



УДК 577.112.853.012.5:577.322.52:577.352.322

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ЗРИТЕЛЬНОГО РОДОПСИНА В ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ МЕМБРАНАХ
МЕТОДОМ ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕИНОЛИЗА****Мартынов В. И., Костина М. В., Фейгина М. Ю.,
Мирошников А. И.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Ограниченным протеинолизом полипептидной цепи животного родопсина в дисках нативной ориентации термолизином, папаином и протеиназой из *St. aureus* V8 идентифицированы участки (236–241 и 321–348), расположенные на внешней поверхности фоторецепторной мембраны. Кроме того, на цитоплазматической поверхности мембраны экспонирован фрагмент, включающий в себя остатки 146–147, поскольку амидная связь между ними расщепляется под влиянием химотрипсина.

Последовательным замораживанием и оттаиванием родопсинсодержащих дисков получена смесь пузырьков с исходной и обратной ориентацией мембран. Для идентификации участков полипептидной цепи родопсина на внутренней стороне мембраны дисков проанализирован гидролизат термолизином и химотрипсином. Найдено, что указанные ферменты отщепляют N-концевой гликопептид, состоящий из 30 аминокислотных остатков. На внутренней стороне мембраны находится также участок, содержащий остатки 186–187, амидная связь между которыми доступна действию папаина.

На основании данных ограниченного протеинолиза предложена модель упаковки белка в фоторецепторной мембране, согласно которой полипептидная цепь семь раз пересекает фосфолипидную мембрану. Каждый из семи трансмембранных сегментов (около 40 аминокислотных остатков) включает в себя примерно 30 аминокислот гидрофобной природы, которые, вероятно, находятся в тесном контакте с углеводородным матриксом мембраны. Последовательности гидрофобных аминокислот в полипептидной цепи родопсина разделены кластерами гидрофильных аминокислот, которые, возможно, взаимодействуют с полярными фрагментами молекул фосфолипидов и ориентируют каждый сегмент относительно плоскости мембраны.

Фоторецепторные клетки сетчатки глаз позвоночных представляют собой нейроны, высокодифференцированные по их роли в процессе зрительной фототрансдукции. Родопсин, основной белковый компонент мембран дисков наружных сегментов палочек сетчатки, при поглощении кванта света вызывает возбуждение клетки посредством регуляции токов плазматической мембраны [1]. Поскольку плазматическая мембрана и мембраны дисков, где сосредоточена основная масса родопсина, топологически не связаны друг с другом, предполагается, что взаимодействие между ними осуществляется с помощью медиатора, содержание которого в цитоплазме регулируется родопсином [1, 2].

В настоящее время обсуждаются два механизма фототрансдукции. Согласно первому, родопсин регулирует активность ферментативного комплекса, контролирующего содержание циклических нуклеотидов в цитоплазме [3]. В качестве медиатора в этом случае предполагается циклический GMP. Суть второго механизма заключается в том, что родопсин регулирует выброс из внутридискового пространства ионов Ca^{2+} , которые способны вызывать гиперполяризацию цитоплазматической мембраны [4]. Не исключено, что в процесс фототрансдукции вовлечены оба медиатора и степень поляризации плазматической мембраны регулируется как с GMP, так и ионами кальция [5].

Важная роль, которая отводится родопсину в зрительном процессе, объясняет особый интерес как к его химической структуре, так и к организации белковой молекулы в фосфолипидной мембране. Молекулярная организация родопсина в мембране может определять взаимодействие

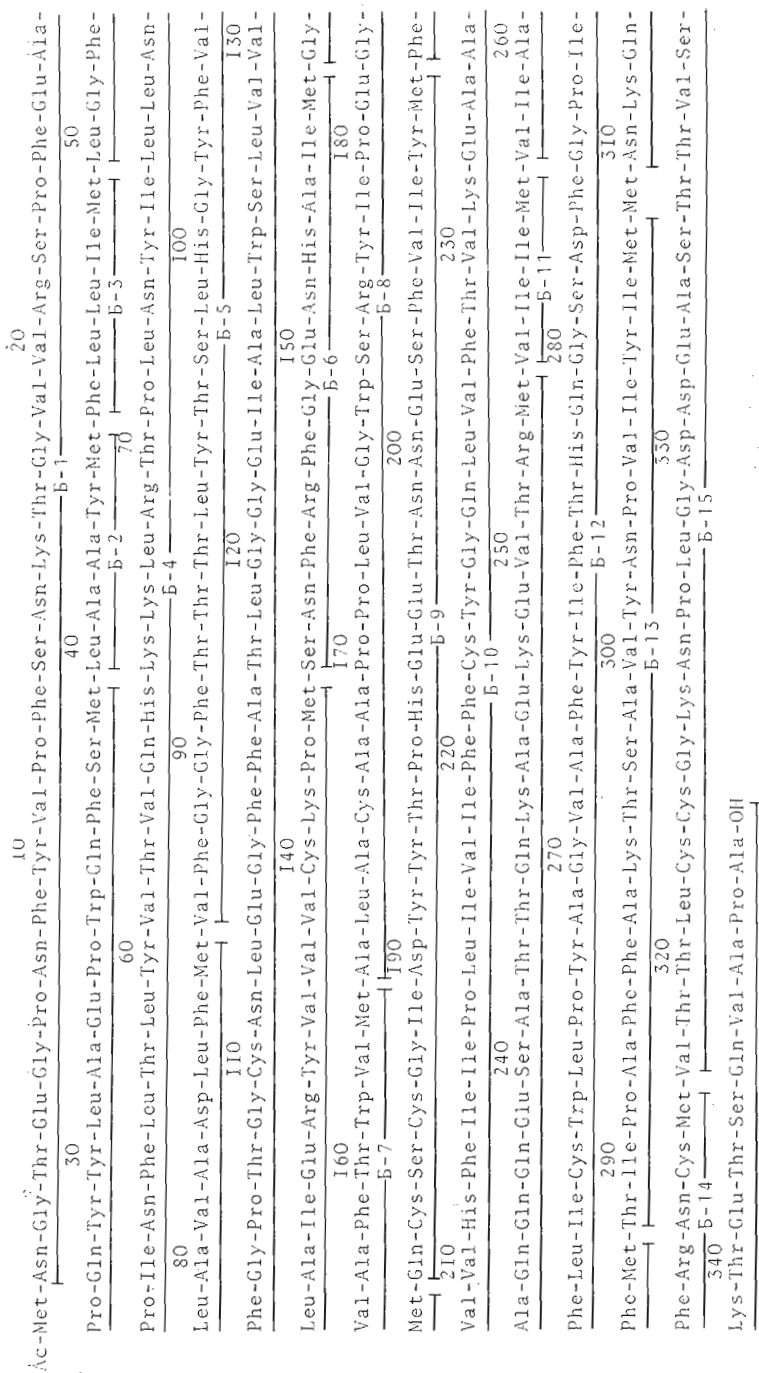


Рис. 4. Схема распределения бромциановых пептидов в молекуле зрительного родопина [6].

