



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.158.54

### МУЛЬТИФЕРМЕНТНАЯ МОДЕЛЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

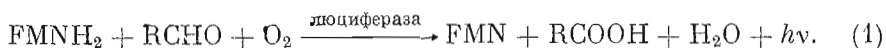
*Данилов В. С., Егоров Н. С.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет*

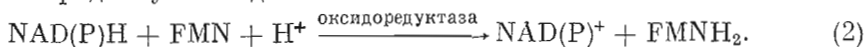
На основе анализа литературных и собственных данных по биолюминесценции бактерий предлагаются соображения о новом возможном механизме функционирования бактериальной люциферазы и природе люминесцентной системы. В отличие от существующих концепций люцифераза рассматривается не как индивидуальный фермент, а как мультиферментный комплекс, состоящий из трех структурных компонентов: флавопротеида, железосеросодержащего белка и цитохрома P-450. Приводится возможная реакционная последовательность, ведущая к генерации квантов света, и обсуждается функциональная роль бактериальной люциферазы.

Бактериальная биолюминесценция привлекает большое внимание исследователей как уникальный феномен трансформации химической энергии в световую и как перспективная ферментная система для применения ее в анализе следовых количеств различных биологически активных соединений. Поэтому совершенно очевидна необходимость конкретных представлений о природе фермента бактериальной люциферазы и механизме его функционирования.

В 1953 г. было установлено [1—3], что бактериальная люцифераза катализирует окисление восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>) и длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) молекулярным кислородом. Реакция сопровождается интенсивным свечением с максимумом в области 495 нм, что открыло инструментальные возможности для проведения интенсивных исследований механизма процесса и свойств фермента. Было обнаружено, что продуктами реакции являются FMN [4], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5], жирная кислота той же длины цепи, как у альдегида [6—8], и вода. Образование воды как продукта выводится скорее из анализа стехиометрии реакции, а экспериментально, насколько нам известно, не показано. Спорным является образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Большинство авторов [9, 10] придерживается мнения, что перекись водорода может образовываться лишь в безызлучательных реакциях люциферазы. Следовательно, *in vitro* реакция биолюминесценции может быть записана в виде уравнения



Реакция свечения в бактериальной системе при наличии фермента NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы может стимулироваться восстановленными пиридиннуклеотидами



Восстановленный FMN далее вступает в реакцию (1).

Приведем вкратце некоторые данные о свойствах бактериальной люциферазы, которые могут нам понадобиться для последующих выводов. До настоящего времени в литературе бактериальную люциферазу описывали как весьма простой фермент, не содержащий каких-либо простетических групп или ионов металла [11, 12]. Фермент считается сильно растворимым [13], хотя появляются указания о его мембранном характере [14]. Активность люциферазы из *Photobacterium leiognathi* оказалась чувствительной к лизоциму.

Люцифераза содержит реактивные SH-группы в активном центре либо около него [15, 16]. Их модификация вызывает потерю активности. Альдегиды и FMN защищают SH-группу от модификаторов. Люцифераза — один из наиболее медленно функционирующих ферментов [17]: время, необходимое для осуществления отдельного цикла, составляет около 10 с. Отсюда был сделан вывод [17, 18], что в реакции может образовываться долгоживущий интермеднат.

Большинство авторов придерживается мнения, что люциферазы из родов *Venezuela* и *Photobacterium* являются гетеродимерами с молекулярной массой около 80 000 [13, 19—21]. Фермент состоит из двух неидентифицированных субъединиц  $\alpha$  ( $M$  39 000—44 000) и  $\beta$  ( $M$  33 000—39 000). Субъединицы могут быть выделены хроматографией на DEAE-сефадексе в 5 M мочевины [21—23]; они не обладают активностью в индивидуальном состоянии, но рекомбинированные в соответствующих условиях, почти полностью восстанавливают исходную активность фермента. Для люцифераз из любого источника обе субъединицы функционально различимы. Связывание субстратов (FMN<sub>2</sub>, RCHO) и каталитические свойства относят к  $\alpha$ -субъединице [19]. Функция  $\beta$ -субъединицы, которая абсолютно необходима для свечения, остается неясной. Изучение свойств субъединиц выполнено в основном на препарате люциферазы, выделенном по методу [21]. Однако гомогенность очищенного таким способом фермента можно поставить под сомнение. Этому препарату свойственна стимуляция свечения при введении NADH [25], степень которой меняется в зависимости от штамма бактерий. Этот факт говорит о том, что в системе помимо  $\alpha, \beta$ -димера (люциферазы) находится по крайней мере еще один фермент — NADH:FMN — оксидоредуктаза. Более того, препарат люциферазы после дополнительной стадии очистки иммобилизацией на сефарозе 6 B, по данным гель-электрофореза в додецилсульфате натрия, содержал дополнительные неохарактеризованные компоненты [26]. Вместе с тем в современной литературе игнорируется довольно тщательная работа [27], из которой следует, что люцифераза из *P. fischeri* представляет собой тетрамер с молекулярным весом мономера 19 000. Таким образом, молекулярная организация люциферазы еще далеко не выяснена.

Открытым остается вопрос и о природе эмиттера свечения. Очевидно, что в реакциях, катализируемых люциферазой, образуется молекула (или некая система) в электронно-возбужденном состоянии, которая и является эмиттером. Установить природу эмиттера — значит во многом облегчить расшифровку механизма процесса. В реакциях *in vitro* биолюминесценцию обычно инициируют добавлением FMN<sub>2</sub>. Поэтому ранее казалось [1, 3], что именно возбужденный флавин должен быть эмиттером в реакции, где окисленный флавин — сильно флуоресцирующая молекула. Впоследствии выдвигались предположения, что эмиттером являются промежуточные продукты окисления флавина FMNH<sup>+</sup> [28] либо пероксидили гидроксизамещенные флавины [9, 18]. Флуоресценция этих соединений коррелировала с эмиссией биолюминесценции. Однако имеются существенные аргументы против того, что флавин может быть эмиттером [29]. Например, большое различие в максимумах флуоресценции FMN (530 нм) и биолюминесценции бактерий (475, 490 нм). Влиянием среды окружения флавина такой сдвиг объяснить трудно. Исследования показывают, что связанный с люциферазой FMN вообще не флуоресцирует. Наконец, с по-

зиций термодинамики окисление одной молекулы FMNH<sub>2</sub> лишь наполовину может обеспечить энергию, необходимую для излучения фотона при длине волны 490 нм (60 ккал/моль). Однако химические аналоги FMN в реакциях с люциферазой не только дают свечение, но и способны изменять спектр свечения [30], поэтому отбрасывать концепции об участии флавинов в качестве эмиттеров преждевременно. Не исключено, что эмиттером в бактериальной системе служит комплекс, одним из компонентов которого является флавин. Восстановленные FAD и рибофлавин, как и FMNH<sub>2</sub>, хотя и в меньшей степени, дают свечение. Появляются экспериментальные данные об участии в бактериальной биолюминесценции предшественников синтеза рибофлавина — люмазинов [31].

Более специфична реакция свечения бактериальной люциферазы с другим субстратом реакции — альдегидом. Люминесценцию инициируют лишь длинноцепочечные алифатические альдегиды. Свечение усиливается по мере роста длины цепи альдегида до некоторого предела. Максимальный уровень свечения наблюдается при взаимодействии люциферазы с тетрадеканалем. Считается, что в клетках также именно тетрадеканаль служит природным субстратом люминесцентной системы [32]. Если к очищенному препарату добавить все субстраты, кроме альдегида, небольшой уровень свечения все же регистрируется. Удовлетворительного объяснения этому феномену нет [13]. Поэтому и роль альдегида остается неясной. Другие производные длинноцепочечных углеводов (кетоны, кислоты, спирты) не дают свечения при взаимодействии с люциферазой [33]. Более того, некоторые из них конкурентны в реакциях биолюминесценции с альдегидом.

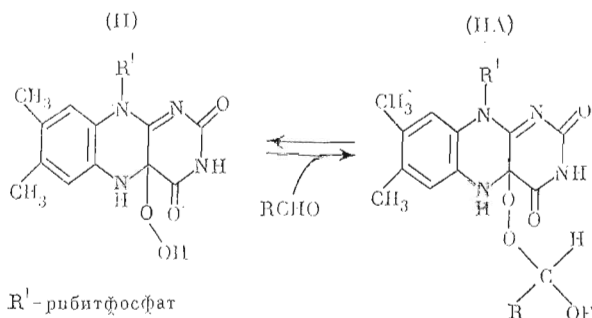
Бактериальная люцифераза характеризуется чрезвычайно большим сроком к еще одному субстрату реакции — кислороду [34]. Выдвигались предположения об участии активированного кислорода в биолюминесценции бактерий [5, 35]. Косвенно образование активированного кислорода в реакциях люциферазы показано в работе [36]. На основании того, что с участием люциферазы происходит одновременное окисление FMNH<sub>2</sub> и RCHO, функционально фермент рассматривают как оксидазу смешанных функций или монооксигеназу [19]. Этот вывод сделан скорее умозрительно, нежели на основании экспериментальных данных, поскольку не конкретизируется, какие оксидазные и оксигеназные реакции осуществляются при каталитическом акте и какова субстратная специфичность монооксигеназы.

Исследователями биолюминесценции бактерий накоплен такой большой фактический материал, который уже не позволяет пользоваться обобщениями свойств люциферазы с неустоявшейся природой, а настойчиво требует более четких и конкретных представлений о структуре и механизме функционирования фермента. Существует много гипотез о механизме биолюминесценции бактерий. Рассмотрение некоторых из них мы считаем целесообразным начать с наиболее активно пропагандируемой в литературе гипотезы Гастингса с коллегами [12, 13, 19, 37, 38]. По их представлениям, суть биолюминесценции бактериальной люциферазы сводится к реакционной последовательности, показанной на схеме 1 по работе [19], где E — бактериальная люцифераза.

