БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 9 * № 10 * 1983

УДК 577.112.5 : 577.352.332

ЗРИТЕЛЬНЫЙ РОДОПСИН.

III.* ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И ТОПОГРАФИЯ В МЕМБРАНЕ

Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Богачук А. С., Золотарев А. С., Еганян Е. Р., Костецкий П. В.

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

Завершена реконструкция полипептидной цепи родопсина. Проведен гидролиз апомембран трипсином, ограниченный протеинолиз нативных мембран термолизином и осуществлено расщепление препарата карбоксиметилированного родопсина BNPS-скатолом. Пептиды выделены с использованием гель-фильтрации на биогеле P-30 в муравьиной кислоте, ионообменной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонках с обращенной фазой.

Сопоставление результатов анализа гидрофобности молекулы родопсина с данными по действию протеолитических ферментов на нативные фоторецепторные мембраны позволило выделить семь α-спиральных сегментов и предложить схему упаковки молекулы родопсина в мембране.

Настоящее сообщение завершает серию статей, посвященных определению полной аминокислотной последовательности родопсина.

В результате расщепления родопсина бромцианом по остаткам метионина и разделения образовавшейся смеси пептидов были выделены все бромциановые фрагменты, составляющие полипептидную цепь белка [2] (рис. 1). Для реконструкции полипептидной цепи молекулы родопсина необходимо было установить порядок расположения бромциановых пептидов.

Основная информация о порядке расположения бромциановых фрагментов была получена при изучении структуры пептидов химотриптического гидролиза белка [1]. Были идентифицированы метионинсодержащие пептиды, определение структуры которых дало возможность установить следующие восемь областей перекрывания бромциановых пептидов: B1-B2-B3-B4 (Ch19) **, B5-B6 (Ch9-4), B7-B8 (Ch6-5), B8-B9 (Ch3-2), B9-B10 (Ch18) и B13-B14 (Ch10-3) (рис. 1).

Для получения недостающих перекрытий между бромциановыми фрагментами использовали данные установления структуры: пептидов триптического гидролиза апомембран; пептидов, выделенных при расщеплении молекулы белка по остаткам триптофана BNPS-скатолом; фрагментов, образовавшихся при ограниченном протеинолизе нативных мембран. Так как во всех этих случаях выделение и установление структуры фрагментов проводилось в основном с целью получения перекрывающих пептидов, не было необходимости в каждом виде гидролиза выделять все образовавшиеся пептиды, причем для некоторых выделенных пептидов достаточно было установить лишь их частичную структуру.

Три области перекрывания между бромциановыми фрагментами были получены в результате установления структуры пептидов, выделенных из триптического гидролизата апомембран. Апомембраны получали как описано в предыдущем сообщении [1]. Для разделения триптического гидро-

---

* Сообщение II см. [1].

