



УДК 577.112.083

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО
ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*
NB8

Гарбер М. В., Решетникова Л. С.

Институт белка Академии наук СССР, Пущино, Московская область

Фактор элонгации G из экстремально-термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* NB8 был впервые выделен и изучен в Японии Казиро [1–3]. Оказалось, что этот белок обладает большим структурным и функциональным сходством с G-фактором из *E. coli*, однако отличается от последнего большей компактностью молекулы и повышенной устойчивостью к денатурирующим агентам и к действию трипсина. По данным Накамуры и др. [3], G-фактор из *T. thermophilus* NB8 практически не изменяется в течение начальных 10 мин инкубации с трипсином, а затем постепенно образуется полипептид с молекулярной массой 75 кДа, который сохраняет способность цативной молекулы образовывать тройной комплекс с GDP и рибосомой. Нами было обнаружено, что при выделении G-фактора в результате естественного протеолиза также образуется активный полипептид с молекулярной массой 75 кДа. Данное сообщение посвящено очистке этого протеолитического фрагмента до гомогенного состояния и сравнению его с соответствующим триптическим фрагментом.

Штамм *T. thermophilus* NB8 был любезно передан нам проф. Т. Осима (Институт наук о жизни, Мицубиси — Касеи, Токио). Клетки *T. thermophilus* NB8 выращивали при 75°С до середины логарифмической фазы роста, замороженную массу хранили при –30°С. Перед экстракцией клетки (400 г) размораживали при 5°С в течение 12 ч, суспендировали в 600 мл 60 мМ трис-HCl-буфера, рН 7,6, с 10 мМ MgCl₂, 5 мМ β-меркаптоэтанолом, 0,2 мМ фенолметалсульфонилфторидом и разрушали с помощью пресса (Manton-Gaulin, США). Грубый экстракт после 30 мин инкубации с ДНКазой I осветляли центрифугированием в течение 3 ч при 95 000 g. Прозрачную надосадочную жидкость наносили на колонку (5×30 см) с DEAE-сефарозой CL-6B (Pharmacia, Швеция), уравновешенной тем же буфером, со скоростью 250 мл/ч. Затем колонку промывали тем же буфером и после смыва несвязавшегося материала элюировали белки в линейном градиенте 0–300 мМ NaCl (по 1,8 л в сосуде). Во фракциях определяли GDP-связывающую и GDP-азную активности по стандартным методам [4, 5]. Активные фракции объединяли и добавляли к ним сульфат аммония до 70% насыщения (47 г к 100 мл). Осадок собирали центрифугированием, растворяли в 20 мМ калий-натрий-фосфатном буфере, рН 6,3, содержащем 50 мМ KCl и 5 мМ меркаптоэтанол, и диализовали против большого объема того же буфера. Образовавшийся при диализе осадок удаляли центрифугированием. Прозрачный белковый раствор концентрировали до 25 мл и хроматографировали на колонке (2,6×270 см) с ультрагелем AcA-44 (LKB, Швеция), уравновешенным тем же буфером. Фракцию, содержащую G-фактор, наносили на колонку (2,6×35 см) с целлюлозой DE-52 (Whatman, Англия) в том же буфере и элюировали в линейном градиенте 50–300 мМ KCl (по 0,85 л в сосуде). Фракцию, содержащую G-фактор, разводили вдвое дистиллированной водой и наносили на колонку (1,5×12 см) с гидроксипатитом, уравновешенным 5 мМ калий-натрий-фосфатным буфером, рН 6,1, с 5 мМ меркаптоэтанолом. Для элюции использовали линейный градиент фосфатного буфера от 10 мМ (рН 6,1) до 100 мМ (рН 7). При необходимости очистки на AcA-44 и

