



УДК 577.112.5:577.352.332

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РОДОПСИНА

I. ПЕПТИДЫ БРОМЦИАНОВОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ

*Артимонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б.,
Хорошилова Н. И., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г.*

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

Проведено расщепление карбоксиметилированного препарата родопсина бромцианом по остаткам метионина. Полученная смесь пептидов разделена на две группы по растворимости в 2 М хлоридрате гуанидина. Фракционирование пептидов каждой группы осуществлено гель-фильтрацией на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте. Для дальнейшей очистки пептидов применялась рехроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография. Выделено 15 бромциановых пептидов, составляющих всю полипептидную цепь молекулы белка. Установлена их полная аминокислотная последовательность.

Зрительные клетки обладают способностью трансформировать энергию кванта света в нервный импульс [1]. Главная роль в реализации этого процесса принадлежит светочувствительному хромопротеиду — родопсину, локализованному в мембране фоторецепторных дисков наружных сегментов этих клеток. Светочувствительность родопсина обусловлена наличием в нем в качестве хромофора 11-*цис*-ретинала, присоединенного через протонированную альдиминную связь к ϵ -аминогруппе одного из лизиновых остатков белка [2].

Имеющиеся в настоящее время данные говорят в пользу того, что первичным звеном в цепи событий, приводящих в конечном итоге к зрительному возбуждению, является индуцированная поглощением кванта света изомеризация 11-*цис*-ретинала в *полностью-транс*-форму. Однако вопрос о механизме сопряжения между фотоизомеризацией ретинала и рядом процессов (генерация фотопотенциала [3], увеличение проницаемости фоторецепторной мембраны для ионов [4], активация ферментативных систем [5]), а также конкретно о роли самого родопсина во всех этих процессах остается открытым. Это отчасти объясняется отсутствием данных о первичной структуре родопсина и архитектуре его полипептидной цепи в фоторецепторной мембране.

Нами определена полная аминокислотная последовательность родопсина из сетчатки глаза быка [6—8]. Настоящее сообщение является первым в серии статей, детально описывающих отдельные этапы установления первичной структуры родопсина, и посвящено изучению продуктов бромцианового расщепления этого белка.

Молекула родопсина состоит из одной полипептидной цепи, большая часть которой локализована в липидном матриксе фоторецепторной мембраны [9]. Величина молекулярной массы родопсина, определенная в различных лабораториях с помощью гель-фильтрации, ультрацентрифугирования и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), варьирует в пределах от 28 до 41 кДа [10—12]. Этот разброс является результатом аномального хроматографического и электрофоретического поведения, характерного для родопсина, как и для большинства интегральных мембранных белков [13]. По данным, полученным в нашей лаборатории, молекулярная масса родопсина, определенная с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, равна 38 кДа.

Аминокислотный состав родопсина

Аминокислота	Число остатков ^{1*}	Аминокислота	Число остатков ^{1*}
Asx	22,6 (20)	Met	13,4 (16)
Thr	21,3 (27)	Ile ^{3*}	17,4 (22)
Ser	13,8 (15)	Leu ^{3*}	28,7 (28)
Glx	29,1 (29)	Tyr	15,3 (18)
Pro	16,3 (20)	Phe	30,4 (31)
Gly	23,7 (23)	His	6,1 (6)
Ala	26,9 (29)	Lys	12,6 (11)
Cys ^{2*}	9,7 (10)	Arg	8,7 (7)
Val ^{3*}	27,4 (31)	Trp ^{1*}	4,8 (5)

^{1*} В скобках указано число аминокислотных остатков, исходя из установленной структуры [6].

^{2*} Определено после окисления надмуравьиной кислотой.

^{3*} Результаты 72-часового гидролиза.

^{4*} Определено после гидролиза метансульфоновой кислотой.

N- и C-Концевыми аминокислотными остатками родопсина являются соответственно N-ацетилметионин и аланин [14, 15].

Молекула родопсина содержит две углеводные цепи, присоединенные N-гликозидной связью к остаткам аспарагина в положениях 2 и 15 [16].

Полученные нами результаты аминокислотного анализа родопсина приведены в табл. 1. Аминокислотный состав белка рассчитан на молекулярную массу 38 кДа. Как видно из таблицы, молекула белка отличается высоким содержанием (~65%) неполярных аминокислот. Определение первичной структуры интегральных мембранных белков, характеризующихся высоким содержанием гидрофобных аминокислот, остается до настоящего времени сложной задачей, несмотря на значительные успехи, достигнутые в этой области за последние годы. Склонность к агрегации и низкая растворимость делипидированных препаратов мембранных белков и их фрагментов приводят к необходимости модификации известных классических методик и разработке специальных методических приемов и методологических подходов при их структурном анализе.

В ходе определения первичной структуры родопсина нашли применение методические приемы, разработанные при структурно-функциональном исследовании бактериородопсина [17]. Так, в качестве основного метода фрагментации полипептидной цепи родопсина было выбрано расщепление белка бромцианом по остаткам метионина.

Фоторецепторные мембраны выделяли как описано ранее [18]. Карбоксиметилирование родопсина проводили по методике [19] с некоторыми модификациями. Карбоксиметилированный белок освобождали от липидов, ретиналя и детергента высаживанием 80% этанолом.

Расщепление карбоксиметилированного белка бромцианом проводили в 80% муравьиной кислоте 500-кратным мольным избытком реагента в расчете на метионин. Попытки разделить общую смесь бромциановых пептидов гель-фильтрацией с использованием высоких концентраций наиболее эффективных дезагрегирующих агентов (8 М мочевины, 8 М хлоргидрат гуанидина (Gun·HCl), 80% муравьиная кислота) не дали удовлетворительных результатов. Даже в этих условиях большая часть пептидного материала находилась в агрегированном состоянии и элюировалась со свободным объемом колонки.

