



УДК 612.015.1+577.15.02

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
ОРГАНИЗАЦИИ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *Photobacterium fischeri*

Шулихин В. Н., Данилов В. С., Егоров Н. С.

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

В статье приведены данные о том, что помимо растворимой люциферазы из *Photobacterium fischeri* можно выделить мембранную форму, которая составляет 20–25% общей активности фермента в бесклеточной системе. Методами гель-хроматографии, обработкой детергентами, ионообменной хроматографией и препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле показано, что фермент состоит из нескольких субъединиц, причем активным является только полный комплекс с  $M$  55 000–60 000. Из данных изоэлектрофокусировки в полиакриламидном геле следует, что белковых субъединиц, различающихся по своим изоэлектрическим точкам, четыре, молекулярный вес этих субъединиц 20 000–23 000. Обсуждается функциональная роль субъединиц и возможная структура люциферазы.

До настоящего времени в литературе бактериальную люциферазу описывали как весьма простой фермент, состоящий всего из двух субъединиц и не содержащий каких-либо простетических групп или ионов металлов [1]. Исследование очищенного препарата фермента позволило определить молекулярный вес люциферазы и вес ее субъединиц [2]. Были предложены теории физиологической роли и механизма действия люциферазы.

Из литературных данных следует, что бактериальная люцифераза представляет собой растворимый фермент [3]. Однако нами было обнаружено, что если разрушение клеток и экстракцию белков проводить в мягких условиях, то значительная часть люциферазной активности (до 20–25%) остается связанной с мембранной фракцией. Введение в систему лизиса EDTA и лизоцима приводит к значительному снижению общей активности, но не позволяет достичь полной экстракции люциферазы из мембран. Только использование детергентов типа тритона X-100 или дезоксихолата натрия (5–10%) и ультразвука привело к полному извлечению фермента в раствор. Эти данные, а также недавно появившиеся в печати сообщения об обнаружении мембранной формы люциферазы у *Photobacterium leiognathi* и о том, что один из компонентов биOLUMИ-несцентной системы *Venezuela harvey* — NAD(P)A-FMN — оксидоредуктаза имеет мембранное происхождение [4, 5], позволяют предположить, что люцифераза бактерий тесно связана с мембранными структурами и существует не только в виде растворимой формы, но и в виде мембрано-связанного фермента.

Фракционирование сульфатом аммония бесклеточного экстракта *Ph. fischeri*, полученного после отделения неразрушенных клеточных частиц центрифугированием, выявило еще одну интересную особенность люци-

