



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5

**ИССЛЕДОВАНИЕ GTP-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ СЕТЧАТКИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА. ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ γ -СУБЪЕДИНИЦЫ****Овчинников Ю. А., Линкин В. М., Шувалева Т. М.,
Ищенко К. А., Телешинская И. Н.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

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 фосфодиэстеразой cGMP [1]. Молекулярная масса этого белка равна примерно 85 кДа, а составляющих его α -, β - и γ -субъединиц — 37–39, 35–37 и 6–10 кДа соответственно [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. Выделение трансдуцина проводилось по описанной ранее методике [3].

Для изучения первичной структуры трансдуцина прежде всего необходимо было разработать метод разделения его на отдельные субъединицы. Было опробовано несколько приемов, из которых в дальнейшей работе использовались электрофорез в ацетатцеллюлозном блоке в денатурирующих условиях и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой. При электрофорезе трансдуцина в ацетатцеллюлозном блоке в 8 М мочеvine, содержащей 0,15 М трис-борат, 0,02 М 2-меркаптоэтанол (pH 8,9), проявлялись две полосы. Полоса с большей подвижностью (R_f 0,34) соответствовала α - и γ -субъединицам, полоса с меньшей подвижностью (R_f 0,18) — β -субъединице. Выход в сумме составлял до 80% от нанесенного количества белка. Индивидуальные α - и γ -субъединицы были получены ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой (носитель Silasorb Phenyl, градиент ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте) с выходом соответственно 50 и 80%. Для каждой из выделенных субъединиц был определен аминокислотный состав, приведенный в таблице.

Было установлено, что N-концевым остатком γ -субъединицы является пролин. С помощью метода Эдмана и на секвенаторе 890 С (Beckman) была определена последовательность 34 N-концевых аминокислотных остатков. Установление полной структуры γ -субъединицы осуществлялось блочным методом. При обработке γ -субъединицы иодуксусной кислотой модификации SH-групп не наблюдалось, поэтому основные исследования

проводились на интактном образце белка. Для фрагментации полипептидной цепи γ -субъединицы использовались гидролизы протеиназой из *Staphylococcus aureus* и химотрипсином, а также расщепление бромцианом. Методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Nucleosil C18 (градиент ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте) из ферментативных гидролизатов было выделено 9 и 12 пептидов соответственно, которые в обоих случаях покрывали всю полипептидную цепь γ -субъединицы. Были получены также N- и C-концевые бромциановые фрагменты.

Аминокислотная последовательность пептидов определялась методом Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных или фенилтиогидантоионов, а в случае крупных пептидов применялась автоматическая деградация на жидкофазном секвенаторе.

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

Аминокислота	Число остатков		
	α -субъединица	β -субъединица	γ -субъединица
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(Cm)	4 ^{2*}	7 ^{2*}	2 ^{3*}
Val	17	15	6
Met	5	15	2
Ile	15	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	320	310	69

* Trp в γ -субъединице отсутствует, в α - и β -субъединицах не определялся.

^{2*} В виде Cys(Cm) после модификации иодуксусной кислотой.

^{3*} В виде цистеиновой кислоты после окисления надмуравьиной кислотой.

Сопоставление аминокислотной последовательности изученных пептидов дало возможность расположить их в полипептидной цепи γ -субъединицы (рисунок). Было выяснено, что γ -субъединица содержит 69 аминокислотных остатков, однако аминокислотные остатки в положении 35 и 36 идентифицировать не удалось. Мы предположили, что это остатки цистеина, которые по какой-то причине не карбоксиметилировались иодуксусной кислотой. Аминокислотный анализ белка после окисления его надмуравьиной кислотой подтвердил, что в состав γ -субъединицы входят два остатка цистеина. Оказалось также, что иодацетамид в отличие от иодуксусной кислоты способен карбоксиметилировать восстановленную дитиотреитом γ -субъединицу. Поэтому было проведено расщепление γ -субъединицы, радиоактивно меченной иод-[¹⁴C]ацетамидом, протеиназой *S. aureus*. Из полученного гидролизата с помощью ВЭЖХ были выделены два радиоактивных пептида. Определение их аминокислотной последовательности показало, что эти пептиды являются производными одного и того же фрагмента (Arg²⁹—Glu³⁸), но каждый из них карбоксиметилирован по одному из двух рядом стоящих не идентифицированных ранее остатков, которые теперь с уверенностью можно было определить как остатки цистеина.

