

УДК 577.158.8

БИОХИМИЯ

М. В. РАЙХИНШТЕЙН, С. С. МЕЛИК-САРКИСЯН, А. И. АРЧАКОВ,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЦИТОХРОМА Р-450
ИЗ БАКТЕРОИДОВ КЛУБЕНЬКОВ ЛЮПИНА**

Известно, что в бактероидах, симбиотической форме клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, содержится растворимый аутооксидабельный цитохром Р-450_{Rh}* (¹, ²). Цитохром Р-450_{Rh} изучен мало и функции его неизвестны, поэтому представлялось интересным сравнить спектральные свойства цитохрома Р-450_{Rh} со свойствами цитохромов Р-450 других объектов. Такое сравнение может облегчить выяснение функций цитохрома Р-450_{Rh} в азотфикссирующих бактероидах. Цитохром Р-450 микросом печени участвует в гидроксилировании чужеродных соединений и стероидов, в реакциях восстановления азо- и нитросоединений и, возможно, в перекисном окислении ненасыщенных жирных кислот (³).

Интересной особенностью микросомального цитохрома Р-450 является его способность давать характерные спектры с веществами, в метаболизме которых он принимает участие. При этом имеют место спектральные изменения двух типов (⁴). Дифференциальный спектр типа I характеризуется максимумом поглощения при 380–390 нм и минимумом при 420–

Таблица 1

Дифференциальный спектр (цитохром Р-450 связанный минус
цитохром Р-450 свободный)

Вещество	Тип спектра	Максимум поглощения, нм		Минимум поглощения, нм		K_s , мМ		$\Delta A_{max} \cdot 10^{-3}$	
		бактероиды	микросомы	бактероиды	микросомы	бактероиды	микросомы	бактероиды	микросомы
Диметиланилин	I	588	385	422	425	5,88	0,443	19,5	12,1
Гексобарбитал	I	384	389	430	423	1,11	0,039	55,7	11,4
D(+) - камфора	I	285	390	425	420	1,61	0,044	25,6	17,6
SKF-525 А	I	382	388	428	420	0,31	0,001	38,6	26,7
Анаплин	II	427	430	402	395	18,00	1,000	55,1	21,9
Метирапон	II	429	425	400	395	3,70	0,079	196,6	40,8

П р и м е ч а н и е. В кюветы помещали 6,62 нмоля цитохрома Р-450_{Rh} или 5,43 нмоля цитохрома Р-450 микросом печени в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0. В случае комплексов, имеющих две K_s , приводятся величины K_s найденные при концентрации субстратов 10^{-4} – 10^{-2} М для цитохрома Р-450_{Rh} и 10^{-5} – 10^{-3} М для цитохрома Р-450 микросом печени.

425 нм, спектр типа II – максимумом в области 420–430 нм и минимумом при 380–390 нм. В отличие от микросомального, цитохромы Р-450 других объектов специфичны по отношению к связываемым субстратам. Так, растворимый цитохром Р-450_{cam} *Pseudomonas putida* из всех соединений, вызывающих спектральные изменения типа I, связывает и гидроксилирует только D(+) - камфору (⁵), а цитохром Р-450 митохондрий коры надпочечников дает спектры такого типа только со стероидами (⁶).

* Цитохром Р-450 бактероидов мы будем называть цитохромом Р-450_{Rh} (*Rhizobium*) в отличие от цитохромов Р-450 других объектов.

В настоящей работе сравниваются спектральные свойства цитохрома P-450_{Rh} бактероидов люпина со свойствами цитохрома P-450 микросом печени крысы.

Бактероиды из клубеньков полевых растений *Lupinus luteus L.*, находившихся в стадии бутонизации, выделяли аэробно при 4°. Среда для выделения содержала 0,3 M сахарозу, 1% поливинил-пирролидон, 0,2 M аскорбат натрия и 10⁻³ M Mg²⁺ в 0,1 M К-фосфатном буфере, pH 7,0. Для получения растворимой фракции бактероиды разрушали в прессе Итона при -40° и давления 80–100 атм и центрифугировали 1 час при 144 000 g. Концентрация цитохрома P-450_{Rh} в центрифугате составляла 0,027 нмоля на 1 мг белка.

