

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

УКРАИНСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

РЕДАКТОР
АКАДЕМИК А. В. ПАЛЛАДИН

ЗАМ. РЕДАКТОРА
ЧЛЕН-КОРР. АН СССР и АН УССР Д. Л. ФЕРДМАН

ТОМ XX, № 2

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
КИЕВ—1948

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНСЬКОЇ РСР
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ

УКРАЇНСЬКИЙ БІОХІМІЧНИЙ ЖУРНАЛ

РЕДАКТОР
АКАДЕМІК А. В. ПАЛЛАДІН

ЗАСТ. РЕДАКТОРА
ЧЛЕН-КОР. АН СРСР і АН УРСР Д. Л. ФЕРДМАН

ТОМ XX, № 2

ВИДАВНИЦТВО АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНСЬКОЇ РСР
КИЇВ—1948

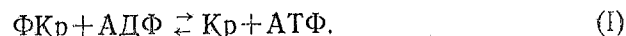
Фосфокреатин-аденозиндифосфат-фераза мускулів та її взаємовідношення з актоміозином

Е. Т. Сорені і Р. Г. Дегтяр

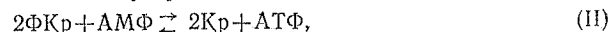
Інститут біохімії Академії наук УРСР

В попередніх повідомленнях (Сорені й Чепинога, 1946) було показано, що фосфор, відщеплений від АТФ *) під впливом аденозинтрифосфатази знаходиться не у вільному стані, а частково зв'язується з міозином. Надзвичайна легкість розщеплення в кислому середовищі та стійкість у лужному свідчили про те, що місцем приєднання Р є, можливо, вільні NH_2 -групи міозину. Було зроблено припущення (Сорені, 1947), що фосфорилування міозину є наслідком фосфоферазної реакції, і мінералізація АТФ міозином являє собою, можливо, баланс двох реакцій: ензиматичного фосфорилування міозину і неензиматичного розщеплення фосфоміозину.

В шуканнях відповідного ензиму, що каталізує цю реакцію, ми виявили, що актоміозин дійсно має властивості фосфофери. Нам вдалося відокремити від актоміозину цей ензим в дуже активній формі та встановити, що він, як і актин, виготовлений за методом Штрауба, каталізує реакцію рівноваги



Ензиматична система, яка каталізує реакцію рівноваги:



до цього часу мало вивчена. Вперше Ломан (Lohmann, 1934) показав, що водні екстракти з мускулів хребетних каталізують цю реакцію зліва направо. Оборотної реакції вивчали Остерн і співробітники (1935), Мейергоф і Ломан (Meyerhof u. Lohmann, 1935), Нідгем і Гейнінген (Needham a. Heuyningen, 1935) і особливо докладно Леман (Lehmann, 1935, 1936, 1942).

*) Прийняті нами скорочення в тексті такі:

АТФ — аденозинтрифосфат;

АДФ — аденозиндифосфат;

АМФ — аденозинмонофосфат;

Кр — креатин;

ФКр — фосфокреатин;

АТФ-аза — аденозинтрифосфатаза.

М. Н. Любимова і В. А. Енгельгардт (1939) спостерігали, що в водних екстрактах з мускулів реакція переестерифікації поміж АТФ і креатином супроводжується „непрямою“ мінералізацією АТФ. Банга (Banga, 1943) показала, що переестерифікація проходить у дві фази і для її протікання необхідна присутність двох ензимів: АТФ-Кр- і АДФ-Кр-фосфофери. Перший з цих ензимів був очищений автором до такого стану, що він не давав другої реакції.

Нарешті, в 1946 р. Прайс і Корі (Price a. Cori) попередньо повідомили про те, що їм вдалося відщепити від міозину АТФ-азу, яка у вільній формі не активується іонами Ca^{++} і активується креатином. Головними етапами методу були діаліз очищеного міозину проти 0,5 насиченого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наступне додавання ацетону і повторний діаліз проти води. Однак уже в своєму другому попередньому повідомленні Корі (1946) заперечив ці дані. Відщеплений від міозину ензим є фосфофери, яка переносить термінальний фосфор АТФ на креатин (див. також Сорені, 1947).

В цій роботі ми доводимо, що ензим мускульної тканини, який каталізує реакцію (I), знаходиться в двох формах: 1) у вільній, як водорозчинний ензим мускульної плазми і 2) у зв'язаній, як водонерозчинний актоміозин-ензим-комплекс мускульної фібрили. Відщеплена від міозину фераза каталізує реакцію (I) і не каталізує реакції (II). Крім того ми доводимо, що величина константи рівноваги реакції (I), визначена з обох напрямів, залежить не тільки від рН середовища (що вже відомо з літератури), а також, і ще в значно більшій мірі, від відсутності або присутності іонів Ca^{++} або Mg^{++} . В присутності цих іонів уже в концентраціях, нижчих за фізіологічні, реакція (I) протікає при будь-якому значенні рН зліва направо. Завдяки створенню водонерозчинного комплексу актоміозину з фосфофери, мускульні фібрили в присутності невеликих кількостей Ca^{++} або Mg^{++} та каталітичних кількостей АДФ або АТФ здатні безпосередньо використовувати енергію ФКр для скорочення. На основі сказаного цей ензим, що каталізує реакцію (I) ми називаємо ФКр-АДФ-фери.

Методика

Препарати. Всі досліди провадили на мускулах кролика. Препарати міозину одержували, як описано в попередній роботі (Сорені, Чепинога, 1946); актин одержували за методом Штрауба. ФКр одержували шляхом ензиматичного фосфорилування креатину фосфогліцериновою кислотою за методом Лемана (1935), АДФ за методом Ломана, АТФ шляхом зміненого методу Ломана, з цією різницею, що для осадження білків вживали 2,5% HgCl_2 на 0,5 N HCl. В деяких препаратах сліди важких металів з препаратів АТФ відділяли за методом Керра.

Для одержання NaATF 150 мг BaATF розчиняли в декількох краплях N HCl, додавали 2—3 мл води і осаджували $\text{M}/25 \text{ Na}_2\text{SO}_4$ до повноти осадження. Осад двічі промивали дистильованою водою, центрифугати з'єднували, нейтралізували до слаборожевого кольору за фенофталеїном і об'єм доводили до 10 мл. Таким же способом одержували розчини NaADF та NaFКр.

Аналізи. Фосфор визначали за методикою Фіске-Зуббарова за допомогою фотометра Пульфіха, фосфор ФКр за Ломаном, як різницю поміж фосфором, що визначали прямо, і неорганічним фосфором; останній осаджували реактивом Матісона (аміачним цитратом магнію); легкогідролізуючий фосфор АТФ і АДФ визначали після 7 хвилин гідролізу в N HCl при 100°C ; білок — за методом, заснованим на біуретовій реакції (стандартом був кристалічний препарат яєчного альбуміну); білок очищених ензиматичних препаратів — за мікрометодом К'ельдала; рН визначали за допомогою потенціометра з шкляним електродом; розчини CaCl_2 і MgCl_2 були титровані AgNO_3 .

Водорозчинна АТФ-Кр-фосфофераза мускульної плазми

Водні екстракти з мускулів містять у собі ензим, що каталізує реакцію (II). Ми знайшли, що при підкисленні екстракту до рН 5,0—5,1 ензим осаджується. Одержаний ізоелектричний осад містить у собі, крім фосфофери, також і АТФ-азу (що відповідає спостереженням Калькара).

Одержання ізоелектричного осаду. Подрібнені мускули кролика екстрагують при 0° С протягом 1 год. дворазовим об'ємом холодної дистильованої води. Екстракт фільтрують крізь бюхнерівську лійку, фільтрат підкислюють 1% ацетатною кислотою до рН 4,9—5,1. Осад відокремлюють центрифугуванням, промивають на центрифугі дистильованою водою і суспендують в 1% КСІ. Активність АТФ-ази і фосфофери визначали в суспензії та центрифугаті. Останній містить у собі сліди білка.

