



УДК 577.112

АРГИОПИНИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК
ИЗ МЕМБРАН КОРЫ МОЗГА БЫКА

Волкова Т. М., Аветисян Н. А., Галкина Т. Г., Гуделин А. Б.,
Махмудова Э. М.*, Соловьев М. М., Ташмухамедов Б. А.*,
Гришин Е. В.

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

* Институт физиологии Академии наук УзССР, Ташкент

С использованием двухстадийной биоспецифичной хроматографии солюбилизированных мембран коры мозга быка выделен аргипоипинсвязывающий гликопротеин с молекулярной массой 40 кДа. Полученный рецепторный компонент способен специфично связывать L -[3H]глутамат с $K_d=0,18\pm 0,019$ мкМ и $B_{max}=43\pm 4,5$ нмоль/мг белка. Аминокислотный анализ выделенного гликопротеина свидетельствует о его принадлежности к классу интегральных мембранных белков.

За последние годы накоплены данные, свидетельствующие о нейромедиаторной роли глутаминовой кислоты и о существовании специализированных мембранных структур — глутаматных рецепторов. Основные функциональные характеристики этих рецепторов установлены электрофизиологическими методами; осуществлен также радиолигандный анализ взаимодействия глутамата, его агонистов и антагонистов с препаратами возбудимых мембран. С помощью селективных фармакологических агентов обнаружено существование нескольких типов глутаматных рецепторов, основными из которых в настоящее время считают каинатный, квисквалатный и N -метил- D -аспаратный [1].

Биохимическое изучение глутаматных рецепторов в значительной степени затруднено из-за отсутствия высокоспецифичных лигандов. Предпринимался ряд попыток выделения рецепторных макромолекул аффинной хроматографией на иммобилизованном глутамате и его агонистах [2–5]. Однако в этих работах не удалось полностью охарактеризовать глутаматные рецепторы, и полученные результаты зачастую противоречивы. Недавно в ядах пауков семейства аранеид были обнаружены высокоаффинные антагонисты глутаматных рецепторов [6–9]. Ташмухамедов и сотр. [10], используя низкомолекулярную фракцию яда паука *Argiope lobata*, выделили из мозга крыс, нервно-мышечных синапсов тараканов и крабов белковую фракцию, обогащенную глутаматными рецепторами.

Основные низкомолекулярные компоненты яда паука *A. lobata*, аргипоипин, аргипоипины и псевдоаргипоипины [11] (далее смесь этих компонентов мы будем называть аргипоипинами), — блокаторы постсинаптических ионных каналов, активируемых глутаматом, в мышце личинки мясной мухи, в изолированных нейронах гишпокампа мозга млекопитающих, а также в спинальных мотонейронах лягушки [11–13]. Исходя из этих данных представлялось целесообразным идентифицировать и выделить связывающие аргипоипины мембранные белки, которые, вероятно, входят в состав глутаматных рецепторов. При этом предполагалось, что очищенный рецепторный препарат должен обладать способностью одновременно связывать как глутамат, так и аргипоипины. Для выделения подобных мембранных компонентов использовалась кора головного мозга быка — один из наиболее богатых источников глутаматных рецепторов.

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия, Arg — аргипоипины, PMSF — фенилметилсульфонилфторид, MOPS — 4-морфолинпропансульфоновая кислота.

В настоящее время установлено, что транспорт и поглощение глутамата в нейронах происходит в присутствии ионов натрия, тогда как рецепторное связывание не зависит от этого катиона, поэтому все эксперименты по идентификации и выделению искомым рецепторных белков проводились в отсутствие ионов натрия. Биологическую активность препаратов в ходе очистки оценивали посредством связывания L - $[^3\text{H}]$ глутамата.

Из гомогената коры мозга модифицированным методом ступенчатого центрифугирования [14] получали мембранную фракцию, которая, по данным радиолигандного анализа, содержит Na -независимые участки связывания L - $[^3\text{H}]$ глутамата в количестве 3,8 пмоль/мг белка. Аргиопинины на 50–60% ингибировали это связывание. Аналогичным эффектом обладали индивидуальные аргиопинин III и аргиопин.

В последние годы был опубликован ряд способов солиubilизации глутаматсвязывающих мембранных компонентов ионными и неионными детергентами: холатом натрия или калия, дезоксихолатом натрия, тригоном X-100, лубролом PX и т. д. [2–4, 15]. В данной работе солиubilизацию мембранных препаратов проводили с помощью холата натрия, позволяющего в дальнейшем получать высокоактивные препараты аргиопининсвязывающего белка.

