

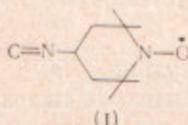
Л. М. РАЙХМАН, Б. АННАЕВ, Э. Г. РОЗАНЦЕВ

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИТОХРОМА Р-450

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 1 III 1971)

Цитохром Р-450, являющийся терминальной оксидазой дыхательной цепи микросом и непосредственно участвующий в гидрокселировании различных неполярных соединений, обладает рядом необычных свойств, отличающих его от других цитохромов (¹). Одна из особенностей цитохрома Р-450 — расположение полосы Соре его комплекса с СО в более длинноволновой области, чем у большинства других гемопroteinов (450 мμ вместо 420—430 мμ); другая — характерное изменение его оптических свойств при взаимодействии с различными неполярными соединениями. Обычно наблюдается увеличение оптической плотности при 390 мμ и уменьшение поглощения при 420 мμ (так называемый первый тип спектральных изменений). Причины этих спектральных сдвигов, свидетельствующих об изменении электронного состояния гемовой группы под влиянием субстратов, непосредственно к ней не присоединяющихся (²), остаются неясными. Они могут вызываться, в частности, изменением взаиморасположения гемовой группы с близлежащими белковыми лигандами в результате конформационных переходов, обусловленных присоединением к цитохрому неполярных субстратов.

В данной работе мы попытались установить взаимосвязь между изменением электронного состояния гемовой группы цитохрома Р-450 и его окислительно-восстановительным потенциалом (о.в.п.), с одной стороны, и конформационными переходами белковой части цитохрома — с другой. Для регистрации последних был применен метод спиновых меток. С этой целью синтезирован радикал I (³), содержащий изоцианидную группу



($-\dot{N} \equiv \bar{C}$) и способный благодаря этому при добавлении его к микросомам специфически связываться с гемовой группой цитохрома Р-450 (в микросомах, кроме цитохрома Р-450, есть еще цитохром В₅, но он не взаимодействует с изоцианидами (⁴)). О степени связывания I с цитохромом Р-450 можно судить по появлению характерных для его изоцианидных производных оптических спектров (с максимумом поглощения при 435 и 455 мμ) (⁵).

Подвижность иминоксильной части метки I, связанной с гемовой группой, ограничивается аминокислотными остатками цитохрома, расположенными вблизи гема, и должна изменяться в случае конформационных переходов, сопровождающихся изменением взаиморасположения гема и ближайших участков белковой части цитохрома. По спектрам э.п.р. спиновой метки можно оценить степень ее подвижности (определив так называемое время корреляции τ_c , приблизительно соответствующее обратной величине частоты молекулярного вращения метки (⁶)), и, таким об-

разом, судить об изменении пространственной структуры белковой части цитохрома вблизи гема.

Опыты проводили на микросомах, выделенных из печени крысы по методу (7). О величине о.в.п. цитохрома Р-450 судили по степени его восстановления при добавлении к микросомам определенных электронных доноров. В качестве последних были использованы красители метилвиологен ($E_0' = -440$ мв) и бензилвиологен ($E_0' = -316$ мв) (8). Полученные результаты откладывали на графике, как показано на рис. 1, и оп-

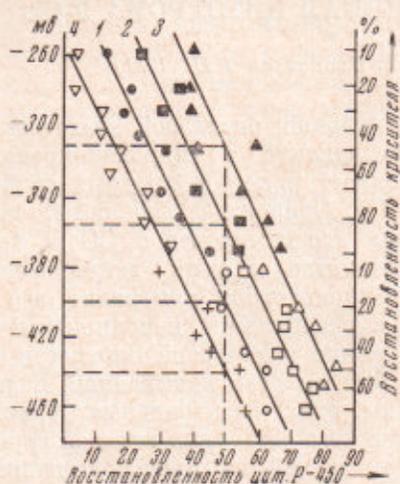


Рис. 1

Рис. 1. О.в.п. цитохрома Р-450 в различных микросомальных препаратах: 1 — интактные микросомы; 2 — микросомы в присутствии 5 мМ аминопирина; 3 — микросомы, обработанные 6 М мочевиной; 4 — микросомы, обработанные дезоксихолатом натрия 4%. Темные точки — определение с бензилвиологеном, светлые — определение с метилвиологеном. Прямые рассчитаны на основе экспериментальных точек по методу наименьших квадратов