** В сообщении [3] Ch19=XT-1, Ch9-4=XT-2, Ch6-5=XT-3, Ch3-2=XT-4, Ch18=XT-5, Ch10-3=XT-6.

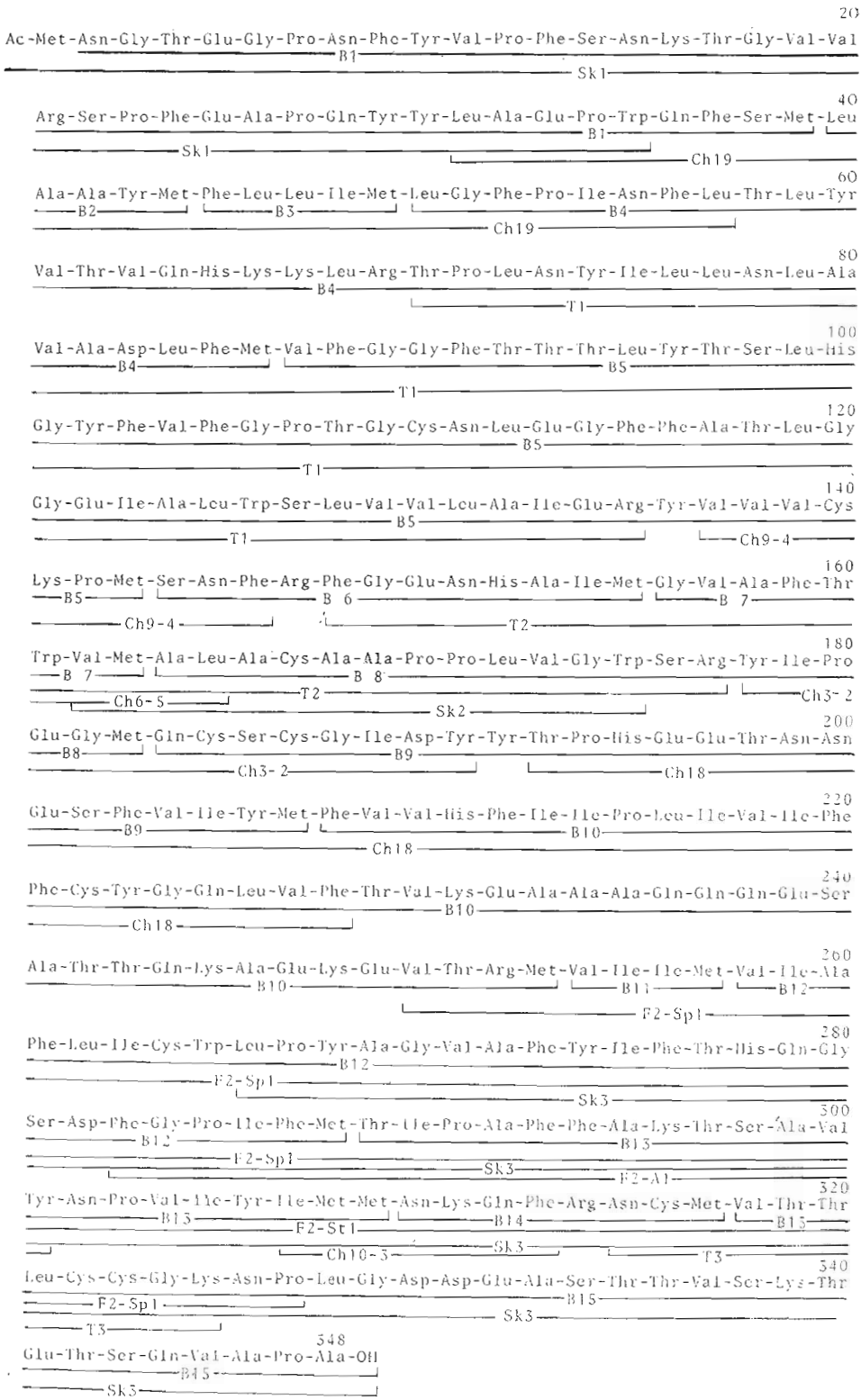

Рис. 1. Полная аминокислотная последовательность зрительного родопсина. T, Ch, Sp – пептиды, полученные при гидролизе соответственно трипсином, химотрипсином, протеазой из *St. aureus*; B, Sk – пептиды, полученные при расщеплении бромцианом и BNPS-скатолом; A – пептиды, полученные при ограниченном кислотном гидролизе; F2 – пептид, полученный при гидролизе термолизином нативных фоторецепторных мембран

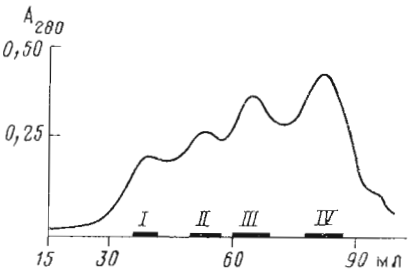

Рис. 2. Разделение мембраносвязанных триптических фрагментов родопсина на колонке (1,0×100 см) с сефадексом LH-60 в системе 2-хлорэтанол – 80% муравьиная кислота (4 : 1). Здесь и далее прямоугольники на оси абсцисс – границы объединения фракций

лизата использовали в основном схему, описанную для разделения химотриптического гидролизата апомембран [1].

Мембраносвязанные фрагменты разделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-60 (рис. 2). Фракция I содержала агрегаты пептидов и далее не исследовалась. Из фракции II рехроматографией был выделен пептид T1 (70–135), имеющий в качестве N-концевого аминокислотного остатка треонин (M~6 кДа). Определение N-концевой аминокислотной последовательности пептида T1 методом Эдмана дало возможность установить последовательность 19 аминокислотных остатков (Thr-Pro-Leu-Asn-Tyr-Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Ala-Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Met-Val-Phe-) * и таким образом определить порядок расположения бромциановых фрагментов B4-B5 (рис. 1).

