

И. Б. ЗБАРСКИЙ и С. С. ДЕБОВ

О БЕЛКАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 VIII 1948)

Давно было показано (^{1,2}), что в состав клеточных ядер входит белок основного характера (протамин или гистон) в соединении с нуклеиновой кислотой. Долгое время принималось, что клеточное ядро почти полностью состоит из нуклеопротеидов такого состава.

Изучая нуклеопротеиды растений и бактерий, А. Н. Белозерский (³) впервые указал, что обычного типа белки с изоэлектрической точкой в слабокислой среде, наряду с основными белками, могут также образовывать соединения с нуклеиновой кислотой рибозного типа.

В последние годы Stedman и Stedman сообщили ((⁴⁻⁶) и др.), что им удалось выделить из клеточных ядер (сперма трески, селезенка быка, уокеровская карцинома крыс и др.) белок кислого характера, названный ими „хромосомин“. Эти авторы дали описание некоторых свойств выделенного ими белка, процентное содержание его в исследованных ядрах и примерное содержание в нем некоторых аминокислот. По их данным, хромосомин составляет от 50 до 72,6% сухого вещества клеточных ядер. Эти данные до настоящего времени не были подтверждены другими авторами.

В недавно опубликованной работе Mirsky и Pollister (⁷) описывают ядерный нуклеопротеид, выделенный авторами при помощи экстракции 1M NaCl. Этот нуклеопротеид назван ими „хромозин“ и включает, по их данным, помимо гистона, небольшой процент белка другого типа, содержащего, в отличие от гистона, триптофан. Отрицательное отношение указанных авторов к данным Stedman и Stedman можно объяснить тем, что они изучали только нуклеопротеид, в то время как хромосомин был выделен из цельной массы клеточных ядер.

Мы, при изучении белков ядер нормальных и злокачественных клеток, ставили себе задачей изолировать ядра в среде, возможно более близкой к нейтральной, получить важнейшие фракции ядерных белков и изучить их состав и свойства. Ядра выделялись нами по методу Douncе (⁸) с некоторыми видоизменениями, в основном так же, как в работе И. Б. Збарского и К. А. Перовицкой (⁹). Это позволило получать ядра при реакции среды, близкой к нейтральной (рН = 6,0—6,2), свободными от целых неразрушенных клеток и обрывков цитоплазмы. Изучались клеточные ядра из зобной железы телят, печени человека, печени крыс и крысиной саркомы № 465 (штамм получен от Л. А. Зильбера).

Из сырых клеточных ядер извлекался нуклеопротеид путем многократных экстракций 1M раствором NaCl и последующего центрифугирования. Извлеченный ядерный нуклеопротеид, по видимому, соответствовал „хромозину“ Mirsky и Pollister (⁷) и обладал свойст-

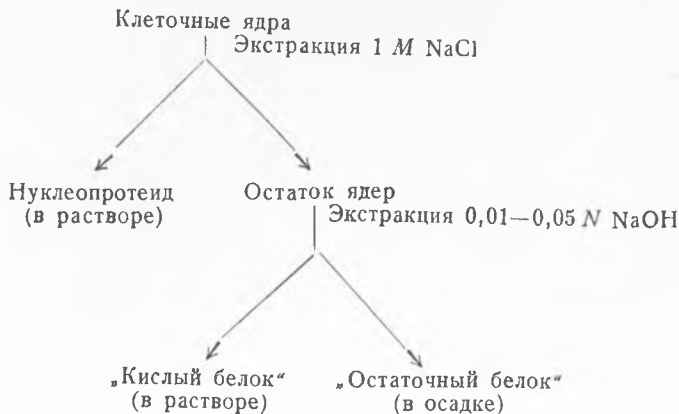
вами, описанными для него этими, а также и другими авторами, а именно: давал очень вязкие растворы, осаждался в виде длинных нитей при добавлении к его раствору 6 объемов воды, мог быть разделен на дезоксирибонуклеиновую кислоту и белок (гистон), содержал лишь следы триптофана.

