



УДК 547.963.02

9/10⁴ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ЗРИТЕЛЬНОГО РОДОПСИНА *

*Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю.,
Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б.,
Богачук А. С., Мирошников А. И., Мартынов В. И.,
Буделин А. Б.*

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

Родопсин является светочувствительным белком фоторецепторных дисков зрительной клетки. Совокупность полученных к настоящему времени данных позволяет полагать, что при поглощении кванта света хромофором родопсина — 11-*цис*-ретиналем происходит его фотоизомеризация, что в свою очередь вызывает целый ряд сложных превращений, приводящих в конечном итоге к зрительному возбуждению [2].

Очевидно, что функциональная роль и механизм действия родопсина не могут быть окончательно и однозначно поняты без детальной информации о строении и пространственной организации его полипептидной цепи.

Настоящая работа является частью структурно-функциональных исследований родопсина (из сетчатки глаза быка) и посвящена определению его полной аминокислотной последовательности (рис. 1).

К началу данной работы было известно, что родопсин представляет собой интегральный мембранный белок с высоким содержанием гидрофобных аминокислот и состоит из одной полипептидной цепи и двух ковалентно-связанных олигосахаридных цепей [3]. Данные о его частичной аминокислотной последовательности опубликованы ранее [4, 5].

В ходе определения первичной структуры родопсина нашли применение методические приемы и подходы, разработанные при структурно-функциональном исследовании бактериородопсина [6, 7].

Основными методами фрагментации полипептидной цепи родопсина были методы ее химического расщепления по остаткам метионина и триптофана, ферментативный гидролиз апоэмогран химотрипсином и трипсином и ограниченный протеинолиз нативных дисков.

Наиболее ценная структурная информация была получена при изучении продуктов расщепления карбоксиметилированного родопсина по остаткам метионина бромцианом. Полученная смесь пептидов разделялась на две группы по растворимости в 2 М растворе хлоридрата гуанидина и фракционировалась на биогелях с использованием в качестве элюента 80% муравьиной кислоты. Для дальнейшей очистки применялась рехроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография на колонках с обращенной фазой, с градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте или в 10 мМ ацетате аммония. В результате было выделено 15 бромциановых пептидов (см. рис. 1). Пептиды Б-5, Б-6, Б-12 и Б-13 были получены с незначительным выходом ввиду неполного расщепления связей Met-Ser, Met-Thr.

N-Концевая аминокислотная последовательность пептидов определялась по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных, фенилтиогидантоинов и 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоинов, а С-концевая — с по-

* Предварительное сообщение опубликовано ранее, данная статья является исправленным и дополненным вариантом [1].

