

УДК 157.152.3

©Коллектив авторов

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ПРЕДШЕСТВЕННИКА МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗЫ
B. AMYLOLIQUEFACIENS МЕТОДОМ ДЕЛЕЦИОННОГО АНАЛИЗА**

С.И. НОВИКОВА, А.В. СЕРКИНА, Г.Е. КОНСТАНТИНОВА, О.И.
ХЛЕБАЛИНА, Г.Г. ЧЕСТУХИНА, А.Б. ШЕВЕЛЕВ

Лаборатория химии белка им. В.М. Степанова, Институт Генетики и Селекции
Промышленных Микроорганизмов, 113545 Москва, 1^{ый} Дорожный пр., 1,
тел. (095) 315-37-38, факс (095) 315-05-01, эл. почта: serkina@rocketmail.com

Функциональное назначение пропептидов и предшественников секреторных протеаз бацилл остается неизученным. Ранее методами делеционного анализа показана необходимость присутствия полноразмерного пропептида в молекулах проферментов для фолдинга или секреции зрелой формы субтилизина *E. B. subtilis*, химотрисиноподобной протеазы SGPB *S. griseus* и металлопротеазы *B. cereus*. В рамках функционального картирования пропептидов секреторных металлопротеиназ бацилл сконструирован искусственный ген металлопротеазы *B. amyloliquefaciens*, лишенный собственного пропептида и N-концевой части пропептида длиной 51 аминокислотных остатков (а.о.). При этом для обеспечения транскрипции делетированного гена и секреции его продукта к нему была присоединена 5'-концевая область гена *wprA B. subtilis*, соответствующая промотору и секреторному лидеру. Клоны *B. subtilis*, содержащие плазмиду с модифицированной формой гена, синтезировали активную зрелую металлопротеиназу.

Ключевые слова: секреция, клеточная стенка, пропептид, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*

ВВЕДЕНИЕ. Все известные в настоящее время предшественники секреторных протеаз бацилл и других грамположительных бактерий первоначально синтезируются в клетках природных продуцентов в виде предшественников-препроферментов, содержащих пре- и пропептиды, которые подвергаются удалению в процессе созревания соответствующих белков. Функциональное назначение пропептидов, общее в случае всех секреторных белков, состоит во взаимодействии с механизмом транспорта белка через плазматическую мембрану клетки с помощью SecA/SecD-зависимого механизма [1]. В то же время, физиологическая роль и судьба пропептидов остается до конца

невыясненной. Выдвигались гипотезы о наличии у них шапероноподобной функции, предполагающей участие в фолдинге «зрелой» части предшественника [2-5], а также подавлении протеолитической активности ферментов [6-9], что может иметь значение с точки зрения защиты клеток бактерии-хозяина от случайного протеолитического повреждения. Кроме того, сформулировано предположение о возможном участии пропептидов в секреции протеаз, в частности, в их транспорте через матрикс клеточной стенки микроорганизмов [5, 10-12].

Известны попытки картирования отдельных структурных детерминант функциональной специфичности пропептидов методом делеционного анализа генов предшественников протеаз. При этом было показано, что делеции 14 и более N-концевых а.о. просубтилизина *E. B. subtilis* [13,14], 4-20 N-концевых а.о. предшественника химотрипсिनотипной протеазы SGPB *S. griseus* [10] и 5 N-концевых а.о. α -литической протеиназы *Lysobacter enzymogenes* [15] приводят к полному нарушению рефолдинга *in vitro* соответствующих предшественников и/или полному или частичному подавлению продукции зрелой формы протеаз *in vivo*. Делетированные формы пропептида субтилизина утрачивали способность ингибировать зрелый фермент *in vitro*, характерную для полноразмерного пропептида [16]. Для пропептидов субтилизина и α -литической протеиназы показано наличие высокоорганизованной вторичной и третичной структуры пропептидов в составе проферментов [17, 18]. Все это заставляло предполагать, что пропептид представляет собой компактную глобулу, из которой невозможно вычленить отдельные элементы, независимые в структурном и функциональном отношении.

В настоящей работе при исследовании функциональной организации типичного представителя семейства металлоэндопептидаз бактерий – металлопротеазы *B. amyloliquefaciens* [19] впервые была успешно проведена протяженная делеция N-концевой части пропептида (51 а.о из 195), которая не привела к подавлению продукции зрелой протеазы клетками бацилл.