После полного извлечения нуклеопротеида остается большое количество ядерного вещества, состоящего почти нацело из белка. Этот остаток содержит лишь следы фосфора (0,03—0,1%) и не дает реакции на дезоксирибонуклеиновую кислоту (дифениламиновая проба Diesche (10)). Белок из остатка ядер хорошо экстрагируется слабыми растворами щелочи (0,01—0,05 *N* NaOH). Он является белком кислого характера с изоэлектрической точкой в пределах $pH = 5,0-5,3$. При добавлении к щелочному раствору этого белка 0,1 *N* HCl до $pH = 5,0$ он выпадает массивными хлопьями в осадок. Собранный центрифугированием осадок легко растворяется в разведенной щелочи, и процедуру переосаждения можно повторять 5—6 и более раз без сколько-нибудь заметных потерь белка или изменения его свойств.

После многократной экстракции „кислого белка“ щелочью остается еще одна белковая фракция, которая нерастворима в этом реактиве и собирается на дне центрифужных пробирок в виде геля. Ни в одном из примененных растворителей (дистиллированная вода, солевые растворы разной концентрации, минеральные и органические кислоты и т. д.) растворить белок не удастся. В растворах щелочи гель способен набухать, в других растворах набухания не наблюдается. Этот „остаточный белок“ был выделен из всех изучавшихся нами ядер.

Таким образом нам удалось получить из клеточных ядер три белковые фракции: нуклеопротеид (содержащий гистон и дезоксирибонуклеиновую кислоту), „кислый белок“ и „остаточный белок“.

Фракционирование ядер по нашей методике можно представить следующей схемой.



Нужно отметить, что фракционирование белков клеточных ядер по этой схеме удастся только в том случае, если ядра изолированы при реакции среды, близкой к нейтральной ($pH = 6,0-6,2$). Если ядра выделяются в кислой среде, то, вследствие частичной денатурации белков, фракционирование не удастся.

Все три белковые фракции отличаются друг от друга по своим свойствам и содержатся в ядрах в различных количествах. Повидимому, нуклеопротеид не составляет главной массы ядер, хотя в некоторых ядрах его может быть до 50% сухого вещества (например, зубная железа телянка).

Кислый белок содержится в ядрах в большом количестве: в ядрах печени человека и крысы его 40—50%, в ядрах саркомы № 465 —

около 40%. Остаточный белок содержится в сравнительно небольшом количестве, 5—10%. Обращает на себя внимание тот факт, что в клеточных ядрах саркомы № 465 остаточного белка очень много — до 40% (больше, чем нуклеопротеида).

Важнейшей характеристикой этих белковых фракций является их аминокислотный состав. Из всех аминокислот наибольший интерес для изучения представляет триптофан. По последним литературным данным ((^{6,7,9}) и др.) и по нашим наблюдениям, эта аминокислота не содержится в гистоне; в то же время в тотальном белке ядер триптофана найдено 1—2%. Этот факт служит косвенным доказательством наличия в ядрах какого-то отличного от гистона триптофан-содержащего белка. Действительно, кислый белок, полученный из различных ядер, содержит около 2,5% триптофана (табл. 1).

Таблица 1

Содержание некоторых аминокислот в белковых фракциях клеточных ядер и тотальных ядерных белках

(Средние цифры из нескольких определений. В процентах на белок, содержащий 16% азота)

Препарат	Фосфор	Триптофан	Тирозин	Аргинин	Лизин	Гистидин	Глютамин. к-та	Аспарагинов. к-та	Цистин	Метонин
Тотальный белок из клеточных ядер зобной железы телянка	2,43	1,12	2,66	7,62	8,11	2,21	10,0	5,60	1,08	2,00
Тотальный белок из клеточных ядер печени человека	0,99	1,86	2,92	6,66	8,50	3,70	11,7	6,50	1,03	2,63
Кислый белок из клеточных ядер зобной железы телянка	0,03	2,57	4,57	7,20	7,14	2,99	13,1	5,80	1,24	2,90
Кислый белок из клеточных ядер крысиной саркомы № 465	—	2,43	6,35	—	—	—	—	—	—	—
Кислый белок из клеточных ядер печени человека	—	2,31	6,27	—	—	—	—	—	—	—
Остаточный белок из клеточных ядер зобной железы телянка	0,03	нет	1,12	8,54	3,66	0,99	13,28	6,07	0,35	0,60