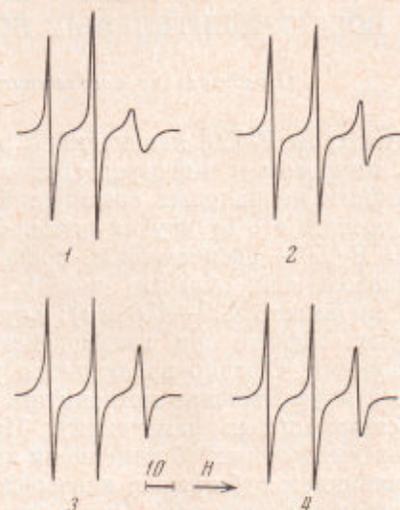


Рис. 2

Рис. 2. Спектры э.п.р. изоцианидной спиновой метки в различных препаратах. Обозначения те же, что на рис. 1. Концентрация микросомального белка 10 мг/мл, изоцианидной метки $1 \cdot 10^{-5}$ М. Микросомы отделяли от несвязанной метки двукратным промыванием в среде трис-КCl (50 мМ трис-буфера pH 7,5 и 50 мМ КCl)

ределяли потенциал, соответствующий 50% восстановлению цитохрома Р-450. Изменение оптических спектров цитохрома Р-450 при добавлении к микросомам I регистрировали на дифференциальном спектрофотометре типа ДСФ-1М. Спектры э.п.р. измеряли на приборе ЭПР-2. Время корреляции τ_c рассчитывали в соответствии с работой (6). Все опыты проводили при температуре 25° с использованием 50 мМ трис-буфера (pH 7,5).

На рис. 2 представлены спектры э.п.р. изоцианидной метки в различных микросомальных препаратах. В интактных микросомах метка в значительной степени заторможена, о чем свидетельствует высокое значение τ_c ($3,3 \pm 0,4$ нсек.). Добавление аминопирина — субстрата, связывающегося с цитохромом Р-450 и способного гидроксильроваться в микросомах, снижало величину τ_c до $2,0 \pm 0,25$ нсек., т. е. заметно увеличивало молекулярную подвижность метки. При обработке микросом мочевиной (6 М) и детергентами (дезоксихолатом натрия 4%) частота вращения метки возрастала в еще большей мере (τ_c снижалось до $1,2 \pm 0,2$ нсек.).

При сопоставлении этих результатов с данными по определению о.в.п. цитохрома Р-450, представленными на рис. 1, обращает на себя внимание тот факт, что аминопирин, мочевина и дезоксихолат, изменяющие в одном направлении подвижность изоцианидной метки, связанной с цито-

хромом P-450, оказывают различное влияние на о.в.п. этого цитохрома. Аминопириин и мочевина увеличивают о.в.п. с -400 мв в интактных микросомах до -355 и -310 мв соответственно, а дезоксихолат, наоборот, снижает потенциал до -440 мв.

В связи с этим важно отметить, что как мочевина, так и дезоксихолат переводят форму P-450 в форму P-420, но при обработке дезоксихолатом цитохром остается в низкоспиновом состоянии, а в случае мочевины становится высокоспиновым (¹). При образовании комплексов с неполярными субстратами цитохром P-450 также частично переходит в высокоспиновую форму (²).

На основании ряда данных, полученных к настоящему времени, можно считать, что причиной низкоспинового состояния цитохрома P-450 служит связывание атомов железа гемовой группы с каким-то серусодержащим лигандом, природа которого пока не выяснена (^{3, 10}). Что касается длинноволнового сдвига полосы Core карбонильного производного цитохрома P-450, то он, как показывают соответствующие модельные эксперименты, может быть обусловлен образованием стабилизированных гидрофобными связями молекулярных комплексов между порфирином и соединениями с делокализованными л-электронами (^{11, 12}). Это могут быть, например, ароматические аминокислотные остатки белковой части цитохрома или какие-либо неидентифицированные пока соединения с сопряженными связями.

