

Академик Ю. А. ОВЧИННИКОВ, академик А. Е. БРАУНШТЕЙН, Ц. А. ЕГОРОВ,
О. Л. ПОЛЯНОВСКИЙ, Н. А. АЛДАНОВА, М. Ю. ФЕЙГИНА, В. М. ЛИПКИН,
Н. Г. АБДУЛАЕВ, Е. В. ГРИШИН, А. П. КИСЕЛЕВ, Н. Н. МОДЯНОВ, В. В. НОСИКОВ

ПОЛНАЯ ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ *

Аспартат-аминотрансфераза (L-аспартат: 2-оксоглутарат аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) относится к числу основных представителей фосфопридоксальсодержащих ферментов, катализирующих реакции переаминирования, или трансаминирования ⁽³⁾. Осуществляемая ею реакция является узловой на путях превращений аминокислот и дикарбоновых кислот, что ставит этот фермент на одно из центральных мест в азотистом и энергетическом метаболизме.

Хотя механизм каталитического действия аспартат-аминотрансферазы изучен на уровне модельных реакций взаимодействия субстратов с коферментом ⁽⁴⁾, его детальное исследование не представлялось возможным без знания структуры фермента. При этом надо подчеркнуть, что высокие скорости ферментативного процесса обусловлены именно уникальным строением белковой части молекулы аспартат-аминотрансферазы. Поэтому мы поставили своей задачей выяснить полную аминокислотную последовательность данного фермента.

В качестве объекта исследования была выбрана цитоплазматическая аспартат-аминотрансфераза сердечной мышцы свиньи, выделенная по описанной ранее методике ⁽⁵⁾ и отличающаяся от митохондриального изоэнзима ^(6,7). Цитоплазматическая аспартат-аминотрансфераза относится к числу сложных белков высокого молекулярного веса и состоит из двух субъединиц, каждая из которых представляет собой одну полипептидную цепь, не имеющую дисульфидных мостиков. Идентичность субъединиц доказывалась косвенными методами (аминокислотный состав, анализ N-концевых аминокислот, пептидные карты) ⁽⁸⁾.

В результате комбинированного использования классических и новейших методов анализа нами была установлена полная аминокислотная последовательность аспартат-аминотрансферазы сердечной мышцы свиньи (см. формулу на стр. 729).

Основные этапы работы соответствовали первоначально принятому плану исследования и могут быть кратко охарактеризованы следующим образом. Для получения пептидных фрагментов аспартат-аминотрансферазы были использованы энзиматические и химические способы расщепления полипептидной цепи белка, включая гидролиз трипсином, химотрипсином, термолизином, частичный кислотный гидролиз и расщепление бромцианом. При этом, кроме обычного триптического гидролиза, был применен также ограниченный гидролиз аспартат-аминотрансферазы трипсином с предварительным ацилированием остатков лизина. Триптическое расщепление фермента, в том числе предварительно модифицированного ^(9,10), позволило в конечном итоге выделить и идентифицировать все пептиды, составляющие полипептидную цепь аспартат-аминотрансферазы, а затем полностью или частично установить их структуру. Другие способы расщепления были использованы главным образом для получения перекры-

* Предыдущие сообщения см ^(1, 2).

Аминокислотная последовательность цитоплазматической аспаратами노트рансферазы сердечной мышцы
свиньи