фрагментов полипептидной цепи с другими компонентами фоторецепторной системы, а также образование трансмембранного ионного канала.

Настоящая работа является частью структурно-функциональных исследований зрительного родопсина из сетчатки глаза быка и посвящена определению способа укладки его полипептидной цепи в фоторецепторной мембране.

Как было показано ранее [6], полипептидная цепь родопсина состоит из 348 аминокислотных остатков (рис. 1) и содержит 10 остатков цистеина, часть которых, по-видимому, образует внутримолекулярные дисульфидные связи [7].

Для решения поставленной задачи в работе использовался метод ограниченного протеинолиза, с помощью которого ранее была исследована топография бактериородопсина [8]. При локализации получаемых фрагментов в полипептидной цепи белка использовались данные по его первичной структуре — распределению бромциановых фрагментов в белковой молекуле [6].

Протеинолиз родопсина в мембранах нативной ориентации

Известно, что родопсин является гликопротеином, две олигосахаридные цепи которого связаны с N-концевым участком белка, экспонированным во внутридискное пространство [9], а C-концевой фрагмент находится в цитоплазматической области [10]. При локализации участков полипептидной цепи молекулы родопсина, расположенных на внешней, цитоплазматической поверхности, использовались мембраны дисков нативной ориентации [11], представляющие собой замкнутые везикулы, не связывающие ферритин-конканавалин А — электронноплотную метку, способную специфически взаимодействовать с углеводными компонентами родопсина. Обработка таких мембран термолизином, папаином и протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8 приводит в каждом случае к расщеплению полипептидной цепи родопсина на два крупных мембраносвязанных фрагмента F1 и F2 с сохранением спектра, характерного для исходной молекулы ($\lambda_{\text{макс}}$ 500 нм). Молекулярная масса фрагментов, оцененная данными диск-электрофореза, составляет 25 кДа (F1) и 12 кДа (F2). Аналогичные результаты протеинолиза были получены и другими авторами [12–18], причем доказано, что фрагмент F1 представляет собой N-концевую часть белковой молекулы и содержит олигосахаридные остатки; фрагмент F2 соответствует C-концевой части и включает остаток липина, участвующий в образовании альдиминной связи с 11-цис-ретиналем [14]. Анализ N- и C-концевых аминокислотных последовательностей фрагментов, составляющих мембраносвязанную часть гидролизата, а также определение первичной структуры водорастворимых пептидов позволяют однозначно локализовать участки ковалентной структуры белка, подверженные действию протеолитических ферментов.

Фрагменты FTh1 и FTh2, полученные в результате ограниченного протеинолиза родопсина термолизином, связаны в виде нековалентного комплекса, который, как известно [14], в детергентах диссоциирует под действием света. Эта способность к диссоциации была использована для очистки и разделения полученных фрагментов аффинной хроматографией на конканавалин-А-сефарозе (рис. 2). После отделения фракции I, содержащей в основном фосфолипиды, колонка подвергалась освещению, и при последующем промывании элюирующим буфером был выделен фрагмент FTh2. Фрагмент FTh1 элюируется после добавления в буфер α -метилманнозида. Фрагмент FTh2 включает в себя четыре бромциановых пептида — B-11, B-12, B-13 и B-14 (см. рис. 1). Кроме того, после разделения бромцианового гидролизата фрагмента FTh2 (рис. 3) были выделены два укороченных пептида (фракции IV и VI), соответствующих фрагментам бромциановых пептидов B-10 и B-15.

Аминокислотная последовательность фрагмента FTh2 (M 12 кДа), определенная деградацией по методу Эдмана (H-Ala-Thr-Thr-Gln-Lys-Ala-...), указывает на то, что термолизин расщепляет в родопсине амид-

