

А. В. КОТЕЛЬНИКОВА

О ФОСФОМУТАЗЕ АДЕНОЗИНДИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ* ИЗ ПЕЧЕНИ

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 11 X 1947)

В 1943 г. Colowick и Kalckar (1) обнаружили в мышцах поразительно термостабильный фермент, названный ими миокиназой, катализирующий, как показали исследования Kalckar (2), превращение двух молекул аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) в одну молекулу аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и одну молекулу адениловой кислоты. На основании данных Colowick и Kalckar, миокиназа является совершенно специфичной для мышц; однако в мозге и в сердце ими было обнаружено все-таки 5% активности миокиназы мышц; печень, почки и эндокринные железы оказались, по описанию авторов, „полностью свободными от миокиназы“.

В настоящее время многими работами показано, что АТФ, выполняя роль донатора фосфата, может отдать лишь один лабильный фосфат, АДФ же донатором фосфата не является. В мышцах лабильный фосфат АДФ может быть использован благодаря присутствию миокиназы. Встает весьма важный вопрос: используется ли в других органах и тканях лабильный фосфат АДФ и если используется, то каким путем?

Мы поставили своей задачей исследовать, не содержится ли фосфомутаза АДФ в других тканях и, в первую очередь, в печени, так как в ней присутствуют в больших количествах как АТФ, так и АДФ.

Мы исследовали на содержание фосфомутазы АДФ экстракты печени кролика, полученные таким же способом, как мы приготавливали экстракты при работе с мышцами (3): водный экстракт—экстракцией растертой печени 2 объемами дистиллированной воды в течение 2 час. при комнатной температуре, центрифугированием и диализом полученного раствора; 0,1 М КСI-экстракт—экстракцией растертой печени 1,5 объемами 0,1 М КСI в течение 2 час. при комнатной температуре, осаждением полученного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при половинном насыщении и диализом фильтра.

О содержании фосфомутазы АДФ судили при помощи двух тестов: гексокиназного, предложенного Kalckar (2), и по расщеплению АДФ в присутствии очищенного миозина. Методика и постановка опытов описаны в нашей предыдущей работе (3). Гексокиназный тест основан на специфической способности гексокиназы переносить один лабильный фосфат АТФ на глюкозу, с АДФ реакция не идет. В присутствии фосфомутазы АДФ гексокиназа переносит на глюкозу фосфат и с АДФ, что можно наблюдать по уменьшению лабильного фосфора.

* В связи с тем, что фермент, катализирующий дисмутацию АДФ, открытый Colowick и Kalckar в мышцах и названный им «миокиназой», как показывает настоящая работа, распространен в организме более широко, чем это предполагалось, и не идентичен миокиназе, акад. Я. О. Парнас предложил мне назвать эту группу ферментов «фосфомутазами АДФ» по аналогии с обозначением «мутазы», предложенным им же в 1911 г. для ферментов, катализирующих реакцию Канныцарро.

Очищенный миозин отщепляет фосфат только от АТФ, но не от АДФ. Если присутствует фосфомутаза АДФ, то АДФ также начинает расщепляться миозином.

Оба теста дали положительный результат с печеночными экстрактами. С миозином более глубокое расщепление АДФ в присутствии КСl-экстракта печени происходило при pH 7,6 (по сравнению с pH 8,6) и с Mg. В этих условиях отщеплялось 53—57% лабильного

Таблица 1

Активность фосфомутазы АДФ в печеночных экстрактах по гексокиназному тесту (инкубация 15 мин. при 37° при pH 7,6 в присутствии АДФ, гексокиназы, глюкозы и Mg 0,025 M)

№ опыта	Экстракт печени		Найдено		Отщепилось неорг. P в % лабильн. P контроля	Перенесено P на глюкозу в % лабильн. P контроля
			неорган. P, γ	лабильн. P + неорган. P, γ		
75	0,1 M КСl-экстракт	Проба	35,2	41,6	31	55
		Контр.	21,0	66,75	—	—
76	0,1 M КСl-экстракт	Проба	20,2	41,6	8,5	51
		Контр.	15,75	68,6	—	—
	Водный экстракт	Проба	33,75	43,0	27	57
		Контр.	18,0	76,5	—	—

фосфора АДФ. Без миозина АДФ также расщеплялась печеночным КСl-экстрактом в присутствии Mg, но значительно менее глубоко — отщеплялось около 20% лабильного фосфата.

Данные, полученные гексокиназным тестом, показаны в табл. 1.

Таблица 2

Активность фосфомутазы АДФ (по миозиновому тесту) и аденозиндифосфатазная активность экстрактов печени после перфузии, обработанных и необработанных HCl (инкубация 10 мин. при 37°, взято лабильного P АДФ 61,2 γ)

№ пробы	Система	Найдено неорган. P, γ	Отщепилось P	
			γ	в % лабильн. P
1	Водный экстракт + M ₃ *, pH 7,6	80	43,75	71,5
2	Водный экстракт + M ₃ , pH 7,6, Mg 0,001 M	87,5	51,25	83
3	Водный экстракт + M ₃ , pH 8,6, Mg 0,001 M	82,5	46,25	81,5
4	Контроль	36,25	—	—
5	Водный экстракт, pH 7,6	46,25	10,0	16
6	Водный экстракт, pH 7,6, Mg 0,001 M	48,75	12,5	20
7	Контроль	36,25	—	—
8	Водный экстракт, обработ. HCl + M ₃ , pH 7,6	51,25	37,5	61
9	Водный экстракт, обработ. HCl + M ₃ , pH 7,6, Mg 0,001 M	57,5	47,75	71,5
10	Водный экстракт, обработ. HCl + M ₃ , pH 8,6, Mg 0,001 M	52,5	38,75	63
11	Контроль	13,75	—	—
12	Водный экстракт, обработ. HCl, pH 7,6	13,75	1,25	2
13	Водный экстракт, обработ. HCl, pH 7,6, Mg 0,001 M	15,0	2,5	4
14	Контроль	12,5	—	—

* Трижды пересаженный миозин.