По этой схеме реакция FMNH<sub>2</sub> с люциферазой приводит к образованию комплекса люцифераза — FMNH<sub>2</sub>, обозначаемого как интермедиат (I). На основании кинетического анализа [39] и измерений спектров кругового дихроизма [40] показано присоединение одной молекулы FMNH<sub>2</sub> на одну молекулу люциферазы из *B. harveyi* и *P. fischeri*. В ранних исследованиях [17, 41] сообщались результаты, ведущие к предположению, что этот этап включает в себя восстановление дисульфидных ферментов до дитиольных с сопутствующим окислением флавина. Последующие попытки повторить эти эксперименты не удались, и от этой гипотезы авторам пришлось отказаться [12, 42].

Реакция интермедата (I) с одной молекулой кислорода очень быстрая [43] и приводит к образованию интермедата (II), который вследствие его сравнительно большого времени жизни при низких температурах может быть накоплен и изучен. Содержащий кислород интермедат (II) отличается спектрально как от окисленных, так и от восстановленных флавинов. Спектр флуоресценции его коррелирует с эмиссией биолоуминесценции [9], хотя авторы и не признают его в качестве эмиттера.

Интермедат (II), занимающий центральное место в схеме, постулирован как 4а-пероксиаддукт FMNH<sub>2</sub> [18]. Вероятным также считали и то, что интермедат (II) есть связанный с люциферазой 4а-гидропероксид FMNH<sub>2</sub> [44]. В присутствии альдегида образуется интермедат (IIA),



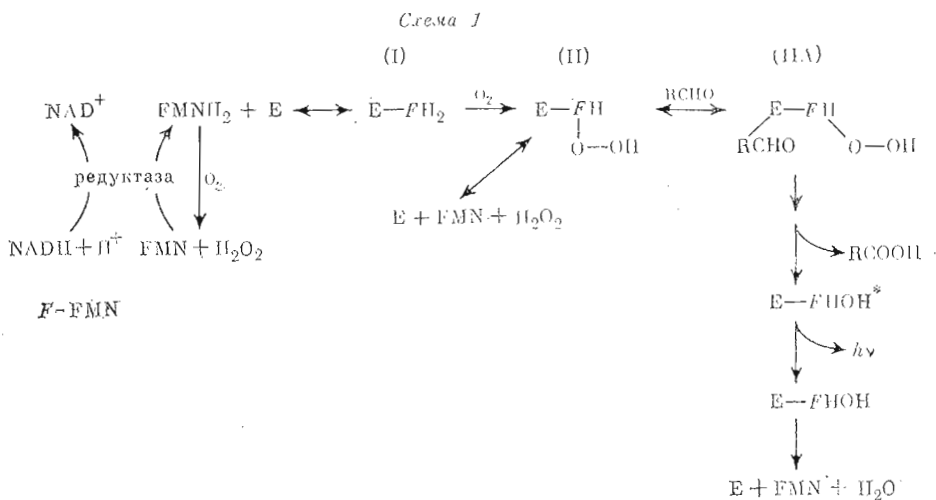
структура которого представлена по [13]. Распад этого интермедата через несколько схематичных и условных этапов приводит к образованию конечных продуктов реакции и люминесценции.

В отсутствие альдегида интермедат (II) распадается спонтанно, давая FMN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и свечение низкой интенсивности [9, 33]. В представленной схеме и подобных ей этот путь назван темновым. Лишь в аналогичной схеме путей и промежуточных продуктов катализируемого люциферазой окисления FMNH<sub>2</sub> из работы [45] прямо указано на образование квантов света.

В принципе такую же функциональную схему (отличие в обозначении интермедатов X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub>) разрабатывают японские исследователи [39, 46–48]. Ими на штамме светящихся бактерий *P. phosphoreum* детально изучены константы скоростей образования и распада интермедатов и показана стехиометрия реакции биолоуминесценции: люцифераза : FMNH<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> = 1 : 1 : 1.

Гипотеза о возможном механизме бактериальной биолоуминесценции, предложенная Гастингсом с коллегами, представляет попытки механистически ответить на главный вопрос — какие возможны этапы, ведущие к генерации квантов света и появлению конечных продуктов реакции. Однако многие ее детали кажутся нам не совсем убедительными. Так, центральное звено этой схемы, интермедат (II), лишь постулирован как 4а-пероксиаддукт FMNH<sub>2</sub>, связанный с люциферазой. Экспериментальных доказательств существования формы, необходимой для осуществления реакции свечения, нет. Связывание FMNH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> и RCHO происходит на одном белке, точнее, на α-субъединице. Более того, алифатический альдегид присоединяется через перекисный мостик к флавиону. Это также лишь предположение. Но согласно схеме, все соединения, ингибирующие свечение конкурентно с флавином, также должны ингибировать свечение и с альдегидом. В противоречие с этим вступают экспериментальные данные, полученные самими авторами гипотезы [49, 50]. Кроме того, схема 1 не отражает гидрофобный характер взаимодействия длинноцепочечных альдегидов с люциферазой. Поэтому действие разнообразных гидрофобных соединений, многие из которых (например, анестетики) [51] ингибируют свечение конкурентно с альдегидом, также трудно объяснить.

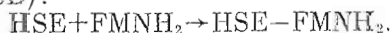
В ряде работ [52, 53] утверждается, что связанные с люциферазой FMNH<sub>2</sub> и RCHO находятся близко друг от друга. Наши эксперименты показывают, что система «бактериальная люцифераза — альдегид» без добавки флавина функционирует с интенсивной биолюминесценцией, что трудно объяснить с позиций обязательного связывания альдегида через флавин. Однако присоединение альдегида и флавина в некоторой степени зависит друг от друга [54]. По данным одного из авторов схемы 1, в лю-



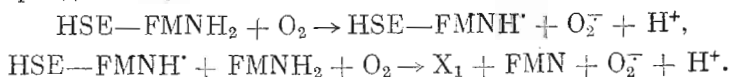
циферазе есть место для связывания таких гидрофобных молекул, как флуоресцентный зонд (1-анилинонафталин-8-сульфат) [50]. Схема 1 не отвечает на важный вопрос: каким образом происходит разрыв C—H-связи в альдегиде? Эта реакция имеет место и лимитирует общую скорость процесса [55]. Следовательно, как минимум, еще один долгоживущий интермедиат должен быть в цепи превращений за интермедиатом (II A). Это соображение получило развитие и была предложена реакционная последовательность из шести интермедиатов [56]. Вообще процессы распада интермедиата (II A) в схеме 1 выглядят довольно механически. Совершенно бездоказательна последовательность появления кислоты, квантов света и затем FMN и H<sub>2</sub>O. Неясно, каким образом возникает возбужденное состояние E—F<sup>h</sup>ON\*, как функционирует реактивная SH-группа фермента и почему наблюдается свечение люциферазы без добавления альдегида?

По-иному описывают возможные реакции бактериальной люциферазы Ли с соавт. [5, 28, 57, 58]. Гипотеза выдвинута ими на основании измерения утилизации субстратов и выхода продуктов реакции, а также отношения квантовых выходов с FMNH<sub>2</sub> и альдегидами. Авторы предприняли попытку описать наблюдаемое ими бифазное поглощение FMNH<sub>2</sub> и кислорода в реакциях с участием бактериальной люциферазы. Серии реакций, включающие в себя одноэлектронные этапы с последовательным окислением двух молекул FMNH<sub>2</sub> и обеспечивающие кинетику 1-го порядка, постулированы для образования долгоживущего интермедиата.

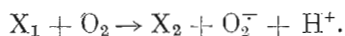
Первый этап в последовательности — взаимодействие FMNH<sub>2</sub> с нативной люциферазой (HSE):



Это слабый комплекс, реагирующий с кислородом в два этапа с образованием интермедиата X<sub>1</sub>:



Реакция интермедиата  $X_1$  с кислородом приводит к появлению еще одного интермедиата реакции  $X_2$ :



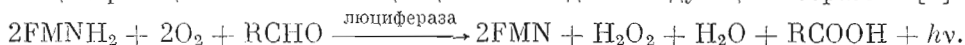
Перекись водорода образуется при дисмутации  $O_2^-$



Структура интермедиата  $X_2$  постулирована как HOOSE—FMN. В данном случае в отличие от схемы 1 гидропероксидная группа находится не на флавине, а в ее образование вовлечена сульфгидрильная группа люциферазы. Взаимодействие  $X_2$  с алифатическим альдегидом сопровождается эмиссией света



Общая реакция биолюминесценции выглядит следующим образом [5]:

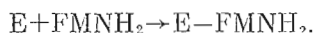


Ни  $H_2O_2$ , ни активированный кислород, по мнению автора, не вовлечены в световую реакцию, а связаны скорее всего с темновыми процессами.

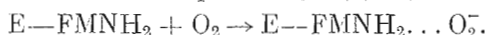
Каковы отличительные черты этой концепции? Это очевидная роль SH-группы люциферазы, участие в реакциях активированного кислорода и утилизация двух молекул восстановленного флавина на один квант света. Следует отметить, что возможное участие двух молекул  $FMNH_2$  в одном акте люциферазы было постулировано ранее [2].

Однако гипотеза Ли не получила распространения, поскольку стехиометрия 1 молекула  $FMNH_2$  на 1 молекулу люциферазы, предложенная в ряде работ [39, 43, 59], находится, как кажется, в лучшем соответствии с экспериментальными данными. Также не получила подтверждения и постулированная структура интермедиата  $X_2$ . Плохо объяснимы в рамках этой схемы появление возбужденного состояния и разрыв C—H-связи в альдегиде.

В работе [35] обсуждается возможный механизм бактериальной биолюминесценции, близкий к свечению *Latia*. При этом восстановленному флавину отводится двойная роль: как продуцента  $O_2^-$  и как эмиттера свечения, когда он находится в протонированной форме. В реакционной последовательности постулировано образование двух интермедиатов



Этот комплекс аналогичен интермедиату (I) (схема 1) или  $X_1$  [5].



Как считают авторы [35], второй интермедиат аналогичен комплексу  $X \dots Fe^{3+} \dots O_2^-$ , где X — лиганд, такой же, как фосфат. Время жизни комплекса много больше, чем свободного  $O_2^-$ . Поскольку супероксиддисмутаза не ингибирует свечение бактерий,  $O_2^-$  функционально связан с люциферазой [35]. Не входя в подробности предлагаемых реакционных путей, отметим образование комплекса  $E-FMNH^+ \dots O_2^-$ . При исследовании механизма биолюминесценции *Latia* [60] был предложен перенос энергии от окисляющегося субстрата, продуцирующего нефлуоресцирующий продукт, к связанному с белком эмиттеру. Эта идея применительно к светящимся бактериям позволила предположить [35], что комплекс  $E-FMNH^+ \dots O_2^-$  возбуждается путем переноса энергии, образующейся при окислении алифатического альдегида. При этом время, необходимое для потери протона из комплекса, много больше времени, необходимого для переноса дополнительной энергии.

