



УДК 577.1+547.963

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ  
И СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ 20S,  
22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА P-450  
ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКА**

*Ахрем А. А., Лапко В. Н., Лапко А. Г.,  
Шкуматов В. М., Чащин В. Л.*

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

Исследован субъединичный состав 20S, 22R-холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 из митохондрий коры надпочечников быка, приведены его физико-химические характеристики и данные структурного анализа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитохром P-450, вероятно, состоит из одной субъединицы.

Биосинтез кортикостероидных гормонов из холестерина в клетках коры надпочечников практически полностью сопряжен с процессом ферментативного гидроксилирования; только две стадии превращения  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -оксистероидов в  $\Delta^4$ -3-кетостероиды катализируются дегидрогеназой и изомеразой [1]. Гидроксилирующая система, отвечающая за превращение холестерина в прегненолон, локализована во внутренней мембране митохондрий, причем за субстратную специфичность, а также за присоединение и активацию молекулярного кислорода несет ответственность цитохром P-450 [2—5]. Следует отметить многостадийность этого процесса. Так, последовательное гидроксилирование молекулы холестерина приводит к промежуточному продукту ферментативной реакции — 20S, 22R-дихолестерину, который далее, с отщеплением боковой цепи, переходит в прегненолон [6]. Однако является ли цитохром P-450 белком, состоящим из одной или нескольких субъединиц, каждая из которых отвечает за отдельные этапы превращения холестерина в прегненолон, до сих пор неясно.

В настоящей работе приведены физико-химические и структурные характеристики 20S, 22R-холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 и на основании полученных данных высказаны предположения о механизме превращения холестерина в прегненолон.

Цитохром P-450 в гомогенном виде выделяли по предложенному нами ранее методу [7] с некоторыми модификациями. Используемый в работе цитохром P-450 имел спектрофотометрический индекс  $D_{393}/D_{280}$  0,85, а при его электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) выявлена только одна полоса. Аминокислотный состав цитохрома P-450 (см. табл. 1) не совпадает с данными, приведенными в работе [8]. Мы склонны считать правильными наши результаты, так как цитохром P-450, выделенный по методу [7], помимо других критериев его чистоты был гомогенен согласно определению N- и C-концевых аминокислот.

Молекулярный вес цитохрома P-450, определенный гель-электрофорезом в ДСН, составил 46 000, однако, по данным гель-хроматографии на сефадексе G-200 в 0,05 M натрий-фосфатном буфере (рН 7,2), его молекулярный вес достигает 400 000. Необходимо отметить, что ДСН помимо дез-

Таблица 1

Аминокислотный состав 20S,22R-холестерингидроксилирующего  
цитохрома P-450 из митохондрий коры надпочечников быка (M 46 000)

Аминокислота	Количество остатков	Литературные данные [8]		Аминокислота	Количество остатков	Литературные данные [8]	
		Фракция I	Фракция II			Фракция I	Фракция II
Asp+Asn	34,3	45,7	44,2	Ile	22,6	24,6	23,8
Thr	20,3	25,4	23,9	Leu	39,2	47,2	45,8
Ser	21,9	34,8	34,9	Tyr	14,2	20,6	18,6
Glu+Gln	45,4	54,4	52,5	Phe	22,9	24,9	25,8
Pro	23,2	25,2	25,3	His	9,9	11,0	11,3
Gly	20,4	34,9	34,0	Lys	24,3	29,4	30,1
Ala	19,0	32,3	31,2	Arg	21,7	24,8	23,5
Cys	3,4	2,9	3,8	Trp	8,1	4,8	4,7
Val	24,0	29,8	29,8	N-Концевая — Ile			
Met	8,3	7,4	6,7	C-Концевая — Ala			

Таблица 2

Превращение 20S,22R-холестерингидроксилирующего цитохрома  
P-450 в цитохром P-420 под действием детергентов  
в различных концентрациях \*

