



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 * № 6 * 1980

УДК 547.962.02+577.158.45

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КУР

IV. СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ БРОМЦИАНОВОГО ГИДРОЛИЗАТА И ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

*Шляпников С. В., Мясников А. Н., Северин Е. С.,
Мягкова М. А., Демидкина Т. В., Торчинский Ю. М.,
Браунштейн А. Е.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Проведено расщепление цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур бромцианом. Одиннадцать индивидуальных пептидных фрагментов, выделенных комбинацией методов гель-фильтрации, препаративного электрофореза в поликариламидном геле, а также хроматографии и электрофореза на бумаге, охватывают в сумме всю полипептидную цепь белка. Анализ структуры бромциановых пептидов позволил завершить расшифровку аминокислотной последовательности аспартат-аминотрансферазы.

Стратегия проведенного нами исследования по расшифровке первичной структуры цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур, основанная в первом сообщении данной серии [1], сводилась главным образом к анализу пептидов, полученных при гидролизе белка стафилококковой протеазой и трипсином [2, 3]. Определение аминокислотной последовательности 46 триптических пептидов и 32 пептидов, выделенных при гидролизе стафилококковой протеазой, а также сравнение полученных данных со структурой гомологичной аспартат-аминотрансферазы из сердца свиньи [4, 5] позволяют реконструировать около 95% структуры полипептидной цепи изучаемого фермента. Неустановленной остается структура двух участков полипептидной цепи белка — 129—141 и 214—222 (см. схему). Кроме того,стыковка пептидных фрагментов в положениях 124—122, 166—167, 206—207, 246—247, 249—250, 320—321, 324—325 является не строго обоснованной, так как проводится только на основании гомологии первичных структур свиного и куриного изозимов. Цель настоящей работы — устранение перечисленных неопределенностей.

Согласно результатам аминокислотного анализа, изучаемый фермент содержит 10 остатков метионина [1]. Изучение структуры пептидов, полученных при гидролизе белка стафилококковой протеазой и трипсином [2, 3], позволило локализовать метиониновые остатки в следующих положениях:

* Здесь и далее номера остатков цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур даются согласно первичной структуре изофермента из сердца свиньи [4, 5]. Для обеспечения максимального соответствия первичных структур двух изозимов первому остатку аспартат-аминотрансферазы из сердца кур присвоен номер 2, а также постулирована делеция в положении 120 куриного фермента.

