



УДК 577.112.5

© 1990 г.

Л. А. Осадчук, Н. Б. Левина *, И. Н. Тележинская *,
С. Н. Храпунов, Г. Д. Вердышев, Н. А. Алданова *

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ОСНОВНОГО ЯДЕРНОГО БЕЛКА
ИЗ СПЕРМАТОЗОИДОВ ГОЛОВОНОГОГО МОЛЛЮСКА
ILLEX ARGENTINUS И СРАВНЕНИЕ ЕЕ СО СТРУКТУРАМИ
СПЕРМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ДРУГИХ ЖИВОТНЫХ

Киевский государственный университет им. Т. Г. Шевченко;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Спермальный белок хроматина I_2 кальмара *Illex argentinus* разделен с помощью ВЭЖХ на два компонента: I_{2-1} и I_{2-2} . Установлена аминокислотная последовательность большей части молекулы белка I_{2-1} (52 остатка) и N-концевая последовательность (21 остаток) белка I_{2-2} . Структура белка I_{2-1} характеризуется типичной для протаминов организацией остатков аргинина в кластеры. Ее отличительная особенность — локализация первого такого кластера в N-концевом положении, а самого протяженного основного гетерогенного кластера — в центральной части цепи; C-концевая половина молекулы содержит два кластера из трех гидроксиминокислот. N-Концевые последовательности иллексинов I_{2-1} и I_{2-2} (1—14 остатка) характеризуются высокой степенью гомологии. Обнаружены участки гомологии в аминокислотных последовательностях иллексина I_{2-1} , тиннина тунцовых рыб и галлина птиц, что позволило конкретизировать понятие о белках промежуточного типа хроматина сперматозоидов головоногих моллюсков на примере протаминоподобного белка кальмара.

Сперматогенез у большинства видов животных связан со значительными структурными преобразованиями ядер [1] и замещением гистонов в составе хроматина спермийспецифическими гистонами, протаминами и так называемыми белками промежуточного типа, к которым по классификации Блоха [2] относят основные белки сперматозоидов моллюсков.

Различные структурные типы спермальных белков хроматина определяют многообразие способов упаковки ДНК и репрессию генома в зрелых сперматозоидах [3, 4].

Для выяснения особенностей организации хроматина в сперматогенезе необходимы более полные сведения о первичной структуре белков зрелых гамет — гаметонов [5, 6], известной в настоящее время для специфических гистонов морских ежей [7], протаминов рыб [8, 9], птиц [10] и млекопитающих [11, 12]. В этом отношении остается неизученной гетерогенная группа спермальных белков моллюсков [13—15]. Эти белки по ряду физико-химических свойств (данным электрофореза и аминокислотного состава) занимают промежуточное положение между гистонами и протаминами, однако лишь сравнение первичных структур может служить критерием их сходства с другими спермальными белками хроматина.

В данной работе проводится анализ аминокислотной последовательности белка промежуточного типа — иллексина I_2 , выделенного из сперматозоидов кальмара *Illex argentinus*.

Сперматогенез кальмара *I. argentinus* сопровождается замещением гистонов на специфические белки семенников и сперматозоидов [16, 17] аналогично тому, как это происходит при сперматогенезе каракатицы [18], акулы [19] и млекопитающих [11, 12]. В семенниках кальмара наряду с гистонами присутствует специфический белок иллексин I_1 , а в зрелых сперматозоидах единственным высокоосновным белком является иллексин

