

М. Н. ЛЮБИМОВА и Г. М. ПОПОВА

АКТИН И КРЕАТИН-ФОСФОФЕРАЗА

(Представлено академиком Л. А. Орбели 28 III 1949)

За последнее время у ряда индивидуальных белков тканей, рассматривавшихся ранее только как основа структурной части клетки, были обнаружены ферментативные свойства — у миозина неотделимые аденозинтрифосфатазные (1) и прочно адсорбированные дезаминазные (2), у кристаллического миогена — альдолазные (Саков и Смирнов, цитировано по (3)), у структурных белков злокачественных опухолей — аденозинтрифосфатазные (4, 5). В свете этих данных совершенно естественно стремление устанавливать для каждого вновь выделяемого индивидуального мышечного белка не только его химические характеристики, но и возможность его специфического биохимического функционирования.

Так, в частности, можно ожидать наличия в актине, втором индивидуальном белке сократительного мышечного комплекса, креатин-фосфоферазных свойств, поскольку и актин и креатин-фосфофераза выделяются примерно одним и тем же способом. Действительно, растворы актина обладают отчетливо выраженным креатин-фосфоферазным действием, не уступающим по активности экстрактам из ткани. В соответствии с данными Ломана (6) и Лемана (7), открывших и изучивших в основном эту равновесную реакцию:



растворы актина при $\text{pH} = 9$ переносят фосфор с АТФ на креатин, т. е. осуществляют реакцию справа налево, а при изменении кислотности до $\text{pH} = 6$ переносят фосфор с КРФ на АДФ, т. е. осуществляют реакцию слева направо.

Обнаружение креатин-фосфоферазных свойств у раствора актина, полученного по методу Штрауба или Сент-Джорджи (8), еще не является доказательством тождества актина и креатин-фосфоферазы, так как эта белковая фракция, бесспорно, негетерогенна. Одним из доказательств тождества могла бы быть неотделимость при очистке ферментативных свойств от основной актиновой фракции, с соответствующим возрастанием этой активности.

Выяснению вопроса о том, существует ли действительно такого рода связь, и было посвящено настоящее исследование.

Методическая часть

Актин получался по методу Штрауба или Сент-Джерджи; миозин и АДФ — по методу М. Н. Любимовой и Д. Певзнер (9); АТФ — по спиртовому, видоизмененному в лаборатории методу; КРФ — по Цейле — Фавац (10), креатин как таковой брался фирмы Кальбаум.

* АТФ — аденозинтрифосфат, АДФ — аденозиндифосфат, КРФ — креатин-фосфат.

Поскольку единственным характерным свойством актина является образование, при добавлении миозина, сгустка — актомиозина, то методически работа сводилась к получению актина тем или другим способом, последующей его очистке или переосаждением ацетатным буфером при изоэлектрической точке ($pH = 4,7$) или осаждением ацетоном при том же pH , и далее сопоставлении ферментативной фосфоферазной активности растворов и их способности образовывать сгустки. Для образования сгустков бралось отношение актина к миозину 2 : 5, концентрация актина была 3—4 мг/мл. Ферментативная активность выражалась, как было введено В. А. Энгельгардтом и М. Н. Любимовой ⁽¹⁾ для растворов миозина, коэффициентом Q_p .

Экспериментальная часть

Как уже указывалось вначале, растворы актина обладают отчетливо выраженной креатин-фосфоферазной активностью (рис. 1, *a*), но при первой же очистке изоэлектрическим переосаждением, как это видно

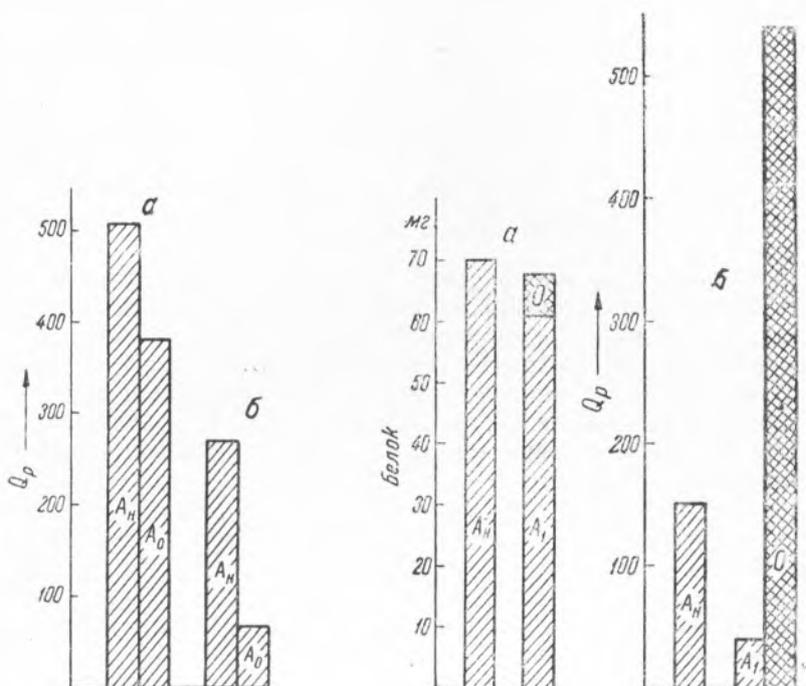


Рис. 1. Различие ферментативной активности актина в зависимости от метод: получения и очистки (образование креатин-фосфата при $pH = 9$). *a* — получение по методу Штрауба; *б* — тот же метод, только мышечная кашка предварительно основательно отмыта водой. A_n — неочищенный актин; A_o — очищенный однократным изоэлектрическим переосаждением