Детергент	Содержание цитохрома P-420 (%) при концентрации детергентов, %				
	0,05	0,1	0,2	0,5	1
Твин 60	6	6	7	18	20
Твин 80	3	4	4	4	4
Твин 40	6	8	8	18	22
Твин 20	10	15	20	20	20
Бридж 58	23	26	34	60	75
Бридж 35	34	40	49	85	90
Мирдж 59	38	42	42	75	90
Плуроник F 68	6	6	8	8	10
Плуроник L 64	6	6	10	10	10
Монфлор 51	6	6	20	30	30
Сурфиол 61	7	8	10	65	—
Поливиниловый спирт 25/140	6	5	6	10	10
Тритон X-100	25	30	30	35	30
Тритон X-405	15	30	60	70	75
Тритон WR-1339	10	20	20	20	20

\* Условия инактивации: 0,05 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,2), 30 мин, 20°. За 100% принято содержание P-450 в контрольном образце без детергента

агрегации цитохрома P-450 до мономерных форм переводит его в неактивную форму — цитохром P-420, а при больших избытках может приводить к удалению из активного центра цитохрома протогема IX. Возникает вопрос: возможно ли существование цитохрома P-450 в нативном состоянии в виде мономеров? Выяснение этого чрезвычайно важного вопроса в значительной мере облегчит изучение организации всей гидроксилирующей системы в целом в мембране митохондрий.

Нами были найдены условия дезагрегации цитохрома P-450, не оказывающие на него инактивирующего воздействия, т. е. исключают переход нативного цитохрома в цитохром P-420. Этот переход не имеет места в среде 1 М NaCl+0,3% холата натрия в 0,05 М натрий-фосфатном буфере [9]. Гель-хроматография цитохрома P-450 в этих условиях показала молекулярный вес 58 000. Завышенный молекулярный вес по сравнению

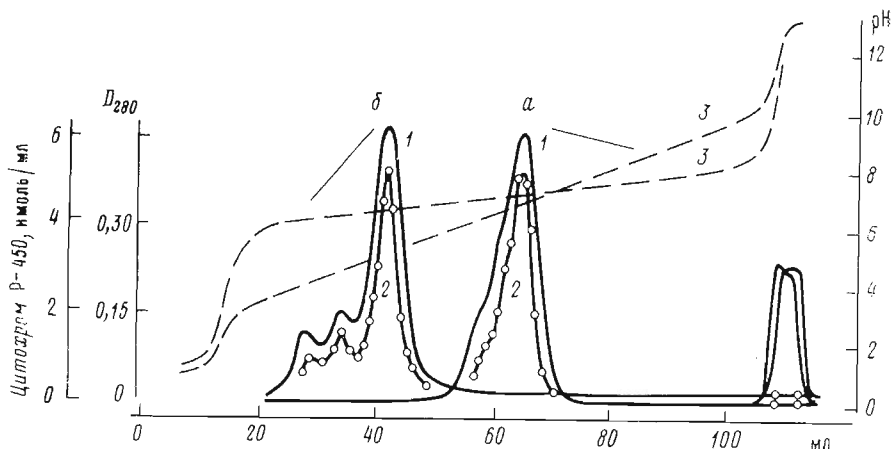


Рис. 1. Изоэлектрическое фокусирование 20S,22R-холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 в интервалах pH 3,5–10 (а) и 6–9 (б), 1 – поглощение при 280 нм, 2 – содержание цитохрома P-450 (нмоль/мл), 3 – градиент pH

с данными гель-электрофореза в ДСН мы объясняем тем, что цитохром P-450 элюировался в мономерной форме, связанной с большим числом молекул детергента. Помимо фракции цитохрома P-450 с молекулярным весом 58 000 выделен в количестве 10% от взятого в опыт белка агрегат цитохрома P-450 ( $M$  400 000).

