина М. Ю., Костецкий П. В. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 476-480.
3. Егоров Ц. А., Казаков В. К., Шахпаронов М. И., Краснобаева Н. Н., Кудрявцева Н. Н., Жизневская Г. Я. (1980) *Биоорганическая химия*, 6, 366-371.
4. Pataki G. (1964) *Chimia*, 18, 23-24.
5. Назимов И. В., Левина Н. Б., Богданова И. А., Розынов Б. В. (1977) *Биоорганическая химия*, 3, 192-199.
6. Inglis A. S., Nicholls P. W., Roxburgh C. M. (1971) *Austral. J. Biol. Sci.*, 24, 1247-1250.
7. Sprackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206.
8. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова П. А., Ляпкина В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, 38, 3-21.
9. Gray W. R. (1967) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XI, pp. 469-475, Acad. Press, N. Y.—London.

Поступила в редакцию
12.X.1979

AMINO ACID SEQUENCE OF LEGHEMOGLOBINS I AND II FROM YELLOW LUPIN

EGOROV Ts. A., KAZAKOV V. K., SHAKHPARONOV M. I., FEIGINA M. Yu.

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

The complete amino acid sequence of leghemoglobins I and II from the root nodules of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) was determined using fragmentation of the proteins with trypsin, chymotrypsin, or thermolysin followed by sequence analysis by manual and automatic techniques.