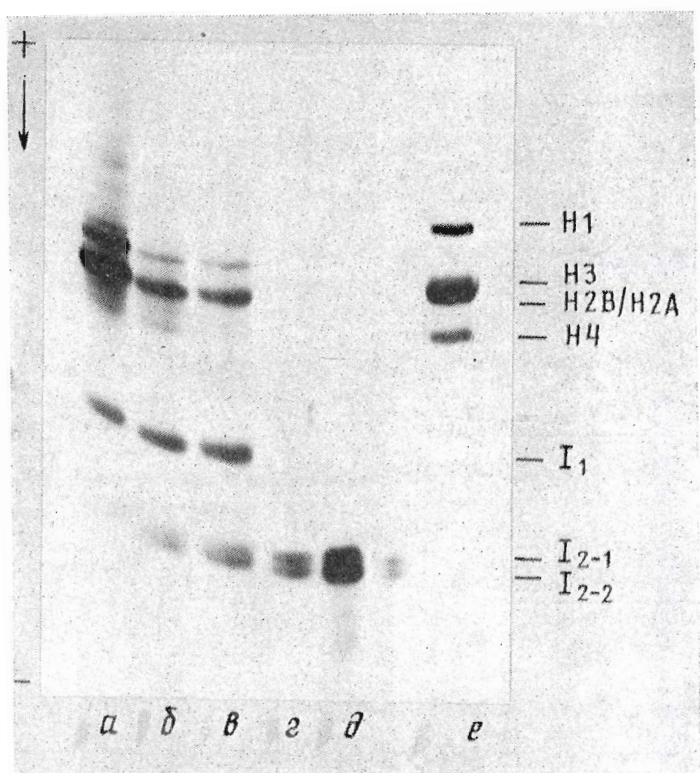


Рис. 1. Электрофорез в 15% ПААГ в 7% уксусной кислоте, содержащей 6 М мочевины: основных белков хроматина незрелых (а), зрелых (б, в) семенников и сперматозоидов (г, д) кальмара *I. argentinus*; е — гистоны тимуса телят

I_2 [16, 17], который, по данным электрофореза в ПААГ (рис. 1) и гель-фильтрации [17], состоит из двух близких по заряду и молекулярному весу субфракций: I_{2-1} и I_{2-2} .

Для определения первичной структуры иллексина I_2 необходимо было получить компоненты I_{2-1} и I_{2-2} в индивидуальном состоянии и выяснить, являются ли они двумя различными структурными вариантами либо модификацией одной и той же полипептидной цепи. С этой целью иллексин I_2 , выделенный из ядер сперматозоидов кальмара *I. argentinus* экстракцией 0,4 н. HCl и очищенный на колонке с сефадексом G-75, фракционировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. На колонке Lichrosorb C-18 в пологом градиенте ацетонитрила удалось достичь разделения иллексина I_2 на субфракции I_{2-1} и I_{2-2} (рис. 2а). Однако для более полной их очистки потребовалось проведение рехроматографии в тех же условиях. Симметричность полученных пиков (рис. 2б, в) и данные электрофоретического анализа (рис. 3в, г) свидетельствуют о гомогенности субфракций I_{2-1} и I_{2-2} . Для установления природы гетерогенности иллексина I_2 был проведен анализ N-концевых аминокислот компонентов I_{2-1} и I_{2-2} методом дансильирования и определен их аминокислотный состав. В качестве N-концевой аминокислоты в обоих случаях был идентифицирован аргинин. По данным аминокислотного анализа (табл. 1), компоненты I_{2-1} и I_{2-2} несколько различаются по количественному соотношению остатков треонина, серина, пролина, тирозина и аланина, в то время как содержание аргинина у них одинаково высокое.

Данные о структуре белков I_{2-1} и I_{2-2} были получены при их секвенировании на газофазном секвенаторе 470 А (Applied Biosystems, США). В связи с необычным аминокислотным составом белков — высоким содержанием в них остатков аргинина (~75%) — потребовалось внести не-

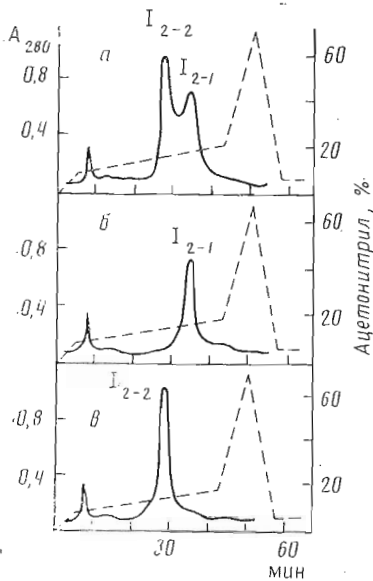


Рис. 2. Фракционирование иллексина I_2 методом ВЭЖХ на колонке ($4,6 \times 250$ мм) Lichrosorb C-18 в градиенте ацетонитрила (пунктирная линия) в 0,1% ТФА; скорость элюции 1,0 мл/мин: а — хроматография иллексина I_2 , очищенного на сефадексе G-75; б, в — рехроматография субфракций I_{2-1} и I_{2-2}

