



УДК 577.158:547.963.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

20S, 22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА
P-450 ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКА

I. ПЕПТИДЫ ИСЧЕРПЫВАЮЩЕГО ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА

Чащин В. Л., Данко В. Н., Адамович Т. Б.,
Данко А. Г., Куприна Н. С., Ахрем А. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Проведены исчерпывающий химотриптический гидролиз карбоксиметилированного цитохрома P-450 и фракционирование продуктов гидролиза на катионите аминокс 50 Wx4 с последующим разделением отдельных фракций при помощи хроматографии на бумаге и метода пептидных карт в тонком слое целлюлозы. Выделено 66 индивидуальных пептидов, составляющих в сумме 476 аминокислот, и изучена их аминокислотная последовательность. Количество аминокислотных остатков, входящих в состав неперекрывающихся пептидов, равно 348, что соответствует 85% полного аминокислотного состава белка.

Основным компонентом мембраносвязанных монооксигеназных систем, осуществляющих окисление различных физиологически активных соединений, является гемопротейд — цитохром P-450. В результате многочисленных работ [1—4] удалось выяснить функцию, выполняемую этим ферментом во многих тканях организма. Среди известных монооксигеназных систем особое место занимает холестерингидроксилирующая система, локализованная во внутренней мембране митохондрий клеток коры надпочечников. Интерес, проявляемый к этой системе, обусловлен тем, что холестерингидроксилаза осуществляет начальную стадию биосинтеза кортикостероидов — превращение холестерина в прегненолон, а входящий в ее состав холестерин-специфичный цитохром P-450 выполняет весь цикл многостадийной ферментативной трансформации холестерина. Однако до настоящего времени ни для одного из мембраносвязанных цитохромов P-450 животного происхождения не изучена первичная структура, и только совсем недавно появилась работа о структурных исследованиях цитохрома P-450 из *Pseudomonas putida* [5].

Данное сообщение является первым в серии, посвященной установлению полной аминокислотной последовательности холестерингидроксилирующего цитохрома P-450, и логичным продолжением работы, проведенной нами по изучению структурных основ функционирования этого гемопротейда на молекулярном уровне. Ранее было показано, что нативная молекула цитохрома P-450 состоит из двух доменов [6]. Выяснение первичной структуры белка позволит расположить в полипептидной цепи отдельные домены, а также сделать окончательный вывод о числе субъединиц, участвующих в ферментативной трансформации холестерина в прегненолон.

При изучении первичной структуры цитохрома P-450 были использованы два дополняющих друг друга подхода: 1) исчерпывающий ферментативный гидролиз карбоксиметилированного цитохрома P-450, 2) ограниченный триптический гидролиз нативного белка до фрагментов Φ_1 (M 27 000) и Φ_2 (M 22 000) [7] с последующим их разделением и структурным анализом.

Учитывая мембранную природу цитохрома P-450, его аминокислотный состав, а также необходимость выделения пептидов, перекрывающих фрагменты Φ_1 и Φ_2 , для деструкции белка был выбран химотрипсин. Несмотря на трудности разделения химотриптического гидролизата, такой подход

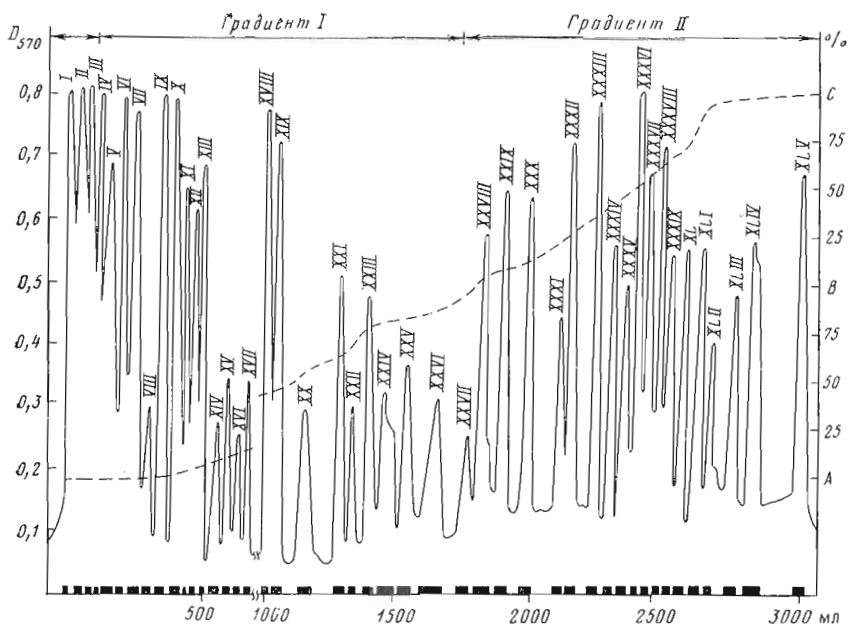


Рис. 1. Разделение растворимых химотриптических пептидов цитохрома Р-450 на катионите аминокс 50 Wx4 в градиенте пиридин-ацетатных буферов (см. «Экспер- часть»). Черными прямоугольниками на оси абсцисс обозначены границы объединенных фракций

позволил бы избежать потерь небольших пептидов, возможно образующихся при ограниченном трипсинолизе цитохрома Р-450.