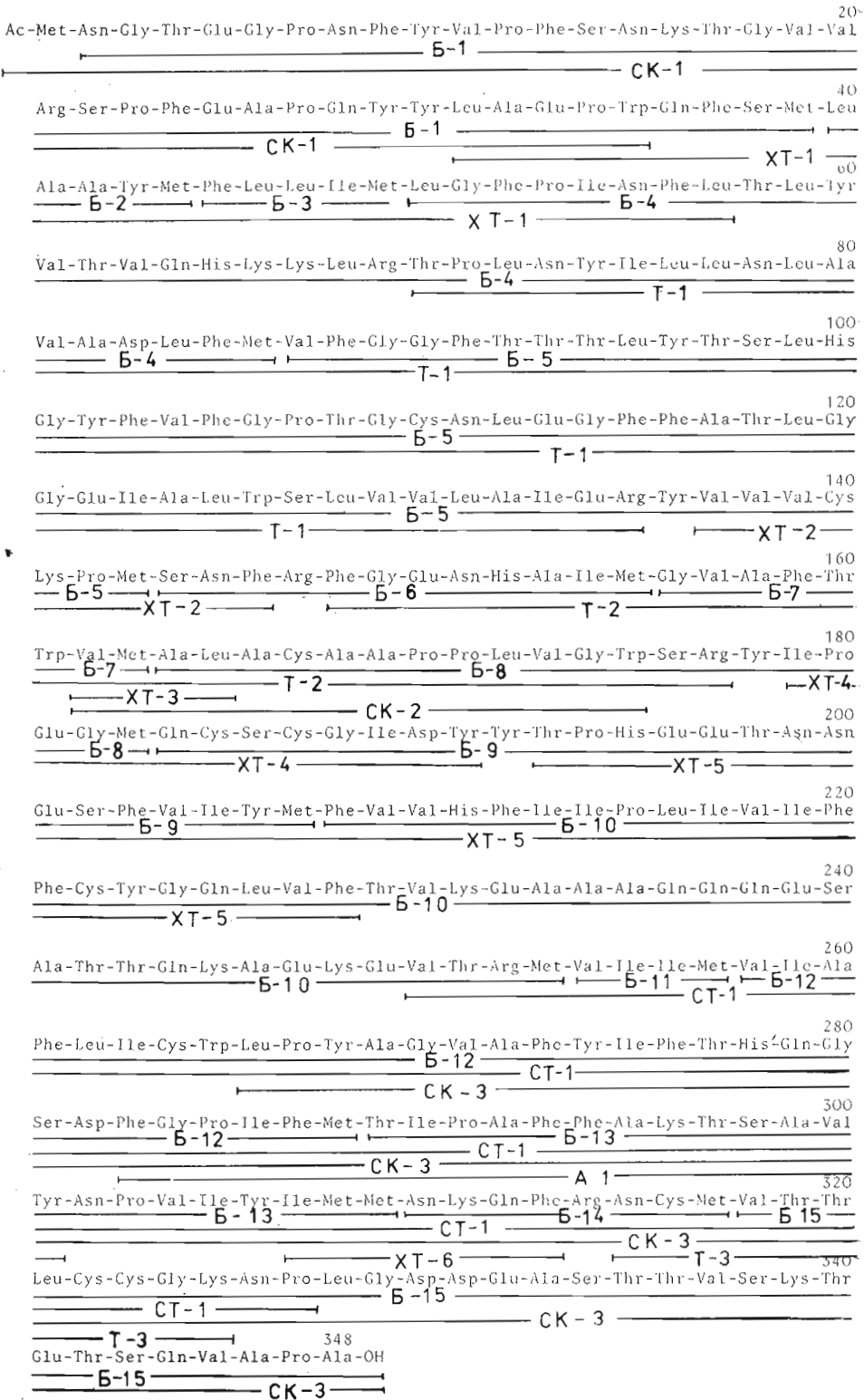


Рис. 1. Полная аминокислотная последовательность зрительного родопсина

мощью карбоксипептидаз А и В и методом гидразинолиза. Для определения N-концевых последовательностей крупных пептидов использовалась автоматическая деградация на жидкостном секвенаторе 890 С (Beckman) по программе 102974 и на твердофазном секвенаторе APS 240 (Rank Hilger).

Бромциановые пептиды Б-2, Б-3, Б-6, Б-7, Б-11 и Б-14 содержали от 4 до 12 аминокислотных остатков, и установление их структуры не вызывало затруднений. Для определения полной структуры крупных бромциановых фрагментов они дополнительно расщеплялись трипсином, химотрипсином, протеиназой из *Staphylococcus aureus*, пепсином, а также BNPS-скатолом и N-бромсукцинимидом по остаткам триптофана и тирозина соответственно, и с помощью частичного кислотного гидролиза.

Структурная информация, полученная в результате установления строения пептидов, выделенных из химотриптического и триптического гидролизатов апомембран, оказалась очень ценной при определении аминокислотной последовательности бромциановых фрагментов. Для разделения полученных пептидов использовали гель-фильтрацию на биогелях в муравьиной кислоте, ионообменную хроматографию, на катионите AG 50W-X4 в градиенте концентрации и рН пиридин-ацетатных буферов и высокоэффективную жидкостную хроматографию. В общей сложности пептиды, выделенные из химотриптического гидролизата, содержали 300 аминокислотных остатков, что составляет 85% аминокислотной последовательности родопсина. Определение структуры ряда пептидов, выделенных из химотриптического и триптического гидролизатов родопсина, дало возможность установить 11 областей перекрытия между бромциановыми фрагментами.