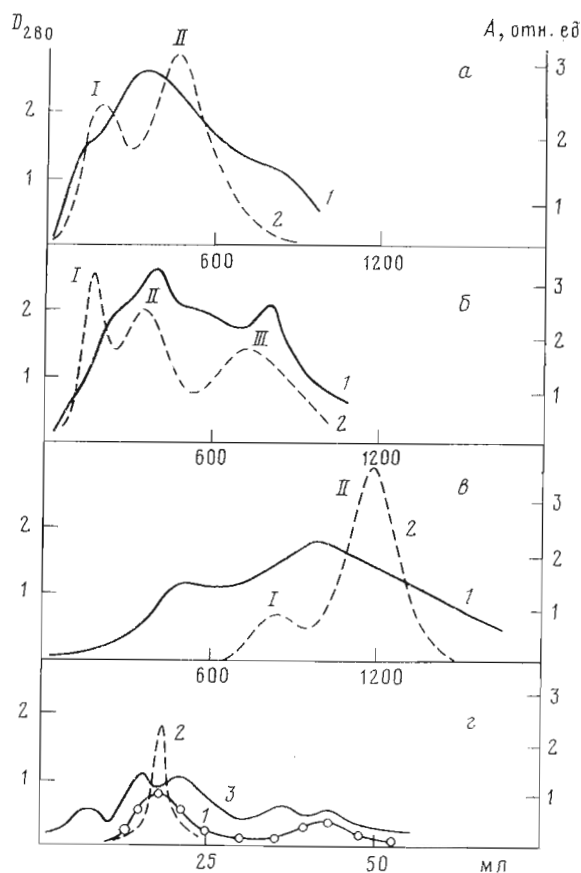


Рис. 1. Гель-хроматография препаратов люциферазы *Ph. fischeri*: а — сефадекс G-25, растворимая фракция люциферазы; б — сефадекс G-25, мембранная фракция фермента; в — сефадекс G-75, растворимая (мембранная) фракция люциферазы; г — сефадекс G-150, очищенный препарат люциферазы (рис. 3б, пик IV) (1, 2) и смесь маркерных белков: ферритин, алкогольдегидрогеназа, альбумин человеческий, альбумин яичный, химотрипсин и цитохром с (3); 1, 3 — поглощение при 280 нм; 2 — люциферазная активность (относительные единицы)

феразы: очень широкий диапазон ее высаливания (25–90% насыщения). Использование более узкого интервала концентраций приводит к большим потерям активности. Так, в интервале 35–75% насыщения осаждается белок, обладающий 50–55% исходной активности, а в отделяемых фракциях можно обнаружить только 5–10% активности. Этот факт можно рассматривать как определенное указание на гетерогенность люциферазы. Растворение полученного осадка в буфере без детергента при концентрации белка 15–20 мг/мл приводит к спонтанному образованию в растворе 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, а остальная обнаруживалась на фильтре.

Дальнейший анализ препаратов бактериальной люциферазы при помощи гель-хроматографии подтвердил наше предположение о сложном гетерогенном характере строения люциферазы. Так, было показано, что уже при хроматографии на сефадексе G-25 можно добиться разделения растворимой люциферазы на две, а мембранной — на три фракции (рис. 1а, б). Поэтому в дальнейшем для обессоливания фермента мы применяли се-

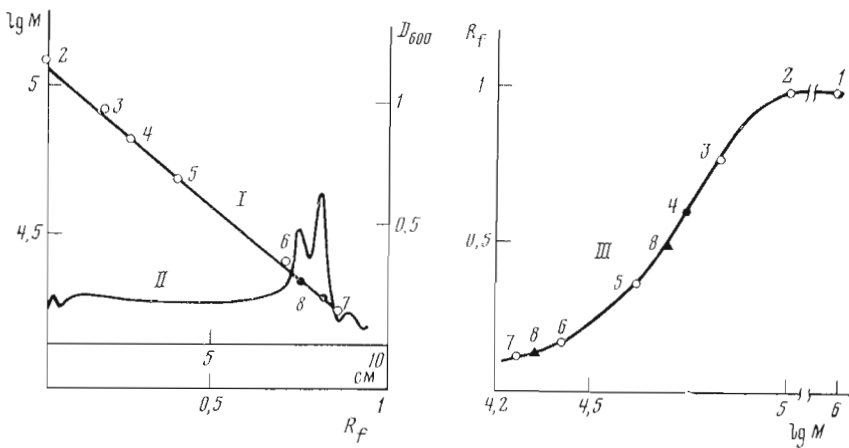


Рис. 2. Определение молекулярного веса очищенного препарата бактериальной люциферазы (рис. 3б, пик IV) методами электрофореза в полиакриламидном геле (I — калибровочная кривая, II — денситограмма люциферазы) и гель-фильтрации в тонком слое сефадекса G-150 (III). Маркерные белки: ферритин (1), алкогольдегидрогеназа (2), альдолаза (3), альбумин человеческий (4), альбумин яичный (5), химотрипсин (6), цитохром с (7); 8 — люцифераза

фадекс G-10. Для улучшения разделения активных форм мы решили использовать сефадекс G-75. Однако применение последнего не дало ожидаемого результата, а привело к потере низкомолекулярного компонента мембранного белка (рис. 1а) и изменению соотношения активностей двух других форм фермента. Белковые фракции, содержащие основную активность, выходили при значительно большем объеме элюции, чем следовало ожидать исходя из данных о том, что молекулярный вес люциферазы 79 000 [1, 6]. Наблюдаемое противоречие нельзя объяснить и на основании известных субъединиц с  $M$  37 000 и 42 000, так как диссоциация происходила только в присутствии 5 М мочевины и отдельные субъединицы не обладали активностью. Известно, что реактивация фермента возможна после удаления мочевины и требует длительной инкубации [7].