Молекула цитохрома Р-450 представляет собой полипептидную цепь с M 49 000 [8]. Аминокислотный состав белка, рассчитанный на указанную молекулярную массу, оказался следующим: Asp — 36,60 (37); Thr — 22,01 (22); Ser — 23,83 (24); Glu — 48,71 (49); Pro — 24,95 (25); Gly — 21,62 (22); Ala — 20,43 (20); Cys — 3,66 (4); Val — 26,14 (26); Met — 8,79 (9); Ile — 25,42 (25); Leu — 42,06 (42); Tyr — 14,97 (15); Phe — 25,42 (25); His — 11,17 (11); Lys — 26,61 (27); Arg — 23,76 (24); Trp — 8,08 (8). Цитохром Р-450 в гомогенном состоянии выделяли согласно методике, описанной ранее [8]. Полученный препарат цитохрома имел удельное содержание гема 18 нмоль/мг белка, а его спектрофотометрический индекс D_{393}/D_{280} был равен 0,83. N-Концевая аминокислотная последовательность карбоксиметилированного цитохрома Р-450, установленная с помощью секвенатора и с учетом ранее полученных данных [9], оказалась следующей: Ile-Ser-Thr-Lys-Thr-Pro-Arg-Pro-Tyr-Ser-Glu-Ile-Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-X-Gly -Asn -Leu-Asn-Leu-Tyr-X-Phe. Применение карбоксипептидазы А позволило определить в качестве С-концевой аминокислоты цитохрома Р-450 аланин.

Непосредственно перед структурным анализом нативный белок обрабатывали согласно методике [10] для удаления протестической группы — протогема IX, а затем карбоксиметилировали моноокдуксусной кислотой в присутствии 8 М хлоргидрата гуанидина [11]. Гидролиз карбоксиметилированного цитохрома Р-450 химотрипсином проводили в стандартных условиях [12]. Для отделения нерастворимых при кислых значениях рН пептидов гидролизат подкисляли уксусной кислотой до рН 2,5 и далее центрифугировали. Первоначальное фракционирование растворимой части химотриптического гидролизата белка осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на катионите АС 50 Wx4 в градиенте возрастающих концентраций (по пиридину) и рН пиридин-ацетатных буферов. В результате разделения было получено 45 объединенных фракций (рис. 1). Хроматография в тонком слое целлюлозы и N-концевой аминокислотный анализ фракций показали, что фракции VI, XII, XVIII, XIX, XXVIII, XXXVI, XXXIX, XL, XLII—XLV содержат индивидуальные пеп-

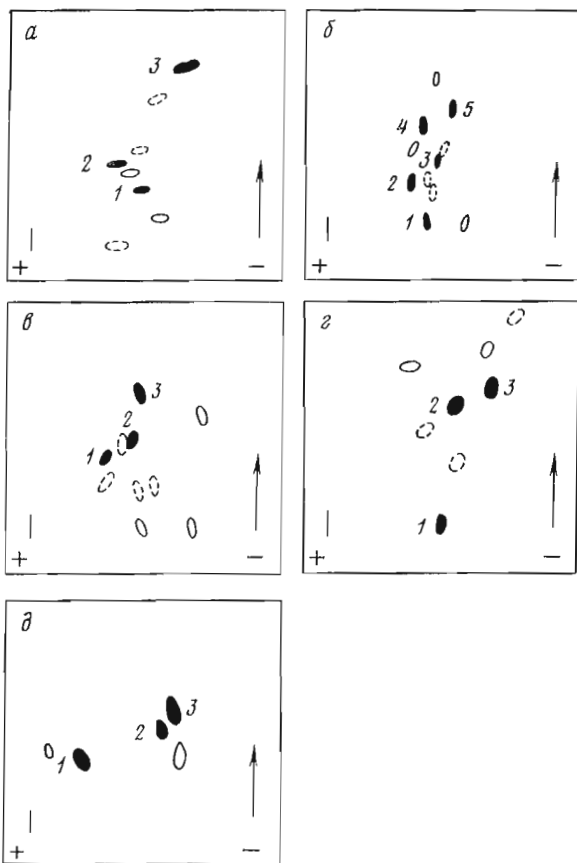


Рис. 2. Разделение методом пептидных карт фракций XXXII (а), XXXIII (б), XXXV (в), XXXVII (г), XXXVIII (д). Электрофорез осуществляли при рН 5,45 (а, б) и 3,5 (в-д). Стрелкой указано направление хроматографии в системе С