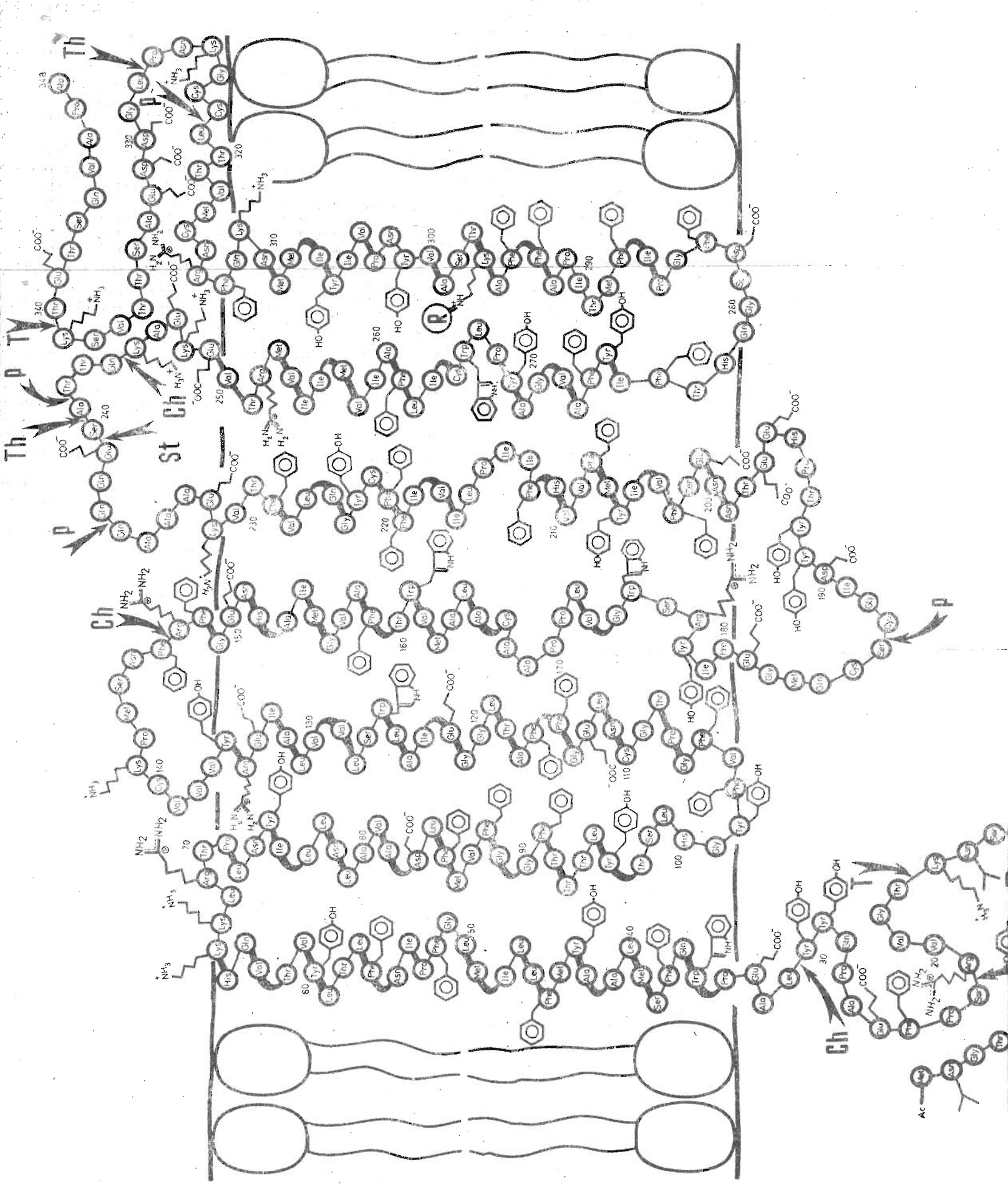
Существенная структурная информация была получена при установлении аминокислотной последовательности крупного фрагмента Ф-2 (241—327), выделенного при ограниченном протеинолизе нативных мембран [8]. При расщеплении этого фрагмента глутаминовой протеиназой из *St. aureus*, а также при его ограниченном кислотном гидролизе были выделены пептиды СТ-1 и А-1 соответственно, определение N-концевой аминокислотной последовательности которых дало возможность найти недостающие перекрытия между бромциановыми фрагментами. Весьма полезными оказались данные по структуре фрагментов СК-2 и СК-3, выделенных при расщеплении родопсина по остаткам триптофана BNPS-скатолом.