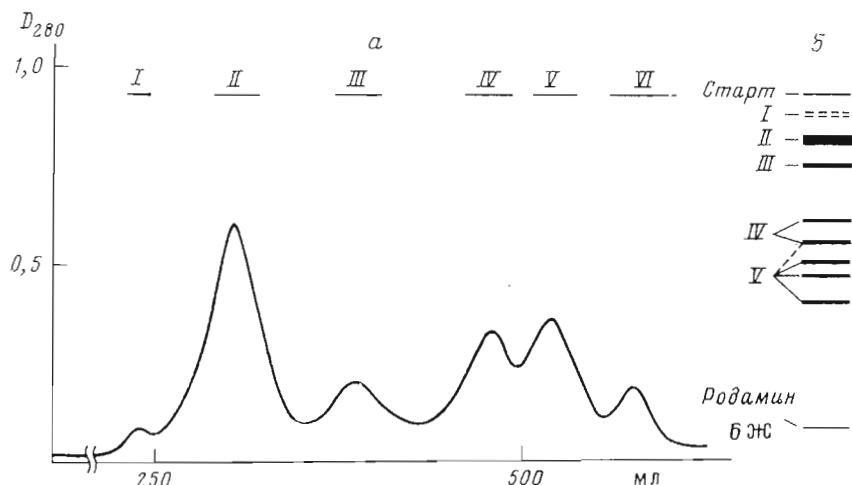


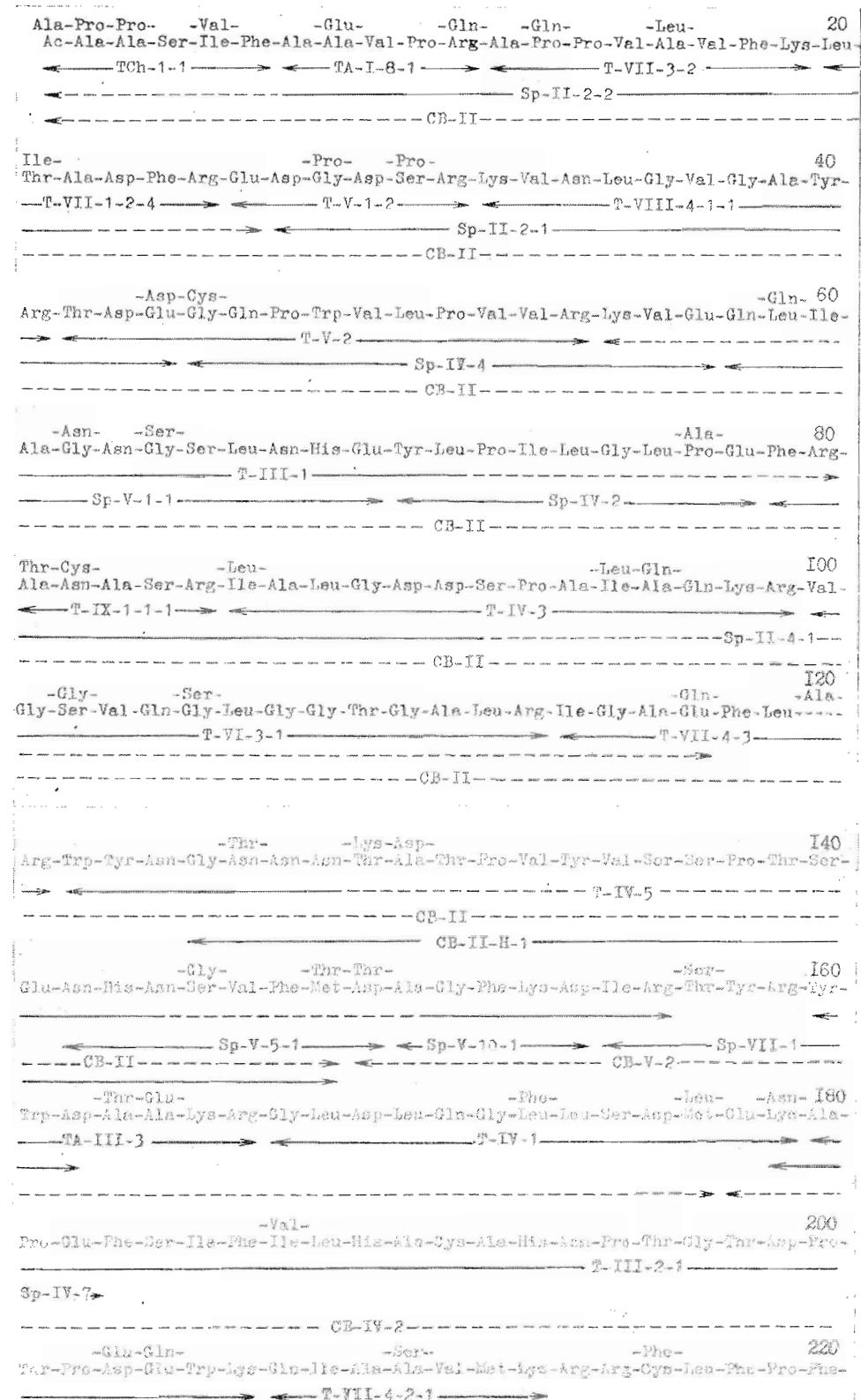
Рис. 1. Анализ смеси пептидов, полученных при расщеплении аспартат-аминотрансферазы бромцианом. *α* — хроматография на колонке (150×2 см) с сепадексом G-75 (сверхтонкий) при элюции 10% уксусной кислотой, содержащей 8 М мочевину, со скоростью 10 мл/ч; здесь и на рис. 2 показаны границы объединения фракций; *β* — разделение при электрофорезе в поликариламидном геле; указано положение на электрофотограмме фракций, полученных при гель-хроматографии