Для дальнейшей очистки искомого рецепторного компонента был разработан двухстадийный метод, представляющий собой комбинацию двух аффинных хроматографий с использованием иммобилизованных глутамата и аргиопининов (табл. 1). Применение такого метода было основано на предположении, что участки связывания глутамата и аргиопининов могут находиться на одном рецепторном комплексе.

На первой стадии был использован модифицированный метод выделения глутаматсвязывающего белка, предложенный в работах [4, 16]. В качестве матрицы для синтеза сорбента использовали пористое стекло CPG-10 (500 Å). Элюцию акцепторов глутамата проводили с помощью раствора 10 мМ NaN_3 . На электрофореграмме полученной таким образом фракции (рис. 1) видно не менее 10 компонентов. Необходимо отметить, что условия проведения электрофореза подобраны так, чтобы максимально исключить возможность образования агрегатов гидрофобных мембранных белков (полиакриламидный гель содержал 6 М мочевины и SDS). Можно предположить, что выделенные белки представляют собой либо смесь различных акцепторов глутамата, соответствующих разным подтипам рецепторов, либо сложный рецепторный комплекс, не диссоциирующий в условиях хроматографии. Полученная фракция содержала участки связывания L - $[^3\text{H}]$ глутамата в количестве 10,4 нмоль/мг, причем смесь аргиопининов [11] ингибировала связывание на 85–90%. В отдельных экспериментах для белков этой фракции радиолигандным анализом обнаружено наличие специфичного насыщаемого связывания с препаратами $[^{125}\text{I}]$ аргиопинина I (результаты анализа будут опубликованы отдельно).

Для дальнейшей очистки применялась хроматография на Affi-Gel 10 с

Таблица 1

Результаты выделения аргиопининсвязывающего белка из 100 г коры мозга быка

Этап выделения	Белок		Удельная связывающая активность, * пмоль/мг белка	Общее связывание, пмоль	Выход, %	Очистка
	мг	%				
Мембранная фракция	1372	100	5,2	7134	100	1
Холатный экстракт	485	35,8	—	—	—	—
Биоспецифическая хроматография на CPG-Glu **	0,288	0,021	10 414	2999	42	2003
Биоспецифическая хроматография на Affi-Arn **	0,019	0,0014	43 000	817	11,45	8269

* Связывающую активность определяли радиолигандным анализом с L - $[^3\text{H}]$ Glu.

** Приготовление сорбентов см. в «Экспериментальной части».

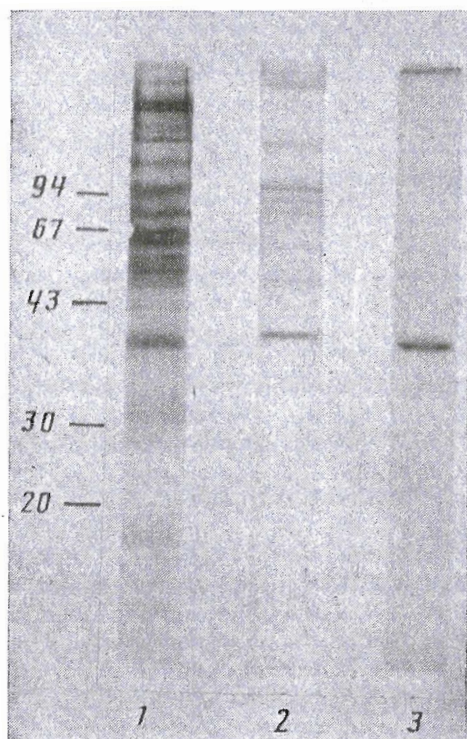


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ в присутствии 0,1% SDS и 6 М мочевины аргинопинсвязывающих белков на разных стадиях выделения (см. табл. 1): 1 — мембранная фракция, 2 — фракция, полученная с CPG-Glu, 3 — полученная с Affi-Arn. Отмечены положения маркерных белков, цифрами — их молекулярная масса в килодальтонах: 94 — фосфоорилаза В, 67 — бычий сывороточный альбумин, 43 — овалбумин, 30 — карбоангидраза, 20 — трипсиновый ингибитор