Данные, полученные при хроматографии люциферазы на сефадексе G-75 и ее препарата, очищенного анионообменной хроматографией (см. ниже) на сефадексе G-150, показали, что фермент имеет  $M$  55 000—60 000 и на сефадексе G-150 хроматографируется как индивидуальный белок (рис. 1г). Обнаруженные хроматографические свойства люциферазы можно объяснить наличием нескольких активаторов фермента или важных ее компонентов, имеющих молекулярный вес значительно меньший, чем у активного комплекса (не более 25 000). Тогда очевидно, что полное отделение этих компонентов от люциферазы должно приводить к одному пику активности. Если разделение белков не очень хорошее, то в зоне перекрытия люциферазы и активатора активность должна увеличиваться, что и происходит при хроматографии на сефадексе G-25 (рис. 1а, пик II, рис. 1б, пики II, III).

Субъединичная структура люциферазы и утверждение, что активным является только полный комплекс, подтверждаются данными, полученными нами в опытах с использованием денатурирующих агентов, таких, как мочевина (4 М), Nyamine 10-X (1%) и додецилсульфат натрия (0,1—0,5%). Внесение этих веществ в инкубационную смесь или предварительная обработка ими фермента приводили к полной потере активности, которая восстанавливалась только после диализа и инкубации в присутствии дитиотрепта ( $10^{-3}$  М) и альбумина. Восстановление активности до 50% требовало 5—6 ч инкубации при температуре  $+10^{\circ}$  С. При тонкослойной гель-фильтрации на сефадексе G-150 нативный фермент мигрировал как белок с  $M$  55 000—66 000. После обработки люциферазы додецилсуль-

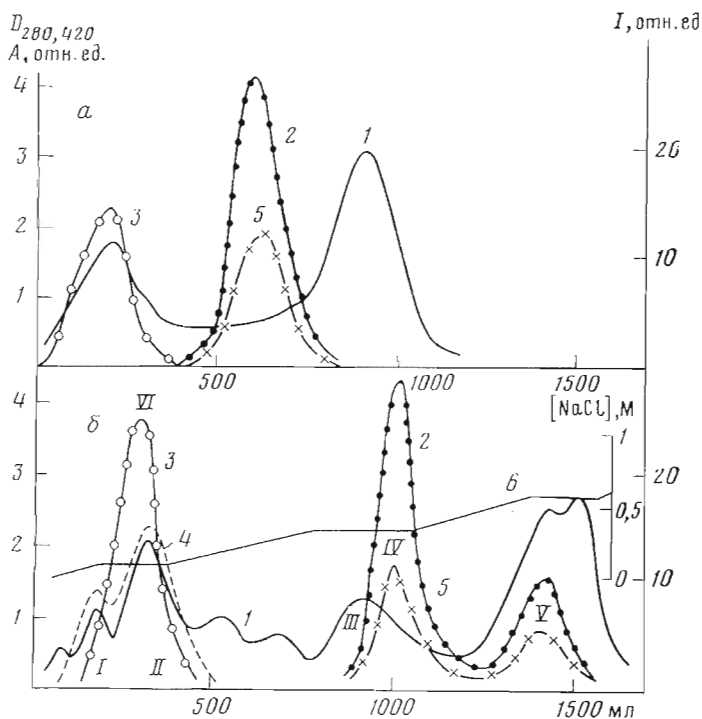


Рис. 3. Профиль элюции препарата люциферазы с DEAE- (а) и с триэтиламиноэтил-целлюлозы (б): 1 — поглощение при 280 нм; 2, 5 — интенсивность свечения биолюминесцентной реакции с  $\text{FMNH}_2$  (*I*-FMN) и с  $\text{NAD(P)H}$  (*I*-NAD(P)H) соответственно (*I*-NAD(P)H отражает оксидоредуктазную активность люциферазы); 3 — оксидоредуктазная активность, измеренная спектрально (см. «Экспериментальную часть»); 4 — поглощение при 420 нм; 6 — градиент NaCl

