

Х. М. РАВИКОВИЧ, О. Н. СЕТКИНА и К. Д. ЛЕОНТЬЕВА

СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ МЫШЦЫ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ОБЛАСТИ

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 28 VI 1947)

Выделенный из мышц белок миозин явился предметом многочисленных исследований, особенно после того как Энгельгардтом и Любимовой была обнаружена аденозинтрифосфатазная активность его как основного сократительного белка мышц и взаимная связь между его механическими свойствами и распадом аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). В последние годы Szent-Györgyi и сотрудники открыли другие структурные белки мышцы — актин и актомиозин, из которых актомиозин является сократительным белком, обладающим большой реакционной способностью.

Наряду с многочисленными исследованиями различных физико-химических свойств миозина (двойное лучепреломление, вязкость, изоэлектрическая точка, аминокислотный состав и др.), только одна работа Любимовой и Шипалова ⁽¹⁾ посвящена изучению его спектральных свойств. В результате проведенного исследования авторы приходят к следующему выводу: а) спектр поглощения миозина в ультрафиолетовой области имеет максимум при $\lambda = 2800 \text{ \AA}$, хотя на представленных в статье спектрограммах изображен только перегиб, но не максимум; б) при смещении растворов миозина и АТФ получается кривая поглощения с максимумом при $\lambda = 2700 \text{ \AA}$, которая представляет результат простого физического наложения обоих спектров; в) инактивация миозина нагреванием до 37° C или подкислением до $\text{pH} = 4$ не изменяет спектра миозина.

Настоящее исследование имело своей целью изучить спектр поглощения белков мышцы в ультрафиолетовой области и в дальнейшем с помощью спектрографического метода проследить кинетику процесса взаимодействия миозина и актомиозина с АТФ, имеющей собственный характерный спектр в этой же области.

Миозиновый гель из мышц кролика получался по методу Greenstein и Edsall двух-, трех- и четырехкратным пересаживанием. Гель разбавлялся 0,6 *M* раствором хлористого калия; такой раствор миозина был достаточно прозрачным для спектрографирования. Первые спектрограммы были получены для миозина в растворах различной степени очистки и концентрации (от 0,156 мг N в мл до 2,01 мг N в мл). Расшифровка спектрограмм показала, что многократность пересаживаний не оказывает влияния на характерную структуру спектра миозина и, повидимому, сказывается только на интенсивности максимумов. В то же время от концентрации миозина в растворе зависит получение более или менее четкой и полно выраженной структуры спектра. Во всех нижеописанных опытах исследовался миозин, полу-

ченный двукратным переосаждением, имеющий концентрацию не ниже 0,7 мг N в мл.

Регистрация спектров белков производилась фотографическим методом порога почернения при помощи кварцевого спектрографа Schmidt и Naensch средней дисперсии. Источником света с непрерывным спектром излучения служила низковольтная водородная лампа ГОИ. При всех съемках применялись диапозитивные пластинки.

Раствор белка помещался в кювету переменной толщины (по Hilger) и спектрографировался при толщинах от 0,1 до 10 мм с экспозицией 1 мин. для каждой толщины в широком интервале длин волн от 3200 до 2200 Å. Кривые поглощения исследуемых веществ строи-

