

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 бактериоидах, симбиотической форме клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, содержится растворимый аутооксидабельный цитохром Р-450<sub>Rh</sub>\* (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Цитохром Р-450<sub>Rh</sub> изучен мало и функции его неизвестны, поэтому представлялось интересным сравнить спектральные свойства цитохрома Р-450<sub>Rh</sub> со свойствами цитохромов Р-450 других объектов. Такое сравнение может облегчить выяснение функций цитохрома Р-450<sub>Rh</sub> в азотфиксирующих бактериоидах. Цитохром Р-450 микросом печени участвует в гидроксилировании чужеродных соединений и стероидов, в реакциях восстановления азо- и нитросоединений и, возможно, в переносе окисления ненасыщенных жирных кислот (<sup>3</sup>).

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 (<sup>4</sup>). 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 <sub>s</sub> , мМ		ΔA <sub>max</sub> ·10 <sup>-3</sup>	
		бактериоиды	микросомы	бактериоиды	микросомы	бактериоиды	микросомы	бактериоиды	микросомы
Диметиланилин	I	388	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	385	390	425	420	1,61	0,044	25,6	17,6
SKF-525 A	I	382	388	428	420	0,31	0,001	38,6	26,7
Анилин	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

Примечание. В кюветы помещали 6,62 нмоля цитохрома Р-450<sub>Rh</sub> или 5,43 нмоля цитохрома Р-450 микросом печени в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,0. В случае комплексов, имеющих две K<sub>s</sub>, приводятся величины K<sub>s</sub> найденные при концентрации субстратов 10<sup>-4</sup>–10<sup>-2</sup> М для цитохрома Р-450<sub>Rh</sub> и 10<sup>-5</sup>–10<sup>-3</sup> 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<sub>cam</sub> *Pseudomonas putida* из всех соединений, вызывающих спектральные изменения типа I, связывает и гидроксилирует только D(+)-камфору (<sup>5</sup>), а цитохром Р-450 митохондрий коры надпочечников дает спектры такого типа только со стероидами (<sup>6</sup>).

\* Цитохром Р-450 бактериоидов мы будем называть цитохромом Р-450<sub>Rh</sub> (*Rhizobium*) в отличие от цитохромов Р-450 других объектов.

В настоящей работе сравниваются спектральные свойства цитохрома P-450<sub>Rh</sub> бактериоидов люпина со свойствами цитохрома P-450 микросом печени крысы.

Бактериоиды из клубеньков полевых растений *Lupinus luteus* L., находившихся в стадии бутонизации, выделяли аэробно при 4°. Среда для выделения содержала 0,3 M

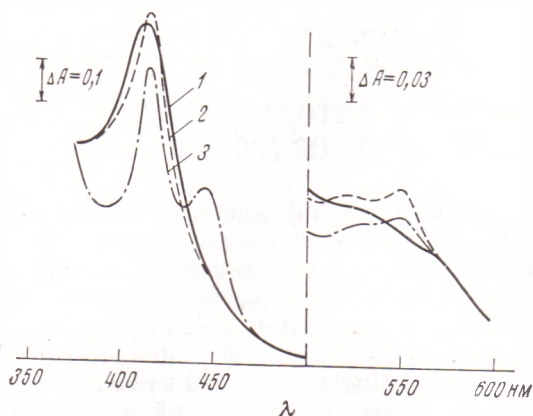


Рис. 1. Абсолютные спектры 2,21  $\mu$ M цитохрома P-450<sub>Rh</sub> в 0,1 M фосфатном буфере, pH 7,0. 1 — окисленный, 2 — восстановленный дитионитом, 3 — восстановленный + SO

сахарозу, 1% поливинилпирролидон, 0,2 M аскорбат натрия и  $10^{-3}$  M  $Mg^{2+}$  в 0,1 M К-фосфатном буфере, pH 7,0. Для получения растворимой фракции бактериоиды разрушали в прессе Итона при  $-40^\circ$  и давления 80–100 атм и центрифугировали 1 час при 144 000 g. Концентрация цитохрома P-450<sub>Rh</sub> в центрифугате составляла 0,027 нмоля на 1 мг белка.