МЕТОДИКА. Штаммы. *E. coli*: TG1 [13];

Bacillus amyloliquefaciens ВКПМ В-4899 (А50) использовался в качестве источника гена металлопротеазы.

Bacillus subtilis AJ73: *amyE4*, *npr512*, *apr73* предоставлен Ю.В. Йомантасом.

Плазмиды. Вектор UK21 для клонирования в *E. coli* предоставлен Й. Мессингом [14]. Плазмидный однорепликонный вектор pLF14 для клонирования в *E. coli*, бациллах, а также других грамположительных и грамотрицательных хозяевах описан ранее [20]. Нуклеотидные последовательности генов *wprA* *B. subtilis* [21] и *npr* *B. amyloliquefaciens* [19] опубликованы ранее и доступны из базы нуклеотидных последовательностей EMBL под номерами U58981 и K02497 соответственно. Плазмида pAR10, несущая детерминанту устойчивости к апрамицину под контролем собственного промотора в виде вставки по сайтам рестриктаз *PstI-EcoRI* размером 1,2 т.п.н. в векторе pBlueScriptKS+ vector (Stratagene), предоставлена Н. Демьяновой.

Культивирование бактериальных штаммов. *E. coli* выращивали на жидкой и агаризованной среде LB (Difco, США) с добавлением при необходимости антибиотиков: 100 мг/л ампициллин, 20 мг/л хлорамфеникол, 40 мг/л канамицин, 100 мг/л апрамицин (Fluka, Швейцария) при 37°C.

При трансформации, поддержании и выделении ДНК культуры *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* выращивали при 37°C на среде Леннокса (Difco) с добавлением при необходимости антибиотиков в следующих концентрациях: 20 мг/л хлорамфеникол, 40 мг/л канамицин, 40 мг/л апрамицин или 20 мг/л эритромицин.

Для определения продукции металлопротеазы штаммы *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* выращивали при 37°C на среде КМ следующего состава: ферментативный гидролизат кукурузной муки 8%, концентрированный кукурузный экстракт 1,6%, дрожжи сухие кормовые 0,27%, NaCl 30 мг/л, лактоза 0,3%, MgSO₄ 160 мг/л, K₂SO₄ 0,3%, CaCl₂ 0,07%, CaCO₃ 0,04%. pH 6,8 доводили с помощью 12% раствора NH₃. Выращивание бактерий проводили в пробирках в объеме среды КМ 5 мл при интенсивной аэрации (500 об/мин) в течение 24 и 48 часов. Немедленно по окончании ферментации в пробах определяли активность металлопротеазы.

Выделение ДНК. Геномную ДНК бациллярных штаммов выделяли как описано ранее [22]. Плазмидную ДНК из *E. coli* и бацилл выделяли с помощью кита Wizard Mini-Prep (Promega, США).

Праймеры и ПЦР. ПЦР проводили с помощью Taq-полимеразы производства Силекс (Москва) как рекомендовано производителем.

Для ПЦР-амплификации фрагмента ДНК размером 1,6 т.п.н., содержащей 5'-концевую часть гена *wprA*, в качестве матрицы использовали тотальную геномную ДНК *B. subtilis* AJ73. Праймеры конструировали на основании последовательности, доступной в банке данных EMBL под номером U58981, на 5'-концах праймеров были добавлены последовательности сайтов рестриктаз:

праймер Wpr1 (SalI) CCCGTCGACCCGGCTCTTTGATAGAGC
праймер Wpr2 (SacI) GGGGAGCTCCATTGCATTGTTATTTCC

Для ПЦР-амплификации гена металлопротеазы *npr* в составе фрагмента длиной 1,6 т.п.н. в качестве матрицы использовали геномную ДНК *B. amyloliquefaciens*. Праймеры для этой цели были изготовлены на основании нуклеотидной последовательности, доступной в банке данных EMBL под номером K02497:

праймер Npr-BA1

TGAAAAAAGGAGAGGATAAAGAaTGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCT
праймер Npr-BE1 (NheI) GGGGCTAGCCTGAGGGATCTCAGGCTTTTCC

Трансформация *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *E. coli*. *E. coli* трансформировали по стандартному протоколу с использованием Ca²⁺ [13]. *B. subtilis* трансформировали по модифицированному методу Спицайзена [23]. Введение ДНК в клетки *B. amyloliquefaciens* проводили методом регенерации протопластов [24].

