

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская,  
Н. В. Роднин, О. С. Мирошниченко, Н. В. Латышко, Л. В. Гудкова

## ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БРОМЦИАНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*

Выяснено строение пяти бромциановых фрагментов каталазы гриба *P. vitale*, включающих 8, 61, 110, 27 и 9 остатков аминокислот.

**Введение.** Ранее [1] опубликованы результаты разделения смеси бромциановых фрагментов каталазы *P. vitale* и исследования аминокислотной последовательности одного из фрагментов. Мы продолжили очистку и дальнейшее выяснение строения некоторых фрагментов. В предыдущей работе [1] один из фрагментов изучали на смеси двух. Цель настоящего исследования состояла в выяснении строения примесного фрагмента из этой смеси путем анализа пептидов, выделенных из продукта расщепления смеси трипсином и химотрипсином.

**Материалы и методы.** Схема разделения и методы очистки самих фрагментов, триптических и химотриптических пептидов описаны в сообщении [1]. Определение аминокислотного состава и аминокислотной последовательности приведено в этом же номере журнала [2].

**Результаты и обсуждение.** Как отмечалось выше, было продолжено исследование бромциановых фрагментов, основные этапы разделения которых описаны ранее [1]. Фрагменты из фракций I-II-3-3 (BrCN1), III-3-4 (BrCN8) и IV-3-2 (BrCN9) [1] подвергали дополнительной очистке высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге,

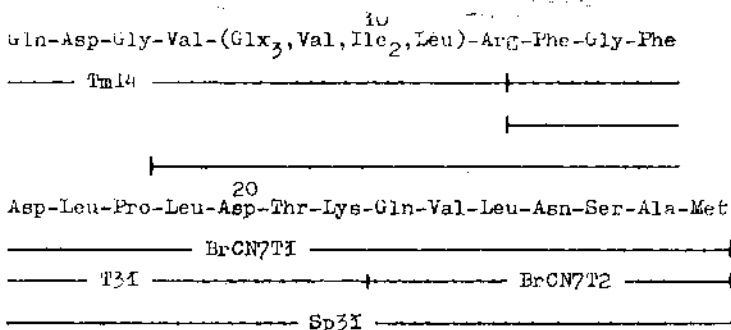


Рис. 1. Схема реконструкции фрагмента BrCN8

после чего был уточнен их аминокислотный состав (таблица). Строение фрагментов BrCN1 и BrCN9 определяли прямым секвенированием, проведя по семь стадий деградации. Их строение: Asp-Val-Ile-Ile-Glu-Thr-Leu-Met (BrCN1) и Leu-Phe-Asp-Glu-Val-Ile-Gly-Ala-Met (BrCN9).

В работе [1] получены два триптических пептида из фрагмента BrCN8. Реконструировать фрагмент можно из этих двух пептидов и пептида Sp13, строение которого установлено нами и приведено в параллельном сообщении [2]. Схема реконструкции показана на рис. 1.

© Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, Н. В. Роднин, О. С. Мирошниченко,  
Н. В. Латышко, Л. В. Гудкова, 1994

В описание строения фрагмента BrCN6, приведенное в сообщении [1], в ходе дальнейших исследований внесены дополнения, некоторые изменения, а также исправлены допущенные опечатки. Так, в пептиде BrCN6Ch1 раскрыты скобки прямым секвенированием, а в пептидах BrCN6T5 и T6 идентифицированы остатки аспарагиновых, глутаминовых кислот и их амидов. После внесенных поправок строение BrCN6 записывается следующим образом: Phe-Gln-Pro-Gly-His-Ile-Val-Arg-Gly-Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg-Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg-His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg-Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asp-Arg-Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met.

В ходе дальнейших исследований были дополнительно очищены пептиды T7—T10 и Ch1 из фрагмента BrCN7 [1], уточнены их аминокислотные составы и проведено несколько стадий деградации по методу Эдмана.

