



УДК 577.152.1'13:577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

20S,22R-ХОЛЕСТЕРИНГИДРОКСИЛИРУЮЩЕГО ЦИТОХРОМА
P-450 ИЗ МИТОХОНДРИЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКАIV. * СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ ТЕРМОЛИТИЧЕСКОГО И ОГРАНИЧЕННОГО
ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗОВ ФРАГМЕНТА Φ_1 ; ПЕПТИДЫ
БРОМЦИАНОВОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ЦИТОХРОМА P-450.
ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

*Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б.,
Лапко А. Г., Куркина Н. С., Кириллова Н. М.,
Берикбаева Т. М., Ахрем А. А., Золотарев А. С. **

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск;

** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Проведен термолитический гидролиз малеинированного фрагмента Φ_1 , в результате которого выделено 44 пептида и определена их аминокислотная последовательность. Неперекрывающиеся термолитические пептиды фрагмента Φ_1 содержат в сумме 178 аминокислотных остатков, что составляет $\sim 71\%$ его аминокислотной последовательности. Проведено также разделение и исследование структуры некоторых триптофансодержащих пептидов, полученных при ограниченном триптическом гидролизе фрагмента Φ_1 , и завершена реконструкция полипептидной цепи данного фрагмента.

Осуществлено расщепление карбоксиметилированного цитохрома P-450 бромцианом и выделено 17 бромциановых пептидов, составляющих почти всю полипептидную цепь молекулы белка (91%). Для структурного анализа бромциановых пептидов использовали гидролиз трипсином, химотрипсином, стафилококковой глутаминовой протеиназой и BNPS-скатолом по остаткам триптофана, в результате чего изучено их строение.

Полученные данные в сумме с ранее опубликованными позволили представить полную первичную структуру холестерингидроксилирующего цитохрома P-450. Полипептидная цепь белка состоит из 481 аминокислотного остатка и имеет точную молекулярную массу 56 407.

Настоящее сообщение завершает серию статей, посвященных определению полной аминокислотной последовательности цитохрома P-450 [1–5].

На первом этапе изучения первичной структуры цитохрома P-450 был проведен его исчерпывающий гидролиз химотрипсином. Из химотриптического гидролизата выделено 66 пептидов и установлена их аминокислотная последовательность [2]. Неперекрывающиеся пептиды содержали 348 остатков, т. е. 73% аминокислот, входящих в состав цитохрома P-450. Последующая стратегия определения аминокислотной последовательности цитохрома P-450 состояла в исследовании строения индивидуальных фрагментов Φ_1 (M_r 30 000) и Φ_2 (M_r 27 000), образующихся при ограниченном трипсинолизе нативной молекулы белка. В результате изучения строения пептидов, выделенных из гидролизатов фрагментов Φ_1 и Φ_2 трипсином и протеиназой из *St. aureus*, была установлена их частичная аминокислотная последовательность [1–5].

В настоящей работе для получения более полной информации по строению фрагмента Φ_1 и характеристики его гидрофобных участков был предпринят гидролиз термוליзином. Расщепление фрагмента Φ_1 вследствие его ограниченной растворимости удалось провести лишь на малеинированном препарате фрагмента. Для первоначального разделения гидролизата использовали гель-фильтрацию на биогеле P-4 в 0,2 М аммоний-бикарбонат-

* Сообщение III см. [1].

Аминокислотная последовательность пептидов термолитического гидролиза фрагмента Φ_1 цитохрома P-450

Пептиды	Аминокислотная последовательность
Th-II-1-1	Val-Ser-Gln-Asp
Th-II-1-2	Leu-Glu-Glu-Thr
Th-II-1-3	Leu-Gly-Asn-Leu-Glu-Ser
Th-II-2	Val-Met-Ala-Pro-Glu-Ala
Th-II-3	Phe-His-Thr-Ser-Val-Pro-Leu-
Th-II-4	Ala-Glu-Lys
Th-II-5	Ile-Ile-His-Pro-Glu-Asn-Val-Ala-His-Leu
Th-II-6	Ile-Lys-Gln-Gln-Gly-Ser-Gly-Lys
Th-II-7	Ile-Ser-Thr-Lys-Thr-Pro-Arg-Pro
Th-III-1	Phe-Ile-Pro-Leu
Th-III-2	Ala-Gln-Lys-Phe
Th-III-3	Phe-Glu-Gly-Ser-Tyr-Pro-Glu-Arg
Th-IV-1	Ile-Lys-Glu-Asp
Th-IV-2	Gln-Lys-Pro
Th-IV-3-1	Leu-Asn-Thr-Glu
Th-IV-3-2	Phe-Ala-Phe-Glu-Ser
Th-IV-4-1	Ile-Glu-Asn
Th-IV-4-2	Ile-Asp-Ala
Th-IV-5	Gly-Ser-Gln-Arg
Th-IV-6	Leu-Asn-Val-Pro-Pro-Glu-Leu-Tyr-Arg
Th-IV-7-1	Phe-Asn-Lys
Th-IV-7-2	Ile-Tyr-Arg-Glu-Lys
Th-IV-8-1	Ile-Lys-Asn
Th-IV-8-2	Tyr-Gln-Lys-Pro-Ile-Gly
Th-IV-9	Tyr-Gln-Lys-Pro
Th-IV-10	Phe-Gln-Lys
Th-IV-11	Leu-Phe-Lys-Lys-Ser
Th-V-1	Val-Asn-Pro-Glu
Th-V-2-1	Ile-Thr-Asn
Th-V-2-2	Leu-Asn-Pro
Th-V-3	Leu-Gly-Asn
Th-V-4	Phe-Val-Gly-Asn
Th-V-5-1	Gly-Glu-Arg
Th-V-5-2	Leu-His-Lys-Arg
Th-V-6	Phe-Gly-Glu-Arg
Th-V-7	Phe-Lys
Th-V-8	Phe-Arg-His
Th-VI-1	Tyr-Gly-Pro
Th-VI-2	Tyr-Asp-Ile-Pro-Pro-Trp
Th-VI-3	Val-Tyr
Th-VI-4	Ile-Phe-Tyr-Gln-Asp
Th-VI-5	Leu-Tyr-His
Th-VI-6	Phe-His
Th-VI-7	Leu-Tyr-Arg-Leu

ном буфере, рН 7,8. В результате было получено 6 фракций (I—VI) (рис. 1).

Фракция I, содержащая продукты неполного расщепления фрагмента Φ_1 , не исследовалась. Разделение фракций II—IV проводили ионообменной хроматографией на пептидном анализаторе на ампексе 50W×4, а для разделения пептидов фракций V, VI использовали смолу ампекс А-5. Большинство фракций, полученных после ионообменной хроматографии, разделяли хроматографией в тонком слое целлюлозы. В результате выделены 44 пептида, аминокислотные последовательности которых установлены только с использованием деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных (табл. 1).

Неперекрывающиеся пептиды термолитического гидролиза содержали 178 аминокислотных остатков, т. е. охватывали 71% полипептидной цепи фрагмента Φ_1 .

Аминокислотная последовательность пептида Th-IV-3-2 (166—170) содержала необходимую информацию по перекрыванию пептидов G₁44

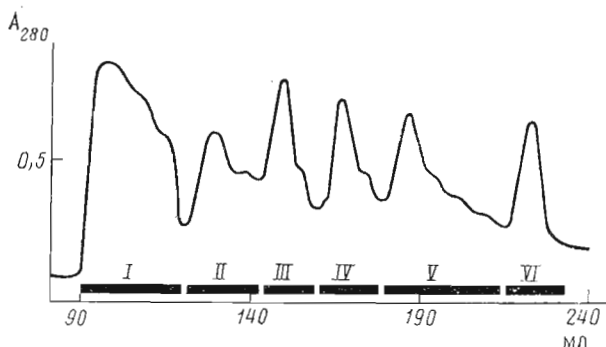


Рис. 1. Разделение пептидов, полученных при гидролизе маленированного СМ- Φ_1 термолизином, на колонке (1,5×150 см) с биогеом Р-4 в 0,2 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 7,8. Скорость элюирования 1,8 мл/ч. Здесь и далее прямоугольники на оси абсцисс — границы объединенных фракций

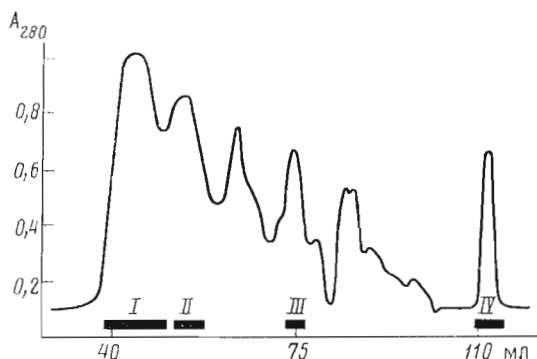
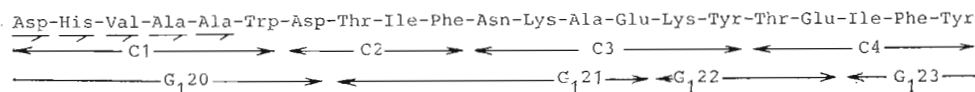


Рис. 2. Разделение пептидов, полученных при гидролизе маленированного СМ- Φ_1 трипсином, на колонке (1,5×100 см) с биогеом Р-4 в 0,25 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 7,8. Скорость элюирования 2,2 мл/ч

и G_{15} * и, следовательно, двух крупных пептидных блоков фрагмента Φ_1 , включающих в себя 169 и 74 остатка соответственно [4].