Для выяснения субъединичного состава цитохрома P-450 мы использовали метод изоэлектрического фокусирования. Изоэлектрическое фокусирование цитохрома P-450 необходимо было проводить в условиях, исключающих агрегацию. Однако условия, описанные выше для гель-хроматографии цитохрома, в данном случае из-за высокой ионной силы были непригодны. Поэтому нами было изучено инактивирующее влияние на цитохром P-450 ряда неионных детергентов в зависимости от их концентрации. Полученные результаты представлены в табл. 2. Видно, что детергенты (бридж 35, бридж 58, мирдж 59, тритон X-405, сурфинол 61) оказывают сильное инактивирующее воздействие на цитохром P-450, в то время как твин 80, плуроник F 68, плуроник L 64, твин 20, твин 40, твин 60, поливиниловый спирт 25/140 оказались наиболее подходящими для наших целей.

Следующий этап работы заключался в оценке детергентов, обладающих наименьшим инактивирующим эффектом. Было установлено, что наиболее подходящим является твин 80 в концентрации 0,3%. При гель-хроматографии цитохрома P-450 на сефадексе G-200 в 0,05 M натрий-фосфатном буфере (pH 7,2), содержащем 0,3% твин 80, выделены устойчивые комплексы с молекулярным весом 115 000. В условиях эксперимента наблюдали также удаление холестерина из активного центра цитохрома P-450. Изоэлектрическое фокусирование цитохрома P-450 в столбиках полиакриламидного геля в присутствии твина 80 выявило одну полосу белка с  $pI$  6,8, в то время как изоэлектрическое фокусирование в отсутствие детергента показывает широкую диффузную полосу. Для дальнейшего анализа фокусируемой зоны нами было проведено изоэлектрическое фокусирование цитохрома P-450 на колонке (110 мл) как в градиенте плотности глицерина в интервале pH 3,5–10, так и в градиенте плотности сахарозы в интервале pH 6–9. При фокусировании цитохрома P-450 в интервале pH 3,5–10 (рис. 1а) наблюдались две зоны белка: одна при pH 6,7, вторая — на границе контакта рабочего объема колонки с электродным раствором, содержащим 1% NaOH. Спектральный анализ этих зон установил, что гем связан только с белком, находящимся в зоне при pH 6,7. N-Концевой анализ этих зон показал как в первом, так и во втором случае

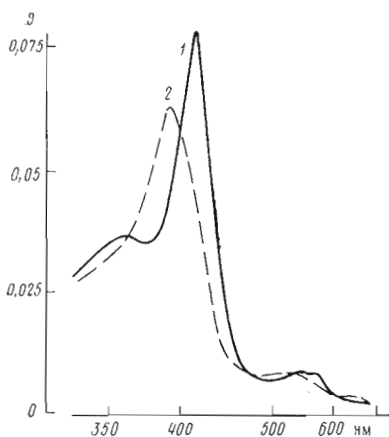


Рис. 2. Спектральные изменения, сопровождаемые образованием комплекса  $20S,22R$ -холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 с холестерином: спектр поглощения цитохрома P-450, свободного от субстрата (1) и обработанного 30-кратным избытком холестерина (2)

изолейцин. С увеличением времени фокусирования количество преципитата на границе контакта возрастает параллельно с исчезновением окрашенной зоны при pH 6,7. Все это свидетельствует о том, что преципитат является апоферментом, образующимся в результате диссоциации гемовой группы от молекулы цитохрома P-450 в процессе изоэлектрического фокусирования.

Недавно в работе [10] методом изоэлектрического фокусирования показано наличие в цитохроме P-450 двух субъединиц в эквимольном соотношении, одна из которых не содержала гем, причем эти субъединицы обладали различной электрофоретической подвижностью в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Наши данные не подтверждают этих результатов.