В гипотезе Пуже и Михельсона развито предположение об активном участии в световой реакции семихипона флавина [28] и конкретизированы как функция альдегида, так и природа возбуждаемого ими комплекса.

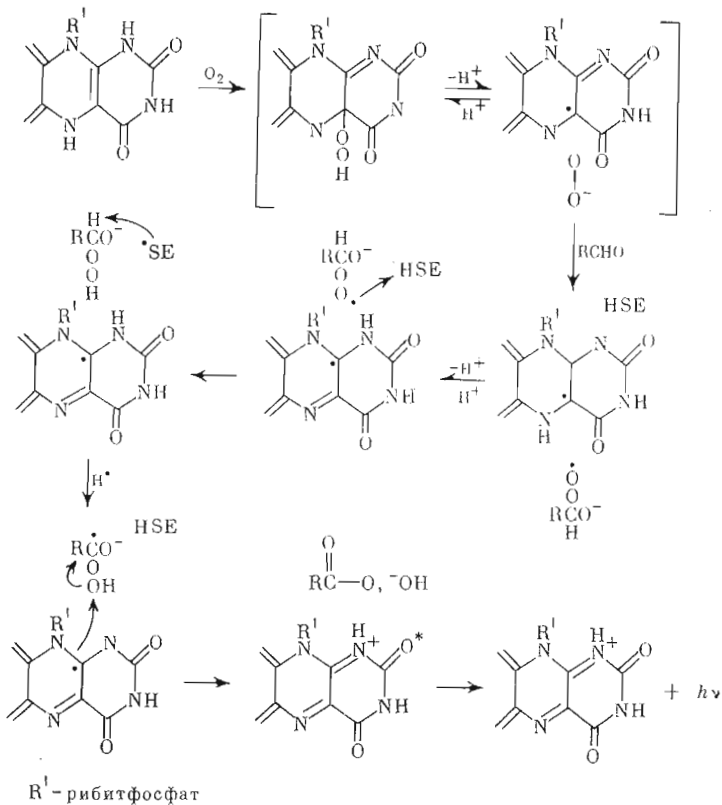
Однако в схеме не обсуждается взаимодействие альдегида с люциферазой, условия разрыва С—Н-связи альдегида. Более того, предположение авторов, что одним из конечных продуктов реакции должен быть  $\text{CO}_2$ , ни в одной из работ подтверждения не получило.

Проводились аналогии между возможными механизмами бактериальной биолюминесценции и хемилюминесценцией люминола [61]. Были исследованы реакции различных пероксидов с солями флавинов, катализируемые ионами металлов. Особое внимание обращено на процесс разрыва С—Н-связи пероксидов. Однако необходимость присутствия металлов в этих системах препятствует прямому их сравнению с реакциями бактериальной люциферазы, которая, как указывалось выше [11, 12], полностью лишена металлов. Сравнение двух систем идет по взаимодействию пероксидов (со структурой  $\text{R}-\text{CH}-\text{O}-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-\text{OH}$ ), световая реакция которых с бактериальной люциферазой не подтверждена.

По-иному рассмотрена возможность взаимодействия кислорода и альдегида с комплексом люцифераза-флавин в работе [62]. Сначала кислород связывается с  $\text{FMNH}_2$  в положении 4а, как и в схеме 1. Затем альдегид реагирует с дегидропероксифлавином (II) в положении N5 с образованием оксазетидинового кольца. Это соединение и есть интермедиат, а продукт реакции  $\text{FMN}$  — эмиттер свечения. Аргументы, исключаящие  $\text{FMN}$  как эмиттер свечения, приведены выше.

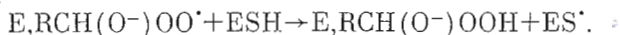
Недавно предложен механизм бактериальной биолюминесценции [63], включающий в себя диссоциативный перенос электрона (схема 2). 4а-Гид-

Схема 2

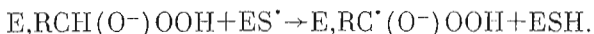


ропероксифлавин (идентичный интермедиату (II) схемы 1) диссоциирует до радикала флавина и  $\text{O}_2^-$ . Анион супероксида реагирует с альдегидом с образованием пероксилгидроксиалкана. Этот радикал стабилен и служит как интермедиат для других реакций. На следующем этапе SH-группа

люциферазы поставляет протон на пероксильный радикал (флавин не показан):



Затем автор постулирует несколько необычную реакцию извлечения тиильным радикалом водорода, т. е. разрыв C—H-связи альдегида



Далее наступает этап преобразования энергии. Образуется протонированный флавин в возбужденном состоянии (эмиттер свечения), анионы гидроксила и  $RCOO^-$ . Высокое сродство гидроксильного радикала к образуемой вторичной C—O-связи считается главным условием для проведения экзотермичной реакции переноса электрона.

Концепция Косовера, основывающаяся на современных представлениях о возможном участии активированного кислорода, SH-группы люциферазы и необходимости в акте переноса энергии, обходит многие противоречия функциональной схемы Гастингса (схема 1). Существенным является предположение об атаке альдегида супероксидом кислорода. Однако и эта схема не лишена многих недостатков. Затруднено понимание общей стехиометрии реакции. Непонятно, как образуется возбужденное состояние, неясны места связывания альдегида и проблематичен разрыв C—H-связи тиильным радикалом. Не получает пока подтверждения и концепция свободнорадикального механизма.

Таким образом, в настоящее время нет недостатка в гипотезах о механизме бактериальной биолюминесценции. Анализ их свидетельствует о том, что основным объединяющим их элементом является никем не оспариваемый факт наличия в реакционной последовательности как минимум двух долгоживущих интермедиатов. И если структура второго интермедиата различна, то первый интермедиат, первый этап световой реакции у всех один и тот же — комплекс люциферазы с восстановленным флавином. Большинство авторов считают, что далее следует присоединение кислорода и на последней стадии — взаимодействие с альдегидом. Лишь в работе [8] выдвинуты соображения о реакции альдегида с люциферазой до кислорода. Согласно всем гипотезам, три активных реагента ( $FMNH_2$ ,  $RCHO$ ,  $O_2$ ) являются субстратами реакции и связываются на индивидуальном белке — люциферазе. Ряд гипотез [5, 35, 63] включают в себя этап активации кислорода. В остальном мнения авторов о возможных реакционных последовательностях сильно расходятся. И важные вопросы природы эмиттера свечения, мест связывания альдегида, флавина и кислорода, последовательность взаимодействия их с люциферазой и другие, к сожалению, остаются открытыми.

Все теории функционирования бактериальной люциферазы в конечном счете основаны на перекислации флавина либо проводятся аналогии с хемилюминесценцией люминола или других соединений. Очевидно, что, манипулируя флавином, можно обнаружить много условных аналогий в модельных реакциях хемилюминесценции (кстати, почти во всех модельных реакциях необходимым считается наличие металла, который в люциферазе пока не обнаружен). Каждая концепция страдает какими-то существенными недостатками, не позволяющими принять ее как наиболее реально отражающую действительность. Общим же недостатком рассмотренных теоретических работ следует признать то, что они плохо либо совсем не связаны с физиологией люминесцентных бактерий, с их биохимическими особенностями.

С нашей точки зрения, чтобы создать модель функционирования бактериальной люциферазы, более приближенную к действительности, необходимо идти не по пути усовершенствования существующих гипотез, а выдвинуть новые постулаты, которые ранее или не рассматривались, или не считались реальными. Естественно, разумные аргументы должны быть привнесены и из имеющихся гипотез.



Среди наиболее важных предпосылок к созданию новой модели мы выделим четыре.

1. Локализация люциферазы в электронтранспортной цепи переноса электронов между NAD(P)H-дегидрогеназой и оксидазой (или оксигеназой). Концевым компонентом цепи может быть гемопротеид.

2. В люминесцентной системе связывание трех субстратов реакции (FMNH<sub>2</sub>, RCHO, O<sub>2</sub>) должно происходить в различных местах. Во всех рассмотренных выше схемах механизм связывания субстратов и особенно альдегида не конкретизируется, а в схеме 1 связывание кислорода и альдегида происходит через флавин. Это нам кажется очень сомнительным, поскольку не отражает гидрофобную природу связывания альдегида.

3. Несмотря на то что свечение можно часто наблюдать без добавки альдегида к люциферазе, мы предполагаем наличие его в системе строго обязательным. Это предположение вытекает из рассмотрения энергетических потребностей реакции биолюминесценции. Очевидно, именно свободная энергия окисления алифатического альдегида обеспечивает возбуждение эмиттера. Этого мнения придерживались исследователи в ранних работах [64].

4. Эмиттером реакции биолюминесценции может быть не индивидуальная молекула, а некая система, скорее всего комплекс с переносом заряда.

Где локализована в клетке люминесцентная система? В ранних работах по изучению взаимосвязи люминесценции и дыхания у светящихся бактерий [65, 66] показано наличие конкуренции между этими процессами за восстанавливающие эквиваленты. При этом предполагалось, что разветвление цепей переноса электронов происходит на уровне NAD(P)H-дегидрогеназы (рис. 1). Эта концепция не претерпела изменений и до настоящего времени [38]. К сожалению, информация о строении и особенностях функционирования электронтранспортных цепей у люминесцентных бактерий крайне ограничена. В тех работах, где проводился анализ цитохромного состава [67, 68], не исследовались люминесцентные характеристики препаратов. Поэтому мы провели изучение цитохромного состава штамма светящихся бактерий *P. fischeri* [69]. Как оказалось, люминесцентные бактерии характеризуются хорошо сформированной системой переноса электронов (рис. 2), которая к тому же достаточно лабильна. Исследуемые бактерии содержат цитохромы *b*- и *c*-типов. Концевыми оксидазами являются цитохромы *o*, *a*<sub>2</sub>+*a*<sub>1</sub> и P-450. Либо люцифераза шунтирует перенос электронов на цитохромы, как на рис. 1, либо она может быть локализована в одной цепи из цепей NAD(P)H-оксидазной системы. Это предположение делается с учетом особенностей цепей переноса электронов и люминесцентных бактериях, которые относительно резистентны к действию CO и цианидов.

