

БИОХИМИЯ

В. Г. КРЮКОВ

О ПЕРЕХОДЕ НЕКОТОРЫХ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ
В НЕРАСТВОРИМОЕ СОСТОЯНИЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(Представлено академиком А. И. Опарином 26 IV 1950)

Рядом блестящих цитологических исследований (Кедровский, Хлопин, Роскин и др.), констатирован полный параллелизм между интенсивностью белкового внутриклеточного синтеза и наличием в клетке нуклеиновых кислот. Одним из важных вытекающих отсюда выводов является необходимость всестороннего исследования нуклеопротеидных связей и явлений, сопровождающих взаимодействие белка с нуклеиновой кислотой. От успеха подобных исследований в значительной мере зависит разработка представления о механизме белкового синтеза и о месте, занимаемом в этом механизме нуклеиновой кислотой. Обращает на себя внимание тот факт, что для синтеза белка, повидимому, необходимо наличие только сложных нуклеиновых кислот полинуклеотидного типа, представляющих собой высокополимерные соединения простых нуклеиновых кислот (мононуклеотидов). Исследование в рентгеновых лучах дезоксирибонуклеиновой кислоты, относящейся к подобным полимерам, показало (¹), что отдельные звенья этой кислоты находятся друг от друга на расстоянии (3,34 Å), совпадающем с расстоянием между отдельными аминокислотными звеньями вполне вытянутой полипептидной цепи белковой молекулы (3,35 Å). Как показали работы советских исследователей (^{2, 3}), растяжение полипептидной цепи молекулы глобулярного белка есть результат развертывания белковой глобулы, закрученной в спираль. Такое развертывание сопровождается обнажением спрятанных внутрь глобулы гидрофобных углеводородных цепей, а также увеличением реактивоспособности белка (⁴) и характерно для так называемого денатурационного изменения белка. На основании сказанного естественно ожидать, что если нуклеиновая кислота действительно способна вытягивать полипептидную цепь белковой молекулы, то это должно сказаться на понижении растворимости данного белка. Естественно также предположить, что гидрофобизирующее влияние на белок способна оказывать не только дезоксирибонуклеиновая кислота, но и другие полинуклеотиды. Этот вопрос, однако, в литературе не получил освещения.

В настоящей работе мы пытаемся при помощи разработанной нами методики обнаружить, имеет ли место переход растворимых белков в нерастворимое состояние под влиянием дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученной из зобной железы, или рибонуклеиновой кислоты из дрожжей или их солей. О понижении сродства к воде у белковой молекулы мы будем судить по появлению коагулята белка, нерастворимого в обычном растворителе. Объектом в большинстве наших опытов слу-

жит белок эдестин из семян конопли, получаемый нами в кристаллическом виде.

Эдестин нерастворим в чистой воде. Поэтому водная взвесь кристаллов этого белка после перемешивания в пробирке выглядит как молочно-белая жидкость. Добавление в пробирку 10% хлористого натра делает содержимое прозрачным, так как эдестин в растворе соли хорошо растворим. При помощи разнообразных коагулянтов (5) эдестин может быть переведен в состояние необратимой коагуляции, т. е. в состояние нерастворимости в обычном его растворителе (в 10% NaCl). Такими агентами являются сильные кислоты, спирты, высокая температура, высушивание и др. Если доза агента незначительна, в кристаллах эдестина сохраняется способность растворяться в растворе поваренной соли. Если она очень велика, кристаллы совершенно перестают растворяться.

Наконец, можно подобрать такую дозу этого агента, которая вызывает коагуляцию только поверхностного слоя каждого белкового кристаллика, внутреннее же его содержимое остается растворимым. По внешнему виду такие кристаллы не отличаются от ничем не обработанных кристаллов эдестина (см. рис. 1), однако опыты с их растворимостью в 10% растворе NaCl и разбавленных кислотах убедили нас в наличии нерастворимой оболочки на поверхности каждого кристалла. Центральная часть кристалла легко растворима в названных растворителях. Оболочка кристалла проницаема для воды, раствора NaCl и для многих низкомолекулярных кислот, но непроницаема для таких высокомолекулярных веществ, как белки, нуклеиновые кислоты и пр. Если подобные кристаллы белка, поверхность которых коагулирована, поместить в 10% раствор NaCl, то каждый кристалл превращается в раздутый шарик (см. рис. 2), представляющий собой осмотическую ячейку. Оболочка такой ячейки состоит, как мы видели, из пленки коагулирующего белка, а внутреннее ее содержимое — из эдестина, растворенного в проникшем сюда растворе поваренной соли. В том, что внутри ячейки заключена жидкость, можно легко убедиться, наблюдая в ней броунирование мелких частиц, или, если проколоть оболочку иглой микроманипулятора.

