



УДК 577.1 + 547.963

**БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ЦИТОХРОМА P-450
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ
НА АДРЕНОДОКСИН-СЕФАРОЗЕ***Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л.**Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

В ряде работ по изучению $20\alpha, (22R)$ -холестерингидроксилирующей системы из митохондрий коры надпочечников было показано, что для проявления функциональной активности указанной системы необходимо образование комплекса между двумя белковыми компонентами: NADPH-зависимой флавопротеидредуктазой (аденодоксинредуктазой) и железосодержащим белком (аденодоксином) [1, 2].

Однако нерешенным оставался вопрос о комплексообразовании третьего компонента — терминальной оксидазы холестерина цитохрома P-450 с первыми двумя. Необходимо отметить, что для митохондриальных цитохромов P-450, осуществляющих гидроксилирование холестерина, дезоксикортикостерона и кортикостерона [3—5], необходима одна электрон-транспортная цепь, состоящая из аденодоксинредуктазы и аденодоксина. Ранее предпринятые попытки получить комплекс аденодоксина с цитохромом P-450 оказались безуспешными [1]. В настоящей работе нами сообщается о получении комплекса цитохрома P-450 с аденодоксином, иммобилизованным на сефарозе. Полученные при этом данные позволили предложить метод выделения $20\alpha, (22R)$ -холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 в высокоочищенном виде практически в одну стадию.

На рис. 1 приведен график насыщения аденодоксин-сефарозы цитохромом P-450, выделенным по модифицированной методике [6]. Емкость сорбента по цитохрому P-450 в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 10^{-4} М дитиотреит и 10^{-4} М EDTA (исходный буфер), составляла 15,9 нмоль цитохрома на 165 нмоль иммобилизованного аденодоксина. Из рис. 2 видно, что повышение ионной силы исходного буфера до 1 М KCl приводило к освобождению лишь 36 % связанного с аденодоксин-сефарозой цитохрома P-450. Увеличение концентрации детергента — натриевой соли холиевой кислоты (холата натрия) в исходном буфере до 0,4 % (вес/объем) также не дает полного освобождения цитохрома P-450. Лишь при использовании исходного буфера с высокой ионной силой (1 М KCl), содержащего 0,4 % (вес/объем) холата натрия, удалось достигнуть полной десорбции цитохрома P-450 с аденодоксин-сефарозы. Эти результаты позволили предложить схему выделения на аденодоксин-сефарозе высокоочищенного цитохрома P-450.

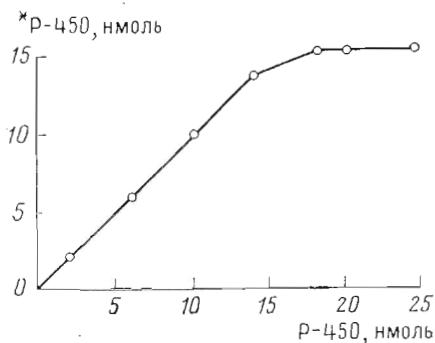


Рис. 1

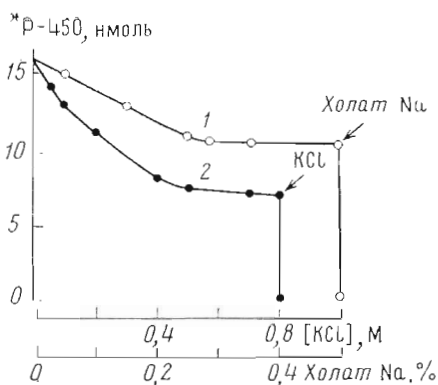


Рис. 2

Рис. 1. Насыщение адренодоксин-сефарозы (165 нмоль иммобилизованного адренодоксина) цитохромом P-450. *P-450 — связанный цитохром P-450, P-450 — добавленный