Для получения недостающей информации по реконструкции С-концевой части полипептидной цепи фрагмента Φ_1 проведен его ограниченный триптический гидролиз по остаткам аргинина с целью выделения триптофансодержащих пептидов. Гидролизат фрагмента Φ_1 первоначально разделяли гель-фильтрацией на биогеоме Р-4. В результате были выделены 4 фракции (I–IV), окрашивающиеся реактивом Эрлиха (рис. 2). Фракция I содержала смесь крупных пептидов и далее не исследовалась. Из фракции II обращенно-фазовой хроматографией на колонке с Servachrom Si 100 C8 получен 21-членный триптофансодержащий пептид T_m -II (221–240). Пептид гидролизовали химотрипсином и из полученного гидролизата методом ВЭЖХ на колонке с Ultrasphere ODS выделены 4 химотриптических пептида (С1–С4), составляющих пептид T_m -II. Установление их аминокислотной последовательности позволило реконструировать С-концевую часть фрагмента Φ_1 , т. е. соединить пептиды G_{120} – G_{123} из гидролизата фрагмента Φ_1 протеиназой из *St. aureus*:



* Здесь и далее G_1 и G_2 — пептиды гидролиза фрагментов Φ_1 и Φ_2 протеиназой из *St. aureus* (см. [4]).

где \rightarrow — стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных. Следует отметить, что пептид T_m-II образовался в результате неспецифического расщепления трипсином связи Tyr²⁴⁶-Gln²⁴⁷.

Из фракции III методом ВЭЖХ выделен пептид T_m-III (221–225), аминокислотная последовательность которого (Thr-Lys-Thr-Trp-Arg) позволила установить строение пептида G₁20 (см. [4]) и вместе с тем завершить работу по изучению полной аминокислотной последовательности фрагмента Ф₁.

Фракция IV (рис. 2) содержала гомогенный пептид T_m-IV (25–28) His-Phe-Trp-Arg, который образовался в результате неспецифического расщепления пептидной связи Tyr²⁴-His²⁵, что свидетельствовало о заметной химотриптической активности использовавшегося препарата трипсина.

По приведенным выше данным, во фрагменте Ф₁ не содержится цистеин, который был определен в нем ранее (в виде карбоксиметилцистеина) [4, 6]. Поскольку нами были получены данные о локализации протогема IX во фрагменте Ф₁ [6], предполагалось наличие в его полипептидной цепи остатка цистеина, обладающего пониженной реакционной способностью [7], который, как показано [8], является пятым лигандом гемового железа. Поэтому для карбоксиметилирования фрагмента Ф₁ после удаления гема нами проводилась его модификация моноиодуксусной кислотой в 6 М хлоргидрате гуанидина в течение более длительного времени (1,5 ч), что, вероятно, привело к модификации остатков метионина, производные которых трудно отличимы при аминокислотном анализе от карбоксиметилцистеина.

С целью проверки полученных перекрытий во фрагменте Ф₁ и реконструкции полипептидной цепи фрагмента Ф₂ было проведено расщепление карбоксиметилированного цитохрома P-450 (СМ-цитохром) бромцианом. Осуществление этой операции на всем белке было вызвано также необходимостью проверки стыковки фрагментов Ф₁ и Ф₂. Молекула цитохрома P-450 характеризуется неравномерным распределением остатков метионина по отдельным фрагментам: фрагмент Ф₁ (251 аминокислотных остатков) содержит 4 остатка метионина, в то время как Ф₂ (230 аминокислотных остатков) — 10. Образование наиболее крупных бромциановых пептидов следует ожидать из N-концевой части белка, так как С-концевая часть цитохрома P-450 характеризуется не только высоким содержанием остатков Met, но и наличием трех кислотоллабильных связей Asp-Pro.

Расщепление СМ-цитохрома P-450 проводили 24 ч в 80% муравьиной кислоте 300-кратным мольным избытком бромциана в расчете на метионин. При разделении пептидов бромцианового гидролизата был применен подход, описанный ранее [9]. Общая смесь бромциановых пептидов солибулизировалась в насыщенном растворе хлоргидрата гуанидина, и при постепенном понижении концентрации денатурирующего агента до 1 М были получены две группы пептидов. Первая группа (нерастворимые пептиды) состояла из наиболее крупных гидрофобных фрагментов цитохрома P-450, тогда как вторая (растворимые пептиды) — из сравнительно небольших фрагментов.

Пептиды первой группы разделяли на биогеле Р-30 (рис. 3). Фракция I, элюирующаяся со свободным объемом колонки, содержала пептиды в агрегированной форме, а также пептид В1. Было обнаружено, что пептидный материал, содержащийся в этой фракции, растворим в 5% уксусной кислоте. Это наблюдение было использовано для выделения пептида В1 в гомогенном виде методом гель-фильтрации на биогеле Р-10, уравновешенном 5% уксусной кислотой.

Фракция II (рис. 3) состояла из пептидов, содержащих в качестве N-концевых аминокислотных остатков фенилаланин и глицин (пептиды В5 и В13 соответственно*). Из-за нерастворимости пептидов В5 и В13

* Нумерация пептидов соответствует их расположению в полипептидной цепи белка.

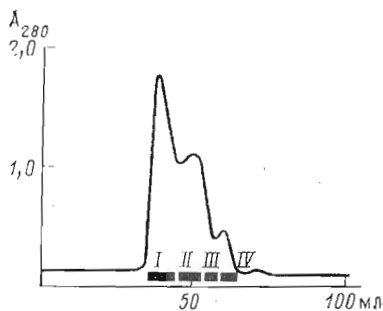


Рис. 3

Рис. 3. Разделение бромциановых пептидов первой группы на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30 в 80% муравьиной кислоте. Скорость элюирования 2,4 мл/ч

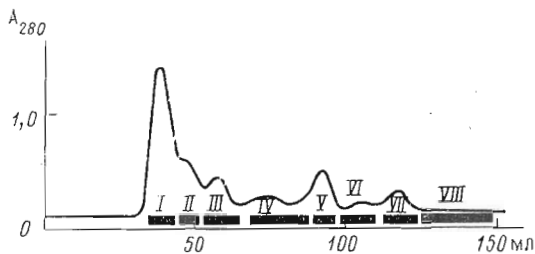


Рис. 4

Рис. 4. Разделение бромциановых пептидов второй группы на биогеле Р-30 в условиях рис. 3

в растворах с денатурирующими агентами исключалось проведение ионообменной хроматографии с целью их выделения. При хранении фракции II в 80% муравьиной кислоте в ней с помощью N-концевого анализа было обнаружено появление наряду с остатками фенилаланина и глицина дополнительного остатка пролина, что указывало на наличие в одном из пептидов кислотолабильной связи Asp-Pro. Для ускорения расщепления пептида по этой связи фракцию II выдерживали 14 сут при 37° С в 80% муравьиной кислоте. После расщепления пептидного материала по связи Asp-Pro из фракции II гель-фильтрацией на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте в гомогенном состоянии были выделены пептиды В5, В13-1, В13-2, В13-3.

Поскольку пептид В5 при гель-фильтрации характеризуется тем же удерживаемым объемом, что и фракция II, был сделан вывод, что этот пептид не расщепляется в кислых условиях. Появление во фракции II после расщепления по связи Asp-Pro трех дополнительных фрагментов и одновременное исчезновение при N-концевом анализе глицина в соответствующем пептиду В13 объеме элюента указывало на то, что пептид В13 содержит две кислотолабильные связи.

Фракции III и IV (рис. 3) содержали в основном пептиды с N-концевыми аминокислотами Ala и Val соответственно. После их фракционирования на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте на основании анализа N-концевых аминокислот узкого объема элюата были выделены в гомогенном состоянии пептиды В2 и В12.

