

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

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ МЫШЦЫ В ПРИСУТСТВИИ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 25 III 1948)

Ферментативная реакция распада аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) является источником энергии для процесса мышечного сокращения. Под влиянием мышечного фермента миозина АТФ расщепляется с освобождением неорганического фосфата. Этот процесс идет при нейтральной реакции и ускоряется при сдвиге рН в щелочную сторону. Одновременно АТФ, в свою очередь, оказывает специфическое влияние на миозин, изменяя его механические свойства (1,2). Еще сильнее это влияние АТФ сказывается на физико-химических свойствах сократительного белкового комплекса мышцы—актомиозина (3).

Для изучения физико-химических свойств миозина и актомиозина и их изменений в присутствии АТФ мы воспользовались спектрами поглощения этих белков и АТФ в ультрафиолетовой области спектра.

Впервые исследование спектров миозина в присутствии АТФ в ультрафиолетовой области было предпринято М. Н. Любимовой и М. С. Шипаловым (4). Авторы указывают, что при смешении растворов миозина и АТФ получается кривая поглощения, которая пред-

ставляет результат простого физического наложения обоих спектров. Однако полученные нами тонкие структуры спектра поглощения миозина в ультрафиолетовой области привели нас к другому выводу.

Спектры поглощения структурных белков мышцы в ультрафиолетовой области обусловлены наличием и количественным содержанием в них избирательно-поглощающих аминокислот и весьма близки друг к другу по положению главной полосы поглощения у $\lambda = 2770$ — 2780 \AA (5). Спектр поглощения АТФ (а также и других производных аденина) имеет в ультрафиолетовой области одну резкую полосу поглощения с максимумом у $\lambda = 2600 \text{ \AA}$. На рис. 1 приводятся кривые поглощения миозина и АТФ в растворе $0,6 \text{ M}$ КСl.

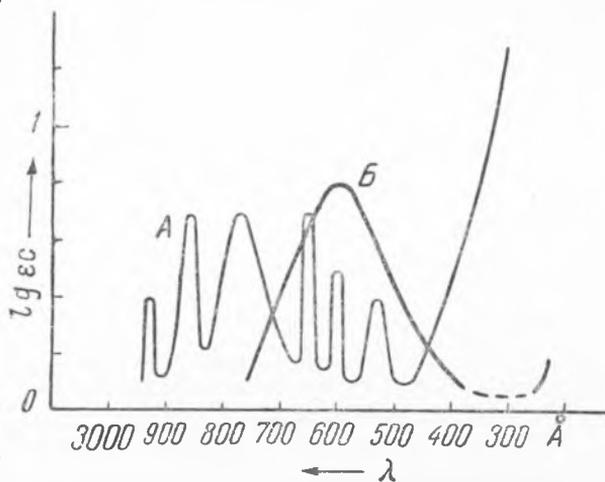


Рис. 1. А — кривая поглощения миозина в $0,6 \text{ M}$ растворе КСl; $C = 0,82 \text{ мг N в мл}$; $\text{pH} = 7,4$; 3-е осаждение. Б — кривая поглощения АТФ в $0,6 \text{ M}$ растворе КСl; $C = 0,5 \text{ мг в мл}$

Белки из мышц кролика получались по методу М. Н. Любимовой (миозин) и по методу Straub и Szent-Györgyi (актин), АТФ получалась из мышц кролика в виде бариевой соли по D. Needham. Метод съемки спектров по порогу почернения и их фотометрирование были кратко описаны раньше (5). Снимается серия спектров поглощения при последовательном изменении в 100 раз толщины слоя раствора исследуемого вещества определенной концентрации. В результате на пластинке получается контур кривой поглощения. Затем на каждом снимке отмечаются точками места заметного поглощения с одинаковой оптической плотностью, определяется по кривой дисперсии их длина волны и путем соответствующего расчета этот контур

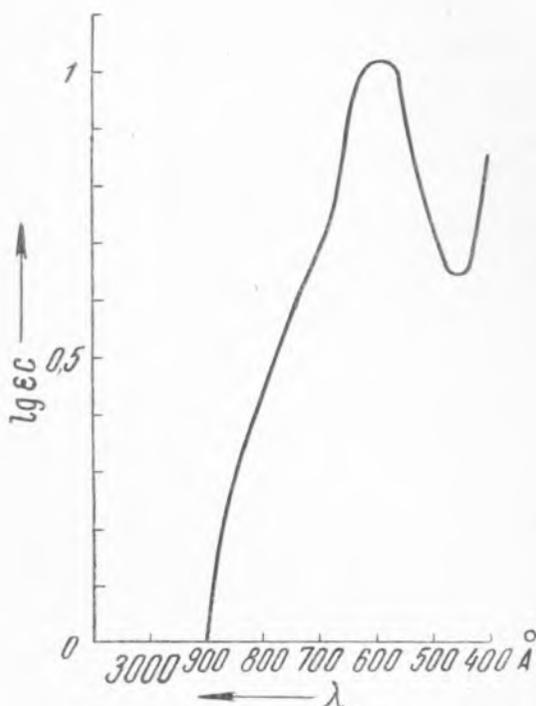


Рис. 2. Кривая поглощения миозина в 0,6 М растворе КСl в присутствии АТФ; $C_{\text{миоз}} = 1,82 \text{ мг Н в мл}$, 3-е осаждение; $C_{\text{АТФ}} = 0,5 \text{ мг в мл}$