Фракция III содержала смесь пептидов, имеющих в качестве N-концевых аминокислотных остатков серин и тирозин, разделить которые не удалось. Фракция IV представляла собой пептид T2 (148–177), для которого методом Эдмана была установлена последовательность 12 аминокислотных остатков (рис. 3). Для получения дальнейшей структурной информации пептид T2 расщепляли бромцианом по остаткам метионина, образовавшуюся смесь пептидов (T2-B1, T2-B2, T2-B3) разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в условиях, описанных для разделения коротких бромциановых пептидов родопсина [2]. Аминокислотный состав выделенных бромциановых фрагментов приведен в таблице **. Установление полной структуры пептида T2 было завершено после определения структуры химотриптического пептида Ch6-5 [1] и пептида Sk2 (см. далее), выделенного при расщеплении родопсина BNPS-скатолом. В результате реконструкции триптического пептида T2 был определен порядок расположения бромциановых фрагментов B6-B7-B8.

Растворимые триптические пептиды разделяли ионообменной хроматографией. Пептид T3 (314–325) элюировался в первой фракции и после ее дополнительного фракционирования ВЭЖХ (рис. 4) был получен в гомогенном состоянии, аминокислотный состав пептида T3 приведен в таблице. Определение его структуры методом Эдмана (Asn-Cys-Met-Val-Thr-Thr-Leu-Cys-Cys-Gly-Lys) позволило расположить бромциановые пептиды B14 и B15 в полипептидной цепи белка.

Недостающие перекрытия в C-концевой части молекулы белка были получены при изучении структуры фрагмента F2 (241–327), выделенного при ограниченном протеинолизе нативных мембран термолизином [5].

Из смеси пептидов, образовавшихся при расщеплении фрагмента F2 протеиназой из *St. aureus*, выделен пептид F2-Spl (250–327), M~8 кДа. Установление N-концевой последовательности этого пептида методом Эдмана (Val-Thr-Arg-Met-Val-Ile-Ile-Met-Val-Ile-Ala) дало возможность расположить в полипептидной цепи белка фрагменты B10–B12.

В результате проведения частичного кислотного гидролиза фрагмента F2 и разделения образовавшейся смеси пептидов гель-фильтрацией на

* Здесь и далее приняты следующие обозначения: стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных (→), в виде Dns- и Pth-производных (→).

** T2-B2 соответствуют бромциановому пептиду родопсина B7 (ср. [2]).

Аминокислотный состав триптического пептида Т3, бромциановых фрагментов триптического пептида Т2 и пептидов Sk1 и Sk2

Аминокислота	T3	T2-B1	T2-B2	T2-B3	Sk1	Sk2
Cys(Cm)	2,31(3)			0,79(1)		0,60(1)
Asp	1,20(1)	1,05(1)			3,12(3)	
Thr	1,98(2)		1,13(1)		2,20(2)	
Ser				1,18(1)	2,18(2)	1,13(1)
Hse		0,52(1)	0,48(1)			
Glu		1,08(1)			3,97(4)	
Pro				1,98(2)	4,98(5)	2,00(2)
Gly	1,23(1)	1,21(1)	1,20(1)	1,25(1)	3,31(3)	1,12(1)
Ala		1,13(1)	1,18(1)	4,12(4)	2,19(2)	4,28(4)
Val [1*]	0,93(1)		1,90(2)	0,85(1)	2,71(3)	1,91(2)
Met	0,89(1)				0,70(1)	0,65(1)
Ile [1*]		0,89(1)				
Leu [1*]	1,15(1)			2,01(2)	0,99(1)	
Tyr					2,67(3)	
Phe		0,91(1)	1,00(1)		2,78(3)	
His		1,00(1)				
Lys	1,00(1)				1,00(1)	
Arg				1,00(1)	1,01(1)	0,93(1)
Trp [2*]			+(1)	+(1)	+(1)	+(1)
Число остатков	11	8	8	14	35	14
N-Концевая	Asn	Phe	Gly	Ala	Ac-Met[3*]	Val

[1*] Результаты 72-часового гидролиза.
[2*] Триптофан определяли качественно по реакции Эрлиха.
[3*] См. [4].

биогеле Р-6 (рис. 5) выделен пептид F2-A1 (283—301) со следующим аминокислотным составом: Thr 2,14(2), Ser 1,21(1), Pro 2,08(2), Gly 1,18(1), Ala 3,10(3), Val 0,85(1), Met 0,71(1), Ile 1,89(2), Tyr 0,92(1), Phe 3,92(4), Lys 1,00(1). Установление N-концевой последовательности пептида F2-A1 методом Эдмана (Phe-Gly-Pro-Ile-Phe-Met-Thr-Ile-Pro-) позволило найти область перекрывания бромциановых пептидов B12 и B13.

