

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,  
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.34, 577.151.45

ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНАЯ СИСТЕМА МОРСКОЙ ПОЛИХЕТЫ  
*Chaetopterus variopedatus*

К. В. Пуртов<sup>1,\*</sup>, В. Н. Петушков<sup>1</sup>, Н. С. Родионова<sup>1</sup>, В. Г. Пахомова<sup>1</sup>, И. Н. Мяснянко<sup>2</sup>,  
Н. М. Мышкина<sup>2</sup>, А. С. Царькова<sup>2</sup>, академик РАН И. И. Гительзон<sup>1</sup>

Поступило 21.02.2019 г.

Представлены первые результаты разделения биолюминесцентной системы морской полихеты *Chaetopterus variopedatus* на люциферин и люциферазу, их очистки и краткого описания некоторых свойств.

**Ключевые слова:** биолюминесценция, *Chaetopterus variopedatus*, полихеты, люциферин, люцифераза.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863398-401>

Светящиеся организмы широко распространены на планете. В подавляющем большинстве это обитатели морей и океанов. Их список насчитывает тысячи видов и ежегодно пополняется. В процессе эволюции феномен биолюминесценции возникал неоднократно, поэтому биолюминесцентные системы различных таксонов разнообразны по механизмам и не зависимы друг от друга. В основе процесса светоизлучения всегда лежит реакция окисления кислородом субстрата (люциферина) с помощью специфического фермента (люциферазы). Существуют два типа таких реакций: люциферин-люциферазный, когда фермент катализирует окисление субстрата молекулярным кислородом с образованием продуктов реакции, и фотопротеиновый, когда фермент связывает субстрат и молекулярный кислород, образуя предокисленный комплекс [1]. Получившийся фотопротеин в отсутствие определённого кофактора (ионов металлов) не образует продукты реакции и кванты света, он стабилен и может быть выделен стандартными хроматографическими методами. После воздействия кофактора испускание света происходит уже без потребления кислорода.

В последние годы ввиду востребованности для аналитических приложений активно идёт изучение механизмов и компонентов различных биолюми-

несцентных систем, а список расшифрованных структур люциферин-люциферазных систем увеличился до десяти. Такая работа сопряжена со многими трудностями, не всегда удаётся точно определить даже тип биолюминесцентной системы конкретного организма. Так, многолетние результаты исследования биолюминесценции морской полихеты *Chaetopterus variopedatus* (сем. *Chaetopteridae*) полны противоречий и неясностей.

*C. variopedatus* — космополит, на взрослой стадии развития ведёт сидячий образ жизни. Прячась в U-образной пергаментной трубке, погружённой в донный грунт, червь постоянно фильтрует воду, получая из неё питательные вещества. В ответ на агрессивное физическое воздействие он выпускает облако светящейся голубым светом слизи [2]. При этом ярко светятся (максимум при 460 нм) и все сегменты тела червя, секретирующие слизь. Осаму Шимомура предполагал, что биолюминесцентная система *C. variopedatus* включает фотопротеин и пять дополнительных компонентов:  $O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $H_2O_2$  и два кофактора неизвестной природы [3]. Белок с молекулярной массой 130 кДа и спектром флуоресценции, аналогичным биолюминесцентному, был выделен из тканей червя, но его структура не была определена [4]. Одни исследователи сообщали, что люминесценция *C. variopedatus* усиливается в присутствии ионов двухвалентного железа и перекиси водорода [5]. Другие авторы, наоборот, отмечали, что ионы железа не стимулируют свечение, а перекись даже ингибирует его, способствуя увеличению вязкости слизи. Классический метод разделения биомассы на люциферазную фракцию и термостабиль-

<sup>1</sup>Красноярский научный центр Сибирского отделения  
Российской Академии наук

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии наук, Москва

\*E-mail: [purtovk@mail.ru](mailto:purtovk@mail.ru)

ный люциферин показал отрицательный результат. В выделяемой слизи были обнаружены флуоресцентные вещества (рибофлавин и FMN). Предполагалось, что они или их производные могут являться источником биolumинесценции (453–455 нм). Однако их связь с механизмами генерации света не доказана [6, 7].

