



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5:577.152.1

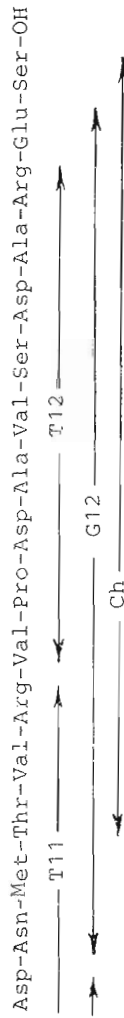
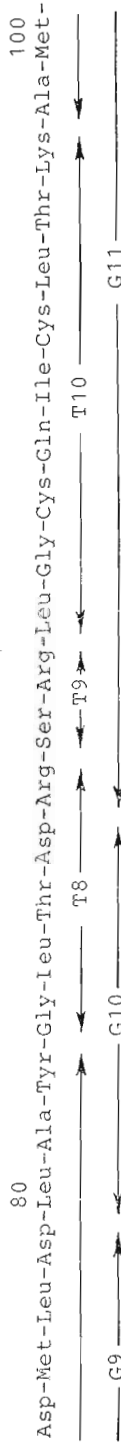
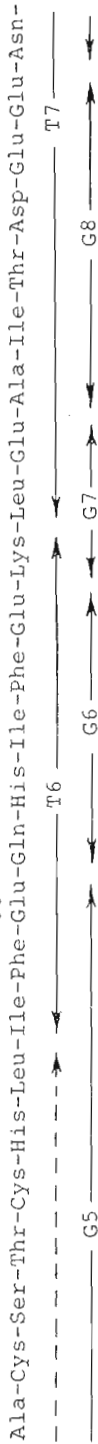
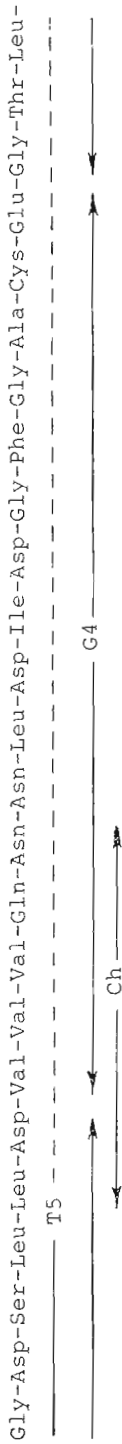
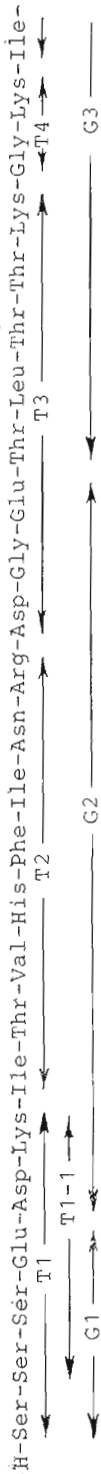
ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ГЕПАТОРЕДОКСИНА
ИЗ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ БЫКАЧащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б.,
Кириллова Н. М., Лапко А. Г., Ахреж А. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Митохондриальные стероидгидроксилирующие системы, состоящие из трех компонентов (NADPH-зависимого флавопротеида — ферредоксин-редуктазы, [2Fe—2S]-ферредоксина и цитохрома P-450), присутствуют в ряде органов млекопитающих. Однако до настоящего времени достаточно хорошо изучены лишь мембраносвязанные мультиферментные комплексы митохондрий коры надпочечников, ответственные за расщепление боковой цепи холестерина и 11 β -гидроксилирование стероидов [1, 2]. В митохондриях печени млекопитающих содержится стероидгидроксилирующий ферментный комплекс, осуществляющий одну из стадий биосинтеза желчных кислот. В последнее время появились сообщения [3—5] о выделении в очищенном виде компонентов этого комплекса. Установлено, что C27-стероидгидроксилазная активность комплекса существенно не изменяется при замене [2Fe—2S]-белка митохондрий печени (гепаторедоксина) на [2Fe—2S]-компонент митохондрий коры надпочечников (адренодоксин), что предполагает определенную гомологию в строении обоих белков [6]. Целью данной работы являлось определение первичной структуры гепаторедоксина из митохондрий печени быка.

Гепаторедоксин с молекулярной массой 12,5 кДа (спектрофотометрический индекс A_{411}/A_{280} 0,83) получали согласно методу [6]. С целью определения аминокислотной последовательности проводили гидролиз карбоксиметилированного гепаторедоксина (СМ-Гд) трипсином и протеиназой из *Staphylococcus aureus*. Выделение индивидуальных пептидов осуществляли гель-хроматографией на биоэле Р-30 в 0,2 М NH_4HCO_3 , рН 7,8 (для триптического гидролизата) и биоэле Р-4 в 50% уксусной кислоте (для гидролизата СМ-Гд протеиназой из *St. aureus*) с последующей ВЭЖХ полученных фракций на колонке с Ultrasphere ODS (5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 40% в 0,1% трифторуксусной кислоте. На заключительном этапе работы был осуществлен химотриптический гидролиз СМ-Гд с выделением необходимых пептидов гель-хроматографией на биоэле Р-4 в 50% уксусной кислоте с последующей ВЭЖХ. Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали ручным вариантом метода Эдмана [7, 8], в ряде случаев дополнительно использовали карбоксипептидазы А, В, Y. Реконструкция полной аминокислотной последовательности гепаторедоксина приведена на рисунке. Пептиды G4 и G5 расположены в полипептидной цепи гепаторедоксина последовательно друг за другом на основании данных анализа аминокислотного состава пептида T5, составными частями которого они являются, а также по аналогии с их расположением в адренодоксине быка [9].

