

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР В. А. ЭНГЕЛЬГАРДТ, Н. С. ДЕМЯНОВСКАЯ
и Т. В. ВЕНКСТЕРН

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ
МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬ НА МИОЗИН**

Известны два рода превращений мышечных белков — миозина и актина. Оба эти превращения проявляются изменением физических свойств белковых растворов, именно резким возрастанием их вязкости, что говорит об образовании сильно удлиненных, нитевидных мицелл; обоим превращениям склонны приписывать важную роль в осуществлении сократительной функции мышцы. Одним из этих превращений является соединение частиц актина между собою под влиянием солевых растворов определенной концентрации. При этом, как показывают электроннооптические наблюдения, образуются длинные нитевидные мицеллы. Штрауб обозначает этот процесс как полимеризацию актина; здесь «актин соединяется с актином». Подобный тип превращений, быть может, целесообразно обозначить как «гомомеризацию» и образующийся продукт как гомомер. Второй тип превращений мы имеем при соединении актина (главным образом, полимеризованного) с миозином. Здесь мы имеем образование более высокомолекулярного продукта из двух разных белков, и можно было бы говорить о «гетеромеризации».

Из излагаемых ниже опытов видно, что подобно тому, как актин способен, с одной стороны, соединяться с самим собою (гомомеризоваться), а с другой, соединяться с миозином, так и миозин способен к двойкого рода реакциям полимеризационного типа: он не только, как было известно, может соединяться с актином, образуя гетеромер — актомиозин, но, как будет показано, может и соединяться сам с собою, образуя гомомер со свойствами, в некоторых отношениях удивительным образом сходными со свойствами актомиозина. Эту способность миозина нам удалось наблюдать при воздействии на миозин метиленовой сини на свету. В этих условиях происходит чрезвычайно значительное возрастание вязкости, ведущее затем к застудневанию раствора, с превращением его в плотный гель.

Опыты ставились, главным образом, на растворах так называемого «миозина А», получавшегося кратковременной экстракцией мышцы и переосаждавшегося не менее 3 раз; в большинстве случаев раствор дважды подвергался освобождению от актина. Принципиально сходные результаты получались и с растворами миозина В, содержащими значительную примесь актомиозина; однако здесь картина менее отчетлива, и таких опытов было лишь небольшое число. Метиленовая синь (МС) добавлялась до конечных концентраций порядка 10^{-4} — 10^{-5} M, освещение производилось 300-ваттной лампой накаливания, через водяной фильтр и при охлаждении. Для отчетливого наблюдения необходима достаточно высокая концентрация взятого раствора миозина. При концентрациях ниже 0,3 мг N/мл с конечной реакционной смеси, изменения вязкости вы-

ражены слабо или могут совсем отсутствовать; при низких концентрациях может наблюдаться более или менее сильно растянутый индукционный период, в течение которого

изменений вязкости не отмечается, а затем возрастание вязкости все же наступает. Измерения вязкости производились в обычных оставальдовских вискозиметрах.

Рис. 1 показывает результаты такого рода опытов. На протяжении 15-минутного освещения вязкость раствора миозина возрастает (в более концентрированном растворе) почти вдвое; при продолжавшемся освещении раствор вскоре превратился в плотный гель. С менее концентрированным раствором возрастание вязкости запаздывает, но потом тоже становится отчетливым. Контрольные пробы, выдерживавшиеся с метиленовой синью в темноте, не обнаруживают никаких изменений вязкости и даже через сутки остаются жидкими.

Очевидно, что указанный эффект метиленовой сини следует рассматривать как фотосенсибилизированное окисление миозина. Подвергшиеся такому воздействию частицы

Рис. 1. Изменение вязкости растворов миозина в присутствии метиленовой сини при освещении. Миозин дважды очищенный от актина; его концентрация: $A - 0,37 \text{ мг N/ml}$; $B - 0,16 \text{ мг N/ml}$; $MC 2 \cdot 10^{-5} M$. Ia и Ib при освещении; IIa и IIb — в темноте

миозина приобретают стремление соединяться (созываться), подобно тому, как соединяются друг с другом гомомерные частицы актина под влиянием солей.

