



УДК 577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА γ -СУБЪЕДИНИЦЫ
GTP-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ СЕТЧАТКИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Тележинская И. Н.,
Шуваева Т. М., Обухов А. Н., Иценко К. А.,
Шемякин В. В.

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

Установлена полная аминокислотная последовательность γ -субъединицы GTP-связывающего белка. Полипептидная цепь γ -субъединицы состоит из 69 аминокислотных остатков и содержит последовательность Cys³⁵—Cys³⁶. Молекулярная масса γ -субъединицы составляет 8008,7 Да.

GTP-связывающий белок, или трансдуцин,— периферический белок, содержащийся в наружных сегментах палочек сетчатки глаза. Трансдуцин является амплификатором и одним из преобразователей зрительного импульса, осуществляющим сопряжение между родопсином и сGMP-фосфодиэстеразой. При поглощении кванта света родопсин претерпевает ряд фотондурцированных превращений, приводящих к образованию метародопсина II. Каждая молекула метародопсина II может активировать до 100 молекул трансдуцина, при этом связанный с трансдуцином GDP обменивается на GTP. Комплекс трансдуцин — GTP в свою очередь активирует сGMP-фосфодиэстеразу, которая затем гидролизует до 500 молекул сGMP. Таким образом, общий коэффициент усиления эффективного кванта света достигает ~50 000. Снижение концентрации сGMP приводит к блокированию натриевых каналов и гиперполяризации цитоплазматической мембраны [1].

Молекулярная масса трансдуцина равна ~85 кДа, он состоит из трех субъединиц. Известно, что α -субъединица (~39 кДа) содержит центр связывания гуаниловых нуклеотидов и принимает участие в активации фосфодиэстеразы, а β - (~36 кДа) и γ - (~8 кДа) субъединицы необходимы для проявления GTP-азной активности и для катализируемого фотоактивированным родопсином обмена GDP на GTP [2].

Настоящая работа является частью комплексных исследований по выяснению первичной структуры и механизма функционирования белков, принимающих участие в преобразовании зрительного импульса, и посвящена установлению аминокислотной последовательности γ -субъединицы трансдуцина из сетчатки крупного рогатого скота. Краткие сообщения по результатам работы опубликованы ранее [3, 4].

Выделение трансдуцина проводилось по методике Кюна [5], основанной на том, что при освещении светом трансдуцин образует прочный комплекс с родопсином, находящимся в мембранах дисков наружных сегментов палочек (НСП). При обработке мембран GTP комплекс разрушается и трансдуцин переходит в растворимое состояние. В стандартную методику выделения нами был внесен ряд изменений. На стадии экстракции растворимых белков из мембран дисков НСП был снижен pH как изотонического, так и гипотонического буферных растворов с 7,4 до 6,0, что способствовало более прочному связыванию трансдуцина с родопсином и увеличению конечного выхода трансдуцина. Кроме того, для концентрирования белка и удаления избытка GTP была введена дополнительная стадия — хроматография на DEAE-целлюлозе.

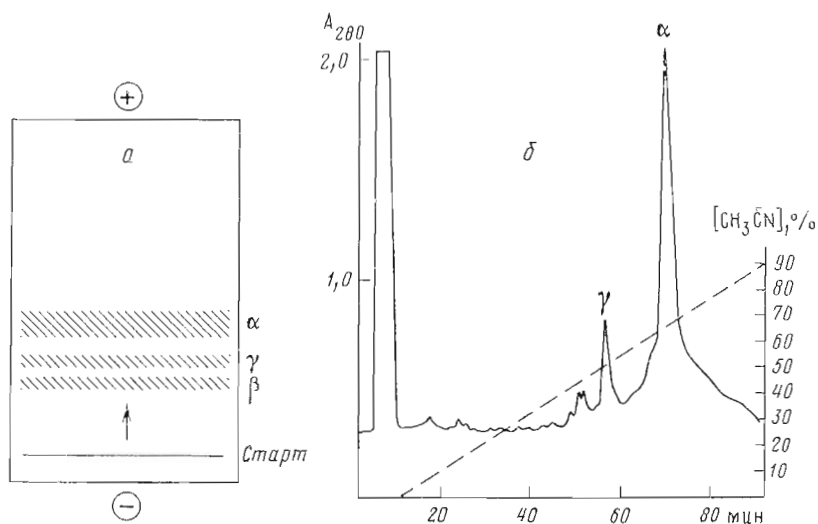


Рис. 1. Разделение субъединиц GTP-связывающего белка: *a* — электрофорезом в ацетат-целлюлозном блоке. Электродный буфер: 0,15 М трис-борат, 8 М мочевины, 0,01 EDTA, 0,02 М β -меркаптоэтанол, pH 8,9. Сила тока 100 мА, время 3 ч; *б* — ВЭЖХ на колонке (0,46 \times 25 см) Silasorb Phenyl (10 мкм) в градиенте ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте при скорости 1 мл/мин

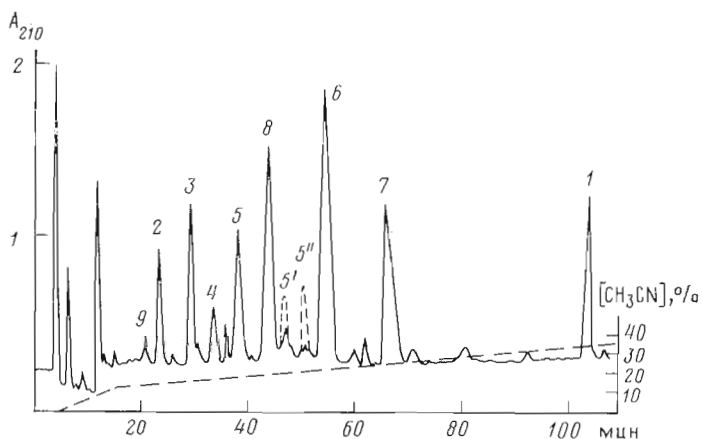


Рис. 2. Разделение пептидов, полученных при гидролизе γ -субъединицы трансдукции на протеиназой из *St. aureus* на колонке (0,46 \times 25 см) Nucleosil 7C18. Условия как на рис. 16. Пунктирной линией показаны радиоактивные пептиды, образующиеся при гидролизе γ -субъединицы, модифицированной под ^{14}C ацетамидом. Номер пика на рисунке соответствует номеру выделенного из данной фракции пептида TGS