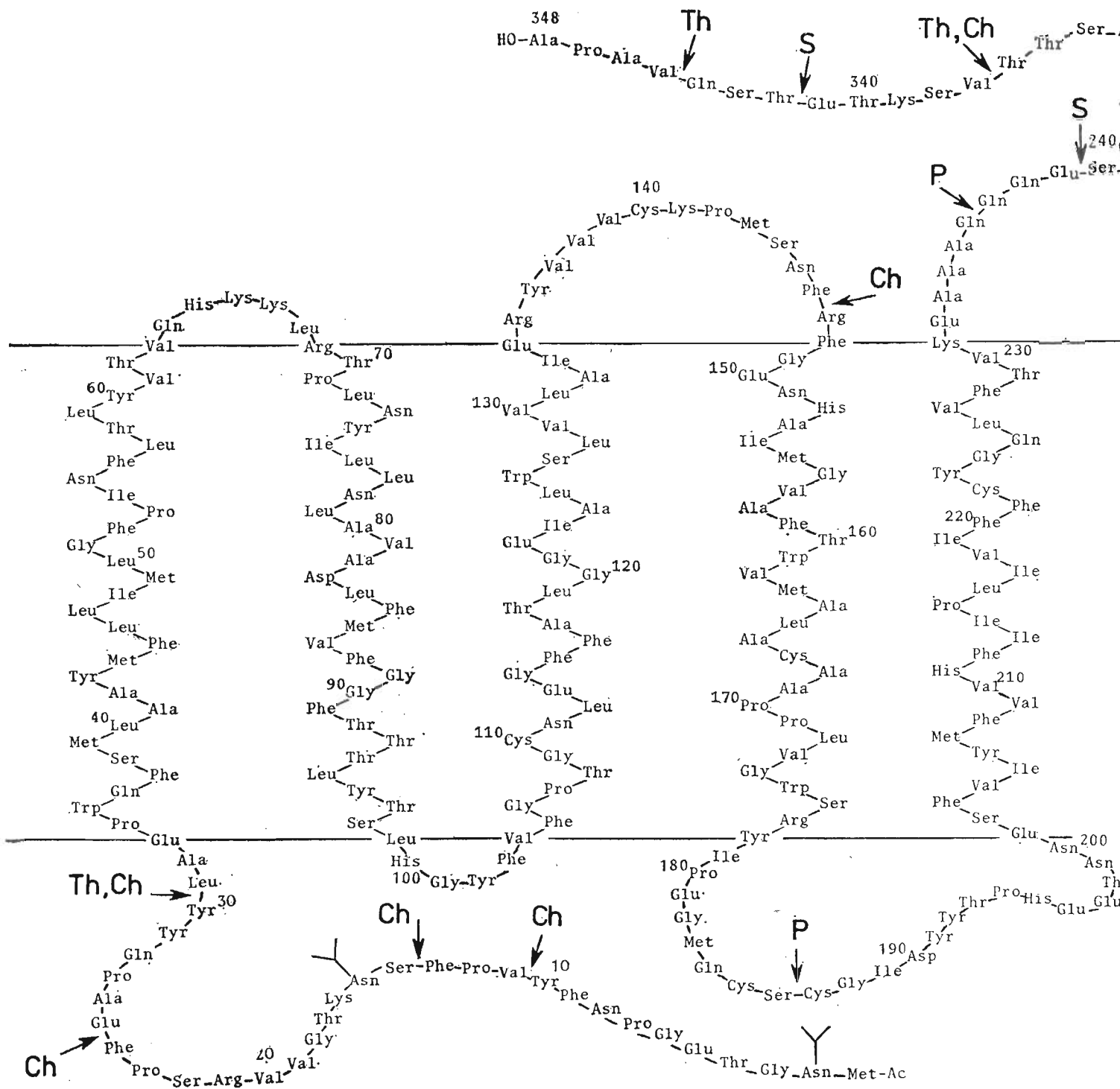
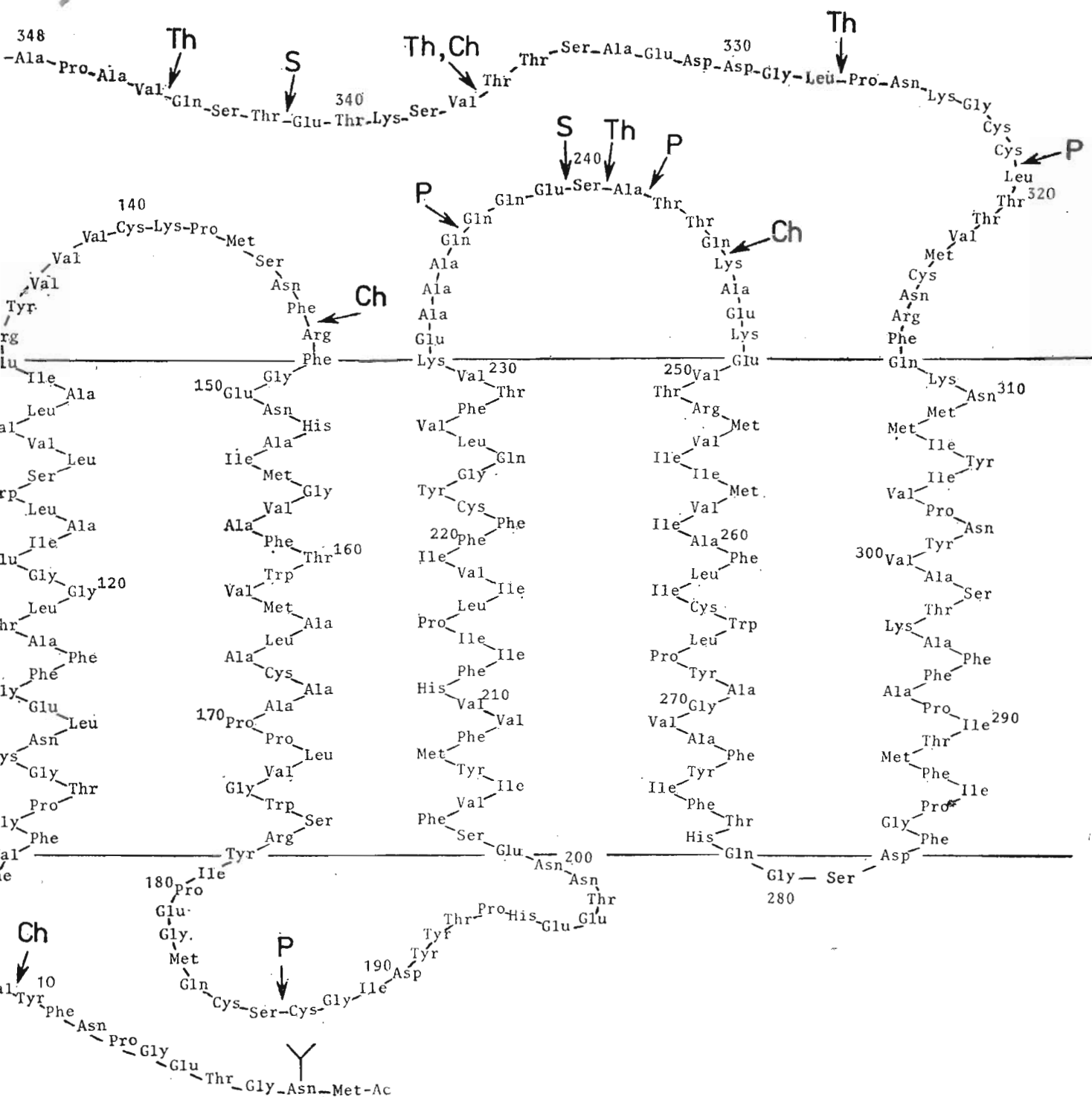


Рис. 10. Схема упаковки молекулы родопсина в фосфолипидной мембране (цитоплазматическая поверхность мембраны в верхней части рисунка)



с. 10. Схема упаковки молекулы родопсина в фосфолипидной мембране (цитоплазматическая поверхность мембраны в верхней части рисунка)

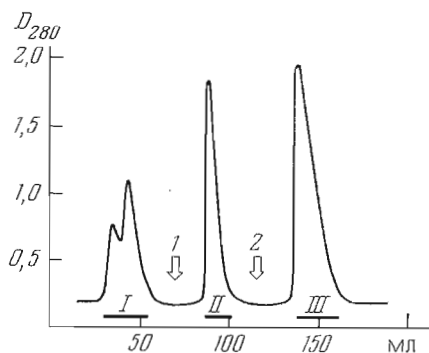


Рис. 2

Рис. 2. Разделение мембраносвязанной части термолитического гидролизата родопсина на колонке (2,5×10 см) с копканавалин-А-сефарозой, уравновешенной буфером, содержащим 0,1 М трис-ацетат, 1 М NaCl, 50 мМ гидроксид-амин, 2 мМ дитиотреит. Скорость элюирования 10 мл/ч. Стрелки указывают момент осветнения колонки (1) и добавления в элюирующий буфер 0,2 М α -метилманнозида (2). Фракция I содержит в основном фосфолипиды, фракция II — фрагмент FTh2, фракция III — FTh1