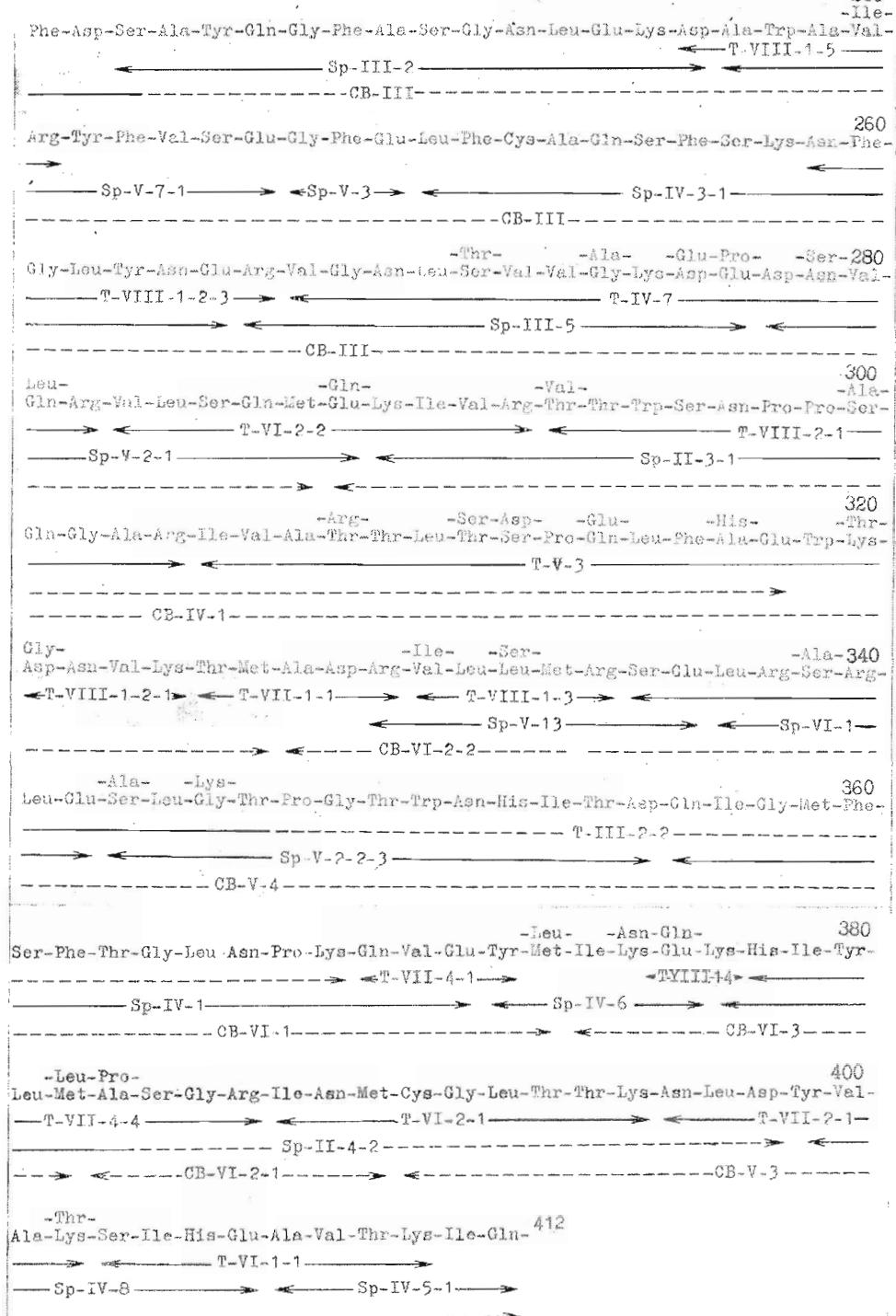
жениях полипептидной цепи фермента: 148, 177, 212, 287, 326, 333, 359, 373, 382 и 389. Отсюда логически вытекает тактика исследования перечисленных выше участков неустановленной структуры аспартат-аминотрансферазы из сердца кур. Действительно, расщепление бромцианом пептидной связи рядом с остатком метиоцина-148 должно приводить к образованию высокомолекулярного, блокированного по α -аминогруппе N-концевого остатка фрагмента, содержащего в C-концевой части искомый участок 129—141. Другой интересующий нас участок (214—222) оказывается N-концевым в 75-членном пептиде 213—287. Анализ других пептидов бромцианового гидролизата может обеспечить информацию, необходимую для объединения аминокислотных последовательностей пептидов других гидролизатов фермента и реконструкции полной первичной структуры белка. В целом, при гидролизе аспартат-аминотрансферазы из сердца кур бромцианом следует ожидать появления 11 существенно различающихся по размерам пептидов. Наиболее крупные из них — это отмеченные выше пептиды, состоящие из 146 и 75 аминокислотных остатков, далее идет серия пептидов с молекулярным весом около 3000—4500 и, наконец, четыре сравнительно коротких пептида, содержащих от 7 до 14 аминокислотных остатков.