Для разделения субъединиц использовались электрофорез в ацетат-целлюлозном блоке в денатурирующих условиях и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой. При электрофорезе трансдукцина в ацетат-целлюлозном блоке в 0,15 М трис-борате (pH 8,9), содержащем 8 М мочевины, проявлялись три полосы (рис. 1). Полоса с большей подвижностью (E_r 0,34) соответствовала α -субъединице, полоса с E_r 0,24 — γ -субъединице и полоса с E_r 0,18 — β -субъединице. Выход в сумме составлял до 80% от нанесенного количества белка. Эффективным методом получения индивидуальных α - и γ -субъединиц оказалась ВЭЖХ трансдукцина на колонке с обращенной фазой Silasorb Phenyl. При использовании градиента ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте γ - и α -субъединицы элюировались с выходом 50 и 80% соответственно, а β -субъединица необратимо сорбировалась на носителе. Чистоту выделенных субъединиц определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсуль-

Аминокислотный состав α -, β - и γ -субъединиц трансдуцина *

Аминокислота	Число остатков субъединиц		
	α	β	γ
Asp	40	43	8
Thr	17	24	2
Ser	23	28	2
Glu	44	25	13
Pro	9	7	4
Gly	24	32	4
Ala	24	29	—
Cys	8 **	7 **	2 ***
Val	17	15	6
Met	11	15	2
Ile	25	13	3
Leu	28	26	7
Tyr	8	7	1
Phe	13	10	2
His	7	7	—
Lys	23	11	10
Arg	14	19	3
Число остатков	340	310	69

* Аминокислотный состав α -, β - и γ -субъединиц рассчитывали исходя из молекулярных масс, описанных в литературе и равных 39, 36 и 8 кДа соответственно. Thr в γ -субъединице отсутствует, в α - и β -субъединицах не определялся.

** В виде Cys(Cm) после модификации иодуксусной кислотой.

*** В виде цистеиновой кислоты после окисления надмуравьиной кислотой.

фата натрия (SDS). Для каждой из выделенных субъединиц трансдуцина был определен аминокислотный состав (табл. 1).

Изучение первичной структуры трансдуцина было начато нами с γ -субъединицы. При обработке γ -субъединицы иодуксусной кислотой модификации SH-групп не наблюдалось, поэтому основные исследования проводились на интактном образце белка. Установлено, что N-концевым остатком белка является пролин. С помощью метода Эдмана и на секвенаторе 890C (Beckman) была определена последовательность 34 аминокислотных остатков: Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu-Lys-Asp-Lys-Leu-Lys-Met-Glu-Val-Asp-Gln-Leu-Lys-Lys-Glu-Val-Thr-Leu-Glu - Arg-Met-Leu-Val-Ser-Lys-.

Установление полной структуры γ -субъединицы осуществляли с использованием химического расщепления бромцианом и ферментативных гидролизом.

В качестве основного метода фрагментации полипептидной цепи был выбран гидролиз протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Гидролиз белка проводили при соотношении фермент — субстрат 1:20. Методом ВЭЖХ (рис. 2) из гидролизата были выделены 9 индивидуальных пептидов (TGS), аминокислотный состав которых приведен в табл. 2.

N-Концевую аминокислотную последовательность полученных пептидов определяли методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns) производных и фенилтиогидантоинов (Pth). Второй вариант обычно применялся для пептидов, содержащих остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот и их амидов.

Структуру пептидов, содержащих более 10 аминокислотных остатков, анализировали автоматической деградацией на жидкофазном секвенаторе в присутствии полибрена. Наличие в пептидах C-концевого остатка глутаминовой кислоты способствовало лучшему их удержанию в стаканчике секвенатора, что позволяло устанавливать полную аминокислотную последовательность 10—20-членных пептидов на микроуровне (3—5 нмоль). Идентификацию отщепленных на секвенаторе аминокислот проводили ВЭЖХ на обращенной фазе. Были подобраны условия, позволяющие раз-

Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе γ -субъединицы транслуцина протеиназой из *St. aureus*

АМИНО- КИСЛОТА	TGS-1	TGS-2	TGS-3	TGS-4	TGS-5	TGS-6	TGS-7	TGS-8	TGS-9
Asp	2,24(2)	1,18(1)	1,17(1)	—	—	1,29(1)	1,40(1)	1,88(2)	—
Thr	1,15(1)	—	—	0,98(1)	—	—	—	—	—
Ser	—	—	—	—	1,30(1)	—	1,31(1)	—	—
Glu	2,33(2)	1,40(1)	2,22(2)	1,20(1)	2,27(2)	2,07(2)	2,20(2)	1,20(1)	—
Pro	0,62(1)	—	—	—	—	—	2,00(2)	0,71(1)	—
Gly	—	—	—	—	—	—	2,23(2)	—	2,10(2)
Val	0,69(1)	—	0,9 $\frac{1}{2}$ (1)	0,83(1)	0,85(1)	0,81(1)	0,79(1)	—	—
Cys *	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Met	—	0,64(1)	—	—	0,60(1)	—	—	—	—
Ile	1,52(2)	—	—	—	—	—	1,02(1)	—	—
Leu	0,92(1)	1,02(1)	0,83(1)	0,95(1)	0,76(1)	—	1,08(1)	—	1,00(1)
Tyr	—	—	—	—	—	0,81(1)	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—	1,04(1)	—	0,94(1)	—
Lys	—	2,80(3)	1,48(2)	—	0,82(1)	—	0,80(1)	1,49(2)	1,00(1)
Arg	—	—	—	—	1,20(1)	1,08(1)	1,09(1)	—	—
N-Концевая	Pro	Lys	Val	Val	Arg	Phe	Arg	Asp	Leu
Число остатков	10	7	7	4	10	7	13	7	4
Выход, %	19,6	26,9	25,2	12,6	12,2	20,4	19,3	24,4	4,8

* Количественно определялся только в составе целой γ -субъединицы.

делить смесь 20 фенилтиогидантоинов на 18 фракций за 10,5 мин (рис. 3). Рабочая чувствительность метода 50–100 пмоль.

Аминокислотная последовательность изученных пептидов представлена в табл. 3. В сумме пептиды содержали 69 аминокислотных остатков, что охватывало всю полипептидную цепь γ -субъединицы.