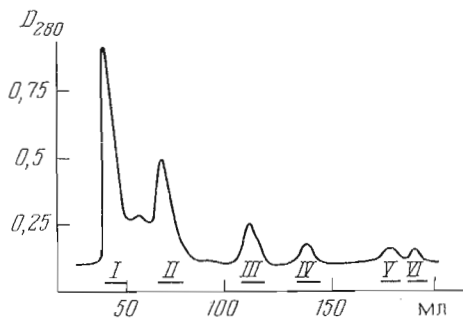


Рис. 3

Рис. 3. Разделение бромцианового гидролизата карбоксиметилированного фрагмента FTh2 на колонке (1,5×100 см) с биогеом P-6 (200–400 меш) в 50% муравьиной кислоте. Скорость элюирования 2 мл/ч. Фракция IV соответствует пептиду Ala²⁴¹ — Met²⁵³, а фракция VI — Val³¹⁸ — Pro³²⁷

ные связи между аминокислотными остатками Ser²⁴⁰—Ala²⁴¹. Фрагмент пептида Б-10, выделенный из бромцианового гидролизата FTh2 (рис. 3, фракция IV), также соответствует N-концевой аминокислотной последовательности FTh2 (241–253). Бромциановый гидролизат содержит также фрагмент пептида Б-15 (рис. 3, фракция VI), отвечающий C-концевой последовательности FTh2 (318–327). Таким образом, C-концевым остатком фрагмента FTh2 является Pro³²⁷.

Анализ водорастворимой части термолитического гидролизата позволил идентифицировать пептиды, отвечающие последовательности 328–336, 337–344 и 345–348 молекулы родопсина, что также свидетельствует о доступности C-концевого участка молекулы (327–348) действию этого фермента.

Идентификацию фрагмента FTh1 (*M* 25 кДа) проводили аналогичным образом. N-концевой анализ этого фрагмента указывает на то, что он не содержит свободной α -NH₂-группы и отвечает N-концевому участку молекулы родопсина с заблокированной ацетильной группой остатком Met⁴ [19]. Таким образом, N-концевой участок родопсина в мембранах дисков нативной ориентации не подвергается действию термолитина. N-Концевой анализ суммарного BrCN-гидролизата этого фрагмента при сопоставлении с данными бромцианового расщепления всей молекулы родопсина (рис. 1) позволил идентифицировать 9 пептидов (Б-1–Б-9), а также пептид, который, по-видимому, является фрагментом Б-10, укороченным с C-конца на несколько аминокислотных остатков. Таким образом, пептиды бромцианового расщепления фрагментов FTh1 и FTh2 в совокупности представляют весь набор бромциановых пептидов нативной молекулы.

Мембраносвязанная часть папаинового гидролизата, как и в случае гидролиза термолитином, состоит из двух фрагментов FP1 и FP2, которые были разделены на колонке с копканавалин-А-сефарозой в условиях, аналогичных описанным выше (рис. 2). Фрагмент FP1 соответствует N-концевому участку молекулы родопсина и включает в себя 10 бромциановых пептидов (Б-1 — Б-10). Учитывая данные электрофореза в полиакриламидном геле для FTh1 и FP1 (*M* 25 кДа), можно утверждать, что ферментативный гидролиз полипептидной цепи родопсина в мембранах нативной ориентации происходит в одной и той же области. Из N-концевой аминокислотной последовательности фрагмента FP2 (Thr-Thr-Gln-Lys-Ala...) следует, что папаин атакует полипептидную цепь родопсина между остат-

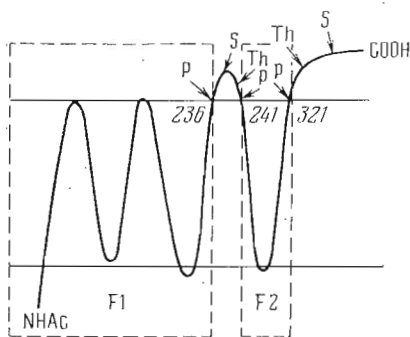


Рис. 4

Рис. 4. Схема расщепления полипептидной цепи родопсина в мембранах нативной ориентации папаином (P), термолизином (Th) и протеиназой из *St. aureus* (S). Числа относятся к номерам аминокислот, входящих в области, доступные действию трех ферментов

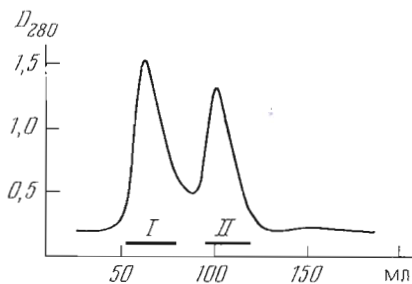


Рис. 5

Рис. 5. Разделение пептидов химотриптического гидролизата родопсина (фракция элюируется с конканавалин-А-сефарозы после освещения) на колонке (1,5×100 см) с биогеом P-30 (200–400 меш) в 70% муравьиной кислоте. Скорость элюирования 2 мл/ч

ками 241–242, т. е. гидролизует амидную связь в той же области, что и термолизин. Фрагмент FP2, так же как и фрагмент FTh2, включает четыре бромциановых пептида (Б-11 – Б-14) и два укороченных пептида Б-10 и Б-15, аминокислотная последовательность которых (242–253 и 318–321) отвечает соответственно N- и C-концевым аминокислотным последовательностям фрагмента FP2. Анализ C-концевой аминокислотной последовательности FP2 с помощью карбоксипептидазы А (...Thr-Thr-Leu-OH) также свидетельствует о том, что C-концевым остатком FP2 является Leu³²¹. Водорастворимая часть папаинового гидролизата содержит пептиды, принадлежащие к C-концевой области молекулы, а также пентапептид Gln-Gln-Glu-Ser-Ala (237–241), соответствующий участку полипептидной цепи белка, связывающему фрагменты F1 и F2 (см. рис. 4).

Подобным же образом проводился анализ гидролизата после обработки родопсинсодержащих мембран нативной ориентации протеиназой из *St. aureus*. Мембраносвязанная часть гидролизата содержит два фрагмента – FS1 и FS2. Фрагмент FS1, элюирующийся с колонки с конканавалин-А-сефарозой во фракции III (рис. 2), согласно данным N-концевого аминокислотного анализа, анализа состава бромцианового гидролизата и электрофореза в полиакриламидном геле, представляет собой N-концевую часть молекулы родопсина и включает в себя, как и FTh1 и FP1, примерно 240 аминокислотных остатков. Фрагмент FS2 содержит бромциановые пептиды Б-11 – Б-14, а также два укороченных пептида с последовательностью 240–253 и 318–341. Определение N-концевой аминокислотной последовательности FS2 (Ser-Ala-Thr-Thr-Gln-Lys...) позволило локализовать место расщепления полипептидной цепи протеиназой из *St. aureus* (Glu²³⁹–Ser²¹⁰). Действию этой протеиназы подвергается также C-концевой участок молекулы, о чем свидетельствует высвобождение в супернатант пептида, соответствующего последовательности 342–348 полипептидной цепи родопсина.