Для разделения этих пептидов наиболее эффективным оказался метод, основанный на их предварительном фракционировании путем высаживания из растворов в концентрированном хлоргидрате гуанидина при снижении концентрации последнего до 2 М. При этом общая смесь пептидов была разделена на две группы. Первая группа (нерастворимые пептиды) состояла в основном из четырех крупных, наиболее гидрофобных фрагментов, в то время как вторая группа (растворимые пептиды) содержала сравнительно небольшие, менее гидрофобные фрагменты. Распределение пептидов между этими двумя группами было практически количествен-

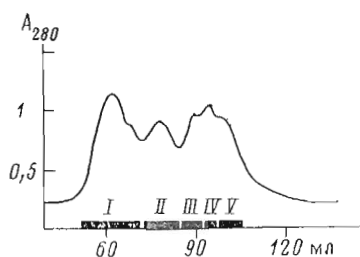


Рис. 1

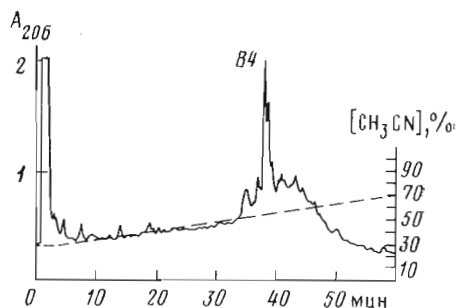


Рис. 2

Рис. 1. Разделение бромциановых пептидов, нерастворимых в 2 М $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$, на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30 в 80% муравьиной кислоте. Здесь и далее прямоугольники на оси абсцисс — границы объединения фракций

Рис. 2. Разделение фракции V рис. 1 ВЭЖХ в системе А

Рис. 3. Разделение бромциановых пептидов, растворимых в 2 М $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$, на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30 в 80% муравьиной кислоте

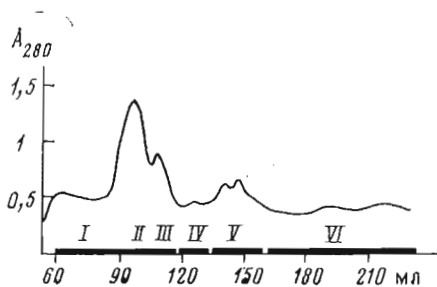


Рис. 3

ным, за исключением пептида В4*, который был обнаружен как в супернатанте, так и в осадке примерно в одинаковых количествах. Таким образом, этот подход значительно снизил агрегацию фрагментов и позволил добиться не только хорошего разделения пептидов с весьма близкими значениями молекулярной массы, но и облегчил и ускорил их дальнейшую очистку высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

Разделение пептидов каждой из двух групп осуществляли гель-фильтрацией на колонках с биогелем в 80% муравьиной кислоте. При разделении пептидов первой группы на биогеле Р-30 было получено пять фракций (рис. 1). Фракция I содержала агрегаты пептидов и в дальнейшем разделению не подвергалась. Фракции II—V содержали в основном фрагменты В5+В6, В10, В12+В13 и В4 соответственно. Первые два фрагмента были очищены рехроматографией на биогеле Р-30, а пептиды В12+В13 и В4 — с помощью ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой с использованием градиента концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (рис. 2; в этих же условиях время удерживания пептида В12+В13 равно 43 мин).

Пептиды второй группы после обессоливания также разделяли гель-фильтрацией на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте (рис. 3). Фракция I, так же как и при разделении пептидов первой группы, содержала агрегированный материал, но в значительно меньшем количестве. Фракции II и IV содержали индивидуальные пептиды В1 и В15 соответственно. Фракция III представляла собой в основном пептид В4, выделенный ранее из смеси пептидов первой группы, и небольшое количество пептида В1. Фракции V и VI состояли из смеси пептидов, которые были разделены ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой. Фракция V содержала три пептида: В8, В9 и В13. Для выделения пептидов В8 и В9 был использован градиент концентрации ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония (рис. 4). Пептид В13 удалось выделить ВЭЖХ в системе В (см. «Эксп. часть», время удерживания пептида 48 мин). Фракция VI содержала шесть небольших пептидов (В2, В3, В6, В7, В11 и В14), которые были разделены ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (рис. 5). Пептиды В6 и В13 были получены с незначительным

* Нумерация бромциановых пептидов дана в соответствии с порядком их расположения в полипептидной цепи белка [6, 20].

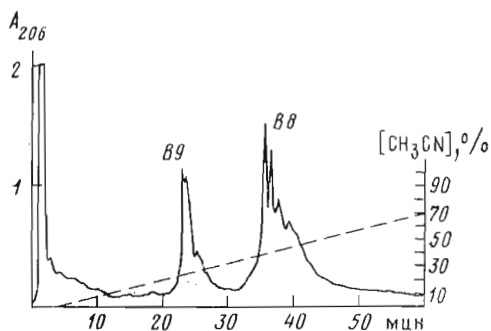


Рис. 4. Разделение фракции V рис. 3 ВЭЖХ в системе С

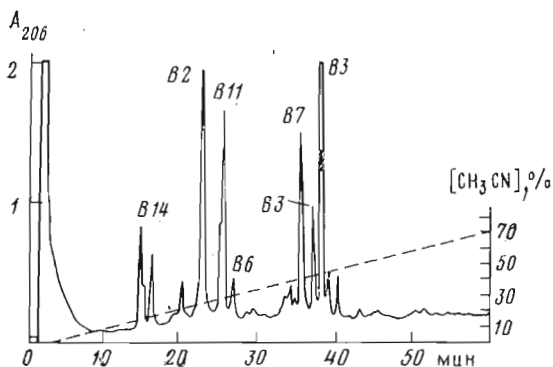


Рис. 5. Разделение фракции VI рис. 3 ВЭЖХ в системе В

выходом ввиду неполного расщепления бромцианом связей Met-Ser и Met-Thr [21, 22]. В качестве основных продуктов, отвечающих данному участку полипептидной цепи белка, были выделены фрагменты B5+B6 и B12+B13, содержащие не расщепленные бромцианом связи Met¹⁴³-Ser и Met²³⁸-Thr соответственно (см. [20]).

В табл. 2 приведен аминокислотный состав выделенных бромциановых фрагментов.

N-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных (Dns), фенилтиогидантоинов (Pth) и 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоинов (Dabth), а C-концевую — с помощью карбоксипептидаз А и В и методом гидразинолиза. N-Концевую последовательность крупных пептидов определяли автоматической деградацией на жидкофазном и твердофазном секвенаторах.