Аминокислотная последовательность пептида TGS-1 совпадала с N-концевой аминокислотной последовательностью γ -субъединицы, из чего следовало, что пептид TGS-1 является N-концевым фрагментом молекулы белка. Пептид TGS-9 не содержал в качестве C-концевого остатка остаток глутаминовой кислоты, что дало основание считать его C-концевым фрагментом молекулы. Информация о N-концевой последовательности белка дала возможность расположить в полипептидной цепи пептиды TGS-2, TGS-3, TGS-4 и TGS-5. Для определения порядка расположения остальных пептидов было проведено расщепление γ -субъединицы бромцианом. Реакцию проводили в 70% муравьиной кислоте при 200-кратном избытке реагента. Из полученного гидролизата методом ВЭЖХ (рис. 4) были выделены пептиды TGB-1 и TGB-3, аминокислотный состав которых приведен в табл. 4. Пептид TGB-2 не был выделен. Определение N-концевой аминокислотной последовательности 39-членного пептида TGB-3 на секвенаторе позволило установить местоположение в цепи белка пептида TGS-6 (табл. 3).

С целью получения структурной информации о C-концевой области молекулы γ -субъединицу гидролизовали α -химотрипсином при соотношении фермент — субстрат 1:50. При разделении полученной смеси пептидов ВЭЖХ были выделены 12 пептидов (рис. 5, табл. 5). Определение структуры пептидов TGCh-5 и TGCh-6 (табл. 3) дало возможность установить месторасположение в полипептидной цепи γ -субъединицы пептидов TGS-7, TGS-8 и TGS-9 и таким образом завершить реконструкцию C-концевой области молекулы белка.

При исследовании аминокислотной последовательности пептидов TGS-5, TGB-3, а также TGCh-4 и TGCh-4' встретились сложности с идентификацией аминокислотных остатков, расположенных в положениях 35 и 36 γ -субъединицы. Мы предположили, что неидентифицированными аминокислотами могут быть остатки цистеина, поскольку аминокислотный

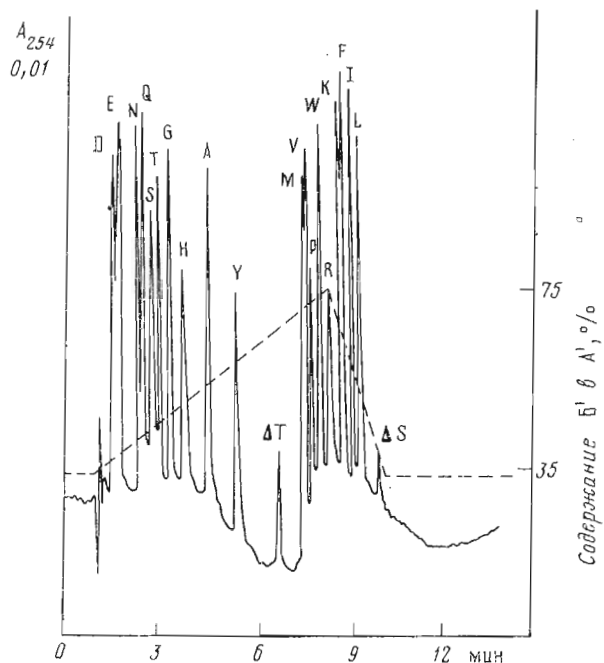


Рис. 3. Разделение стандартной смеси Pth-производных аминокислот (каждой по 80–120 пмоль) на колонке (0,46×25 см) Ultrasphere ODS (5 мкм). Элюирующие растворители: А' – 0,03 М трифторацетат натрия, рН 5,4 – ацетонитрил (9:1); Б' – ацетонитрил. Скорость потока 1,3 мл/мин, температура 40° С. Соответствующие пикам аминокислоты приведены в однобуквенном коде, ΔS – дегидросерин, ΔТ – дегидротреонин

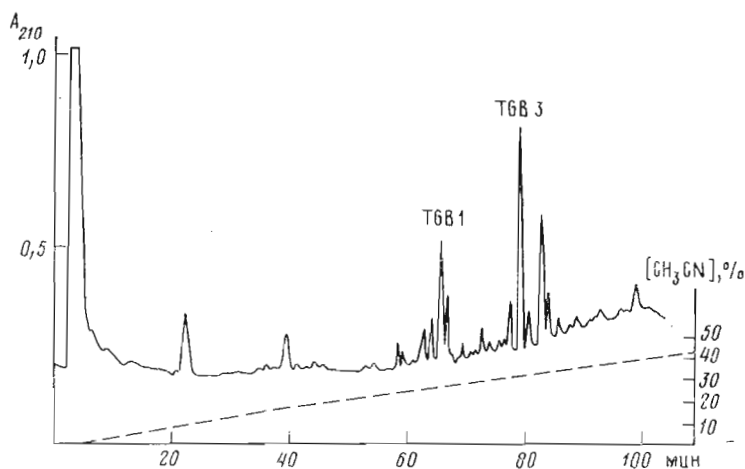


Рис. 4. Разделение пептидов бромцианового гидролиза γ -субъединицы трансдуцина на колонке Nucleosil 7C18

анализ белка после окисления его пядмуравьиной кислотой показал наличие в составе γ -субъединицы двух остатков цистеина. Было установлено, что иодацетамид в отличие от иодуксусной кислоты способен модифицировать восстановленную дитиотреитом γ -субъединицу. Поэтому был проведен повторный гидролиз γ -субъединицы, радиоактивно меченной иод[^{14}C]ацетамидом, протенназой из *St. aureus*. Из полученного гидролизата с помощью ВЭЖХ были выделены два радиоактивных пептида: TGS-5' и TGS-5'' (рис. 2). Определение их аминокислотной последовательности (табл. 3) показало, что эти пептиды являются производными одного и того же фрагмента — TGS-5 (Arg²⁹ — Glu³⁸), но каждый из них модифицирован по одному из двух рядом стоящих неидентифицированных ранее