Удаление от гемовой группы как серусодержащего участка (т. е. содержащего серусодержащий лиганд), так и «ароматического» участка (т. е. содержащего ароматические аминокислоты или другие сопряженные системы, вызывающие длинноволновый сдвиг полосы Core) должно уменьшать структурные препятствия для связанной с гемом изонитридной метки и, таким образом, увеличивать частоту ее молекулярного вращения. С другой стороны, при удалении серусодержащего лиганда следует ожидать увеличения электронной плотности на атоме железа и, следовательно, увеличения о.в.п. цитохрома. Отделение же от железопорфириновой группы «ароматического» участка при сохранении связи атома железа с серусодержащим лигандом может изменить о.в.п. цитохрома в противоположном направлении.

Эти предположения дают естественное объяснение полученным в настоящей работе результатам. Дезоксихолат, будучи детергентом, разрушает гидрофобные связи между порфирином и ароматическим участком, не нарушая существенным образом взаимодействия гемового железа с серным лигандом. В результате форма P-450 переходит в форму P-420, несколько уменьшается о.в.п. цитохрома и увеличивается подвижность связанной с гемом метки I. При взаимодействии же с гидроксильруемым субстратом цитохром P-450, по-видимому, претерпевает конформационный переход, сопровождающийся некоторым отдалением серного участка от гемовой группы. Это приводит к частичному переходу цитохрома P-450 в высокоспиновое состояние (³) и, как показано в данной работе, повышает о.в.п. цитохрома, наряду с увеличением молекулярной подвижности метки I. Мочевина, денатурирующая и «разворачивающая» белковую молекулу, в значительно большей мере, чем гидроксильруемый субстрат, отдаляет серусодержащий лиганд от гема и, соответственно, в большей степени повышает как о.в.п. цитохрома P-450, так и подвижность связанной с гемом I.

Увеличение о.в.п. цитохрома P-450 при связывании с гидроксильруемым субстратом представляет большой интерес с точки зрения регуляции дыхательной цепи микросом. Благодаря этому цитохром P-450 обладает достаточно высоким о.в.п., необходимым для эффективного окисления предшествующих электронных переносчиков, только в присутствии гидроксильруемого субстрата, чем, в известной мере, предотвращается «холодное» дыхание без осуществления гидроксильрования. Таким образом,

способность цитохрома Р-450 к конформационным переходам, связанным с изменением его о.в.п., позволяет объяснить на молекулярном уровне механизм «дыхательного контроля» в микросомальной дыхательной цепи.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. М. Маслова, Л. М. Райхман, В. П. Скулачев, Усп. совр. биол., 67, 3, 400 (1969). ² М. Р. Борукаева, Л. М. Райхман и др., ДАН, 189, 3, 651 (1969). ³ Б. Анпаев, В. П. Иванов и др., Изв. АН СССР, сер. химич., 1971, № 12. ⁴ Н. Nishibayashi, T. Omura, R. Sato, Biochim. et Biophys. acta, 118, 3, 651 (1966). ⁵ Y. Ichikawa, T. Yamano, Biochim. et Biophys. acta, 153, 4, 753 (1968). ⁶ T. J. Stone, T. Buchman et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 4, 1010 (1965). ⁷ T. Omura, R. Sato, J. Biol. Chem., 239, 9, 2370 (1964). ⁸ M. R. Waterman, H. S. Mason, Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 3, 450 (1970). ⁹ R. Tsai, C. A. Yu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 66, 4, 1157 (1970). ¹⁰ H. A. O. Hill, A. Roder, R. J. P. Williams, Biochem. J., 115, 5, 59 (1969). ¹¹ Y. Imai, R. Sato, J. Biochem. (Tokyo), 64, 2, 147 (1968). ¹² C. R. E. Jefcoate, J. A. Gaylor, J. Am. Chem. Soc., 91, 16, 4610 (1969).