

ИЗУЧЕНИЕ АСИММЕТРИЧНОЙ ОРИЕНТАЦИИ
БАКТЕРИОРОДОПСИНА В ПУРПУРНОЙ МЕМБРАНЕ

HALOBACTERIUM HALOBIVUM

Абдулаев П. Г., Киселев А. В., Фейгина М. Ю.,
Овчинников Ю. А.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Для выяснения функционирования бактериородопсина в качестве протонного насоса необходимы знания о локализации функциональных групп, принимающих участие в транспорте ионов водорода. Как уже отмечалось ранее, интересным подходом, позволяющим определить локализацию тех или иных аминокислотных остатков белка в мембране, является использование протеолитических ферментов. В предыдущей работе [1] мы показали, что действие протеолитического фермента папаина направлено как на С-, так и на N-концевые участки молекулы белка.

В настоящей работе осуществлен более детальный анализ действия различных протеаз на пурпурные мембраны.

Трипсин и химотрипсин не приводят к видимым изменениям в структуре белка, что подтверждается N- и С-концевым анализом, а также электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Карбоксипептидаза А отщепляет от бактериородопсина два остатка аланина, один тронина и один серина. Кинетический анализ, а также гидразинолиз по Акабори дает такую С-концевую последовательность белка: -Ala-Ala-Thr-Ser.

Кратковременная обработка папаином мембран при низком фермент-субстратном соотношении приводит к отщеплению последних 17 аминокислот из С-концевого участка белка (Asp — 1, Thr — 1, Ser—2, Pro—2, Glx — 4, Ala — 5, Gly — 2).

Как видно, отщепляющийся С-концевой фрагмент носит кислотный характер. При действии папаина в низкой концентрации остающийся в мембране фрагмент имеет в качестве С-концевой аминокислоты Gly и кажущийся молекулярный вес 20 500 дальтон, в то время как у нативного белка в этих условиях молекулярный вес равен 22 500.

При большей концентрации папаина и более длительном времени реакции наблюдается отщепление не только 17 аминокислот из С-концевой области, но и расщепление молекулы вблизи ее N-концевой части. Это приводит к образованию в мембране еще двух фрагментов с M 16 000 и 12 000, имеющих в качестве N-концевых аминокислот глицин и изолейцин, причем кинетический анализ реакции показывает, что бактериородопсин сначала превращается во фрагмент с M 20 500, а последний — в более короткий фрагмент с M 16 000. Фрагмент с M 12 000 является, по-видимому, продуктом дальнейшей деградации фрагмента с M 16 000. С-концевой анализ смеси трех фрагментов в мембране (20 500, 16 000 и 12 000 дальтон) свидетельствует о наличии в них одной аминокислоты — глицина.

Интересно отметить, что в тех же условиях, но в присутствии 2,3 M NaCl папаин действует только на С-концевую область молекулы.

По-видимому, расщепление папаином белка в N-концевой области происходит в местах перехода между отдельными α -спиральными тяжами

молекулы, обнаруженного Хендерсоном и Унвином [2], в то время как гидрофильная кислая С-концевая часть белка локализована в водной фазе и доступна для действия различных протеаз. Действительно, действие термолизина в условиях наших опытов направлено также на С-концевую область белковой молекулы. После обработки этим ферментом в мембране остается фрагмент с кажущимся $M_{21} 500$; N-концевая аминокислота его остается блокированной, в то время как С-концевая изменяется.

Удаление С-концевой области бактериородопсина папаином, термолизином и карбоксипептидазой А не изменяет его спектральных характеристик, в то время как расщепление N-концевой области белка сдвигает его абсорбционный максимум в область 600 нм.

Все описанные препараты модифицированных мембран способны вступать в фотохимический цикл и функционировать в качестве протонного насоса [3].

Экспериментальная часть

Пурпурные мембраны выделяли из клеток *Halobacterium halobium* R₁ по методу Стокениуса [4]. Папаин (PAP ЗАА, Worthington, США) использовали в количестве от 1 до 0,002 мг/мг сухого веса мембран. Условия проведения реакции описаны ранее [1]. Протеолиз термолизином проводили 18 ч при pH 8 и 37°. Термолизин (Serva, ФРГ) брали в количестве от 0,03 до 0,01 мг/мг сухого веса мембран. Протеолиз трипсином и химотрипсином осуществляли в 0,1 М бикарбонате натрия в течение 18 ч при pH 8,4 и 37°. Трипсин (Worthington, США) и химотрипсин (Sigma, ФРГ) брали в количестве 0,03 мг/мг сухого веса мембран. Концентрация пурпурных мембран во всех опытах составляла 1 мг/мл реакционной среды. Мембранные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (РАА 4/30, Pharmacia, Швеция) в присутствии додецилсульфата натрия [5]. N- и С-концевые аминокислоты определяли методами, описанными в работе [6]. Гидрализ проводили по методу Акабори [7]. Спектральный анализ препаратов в воде осуществляли на спектрофотометре Gilford M-240 (Франция).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулаев Н. Г., Киселев А. В., Овчинников Ю. А. (1976) Биоорг. химия, 2, 1148—1150.
2. Henderson R., Unwin R. N. T. (1975) Nature, 257, 28—31.
3. Барский Е. А., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Кондрашина 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. Oesterhelt D., Stoekenius W. (1971) Nature New Biol., 239, 149—152.
5. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
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.
7. Akabori S., Ohno K., Narita K. (1952) Bull. Chem. Soc. Japan, 25, 214.

Поступило в редакцию
4.III.1977

STUDY ON ASYMMETRIC ARRANGEMENT OF BACTERIORHODOPSIN IN THE PURPLE MEMBRANE OF *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

§ ABDULAEV N. G., KISELEV A. V., FEIGINA M. Yu., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The effect of different proteases on the intact purple membranes of *Halobacterium halobium* is described. It is shown that hydrophilic acidic C-terminal part of the protein molecule is localized in the water phase and is accessible to the action of papain thermolysin and carboxypeptidase A. The treatment with high concentrations of papain gives rise to a scission of the bacteriorhodopsin molecule in the N-terminal part. The limited proteolysis of the purple membrane does not affect their proton pumping capacity.

Технический редактор Е. С. Кузьмишкина

Сдано в набор 21/II-1977 г. Т-07710 Подписано к печати 30/III-1977 г. Тираж 840 экз.
Зак. 1883 Формат бумаги 70×109/16 Усл. печ. л. 12,6 Бум. л. 4,5 Уч.-изд. л. 12,8

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