Ala — Pro — Pro — Ser — Val — Phe — Ala — Glu — Val — ¹⁰Pro — Gln — Ala — Gln — Pro — Val —
 Leu — Val — Phe — Lys — ²⁰Leu — Ile — Ala — Asp — Phe — Arg — Glu — Asp — Pro — Asp — ³⁰Pro —
 Arg — Lys — Val — Asn — Leu — Gly — Val — Gly — Ala — ⁴⁰Tyr — Arg — Thr — Asp — Asp — Cys —
 Gln — Pro — Trp — Val — ⁵⁰Leu — Pro — Val — Val — Arg — Lys — Val — Glu — Gln — Arg — Ile —
 Ala — Asn — Asp — Ser — Ser — ⁶⁰Leu — Asn — His — Glu — Tyr — Leu — Pro — Ile — Leu — Gly —
 Leu — Ala — Glu — Phe — ⁷⁰Arg — Thr — Cys — Ala — Ser — Arg — Leu — Ala — Leu — Gly — ⁸⁰Asp —
 Asp — Ser — Pro — Ala — Leu — Gln — Glu — Lys — Arg — ⁹⁰Val — Gly — Gly — Val — Gln — Ser —
 Leu — Gly — Gly — Thr — ¹⁰⁰Gly — Ala — Leu — Arg — Ile — Gly — Ala — Glu — Phe — Leu — ¹¹⁰Ala —
 Arg — Trp — Tyr — Asn — Gly — Thr — Asn — Asn — Lys — ¹²⁰Asp — Thr — Pro — Val — Tyr — Val —
 Ser — Ser — Pro — Thr — ¹³⁰Trp — Glu — Asn — His — Asp — Gly — Val — Phe — Thr — Thr — Ala —
 Gly — Phe — Lys — Asp — Ile — Arg — Ser — Tyr — Arg — ¹⁴⁰Tyr — Trp — Asp — Thr — Glu — Lys —
 Arg — Gly — Leu — Asp — ¹⁵⁰Leu — Gln — Gly — Phe — Leu — Ser — Asp — Leu — Glu — Asn — Ala —
 Pro — Glu — Phe — Ser — Ile — Phe — Val — Leu — His — ¹⁶⁰Ala — Cys — Ala — His — Asn — Pro — Thr —
 Gly — Thr — Asp — ¹⁷⁰Pro — Thr — Pro — Glu — Gln — Trp — Lys — Gln — Ile — Ala — Ser — Val — Met —
 Lys — Arg — Arg — Phe — Leu — Phe — Pro — Phe — Phe — Asp — Ser — Ala — Tyr — Gln — Gly — Phe —
 Ala — ¹⁸⁰Ser — Gly — Asn — Leu — Glu — Lys — Asp — Ala — Trp — Ala — ¹⁹⁰Ile — Arg — Tyr — Phe —
 Val — Ser — Glu — Gly — Phe — Glu — ²⁰⁰Leu — Phe — Cys — Ala — Gln — Ser — Phe — Ser — ²¹⁰Lys —
 Asn — ²²⁰Phe — Gly — Leu — Tyr — Asn — Glu — Arg — Val — Gly — Asn — ²³⁰Leu — Thr — Val — Val —
 Ala — Lys — Glu — Pro — Asp — Ser — ²⁴⁰Ile — Leu — Arg — Val — Leu — Ser — Gln — Met — Glu —
 Lys — ²⁵⁰Ile — Val — Arg — Val — Thr — Trp — Ser — Asn — Pro — Pro — ²⁶⁰Ala — Gln — Gly — Ala —
 Arg — Ile — Val — Ala — Arg — Thr — ²⁷⁰Leu — Ser — Asp — Pro — Glu — Leu — Phe — His — Glu —
 Trp — Thr — Gly — Asn — Val — Lys — Thr — Met — Ala — ²⁸⁰Asp — Arg — Ile — Leu — Ser — Met —
 Arg — Ser — Glu — Leu — Arg — Ala — ²⁹⁰Arg — Leu — Glu — Ala — Leu — Lys — Thr — Pro — Gly —
 Thr — Trp — Asn — His — Ile — Thr — ³⁰⁰Asp — Gln — Ile — Gly — Met — Phe — Ser — Phe — Thr —
 Gly — Leu — Asn — Pro — Lys — Gln — ³¹⁰Val — Glu — Tyr — Leu — Ile — Asn — Glu — Lys — His —
 Ile — ³²⁰Tyr — Leu — Leu — Pro — Ser — Gly — Arg — Ile — Asn — Met — ³³⁰Cys — Gly — Leu — Thr —
 Thr — Lys — Asn — Leu — Asp — Tyr — ³⁴⁰Val — Ala — Thr — Ser — Ile — His — Glu — Ala — Val —
 Thr — ³⁵⁰Lys — Ile — Gln

* Остаток лизина, образующий альдиминную связь с пиридоксальфосфатом.