Рис. 2. Распределение белка и ферментативной активности между осадком и центрифугатом при изоэлектрическом осаждении. *a* — распределение белка между осадком и центрифугатом; *б* — распределение ферментативной активности в осадке и центрифугате (образование креатин-фосфата при $pH = 9$). A_n — исходный неочищенный актин; A_1 — актин первого переосаждения; O — центрифугат

из того же рисунка (A_o), отмечается снижение ферментативной активности на 25—50%. Такое же и даже большее снижение ферментативной активности обнаруживается в растворах актина, если в процессе его получения, до обработки ацетоном, мышечную кашку основательно

отмыть водой (рис. 1, б). Вместе с тем следует отметить, что у этих же растворов способность образовывать сгусток в стандартных условиях остается неизменной.

Этот опыт еще не может служить доказательством разделения белков. Из него лишь очевидно, что способность образовывать сгусток не связана с ферментативной активностью. Можно было допустить, что при изоэлектрическом переосаждении происходит только инактивация ферментативной группировки. В этом случае отстой должен был быть лишенным ферментативных свойств. Опыт показал обратное (рис. 2).

При изоэлектрическом осаждении в растворе остается всего только около 10% белков, а основная масса белка уходит в осадок (рис. 2, а). Ферментативная же активность при пересчете на белок распределяется как раз обратно — в центрифугате она повышается более чем в 10 раз (рис. 2, б). При этом у фермента центрифугата, как и следовало ожидать, ферментативная реакция в зависимости от рН среды идет как в одном, так и в другом направлении, т. е. может быть осуществлено фосфорилирование как креатина с АТФ, так и фосфорилирование АДФ с креатин-фосфата.

Повторным изоэлектрическим переосаждением можно полностью очистить актин от креатин-фосфоферазных свойств. Как правило, трижды переосажденный актин совершенно лишен ферментативных свойств (рис. 3). Он не способен фосфорилировать ни креатин с АТФ при рН = 9, ни АДФ с креатин-фосфата при рН = 6. В то же время и в этом случае актин сохраняет свою способность образовывать сгустки с миозином. Скорость образования сгустка трижды переосажденным актином та же, что и скорость образования из исходного, неочищенного актина.

В свете этих данных совершенно очевидно, что актин очень просто и полностью отделим от креатин-фосфофазы. Таким образом, наши выводы не совпадают с данными Э. Т. Сорени и Р. Г. Дегтярь⁽¹¹⁾, сообщивших об увеличении креатин-фосфоферазной активности актина при изоэлектрическом переосаждении.

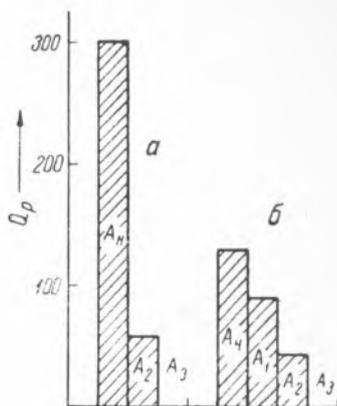


Рис. 3. Очистка актина изоэлектрическим осаждением; индексы при А указывают число изоэлектрических переосаждений (образование креатин-фосфата при рН = 9). а — неотмытые мышцы, б — предварительно отмытые мышцы

Поступило
7 III 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Н. Любимова и В. А. Энгельгардт, Биохимия, 4, 716 (1939).
- ² Д. Л. Фердман и З. Ю. Нечипоренко, Укр. биохим. журн., 20, 135 (1948).
- ³ В. А. Энгельгардт, Усп. совр. биол., 14, 177 (1941).
- ⁴ Н. В. Ельцина, Биохимия, 13, 351 (1948).
- ⁵ И. И. Иванов, Б. С. Касавина и С. И. Пехтерева, Биохимия, 13, 310 (1948).
- ⁶ К. Lohmann, Biochem. Z., 271, 264 (1934).
- ⁷ Н. Lehmann, *ibid.*, 281, 271 (1935); 286, 336 (1936).
- ⁸ А. Сент-Дьердьи, О мышечной деятельности, 1947.
- ⁹ М. Н. Любимова и Д. Певзнер, Биохимия, 6, 176 (1941).
- ¹⁰ Д. Л. Фердман, Обмен фосфорных соединений, 1940.
- ¹¹ Э. Т. Сорени и Р. Г. Дегтярь, Укр. биохим. журн., 20, 250 (1948).