Результаты нашей работы показывают практически полную идентичность первичных структур гепаторедоксина (рисунок) и адренодоксина [9], и, следовательно, вполне вероятно, что эти два белка являются продуктами одного и того же структурного гена. В связи с этим следует



Полная аминокислотная последовательность генаторедоксина из митохондрий почки быка. Пептиды, полученные при гидролизе СМ-Гх трипсином (Т), протеиназой из *St. aureus* (G), химотрипсином (Ch)

отметить, что в почках, печени и желтом теле яичника крупного рогатого скота недавно были обнаружены ДНК-транскрипты, которые гибридизовались с кДНК, соответствующей транслируемой области мРНК адренодоксина быка [10].

Исходя из приведенных данных, можно предположить, что для митохондриальных стероидгидроксилирующих систем из различных органов ферредоксиновым компонентом является один и тот же [2Fe—2S]-белок, а отличия в субстратной специфичности обеспечиваются цитохромом P-450. Так как наличие комплексобразования между электронтранспортным белком и гемопротеидом необходимо для функционирования митохондриальных стероидных гидроксилаз, по-видимому, в молекулах различных по субстратной специфичности цитохромов P-450 имеются консервативные участки аминокислотной последовательности, отвечающие за биоспецифическое взаимодействие с электронтранспортным белком.

Аминокислотная последовательность адренодоксина быка, предсказанная исходя из данных по нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК [10], содержит по сравнению с первичными структурами гепаторедоксина (рисунок) и адренодоксина быка [9], установленными методами химии белка, дополнительную С-концевую последовательность из 11 аминокислотных остатков (—Phe-Asp-Met-Gly-Met-Asn-Ser-Lys-Pe¹¹⁸-Glu [10]). По-видимому, этот участок аминокислотной последовательности как в случае адренодоксина, так и в случае гепаторедоксина удаляется протеолитически в процессе выделения белков в результате расщепления пептидной связи Ser¹¹⁷-Phe¹¹⁸.

Нами установлена также частичная протеолитическая модификация в N-концевой части гепаторедоксина по пептидной связи Ser²-Ser³. Аналогичные данные были получены по N- и С-концевым аминокислотным последовательностям при изучении первичной структуры адренодоксина из митохондрий коры надпочечников свиньи [11].

Во время подготовки материалов данной работы к печати появилось сообщение [12], в котором приводится N-концевая аминокислотная последовательность гепаторедоксина быка: Xaa-Val-Arg-Lys-Phe-Thr-Glu-Lys-His-Glu-Xaa-Val-Thr-Thr-. Эти данные, однако, принципиально отличаются от полученных нами результатов.

Авторы выражают благодарность М. В. Будрис и Л. Г. Мартинович за проведение ряда экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akhrem A. A., Lapko A. G., Lapko V. N., Schkumatov V. M., Chashchin V. L. *Acta biol. med. Germ.*, 1979, v. 38, № 2-3, p. 257-273.
2. Марцев С. П., Чащин В. Л., Ахрем А. А. *Биохимия*, 1982, т. 47, № 7, с. 1070-1083.
3. Pedersen J. I., Oftebro H., Vanngard T. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 76, № 3, p. 666-673.
4. Pedersen J. I., Godager H. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 525, № 1, p. 28-36.
5. Oftebro H., Saarem K., Bjorkhem I., Pedersen J. I. *J. Lipid Res.*, 1981, v. 22, № 8, p. 1254-1264.
6. Гулевич С. И., Гурьев О. Л., Шкуматов В. М., Чащин В. Л., Ахрем А. А. *Биохимия*, 1985, т. 50, № 8, с. 1342-1349.
7. Bruton C. J., Hartley B. C. *J. Mol. Biol.*, 1970, v. 52, № 2, p. 165-178.
8. Roseau G., Pantel P. *J. Chromatogr.*, 1969, v. 44, № 2, p. 392-395.
9. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. *T. J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 4, p. 1141-1157.
10. Okamura T., John M. E., Zuber M. X., Simpson E. R., Waterman M. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, v. 82, № 17, p. 5705-5709.
11. Ахрем А. А., Лапко А. Г., Лапко В. Н., Чащин В. Л. *Блюорган. химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 462-475.
12. Waki N., Hiwatashi A., Ichikawa Y. *FEBS Lett.*, 1986, v. 195, № 1, p. 87-91.

Поступило в редакцию
27.II.1986.

THE PRIMARY STRUCTURE OF HEPATOREDOXIN FROM BOVINE LIVER MITOCHONDRIA

CHASHCHIN V. L., LAPKO V. N., ADAMOVICH T. B., KIRILLOVA N. M.,
LAPKO A. G., AKHREM A. A.

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

The primary structure of heptatoredoxin from bovine liver mitochondria was established. It consists of 117 amino acid residues. The identity of the amino acid sequences of bovine heptatoredoxin and adrenodoxin from bovine adrenal cortex mitochondria was shown. It is assumed that the role of a ferredoxin component in mitochondrial steroid-hydroxylating systems from different organs is played by the same [2Fe-2S]-protein.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.06.86 Подписано к печати 30.07.86 Т-14845 Формат бумаги 70×108^{1/4},
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 10,9 тыс. Уч.-изд. л. 14,4 Бум. л. 4,5
Тираж 905 Зак. 2701

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6