Дослідна суміш містила: 0,2 мл ензиму; 2,9 μ М АТФ (=180 μ г 7'Р), 7,6 μ М креатину; 27 μ М Са і до 1 мл глікоколового буфера рН 6,1 або 9,1. Інкубація тривала 10 хв. при 37° С, після чого додавали 1 мл $\text{CCl}_3 \cdot \text{COOH}$. У вихідних пробах з самого початку додавали $\text{CCl}_3 \cdot \text{COOH}$. Кілька прикладів таких дослідів наведено в табл. 1.

Таблиця 1

АТФ-азна та АТФ-Кр-фосфоферазна активність ізоелектричного осаду

АТФ-азная и АТФ-Кр-фосфоферазная активность изоэлектрического осадка (Збільшення прямовизначуваного Р в μ г на 1 мл суміші за 10 хв. при 37° С)

| | рН 9,1 | | | | рН 6,1 | | | |
|-------------|--------|-----------------------|---------|---------------------------|--------|-----------------------|---------|---------------------------|
| | АТФ | АТФ+ Са ⁺⁺ | АТФ+ Кр | АТФ+ Са ⁺⁺ +Кр | АТФ | АТФ+ Са ⁺⁺ | АТФ+ Кр | АТФ+ Са ⁺⁺ +Кр |
| Центрифугат | 6 | 24 | — | — | 18 | 40 | 20 | 4 |
| Осад | — | — | 28 | 20 | 12 | 20 | 8 | 10 |
| | 24 | 42 | — | — | 46 | 60 | — | — |
| | 12 | 40 | 48 | 32 | 72 | 96 | 52 | 48 |
| | 8 | 4 | 8 | 0 | 20 | 48 | 28 | 24 |
| | 32 | 20 | 44 | — | 24 | 32 | 24 | — |

З наведених дослідів можна бачити, що: 1) ізоелектричний осад з водних екстрактів мускулів містить АТФ-азу і АТФ-Кр-фосфофери; 2) АТФ-аза має два оптимуми — при рН 6,1 і рН 9,1 і активується іонами Са; 3) активність АТФ-Кр-фосфофери виявляється при рН 9,1 і гальмується іонами Са.

Водорозчинні препарати АТФ-ази, виготовлені за методом Сакова (1941), шляхом висолювання водного екстракту мускулів $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

при насиченні 0,35, показують лише малу активність АТФ-Кр-фосфофери.

Дальший дослід указує на те, що водорозчинна АТФ-аза міститься в глобуліновій фракції мускулів, а АТФ-Кр-фосфофераза — в альбуміновій фракції. Подрібнені мускули кролика екстрагували протягом 30 хв. п'ятикратним об'ємом 4,5% КСІ на карбонатно-бікарбонатному буфері рН 9,1. Центрифугат діалізували на холоді проти 0,03 М КСІ до випадіння міозину (рідину змінювали 3 рази). Вміст гільзи центрифугували, міозин відкидали. Центрифугат діалізували проти 0,0016 М ацетату калію рН 5,5 (100 мл 0,1 N ацетатний буфер рН 5,5+10 М 4,5% КСІ, дистил. води до 1 л). Через 4 год. діалізу на холоді випадав невеликий осад (глобулін α Вебера, який відокремлювали центрифугуванням і розчиняли в невеликому об'ємі 4,5% КСІ (1 мл=5,79 мг білка); центрифугат (1 мл=0,69 мг білка) містить альбуміни.

Дослідна суміш така, як указано вище. Ензиматична активність визначена на 1 мг білка.

Таблиця 2

Збільшення прямовизначуваного Р в μ г за 10 хв. при 37° С

Увеличение прямоопределяемого Р в μ г за 10 мин. при 37° С (на 1 мг белка)

| | рН 9,1 | | | рН 6,1 | | |
|---------------------|--------|-----------------------|--------|--------|-----------------------|--------|
| | АТФ | АТФ+ Са ⁺⁺ | АТФ+Кр | АТФ | АТФ+ Са ⁺⁺ | АТФ+Кр |
| Глобулінова фракція | 10 | 40 | 22 | 8 | 21 | 16 |
| Альбумінова фракція | 1 | 1 | 37 | 0 | 0 | 18 |

Надзвичайно активну фосфофери, що каталізує реакцію (I) і не має АТФ-ази, можна одержати таким способом: охолоджені мускули кролика подрібнюють на м'ясорубці Латапі і додають 5—8-кратний об'єм охолодженого ацетону (ацетон не повинен бути переохолодженим нижче —2 — 0° С). Суспензію енергійно розмішують і фільтрують крізь бюхнерівську лійку. Мускульний осад промивають ацетоном, ефіром, просушують у вакуумі над сірчаною кислотою й подрібнюють на порошок. Сухий препарат зберігає свою активність протягом довгого часу. Перед вживанням сухий препарат промивають на центрифугі 20-кратним об'ємом охолодженої дистильованої води, промивна вода відкидається, осад розтирається з 10-кратним об'ємом 1% КСІ. Одержаний таким чином ензим містить 9—10 мг білка в 1 мл. Він не містить АТФ-ази і переносить при рН 9,1 тільки термінальний фосфор АТФ на креатин. В табл. 3 зведені дані ензиматичної активності шести препаратів. Дослідна суміш містить 0,0034 М АТФ і 0,0076 М креатину.

Іони Ca^{++} гальмують активність ензиму: 0,0225 М Ca^{++} на 78%, 0,001 М Ca^{++} на 39%.

Таблиця 3
Активність АТФ-Кр-фосфофери
Активність АТФ-Кр-фосфофери
(Утворення ФКр за 10 хв. при 37°С на 1 мг білка в мкг Р)

| Дата | Р ФКр в мкг | Дата | Р ФКр в мкг |
|-----------|----------------|-------------|----------------|
| 23.X 1946 | 43 | 3.XII 1946 | 27 |
| 25.X | 41 | 26.III 1947 | 49 |
| 28.X | 59 | 27.III | 43 |

АТФ-Кр-фосфофери на властивість міозину та актоміозину

Вихідне спостереження для цього повідомлення, зроблене нами в 1946 р., полягає в такому. Якщо ензим першого, другого або третього осадження або міозин В осадити ацетоном і потім швидко висушити, то досить значна частина його розчиняється в дистильованій воді або в сольових розчинах. Ці білкові розчини ні на вигляд, ні за хімічними й фізичними властивостями не схожі з міозином. Вони мають дуже низку в'язкість, не осаджуються холодною водою і в присутності солей не осаджуються при незначному підкисленні. За всіма властивостями цей білок (або суміш білків) має глобулярну, а не фібрилярну структуру. Розчин цього білка, відділеного від акто-міозину, має ясно виявлену здатність переносити термінальний Р АТФ на креатин.

Одержання ацетонових препаратів з міозину. Міозин першого, другого або третього осадження (A_1 , A_2 , A_3) одержували за методом Любимова і Певзнер, міозин В (B_1) за методом Сент-Джордї. До 100 мл гелю міозину додавали 1,5 мл NaATP (з 22,5 мг BaATP *) і 500 мл охолодженого ацетону. Осад енергійно розмішували і швидко фільтрували крізь бюксерівську лійку. Осад промивали ацетоном, ефіром, просували в вакуумі над сірчаною кислотою і розтирали на порошок. Для елюції фосфофери сухий ацетоновий препарат з міозину розтирали з 20-кратним об'ємом екстрагуючої рідини і після 30 хв. екстракції на холоді фільтрували. Для екстракції ми застосовували дистильовану воду, 0,1 N карбонатно-бікарбонатний буфер та 1% КСІ. Дистильована вода добре екстрагує фосфофери. Екстракт містить 2—3 мг білка в 1 мл. Екстракти, одержані за допомогою лужних буферів, містять значно більше білка, і активність фосфофери на 1 мг білка у них значно менша. Найбільш активну фосфофери одержуємо при екстракції 1% КСІ. Такі екстракти містять 0,5—1,5 мг білка в 1 мл і виявляють лише незначну активність АТФ-ази, яка злегка активується іонами Ca^{++} . Цікаво відмітити, що повторний гліколовий екстракт (рН 9,1), одержаний з залишку ацетонового препарату після екстрагування його 1% КСІ, виявляє лише незначну активність фосфофери, в той час як його АТФ-азна активність значно вища, ніж у першому екстракті. Проте активність АТФ-ази на 1 мг білка менша, ніж у вихідному міозині.