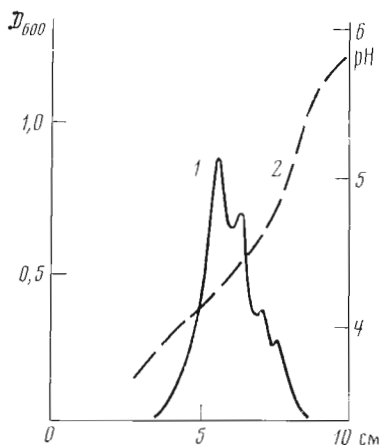
фатом натрия фермент переходил в низкомолекулярную форму с  $M$  20 000. Подобные результаты были получены ранее Кувабара и др. [8].

Анализ очищенного препарата люциферазы (см. ниже) при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показал, что диссоциированный комплекс содержит два компонента с  $M$   $23\,000 \pm 1000$  и  $19\,800 \pm 1200$  и, возможно, более низкомолекулярные компоненты (рис. 2). Картина, наблюдаемая при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия, а также при аналитической гель-фильтрации, была идентична для растворимой и мембранной фракций люциферазы.

Детергенты типа тритон X-100, твин 20 и 80 повышают стабильность и активность обеих фракций люциферазы. Этот факт, а также то, что дезоксихолат натрия вызывает полную солубилизацию фермента, 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 люциферазному комплексу достаточно легко выходить в гидрофильную среду. Не исключено, что первичный комплекс представляет собой значительно более прочную структуру, чем сообщалось ранее. На это указывает описанная выше спонтанная агрегация белков в тяжелые комплексы с высоким содержанием люциферазной активности.

Анализ поведения люциферазы на анионообменниках показал, что эффективность разделения люциферазного комплекса зависит от используемого типа адсорбента. При хроматографии препарата люциферазы на DEAE-целлюлозе (рис. 3а) наблюдали один пик ферментативной активности, при использовании триэтиламиноэтил-целлюлозы активность разделялась на два компонента (рис. 3б, пики IV и V) и происходило смещение

Рис. 4. Изоэлектрофокусирование препарата люциферазы (рис. 3б, пик IV) в диапазоне pH 3,65–6,0 в полиакриламидном геле: 1 — денситограмма белков (окрашивание кумасси R-250); 2 — градиент pH, для создания градиентов pH использовали соответствующие амфолины (ЛКВ, Швеция)



относительно друг друга максимумов активности и содержания белка (пики III и IV).

Очищенная фракция люциферазы (рис. 3б, фракция IV) при хроматографии на сефадексе QAE-50 полностью потеряла люциферазную активность. При этом наблюдалось разделение фракции на четыре белковых компонента, не содержавших исследуемой активности, но при смешивании их фермент реактивировался до 30% от исходной активности.

Подобный результат был получен нами при препаративном электрофокусе этой фракции в полиакриламидном геле, а также при хроматографии люциферазы на магний-силикате (флорисил) и таких катионообменниках, как фосфоселлюлоза и SP-сефадекс. Во всех случаях можно было наблюдать разделение препарата на несколько (не более четырех) неактивных компонентов, смешивание которых приводило к частичной ренатурации активной люциферазы.