переносится на бумагу в виде кривой поглощения. Спектры снимались с помощью кварцевого спектрографа Schmidt и Haensch средней дисперсии, источник света с непрерывным спектром излучения — водородная лампа ГОИ, пластинки ди. положительные, кювета переменной толщины в интервале от 0,1 до 10 мм.

Раствор белка, содержащий АТФ, спектрографировался в двух кюветах переменной толщины одновременно, так что свет от источника проходил последовательно через обе кюветы при одинаковых толщинах слоя раствора в каждой из них. При контрольном опыте измерения производилось таким же образом, но при этом в одной из кювет находилась раствор белка, а в другой кювете — раствор АТФ. Порядок расположения кювет не изменял характера регистрируемого спектра.

На рис. 2 приводится кривая поглощения миозина в солевом растворе в присутствии

АТФ. Результаты измерений проверялись в каждом случае наложением спектров поглощения каждого из этих веществ. В качестве примера на рис. 3 приводится кривая, полученная при оптическом наложении поглощения миозина и АТФ в растворе КСl (помещенных отдельно в две кюветы, расположенные последовательно по ходу светового луча). При таком наложении обоих спектров сохраняется практически неизменным нуклеиновый максимум у $\lambda = 2600 \text{ Å}$ (смещенный лишь на 15—20 Å из-за наложения соответствующего миозинового максимума). Сохраняется также и основной максимум миозина у $\lambda = 2770\text{—}2780 \text{ Å}$.

Как видно из сравнения обеих кривых (рис. 2 и 3), при взаимодействии фермента и субстрата (миозин и АТФ) происходит значительное смещение основного, наиболее интенсивного максимума миозина. Максимум миозина сдвигается в сторону коротковолновой части спектра и, повидимому, достигает зоны поглощения АТФ. Наложение спектров, которое при этом происходит, вызывает небольшой сдвиг максимума АТФ.

Аналогичное явление сдвига максимума миозина было обнаружено при исследовании спектральных свойств комплекса миозин-гликоген (6). В изучаемой зоне 2300 - 3100 Å только один из компонентов этого комплекса, миозин, обнаруживает избирательное поглощение, гликоген же в этих условиях прозрачен. В то же время при спектрографировании этих двух веществ в одном растворе получен спектр, в котором основной максимум миозина смещен в коротковолновую часть спектра до $\lambda = 2600$ Å.

Появление в спектре миозина в присутствии АТФ максимума у $\lambda \approx 2640$ Å и исчезновение максимума у $\lambda = 2770-2780$ Å наблюдается при достаточно высокой ферментативной активности миозина и концентрации АТФ 0,5 мг/мл. Так например, для миозина, осажденного два раза, оптимальная, в условиях нашего опыта, ферментативная активность выражается в 2200 γ фосфора, рассчитанного на 1 мг азота миозина. По данным Szent-Györgyi, указанное количество АТФ в 1 мл солевого раствора миозина является физиологической концентрацией АТФ в нормальной мышце. При низкой активности миозина кривая поглощения миозина в присутствии АТФ принимает такой же вид, как на рис. 3.

Подобные изменения спектра наблюдаются в присутствии АТФ также у актомиозина, представляющего в наших опытах комплекс 1 части актина с 2 частями (по весу) миозина.

Спектральные свойства миозина изменяются в присутствии АТФ вполне обратимо. На рис. 4 приведены кривые поглощения, характеризующие кинетику процесса взаимодействия миозина с АТФ при расщеплении последней. В этом случае на кривых отмечены только вершины максимумов: 1 — кривая поглощения, измеренная тотчас же при смешении миозина и АТФ, 2 и 3 — кривые поглощения, измеренные через 1 и 20 час. инкубации (при 0°). После полного расщепления АТФ (кривая 3) измеренный максимум совпадает с основным максимумом спектра миозина.

Из последней спектрограммы можно видеть, что подобно двойному лучепреломлению миозина, которое обратимо изменяется в присутствии АТФ, причем этот процесс может многократно повторяться (7), спектр миозина в ультрафиолетовой области также может обратимо изменять свою структуру. Однако проследить повторные изменения спектральных свойств на одном образце миозина невозможно в связи с частичной инактивацией белка под влиянием длительного освещения (около 15 мин.) ультрафиолетовыми лучами.