Бромциановые пептиды B2, B3, B6, B7, B11, B13 и B14 содержали от четырех до 12 аминокислотных остатков, и установление их структуры не вызвало затруднений. Для определения полной структуры крупных бромциановых фрагментов их дополнительно расщепляли трипсином, химотрипсином, протеиназой из *St. aureus*, пепсином, а также по остаткам тирозина N-бромсукцинимидом или осуществляли ограниченный кислотный гидролиз. Вследствие плохой растворимости пептидов в водных средах ферментативные расщепления в ряде случаев проводили в суспензии с использованием высоких (1 : 10) фермент-субстратных соотношений.

Иногда для установления аминокислотной последовательности крупного фрагмента необходимо было проведение трех и более видов гидролиза. Полученные в результате расщепления смеси пептидов разделяли гель-фильтрацией и ВЭЖХ в различных системах.

В ходе структурного анализа бромциановых фрагментов широко использовались данные, полученные в результате установления структуры пептидов, выделенных из различных гидролизатов всей молекулы белка,

Аминокислотный состав пептидов бромцанового расщепления родопина

Аминокислота	B1	B2	B3	B4	B5+ +B6*	B6	B7	B8	B9	B10*	B11	B12+B13	B13	B14	B15
Cys (Cm)															
Asp	3,19(3)			4,15(4)	2	1,95(2)	0,96(1)	0,57(1)	1,20(2)	4		0,61(4)	1,30(1)	0,63(1)	1,28(2)
Thr	2,24(2)			3,15(3)	3				3,07(3)	4		2,13(2)	2,41(2)	2,13(2)	3,36(3)
Ser	2,68(3)				6	1,23(1)		1,30(1)	1,83(2)	4		3,23(3)	2,41(2)	2,13(2)	5,93(6)
Glu	4,82(5)			1,31(1)	3	1,08(1)		1,31(1)	1,87(2)	1		2,13(2)	1,28(1)	1,23(1)	2,91(3)
Pro	4,80(5)			2,47(2)	4			2,80(3)	3,94(4)	9		3,79(4)	1,97(2)		3,34(3)
Gly	2,91(3)			1,57(1)	2	1,31(1)	1,14(1)	1,72(2)	1,37(1)	1		3,30(3)	3,14(3)		2,41(2)
Val 2**	2,24(2)	2,36(2)		2,47(2)	9	1,11(1)	1,06(1)	4,13(4)	1,04(1)	1		6,16(6)	1,93(2)		2,87(2)
Val 2**	2,93(3)			2,95(3)	4		1,71(2)	0,91(1)	1,04(1)	5	1,00(1)	3,80(4)	0,39(1)		2,88(2)
Hse	0,42(1)	0,38(1)		0,54(1)	7	0,48(1)	0,48(1)	0,41(1)	0,36(1)	6	0,40(1)	0,38(1)		0,52(1)	2,76(3)
Met					1					1		0,7(1)			0,49(1)
Ile 2**				1,68(2)	3	1,01(1)		1,01(1)	1,31(2)	4	2,21(2)	6,69(7)	2,98(3)		
Leu 2**	4,21(1)	1,00(1)		9,09(9)	7			1,84(2)	1,99(2)	2		1,99(2)			2,00(2)
Tyr	2,76(3)	1,40(1)		1,90(2)	3			0,73(1)	2,77(3)	1		3,81(4)	1,80(2)		
Phe	3,76(4)			3,41(3)	8	1,87(2)	1,00(1)		1,00(1)	5		6,70(7)	1,83(2)	0,98(1)	
His				1,07(1)	2	1,14(1)			0,87(1)	1		1,01(1)			
Lys	1,00(1)			2,00(2)	1	1,00(1)				3		1,00(1)	1,00(1)	1,00(1)	1,73(2)
Arg	0,79(1)			1,2(1)	2			1,00(1)		1		1,00(1)		1,13(1)	
Tyr 3**	0,72(1)				1		0,60(1)	0,54(1)				0,60(1)			
Число остатков	38	5	5	37	69	12	8	20	24	46	4	51	20	8	31
N-Концевая	Asn	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Gly	Ala	Gln	Phe	Val	Val	Thr	Asn	Val
Выход, %	61	69	69	54	35	3	20	35	53	30	60	38	3	20	60

* Приведен аминокислотный состав, исходя из установленной первичной структуры [6].

** Результаты 72-часового гидролиза.

*** Определено после гидролиза метансульфоновой кислотой.

Asn-Gly-Thr-Glu-Gly-Pro-Asn-Phe-Tyr-Val-Pro-Phe-Ser-Asn-Lys-Thr-Gly

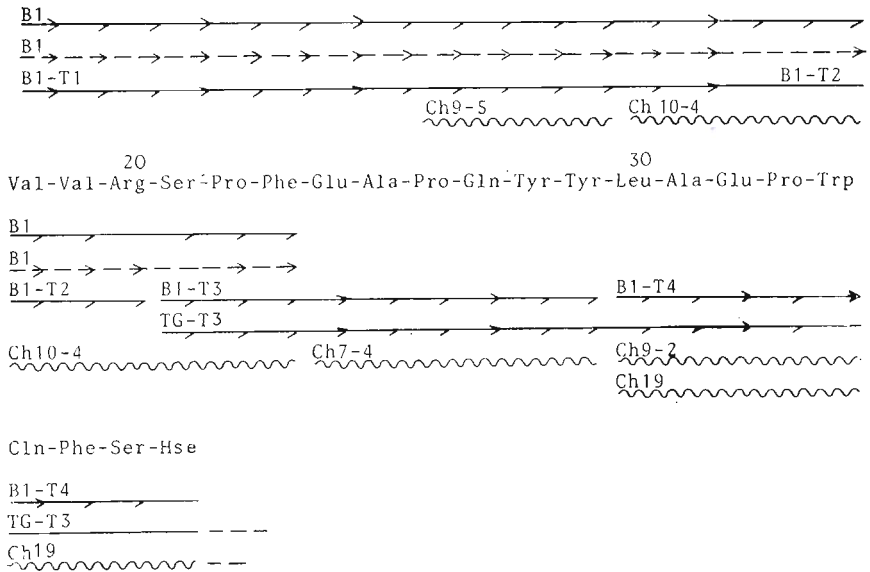


Рис. 6. Структура бромцианового пептида B1. Здесь и далее приняты следующие обозначения: стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных (→), Dns- и Pth-производных (⇨), Dabth-производных (---→), неидентифицированные аминокислоты (—), пептиды химотриптического гидролизата апомембран (~~~~), B — пептиды, полученные после расщепления бромцианом, T, Ch — пептиды, полученные после гидролиза соответственно трипсином и химотрипсином, TG — пептиды, полученные при расщеплении белка, иммобилизованного на тиолстекле

главным образом из химотриптического гидролизата апомембран флуоресцентных дисков [23].