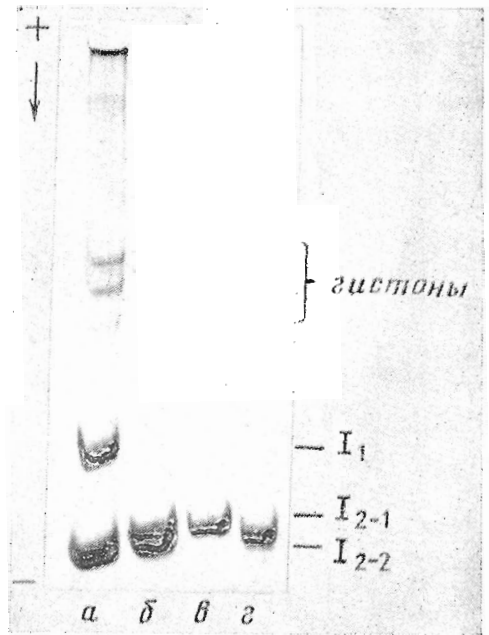


Рис. 3. Электрофорез в 15% ПААГ в 7% уксусной кислоте, содержащей 6 М мочевины, иллексинов I_{2-1} (б) и I_{2-2} (в), полученных рехроматографией в обращенной фазе на колонке Lichrosorb C-18; а — суммарный основной белок семянок, б — основной белок зрелых сперматозоидов кальмара

которые изменения в технологию процесса секвенирования и его программу. Известно, что анилинотиазолиноновые производные аргинина плохо экстрагируются с фильтра реактора газофазного секвенатора, что вызывает уменьшение выхода образующихся затем фенилтиогидантоинов и тем самым затрудняет их идентификацию. Для повышения эффективности экстракции тиазолинонов аргинина был использован полибрен (1 мг), содержащий 0,2 мг NaCl. Кроме того, было сокращено время сушки после отщепления тиазолиноновых производных. Это позволило с большей достоверностью проводить идентификацию производных аргинина.

В результате секвенирования иллексина I_{2-1} установлена последовательность 52 аминокислотных остатков (рис. 4), что составляет 80% всего белка, кажущаяся молекулярная масса которого, по данным гель-фильтрации, 7 кДа [17]. Для получения информации о С-концевой последовательности иллексина I_{2-1} проведен гидролиз его карбоксипептидазами А и В и их смесью (табл. 2). Карбоксипептидаза А не гидролизует иллексин. При гидролизе белка карбоксипептидазой В в качестве С-концевой аминокислоты иллексина был однозначно идентифицирован аргинин, причем количество отщепленного аргинина указывало на то, что на С-конце белка I_{2-1} расположен кластер, состоящий не менее чем из 4 остатков аргинина. Применение смеси карбоксипептидаз А и В приводит к отщеплению 18 аминокислотных остатков: 12 аргинина, 3 серина, 1 тирозина, 1 гистидина и 1 треонина, в результате чего С-концевую последовательность белка можно изобразить так: ... (Arg₃Ser₃His₁Tyr₁Thr₁)-Arg-Arg-Arg-Arg.

Сравнение N-концевой последовательности второго компонента иллексина I_2 (I_{2-2}), установленной автоматическим методом Эдмана (рис. 5), со структурой иллексина I_{2-1} показывает, что последовательность первых 14 аминокислот высококонсервативна и характеризуется всего одной заменой (в позиции 6), как это видно из рис. 6, на котором представлены

Аминокислотный состав основных ядерных белков хроматина сперматозоидов кальмара *I. argentinus* и других головоногих моллюсков (в мол.%)

Аминокислота	<i>I. argentinus</i>		<i>L. pealii</i>	<i>L. opalescens</i>	<i>S. officinalis</i>
	I ₂₋₁	I ₂₋₂	[14]	[14]	[18]
Thr	3,3	1,6		1,4	
Ser	13,7	11,8	9,7	9,6	11,3
Pro	1,0	1,9	2,7	2,1	2,2
Ala		1,6			
Tyr	5,4	2,7	8,4	4,2	9,0
His	3,6	3,2		1,5	
Arg	74,1	77,0	77,1	77,5	77,4
N-Концевая	Arg	Arg			Arg
C-Концевая	Arg	Arg			Arg

данные хроматографической идентификации фенилтиогидантоинов аминокислотных остатков двух белков (позиции 1 — 14) в процессе их секвенирования. На участке 15—21 полипептидной цепи иллексина I₂₋₂ степень его сходства с белком I₂₋₁ снижается. Эти данные в совокупности с результатами аминокислотного анализа позволяют говорить о наличии двух полипептидных цепей в составе иллексина I₂.