Предварительное разделение группы водорастворимых пептидов проводили методом гель-фильтрации на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте (рис. 4). Было получено 8 пептидных фракций. Фракции I—III содержали в незначительных количествах (не более 10% по данным N-концевого анализа) ранее выделенные пептиды В1, В2 и В13, поэтому дальнейшая работа с ними не проводилась. Фракции IV—VIII, по данным N-концевого анализа, содержали несложные смеси пептидов, которые разделяли ВЭЖХ (рис. 5а—г). Таким образом, были получены гомогенные пептиды В10 (фракция IV), В4, В7+8, В6 (фракция V), В6 и В9 (фракция VI), В3, В7 и В8 (фракция VII), В7, В11 и В14 (фракция VIII).

В результате разделения бромцианового гидролизата СМ-цитохрома Р-450 было выделено 17 пептидов, аминокислотный состав которых приведен в табл. 2. Аминокислотную последовательность коротких пептидов определяли ручным вариантом метода Эдмана (в дансильной модификации). Для изучения строения крупных бромциановых фрагментов их дополнительно расщепляли трипсином, химотрипсином, протеиназой из *St. aureus*, а также BNPS-скатолом. Полученные в результате гидролиза смеси пептидов разделяли гель-фильтрацией и ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой.

Аминокислотный состав пептидов бромцианового расщепления цитохрома P-450

Аминокислота	В-1	В-2	В-3	В-4	В-5	В-6	В-7	В-8
Cys (Cm)					0,68 (1)			
Asp	9,02 (9)	6,02 (6)		2,04 (2)	6,30 (6)	1,82 (2)	1,21 (1)	
Thr	3,61 (4)	1,14 (1)		1,12 (1)	5,29 (6)	0,84 (1)	1,02 (2)	1,13 (1)
Ser	6,59 (7)	4,40 (4)			2,35 (2)		1,11 (1)	
Glu	11,58 (12)	7,23 (6)	1,92 (1)	4,43 (4)	6,46 (6)	2,16 (2)		2,24 (2)
Pro	11,10 (10)	2,77 (3)		1,12 (1)	3,57 (4)			
Gly	6,54 (8)	3,29 (3)	2,31 (2)		2,44 (1)		2,37 (2)	
Ala	2,08 (2)	2,54 (3)		2,18 (2)	3,26 (3)	1,23 (1)	1,23 (1)	
Val	5,02 (6)	3,10 (4)		1,97 (2)	3,22 (3)	1,07 (1)	0,9 (1)	
Hse	1	1	1	1	1	1	1	1
Met								
Ile	7,52 (9)	3,11 (5)		0,92 (1)	2,97 (3)	0,95 (1)		
Leu	8,58 (8)	4,50 (5)	1,14 (1)	1,14 (1)	9,02 (8)	1,93 (2)	1,14 (1)	2,21 (2)
Tyr	9,62 (10)			0,93 (1)	4,53 (5)			1,02 (1)
Phe	6,12 (6)	5,86 (6)	0,96 (1)	1,12 (1)	4,60 (5)			
His	5,06 (6)	1,76 (2)			1,93 (2)			1,07 (1)
Lys	10,00 (10)	5,10 (5)		2,00 (2)	6,00 (6)	1,00 (1)		
Arg	7,34 (8)	1,46 (1)	1,00 (1)		5,72 (6)			
Trp	3,58 (4)				1,64 (2)			
Всего остатков	120	55	7	19	70	12	10	9
N-Концевая	Ile	Ala	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Thr
Выход, %	50	12	60	72	15	78	7	4

Аминокислота	В7-8	В-9	В-10	В-11	В-12	В-13-1	В-13-2	В-13-3	В-14
Cys (Cm)								0,67 (1)	
Asp	1,21 (1)	1,12 (1)	2,08 (2)		2,46 (2)	1,04 (1)	2,12 (2)	4,42 (4)	
Thr	2,15 (3)				2,58 (3)			2,07 (2)	
Ser	1,11 (1)	1,23 (1)	1,15 (1)		1,53 (3)		1,96 (2)	1,62 (1)	
Glu	2,24 (2)	2,14 (2)	4,21 (4)	1,22 (1)	5,12 (5)			6,22 (5)	1,04 (1)
Pro					3,24 (4)		2,03 (2)	2,40 (1)	2,32 (2)
Gly	2,37 (2)		1,31 (1)		1,14 (0)	1,14 (1)		4,40 (4)	
Ala	1,23 (1)	1,14 (1)	2,24 (2)		4,11 (4)		1,23 (1)	2,37 (1)	1,42 (1)
Val	0,92 (1)	0,98 (1)	1,07 (1)		4,23 (5)			3,41 (3)	
Hse	1	1	1	1	1		1	1	
Met	0,79 (1)							0,83 (1)	
Ile			1,05 (1)		3,31 (4)			3,81 (4)	
Leu	3,35 (3)	1,08 (1)	1,85 (2)	1,06 (1)	7,60 (9)			7,20 (7)	
Tyr	1,02 (1)				2,40 (3)				
Phe					1,02 (0)		2,9 (3)	4,38 (4)	
His	1,07 (1)				1,04 (1)			1,12 (2)	
Lys			1,05 (1)		3,47 (3)		1,11 (1)	4,00 (3)	
Arg		1,07 (1)	3,13 (3)		2,00 (2)	1,00 (1)		5,00 (5)	
Trp	0,71 (1)							1,64 (2)	
Всего остатков	19	9	19	3	49	3	11	51	4
N-Концевая	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Gly	Pro	Pro	Pro
Выход, %	34	59	60	36	58	20	24	20	15

Пептид В1 (1–120) является самым крупным пептидом бромцианового расщепления цитохрома P-450 и представляет собой N-концевой фрагмент молекулы белка. Отмечена устойчивость пептида В1 к действию трипсина, химотрипсина, протеиназы из *St. aureus* вследствие его низкой растворимости в условиях гидролиза при значениях pH 7,8–8,0. Для определения аминокислотной последовательности пептида было проведено его расщепление протеиназой из *St. aureus* в 0,2 М ацетате аммония, pH 4,0. В результате разделения гидролизата гель-фильтрацией на биогеле Р-60 в 80%

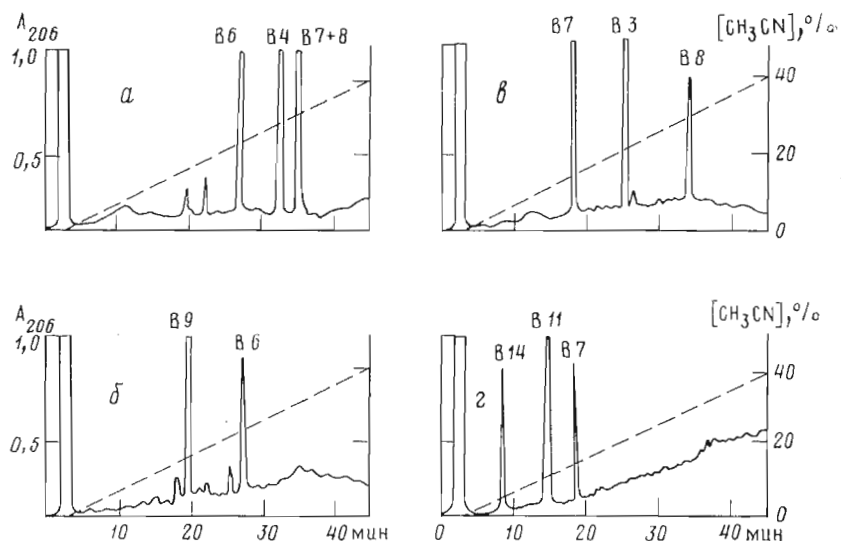


Рис. 5. Разделение пептидов фракций V (а), VI (б), VII (в), VIII (г) рис. 4 ВЭЖХ на колонке с силасорбом C_{18} в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ ацетате аммония, pH 5,7 (система В). Скорость элюирования 2 мл/мин