Нам удалось установить, что катионообменники связывают NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазу, содержащуюся как в неочищенном, так и в очищенном препаратах люциферазы, что, по-видимому, и приводит к инактивации люциферазы. В пользу этого факта говорит и то, что добавление фракции VI (рис. 3б) к неактивной люциферазе, прошедшей через катионообменники, способствовало восстановлению активности. Кроме того, рехроматографией на триэтиламиноэтил-целлюлозе, а также хроматографией на фосфоселлюлозе нам удалось разделить фракцию, содержащую NAD(P)-FMN-оксидоредуктазную активность (рис. 3б, пик VI), на два компонента. Один из них имел диафоразную активность и крайне невысокую NAD(P)-FMN-оксидоредуктазную активность, другой же не имел никакой ферментативной активности, но обладал способностью стимулировать NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазную активность первого компонента и I-FMN-активность люциферазы. Оба компонента имели в спектре поглощения максимумы в области 420 нм, что позволяет предположить, что эти белки содержат связанный FMN и/или FAD.

Для выяснения числа субъединиц, входящих в люциферазный комплекс, был использован метод аналитического изофокусирования в полиакриламидном геле с амфоллинами. Препарат очищенной люциферазы (рис. 3б, пик IV) содержит четыре белковых компонента, различающихся по своим изоэлектрическим точкам (рис. 4). Исходя из этого можно предположить, что люцифераза — тетрамер, но здесь, учитывая сложный состав фермента, имеет смысл уточнить, что называть люциферазой.

Очевидно, это минимальный комплекс, способный осуществлять биолюминесцентную реакцию, и ясно, что по крайней мере *in vitro* присутствие в нем NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазы не требуется. Однако следует отметить, что 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 труда, то получение активной люциферазы без оксидоредуктазной активности представляется затруднительным [6, 8—10]. Так как взятый для анализа препарат имел NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазную активность, то очевидно, что два компонента из четырех, разделяемых при изоэлектрофокусировании, имеют непосредственное отношение к оксидоредуктазе и являются диафоразой и некаталитическим флавопротеидом. Это подтверждается и тем, что фракция VI (рис. 3б) при изоэлектрофокусировании даст две полосы в районе рН 5,0 и 4,8.

Итак, минорными компонентами люциферазного комплекса, полученного нами, можно считать диафоруазу и некаталитический флавопротеид, которые и обуславливают NAD(P)H-оксидоредуктазную активность люциферазы. Несколько неожиданным явилось обнаружение дополнительного белка, необходимого для оксидоредуктазной активности (см. выше, рис. 3б, пик II). Результаты экспериментов заставляют предположить субъединичное строение оксидоредуктазы, которая, очевидно, является двухфлавиновым димером, причем вес и заряд субъединиц весьма близок. Последнее предположение необходимо, так как иначе трудно объяснить, почему этот фермент описывали в литературе как одофлавиновый мономер с  $M$  23 500 [11]. Кроме того, оно подтверждается нашими данными, полученными при определении молекулярного веса белков. То, что обнаруженный нами флавопротеид стимулировал биoluminesцентную реакцию при неферментативном восстановлении (I-FMN), позволяет предположить, что он является излучательным звеном. На основании изложенных выше фактов и предположений можно объяснить имеющиеся расхождения относительно того, каким ферментом является люцифераза: одно- или двухфлавиновым. Так, потеря оксидоредуктазной активности может быть связана с тем, что в люциферазе отсутствует диафоруаза и тогда мы имеем дело с одофлавиновым комплексом [1]; если же оксидоредуктазная активность люциферазы сохранилась, то комплекс будет двухфлавиновым [6].

Основными компонентами люциферазного комплекса, по-видимому, следует считать белковые фракции III и V, получаемые при хроматографии на триэтиламиноэтил-целлюлозе (рис. 3б). Наличие двух максимумов люциферазной активности можно объяснить взаимонекрывающимся этих фракций и тем, что существует несколько оптимальных соотношений компонентов люциферазного комплекса. Литературные данные [1, 13] и результаты, полученные в нашей лаборатории, показывают, что терминальным компонентом люциферазной системы служит оксидаза смешанного типа. В этом случае четвертый компонент должен выполнять связующие функции между редуктазой и оксидазой.