При сравнении аминокислотных составов субфракций иллексина I₂ и аналогичных белков кальмаров рода *Loligo* (лолигинов) [13, 14], а также белка Sp сперматозоидов каракатицы *Sephia officinalis* [18] обнаруживается высокая степень сходства между ними (табл. 1). Тем не менее иллексины I₂₋₁ и I₂₋₂ по содержанию тирозина, наличию в них треонина и гистидина больше напоминают лוליгин *L. opalescens*, в то время как лוליгин *L. pealii* ближе к белку Sp каракатицы, поскольку в обоих белках отсутствуют гистидин и треонин, а количество тирозина в 2 раза выше, чем в двух первых белках.

Анализ частичной аминокислотной последовательности иллексина I₂₋₁ позволяет выявить характерные черты строения спермального белка хроматина кальмара и провести сравнение его структуры со структурой ядерных белков сперматозоидов других животных (рис. 7). Полипептидная цепь иллексина I₂₋₁ характеризуется типичной для протаминов организацией аргининов в кластеры. Особенность первичной структуры иллексина I₂₋₁ заключается в том, что первый аргининовый кластер занимает N-концевое положение (позиции 1—5), самый большой кластер из 9 основных аминокислот является смешанным и расположен в центральной части молекулы (позиции 26—34), а в C-концевой половине находятся два кластера из трех гидроксиминокислот, включающие серин и треонин (позиции 35—37 и 45—47). Все кластеры аргинины относительно равномерно распределены вдоль полипептидной цепи, подобно четырем кластерам в протаминных костистых рыб, однако количество кластеров у иллексина I₂₋₁ в 2 раза выше, и их протяженность варьирует в более широких пределах (2—9 и 4—5 остатков в блоке у кальмара и рыб соответственно). По этим критериям, а также тенденции к повышению основности центральной части молекулы (позиции 21—34) иллексин I₂₋₁ напоминает более сложные протамины птиц и млекопитающих.

В отдельных участках аминокислотной последовательности особенно ярко проявляются черты сходства между иллексином I₂₋₁, тиннином тунцовых рыб и галлином птице, в то время как протамины других костистых рыб (клуцеины сельдевых, сальмины и иридины лососевых), а также спермальные белки хроматина млекопитающих не имеют выраженных областей сходства с иллексином I₂₋₁ (рис. 7). Так, N-концевой участок иллексина I₂₋₁ (позиции 1—8) подобен последовательности -Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Tyr-Arg-Arg-тиннина (позиции 12—19), которая включена в высо-

1 5 10 15 20
 Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Tyr-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Arg-Arg-Arg-Ser-Arg-Ser-Pro-
 25 30 35 40
 Tyr-Arg-Arg-Arg-Ser-Arg-His-His-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Thr-Thr-Arg-Arg-Ser-
 45 50
 Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Thr-Ser-His-Tyr-Arg-Arg-Arg-...

Рис. 4. N-Концевая последовательность иллексина I₂₋₁, полученная автоматическим методом Эдмана (остатки 1—52)

1 5 10 15 20
 Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Arg-Ser-Pro-His-His-Arg-Arg-Tyr-...

Рис. 5. N-Концевая последовательность иллексина I₂₋₂, полученная автоматическим методом Эдмана (остатки 1—21)

жоконсервативную область, характерную для всех четырех его структурных вариантов: Y1, YII, Z1, Z2 [8]. Последовательность -Arg-Arg-Ser-Thr-тиннинов (остатки 18—21) дважды встречается в иллексине I₂₋₁ (остатки 33—36 и 43—46). В то же время центральная часть иллексина I₂₋₁ (остатки 14—30) имеет значительную гомологию (71%) с участком последовательности центральной области галлина птиц, отличающейся высокой степенью концентрации кластеров аргинина (остатки 24—38).

Общей и специфической для трех рассматриваемых белков является последовательность -Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Tyr-, которая у тиннинов и иллексина занимает позиции 12—17 и 1—6 соответственно, а у галлина повторяется трижды: в позиции 34—39, в позиции 52—56, где содержится на один аргинин меньше, и в позиции 59—65, где кластер увеличен на один остаток аргинина (рис. 7).