Эта разработанная нами методика оказалась очень удобной для изучения действия различных агентов, вызывающих коагуляцию того или иного белка. Вышеописанные шары легко получить, действуя на взвесь кристаллов эдестина (или других белков) высокой температурой (по-142

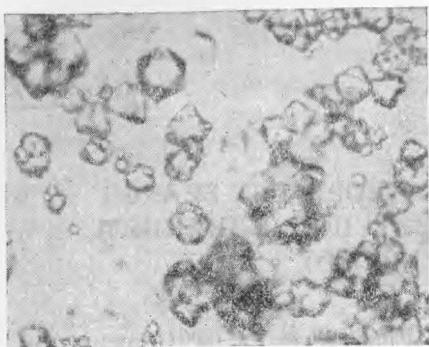


Рис. 1. Кристаллы исходного эдестина. $\times 150$. Репрод. 3:4



Рис. 2. Шары — осмотические ячейки, образующиеся из кристаллов эдестина (рис. 1) при действии на их поверхность 2% водного раствора рибонуклеиновой кислоты. Оболочки шаров проницаемы для растворителя (10% NaCl) и непроницаемы для нуклеиновой кислоты и белка. $\times 150$. Репрод. 3:4

луминутное нагревание пробирки в кипящей водяной бане), спиртом, формалином, водными растворами нуклеиновых кислот и их солей. В том случае, если белок находится в жидким состоянии (например, белок куриного яйца), методика образования нуклеино-белковых осмотических ячеек видоизменяется: твердая частица нуклеиновой кислоты, накрытая каплей раствора белка, образует вокруг себя раздувающийся шар. Из одинаковых по величине кристаллов эдестина при любом упомянутом воздействии мы получали одинакового размера шары (их объем, как правило, приблизительно в 8 раз превышал объем исходного кристалла), они имели вполне одинаковый внешний вид, а их оболочки имели одинаковую проницаемость. Сравнивая концентрацию различных примененных нами веществ, мы могли судить о различной силе их коагулирующего действия на белок. Для образования оболочки нужна была концентрация формалина около $0,5\text{ M}$, тогда как рибонуклеиновой кислоты — около $0,007$ — $0,015\text{ M}$. Мононуклеотиды оболочки не образовывали. То, что нуклеиновые кислоты, так же как и разнообразные коагулянты, примененные в определенной для каждого из них концентрации, при действии на белковый кристалл производят одинаковый эффект на его поверхность, и навело нас на мысль, что механизм образования нуклеоэдестиновых шаров таков же, каков он в случае образования подобных эдестиновых шаров, получающихся под влиянием других изученных агентов. Во всех этих случаях происходит коагуляция поверхности белкового кристалла под влиянием того или иного агента, в данном случае дезоксирибонуклеиновой или рибонуклеиновой кислот или их солей. Вышеописанная методика позволила экспериментально проверить наше предположение. Если оно верно, то удаление нуклеиновой кислоты из кристалла (или из полученного из него нуклеоэдестинового шара) не должно разрушить образовавшуюся оболочку. Растворение же оболочки в растворе соли будет говорить против нашего предположения.

Удаление рибонуклеинового компонента с поверхностей кристаллов (из предыдущего следует, что нуклеиновая кислота могла находиться только на поверхности каждого кристалла) мы производили двумя способами: 1) при помощи фермента рибонуклеазы, полученной из поджелудочной железы; 2) путем простого отмывания водой. В последнем случае мы исходили из представления, неоднократно высказанного в литературе (⁶), что рибонуклеопротеиды могут легко диссоциировать и рибонуклеиновый компонент обладает большой подвижностью. Кроме того, в образовании нуклеопротеидных комплексов весьма большое зна-

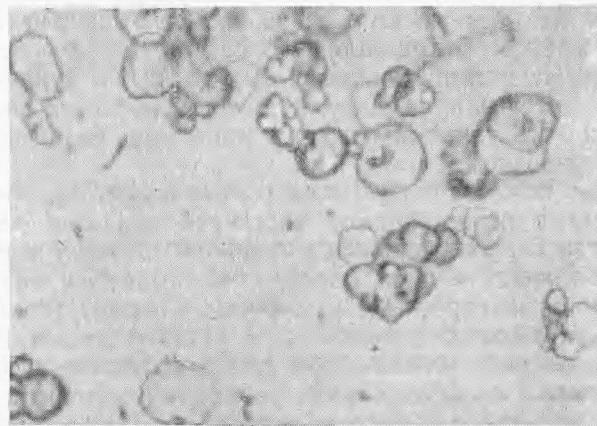


Рис. 3. Оболочки кристаллов эдестина (рис. 1), образовавшиеся благодаря действию 2% рибонуклеата натрия, который затем был удален при помощи рибонуклеазы. Последующим промыванием в 10% NaCl растворимый эдестин из внутренних частей кристаллов был удален. Удаление белка возможно вследствие того, что ультрапоры оболочек после действия фермента становятся вполне проницаемыми для белка. Осмотическое раздувание в шары (ср. рис. 2) поэтому отсутствует. $\times 150$. Репрод. 3 : 4

