

А. В. КОТЕЛЬНИКОВА

О ГЕКСОКИНАЗЕ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 III 1951)

Гексокиназная реакция, в которой осуществляется первичное фосфорилирование гексоз за счет одного лабильного фосфата аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), является начальной стадией превращения гексоз как при анаэробном расщеплении их, так и при синтезе полисахаридов. Она хорошо изучена в дрожжах и в некоторых животных тканях и почти не исследована у высших растений.

По данным Боннера (1), бесклеточный сок из колеоптилей овса способен фосфорилировать глюкозу с образованием фруктозодифосфата; прибавление АТФ усиливало этот процесс, что являлось указанием на гексокиназный механизм реакции. Особенно интересным является вопрос о содержании гексокиназы в клубнях картофеля, где идет интенсивный процесс крахмалообразования, который, вероятно, включает в себя как необходимую стадию реакцию фосфорилирования гексоз. По Гриффитсу (2), в экстрактах клубней картофеля удается обнаружить гексокиназную реакцию, но лишь в небольшой степени, так как выявлению гексокиназной реакции мешает присутствующая в клубнях картофеля активная апираза, отщепляющая оба лабильных фосфата от АТФ.

Изучая связь между процессом крахмалообразования в картофеле и обменом аденозинфосфорных кислот, мы поставили своей задачей подобрать такие условия, при которых гексокиназную активность клубней картофеля можно было бы ясно обнаружить. Опыты ставились на различно обработанных экстрактах из клубней картофеля, которые приготавливались измельчением клубней в гомогенизаторе в течение 1 мин. при охлаждении с равным или половинным объемом воды или солевого раствора. Полученный гомогенат центрифугировали. Центрифугат фильтровали и исследовали в нем гексокиназную, так же как и апиразную активность. Реакцию проводили в присутствии нейтрализованной Na-соли АТФ, избытка глюкозы (или фруктозы), 0,003 M Mg и экстракта картофеля. В пробах определяли легко гидролизуемый фосфат, отщепляемый за 15 мин. нагревания в кипящей водяной бане с 1 N HCl, и неорганический фосфат до и после инкубации. Мерой гексокиназной реакции являлось уменьшение суммы легко гидролизуемого и неорганического фосфата, а мерой апиразной активности в условиях нашей постановки опытов — увеличение неорганического фосфата. Контролем служили пробы, в которых до прибавления картофельного экстракта добавлялась трихлоруксусная кислота, а в ряде опытов также и пробы без глюкозы.

В табл. 1 приводятся некоторые характерные опыты, полученные на экстрактах.

Как видно из таблицы, гексокиназная активность водных экстрактов клубней картофеля (опыт 385), а также экстрактов на 0,01 M KCN,

Таблица 1

Гексокиназная активность в экстрактах клубней картофеля (АТФ 0,001 М, гексоза 0,01 М, MgSO₄ 0,003 М, NaHCO₃ 0,03 М; температура 35°)

№ опыта	Экстракт из клубней	Время инкубации пробы в мин.	Гексоза в пробе	NaF в пробе в мол.	Найдено		Перенесено Р на гексозу в % лабильн. Р контрол ²	Отщепилось Р в % лабильн. Р контрол ¹	
					+ лабильн. Р в γ	неорг. Р в γ			
385	Водный экстракт	15	Проба	Глюкоза	0,06	128,5	121	7,5	83
			Контр.				134,5	54,5	—
386	Водный экстракт после автолиза гомогената в течение 1 суток	15	Проба	Фруктоза	0,06	125,5	114	8	78
			Контр.				132	48,5	—
387	Водный экстракт после автолиза гомогената в течение 3 суток	15	Проба	Глюкоза	0,06	144	110	5	53
			Контр.				148,5	66	—
387	Диализиров. водный экстракт после автолиза гомогената в течение 3 суток	15	Проба	Глюкоза	0,06	150	99	0	42
			Контр.				149,5	62	—
452	Экстракт на 0,01 М KCN	30	Проба	Глюкоза	0,074	139,5	134	8	86
			Контр.				146,5	57	—
411	Экстракт на 1 М NaF	30	Проба	Глюкоза	0,118	121,5	115	16	77
			Контр.				136	45	—
413	Экстракт на 0,5 М NaF	30	Проба	Глюкоза	0,103	130	120	15	73
			Контр.				142,5	58	—