Аминокислотная последовательность пептидов γ -субъединицы

Пептид	Аминокислотная последовательность *	Местоположение в цепи белка
TGS-1	Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu → → → → → → → → →	1-10
TGS-2	Lys-Asp-Lys-Leu-Lys-Met-Glu → → → → → → →	11-17
TGS-3	Val-Asp-Gln-Leu-Lys-Lys-Glu → → → → → → →	18-24
TGS-4	Val-Thr-Leu-Glu → → →	25-28
TGS-5	Arg-Met-Leu-Val-Ser-Lys-Cys-Cys-Glu-Glu → → → → → → → → →	29-38
TGS-5'	Arg-Met-Leu-Val-Ser-Lys-Cys(Cm)-Cys-Glu-Glu → → → → → → → → →	29-38
TGS-5''	Arg-Met-Leu-Val-Ser-Lys-Cys-Cys(Cm)-Glu-Glu → → → → → → → → →	29-38
TGS-6	Phe-Arg-Asp-Tyr-Val-Glu-Glu → → → → → →	39-45
TGS-7	Arg-Ser-Gly-Glu-Asp-Pro-Leu-Val-Lys-Gly-Ile-Pro-Glu → → → → → → → → → → → →	46-58
TGS-8	Asp-Lys-Asn-Pro-Phe-Lys-Glu → → → → → →	59-65
TGS-9	Leu-Lys-Gly-Gly → → → →	66-69
TGB-1	Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu → → → → → → → → → ←←←←← TGS-1 →→→→→ Lys-Asp-Lys-Leu-Lys-Hse → → → → → → ←←←←← TGS-2 →→→→→	1-16
TGB-3	Leu-Val-Ser-Lys-Cys-Cys-Glu-Glu-Phe-Arg-Asp-Tyr-Val- → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-5 →→→→→ ←←←←← TGS-6 →→→→→ Glu-Glu-Arg-Ser-Gly-Glu-Asp-Pro-Leu-Val-Lys-Gly-Ile- → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-7 →→→→→ Pro-Glu-Asp-Lys-Asn-Pro-Phe-Lys-Glu-Leu-Lys-Gly-Gly → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-8 →→→→→ ←←←←← TGS-9 →→→→→	31-69
TGCh-1	Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu-Lys-Asp-Lys- → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-1 →→→→→ ←←←←← TGS-2 →→→→→ Leu →	1-14
TGCh-2	Lys-Met-Glu-Val-Asp-Gln-Leu → → → → → → → → → ←←←←← TGS-2 →→→→→ ←←←←← TGS-3 →→→→→	15-21
TGCh-1+2	Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu- → → → → → → → → → ←←←←← TGS-1 →→→→→ Lys-Asp-Lys-Leu-Lys-Met-Glu-Val-Asp-Gln-Leu → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-2 →→→→→ ←←←←← TGS-3 →→→→→	1-21
TGCh-3	Lys-Lys-Glu-Val-Thr-Leu-Glu-Arg-Met → → → → → → → → → ←←←←← TGS-3 →→→→→ ←←←←← TGS-4 →→→→→ ←←←←← TGS-5 →→→→→	22-30
TGCh-4	Leu-Val-Ser-Lys-Cys-Cys-Glu-Glu-Phe-Arg-Asp-Tyr → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-5 →→→→→ ←←←←← TGS-6 →→→→→	31-42
TGCh-4'	Val-Ser-Lys-Cys-Cys-Glu-Glu-Phe-Arg-Asp-Tyr → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-5 →→→→→ ←←←←← TGS-6 →→→→→	32-42
TGCh-4''	Arg-Asp-Tyr → → → ←←←←← TGS-6 →→→→→	40-42
TGCh-5	Val-Glu-Glu-Arg-Ser-Gly-Glu-Asp-Pro-Leu-Val-Lys- → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-6 →→→→→ ←←←←← TGS-7 →→→→→ Gly-Ile-Pro-Glu-Asp-Lys-Asn-Pro-Phe → → → → → → → → → → → → ←←←←← TGS-8 →→→→→	43-63
TGCh-5'	Val-Glu-Glu-Arg-Ser-Gly-Glu-Asp-Pro-Leu → → → → → → → → → ←←←←← TGS-6 →→→→→ ←←←←← TGS-7 →→→→→	43-52

Пептид	Аминокислотная последовательность *	Местоположение в цепи белка
TGCh-5''	Val-Lys-Gly-Ile-Pro-Glu-Asp-Lys-Asn-Pro-Phe $\xrightarrow{\text{Dns}}$ TGS-7 $\xrightarrow{\text{Pth}}$ TGS-8	53-63
TGCh-6	Lys-Glu-Leu-Lys-Gly-Gly $\xrightarrow{\text{Dns}}$ TGS-8 $\xrightarrow{\text{Pth}}$ TGS-9	64-69
TGCh-6'	Lys-Glu-Leu $\xrightarrow{\text{Dns}}$ TGS-8 $\xrightarrow{\text{Pth}}$ TGS-9	64-66

* Приняты следующие обозначения: стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией Dns-($\xrightarrow{\text{Dns}}$), Dns- и Pth-($\xrightarrow{\text{Pth}}$) производных аминокислот; \Rightarrow — аминокислоты, определенные автоматической деградацией на жидкофазном секвенаторе.

Таблица 4

Аминокислотный состав пептидов, полученных при расщеплении γ -субъединицы трансдуктина бромцианом

Аминокислота	Пептиды	
	TGB-1	TGB-3
Asp	3,29 (3)	4,25 (4)
Thr	1,02 (1)	—
Ser	—	2,40 (2)
Glu	2,24 (2)	7,42 (7)
Pro	0,83 (1)	3,03 (3)
Gly	—	4,28 (4)
Val	0,91 (1)	2,69 (3)
Cys	—	(2) *
Hse	0,41 (1)	—
Ile	1,65 (2)	1,01 (1)
Leu	1,96 (2)	3,04 (3)
Tyr	—	0,84 (1)
Phe	—	1,66 (2)
Lys	2,92 (3)	4,83 (5)
Arg	—	1,85 (2)
N-Концевая	Pro	Leu
Число остатков	16	39
Выход, %	3,1	2,9

* По данным первичной структуры пептида.

остатков, которые теперь с уверенностью можно было определить как остатки цистеина.

С введением в масс-спектрометрию новых методов ионизации молекул (бомбардировка быстрыми атомами, полевая десорбция) резко повысилась эффективность этого метода при анализе структуры белков и пептидов. С целью подтверждения установленной нами структуры γ -субъединицы был проведен анализ пептидов кластрипаинового гидролизата на масс-спектрометре с бомбардировкой быстрыми атомами. Смесь пептидов, полученных после гидролиза γ -субъединицы кластрипаином, отделяли от солей и нерасщепившегося белка гель-фильтрацией (рис. 6) и без модификации в смеси с триглицерином вводили в источник масс-спектрометра. Полученный масс-спектр (рис. 7) в основном состоял из пиков молекулярных ионов кластрипаиновых пептидов γ -субъединицы. Полное совпадение молекулярных масс пептидов с ожидаемыми (табл. 6) подтвердило правильность установленной нами структуры. Следует отметить, что для получения масс-спектра потребовался ~ 1 нмоль смеси пептидов.