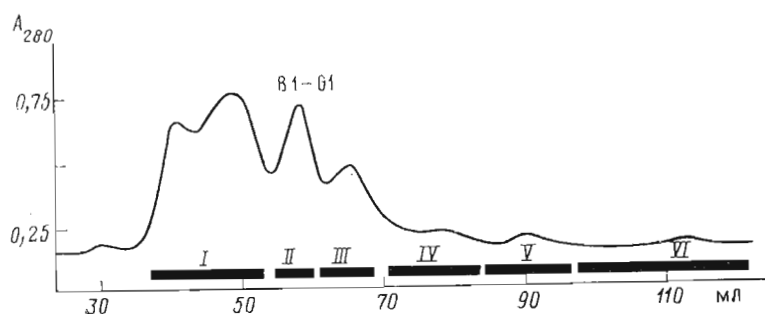


Рис. 6. Разделение пептидов, полученных при гидролизе пептида B1 протеиназой из *St. aureus*, на колонке (1,5×100 см) с биогеелем P-60 в 80% муравьиной кислоте. Скорость элюирования 4 мл/ч

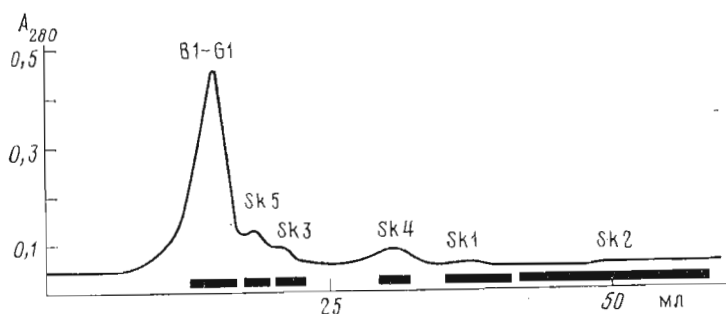


Рис. 7. Разделение пептидов, полученных при гидролизе пептида B1-G1 (рис. 6) BNPS-скатолом, на колонке (1,0×100 см) с биогеелем P-30 в 80% муравьиной кислоте. Скорость элюирования 1,5 мл/ч

муравьиной кислоте (рис. 6) был выделен 58-членный пептид, являющийся N-концевым в пептиде B1 и содержащий 4 перасцепленные связи, образованные α -карбоксильными группами глутаминовой кислоты. Остальные фрагменты (B1-G2–B1-G6), составляющие пептид B1, были выделены из полученных фракций (III–VI) методом ВЭЖХ на силасорбе C_{18} . Данные аминокислотного состава и определения N-концевой аминокислотной

последовательности пептидов В1-G2—В1-G6 (схема 1) показали, что пептид В1 включает в себя ранее изученные пептиды G₆—G₁₀ фрагмента Ф₁ [4]. С целью установления полной структуры пептида В1 его N-концевой фрагмент В1-G1 был подвергнут расщеплению по остаткам триптофана BNPS-скатолом. Смесь пептидов разделяли гель-фильтрацией на био-геле Р-30 в 80% муравьиной кислоте (рис. 7). В результате были выделены 5 гомогенных фрагментов, 2 из которых образовались вследствие неполного расщепления соответствующих связей Trp-Leu и Trp-Arg. Исследование аминокислотной последовательности выделенных пептидов (см. схему 1) подтвердило порядок расположения пептидов G₁—G₃ фрагмента Ф₁ [4]. Полученные данные в совокупности с опубликованными нами ранее [2—4] позволили установить полную аминокислотную последовательность пептида В1.

Пептид В2 (121—175). Для выяснения структуры 54-членного пептида В2 мы исследовали продукты его триптического гидролиза. С помощью ВЭЖХ из гидролизата были выделены 5 пептидов (схема 2). Установленные строения триптического пептида В2-Т-5, содержащего на С-конце остаток гомосерина, явилось дополнительным подтверждением расположения пептида G₁₅ во фрагменте Ф₁ непосредственно за G₁₄ (ср. [4]). Полная аминокислотная последовательность пептида В2 была определена на основании данных по структуре пептидов G₁₁—G₁₅ фрагмента Ф₁, описанных в работе [4].

Пептид В3 (176—182) Phe-Gly-Glu-Arg-Leu-Gly-Hse.

Пептид В4 (183—201) $\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-}\overrightarrow{\text{Pro}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gln}}\text{-}\overrightarrow{\text{Lys}}\text{-}\overrightarrow{\text{Phe}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ile}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asp}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Tyr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Lys}}\text{-}\overrightarrow{\text{Hse}}$. Строение пептида В4 было установлено в результате определения его аминокислотного состава и N-концевой последовательности с учетом ранее полученных данных по частичной аминокислотной последовательности фрагмента Ф₁ [4].

Пептид В5 (202—271) представляет собой 70-членный пептид, связывающий фрагменты Ф₁ и Ф₂ цитохрома Р-450. Его N-концевая последовательность, включающая в себя 8 аминокислотных остатков, была установлена по методу Эдмана (в дансильном варианте). Исходя из аминокислотного состава, N-концевой последовательности пептида В5 и результатов определения структуры пептидов гидролиза индивидуальных фрагментов Ф₁ и Ф₂ протеиназой из *St. aureus* [1, 4] было предложено строение данного пептида. Для подтверждения полной аминокислотной последовательности пептида В5 нами был предпринят его гидролиз химотрипсином. В результате разделения химотриптического гидролизата методом обращенно-фазовой хроматографии (рис. 8а) были выделены и охарактеризованы пептиды В5-С1—В5-С13 (схема 3).

Пептид В6 (272—283) $\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asp}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Lys}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ile}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Hse}}$ позволил перекрыть пептиды G₂₂—G₂₄, полученные при разделении гидролизата фрагмента Ф₂ протеиназой из *St. aureus*.

Пептид В7 (284—293) $\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gly}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gly}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ser}}\text{-}\overrightarrow{\text{Hse}}$. Изучение структуры пептида В7 позволило однозначно идентифицировать остаток Thr в положении 291 полипептидной цепи цитохрома Р-450.

Пептид В8 (294—302) $\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gln}}\text{-}\overrightarrow{\text{Trp}}\text{-}\overrightarrow{\text{His}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Tyr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Hse}}$.

Пептид В7+8 (284—302) $\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gly}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gly}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ser}}\text{-}\overrightarrow{\text{Met}}\text{-}\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gln}}\text{-}\overrightarrow{\text{Trp}}\text{-}\overrightarrow{\text{His}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Tyr}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Hse}}$. Дегградацией по методу Эдмана с идентификацией Dns-аминокислот была установлена последовательность первых 13 аминокислотных остатков, которая позволила доказать, что пептид В7+8 является продуктом неполного расщепления связи Met²⁹³-Thr бромцианом. Аминокислотная последовательность бромцианового фрагмента В7+8 подтвердила порядок расположения пептидов G₂₄ и G₂₅ в полипептидной цепи цитохрома Р-450.

Пептид В9 (303—311) $\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Arg}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ser}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Gln}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Hse}}$.

Пептид В10 (312—330) $\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Arg}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-}\overrightarrow{\text{Arg}}\text{-}\overrightarrow{\text{Arg}}$

