

Г. А. КРИТСКИЙ

О ПРОСТЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЕ ФОСФОРИЛАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 28 VI 1948)

На протяжении истории развития учения о фосфорилазе было много противоречий относительно вопроса о коэнзиме фосфорилазы. Одни авторы (¹, ²), изучая процесс фосфорилиции гликогена, пришли к выводу, что фосфорилиция гликогена ферментными препаратами из мышцы требует наличия в реакционной смеси не только неорганического фосфата, но и каких-то коэнзимов, содержащихся в мышечном экстракте. Другие, наоборот, считали (³⁻⁵), что фосфорилиция гликогена имеет место и без коэнзима.

Я. О. Парнас, рассматривая (⁶) этот вопрос, пишет, что фосфоролиз гликогена не требует кофермента и фосфорилаза не инактивируется при диализе, но затем добавляет, что его препараты фосфорилазы при тщательном диализе инактивировались. Все эти противоречия зависят, вероятно, от ряда причин и, в частности, от того, что обычный диализ экстрактов из тканей есть по существу сочетание диализа и автолиза. Аппарат для ускоренного диализа позволил нам раздельно изучать эти процессы.

Существенные противоречия относительно простетической группы фосфорилазы имеются и в работах школы Кори. Так, в (⁷) Кори полагает, что фосфорилаза *a* содержит простетическую группу нуклеотидного характера, связанную с белком пептидной связью. Однако несколько ниже он сообщает, что при осаждении фосфорилазы трихлоруксусной кислотой в осадке остаются только следы пентозы.

По мнению Кори (⁷), простетическая группа от фосфорилазы *a* отщепляется с помощью специального энзима (PR-энзима). Однако в другом месте (⁸) он сообщает, что в продуктах отщепления от фосфорилазы *a* под влиянием PR-энзима нет ни пентозы, ни азота и т. д.

Таким образом, из литературных данных по вопросу о коэнзиме или простетической группе фосфорилазы видно, что вопрос о том, может или не может фосфоролиз проходить без участия нуклеотидов в реакционной смеси, до сих пор оставался не решенным.

Учитывая принципиальную важность этого вопроса, мы предприняли ряд исследований и проверок вышеупомянутых фактов, в результате чего нам удалось, повидимому, окончательно решить этот вопрос в том смысле, что фосфоролиз возможен и при полном отсутствии нуклеотидов в реакционной смеси.

Экспериментальная часть

Методы. Фосфорилаза получалась по методу Кори (⁷).

Наилучшие результаты нами были получены при следующих его изменениях: а) анестезия кроликов интравенозная гексабарбитоновая или магнезиальная интраперитонеальная; б) диализ экстракта произво-

дился в аппарате для ускоренного диализа; в) осаждение фосфорилазы сульфатом аммония при $\text{pH} = 7,6$, а не $6,8$; г) для лучшей кристаллизации фосфорилазы осадок фосфорилазы от сульфата аммония разбалтывался в минимально возможном объеме воды и диализовался против цистеинсукцинатного буфера с ионами калия и втрое большей концентрации, чем применявшаяся Кори. Остальные операции были, как и в оригинальном методе Кори.

Однако, даже при этих изменениях метода Кори, нам не удалось добиться, чтобы при кристаллизации фосфорилазы не получалось вместе с кристаллами фосфорилазы и некоторое количество некристаллического материала (от 20 до 90%). Впрочем, и этот некристаллический материал также имел высокую фосфорилазную активность.

Активность фосфорилазы большей частью определялась по синтезу полисахарида из эфира Кори* (⁹). В одном опыте активность фосфорилазы была проверена по фосфоролу крахмала с выделением из реакционной смеси эфира Кори; выделенный продукт по процентному содержанию фосфора и по углу вращения в пределах ошибки метода вполне соответствовал теории.

Результаты. Прежде всего мы обнаружили, что аскорбиновая кислота дает реакцию, сходную с реакцией пентоз, если ее испытывать по реакции Биаля-Альбаум (¹⁰). Это указывало на то, что данные Кори о наличии пентозы в фосфорилазе *a* не могут считаться вполне доказанными. В связи с этим мы решили выделить пентозу из гидролизата кристаллической фосфорилазы.

