

Г. А. КРИТСКИЙ

О МЕХАНИЗМЕ РЕАКЦИИ ФОСФОРОЛИЗА

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 XII 1949)

В предыдущем сообщении ⁽¹⁾ нами было показано, что в препаратах фосфорилазы обычно содержится две фракции фосфата: а) фракция лабильно связанного фосфата, б) фракция трудно гидролизуемого фосфата (эта последняя фракция обнаруживалась также Кори и сотр. ⁽⁹⁾). Было также показано, что лабильно связанный фосфат не удаляется из фосфорилазы переосаждением сульфатом аммония, но отщепляется от фермента в виде неорганического фосфата, если фермент осаждается трихлоруксусной кислотой. В проведенных нами дальнейших экспериментах эти факты, полученные на некристаллической фосфорилазе, были также подтверждены и на препаратах кристаллической фосфорилазы, полученной по ранее описанной нами методике ⁽²⁾.

Попытки обнаружить в фосфорилазе ту фракцию фосфата, которая по легкости своего гидролиза соответствовала бы фосфату эфира Кори или легко гидролизуемому фосфату аденозинтрифосфорной кислоты, не привели к положительному результату. Таким образом, фракция лабильно связанного фосфата, обнаруженная в фосфорилазе, существенно отличается и от фосфата глюкозо-1-фосфата, и от лабильных фосфатных групп АТФ.

Проведенные в дальнейшем опыты с радиоактивным фосфором (P^{32}) показали, что лабильно связанный фосфат фосфорилазы находится в постоянном обмене с неорганическим фосфатом, находящимся в растворе фермента, и не находится в обмене с фосфатом глюкозо-1-фосфата, если в реакционной смеси отсутствует полисахарид, являющийся «затравкой» в процессе синтеза полисахарида. Кроме того, было обнаружено, что в процессе фосфоролиза нуклеозидов имеет место такая же реакция обмена фосфата за фосфат. Ниже нами представляются как дополнительные данные о составе фосфорных фракций фосфорилазы, так и опыты по изучению обмена фосфора, связанного с фосфорилазой.

Экспериментальная часть

А. Фосфатные фракции фосфорилазы. В связи с тем, что были получены данные ⁽¹⁾, указывающие на наличие в протетической группе фосфорилазы нуклеиновой кислоты, последняя нами была определена по недавно разработанному методу ^(3, 4). В опыт бралась фосфорилаза, полученная по ранее опубликованному методу ⁽²⁾, после дополнительного переосаждения фермента сульфатом аммония. Результаты, полученные на основании ряда опытов, приводятся в табл. 1.

Лабильно связанный с фосфорилазой фосфат отщепляется от фермента в виде неорганического фосфата, если фермент осаждается три-

Таблица 1

Фосфатные фракции фосфорилазы
(фосфор в γ на 1 мг белка)

Кислотно-растворимый фосфор			Фосфор нуклеиновой кислоты	Общий фосфор фосфорилазы
лабильно связанный фосфор	трудно-гидролизуемый фосфор	общий кислотно-растворимый фосфор		
0,4—0,5	0,3	0,7—0,8	0,5—0,6	1,2—1,3

хлоруксусной кислотой. Содержание лабильно связанного с фосфорилазой фосфата может колебаться в разных препаратах от 0,4 до 0,5 γ на 1 мг белка без заметной взаимосвязи с содержанием в фосфорилазе пентозы (рибозы), которой было в большинстве препаратов 1,2—1,3 γ на 1 мг белка. Так как молекулярный вес фосфорилазы равен около 400 000, то, согласно расчету, на 1 молекулу фермента приходится около 6 молекул лабильно связанного фосфата.

Простетическая группа, выделенная нами из фосфорилазы, давала слабую, всегда отчетливо положительную реакцию на дезоксирибонуклеиновую кислоту по реакции Дише (5) с дифениламином, хотя основная часть нуклеиновой кислоты, содержащейся в фосфорилазе, является рибонуклеиновой кислотой.