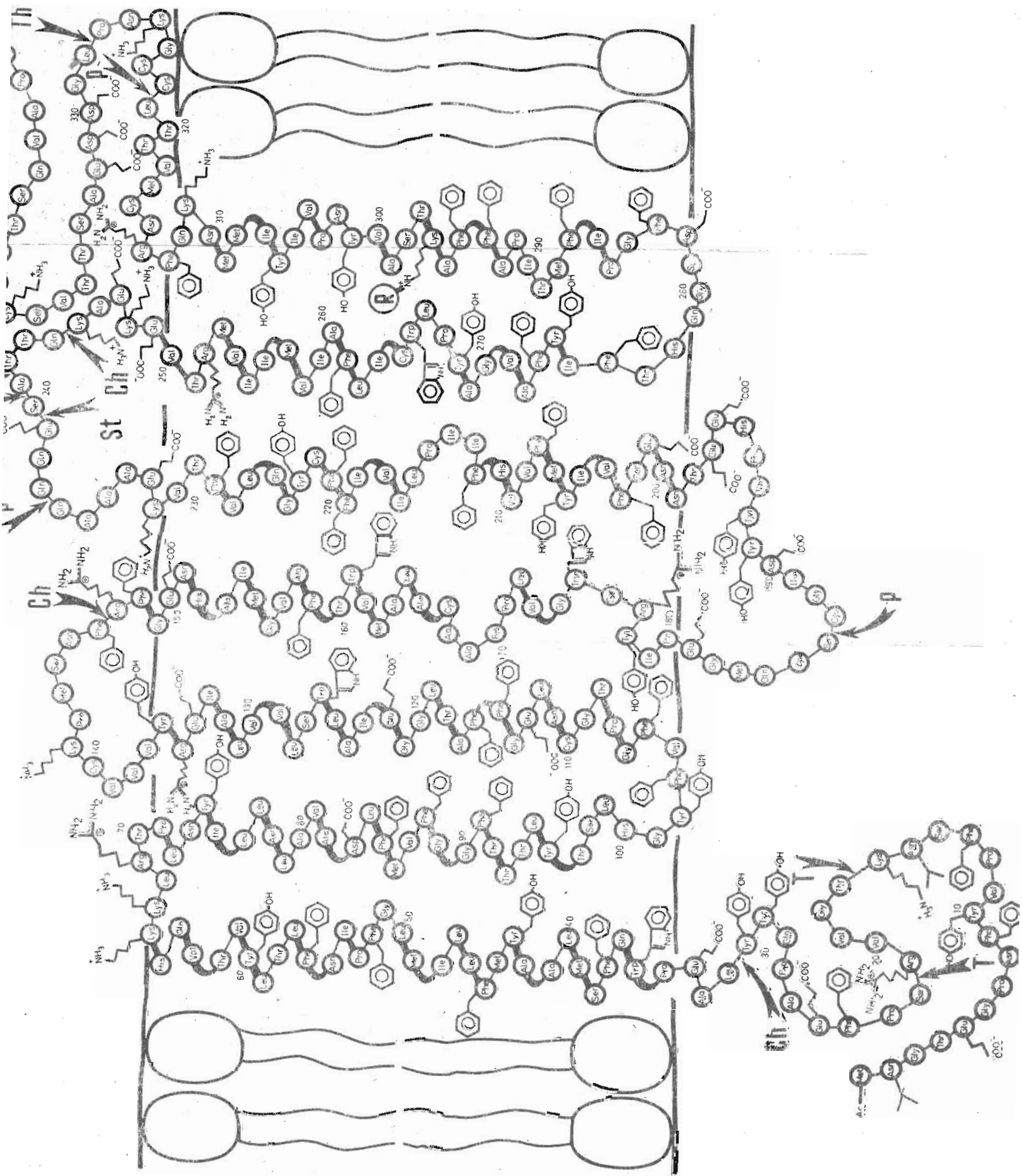
Дополнительная информация о первичной структуре родопсина была получена в результате анализа продуктов последовательного расщепления иммобилизованного на активированном тиол-стекле белка трипсином, протеиназой из *St. aureus* и химотрипсином. Этот подход значительно упростил разделение пептидов и позволил избирательно выделить цистеинсодержащие пептиды родопсина.