Полезными для реконструкции полипептидной цепи родопсина оказались данные по структуре фрагментов, выделенных при расщеплении родопсина по остаткам триптофана BNPS-скатолом. Расщепление BNPS-скатолом проводили на карбоксиметилированном образце белка [2] по описанной методике [6] с некоторыми изменениями — избыток реагента после окончания реакции экстрагировали 1-хлорбутаном. Образовавшуюся смесь фрагментов разделяли гель-фильтрацией на биогеле Р-30 (рис. 6). Бóльшая часть пептидов элюировалась со свободным объемом колонки в агрегированном состоянии (фракция I).

Фракция II содержала С-концевой фрагмент Sk3* (266—348) ($M \sim$ ~8 кДа), имеющий в качестве N-концевого аминокислотного остатка лейцин. Автоматической деградацией пептида Sk3 на жидкофазном секвенаторе определена последовательность 20 аминокислотных остатков (Leu-Pro-Tyr-Ala-Gly-Val-Ala-Phe-Tyr-Ile-Phe-Thr-His-Gln-Gly - Ser - Asp - Phe-Gly-Pro-). В качестве С-концевого аминокислотного остатка методом гидразинолиза найден аланин. Полученные нами данные о структуре пептида Sk3 совпадают с данными, опубликованными в литературе [7], и подтверждают правильность расположения бромциановых пептидов в С-концевой части молекулы белка. Фракция III содержала фрагмент Sk1 (1—35) с блокированным N-концевым остатком. Аминокислотный состав пептида приведен в таблице. Сравнение аминокислотных составов пептида Sk1 и бромцианового пептида B1 [2] показало, что пептид Sk1 является N-концевым фрагментом молекулы белка. В качестве N-концевого остатка пептид Sk1 содержит модифицированный остаток метионина (N-аце-

* Нумерация пептидов, выделенных при расщеплении родопсина BNPS-скатолом, дана в соответствии с порядком расположения их в полипептидной цепи белка

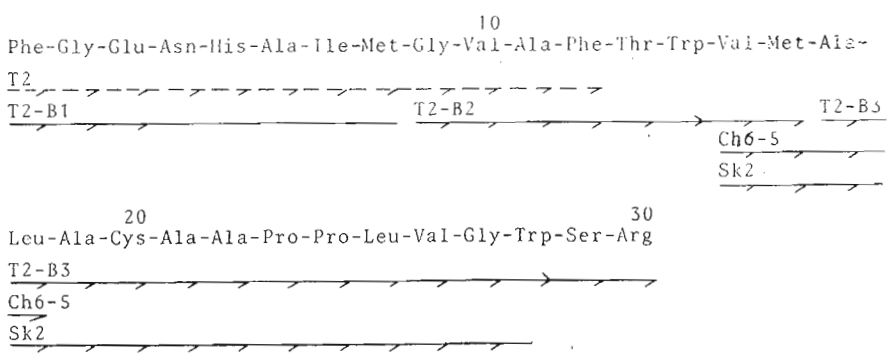

Рис. 3. Структура триптического пептида T2. Принятые обозначения: стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns- (→), Dns- и Pth-производных (⟶), Dabth-производных (– –→), неидентифицированные аминокислоты (—)

тилметионин [4]). Фракция IV представляла собой 14-членный пептид Sk2 (162—175), аминокислотный состав пептида приведен в таблице. Определение аминокислотной последовательности пептида Sk2 методом Эдмана (Val-Met-Ala-Leu-Ala-Cys-Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-Val-Gly-Trp) подтвердило порядок расположения бромциановых фрагментов B7—B8.

В результате проведенного исследования все бромциановые пептиды были расположены в единую полипептидную цепь и таким образом молекула родопсина была полностью реконструирована.

Суммируя результаты определения первичной структуры родопсина и анализируя использованную при этом методологию, можно отметить, что основными задачами, решение которых во многом определило успешное завершение этой работы, явились солюбилизация белка и избирательная фрагментация его полипептидной цепи, а также разделение смеси гидрофобных фрагментов и определение их структуры.

Хорошая растворимость делипидированных препаратов родопсина в концентрированных растворах муравьиной кислоты позволила использовать химические методы фрагментации — расщепление белка по остаткам метионина и триптофана соответственно бромцианом и BNSP-скатолом.

