



УДК 547.96.02

## К ВОПРОСУ О ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЕ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю.,  
Киселев А. В., Лобанов Н. А., Назимов И. В.

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

Бактериородопсин, ключевой элемент в бесхлорофильном фотосинтезе в галофильных бактериях, представляет собой сравнительно низкомолекулярный мембранный хромопротеид ( $M$  22 000—26 000), содержащий в качестве простетической группы остаток ретиналя [1]. Изучение первичной структуры бактериородопсина позволяет детализировать предложенную упаковку бактериородопсина в мембране [2], а также заложить фундамент дальнейших исследований для выяснения его функционирования в качестве протонного насоса.

Настоящая работа посвящена определению первичной структуры бактериородопсина. Следует отметить, что в силу уникальности свойств интегральных мембранных белков, представителем которых является бактериородопсин, анализ первичной структуры оказался весьма сложным и потребовал разработки новых методических приемов и подходов. Пурпурные мембраны, содержащие бактериородопсин, выделяли из клеток *Halobacterium halobium* R', как описано Остерхельтом и Стокеннусом [1], освобождение от липидов достигалось многократной экстракцией смесью ацетон — 25% аммиак. В процессе определения первичной структуры бактериородопсина были использованы методы химического расщепления белка по остаткам Met, Trp, Tyr с дальнейшей деградацией полученных крупных фрагментов трипсином, химотрипсином, термолизинном и стафилококковой протеазой. Полученные фрагменты разделяли ступенчатой эксклюзионной хроматографией на сефадексах и биогелях с использованием в качестве элюентов органических кислот (муравьиной, уксусной и трифторуксусной) и концентрированных растворов хлоргидрата гуанидина. Пептиды, полученные после дополнительного расщепления крупных фрагментов, разделяли и очищали хроматографией на катионите AG 50W-X4 в пиридин-ацетатных буферах, а также электрофорезом и хроматографией на пластинках с тонким слоем целлюлозы.

N-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных и фенилтиогидантоинов, C-концевую — с помощью карбоксипептидаз A, B и C [3]. N-Концевую последовательность крупных пептидов определяли автоматической деградацией на секвенаторе [4].

Расщепление бактериородопсина по остаткам Met бромцианом проводили в 70% муравьиной кислоте 500-кратным избытком реагента на моль

<Glu-Ala-Gln-Ile-Thr-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Ile-Trp-Leu-Ala-Leu-Gly-Thr-Ala-Leu-Met-<sup>20</sup>  
 Gly-Leu-Gly-Thr-Leu-Tyr-Phe-Leu-Val-Lys-Gly-Met-Gly-Val-Ser-Asp-Pro-Asp-Ala-Lys-<sup>40</sup>  
 Lys-Phe-Tyr-Ala-Ile-Thr-Thr-Leu-Val-Pro-Ala-Ile-Ala-Phe-Thr-Met-Tyr-Leu-Ser-Met-<sup>60</sup>  
 Leu-Leu-Gly-Tyr-Gly-Leu-Thr-Met-Val-Pro-Phe-Gly-Gly-Glu-Gln-Asn-Pro-Ile-Tyr-Trp-<sup>80</sup>  
 Ala-Arg-Tyr-Ala-Asp-Trp-Leu-Phe-Thr-Thr-Pro-Leu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Ala-Leu-Leu-<sup>100</sup>  
 Val-Asp-Ala-Asp-Glu-Gly-Thr-Ile-Leu-Ala-Ile-Val-Gly-Ala-Asp-Gly-Leu-Met-Ile-Gly-<sup>120</sup>  
 Thr-Gly-Leu-Val-Gly-Ala-Leu-Thr-Lys-Val-Tyr-Ser-Tyr-Arg-Phe-Val-Trp-Ala-Ile-Ser-<sup>140</sup>  
 Thr-Ala-Ala-Met.....-Ala-Glu-Ser-Met-Arg-Pro-Glu-Val-Ala-Ser-Thr-<sup>80'</sup>  
 Phe-Lys-Val-Leu-Arg-Asn-Trp-Ser-Ala-Tyr-Pro-Val-Val-Trp-Leu-Ile-Gly-Ser-Glu-Gly-<sup>60'</sup>  
 Ala-Gly-Ile-Val-Pro-Leu-Asn-Ile-Glu-Thr-Ala-Leu-Phe-Met--Val-Leu-Asp-Val-Ser-Ala-<sup>40'</sup>  
 Lys-Val-Gly-Phe-Gly-Leu-Ile-Leu-Leu-Arg-Ser-Arg-Ala-Ile-Phe-Gly-Glu-Ala-Glu-Ala-<sup>20'</sup>  
 Pro-Glu-Pro-Ser-Ala-Gly-Asp-Gly-Ala-Ala-Ala-Thr-Ser.