вающих пептидов. Так, при гидролизе аспарат-аминотрансферазы химо-трипсином было выделено 68 пептидов, включающих в сумме 341 аминокислотный остаток. Из продуктов расщепления фермента бромцианом удалось выделить шесть из семи ожидаемых пептидных фрагментов, на основе чего была получена необходимая информация для реконструирования полипептидной цепи аспарат-аминотрансферазы. Кроме того, N-концевая последовательность аспарат-аминотрансферазы до девятого остатка была определена на карбоксиметилированном ферменте с помощью секвенатора АП-01, сконструированного в СКБ аналитического приборостроения АН СССР. Для установления C-концевой последовательности были использованы карбоксипептидазы А и В, и результаты анализа были затем подтверждены выделением с большим выходом пептида изолейцил-глутамин из триптического гидролизата фермента.

Для выделения и очистки пептидов были использованы различные методы и приемы, включая хроматографию на колонках с высокоразрешающими ионообменными смолами и целлюлозами, гель-хроматографию, электрофорез и хроматографию на бумаге. Структура относительно небольших пептидов определялась непосредственно деградацией по Эдману, модифицированным методом Эдмана с идентификацией N-концевой аминокислоты в виде дансил-производных, а также с использованием амино- и карбокси-пептидаз. Строение ряда больших пептидов было установлено путем их предварительного расщепления с помощью различных протеаз, выделения составляющих пептидов и определения в них аминокислотной последовательности одним из перечисленных приемов. При анализе большого числа коротких пептидов (вплоть до восьмичленных), полученных при гидролизе аспарат-аминотрансферазы термолизинном, был успешно использован масс-спектрометрический метод определения аминокислотной последовательности⁽¹¹⁾.

Следует отметить, что при расшифровке структуры аспарат-аминотрансферазы мы столкнулись со значительными трудностями, которые были обусловлены большой длиной полипептидной цепи данного фермента и своеобразием ее аминокислотной последовательности. Так, серьезным препятствием при разделении и очистке продуктов расщепления аспарат-аминотрансферазы оказалась сильная агрегация крупных пептидов, которую удалось предотвратить лишь специальными приемами (модифицирование остатков лизина малеиновым или цитраконовым ангидридами, применение концентрированных растворов мочевины и т. п.). Нами был также установлен факт неполного расщепления аспарат-аминотрансферазы бромцианом в том случае, когда рядом с остатком метионина расположен остаток оксиаминокислоты (см., например, последовательность Ser—Met (№ 332—333)). В ходе работы было также обнаружено, что в кислой среде (рН ~ 3) происходит частичный гидролиз связей аспартил-пролил. По этим причинам выход некоторых пептидов, главным образом полученных при расщеплении аспарат-аминотрансферазы бромцианом или трипсином (в случае модифицированного по остаткам лизина фермента), оказывался очень низким, а их очистка соответственно усложнялась. В связи с этим следует упомянуть, что методология исследования первичной структуры белков, содержащих очень длинные полипептидные цепи, до настоящего времени недостаточно разработана и имеющиеся здесь данные ограничивались установлением структуры глутамат-дегидрогеназы⁽¹²⁾ и γ G-иммуноглобулина⁽¹³⁾. В этом отношении опыт, накопленный при установлении структуры аспарат-аминотрансферазы, может оказаться полезным при выработке общих принципов и путей расшифровки структуры сложных белков. К этому следует добавить, что аспарат-аминотрансфераза является первым из природносодержащих ферментов, первичная структура которого полностью установлена.