Анализ состава бромцианового гидролизата белка определил схему выделения индивидуальных пептидов, которая включала: а) гель-фильтрацию исходной смеси пептидов для выделения наиболее крупных и представляющих наибольший интерес пептидов; б) препаративный электрофорез в поликариламидном геле для разделения пептидов среднего молекулярного веса; в) высоковольтный электрофорез и хроматографию на бумаге для получения гомогенных низкомолекулярных пептидов. На рис. 1 представлены результаты разделения бромцианового гидролизата на колонке с сепадексом G-75. На этом же рисунке приведены результаты аналитического электрофореза в поликариламидном геле исходного гидролизата и полученных при его разделении отдельных фракций.

Фракция I соответствует гетерогенная смесь высокомолекулярных продуктов неполного расщепления исходного субстрата.

Фракции II и III, по данным электрофореза в поликариламидном геле, содержали индивидуальные пептиды (соответственно CB-II и CB-III).





Первичная структура цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур. Показаны пентиды, необходимые для реконструкции полной аминокислотной последовательности белка [1-3]. Сплошные стрелки соответствуют участкам пентидов, структура которых установлена непосредственно, прерывистые – участкам, структура которых восстановлена по данным аминокислотного анализа и результатам исследования пентидов других гидролизатов. Остатки пронумерованы согласно первичной структуре изофермента из сердца свиньи [4, 5]. В верхней строке показаны участки первичной структуры свиной аспартат-аминотрансферазы, не совпадающие с соответствующими участками структуры куриного изоизима.

Определение N-концевых аминокислотных остатков показало, что пептид СВ-II не имеет свободной α -аминогруппы, а на N-конце пептида СВ-III находится остаток лизина. Гидролиз пептида СВ-II карбоксипептидазой А в присутствии 1% додецилсульфата натрия [1] (соотношение фермент — субстрат 0,5 мкг/нмоль) приводит к отщеплению примерно эквимольных количеств гомосерина, фенилаланина и валина. Эти данные в сочетании с результатами определения аминокислотного состава (табл. 1) позволяют уверенно соотнести пептиды СВ-II и СВ-III с участками полипептидной цепи 2–148 и 213–287 соответственно.

Разделение пептидов фракций IV и V проводили препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле. При этом из фракции IV были выделены два пептида (СВ-IV-1 и СВ-IV-2), а из фракции V — пептиды СВ-V-2, СВ-V-3 и СВ-V-4, а также дополнительное количество (около 30%) пептида СВ-IV-2. Из данных аминокислотного и N-концевого анализа 5 перечисленных пептидов (табл. 1) однозначно следует их положение в полипептидной цепи (СВ-IV-1 — 288–326, СВ-IV-2 — 178–212, СВ-V-2 — 149–177, СВ-V-3 — 390–412 и СВ-V-4 — 334–359). Фрагмент СВ-V-3 является в белке С-концевым и не содержит остатков метионина.

Фракция VI содержала низкомолекулярные пептиды, которые после превращения всех C-концевых остатков в форму гомосериллактона [7] подвергали препаративному электрофорезу на бумаге при pH 3,5, что позволило получить гомогенные пептиды СВ-VI-1 и СВ-VI-3. Выделение индивидуальных пептидов СВ-VI-2-1 и СВ-VI-2-2 потребовало проведения дополнительного разделения хроматографией на бумаге субфракции VI-2. Аминокислотный состав пептидов фракции VI (табл. 1) доказывает их соответствие ранее изученным областям полипептидной цепи аспартат-аминотрансферазы из сердца кур: СВ-VI-1 — 360–373, СВ-VI-2-1 — 383–389, СВ-VI-2-2 — 327–333, СВ-VI-3 — 374–382 [2, 3].

Таким образом, в результате настоящей работы выделены все 11 ожидаемых бромциановых пептидов. Структура девяти из них непосредственно вытекает из данных аминокислотного анализа и полностью соответствует результатам, полученным ранее при изучении соответствующих пептидных фрагментов, выделенных после гидролиза аспартат-аминотрансферазы из сердца кур стафилококковой протеазой и трипсином [2, 3].

