



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.313'112.5

ПРОТОННАЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА  
*STREPTOCOCCUS FAECALIS*.  
СТРУКТУРА ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДСВЯЗЫВАЮЩЕЙ  
СУБЪЕДИНИЦЫ

Кочергинская С. А., Шахпаров М. И., Алданова Н. А.,  
Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

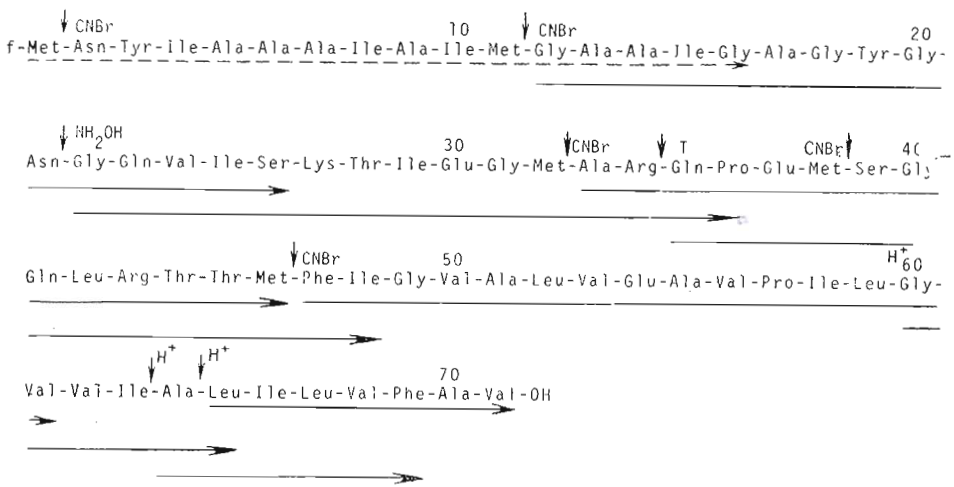
Протонтранслоцирующие аденозинтрифосфатазы, выделенные из различных эукариотических и бактериальных клеток, имеют весьма сходную структурную организацию. Молекулы этих мультисубъединичных ферментов состоят из двух частей: водорастворимой каталитической — фактор  $F_1$  и мембранной, формирующей трансмембранный протонпроводящий путь — фактор  $F_0$ . Главным компонентом фактора  $F_0$ , непосредственно участвующим в транспорте протонов, является низкомолекулярный ( $M \sim 8000$ ) гидрофобный белок. Эффективный ингибитор  $H^+$ -АТФаз —  $N,N'$ -дидиклогексилкарбодимид (DCCD), подавляющий активность фермента путем блокирования протонной проводимости мембранного сектора, взаимодействует именно с этой субъединицей комплекса, обычно называемой протеолипидом или DCCD-связывающим белком (см. обзоры [1–3]).

К настоящему времени установлена первичная структура DCCD-связывающих субъединиц  $H^+$ -АТФаз митохондрий (сердце быка, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*), хлоропластов шпината, ряда бактерий и обнаружена четко выраженная гомология как в общем характере организации полипептидной цепи, так и в положениях некоторых аминокислотных остатков [2, 4].

Данная работа посвящена определению первичной структуры DCCD-связывающей субъединицы  $H^+$ -АТФазы гликолизирующих бактерий *S. faecalis*. Следует отметить, что в клетках этих микроорганизмов в отличие от перечисленных выше ферментов  $H^+$ -АТФазы осуществляет только сопряженную с гидролизом АТФ генерацию градиента электрохимического потенциала протонов [1]. Таким образом, установление аминокислотной последовательности этой субъединицы позволяет определить, в какой степени закономерности структурной организации DCCD-связывающих субъединиц  $H^+$ -АТФаз распространяются на гликолизирующие бактерии.