Из 18 кроликов весом по 2,4—2,8 кг была выделена в кристаллическом виде мышечная фосфорилаза в количестве 2,5 г в пересчете на сухой вес белка. Препарат гидролизовался с помощью 2% H_2SO_4 3 часа на водно-солевой бане при температуре 100—108°.

После удаления пуриновых оснований** из гидролизата мы осадили из него пентозу методом Сальковского, т. е. смесью $\text{CuSO}_4 + \text{CaO}$ (¹²).

Осадок с углеводами мы анализировали на пентозу с уксусноокислым анилином по следующему методу (¹³). Осадок поместили в колбу, залили 15% раствором HCl и кипятили, направляя выходящие из колбы пары на фильтровальную бумагу, смоченную уксусноокислым анилином. Переход цвета анилиновой бумаги из желто-оранжевого в ало-красный доказал наличие пентозы в фосфорилазе (параллельно были проведены контрольные опыты с чистыми реактивами и с добавлением в них АТР).

Убедившись в наличии пентозы в фосфорилазе *a*, мы все же не были уверены в том, что именно нуклеотидная группировка фосфорилазы является активной группой фосфорилазы, необходимой для процесса фосфоролу. Мы допускали возможность, что фосфоролу может проходить и без участия нуклеотидов в реакционной системе. И действительно, это допущение было затем вполне доказано — первоначально косвенными данными, а затем и прямым путем.

Косвенным доказательством вышеупомянутого предположения явилось то, что наличие пентозы в фосфорилазе оказалось совершенно неспецифичным для данного фермента. Пентоза по реакции Биаля-Альбаум (¹⁰) нами была обнаружена в кристаллическом диализованном миогене, в миозине, в проколлагене и некоторых других белках. Таким образом, повидимому, все белки (за исключением, вероятно, протеиноидов) в физиологическом состоянии в той или иной мере протеинизированы. Следовательно, повидимому, резкой грани между протеинами и протеидами нет.

Для того чтобы прямыми опытами доказать, что фосфоролу возможен и без участия нуклеотидов в реакционной смеси, мы предприняли

* В реакционную смесь адениловая или инозиновая кислоты не добавлялись.

** Из гидролизата для изучения пуриновых оснований фосфорилазы последние были осаждены кипячением гидролизата с $\text{CuSO}_4 + \text{NaHSO}_3$ ¹¹.

следующие опыты. Из мышечного экстракта были удалены выпадающие при диализе глобулины, и полученный прозрачный раствор диализовался в аппарате для ускоренного диализа в течение 39 час. Диализ проводился против текущей водопроводной воды температуры $+8^{\circ}$. Затем из отдиализованного и еще раз отфильтрованного раствора сульфатом аммония осаждалась фосфорилаза, которая затем анализировалась на содержание пентозы и на активность. При этом оказывалось, что полученная таким образом фосфорилаза была активна, но в то же время содержала пентозу в количестве около 0,2 γ на 1 мг белка. Таким образом, в этих опытах нам хотя и не удалось получить активную фосфорилазу без простетической группы, но зато, как нам кажется, впервые убедительным образом было доказано, что сам по себе тщательный диализ, без автолиза, не инактивирует фосфорилазу; противоположные данные некоторых других авторов, очевидно, следует интерпретировать иначе, на чем мы сейчас останавливаться не будем.

Для проверки предположения о пептидной связи между простетической группой фосфорилазы и белком, мы осадили фосфорилазу трихлоруксусной кислотой и убедились, что в осадке пентозы практически нет, что и отклоняет это предположение.