Мы проверили в одном из опытов, не содержится ли фосфомутаза АДФ в крови. Для этого из крови кролика был получен экстракт 0,1 М КСІ таким же способом, как и для печени; с ним был поставлен гексокиназный тест. Мы обнаружили уменьшение лабильного фосфора АДФ в присутствии экстракта крови при обычных условиях опыта на 37%, т. е. фосфомутаза АДФ в крови присутствует, хотя и несколько менее активная, чем в печени. Так как печень содержит много крови, то встал вопрос, не зависит ли фосфомутазный эффект печеночных экстрактов от содержащейся в печени крови. Для выяснения этого был поставлен опыт с перфузией печени физио-

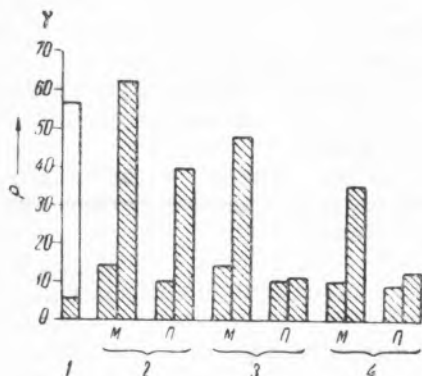


Рис. 1. Активность фосфомутазы АДФ по миозиновому тесту мышечного и печеночного экстрактов без обработки, при кипячении и после осаждения ТХУ. Mg 0,001 М, рН 8,6. М — мышечный экстракт, П — печеночный экстракт; левые столбики — контроль, правые — проба; светлые столбики — лабильный Р, заштрихованные — неорганический Р; 1 — кислотный гидролиз АДФ; 2 — АДФ + М₃ + экстракт, 3 — АДФ + М₃ + экстракт, кипяч. 1 мин., 4 — АДФ + М₃ + экстракт, осажденный ТХУ

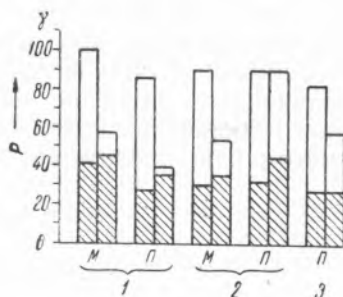


Рис. 2. Активность фосфомутазы АДФ по гексокиназному тесту мышечного и печеночного экстрактов без обработки, при кипячении и после осаждения ТХУ. М — мышечный экстракт, П — печеночный экстракт; левые столбики — контроль, правые — проба; светлые столбики — лабильный Р, заштрихованные — неорганический Р; 1 — АДФ + гексокиназа + экстракт, 2 — АДФ + гексокиназа + экстракт, кипяч. 5 мин., 3 — АДФ + гексокиназа + экстракт, осажденный ТХУ

логическим раствором. Из отмытой от крови печени был получен водный экстракт, который был разделен на две части. Одна часть была поставлена сразу на диализ, другая предварительно обработана 0,05 объема N HCl и нейтрализована, как это применял Kalskar⁽²⁾ при получении миокиназы из мышц, чтобы выяснить, устойчива ли печеночная фосфомутаза АДФ в кислой среде. С полученными экстрактами были поставлены опыты как с миозином, так и с гексокиназой. Результаты опытов с миозиновым тестом приведены в табл. 2.

Миозиновым тестом мы получили в этом опыте наибольшую активность фосфомутазы АДФ по сравнению с остальными опытами, так что активность должна быть отнесена за счет самой печеночной ткани, а не за счет крови. После обработки HCl фосфомутазная активность сохранялась почти полностью, наоборот, аденозиндифосфатазная активность почти целиком исчезла (пробы 12—14). Гексокиназный тест с экстрактами перфузированной печени подтвердил данные миозинового теста. Мы обнаружили, однако, что печеночные экстракты и, в особенности, обработанные HCl, быстро инактивируются при стоянии хотя бы и на холоду. Миозиновый тест, поставленный через неделю после опыта, приведенного в табл. 2, показал, что водный экстракт потерял больше половины активности, а экстракт, обработанный HCl, был совершенно неактивным.

Мы сравнивали печеночный и мышечный водные экстракты, полученные из одного и того же кролика одновременно и одинаковым способом, на содержание фосфомутаза АДФ и ее свойства: устойчивость к кипячению и к обработке трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Результаты с миозиновым тестом показаны на рис. 1 и с гексокиназным тестом на рис. 2.

Как видно из рисунков, наибольшее различие между фосфомутазой АДФ мышц и печени проявляется по отношению к кипячению в нейтральной среде: за 5 мин. кипячения печеночная фосфомутаза полностью инактивируется, мышечная же почти не теряет активности. Обработку ТХУ (осаждение равным объемом 10% ТХУ, растворение осадка в воде и нейтрализация) печеночная фосфомутаза выдерживает, но в меньшей степени, чем мышечная фосфомутаза.

При всех применяемых нами обработках, а также при хранении печеночная фосфомутаза проявляла себя как фермент значительно более лабильный, чем фосфомутаза из мышц.

Дальнейшее изучение фосфомутаза из печени, а также других органов и тканей на содержание фосфомутаза подобного типа является предметом наших ближайших исследований.

Поступило
11 X 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ S. Colowick and H. Kalckar, J. Biol. Chem., 148, 117 (1943). ² H. Kalckar, *ibid.*, 148, 127 (1943). ³ А. В. Котельникова, Биохимия, № 1 (1948).