*) АТФ можна не додавати, але, за нашими спостереженнями, активність ензиму при цьому зменшується.

В нижченаведених дослідах як препарат фосфофери застосовували тільки КСІ-екстракти. В табл. 4 зведена ензиматична активність таких препаратів, одержаних з міозину В, A_1 , A_2 , A_3 , з одночасним зазначенням кількості білка в екстрактах та проценту білка проти вихідного міозину.

Таблиця 4
1% КСІ-екстракт з ацетонових препаратів міозину
1% КСІ-екстракт из ацетоновых препаратов миозина

| Дата | Вихідний міозин | Вміст білка в екстракті | | Активність фос- фофери (фосфо- рилювання креа- тину на 1 мг біл- ка за 10 хв. при 37°С; в мкг Р) |
|----------------|--------------------|-------------------------|----------------------------------|---|
| | | в % | в % до ви- хідного міозину | |
| 11.XII 1946 р. | В | 0,300 | 6,0 | 67 |
| 20.XII | | 0,114 | 2,3 | 484 |
| 16.I 1947 р. | | 0,047 | 0,94 | 477 |
| 17.I | | 0,145 | 2,90 | 40 |
| 18.I | | 0,116 | 2,32 | 130 |
| 11.III | | 0,095 | 1,90 | 52 |
| 7.III | | 0,112 | 2,24 | 76 |
| 14.IV | | 0,178 | 3,57 | 168 |
| 14.VI | | 0,208 | 4,16 | 120 |
| 27.IX | | 0,15 | 3,0 | 67 |
| 24.X | | 0,223 | 4,5 | 90 |
| 5.XI | | 0,414 | 4,3 | 140 |
| 27.XII 1946 р. | | 0,16 | 3,2 | 206 |
| | | 0,15 | 3,0 | 73 |
| 20.I 1947 р. | | 0,077 | 1,5 | 130 |
| 24.I | A_1 | 0,152 | 3,0 | 120 |
| 25.I | | 0,135 | 2,7 | 115 |
| 3.III | | 0,114 | 2,27 | 18 |
| 5.III | | 0,088 | 1,76 | 23 |
| 12.III | | 0,139 | 2,8 | 50 |
| 17.III | | 0,078 | 1,56 | 45 |
| 17.X | | 0,166 | 3,30 | 66 |
| 24.X | | 0,117 | 2,34 | 60 |
| 12.XI | | 0,166 | 2,32 | 66 |
| 1.III 1947 р. | | 0,10 | 2,0 | 105 |
| 12.III | | 0,088 | 1,76 | 11 |
| 3.X | | 0,125 | 2,5 | 32 |
| 8.X | | 0,125 | 2,5 | 32 |
| 1.III | | 0,16 | 3,2 | 19 |
| 12.III | A_2 | 0,066 | 1,3 | 61 |
| 7.IV | | 0,043 | 0,87 | 69 |

Дані, наведені в табл. 4, свідчать про те, що екстракти ацетонових препаратів міозину мають дуже високу фосфофери активність. Препарати, одержані з міозину В, дуже часто більш активні, ніж препарати, одержані з міозину A_1 , A_2 , A_3 .

Дальший ряд дослідів мав своєю метою одночасно визначити фосфофери активність міозину (B , A_1 , A_2 , A_3) та відповідних ацетонових препаратів.

Схема цих дослідів така. Гель міозину A_1 поділяли на три частини: невелику частину розчиняли в 0,1 N гліколовому буфері pH 9,1 і використовували для визначення ензиматичної активності і кількості білка, другу осаджували ацетоном, як описано вище, третю розчиняли в 12% KCl на карбонатно-бікарбонатному буфері, фільтрували, осаджували 20-кратним об'ємом охолодженої дистильованої води. Одержані препарати міозину A_2 і A_3 обробляли подібно до міозину A_1 .

В деяких випадках визначали також вміст креатину в препаратах міозину.

За нашими спостереженнями, міозини B і A_1 містять невелику кількість креатину (напр., 1 г міозину A_1 містить 1,4 мг креатину); в препаратах A_2 і A_3 нам не вдалося встановити присутність креатину. Відповідно до цього ми спостерігали, що при визначенні АТФ-азної активності неочищеного міозину кількість прямовизначеного фосфору завжди більша за кількість неорганічного фосфору (за Матісоном). Після переосадження міозину це розходження зникає. Досліди, наведені в табл. 5, демонструють це.

Таблиця 5

Активність АТФ-ази на 1 мг міозину
Активність АТФ-ази на 1 мг миозина
(Інкубація 10 хв. при 37° С без Са)
Збільшення прямовизначеного Р
(в $\mu\text{г Р}$)

| | Збільшення неорганічного Р (в $\mu\text{г Р}$) |
|-------------------|--|
| A_1 | 100 |
| A_1 | 140 |
| A_1 | 68 |
| A_1 | 40 |
| A_2 | 20 |
| A_3 | 16 |
| A_3 | 24 |
| $A_3 + \text{Ca}$ | 64 |

Ці досліді вказують на те, що A_1 каталізує, крім мінералізації АТФ, також фосфорилювання свого креатину. При переосадженні міозину креатин виділяється, і збільшення прямовизначеного фосфору відповідає справжній мінералізації АТФ.

Наслідки паралельних досліджень АТФ-ної та фосфофразної активності міозину і відповідних ацетонових препаратів зведені в табл. 6.

Ці досліді показали, що в той час як ацетонові препарати мають велику активність, вихідний міозин не активний або має лише невелику здатність переносити термінальний Р АТФ на креатин.

Однак при вивченні зворотного напрямку реакції (дефосфорилювання ФКр в присутності каталітичної кількості аденілової системи та іонів Ca^{++}) можна виявити фосфофразну активність нативного міозину. При багаторазовому переосадженні ця активність зменшується, але не зникає зовсім. В табл. 7 наведені наслідки кількох дослідів, в яких показана властивість міозину дефосфорилювати ФКр в присутності аденілової системи.

Маємо на увазі, що кількість глобулярних білків, які утворюють стійкий комплекс з міозином, за нашими даними, становить майже

Таблиця 6

Активність АТФ-ази і фосфофрази міозину і KCl-екстракту з ацетонового препарату, виготовленого з того ж міозину

Активність АТФ-ази і фосфофрази миозина и KCl-экстракта из ацетонового препарата из того же миозина

(Збільшення прямовизначеного фосфору на 1 мг білка; інкубація 10 хв. при 37° С; pH 9,1).