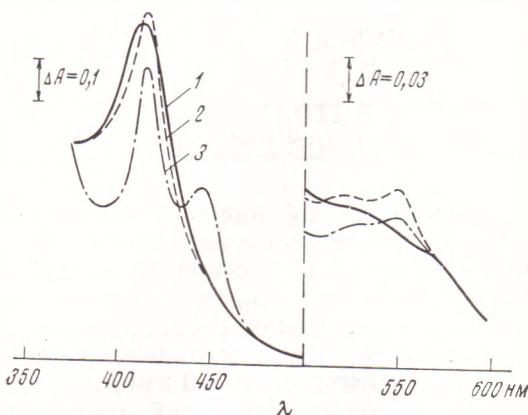


Рис. 1. Абсолютные спектры 2,21 μM цитохрома P-450_{Rh} в 0,1 M фосфатном буфере, pH 7,0. 1 – окисленный, 2 – восстановленный дитионитом, 3 – восстановленный + CO

кулярной массой отделяли гель-фильтрацией через биогель P-30, 100–200 меш фирмы «Био-Ред». Дальнейшую очистку проводили путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюзоде ДЕ-52 фирмы «Ватман». Фракцию, содержащую цитохром P-450_{Rh} (0,410 нмоля на 1 мг белка) и следы цитохромов C₅₅₂ и P-420, элюировали при ионной силе 0,12–0,15 линейным градиентом (0,01 M фосфат + 0,5 M NaCl/0,01 M фосфат) при pH 7,0. Фракцию микросом печени крыс получали, как описано ранее (7).

Спектрофотометрические измерения проводили на дифференциальном спектрофотометре «Hitachi-356». При расчетах использовали $\Delta\epsilon_{mm}$ -87 для цитохрома P-450_{Rh} (1) и $\Delta\epsilon_{mm}$ =91 для цитохрома P-450 микросом печени (8). Спектральную константу диссоциации K_s (т. е. концентрацию субстрата, при которой спектральные изменения достигают половины максимально возможных) и величину ΔA_{max} (наибольшую сумму высот пика и провала на дифференциальном спектре 1 mM цитохром P-450, выраженную в единицах оптической плотности) рассчитывали по Лайнуверу и Берку (9).

На рис. 1 приведены абсолютные спектры поглощения цитохрома P-450_{Rh} бактероидов люпина. Спектры окисленной и восстановленной форм мало отличаются друг от друга, так же как и у микросомального цитохрома P-450 (8). На спектре восстановленного в присутствии CO цитохрома P-450_{Rh} видна обычная для цитохромов этой группы полоса поглощения около 450 нм. Подобные спектры получал Эпплби (1) с цитохромом P-450_{Rh}, выделенным из бактероидов сои. Как видно из табл. 1, цитохром P-450 способен связывать субстраты (диметиланилин, гексобарбитал, анилин) и ингибиторы (SKF-525 A, метирапон) микросомального гидроксилирования. При этом наблюдаются спектральные изменения типа I и типа II. Кроме того, цитохром P-450_{Rh}, как и цитохром P-450 микросом, связывает гидроксилируемую цитохромом P-450_{camD}(+)-камфору.

Таким образом, по субстратной специфичности цитохром P-450_{Rh} бактероидов люпина напоминает микросомальный цитохром P-450, поскольку он дает спектральные изменения типа I с диметиланилином и гексобар-

биталом, тогда как цитохром P-450_{cam} и цитохром P-450 митохондрий коры надпочечников эти вещества не связывают и не гидроксилируют (5, 6). Расположение максимумов и минимумов на дифференциальных спектрах цитохрома P-450_{Rh} со всеми изученными субстратами и ингибиторами близко к их расположению на спектрах микросомального цитохрома P-450. K_s комплексов, образованных цитохромом P-450_{Rh}, значительно превышают K_s комплексов соответствующих веществ с микросомальным цитохромом P-450. Величины ΔA_{\max} также были больше в случае цитохрома P-450_{Rh}.