Интегративные конструкции вводили в геном *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* в виде линейных амплификатов, полученных с помощью ПЦР. При нагрузке ДНК 1-3 мкг в одном эксперименте выход колоний трансформантов составлял 10³-10⁴ для *B. subtilis* и 10² для *B. amyloliquefaciens*. Сборка плазмидной конструкции, содержащей модифицированный вариант гена

npr проводили в клетках *B. subtilis* AJ73, применяя селекцию трансформантов в функциональном тесте на образование зоны просветления на молочном агаре, как описано ранее [22].

Активность металлопротеазы измеряли непосредственно в освобожденной от клеток культуральной жидкости бацилл с использованием хромофорного субстрата Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH₂ синтезированного в нашей лаборатории [25]. Удельную активность протеазы считали равной 1200 ед/мг чистого фермента (Н.М. Иванова, персональное сообщение).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Конструирование делеционного производного гена *npr* слитого с 5'-фланкирующей регуляторной областью *wprA*. Конструирование химерного гена *wprA/npr* проводили *in vitro* в виде амплифицированных линейных фрагментов ДНК. Фрагмент гена *wprA* размером 280 п.н., соответствующий промоторной области, сайту начала трансляции и препептиду, отщепляли от амплификата с праймеров Wpr1 и Wpr2 с помощью рестриктазы *Pst*I, после чего присоединяли к ней фрагмент полилинкера плазмиды pUK21, содержащий сайты *Pst*I и *Hind*III. Амплификат гена *npr* обрабатывали рестриктазой *Hind*III и лигировали с фрагментом, содержащим промоторную область *wprA*. Полученный слитой ген реамплифицировали с праймеров Wpr1 и Npr-BE1, после чего присоединяли к его 3'-концу мини-ген устойчивости к эритромицину (E-пептид) [26]. Полученный слитой фрагмент ДНК реамплифицировали с праймеров Wpr1 и pUC/M13 reverse (Fermentas), обрабатывали рестриктазами *Sal*I и *Sac*I и лигировали с вектором pLF14, линейризованным по одноименным сайтам. Лигированную смесь ДНК трансформировали в клетки *B. subtilis* AJ73, отбирая колонии трансформантов на среде с хлорамфениколом и эритромицином. Отобранная в результате конструкция с модифицированным геном *npr* получила название pLF-wpr-npr1 (рис. 1,2).

Изучение экспрессии модифицированного варианта гена *npr* в *B. subtilis*.

Штамм *B. subtilis* AJ73, трансформированный описанной выше конструкцией pLF-wpr-npr1, содержащей делетированное производное гена *npr*, а также изогенные ему штаммы *B. subtilis* AJ73, несущие ген *npr* дикого типа в составе конструкции pBA4-Npr5 (положительный контроль) и исходный вектор pLF14 без вставки (отрицательный контроль), изучали на способность продуцировать секретлируемую металлопротеазу. Штаммы рассеивали до единичных колоний на молочном агаре для отбора наиболее продуктивных вариантов в пределах физиологической нормы реакции, после чего высевали штрихом на чашки со средой Леннокса и выращивали в течение суток до образования газона. Полученную культуру использовали в качестве посевного материала, внося его в соотношении $\approx 5 \cdot 10^8$ клеток на 5 мл среды КМ, используемой для культивирования продуцентов нейтральной протеазы на основе *B. subtilis* на Омутнинском ПО «Восток».