Таким образом, химия процесса биolumинесценции *C. variopedatus* до сих пор не описана, конкретные участники реакции не идентифицированы. Кинетики биolumинесценции *in vitro*, приводимые в вышеупомянутых статьях, слишком медленные, что не характерно для фотопротеиновых реакций. Описанные эффекты изменения интенсивности свечения в ответ на добавки  $H_2O_2$  вполне могли объясняться вкладом хемилюминесценции при реакции Фентона. При попытке выделить фотопротейн *C. variopedatus* градиентной анионообменной хроматографией нам не удалось обнаружить биolumинесцентную активность ни в одном исходящем пике, хотя при элюировании ступенькой нанесённая активность на выходе детектировалась практически полностью. Всё это вызывало сомнения в фотопротеиновой природе свечения этого червя.

Целью данного исследования было уточнение типа биolumинесцентной реакции морского червя *Chaetopterus variopedatus* для последующей идентификации её компонентов.

Исследования проводили на замороженной биомассе полихеты *C. variopedatus*, выловленной у берегов Бразилии. Целого червя гомогенизировали (1:10) в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,5) при 0 °C. Для лучшего разрушения клеток гомогенат пяти-

кратно по 2 мин, обрабатывали ультразвуком с помощью “UltrasonicdisintegratorUD-20” (Techpan, Poland) на льду, затем центрифугировали (25 000 g×20 мин) при 4 °C на центрифуге Avanti® J-E (Beck-manCoulter, USA). Осадок отбрасывали.

Супернатант проявлял высокую биolumинесцентную активность. Измерения интенсивности свечения проводили на люминиметре БЛМ-530 (Оберон-К, Россия). Реакционная смесь содержала 200 мкл 0,2 М фосфатного буфера (pH 7,5) и 5 мкл исследуемого препарата. Реакцию инициировали впрыском в измерительную кювету 10 мкл 20 мкМ раствора сульфата железа ( $Fe^{2+}$ ) с помощью шприца (HamiltonCompany, USA). Также тестировали активность фракций после последующих хроматографических этапов.

Супернатант разводили в 5 раз дистиллированной водой и наносили на колонку с SepharoseDEAEFF. Элюцию проводили при 4 °C градиентом 0,02 М фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 0,5 М NaCl. Биolumинесценция в собранных пробах при тестировании не обнаруживалась. Однако при перекрёстном смешивании проб, что является стандартной процедурой для люциферин-люциферазных систем, были найдены два пика 1, 2 (рис. 1), проявляющие биolumинесцентную активность. Суммарно их активность составляла 5–8% от исходной. Применив центрифужные мембранные концентраторы Corning Spin-X с различными пороговыми значениями молекулярной массы (MWCO), мы установили, что первый пик содержал некий высокомолекулярный компонент с молекулярной массой больше 30 кДа, а второй — низкомолекуляр-