тиды, а фракция VIII — индивидуальную аминокислоту Ala. Для дальнейшего разделения фракций, содержащих сложные смеси пептидов, использовали метод пептидных карт при различных значениях рН. Так, высоковольтный электрофорез фракций XXXII и XXXIII проводили при рН 5,45, а в случае фракций XXXV, XXXVII и XXXVIII — при рН 3,5 (рис. 2). Остальные объединенные фракции имели несложный состав, и их разделяли хроматографией на бумаге. Для обнаружения триптофансодержащих пептидов все фракции были исследованы при помощи реактива Эрлиха. Триптофансодержащие пептиды были найдены в семи фракциях (V, XVII, XX, XXXI, XLI, XLII и XLV), из которых впоследствии были выделены соответствующие пептиды: С-V, С-XVII, С-XX-2, С-XXXI-2, С-XLI-2, С-XLII и С-XLV. Таким образом, из растворимой при кислых значениях рН части химотриптического гидролизата цитохрома Р-450 было выделено 66 пептидов. Аминокислотный состав, N-концевые аминокислотные остатки и выход химотриптических пептидов приведены в табл. 1.

При исследовании нерастворимой при рН 2,5 части химотриптического гидролизата цитохрома Р-450 было установлено, что в ней содержится смесь небольших количеств пептидного материала с частично гидролизованным белком.

Анализ фракций XV и XXX показал наличие пептидов С-XV-1 и С-XXX-1, не содержащих свободной α -аминогруппы. По данным аминокислотного состава, в обоих пептидах имеются остатки глутаминовой кислоты. На основании этих данных можно предположить, что N-концевой аминокислотой в указанных пептидах является глутамин, который при кислых значениях рН среды превратился в пироглутаминовую кислоту. С целью

Аминокислотный состав пептидов химогритического гидролиза цитохрома Р-450

Аминокислота	C-I	C-II	C-III-1	C-III-2	C-IV-1	C-IV-2	C-V	C-VI	C-VII-1	C-VII-2	C-VIII	C-IX	C-X
Asp	2,02(2)	1,00(1)	2,34(2)		1,64(2)	0,72(1)	2,23(2)	0,77(1)				0,92(1)	
Thr					0,75(1)		1,84(2)	0,78(1)				0,84(1)	0,80(1)
Ser	2,02(2)	1,03(1)	2,24(2)	1,00(1)	1,09(1)		1,17(1)		1,00(1)			0,98(1)	
Glu	1,78(2)	1,81(2)	2,00(2)	0,87(1)	0,84(1)	1,69(2)	2,19(2)			1,00(1)			
Pro							2,00(2)					0,85(1)	2,00(2)
Gly	1,14(1)					0,77(1)			1,03(1)		1,05(1)		
Ala					0,99(1)				1,58(2)			0,95(1)	0,98(1)
Val		0,94(1)		0,99(1)	0,74(1)			1,12(1)	0,91(1)	1,01(1)			
Met							4,00(1)			1,00(1)			
Ile		2,00(2)		1,71(2)	1,00(1)	0,78(1)			0,76(1)			1,00(1)	1,74(2)
Leu		0,90(1)				1,00(1)						0,86(1)	
Tyr					0,84(1)	0,81(1)		1,00(1)		0,76(1)			
Phe													
His													
Lys													
Arg							0,76(1)						
Trp													
Число остатков	7	8	6	6	8	7	11	4	6	4	1	7	6
N-Концевая аминокислота	Asn	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Ile	Phe	Ala	Gly	Val
Выход, %	14,0	18,0	12,5	4,0	25,0	35,0	6,0	21,0	3,0	7,5	4,0	10,0	7,5