Рис. 2. Зависимость количества связанного с адренодоксин-сефарозой цитохрома P-450 от ионной силы (1) и концентрации детергента (2). Стрелками указаны точки добавления KCl или холата Na (конечные концентрации 1 M и 0,4% соответственно), приводящие к полной десорбции цитохрома P-450

Адренодоксин-сефарозу готовили по способу, о котором мы ранее сообщали [7]. Полученный сорбент содержал не менее 330 нмоль адренодоксина на 1 мл осажденного при 2000 об/мин геля сефарозы. Содержание белка определяли по методу Лоури [8] и биуретовым методом [9]. Количественное содержание цитохрома P-450 оценивали спектрофотометрически по поглощению комплекса восстановленного цитохрома с CO [10].

Сульфат-аммонийную фракцию (400 нмоль цитохрома P-450, удельное содержание 1,5 нмоль/мг белка) получали согласно работе [6], растворяли в 10 мл исходного буфера и обессоливали на колонке (2,5 × 35 см) с сефадексом G-50 в том же буфере. Обессоленный препарат центрифугировали 30 мин при 50 000g и супернатант (40 мл) наносили на колонку (1,5 × 10 см) с адренодоксин-сефарозой. Колонку для удаления сопутствующих белков промывали 100 мл исходного буфера, содержащего 0,5 M KCl, а цитохром P-450 элюировали этим же буфером, содержащим 1 M KCl и 0,4% холата натрия. Полученный белок концентрировали сульфатом аммония (40% от насыщения) и диализовали против исходного буфера.

Эта схема позволяет получать препаративные количества высокоочищенного цитохрома P-450 (спектрофотометрический индекс чистоты D_{391}/D_{280} 0,75, удельное содержание 13,5 нмоль/мг белка) практически в одну стадию. Выделенный цитохром P-450 был свободен от своей денатурированной формы — цитохрома P-420 и находился в комплексе с субстратом — холестерином.

Таким образом, показано образование высокоспецифичного комплекса между цитохромом P-450 и адренодоксином. Полученные данные позволяют предположить, что процесс гидроксирования стероидных субстратов в митохондриях коры надпочечников осуществляется единым мультиферментным комплексом, состоящим из адренодоксинредуктазы, адренодоксина и цитохрома P-450.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chu J., Kimura T. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5183—5187.
2. Hiwatashi A., Ishikawa Y., Maruya N., Yamano T., Aki K. (1976) Biochemistry, 15, 3082—3090.
3. Simpson E. R., Boyd G. S. (1967) Eur. J. Biochem., 2, 275—285.
4. Wilson L. D., Harding B. W. (1970) Biochemistry, 9, 1615—1621.

5. Greengard P., Psychoyos S., Tallan H. H., Cooper D. Y., Rosental O., Estabrook R. W. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., 121, 298—303.
6. Takemori S., Suhara K., Hashimoto S., Hashimoto M., Sato H., Gomi T., Katagiri M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 63, 588—593.
7. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чашин В. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 780—786.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
9. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. (1949) J. Biol. Chem., 177, 751—766.
10. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2370—2378.

Поступило в редакцию
5.IX.1977

BIOSPECIFIC CHROMATOGRAPHY OF CYTOCHROME P-450 FROM ADRENOCORTICAL MITOCHONDRIA ON ADRENODOXIN-SEPHAROSE

AKHREM A. A., SHKUMATOV V. M., CHASHCHIN V. L.

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

A possibility of complexing adrenodoxin and cytochrome P-450, the components of mitochondrial steroidhydroxylating system, has been shown. The results obtained allowed a new method for isolating high purity cytochrome P-450 to be proposed.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишина*

Сдано в набор 24/XI-1977 г.	Т-00303	Подписано к печати 12/1-1978 г.	Тираж 845 экз.
Зак. 3066	Формат бумаги 70×108 ^{1/8}	Усл. печ. л. 12,6	Бум. л. 4,5
		Уч.-изд. л. 13,3	

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10