Анализ бромциановых фрагментов СВ-V-2, СВ-IV-2 и СВ-IV-1 позволил объединить низкомолекулярные пептидные фрагменты триптического гидролизата белка и обеспечил их «стыковку» в участках 166–167, 206–207, 320–321 и 324–325.

Строение участков полипептидной цепи 129–141 и 214–222 установлено при изучении структуры бромциановых пептидов СВ-II и СВ-III. В табл. 2 приведены результаты определения аминокислотной последовательности пептида СВ-III при деградации его дасильным вариантом метода Эдмана [8]. Гидролиз пептида аминопептидазой М (0,5 мкг/нмоль) в течение 30 мин приводит к освобождению 10% аспарагиновой кислоты, что при отсутствии в гидролизате аспарагина доказывает, что остаток Asx²²² не амидирован. Таким образом была установлена структура одного из ранее не исследованных участков пептидной цепи аспартат-аминотрансферазы (214–222). Кроме того, аминокислотный анализ пептида СВ-III подтвердил предположительную ранее «стыковку» пептидов, выделенных после гидролиза белка стафилококковой протеазой [2], в положениях 246–247 и 249–250.

Анализ части структуры пептида СВ-II (последовательность 2–148), которая была реконструирована ранее по данным о строении пептидов энзиматических гидролизатов аспартат-аминотрансферазы [2, 3], показывает, что в его состав входят две связи Asn — Glu (63–64 и 124–125), причем вторая из них находится непосредственно перед интересующей нас областью 129–141. В этой связи представлялось целесообразным проведение гидролиза пептида СВ-II гидроксиламином [9]. Действительно,

Таблица 1

состав пептидов бромцианового гидролизата аспартат-амино转运феразы *

Все обозначения периодов биоритмического расщепления, а также обозначение периодов циклического расщепления, включая имена, сокращения, обозначения, единицы измерения и т. д., должны быть одинаковы для всех трех биоритмов. Важно, чтобы обозначения, применявшиеся в одном биоритме, не применялись в других.

11

16

DIRE

3MA
doc

**Аминокислотные последовательности бромциановых пептидов
аспартат-аминотрансферазы ***

Пептид	Аминокислотная последовательность
CB-III	Lys-Arg-Arg-Cys **-Leu-Phe-Pro-Phe-Phe-Asp-Ser-...
CB-II-H-1	Gly-Asx-Asx-Asx-Thr-Ala-Thr-Pro-Val-Tyr-Val-Ser-...
CB-II-H-1-Ch-1	Gly-Asn-Asn-Asn-Thr-Ala-Thr-Pro-Val-Tyr
CB-II-H-1-Ch-2	Val-Ser-Ser-Pro-Thr-X ***-Glu-Asn-His-Asn-Ser-Val-Phe

* Положение аминокислотных остатков установлено с помощью метода Эдмана (\rightarrow), при изучении кинетики гидролиза пептида АРМ (\rightarrow) или СРА (\leftarrow); состояние амидированья остатков дикарбоновых кислот определено при анализе гидролизата аминопептидазой М.

** Остатки цистеина в пептидах присутствуют в форме S-карбоксиметицистеина.

*** Природа остатка не установлена. Обсуждение — см. в тексте.

хотя в результате гидролиза по двум упомянутым связям Asn — Gly следует ожидать (с учетом неполноты расщепления каждой из них) появления шести различных пептидных фрагментов, лишь один из них должен резко выделяться по молекулярному весу. Именно этот пизкомолекулярный фрагмент 125—148 содержит интересующую нас область полипептидной цепи белка.

Селективное выделение данного пептидного фрагмента (CB-II-H-1) проводили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-75 гидролизата пептида CB-II, полученного действием гидроксилиамина в присутствии 7 М солянокислого гуанидина (рис. 2). Гомогенность выделенного пептида доказана определением его N-концевой последовательности аминокислотных остатков (табл. 2), а также результатами аминокислотного анализа (табл. 1).