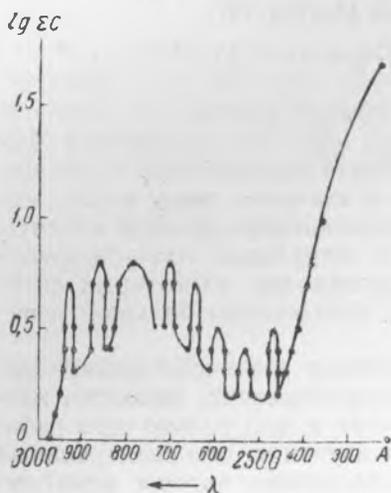


Рис. 1. Кривая поглощения миозина, $C=2,01$ мг N в мл, $pH=7,1$

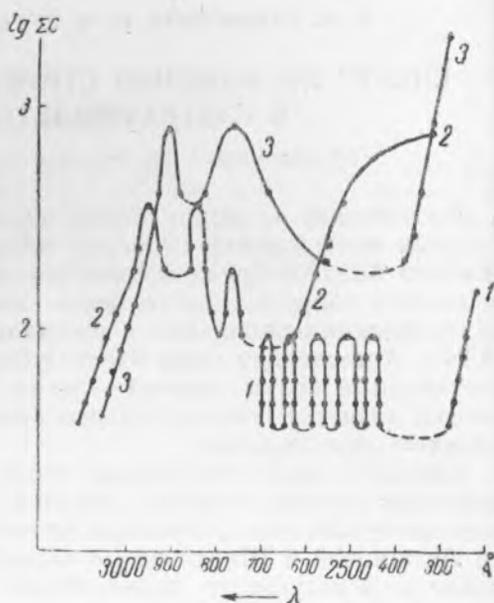


Рис. 2. Абсолютные кривые поглощения фенилаланина (1), тирозина (2) и триптофана (3)

лись в координатных осях $lg \Sigma C - \lambda$, причем расчет значений координат для каждой толщины производился по выражению $lg \Sigma C = O - lg d$, а значение длин волн λ , откладываемых по оси абсцисс, определялось с помощью негатива по дисперсионной кривой прибора.

Полученный нами спектр поглощения миозина в солевом растворе в ультрафиолетовой области изображен на рис. 1. Как видно из рисунка, спектр имеет сложную структуру, состоящую из ряда отдельных максимумов различной интенсивности, которая в целом представляет совокупность полос поглощения триптофана, тирозина и фенилаланина. Сравнение миозина и составляющих его компонентов по их поглощению в ультрафиолетовой области возможно только по спектрам поглощения, полученным для этих веществ в растворах с одним растворителем. Так как в специальной литературе имеются данные по поглощению циклических аминокислот, главным образом в водных растворах и частично в солянокислых растворах, нами были исследованы дополнительно спектры поглощения триптофана, тирозина и фенилаланина в 0,6 M растворе хлористого калия. Концентрация каждой аминокислоты в исследуемом растворе соответствовала процентному содержанию ее в миозине (фенилаланина 4,3; тирозина 3,4; триптофана 0,8 в % по весу⁽²⁾). Данные по спектрографическому исследованию аминокислот представлены на рис. 2 в виде абсолютных кривых погло-

шения, построенных для эквимолекулярных количеств чистых препаратов.

Сравнивая спектры миозина и циклических аминокислот по рис. 1 и 2, можно отметить, что максимумы в спектре миозина, выявленные у $\lambda=2930$ и 2780 \AA , соответствуют поглощению триптофаном и тирозином в этой области, максимум у $\lambda=2860 \text{ \AA}$ соответствует поглощению тирозином, и максимумы у $\lambda=2710, 2650, 2590, 2535, 2470 \text{ \AA}$ соответствуют поглощению фенилаланином. Максимум поглощения у $\lambda=2905 \text{ \AA}$, характерный для спектра триптофана, полученного в солевом растворе, очевидно, перекрывается полосой поглощения тирозина благодаря тому, что содержание последнего в миозине в четыре раза превышает содержание триптофана, хотя абсолютная интенсивность поглощения триптофана больше, чем у тирозина.

Спектр поглощения миозина был получен также с помощью фотоэлектрического способа регистрации. В этом случае тонкую структуру спектра возможно было выявить только в растворах с низкой концентрацией белка ($0,2 - 0,25 \text{ мг N в мл}$) и при высокой чувствительности установки. Для этой цели мы пользовались кварцевым ультрафиолетовым монохроматором Fuess и в качестве индикатора — сурьмяно-цезиевым фотоэлементом для ультрафиолетовой области. Источником света служила низковольтная водородная лампа ГОИ. Измерение проводилось с ламповым электрометром чувствительностью 1 деление = $0,5 \cdot 10^{-12} \text{ A}^*$.

Кривые поглощения для миозина, полученные фотографическим и фотоэлектрическим способами, полностью совпадают друг с другом (с точностью до 5 \AA) при всех длинах волн в интервале от 3040 до 2400 \AA . При фотоэлектрической регистрации спектра на кривой поглощения миозина, кроме максимумов, соответствующих поглощению циклических аминокислот, выявляется еще дополнительное поглощение, многократно наблюдаемое в белках, но не получившее еще достаточного объяснения.