Наконец, нам удалось прямым путем доказать возможность фосфорилиза без участия нуклеотидов в реакционной системе. Фосфорилазу, полученную в виде осадка от сульфата аммония, мы растворяли в 2% растворе глицерофосфата с добавлением цистеина-гидрохлорида до $\text{pH} = 7,2-7,4$, раствор центрифугировался от случайных нерастворившихся примесей, и совершенно прозрачный, слегка желтоватый раствор пропускали через хроматографическую колонку⁽¹⁴⁾, начиненную активированным углем. Высота колонки 5—6 см. Прохождение раствора через колонку ускорялось применением вакуум-насоса. В приемную склянку стекал прозрачный попрежнему желтоватый раствор; содержание белка и фосфорилазная активность в этом растворе были лишь незначительно ниже исходного раствора, тогда как пентоза в нем полностью отсутствовала. Никаких следов пентозы не обнаруживалось, даже если для анализа бралось около 50 мг ферментного белка, тогда как уже 5—8 мг обычного препарата фосфорилазы достаточно для обнаружения в ней пентозы.

Полученный препарат фосфорилазы ферментативно активный, но не содержащий пентозу, мы обозначили как фосфорилазу *c*, так как ее свойства существенно отличаются от тех, которые приписываются фосфорилазами *a* и *b*.

Вышеупомянутый опыт, как нам кажется, важен и в том отношении, что он делает излишним предположение о специальном энзиме, отщепляющем простетическую группу от фосфорилазы *a*. Между простетической группой и белком здесь, повидимому, имеется солеобразная и водородная связи, образование и распад которых происходит без энзимов.

В физиологических условиях в процессе работы мышцы, вероятно, вследствие подкисления молочной кислотой происходит частичная или полная потеря фосфорилазой ее простетической группы; возможно, что этот процесс имеет отдаленное сходство с потерей фосфорилазой ее простетической группы при подкислении фосфорилазы *a* трихлоруксусной кислотой.

Полученный нами результат указывает также на ошибочность весьма распространенного отождествления понятий простетической группы фермента и его активной группы. Очевидно, что эти понятия совпадают далеко не всегда.

Таким образом, наличие пентозы в фосфорилазе *a* доказано выделением ее и идентификацией с уксуснокислым анилином образованного из нее фурфурола.

Наличие пентозы или нуклеотидов в фосфорилазе *a* не специфично для этого фермента. Повидимому, все белки в физиологически активном состоянии, как правило, связаны с нуклеотидами.

Жесткий машинный диализ без одновременного автолиза не удаляет простетическую группу фосфорилазы и не инактивирует ее.

Нуклеотидная простетическая группа фосфорилазы не является необходимой для процесса фосфорилиза, ее удаление при определенных условиях не лишает фосфорилазу ферментативной активности.

Предположение о пептидной связи между простетической группой фосфорилазы *a* и белком и предположение о наличии специального энзима (PR-энзима), отщепляющего простетическую группу от фосфорилазы *a*, не согласуются с полученными нами данными.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
26 VI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Meyer, *Bioch. Z.*, **193**, 139 (1928). ² E. Bauer, H. Euler u. K. Lundberg, *Hoppe Seil. Z. f. physiol. Chem.*, **256**, 89 (1938). ³ R. Nilsson, *Bioch. Z.*, **258**, 198 (1933). ⁴ W. Kiessling, *ibid.*, **302**, 50 (1939). ⁵ P. Ostern, J. Gutke u. J. Terzakowec, *Hoppe Seil. Z. f. physiol. Chem.*, **243**, 9 (1936). ⁶ J. O. Parnas, *Ergebn. Enzymforschung*, **6**, 57 (1937). ⁷ G. T. Cori and A. A. Green, *J. of Biol. Chem.*, **151**, 31 (1943). ⁸ G. T. Cori and C. F. Cori, *ibid.*, **158**, 321 (1945). ⁹ C. F. Cori, G. T. Cori and A. A. Green, *ibid.*, **151**, 39 (1943). ¹⁰ H. Albaum and W. Umbreit, *ibid.*, **167**, 369 (1947). ¹¹ В. С. Асатиани, *Руководство по биохимической методике*, 1939, стр. 548. ¹² А. Р. Кизель, *Практикум по биохимии растений*, 1934. ¹³ П. П. Шорыгин, *Химия углеводов*, 1938. ¹⁴ М. С. Цвет, *Хроматографический адсорбционный анализ*, 1946.