Интересные данные получены при фокусировании цитохрома P-450 при pH 6—9 (рис. 16) в градиенте сахарозы. Как и в предыдущем опыте, происходило образование значительных количеств (до 20%) преципитата в зоне контакта с электродным буфером, а зона нативного белка была представлена в виде трех полос с  $pI$  6,2 (5%), 6,4 (10%) и 6,62 (85%). Мы не считаем возможным без дополнительных исследований интерпретировать эти результаты как существование различных субъединиц  $20S,22R$ -холестерингидроксилирующего цитохрома P-450. Необходимо отметить, что большая склонность цитохрома к самопроизвольной агрегации и, как следствие, существование ряда агрегатов с различными физико-химическими свойствами заставляют с большой осторожностью относиться к данным изоэлектрического фокусирования.

Известно, что в зависимости от того, находится цитохром P-450 в комплексе с субстратом или в свободном виде, различают высокоспиновую и низкоспиновую формы фермента соответственно [11, 12]. Нами было проведено специальное исследование по количественной оценке взаимодействия низкоспиновой формы цитохрома P-450 с холестерином. Это выполнялось в следующих целях. Если  $20S,22R$ -холестерингидроксилирующий цитохром P-450 состоит из нескольких субъединиц, каждая из которых отвечает за отдельные этапы превращения холестерина, то холестерин является «истинным» субстратом только для той субъединицы, с которой начинается процесс его гидроксилирования. В таком случае под действием холестерина произойдет переход в высокоспиновую форму (т. е. в фермент-субстратный комплекс) не всего количества цитохрома, а только его части, количественно соответствующей субъединице, начинающей гидроксилирование холестерина. В то же время переход остальных субъединиц в высокоспиновую форму должен осуществляться под влиянием промежуточных продуктов — 20- или 22-оксихолестерина и  $20S,22R$ -диоксихолестерина.

Цитохром Р-450 обычно выделяется в виде фермент-субстратного комплекса. Для получения низкоспиновой формы цитохрома Р-450 применяли реконструированную, согласно [13], на колонке с аденодокси-сефарозой 20S,22R-холестерингидроксилирующую систему. Данные, полученные по титрованию цитохрома Р-450 холестерином (рис. 2), свидетельствуют о том, что холестерин переводит практически нацело цитохром Р-450 из низкоспиновой формы в высокоспиновую форму. Это является одним из доказательств существования цитохрома Р-450 в виде одной субъединицы. Наиболее ценные результаты, позволяющие выяснить вопрос о составе цитохрома Р-450, могут быть получены, на наш взгляд, при структурном анализе цитохрома Р-450. В настоящей работе приведены данные по изучению N- и С-концевых аминокислотных последовательностей этого белка. Непосредственно перед анализом N-концевой аминокислотной последовательности из цитохрома подкисленным ацетоном удаляли протогем IX по модифицированной методике [14]. Белок после такой обработки удалось растворить только в 8 М растворе хлоридрата гуанидина, и в этих условиях проводили его последующее карбоксиметилирование моноиодуксусной кислотой. N-Концевая аминокислотная последовательность определена как с использованием автоматической деградации цитохрома Р-450 на секвенаторе, так и с помощью модифицированного метода Эдмана с идентификацией аминокислот в виде их дансильных производных. Параллельный анализ аминокислотной последовательности цитохрома Р-450 был предпринят с целью выяснения не идентифицированных на секвенаторе аминокислот, а также проверки результатов автоматической деградации белка. Ниже представлены данные, полученные при автоматической деградации, использовании классического варианта и суммарный результат определения N-концевой аминокислотной последовательности цитохрома Р-450.

<sup>1</sup> Ile-X-Thr-Lys-Thr-Pro-Arg-Pro-Tyr-X-Glu-Ile-Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Asn-Gly-Thr-  
<sup>10</sup> Ile-Ser-Thr-Lys-Thr-Pro-Arg-Pro-  
<sup>20</sup> Ile-Ser-Thr-Lys-Thr-Pro-Arg-Pro-Tyr-X-Glu-Ile-Pro-Ser-Pro-Gly-Asp-Asn-Gly-Thr-

Анализ приведенной последовательности приводит к выводу, что цитохром Р-450 является белком с одной полипептидной цепью. Для выяснения С-концевой аминокислотной последовательности цитохрома Р-450 денатурированный образец белка обрабатывали карбоксипептидазой А, карбоксипептидазой В и смесью этих ферментов. Кинетика отщепления аминокислот позволяет представить С-концевую аминокислотную последовательность цитохрома Р-450 следующим образом: -(Lys, Ala, Asp)-Ser-Ala-.