Таким образом, установление полной аминокислотной последовательности γ -субъединицы можно считать завершенным (рис. 8). В состав бел-

**Аминокислотный состав пептидов, полученных при гидролизе γ -субъединицы
 α -химотрипсина**

Аминокислота	TGCh-1	TGCh-2	TGCh-1+2	TGCh-3	TGCh-4	TGCh-4'	TGCh-4''
Asp	3,31 (3)	1,09 (1)	4,18 (4)	—	1,14 (1)	0,90 (1)	1,09 (1)
Thr	1,28 (1)	—	1,09 (1)	0,91 (1)	—	—	—
Ser	—	—	—	—	1,14 (1)	0,76 (1)	—
Glu	2,26 (2)	2,15 (2)	4,23 (4)	2,00 (2)	2,25 (2)	2,03 (2)	—
Pro	1,18 (1)	—	1,09 (1)	—	—	—	—
Gly	—	—	—	—	—	—	—
Val	0,74 (1)	1,15 (1)	1,69 (2)	1,05 (1)	1,24 (1)	1,10 (1)	—
Cys	—	—	—	—	+ (2)	+ (2)	—
Met	—	0,71 (1)	0,65 (1)	0,68 (1)	—	—	—
Ile	1,57 (2)	—	1,62 (2)	—	—	—	—
Leu	2,14 (2)	0,88 (1)	3,08 (3)	1,10 (1)	1,14 (1)	—	—
Tyr	—	—	—	—	0,63 (1)	0,61 (1)	0,58 (1)
Phe	—	—	—	—	0,70 (1)	0,64 (1)	—
Lys	2,07 (2)	0,86 (1)	3,02 (3)	1,52 (2)	1,14 (1)	1,03 (1)	—
Arg	—	—	—	0,90 (1)	0,86 (1)	0,91 (1)	1,16 (1)
N-Концевая	Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Arg
Число остатков	14	7	21	9	12	11	3
Выход, %	14,4	1,5	8,8	3,6	7,4	10,4	2,4

Аминокислота	TGCh-5	TGCh-5'	TGCh-5''	TGCh-6	TGCh-6'
Asp	3,26 (3)	1,00 (1)	2,15 (2)	—	—
Thr	—	—	—	—	—
Ser	1,13 (1)	1,00 (1)	—	—	—
Glu	4,32 (4)	3,08 (3)	1,21 (1)	1,12 (1)	1,27 (1)
Pro	3,33 (3)	0,96 (1)	1,58 (2)	—	—
Gly	2,13 (2)	1,07 (1)	1,26 (1)	1,95 (2)	—
Val	1,93 (2)	1,10 (1)	0,90 (1)	—	—
Cys	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—
Ile	1,07 (1)	—	0,83 (1)	—	—
Leu	1,07 (1)	1,04 (1)	—	0,90 (1)	0,95 (1)
Tyr	—	—	—	—	—
Phe	0,96 (1)	—	0,72 (1)	—	—
Lys	1,72 (2)	—	1,65 (2)	1,74 (2)	0,82 (1)
Arg	1,13 (1)	0,92 (1)	—	—	—
N-Концевая	Val	Val	Val	Lys	Lys
Число остатков	21	10	11	6	3
Выход, %	25,5	2,6	12,8	5,0	3,2

Таблица 6

Массовые числа молекулярных ионов кластеризированных пептидов γ -субъединицы GTP-связывающего белка

Пептид	m/z иона $[M+H]^+$	m/z иона $[M+2H]^{++}$
Pro ¹ -Lys ¹³	1513	757
Pro ⁶ -Lys ¹⁵	1754	—
Leu ¹⁴ -Arg ²⁹	1958	979,5
Met ¹⁶ -Arg ²⁹	1717	—
Met ³⁰ -Arg ⁴⁰	1342	—
Met ³⁰ -Arg ^{40*}	1344	—
Asp ⁴¹ -Arg ⁴⁶	810	—
Ser ⁴⁷ -Lys ⁵⁴	844	422,5
Ser ⁴⁷ -Lys ⁶⁷	2339	—
Gly ⁵⁵ -Lys ⁶⁷	1514	757,5

* Восстановленная форма пептида.

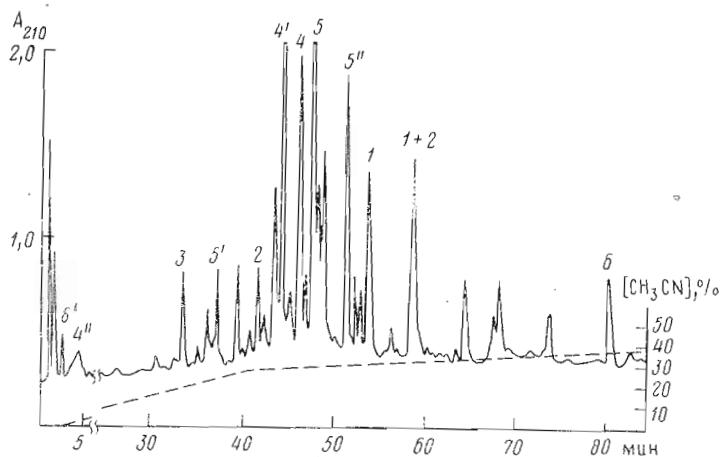
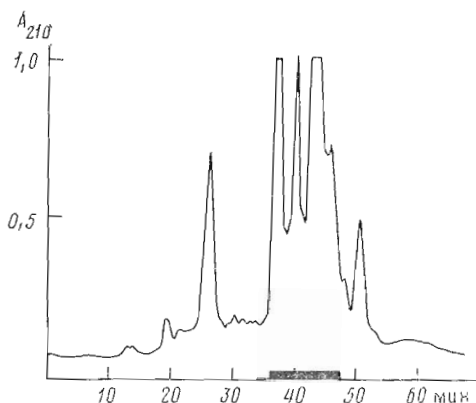


Рис. 5. Разделение пептидов, полученных при гидролизе γ -субъединицы трансдуцина α -химотрипсином. Номер пика на рисунке соответствует номеру выделенной фракции пептида TGCh

Рис. 6. Гель-фильтрация продуктов гидролиза γ -субъединицы кластрианном на колонке (0,75×60 см) Sphergel TSK 2000 SW в 0,1 М бикарбонате аммония (рН 8,0) при скорости потока 0,35 мл/мин. Отмечена фракция, анализируемая в масс-спектрометре



ка входят 69 аминокислотных остатков, его молекулярная масса равна 8008,7 Да. В γ -субъединице отсутствуют остатки аланина, гистидина и триптофана, и 60% аминокислотных остатков обладают гидрофильными свойствами. Среди них 18 остатков дикарбоновых аминокислот и 13 основных. Такой состав определяет исключительную растворимость γ -субъединицы (в отличие от α - и β -субъединиц) трансдуцина в воде.