Строение пептидов BrCNT7 и T9 оказалось идентичным такому пептиду BrCN6T5 [1]. Строение пептида BrCN7T8 — Tyr-Asn-(Thr, Ser, Gln, Pro, Gly<sub>2</sub>)-Lys. Аминокислотный состав уже опубликованного пептида BrCN7T10 [1] необходимо удвоить. На этом пептиде проведено четыре стадии деградации. Его строение: Leu-Gln-Val-Val-(Asx, Ser<sub>3</sub>, Glx<sub>2</sub>, Gly, Ala<sub>2</sub>, Ile, Leu, Phe)-Lys. Ранее такого пептида из триптических гидролизатов немодифицированной [3] и малеил-каталазы [4] мы не получали. Однако первые два остатка совпадают с двумя остатками N-конца пептида Tm56 [4]. Очевидно, что BrCN7T10 занимает N-концевое положение в Tm56. Следовательно, пептид Tm56 входит в состав фрагмента BrCN7. Анализируя аминокислотный состав всех известных

Аминокислотный состав бромциановых фрагментов каталазы *P. vitale*

Аминокислота	BrCN-2	BrCN-6	BrCN-7	BrCN-8	BrCN-9
Lys	—	—	7,6(8)	1,0(1)	—
His	—	3,0(3)	2,0(2)	—	—
Arg	—	6,0(6)	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)
Asp	1,0(1)	10,0(10)	12,1(12)	3,8(4)	—
Thr	0,7(1)	2,0(2)	4,0(4)	0,8(1)	—
Ser	—	0,9(1)	9,4(10)	0,8(1)	—
Glu	1,1(1)	7,3(7)	11,1(11)	5,0(5)	1,0(1)
Pro	—	5,5(6)	5,6(6)	1,0(1)	—
Gly	—	7,2(7)	9,8(10)	2,2(2)	0,7(1)
Ala	—	2,2(2)	16,6(17)	1,1(1)	0,8(1)
Val	0,6(1)	1,7(2)	9,3(10)	1,9(2)	0,5(1)
Ile	1,3(2)	2,6(3)	3,6(4)	1,0(1)	0,5(1)
Leu	1,0(1)	6,2(6)	5,0(5)	4,0(4)	0,9(1)
Tyr	—	0,7(1)	2,4(3)	—	—
Phe	—	3,5(4)	5,6(6)	1,8(2)	0,8(1)
HSer	0,7(1)	0,5	0,9(1)	—	0,4
Lact.	—	0,5	—	1,0(1)	0,6
Всего	8	61	110	27	9

триптических пептидов немодифицированной и малеил-каталазы гриба *P. vitale* [3, 4] и сопоставляя их с аминокислотным составом Tm56, можно предположить, что в Tm56 С-концевое положение занимает пептид T32 [3], содержащий остаток метионина. По-видимому, Tm56 занимает С-концевое положение в пептиде Tm2 [4].

На пептиде BrCN7Ch1 проведено шесть стадий деградации по методу Эдмана. Его строение: Ser-Val-Asn-Glu-Gly-Gln-Ala-Asn.

Кроме полученных ранее [1] триптических пептидов, мы выделили из триптической смеси BrCN6,7 еще один существенный для реконструкции фрагмента BrCN7 триптический пептид BrCN7T11 со строением Val-Ala-Lys. Как известно, этот пептид занимает N-концевое положение в пептиде Tm2 [4], из чего следует, что почти весь пептид Tm2 входит во фрагмент BrCN7 и занимает в нем С-концевое положение. При этом

N-конец фрагмента BrCN7 заблокирован, так как автоматическим секвенированием смеси BrCN6,7 пройдена последовательность только BrCN6 [1]. Таким образом, N-концевое положение во фрагменте BrCN7 должно принадлежать остатку пептида, имеющего последовательность Met-Gln. Среди триптических пептидов из малеил-каталазы таких пептидов имеется два — Tm14 и Tm52 [4]. Но C-концевая часть Tm14 занимает