Установленная нами структура γ -субъединицы была подтверждена анализом пептидов кластрипаинового гидролизата γ -субъединицы на масс-

спектрометре с бомбардировкой быстрыми атомами. Полученный масс-спектр в основном состоял из пиков молекулярных ионов кластрипаино-вых пептидов γ -субъединицы. Следует отметить, что для получения масс-спектра потребовалось всего ~ 1 нмоль смеси пептидов.

Таким образом, γ -субъединица состоит из 69 аминокислотных остатков, и ее молекулярная масса равна 8008,7 Да.

Заслуживают интереса полученные нами данные о присутствии в полипептидной цепи γ -субъединицы дисульфидной связи между двумя рядом стоящими остатками цистеина (35 и 36). Во-первых, в масс-спектре

1-12	Pro-Val-Ile-Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Thr-Glu-Lys-Asp-
	S _____
	B _____
	Ch _____
13-24	Lys-Leu-Lys-Met-Glu-Val-Asp-Gln-Leu-Lys-Lys-Glu-
	S _____
	B _____
	Ch _____
25-36	Val-Thr-Leu-Glu-Arg-Met-Leu-Val-Ser-Lys-Cys-Cys-
	S _____
	B _____
	Ch _____
37-48	Glu-Glu-Phe-Arg-Asp-Tyr-Val-Glu-Glu-Arg-Ser-Gly-
	S _____
	B _____
	Ch _____
49-60	Glu-Asp-Pro-Leu-Val-Lys-Gly-Ile-Pro-Glu-Asp-Lys-
	S _____
	B _____
	Ch _____
61-69	Asn-Pro-Phe-Lys-Glu-Leu-Lys-Gly-Gly
	S _____
	B _____
	Ch _____

Аминокислотная последовательность γ -субъединицы GTP-связывающего белка. Показаны пептиды, полученные при расщеплении белка протеиназой *S. aureus* (S), бромцианом (B), химотрипсином (Ch)

кластрипаинового гидролизата γ -субъединицы присутствует интенсивный пик с m/z 1342, соответствующий пептиду Met³⁰-Arg⁴⁰ с дисульфидной связью, а также пик иона 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.

Следует отметить тот факт, что один из участков полипептидной цепи родопсина, экспонированный в цитоплазму, также содержит последовательность Cys³²²-Cys³²³ [4], которая по одним данным становится доступной для модификации при облучении светом [5], а по другим — также образует дисульфидную связь [6]. Можно предположить, что эти последовательности в обоих белках могут иметь функциональное значение для процесса передачи светового сигнала.

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. Kuhn H. Nature, 1980, v. 283, № 5748, p. 587-589.
4. Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 179-191.

5. Куделин А. Б., Шемякин В. В., Хорошлова Н. И., Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 3, с. 341-357.
6. Овчинников Ю. А. Тез. докл. 16 конференции ФЕБО. М.: 1984, с. 65.

Поступило в редакцию
5.IV.1984

INVESTIGATION OF GTP-BINDING PROTEIN FROM BOVINE RETINA.
COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF γ -SUBUNIT

OVCHINNIKOV Yu. A., LIPKIN V. M., SHUVAEVA T. M.,
ISHCHENKO K. A., TELEZHINSKAYA I. N.

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

The complete amino acid sequence of γ -subunit of GTP-binding protein from bovine retina was determined. The polipeptide chain consists of 69 amino acid residues. It contains unusual sequence -Cys³⁵-Cys³⁶- with disulfide bridge.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 20.08.84 Подписано к печати 10.10.84 Т-05799 Формат бумаги 70×103¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отг. 11,2 тыс. Уч.-изд. л. 13,3 Бум. л. 4,5
Тираж 868 экз. Зак. 472

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10