Измерения активности металлопротеазы в культуральной жидкости штаммов показали, что уровень активности штамма *B. subtilis* AJ73 (pLF-wpr-npr1) на 24 часу культивирования в 2 раза, а на 48 часу – более чем в 3 раза превосходит уровень контрольного штамма *B. subtilis* AJ73 (pBA-Npr5). При этом синтез нейтральной протеазы штаммом AJ73 (pLF14), не несущим введенного на плазмиде гена *npr*, находился на незначительном уровне. Этот результат доказывает возможность правильного фолдинга и секреции делеционного

производного предшественника металлопротеазы *B. amyloliquefaciens*, несмотря на утрату 51 N-концевого а.о. пропептида из 195.

a) pLF-wpr-npr1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
GTCGACCCGGCTCTTTGATAGAGCTGGTTTTTTTTATATTTATCCSCTCATATCCAAATCATTAAAATAACCTTAAAATTC
      |90      100      110      120      130      | 140      150      160
CCTGTAAGCGGTATCTCGTCCATGAAATTATGATACSTTCAAGGAGATTTCATTATTTTGCAGGAGGATAACATGAAAC
                                         SD           M K

170      180      190      200      210      220      230      240
GCAGAAAATTCAGCTCGGCTGTGGCGGCAGTGATTATTTTGCAGCTGATTTTCAGCCTTTTCTCCGGGAACCAAAGCT
R R K F S S A V A A V I I F A L I F S L F S P G T K A
secretory leader peptide of WprA
      250      260      270      280      290      300      310      320
GCATGCCATGGTACCCGGGAGCTCGAATTCAGCTTGTGAAAGCACGACTGATGCCCTTGATACAAGCACTTTCGATA
A C H G T R E L E F K L V E S T T D A L G Y K H F R Y
polylinker           propeptide
      330      340      350      360      370      380      390      400
TGCGCCTGTCGTTAACGGAGTGCCAATTAAGATTTCGCAAGTGATCGTTCACGTCGATAAATCCGATAATGTCTATGCGG
A P V V N G V P I K D S Q V I V H V D K S D N V Y A

      410      420      430      440      450      460      470      480
TCAATGGTGAATTACACAATCAATCTGCTGCAAAAACAGATAACAGCCAAAAGTCTCTTCTGAAAAGCGCTGGCACTC
V N G E L H N Q S A A K T D N S Q K V S S E K A L A L

      490      500
GCTTTCAAAGCTATCGGCAAATCACCAGACGCTGTTTCTAACGGAGCGGCCAAAACAGCAATAAAGCCGAATAAAAG
A F K A I G K S P D A V S N G A A K N S N K A E L K

      510      520      530      540      550      560      570      580
CGATAGAAAACAAAAGACGGCAGCTATCGTCTTGCTTACGACGTGACGATTTCGCTATGTCGAGCCTGAACCTGCAAACCTGG
A I E T K D G S Y R L A Y D V T I R Y V E P E P A N W

      590      600      610      620      630      640      650      660
GAAGTCTTAGTTGACGCCGAAACAGGCAGCATTTTAAAACAGCAAAATAAAGTAGAACATGCCCGCCGCC
E V L V D A E T G S I L K Q Q N K V E H A A A
                                         mature enzyme
  
```

Рисунок 1.

Гибридный ген *wprA/npr*, экспрессированный в составе конструкции pLF-wpr-npr1. Стрелками указаны экспериментально определенные точки начала транскрипции [21]. Последовательность Шайна-Дальгарно показана жирным шрифтом и подчеркнута. Последовательность секреторного лидерного пептида подчеркнута. Искусственная нуклеотидная последовательность из полилинкера pUK21 показана курсивом. Последовательность пропептида Nprg подчеркнута штриховой линией. Сайт процессинга пропептида отмечен символом ↵.

Полученный результат является оригинальным, поскольку ранее в литературе не было данных по делеционному анализу N-концевых остатков пропептидов металлопротеаз бактерий. В работе [27] проводилось удаление C-концевых остатков пропептида металлопротеазы *B. cereus*. При этом необходимо отметить, что особенностью выбранного объекта является наличие C-концевого 23-членного ω-пептида, непосредственно примыкающего к сайту процессинга, который отсутствует в пропептидах других ферментов этой группы. Делеционный анализ показал, что удаление ω-пептида снижает уровень продукции секреторной металлопротеазы на 75%. Этот результат не может иметь универсального значения с точки зрения понимания структурной организации

предшественников металлопротеаз по причине уникальности ω-пептида для металлопротеазы *B. cereus*.

б) *npr* - дикий тип