С целью проверки возможной взаимосвязи люминесцентной активности с пеким цитохромным компонентом мы провели разделение бесклеточного экстракта на фракции супернатанта (140 000g) и суббактериальных частиц. Из супернатанта выделяли фракцию белков, обладающую люциферазной активностью, которую последовательно хроматографировали на сефадексах G-10 и G-75. Затем высокоочищенный препарат бактериальной люциферазы (очистка в 500 раз по реакции с FMNH<sub>2</sub>) получали хроматографией на TEAE-целлюлозе [70]. Все фракции проверяли на люциферазную активность, содержание цитохромов и флавопротеидных компонентов [71].

Люциферазная активность распределялась по фракциям неравномерно. Подавляющая величина активности переходит в супернатант. Поскольку свечение супернатанта характеризуется достаточно высоким уровнем без добавляемых NADH, FMN, можно полагать, что все компоненты, необходимые для свечения (за исключением в некоторой степени альдегида), содержатся в супернатанте в избытке. Низкий уровень свечения суббактериальных частиц объясняется скорее всего наличием у *P. fischeri* непрочно связанных с мембранами дегидрогеназных комплексов и флавопротеи-

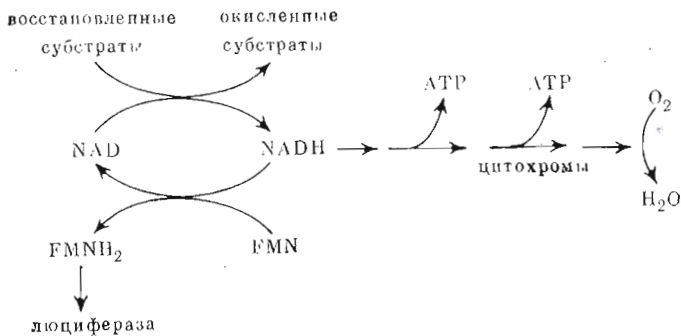


Рис. 1. Взаимосвязь люциферазы и цепи переноса электронов в люминесцентных бактериях (по Нельсону и Гастингсу [38])

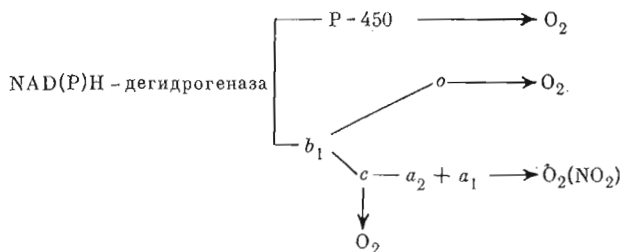


Рис. 2. Структура электронтранспортных цепей у люминесцентных бактерий

дов, которые легко солибилизируются и переходят в раствор. Цитохромы  $b_1$  и  $c$  распределяются сходным образом по частицам и супернатанту. Цитохромы  $o$  и  $a_2 + a_1$  являются хромофорами, непрочно связанными с мембранами, и легко переходят в супернатант. Цитохром P-450 содержится в супернатанте, но в большей степени в частицах.

Фракции белков с люциферазной активностью характеризуются составом цитохромов, в принципе близким к составу супернатанта, но с меньшим содержанием флавопротеидов. Свечение этих фракций уже лимитируется NADH и FMN. И наконец, в препарате люциферазы с высокой степенью очистки мы обнаружили только один гемопротеид. Ранее было показано [72], что очищенная люцифераза из *P. fischeri* содержит гемопротеид, идентифицированный авторами как цитохром  $c_1$ . Однако при этом никакой взаимосвязи этого компонента с люциферазной активностью не было предположено. Спектральные характеристики фермента, полученные нами [71], и спектральные характеристики люциферазы в цитируемой работе [72] практически аналогичны. Однако, с нашей точки зрения, они больше соответствуют цитохрому с протогемом, а не с мезогемом в качестве протетической группировки. СО-спектр этого препарата показал, что данный хромофор обладает полосами поглощения, характерными для цитохрома P-450. Корреляция между люминесцентной активностью и наличием этого гемопротеида может указывать на два возможных варианта. Либо цитохром является необходимым компонентом люминесцентной системы бактерий, либо это просто сопутствующая примесь.

При рассмотрении вопроса, может ли цитохром P-450 служить активным компонентом люминесцентной системы, мы обратили внимание на известные из литературы факты и подтвердили в эксперименте высокую чувствительность люминесценции бактерий к действию широкого ряда химических соединений, таких, как анестетики, наркотики, полициклические углеводороды, стероиды и т. д. [51, 73–76].

Все эти соединения с различной химической природой эффективно тушат свечение бактерий и бактериальной люциферазы. Всех их объединяет один признак — гидрофобность. Известные до сих пор гипотезы о механизме биолюминесценции бактерий, рассмотренные выше, к сожалению, игнорировали этот феномен. Системы, где осуществляются десятки различных реакций окисления-восстановления и при этом в качестве субстратов выступают гидрофобные соединения самой различной химической структуры, обнаружены в микросомах печени, почек, растениях, бактериях [77, 78]. Во всех случаях первая стадия превращения соединений протекает с участием цитохрома Р-450. Все это весьма предварительно может свидетельствовать в пользу того, что цитохром Р-450 является либо необходимым компонентом люминесцентной системы, либо самой люциферазой. Но последнее соображение неправдоподобно, поскольку надо допустить, что сам гемопротеид способен генерировать кванты света. Подобных сведений в литературе нет. Здесь уместно вернуться к нашим опытам по солюбилизации цитохромов. Цитохром Р-450 — гидрофобный белок, и, естественно, большая часть его содержалась в мембранной фракции — суббактериальных частицах. Основная же люциферазная активность содержалась не в частицах, а в супернатанте. Этот факт может свидетельствовать о том, что Р-450 — условие необходимое, но не достаточное для нормального преобразования химической энергии в световую. Очевидно, люминесцентная система должна включать в себя, кроме Р-450, и другие компоненты.

Если цитохром Р-450 служит необходимым компонентом бактериальной люциферазы, то какую функцию он может выполнять? Естественно было предположить в таком случае, что Р-450 должен связывать кислород и активировать его. Такая функция цитохрома Р-450 широко известна [79], как и функция гидроксиглирования (окисления) соединений. Какое же химическое соединение может окисляться цитохромом в реакциях биолюминесценции? Нам было предположено, что Р-450 выполняет роль компонента, связывающего и окисляющего алифатический альдегид [80].

Известна способность гемопротеида образовывать комплексы с субстратами и ингибиторами гидроксиглирования, существование которых можно контролировать спектрально. При изучении связывания субстратов реакции биолюминесценции алифатических альдегидов с цитохромом Р-450 в бесклеточных экстрактах и препарате люциферазы были обнаружены типичные для данного гемопротеида спектральные переходы первого типа. Параллельное изучение зависимости интенсивности свечения и величины спектрального перехода от концентрации альдегида (деканала) на одном и том же препарате люциферазы показало хорошее совпадение константы связывания и константы Михаэлиса, измеренные двумя независимыми способами: спектрально и люминесцентными способами [80]. Следовательно, именно цитохром Р-450 может связывать и в дальнейшем проводить окисление альдегида до кислоты молекулярным кислородом.

Если это действительно так, то различные субстраты гидроксиглирования должны ингибировать свечение, конкурируя с альдегидом за место связывания на гемопротеиде [81]. Подтверждением этому послужили наши эксперименты [80, 82] по изучению влияния типичных субстратов цитохромов Р-450 из микросом (диметиланилин, этилморфин, гексобарбитал, аминопирин), субстрата Р-450 из *Pseudomonas putida* (камфора), а также ингибиторов Р-450-зависимого гидроксиглирования (метиранон, SKF-525A (2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенилвалериат), пропилгаллат) на бактериальную биолюминесценцию. Все эти соединения эффективно тушили свечение целых клеток и бактериальной люциферазы. Спектральным методом было показано связывание субстратов с Р-450 из *P. fischeri*. Но гораздо важнее то, что все эти соединения тушили свечение препаратов бактериальной люциферазы по одному механизму — за

счет строгой конкуренции с алифатическим альдегидом и неконкурентно — с флавином. Это может служить еще одним доказательством участия цитохрома P-450 в реакциях бактериальной биолюминесценции.

Как отмечалось выше, в литературе имеются сведения о большой чувствительности биолюминесценции бактерий к действию различных гидрофобных соединений. Большинство авторов ограничивались лишь простой констатацией факта тушения свечения, без объяснения сущности явления. Исключения составляют работы по влиянию различных анестетиков [51, 75], ингибиторов оксидаз смешанных функций [49], соединений алифатической природы [33], в которых говорится о конкурентных взаимоотношениях этих веществ с альдегидом. Так, в работе [51] показано, что анестетики, не затрагивая общий метаболизм клетки, действуют эффективно на люциферазу. Эти соединения не препятствовали связыванию FMNH<sub>2</sub> и кислорода. Поскольку спектр свечения не менялся, эмиттер не изменялся. Корреляция ингибиторного эффекта анестетиков с коэффициентом распределения в системе масло — воздух свидетельствовала о гидрофобном характере их взаимодействия с люциферазой. Однако и в этих случаях сложившиеся представления о строении бактериальной люциферазы не позволили интерпретировать механизм действия. Очевидно, это было связано с тем, что природа альдегидсвязывающего компонента оставалась неизвестной, и в функциональных схемах окисление альдегида в кислоту рассматривалось формально.

Таким образом, алифатические альдегиды может связывать и окислять не «люцифераза», а цитохром P-450. При этом никакого свечения не должно происходить. Следовательно, люциферазная активность локализуется между NAD(P)H-дегидрогеназой и монооксигеназой — цитохромом P-450. И сразу напрашивается вывод о гетерогенном строении бактериальной люминесцентной системы.