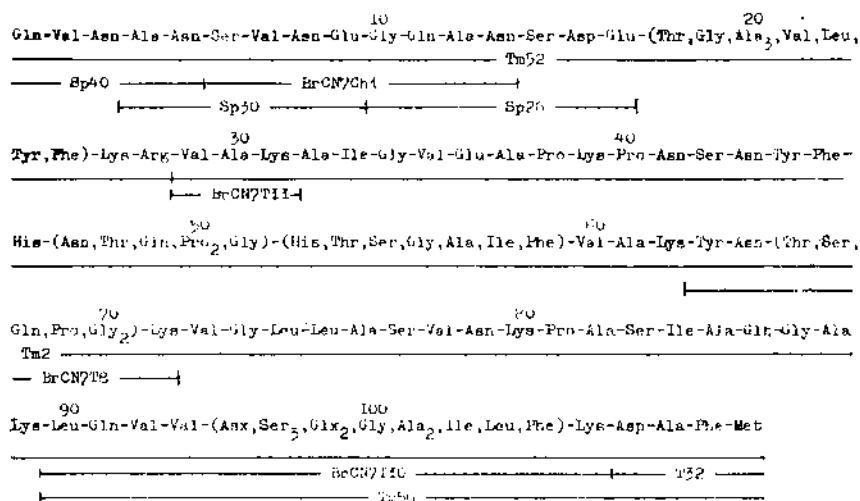


Рис. 2. Схема реконструкции фрагментов BrCN7

N-концевое положение во фрагменте BrCN8 (рис. 1). Из этого вытекает, что весь пептид Tm52 без остатка метионина находится в N-концевом положении во фрагменте BrCN7. Сумма аминокислотных составов пептидов Tm2 и Tm52, входящих во фрагмент BrCN7, соответствует приблизительно ранее опубликованному аминокислотному составу фрагмента BrCN7 [1]. Зная соотношение фрагментов BrCN6 и BrCN7 в смеси [1], точное строение BrCN6 (см. выше) и аминокислотный состав смеси BrCN6,7, нетрудно рассчитать точные аминокислотные составы обоих фрагментов, которые и приведены в таблице.

Все изложенные выше соображения можно выразить в виде схемы реконструкции фрагмента BrCN7, представленной на рис. 2. Для реконструкции N-концевой части фрагмента BrCN7 привлечены также три Sp-пептида, строение которых описано в параллельном сообщении в этом же номере журнала [2].

Таким образом, из 11 предполагаемых из содержания метионина в каталазе *P. vitale* [5] бромциановых фрагментов нами выяснено строение пяти, включающих в сумме 215 остатков аминокислот, что составляет 32% длины полипептидной цепи по данным рентгеноструктурного анализа [6].

Е. А. Козлов, Т. Л. Левітіна, М. Т. Бобровська,  
М. В. Роднін, О. С. Мірошніченко, Н. В. Лагишко, Л. В. Гудкова

#### ДОДАТКОВЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БРОМЦІАНОВИХ ФРАГМЕНТІВ КАТАЛАЗИ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*

##### Резюме

З'ясовано побудову п'яти бромціанових фрагментів каталази гриба *P. vitale*, що включають 8, 61, 110, 27 і 9 залишків амінокислот.

ADDITIONAL INVESTIGATION OF *PENICILLIUM VITALE*  
CATALASE CYANOGEN BROMIDE FRAGMENTS

Summary

The structure of *Penicillium vitale* catalase cyanogen bromide fragments including 8, 61, 110, 27 and 9 amino acid residues was determined.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В. и др. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 5.— С. 55—63.
2. Бобровская М. Т., Латышко Н. Б., Левитина Т. Л. и др. Строение некоторых пептидов, полученных расщеплением каталазы гриба *Penicillium vitale* стафилококковой протеиназой // Там же.— 1994.— 10, № 2.— С. 49—51.
3. Козлов Э. А., Гудкова Л. В., Левитина Т. Л. и др. Дополнительное исследование триптических пептидов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же.— 1993.— 9, № 1.— С. 22—25.
4. Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Гусак Н. М. и др. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Строение пептидов // Там же.— № 3.— С. 42—45.
5. Гудкова Л. В., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Козлов Э. А. Исследование субъединичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale* // Укр. биохим. журн.— 1985.— 57, № 4.— С. 29—33.
6. Vainshlein B. K., Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V. et al. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* of 2 Å resolution // J. Mol. Biol.— 1986.— 188, N 1.— P. 49—61.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев  
Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН Украины, Киев

Получено 20.10.93