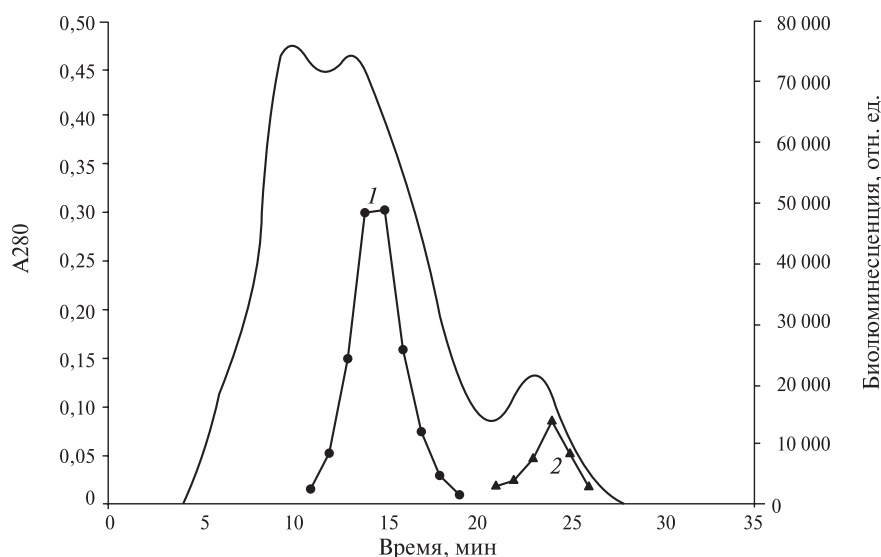


Рис. 1. Распределение компонентов биolumинесцентной системы *Chaetopterus variopedatus* при хроматографировании на сорбенте SepharoseDEAEFF, линейный градиент.

ный компонент, фильтрующийся через мембрану 5 кДа. Логично предположить, что в первом пике присутствовала люцифераза, а во втором — люциферин. Чтобы подтвердить эту гипотезу, необходимо на первом этапе получить очищенные компоненты, более точно определить их молекулярные веса и кинетические характеристики.

**Получение частично очищенной люциферазы.** 100 г замороженной биомассы *C. variopedatus* гомогенизировали в 300 мл 10 мМ фосфатного буфера (ФБ) с pH 7,5, затем подвергали ультразвуковой обработке и центрифугированию, как описано выше. К полученному супернатанту добавляли сульфат аммония до 30% и повторно центрифугировали в тех же условиях. К супернатанту вновь добавляли сульфат аммония — теперь до 60%, и центрифугировали третий раз. Итоговый осадок разводили в 35 мл 10 мМ ФБ с pH 6, и диализовали против этого же буфера 1 ч при 4 °С. Полученный образец центрифугировали 25000 г×20 мин при 4 °С, осадок отбрасывали. Супернатант пропускали через колонку 30×100 мм с CelluloseDEAE-32 (Serva), уравновешенную 10 мМ ФБ с pH 6. К итоговому 100 мл образцу добавляли 500 мкл 2 М ФБ с pH 9 и наносили на колонку 16×200 мм с SepharoseDEAEFF (GESweden), уравновешенную 10 мМ ФБ с pH 7,5. После промывки колонки 10 мМ ФБ с pH 7,5, проводили элюцию линейным градиентом 160 мл того же буфера, но с 0,5 М NaCl, со скоростью 4 мл/мин. Итоговые активные фракции объединяли, добавили к ним сульфат аммония до 60%, затем центрифугировали 25000 г×20 мин при 4 °С. Полученный осадок разводили в 10 мл 10 мМ ФБ с pH 7,5 и наносили на колонку 30 1000 мм с SephacrylS-200, уравновешенную 100 мМ ФБ с pH 7,5. Элюцию проводили со скоростью 1,5 мл/мин. Активные фракции объединяли, разводили водой до конечной концентрации буфера 25 мМ и наносили со скоростью 2 мл/мин на колонку 10×500 мм с SepharoseDEAEFF, уравни-

вленную 10 мМ ФБ с pH 7,5. После промывки колонки элюцию образцов проводили линейным градиентом 300 мл того же буфера, но с 0,5 М NaCl со скоростью 4 мл/мин. Активные фракции объединяли и концентрировали до объема 200 мкл на центрифужных фильтрах 30 кДа Ultracel-30 (Amicon, Ireland), после чего наносили со скоростью 0,5 мл/мин на колонку Superdex 200, уравновешенную 100 мМ фосфатным буфером (pH 7,5). Колонку предварительно калибровали стандартным набором белков с известными молекулярными массами. Нативная молекулярная масса люциферазы, рассчитанная по результатам гель-фильтрации, равна 80 кДа. Полученный частично очищенный препарат люциферазы *C. variopedatus* далее использовали для определения концентрационных зависимостей.