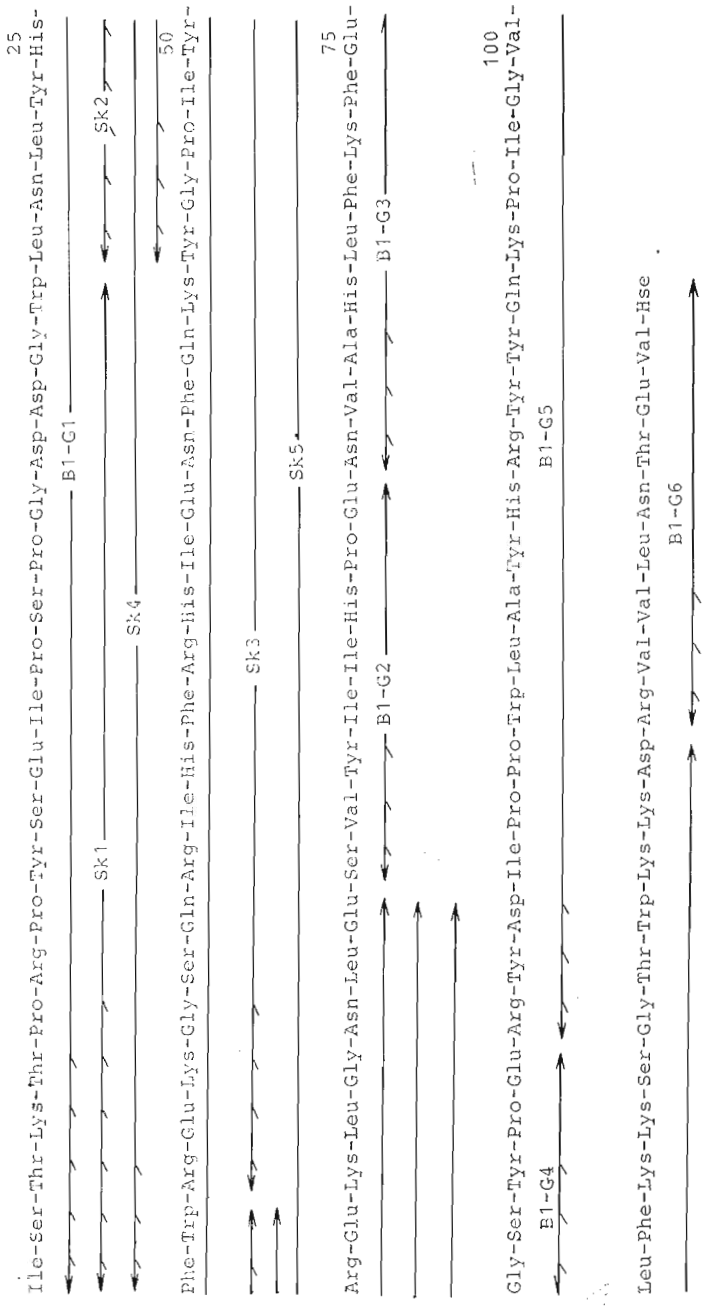


Схема 1. Структура пептида В1 - фрагмента бромидного расщепления СМ-пептихома Р-450. Обозначены пептиды, полученные при расщеплении фрагмента В1 протеиназой *St. aureus* (В1-Г) и BNPS-скатоном (Sk); стрелкой (-) здесь и далее обозначены стадии деградации по методу Эдмана в Dns-модификации

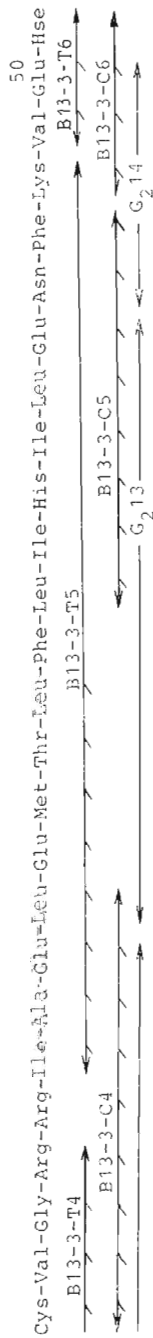
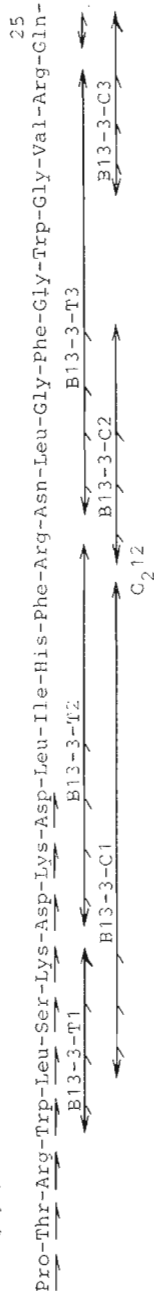
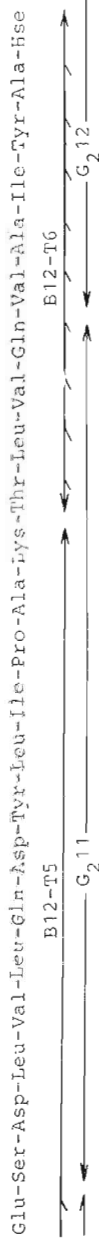
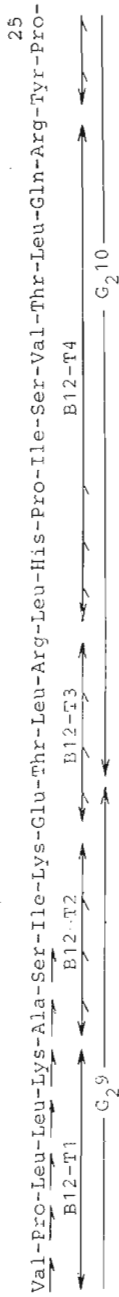
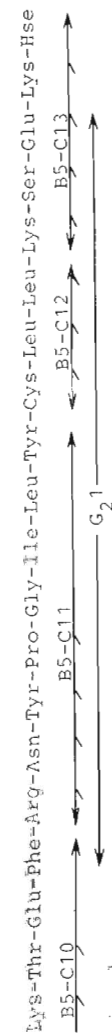
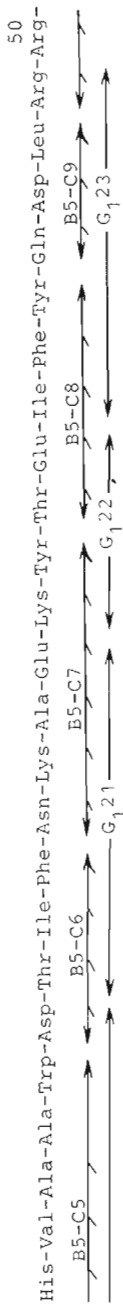
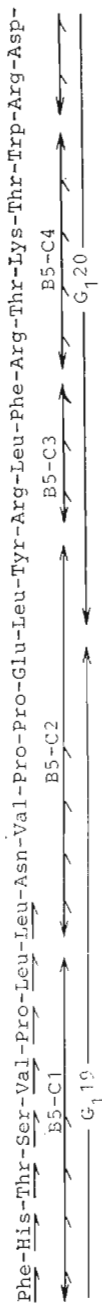
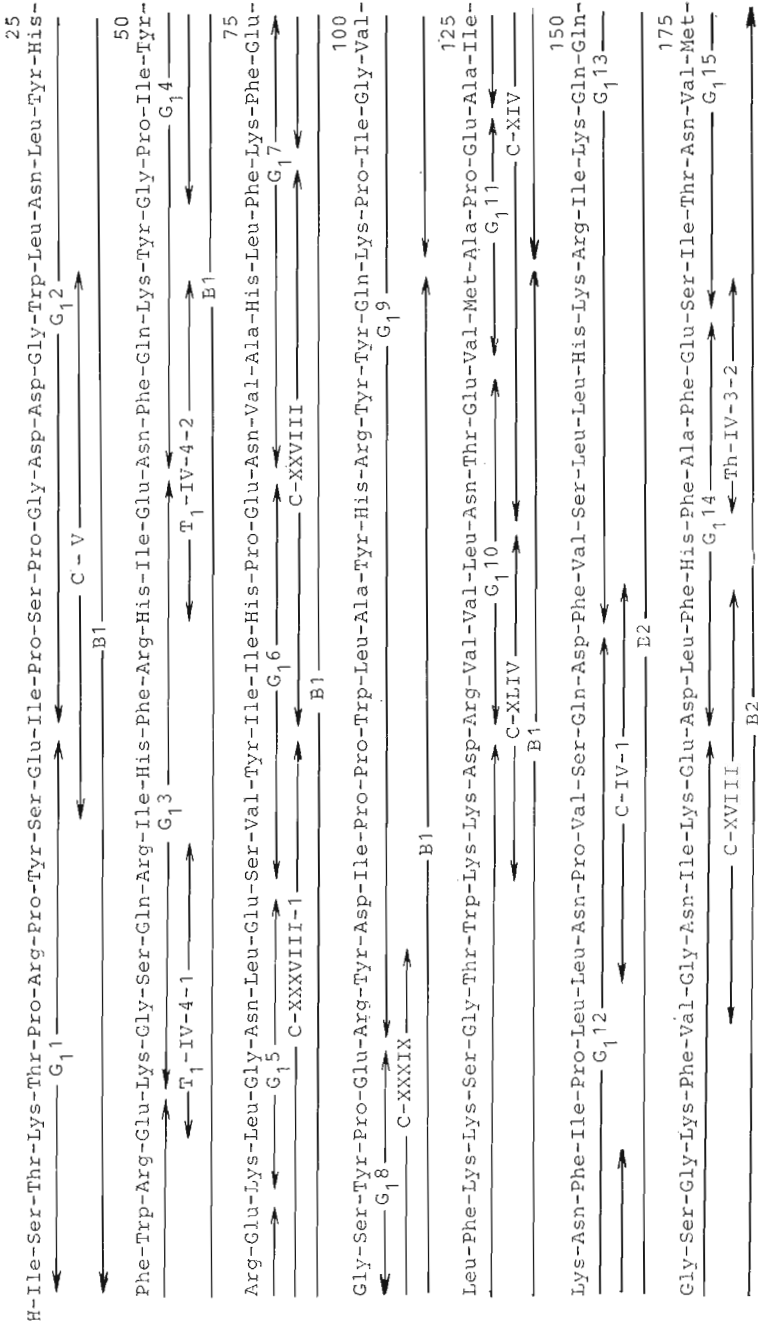
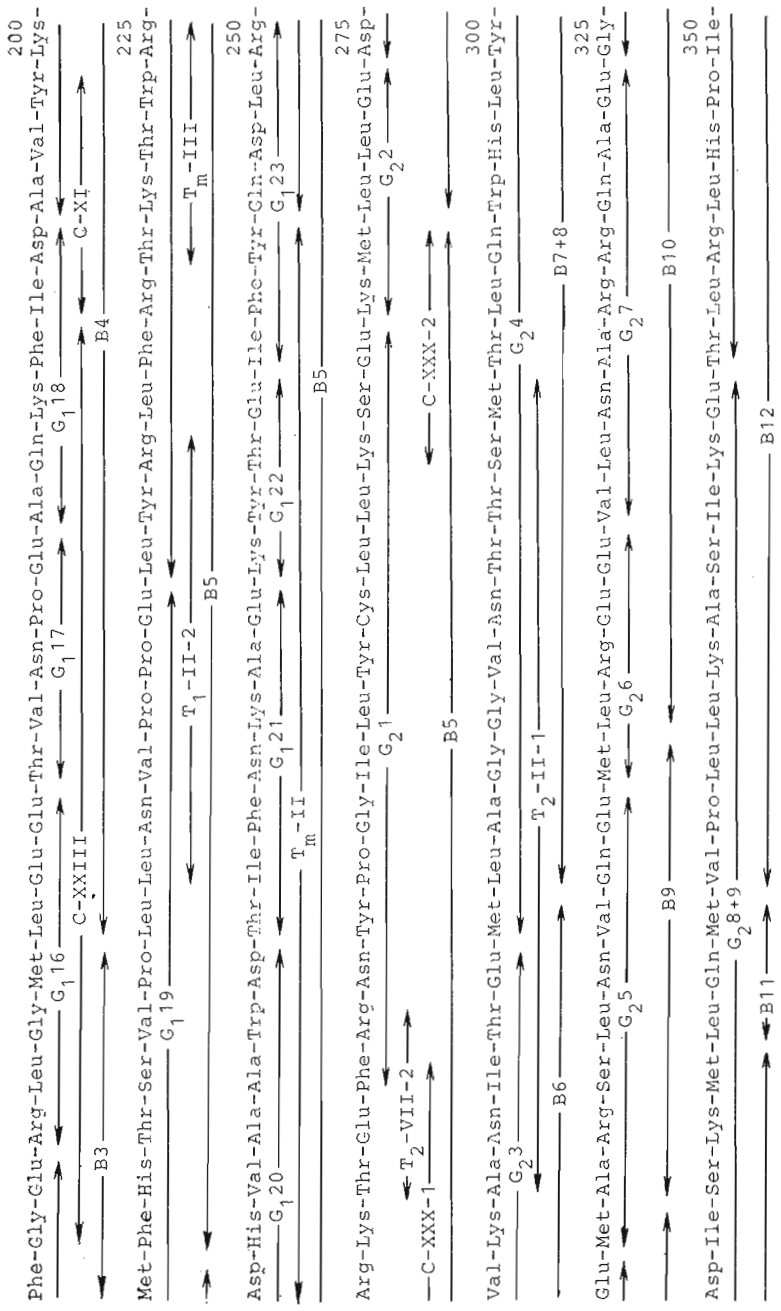