иммобилизованными аргинопинами (Affi-Arn). Ранее Ташмухамедов и сотр. [10] показали, что при использовании аффинного сорбента с иммобилизованной при помощи глутарового альдегида на полиамиде низкомолекулярной токсичной фракции яда *A. lobata* из синапсом мозга крыс, нейромышечных синапсов крабов и тараканов удается выделить белковую фракцию, при встраивании которой в бислойную липидную мембрану проявляется глутаматиндуцируемая проводимость. Эти эксперименты продемонстрировали, что ковалентное присоединение аргинопинов к матрице через свободную аминогруппу не приводит к нарушению их взаимодействия с постсинаптическим глутаматным рецептором. В нашей работе в качестве матрицы был использован высокостабильный Affi-Gel 10. Активированные N-гидроксисукцинимидом карбоксильные группы этого носителя быстро и с хорошим выходом образуют амидную связь с первичными аминогруппами лиганда. Все компоненты основной фракции яда *A. lobata*, как сказано выше, обладают одинаковой биологической активностью, однако некоторые из них (аргиопины I и II, псевдоаргиопины I и II) имеют две α -аминогруппы на молекулу аргинина и лизина [11]. Присоединение к носителю происходит через обе группы, что может привести к существенному изменению свойств этих лигандов. Кроме того, аргипин, который составляет не менее 30% основной фракции, содержит высоколабильную хромофорную группу — 2,4-дигидроксибензилуксусную кислоту. Нами был также получен сорбент с синтетическим аргипином, иммобилизованным на Affi-Gel 10. Ряд аналитических экспериментов показал, что препараты рецепторов, выделенные на этом и упомянутом выше носителе, не различались между собой.

Инкубация фракции акцепторов глутамата с сорбентом Affi-Arn проводилась при повышенных pH (до 8–8,5). Для выбора условий десорбции рецепторного комплекса были использованы данные о возможном присутствии ионов Fe^{2+} в активном центре акцепторного белка. Впервые Михаэлис и сотр. [17] при исследовании глутаматсвязывающего белка предположили, что в нем находятся ионы Fe^{3+} , и показали, что его связывание с L-глутаматом ингибируется NaN_3 и o-фепантролином. С другой стороны, было обнаружено, что JORO-токсин, структурноподобный аргипину, об-

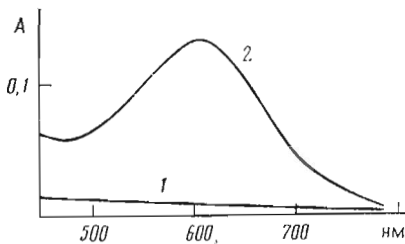


Рис. 2

Рис. 2. Взаимодействие аргинина III с ионами железа: видимая область спектра поглощения аргинина III ($1,3 \cdot 10^{-5}$ М) в воде (1); после добавления FeCl_3 ($1,8 \cdot 10^{-3}$ М) (2)

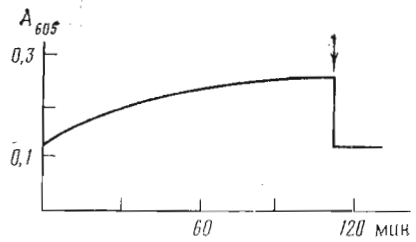


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика образования окрашенного комплекса аргинина III ($3 \cdot 10^{-4}$ М) с фракцией акцепторов глутамата (80 мкг/мл), полученной с сорбента СРГ-Glu. Стрелкой показан момент добавления 1 мМ EDTA

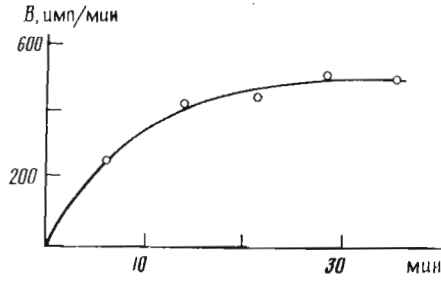


Рис. 4. Зависимость специфического связывания $L\text{-}[^3\text{H}]\text{Glu}$ (30 нМ) с рецепторной фракцией от времени инкубации при 25°C