DCCD-Связывающая субъединица была получена экстракцией смесью хлороформа и метанола (2 : 1) из полного АТФ-азного комплекса *S. faecalis*, выделенного по методу [5] и предварительно модифицированного [ $^{14}C$ ]DCCD. Гомогенность полученного препарата была доказана с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и анализом  $N$ -концевой аминокислотной последовательности. Как и в случае других бактериальных протеолипидов,  $N$ -концевым остатком белка является формилметионин, обнаруживаемый в виде метионина после обработки белка раствором  $HCl$  в метаноле [6]. В структурных исследованиях был использован препарат белка, полученный непосредственно из суббактериальных частиц *S. faecalis* по модифицированной методике Филлинггейма [7].

Основная информация о структуре DCCD-связывающего белка была получена при анализе аминокислотной последовательности бромциановых фрагментов. Исходная смесь пептидов была разделена гель-фильтрацией на биогеле Р-10 в 80% муравьиной кислоте. В результате были выделены



Определение аминокислотной последовательности DCCD-связывающей субъединицы H<sup>+</sup>-АТФ-азы *S. faecalis*. Подчеркнуты аминокислотные последовательности, необходимые для реконструкции полипептидной цепи (→). Вертикальными стрелками обозначены связи, расщепляемые бромцианом, гидроксилламинном, трипсином (Т), а также при ограниченном кислотном гидролизе (H<sup>+</sup>)

все бромциановые фрагменты, составляющие полипептидную цепь белка, и установлена их аминокислотная последовательность.

Схема реконструкции полипептидной цепи белка представлена на рисунке.

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности деформированного образца белка на твердофазном секвенаторе позволил получить перекрытие между бромциановыми фрагментами 1, 2–41 и 12–32. Наличие связи Asn<sup>21</sup>-Gly<sup>32</sup> в последовательности пептида 12–32 позволило осуществить расщепление белка гидроксилламинном [8], которое прошло с выходом 50%. Определение N-концевой последовательности фрагмента 22–71, выделенного из гидролизата хроматографией на биогеле Р-10 в 80% муравьиной кислоте, позволило установить структуру C-концевой области пептида 12–32, а также получить перекрытие между ним и фрагментом 33–38. Из бромцианового гидролизата наряду с пептидами 33–38 и 39–46 был выделен (с меньшим выходом) пептид 33–46, образовавшийся в результате неполного расщепления бромцианом связи Met-Ser. При обработке трипсином суспензии белка в аммоний-бикарбонатном буфере было обнаружено преимущественное расщепление только одной из трех возможных связей, а именно Arg<sup>34</sup>-Gln<sup>35</sup>, что обусловлено, по-видимому, локализацией этой последовательности в середине кластера гидрофильных остатков (см. выше). Наличие формильной группировки на N-концевом остатке белка позволило осуществить определение N-концевой последовательности пептида 35–71 без разделения продуктов триптического гидролиза. Таким образом было найдено перекрытие между бромциановыми фрагментами 33–46 и 47–71.

Значительные затруднения вызвало определение полной аминокислотной последовательности C-концевого 25-членного исключительно гидрофобного по составу фрагмента 47–71. По методу Эдмана – Чанга [9] было идентифицировано 15 аминокислот пептида 47–71 и показано, что остаток глутаминовой кислоты в 8-м положении этого пептида модифицирован [<sup>14</sup>C]DCCD. Низкая растворимость пептида в различных водных и водно-органических смесях не позволила осуществить его протеолиз рядом ферментов (химотрипсин, термолизин, протеаза из *St. aureus*), а также иммобилизацию на носителе для твердофазной деградации по Эдману. Необходимая информация была получена при анализе продуктов ограниченного кислотного гидролиза этого пептида. В результате серии экспериментов были найдены оптимальные, позволившие получить перекрывающиеся фрагменты, условия гидролиза: 98% HCOOH: 12 н.

HCl(1:1 *v/v*), 30 мин, 110°С. Полученную смесь пептидов разделяли высокоэффективной жидкостной хроматографией на обращенной фазе. Как белок, так и пептид 47–71 были абсолютно устойчивы к действию карбоксипептидаз А, В и У, их С-концевой остаток (Val) был определен методом гидразинолиза по Акабори [10].