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	C-XI	C-XII	C-XIII-1	C-XIII-2	C-XIV	C-XV-1	C-XV-2	C-XVI	C-XVII	C-XVIII	C-XIX	C-XX-1	C-XX-2
Asp	4,00(1)	2,44(2)		0,84(1)	4,63(2)			0,75(1)	0,66(1)	2,21(2)	0,81(1)	1,98(2)	
Thr		1,28(1)			0,93(1)							1,81(2)	
Ser		2,30(2)			2,02(2)	1,02(1)			0,96(1)	1,23(1)	1,21(1)	0,83(1)	
Glu		1,03(1)	0,85(1)	0,82(1)	1,03(1)					1,11(1)	1,08(1)		1,18(1)
Pro													
Gly													
Ala	4,07(1)	2,41(2)			2,04(2)					1,20(1)			
Val	4,23(1)	1,15(1)			1,01(1)	0,94(1)							
Met		0,78(1)			0,70(1)	0,81(1)				1,04(1)	1,00(1)		
Ile	4,00(1)	1,00(1)	1,00(1)		0,95(1)			1,00(1)	1,00(1)	1,36(1)	2,00(2)		
Leu				2,17(2)									
Tyr	0,91(1)		1,03(1)	1,00(1)		1,00(1)	1,00(1)			1,00(1)		1,00(1)	
Phe					0,93(1)								
His													
Lys		0,99(1)			1,00(1)	1,03(1)				1,00(1)	1,02(1)	1,09(1)	
Arg													0,89(1)
Trp									0,83(1)				
Число остатков	5	12	4	4	13	3	3	2	4	8	7	7	2
N-Концевая аминокислота	Ile	Asn	Gly	Leu	Asn	Gln	Val	Asn	Thr	Val	Leu	Ser	Gly
Выход, %	15	18	12	10	3	25	7	4	4	18	12	2	15

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	C-XXI	C-XXII-1	C-XXII-2	C-XXIII	C-XXIV	C-XXV	C-XXVI	C-XXVII	C-XXVIII	C-XXIX	C-XXX-1	C-XXX-2	C-XXXI-1
Asp	0,95 (1)	4,18 (1)		4,24 (1)	0,67 (1)			0,88 (1)			1,09 (1)		1,92 (2)
Thr	0,86 (1)		4,11 (1)	1,12 (1)		1,00 (1)		0,87 (1)			0,99 (1)	1,00 (1)	0,91 (1)
Ser	0,95 (1)		1,38 (1)	4,92 (5)	0,88 (1)	2,29 (2)	2,22 (2)	0,75 (1)			2,17 (2)	1,16 (1)	3,94 (4)
Glu				0,90 (1)		0,95 (1)							0,96 (1)
Pro				1,97 (2)		1,26 (1)							1,31 (1)
Gly				1,17 (1)									2,01 (2)
Ala	0,86 (1)	4,14 (1)	4,13 (1)	1,04 (1)			0,74 (1)						1,03 (1)
Val		0,77 (1)	0,82 (1)	0,81 (1)	2,11 (2)								0,89 (1)
Met					2,00 (2)		1,88 (2)					0,88 (1)	0,91 (1)
Ile	1,00 (1)		4,00 (1)	2,10 (2)		1,78 (2)					1,10 (1)		2,00 (2)
Leu				4,00 (1)									
Tyr					0,79 (1)					1,21 (1)	1,00 (1)		
Phe				1,00 (1)									
His	0,85 (1)			1,10 (1)	0,87 (1)								
Lys				1,10 (1)				1,00 (1)					
Arg		1,00 (1)	4,00 (1)	1,06 (1)		1,00 (1)	1,00 (1)			1,00 (1)	1,08 (1)	1,81 (2)	1,00 (1)
Trp											1,85 (2)		1,91 (2)
Число остатков	6	5	6	18	8	8	6	3	41	2	9	5	19
N-Концевая аминокислота	His	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Leu	Lys	Ile	Lys	Gln	Lys	Asn
Выход, %	15,0	10,0	7,5	7,5	3,5	3,0	2,0	2,0	44,0	4,1	9,2	8,3	10,1

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	С-XXXI-2	С-XXXII-1	С-XXXII-2	С-XXXII-3	С-XXXII-1	С-XXXII-2	С-XXXII-3	С-XXXIII-4	С-XXXIII-5	С-XXXI	С-XXXV-1	С-XXXV-2	С-XXXV-3
Asp	2,20(2)		1,03(1)		1,01(1)	2,33(2)	2,00(2)				1,95(2)	1,03(1)	
Thr	1,01(1)	1,06(1)				1,41(1)	1,00(1)				0,95(1)	0,94(1)	
Ser	1,69(2)	1,09(1)			1,15(1)						2,19(2)	1,91(2)	
Glu		1,09(1)											
Pro	2,40(2)		1,08(1)					1,00(1)		1,40(1)	1,00(1)	1,48(1)	1,00(1)
Gly										0,98(1)	1,72(2)	0,90(1)	0,97(1)
Ala		0,94(1)			0,99(1)						0,93(1)		0,87(1)
Val											1,07(1)		
Met													
Ile		0,96(1)				0,68(1)	0,64(1)		1,00(1)				
Leu		2,00(2)	1,14(1)		1,00(1)	1,00(1)	1,80(2)		1,12(1)	1,00(1)		1,88(2)	3,03(3)
Tyr	1,00(1)		1,00(1)			1,00(1)	1,00(1)	1,00(1)	0,86(1)			1,00(1)	
Phe										1,96(2)	1,07(1)	1,00(1)	
His						0,85(1)	0,70(1)			1,96(2)	1,70(2)	1,00(1)	
Lys	1,18(1)	1,98(2)			2,00(2)	2,00(2)	1,97(2)		0,86(1)			1,09(1)	
Arg	1,00(1)		1,00(1)					1,04(1)					1,05(1)
Trp	0,89(1)												
Число остатков	11	9	5	3	6	9	10	3	3	5	13	11	7
N-Концевая аминокислота	Ser	Leu	Arg	Lys	Asn	Ser	Leu	Arg	His	Lys	Asn	Arg	Val
Выход, %	12,0	13,1	14,0	14,1	15,1	3,0	15,1	23,0	10,0	5,1	4,5	11,0	6,0