| Міозин | Міозин | | | | Ацетоновий препарат з того ж міозину (екстрагований 20-кратним об'ємом 1% KCl) | | | |
|--------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|--|--------------------------|--------------------------|---|
| | Активність АТФ-ази | | З Кр ($\mu\text{г Р}$) | Активність фосфофрази 3-1 ($\mu\text{г Р}$) | Активність АТФ-ази | | З Кр ($\mu\text{г Р}$) | Активність фосфофрази 3-1 ($\mu\text{г Р}$) |
| | 1 без Са ($\mu\text{г Р}$) | 2 Са ($\mu\text{г Р}$) | | | 1 без Са ($\mu\text{г Р}$) | 2 Са ($\mu\text{г Р}$) | | |
| A_1 | 22 | — | 33 | 11 | — | — | — | — |
| A_2 | 9 | 66 | 20 | 11 | 0 | 10 | 105 | 105 |
| A_3 | 19 | 50 | 0 | 0 | 0 | 19 | 19 | 19 |
| A_1 | 11 | 30 | 21 | 10 | 0 | 0 | 61 | 61 |
| A_2 | 5 | 64 | 21 | 16 | 0 | 0 | 11 | 11 |
| A_3 | 4 | 55 | 7 | 3 | 0 | 0 | 62 | 62 |
| A_1 | 17 | 40 | 18 | 1 | 12 | — | 44 | 32 |
| A_3 | 19 | 50 | 19 | 0 | 23 | — | 47 | 24 |
| A_2 | 4 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 32 |
| A_3 | 3 | 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 32 |
| A_1 | 7 | 33 | 9 | 2 | 0 | — | 60 | 60 |
| A_1 | 7 | 99 | 10 | 3 | — | 10 | 105 | 95 |
| B | 0 | 74 | 2 | 2 | 4 | 4 | 76 | 72 |
| B | 8 | 32 | 8 | 0 | 0 | 5 | 120 | 120 |
| B | 9 | 35 | 4 | 0 | 0 | — | 60 | 60 |
| B | 37 | 37 | — | — | 0 | — | 90 | 90 |

Таблиця 7

Фосфокреатин-АДФ-фразна активність міозину

Фосфокреатин-АДФ-фразная активность миозина

| Міозин | Інкубація при 37° С | pH | Молярна концентрація доданих | | | Відщепилося Р ФКр на 1 мг міозину (в $\mu\text{г Р}$) |
|--------|---------------------|------|------------------------------|---------|--------|--|
| | | | ФКр | АТФ | АДФ | |
| A_1 | 15 | 7,2 | 0,0020 | 0,00045 | 0 | 20 |
| A_2 | 15 | 7,2 | 0,0020 | 0,00045 | 0 | 7 |
| A_3 | 15 | 7,2 | 0,0020 | 0,00045 | 0 | 2 |
| A_1 | 20 | 7,54 | 0,0023 | 0 | 0,0006 | 7 |
| A_2 | 20 | 7,54 | 0,0023 | 0 | 0,0006 | 4 |
| A_3 | 20 | 7,54 | 0,0023 | 0 | 0,0006 | 1 |
| A_1 | 60 | 7,05 | 0,0025 | 0,0009 | 0 | 21 |
| A_2 | 60 | 7,05 | 0,0025 | 0,0009 | 0 | 7 |
| A_3 | 60 | 7,05 | 0,0025 | 0,0009 | 0 | 5 |

4%, значить ця активність приблизно відповідає активності ацетонних препаратів. Ці дослідні, отже, показують, що утворення комплексу ензиму з міозином не гальмує дії фосфофери. Гальмування реакції справа наліво при умовах, оптимальних для дії АТФ-ази, обумовлене, мабуть, успішною конкуренцією АТФ-ази з фосфофери за субстрат. Раніш висловлене нами припущення (Сорені, 1947), що створення комплексу міозину з фосфофери гальмує активність фосфофери, не відповідає дійсності.

Вплив іонів Ca^{++} та Mg^{++} на константу рівноваги реакції: $\text{ФКр} + \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{Кр} + \text{АТФ}$

При паралельному вивченні АТФ-азної та фосфофери активності ензиматичних препаратів виявлено, що іони Ca^{++} та Mg^{++} гальмують фосфорилювання креатину. Докладне вивчення цього гальмування (див. табл. 8) показало, що воно залежить від концентрації реагуючих речовин. При постійній концентрації АТФ (близько $3 \cdot 10^{-3}$) максимальне гальмування (95—100%) спостерігають, коли молярна концентрація Ca^{++} або Mg^{++} майже в 6 разів більша за молярну концентрацію доданого креатину.

Цей факт вказує на те, що Mg^{++} та Ca^{++} впливають не на активність ензиму, а на активність субстрату. З другого боку, з літератури відомо, що фосфорилювання креатину з участю аденілової системи являє собою зворотну реакцію. При однакових інших умовах лужна реакція (рН 9—10) сприяє фосфорилюванню креатину, кисла реакція (рН 6) — фосфорилюванню аденілової системи. Виходячи з цих фактів, можна було припустити, що іони лужноземельних металів, можливо, впливають також на рівновагу реакції.

Щоб перевірити це припущення, ми поставили такий дослід. Досліджена суміш складалася з 4 мл ензиму (КСІ-екстракту ацетонного препарату), 4 мл NaATP , з 60 мг BaATP , 4 мл 1% креатину та 8 мл гликоколового буфера; рН суміші 9,1. Ідентичну суміш відразу осаджували рівним об'ємом 10% $\text{CCl}_3 \cdot \text{COOH}$ (спочатку додавали кислоту) і цю пробу вважали за вихідну. Дослідна суміш підлягала інкубації протягом 40 хв. при 37°C (*). Після цього певну частину дослідної суміші осаджували $\text{CCl}_3 \cdot \text{COOH}$. Решту інкубаційної суміші поділяли на 2 частини: до одної з них додавали CaCl_2 в такій кількості, щоб кінцева концентрація Ca^{++} була $0,0074 \text{ M}$; до другої частини додавали стільки ж MgCl_2 . Обидві проби інкубували вдруге протягом 40 хв. при 37°C . В трихлорацетатних фільтрах визначали: 1) неорганічний Р за Матісоном, 2) прямовизначуваний Р; 3) Р після 7 хв. гідролізу в N HCl при 100°C ($3-2=\text{P}_7$; $2-1=\text{P ФКр}$).

*) Рівновага настає, як показали попередні дослідні, вже значно раніше — через 15—20 хв. Але, щоб бути впевненими у встановленні рівноваги, ми продовжили інкубацію до 40 хв.

Таблиця 8

Вплив іонів Ca^{++} на фосфофери реакцію (активність на 1 мг білка; інкубація 10 хв. при 37°C)
Влияние ионов Ca^{++} на фосфофери реакцію (активність на 1 мг белка; инкубация 10 мин. при 37°C)

| Молярна кон- центрація креатину | Молярна кон- центрація Ca | Утворення ФКр (в $\mu\text{г Р}$) | Гальмування (в %) |
|---------------------------------------|--|---------------------------------------|----------------------|
| 0,0076 | 0 | 172 | — |
| | 0,00036 | 167 | 2,9 |
| | 0,00048 | 158 | 8,2 |
| | 0,0015 | 136 | 21,0 |
| | 0,003 | 132 | 23,2 |
| | 0,00115 | 106 | 38,3 |
| | 0,023 | 70 | 59,3 |
| | 0,046 | 9 | 95 |
| 0,0076 | 0 | 67 | — |
| | 0,0038 | 60 | 10,5 |
| | 0,076 | 40 | 40 |
| | 0,0115 | 33 | 51 |
| | 0,023 | 13 | 81 |
| 0,0152 | 0 | 66 | — |
| | 0,023 | 42 | 21 |
| 0,0076 | 0 | 42 | — |
| | 0,023 | 24 | 43 |
| 0,0038 | 0 | 42 | — |
| | 0,023 | 18 | 57 |
| 0,0202 | 0 | 140 | — |
| | 0,0153 | 58 | 58,5 |
| 0,0101 | 0 | 96 | — |
| | 0,0153 | 39 | 59,5 |
| 0,00905 | 0 | 77 | — |
| | 0,0153 | 34 | 56 |
| 0,00252 | 0 | 39 | — |
| | 0,0153 | 19 | 51,3 |
| 0,0304 | 0 | 36 | — |
| 0,0152 | 0 | 15 | — |
| 0,0076 | 0 | 9 | — |
| 0,0038 | 0 | 3 | — |
| 0,0202 | 0 | 66 | — |
| | 0,0153 | 57 | 13,6 |
| 0,0101 | 0 | 30 | — |
| | 0,0153 | 15 | 50 |
| 0,00505 | 0 | 27 | — |
| | 0,0153 | 15 | 44,5 |
| 0,0202 | 0 | 60 | — |
| | 0,003 | 43 | 28,2 |
| | 0,006 | 21 | 65 |
| | 0,012 | 0 | 100 |