Эффект метиленовой сини является, повидимому, в определенной мере специфичным в отношении миозина — он не обнаруживается на других белках. Яичный глобулин или миоген, взятые в концентрациях, по вязкости или по содержанию белка одинаковых с раствором миозина, не показывают возрастания вязкости при освещении в присутствии МС. Опыт с яичным глобулином представлен в табл. 1. МС взята в концентрации $6,7 \cdot 10^{-5} M$.

Своеобразной и по природе своей еще неясной особенностью действия МС является то, что оно проявляется только при доступе воздуха, в аэробных условиях. В анаэробных условиях (эвакуированные и заполненные азотом тунберговские трубки) освещение в присутствии МС ведет к значительному ослаблению окраски МС, но загустевания раствора не наступает. Не возрастает вязкость и в том случае, если такой, анаэробно освещавшийся раствор привести в соприкосновение с воздухом, поместив его в темноту; при этом не происходит и сколько-нибудь значительного регенерирования окраски. Лишь если теперь снова осветить раствор, удается наблюдать обычное загустение (вероятно, за счет действия оставшейся невосстановленной части МС). Можно было бы думать о таком механизме: фотоактивированная МС реагирует с миозином, дегидрируя какие-то его легко окисляющиеся группировки и восстанавливаясь в лейкобазу. Однако этого воздействия еще недостаточно для того, чтобы частицы миозина приобрели способ-

Таблица 1

Относительная вязкость (η/η_0)

Время освещения в минутах	Миозин 0,4 мг N/ml	Яичн. глоб. 0,96 мг N/ml
Начальный	2,03	1,84
5	2,28	1,67
10	2,50	1,57
15	4,15	1,56

ность томомеризоваться — для этого должно присоединиться действие перекиси водорода, образующейся при реокислении лейкокометиленовой сини кислородом воздуха. Возможно, однако, что тут механизм какой-то иной; по крайней мере добавление H_2O_2 к миозину не дает той картины, какая наблюдается при действии МС на свету. Лишь при больших количествах H_2O_2 получается образование сгустков, но весь характер процесса тут совсем иной, чем в опытах с МС. Надо отметить, что речь может идти лишь об исчезающие малых количествах образующейся перекиси водорода, так как попытки измерить в респирометре Варбурга количество кислорода, поглощаемого при фотосенсибилизированном воздействии МС на миозин, не дали уловимых величин — наблюдавшиеся изменения давления лежали в пределах точности измерений.

Характерным свойством продукта соединения миозина с актином, актомиозина, является резкое снижение его высокой вязкости под действием аденоинтрифосфорной кислоты (АТФ). Оказалось, что аналогичным действием АТФ обладает и по отношению к растворам миозина, приобретшим высокую вязкость под фотосенсибилизированным воздействием метиленовой сини. Если АТФ добавить с самого начала опыта, одновременно с МС, то нарастания вязкости при освещении такой пробы не происходит, в то время как параллельная пробы, не содержащая АТФ, резко изменяет вязкость (см. рис. 2).

Если дать возрасти вязкости раствора миозина, подвергая его в присутствии МС освещению, и затем, прекратив освещение, добавить АТФ, то вязкость резко падает, иногда до величин, лишь немногим отличающихся от вязкости исходного раствора миозина (см. рис. 3).

Изменения в молекуле миозина, вызываемые фотосенсибилизированным воздействием МС, затрагивают группировки, в какой-то мере принимающие участие в осуществлении энзиматической, аденоинтрифосфатазной (АТФазной) функции миозина. Это выражается в наступающем в этих условиях снижении АТФазной активности (см. рис. 4).

И в этом случае указанные изменения наступают лишь при освещении, при выдерживании же аналогичной активность не меняется.