Таблица 1 (окончание)

Аминокислота	G-XXXXV	I-IIIAXXXV-1	2-IIIAXXXV-2	3-IIIAXXXV-3	G-XXXXVII-1	2-IIIAXXXV-2	G-XXXXVII-2	G-XXXXVII-3	G-XXXXVII-4	G-XXXXVII-5	G-XXXXVII-6	G-XXXXVII-7	G-XXXXVII-8	G-XXXXVII-9	G-XXXXVII-10	G-XXXXVII-11	G-XXXXVII-12
Asp	1,81(2)	0,87(1)	1,82(2)		1,48(4)	0,71(4)											
Thr	0,98(4)	0,82(1)	0,79(1)		1,06(1)												
Ser		1,70(2)	1,92(2)		2,09(2)												
Glu	2,05(2)		1,14(4)		0,94(1)	1,40(1)											
Pro		0,98(4)	0,99(4)		1,72(2)	0,97(4)											
Gly		1,88(2)	1,96(2)														
Ala					0,98(4)												
Val		0,68(4)	0,72(4)														
Met	0,98(4)	0,89(4)	0,85(4)		1,09(1)	0,94(4)											
Ile			0,80(1)		2,48(2)	1,00(4)											
Leu					2,00(2)	0,74(4)											
Tyr	1,00(4)																
Phe																	
His	0,99(4)	1,00(4)	1,00(4)		4,03(4)	1,00(1)											
Lys	1,00(1)	2,09(2)	2,04(2)		1,00(4)	1,00(1)											
Arg																	
Trp																	
Число остатков	9	12	14	4	15	7	3	40	8	6	4	7	9	7	6		
N-Концевая аминокислота	Ile	Ala	Asn	Arg	Gly	Arg	Arg	Lys	Gly	His	Pro	Arg	Arg	Lys	Lys		
Выход, %	63,0	4,5	2,0	4,0	6,0	28,0	7,5	60,0	14,0	25,0	33,0	42,0	30,0	40,0	40,0		

подтверждения этого была проведена обработка пептидов С-ХV-1 и С-ХХХ-1 1 н. раствором НСl в метаноле [13]. В результате при последующем N-концевом аминокислотном анализе были идентифицированы остатки глутаминовой кислоты.

Аминокислотную последовательность пептидов изучали по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде дансильных (Dns-) производных, а для определения дикарбоновых кислот и их амидов использовали методику Розо [14]. В некоторых случаях, при анализе пептидов, содержащих триптофан, а также дикарбоновые кислоты и их амиды, применяли «прямой» метод Эдмана с идентификацией фенилтиогидантоиновых (Pth-) производных аминокислот и метод Эдмана в модификации Чанга с идентификацией диметиламиноазобензолтиогидантоиновых (ДАВТН-) производных аминокислот. C-Концевую аминокислотную последовательность определяли с помощью карбоксипептидазы А. В табл. 2 приведены результаты определения аминокислотной последовательности химотриптических пептидов цитохрома Р-450.

Пептид С-ХХIII. Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот была установлена N-концевая аминокислотная последовательность данного пептида: Gly-Glu-Arg-Leu-Gly-Met-Leu-Glx-Glx-Thr-(Val, Asx, Pro, Glx₂, Lys, Ala, Phe). Полную структуру определяли по методу Эдмана в модификации Чанга, что дало возможность определить аминокислотную последовательность первых 15 аминокислот, в том числе было установлено наличие глутаминовой кислоты в положениях 8 и 9, а также аспарагина — в положении 12. Карбоксипептидаза А отщепляла за 2 ч 88,4% фенилаланина. В связи с низким выходом полную аминокислотную последовательность пептида С-ХХIII установить не удалось.