Схема 3. Структура бромидного фрагмента В5. В5-С – пептиды его химотрипсиническо-го гидролиза

Схема 4. Структура бромидного фрагмента В12. В12-Т – пептиды, полученные при расщеплении фрагмента трипсином

Схема 5. Структура бромидного фрагмента В13-3. В13-3-Т и В13-3-С – пептиды, полученные при расщеплении фрагмента В13-3 трипсином и химотрипсином





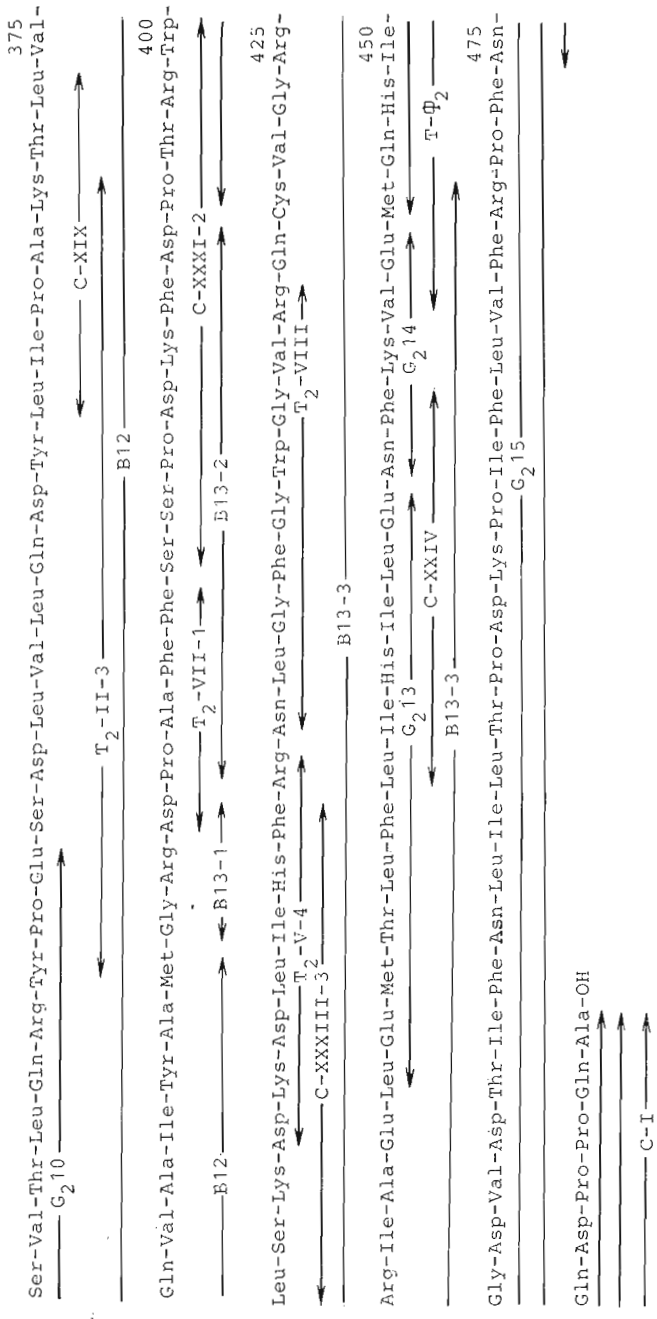


Схема 6. Полная аминокислотная последовательность пептида Р-450. Обозначения см. схемы 1-5; С - пептиды химотриптического гидролиза белка, Th - пептиды термолитического гидролиза фрагмента Ф₁, Т_м - триптофансодержащие пептиды фрагмента Ф₁, Т-Ф₂ - пептид триптического гидролиза фрагмента Ф₂, полученные в данной работе

Servachrom Si 100 C₈ после первичного разделения триптического гидролизата на биогеле Р-30 в 80% муравьиной кислоте позволило получить интересующий нас 37-членный пептид T₁Φ₂ с N-концевым остатком валина, в котором при хранении в кислых условиях отщеплялся C-концевой тетрапептид Pro-Pro-Gln-Ala. Методом Эдмана (в дансильном варианте) была установлена последовательность первых четырех аминокислотных остатков данного пептида, которая показала, что пептиды G₂14 и G₂15 фрагмента Φ₂ [1] следуют друг за другом (см. схему 6).

Результаты исследований, изложенные в настоящем сообщении, вместе с данными по первичной структуре цитохрома Р-450, полученными нами ранее (см. [1–6]), позволили завершить работу по установлению полной аминокислотной последовательности белка, полипептидная цепь которого состоит из 481 аминокислотного остатка (схема 6) и имеет M_r 56 407. Результаты определения M_r (49 000) цитохрома Р-450 и его индивидуальных фрагментов Φ₁ и Φ₂ (27 000 и 22 000) методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [6] оказались заниженными. Истинное значение молекулярных масс фрагментов Φ₁ и Φ₂ равны соответственно 29 800 и 26 600. Это расхождение является, по-видимому, результатом аномального электрофоретического поведения цитохрома Р-450 и его фрагментов Φ₁ и Φ₂, характерного для ряда интегральных мембранных белков [9]. В случае микросомного цитохрома Р-450_{LM₂} [10] результаты определения молекулярной массы электрофоретическим методом оказались на 7–13% ниже величин, установленных из результатов аминокислотной последовательности.