Более сложное, чем казалось ранее, строение люциферазы из бактерий *P. fischeri*, подтверждают некоторые наши наблюдения [83]. Если разрушение люминесцентных бактерий и экстракцию белков проводить в мягких условиях, значительная часть люциферазной активности остается связанной с мембранной фракцией. Введение в систему EDTA и лизоцима приводило к значительному сжатию общей активности, но не позволяло достичь полной экстракции люциферазы из мембран. Только использование детергентов типа тритона X-100 и ультразвука привело к полному извлечению фермента в раствор. Фракционирование сульфатом аммония бесклеточного экстракта выявило интересную особенность люциферазы — широкий диапазон ее высаливания (20—90% насыщения). Этот факт можно рассматривать как определенное указание на гетерогенность фермента. Растворение сульфатаммонийного осадка в буфере без детергента приводит к спонтанному образованию надмолекулярных структур, содержащих значительное количество люциферазы, которые могут быть осаждены ультрацентрифугированием при 105 000g в течение 60 мин. Фильтрация этого раствора через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм вызывало ускорение агрегации, причем фильтрат содержал не более 5—10% исходной ферментативной активности. Кроме того, анализ препаратов люциферазы при помощи гель-хроматографии на сефадексах G-10, G-25 и G-75 показал наличие нескольких пиков люминесцентной активности.

Сложная структура люциферазы и утверждение, что активным является только полный комплекс, подтверждаются данными, полученными нами [83] в опытах с использованием денатурирующих агентов, таких, как мочевины, Nuamine 10-X и додецилсульфат натрия. Внесение этих веществ в инкубационную смесь или предварительная обработка ими фермента приводили к полной потере активности, которая восстанавливалась после диализа и инкубации в присутствии дигитоксина и альбумина. Анализ очищенного препарата люциферазы при помощи электрофореза в

полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показал, что диссоциированный комплекс содержит два компонента с  $M$  23 000 и  $M$  19 800 и, вероятно, более низкомолекулярные компоненты. Подобные результаты были получены ранее и другими исследователями [27]. Картина, наблюдаемая при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия, а также при аналитической гель-фильтрации, была идентична для растворимой и мембранной фракций люциферазы. Это и другие наблюдения позволили нам предположить, что чисто растворимой люциферазы не существует и этот фермент является мембранным. Тогда существование «растворимой» люциферазы может быть обусловлено особенностями строения мембран светящихся бактерий, позволяющими части люциферазного комплекса достаточно легко выходить в гидрофильную среду.

Очищенная на анионообменниках (DEAE- и TEAE-целлюлоза) фракция люциферазы при препаративном электрофорезе в полиакриламидном геле, последующей хроматографии на магний-силикате (флорисил) и таких катионообменниках, как фосфоцеллюлоза и SP-сефадекс, полностью теряла люциферазную активность. При этом наблюдали разделение препаратов на несколько (не более четырех) неактивных компонентов, смешивание которых приводило к ренатурации активной люциферазы.

Для выяснения числа компонентов, входящих в люциферазный комплекс, был использован метод аналитического изофокусирования в полиакриламидном геле с амфоллинами. Препарат высокоочищенной люциферазы содержал четыре белковых компонента, различающихся по своим изоэлектрическим точкам.

Одним из компонентов может быть цитохром P-450. Поскольку свечение этого препарата стимулируется NADH и NADPH, логично предположить, что еще одним компонентом должна быть NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза. Имеющиеся в литературе данные говорят о том, что люцифераза и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза тесно связаны, и если получить оксидоредуктазу, не содержащую люциферазной активности, не представляет большого труда, то получение активной люциферазы без оксидоредуктазной активности затруднительно [27, 72, 84, 85].

В наших экспериментах [83] рехроматографией на TEAE-целлюлозе, а также хроматографией на фосфоцеллюлозе удалось разделить фракцию, содержащую NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазную активность, на два компонента. Один из них осуществлял дегидрирование NADH и обладал диафоразной активностью. Другой же не имел никакой ферментативной активности, но обладал способностью стимулировать NADH:FMN-оксидоредуктазную активность, т. е. был флавопротеидом. Оба компонента содержали связанный FMN и/или FAD. Результаты экспериментов позволили предположить субъединичное строение оксидоредуктазы, которая, очевидно, является двухфлавиновым димером, причем вес и заряд субъединиц весьма близок. Обе субъединицы были минорными компонентами люциферазного комплекса. То, что обнаруженный нами флавопротеид стимулировал свечение люциферазы при неферментативном восстановлении FMN, наводит на мысль, что он является активным компонентом люциферазы и, вероятно, входит в состав излучательного звена. Итак, мы нашли место связывания последнего субстрата биoluminesцентной реакции — флавина. Подобное усиление свечения люциферазы *P. phosphoreum* происходило при добавлении белка люмазина с протетической группой 6,7-диметил-8-рибтиллюмазином [86].

Помимо этого в элюате с TEAE-целлюлозы нами обнаружена низкомолекулярная фракция со спектральными характеристиками железосеросодержащих белков, типичных участников цепи гидроксирования бактерий [87]. Этот белок, получивший название «люмиредоксин» [80], при определенных концентрациях значительно стимулировал и свечение препаратов бактериальной люциферазы. При добавлении фракции люми-

редоксина к NADH:FMN-оксидоредуктазе появлялась NADH:цит. с (цит. P-450)-редуктазная активность. Все это свидетельствует в пользу предположения, что в люминесцентной системе может быть специфичный железосодержащий белок. Тип этого белка еще предстоит установить.

Следовательно, система может состоять из четырех компонентов, и люминесцентная электронтранспортная цепь бактерий такова: субстраты → NAD(P)H → NAD(P)H-дегидрогеназа → эмиттерный флавопротеид → люмиредоксин → цитохром P-450 → O<sub>2</sub>. Структурная схема строения биологической люминесцентной цепи бактерий, отражающая суть нашей гипотезы, представлена на рис. 3. Помимо указанных четырех структурных компонентов в биологической люминесцентной системе, очевидно, важную роль играют фосфолипиды. Фосфолипиды стабилизируют цитохром P-450 в активной конформации и необходимы для получения активности в реконструированных гидроксилирующих системах [88]. Электронный транспорт во многом зависит от структурной организации системы цитохрома P-450. То, что фосфолипиды необходимы для нормального функционирования бактериальной люциферазы, подтверждается нашими опытами по тушению люминесценции очищенного фермента фосфолипазой A<sub>2</sub><sup>\*</sup>.

С целью проверки мультиферментного строения люциферазы нами исследована способность тушения свечения препарата люциферазы *P. fischeri* классическими акцепторами электронов и ингибиторами дегидрогеназ [89]. При этом нас интересовал механизм (конкурентный, смешанный или неконкурентный) взаимодействия ингибиторов с субстратами реакции свечения NADH (функция дегидрогеназы), FMN<sub>2</sub> (функция флавопротеида), RCHO (функция P-450), а также влияние их на скорость восстановления цитохрома с (функция люмиредоксина). Ингибиторный анализ подтвердил предложенную схему, были конкретизированы и определены компоненты, непосредственно взаимодействующие с ингибиторами [89]. С позиций строения люциферазы как индивидуального белка эти результаты объяснить затруднительно.

Нетрудно заметить, что предлагаемая мультиферментная модель люциферазы принципиально отличается от существующих воззрений на фермент как индивидуальный белок с двумя субъединицами. К такой организации люциферазы мы пришли, исходя в основном из ее функциональной роли — чувствительности бактериальной биологической люминесценции к различным гидрофобным соединениям. Почему же исследователи не обнаружили до сих пор четырех структурных компонентов или в крайнем случае металла в препаратах высокоочищенной люциферазы? Нам кажется, это связано с условиями хроматографии мультиферментного комплекса. Элюируемая с колонки, например с ионообменника, максимальная люциферазная активность — это оптимальное соотношение входящих в комплекс компонентов, причем в весьма малых количествах [83]. При этом сами компоненты элюируются при ионной силе раствора, отличной от ионной силы элюции люциферазной активности. Каждый компонент необходим для свечения, но увеличение мольного отношения одного из них к другим выше некой величины должно приводить уже не к увеличению интенсивности свечения, а к его ингибированию. Уместно напомнить о работах [86, 90] по обнаружению фракций, стимулировавших свечение люциферазы.

Приведем краткую характеристику возможных компонентов люминесцентной цепи бактерий. Свечение *in vivo* реализуется при функционировании всех четырех компонентов цепи переноса электронов. Фермент NAD(P)H — дегидрогеназа не специфичен и может быть взят из других источников. Не исключено, что дегидрогеназа, несущая диафоразную активность, содержит в качестве протетической группы флавин [83]. Если

\* Неопубликованные данные.

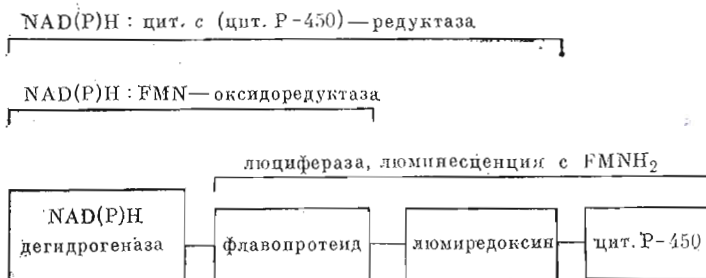


Рис. 3. Мультиферментная модель бактериальной люциферазы

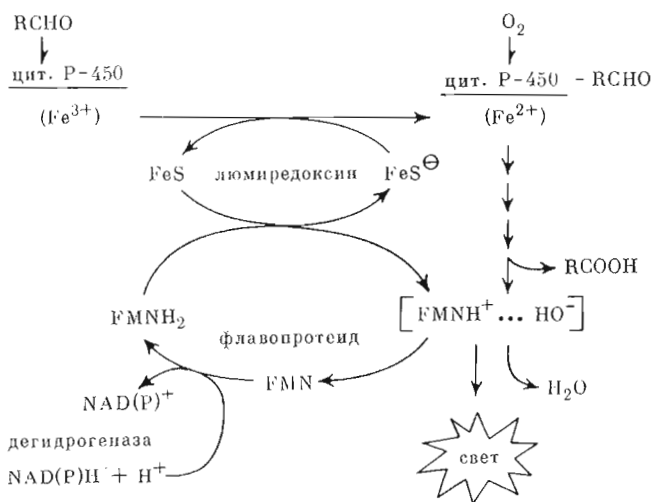


Рис. 4. Схема функционирования бактериальной люциферазы как мультиферментного комплекса

это справедливо, то снимается противоречие гипотез о количестве флавинов (два или один), участвующих в акте свечения [13, 58].