Наслідки в $\mu\text{г}$ Р на 1 мл вихідної суміші подаємо:

| | $P_{7'}$ | Р ФКр | Р неорганічний |
|---|----------|-------|----------------|
| I. Вихідна суміш | 160 | 0 | 16 |
| II. Рівновага при 37°C | 82 | 75 | 19 |
| III. Рівновага при 37°C після повторної інкубації II в присутності $0,0074 \text{ M CaCl}_2$ | 112 | 48 | 20 |
| IV. Рівновага при 37°C після повторної інкубації II в присутності $0,0074 \text{ M MgCl}_2$ | 118 | 38 | 20 |

Цей дослід доводить вірність нашого припущення, що іони лужноземельних металів впливають на напрям реакції. Без додавання іонів лужноземельних металів на 1 мл суміші (0,33 мг білка) утворилося 75 $\mu\text{г}$ Р ФКр, одночасно кількість $P_{7'}$ зменшилась на 78 $\mu\text{г}$. При повторній інкубації суміші до встановлення нової рівноваги в присутності $0,007 \text{ M Ca}^{++}$ зникло 27 $\mu\text{г}$ Р ФКр при одночасному збільшенні $P_{7'}$ на 30 $\mu\text{г}$. Аналогічно в присутності $0,007 \text{ M Mg}^{++}$ зникло 37 $\mu\text{г}$ Р ФКр і утворились 36 $\mu\text{г}$ $P_{7'}$.

Для кількісного виразу впливу іонів лужноземельних металів ми вивчали залежність константи рівноваги від концентрації іонів Ca^{++} та Mg^{++} при однаковому рН (9,1).

Константа рівноваги реакції $\text{ФКр} + \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{Кр} + \text{АТФ}$ визначається

$$K = \frac{[\text{Кр}] \cdot [\text{АТФ}]}{[\text{ФКр}] \cdot [\text{АДФ}]}$$

Реакцію зліва направо ми вивчали двома методами: 1) додаванням до дослідної суміші ФКр та АДФ і 2) вищеописаним способом, принцип якого полягає в тому, що реакційна суміш після рівноваги справа наліво являє собою вихідну суміш для вивчення реакції зліва направо. В кількісному відношенні другий метод дав значно кращі наслідки, ніж перший. Відносно велика кількість неорганічного Р в наших препаратах АДФ та ФКр значно збільшила методичну похибку цих аналізів. Нехтуючи цими аналізами, в табл. 9 зведені наслідки, одержані за допомогою другого методу. Константу рівноваги в пробах без додавання іонів лужноземельних металів визначали тільки справа наліво, в пробах з додаванням цих іонів її визначали з двох напрямів. Наслідки подані в молярних концентраціях.

На рис. 1 графічно зображена залежність логарифма константи від молярної концентрації Ca^{++} та Mg^{++} при рН 9,1.

Наведені в табл. 9 та на рис. 1 досліди показують, що додавання $\text{M}/100 \text{ Ca}^{++}$ або Mg^{++} збільшує константу рівноваги приблизно в 80 разів (від 0,126 до 10,0), тоді як зміна рН від 9,1 до 6,0 без додавання цих іонів збільшує константу лише в 20 разів. $\text{M}/300 \text{ Ca}^{++}$ або Mg^{++} дає приблизно такий самий ефект, як перехід від рН 9,1 до рН 6,0. Таким чином іони Ca^{++} та Mg^{++} у фізіологічних концен-

траціях виявили себе рівноцінними за дією, дуже могутніми факторами, які спрямовують фосфоферазну реакцію, незалежно від значення рН, зліва направо.

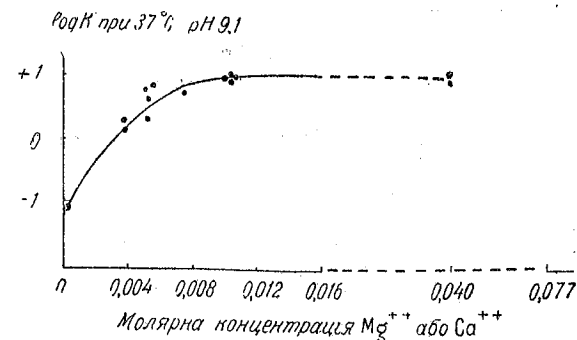


Рис. 1. Залежність константи рівноваги фосфоферазної реакції від концентрації іонів Ca та Mg .
Зависимость константы равновесия фосфоферазной реакции от концентрации ионов Ca и Mg .

АТФ-Кр-фосфоферазна властивість актину

Виходячи з факту, що з міозину В вихід білка, що має фосфоферазну властивість, в значній кількості випадків більший, ніж з міозину A_1 , A_2 , A_3 (див. табл. 4), було цікаво перевірити фосфоферазну активність актину. Актин одержували за методом Штрауба (див. Сент-Дьордьї, 1947). Він виявляв „активність“ в тесті за Сент-Дьордьї. Наслідки деяких дослідів (див. табл. 10) показують, що активність фосфофери на 1 мг актину приблизно така ж, як і активність фосфофери на 1 мг білка, відщепленого від міозину.

Таблиця 10
Фосфоферазна активність актину
Фосфоферазная активность актина

| Кількість білка в 1 мл розчину актину (в мг) | Активність фосфофери на 1 мг білка (в $\mu\text{г}$ Р) |
|--|--|
| 2,0 | 145 |
| 1,6 | 115 |
| 2,4 | 117 |
| 3,9 | 76 |
| 3,1 | 89 |

Фракціонуванням за методом ізоелектричного осадження, вдалося збільшити активність фосфофери в 2—3 рази по відношенню до вихідного розчину. Молекулярна гомогенність актину до цього часу не доведена. Питання взаємовідношення актину з фосфофериною потребує дальшого вивчення.

Вплив іонів Ca^{++} і Mg^{++} на константу
Влияние ионов Ca^{++} и Mg^{++} на константу

| рН | Додано | | | | | | |
|---------|--------|--------|---|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | [Ca] | [Mg] | Кіль- кість білка в 1 мл (мг) | Р неорг. (мг) | [АТФ]·10 ⁻³ | [АДФ]·10 ⁻³ | [ФКР]·10 ⁻³ |
| 9,22*) | | | | | | | |
| 9,02**) | 0 | 0 | 0,38 | 16 | 2,62 | 0 | 15,20 |
| 9,1 | 0 | 0 | 0,51 | 19 | 2,86 | 0 | 15,20 |
| 9,1 | 0 | 0 | 0,33 | 16 | 2,58 | 0 | 15,20 |
| 9,1 | 0 | 0 | 0,29 | 20 | 3,02 | 0 | 15,20 |
| 6,02 | 0 | 0 | 0,38 | 20 | 0,07 | 2,55 | 12,65 |
| 8,72 | 0,077 | 0 | 0,38 | 20 | 0,07 | 2,55 | 12,65 |
| 5,98 | 0,077 | 0 | 0,38 | 20 | 0,07 | 2,55 | 12,65 |
| 9,1 | 0,042 | 0 | 0,51 | 22 | 0,08 | 2,78 | 12,42 |
| 9,1 | 0 | 0,042 | 0,51 | 22 | 0,08 | 2,78 | 12,42 |
| 9,1 | 0,0148 | 0 | 0,33 | 19 | 0,06 | 2,52 | 12,78 |
| 9,1 | 0,0074 | 0 | 0,33 | 19 | 0,06 | 2,52 | 12,78 |
| 9,1 | 0,0037 | 0 | 0,33 | 19 | 0,06 | 2,52 | 12,78 |
| 9,1 | 0 | 0,0074 | 0,33 | 19 | 0,06 | 2,52 | 12,78 |
| 9,1 | 0 | 0,0037 | 0,33 | 19 | 0,06 | 2,52 | 12,78 |
| 9,1 | 0,0052 | 0 | 0,29 | 20 | 3,02 | 0 | 15,2 |
| 9,1 | 0 | 0,0052 | 0,29 | 20 | 3,02 | 0 | 15,2 |
| 9,1 | 0,0052 | 0 | 0,29 | 33 | 0,09 | 0,93 | 12,27 |
| 9,1 | 0 | 0,0052 | 0,29 | 33 | 0,09 | 0,93 | 12,27 |
| 9,1 | 0,0105 | 0 | 0,29 | 24 | 3,36 | 0 | 15,2 |
| 9,1 | 0 | 0,0105 | 0,29 | 24 | 3,36 | 0 | 15,2 |
| 9,1 | 0,0105 | 0 | 0,29 | 28 | 0 | 3,42 | 12,04 |
| 9,1 | 0 | 0,0105 | 0,29 | 28 | 0 | 3,42 | 12,04 |