```

      169      179      189      199      209      219      229
ATGGGTTTAGGTAAGAAATTGTCTGTTCGTGTCGCTGCTTCGTTTATGAGTTTATCAATCAGCCTGCCA
  M G L G K K L S V R V A A S F M S L S I S L P

      239      249      259      269      279      289      299      309
GGTGTTCAGGCTGCTGAAGGTCATCAGCTTAAAGGAATCAAACAAATTTCCCTCCAAAAAGCCGATTGCGCAATCAGA
  G V Q A A E G H Q L K E N Q T N F L S K K P I A Q S E

      319      329      339      349      359      369      379      389
ACTCTGTCACCAAATGACAAGGCTGTCAAGCAGTTTTTGAAAAAGAACAGCAACATTTTAAAGGTGACCCCTCCAAAA
  L S A P N D K A V K Q F L K K N S N I F K G D P S K

      HindIII  409      419      429      439      449      459      469
GCGTGAAGCTTGTGAAAGCACGACTGATGCCCTTGGATACAAGCACTTTCGATATGCGCCTGTCGTTAACGGAGTGCCA
  S V K L V E S T T D A L G Y K H F R Y A P V V N G V P

      479      489      499      509      519      529      539      549
ATTAAAGATTCGCAAGTGATCGTTCACGTCGATAAATCCGATAATGTCTATGCGGTCGAATGGTGAATTACACAATCAATC
  I K D S Q V I V H V D K S D N V Y A V N G E L H N Q S

      559      569      579      589      599      609      619      629
TGCTGCAAAAACAGATAACAGCCAAAAAGTCTTCTGAAAAAGCGCTGGCACTCGCTTTCAAAGCTATCGGCAAAATCAC
  A A K T D N S Q K V S S E K A L A L A F K A I G K S

      639      649      659      669      679      689      699      709
CAGACGCTGTTTCTAACGGAGCGGCCAAAAACAGCAATAAAGCCGAATTAAGCGATAGAAAACAAAAGACGGCAGCTAT
  P D A V S N G A A K N S N K A E L K A I E T K D G S Y

      719      729      739      749      759      769      779      789
CGTCTTGCTTACGAGGTGACGATTCGCTATGTCGAGCCTGAACCTGCAAACCTGGGAAGTCTTAGTTGACGCCGAAACAGG
  R L A Y D V T I R Y V E P E P A N W E V L V D A E T G