Флавопротеид является каталитически неактивным. Вместе с NAD(P)H — дегидрогеназой он образует фермент NAD(P)H:FMN — оксидоредуктазу. Вес и заряд флавопротеида и дегидрогеназы, очевидно, весьма близки. Флавопротеид, вероятно, специфичен для реакции биolumинесценции. Он достаточно лабилен, и константа диссоциации фламина может меняться в широких пределах, вызывая изменения в интенсивности свечения. Так, нами проведено разделение люциферазы светящегося и «тусклого» штаммов *P. fischeri* на структурные компоненты и показано, что низкая интенсивность свечения последних связана с дефектом во флавопротеиде вследствие изменения константы диссоциации FMNH<sub>2</sub> [90]. Замена этого компонента на флавопротеид из ярко светящегося штамма приводила к резкому увеличению интенсивности свечения реконструированной системы.

Люмиредоксин, как и другие железосеросодержащие белки, выполняет редуктазную роль в реакциях гидроксирования [87]. В восстановленном состоянии он является донором электронов для реакций гидроксирования (в случае алифатического альдегида — реакции свечения). В комплексе с NAD(P)H-дегидрогеназой и флавопротеидом он образует фермент NAD(P)H:цит. с (цит. P-450) — редуктазу.

Цитохром P-450 — цитохром *b*-типа, и он осуществляет связывание субстратов гидроксирования. Гемопротеид выполняет роль своеобразного рецепторного белка, являясь специфичным не по отношению к одному

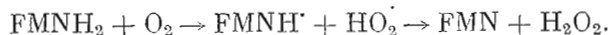
субстрату, а взаимодействуя с определенными классами соединений. Наши наблюдения показывают, что Р-450 из люминесцентных бактерий обладает довольно широкой субстратной специфичностью [80, 82]. Стадия активации молекулярного кислорода, которая, как показано, сопровождает и реакцию биолюминесценции бактериальной люциферазы [36] и предположена в ряде схем функционирования фермента [5, 35, 63], необходима для гидроксилирования и характерна для цитохромов Р-450 из различных источников [77]. Цитохром Р-450 катализирует восстановление молекулярного кислорода до воды в присутствии различных субстратов. Молекула воды, как известно, один из конечных продуктов реакции биолюминесценции. Одна из SH-групп цитохрома входит в состав активного центра и участвует в переносе электронов [77, 78]. Здесь уместно напомнить о лабильной SH-группе люциферазы [15, 16]. Реакции с участием цитохрома Р-450 характеризуются довольно низкими числами оборотов в следствии наличия в реакционной последовательности долгоживущих интермедиатов [77]. И в данном случае аналогия с люциферазой паразитерна. Цитохром Р-450 характеризуется высоким сродством к кислороду и резкой активацией реакции гидроксилирования при освещении (сравним со световозбудимой люциферазой).

Как функционирует мультиферментный комплекс? Структурно-функциональная схема приведена на рис. 4. Присоединение алифатического альдегида посредством гидрофобного взаимодействия к окисленному цитохрому Р-450 является первым этапом биолюминесцентной реакции. При этом образуется первый интермедиат реакции.



Цитохром Р-450 может акцептировать электроны только в присутствии субстратов, которые повышают его редокс-потенциал [77]. Образование интермедиата не означает осуществления реакции окисления альдегида. Для этого необходимо функционирование NAD(P)H-зависимой цепи переноса электронов. NAD(P)H:FMN — оксидоредуктаза восстанавливает FMN на структурном флавопротеиде согласно реакции (2).

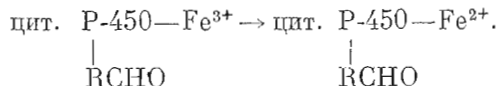
Если не произошло связывания какого-либо субстрата с цитохромом, то FMNH<sub>2</sub> может аутоокисляться в реакции с молекулярным кислородом:



В биолюминесцентной реакции FMNH<sub>2</sub> через переносчик люмиредоксин восстанавливает цитохром Р-450, отдавая протон и два электрона. На флавопротеиде образуется семихинон в заряженной или нейтральной форме. В настоящее время мы отдаем предпочтение катиону семихинона.



При восстановлении цитохрома Р-450 образуется второй интермедиат:

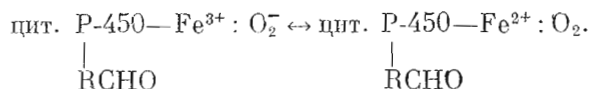


На некотором неустановленном по последовательности этапе гем цитохрома акцептирует молекулярный кислород и активирует его. Какая форма активированного кислорода образуется на гемопротеиде? Считается, что в реакциях гидроксилирования, например в *Pseudomonas putida*, на цитохроме Р-450 образуется O<sub>2</sub><sup>-</sup> [87]. Вполне вероятно, что супероксид образуется и в реакциях люциферазы. Неудачные попытки заингибировать свечение супероксиддисмутазой [35] не дают окончательного отрицательного ответа, поскольку известно, что в некоторых системах O<sub>2</sub><sup>-</sup> трудно

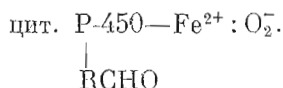


определим. Более того, вероятно, сам  $O_2^-$  не служит гидроксيليрующим агентом [91], но является существенным промежуточным видом в реакциях гидрокселирования. Возможно, на гемопротейде образуются другие формы активированного кислорода, например  $O_2^{2-}$  [92]. Этот вопрос требует дальнейших исследований. Для нас важно, что активированная форма кислорода образуется. Пусть этой формой в схеме будет  $O_2^-$ .

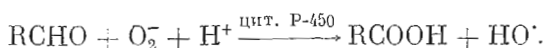
Активация кислорода приводит к образованию следующих интермедиатов [87]:



Перенос еще одного электрона от лопиредоксина ведет к появлению еще одного долгоживущего интермедиата:



Дальнейшее развитие процесса лимитирует разрыв C—H-связи в молекуле альдегида. Показано, что разрыв C—H-связи, который происходит на последних этапах в реакциях с цитохромом P-450, является лимитирующей стадией в гидрокселировании жирных кислот и стероидов [77, 79]. К аналогичному выводу приводит нас обнаруженный изотопный эффект реакции альдегида с люциферазой [93]. Происходит окисление альдегида до кислоты:



Образование радикала гидроксила в реакциях с участием цитохрома P-450 показано ранее [94]. При физиологических условиях в клетке радикал гидроксила превращается легко в ион гидроксила,  $HO^-$  [92], который образует комплекс с переносом заряда с  $FMNH^+$ . Избыточная свободная энергия реакции окисления альдегида ( $\Delta G$ ) активирует этот комплекс. Термодинамические параметры окисления алифатических альдегидов в реакции с бактериальной люциферазой рассмотрены в работе [95]. Происходит реакция образования конечных продуктов реакции  $FMN$ ,  $H_2O$  и высвечивание кванта света



По предлагаемой гипотезе общая реакция бактериальной биолюминесценции (1) остается неизменной.

Развивая мультиферментную гипотезу строения бактериальной люциферазы, мы приходим к очевидному выводу, что люминесцентная цепь в принципе аналогична многим гидрокселирующим системам от бактерий до микросом [77, 87, 92], в которых осуществляются подобные процессы, но без видимого свечения. В чем же специфика реакции бактериальной люциферазы с альдегидом и почему камфора, диметиланилин, 3,4-бензпирен и другие субстраты P-450 не только не индуцируют свечение, но и эффективно его тушат [74, 80, 82]. Во всех случаях на гемопротейде должен образовываться необходимый для свечения активированный кислород. В дальнейшем различие в процессах, очевидно, регулируется на уровне взаимодействия субстратов с цитохромом.

Мы обратили внимание на возможность связывания алифатических углеводов с SH-группой апофермента, входящей в активный центр гемопротейда или вблизи него [77]. При этом осуществляется прооксидативная функция цитохрома P-450, активность которого не ингибируется при

низком содержании CO, но эффективно ингибируется соединениями типа SKF-525A [96]. Связывание альдегида с SH-группой подтверждается защитой им тиолов люциферазы от различных гидрофобных алкилирующих агентов [16]. Легко заметить, что эти экспериментальные данные находятся в серьезном противоречии с предположением о связывании алифатического альдегида с пероксифлавином [13, 19]. Наши исследования показали, что гидрофобная емкость, где происходит связывание альдегидов, на цитохроме P-450 *P. fischeri*, ограничена объемом около  $900 \text{ \AA}^3$ , что не позволяет более крупным молекулам — ингибиторам свечения — связываться в одном месте с альдегидом [97]. Различием в месте связывания можно объяснить отсутствие свечения при действии полициклических соединений. Однако скорее всего такие соединения, как алифатические спирты, алканы, связываются в одном месте с субстратом свечения — альдегидом. Следовательно, место связывания субстратов на P-450 не может определять наличие свечения. На наш взгляд, различие в поведении люминесцентной цепи на введении альдегида (реакция со свечением) или других субстратов P-450 (реакция без свечения) заключается в том, что в первом случае свободная энергия реакции окисления альдегида достаточна для возбуждения комплекса с переносом заряда (реакция 3). Во втором случае избыточной свободной энергии реакции нет, «эмиттер» не возбуждается, поэтому нет свечения. В остальном, кроме промежуточной стадии в реакции (3), химизм взаимодействия этих соединений с P-450 описывается подобно взаимодействию цитохрома с альдегидом.