Комплекс восстановленного цитохрома P-450 микросом печени с этилизоцианидом характеризуется двумя максимумами в области полосы Соре, при 455 нм и 430 нм; соотношение высот этих пиков зависит от pH и ионной силы раствора (8). Выделенный Эпплби из бактериоидов сои цитохром P-450_{Rh} также давал с этилизоцианидом две полосы поглощения (453 нм и 428 нм), интенсивность которых зависела от pH (1). Восстановленный цитохром P-450_{cam} давал с этилизоцианидом только один пик 453 нм (10). На рис. 2 приведен этилизоцианидный спектр цитохрома P-450_{Rh} бактериоидов люпина. Расположение максимумов поглощения близко к таковому у микросомального цитохрома P-450_{Rh} бактериоидов сои. $K_s=19,6 \text{ M}$ при pH 7,0. При повышении pH поглощение при 456 нм увеличивалось, а при 427 нм уменьшалось.

Проведенная работа дает основания утверждать, что по спектральным свойствам цитохром P-450_{Rh} ближе к связанному с мембранами цитохрому P-450 эндоплазматического ретикулума печени, чем к растворимому бактериальному цитохрому P-450_{cam}. Однако нам не удалось обнаружить гидроксилирование диметиланилина и анилина и деметилирование диметиланилина супензией целых или разрушенных бактериоидов, пользуясь описанным ранее методом (7), с сукцинатом натрия, НАД-Н, и НАДФ-Н в качестве доноров водорода и электронов.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Второй Московский государственный медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
6 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 C. A. Appleby, In: *Structure and Function of Cytochromes*, Tokio, 1968, p. 666.
- 2 В. Л. Кретович, С. С. Мелик-Саркисян, В. К. Матус, Биохимия, т. 37, 711 (1972).
- 3 А. И. Арчаков, Усп. биол. хим., т. 12, 136 (1971).
- 4 H. Remmer, J. Schenkman et al., *Molec. Pharmacol.*, v. 2, 187 (1966).
- 5 I. C. Gunsalus, *Hoppe-Seyler's Zs., Physiol. Chem.*, B. 349, 1610 (1969).
- 6 W. Cammer, R. W. Estabrook, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 122, 721 (1967).
- 7 A. I. Archakov, I. I. Karuzina et al., *Biochem. J.*, v. 136, 371 (1973).
- 8 T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, v. 239, 2370 (1964).
- 9 М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, Лондон, 1966, стр. 66.
- 10 B. Griffin, J. A. Peterson, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 145, 220 (1971).

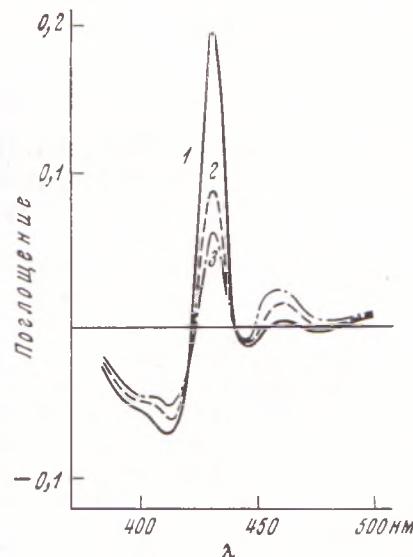


Рис. 2. Дифференциальные спектры 1,10 μM цитохрома P-450_{Rh} (восстановленный плюс 240 μM этилизоцианид минус восстановленный) в 0,1 M фосфатном буфере. 1 — pH 7,1, 2 — pH 8,0, 3 — pH 8,4