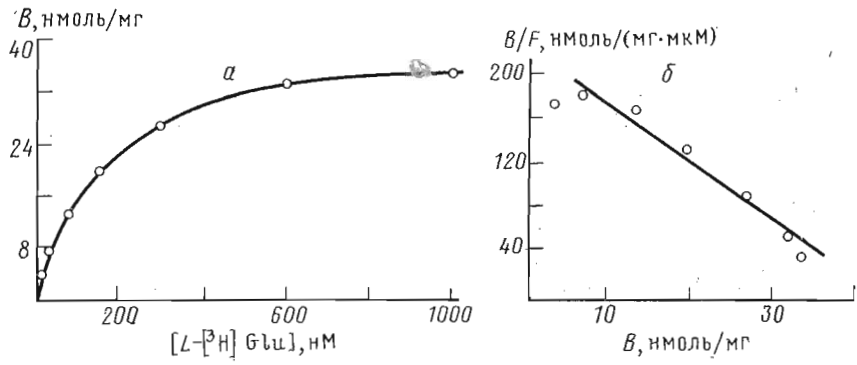


Рис. 5. Специфическое связывание $L\text{-}[^3\text{H}]\text{Glu}$ с рецепторной фракцией: зависимость специфического связывания (B) от концентрации $L\text{-}[^3\text{H}]\text{Glu}$ (а); представление экспериментальных данных в координатах Скэтчарда (б) (F — концентрация свободного лиганда). Рассчитанные параметры связывания: $K_d = 0,18 \pm 0,019$ нМ, $B_{\text{max}} = 43 \pm 4,5$ нмоль/мг

разует комплекс с ионами Fe^{3+} ($\lambda_{\text{max}} = 620$ нм) [18]. Данные, указывающие на образование подобного комплекса, были получены нами при изучении взаимодействия аргинина III с FeCl_3 (рис. 2), однако λ_{max} окрашенного комплекса оказалось равным 605 нм. Это, по-видимому, обусловлено присутствием в молекуле аргинина III другой хромофорной группы — 4-гидроксииндол-3-уксусной кислоты. Аналогичным образом удалось зарегистрировать появление максимума поглощения при 605 нм при взаимодействии аргинина III с рецепторной фракцией, полученной в процессе биоспецифической хроматографии на сорбенте с иммобилизованным глутаматом. Важно отметить, что добавление к образуемому комплексу хелаторов ионов железа, например EDTA, сопровождается его диссоциацией (рис. 3). В совокупности приведенные выше данные позволили ис-

пользовать для специфичной элюции аргиопининсвязывающего белка с сорбента Affi-Arn раствор 10 мМ EDTA.

Полученные рецепторные препараты обладали достаточно воспроизводимым белковым составом. В 35 из более 100 проделанных экспериментов, по данным электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и 6 М мочевины, рецепторный препарат представлял собой практически гомогенный белок с молекулярной массой ~40 кДа (рис. 1). Однако в остальных экспериментах наряду с этим белком присутствовали компоненты с молекулярной массой 68, 45 и 54 кДа. Появление в рецепторных препаратах дополнительных белковых зон, по-видимому, нельзя считать случайным. Не исключено, что они — часть сложного рецепторного комплекса, который в условиях выделения частично или полностью разрушается. Можно также предположить, что белок 40 кДа образуется при расщеплении высоколабильных пептидных связей более крупного белка.

На рис. 4 и 5 представлены данные по радиолигандному анализу рецепторных препаратов, содержащих только компонент 40 кДа. Не трудно видеть, что за 30 мин при 25° С достигается максимальное связывание $L-[^3H]Glu$ (рис. 4). Результаты определения зависимости специфического связывания от концентрации лиганда (рис. 5) позволяют предположить наличие одного типа участков связывания с параметрами рецепции — $K_d=0,18\pm 0,019$ мкМ и $B_{max}=43\pm 4,5$ нмоль/мг белка, причем значение B_{max} свидетельствует, вероятно, о том, что молекула выделенного белка имеет больше одного участка связывания глутамата.

Для проведения аминокислотного анализа с целью отделения от возможных примесных белков фракцию, полученную с сорбента Affi-Arn, подвергали электрофорезу, затем проводили электроперенос белковых зон на иммобилон. После окрашивания и высушивания вырезали полосу, соответствующую 40 кДа, и подвергали ее кислотному гидролизу. Выход белка после электрофореза и электроблота составил ~50%. Соотношение аминокислот в этом белке (табл. 2) весьма характерно для мембранных белков: общее количество гидрофобных остатков составляет более 48%; отношение количества полярных аминокислот к гидрофобным ($Asx+Glx+His+Lys+Arg+Val+Met+Phe+Tyr+Leu+Phe$) — 0,83, что позволяет отнести этот белок к категории интегральных мембранных белков [19]. В аргиопининсвязывающем белке содержится очень мало остатков цистеина, метионина и гистидина, тогда как весьма велико содержание аланина и глицина. Количество кислых аминокислотных остатков много выше, чем основных. При сравнении состава этого белка с глутаматсвязывающим белком из мозга крысы [20] между ними обнаруживается очень большая разница. Причем нам не удалось обнаружить присутствия необычных аминокислот (в белке крысы это $N^ε$ -метиллизин [20]).