Заслуживают интереса полученные нами результаты о присутствии в полипептидной цепи γ -субъединицы дисульфидной связи между двумя рядом стоящими остатками цистеина (35 и 36). Во-первых, в масс-спектре кластрианнового гидролизата γ -субъединицы присутствует интенсивный пик с m/z 1342, соответствующий пептиду Met³⁶ — Arg⁴⁰ с дисульфидной связью, а также пик пептида с m/z 1358, образовавшегося в результате окисления остатка метионина в данном пептиде. Наряду с этими пиками масс-спектр содержит также пики, соответствующие восстановленной форме пептидов. Во-вторых, γ -субъединица в отличие от α - и β -субъединиц не связывалась с активированной тиол-сефарозой 4В, которая, как известно, образует ковалентную связь со свободными сульфгидрильными группами.

Дисульфидная связь между рядом стоящими остатками цистеина в γ -субъединице трансдуцина, вероятно, играет существенную роль в поддержании ее специфичной конформации. Возможно, в этом месте γ -субъединица образует β -изгиб. В его формировании наряду с остатками цистеина также может принимать участие полная пара, образованная остатками лизина-34 и глутаминовой кислоты-37. Один из участков полипептидной цепи родопсина, экспонированный в цитоплазму, также содержит после-

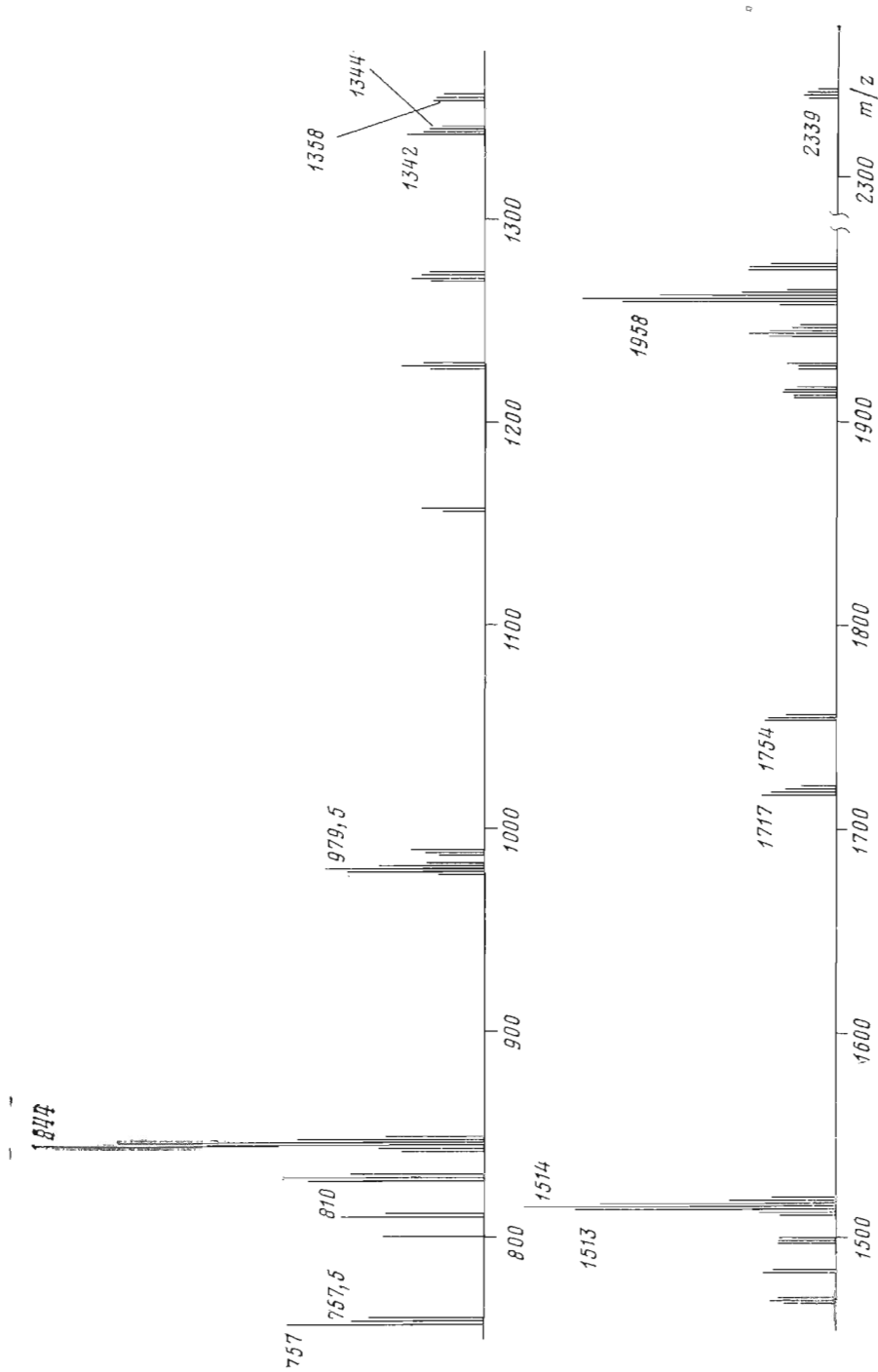


Рис. 7. Масс-спектр смеси пептидов, полученных после гидролиза γ -субъединицы кластрина

1 10

Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu-Lys-Asp-Lys-Leu-Lys-

20 30

Met-Glu-Val-Asp-Gln-Leu-Lys-Lys-Glu-Val-Thr-Leu-Glu-Arg-Met-

40

Leu-Val-Ser-Lys-Cys-Cys-Glu-Glu-Phe-Arg-Asp-Tyr-Val-Glu-Glu-

50 60

Arg-Ser-Gly-Glu-Asp-Pro-Leu-Val-Lys-Gly-Ile-Pro-Glu-Asp-Lys-

Asn-Pro-Phe-Lys-Glu-Leu-Lys-Gly-Gly

Рис. 8. Полная аминокислотная последовательность γ -субъединицы GTP-связывающего белка