Ниже приведено описание определения аминокислотной последовательности выделенных бромциановых пептидов.

Пептид B1 (2—39) (рис. 6). Деградацией пептида B1 по методу Эдмана найдена последовательность 23 аминокислотных остатков. Для получения дополнительной информации проведен триптический гидролиз пептида и из гидролизата методом ВЭЖХ выделены четыре триптических фрагмента (B1-T1—B1-T4), аминокислотный состав которых приведен в табл. 3. Фрагменты B1-T3 и B1-T4 образовались в результате неспецифического расщепления связи Tyr-Leu.

Установить порядок расположения фрагментов B1-T3 и B1-T4 удалось в результате определения аминокислотной последовательности пептида TG-T3, выделенного из триптического гидролизата родопсина, иммобилизованного на тиолстекле по тиольным группам остатков цистеина*. Установленную структуру пептида B1 подтверждают данные, полученные при анализе строения пептидов химотриптического гидролизата апомембран: Ch 9-5, Ch 10-4, Ch 7-4, Ch 9-2, Ch 19**.

Сравнение структуры бромцианового пептида B1 со структурой пептида Sk-1, имеющего блокированный N-концевой аминокислотный остаток (Ac-Met [14]), полученного после расщепления родопсина BNPS-скатолом по остаткам триптофана [20], позволило однозначно установить, что оба эти фрагмента отвечают N-концевой области полипептидной цепи белка.

Структура пептида B1, установленная нами, совпала с опубликованной ранее [24], за исключением положения остатков Trp³⁵ и Gln³⁶, для которых в указанном сообщении найдена обратная последовательность Gln-Trp.

* Данные будут опубликованы в отдельном сообщении.

** Здесь и далее обозначения химотриптических пептидов родопсина и данные об их структуре приведены в соответствии с результатами работы [23].

Аминокислотный состав триптических фрагментов бромциановых пептидов В1 и В4

Аминокислота	В1-Т1	В1-Т2	В1-Т3	В1-Т4	В4-Т1	В4-Т3
Cys(Cm)						
Asp	3,12(3)				1,31(1)	2,98(3)
Thr	1,21(1)	1,18(1)			1,79(2)	1,06(1)
Ser	1,49(1)		1,20(1)	1,15(1)		
Glu	1,14(1)		2,28(2)	2,13(2)	1,13(1)	
Pro	1,98(2)		2,00(2)	1,00(1)	1,12(1)	1,02(1)
Gly	2,31(2)	1,20(1)			1,34(1)	
Ala			1,15(1)	1,09(1)		1,77(2)
Val*	0,91(1)	1,91(2)			2,35(2)	0,94(1)
Hse				0,39(1)		0,37(1)
Ile*					1,08(1)	0,70(1)
Leu*				0,97(1)	3,34(3)	4,91(5)
Tyr	0,82(1)		1,87(2)		0,80(1)	0,77(1)
Phe	1,98(2)		0,99(1)	0,81(1)	2,00(2)	1,00(1)
His					0,99(1)	
Lys	1,00(1)				1,33(1)	
Arg		1,00(1)				
Trp**				+(1)		
Число остатков	15	5	9	9	17	17
N-Концевая	Asn	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr

* Результаты 72-часового гидролиза.

** Триптофан определяли качественно по реакции Эрлиха.

Таблица 4

Аминокислотный состав пептических пептидов бромцианового фрагмента В5+В6

Аминокислота	P1	P3	P4	P5	P9	P10	P12
Cys(Cm)				0,58(1)			0,68(1)
Asp				1,14(1)			1,23(1)
Thr		1,23(1)		1,08(1)			
Ser		1,12(1)			1,12(1)		1,05(1)
Glu							
Pro				1,00(1)			1,10(1)
Gly	2,31(2)		1,21(1)	2,30(2)			
Ala							
Val*	0,87(1)			1,11(1)		1,83(2)	2,78(3)
Hse							
Met							0,81(1)
Ile*							
Leu*		1,00(1)			1,08(1)	1,15(1)	
Tyr		0,82(1)	0,89(1)				
Phe	2,00(2)		1,00(1)	1,05(1)			0,98(1)
His			0,97(1)				
Lys							1,00(1)
Arg							
Trp**					+(1)		
Число остатков	5	4	4	8	3	3	10
N-Концевая	Val	Tyr	His	Val	Trp	Val	Val

Примечание. См. сноски в табл. 3.

Пептид В2 (40-44). $\overrightarrow{\text{Leu-Ala-Ala-Tyr-Hse}}$.Пептид В3 (45-49). $\overrightarrow{\text{Phe-Leu-Leu-Ile-Hse}}$.

Пептид В4 (50-86) (рис. 7). Автоматической деградацией пептида определена последовательность 24 аминокислотных остатков. Попытки охарактеризовать С-концевую область пептида с помощью карбоксипептидаз оказались безуспешными из-за низкой растворимости пептида в водных буферных системах, пригодных для проведения ферментативного

определения структуры пептида Ch4-2, выделенного из супернатанта химотриптического гидролизата апомембран.