Б. Обмен фосфора, лабильно связанного с фосфорилазой. Из мышц взрослых кроликов выделялась фосфорилаза по ранее описанному методу (2). В каждом опыте фосфорилаза от 2 кроликов растворялась в 600 мл 0,2% цистеин-сукцинатного буфера с рН 7,0 и в раствор добавлялось 1—3 мл раствора радиоактивного фосфата в виде Na_2HPO_4 с содержанием 4,2 мг фосфора в 1 мл. Через 5—10 мин. стояния смеси при комнатной температуре фермент осаждался 0,7 объемом насыщенного раствора сульфата аммония с рН 7,0 и отфильтровывался. Для очистки фермента от случайной примеси радиоактивного фосфата фермент многократно переосаждался сульфатом аммония из объема около 1 л. При каждом переосаждении фермент растворялся в 0,2% цистеин-сукцинатном буфере с рН 7,0, раствор профильтровывался, осаждался 0,7 объемом насыщенного раствора сульфата аммония, подщелоченного аммиаком до рН 7,0, и осадок белка отфильтровывался. При этом оказывалось, что уже после 4—5-го переосаждения в фильтрате от осадка фосфорилазы были только следы радиоактивности, тогда как фермент имел весьма высокую радиоактивность (табл. 2).

Таким образом, концентрация фосфата на поверхности фосфорилазы во много тысяч раз более, чем в окружающем растворе, что, повидимому, имеет существенное значение в процессе реакции фосфорилиза. Такая меченая фосфорилаза, как и обычные ее препараты, длительно сохраняла свою энзиматическую активность.

Для выяснения вопроса о том, в какую фосфатную фракцию фосфорилазы вошел в вышеописанном опыте меченый фосфат, радиоактивный фермент растворялся в цистеин-сукцинатном буфере, белок осаждался трихлоруксусной кислотой и отфильтровывался; при этом оказалось, что в осадке белка были только следы радиоактивности. В фильтрат добавлялся неорганический нерадиоактивный фосфат, затем аммиак и магниальная смесь для осаждения неорганического фосфора. При этом оказывалось, что вся радиоактивность переходила в осадок неорганического фосфата.

Таблица 2

Радиоактивность осадка фосфорилазы и фильтрата от фосфорилазы после переосаждения сульфатом аммония (среднее из 3 определений)

Испытуемый препарат	Колич. раствора P^{32} , добавленного в исходный раствор фермента, в мл	Число переосаждений	Число импульсов, воспринимаемых счетчиком в 1 мин. (без фона)	
			100 мг фермента	100 мл фильтрата от фермента
Некристаллич. фосфорилаза от 2 кроликов	1	5	2228	3
Кристаллич. фосфорилаза от 2 кроликов	3	6	4666	8

Следовательно, только фосфат, лабильно связанный с фосфорилазой, находится в равновесии с неорганическим фосфатом среды. В дальнейшем оказалось, что меченый фермент в значительной мере теряет свою радиоактивность в том случае, если его переосаждают сульфатом аммония из раствора, содержащего нерадиоактивный фосфат и гликоген. Очевидно, что при этом радиоактивный фосфат, связанный с ферментом, замещался нерадиоактивным фосфатом раствора. Кроме того, нами были подтверждены данные Кон и Кори (10), что если к раствору фосфорилазы добавлять глюкозо-1-фосфат и радиоактивный неорганический фосфат, но не добавлять гликогена, то перехода радиоактивности во фракцию глюкозо-1-фосфата не наблюдается.

М. Ф. Гулием было установлено (6, 7), что фосфорилаза полисахаридов способна связывать и другой субстрат своего действия — полисахарид. Однако тот факт, что в смеси фосфорилазы с глюкозо-1-фосфатом и меченым неорганическим фосфатом не происходит перехода метки во фракцию глюкозо-1-фосфата, указывает на то, что связь фосфорилазы с полисахаридом менее прочна, чем с фосфатом.

На основании обнаруженного свойства фосфорилазы связывать неорганический фосфат можно сделать заключение и о том, что представление Дудорова о бесфосфорном переносе глюкозных остатков фосфорилазой (трансглюкозидирование) (8) недостаточно обосновано, поскольку его препараты фосфорилазы, «тщательно освобожденные от фосфора» путем 6-кратного переосаждения сульфатом аммония, вероятно, на самом деле также содержали неорганический фосфат, лабильно связанный ферментом.

Далее оказалось, что изомераза амилозы, полученная по методу Петровой (11) также связывает неорганический фосфат.