Полученные данные показывают, что 20S,22R-холестерингидроксилирующий цитохром Р-450 представляет собой белок с молекулярным весом 46 000, имеющий изоэлектрическую точку при рН 6,62 в присутствии гвина 80 (в этих условиях цитохром Р-450 находится в виде комплексов с молекулярным весом 115 000 в низкоспиновом состоянии), и, по данным анализа N- и С-концевых аминокислот, а также по результатам определения N-концевой аминокислотной последовательности, состоит из одной полипептидной цепи. Окончательный вывод о субъединичном составе цитохрома Р-450 может быть получен при исследовании его полной аминокислотной последовательности, и такая работа в настоящее время нами проводится.

По-видимому, превращение холестерина в прегненолон происходит в зоне одного из того же активного центра фермента. Ранее [9] при работе с гомогенизным цитохромом Р-450 в виде, свободном от субстрата, нам удалось показать, что он в отличие от фермент-субстратного комплекса не восстанавливается при реконструкции 20S,22R-холестерингидроксилирующей системы. Аналогичным образом после полного превращения холесте-

рина, находящегося в системе, в прегненолон электронный транспорт в системе полностью прекращается, и «включить» транспорт электронов можно только добавлением новой порции стерина. Это согласуется с ранее отмеченным стимулирующим влиянием на восстановление суммарного цитохрома P-450, полученного в виде ацетоновых порошков [15]. Учитывая данные [9, 13, 16], можно заключить, что инициация электронного транспорта в системе при добавлении к ней холестерина вызвана изменением окислительно-восстановительного потенциала цитохрома P-450 в случае его взаимодействия с субстратом. Такой вывод вполне справедлив и в случае моно- и диоксипроизводных холестерина, которые для постоянного электронного транспорта в системе в течение одного каталитического цикла должны сохранять цитохром P-450 в высокоспиновом состоянии.

К моменту подготовки рукописи статьи в печать мы ознакомились с работой [17], в которой получены сходные результаты по изоэлектрическому фокусированию 20S,22R-холестерингидроксилирующего цитохрома P-450. Авторами этой работы с привлечением некоторых других данных сделан аналогичный вывод о субъединичном составе этого белка.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы глюкозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, NADP<sup>+</sup>, набор белков стандартов для определения молекулярного веса MS-II, набор белков-стандартов для определения изоэлектрической точки (Serva, ФРГ), EDTA, дитиотреит, холат натрия (Sigma, США), холестерин (Germed, ГДР), амфолины pH 3,5—10, 6—8 и 7—9 (ЛКВ, Швеция), сефадекс G-200 (Pharmacia, Швеция). Гомогенные препараты аденодоксинредуктазы и аденодоксина получали как описано ранее [18].

