



УДК 547.963.02

ПОЛНАЯ 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.,  
Гуделин 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 [1].

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 зрительного родопсина 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 [2]. Данные о его частичной структуре опубликованы ранее [3, 4].

В ходе определения первичной структуры родопсина нашли применение методические приемы и подходы, разработанные при структурно-функциональном исследовании бактериородопсина [5, 6].

Наиболее ценная структурная информация была получена при изучении продуктов расщепления 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 (рис. 1).

Пептиды Б-5, Б-6, Б-12 и Б-13 были получены с незначительным выходом ввиду неполного расщепления связей Met — Thr, Met — Ser. N-Концевая аминокислотная последовательность бромциановых пептидов определялась по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных, фенилтиогидантоинов и 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоинов, а C-концевая — с помощью карбоксипептидаз А и В и методом гидразиолиза. Для определения N-концевых последовательностей крупных пептидов использовалась автоматическая деградация на жидкофазном секвенаторе 890 С (Beckman) по программе 102974 и на твердофазном секвенаторе AP 240 (Rank Hilger).

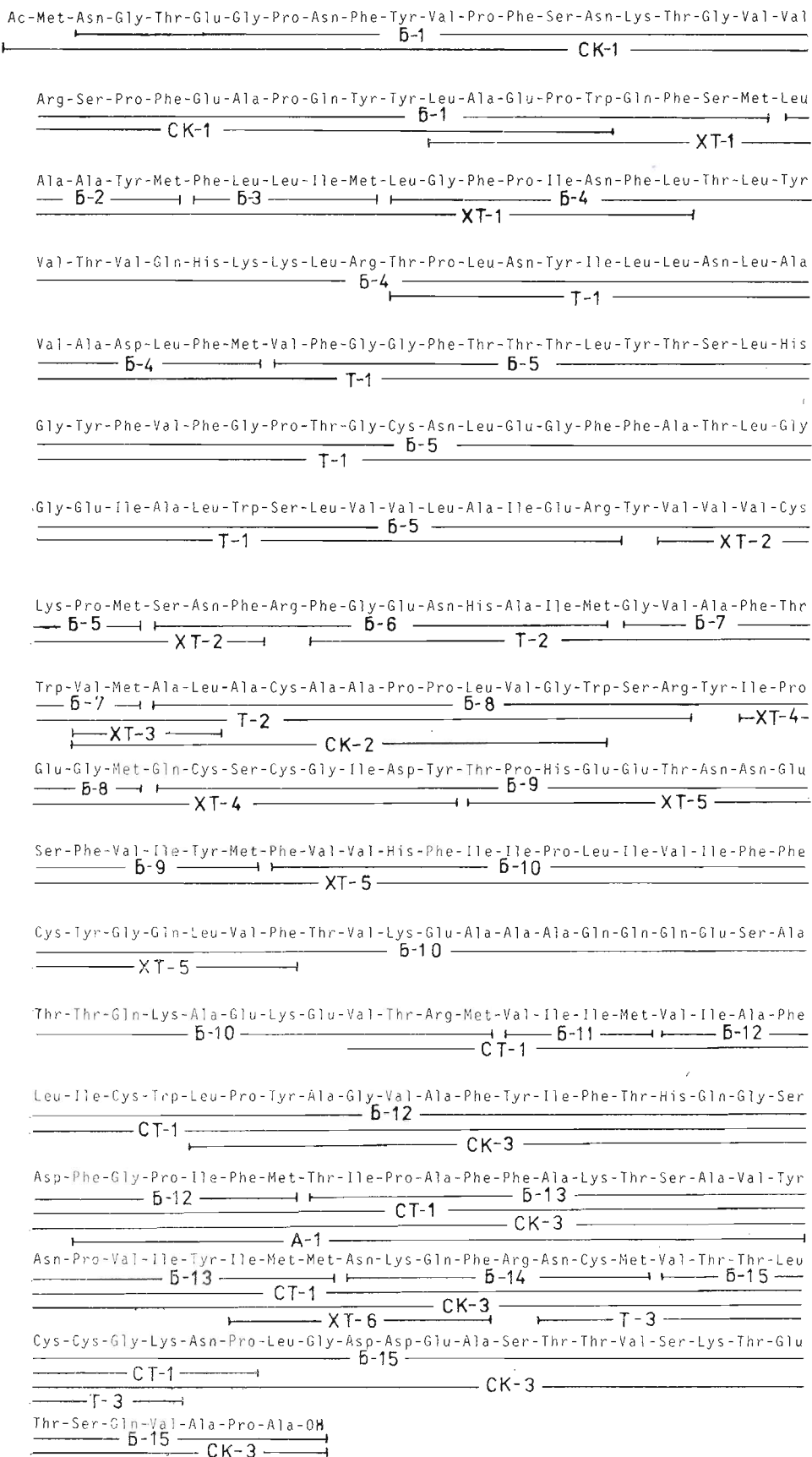
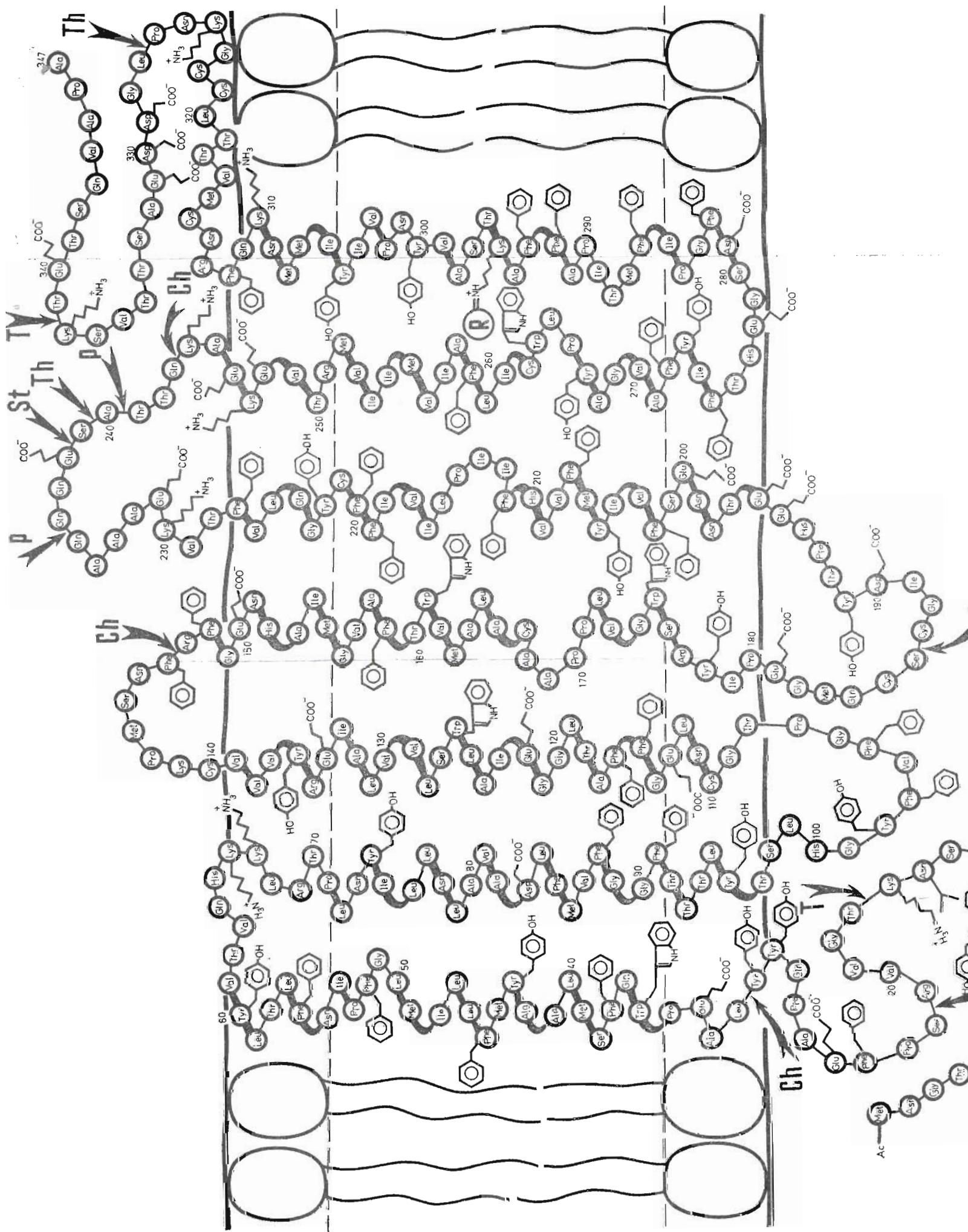