В результате установления структуры бромциановых фрагментов была получена основная информация об аминокислотной последовательности полипептидной цепи родопсина [2].

Известно, что в большинстве случаев определение первичной структуры белков не может базироваться на результатах анализа структуры продуктов лишь химических методов расщепления и, как правило, требует проведения ферментативных гидролизов. Проведение ферментативных гидролизов мембранных белков связано со значительными трудностями в силу практически полной нерастворимости делипидированных препаратов белков в водных растворах. Однако оказалось, что молекула опсина, локализованная в апомембране, в отличие от делипидированного препарата родопсина может быть подвергнута исчерпывающему ферментативному гидролизу. Так, из химотриптического гидролизата апомембран были выделены пептиды, которые составили в сумме ~85% полипептидной цепи белка.

Определение аминокислотной последовательности этих пептидов внесло существенный вклад в установление структуры крупных бромциановых фрагментов и порядка расположения их в молекуле белка [1].

Для фрагментации полипептидной цепи родопсина было использовано также ферментативное расщепление белка непосредственно в мембране [5]. Такой прием был применен ранее для фрагментации молекулы бактериородопсина [8, 9] и целого ряда других мембранных белков [10]. Ограниченный протеинолиз фоторецепторных мембран термолизином привел к получению двух крупных фрагментов, структурный анализ которых

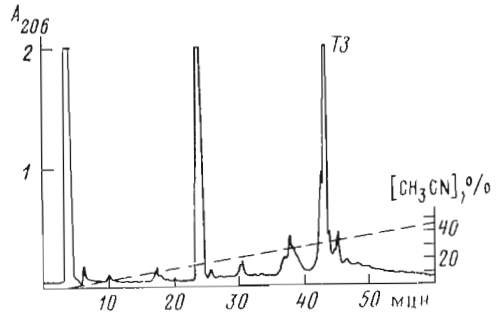

Рис. 4. Выделение пептида T3 ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с носителем Nucleosil C_8, градиент ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте, скорость элюции 1 мл/мин

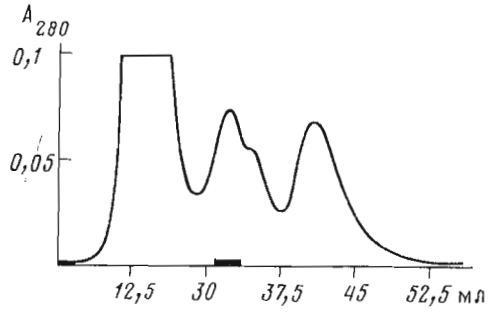

Рис. 5. Выделение пептида F2-A1 на колонке (1,0×100 см) с биогелем P-6 в 50% муравьиной кислоте

позволил однозначно подтвердить правильность реконструкции отдельных участков полипептидной цепи родопсина и в ряде случаев получить недостающую структурную информацию.

В ходе определения первичной структуры родопсина для фрагментации его полипептидной цепи был использован еще один прием, заключающийся в последовательном ферментативном и химическом расщеплении молекулы белка, иммобилизованного на твердом носителе по тиольным группам остатков цистеина*. Этот подход оказался особенно ценным на завершающих этапах работы и обеспечил возможность не только избирательного выделения цистеинсодержащих пептидов, но и значительно облегчил целенаправленный поиск необходимых участков полипептидной цепи и проверку достоверности уже установленных последовательностей.

Выделение и очистка гидрофобных пептидов все еще остается самой трудной задачей. Высокая степень агрегации пептидов, образовавшихся при расщеплении молекулы родопсина бромцианом, не позволила получить удовлетворительные результаты при их разделении гель-фильтрацией с использованием дезагрегирующих и денатурирующих растворителей. При разделении общей смеси бромциановых фрагментов гель-фильтрацией на биогелях в 80% муравьиной кислоте в чистом виде удалось выделить лишь небольшое число пептидов с незначительными выходами, а основная масса пептидов элюировалась в агрегированном состоянии со свободным объемом колонки. Разработанный нами прием, заключающийся в предварительном разделении смеси бромциановых фрагментов на две группы по их растворимости в 2 М растворе хлоргидрата гуанидина, позволил существенно снизить агрегацию пептидов и добиться не только разделения пептидов обеих групп гель-фильтрацией на биогеле P-30 в 80% муравьиной кислоте, но и облегчить их дальнейшую очистку с помощью ВЭЖХ.