**Получение препарата люциферина.** Люциферин экстрагировали из 10 г замороженной биомассы *C. variopedatus* 20 мл 70% этанола в течение 1 ч при 0 °С, после чего центрифугировали 25000 г×20 мин при 4 °С. Полученный супернатант разводили равным объемом дистиллированной воды и наносили на концентрирующий патрон С16М (Биохиммак, Москва). После промывки 50% этанолом образец элюировали 2 мл 96% этанола и доводили его объем до 100 мкл на вакуумном концентраторе “Eppendorf 5301”. Полученный препарат люциферина далее использовали в качестве субстрата в проводимых реакциях. Получить высокоочищенный препарат люциферина *C. variopedatus* не представлялось возможным в связи с его нестабильностью и низким содержанием в имеющейся у нас биомассе.

Для измерения зависимости интенсивности свечения от количества препарата люциферина в реакционную смесь, содержащую 200 мкл 0,2 М ФБ с pH 7,5 и 5 мкл частично очищенной люциферазы, вносили 0,5 мкл препарата люциферина, предварительно разводя его в 96%-ом этаноле для получения разной концентрации. Биоломинесцентную реак-

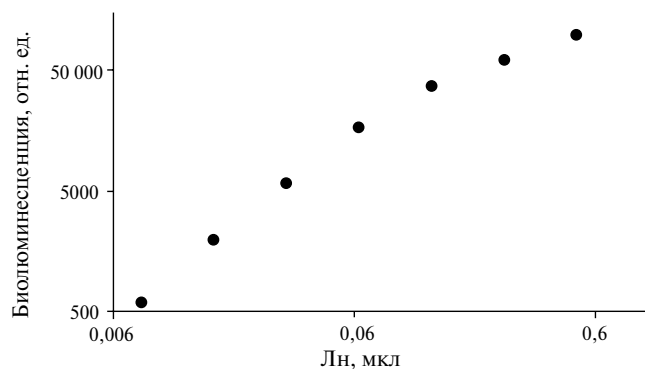


Рис. 2. Зависимость интенсивности биоломинесценции от количества препарата люциферина.

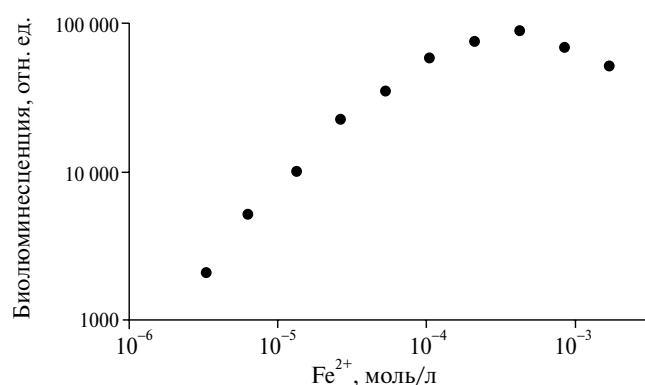


Рис. 3. Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации ионов железа.

цию инициировали впрыском в измерительную кювету 10 мкл 25 мкМ раствора сульфата железа ( $Fe^{2+}$ ). Полученная зависимость близка к линейной: при варьировании количества люциферина интенсивность биолюминесценции меняется более чем в 100 раз (рис. 2). Однако насыщения по люциферину пока достичь не удалось ввиду малого количества исходного материала.