На основе настоящей работы можно считать доказанным, что обе субъединицы аспарат-аминотрансферазы идентичны, т. е. имеют одинаковую аминокислотную последовательность, а отмечаемая хроматографическая

гетерогенность фермента не связана с различиями в первичной структуре выделяемых компонентов. Как это следует из первичной структуры, одна субъединица аспартат-аминотрансферазы состоит из 412 аминокислотных остатков и имеет следующий состав: Lys₁₉, His₈, Arg₂₆, (Asp + Asn)₄₂, Thr₂₅, Ser₂₆, (Glu + Gln)₄₁, Pro₂₄, Gly₂₈, Ala₃₂, Cys₅, Val₂₉, Met₆, Ile₁₉, Leu₃₈, Tyr₁₂, Phe₂₃, Trp₉. Следовательно, молекулярный вес одной полипептидной цепи аспартат-аминотрансферазы равен 46 344, а мол. вес. холофермента с учетом двух молей пиридоксальфосфата 93 147.

Более конкретный характер теперь приобретают и сведения о функциональных группах данного фермента. Ранее разными авторами были модифицированы некоторые функционально важные группы аспартат-аминотрансферазы и выделены соответствующие пептидные фрагменты (¹⁴⁻¹⁶). Уже сейчас представляется возможным дислоцировать местоположение некоторых участков «активного центра» фермента, в первую очередь остатка лизина, образующего альдиминную связь с пиридоксальфосфатом (Lys-258), а также существенного для действия фермента остатка тирозина (Tyr-40). Знание первичной структуры, безусловно, облегчит и ускорит определение местоположения других функционально важных групп молекулы фермента, послужит основой при выяснении и сопоставлении первичных структур гомологичных и родственных белков, а также при построении трехмерной структуры аспартат-аминотрансферазы.

Авторы выражают благодарность А. П. Сухих, Ю. В. Смирнову и В. Л. Чащину за непосредственное участие в отдельных этапах данного исследования, а также Л. Д. Макаровой и В. С. Хохрякову за работу по выделению препаратов аспартат-аминотрансферазы.

Институт химии природных соединений
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР

Поступило
22 IX 1972

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin et al., FEBS Letters, **12**, 194 (1971).
- ² Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin et al., FEBS Letters, **17**, 133 (1971).
- ³ А. Е. Браунштейн, М. Г. Крицман, Биохимия, **3**, 590 (1938).
- ⁴ V. I. Ivanov, M. Ya. Karpeisky, Advances in Enzymology, **32**, 22 (1969).
- ⁵ О. Л. Поляновский, М. Телегди, Биохимия, **30**, 174 (1965).
- ⁶ H. Wada, Y. Morino, Vitamins Hormones, **22**, 411 (1964).
- ⁷ M. Martinez-Carrion, D. Tiemeier, Biochemistry, **6**, 1715 (1967).
- ⁸ M. Martinez-Carrion, C. Turano et al., J. Biol. Chem., **242**, 2397 (1967).
- ⁹ Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин и др., Биохимия, **37**, 451 (1972).
- ¹⁰ Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин и др., Биохимия, **37**, 461 (1972).
- ¹¹ М. М. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov et al., FEBS Letters, **7**, 8 (1970).
- ¹² K. Moon, D. Pizkiewicz, E. L. Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **69**, 1380 (1972).
- ¹³ G. M. Edelman, Biochemistry, **9**, 3197 (1970).
- ¹⁴ О. Л. Поляновский, Б. А. Рейл, Биохимия, **28**, 372 (1963).
- ¹⁵ Y. Morino, T. Watanabe, Biochemistry, **8**, 3412 (1969).
- ¹⁶ О. Л. Поляновский, Т. В. Демидкина, С. А. Егоров, FEBS Letters, **23**, 262 (1972).