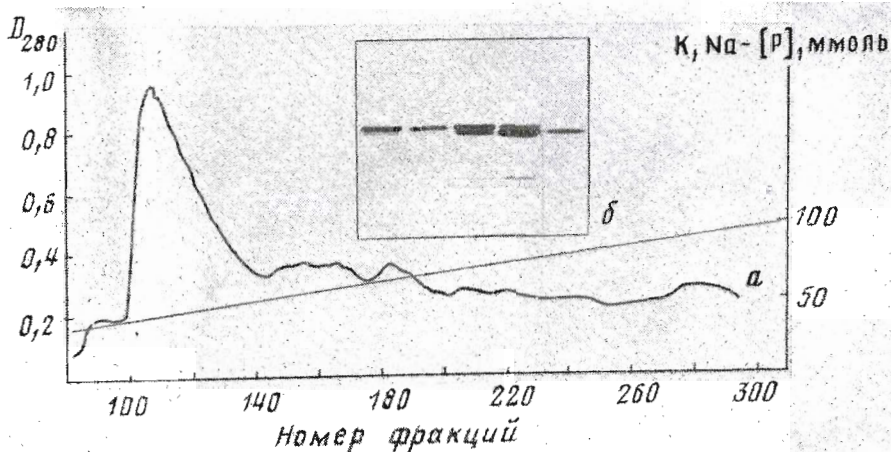


Рис. 1. Разделение нативного и модифицированного G-фактора из *T. thermophilus* HB8 на гидроксипатите (а) и результаты анализа состава фракций, обладающих GTP-азной активностью с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (б). Столбики геля располагаются точно над соответствующими фракциями

гидроксипатите повторяли. Для проведения ограниченного триптического гидролиза белок диализовали против 0,1 М трис-НСl-буфера, рН 8,1, с 1 мМ меркаптоэтанолом и добавляли трипсин (Sigma, США) при весовом соотношении к белку 1:50. Реакцию останавливали добавлением соевого ингибитора трипсина. При изучении кинетики триптического гидролиза отобранные через определенные промежутки времени пробы осаждали ацетоном и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу [6].

При выделении G-фактора из *T. thermophilus* HB8 мы обнаружили, что уже на первых этапах очистки этот белок подвергается протеолитическому расщеплению. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия показывает, что во фракциях G-фактора, полученных после хроматографии на DEAE-сефарозе и ультрагеле, наряду с G-фактором всегда присутствует полипептид с молекулярной массой 75 кДа. Последний настолько близок по своим физико-химическим свойствам к нативному G-фактору, что не может быть отделен от него ни геле-фильтрацией, ни ионообменной хроматографией. Только с помощью адсорбционной хроматографии на гидроксипатите нам удалось выделить фрагмент с молекулярной массой 75 кДа в чистом виде (рис. 1). Оказалось, что этот полипептид сохраняет способность G-фактора к катализу несопряженной GTP-азной реакции и к стимуляции синтеза полифенилаланина на рибосомах с $\text{poly}(U)$ в качестве матрицы. Полученный фрагмент может храниться в растворе в течение длительного времени без изменений. Анализ по методу Вайнера [7] показал, что N-концевой аминокислотный остаток в протеолитическом фрагменте — глицин, тогда как в G-факторе на N-конце находится фенилаланин [3].

На рис. 2 представлен ход ограниченного триптического гидролиза G-фактора в зависимости от времени. Видно, что уже через 1 мин инкубации с трипсином нативный G-фактор почти полностью переходит в полипептид с молекулярной массой 75 кДа. Этот крупный фрагмент содержится в гидролизате в заметном количестве в течение 3 ч инкубации с трипсином при 37° С. При этом гидролизат сохраняет способность G-фактора катализировать несопряженную GTP-азную реакцию.