*) рН дослідної суміші до інкубації.

**) рН дослідної суміші після інкубації.

Таблица 9

рівноваги фосфофразної реакції при 37° С
равновесия фосфофразной реакции при 37° С

| Знайдено при рівновазі | | | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|--|
| Р неорг. (мг) | [АТФ]·10 ⁻³ | [АДФ]·10 ⁻³ | [ФКР]·10 ⁻³ | [КР]·10 ⁻³ | $K = \frac{[\text{КР}] \cdot [\text{АТФ}]}{[\text{ФКР}] \cdot [\text{АДФ}]}$ |
| 20 | 0,07 | 2,55 | 2,55 | 12,65 | 0,136 |
| 22 | 0,08 | 2,78 | 2,78 | 12,42 | 0,129 |
| 19 | 0,06 | 2,52 | 2,42 | 12,78 | 0,126 |
| 33 | 0,08 | 2,94 | 2,94 | 12,26 | 0,113 |
| 19 | 1,68 | 0,94 | 0,94 | 14,26 | середнє 0,126 2,7 |
| 26 | 0,88 | 1,74 | 1,74 | 13,46 | 3,9 |
| 23 | 2,39 | 0,23 | 0,23 | 14,97 | 6,8 |
| 24 | 1,44 | 1,42 | 1,42 | 13,78 | 9,9 |
| 23 | 1,31 | 1,55 | 1,55 | 13,65 | 7,5 |
| 20 | 1,16 | 1,42 | 1,42 | 13,78 | 8,0 |
| 20 | 1,03 | 1,55 | 1,55 | 13,65 | 5,9 |
| 19 | 0,62 | 1,94 | 1,97 | 13,23 | 2,2 |
| 20 | 1,29 | 1,35 | 1,23 | 13,95 | 10,8 |
| 19 | 0,88 | 1,74 | 1,65 | 13,56 | 4,2 |
| 29 | 1,37 | 1,65 | 1,65 | 13,55 | 6,8 |
| 29 | 1,37 | 1,65 | 1,65 | 13,55 | 6,8 |
| 29 | 1,16 | 1,86 | 1,90 | 13,30 | 4,4 |
| 29 | 1,03 | 1,99 | 2,03 | 13,17 | 3,4 |
| 28 | 1,81 | 1,55 | 1,55 | 13,65 | 9,7 |
| 27 | 1,78 | 1,58 | 1,58 | 13,62 | 9,7 |
| 31 | 1,71 | 1,71 | 1,71 | 13,49 | 7,9 |
| 28 | 1,74 | 1,68 | 1,68 | 13,52 | 8,4 |

Обговорення результатів

За нашими спостереженнями, із сухого ацетонowego препарату очищеного міозину за допомогою дистильованої води або сольових розчинів можна здобути білкову фракцію, яка становить майже 4% вихідного міозину. За всіма своїми властивостями цей білок (або суміш білків) є, на протилежність до вихідного міозину, не фібрилярним, а глобулярним. Для пояснення цього факту можна було зробити два припущення: 1) під впливом ацетону міозин може перетворюватися на глобулярний білок і 2) міозин утворює стійкий комплекс з деякими глобулярними білками мускульної плазми, і цей комплекс дисоціює під впливом ацетону. Перше припущення хоч і не можна повністю відкинути, все ж воно мало ймовірно, друге ж припущення добре погоджується з низкою експериментальних фактів. На сьогодні більшість авторів додержується погляду, що міозин, не дивлячись на те, що він легко кристалізується, не являє собою хімічного індивідууму, а є комплексною системою речовин. До такого погляду схиляється останнім часом Енгельгардт (1947). До цього ж висновку прийшли Фердман і Нечипоренко (1946, 1947) на підставі своїх досліджень над процесом дезамінування аденілової системи міозином. Нарешті, такого ж погляду додержується Сент-Дьордьї з співробітниками (1946—1947); вони гадають, що міозин складається з ензиматично неактивного скелету, на якому адсорбована деяка кількість термостабільних протеїноподібних речовин, названих цими авторами „протинами“, які з міозиновим скелетом утворюють ензиматично активний комплекс.

Наслідки нашої роботи щодо існування ФКр-АДФ-фосфофери у вільній і зв'язаній з актоміозином формах, так само, як і дані Фердмана і Нечипоренко (1946), що показали те ж саме відносно дезамінази Шмідта, важко погодити з поглядом Сент-Дьордьї. В цих випадках мова йде про комплексоутворення міозину з двома ензимами мускульної тканини, а не про одержання ензиматичної активності внаслідок утворення комплексу з двох білків, що самі по собі неактивні. Очевидно, природа білків, відділених від міозинового комплексу, більш складна і потребує дальшого вивчення. Дальшого вивчення потребує також питання взаємовідношення актину з фосфофери.

Деякого обговорення вимагають наслідки, одержані нами при вивченні властивостей фосфофери. За літературними даними відносно властивостей неочищеної фосфофери (діалізований мускульний екстракт) іони Mg^{++} потрібні для протікання реакції в обох напрямках. Наші дані показали, що іони Mg^{++} , які повністю можна замінити іонами Ca^{++} , сприяють протіканню реакції тільки в одному напрямі (I) — в напрямі фосфорилування АДФ за рахунок фосфокреатину. Наші дані свідчать про те, що іони лужноземельних металів впливають не на активність ензиму, а на активність субстрату. Цей ефект за своїм змістом, мабуть, ідентичний ефектові, який описав Гейнс (Hanes, 1940—1942) з фосфорилазою, а також Беліцер і Ципе-

рович (1947) з фосфатазами. За даними цих авторів, константа рівноваги визначається не відношенням концентрацій реагуючих фосфорних ефірів, а відношенням концентрацій однойменних фосфатних іонів цих сполук. Пірофосфатні сполуки, якими є АТФ і АДФ, за деякими даними літератури (напр., Frankentahl, 1944), утворюють комплекс з двовалентними іонами, звільняючи при цьому водневі іони. Утворення комплексу з цими іонами впливає на відношення однойменних іонів, мабуть, таким же чином, як і зміна рН. Для вирахування кількісного відношення необхідно було знати чотири константи дисоціації АТФ і три константи дисоціації АДФ, а також константи дисоціації кальцієвих та магнієвих солей цих сполук. Встановлення факту, що Mg^{++} у фосфофери реакції впливає не на активність ензиму, а на активність субстрату, очевидно, потребує перегляду загальноприйнятого погляду, висловленого вперше Парнасом, про механізм дії Mg^{++} у фосфофери реакції, а саме, що Mg^{++} наближає субстрат до ензиму. Суть впливу іонів лужноземельних металів на фосфофери реакцію полягає, очевидно, в тому, що вони, завдяки утворенню комплексу з АДФ і АТФ, змінюють відношення однойменних іонів.