Для структурного анализа крупных гидрофобных фрагментов использовались пептиды, полученные химическими и ферментативными методами расщепления самих фрагментов, а также привлекалась информация

* Данные будут опубликованы в отдельном сообщении.

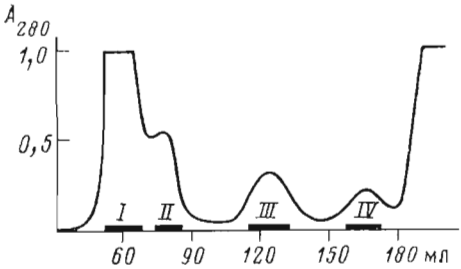

Рис. 6

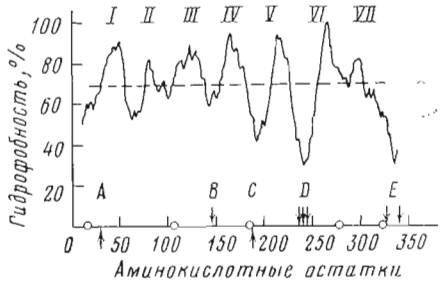

Рис. 7

Рис. 6. Разделение пептидов, полученных при расщеплении родопсина BNPS-скатолом, на колонке (1,5×100 см) с биогелем P-30 в 80% муравьиной кислоте

Рис. 7. Профиль гидрофобности молекулы родопсина. Ретинальсодержащий остаток Lys^{296} при расчете принимался за неполярный. Для сравнения на рисунке проведена пунктирная линия, отвечающая рассчитанному нами минимальному значению гидрофобности внутримембранных сегментов молекулы бактериородопсина. ↓ и ↑ — места расщепления молекулы белка с внешней и внутренней стороны мембраны фоторецепторного диска соответственно [15]

о структуре пептидов, выделенных с помощью различных нетрадиционных методов фрагментации целой молекулы белка.

Комбинация всех этих подходов привела к установлению первичной структуры родопсина, которая представлена на рис. 1.

Полипептидная цепь молекулы родопсина состоит из 348 аминокислотных остатков ($M \sim 39\,048$ Да) 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.

Частью структурных исследований родопсина была идентификация в установленной аминокислотной последовательности остатка лизина, ответственного за связывание хромофора. С этой целью фоторецепторные мембраны обрабатывали NaB^3H_4 или $NaBH_3CN$, а затем расщепляли термолизином [5] на фрагменты 1—240 и 241—327, которые разделяли на колонке с сефадексом LH-60, уравновешенным смесью муравьиная кислота — этанол (3 : 7). Радиоактивность и флуоресценция ретинильного остатка были обнаружены только во фрагменте 241—327. Этот фрагмент затем расщепляли бромцианом и образовавшиеся пептиды разделяли на сефадексе LH-60. Радиоактивность и флуоресценция сопутствовали только одному пептиду (258—308), определение структуры которого показало, что местом связывания ретиналя является ε-аминогруппа лизина-296. С полученными нами результатами согласуются данные о структуре более коротких ретинальсодержащих пептидов [11, 12].

Установление первичной структуры родопсина заложило основы для выяснения топографии его полипептидной цепи в фоторецепторной мембране. Для решения этой задачи использовали два взаимодополняющих подхода. Первый из них заключался в анализе гидрофобности отдельных участков полипептидной цепи белка, который позволил бы локализовать эти участки внутри или вне мембраны. Второй подход заключался в изучении действия протеолитических ферментов на полипептидную цепь родопсина, локализованного в нативной фоторецепторной мембране, т. е. в выяснении с помощью протеолитических ферментов участков белка, выступающих из мембраны.

Проводился расчет гидрофобности пептидных фрагментов родопсина, перекрывающихся следующим образом: 1—20, 2—21, 3—22 и т. д.; в каждом фрагменте подсчитывалось содержание остатков неполярных аминокислот и полученные значения наносились на график гидрофобности полипептидной цепи, представленный на рис. 7 [13, 14]. Длину фрагментов в 20 аминокислотных остатков выбирали с учетом возможности образования α-спиральных тяжей, способных пересечь толщу неполярной части мембраны. Распределение неполярных аминокислот в полипептидной цепи

родопсина оказалось неравномерным. Действительно, отчетливые пики на рис. 7 соответствуют гидрофобным участкам молекулы, а впадины, напротив, отвечают гидрофильным участкам белковой цепи, выступающим из мембраны.