Рис. 1. Полная аминокислотная последовательность зрительного родопсина





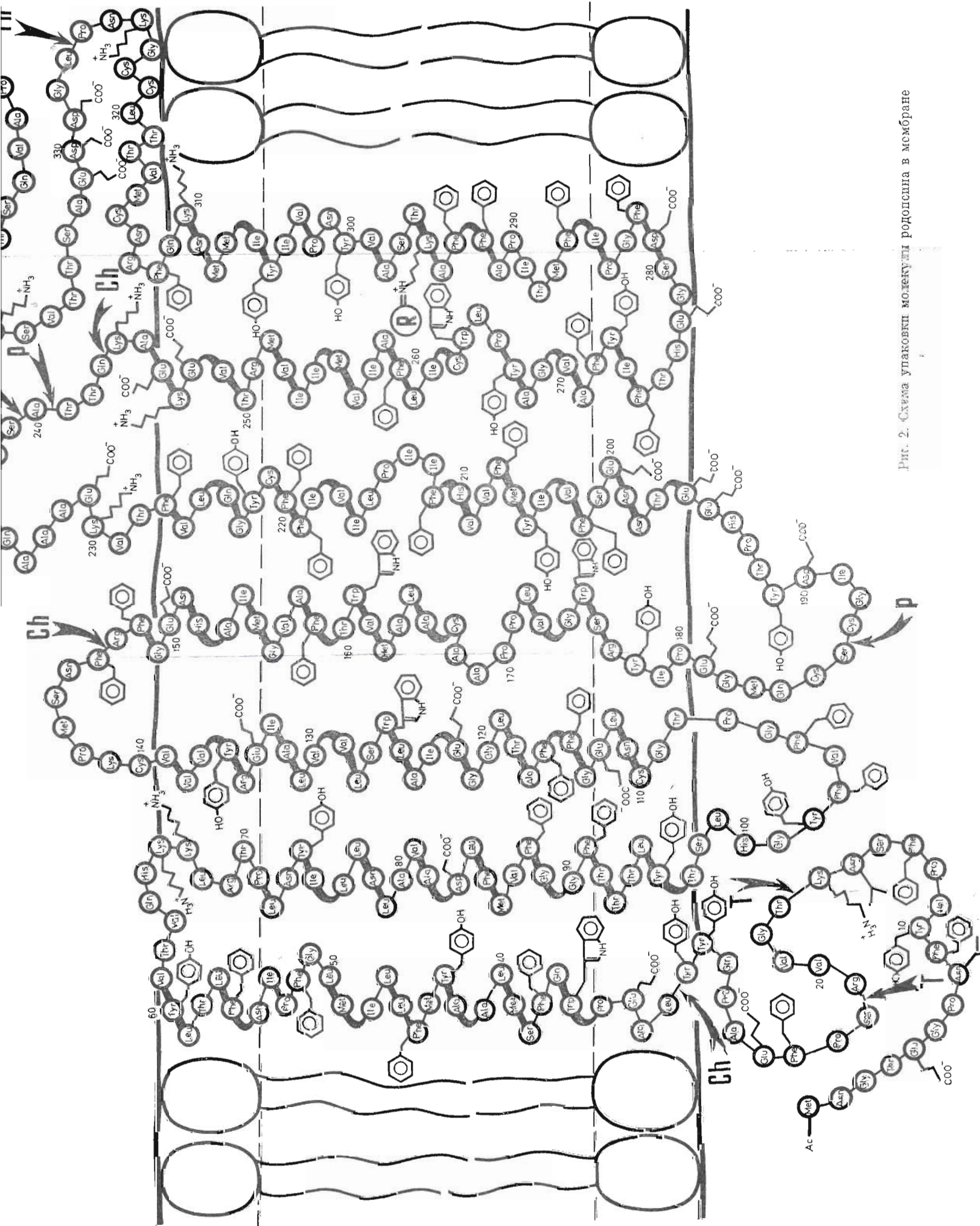


Рис. 2. Схема упаковки молекул родопсина в мембране

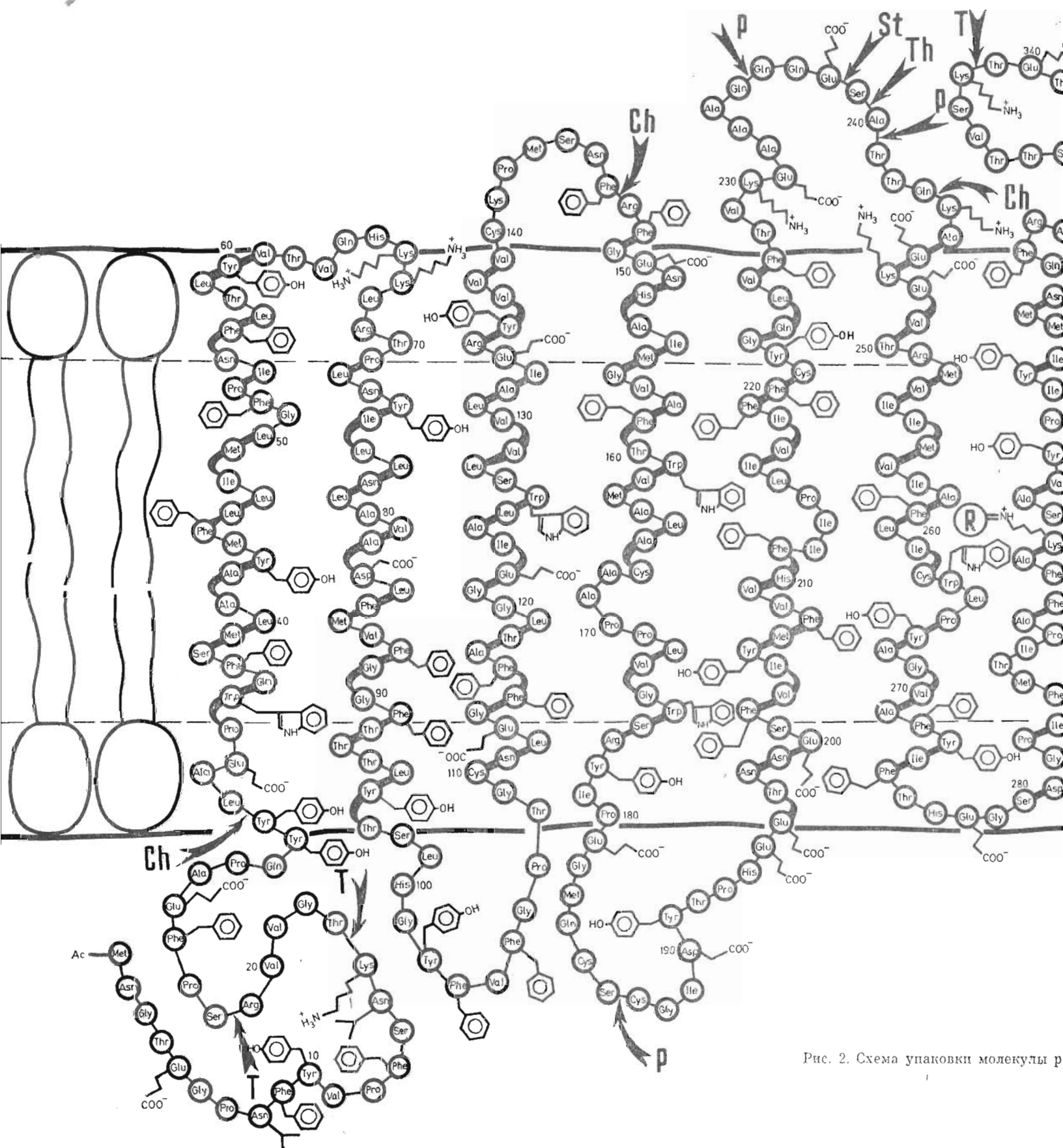


Рис. 2. Схема упаковки молекулы р



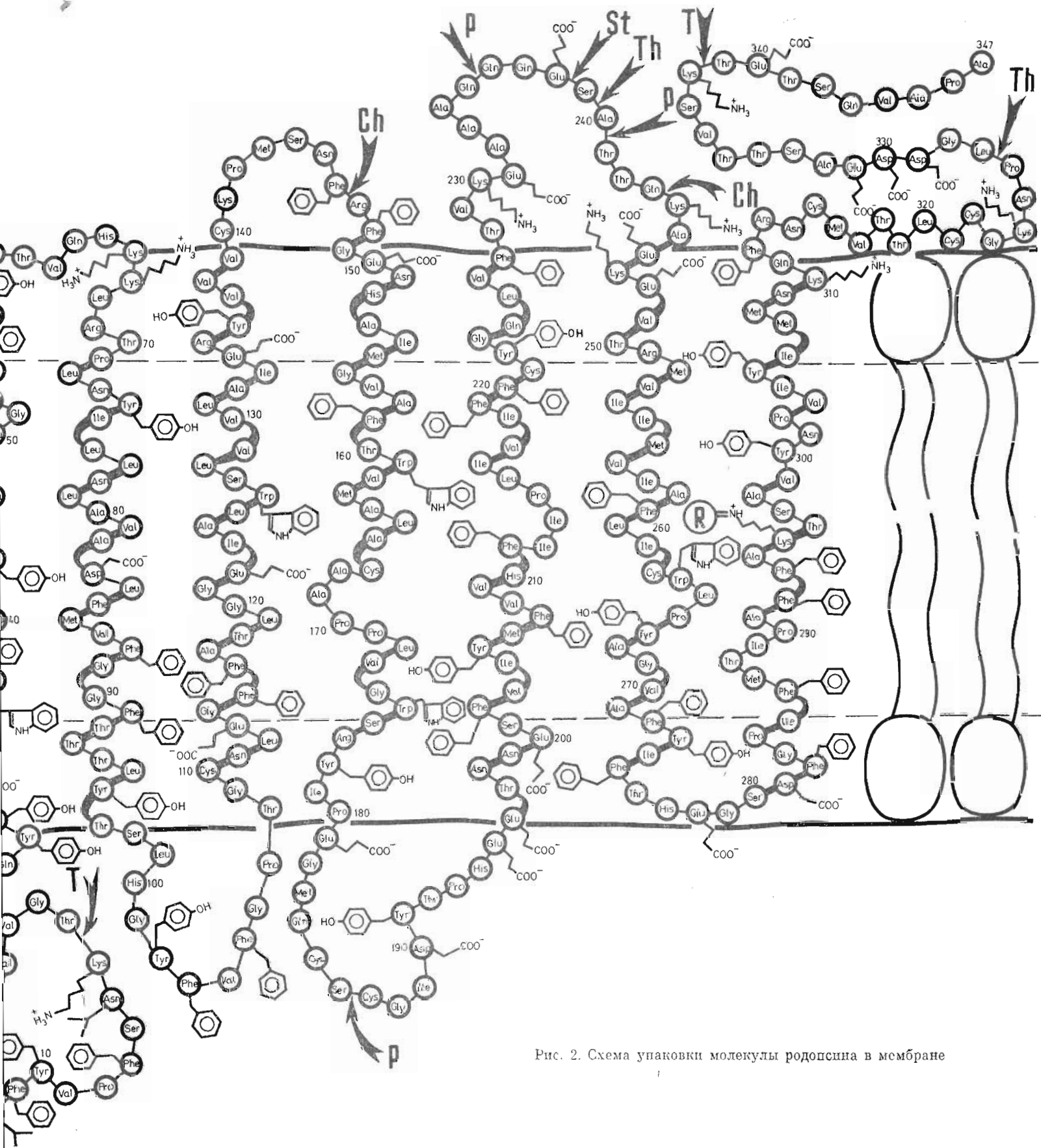


Рис. 2. Схема упаковки молекулы родопсина в мембране

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 вызвало затруднений. Для определения полной структуры крупных бромциановых фрагментов они дополнительно расщеплялись трипсином, химотрипсином, протеназой из *Staphylococcus aureus*, пепсином, а также по остаткам триптофана и тирозина BNPS-скатолом и N-бромсукцинимидом соответственно.

Значительная структурная информация, оказавшаяся очень ценной для определения аминокислотной последовательности бромциановых фрагментов, была получена в результате установления структуры пептидов, выделенных из химотриптического гидролизата апомембран. Для разделения полученных пептидов использовали гель-фильтрацию на биогелях в муравьиной