Существенные различия предложенной мультиферментной модели [80] и существующих гипотез о строении и функции бактериальной люциферазы очевидны. По нашим представлениям, люцифераза не индивидуальный белок, а сложный комплекс, состоящий из трех структурных единиц, каждая из которых необходима для эффективной трансформации химической энергии в световую. Согласно схеме Гастингса (схема 1), флаavin, альдегид и кислород связываются в одном месте на  $\alpha$ -субъединице фермента. По нашей схеме, субстраты связываются на конкретных белках (FMNH<sub>2</sub> — на флавопротеиде, RCHO и O<sub>2</sub> — на цитохроме P-450). Последовательность взаимодействия субстратов также несколько иная. Свечение препаратов фермента без добавляемого альдегида, свечение при низких температурах и опыты с гидроксиламином — все это ранее привело к заключению, что альдегид вступает в реакцию последним и способен лишь изменять конформацию люциферазы, тем самым облегчая эмиссию света [33]. Мы придерживаемся альтернативной точки зрения и поддерживаем выводы авторов работы [8], считающих, что первым из субстратов с люциферазой взаимодействует альдегид. Более того, мы считаем, что без альдегида свечение невозможно. Наблюдаемое свечение «без добавленного альдегида» хорошо объясняется свойствами цитохрома P-450, всегда несущего с собой при хроматографии липидные компоненты. В рамках участия P-450 в люминесцентной цепи конкретизирована гидрофобная природа взаимодействия альдегида, объяснены процессы активации кислорода и разрыва C—H-связи в альдегиде.

При рассмотрении возможной природы эмиттера ранее высказывались соображения о необходимости введения понятия переноса энергии [35, 63]. Эмиттер представляется нам в виде комплекса с переносом заряда FMNH<sup>+</sup>...HO<sup>-</sup>, что подразумевает определенную кооперативность взаимодействия FMNH<sub>2</sub> и альдегида. В пользу этого свидетельствует также то, что время свечения люциферазы с FMNH<sub>2</sub> намного больше времени его автоокисления [99].

Вместе с тем мультиферментная модель имеет и общие черты с ранними гипотезами. Осталась без изменения общая реакция свечения *in vitro* — реакция (1). Сохранено представление о наличии в реакционной последовательности долгоживущих интермедиатов. Сохранена концепция об участии в реакциях биолюминесценции активированного кислорода

[5, 35]. Эмиттерный вид  $FMNH^+ \dots NO^-$  по существу близок к  $FMNH^+ \dots O_2^-$ , предложенному ранее [35]. Кстати, авторы работы [35] искали аналогию между люциферазой и некоей системой, где флавин функционирует посередине. Они указали на близкие черты люциферазы и системы P-450, но, к сожалению, без объяснения, сочли аналогию нереальной.

Действительно, после устоявшихся представлений о люциферазе как о просто устроенном индивидуальном белке трудно сразу перестроиться на восприятие ее как более сложно устроенной системы. Поскольку наличие цитохрома P-450 и связывание им субстрата биоломинесценции — алифатического альдегида — показано экспериментально [80, 98], оппоненты мультиферментной гипотезы могут предложить следующий вариант. Во-первых, в люминесцентных бактериях имеются две независимые системы, связывающие и окисляющие альдегид: люцифераза (реакция со свечением) и цитохромом P-450 (реакция без свечения). Во-вторых, люцифераза способна связывать самые разнообразные гидрофобные соединения, что и приводит к тушению биоломинесценции. Каким образом можно разрешить эти вопросы? Непосредственные опыты по разработке и реконструкции мультиферментного комплекса могли бы дать однозначный ответ об обязательном участии цитохрома P-450 в световой реакции. К сожалению, предварительные эксперименты, проведенные в нашей лаборатории, не дали пока положительного ответа. Получить фракцию цитохрома P-450 без люциферазной активности оказалось довольно трудной задачей. Однако ряд наблюдений говорит о том, что цитохром P-450 действительно может быть необходимым компонентом люциферазы:

- 1) по своим спектральным характеристикам комплекс альдегид—люцифераза идентичен хорошо известным комплексам субстрат—цитохром P-450;

- 2) широкая субстратная специфичность люциферазы от алканов до полициклических углеводов также присуща именно цитохрому P-450;

- 3) совпадение константы связывания альдегида с цитохромом P-450 и константы Михаэлиса реакции биоломинесценции, стимулируемой альдегидом. Обе константы измерены в одинаковых условиях двумя независимыми методами — спектральным и биоломинесцентным;

- 4) корреляция между степенью гидрофобности химического соединения и степенью ингибирования люминесценции;

- 5) не обнаружен какой-либо субстрат цитохрома P-450, который не ингибировал бы свечение люциферазы;

- 6) трудно объяснить ингибирование свечения субстратами цитохрома P-450 вследствие конкуренции за восстановленные пиридинуклеотиды, поскольку ингибируется чисто «люциферазная реакция» — свечение, стимулируемое  $FMNH_2$ .

Предложенный механизм бактериальной биоломинесценции, основанный на мультиферментной модели, чтобы завоевать право на жизнь, должен пройти экспериментальную проверку. Еще предстоит представить дополнительные доказательства, что флавопротеид, железосеросодержащий белок и цитохром P-450 — существенные компоненты люминесцентной цепи, и изучить их природу. Необходимо в рамках модели объяснить структуру наблюдаемых  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц как возможную комбинацию входящих в состав комплекса компонентов. Из нашей модели, как и из схемы [63], вытекает следствие о вовлечении в процесс биоломинесценции бактерий свободнорадикальных реакций. Экспериментальных доказательств этому пока нет, хотя в работе [72] показано тушение свечения бактериальной люциферазы некоторыми ингибиторами свободных радикалов. Нет пока доказательств и наличия в люциферазе ионов металла. Однако если принять, что количество люциферазы равно количеству цитохрома P-450 (порядка  $10^{-11}$  M), то содержание металла в препарате очищенной люциферазы будет на много порядков ниже, нежели ожидалось ранее.

Вместе с тем гипотеза хорошо объясняет многие явления и свойства светящихся бактерий и люциферазы. В частности, понятны становятся отмеченные выше противоречия в величинах молекулярных весов фермента (от  $M$  20 000 до  $M$  80 000) [21, 27]. В рамках свойств цитохрома P-450 находят объяснения высокая чувствительность люминесценции бактерий к различным гидрофобным соединениям, наличие в реакциях известных интермедиатов, высокое сродство люциферазы к кислороду, низкие числа оборота системы и другие явления. Трудно объяснимый до сих пор сдвиг максимума свечения флуоресценции как эмиттера с 530 до 490 нм связан с тем, что люминесцирует не «чистый» флавин, а флавиновый комплекс с переносом заряда.

Вопросы биосинтеза люциферазы также во многом связаны с синтезом гемопротейда. Известно, что синтез цитохрома P-450 индуцируем. Задержка свечения бактерий при их культивировании на сложной среде может быть объяснена тем, что многие органические соединения, присутствующие в среде культивирования, утилизируются системой гидроксилирования, т. е. люциферазой, конкурируя при этом с альдегидом, и вызывают тушение биолюминесценции. Одновременно эти соединения могут индуцировать синтез гемопротейда. Предварительные результаты, полученные в нашей лаборатории, подтверждают это предположение. После полной утилизации соединений наблюдается более высокое свечение клеток, что и является эффектом «аутоиндукции».

Большая лабильность люминесцентных бактерий, появление спонтанных мутантов, вероятно, связаны в первую очередь с лабильностью флуоропротейда (константа диссоциации флавина) и апофермента цитохрома P-450.

В течение многих лет продолжается дискуссия о функциональной роли биолюминесценции бактерий [12, 38, 100]. Ранее [12] господствовало мнение о нефункциональной (рудиментарной) роли. В настоящее время большинство авторов считают, что биолюминесценция не только имеет функциональное значение, но и дает светящимся бактериям определенные преимущества в выживаемости перед другими нелюминесцирующими видами [38]. Если предложенный нами механизм биолюминесценции бактерий отражает действительность, то биолюминесценция нефункциональна и не дает светящимся видам никаких преимуществ. Биологическая функция люциферазы, как ни парадоксально, не в генерации квантов света, а в окислении природных гидрофобных соединений и защите клетки от различных ксенобиотиков. Не исключено, что так называемые темновые штаммы, или К-варианты светящихся бактерий, обладают более активной «люциферазой», чем светящиеся формы. По своей природе бактериальная люцифераза является оксидазой смешанных функций, внешней цитохром-P-450-зависимой монооксигеназой, гидроксилирующей самые разнообразные гидрофобные химические соединения. В этом и может состоять приспособление морских светящихся бактерий к обитанию в окружающей среде.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cormier M. J., Strehler B. L. J. Amer. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 5, p. 4864–4865.
2. Strehler B. L., Cormier M. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1953, v. 47, № 1, p. 16–33.
3. McElroy W. D., Hastings J. W., Sonnenfeld V., Coulombre J. Science, 1953, v. 118, № 3069, p. 385–386.
4. Cormier M. J., Totter J. Biochim. et biophys. acta, 1957, v. 25, № 2, p. 229–237.
5. Lee J. Biochemistry, 1972, v. 11, № 18, p. 3350–3359.
6. Vigny A., Michelson A. M. Biochimie, 1974, v. 56, № 1, p. 171–176.
7. Dunn D. K., Michaliszyn G. A., Bogacki J. G., Meighen E. A. Biochemistry, 1973, v. 12, № 24, p. 4911–4918.
8. McCapra F., Hysert D. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 52, № 1, p. 298–304.
9. Balny C., Hastings J. W. Biochemistry, 1975, v. 14, № 21, p. 4719–4723.
10. Hastings J. W., Balny C. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 18, p. 7288–7293.