Оценивая распределение гидрофобных аминокислотных остатков для индивидуальных доменов цитохрома Р-450, следует отметить, что значения полярности для фрагментов Φ₁ и Φ₂ по Копальди [11] близки (42,6 и 42,2 соответственно). Это не позволяет сделать определенных выводов о преимущественном взаимодействии одного из доменов цитохрома Р-450 с митохондриальной мембраной.

Недавно была установлена нуклеотидная последовательность участка гена, кодирующего митохондриальный холестерингидроксилирующий цитохром Р-450 [12], при изучении которой были использованы ранее опубликованные нами результаты по частичной аминокислотной последовательности белка [6]. Наши данные по установлению первичной структуры цитохрома Р-450 методом белкового секвенирования совпадают с результатами, выведенными на основании исследования структуры ДНК. Единственным расхождением установленных структур является идентификация нами [4] аспарагиновой кислоты в положении 17 вместо остатка аспарагина. Это, вероятно, связано с дезамидированием аспарагина-17 в процессе выделения пептида G₁2, при изучении строения которого нами был идентифицирован этот аминокислотный остаток [4].

Поскольку спектральные свойства различных форм цитохрома Р-450 сходны, отсутствие остатка цистеина в N-концевой части цитохрома Р-450 (ХГ)* (фрагмент Φ₁) исключает возможность функционирования Cys¹³⁴ цитохрома Р-450 из *Pseudomonas putida* (Р-450_{сам}) [13] и Cys¹⁵² цитохрома Р-450_{LM₂} [10] в качестве аксиального лиганда гемового железа.

Как отмечалось авторами работы [12], в аминокислотной последовательности цитохрома Р-450 (ХГ) имеется всего лишь 1 участок высокой гомологии с микросомными цитохромами Р-450_{LM₂}, Р-450_е, Р-450_д, Р-450_с и цитохромом Р-450_{сам}, содержащий остаток Cys⁴²². Было сделано предположение, что данный остаток Cys⁴²² в молекуле цитохрома Р-450 (ХГ) — наиболее вероятный кандидат на роль аксиального лиганда гемового железа.

Ранее с помощью ковалентной хроматографии на тиопропилсефарозе нами были выделены пептиды цитохрома Р-450 (ХГ), содержащие поверхностные остатки цистеина, в том числе и пептид, включающий в себя остаток Cys⁴²² [14]. Этот факт с учетом известной высокой реакционной способности остатка Cys³⁵⁵ в гомологичном участке цитохрома

* Холестерингидроксилирующий.

P-450_{сам} [13] является довольно неожиданным ввиду общепринятого мнения о низкой реакционной способности остатка цистеина, выступающего в качестве пятого лиганда гемового атома железа [7].

В заключение необходимо отметить, что, согласно классическому представлению, при биосинтезе кортикостероидных гормонов образование прегненолона происходит в результате трех последовательных реакций (C_{22} - и C_{20} -гидроксилирования и C_{20} - C_{22} -лиазной). Предполагалось, что катализ осуществляется комплексом цитохром-P-450-зависимых ферментов (или субъединиц) без высвобождения интермедиатов в среду. Установленная нами первичная структура холестерингидроксилирующего цитохрома P-450 из митохондрий коры надпочечников быка позволила доказать, что весь трехстадийный цикл трансформации холестерина в прегненолон осуществляется одной субъединицей цитохрома P-450.

Экспериментальная часть

В работе использованы трипсин, химотрипсин (Serva, ФРГ), протеиназа из *St. aureus* (Miles, Англия), термолизин (Calbiochem, США), бромциан, BNPS-скатол (Pierce, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), хлорид, Dns-аминокислоты (Serva, ФРГ), Pth-аминокислоты (Pierce, США), β -меркаптоэтанол (Serva, ФРГ).

Выделение цитохрома P-450 и получение его индивидуальных фрагментов Φ_1 и Φ_2 проводили как описано ранее [15, 16]. Условия карбоксиметилирования белка, фрагментов Φ_1 и Φ_2 , малеинирования фрагмента Φ_1 приведены в работах [1, 2, 4].

Термолитический гидролиз фрагмента Φ_1 . Раствор 2,0 мкмоль малеинированного карбоксиметилированного фрагмента Φ_1 (СМ- Φ_1) в 5 мл 0,05 М бикарбоната аммония выдерживали 15 мин при 100° С. После охлаждения добавляли 5 мл 0,3 М бикарбоната аммония и 25% водным аммиаком доводили рН раствора до 8,3. Термолизин добавляли двумя равными порциями с интервалом 6 ч. Гидролиз проводили в течение 22 ч при 37° С и фермент-субстратном соотношении 1:75. Полученный гидролизат лиофильно высушивали.

Разделение пептидов термолитического гидролиза фрагмента Φ_1 . Гидролизат СМ- Φ_1 разделяли на колонке с биогеом P-4 (рис. 1). Полученные фракции лиофилизировали и подвергали демалеинированию, как описано в работе [4]. После предварительного обессоливания фракций на колонке (1,5×25 см) с биогеом P-2 в 30% уксусной кислоте их разделяли на пептидном анализаторе [2] в градиенте концентрации пиридин-ацетата (от 0,1 до 2,0 М) и рН (от 2,7 до 5,0) на колонке (0,6×60 см) с аминоксом 50 Wx4 (фракции II—IV) со скоростью элюирования 12 мл/ч и колонке (0,6×30 см) с аминоксом А-5 (фракции V—VI) со скоростью элюирования 16 мл/ч. Температура рубашки колонок 45° С.

ТСХ объединенных фракций проводили на пластинках (20×20 см) с тонким слоем целлюлозы Whatman N300 (Англия) в системе С [2]. Фракцию V-5 разделяли методом пептидных карт. Электрофорез проводили в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5, при напряжении 1000 В в течение 60 мин, а хроматографию — в системе С.

Триптический гидролиз малеинированного СМ- Φ_1 . К раствору 1,2 мкмоль малеинированного СМ- Φ_1 в 6 мл 0,2 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,2, добавляли трипсин (фермент-субстратное отношение 1:50) и выдерживали 7 ч при 37° С. Полученный гидролизат лиофилизировали.

Разделение пептидов ограниченного триптического гидролиза СМ- Φ_1 . Триптический гидролизат малеинированного СМ- Φ_1 разделяли на биогеоме P-4 (рис. 2). Полученные фракции исследовали на наличие триптофансодержащих пептидов с помощью реактива Эрлиха. Фракцию II после демалеинирования разделяли на колонке (0,6×25 см) с обращенной фазой Servachrom Si 100 C8 (5 мкм) в градиенте ацетонитрила от 0 до 70% в 0,05% трифторуксусной кислоте. Скорость элюирования 25 мл/ч, время изменения градиента 4 ч. Выделили триптофансодержащий пептид T_m -II. Фрак-

цию III разделяли методом ВЭЖХ на хроматографе Altex, модель 344 (Altex, США), с проточным спектрофотометром Altex, модель 160: колонка (0,46×25 см) с фазой Ultrasphere ODS (5 мкм), элюирование градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 60% в 0,05% трифторуксусной кислоте (система А), скорость элюирования 0,8 мл/мин, время изменения градиента 70 мин. Выделили пептид T_m-III.

Химотриптический гидролиз пептида T_m-III. Раствор 0,15 мкмоль пептида в 0,3 мл 0,1 М NH₄HCO₃, pH 8,3, инкубировали 6 ч при 37° С с химотрипсином при фермент-субстратном соотношении 1:50. Гидролиз останавливали лиофилизацией. Гидролизат разделяли методом ВЭЖХ в системе А.

Расщепление карбоксиметилированного цитохрома P-450 (СМ-цитохром) бромцианом. К раствору 4,0 мкмоль цитохрома в 12 мл 99,7% муравьиной кислоты, разбавленному водой до конечной концентрации кислоты 80%, добавляли 1,78 г бромциана (300 моль на 1 моль метионина) и выдерживали 24 ч в темноте при 20° С. Раствор пептидов упаривали досуха, остаток растворяли в 11 мл 8 М хлоргидрата гуанидина и постепенно добавляли 90 мл воды. Выпавший осадок центрифугировали 20 мин при 5000g, промывали водой (2×8 мл) и растворяли в 4 мл муравьиной кислоты (пептиды первой группы).

Супернатант обессоливали на колонке (2,5×45 см) с биогелем P-2 (Bio-Rad, США) в 30% муравьиной кислоте. Пептидную фракцию упаривали до объема 1,5 мл (пептиды второй группы).