Спектры поглощения других структурных белков мышцы — актина и актомиозина, как было указано выше, исследовались фотографическим способом. Предоставленный нам проф. И. И. Ивановым для спектральных исследований белок актин был приготовлен в лаборатории кафедры биохимии I Московского медицинского института по методу Straub и Szent-Györgyi⁽³⁾. Концентрация актина в растворе не превышала $0,7 \text{ мг N в мл}$. На рис. 3 дана кривая поглощения актина, активированного солями, которая в основном совпадает с кривой поглощения неактивированного актина. Как видно из рис. 3, поглощение актином в длинноволновой части спектра более полное, чем в той же области для миозина.

Другим более существенным различием в структурах спектров миозина и актина является отсутствие в спектре актина максимумов в коротковолновой области, соответствующих полосам поглощения фенилаланина. В связи с этим обстоятельством возникает предположение о том, что содержание фенилаланина в актине, вероятно, очень мало и во всяком случае значительно меньше, чем в миозине. Исследование актина на содержание в нем циклических аминокислот, в особенности фенилаланина, химическими методами позволило бы решить этот вопрос в окончательной форме.

Актомиозин исследовался спектрографически в виде естественной белковой фракции так называемого миозина Б, приготовленного по Banga и Szent-Györgyi⁽⁴⁾ и в виде искусственного соединения одной части активированного актина и двух частей (по весу) миозина, при-

* Выражаем благодарность Н. С. Хлебникову и А. Е. Меламиду за помощь при проведении фотоэлектрических измерений спектров миозина.

готовленного по Szent-Györgyi (3). В обоих случаях относительная вязкость полученного препарата белка увеличивалась по сравнению с вязкостью исходных компонентов, что по Szent-Györgyi является специфической характеристикой актомиозина. Кривые поглощения, полученные для обоих препаратов актомиозина, идентичны между собой и не отличаются по положению максимумов от кривой поглощения миозина. В то же время они представляют как бы сумму кривых поглощения активированного актина и фенилаланина (рис. 4).

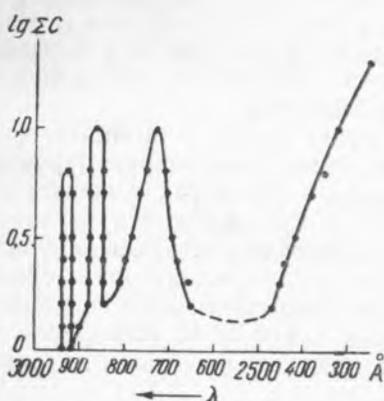


Рис. 3. Кривая поглощения актина, активированного солями, $C=0,7$ мг N в мл

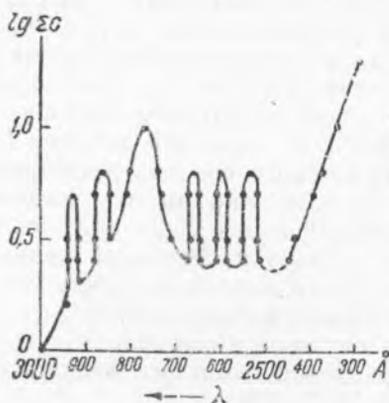


Рис. 4. Кривая поглощения актомиозина

Таким образом, в результате спектрального исследования миозина, актина и актомиозина выявлена тонкая структура спектра этих белков в ультрафиолетовой области (3040—2230 Å). Спектральная характеристика каждого структурного белка соответствует наличию и количественному содержанию в нем избирательно поглощающих аминокислот и зависит также от поглощения самим белком.

Дальнейшей задачей наших исследований структурных белков мышцы является выяснение вопроса о существовании взаимной связи между спектральными свойствами миозина и актомиозина и распадом аденозинтрифосфата.

Лаборатория физической химии Института
биологической и медицинской химии
Академии Наук СССР

Поступило
28 VI 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Н. Любимова и М. С. Шипалов, Биохимия, 5, в. 2, 144 (1940). ² J. T. Edsall, Advances in Protein Chemistry, 1 (1944). ³ F. B. Straub, Studies from the Institutes of Medical Chemistry Univ. Szeged, 2 (1942); 3 (1943); A. Szent-Györgyi, 3 (1943). ⁴ I. Banga and A. Szent-Györgyi, ibid., 1 (1941—1942).