чение придается адсорбционным явлениям ⁽⁷⁾, которые, повидимому, играют большую роль в происхождении описываемой нами нерастворимой нуклеопротеидной оболочки. Следовательно, при обработке водой рибонуклеиновый компонент, вследствие диссоциации, должен десорбироваться и легко удаляться из нуклеопротеидного комплекса благодаря отмыванию.

Полнота удаления рибонуклеинового компонента контролировалась в обоих случаях по исчезновению реакции на фосфор*. Результат опыта вполне соответствовал нашему предположению: несмотря на удаление рибонуклеинового компонента, оболочки вокруг кристаллов продолжали оставаться нерастворимыми (см. рис. 3). Контрольные опыты показали, что условия, в которых производилось удаление рибонуклеинового компонента, сами по себе не вызывают необратимой коагуляции белка поверхности кристаллов эдестина. Следовательно, коагуляция белка в вышеописанных опытах была вызвана нуклеиновыми кислотами.

Коагулирующее действие нуклеиновых кислот на белки нами наблюдалось также в опытах с глобином, темоглобином и с кристаллическим трипсином.

Изучавшимся в этой работе свойством превращать растворимые белки в нерастворимое состояние обладает как дезоксирибонуклеиновая, так и рибонуклеиновая кислота. Мононуклеотиды таким свойством не обладают. Таким образом, это свойство, повидимому, связано с полимерным строением нуклеиновых кислот (полинуклеотидов).

Мы исследовали модели. Однако весьма вероятно, что в клетке могут возникать условия, при которых нуклеиновые кислоты проявляют описанное свойство. Такая возможность должна учитываться при изучении агрегатного состояния протоплазмы и проблемы повреждения. Этот учет особенно необходим при обсуждении механизмов образования артефактов. В частности, нам кажется не исключенной вероятность предположения, что одной из причин наблюдающегося резкого выявления ядерной оболочки во время умирания клетки ⁽¹⁰⁾ является переход белков в нерастворимое состояние на поверхности ядра под влиянием нуклеиновых кислот, адсорбирующихся здесь в результате изменившихся взаимоотношений между белками и полинуклеотидами. Естественно ожидать, что развертывание белковых глобул под влиянием нуклеиновых кислот может иметь место и в физиологических условиях.

Для правильного понимания биологической значимости описанного здесь денатурирующего влияния нуклеиновых кислот на белки было важно выяснить, имеется ли параллелизм между известным явлением прижизненной денатурации клеточных белков ⁽¹¹⁾ и накоплением в клетке нуклеиновых кислот синтезом белков или активированием обмена.

Институт экспериментальной биологии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
27 III 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Astbury and F. Bell, Cold Spr. Harb. Symp., **9**, 109 (1938). ² С. Бреслер и Д. Талмуд, ДАН, **43**, 326 (1944). ³ П. Афанасьев, Б. Талмуд и Д. Талмуд, ДАН, **55**, 615, 725 (1947); А. Пасынский, Б. Талмуд и Д. Талмуд, ДАН, **56**, 279 (1947). ⁴ К. И. Страцицкий, ДАН, **58**, 1423 (1947). ⁵ Т. Осборн, Растительные белки, пер. с англ., М.—Л., 1935. ⁶ А. Белозерский и Г. Бажилина, Биохимия, **9**, № 2—3, 134 (1944). ⁷ А. Кизель, Химия протоплазмы, изд. АН СССР, М.—Л., 1940. ⁸ Ф. Файгль, Капельный анализ, пер. с нем., М.—Л., 1933. ⁹ И. Буланкин, Сообщ. на Сессии мед.-биол. отд. АМН СССР, посвящ. проблеме белка, Л., 1949. ¹⁰ Л. Ларionов и Е. Брумберг, ДАН, **54**, 267 (1946); Nature, **158**, 663 (1946). ¹¹ В. Александров, Усп. совр. биол., **24**, 45 (1947).

* Продукт подвергался легкому гидролизу с серной кислотой; производилась капельная реакция на фосфат с молибдатом аммония и бензидином на фильтровальной бумаге ⁽⁸⁾.