В данной работе также установлен качественный углеводный состав аргиопининсвязывающего белка. Показано присутствие сиаловых кислот, галактозы, маннозы, фукозы, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилманнозамина. Интересно, что в белке крысы [20] совершенно отсутствуют N-ацетилгексозамины.

Определение N-концевых аминокислотных остатков аргиопининсвязывающего белка позволило предположить, что его N-концевая аминокислота блокирована.

Таблица 2

Аминокислотный состав аргиопининсвязывающего белка

Аминокислота	Мольные %	Аминокислота	Мольные %	Аминокислота	Мольные %
Asx	8,43	Ala	14,21	Phe	4,88
Thr	9,22	$\frac{1}{2}$ Cys	0,30	Tyr	0,97
Ser	7,16	Val	8,17	His	0,60
Glx	8,03	Met	0,58	Lys	3,16
Pro	7,92	Ile	4,41	Arg	2,13
Gly	11,98	Leu	7,85	Trp	Не определяли

Несомненно, что выделенный в настоящей работе аргипопрининсвязывающий гликопротеин принадлежит к мембранной системе рецепции глутамата. Дальнейшие исследования по его реконструкции, клонированию и экспрессии, а также изучение фармакологических характеристик позволят высветить его функциональную роль в нейрональной проводимости мозга млекопитающих.

Экспериментальная часть

Выделение мембран мозга быка. Все операции проводили при 4° С. От свежееизвлеченного мозга быка отделяли кору. Затем 200 г коры гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 2 л ледяного буфера А: 0,32 М сахараза, 0,3 мМ PMSF, 0,1 мМ EGTA, 10 мМ ϵ -аминокапроновая кислота, 1 мкМ пепстатин, рН 7,4. Полученную суспензию центрифугировали 30 мин при 11 000 *g* в роторе JA-10 (Beckman, США). Рыхлый осадок, содержащий мембраны, ресуспендировали с помощью тefлонового гомогенизатора в 2 л буфера Б: 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 2 мМ СаСl₂, 0,03 мМ PMSF, 0,01 мМ EGTA, 1 мМ ϵ -аминокапроновая кислота. После центрифугирования 40 мин при 11 000 *g* (ротор JA-10, Beckman, США) верхний, менее плотный осадок отделяли и затем дважды ресуспендировали в 1 л воды со льдом, содержащей такую же концентрацию ингибиторов протеиназ, как и в буфере Б. Фракцию синаптосомальных мембран отделяли с помощью центрифугирования в течение 30 мин при 11 000 *g* (JA-10). Полученные мембраны суспендировали в 500 мл буфера Б, центрифугировали 30 мин при 80 000 *g* (ротор Ti-45, Beckman, США).

Солюбилизацию проводили при 4° С при постоянном перемешивании суспензии мембран (концентрация белка 5–7 мг/мл) в буфере В: 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 0,3 мМ PMSF, 0,1 мМ EGTA, 10 мМ ϵ -аминокапроновая кислота, 1 мМ пепстатин с добавлением холата натрия до 1%. Через 3 ч суспензию центрифугировали 1 ч при 120 000 *g* (ротор Ti-45). Супернатант осторожно отсасывали.

Аффинная хроматография солюбилизованных мембран на сорбенте с иммобилизованных L-глутаматом. Аффинный сорбент (CPG-Clu) синтезировали на основе пористого стекла CPG-10 (500 Å, 200–400 меш; Serva, ФРГ) по методу [21]. Холатный экстракт мембран инкубировали 18 ч при перемешивании с сорбентом CPG-Clu. Затем носитель промывали 50-кратным объемом буфера Б на фильтре. В этом и во всех используемых далее для выделения буферных растворах содержалось 0,1% холата натрия. Десорбцию фракции акцепторов глутамата осуществляли с помощью инкубации сорбента в течение 6 ч в буфере Б, содержащем 10 мМ NaN₃. Полученную рецепторную фракцию концентрировали и тщательно диализовали против буфера Б (без EGTA).