Пептид B5+B6 (87—155) (рис. 8) является самым крупным фрагментом бромцианового расщепления родопсина и содержит плохо расщепляемую бромцианом связь Met¹⁴³-Ser. При автоматической деградации этого пептида получена информация о последовательности 31 аминокислотного остатка. Попытки расщепить пептид трипсином оказались безуспешными. Однако удалось провести гидролиз пептида B5+B6 пепсином в жестких условиях. Аминокислотный состав пептидов, выделенных в индивидуальном состоянии (см. рис. 9), приведен в табл. 4. Три фракции представляли собой парные смеси (P2+P7, P6+P8, P11+P13). Структура пептидов всех фракций определена деградацией по методу Эдмана, причем данные о структуре бромцианового пептида B6 (см. ниже) и N-концевой последовательности исходного пептида B5+B6 позволили установить аминокислотную последовательность смесевых фракций без их дальнейшего разделения.

Перекрытия между отдельными пептическими фрагментами получены в результате определения строения ряда пептидов химотриптического гидролизата апомембран (Ch6-7, Ch14-4, Ch3-5, Ch7-5, Ch8-6, Ch5-3). Для получения недостающих перекрытий в пептиде B5+B6 использовали расщепление родопсина, иммобилизованного на тиолстекле (см. выше). После обработки иммобилизованного белка трипсином, а затем VNPS-скатоном выделен пептид TG-Sk1, после последовательной обработки трипсином, протеиназой из *St. aureus* — пептид TG-Sp1, а после гидролиза трипсином, протеиназой из *St. aureus* и химотрипсином — цистеинсодержащий пептид TG2.

На основании совокупности приведенных результатов была установлена полная аминокислотная последовательность пептида B5+B6.

Пептид B6 (144—155) Ser-Asn-Phe-Arg-Phe-Gly-Glu-Asn-His-Ala-Ile-Hse.

Пептид B7 (156—163). Gly-Val-Ala-Phe-Thr-Trp-Val-Hse.

Пептид B8 (164—183) (рис. 10). Методом Эдмана идентифицировано 15 аминокислотных остатков. Для получения дополнительной структурной информации проведен гидролиз пептида B8 химотрипсином. Методом ВЭЖХ выделено четыре химотриптических фрагмента: B8-Ch1, B8-Ch2, B8-Ch3, B8-Ch4 (см. табл. 5). Определение структуры полученных химотриптических фрагментов дало возможность установить полную аминокислотную последовательность бромцианового пептида B8. Следует отметить, что структура химотриптических фрагментов пептида B8 (B8-Ch1, B8-Ch3, B8-Ch4) совпадает со структурой химотриптических фрагментов апомембран Ch3-4, Ch16, Ch3-2 соответственно.

Пептид B9 (184—207) (рис. 11). Для определения структуры пептида B9 потребовалось проведение двух дополнительных расщеплений — гидролиза химотрипсином (B9-Ch) и ограниченного кислотного гидролиза (B9-A). Полученные продукты разделяли методом ВЭЖХ, аминокислотный состав выделенных фрагментов приведен в табл. 5. Пептид B9 не содержал свободной α-аминогруппы, поэтому его N-концевую последовательность определяли с помощью пептидов химотриптического гидролиза

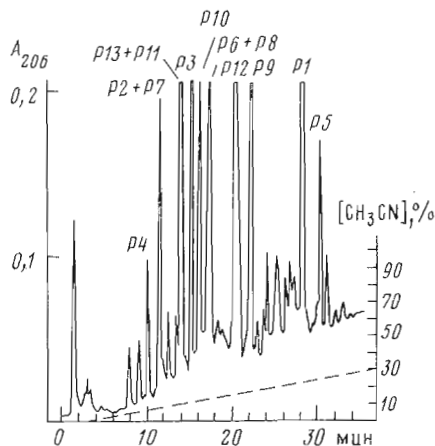


Рис. 9. Разделение пептидов, полученных при гидролизе пепсином бромцианового фрагмента B5+B6, ВЭЖХ в системе С

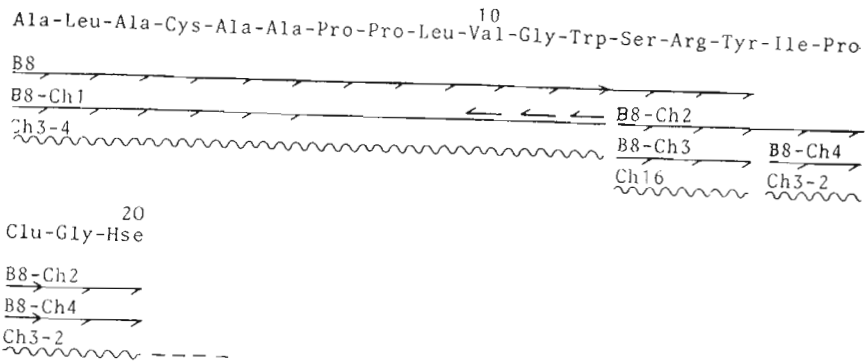


Рис. 10. Структура бромцианового пептида B8

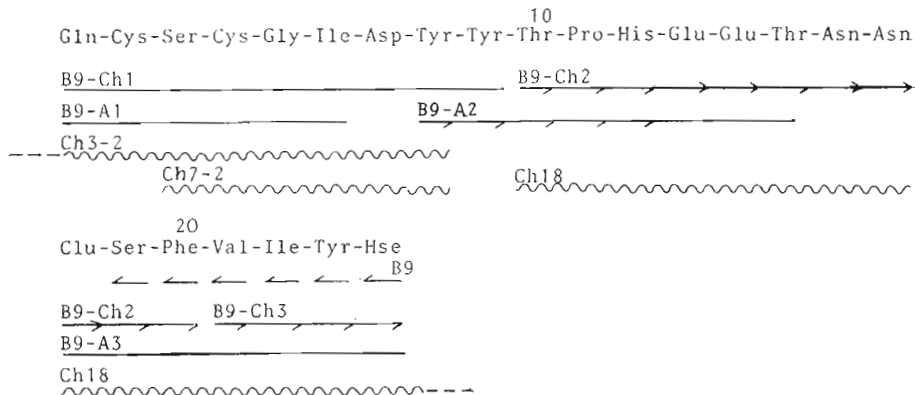


Рис. 11. Структура бромцианового пептида B9. А — пептиды, полученные после ограниченного кислотного гидролиза

апомембран (Ch7-2, Ch3-2). Результаты определения строения мембрано-связанного химотриптического фрагмента Ch18 дали дополнительную информацию для завершения реконструкции полной аминокислотной последовательности пептида B9.