*Выделение цитохрома P-450* в гомогенном виде проводили согласно работе [7], с введением дополнительной стадии хроматографии на аденодоксин-сефарозе. Для этого к 1 мкмоль цитохрома, имеющему спектрофотометрический индекс  $D_{393}/D_{280}$ , равный 0,75, в 100 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,1 мМ EDTA и 0,1 мМ дитиотреит (исходный буфер), при постоянном перемешивании добавляли 28 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Образующийся осадок отделяли центрифугированием (50 000g, 10 мин), растворяли в 100 мл исходного буфера и наносили на колонку (1,5×10 см) с аденодоксин-сефарозой. Колонку промывали 100 мл исходного буфера, а затем 100 мл буфера, содержащего 1 М NaCl. При последней промывке элюировано 0,2 мкмоль цитохрома P-450 ( $D_{393}/D_{280}$  0,70). Десорбция основного количества цитохрома P-450 (0,75 мкмоль) достигалась применением исходного буфера, содержащего 1 М NaCl и 0,3% холата натрия. Полученный препарат цитохрома P-450 имел спектрофотометрический индекс  $D_{393}/D_{280}$  0,85, а удельное его содержание составляло 18 нмоль на 1 мг белка. Отношение  $D_{393}-D_{470}/D_{418}-D_{470}$ , равное 1,55, свидетельствовало о наличии комплекса выделенного цитохрома с холестерином. Содержание энзиматически неактивной формы цитохрома P-420 (2—3%) определяли после полного перевода небольшого количества цитохрома P-450 в цитохром P-420 обработкой 4 М раствором хлоридрата гуанидина в течение 60 мин при 25° с последующим пересчетом количества производного цитохрома P-420 на производное нативного цитохрома P-450.

*Получение цитохрома P-450, свободного от субстрата.* К 0,1 мкмоль цитохрома P-450 в высокоспиновой форме в 50 мл исходного буфера добавляли 0,01 мкмоль аденодоксинредуктазы, 0,2 мкмоль аденодоксина и компоненты NADPH-генерирующей системы ( $10^{-4}$  М NADP<sup>+</sup>,  $10^{-3}$  М глюкозо-6-фосфат и 35 ед. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). После 60 мин инкубации при 25° смесь наносили на колонку с аденодоксин-сефарозой. В свободном объеме элюировались компоненты NADPH-генерирующей си-

стемы и аденодоксин, в то время как аденодоксинредуктаза элюирована исходным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, а цитохром Р-450 — исходным буфером с 1 М NaCl и 0,3% холата натрия. Отношение  $D_{418}/D_{280}$  для полученной формы белка составляло 0,91, а отношение  $D_{393}-D_{470}/D_{418}-D_{470} = 0,54$ , что характерно для цитохрома Р-450, свободного от субстрата.

*Определение молекулярного веса методом гель-хроматографии* [19] проводили на колонке с сефадексом G-200. В качестве белков-стандартов использовали: цитохром с ( $M$  12 400), химотрипсиноген ( $M$  25 000), бычий сывороточный альбумин (мономер,  $M$  67 000), альдолазу ( $M$  147 000), каталазу ( $M$  240 000), ферритин ( $M$  480 000). Свободный объем колонки определяли по объему выхода голубого декстрана ( $M$   $2 \cdot 10^6$ ).

*Определение молекулярного веса гель-электрофорезом* в денатурирующих условиях проводили по методу [20]. После электрофореза столбики геля фиксировали в 12% трихлоруксусной кислоте и окрашивали 0,04% кумасси G-250. Молекулярный вес рассчитывали по калибровочному графику, выражающему зависимость относительной подвижности стандартных белков-маркеров от логарифма их молекулярного веса. Относительную подвижность определяли как отношение расстояния миграции белковой полосы к расстоянию, пройденному красителем — бромфеноловым синим. В качестве белков-маркеров использовали цитохром с ( $M$  12 400), миоглобин ( $M$  17 800), химотрипсиноген ( $M$  25 000), яичный альбумин ( $M$  45 000), бычий сывороточный альбумин ( $M$  67 000).

*Изоэлектрическое фокусирование в геле* [21] проводили в течение 4 ч при 20° в столбиках 7,5% полиакриламидного геля, полученных фотополимеризацией и содержащих 0,1% твин 80, 0,1 мМ дитиотреит и 1% амфолинов с интервалом рН 3,5—10. Белок (30 мкг) диализовали против 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,2, содержащего 0,1% твин 80 и 0,1 мМ дитиотреит, вносили в разделительную смесь (2 мл на трубочку) и смесь полимеризовали в течение 30 мин. Фокусирование проводили 4 ч при токе 1 мА на трубочку. Калибровочную кривую строили, используя набор белков-стандартов для определения изоэлектрической точки: ферритин (рI 4,4), альбумин (рI 4,7),  $\beta$ -лактоглобулин (рI 5,34), кональбумин (рI 5,9), миоглобин лошади (рI 7,3), миоглобин кашалота (рI 8,3), рибонуклеазу (рI 9,45).