Аффинная хроматография на носителе с иммобилизованными аргипопрининами. Из яда паука *A. lobata*, как описано в работе [11], получали фракцию основных низкомолекулярных компонентов — аргипопрининов. 18 мл Affi-Gel 10 (Bio-Rad, США) инкубировали 18 ч при 0° С со 150 мг аргипопрининов в 9 мл 0,2 М MOPS (рН 8,2) и 9 мл этанола. Затем промывали 5 объемами 0,1 М MOPS (рН 8,2), инкубировали 2 ч при 20° С с 1 М этаноламином в 0,1 М MOPS (рН 8,2). Полученный аффинный сорбент (Affi-Arg) тщательно промывали буферами с высокой ионной силой (до 1 М NaCl), содержащими 0,1% холата натрия. Аналогично синтезировали сорбент с аргипопринином (при этом 4 мг синтетического аргипопринина иммобилизовали на 1 мл Affi-Gel 10). Фракцию акцепторов глутамата инкубировали с Affi-Arg в течение 18 ч при перемешивании, после чего сорбент промывали буфером Б (без EGTA, рН 8) до полного удаления несорбированных белков. Для элюции рецептора Affi-Arg инкубировали 18 ч с буфером Б, содержащим 10 мМ EDTA (рН 8).

Связывание L-[³H]Glu. 100–200 мкг мембран или 0,3 мкг солюбилизованного белка инкубировали 30 мин при 25° С в 100 мкл смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 20–1000 нМ L-[³H]Glu. Реакцию инициировали добавлением белка. Для каждой точки делали по пять повторов.

Неспецифическое связывание определяли в присутствии в инкубационной смеси 1 мкМ немеченого *L*-Glu. Оставляли реакцию разбавлением смеси до 1 мл 50 мМ трис-HCl (pH 7,4). Отделение несвязавшегося лиганда проводили фильтрацией под вакуумом через стеклянные фильтры GF/B (Whatman, Англия), обработанные 0,3% полиэтиленмином [22]. Затем фильтры быстро промывали охлажденным до 0° С 50 мМ трис-HCl, pH 7,4 (3×5 мл), после чего каждый фильтр заливали 10 мл сцинтиллятора Unisolve (Kocht-Light, Англия) и инкубировали 24 ч. Радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-7000 (Beckman, США).

Концентрацию белка определяли по методу [23] после осаждения 7,5% трихлоруксусной кислотой и растворения осадка в 0,5М NaOH 2,5% SDS.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу [24]. Образец осаждали смесью хлороформ-метанол по методу [25], затем растворяли в инкубационном буфере так, чтобы концентрация белка была не более 1 мг/мл и инкубировали 10 мин при 60° С.

Электроперенос белковых зон на иммобилоп (поливинилидендифторид) (Millipore, США) осуществляли по методу [26] в 10 мМ Na-боратном буфере (pH 9,5), содержащем 0,005% SDS (300 мА, 2,5 ч). Полноту переноса контролировали при окрашивании ПААГ. Белковые зоны на иммобилопне окрашивали 0,1 кумасси R-250 в 50% метаноле в течение 5 мин. Отмывали 15 мин в 50% метаноле, содержащем 10% уксусной кислоты, промывали водой и высушивали.

Для аминокислотного анализа кусочки иммобилона в стеклянной ампуле заливали 6 н. HCl, вакуумировали и гидролизовали 24 ч при 110° С. Аминокислотный анализ проводили на приборе D-500 (Durrum, США).

Для углеводного анализа кусочки иммобилона помещали в кварцевую ампулу и проводили гидролиз в газовой фазе смесью 4 н. HCl — 4 н. трифторуксусная кислота (1:1) в течение 18 ч при 100° С. Анализ проводили по методу [27].

N-Концевые аминокислотные остатки определяли по описанному ранее методу [28].