Ионы двухвалентных металлов в различных биолюминесцентных системах обычно служат кофакторами люцифераз и не расходуются в реакциях светоизлучения. В качестве примеров можно привести  $Mg^{2+}$  в люциферин-люциферазной системе энхитреиды *Fridericia heliota* [8] или  $Ca^{2+}$  в различных фотопротеиновых системах [1]. В отличие от этого  $Fe^{2+}$  в реакции биолюминесценции *C. variopedatus* необратимо превращается в  $Fe^{3+}$ . При этом ионы  $Fe^{3+}$  не стимулируют свечение *C. variopedatus* in vitro. На основании этих фактов логично считать ион двухвалентного железа вторым субстратом реакции наряду с люциферин. Кажущаяся константа Михаэлиса, рассчитанная по зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации ионов  $Fe^{2+}$  (рис. 3) равна  $10^{-4}$  моль/л, а максимум интенсивности соответствует  $4,2 \times 10^{-4}$  моль/л.

Отметим также, что инкубирование частично очищенной люциферазы *C. variopedatus* с препаратом люциферина никогда не приводило к увеличению интенсивности свечения образцов. Этот факт говорит о том, что образование фотопротеинового комплекса не происходит и ещё раз подтверждает гипотезу о люциферин-люциферазном типе биолюминесцентной системы *C. variopedatus*.

Дальнейшее получение очищенных компонентов в достаточных количествах и исследование их структур методами масс-спектропии и ЯМР даст полный ответ относительно их истинной природы

и роли в биолюминесцентной реакции морской полихеты *C. variopedatus*.

**Источник финансирования.** Работа выполнена за счёт средств гранта РНФ (проект № 18–74–10102).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimomura O. Bioluminescence in the Sea: Photoprotein Systems // Soc. Exp. Biol. Symp. 1985. V. 39. P. 351–371.
2. Nicol J. A. C. Studies on *Chaetopterus variopedatus* (Renier). II Nervous control of light production // J. Mar. Biol. Assoc. 1952. V. 30. P. 433–452.
3. Shimomura O., Johnson F.H. Partial Purification and Properties of the *Chaetopterus* Luminescence System // Bioluminescence in Progress. 1966. P. 495–521.
4. Shimomura O., Johnson F.H. *Chaetopterus* Photoprotein: Crystallization and Cofactor Requirements for Bioluminescence // Science. 1968. V. 159. № 3820. P. 1239–1240.
5. Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Singapore. World Sci. 2006. 470 p.
6. Deheyn D. D., Enzor L. A., Dubowitz A., Urbach J. S., Blair D. Optical and Physicochemical Characterization of the Luminous Mucous Secreted by the Marine Worm *Chaetopterus* sp. // Physiol. Biochem. Zool. 2013. V. 86. P. 702–715.
7. Branchini B.R., Behney C.E., Southworth T.L., Rawat R., Deheyn D.D. Chemical Analysis of the Luminous Slime Secreted by the Marine Worm *Chaetopterus* (Annelida, Polychaeta) // Photochem. Photobiol. 2014. V. 90. P. 247–251.
8. Dubinnyi M.A., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Baranov M.S., Gorokhovatsky A. Yu., Kotlobai A., Solntsev K.M., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., Yampolsky I.V. Novel Mechanism of Bioluminescence: Oxidative Decarboxylation of a Moiety Adjacent to the Light Emitter of *Fridericia* Luciferin. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015. V. 54. № 24. P. 7065–7067.

## LUCIFERIN-LUCIFERASE SYSTEM OF MARINE POLYCHAETE

*Chaetopterus variopedatus*

**K. V. Purtov<sup>1</sup>, V. N. Petushkov<sup>1</sup>, N. S. Rodionova<sup>1</sup>, V. G. Pakhomova<sup>1</sup>, I. N. Myasnyanko<sup>2</sup>,  
N. M. Myshkina<sup>2</sup>, A. S. Tsarkova<sup>2</sup>, Academician of the RAS J. I. Gitelson<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Krasnoyarsk Science Centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Krasnoyarsk, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation*

Received February 21, 2019

This paper presents the preliminary results of the *Chaetopterus variopedatus* bioluminescent system separation into luciferin and luciferase and a brief description of some their properties

**Keywords:** bioluminescence, *Chaetopterus variopedatus*, polychaeta, luciferin, luciferase.