Приведенные выше данные позволяют заключить, что бактериальная люцифераза представляет собой сложный комплекс, состоящий не менее чем из четырех субъединиц, причем активен только полный комплекс, так как удаление любой субъединицы приводит к частичной (тример, не содержащий I-NADH-активности) или полной инактивации. Первые два компонента биoluminesцентной системы становятся ясными из настоящей работы — это диафоруаза и некаталитический флавопротеид, составляющие оксидоредуктазное и, по-видимому, излучательное звено люциферазы. Установление природы двух других компонентов позволит полностью понять структуру и, возможно, функцию бактериальной люциферазы.

### Экспериментальная часть

Для получения люциферазы использовали 10-часовую культуру *Photobacterium fischeri*. Выделение люциферазы проводили несколькими способами:

1) полученные клетки замораживали до  $-70^{\circ}\text{C}$ , затем быстро оттаивали в гипотоничном буфере (0,02 М калий-натрий-фосфатный буфер,

pH 7,4;  $10^{-4}$  М дитиотреит) с последующей инкубацией в течение 16 ч при  $0-4^{\circ}\text{C}$ ;

2) клетки помещали в среду  $0,1$  М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $10^{-2}$  М EDTA,  $0,1\%$  лизоцима и инкубировали 12–16 ч при  $0-4^{\circ}\text{C}$ ;

3) клетки разрушали при  $23^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин в присутствии  $10\%$  тритона X-100 в  $0,02$  М калий-натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, с  $10^{-3}$  М дитиотреитом. Для уменьшения протеолиза добавляли фенолметилсульфоцилфторид, полученный раствор обрабатывали ультразвуком.

Бесклеточный раствор центрифугировали 60 мин при  $105\,000\text{ g}$ . Осадок использовали для получения мембранной фракции люциферазы (разрушение по способам 1 и 2). Для этого его суспендировали в буфере с  $5-10\%$  дезоксихолата натрия и инкубировали при  $23^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин и еще 4 ч при  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Белки супернатанта (растворимая фракция) фракционировали сульфатом аммония в интервалах  $0-35$ ,  $35-75$ ,  $75-95$  или  $0-25$  и  $25-90\%$  насыщения. Бесклеточный экстракт мембранной формы люциферазы центрифугировали и супернатант обрабатывали сульфатом аммония аналогично описанному выше. Осадок не содержал никакой активности, и его отбрасывали.

Гель-хроматографию проводили на сефадексах G-10 ( $5\times 60$  см), G-25 ( $5\times 100$  см), G-75 ( $5\times 100$  см), G-150 ( $1,2\times 100$  см), QAE-25 и SP-25 (Pharmacia, Швеция). В качестве белков-маркеров брали стандартный набор белков фирмы Merck (ФРГ). В работе использовали ионообменные целлюлозы DE-52 и P-11 (Whatman, Англия), а также флорисил (Sigma, США). Для работы с ионообменниками и флорисилом использовали колонки размером  $2,5\times 25$  см (ЛКВ, Швеция). Развертку градиента NaCl в диапазоне  $0-2$  М при элюции с ионообменников осуществляли с помощью системы Ultrograd-Uvicord III. Препаративный электрофорез проводили на установке Uniphor, аналитическое изофокусирование и электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии  $0,1\%$  додецилсульфата натрия проводили с помощью Multiphor (ЛКВ, Швеция).

Свечение люциферазы (биолюминесцентный тест) измеряли на установке, состоящей из фотумножителя (калиброванного по кварцовому выходу в области  $450-500$  нм), источника высокого напряжения, усилителя микровольтметра и самописца. Измерительная кювета находилась в термостатированной ячейке ( $20^{\circ}\text{C}$ ) с перемешиванием.