*Изоэлектрическое фокусирование в препаративном варианте* проводили в колонке ЛКВ-800-1 ( $v$  110 мл) (ЛКВ, Швеция), содержащей 2% амфолинов с интервалом рН 3,5—10 или 6—9 (интервал рН 6—9 получали смешением амфолинов с рН 6—8 и 7—9), 0,1 мМ дитиотреит, 0,5% твин 80 и градиент сахарозы (0—40%) для амфолинов с рН 3,5—10 или градиент глицерина (0—40%) для амфолинов с рН 6—9. В качестве анодного и катодного растворов использованы фосфорная кислота (1% в 45% сахарозе) и 1% NaOH соответственно. В опыты брали 2,5—5 мг цитохрома Р-450. Фокусирование проводили при 3° в течение 48 ч при 1,2—1,5 Вт. Фракции собирали по 2 мл со скоростью 60 мл/ч. Для построения профиля градиента рН проводили измерение рН в отдельных фракциях. Удельное содержание цитохрома Р-450 определяли после продолжительного диализа объединенных фракций против 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,2, содержащего 0,2 М NaCl, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит и 0,03% холата натрия.

*Влияние детергентов на цитохром Р-450* оценивали по спектрам поглощения комплекса восстановленной формы гемопротеида с СО. Детергенты были взяты в концентрациях от 0,05 до 1% в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2. Цитохром Р-450 (2 нмоль) выдерживали 30 мин при 20° в растворе соответствующего детергента, затем его восстанавливали в течение 30 мин дитионитом натрия и далее обрабатывали СО с последующей регистрацией спектра поглощения в районе 400—500 нм. За 100% принимали содержание цитохрома Р-450 в контрольном образце, не обработанном детергентом. В работе использовали следующие детергенты,

полученные от фирмы Serva (ФРГ): твин 60 (14,9), твин 80 (15,0), твин 40 (15,6), бридж 58 (15,8), твин 20 (16,7), бридж 35 (16,9), мирдж 59 (18,8), плуроник F 68 (29), плуроник L 64 (15), монфлор 51, сурфипол 61, поливиниловый спирт 25/140, тритоны X-100, X-405 и WR 1339 (в скобках дано численное значение гидрофильно-липофильного баланса). Содержание цитохромов P-450 и P-420 рассчитывали с использованием коэффициентов молярной экстинкции  $\epsilon_{450-490} 91 \cdot 10^3$  и  $\epsilon_{420-490} 115 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  соответственно [22].

*Взаимодействие низкоспиновой формы цитохрома P-450 с холестерином* регистрировали по спектральным изменениям в области полосы Soret после добавления субстрата. Титрование холестерином ( $10^{-3}$  М раствор в этаноле) проводили добавлением порций холестерина к раствору цитохрома P-450 ( $0,75 \cdot 10^{-6}$  М в  $0,05$  М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2) в кювете двухлучевого спектрофотометра SP-700 Pye Unicam (Англия) с длиной оптического пути 4 см. Спектры записывали через 10 мин после добавления очередной порции холестерина.

*Автоматический анализ N-концевой аминокислотной последовательности* был выполнен на секвенаторе модели 890С (Beckman, США) с использованием квадрольной программы. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных осуществляли на газовом хроматографе GC-65 (Beckman, США) с колонкой, наполненной фазой SP-400, хроматографией в тонком слое кизельгеля F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ), а также на аминокислотном анализаторе D-500 после гидролиза фенилтиогидантоиновых производных 5,6 н. HCl.

*Ручное определение N-концевой аминокислотной последовательности* проводили согласно [23] с идентификацией дансильных производных двумерной хроматографией в тонком слое силикагеля.