Сравнивая полученные результаты с имеющимися литературными данными (^{4—6}), можно заключить, что выделенный нами из различных клеточных ядер кислый белок по своим свойствам и составу, по-видимому, соответствует „хромосомину“ Stedman и Stedman. Метод, применяемый этими авторами для выделения „хромосомина“, чрезвычайно громоздок и, по признанию самих авторов, не позволяет полностью освободить белок от нуклеиновой кислоты. В этом отношении наша методика более проста и удобна для работы.

Полученные нами экспериментальные данные в некоторых пунктах расходятся с данными Stedman и Stedman. Эти авторы, экстрагируя гистон из высушенных и обезжиренных клеточных ядер разведенной минеральной кислотой, считают, что в остатке у них остается только „хромосомин“ и нуклеиновая кислота. В действительности же ядерный остаток, кроме этих компонентов, содержит еще некоторое количество (иногда весьма значительное) остаточного белка. По упомянутым авторам, в ядрах злокачественной опухоли (уокеровская карцинома крыс) резко понижается содержание гистона и соответственно

увеличивается, по сравнению с нормальными клеточными ядрами, количество „хромосомина“. По нашим данным, количество кислого белка в ядрах как нормальных, так и злокачественных клеток остается примерно одинаковым (40—50%), а сильно возрастает содержание остаточного белка (до 40%).

Мы не можем согласиться с мнением Stedman и Stedman, что хромосомин является единственным или главным протеином хромосом, так как данные, полученные в нашей лаборатории, согласно которым гистоновая фракция ядер обладает контрактильными свойствами⁽⁹⁾, позволяют предположить, что и гистон является важной белковой структурной единицей в составе хромосомы. Сократительные свойства гистона можно поставить в связь с превращениями хромосом в митотическом цикле.

Малодоказательными представляются также приводимые Stedman и Stedman опыты по окрашиваемости гематоксилином изолированных ядерных компонентов. Основываясь на способности „хромосомина“, как белка кислого характера, окрашиваться гематоксилином в голубой цвет, они делают вывод, что „хромосомин“ является главным или единственным белковым компонентом в составе хромосомы. Тот факт, что при экстракции ядер разведенными щелочами переходят в раствор все ядерные белки вместе с нуклеиновой кислотой, говорит в пользу того, что и кислый белок, и гистон связаны в ядре с нуклеиновой кислотой в единый комплекс. Этот белково-нуклеиновый комплекс, включающий в себя также и липиды, и обуславливает свойства ядерной субстанции — в том числе и базофильность окраски.

Остаточный белок детальному изучению не подвергался. Факт выделения его во всех случаях из ядер позволяет думать, что этот белок не является артефактом, а в качестве одного из компонентов входит в состав ядер. По своему аминокислотному составу он резко отличается как от гистона, так и от кислого белка.

Центральный научно-исследовательский
онкологический институт
им. П. А. Герцена

Поступило
27 VIII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Miescher, *Histochemische und physiologische Arbeiten*, 2, Leipzig, 1897 (цит. по⁽²⁾). ² A. Kossel, *Protamine und Histone*, Leipzig, 1929. ³ А. Н. Белозерский, Уч. зап. МГУ, Ботаника, в. 36, 5 (1940). ⁴ E. Stedman and E. Stedman Mrs., *Nature*, 152, 267 (1943). ⁵ E. Stedman, *Edinburgh Med. J.*, 51, 353 (1944). ⁶ E. Stedman and E. Stedman, *Symposia Soc. Exp. Biol.*, No. 1, „Nucleic Acid“, Cambridge, 1947, 232. ⁷ A. E. Mirsky and A. W. Pollister, *J. Gen. Physiol.*, 30, 117 (1946). ⁸ A. Douncse, *J. Biol. Chem.*, 147, 685 (1943). ⁹ И. Б. Збарский и К. А. Перевощикова, ДАН, 60, 77 (1948). ¹⁰ Z. Diesche, *Mikrochem.*, 8, 1 (1930).