Авторы выражают благодарность Э. А. Елину за предоставление синтетического аргипина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watkins J. C., Evans R. H. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1981. V. 21. P. 165–204.
2. Kuonen D. R., Roberts P. J. // *J. Neurochem.* 1987. V. 49. № 1. P. 272–281.
3. Дамбинова С. А., Беседин В. И., Демина М. Н. // *Биохимия.* 1984. Т. 49. Вып. 2. С. 216–221.
4. Michaelis E. K., Chittenden W. L., Jonson B. E., Galton N., Decedue C. // *J. Neurochem.* 1984. V. 42. № 6. P. 397–406.
5. Hampson D. R., Wenthold R. J. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 5. P. 2500–2505.
6. Магазаник Л. Г., Антонов С. М., Федорова И. М., Волкова Т. М., Гришин Е. В. // *Биол. мембраны.* 1986. Т. 3. № 12. С. 1204–1219.
7. Kawai N., Niwa A., Abe T. // *Brain Res.* 1982. V. 247. № 1. P. 169–171.
8. Uscherwood P. N. R., Duce I. R., Boden P. // *J. physiol. (France).* 1984. V. 79. № 4. P. 241–245.
9. Усманов П. В., Каликулов Д., Шадыева Н., Ташмухамедов Б. А. // *Докл. АН СССР.* 1983. Т. 273. № 4. С. 1017–1018.
10. Ташмухамедов Б. А., Махмудова Э. М., Усманов П. В., Казаков И., Аракушев Б. У. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 276. № 4. С. 977–979.
11. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Арсеньев А. С. // *Биоорг. химия.* 1988. Т. 14. № 7. С. 883–892.
12. Antonov S. M., Grishin E. V., Magazanik L. G., Shuplyakov O. V., Vesselkin N. P., Volkova T. M. // *Neurosci. Lett.* 1987. V. 83. № 2. P. 179–184.
13. Антонов С. М., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Кискин Н. И., Крышталъ О. А., Магазаник Л. Г., Федорова И. М. // V Советско-швейцарский симпозиум «Биологические мембраны» структура и функции. Тез. докл. Рига. 1988. С. 107.
14. Zukin S. R., Young A. B., Snyder S. H. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. № 12. P. 3802–4807.
15. Yoneda Y., Ogita K. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 142. № 2. P. 609–616.
16. Chen J.-W., Cunningham M. D., Galton N., Michaelis E. K. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 1. P. 417–426.

17. Michaelis E. K., Belieu R. M., Grubbs R. D., Michaelis M. L., Chang H. H. // *Neurochem. Res.* 1982. V. 7. № 4. P. 423-436.
18. Yoshioka M., Narai N., Pan-Hou H., Shimazaki K., Miwa A., Kawai N. // *Toxicol.* 1988. V. 26. № 4. P. 414-416.
19. Barrantes F. J. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 62. № 2. P. 407-414.
20. Michaelis E. K., Michaelis M. L., Stormann T. M., Chittenden W. L., Grubbs R. D. // *J. Neurochem.* 1983. V. 40. № 6. P. 1742-1753.
21. Julliard J. H., Gautheron D. C. // *FEBS Lett.* 1973. V. 37. № 1. P. 10-16.
22. Bruns R. F., Lawson-Wendling K., Pugsley T. A. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. № 1. P. 74-81.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. N 1. P. 265-275.
24. Tandy N. E., Dilley R. A., Regnier F. E. // *J. Chromatogr.* 1983. V. 266. № 2. P. 599-609.
25. Wessel D., Flügge V. I. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138. № 1. P. 141-143.
26. Matsudiara P. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 21. P. 10035-10038.
27. Хорлин А. Я., Шульн С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В., Мирзоянова М. Н. // *Биоорг. химия.* 1986. Т. 12. № 9. С. 1203-1213.
28. Levina N. B., Nazimov I. V. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 286. № 1. P. 207-216.

Поступила в редакцию
30.XII.1988

ARGIOPININ-BINDING PROTEIN FROM BOVINE CEREBRUM MEMBRANES

VOLKOVA T. M., AVETISYAN N. A., GALKINA T. G., KUDELIN A. B.,
MAKHMUDOVA E. M.*, SOLOVIEV M. M., TASHMUKHAMEDOV B. A.*,
GRISHIN E. V.

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

* *Institute of Physiology, Academy of Sciences of the UzbekSSR,
Tashkent*

The 40 kDa argiopinine-binding glycoprotein has been isolated from the solubilised preparations of bovine cerebrum membranes by means of two-step biospecific chromatography on affinity sorbents with immobilized glutamate and argiopinins. This receptor component displays a specific *L*-[³H]glutamate binding with $K_d=0,18 \pm 0,019 \mu\text{mole}$ and $B_{\text{max}}=43 \pm 4,5 \text{ nmole/mg}$. Amino acid analysis reveals it to be a member of integral membrane proteins.