довательность Cys-Cys [6], вероятно связанную дисульфидной связью [7]. Согласно работе [8], остатки цистеина, входящие в указанную последовательность, после облучения мембран дисков светом становятся доступными для модификации. Можно предположить, что последовательности Cys-Cys в обоих белках имеют функциональное значение для процесса передачи светового сигнала.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химотрипсин (Worthington, США), протеиназу из *St. aureus* (Miles, Англия), клострипаин (Boehringer Mannheim, ФРГ), дитиотреит, 5-диметиламино-1-нафталинсульфохлорид (Serva, ФРГ), ацетонитрил, моноодуксусную кислоту (свежеперекристаллизованную из бензола), динатриевую соль EDTA, борную кислоту, муравьиную кислоту (Merck, ФРГ), трифторуксусную кислоту, гидроклорид гуанидина, фенилизотиоцианат (Pierce, США), сефадекс G-15, тиол-сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), бромфеноловый синий, кумасся ярко-голубой R-250, амидочерный 10В, додецилсульфат натрия (Bio-Rad, США), вод[^{14}C]ацетамид, удельная радиоактивность 57 мКи/ммоль (Amersham, Англия), трис-гидрокси метиламинометан, бикарбонат аммония (Sigma, США), пластинки с тонким слоем целлюлозы и полиамида (Schleicher und Schüll, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Выделение трансдуцина. НСП из 500 свежепренирированных сетчаток крупного рогатого скота, полученные по методу, описанному ранее [9], суспендировали в 220 мл изотонического буферного раствора, pH 6,0 (10 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,01 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF)), засвечивали в течение 2 мин с помощью диапроектора «Свitezь» (желтый светофильтр, расстояние 30 см, лампа мощностью 100 Вт) и центрифугировали 30 мин при 18 000 об/мин (ротор J-20). Супернатант сливали, а осадок повторно гомогенизировали в изотоническом буфере и центрифугировали (операцию повторяли трижды). Полученный осадок суспендировали в 220 мл гипотонического буферного раствора, pH 6,0 (10 мМ трис-НСl, 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,01 мМ PMSF), и центрифугировали 30 мин при 35 000 об/мин (ротор Ti-42). Операцию повторяли дважды. Осадок суспендировали в 220 мл гипотонического буферного раствора, pH 7,5, содержащего 40 мМ GTP, и центрифугировали 30 мин при 35 000 об/мин, операцию повторяли. К супернатанту, полученному из двух последовательных центрифугирований, добавляли 100 мМ NaCl, и раствор наносили на колошку (1×5 см) с DEAE-целлюлозой DE-52, уравновешенной буферным раствором А (10 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит, pH 7,5), колонку промывали 100 мл буфера А. Трансдуцин элюировали буфером А, содержащим 500 мМ NaCl.

Разделение субъединиц трансдукцина электрофорезом в ацетат-целлюлозном блоке. Ацетат-целлюлозный блок получали коагуляцией 4% раствора диацетата целлюлозы в 75% уксусной кислоте в стеклянной плоской кювете, плавающей на поверхности воды в герметичном эксикаторе. Готовый блок уравнивали в буфере В (0,15 М трис-борат, 8 М мочевины, 0,01 М EDTA, 0,02 М β -меркаптоэтанол), pH 8,9.

Трансдуктин (4 мг) переводили в буфер В диализом, наносили на блок 200×200×4 мм и вели электрофорез (на приборе DESAGA, ФРГ) в течение 3 ч при силе тока 100 мА с охлаждением водопроводной водой. Электродный буфер имел тот же состав, что и буфер В. В качестве лидирующего красителя использовали бромфеноловый синий. После электрофореза полоску геля окрашивали 0,25% раствором амидочерного в смеси уксусная кислота — метанол — вода (1:25:25), обезбечивание проводили той же смесью без красителя. Субъединицы трансдукцина извлекали из геля центрифугированием и обессоливали на колонке (1×35 см) с сефадексом G-25, уравниваемым 100 мМ NaHCO₃, pH 8,0.

Разделение субъединиц трансдукцина ВЭЖХ проводили на хроматографе модели 322 (Altex, США). Трансдуктин (2 мг) в 2 мл буферного раствора А наносили на колонку (0,46×25 см) 10 мкм Silasorb Phenyl (Lachema, СССР). Субъединицы элюировали ацетонитрилом в 0,1% трифторуксусной кислоте (линейный градиент концентрации от 0 до 90%) в течение 90 мин со скоростью 1 мл/мин; контроль элюата при 280 нм (спектрофотометр Uvidesc-100-II, Jasco, Япония) и при 254 нм (спектрофотометр модели 153, Altex, США) (рис. 1). γ -Субъединица (180 мкг) элюировалась в 54% ацетонитриле, а α -субъединица (430 мкг) — в 74% ацетонитриле. Полученные фракции лиофилизовали.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Раствор 10 мкг белка в 15 мкл буфера, pH 8,2 (0,01 М трис-борат, 0,025 М дитиотреит, 0,5 мМ EDTA, 1% SDS), наносили на пластинку ПААГ 4—30% размером 8×8 см, полимеризованную в буфере С (0,1 М трис-борат, 0,01 М дитиотреит, 0,005 М EDTA, pH 8,2). Электрофорез проводили в буфере С с 0,1% раствором SDS в течение 1,5 ч в приборе для электрофореза (модель G-2/4, Pharmacia, Швеция) при силе тока 80 мА на пластинку. В качестве лидирующего красителя использовали бромфеноловый синий. Окрашивание белковых полос проводили 0,25% раствором кумасси ярко-голубого R-250 при 20°С в течение 1,5 ч. Избыток красителя отмывали смесью вода — метанол — уксусная кислота, 45:45:10.

Модификация γ -субъединицы моноiodуксусной кислотой. γ -Субъединицу (60 нмоль) растворяли в 600 мкл буфера D (0,1 М трис-HCl, 6 М гуанидин-HCl, pH 8,0), добавляли 27 мкл (3 моль/моль Cys) β -меркаптоэтанола. Раствор инкубировали 5 ч при 20°С и перемешивании, затем обрабатывали моноiodуксусной кислотой при 10-кратном мольном избытке реагента в расчете на SH-группу (850 мкг). Модификацию проводили в течение 1 ч в темноте при 20°С. Реакцию останавливали добавлением избытка β -меркаптоэтанола и смесь обессоливали гель-фильтрацией на колонке (0,5×26 см) с сефадексом G-15 в аммиачной воде. Элюат контролировали при 254 нм. Полученную белковую фракцию лиофилизовали.