Пептид С-ХХХI-1. N-Концевая аминокислотная последовательность пептида, включающая восемь аминокислотных остатков, была определена по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот: Asn-Ala-Arg-Arg-Glx-Ala-Glx-Gly-(Asx, Ile, Ser, Lys, Met, Leu, Glx₂, Pro, Val, Leu).

Деградацией по методу Эдмана с идентификацией ДАВТН-производных аминокислот была установлена аминокислотная последовательность первых 13 аминокислотных остатков (см. табл. 2). Полное строение данного пептида установить не удалось из-за недостаточных количеств пептидного материала.

Пептид С-ХХХVIII-1. Деградацией по методу Эдмана с идентификацией Dns-производных аминокислот была найдена последовательность первых 14 аминокислот. Для подтверждения наличия остатков глутаминовой кислоты в положениях 6 и 12 был проведен гидролиз пептида С-ХХХVIII-1 глутамин-специфичной протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Наличие в гидролизате таких N-концевых аминокислот, как глицин, лизин и серин, подтвердило расположение остатков глутаминовой кислоты в пептиде (см. табл. 2).

Пептид С-ХХХIX. Методом Эдмана с идентификацией Dns-аминокислот определена аминокислотная последовательность первых шести аминокислотных остатков: Lys-Phe-Glx-Gly-Ser-Tyr-(Pro, Glx, Arg, Tyr). По данным аминокислотного анализа и первичной структуры двух химотриптических пептидов С-ХХIX и С-ХХV-1, входящих в состав пептида С-ХХХIX, установлено полное строение пептида.

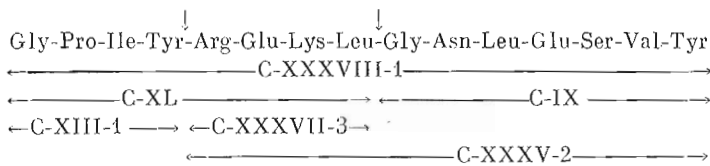
В результате гидролиза пептида С-ХХХIX глутамин-специфичной протеиназой было доказано наличие остатка глутаминовой кислоты в положении 3 с N-конца пептида.

Таким образом, из химотриптического гидролизата цитохрома Р-450 выделено и охарактеризовано 66 пептидов, которые объединяют в своем составе 476 аминокислотных остатков. Установлена полная структура всех пептидов, за исключением С-V, С-X, С-ХХIII и С-ХХХI-1, для которых определена только частичная последовательность аминокислот. Анализ приведенных данных показал, что гидролиз цитохрома Р-450 под действием химотриптина прошел в полном соответствии со специфичностью

Пептид	Аминокислотная последовательность
C-XL	Gly-Pro-Ile-Tyr-Arg-Glx-Lys-Leu $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
C-XLI-1	His-Arg-Ile-Glu-Asn-Phe $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
C-XLI-2	Pro-Thr-Arg-Trp $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$
C-XLII	Arg-Asp-His-Val-Ala-Ala-Trp $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
C-XLIII	Arg-Lei-His-Pro-Ile-Ser-Val-Thr-Leu $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ $\leftarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow$
C-XLIV	Lys-Lys-Asp-Arg-Val-Val-Leu $\xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad} \xrightarrow{\quad}$
C-XLV	Lys-Lys-Ser-Gly-Thr-Trp $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$

Примечание. Стрелками показаны стадии деградации пептидов по методу Эдмана с идентификацией Dns-($\xrightarrow{\quad}$), Dns- и Pth-(\Rightarrow) и DABTH-(\rightarrow) производных аминокислот; \leftarrow — результаты С-концевого анализа с помощью карбоксипептидазы А.

фермента. Подавляющее большинство химотриптических пептидов содержат в качестве С-концевых аминокислот остатки лейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана и метионина. Расщепление пептидных связей по амидам дикарбоновых кислот привело к образованию четырех пептидов, С-XXXVII, С-III-1, С-XII и С-XXII-1, причем три последних пептида были получены с достаточно высоким выходом. Образование пептидов С-XX-1 и С-XII-2 объясняется кислотным гидролизом пептидной связи Asp-Pro в процессе хроматографического разделения пептидов, что подтверждается аминокислотной последовательностью пептида С-XXXI-2. Получение большого числа перекрывающихся пептидов, по-видимому, можно интерпретировать неполной расщепления химотрипсином некоторых пептидных связей цитохрома Р-450. Так, образование химотриптических пептидов С-XL, С-XXXV-2, С-XXXVIII-1 наряду с пептидами С-XIII-1, С-XXXVII-1 и С-IX объясняется неполным гидролизом связей Tyr-Arg и Leu-Gly (см. схему):



Аналогично в результате гидролиза химотрипсином по остаткам аспарагина, метионина и лейцина были выделены помимо пептида С-XXXI-1 три дополнительных: С-XXXV-1, С-XXXVII-1 и С-XXXVII-2 (см. табл. 2).