Для препаративного выделения образующегося триптического фрагмента мы проводили инкубацию G-фактора с трипсином в течение 1 мин при 20° С, затем добавляли ингибитор трипсина и хроматографировали реакционную смесь на колонке с ультрагелем АсА-44. Электрофоретически гомогенный триптический фрагмент с молекулярной массой 75 кДа так

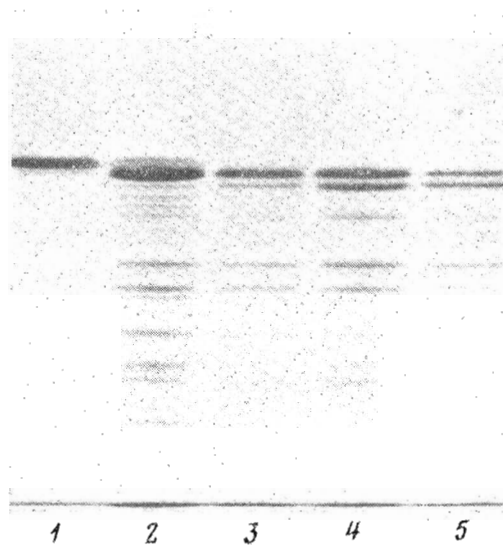


Рис. 2. Электрофорез G-фактора из *T. thermophilus* HB8 (1) в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и продуктов его триптического гидролиза в течение 1 (2), 10 (3), 60 (4) и 180 мин (5)

же, как и описанный выше естественно образующийся протеолитический фрагмент, сохраняет способность G-фактора к несопряженному расщеплению GTP и к стимуляции синтеза полифенилаланина на рибосомах с poly(U) в качестве матрицы. N-Концевым аминокислотным остатком в триптическом фрагменте также является глицин.

Исходя из полученных данных, можно сказать, что в молекуле G-фактора из *T. thermophilus* HB8 имеется очень чувствительная к протеолизу пептидная связь, которая, по-видимому, отстоит на 10–15 аминокислотных остатков от N-конца полипептидной цепи. Расщепление молекулы в этом месте не приводит к потере функциональной активности G-фактора и, по-видимому, не вызывает существенных изменений в его структуре. Получающийся в результате протеолиза модифицированный фактор устойчив в растворе и может быть использован для исследования структуры G-фактора с помощью физических методов.

Авторы выражают благодарность И. Н. Гогия за определение активности G-фактора в бесклеточной системе синтеза полифенилаланина и Л. Ф. Марковой за помощь в определении N-концевых аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arai K., Ota Y. O., Arai N., Nakamura Sh., Henneke Ch., Oshima T., Kaziro Y. Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 509–510.
2. Arai K., Arai N., Nakamura Sh., Oshima T., Kaziro Y. Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 521–531.
3. Nakamura Sh., Ohta Sh., Arai K., Arai N., Oshima T., Kaziro Y. Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 533–543.
4. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 21, p. 7029–7037.
5. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Kawakita M. J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 72, № 4, p. 853–863.
6. Laemmly U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680–685.
7. Weiner A. M., Platt T., Weber K. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 10, p. 3242–3251.

Поступило в редакцию
1.VII.1982

ISOLATION OF THE PROTEOLYTICALLY MODIFIED ELONGATION FACTOR G
FROM *THERMUS THERMOPHILUS* HB8

GARBER M. B., RESHETNIKOVA L. S.

Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

During purification of elongation factor G from *Thermus thermophilus* HB8, protein modification due to natural proteolysis is observed. The proteolytic fragment with a molecular mass of 75 K preserves the G factor capability to catalyze the uncoupled GTPase reaction, as well as to stimulate the polyphenylalanine synthesis on ribosomes with poly(U) as a template. A similar fragment is formed as a result of the limited trypsinolysis of G-factor. Both fragments were purified to a homogeneity and shown to have glycine at N-termini.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.08.82 Подписано к печати 10.10.82 Т-12590 Формат бумаги 70×108¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 10,9 тыс. Уч.-изд. л. 14,7 Бум. л. 4,5
Тираж 848 экз. Зак. 1955

Издательство «Наука», 103717 ГСП, Москва, К-62, Подосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099 Москва, Шубинский пер., 10