Бромциановые пептиды обеих групп разделяли гель-фильтрацией на колонке (1,5×100 см) с биогелем P-30 (Bio-Rad, США), уравновешенным 80% муравьиной кислотой (рис. 3, 4). Гомогенность фракций оценивали с помощью N-концевого аминокислотного анализа (даксильным методом). Смесь пептидов фракции I (рис. 3) разделяли гель-фильтрацией на биогеле P-10 в 5% уксусной кислоте (колонка 1,5×100 см). Скорость элюирования 2,9 мл/ч.

Пептиды фракции II (рис. 3) после инкубации в 80% муравьиной кислоте (37° С, 14 сут) разделяли на колонке (1,5×100 см) с биогелем P-30 в 80% муравьиной кислоте. Фракции IV–VIII (рис. 4) подвергали дальнейшему разделению ВЭЖХ (рис. 5а–г) на хроматографе Altex, модель 322 (Altex, США), с проточным спектрофотометром Hitachi, модель 100-40 (Япония): колонка 0,46×25 см, носитель – Silasorb C₁₈ (диаметр частиц 7,5 мкм, Lachema, СССР), градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 40% в 10 мМ ацетате аммония, pH 5,7 (система В). Время изменения градиента 40 мин, скорость элюции 2 мл/мин. Пептиды детектировали спектрофотометрически (λ 206 нм).

Гидролиз пептида В1 протеиназой из St. aureus. Раствор 0,5 мкмоль пептида В1 в 5% уксусной кислоте разбавляли водой до концентрации уксусной кислоты 0,2 М и 25% раствором аммиака доводили pH раствора до 4,0. Фермент добавляли двумя порциями до конечного фермент-субстратного соотношения 1:20 (по весу) и выдерживали 24 ч при 37° С и интенсивном перемешивании. После обессоливания на биогеле P-2 в 80% муравьиной кислоте гидролизат разделяли на колонке (1,5×100 см) с биогелем P-60 в 80% муравьиной кислоте (рис. 6). Объединенные фракции III–VI разделяли методом ВЭЖХ на силасорбе C₁₈ в системе В.

Гидролиз 0,1 мкмоль пептида В1-Г1 BNPS-скатолом проводили 20 ч в 1,5 мл 80% муравьиной кислоты в темноте, используя 100-кратный мольный избыток реагента в расчете на триптофан. Избыток BNPS-скатола удаляли 7-кратной экстракцией 1-хлорбутаном. Гидролизат упаривали на роторном испарителе досуха, остаток растворяли в 0,75 мл 80% HCOOH и разделяли на биогеле P-30 (рис. 7).

Триптический гидролиз пептидов В2, В12, В13-3. К суспензии 0,2 мкмоль пептида в 1,4 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, pH 8,2, добавляли трипсин двумя порциями до конечного фермент-субстратного соотношения 1:20 (по весу). Реакцию проводили в атмосфере аргона при интенсивном перемешивании в течение 18 ч при 37° С. Гидролизат лиофи-

лизовали для удаления бикарбоната аммония и разделяли методом ВЭЖХ в системе В (рис. 8в, б).

Химотриптический гидролиз пептидов В5, В13-3. Суспензию 0,5 мкмоль пептида в 2 мл 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 7,8, инкубировали 18 ч при 37° С с химотрипсином (фермент-субстратное соотношение 1:20 (по весу); фермент добавляли двумя равными порциями с интервалом 6 ч). Гидролизат разделяли методом ВЭЖХ в систем В (рис. 8а, г).

Триптический гидролиз карбоксиметилированного фрагмента Φ_2 (СМ- Φ_2). 0,8 мкмоль суспензии СМ- Φ_2 в 4 мл 0,2 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,2, инкубировали 6 ч при 37° С с трипсином (фермент-субстратное соотношение 1:50). Реакцию останавливали лиофилизацией. Гидролизат растворяли в 1,5 мл 80% муравьиной кислоты и разделяли на колонке (1,5×100 см) с биогелем Р-30, уравновешенным 80% муравьиной кислотой. Фракцию, элюировавшуюся в объеме 49–61 мл, подвергали дальнейшему разделению на колонке (0,4×25 см) с Servachrom Si 100 С8 в градиенте ацетонитрила от 0 до 90% в 0,05% трифторуксусной кислоте. 37-членный пептид Т- Φ_2 элюировался при промывке колонки 90% ацетонитрилом.

Аминокислотный анализ пептидов, определение N-концевых аминокислотных остатков и деградацию пептидов методом Эдмана (в дансильном варианте) проводили как описано в сообщении [4].

Авторы выражают благодарность Н. А. Лобанову, С. Д. Тимошенко, Л. Г. Мартинович, М. В. Бурдис за участие в отдельных этапах работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чащин В. Л., Адамович Т. Б., Лапко В. Н., Куприна Н. С., Лапко А. Г., Кириллова Н. М., Ахрем А. А. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 7, с. 895–907.
2. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Куприна Н. С., Ахрем А. А. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 10, с. 1307–1320.
3. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Тимошенко С. Д., Лапко А. Г., Ахрем А. А. Весті АН БССР. Сер. хімія, 1984, № 3, с. 89–97.
4. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Лапко А. Г., Куприна Н. С., Кириллова Н. М., Ахрем А. А. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 4, с. 455–470.
5. Чащин В. Л., Лапко В. Н., Адамович Т. Б., Куприна Н. С., Кириллова Н. М., Ахрем А. А. Весті АН БССР. Сер. хімія, 1985, № 3.
6. Akhrem A. A., Vasilevsky V. I., Adamovich T. B., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L. In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450. Amsterdam: North-Holland Press, 1980, p. 57–64.
7. Haniu M., Yasunobu K. T., Gunsalus I. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 116, № 1, p. 30–38.
8. Hahn J. E., Hodgson K. O., Andersson L. A., Dawson J. H. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 18, p. 10934–10941.
9. Артамонов И. Д., Золотарев А. С., Костина М. Б., Хорошилова Н. И., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1301–1316.
10. Heinemann F. S., Ozols J. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 7, p. 4195–4201.
11. Capaldi K. A., Vanderkooi G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 4, p. 930–932.
12. Morohashi K., Fujii-Kuriyama Y., Okada Y., Sogawa K., Hirose T., Inajama S., Omura T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 15, p. 4647–4651.
13. Shastry B. S., Wagner G. C., Gunsalus I. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 105, № 3, p. 889–894.
14. Chashchin V. L., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M., Lapko V. N., Adamovich T. B., Berikbaeva T. M., Akhrem A. A. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 791, № 3, p. 375–383.
15. Ахрем А. А., Шкуматов В. М., Чащин В. Л. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 2, с. 278–280.
16. Чащин В. Л., Василевский В. И., Шкуматов В. М., Ахрем А. А. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1690–1692.

Поступила в редакцию
22.I.1985

PRIMARY STRUCTURE OF 20S, 22R-CHOLESTEROL-HYDROXYLATING
CYTOCHROME P-450 FROM BOVINE ADRENAL CORTEX MITOCHONDRIA.
IV. STRUCTURAL INVESTIGATION OF THERMOLYTIC AND LIMITED TRYPTIC
HYDROLYSIS OF FRAGMENT F₁; CYANOGEN BROMIDE PEPTIDES
OF CYTOCHROME P-450. COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE

CHASHCHIN V. L., LAPKO V. N., ADAMOVICH T. B., LAPKO A. G.,
KUPRINA N. S., KIRILLOVA N. M., BERIKBAYEVA T. M.,
AKHREM A. A., ZOLOTAREV A. S. *

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the
Byelorussian SSR, Minsk; *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A thermolytic hydrolysis of maleinated fragment F₁ has been performed, resulted in isolation of 44 peptides; their complete amino acid sequence has been determined. Non-overlapping thermolytic peptides of fragment F₁ involve 178 amino acid residues, which comprises about 71% of its amino acid sequence. Also, the cleavage and structural investigation of some tryptophan-containing peptides obtained from the limited trypsinolysis of fragment F₁ were carried out; reconstitution of the polipeptide chain of the fragment is completed. The cyanogen bromide cleavage of carboxymethylated cytochrome P-450 was achieved and 17 peptides, comprising almost the whole polipeptide chain of the protein molecule (91%), was isolated. To investigate structure of the cyanogen bromide peptides, we hydrolysed them at tryptophan residues with trypsin, chymotrypsin, proteinase from *Staphylococcus aureus*, and BNPS-skatole. The data obtained and those published earlier led to the complete primary structure of the cholesterol-hydroxylating cytochrome P-450. The proteins polipeptide chain consists of 481 amino acid residues and has the precise molecular mass 56 407.7.