



УДК 547.96:577.156+541.69

ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ПУРПУРНЫЕ  
МЕМБРАНЫ *Halobacterium halobium*

Абдулаев Н. Г., Киселев А. В., Овчинников Ю. А.

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

Изучение структуры и функции бактериального родопсина привлекает в настоящее время особое внимание. Бактериородопсин был открыт в 1971 г. В. Стокениусом [1] в клетках крайне галофильных бактерий *Halobacterium halobium*. С тех пор благодаря многочисленным работам (см. обзор [2]) многое стало известно о функционировании и структурной организации этого белка в мембране.

Основная функция бактериородопсина в бактериальной клетке — светозависимый активный транспорт протонов, приводящий к возникновению трансмембранной разности электрохимического потенциала ионов водорода, которая используется, в частности, для синтеза АТФ.

Для выяснения механизма действия бактериородопсина в качестве протонного насоса необходимо не только детально знать организацию этого белка в мембране, но и иметь точные сведения о локализации функциональных групп, принимающих участие в транспорте.

Интересным подходом, позволяющим определить, в каком месте белковой цепи находятся те или иные группы, расположенные на поверхности мембраны, является использование протеолитических ферментов.

В настоящей работе мы исследовали доступность бактериородопсина папаину в нативной пурпурной мембране. При анализе белковых фрагментов, оставшихся в обработанных папаином мембранах, обнаружены N-концевые остатки глицина и изолейцина, тогда как в бактериородопсине из нативных мембран N-концевой остаток обычными методами обнаружить не удается. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия свидетельствует о том, что модифицированные мембраны содержат в соизмеримых количествах два фрагмента с кажущимся  $M$  12 000 и 16 000, в то время как в нативных мембранах присутствует только один белок с кажущимся  $M$  19 000. Исходный белок в обработанных папаином мембранах не обнаружен. Таким образом, ограниченному протеолизу подвергаются практически все молекулы бактериородопсина. После центрифугирования в супернатанте папаинового гидролизата найдено  $4,5 \pm 0,2$  моль норлейцина на 1 моль белка и по крайней мере 12 мелких фрагментов, дающих положительную реакцию с нингидрином.

Препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а также используя нерастворимость одного из фрагментов в 90% водном ацетоне, нам удалось разделить и оха-

рактировать образующиеся крупные фрагменты. Фрагмент с  $M$  16 000 в качестве N-концевой аминокислоты имеет глицин, фрагмент с  $M$  12 000 — изолейцин.

После обработки папаином бактериородопсин способен вступать в фотохимический цикл и создавать разность электрохимического потенциала на плоских искусственных мембранах [3]. Обработанные и нативные мембраны встраивали в плоскую липидную мембрану и регистрировали электрический ответ на вспышку длительностью 1 с, а также на постоянный свет. Ответ на вспышку у обработанных мембран отсутствовал, в то время как у нативных мембран равнялся 45—50 мВ. Время нарастания ответа на постоянный свет у обработанных мембран 2—3 с, у нативных — 0,3—0,4 с. Полный ответ на постоянный свет у обработанных мембран 140 мВ, у нативных — 118 мВ. Таким образом, несмотря на то что папаин отщепляет приблизительно 30% белкового материала, бактериородопсин остается активным.

Действие папаина направлено не только на N-концевые, но, по-видимому, и на C-концевые участки молекулы белка. Действительно, при действии на нативные мембраны карбоксипептидаза А отщепляет аланин, который, следовательно, является C-концевым остатком бактериородопсина. Однако при действии карбоксипептидазы А на мембраны, предварительно обработанные папаином, C-концевую аминокислоту обнаружить не удалось.

В настоящее время мы не можем ответить, почему при действии папаина молекулы белка в мембранах подвергаются двум разным типам ограниченного протеолиза. Изучение последовательности аминокислот в полученных фрагментах наряду с данными о полной аминокислотной последовательности бактериородопсина, вероятно, позволит ответить на этот вопрос и создать модель организации белка в мембране.

### Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны выделяли из клеток *Halobacterium halobium* R<sub>1</sub> по методу Стокениуса [1]. Папаин (PAP ЗАА, Worthington) был взят в количестве 0,03 мг/мг сухого веса мембран. Протеолиз суспензии (1 мг/мл) проводили в присутствии 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 10 мМ NaCN (рН 7) в ячейке автоматического титратора ТТА-31/ТТТ-60/рН М-64 (Radiometer, Дания) в течение 18 ч при 37°. Мембраны осаждали центрифугированием при 50 000  $g$  в течение 1 ч и затем трижды промывали бидистиллированной водой. Супернатант исследовали на пептидном анализаторе Technikon (США), количество пептидного материала оценивали по норлейциновой калибровочной кривой (реакции с нингидрином) с поправкой на папаин [4]. Осажденные мембраны лиофилизовали. Лиофилизованный препарат растворяли в 2% додецилсульфате натрия при 90° в течение 5 мин и подвергали электрофорезу в 12,5% полиакриламидном геле по методу Фербенкса и др. [5]. N- и C-концевые аминокислоты определяли методами, описанными в работе [6]. Исследования на плоских липидных мембранах осуществляли в соответствии с Барским и др. [3]. Препаративное разделение пептидов с  $M$  12 000 и 16 000 проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия на приборе Unifor (LKB, Швеция). Разделение этих пептидов достигалось также следующим путем: обработанные папаином и отмытые мембраны растворяли в 4% додецилсульфате натрия (90°, 20 мин) и лиофилизовали. Лиофилизованный препарат растворяли в 90% водном ацетоне при 4° (50 мл/100 мг мембран). Через 12 ч пептид с  $M$  16 000 выпадал в осадок. Оставшийся в растворе пептид с  $M$  12 000 очищали на колонке с сефадексом G-10, уравновешенным аммонийбикарбонатным буфером (0,01  $M$ , рН 8,0).

Авторы приносят благодарность Л. А. Драчеву за проведение опытов на плоских мембранах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoekenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **239**, 149—152.
2. Oesterhelt D. (1976) *Angew. Chem.*, **15**, 17—24.
3. Барский Е. А., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Кондрашин А. А., Либерман Е. А., Остроумов С. А., Самуилов В. Д., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 113—125.
4. Rosen H. (1957) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **67**, 10.
5. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2606—2617.
6. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3—22.

Поступила в редакцию  
14.VI.1976

---

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

---

Сдано в набор 20/V-1976	Т-12526	Подписано к печати 28/VI-1976 г.	Тираж 825 экз.
Зак. 642	Формат бумаги 70×108 <sup>1/4</sup>	Усл. печ. л. 13,3	Бум. л. 4,75
			Уч.-изд. л. 13,5

---

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10