Пептид B10 (208—253) (рис. 12). При автоматической деградации пептида получена информация о последовательности 27 аминокислотных остатков. Пептид подвергали химическому расщеплению по единственному остатку тирозина N-бромсукцинимидом. Однако результаты установления частичного строения пептидов B10-NBS1 и B10-NBS2 позволили только подтвердить уже известную N-концевую последовательность пептида B10.

Из супернатанта химотриптического гидролизата апомембран были выделены пептиды Ch10-1 и Ch5-1, определение структуры которых позволило удлинить известную N-концевую последовательность до 37 аминокислотных остатков.

Полная структура пептида B10 установлена после определения автоматической деградацией N-концевой аминокислотной последовательности фрагмента F2, образующегося при расщеплении нативных мембран термолизином [25].

Пептид B11 (254—257). Val-Ile-Ile-Hse.

Пептид B12+B13 (258—308) (рис. 13). При установлении структуры фрагмента использовали метод Эдмана с применением 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата, дающий оптимальные результаты при структурном анализе крупных гидрофобных пептидов. С использованием этого реагента анализировались N-концевые последовательности целого фрагмента B12+B13, а также пептидов Sk3 и F2-A1, полученных соответственно в результате расщепления белка BNPS-скатоном и после ограниченного кислотного гидролиза фрагмента F2 [20]. Фрагмент B12+B13

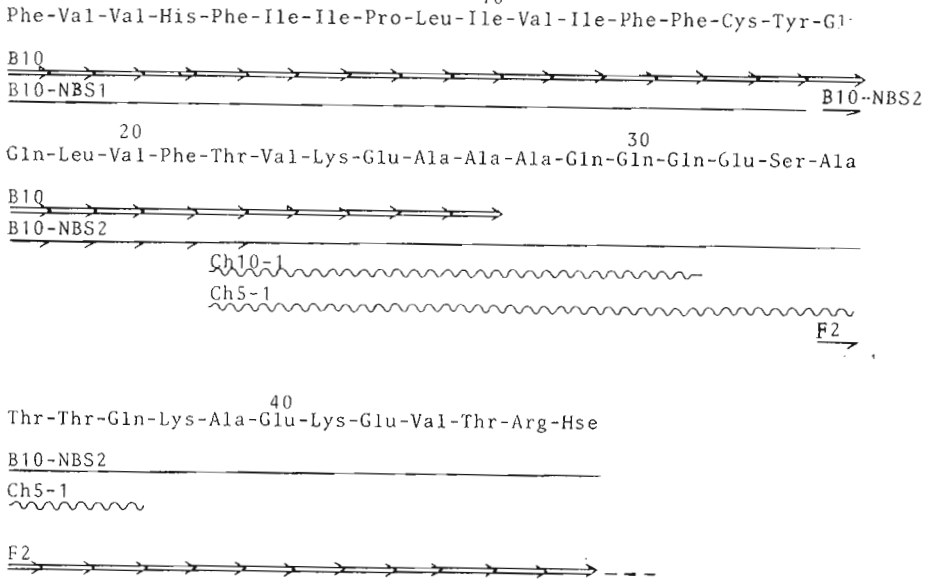


Рис. 12. Структура бромцианового пептида В10. NBS – пептиды, полученные после расщепления N-бромсукцинимидом; F2 – фрагмент, полученный при расщеплении термוליзином нативных фоторецепторных мембран

содержал плохо расщепляемую бромцианом связь Met²⁸⁸-Thr, однако из смеси бромциановых пептидов родопсина методом ВЭЖХ был выделен с незначительным выходом пептид В13, для которого методом Эдмана установлена последовательность 16 N-концевых аминокислотных остатков. Вывод о строении С-концевой области пептида В13 сделан на основании кипетических данных по расщеплению пептида карбоксипептидазой А. Полученные результаты в совокупности с данными о строении пептидов химотриптического гидролиза апомембран (Ch12-1, Ch12-3, Ch11, Ch6-6, Ch10-3) позволили полностью завершить реконструкцию структуры фрагмента В12+В13.

Пептид В14 (310–317). $\text{Asn-Lys-Gln-Phe-Arg-Asn-Cys-Hse}$.

Пептид В15 (318–348) (рис. 14) не содержит в своем составе остатка гомосерина. Методом гидролиза показано, что его С-концевым аминокислотным остатком, так же как и всей молекулы белка [15], является аланин. Таким образом, пептид В15 представляет собой С-концевой фрагмент родопсина. Деградацией по методу Эдмана установлена последовательность первых 11 аминокислотных остатков. Для установления полной структуры пептида проведен его гидролиз трипсином. Гидролизат разделен методом ВЭЖХ, аминокислотный состав выделенных триптических фрагментов В15-Т1 – В15-Т3 приведен в табл. 6. Перекрытия между триптическими фрагментами найдены с помощью пептидов химотриптического гидролиза апомембран (Ch3-1, Ch8-2).

Таким образом, в результате расщепления родопсина бромцианом по остаткам метионина и разделения образовавшейся смеси пептидов были выделены все бромциановые фрагменты, составляющие полипептидную цепь белка [6, 20]. Установление аминокислотной последовательности бромциановых пептидов дало основную информацию о структуре полипептидной цепи родопсина.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин, химотрипсин, пепсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), протеиназа из *Staphylococcus aureus* (Miles, Англия), бромциан, N-бромсукцинимид (Pierce, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ).