      799      809      819      829
CAGCATTTTAAAACAGCAAAATAAAGTAGAACATGCCGCCG
  S I L K Q Q N K V E H A A
  
```

Рисунок 2.

Нуклеотидные последовательности использованных в работе вариантов генов *npr* в районе старта трансляции. Ген *npr* дикого типа, экспрессированный в составе конструкции рВА4-*Npr*5. Последовательность пропептида подчеркнута и выделена жирным шрифтом. Волнистой линией подчеркнута та часть пропептида, которая не была делетирована в составе конструкции рLF-*wpr*-*npr*1. Сайт процессинга пропептида отмечен символом. Отмечен сайт *Hind*III, по которому проводилась делеция 5'-концевой части гена *npr*.

Таблица 1. Изучение продукции металлопротеазы штаммом *B. subtilis* AJ73, несущим делеционное производное гена *npr* в составе плазмиды pLF-Wpr-Npr. Измерение проводили после культивирования штамма в пробирках со средой КМ объемом 5 мл в течение 24 и 48 часов. В качестве положительного контроля использован штамм AJ37 (pBA4-Npr5), в качестве отрицательного контроля - AJ73 (pLF14).

Условия опыта	Активность, ед.
а) ферментация 24 часа	
AJ73 (pLF14)	0,01
AJ73 (pBA4-Npr5)	0,08
AJ73 (pLF-Wpr-Npr)	0,17
б) ферментация 48 часов	
AJ73 (pLF14)	0,03
AJ73 (pBA4-Npr5)	0,15
AJ73 (pLF-Wpr-Npr)	0,48

Полученные в настоящей работе данные о возможности продукции металлопротеазы *B. amyloliquefaciens* с укороченным пропептидом ставят вопрос о функциональном предназначении той части предшественника этого фермента, которая подверглась удалению. Обсуждая этот вопрос, хотелось бы указать на два факта: (а) пропептиды металлопротеаз бактерий обладают значительным размером - около 200 а.о., тогда как пропептиды других секреторных протеаз - субтилизинов, химотрипсиноподобных протеаз *S. griseus*, α -литической протеазы *L. enzymogenes*, глутамилэндопептидаз бацилл и стафилококков обычно не превышают 100 а.о.; (б) при активации лизостафинподобной металлоэндопептидазы LasA *P. aeruginosa* происходит ступенчатое удаление ее пропептида [12]: вначале отщепляется N-концевая часть пропептида размером 14 кДа, по-видимому, ответственная за транспорт предшественника из периплазмы во внешнюю среду, и лишь затем удаляется С-концевой фрагмент размером 8 кДа. Эти факты косвенно свидетельствуют о возможности наличия в структуре пропептидов металлопротеаз бактерий двух структурно и функционально независимых доменов, из которых N-концевой может отвечать за транспорт предшественника из клетки, а С-концевой - за поддержание фермента в неактивном состоянии и его фолдинг. Таким образом, факт секреции активной металлопротеазы *B. amyloliquefaciens* в отсутствие N-концевого фрагмента пропептида указывает на сохранение фолдирующей функции у оставшегося С-концевого фрагмента пропептида. Возможное сохранение у последнего ингибирующей функции, характерной для других представителей семейства металлопротеаз [8, 9, 28], может быть непосредственно проверено с помощью экспериментов по получению и изучению делетированной формы предшественника *B. amyloliquefaciens* в системе, аналогичной описанной в работе [29] для препрофермента металлопротеазы *B. brevis*. При этом, получая усеченную с N-конца форму металлопротеазы *in vitro*, необходимо контролировать отсутствие или наличие у предшественника или комплекса пропептид-зрелый фермент активности металлопротеазы.

Наличие предполагаемой транспортной функции у N-концевой части пропептида вряд ли может быть изучено прямыми экспериментами *in vitro*. В то же время, не исключено, что успех получения секреторной формы металлопротеазы *B. amyloliquefaciens* в настоящей работе достигнут благодаря

уникальным свойствам использованного в качестве сигнала секреции препептида WprA *B. subtilis*. В отличие от других секретируемых белков, препептиды которых часто используются для обеспечения секреции в бациллах, прежде всего, α -амилазы *B. amyloliquefaciens* [30], продукты процессинга WprA: CWBP23 и CWBP52 [21] не высвобождаются в культуральную жидкость бацилл, а остаются прочно связаны с клеточной стенкой. Это дает основания предполагать, что путь их секреции отличается от пути секреции других белков. Если выдвинутая гипотеза справедлива, это позволяет предполагать, что наличие специфического препептида WprA в молекуле предшественника профермента металлопротеазы компенсирует возможное частичное нарушение транспортной функции его пропептида.

Авторы выражают признательность М.П. Юсуповой за предоставленный хромофорный субстрат, Н.М. Ивановой за предоставленный очищенный препарат металлопротеазы, Ю.В. Йомантасу за предоставленные штаммы бацилл и Н. Демьяновой, предоставившей плазмиду с устойчивостью к апрамицину.