*Расщепление γ -субъединицы протеиназой из *St. aureus* и разделение пептидов гидролизата.* Белок (60 нмоль) растворяли в 1000 мкл 0,2 М бикарбоната аммония (pH 8,0), добавляли 27 мкг (3 нмоль) протеиназы из *St. aureus* и раствор инкубировали 6 ч при 37°С. Полученный гидролизат разделяли ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) с обращенной фазой Nucleosil 7C18 (Macherey-Nagel, ФРГ). Пептиды элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 50% в 0,1% трифторуксусной кислоте в течение 120 мин со скоростью 1 мл/мин. Детектирование проводили на длине волны 210 нм (рис. 2).

Расщепление γ -субъединицы бромцианом. Белок (30 нмоль) растворяли в 400 мкл 70% муравьиной кислоты и добавляли 45 мг бромциана (200 моль/моль Met). Гидролиз проводили в течение 16 ч при 20°С в темноте. Гидролизат лиофилизовали, растворяли в 0,1% трифторуксусной

кислоте и разделяли полученную смесь пептидов ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой, как описано выше (рис. 4).

Расщепление γ -субъединицы α -химотрипсином. Белок (50 нмоль) растворяли в 1000 мкл 0,2 М бикарбоната аммония (рН 8,4), добавляли 7 мкг (1 нмоль) α -химотрипсина и инкубировали 2,5 ч при 37° С. Гидролизат лиофилизovali, растворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте и разделяли полученную смесь пептидов на колонке с обращенной фазой, как описано выше (рис. 5).

Модификация γ -субъединицы моноиод [¹⁴С]ацетамидом. К 20 нмоль белка в 200 мкл буфера D добавляли 9 мкл β -меркаптоэтанола и раствор инкубировали 4 ч при 20° С, добавляли моноиод [¹⁴С]ацетамид (50 мКи, 300 мкг) и выдерживали 30 мин при 20° С в темноте. Реакцию останавливали добавлением избытка β -меркаптоэтанола, раствор модифицированной γ -субъединицы обессоливали гель-фильтрацией и лиофилизovali.

Установление первичной структуры выделенных пептидов. N-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли химической деградацией по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных и фенилтиогидантоипов [10].

Автоматический анализ аминокислотной последовательности проводили на жидкофазном секвенаторе (модель 890 С, Beckman, США) по программе 122 974 со следующими изменениями: 1) время реакции отщепления увеличено до 180 с; 2) время экстракции этилацетатом сокращено до 240 с. В реакционный стакан секвенатора помещали 30 мг полибрена (Aldrich, США) и после завершения одного полного цикла отщепления наносили образец пептида. Pth-производные аминокислот анализировали методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (Altex, США). В качестве элюирующих растворителей использовали буфер А' — 0,03 М трифтороацетат натрия (рН 5,4) — ацетонитрил (9 : 1); буфер Б' — ацетонитрил (рис. 3).

Расщепление γ -субъединицы кластрипаином и масс-спектрометрический анализ полученной смеси пептидов. К 10 нмоль белка в 50 мкл буфера E (0,1 М моногидрофосфат натрия, 1 мМ СаСl₂, 5 мМ дитиотреит, рН 7,8) добавляли 0,8 мкг (0,1 нмоль) предварительно активированного кластрипаина [11]. Раствор инкубировали 1 ч при 20° С, подвергали гель-фильтрации на колонке Spherogel TSK 2000 SW (0,75×60 см, Altex, США) в буфере E (скорость элюции 0,35 мл/мин, детектирование при 210 нм). Смесь пептидов (см. рис. 6) лиофилизovali и растворяли в 25 мкл метанола, к 5 мкл раствора добавляли 5 мкл тиоглицерина и снимали масс-спектр на приборе ZAB (VG, Англия).

Ковалентная хроматография на тиол-сефарозе. Трансдуции (10 нмоль) в буфере А с помощью гель-фильтрации на колонке (0,5×20 см) с сефадексом G-15 переводили в буферный раствор для ковалентной хроматографии (0,1 М трис-НСl, рН 7,5; 0,5 М NaCl, 1 мМ EDTA) и наносили на колонку (1,0×4 см) с тиол-сефарозой при скорости потока 4 мл/ч. Элюирование белка, не связанного с SH-группами сорбента, проводили тем же буфером. Для элюции связанного с носителем белка использовали 0,02 М β -меркаптоэтанол в том же буфере. Обе полученные фракции обессоливали, лиофилизovali и анализировали SDS-электрофорезом в 4–30% ПААГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fung B. K.-K., Hurley J. B., Stryer L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 152–156.
2. *Fung B. K.-K. J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 17, p. 10495–10502.
3. *Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Шуваева Т. М., Ищенко К. А., Тележинская И. Н.* Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1572–1575.
4. *Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Shuvaeva T. M., Bogachuk A. P., Shemyakin V. V.* FEBS Lett., 1985, v. 179, № 1, p. 107–110.
5. *Kühn H.* Nature, 1980, v. 283, p. 587–589.
6. *Ovchinnikov Yu. A.* FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179–191.
7. *Абдулаев Н. Г., Аргамонов И. Д.* Биол. мембраны, 1984, т. 1, № 8, с. 775–793.
8. *Куделин А. Б., Шемякин В. В., Хорошилова Н. И., Овчинников Ю. А.* Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 3, с. 341–357.

9. Papermaster D. S., Dkeyer W. I. *Biochemistry*, 1974, v. 13, p. 2438-2444.
10. Липкин В. М., Макарова И. А., Гринкевич В. А., Ахапкина И. Г., Потопенко Н. А., Тележинская И. Н. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 6, с. 747-775.
11. Mitchell W. M., Harrington W. F. *Meth. Enzymes*, 1971, v. 47, p. 699.

Поступила в редакцию
22.IV.1985

PRIMARY STRUCTURE OF γ -SUBUNIT OF GTP-BINDING PROTEIN FROM CATTLE RETINA

OVCHINNIKOV YU. A., LIPKIN V. M., TELEZHINSKAYA I. N.,
SHUVAEVA T. M., OBUKHOV A. N., ISHCHEENKO K. A., SHEMYAKIN V. V.

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

The complete amino acid sequence of the γ -subunit of GTP-binding protein from cattle retina has been established. The polypeptide chain consists of 69 amino acid residues and contains an unusual sequence Cys³⁵-Cys³⁶. The molecular mass of the γ -subunit is 8008.7.