БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 5 * № 5 * 1979

УДК 547.962:577.156.1+577.23

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ 20*S*,22*R*-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА Р-450 ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Ранее нами была показана возможность самосборки отдельных компонентов 20*S*,22*R*-холестерингидроксилирующей системы — адренодоксинредуктазы, адренодоксина и цитохрома Р-450 [1]. Из полученных при этом данных следовал вывод, что у молекулы цитохрома Р-450 помимо каталитического центра, отвечающего за присоединение холестерина и его трансформацию в прегненолон, имеется «площадка» связывания с электронотранспортным белком — адренодоксином. Выяснение топографии этих функционально необходимых участков позволит детально исследовать такие чрезвычайно важные вопросы функционирования мембраносвязанных стероидгидроксилирующих систем, как электронный транспорт между отдельными белками и ориентация цитохрома Р-450 в мембранах митохондрий.

Мы решили, применяя ограниченный протеолиз цитохрома Р-450 трипсином, разъединить каталитический участок (активный центр фермента, содержащий протогем IX) и участок, отвечающий за самосборку цитохрома Р-450 с адренодоксином.

Цитохром Р-450 в гомогенном состоянии выделяли согласно работе [2]. При гидролизе нативного 20*S*,22*R*-холестерингидроксилирующего цитохрома Р-450 трипсином (600 нмоль цитохрома Р-450 в 10 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, соотношение фермент — субстрат 1 : 50, 20°) последующий гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) показал, что уже в течение первых 2 мин помимо нерасщепленного белка (30%) появляются два фрагмента: I (M 27 000) и II (M 21 000). При увеличении времени гидролиза до 20 мин полоса, отвечающая нативному белку, полностью исчезает и остаются только фрагменты I и II. Дальнейшее увеличение времени протеолиза до 8 ч приводит к некоторому уменьшению количеств фрагментов I и II с появлением в столбиках геля двух слабых полос фрагментов III и IV с M 14 000 и 10 000 соответственно.

Было решено для разделения образующихся фрагментов применить ранее предложенную нами для выделения цитохрома Р-450 адренодоксин-сефарозу [2] и, таким образом, получить фрагмент, отвечающий за самосборку цитохрома Р-450 с адренодоксином. Однако при хроматографии 20-минутного гидролизата (действие трипсина останавливали 200-кратным избытком фенилметилсульфонилфторида [3]) продукты гидролиза элюировались одной фракцией в условиях, предложенных для нативного цитохро-

ма Р-450 (1 М NaCl+0,3% холата натрия в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2). Таким образом, фрагменты I и II, очевидно, образуют комплекс друг с другом и в таком случае «разрезанная» на 2 части молекула цитохрома могла сохранить ферментативную активность. Действительно, при последующей реконструкции 20*S*,22*R*-холестеингидроксилирующей системы как в растворе [4], так и на колонке [1] с использованием расщепленного цитохрома Р-450 система сохраняла способность трансформировать холестерин в прегненолон.

Нами был предпринят поиск условий разделения фрагментов I и II с целью их дальнейшего структурно-функционального анализа. При гель-хроматографии на сефадексе G-200 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере эти фрагменты элюировались одним пиком с *M* 400 000. Введение в используемый для хроматографии буфер 0,3% твин 80 привело к частичному разделению полученных фрагментов, но, как и в первом случае, они элюировались в агрегированном состоянии: фрагмент I с *M* 180 000, фрагмент II с *M* 400 000. Во всех опытах по гель-хроматографии продуктов протеолиза цитохрома Р-450 обнаруживали также и низкомолекулярную часть пептидного материала ($M<5000$).

Недавно мы сообщили [5] об условиях дезагрегации цитохрома Р-450, не оказывающих на него инактивирующего воздействия и совпадающих с условиями десорбции цитохрома с адренодоксин-сефарозы (см. выше). Гель-хроматография продуктов гидролиза в этих условиях также не привела к разделению фрагментов.