С целью выяснения вопроса о том, не способна ли фосфорилаза нуклеозидов связывать неорганический фосфат, из печеней 5 взрослых крыс нами была получена фосфорилаза нуклеозидов по методу Калькара (с заменой высокоскоростного центрифугирования фильтрованием через ватмановскую фильтровальную бумагу). При проверке ферментативной активности препаратов фосфорилазы нуклеозидов нами было обнаружено, что эти препараты способны осуществлять перенос пентозного остатка нуклеозидов от одного пуринового основания к другому. Эта реакция, обозначенная нами как реакция транспентозидирования

(транспентозидации), исследовалась на примере превращения гуанозина в инозин.

Образующийся при реакции гуанин затем расщепляется гуаназой на ксантин и аммиак. Последний отгонялся из реакционной смеси и определялся титрованием. Один из таких опытов* приводим ниже.

В колбу № 1 взято: гуанозина 20 мг + гипоксантина 9 мг + 1 мл водного раствора фермента из 20 мл раствора фермента, полученного из одной печени крысы (фермент содержал как фосфорилазу нуклеозидов, так и гуаназу). В смесь добавлено воды до 20 мл; рН = 7,0.

В колбу № 2 (контроль) взяты те же компоненты, как и в колбу № 1, но без гипоксантина.

Обе колбочки инкубировались в термостате при 30° в течение 20 час. Затем для определения аммиака в реакционные смеси добавлялось по 20 мл насыщенного раствора буры и через смесь протягивался очищенный воздух, который затем пропусклся в титрованный раствор кислоты. По данным титрования найдено, что в то время как в колбочке № 2 образование аммиака не имеет места, в колбочке № 1 образовалось 0,3 мг, что лежит за пределами ошибки метода анализа и указывает, что реакция прошла на 27%, если считать за 100% полную замену гуанина в гуанозине на гипоксантин.

С целью выяснения вопроса о том, является ли эта реакция простейшей, могущей идти без участия фосфора, или она является балансовой реакцией обратимых процессов фосфорилиза гуанозина и инозина, нами был исследован вопрос о возможности получения препарата фермента без фосфата. Используя для выяснения этого вопроса радиоактивный фосфор и ту же методику, как при исследовании фосфорилазы полисахаридов, нами было найдено, что препараты фосфорилазы нуклеозидов также содержат лабильно связанный фосфат, находящийся в равновесном обмене с неорганическим фосфатом среды.

Таким образом, на кристаллических препаратах фосфорилазы полисахаридов и некристаллическом препарате фосфорилазы нуклеозидов установлено, что фосфорилаза всегда содержит лабильно связанный фосфат, не удаляемый многократным пересаживанием фермента сульфатом аммония. Этот лабильно связанный фосфат находится в постоянном равновесном обмене с неорганическим фосфатом среды.

Обратимый процесс фосфорилиза состоит, повидимому, из двух стадий: стадии лабильного связывания неорганического фосфата на определенном участке или участках поверхности фермента и стадии разрыва глюкозидной или глюкозидоподобной связи с помощью этого лабильно связанного фосфата. Реакции трансглюкозидирования и транспентозидирования, возможно, являются не первичными, а балансовыми реакциями, протекающими с участием фосфора.

Приношу благодарность проф. Н. М. Сисакяну за поддержку и содействие в настоящей работе.

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

Поступило
18 XI 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. А. Критский, ДАН, 64, № 3 (1949). ² Г. А. Критский и Е. Б. Куваева, ДАН, 64, № 4 (1949). ³ G. Schmidt and S. T. Thannhauser, Journ. Biol. Chem., 161, 83 (1945). ⁴ W. C. Schneider, *ibid.*, 164, 747 (1946). ⁵ В. С. Асатиани, Руководство по биохимич. методике, 1939, стр. 178. ⁶ М. Ф. Гулий и М. А. Коломийченко, Укр. биохим. журн., 19, 148 (1947). ⁷ М. Ф. Гулий, там же, 19, 427 (1947). ⁸ M. Doudoroff, H. H. Barker and W. Z. Hassid, Journ. Biol. Chem., 170, 147 (1947). ⁹ G. T. Cori and C. F. Cori, *ibid.*, 158, 321 (1945). ¹⁰ M. Cohn and G. T. Cori, *ibid.*, 175, 89 (1948). ¹¹ А. Н. Петрова, Биохимия, 14, 155 (1949).

* Было поставлено два опыта, оба дали положительные результаты.