Многое говорит в пользу того, что действие МС затрагивает сульфогидрильные группы миозина. Этим группам принадлежит определенная

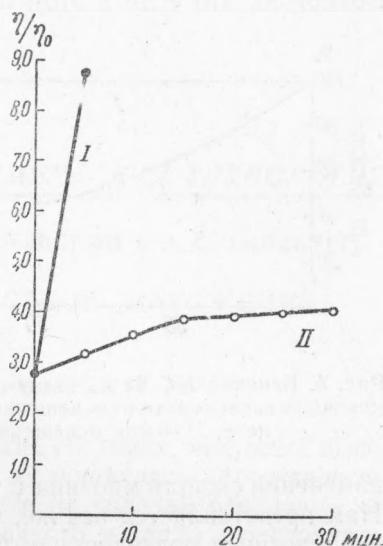


Рис. 2. Влияние АТФ на возрастание вязкости миозина при освещении с МС. Миозин 0,6 мг N/мл; МС $2 \cdot 10^{-5}$ M. АТФ 5 мг Ва-соли на 5,5 мл конечного объема: I — без АТФ (контроль); II — с АТФ

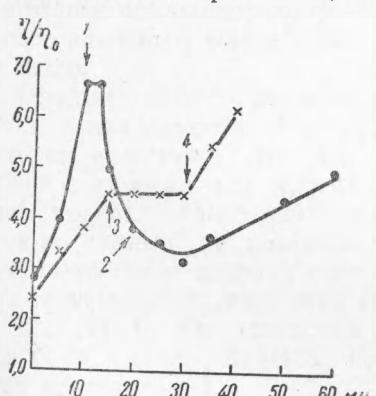


Рис. 3. Снижение вязкости при добавлении АТФ. Миозин 1,1 мг N/мл; МС $2 \cdot 10^{-5}$ M; АТФ 0,1 мл 0,6 M раствора к 5 мл общего объема, добавлено в момент, помеченный стрелкой. Стрелки указывают: 1 — добавление АТФ, свет выключен; 2 — свет включен (опытная пробы); 3 — добавление 0,1 Мл KCl, свет выключен; 4 — свет включен (контрольная пробы)

пробы в темноте энзиматическая

Многое говорит в пользу того, что действие МС затрагивает сульфогидрильные группы миозина. Этим группам принадлежит определенная

роль в осуществлении АТФазной функции миозина, и мы видели, что эта активность снижалась в условиях наших опытов. Сульфидрильным группам миозина приписывается участие во взаимодействии с актином. Возможно, что если в этом последнем случае в образовании межмицеллярных, гетеромерных связей участвуют восстановленные Н-группы, то для соединения «миозина с миозином» требуется наличие каких-то окисленных форм этих группировок. Достаточно надежно промерить превращения Н-групп миозина при фотоактивированном воздействии МС нам еще не удалось, так как окраска самой метиленовой сини мешает и при иодометрии, и при нитропруссидной реакции.

Сейчас еще трудно сказать, каково значение отмеченных функционально-биохимической. Нам представляется все же, что отнюдь не исключена возможность того, что миозин и под влиянием биологических окислительных систем мог бы подвергаться тем же превращениям, какие обнаруживаются при фотоактивированном действии метиленовой сини. Тогда мы имели бы еще один процесс, с которым необходимо было бы считаться при рассмотрении функционального обмена мышцы, именно, процесс «окислительной гомомеризации» миозина и обратный распад образовавшегося гомомера на мономерные частицы под действием аденоцинтрифосфорной кислоты.

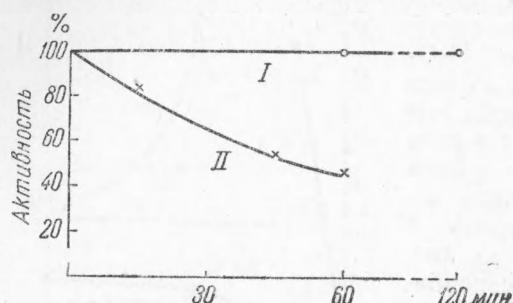


Рис. 4. Влияние МС на АТФазную активность миозина в зависимости от освещения. I — в темноте; II — при освещении

изменений свойств миозина с точки зрения функционально-биохимической. Нам представляется все же, что отнюдь не исключена возможность того, что миозин и под влиянием биологических окислительных систем мог бы подвергаться тем же превращениям, какие обнаруживаются при фотоактивированном действии метиленовой сини. Тогда мы имели бы еще один процесс, с которым необходимо было бы считаться при рассмотрении функционального обмена мышцы, именно, процесс «окислительной гомомеризации» миозина и обратный распад образовавшегося гомомера на мономерные частицы под действием аденоцинтрифосфорной кислоты.

Лаборатория биохимии
Физиологического института
им. И. П. Павлова
Академии наук СССР

Поступило
3 V 1950