Окончательно структуру участка 129—141 устанавливали после выделения электрофорезом на бумаге и анализа пептидов CB-II-H-1-Ch-1 и CB-II-H-1-Ch-2, полученных при химотриптическом гидролизе фрагмента CB-II-H-1. Результаты определения их аминокислотного состава и анализа аминокислотной последовательности приведены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 2, применение обычных методов пептидной химии не позволило установить природу остатка, занимающего в полипептидной цепи аспартат-аминотрансферазы из сердца кур положение 140. Соответствующее положение в структуре свиного изозима занимает остаток триптофана. Применение к пептиду T-IV-5 [3], прошедшему 4 цикла деградации по методу Эдмана, качественной реакции на триптофан [6] свидетельствует о наличии в обсуждаемом районе остатка триптофана, который, по-видимому, занимает в белковой цепи именно положение 140, поскольку структура остальной части этого района установлена полностью. Отсутствие химотриптического гидролиза по связи 140—141 пептида CB-II-H-1, а также невозможность идентификации остатка триптофана в соответствующем положении пептида CB-II-H-1-Ch-2 при исследовании его дансильным вариантом метода Эдмана (используя для гидролиза Dns-пептидов метапсульфоновую кислоту) и при гидролизе аминопептидазой М можно объяснить, предположив, что остаток триптофана-140 куриной аспартат-аминотрансферазы разрушается в процессе бромцианового гидролиза белка (подобные явления отмечались ранее [10]). Аминокислотный состав бромцианового пептида CB-II обеспечивает перекрытие триптических пептидов в положениях 121—122 полипептидной цепи белка.

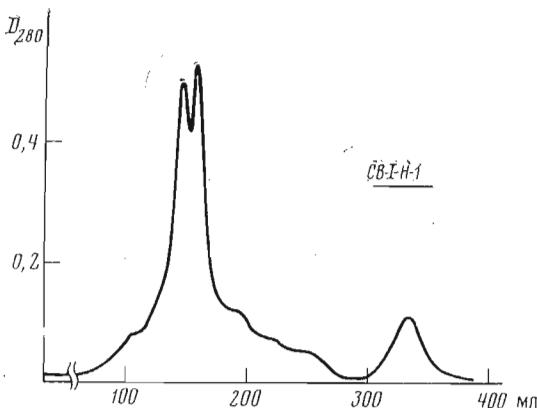


Рис. 2. Хроматография смеси пептидов, полученной при расщеплении пептида СВ-II гидроксиламином, на колонке (125×2 см) с сефадексом G-75 (сверхтонкий). Элюция 0,1 М трип-НCl-буфером, содержащим 8 М мочевину. Скорость элюции 10 мл/ч

Таким образом, исследование структуры пептидов, полученных при гидролизе цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы из сердца кур трипсином, стафилококковой протеазой и бромцианом, позволило реконструировать полную аминокислотную последовательность белка (см. схему). Анализ представленных данных с точки зрения надежности предлагаемой нами аминокислотной последовательности выявляет лишь два формально возможных источника ошибки. Первый из них относится к остатку триптофана-140, обсуждавшемуся выше. Второй касается «перекрытия» между положениями полипептидной цепи 121 и 122, обеспеченного лишь аминокислотным анализом крупного пептида СВ-II и данными гомологии с изоферментом из сердца свиньи. Положение всех остальных остатков белковой цепи куриной аспартат-аминотрансферазы однозначно показано в прямых экспериментах по установлению структуры пептидов и подтверждено результатами их аминокислотных анализов. Хорошая корреляция экспериментально найденного и рассчитанного аминокислотных составов белка также свидетельствует в пользу корректности представленных результатов.

Полипептидная цепь фермента из сердца кур содержит 410 аминокислотных остатков, на два меньше свиного изоизома. Молекулярный вес фермента, рассчитанный по его аминокислотной последовательности, равен 45 850. Сравнение первичных структур изоэнзимов аспартат-аминотрансферазы из сердца кур и сердца свиньи (схема) подтверждает сделанный ранее вывод о высокой степени сходства двух этих белков. Средний уровень гомологии их аминокислотных последовательностей равен 83%. Вместе с тем степень гомологичности отдельных участков полипептидной цепи свиного и куриного ферментов варьирует в широких пределах. Наибольший интерес в этом отношении представляют участки повышенного консерватизма, среди которых выделяется 54-членный фрагмент 217—270, содержащий лишь одну химически консервативную замену. Следует отметить, что именно в этом районе находится функционально важный остаток лизина-258. Остатки тирозина-40 и цистеина-390, роль которых неоднократно обсуждалась в литературе [11], также входят в состав сегментов повышенного сходства. Наибольшие различия аминокислотных последовательностей сравниваемых белков наблюдаются в N-концевой части (1—16) и в участке 308—321. Степень гомологии в этих участках снижена примерно до 50%.