Анализ первичной структуры химотриптических пептидов показал, что суммарное количество аминокислотных остатков перекрывающихся пептидов равно 348, что составляет 85% аминокислот, входящих в состав цитохрома Р-450.

Экспериментальная часть

Холестерин-специфичный цитохром Р-450 выделяли по методу, описанному ранее [8]. Повторная хроматография полученного препарата на колонке с аденодоксин-сефарозой в условиях работы [8] позволила получить гомогенный препарат белка, имеющий спектрофотометрический индекс чистоты $D_{393}/D_{280}=0,83$.

Удаление протопгема IX и карбоксиметилирование цитохрома Р-450. Лиофилизированный препарат белка суспендировали в 30% водном ацетоне

и подкисляли 0,1 н. HCl до полного растворения осадка. Далее белок осаждали 9-кратным избытком ацетона, полученный осадок отделяли центрифугированием и растворяли в трис-HCl-буфере, pH 8,6, содержащем 8 М хлоргидрат гуанидина, а затем карбоксиметилировали по стандартной методике [14].

Химотриптический гидролиз карбоксиметилированного цитохрома P-450. CM-белок (2 мкмоль) суспендировали в 8 мл воды, очищенной от аминокислот, и денатурировали в термостатируемой ячейке при 98° С в течение 10 мин. После охлаждения до 37° С к суспензии белка приливали 7 мл 0,2 М раствора аммонийбикарбоната и доводили pH среды до 8,3, а затем добавляли порцию химотрипсина (Serva, ФРГ) до соотношения фермент — субстрат 1 : 100 (по весу). Гидролиз вели в атмосфере аргона при 37° С, при тщательном перемешивании. Через 2 ч добавляли вторую порцию химотрипсина (1 : 50). После 24 ч гидролизат лиофилизировали.

Разделение химотриптического гидролизата CM-цитохрома P-450. Лиофильно высушенный гидролизат CM-белка растворяли в 10% CH₃COOH и растворимую при pH 2,5 часть гидролизата подвергали разделению на пептидном анализаторе, собранном на базе аминокислотного анализатора AAA-881 (Microtechna, ЧССР) [15]. Для хроматографии использовали колонку (0,9×60 см) высокого давления со смолой аминокс 50Wx4 (20—30 мкм) (Bio-Rad, США). Пептиды с колонки элюировали пиридин-ацетатными буферами с увеличивающимися значениями pH и молярности (до пиридину) со скоростью 24 мл/ч и давлением 20—28 атм. Начальная температура рубашки колонки 42° С; после 83 ч элюирования температуру поднимали до 57° С. Для создания градиента использовали смеситель типа Ultrograd (ЛКВ, Швеция). Элюирование начинали 0,2 М пиридин-ацетатным буфером, pH 2,9 (стартовый буфер). Для дальнейшего хроматографирования создавали градиент I, используя в качестве буфера А стартовый буфер, а в качестве буфера В — 0,5 М пиридин-ацетатный буфер, pH 4,9. Для создания градиента II применяли буфер В и буфер С (2 М пиридин-ацетатный буфер, pH 5,0). Форму градиента задавали в зависимости от наблюдаемой картины разделения. На заключительном этапе промывку колонки осуществляли 2 М водным пиридином. Отбор элюата для реакции с нингидриновым реагентом проводили непрерывно со скоростью 1,2 мл/ч, а оставшаяся часть элюата поступала на автоматический коллектор фракций. Объем каждой фракции составлял 5,7 мл. Объединение фракций проводили согласно профилю элюирования пептидного материала с колонки и регистрации сигнала фотоколориметра на самописце после реакции этого же пептидного материала с нингидриновым реагентом, которая в нашем случае составляла 20 мин. Сотая часть объединенных фракций использовалась для анализа на пластинках с тонким слоем целлюлозы в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12 (С). Параллельно отбирали аликвоты для определения N-концевых аминокислотных остатков.

Препаративное разделение пептидов химотриптического гидролизата методом пептидных карт и хроматографии на бумаге. Пептидные карты смесей пептидов выполняли на пластинках (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы марки Whatman № 300. Первоначально проводили электрофорез, а во втором направлении — хроматографию в системе С. Электрофорез осуществляли в течение 1 ч при pH 5,45 (пиридин — уксусная кислота — вода, 1 : 4 : 120), pH 3,5 (пиридин — уксусная кислота — вода, 0,3 : 15 : 109,7) при напряжении 1000 В. Пептиды обнаруживали после обработки пластинки 0,025% раствором флуорескамина в ацетоне, содержащем 2,5% пиридина, а затем элюировали 20% уксусной кислотой и 30% пиридином.