Таким образом, сумма данных по ограниченному протеинолизу белка в мембранах нативной ориентации тремя ферментами указывает на две области полипептидной цепи родопсина, экспонированные в цитоплазматическое пространство – C-концевой участок 321–348 и участок с последовательностью 236–241, доступность которого протеиназам обуславливает образование фрагментов F1 и F2 (рис. 4).

При обработке мембран нативной ориентации химотрипсином полипептидная цепь родопсина подвергается более глубокому гидролизу, чем при действии ферментов, использованных ранее. При разделении гидролизата

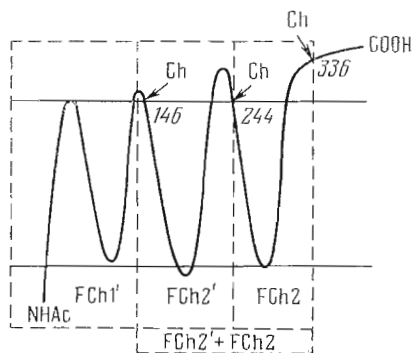


Рис. 6

Рис. 6. Схема действия химотрипсина (Ch) на молекулу родопсина в мембранах нативной ориентации

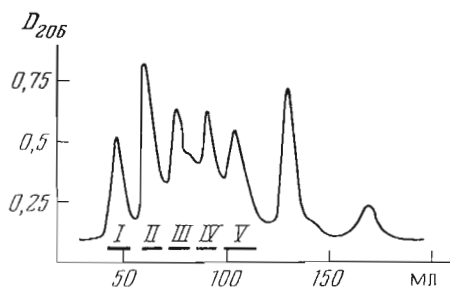


Рис. 7

Рис. 7. Фракционирование водорастворимой части химотриптического гидролизата (инвертированные мембраны) на колонке (1,5×100 см) с биогелем P-6 (200–400 меш), уравновешенным 1% уксусной кислотой. Скорость элюирования 5 мл/ч

аффинной хроматографией на конканавалин-А-сефарозе в стандартных условиях (рис. 2) фракция II, элюируемая после осветнения колонки, содержит смесь пептидов, N-концевой аминокислотный анализ которых показывает наличие лизина и аргинина. Добавление α -метилманнозида приводит к элюированию с колонки индивидуального фрагмента FCh1'. Для локализации последнего в полипептидной цепи родопсина был использован его гидролиз бромцианом. Согласно данным N-концевого аминокислотного анализа полученных пептидов, фрагмент FCh1' включает в себя шесть бромциановых пептидов Б-1 — Б-6 (см. рис. 1), т. е. представляет собой N-концевую часть молекулы родопсина и содержит примерно 150 аминокислотных остатков (18 кДа). Бромциановый гидролизат фракции II, элюируемой после осветнения колонки, по сравнению с бромциановым гидролизатом фрагментов FTh2, FP2 и FS2, кроме пептидов Б-11 — Б-14 содержит также пептиды Б-7 — Б-10 (рис. 1). Для локализации участков полипептидной цепи белка, подверженных действию химотрипсина, фракция II (см. рис. 2), содержащая в данном случае смесь пептидов, была разделена на биогеле P-30 в 70% муравьиной кислоте на две фракции (рис. 5). Высокомолекулярная фракция (M 20 кДа) представляет собой индивидуальный полипептид с N-концевой аминокислотной последовательностью $^{147}\text{Arg-Phe-Gly-Glu-Asn-His-...}$. Фракция с меньшей молекулярной массой (M 12 кДа) содержит два полипептида с N-концевыми аминокислотами — аргинин (FCh2') и лизин (FCh2). Для локализации этих пептидов в полипептидной цепи родопсина был осуществлен гидролиз их смеси бромцианом. Из суммы водорастворимых пептидов жидкостной хроматографией на колонке Zorbax C-18 были выделены два пептида, имеющие в качестве N-концевых аминокислот остатки Lys и Arg, для которых методом Эдмана была установлена структура



Это позволило однозначно локализовать точки расщепления полипептидной цепи родопсина в мембранах нативной ориентации химотрипсином ($\text{Phe}^{146}\text{-Arg}^{147}$ и $\text{Gln}^{244}\text{-Lys}^{245}$). Совпадение аминокислотной последовательности первого из этих пептидов с N-концевой аминокислотной последовательностью высокомолекулярного фрагмента, полученного после разделения на биогеле P-30 (рис. 5), с учетом молекулярных масс фрагментов FCh2'+FCh2, FCh2' и FCh2 позволяет заключить, что высокомолекулярный фрагмент включает в себя оба полипептида FCh2' и FCh2 и представляет собой продукт неполного гидролиза по связи $\text{Gln}^{244}\text{-Lys}^{245}$. Жидкостной хроматографией из бромцианового гидролизата смеси фрагментов FCh2' и FCh2 также был выделен пептид, отвечающий C-концевой области поли-

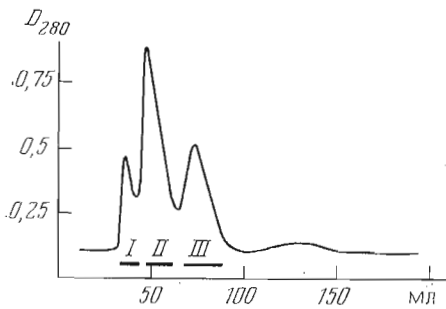


Рис. 8

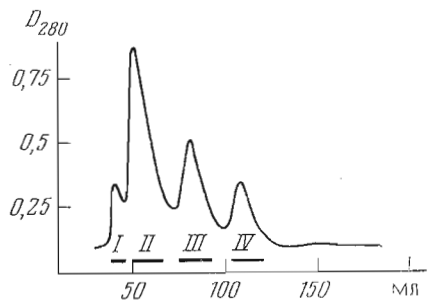


Рис. 9

Рис. 8. Разделение мембраносвязанных фрагментов химотриптического гидролизата родопсина (инвертированные мембраны) на колонке (1,5×100 см) с сефадексом LH-60, уравновешенным системой этанол – муравьиная кислота (70 : 30). Скорость элюирования 10 мл/ч

Рис. 9. Разделение мембраносвязанных фрагментов папаинового гидролизата родопсина (инвертированные мембраны) на колонке (1,5×100 см) с сефадексом LH-60, уравновешенным системой этанол – муравьиная кислота (70 : 30). Скорость элюирования 10 мл/ч

пептидной цепи родопсина (318–336). В смеси водорастворимых пептидов, полученных после ограниченного протеинолиза родопсина химотрипсином, идентифицирован пептид с последовательностью 337–348, дополняющий бромциановый пептид с последовательностью 318–336 из фрагмента FCh2 до целого С-концевого бромцианового пептида В-15 нативной молекулы родопсина (рис. 1). Это дало возможность локализовать третью точку расщепления химотрипсином полипептидной цепи родопсина, находящуюся с цитоплазматической стороны мембраны (Thr³³⁶–Val³³⁷) (рис. 6).