Установление сходства в содержащих аргининовые кластеры последовательностях существенно для дальнейших исследований формирования структуры хроматина в сперматогенезе, так как именно эти последовательности являются главными во взаимодействии протаминов с ДНК [11,

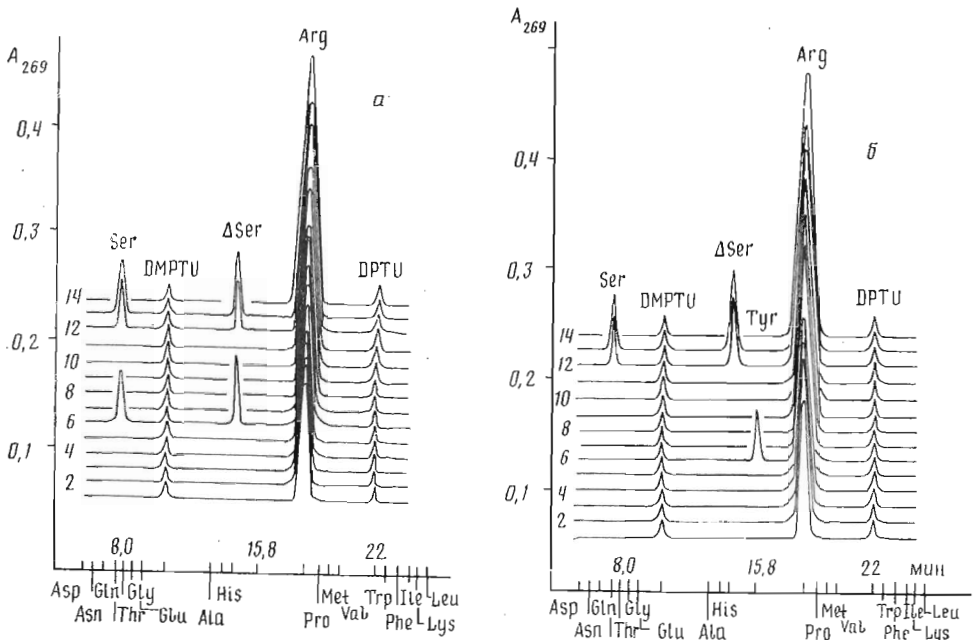


Рис. 6. Хроматография фенолтиогидантоинов аминокислот в процессе секвенирования (циклы 1—14 снизу вверх соответственно) иллексина I₂₋₁ (а) и I₂₋₂ (б). Δ Ser — дегидросерин, DMPTU и DPTU — диметил- и дифенилтиомочевина

способствуя стабилизации хроматина сперматозоидов, подобно тому как это происходит в цистеин- и гистидинбогатых участках некоторых регуляторных белков, взаимодействующих с ДНК [24, 25]. Появление остатков тирозина и гистидина отражает усложнение структуры протаминов и повышение их способности связываться с ДНК.

Распределение в иллексине I_{2-1} гидроксиаминокислот серина и треонина — потенциальных сайтов фосфорилирования — носит специфический характер. В N-концевой части молекулы остатки серина равномерно чередуются с аргининовыми кластерами, как в протаминных костистых рыб и центральной части галлина, а в C-концевой половине серин совместно с треонином образует два кластера из трех гидроксиаминокислот: -Ser-Thr-Thr- и -Ser-Thr-Ser- (позиции 35—37 и 45—47 соответственно). Подобный кластер гидроксиаминокислот -Ser-Ser-Thr- найден в ядерном основном белке сперматозоидов акулы и расположен в центральной части молекулы (позиции 26—28) [9].

На основании результатов сравнительного анализа можно заключить, что иллексин I_{2-1} сперматозоидов кальмара *I. argentinus* имеет оригинальную первичную структуру, содержащую одновременно области гомологии с тиннином тунцовых рыб и галлином птиц, что позволяет отнести его к промежуточному (между этими двумя) типу белков, аналогично тому как галлин рассматривают в качестве белка, промежуточного между тиннинами рыб и протаминами млекопитающих [11].