Сопоставление результатов анализа гидрофобности молекулы родопсина с данными о доступности его полипептидной цепи, локализованной в нативной фоторецепторной мембране, действию протеолитических ферментов [15, 16] позволяет выделить семь гидрофобных сегментов (рис. 7, I—VII), каждый из которых состоит в среднем из 26 аминокислотных остатков.

Подводя итоги структурного анализа родопсина и сравнивая эти результаты с данными о структуре бактериородопсина, можно отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии в первичной структуре, эти белки обладают определенным сходством: наличие блокированных N-концевых аминокислот, высокое содержание гидрофобных остатков, преобладание кислых аминокислот над основными. Особенно отчетливо сходство прослеживается в построении полипептидных цепей белков, а именно в наличии семи протяженных трансмембранных тяжей, асимметричном расположении N- и C-концевых фрагментов по отношению к различным поверхностям мембран, а также локализации ретиналя на седьмом α-спиральном сегменте, ближе к центру мембраны.

Вполне понятно, что результаты этой работы являются лишь первым и важным этапом на пути к выяснению реального механизма функционирования этого интересного белка независимо от того, является ли он светочувствительным ионным каналом или модулятором уровня циклических нуклеотидов в клетке [17]. Методические подходы, использованные в процессе этой работы, как мы надеемся, могут оказаться полезными при анализе структуры других мембранных белков.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин (Worthington, США), протеиназа из *Staphylococcus aureus* (Miles, Англия), термолизин (Calbiochem, США), бромциан, BNPS-скатол (Pierce, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ).

Выделение фоторецепторных мембран проводили по методике [2], апомембраны получали как описано ранее [1].

Триптический гидролиз апомембран. Апомембраны, содержащие 1 мкмоль белка, суспендировали в 8 мл 0,1 М бикарбоната аммония, pH 8,3. После инкубации суспензии в течение 1 ч добавляли трипсин (фермент-субстратное соотношение 1 : 50) и выдерживали 16 ч при 20° С. Реакцию останавливали добавлением концентрированной муравьиной кислоты до pH 3,0, реакционную смесь центрифугировали при 3000*g* в течение 30 мин. Осадок промывали водой (16 мл) и надосадочную жидкость объединяли с супернатантом. Супернатант и осадок лиофилизовали.

Карбоксиметилирование водорастворимых и мембраносвязанных пептидов триптического гидролизата апомембран проводили как описано для химотриптических пептидов [1].

Разделение растворимых триптических пептидов ионообменной хроматографией проводили в условиях, описанных для разделения растворимых пептидов химотриптического гидролизата апомембран [1].

Выделение пептида T3 методом ВЭЖХ осуществляли на колонке (0,46×25 см) с носителем Nucleosil C_8 (Macherey-Nagel, ФРГ) с диаметром частиц 7 мкм, используя градиент ацетонитрила в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты (скорость элюирования 1 мл/мин). Пептиды детектировали при λ 206 нм.

Разделение мембраносвязанных триптических пептидов осуществляли гель-фильтрацией на колонке (1,0×100 см) с сефадексом LH-60 (Pharmacia, Швеция) (фракция 30—40 мкм) в системе 2-хлорэтанол — 85% муравьиная кислота (4 : 1). Перед нанесением на колонку пептиды растворяли в 0,5 мл 99,7% муравьиной кислоты и к раствору добавляли 0,5 мл 2-хлорэтанола. Детекцию пептидов проводили при помощи Uvicord II

(LKB, Швеция) по поглощению при 280 нм. Элюат собирали фракциями по 1 мл/ч.

Расщепление бромцианом пептида T2. 0,1 мкмоль пептида растворяли в 0,2 мл 80% муравьиной кислоты и добавляли к раствору бромциан (100-кратный избыток на остаток метионина). Смесь выдерживали 24 ч под азотом при 20° С, разбавляли в 2 раза водой и лиофилизовали. Разделение пептидов проводили методом ВЭЖХ на колонке с носителем LiChrosorb C_8 [2].

Расщепление родопсина BNPS-скатолом и разделение фрагментов. Карбоксиметилирование белка (1 мкмоль) проводили как описано в сообщении [2]. Осадок белка растворяли в 5 мл 99,7% муравьиной кислоты. К раствору добавляли 72,6 мг BNPS-скатола, растворенного в 5 мл 99,7% муравьиной кислоты (40-кратный мольный избыток в расчете на остаток триптофана). Смесь разбавляли водой до конечной концентрации муравьиной кислоты 80% и выдерживали 16 ч в темноте при 20° С. Реакционную смесь разбавляли равным объемом воды и избыток BNPS-скатола экстрагировали 1-хлорбутаном (4×20 мл). Водную фазу объединяли с интерфазой и упаривали досуха в токе азота. Разделение образовавшихся фрагментов осуществляли гель-фильтрацией в условиях, описанных для разделения крупных бромциановых фрагментов родопсина [2].