11. *Cormier M. J., Totter J. R.* Annual Rev. Biochem., 1964, v. 33, p. 431-458.
12. *Hastings J. W.* Annual Rev. Biochem., 1968, v. 37, p. 597-630.
13. *Hastings J. W., Nealson K. H.* Annual Rev. Microbiol., 1977, v. 31, p. 549-595.
14. *Balakrishnan C. V., Langerman N.* Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 181, № 2, p. 680-682.
15. *Nicoli M. Z., Meighen E. A., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 8, p. 2385-2392.
16. *Nicoli M. Z., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 8, p. 2393-2396.
17. *Hastings J. W., Gibson C. H. J.* Biol. Chem., 1963, v. 238, № 7, p. 2537-2554.
18. *Hastings J. W., Balny C., Le Peuch Ch., Douzou P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 12, p. 3468-3472.
19. *Hastings J. W.* Photochem. Photobiol., 1978, v. 27, № 4, p. 397-404.
20. *Hastings J. W., Weber K., Friedland J., Eberhard A., Mitchell F. W., Gunsalus A.* Biochemistry, 1969, v. 8, № 12, p. 4681-4689.
21. *Gunsalus-Meighen A., Meighen E., Nicoli Z., Nealson K. H., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1972, № 2, p. 398-404.
22. *Ruby E. G., Hastings J. W.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 22, p. 4989-4993.
23. *Friedland J. M., Hastings J. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, v. 58, № 7, p. 2336-2342.
24. *Friedland J. M., Hastings J. W.* Biochemistry, 1967, v. 6, № 14, p. 2893-2900.
25. *Jablonski E., DeLuca M.* In: Bioluminescence and chemiluminescence. Methods of enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 57, p. 202-214.
26. *Tu S.-C., Hastings J. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 1, p. 249-252.
27. *Kuwabara S., Cormier M. J., Dure L. S., Kreiss P., Pfuderer P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1963, v. 53, № 4, p. 822-828.
28. *Eley M., Lee J., Lhoste J.-M., Lee C. Y., Cormier M. J., Hemmerich P.* Biochemistry, 1970, v. 9, № 14, p. 2902-2908.
29. *Cormier M. J., Lee J., Wamper J. E.* Annual Rev. Biochem., 1975, v. 44, p. 255-272.
30. *Mitchell G., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 10, p. 2572-2576.
31. *Koka P., Lee J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 7, p. 3068-3072.
32. *Uhlitzur S., Hastings J. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 1, p. 266-269.
33. *Hastings J. W., Gibson C. H., Friedland J., Spudich J.* Bioluminescence in Progress. N. Y.: Acad. Press, 1966, p. 151-186.
34. *Chance B., Oshino R.* Bioluminescence and chemiluminescence. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 223-226.
35. *Pugel K., Michelson A. M.* Biochemie, 1972, v. 54, № 9, p. 1197-1204.
36. *Красасюк Г. А., Подоплецов А. В., Красасюк В. А., Фун А. М., Гирельзон И. И.* Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 5, с. 1247-1249.
37. *Hastings J. W., Nealson K. H.* CRC Crit. Rev. in Biochem., 1978, v. 5, p. 163-184.
38. *Nealson K. H., Hastings J. W.* Microbiol. Rev., 1979, v. 43, № 4, p. 496-518.
39. *Meighen E. A., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1974, v. 246, № 24, p. 7666-7674.
40. *Becvar J. E., Hastings J. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 9, p. 3374.
41. *Hastings J. W., Riley W. H., Massa J. J.* Biol. Chem., 1965, v. 240, № 3, p. 1473-1481.
42. *Tu S.-C., Baldwin T. O., Becvar J. E., Hastings J. W.* Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 179, № 2, p. 342-348.
43. *Watanabe T., Nakamura T. J.* Biochem., 1972, v. 72, № 3, p. 647-653.
44. *Eberhard A., Hastings J. W.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, v. 47, № 2, p. 348-353.
45. *Дузу П.* Кробиохимия. М.: Мир, 1980, с. 201.
46. *Yoshida K., Takahashi M., Nakamura T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 52, № 4, p. 1470-1474.
47. *Watanabe T., Tomita G., Nakamura R. J.* Biochem., 1974, v. 75, № 6, p. 1249-1255.
48. *Yoshida K., Takahashi M., Nakamura T. J.* Biochem., 1974, v. 75, № 3, p. 583-589.
49. *Nealson K. H., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 3, p. 888-894.
50. *Tu S.-C., Hastings J. W.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 19, p. 4310-4316.
51. *Halsey M. J., Smith E. B.* Nature, 1970, v. 227, № 5265, p. 1363-1365.
52. *Meighen E. A., MacKenzie R. E.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 8, p. 1482-1491.
53. *Nicoli M. Z., Baldwin T. O., Becvar J. E., Hastings J. W.* Flavins and Flavoproteins. Amsterdam. Elsevier, 1976, p. 87-93.
54. *Cline T. W., Hastings J. W.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 18, p. 3359-3370.
55. *Bentley D., Eberhard A., Solsky R.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 56, № 2, p. 865-868.
56. *Presswood R. P., Shannon P., Spencer R., Walsh C., Becvar J. E., Tu S.-C., Hastings J. W.* Flavins and Flavoproteins. Tokyo Press, 1980, p. 155-160.
57. *Lee J., Murphy C. L.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 53, № 1, p. 157-163.
58. *Lee J., Murphy C. L.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 10, p. 2259-2268.
59. *Baldwin T. O., Nicoli M. Z., Becvar J. E., Hastings J. W.* J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 8, p. 2763-2768.
60. *Shimomura O., Johnson F. H., Kohama Y.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 6, p. 2086-2089.
61. *McCapra F., Leeson P. D. J.* Chem. Soc. Chem. Commun., 1979, v. 3, № 1, p. 114-117.

62. Lowe G. N., Ingraham L. L., Alspodi G., Rasmussen R. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 73, № 2, p. 465-469.
63. Kosower E. M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 92, № 2, p. 356-364.
64. McElroy W. D., Green A. A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1955, v. 56, № 1, p. 240.
65. Johnson F. H., Eyring H., Steblay R., Chaplin H., Huber C., Gherardi G. J. *Gen. Physiol.*, 1945, v. 28, № 5, p. 463-537.
66. Sadana J. C., McElroy W. D. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1957, v. 67, № 1, p. 16-34.
67. Arima K., Oka T. J. *Bacteriol.*, 1965, v. 90, № 3, p. 734-743.
68. Prakash O., Sadana J. C. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1972, v. 148, № 2, p. 614-632.
69. Исмаилов А. Д., Баранова Н. А., Егоров Н. С., Данилов В. С. *Микробиология*, 1980, т. 49, № 3, с. 377-382.
70. Шумихин В. Н., Данилов В. С., Малков Ю. А., Егоров Н. С. *Биохимия*, 1980, т. 45, № 7, с. 1325-1330.
71. Баранова Н. А., Исмаилов А. Д., Егоров Н. С., Данилов В. С. *Микробиология*, 1980, т. 49, № 4, с. 477-482.
72. Lee J., Murphy C. L., Faini G. J., Baucot T. L. *Liquid scintillation counting. Recent developments*. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 403-420.
73. Johnson F. H., Plough B. J. *Cell. Compar. and Physiol.*, 1959, v. 53, № 1, p. 279-306.
74. Kössler F. *Arch. Microbiol.*, 1968, v. 64, № 1, p. 146-157.
75. Middleton A. J., Smith E. B. *Proc. Roy. Soc. London*, 1976, v. 193, № 1111, p. 173-190.
76. Sie E. H.-C., Thanos A., Jordon A. *Bioluminescence in progress*. N. Y.: Acad. Press, 1966, p. 195-201.
77. Арчаков А. И. *Микросомальное окисление*. М.: Наука, 1975.
78. Gunsalus I. C., Pederson T. C., Sligar S. G. *Annual Rev. Biochem.*, 1975, v. 44, p. 377-388.
79. Nayaishi O. *Molecular mechanisms of oxygen activation*. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 1-28.
80. Данилов В. С. *Докл. АН СССР*, 1979, т. 249, № 2, с. 477-479.
81. Leibman K. C., Hildebrandt A. G., Estabrook R. W. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1969, v. 36, № 5, p. 789-794.
82. Исмаилов А. Д., Баранова Н. А., Данилов В. С., Егоров Н. С. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 2, с. 234-239.
83. Шумихин В. Н., Данилов В. С., Егоров Н. С. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 765-772.
84. Brolin S. E., Hjerten S. *Mol. and Cell. Biochem.*, 1977, v. 17, № 2, p. 61-73.
85. Nakamura T., Matsudo K. J. *Biochem.*, 1971, v. 70, № 1, p. 35-44.
86. Gast R., Lee J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 2, p. 833-837.
87. Gunsalus I. C., Meeks J. R., Lipscomb J. D., Debrunner P., Münck E. *Molecular mechanisms of oxygen activation*. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 559-613.
88. Ingelman-Sundberg M., Gustafsson J.-A. *Biochem. Soc. Trans.*, 1975, v. 3, № 6, p. 977-985.
89. Исмаилов А. Д., Данилов В. С., Малков Ю. А., Егоров Н. С. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 1, с. 40-46.
90. Баранова Н. А., Данилов В. С., Егоров Н. С. *Докл. АН СССР*, 1980, т. 252, № 4, с. 1009-1012.
91. Hamilton G. A. *Molecular mechanisms of oxygen activation*. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 405-451.
92. Gunsalus I. C., Sligar S. G. *Adv. Enzymol.*, 1978, v. 47, № 1, p. 1-44.
93. Presswood R. P., Hastings J. W. *Photochem. Photobiol.*, 1979, v. 30, № 1, p. 93-99.
94. Ohnishi K., Lieber C. S. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, v. 191, № 2, p. 798-803.
95. Watanabe T., Nakamura T. J. *Biochem.*, 1976, v. 79, № 3, p. 489-495.
96. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.: Наука, 1972, с. 186.
97. Данилов В. С., Исмаилов А. Д., Малков Ю. А., Егоров Н. С. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 1, с. 68-74.
98. Исмаилов А. Д., Егоров Н. С., Данилов В. С. *Докл. АН СССР*, 1979, т. 249, № 2, с. 482-485.
99. Erlanger B. F., Isambert M. F., Michelson A. N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1970, v. 40, № 1, p. 70-76.
100. Harvey E. N. *Bioluminescence*. N. Y.: Acad. Press, 1952, p. 649.

Поступила в редакцию 1.VI.1981

## A MULTIENZYME MODEL FOR BACTERIAL LUCIFERASE

DANILOV V. S., EGOROV N. S.

*Biology Department M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Different hypothesis on the structure and mechanism of bacterial luciferase functioning have been examined and a new model has been suggested which can better fit all the experimental data. In terms of this model, luciferase is regarded not as an individual enzyme, but as a complex made of the three structural components: flavoprotein, a Fe-S-containing protein, and cytochrome P-450. A possible sequence of reactions leading to the light emission is proposed and functional significance of bacterial luciferase is discussed.