кислоте, ионообменную хроматографию на катионите AG 50x4 в градиенте концентраций и pH пиридин-ацетатных буферов и высокоэффективную жидкостную хроматографию. В общей сложности выделенные пептиды содержали 300 аминокислотных остатков, что составляет 85% аминокислотной последовательности родопсина.

Существенная структурная информация была получена при установлении аминокислотной последовательности крупного фрагмента Ф-2 (240–326), выделенного при ограниченном протеинолизе нативных мембран [7]. При расщеплении этого фрагмента глутаминовой протеиназой из *St. aureus* был выделен пептид СТ-1, определение N-концевой аминокислотной последовательности которого дало возможность найти перекрытия между бромциановыми фрагментами. Весьма полезной оказалась и структура фрагментов СК-2 и СК-3, выделенных при расщеплении родопсина по остаткам триптофана BNPS-скатолом.

Таким образом, полностью реконструированная полипептидная цепь молекулы родопсина состоит из 347 аминокислотных остатков ( $M$  38 850) и имеет следующий аминокислотный состав: Asp 5, Asn 15, Thr 27, Ser 15, Glu 17, Gln 12, Pro 20, Gly 23, Ala 29, Val 31, Met 16, Ile 22, Leu 28, Tyr 17, Phe 31, His 6, Trp 5, Lys 11, Arg 7, Cys 10.

Подводя итоги определения первичной структуры родопсина и сравнивая эти результаты с данными об аминокислотной последовательности бактериородопсина [5], можно отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии в первичной структуре, эти белки имеют определенное сходство: 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, прерывающихся 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 [8].

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. Uhl R., Abrahamson E. W. Chem. Rev., 1981, v. 81, p. 281–312.
2. Hargrave P. A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 492, p. 83–94.
3. 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.
4. Pellicone Ch., Bouillon Ph., Virmaux N., Vincendon G. Biochimie, 1981, v. 63, p. 671–676.
5. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Letters, 1979, v. 100, p. 219–224.
6. Abdulaev N. G., Ovchinnikov Yu. A. Methods in Enzymology, 1982, v. 88, p. 723–729.
7. Pober J. S., Stryer L. J. Mol. Biol., 1975, v. 95, p. 477–481.

8. *Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Artamonov I. D., Zolotarev A. S., Kostina M. B., Miroshnikov A. I., Martinov V. I., Kudelin A. B., Bogachuk A. S.* FEBS Letters, 1982, in press.

Поступило в редакцию  
12.I.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 of Biorganic 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 347 amino acid residues. A model for organization of the protein molecule in the membrane is presented.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*:

---

Сдано в набор 20.04.82      Подписано в печати 07.06.82      Т-07494      Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup>  
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6+1 вкл.      Усл. кр.-отт. 11,1 тыс.      Уч.-изд. л. 13,6,      Бум. л. 4,5  
Тираж 864 экз.      Зак. 1558

---

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