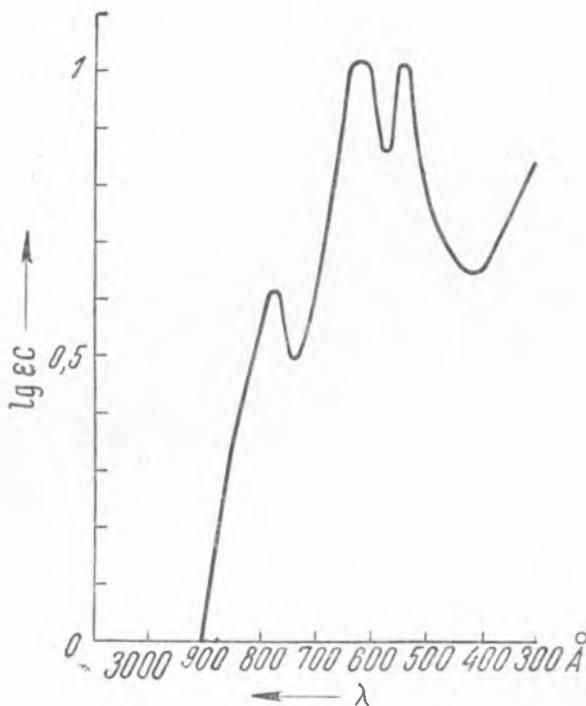


Рис. 3. Наложение кривых поглощения миозина и АТФ; $C_{\text{миоз}} = 0,82$ мг N в мл, 3-е осаждение; $C_{\text{АТФ}} = 0,5$ мг в мл

Влияние, оказываемое АТФ на спектральные свойства миозина, совершенно специфическое. В присутствии других производных аденина (аденозиндифосфорной кислоты, адениловой кислоты и аденозина) в спектре поглощения миозина не наблюдается смещения максимумов, описанного выше для миозина в присутствии АТФ.

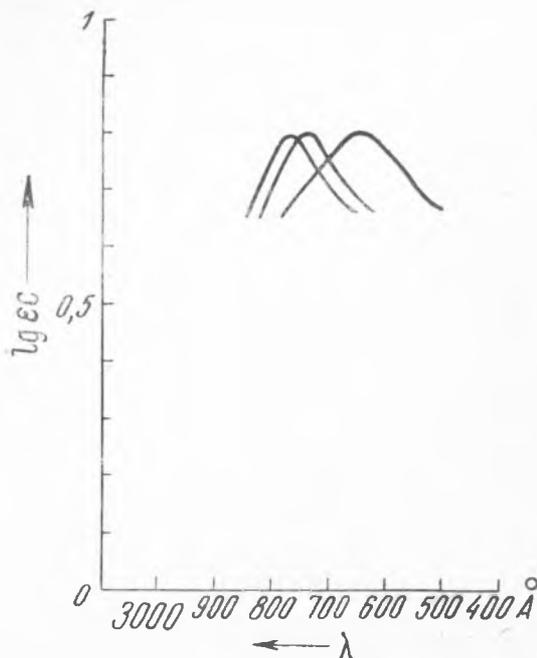


Рис. 4. Взаимодействие миозина и АТФ во времени. 1 — кривая поглощения, измеренная тотчас же при смещении миозина и АТФ; 2 — кривая, измеренная через 1 час; 3 — кривая, измеренная через 20 час.

жением комплекса. Это сопровождается сдвигом максимума поглощения комплекса из коротковолновой части спектра в зону поглощения белка, где можно вновь обнаружить основную структуру спектра миозина.

Выражаем благодарность проф. Д. Л. Рубинштейну за постоянный интерес к работе и ценные указания.

Институт биологической
и медицинской химии
Академии Медицинских Наук СССР

Поступило
23 II 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Энгельгардт, Усп. совр. биол., 14, 177 (1941). ² Н. Weber, Pfl. Arch., 235, 205 (1934). ³ А. Szent-Györgyi, Studies on Muscle, Stockholm, 1945. ⁴ М. Н. Любимова и М. С. Шипалов, Биохимия, 5, 144 (1940). ⁵ Х. М. Равикович, О. Н. Сеткина и К. Д. Леонтьева, ДАН, 58, № 3 (1947). ⁶ Е. Л. Розенфельд и Х. М. Равикович, ДАН, 59, № 1 (1948). ⁷ M. Dainty, A. Kleinzeller, A. Lawrence, M. Miall, J. Needham, D. Needham and Sh. Shen, J. Gen. Physiol., 27, 355 (1948).