За літературними даними (див. Сент-Дьордьї, 1947), Ca^{++} і Mg^{++} у мускулах зв'язані з міозином. Цей факт, можливо, сприяє тому, що в мускульній плазмі креатин служить могутнім акцептором фосфора і акумулятором енергії (див. роботи Беліцера, 1940), тоді як у міозинових міцелах ФКр служить донатором фосфату і енергії. Фізіологічне значення утворення комплексу міозину з фосфофери полягає, мабуть, у тому, що внаслідок цього мускульні фібрили мають можливість у присутності іонів Ca або Mg і каталітичних кількостей АДФ безпосередньо використовувати енергію ФКр для скорочення.

Висновки

1. Ензим, що каталізує встановлення рівноваги між ФКр і АДФ, з одного боку, та креатином і АТФ, з другого, міститься в мускулах у двох формах: а) у вільній, як водорозчинний ензим мускульної плазми, і б) в зв'язаній, як водонерозчинний актоміозин-ензим-комплекс мускульної фібрили.

2. Із сухого ацетонowego препарату очищеного міозину можна за допомогою дистильованої води або сольових розчинів здобути білкову фракцію (майже 4% вихідного міозину), що може переносити термінальний Р АТФ на креатин. У вихідному міозині при рН близько 7 в присутності іонів Ca і каталітичних кількостей АТФ або АДФ помічається дефосфорилування ФКр.

3. Була вивчена константа рівноваги фосфофери реакції і встановлена залежність її від концентрації іонів Ca^{++} і Mg^{++} при рН 9,1. Ці дослідження показали, що іони Ca^{++} і Mg^{++} впливають не на активність ензиму, а на активність субстрату.

4. Актин, виготовлений за методом Штрауба, має фосфофазну активність приблизно такого ж порядку, як і білок, відщеплений від міозину.

ЛІТЕРАТУРА

- Белицер В. А. (1940), Химические превращения в мышце, Медгиз.
Беліцер В. О. і Циперович А. С. (1947), Укр. біох. журн., XIX, 5; XX, друкується.
Любимова М. Н. и Ангельгардт В. А. (1939), Биохимия, 4, 716.
Любимова М. Н. и Певзнер (1941), Биохимия, 6, 176.
Саков Н. Е. (1941), Биохимия, 6, 163.
Сорени Э. Т. и Чепинога О. П. (1946), Докл. АН СССР, 52, 323; Укр. біох. журн. XVIII, 159.
Сорени Э. Т. (1947), Укр. біох. журн., XX, 244; Докл. на VII Всес. съезде физиологов, биохимиков и фармакологов.
Фердман Л. Л. і Нечипоренко З. Ю. (1946), Укр. біох. журн., XVIII, 105.
Фердман Л. Л. і Нечипоренко З. Ю. (1947), Укр. біох. журн. XIX, 67; XX, друкується.
Ангельгардт В. А. (1947), Докл. на белковой конференции АН СССР 12. III 1947 г.
Banga I. (1943), Studies Univ. Szeged, 3, 59.
Cori C. F. (1946), J. Biol. Chem., 165, 395.
Frankenthal L. (1944), J. Amer. Chem. Soc., 66, 2124.
Hanes C. S. (1940 і 1942), Proc. Roy. Soc., B, 128, 421; — and Maskell, Biochem. J., 36, 76.
Lehmann H. (1935; 1936; 1942), Biochem. Z., 281, 271; 286, 336; — and Pollak, Biochem. J. 36, 672.
Lohmann K. (1934), Biochem. Z.; 271, 264.
Meyerhof O. u. Lohmann K. (1935), Naturwiss., 23, 337.
Needham D. M. and van Heyningen W. E. (1935), Biochem. J., 29, 2040.
Ostern P., Baranowski T. et Reiss (1935), C. r. Soc. Biol., Paris, 118, 1414.
Price W. H. and Cori C. F. (1946), J. Biol. Chem., 162, 393.
Szent-Györgyi і співробітники (1946—1947), Hung. Acta Physiol., 1; 2; Nature, 159, 124; О мышечной деятельности, Медгиз.

Фосфокреатин-аденозиндифосфат-фераза мышц и ее взаимоотношение с актомиозином

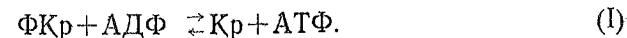
Э. Т. Сорени и Р. Г. Дегтярь

Институт биохимии Академии наук УССР, Киев

I

Исходное наблюдение для настоящего сообщения следующее: если миозин первого, второго или третьего осаждения или миозин В осадить охлажденным ацетоном и быстро высушить, то довольно значительная часть сухих ацетоновых препаратов растворяется

в дистиллированной воде или в солевых растворах. Эти белковые растворы ни по виду, ни по химическим и физическим свойствам не похожи на растворы исходного миозина. Они имеют низкую вязкость и не осаждаются холодной водой или при слабом подкислении в присутствии солей. По всем свойствам этот белок (или смесь белков) является, в противоположность исходному миозину, не фибриллярным, а глобулярным. Отщепленный от миозина белок так же, как и актин, полученный по методу Штрауба, катализирует реакцию равновесия:



Идентичный белок можно выделить также из водных экстрактов мышцы. Таким образом энзим ФКр-АДФ-фераза находится в мышцах в двух формах: а) в свободной, как воднорастворимый энзим мышечной плазмы и б) в связанной, как воднонерастворимый актомиозин-энзим-комплекс мышечной фибриллы. В настоящей работе мы сообщаем о некоторых свойствах этого энзима.

II

При подкислении водных экстрактов из мышцы кролика до pH 5,0—5,1 АТФ-Кр-фосфофераза осаждается вместе с воднорастворимой АТФ-азой (см. табл. 1). Оба энзима легко отделимы друг от друга. АТФ-аза находится, в соответствии с данными Сакова, в глобулиновой фракции, АТФ-Кр-фосфофераза в альбуминовой (см. табл. 2).

Активный энзим, катализирующий реакцию (I), можно приготовить путем обработки охлажденных, измельченных на мясорубке Латапи мышц 5—8-кратным объемом охлажденного ацетона, быстрым высушиванием ацетонового препарата, промыванием сухого ацетонового препарата 20-кратным объемом охлажденной воды и экстракцией 10-кратным объемом 1% KCl. Приготовленный таким образом энзим содержит 9—10 мг белка в 1 мл, не содержит АТФ-азы и переносит при pH 9,1 только терминальный Р АТФ на креатин (см. табл. 3). Ионы Ca^{++} тормозят активность энзима: 0,023 M Ca на 78%, 0,001 M Ca на 39%.

III

Аналогичным образом готовится ацетоновый препарат из миозина и актомиозина. Перед осаждением ацетоном целесообразно прибавить небольшое количество NaATF. Самая активная фосфофераза, обладающая очень слабой АТФ-азной активностью, получается при экстракции сухого ацетонового препарата 1% KCl. Интересно отметить, что вторичный гликолевый (pH 9,1) экстракт, полученный из остатков сухого ацетонового препарата после экстракции его в 1% KCl, проявляет лишь слабую активность фосфофазы, в то время как

его АТФ-азная активность значительно выше, чем в первом экстракте. Однако активность АТФ-азы на 1 мг белка ниже, чем в исходном миозине. В табл. 4 сопоставлены фосфоферазная активность КСI-экстрактов ацетоновых препаратов из миозина В, А₁, А₂ и А₃ с одновременным указанием содержания белка в экстрактах и процента белка по отношению к исходному миозину. Препараты, полученные из миозина В, в большинстве случаев обладают более высокой активностью, чем препараты из А₁, А₂ и А₃.