*Определение N- и C-концевых аминокислот.* Определение N-концевой аминокислоты проводили по методу [24] с идентификацией дансильного производного двумерной хроматографией в тонком слое силикагеля ( $5 \times 5$  см). C-концевые аминокислоты определяли с помощью карбоксипептидаз А и В с идентификацией на аминокислотном анализаторе [25].

*Аминокислотный анализ* проводили на аминокислотном анализаторе LKB-3201 (LKB, Швеция). Гидролиз цитохрома осуществляли 5,6 н. HCl в вакуумированных, запаянных ампулах 24 и 72 ч. Цистеин определяли после обработки белка надмуравьиной кислотой [26]. Количество триптофана устанавливали после гидролиза белка с помощью *n*-толуолсульфокислоты [27]. Содержание в белке валина и изолейцина оценивали по результатам 72-часового гидролиза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tamaoki B. I. (1973) *J. Steroid Biochem.*, **4**, 89–116.
2. Simpson E. R., Boyd G. S. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **2**, 275–285.
3. Wilson L. D., Harding B. W. (1970) *Biochemistry*, **9**, 1615–1621.
4. Greengard P., Psychoyos S., Tallan H. H., Cooper D. Y., Rosental O., Estabrook R. W. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **121**, 298–303.
5. Bjorkhem I., Karlmar K. E. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **51**, 145–154.
6. Morisaki M., Bannai K., Ikekawa N., Shikita M. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **69**, 481–488.
7. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 278–280.
8. Tilley B. E., Watanuki M., Hall P. F. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **488**, 330–339.
9. Akhrem A. A., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. (1978) *Cytochrome P-450. Structural and Functional Aspects, Abstracts*, pp. 1–3, Eberswalde.
10. Tilley B. E., Watanuki M., Hall P. F. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1303–1307.
11. Jefcoate C. R., Orme-Johnson W. H., Beinert H. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 3706–3715.
12. Jefcoate C. R. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8788–8796.
13. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 688–693.
14. Strittmatter P. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 2492–2497.
15. Ramseyer J., Harding B. W. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **315**, 306–316.



16. Pederson T. S., Austin R. H., Gunsalus I. C. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1048-1049.
17. Duque C., Morisaki M., Ikekawa N., Shikita M. (1978) Biochem. and Biophys. Res. Communs, 82, 179-187.
18. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чашин В. Л. (1977) Биоорган. химия, 3, 780-786.
19. Andrews P. (1964) Biochem. J., 91, 222-233.
20. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
21. Wrigley C. W. (1968) J. Chromatogr., 36, 362-368.
22. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2370-2378.
23. Gray W. R. (1967) in: Methods in Enzymol., vol. XI, pp. 469-475, Acad. Press, N. Y — London.
24. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., 89, 59P.
25. Ambler R. P. (1967) in: Methods in Enzymol. (Hirs C. H. W., ed.), vol. XI, pp. 155-166, Acad. Press, N. Y.— London.
26. Sanger F. (1947) Nature, 160, 295-296.
27. Liu T. Y., Chang Y. (1971) J. Biol. Chem., 246, 2842-2848.

Поступила в редакцию  
30.XI.1978

После доработки  
12.II.1979

**PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES, STRUCTURAL ANALYSIS AND SUBUNIT  
COMPOSITION OF THE 20S, 22R-CHOLESTEROL HYDROXYLATING CYTOCHROME  
P-450 FROM BOVINE ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA**

**AKHREM A. A., LAPKO V. N., LAPKO A. G., SHKUMATOV V. M.,  
CHASHCHIN V. L.**

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

An investigation of the subunit composition of the 20S,22R-cholesterol hydroxylating cytochrome P-450 from bovine adrenal cortex mitochondria was made and the physico-chemical characteristics and the data on the structural analysis were presented. According to the results obtained, cytochrome P-450 seemed to consist of a single subunit.

---