Аминокислотный состав химотриптических фрагментов бромциановых пептидов В8 и В9 и продуктов ограниченного кислотного гидролиза пептида В9

Аминокислота	В8-Сh1	В8-Сh2	В8-Сh3	В8-Сh4	В9-Сh1	В9-Сh2	В9-Сh3	В9-А1	В9-А2	В9-А3
Cys(Сm)	0,56(1)				1,29(2)			1,37(2)		
Asp					1,11(1)	2,22(2)				
Thr						1,83(2)			2,30(2)	
Ser		1,04(1)	1,31(1)		1,30(1)	1,44(1)		1,23(1)		1,25(1)
Glu		1,18(1)		1,14(1)	1,13(1)	3,20(3)		1,09(1)	2,15(2)	1,40(1)
Pro	2,14(2)	1,03(1)		1,00(1)		1,39(1)			1,00(1)	
Gly	1,31(1)	1,06(1)		1,09(1)	1,24(1)			1,31(1)		
Ala	4,03(4)									
Val*	1,34(1)									0,99(1)
Hse		0,41(1)		0,47(1)				0,86(1)		
Ile*		0,91(1)		0,89(1)	0,98(1)			0,46(1)		0,36(1)
Leu*	2,03(2)							0,89(1)	0,95(1)	1,01(1)
Tyr		0,69(1)	0,78(1)		1,78(2)					
Phe						1,00(1)	0,91(1)		1,71(2)	0,89(1)
His						0,92(1)			0,98(1)	
Lys										
Arg		1,00(1)	1,00(1)							
Trp**	+									
Число остатков	12	8	3	5	9	11	4	6	8	6
N-Концевая	Ala	Ser	Ser	Ile	Gln	Thr	Val	Gln	Tyr	Glu

Примечание. См. сноски в табл. 3.

Таблица 6

Аминокислотный состав триптических фрагментов бромцианового пептида В15

Аминокислота	В15-Т1	В15-Т2	В15-Т3
Cys(Сm)	1,28(2)		
Asp		2,63(3)	
Thr	1,68(2)	1,82(2)	1,97(2)
Ser		1,84(2)	1,12(1)
Glu		1,29(1)	1,90(2)
Pro		0,79(1)	1,00(1)
Gly	1,25(1)	1,24(1)	
Ala		1,14(1)	2,25(2)
Val*	0,71(1)	0,78(1)	1,12(1)
Hse			
Ile*			
Leu*	1,16(1)	0,93(1)	
Tyr			
Phe			
His			
Lys	1,00(1)	1,00(1)	
Arg			
Trp**			
Число остатков	8	14	9
N-Концевая	Val	Asn	Thr

Примечание. См. сноски в табл. 3.

Фоторецепторные мембраны из наружных сегментов палочек глаз быка выделяли по методике [18]. Количество родопсина в мембранах определяли спектрофотометрически, принимая молярный коэффициент поглощения равным $42\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [26] при $\lambda\ 500\text{ nm}$. Спектральный критерий чистоты полученных препаратов мембран A_{278}/A_{500} составлял 2,0–2,1.

Молекулярную массу родопсина определяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS [27], используя градиентные полиакриламид-

Val-Thr-Thr-Leu-Cys-Cys-Gly-Lys-Asn-Pro-Leu-Gly-Asp-Asp-Glu-Ala-Ser

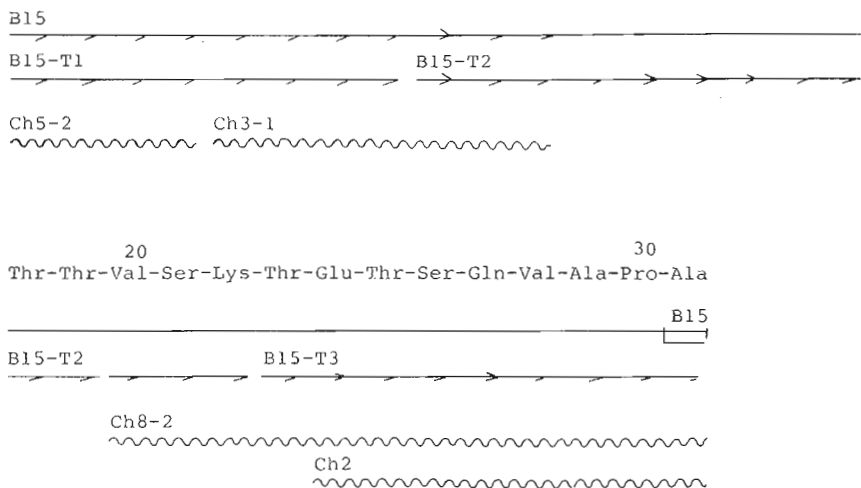


Рис. 14. Структура бромцианового пептида B15. Определение С-концевого аминокислотного остатка методом гидразиолиза ($i=i$)

ной кислотой. Детектировали пептиды с помощью Uvicord II (ЛКВ, Швеция) по поглощению при 280 нм. Элюат собирали фракциями по 3 мл/ч.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию пептидов проводили на хроматографе Altex, модель 322 (Altex, США) с проточным спектрофотометром Hitachi, модель 100-40 (Япония). При разделении использовали колонки 0,46×25 см и следующие хроматографические системы: А) носитель Nucleosil C₈ (диаметр частиц 7,5 мкм, Macherey-Nagal, ФРГ), градиент концентрации ацетонитрила от 28 до 70% в 0,1% трифторуксусной кислоте (время изменения градиента 1 ч), скорость элюции 1 мл/мин; В) носитель LiChrosorb RP-18 (диаметр частиц 10 мкм, Merck, ФРГ), градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 70% в 0,1% трифторуксусной кислоте (время изменения градиента 1 ч), скорость элюции 1 мл/мин; С) носитель Silasorb C₁₈ (диаметр частиц 10 мкм, Lachema, ЧССР), градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 70% в 10 мМ ацетате аммония, pH 5,7 (время изменения градиента 1 ч), скорость элюции 2 мл/мин. Пептиды детектировали спектрофотометрически (λ 206 нм). Аналитические опыты проводили, используя 1–2 пмоль пептидного материала. Образец вводили в виде раствора в 80% муравьиной кислоте.

Триптический и химотриптический гидролиз бромциановых пептидов. К 0,1 мкмоль пептида в 0,3 мл 0,1 М бикарбоната аммония (pH 8,4) добавляли фермент в фермент-субстратном соотношении 1:50 (по весу). Реакционную смесь выдерживали при 37°С 2 ч, затем добавляли такую же порцию фермента и инкубировали в течение еще 2 ч. По окончании реакции гидролизат подкисляли уксусной кислотой и хранили при –10°С.

В случае пептида В4 триптический гидролиз проводили при интенсивном перемешивании в течение 16 ч.