Ограниченный протеолиз нативных мембран и выделение фрагмента F2 (*M* 12 кДа) проводили как описано в работе [5].

Ограниченный кислотный гидролиз фрагмента F2. 0,2 мкмоль пептида суспендировали в 0,8 мл 0,03 н. HCl и инкубировали 15 ч в вакуумированной ампуле при 110° С. Гидролизат упаривали досуха, остаток растворяли в 50% муравьиной кислоте и хроматографировали на биогеле P-6 (Bio-Rad, США).

Гидролиз фрагмента F2 протеиназой из St. aureus. К 0,05 мкмоль пептида в 0,2 мл 0,1 М ацетата аммония, pH 4,0, добавляли фермент в фермент-субстратном соотношении 1 : 20 (по весу). Гидролиз проводили на суспензии при 37° С в течение 12 ч. По окончании реакции гидролизат разделяли на осадок и супернатант центрифугированием. Осадок тщательно отмывали водой и лиофильно высушивали.

Молекулярную массу пептидов определяли электрофорезом в ПААГ по методике [18].

Определение N-концевых аминокислотных остатков, N-концевой аминокислотной последовательности методом Эдмана и автоматической деградацией на жидкофазном секвенаторе, аминокислотный анализ пептидов проводили как описано в сообщении [2].

Авторы выражают благодарность И. В. Назимову за участие в отдельных этапах работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Золотарев А. С., Миталева С. И., Шемякин В. В., Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1317–1330.
2. *Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Хорошилова Н. И., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г.* Биоорган. химия. 1983, т. 9, № 10, с. 1301–1316.
3. *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., Куделин А. Б.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1424–1427.
4. *Tsunasawa S., Narita K., Shichi H.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 624, № 1, p. 218–225.
5. *Мартынов В. И., Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Мирошников А. И.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 734–745.
6. *Bornstein P.* Biochemistry, 1970, v. 9, № 12, p. 2408–2421.
7. *Pellicone Ch., Bouillon Ph., Virmaux N., Vincendon G.* Biochemie, 1981, v. 63, № 89, p. 671–677.
8. *Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A.* FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 219–224.
9. *Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A.* FEBS Lett., 1977, v. 84, № 1, p. 1–4.
10. *Etemadi A.-H.* Biochem. et biophys. acta, 1980, v. 604, № 3–4, p. 423–475.
11. *Wang J. K., McDowell J. H., Hargrave P. A.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 22, p. 5111–5117.

12. *Mullen E., Akhtar M.* FEBS Lett., 1981, v. 132, № 2, p. 216–264.
13. *Rose G. D., Roy S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 8, p. 4643–4647.
14. *Capaldi A. R., Vanderkooi G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 4, p. 930–932.
15. *Ovchinnikov Yu. A.* FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179–191.
16. *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.
17. *Fatt P.* FEBS Lett., 1982, v. 149, № 2, p. 159–166.
18. *Swank R., Munkres K.* Anal. Biochem., 1971, v. 39, № 2, p. 462–477.

Поступила в редакцию
27.IV.1983

VISUAL RHODOPSIN. III. TOTAL AMINO ACID SEQUENCE AND ARRANGEMENT IN THE MEMBRANE

[OVCHINNIKOV Yu. A., ABDULAEV N. G., FEIGINA M. Yu., ARTAMONOV I. D., BOGACHUK A. S., ZOLOTAREV A. S., EGANYAN E. R., KOSTETSKY P. V.

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

Tryptic hydrolysis of apomembranes, BNPS-skatole cleavage of carboxymethylated rhodopsin and thermolytic digestion of native membranes were carried out to obtain the peptides necessary for the polypeptide chain reconstruction. Gel-filtration on Bio-Gel P-30 in 80% formic acid, ion-exchange and reversed-phase high performance liquid chromatography were used for the peptide isolation. A comparison of rhodopsin hydrophobicity profile with the accessibility of the polypeptide chain in native photoreceptor membranes for proteases allowed to distinguish seven α-helical segments and propose a model for arrangement of the protein molecule in the membrane.