Нисходящую хроматографию проводили на бумаге марки Whatman 3 MM (Англия) в системе С. Пептиды обнаруживали путем опрыскивания узких полос хроматограммы 0,2% раствором нингидрина в ацетоне. Найденные пептиды элюировали 20% уксусной кислотой.

Аминокислотный анализ. Пробы белка или пептидов гидролизировали 5,6 н. HCl в течение 24 и 72 ч при 110° С. Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотных анализаторах LC-2000 (Biotronik, ФРГ) и

ЛКВ-3201 (Швеция). Для определения содержания триптофана гидролиз проводили 3 н. меркаптоэтанолсульфокислотой согласно [16].

Аминокислотные последовательности пептидов (0,01–0,03 мкмоль) определяли ручным методом Эдмана в модификации Хартли [17]. Для идентификации Dns-производных аминокислот использовали тонкослойную хроматографию на силикагеле и на полиамидных пластинках микрополиамид F 1700 (Schleicher und Schüll, ФРГ) [18]. В некоторых случаях использовали Pth-метод Эдмана [19] и для более длинных пептидов (до 0,01 мкмоль), содержащих 15–20 аминокислотных остатков, метод Эдмана в модификации Чанга [20].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Estabrook R. W., Cooper D. Y., Rosental O.* Biochem. Z., 1963, В. 338, S. 741–745.
2. *Юдаев Н. А.* В кн.: Современные вопросы эндокринологии. М.: Медицина, 1969, с. 7–20.
3. *Gunsalus I. C., Pederson T. C., Sligar S. G.* In: Annual Review of Biochemistry, 1975, v. 44, p. 377–408.
4. *Gunsalus I. C., Meeks J. R., Lipscomb J. D., Debrunner P., Münck E.* In: Molecular mechanisms of oxygen activation. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 559–613.
5. *Gunsalus I. C.* In: Abstracts fifth international symposium on microsomes and drug oxidation. Tokyo, 1981, p. 2.
6. *Ахрем А. А., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.* Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 5, с. 789–791.
7. *Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.* Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 285–295.
8. *Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.* Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 278–280.
9. *Ахрем А. А., Лапко В. Н., Лапко А. Г., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.* Докл. АН СССР, 1978, т. 243, № 2, с. 505–507.
10. *Strittmatter P. J.* Biol. Chem., 1960, v. 235, № 8, p. 2492–2497.
11. *Crestfield A. M., Moore S., Stein V. H. J.* Biol. Chem., 1963, v. 238, № 2, p. 622.
12. *Smyth D. G.* In: Methods in Enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 214–222.
13. *Kawasaki I., Itano H. A.* Anal. Biochem., 1972, v. 48, № 2, p. 546–556.
14. *Roseau G., Pantel P. J.* Chromatogr., 1969, v. 44, № 2, p. 392–395.
15. *Ахрем А. А., Лапко А. Г., Лапко В. Н., Морозова Л. А., Репин В. А., Тищенко И. В., Чащин В. Л.* Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 462–475.
16. *Penke V., Ferenczi R., Kovacs K.* Anal. Biochem., 1974, v. 60, № 1, p. 45–50.
17. *Bruton C. J., Hartly B. C. J.* Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 165–178.
18. *Woods K., Wang K.* Biochem. et biophys. acta, 1967, v. 133, № 2, p. 369–370.
19. *Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М.* Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 158–178.
20. *Chang J. Y., Creaser E. H.* Biochem. J., 1976, v. 157, № 1, p. 77–85.

Поступила в редакцию
10.III.1982

PRIMARY STRUCTURE OF 20S, 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING CYTOCHROME P-450 FROM ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA. I. PEPTIDES OF EXHAUSTIVE CHYMOTRYPTIC HYDROLYSIS

CHASHCHIN V. L., LAPKO V. N., ADAMOVICH T. B.,
LAPKO A. G., KUPRINA N. S., AKHREM A. A.

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

Exhaustive chymotryptic hydrolysis of carboxymethylated cytochrome P-450 and hydrolysate fractionation of Amines 50Wx4, followed by separation of some fractions using paper chromatography or thin-layer cellulose peptide mapping have been carried out. As a result, 66 individual peptides amounting in total to 476 amino acids have been isolated and their amino acid sequences investigated. The non-overlapping peptides comprised 348 amino acid residues, that corresponds to 85% of the total amino acid composition of the protein.