Экспериментальная часть

В работе использованы зрелые сперматофоры кальмара *I. argentinus*, полученные в Атлантическом НИИ рыбного хозяйства и океанографии (Атлант НИИРО, г. Калининград). Материал фиксировали в 96% этаноле непосредственно после вылова кальмаров. Ядра сперматозоидов выделяли по методу [26], суспендируя их в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ CaCl₂, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 50 мМ метабисульфат натрия. Белки экстрагировали из ядер 0,4 н. HCl в течение 2 ч при 4° С, после чего осаждали в 20% трихлоруксусной кислоте и собирали центрифугированием при 3500g. Осадок промывали дважды ацетоном, подкисленным 0,25 н. HCl, трижды — чистым ацетоном и высушивали под вакуумом.

Очистку белков проводили гель-фильтрацией на колонке (2 × 100 см) с сефадексом G-75 (Superfine, Pharmacia, Швеция), уравновешенной 0,05 н. HCl, используя в качестве детектора спектрофотометр СФ-26 (λ 230 нм). Белки из полученных фракций лиофилизировали.

Для разделения иллексина I_2 на две субфракции был применен метод ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой (хроматограф Altex, США), C-18 Lichrosorb (4,6 × 250 мм), уравновешенной 0,1% трифторуксусной кислотой в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Детекцию проводили на проточном спектрофотометре Altex при длине волны λ 280 нм. Хроматографию вели в течение 65 мин со скоростью элюции 1 мл/мин. Собранные фракции продували теплым воздухом для удаления ацетонитрила, после чего высушивали лиофилизацией.

Электрофорез белков в 15% полиакриламидном геле в системе 7% уксусная кислота — 6 М мочевины [26] проводили в стеклянных пластинах (15 × 15 см) в течение 3 ч при 200 В. Гели окрашивали 0,1% раствором кумасси голубого R-250 в 30% этаноле и 7% уксусной кислоте.

Аминокислотный анализ проводили на анализаторе D550 (Durrum, США). Перед анализом белок гидролизovali 24 ч при 110° С под вакуумом в трижды перегнанной 5,7 н. HCl.

N-Концевые аминокислоты устанавливали дансилевым методом [27] с последующей идентификацией дансилпроизводного аминокислотного остатка методом тонкослойной двумерной хроматографии на стеклянных пластинах (6 × 6 см) с силикагелем [28].

Аминокислотная последовательность большей части молекулы иллексина I₂₋₁ была определена на газофазном секвенаторе 470 A (Applied Biosystems, США), Фенилтиогидантоиновые производные аминокислот анализировали методом ВЭЖХ в режиме «on-line» на хроматографе модели 120A PTH-Analyzer той же фирмы [29]. В стандартную программу «03 RPTH» были внесены следующие изменения: на 36-м шаге функция «Argon dry» была заменена на функцию «Pause» [30].