DCCD-Связывающая субъединица *S. faecalis* содержит 71 аминокислотный остаток и является самым коротким из изученных протеолипидов. Как и в других протеолипидах, в белке из *S. faecalis* определенные положения в полипептидной цепи занимают инвариантные аминокислотные остатки. К ним относятся Arg<sup>34</sup>, Gln<sup>35</sup>, Pro<sup>36</sup>, Ala<sup>51</sup>, Glu<sup>54</sup>, Ala<sup>55</sup>, Phe<sup>68</sup>, а также остатки Glu в положениях 16, 18, 20 и 31. Наибольшую степень гомологии этот белок проявляет с соответствующей субъединицей из H<sup>+</sup>-АТРазы термофильной бактерии PS-3: сорок одно положение в полипептидной цепи занято идентичными остатками, отсутствует полярный N-концевой фрагмент, характерный для других протеолипидов [11].

В установленной аминокислотной последовательности DCCD-связывающего белка АТР-азы *S. faecalis* наблюдается кластеризация гидрофобных и гидрофильных остатков аминокислот в определенных участках полипептидной цепи. N-Концевой участок белка вплоть до остатка Ile<sup>25</sup> исключительно гидрофобен и содержит только три незаряженных полярных аминокислотных остатка: Asp<sup>2</sup>, Asn<sup>21</sup> и Gln<sup>23</sup>. Второй гидрофобный участок, содержащий 26 остатков, локализован в С-концевой области белка (положения 46–71), в середине которого расположен функционально важный остаток Glu<sup>54</sup>. Остальные 12 гидрофильных остатков сконцентрированы в 20-членном центральном фрагменте.

Такая четкая кластеризация дает возможность предположить вполне определенную укладку полипептидной цепи внутри мембраны: гидрофобные участки пересекают липидный бислой, в то время как полярный фрагмент либо экспонирован в водную фазу, либо участвует в специфических контактах с другими субъединицами АТР-азного комплекса [2, 4]. Таким образом, организация полипептидной цепи DCCD-связывающей субъединицы H<sup>+</sup>-АТР-азы *S. faecalis* имеет все характерные особенности, присущие молекулам аналогичных субъединиц протонных аденозинтрифосфатаз.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fillingame R. H. Current Topics in Bioenergetics, 1981, v. 11, p. 35–106.
2. Sebald W., Hoppe J. Current Topics in Bioenergetics, 1981, v. 12, p. 1–64.
3. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Modyanov N. N. Ann. Rev. Biophys. and Bieng., 1982, v. 11, p. 445–463.
4. Hoppe J., Sebald W. In: Chemiosmotic proton cycles/Eds Hinckle P., Skulachev V. P. Reading, Mass. Addison – Wesley, 1981, p. 449–458.
5. Бабаков А. В., Васильев Р. Г. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 119–125.
6. Sheehan J. C., Yang D. H. J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 5, p. 1154–1158.
7. Beechey R. B., Linnett P. E., Fillingame R. H. Methods in Enzymology, 1975, v. 55, p. 426–433.
8. Bornstein P. Biochemistry, 1970, v. 9, № 12, p. 2408–2420.
9. Chang I. Y. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 578, № 1, p. 175–187.
10. Fraenkel-Conrat H., Taung C. M. Methods in Enzymology, 1967, v. 11, p. 151–155.
11. Hoppe J., Sebald W. Eur. J. Biochem., 1980, v. 107, № 1, p. 57–65.

Поступило в редакцию  
6.VII.1982

#### PROTON-TRANSLLOCATING ADENOSINETRIPHOSPHATASE FROM *STREPTOCOCCUS FAECALIS*. STRUCTURE OF THE DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE-BINDING SUBUNIT

KOSHERGINSKAYA S. A., SHAKHPARONOV M. I., ALDANOVA N. A.,  
MODYANOV N. N., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)-binding subunit of H<sup>+</sup>-ATPase from glycolizing bacteria *Streptococcus faecalis* was isolated and its primary structure established. The polypeptide chain consists of 71 amino acid residues, and the molecular weight is 7291. The amino acid sequence shows a high degree of homology with those of other ATPase DCCD-binding subunits.