Миозины В и А₁ содержат небольшое количество креатина; при переосаждении миозина креатин исчезает. В соответствии с этим, при определении АТФ-азной активности неочищенного миозина, количество прямо определяемого фосфора всегда больше количества неорганического фосфора (по Матисону). После переосаждения миозина это расхождение исчезает, и увеличение прямо определяемого фосфора соответствует истинной минерализации АТФ (см. табл. 5).

Параллельное исследование фосфоферазной активности миозина и соответствующих ацетоновых препаратов (см. табл. 6) показало, что, в то время как ацетоновые препараты хорошо активны, исходный очищенный миозин не обладает способностью переносить терминальный Р АТФ на креатин. Однако при изучении обратного направления реакции (дефосфорилирование ФКр в присутствии ионов Са⁺⁺ и каталитических количеств АДФ или АТФ) можно обнаружить фосфоферазную активность нативного миозина (см. табл. 7): При многократном переосаждении эта активность хотя и падает, но полностью не исчезает. Поскольку количество глобулярных белков, образующих стойкий комплекс с миозином, равно примерно 4%, эта активность приблизительно соответствует активности ацетоновых препаратов. Ранее высказанное нами предположение (Сорени, 1947), что комплексообразование миозина с фосфоферазой тормозит активность последней, не соответствует действительности. Торможение реакции справа налево, при условиях, оптимальных для действия АТФ-азы, обуславливается, очевидно, успешной конкуренцией АТФ-азы с фосфоферазой за субстрат.

IV

Белок, отщепленный от миозина, катализирует, как сказано выше, реакцию (I) и не дает реакции



По литературным данным, реакция (II) протекает в кислой среде слева направо, в щелочной среде справа налево, причем ионы Mg⁺⁺ требуются для протекания реакции с обеих сторон. Во всех этих работах в качестве энзима служили диализированные мышечные экстракты. Банга (1943), правда, очистила фосфоферазу до такой степени, что она, подобно нашему препарату, не давала реакцию (II), однако автор не изучал влияния ионов щелочноземельных металлов.

По нашим наблюдениям, ионы Mg⁺⁺, которые полностью можно заменить ионами Са⁺⁺, тормозят реакцию (I) справа налево и катализируют ее слева направо. Торможение фосфорилирования креатина ионами Са⁺⁺ или Mg⁺⁺ при pH 9,1 зависит от концентрации реагирующих веществ (см. табл. 8). При постоянной концентрации АТФ (около 3 · 10⁻³ M) максимальное торможение (95—100%) наблюдалось, если молярная концентрация Са⁺⁺ или Mg⁺⁺ была примерно в 6 раз больше молярной концентрации прибавленного креатина. Эти данные говорят о том, что Mg и Са влияют не на активность энзима, а на активность субстрата.

Для количественного выражения действия ионов щелочноземельных металлов мы изучали зависимость константы равновесия от концентрации ионов Са и Mg при одинаковом pH (9,1).

Константа равновесия

$$K = \frac{[\text{Кр}] \cdot [\text{АТФ}]}{[\text{ФКр}] \cdot [\text{АДФ}]}$$

в пробах без прибавления Са и Mg определялась только справа налево, в пробах с прибавлением этих ионов — с обеих сторон. Опыты, приведенные в табл. 9 и на рис. 1, показывают, что прибавление M/100 Са⁺⁺ или Mg⁺⁺ при pH 9,1 увеличивает константу равновесия примерно в 80 раз (от 0,126 до около 10), в то время как изменение pH от 9,1 до 6,0 без прибавления этих ионов увеличивает константу лишь в 20 раз. M/300 Са или Mg дает примерно такой же эффект, как переход от pH 9,1 до pH 6,1.

Константа равновесия определяется, как это установил Гейнс (Hanes, 1940, 1942) для фосфоролазной реакции и Белицер и Циперович (1947) для фосфатазной, не отношением концентраций, реагирующих фосфорных эфиров, а отношением од но и м е н н ы х концентраций фосфатных ионов этих соединений. Пирфосфатные соединения образуют комплексы с двухвалентными ионами, освобождая при этом водородные ионы (Франкенталь, 1944). На отношение одноименных фосфатных ионов АТФ и АДФ влияет, очевидно, не только pH среды, а также присутствие двухвалентных ионов. Таким образом суть влияния щелочноземельных ионов на фосфоферазную реакцию заключается в том, что они благодаря комплексообразованию с АТФ и АДФ изменяют отношение одноименных ионов этих соединений.

Ионы Са и Mg в физиологических концентрациях оказались равноценными по действию, чрезвычайно мощными факторами, регулирующими направление фосфоферазной реакции. В мышечной плазме креатин служит акцептором фосфата и аккумулятором энергии (Белицер), в то время как в миозиновых мицеллах, содержащих ионы Са и Mg, ФКр служит донатором фосфата и энергии. Физиологическое значение комплексообразования актомиозина с ФКр-АДФ-феразой заключается, очевидно, в том, что вследствие этого мышеч-

ные фибриллы могут в присутствии ионов Mg или Ca и каталитических количеств АДФ использовать энергию ФКр для сокращения.

Природа белков, отделяемых от миозинового комплекса сложна и требует дальнейшего изучения.

V

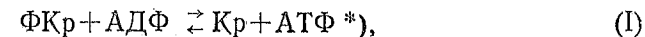
Исходя из факта, что из миозина В выход белка, обладающего фосфоферазной активностью, обычно больше, чем из миозина А₁, А₂, А₃ (см. табл. 4), мы проверили АТФ-Кр-фосфоферазную активность актина, полученного по методу Штрауба. Оказалось, что актин действительно обладает фосфоферазной активностью примерно такого же порядка, как и белок, отщепленный от миозина (см. табл. 10). При фракционировании актина методом изоэлектрического осаждения удается повысить его энзиматическую активность в два-три раза по отношению к исходному белку. Молекулярная гомогенность актина до сих пор не доказана. Вопрос взаимоотношения актина с фосфоферазой требует дальнейшего изучения.

Дослідження взаємодії міозину з фосфокреатином

Е. Т. Сорені і П. Д. Дворникова

Інститут біохімії Академії наук УРСР, Київ

В попередньому повідомленні (Сорені і Дегтяр, 1948) показано, що ФКр-АДФ-фераза, що каталізує реакцію рівноваги



знаходиться в мускулах у двох формах: а) вільний — водорозчинний ензим мускульної плазми і б) зв'язаний — водонерозчинний актоміозин-ензим-комплекс.

Було висказано припущення, що внаслідок комплексоутворення міозину з фосфоферазою в присутності іонів Са і каталітичних кількостей АДФ мускульні фібрили використовують безпосередньо енергію ФКр для скорочення. Міозин, як відомо, виділяється поміж білків своєю надзвичайно виявленою здатністю утворювати комплекси з різними хімічними сполуками, з ліпідами, глікогеном, білками і т. ін.

Ця робота має своєю метою вивчити:

- 1) чи здатний міозин зв'язувати креатин і ФКр і
- 2) чи можливе фосфорилування міозину за допомогою ФКр в присутності каталітичних кількостей АДФ.

Методика

Препарати. Міозин ми здобували за методом Любимової і Певзнер, АТФ і АДФ за методом Ломана (Lohmann). Креатин виділяли з мускулів кролика за методом Нейбауера (Neubaue), а ФКр за методом Лемана (Lehmann) шляхом ензиматичного фосфорилування креатину фосфогліцериновою кислотою. Наші препарати Ва-солі ФКр ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_6\text{N}_3\text{Ba} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) мали 0,1—0,3% неорганічного фосфору і 4,5—4,8% прямовизначуваного фосфору, замість теоретичного 7,4% (чистота препарату приблизно 60%).

*) Скорочення, що ми їх вживаємо в тексті, такі:

Кр — креатин;

ФКр — фосфокреатин;

АТФ — аденозинтрифосфат;

АДФ — аденозиндифосфат.