Ограниченный кислотный гидролиз пептида В9. 0,05 мкмоль пептида суспендировали в 0,2 мл 0,03 н. HCl и инкубировали 16 ч в вакуумированной ампуле при 110°С.

Расщепление пепсином пептида В5+В6. 0,2 мкмоль пептида растворяли в 0,1 мл 99,7% муравьиной кислоты. К полученному раствору постепенно добавляли 0,9 мл 1 мМ NaCl. Гидролиз проводили при фермент-субстратном соотношении 1:10 при 20°С в течение 24 ч. Гидролизат упаривали досуха.

Расщепление N-бромсукцинимидом пептида В10. 0,05 мкмоль пептида суспендировали в 0,5 мл 50% уксусной кислоты, добавляли равный объем раствора N-бромсукцинимида (0,07 мг, 10-кратный мольный избыток) в ледяной уксусной кислоте. Смесь выдерживали при 20°С 16 ч в темноте при перемешивании, затем упаривали досуха.

Деградацию пептидов по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных проводили как описано в сообщении [29].

Триптофан, дикарбоновые кислоты и их амиды определяли в виде Pth-производных [30].

Деградиацию пептидов по методу Эдмана с использованием 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата осуществляли по методу [31].

C-Концевую последовательность пептидов определяли с помощью карбоксипептидаз А и В [32] и методом гидразинолиза [33].

Автоматическую деградиацию пептидов осуществляли на жидкофазном секвенаторе 890 С (Beckman, США) по программе 102 974 и на твердофазном секвенаторе APS 240 (Rank Hilger, Англия); идентификацию Pth-производных проводили как описано в сообщении [34].

Аминокислотный анализ белка и пептидов (условия гидролиза см. [29]) выполняли на аминокислотных анализаторах D-500 (Dugum, США) и Biotronik LC-7000 (Biotronik, ФРГ).

Авторы приносят глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные советы и помощь при выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wald G. Science, 1968, v. 162, № 3850, p. 230-239.
2. Bownds D. Nature, 1967, v. 216, № 5121, p. 1178-1181.
3. Drachev L. A., Kalamkarov G. R., Kaulen A. D., Ostrovsky M. A. Eur. J. Biochem., 1981, v. 117, № 3, p. 471-481.
4. Hagens W. A. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1972, v. 1, p. 131-158.
5. Fung B. K.-K., Hurley J. B., Strayer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 152-156.
6. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Богачук А. С., Мирошников А. И., Маргынков В. И., Куделин А. Б. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1424-1427.
7. Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179-191.
8. 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, v. 5, № 6, p. 693-703.
9. Litman B. J. Photochem. and Photobiol., 1979, v. 29, p. 671-677.
10. Hubbard R. J. Gen. Physiol., 1954, v. 37, № 3, p. 381-399.
11. Frank R. N., Rodbard D. Arch. Biochem. and Biophys., 1975, v. 171, № 1, p. 1-13.
12. Heller J. Biochemistry, 1968, v. 7, № 8, p. 2906-2913.
13. Helenius A., Simons K. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 415, № 1, p. 29-79.
14. Tsunasawa S., Narita K., Shichi H. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 624, № 1, p. 218-225.
15. Hargrave P. A., Fong S.-L. J. Supramol. Struct., 1977, v. 6, p. 559-570.
16. Hargrave P. A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 492, № 1, p. 83-94.
17. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 219-224.
18. Шевченко Т. Ф., Каламкаргов Г. Р., Островский М. А. Биофизика, 1980, т. 25, вып. 3, с. 462-468.
19. Crestfield A. M., Moor S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622-627.
20. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Богачук А. С., Золотарев А. С., Еганян Е. Р., Костецкий П. В. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1331-1340.
21. Schroder W. A., Shelton J. B., Shelton G. R. Arch. Biochem. and Biophys., 1969, № 1-2, p. 551-556.
22. Narita K., Titani K. J. Biochem., 1968, v. 63, № 2, p. 226-241.
23. Золотарев А. С., Мигалева С. И., Шемякин В. В., Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1317-1330.
24. Hargrave P. A., Fong S.-L., McDourell J. H., Mas M. T., Curtis D. R., Wand J. K., Juszczak E. Neurochem. Int., 1980, v. 1, p. 231-244.
25. Маргынков В. И., Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Мирошников А. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 734-745.
26. Shichi H.; Lewis M. S., Irreverre F., Stone A. L. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 3, p. 529-536.
27. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406-4412.
28. Papermaster D. S., Dreyer W. J. Biochemistry, 1974, v. 13, № 11, p. 2438-2444.
29. Гринкевич В. А., Арзамасова Н. М., Поповенко Н. А., Гринкевич Х. А., Красченко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1757-1774.
30. Chen K. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, B. 357, № 6, S. 873-886.
31. Chang J. Y., Brancor D., Wittman-Liebold B. FEBS Lett., 1978, v. 93, № 2, p. 205-214.
32. Ambler R. P. Methods in Enzymol., 1972, v. 25, p. 143-154, 262-272.

33. Mesrob B., Holeysovsky V. Collect. Czech. Chem. Commun., 1967, v. 32, № 5, p. 1976-1982.
34. Гринкевич В. А., Арзамасова Н. М., Гринкевич Х. А., Акименко З. А., Мороз И. Н., Назимов И. В., Алданова И. А. Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1775-1781.

Поступила в редакцию
27.IV.1983

PRIMARY STRUCTURE OF RHODOPSIN. I. CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES

ARTAMONOV I. D., ZOLOTAREV A. S., KOSTINA M. B.,
KHOROSHILOVA N. I., FEIGINA M. Yu., ABDULAEV N. G.

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

Carboxymethylated bovine rhodopsin was subjected to cyanogen bromide cleavage at methionine residues. The resultant products were fractionated into the two groups according to the solubility of peptides in 2 M guanidine hydrochloride. Gel-filtration on Bio-Gel P-30 in 80% formic acid of each group followed by rechromatography and high performance liquid chromatography resulted in 15 peptides embracing the whole polypeptide chain of rhodopsin. Amino acid sequence of these peptides was determined.