Протеинолиз родопсина в инвертированных мембранах

Данные, приведенные выше, касаются мембран нативной ориентации, представляющих собой замкнутые везикулы, ориентированные цитоплазматической стороной наружу. Внутридисковая поверхность этих везикул недоступна действию таких непроникающих агентов, какими являются протеолитические ферменты. Поскольку родопсин – трансмембранный белок, его полипептидная цепь должна пронизывать гидрофобную часть мембраны, т. е. некоторые участки полипептидной цепи должны быть экспонированы во внутридисковое пространство. Чтобы получить информацию о таких участках, мембраны дисков последовательно замораживали и оттаивали с целью получения пузырьков с обратной ориентацией мембран [20]. В процессе обработки ферментами эта процедура повторялась несколько раз.

В результате инкубации таких инвертированных пузырьков с химотрипсином наряду с С-концевым пептидом 337–348 в супернатанте при его разделении на биогеле Р-6 (рис. 7) были найдены пептиды, принадлежащие N-концевой части молекулы родопсина с последовательностью Ac-Met¹–Tyr¹⁰ (фракция III), Val¹¹–Phe¹³ (фракция V), Ser¹⁴–Phe²⁴ (фракция I), Glu²⁵–Tyr³⁰ (фракция IV).

При анализе мембраносвязанной части гидролизата был идентифицирован пептид ³¹Leu-Ala-Glu-Pro-Trp-Gln... (рис. 8, фракция II).

Пептид с аналогичной аминокислотной последовательностью был обнаружен также в мембраносвязанной части гидролизата при протеинолизе термолизинном, что свидетельствует о доступности 30 аминокислотных остатков N-концевой области родопсина с внутренней стороны мембран действию различных протеолитических ферментов.

Кроме N-концевого участка полипептидной цепи родопсина с внутридисковой стороны мембраны находится область, включающая в себя последовательность 186–187, что следует из данных ограниченного протеи-

нолиза папаином. При разделении мембраносвязанных фрагментов (рис. 9) был идентифицирован пептид с молекулярной массой 6 кДа (фракция IV) с N-концевой аминокислотной последовательностью $^{187}\text{Cys-Gly-Pe-Asp-Tyr}...$ Определение C-концевой аминокислотной последовательности этого пептида с помощью карбоксипептидазы А указывает на то, что C-концевым остатком этого пептида является Gln^{236} . По-видимому, полученный полипептид, состоящий из 50 аминокислотных остатков, является единичным сегментом, пронизывающим гидрофобную область фосфолипидного бислоя.

Об укладке полипептидной цепи родопсина в мембране

Анализ результатов ограниченного протеинолиза в мембране исходной и обратной ориентации позволяет сделать вывод относительно укладки полипептидной цепи в мембране (рис. 10).

N-Концевая часть молекулы (фрагмент 1–30), содержащая олигосахаридные остатки, экспонирована во внутридискное пространство. C-Концевая область 321–348, содержащая фосфорилируемые родопсинкиназой остатки серина и треонина [10], находится в цитоплазме. Как предполагается [21], полипептидная цепь родопсина пронизывает гидрофобную область липидного бислоя семь раз, образуя с цитоплазматической стороны мембраны две петли, доступные действию протеолитических ферментов. В области 236–244, наиболее подверженной протеинолизу, находятся четыре остатка глутамина, один из которых, вероятно, подвергается модификации в присутствии трансглутаминазы [22].

В предлагаемой модели фрагменты полипептидной цепи родопсина, образующие петли с цитоплазматической и внутридискковой поверхностей мембраны, состоят из кластеров гидрофильных аминокислот, возможно взаимодействующих с полярной областью молекул фосфолипидов. Гидрофильные кластеры разделены семью полипептидными фрагментами, каждый из которых содержит около 30 аминокислотных остатков в основном гидрофобной природы. Эти фрагменты, по-видимому, являются α -спиральными тяжами, пронизывающими гидрофобную область мембраны. Таким образом, каждый гидрофобный тяж с обоих концов имеет полярные участки из гидрофильных аминокислот, ориентирующих его в мембране. Каждый из семи амфифильных сегментов включает в себя ~ 40 аминокислотных остатков, что хорошо согласуется с моделью, по которой родопсин представляет собой цилиндр длиной 70–80 Å [23] с гидрофильной внутренней и гидрофобной внешней поверхностями, в котором отдельные α -спиральные сегменты ассоциированы за счет нековалентных взаимодействий. Предполагается, что под действием света образуется гидрофильный канал диаметром 10 Å [24].

С этой точки зрения эксперименты с конканавалин-А-сефарозой могут дать ценную информацию, касающуюся нековалентных взаимодействий в молекуле родопсина.

Предполагается, что после протеинолиза мембраносвязанные фрагменты родопсина, не участвующие в образовании нековалентного комплекса, должны элюироваться с конканавалин-А-сефарозы до освещения (во фракции с фосфолипидами). Фрагменты же, составляющие фоточувствительный комплекс, должны находиться во фракции, выделяемой как непосредственно после освещения, так и при дополнительном элюировании α -метилманнозидом, поскольку в последней фракции находится углеводсодержащий фрагмент, посредством которого комплекс иммобилизован на аффинном сорбенте.

Анализ фракции химотриптического гидролизата до освещения показал, что она содержит лишь незначительное количество пептидного материала, относящегося к фрагментам минорных белков, а также к небольшой части опсина, неизбежно присутствующего в препаратах мембран. Комплекс из трех фрагментов, иммобилизованный на конканавалин-А-сефарозе, стабилизирован за счет нековалентных взаимодействий между α -спиральными тяжами. В стабилизацию комплекса, очевидно, вносит вклад окру-

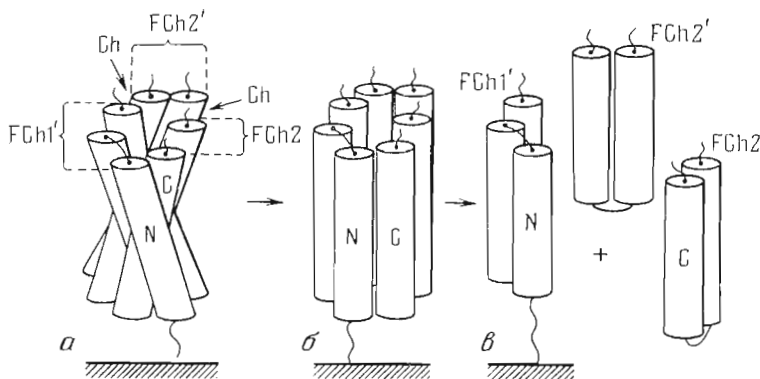


Рис. 11. Схема превращений молекулы родопсина, расщепленной химотрипсином, под действием света. Мембраносвязанная часть гидролизата состоит из трех фрагментов FCh1', FCh2' и FCh2, которые ассоциированы в виде нековалентного комплекса (а). Обесцвечивание комплекса, иммобилизованного на конканавалин-А-сефарозе, сопровождается разрывом нековалентных связей между отдельными сегментами (N и C-N- и C-концевые сегменты соответственно) (б) с последующей диссоциацией комплекса в детергенте (в). Стрелками указаны области расщепления химотрипсином (Ch)