Для значительной части аминокислотной последовательности структурная информация была получена различными независимыми методами; при этом оказалось, что в последовательности, приведенной в предварительном сообщении [4], отсутствует один остаток (Тур¹⁹²).

Таким образом, полностью реконструированная полипептидная цепь молекулы родопсина (см. рис. 1) состоит из 348 аминокислотных остатков (M 39 048) и имеет следующий аминокислотный состав: Asp 5, Asn 15, Thr 27, Ser 15, Glu 17, Gln 12, Pro 20, Gly 23, Ala 29, Cys 10, Val 31, Met 16, Ile 22, Leu 28, Tyr 18, Phe 31, His 6, Lys 11, Arg 7, Trp 5.

Подводя итоги определения первичной структуры зрительного родопсина и сравнивая эти результаты с данными по аминокислотной последовательности бактериородопсина [6], можно отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии в первичной структуре, эти белки обладают определенным сходством: наличие блокированных N-концевых аминокислотных остатков, высокое содержание гидрофобных аминокислот, преобладание кислых аминокислот над основными. Особенно отчетливо сходство прослеживается в построении полипептидных цепей этих белков, а именно, в наличии протяженных гидрофобных последовательностей, прерыв-





вающихся гидрофильными участками. Это позволяет дать схему упаковки молекулы родопсина в мембране (рис. 2), которая получила подтверждение в ходе проводимого нами исследования по частичному протеинолизу белка в мембране [9].

Установленная нами аминокислотная последовательность молекулы родопсина, несомненно, является первым этапом в выяснении структурных основ функционирования этого белка в процессе зрительного возбуждения и его взаимодействия с ферментами, участвующими в процессе амплификации сигнала. Такая работа проводится нами в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Аргамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Богачук А. С., Мирошников А. И., Маргынов В. И., Куделин А. Б. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 1011–1014.
2. Uhl R., Abrahamson E. W. Chem. Rev., 1981, v. 81, p. 281–312.
3. Hargrave P. A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 492, p. 83–94.
4. Hargrave P. A., Fong S. L., McDowell J. H., Mas M. T., Curtis D. K., Wang G. K., Juszczak E., Smith D. P. Neurochem. Int., 1980, v. 1, p. 231–244.
5. Pellicone Ch., Bouillon Ph., Virmaux N., Vincendon G. Biochimie, 1981, v. 63, p. 671–676.
6. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Letters, 1979, v. 100, p. 219–224.
7. Abdulaev N. G., Ovchinnikov Yu. A. Methods in Enzymology, 1982, v. 88, p. 723–729.
8. Pober J. S., Stryer L. J. Mol. Biol., 1975, v. 95, p. 477–481.
9. Abdulaev N. G., Artamonov I. D., Bogachuk A. S., Zolotarev A. S., Kostina M. B., Kudelin A. B., Martinov V. I., Miroshnikov A. I., Feigina M. Yu., Ovchinnikov Yu. A. Biochem. International, 1982, in press.

Поступило в редакцию
30.VIII.1982

THE COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF VISUAL RHODOPSIN

OVCHINNIKOV Yu. A., ABDULAEV N. G., FEIGINA M. Yu., ARTAMONOV I. D.,
ZOLOTAREV A. S., KOSTINA M. B., BOGACHUK A. S., MIROSHNIKOV A. I.,
MARTINOV V. I., KUDELIN A. B.

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

The complete amino acid sequence of visual rhodopsin from bovine retina was determined. The polypeptide chain consists of 348 amino acid residues. A model for organization of the protein molecule in the membrane is presented.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.07.82 Подписано к печати 03.09.82 Т-12562 Формат бумаги 70×108/16
Быстрая печать Усл. печ. л. 12,6+1 вкл. Усл. кр.-отт. 11,0 тыс. Уч.-изд. л. 14,6 Бум. л. 4,
Тираж 853 экз. Зак. 1876

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, Р-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10