Настоящая работа была поддержана грантами РФФИ №00-04-48320 и №00-04-48280.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Simonen M., Palva I.* (1993) *Microbiol. Rev.*, **57**, 109-137.
2. *Eder J., Fersht A.R.* (1995) *Mol. Microbiol.*, **16**, 609-614.
3. *Shinde U, Inouye M.* (1993) *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 442-446.
4. *Marie-Claire C., Ruffet E., Beaumont A., Roques B.P.* (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 1911-1915.
5. *McIver K.S., Kessler E., Olson J.C., Ohman D.E.* (1995) *Mol. Microbiol.*, **18**, 877-889.
6. *Hu Z., Haghjoo K., Jordan F.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 3375-3384.
7. *Baker D., Silen J.L., Agard D.A.* (1992) *Proteins: structure, function and genetics*, **12**, 339-344.
8. *O'Donohue M.J., Beaumont A.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 26477-26481.
9. *Kessler E., Safrin M.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 22726-22731.
10. *Baardsnes J., Sidhu S., MacLeod A., Elliott J., Morden D., Watson J., Borgford T.* (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 3241-3244.
11. *Braun P., Tommassen J., Filloux A.* (1996) *Mol. Microbiol.*, **19**, 297-306.
12. *Kessler E., Safrin M., Gustin J.K., Ohman D.E.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 30225-30231.
13. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* (1989) *Molecular cloning; 2-nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol.3, New York, NY.
14. *Vieira J., Messing J.* (1991) *Gene*, **100**, 184-194.
15. *Fujishige A., Smith K.R., Silen J.L., Agard D.A.* (1992) *J. Cell Biol.*, **118**, 33-42.
16. *Ohta Y., Hojo H., Aimoto S., Kobayashi T., Zhu X., Jordan F., Inouye M.* (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 1507-1510.
17. *Gallagher T., Gilliland G., Wang L., Bryan P.* (1995) *Structure*, **3**, 907-914.
18. *Sohl J.L., Shiau A.K., Rader S.D., Wilk B.J., Agard D.A.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 3894-3902.

19. *Vasantha N., Thompson L.D., Rhodes C., Banner C., Nagle J., Filpula D.* (1984) *J. Bacteriol.*, **159**, 811-819.
20. *Shevelev A.B., Aleoshin V.V., Trachuk L.A., Novikova S.I., et al.* (2000) *Plasmid*, **43**, 190-199.
21. *Margot P., Karamata D.* (1996) *Microbiology*, **142**, 3437-3444.
22. *Rebrikov D.V., Akimkina T.V., Shevelev A.B., Demidyuk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M.* (1999) *J. Protein Chem.*, **18**, 21-27.
23. *Canosi U., Morelli G., Trautner T.A.* (1978) *Mol. Gen. Genet.*, **166**, 259-267.
24. *Ferrari E., Hoch J.A.* (1990) *Bacilli.* / Eds. Harwood C.R. – New York: Plenum Publishing Corporation, pp. 84-104.
25. Юсупова М.П, Котлова Е.К., Тимохина Е.А., Степанов В.М. (1995) *Биоорган. химия*, **21**, 33-38.
26. *Novikova S.I., Bushueva A.M., Trachuk L.A., Konstantinova G.E. et al.* (2000) *FEMS Microbiol. Lett.*, **182**, 213-218.
27. *Wetmore D.R., Wong S.L., Roche R.S.* (1992) *Mol. Microbiol.*, **6**, 1593-1604.
28. *Markaryan A., Lee J.D., Sirakova T.D., Kolattukudy P.E.* (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 2211-2215.
29. *Serkina A.V., Gorozhankina T.F., Shevelev A.B., Chestukhina G.G.* (1999) *FEBS Lett.*, **456**, 215-219.
30. *Kakudo S., Yoshikawa K., Tamaki M., Nakamura E., Teraoka H.* (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 226-233.

Поступила 14.10.2000.

**STUDY OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION IN
B. AMYLOLIQUEFACIENS METALLOENDOPEPTIDASE PRECURSOR BY
DELETION ANALYSIS**

S.I. NOVIKOVA, A.V. SERKINA, G.E. KONSTANTINOVA, O.I. KHLEBALINA,
G.G. CHESTUKHINA AND A.B. SHEVELEV

Stepanov Laboratory of Protein Chemistry, Federal Research Center GNIIGenetika, 1st
Dorozhny pr., 1, 113545 Moscow RUSSIA tel. (095) 315-37-38, fax (095) 315-05-01,
e-mail: shevel_a@hotmail.com

Functional destination of propeptides and precursors in bacillar secretory proteases remains uncertain. Formerly deletion assay demonstrated folding and secretion of subtilisin E, chymotrypsin-like protease SGPB from *S. griseus* and *B. cereus* metalloprotease to depend on full-length propeptide in the precursors. Actually an artificial *B. amyloliquefaciens* metalloprotease gene with deletion of 51 amino acid residues from N-terminus was constructed with regard to carry out functional mapping of secretory metalloprotease propeptides. *B. subtilis wprA* gene 5'-terminal region spanning promoter and secretory leader was coupled to provide transcription to the truncated gene and secretion to its product. *B. subtilis* clones bearing a plasmid with the modified gene synthesised an active mature metalloprotease.

Key words: secretion, cell wall, propeptide, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*