жение 11-*цис*-ретинала «гидрофобным карманом». Изомеризация ретинала в результате поглощения кванта света вызывает пертурбацию нековалентных взаимодействий с последующей диссоциацией комплекса в детергентах (рис. 11). Возможно, что такая диссоциация может служить моделью процессов, которые происходят с нативным родопсином в мембране под действием света. Согласно такой модели, молекула родопсина, поглощая квант света, претерпевает серию конформационных превращений с ослаблением или разрывом нековалентных взаимодействий между отдельными α -спиральными тяжами, что приводит к образованию гидрофильной поры (рис. 11б).

Экспериментальная часть

Мембраны дисков нативной ориентации из глаз быка были выделены по методике, описанной в работе [11]. Все операции проводили при слабом красном освещении в атмосфере аргона при 4°С. Исходный раствор фосфатного буфера, использованный при выделении фоторецепторных мембран, был предварительно пропущен через колонку с Chelex-100 (Bio-Rad, США) для удаления следов тяжелых металлов, катализирующих окисление ненасыщенных жирных кислот. Препараты мембран имели спектральный критерий чистоты $D_{280}/D_{500}=1,9-2,0$.

В работе были использованы папаин, химотрипсин (Worthington, Англия), термоллизин (Sigma, США), протеиназа из *Staphylococcus aureus* V8 (Miles, Англия), иодацетамид, диизопропилфторфосфат, цетилтриметиламмонийбромид (Fluka, Швейцария), этилендиаминтетрауксусная кислота, дитиотрент, додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), бромциан (Pierce, США), конканавалин-А-сефароза 4В, сефадекс LH-60 (Pharmacia, Швеция), блотгели Р-6, Р-30 (Bio-Rad, США).

Ограниченный протеолиз родопсина проводили в темноте при 20°С на суспензии мембран с концентрацией 4 мг/мл в расчете на белок. Весовое соотношение фермент — белок от 1:10 до 1:50. Протеолиз папаином проводили в течение 3 ч в 67 мМ натрий-фосфатном буфере, содержащем 2 мМ EDTA, 5 мМ цистеин (рН 7,0); термоллизин в 10 мМ трис-ацетатном буфере, содержащем 2 мМ CaCl₂ (рН 7,4), в течение 12 ч; протеиназой из *St. aureus* в буфере 10 мМ NaHCO₃ и 70 мМ NaCl (рН 8,0) в течение 12 ч; химотрипсином в 67 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 8,0) в течение 12 ч. По окончании гидролиза добавляли соответствующий ингибитор протеиназ: для папаина — 0,1 М иодацетамид, для термоллизина —

0,1 М EDTA, для химотрипсина и протеиназы из *St. aureus* — 20 мМ диизопротилфторфосфат. Мембраны осаждали на центрифуге J-21 (Бекман, США) в течение 30 мин при 18 000 об/мин в 0,1 М трис-ацетатном буфере (рН 7,0), супернатант отбирали, полученный осадок промывали в тех же условиях дополнительно 2 раза.

Отмытый от фермента осадок мембран суспендировали в буфере, содержащем 0,1 М СТАВ, 1 М NaCl, 0,1 М трис-ацетат, 50 мМ гидроксилламин и 2 мМ дитиотреит (рН 7,0), и наносили на колонку с кошканавалин-А-сефарозой (рис. 2). После отделения фракции I колонку подвергали освещению дневным светом и фракцию II элюировали уравнивающим буфером. Фракцию III элюировали тем же буфером, содержащим 0,2 М α -метилманнозид. После диализа против воды (24 ч) белковые фрагменты из фракций I—III осаждали из раствора, содержащего детергент, добавлением этанола до конечной концентрации 50%. Осажденную центрифугированием суспензию промывали седиментацией в 70% этаноле и воде, после чего полученный осадок суспендировали в буфере, содержащем 1% SDS и 6 М мочевины, восстанавливали дитиотреитом (12 ч) и карбоксиметилировали [25]. Карбоксиметилированные производные вновь осаждали и промывали последовательно седиментацией в этаноле и воде. Лиофилизированный осадок растворяли в 99% муравьиной кислоте, добавляли этанол до концентрации 70% и раствор карбоксиметилированных производных фрагментов белка наносили на колонку (1,5×40 см) с сефадексом LH-60, уравниваемую системой муравьиная кислота — этанол (30 : 70). Обессоленную карбоксиметилированную фракцию II (рис. 2) химотриптического гидролизата (фрагменты FCh2', FCh2 и FCh2'+FCh2) подвергали дальнейшему разделению на колонке (1,5×100 см) с биогеом P-30 (200—400 меш) в 70% муравьиной кислоте (рис. 5). Полученные фрагменты упаривали на роторном испарителе, растворяли в конц. муравьиной кислоте, разбавляли водой до конечной концентрации кислоты 70%, после чего проводили их дальнейший анализ.

Согласно данным аминокислотного анализа, фракция I (рис. 2) содержит лишь следовые количества пептидного материала, относящегося, по-видимому, к минорным белкам и опсину, и состоит в основном из фосфолипидов.

Расщепление фрагментов бромцианом проводили в 70% муравьиной кислоте при 100-кратном избытке реагента в течение 24 ч при 20°С в атмосфере аргона. Гидролизат, полученный расщеплением бромцианом фрагментов F2, упаривали, растворяли в минимальном количестве конц. муравьиной кислоты, разбавляли водой до конечной концентрации кислоты 50% и наносили на колонку с биогеом P-6 (200—400 меш), уравниваемую кислотой той же концентрации (рис. 3). В случае химотриптических фрагментов FCh2' и FCh2 (фракция II, рис. 5) разделяли только водорастворимую часть гидролизата, поскольку необходимые для анализа N- и C-концевые бромциановые пептиды этих фрагментов растворимы в воде.