Аминокислотная последовательность бактериородопсина

Met. В результате проведенного расщепления было идентифицировано 9 фрагментов, 7 из которых удалось получить в гомогенном состоянии. N-Концевой фрагмент (1—20) не содержал свободной α-аминогруппы. Рядом дополнительных исследований N-концевая аминокислота была идентифицирована как пироглутаминовая. Установление структуры коротких пептидов (21—32), (57—60) и (61—68) не вызвало затруднений. Определение аминокислотной последовательности бромцианового фрагмента (33—56) показало, что остаток Lys, ответственный за связывание хромофора, находится в положении 41, а порядок расположения аминокислот, за исключением Ala-39, совпадает со структурой ретинальсодержащего пептида, выделенного Бридженом и Уолкером [5]. N-Концевая последовательность C-концевого бромцианового фрагмента (39'—1') установлена автоматической деградацией на секвенаторе (24 остатка). Для установления его полной структуры проводили триптический гидролиз с последующим выделением 21-членного пептида, C-концевая последовательность которого полностью совпадала с C-концевой последовательностью бактериородопсина, определенной на нативной молекуле белка. Бромциановые фрагменты (69—118) и (80'—40') разделить не удалось, их структура была определена сочетанием непосредственного анализа их смеси на секвенаторе и дальнейшего более глубокого расщепления исходных фрагментов с выделением образовавшихся коротких пептидов. Наибольшую трудность представило выделение и определение структуры бромцианового фрагмента, начинающегося с Ile (119—144). N-Концевая последовательность этого пептида была установлена с помощью автоматической деградации на твердофазном секвенаторе смеси его с N-концевым пептидом (1—20). Полную структуру удалось определить после проведения триптического гидролиза гомогенного образца пептида.

Для реконструкции полипептидной цепи бактериородопсина из бромциановых фрагментов было проведено расщепление белка по остаткам Trp BNPS-скатоном (Pierce, США) [6]. Выделение фрагмента (13—80) в гомогенном состоянии и анализ его структуры позволили установить последовательность расположения шести бромциановых пептидов и реконструировать молекулу белка с N-конца до 119-го остатка. Определение N-концевой последовательности C-концевого скатольного фрагмента (59'—1') автоматической деградацией на секвенаторе дало возможность

получить перекрытие между бромциановыми фрагментами (80' — 40') и (39' — 1'). Структурный анализ фрагментов (4—67) и (73—18'), образующихся в результате действия папаина на бактериородопсин в пурпурных мембранах 171, позволил подтвердить порядок расположения бромциановых пептидов в молекуле белка. Информация о последовательности, обозначенной на схеме пунктиром, будет подтверждена независимыми методами. Положение Met-81' локализовано в результате установления структуры пептида Ala-Glu-Ser-Met-Arg-Pro-Glu-Val-Ala-Ser-Thr-Phe-Lys, выделенного из триптического гидролизата бактериородопсина. Пока остается невыясненной аминокислотная последовательность участка молекулы белка от Met-144 до Ala-84'.

Установленная к настоящему времени структура бактериородопсина приведена на схеме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) *Nature New Biol.*, 233, 149—152.
2. Henderson R., Unwin P. N. T. (1975) *Nature*, 257, 28—31.
3. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чергов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 158—179.
4. Edman P., Begg J. (1967) *Eur. J. Biochem.*, 1, 80—91.
5. Bridgen J., Walker I. (1976) *Biochemistry*, 15, 792—796.
6. Fontana A. (1972) in *Methods in Enzymol.*, XXV, 419—423, Acad. Press.
7. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. (1977) *FEBS Lett.*, 84, 1—4.

Поступило в редакцию  
2.III.1978

#### STUDY ON THE PRIMARY STRUCTURE OF BACTERIORHODOPSIN

OVCHEVNIKOV Yu. A., ABDULAEV N. G., FEIGINA M. Yu.,  
KISELEV A. V., LOBANOV N. A., NASIMOV I. V.

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

The sequence of both N- and C-terminal parts of bacteriorhodopsin consisting of 144 and 84 amino acids respectively has been determined. The protein molecule was splitted by chemical and enzymatic methods. Automatic and manual degradation was used for sequence analysis.

---