Для измерения активности люциферазы использовали две системы, позволившие разделить NAD(P)H-зависимое свечение (*I*-NADH) и FMN<sub>2</sub>-зависимое свечение (*I*-FMN).

*Измерение I-NADH*: в пробу, содержащую  $10^{-2}$  М NAD(P)H,  $10^{-3}$  М FMN и  $10^{-6}$  М деканала, общим объемом  $300$  мкл вносили  $200$  мкл исследуемой фракции и измеряли свечение (в мВ).

*Измерение I-FMN*: в пробу, содержащую  $10^{-3}$  М FMN,  $10^{-6}$  М деканала и исследуемую фракцию (люциферазу), вносили дитионит натрия для восстановления FMN и регистрировали свечение.

Электрофорез [14, 15], изоэлектрофокусирование [16], определение белка [17], а также определение NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазной и диафоразной активностей [18] осуществляли по известным методикам.

Сканирование гелей после электрофореза и изоэлектрофокусирования проводили при длине волны  $600$  нм аналогично работе [17].

Все процедуры, если не оговорено специально, проводили при  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Используемые в работе реактивы имели степень чистоты х.ч. и ч.д.а.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hastings J. W., Nealson K. H. (1977) Ann. Rev. Microb., **31**, 549–595.
2. Gunsalus-Miguel A., Meighen E., Nicoli Z., Nealson K. H., Hastings J. W. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 398–404.
3. Hastings J. W. (1978) Photochem. and Photobiol., **27**, 397–404.
4. Balakrishnan C. V., Langerman N. (1977) Arch. Biochem. and Biophys., **181**, 680–682.

5. Jablonski E., Deluca M. (1978) *Biochemistry*, **17**, 672-678.
6. Lee J., Murphy C. L., Faini J. G., Baucom L. T. (1974) *Liquid Scintillation Counting*, pp. 403-420, Acad. Press, Inc., New York - London.
7. Hastings J. W., Weber K., Friedland J., Eberhard A., Mitchel F. W., Gunsalus A. (1969) *Biochemistry*, **8**, 4681-4689.
8. Kuwabara S., Cormier M. J., Dure L. S., Kreiss P., Pfuderer P. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 822-828.
9. Brolin S. E., Hjerten S. (1977) *Molec. Cell. Biochem.*, **9**, 61-73.
10. Nackamura T., Matsuda K. (1977) *J. Biol. Chem.*, **70**, 38-44.
11. Puger K., Michelson A. M. (1972) *Biochimie*, **54**, 1197-1204.
12. Gast R., Neering I. R., Lee J. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 14-21.
13. Hastings J. W. (1978) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **5**, 163-184.
14. Devis B. J., (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-416.
15. Dulney G. T., Touster O. (1970) *Biochem. et biophys. acta*, **196**, 29-34.
16. Schalner W., Weissman C. (1973) *Anal. Biochem.*, **56**, 502-504.
17. Allen R. C., Harley R. A., Talamo R. C. (1974) *Amer. J. Clin. Pathol.*, **62**, 732-738.
18. Yohko A., Kyuichiro O. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 4653-4658.

Поступила в редакцию  
18.VI. 1979

После доработки  
22.X.1979

### SOME FEATURES OF THE STRUCTURE-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF *PHOTOBACTERIUM FISCHERI* LUCIFERASE

SHUMIKHIN V. N., DANILOV V. S., EGOROV N. S.

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

The data obtained demonstrate that from *Photobacterium fischeri*, apart from soluble luciferase, the membrane-bound enzyme can be isolated which accounts for 20-25% enzymic activity in the cell-free system. Gel filtration, detergent treatment, ion-exchange chromatography and preparative polyacrylamide gel electrophoresis revealed that the enzyme is composed of several subunits, the activity being manifested only by the whole complex of  $M$  55 000-60 000. Four protein subunits of  $M$  ranging from 20 000 to 23 000 and differing in isoelectric points were found on polyacrylamide gel electrofocusing. A functional role of the subunits and possible structure of luciferase are discussed.