Экспериментальная часть

Карбоксиметилирование цитоплазматической аспартат-аминотрансферазы, разделение пептидов электрофорезом и хроматографией на бумаге, гидролиз пептидов карбоксипептидазой А, в том числе в присутствии доцетилсульфата натрия, анализ экзопептидных гидролизатов дансильным методом, определение аминокислотных последовательностей дансильным вариантом метода Эдмана, а также аминокислотный анализ пептидов описаны в сообщении I [1], препаративный и аналитический электрофорез в полиакриламидном геле и гидролиз пептидов аминопептидазой М — в сообщении II [2].

Расщепление аспартат-аминотрансферазы бромцианом. Карбоксиметилированный белок растворяли в 70% муравьиной кислоте при концентрации 10 мг/мл и обрабатывали 300-кратным мольным избытком бромциана (Pierce, США) — по отношению к общему числу метиониновых остатков. После инкубации в течение 24 ч при 20°С раствор упаривали в вакууме до 1/10 первоначального объема, разбавляли в 20 раз водой и лиофильно высушивали. Разделение гидролизата — см. рис. 1.

Расщепление пептида CB-II гидроксиламином проводили по методике Борнштейна [9]. Пептид растворяли при концентрации 1 мкмоль/мл в 0,2 М KHCO_3 , содержащем 2 М солянокислый гидроксиламин и 7 М солянокислый гуанидин, pH 9,0. Смесь инкубировали 4 ч при 45°С и непосредственно наносили на колонку с сефадексом G-75 (рис. 2).

Химотриптический гидролиз пептида CB-II-H-1. 200 нмоль пептида растворяли в 200 мкл 2% NH_4HCO_3 и обрабатывали 10 мкг химотрипсина (Worthington, США) в течение 4 ч при 37°С. Реакцию останавливали лиофилизацией.

Авторы приносят благодарность В. А. Куликову и Е. В. Чурдалевой за проведение аминокислотных анализов.

ЛИТЕРАТУРА

- Мясников А. Н., Мягкова М. А., Шляпников С. В., Орлов В. М., Торчинский Ю. М., Северин Е. С. (1980) Биоорган. химия, 6, 348–358.
- Мясников А. Н., Шляпников С. В. (1980) Биоорган. химия, 6, 529–541.
- Шляпников С. В., Мясников А. Н., Мягкова М. А. (1980) Биоорган. химия, 6, 700–713.
- 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 P. L., Nosikov V. V. (1973) FEBS Lett., 29, 31–34.
- Doonan S., Doonan H. J., Hanford R., Vernon C. A., Walter J. M., Bossa F., Barra D., Carloni M., Fasella P., Riva F., Waltin P. L. (1974) FEBS Lett., 32, 229–233.
- Hirs C. W. H. (1967) in: Methods in Enzymology (Hirs C. W. H., ed.), vol. XI, pp. 179–199, Acad. Press, N. Y.
- Ambler R. P. (1965) Biochem. J., 96, 32.
- Bruton C. J., Hartley B. S. (1970) J. Mol. Biol., 52, 165–178.
- Bornstein P. (1970) Biochemistry, 9, 2408–2417.
- Hanford R., Doonan H. J., Doonan S., Riva F., Vernon C. A., Walter J. M., Bossa F., Barra D., Carloni M., Fasella P. (1973) Atti Acad. Naz. Lincei Rend., 56, 73–83.
- Braunstein A. E. (1973) in: The Enzymes (Boyer P. D., ed.), vol. 9, pp. 379–481, Acad. Press, N. Y.

Поступила в редакцию
4.IX.1979

PRIMARY STRUCTURE OF CYTOPLASMIC ASPARTATE AMINOTRANSFERASE FROM CHICKEN HEART.

IV. STRUCTURE OF CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES AND THE COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF THE PROTEIN

SHLYAPNIKOV S. V., MYASNIKOV A. N., SEVERIN E. S., MYAGKOVA M. A., DEMIDKINA T. V., TORCHINSKY Yu. M., BRAUNSTEIN A. E.
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

All 11 expected peptides were purified from the cyanogen bromide hydrolysate of chicken heart cytoplasmic aspartate aminotransferase. The analysis of peptide structure, which included cleavage of the largest cyanogen bromide fragment with hydroxylamine, allowed to establish the total amino acid sequence of the protein.