С-Концевую последовательность иллексина I₂₋₁ определяли с помощью карбоксипептидаз А и В (Boehringer, ФРГ), используя или их смесь, или карбоксипептидазы А и В, взятые отдельно. 1 нмоль белка растворяли в 50 мкл этилморфолинового буфера, рН 8,4, и добавляли соответственно 1 и 0,1 мкг карбоксипептидаз А и В. Использовали свежеприготовленный раствор карбоксипептидазы А. Гидролиз проводили 2 ч при 37° С. Реакцию останавливали добавлением уксусной кислоты до рН 3, после чего гидролизаты упаривали и отщепившиеся аминокислоты определяли на аминокислотном анализаторе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poccia D. // Inter. Rev. Cytol. 1986. V. 105. P. 1—65.
2. Bloch D. P. // Handbook of genetics. V. 5. N. Y.— L.: Plenum Press, 1976. P. 139—167.
3. Gusse M., Chevaillier Ph. // J. Cell. Biol. 1980. V. 87. № 1. P. 280—284.
4. Ausio J., Van Holde K. E. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 165. № 2. P. 363—371.
5. Осадчук Л. А., Бердышев Г. Д., Храпунов С. Н. // Структура и генетическое значение белков хроматина эукариот. Киев: Наук. думка, 1985. С. 52—75.
6. Храпунов С. Н., Бердышев Г. Д. // Усп. совр. биологии. 1981. Т. 92. № 3 (6). С. 323—337.
7. Von Holt C., Strickland W., Brandt W., Strickland M. // FEBS Lett. 1979. V. 100. № 2. P. 201—216.
8. Ando T., Yamasaki M., Suzuki K. Protamines. Isolation, characterisation, structure and function. Molecular biology, biochemistry and biophysics. Berlin—Heidelberg—New York: Springer-Verlag, 1973. P. 109.
9. Martinage A., Gusse M., Belaiche D., Sautière P., Chevaillier Ph. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 831. № 2. P. 172—178.
10. Nakano M., Tobita T., Ando T. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1976. V. 8. № 6. P. 565—578.
11. Tobita T., Tsutsumi H., Kato A., Suzuki H., Nomoto M., Nakano M., Ando T. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 744. № 2. P. 141—146.
12. Ammer H., Henschen A. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1987. V. 368. № 12. P. 1619—1626.
13. Subirana J. A., Cozcolluela C., Palau J., Unzeta M. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 317. № 2. P. 364—379.
14. Colom J., Subirana J. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 581. № 2. P. 217—227.
15. Ausio J., Subirana J. A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 6. P. 2802—2805.
16. Кадура С. Н., Осадчук Л. А., Храпунов С. Н., Бердышев Г. Д. // Биохимические механизмы регуляции генетической активности. Тез. докл. республ. симпозиум. Киев, 1984. С. 38.
17. Храпунов С. Н., Кадура С. Н., Драган А. И. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 9. С. 1430—1437.
18. Wouters-Tyrou D., Martin-Ponthieu A., Richard A., Sautiere P. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 953. № 1. P. 86—94.
19. Chauviere M., Martinage A., Briand G., Sautiere P., Chevaillier P. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 169. № 1. P. 105—111.
20. Rodman T. C., Pruslin F. H., Allfrey V. G. // Exp. Cell. Res. 1984. V. 150. № 2. P. 269—281.
21. Samuel T. // Immun. Commun. 1980. V. 9. № 3. P. 283—288.
22. Singh J., Rao M. R. S. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 2. P. 734—740.
23. Юликова Е. П., Есеев Л. К., Рыбин В. К., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Силаев А. Б. // Тез. XI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. 1975. № 6. С. 85.
24. Casswall T. H., Bjoerndahl L., Kvist V. // J. Trace Elem. Electrolytes Health. Dis. 1987. V. 1. № 2. P. 85—87.
25. Hartshorne T. A., Blumberg P., Young E. T. // Nature. 1986. V. 320. № 6059. P. 283—287.
26. Panyim S., Bilek D., Chalkley R. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 13. P. 4206—4215.
27. Gray W. R., Hartley B. S. // Biochem. J. 1963. V. 89. № 1. 59P.
28. Белецкий Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. // Докл. АН СССР, 1967. Т. 172. № 1. С. 94—93.

29. Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. I. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 15. P. 7990—7997.
30. Applied Biosystems Sequencer User Bulletin. 1986. № 21.

Поступила в редакцию
7.VII.1989

L. A. OSADCHUK, N. B. LEVINA *, I. N. TELEZHINSKAYA *, S. N. KHRAPUNOV,
G. D. BERDYSHEV, N. A. ALDANOVA *

PRIMARY STRUCTURE OF THE BASIC NUCLEAR PROTEIN FROM
SPERMATOCYTES OF MOLLUSC *ILLEX ARGENTINUS* AND ITS COMPARISON
WITH STRUCTURES OF SPERMATIC PROTEINS OF OTHER ANIMALS

T. G. Shevchenko Kiev State University, Kiev;

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

The spermatic protein of chromatin I_2 of squid *Illex argentinus* was separated by HPLC into two components I_{2-1} and I_{2-2} . Amino acid sequences of the major portion of protein I_{2-1} (52 residues) and the N-terminal sequence of protein I_{2-2} (21 residues) were determined. Arginines in protein I_{2-1} are arranged in clusters typical of protamines; the first cluster is in the N-terminus, the longest heterogeneous basic cluster is in the central part of the protein chain, the C-terminal part of the molecule contains two clusters of three hydroxyamino acids each. The N-terminal sequences of illexins I_{2-1} and I_{2-2} (1—14 residues) are highly homologous. Homologous regions were found in illexin I_{2-1} , tunnin of tuna fish and avian gallin thus defining the notion of proteins of an intermediate type from mollusc spermatozoa chromatin exemplified by the squid protamine-like protein.