При высаливании сульфатом аммония цитохром P-450<sub>Rh</sub> попадал во фракцию белков, осаждающихся при 35–60% насыщения. Низкомолекулярные вещества и белки с небольшой моле-

кулярной массой отделяли гель-фильтрацией через биогель P-30, 100–200 меш фирмы «Био-Ред». Дальнейшую очистку проводили путем хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе DE-52 фирмы «Ватман». Фракцию, содержащую цитохром P-450<sub>Rh</sub> (0,410 нмоля на 1 мг белка) и следы цитохромов C<sub>552</sub> 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  $\Delta\epsilon_{\text{мм}}=87$  для цитохрома P-450<sub>Rh</sub> (1) и  $\Delta\epsilon_{\text{мм}}=91$  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  $\Delta A_{\text{max}}$  (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<sub>Rh</sub> бактериоидов 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 SO цитохрома P-450<sub>Rh</sub> видна обычная для цитохромов этой группы полоса поглощения около 450 нм. Подобные спектры получал Эпплби (1) с цитохромом P-450<sub>Rh</sub>, выделенным из бактериоидов сои. Как видно из табл. 1, цитохром P-450 способен связывать субстраты (диметиланплиц, гексобарбитал, анилин) и ингибиторы (SKF-525 A, метирапон) микросомального гидроксирования. При этом наблюдаются спектральные изменения типа I и типа II. Кроме того, цитохром P-450<sub>Rh</sub>, как и цитохром P-450 микросом, связывает гидроксильруемую цитохромом P-450<sub>cam</sub>D(+)-камфору.

Таким образом, по субстратной специфичности цитохром P-450<sub>Rh</sub> бактериоидов люпина напоминает микросомальный цитохром P-450, поскольку он дает спектральные изменения типа I с диметиланилином и гексобар-

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

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 (<sup>8</sup>). Выделенный Энпльби из бактериоидов сои цитохром P-450<sub>Rh</sub> также давал с этилизоцианидом две полосы поглощения (453 нм и 428 нм), интенсивность которых зависела от pH (<sup>1</sup>). Восстановленный цитохром P-450<sub>cam</sub> давал с этилизоцианидом только один пик 453 нм (<sup>10</sup>). На рис. 2 приведен этилизоцианидный спектр цитохрома P-450<sub>Rh</sub> бактериоидов люпина. Расположение максимумов поглощения близко к таковому у микросомального цитохрома P-450 и цитохрома P-450<sub>Rh</sub> бактериоидов сои.  $K_s = 19,6$  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<sub>Rh</sub> ближе к связанному с мембранами цитохрому P-450 эндоплазматического ретикулума печени, чем к растворимому бактериальному цитохрому P-450<sub>cam</sub>. Однако нам не удалось обнаружить гидроксирование диметиланилина и анилина и деметилирование диметиланилина суспензией целых или разрушенных бактериоидов, пользуясь описанным ранее методом (<sup>7</sup>), с сукцинатом натрия, НАД-Н, и НАДФ-Н в качестве доноров водорода и электронов.

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

Поступило  
6 II 1974

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

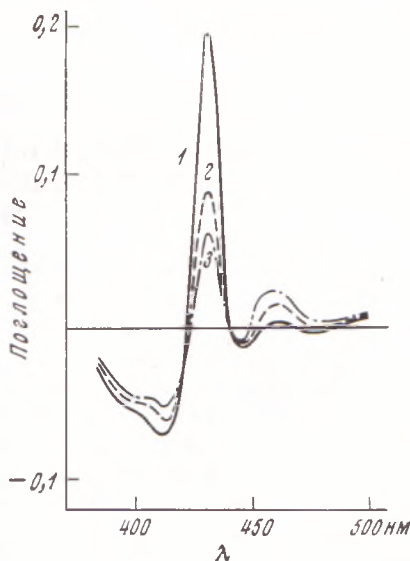


Рис. 2. Дифференциальные спектры 1,10  $\mu$ M цитохрома P-450<sub>Rh</sub> (восстановленный плюс 240  $\mu$ M этилизоцианид минус восстановленный) в 0,1 M фосфатном буфере. 1 — pH 7,1, 2 — pH 8,0, 3 — pH 8,4

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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