Супернатант, полученный после осаждения мембран, обработанных ферментами, лиофилизировали и обессоливали на колонке (1,5×100 см) с биогеом P-6 (200—400 меш), уравниваемой 1% уксусной кислотой. Разделение пептидов супернатанта, а также водорастворимых бромциановых пептидов мембраносвязанных фрагментов осуществляли жидкостной хроматографией на колонке Zorbax C-18 (4,6×250 мм) (Du Pont, США), уравниваемой 10 мМ аммоний-ацетатным буфером (рН 5,7), с использованием линейного градиента ацетонитрила от 1 до 50%. Детекцию проводили на УФ-спектрофотометре (Du Pont, США) при 220 нм.

Для получения мембран с инвертированной ориентацией мембраны дисков суспендировали в соответствующем для протеинолиза буфере, содержащем 5% сахарозы, и осаждали на центрифуге (30 мин, 18 000 об/мин). Полученный осадок мембран замораживали в жидком азоте, затем оттаивали до 20°С и вновь суспендировали в буфере для протеинолиза (без сахарозы). После добавления фермента замораживание-оттаивание проводили дополнительно 3 раза в процессе 12-ч инкубации

мембран. После добавления ингибитора протеиназы суспензию вновь подвергали замораживанию-оттаиванию и центрифугированию.

Поскольку в опытах с инвертированными мембранами N-концевой участок молекулы родопсина, содержащий олигосахаридные цепи, гидролизует ферментами, конканавалин-A-сефароза непригодна в этом случае для разделения белковых фрагментов.

Отмытые от фермента мембраны суспендировали в буфере с 1% додецилсульфатом натрия и 6М мочевиной и подвергали восстановлению и карбоксиметилированию, как описано выше. Карбоксиметилированные фрагменты белка осаждали этанолом и после экстракции фосфолипидов смесью хлороформ — метанол (2:1) разделяли гель-фильтрацией на колонке (1,5×100 см) с сефадексом LH-60, уравновешенным системой муравьиная кислота — этанол (30:70) (рис. 8 и 9).

Супернатант, полученный после осаждения инвертированных мембран, обработанных химотрипсином, был лиофилизирован и фракционирован на колонке (1,5×100 см) с биогеом Р-6 (200—400 меш), уравновешенным 1% уксусной кислотой (рис. 7). Фракции I и II содержат идентифицированные пептиды 14—24 и 337—348 в индивидуальном состоянии. Фракции III—V подвергали дополнительной очистке при помощи жидкостной хроматографии на колонке Zorbax C-18, как описано выше.

Авторы выражают благодарность руководителю настоящей работы академику Ю. А. Овчинникову за обсуждение результатов и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hagins W. A. *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.*, 1972, v. 1, № 1, p. 131—158.
2. Hagins W. A., Yoshikami S. In: *Vertebrate Photoreception* / Eds Barlow H. B., Fatt P. N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 97—139.
3. Miller W. H., Nicol G. D. *Nature*, 1979, v. 280, № 5717, p. 64—66.
4. Hagins W. A., Yoshikami S. *Exp. Eye Res.*, 1974, v. 18, № 3, p. 299—305.
5. Torda C. *Inter. J. Neuroscience*, 1981, v. 14, № 1, p. 153—161.
6. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Аргамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Богачук А. С., Мирошников А. И., Мартынов В. И., Куделин А. Б. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 10, с. 1424—1427.
7. De Grip W. J., van de Laar G. L. M., Daemen F. J. M., Bonting S. L. *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 325, № 2, p. 315—322.
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. Röhlich P. *Nature*, 1976, v. 263, № 5580, p. 789—791.
10. Hargrave P. A., Fong S.-L., McDowell J. H., Mas M. T., Curtis D. R., Wang J. K., Juszczak E., Smith D. P. *Neurochem. Int.*, 1980, v. 1, № 1, p. 231—244.
11. Smith H. G., Stubbs G. W., Lilman B. J. *Exp. Eye Res.*, 1975, v. 20, № 2, p. 211—217.
12. Trayhurn P., Mandel P., Virmaux N. *FEBS Lett.*, 1974, v. 38, № 3, p. 351—354.
13. Saari J. C. *J. Cell Biol.*, 1974, v. 63, № 2, p. 480—491.
14. Pober J. S., Stryer L. *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 95, № 3, p. 477—481.
15. Klip A., Darszon A., Montal M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 72, № 4, p. 1350—1358.
16. Sale G. J., Towner P., Akhtar M. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 25, p. 5641—5649.
17. Fung B. K.-K., Hubbel W. L. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 21, p. 4396—4402.
18. Findlay J. B. C., Brett M., Pappin D. J. C. *Nature*, 1981, v. 293, № 5830, p. 314—316.
19. Tsunasawa S., Narita K., Shichi H. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 624, № 1, p. 218—225.
20. Adams A. J., Tanaka M., Shichi H. *Exp. Eye Res.*, 1978, v. 27, № 4, p. 595—605.
21. Ovchinnikov Yu. A. *FEBS Lett.*, 1982, v. 148, № 2, p. 179—191.
22. Pober J. S., Iwanij V., Reich E., Stryer L. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 11, p. 2163—2169.
23. Corless J. M., McCaslin D. R., Scott B. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 4, p. 1116—1120.
24. Darszon A., Montal M., Zarco J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 76, № 3, p. 820—827.
25. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 3, p. 622—627.

Поступила в редакцию
1.XII.1982

LIMITED PROTEOLYSIS STUDIES ON MOLECULAR ORGANIZATION
OF BOVINE RHODOPSIN IN THE PHOTORECEPTOR MEMBRANE

MARTYNOV V. I., KOSTINA M. B., FEIGINA M. Yu., MIROSHNIKOV A. I.

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

Proteolysis of rhodopsin in disc membranes of right-side out orientation by thermolysin, papain and *St. aureus* V8 protease allowed to identify two highly exposed regions of polypeptide chain located on the cytoplasmic membrane surface: carboxyl terminal sequence 321-348 and the fragment 236-241. Incubation with chymotrypsin reveals the third site on the cytoplasmic surface, 146-147, accessible to proteolytic enzymes. Frozen-thawed membranes comprise a mixture of vesicles with normal and inverted orientation. Both thermolytic and chymotryptic digests of rhodopsin in these membranes contain the polypeptide which represents the amino terminal sequence lacking the first 30 amino acid residues. Thus at least 30 amino acids from the N-terminus must protrude into the intradiscal space. One additional site was located on the intradiscal surface: papain digests rhodopsin in the inverted membranes at the position 186-187. Localization of the proteolytic cleavage sites allowed to propose a model for rhodopsin topography in disc membrane: the polypeptide chain traverses the bilayer thickness seven times; each of seven transmembrane segments containing approximately 40 amino acid residues includes a sequence of ~30 hydrophobic amino acids, which are probably in close contact with hydrocarbon matrix of the membrane. Hydrophobic sequences are terminated with fragments containing clusters of hydrophilic amino acids, possibly interacting with lipid polar head groups and orienting each segment in the bilayer.