Ранее мы определили изоэлектрическую точку цитохрома Р-450 p*I* 6,62 [5]. При проведении аналитического изоэлектрофокусирования триптического гидролизата в условиях работы [5] (0,1% твин 80) были выявлены две полосы с p*I* 7,3 и 5,7. Такое существенное различие в изоэлектрических точках фрагментов создавало хорошие предпосылки для использования в их разделении ионообменной хроматографии. Действительно, при хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой DE-32 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,3% твин 80, часть фрагмента II сорбируется на колонке и его элюция достигается введением в буфер дополнительно 0,2 М NaCl; остальное его количество в смеси с фрагментом I обнаруживается в несорбировавшемся пептидном материале. Аналогичная картина разделения была получена и в присутствии 4 и 8 М мочевины.

Использовав все вышеописанные подходы к разделению фрагментов, мы обратились к продолжительному гидролизу цитохрома Р-450 трипсином с целью полного расщепления одного из фрагментов. При увеличении времени протеолиза до 24 ч последующий гель-электрофорез в присутствии ДСН показал наличие фрагментов I (70%), III и II (последний в незначительном количестве). Фрагмент I сохранил способность образовывать комплекс с адренодоксином и отделен от остальной части гидролизата биоспецифической хроматографией на адренодоксин-сефарозе. Такой же состав гидролизата был получен при увеличении количества трипсина (фермент — субстрат, 1 : 10) с уменьшением времени гидролиза до 2 ч.

Последующий спектральный анализ фрагмента I показал, что в его состав входит протогем IX, т. е. каталитический центр цитохрома Р-450. Кроме того, оказалось, что фрагмент I в присутствии фрагмента III сохранил активность цитохрома Р-450 по трансформации холестерина в прегненолон. Таким образом, можно предположить непосредственную сближенность в молекуле цитохрома Р-450 активного центра и «площадки» его связывания с адренодоксином. Мы полагаем, что фрагмент II отвечает за связывание цитохрома Р-450 с митохондриальной мембраной.

Картина протеолиза цитохрома Р-450 в условиях его дезагрегации (0,05 М натрий-фосфатный буфер, содержащий 1 М NaCl и 0,3% холат натрия) не изменялась. Гидролиз цитохрома трипсином в присутствии твина 80 (цитохром Р-450 находится в виде димеров с *M* 115 000 [5]) также

не показал никаких отличий. Это свидетельствует о том, что в агрегатах цитохрома Р-450 (M 400 000) и его димерах (M 115 000) действию трипсина доступны те же участки молекулы белка, что и в мономерах (M 46 000). По всей видимости, агрегация цитохрома Р-450 носит упорядоченный характер и, вероятно, в какой-то мере отражает ориентацию цитохрома в митохондриальных мембранах.

Следует отметить, что действие на цитохром Р-450 химотрипсина не совпадает с действием трипсина. В процессе протеолиза химотрипсином наблюдается (данные гель-электрофореза в присутствии ДСН) медленное исчезновение полосы нативного белка, а устойчивые к дальнейшему протеолизу фрагменты не образуются. На наш взгляд, молекула цитохрома Р-450 имеет полиглобулярную структуру.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 688–693.
2. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 278–280.
3. Fahrney D. E., Cold A. M. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 997–1000.
4. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 780–786.
5. Akhrem A. A., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1978) Cytochrome P-450. Structural and Functional Aspects, Abstracts, pp. 1–3, Eberswalde.

Поступило в редакцию
21.XI.1978

STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE 20*S*, 22*R*-CHOLESTEROL HYDROXYLATING CYTOCHROME P-450 FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA

AKHREM A. A., VASILEVSKI V. I., SHKUMATOV V. M., CHASHCHIN V. L.

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Upon limited tryptic hydrolysis of cytochrome P-450, two fragments of molecular weight of 27 000 and 21 000 are formed. The cleaved cytochrome P-450 within reconstituted 20*S*,22*R*-cholesterol hydroxylating system retains its capacity of converting cholesterol into pregnenolone. The 27 000 fragment is also formed on prolonged tryptic digestion. It complexes adrenodoxin, comprises a catalytic site and in the reconstituted system accomplishes the cholesterol hydroxylation, similarly to native cytochrome P-450. The data on limited chymotryptic digestion of cytochrome P-450 are also given.

Технический редактор *Кузьмишкина Е. С.*

Сдано в набор 20.02.79 Подписано к печати 2.04.79 Т-02895 Формат бумаги 70×108¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 Уч.-изд. л. 14,3 Бум. л. 5,0 Тираж 870 экз. Зак. 1560

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