применяемом для предохранения экстрактов от потемнения (опыт 452), незначительна: перенос фосфата на глюкозу за 15—30 мин. инкубации составлял 7—8%, а в некоторых опытах гексокиназной активности обнаружить совсем не удавалось; апиразная же активность экстрактов была очень велика — отщеплялось около 80% лабильного фосфата АТФ, несмотря на применение 0,06—0,07 М NaF для подавления апиразной активности. Замена глюкозы фруктозой (опыт 385) не увеличивала гексокиназной реакции. В опытах 386 и 387 было исследовано влияние на гексокиназную реакцию автолиза. Для этого тот же гомогенат клубней, из которого был получен экстракт для опыта 385, был поставлен на автолиз при 36° на 1 сутки и 3 суток. После автолиза гексокиназная реакция экстракта не только не увеличилась, но, наоборот, уменьшилась, полностью исчезая после автолиза в течение 3 суток. Экстракт после 3-суточного автолиза, диализированный для снижения «фосфатного фона», также оказался неактивным (опыт 387).

Помимо приведенных в таблице факторов, гексокиназная активность изучалась и при ряде других условий, как, например, при замене во всех применяемых в опыте растворах иона Na на ион K; исследовалась также гексокиназная активность в целом гомогенате клубней и в экстракте из ростков картофеля, однако при всех изменениях условий гексокиназная активность была найдена примерно одинаковой. Увеличение концентрации фтористого натрия до 0,1 М в конечном разведении, что достигалось приготовлением картофельного экстракта на 0,5—1 М NaF (опыты 411 и 413), усилило перенос фосфата на глюкозу до 15—16% лабильного фосфата, но эффект не всегда воспроизводился. Картофельный экстракт не содержал, однако, ингибитора гексокиназы, так как заметного подавления активности препарата гексокиназы из дрожжей в присутствии картофельного экстракта найде-

но не было — за 45 мин. инкубации было перенесено на глюкозу 32% лабильного фосфата.

Таким образом, обнаружить в экстрактах картофеля гексокиназную реакцию достаточной интенсивности без отделения апиразы не удалось.

Исследование распределения апиразной активности при фракционировании экстракта картофеля серноокислым аммонием показало, что она

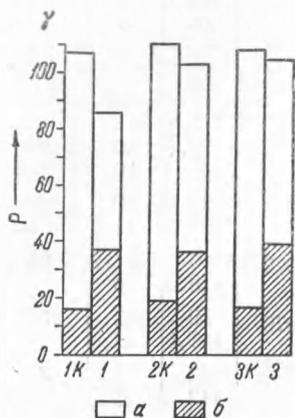


Рис. 1. Гексокиназная активность фракций 0,3 насыщения серноокислым аммонием экстракта картофеля. *α* — лабильный Р, *β* — неорганический Р. *К* — контроль с трихлоруксусной кислотой. NaF 0,074 M, АТФ 0,001 M, MgSO₄ 0,003 M, NaHCO₃ 0,03 M. 1 — проба с осадком 1-й фракции 0,3; 2 — проба с раствором 2-й фракции 0,3; 3 — проба с осадком 2-й фракции 0,3

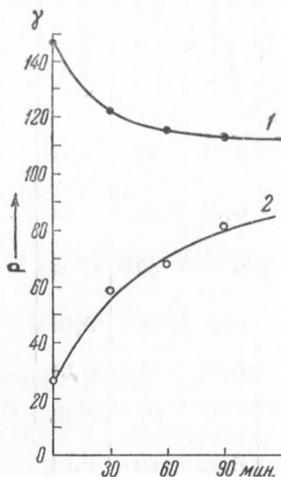


Рис. 2. Гексокиназная и апиразная активность осадка 2-й фракции 0,3 экстракта картофеля № 4. 1 — гексокиназная активность (легко гидролизующийся фосфат + неорганический фосфат); 2 — апиразная активность (неорганический фосфат). NaF 0,074 M, АТФ 0,001 M, MgSO₄ 0,003 M, NaHCO₃ 0,03 M

возрастает по мере увеличения насыщения серноокислым аммонием. Так, активность фракции 0,3 насыщения равнялась 0,23 γР/γ белка в стандартных условиях (за 15 мин. инкубации при 30°), фракции 0,6—7 γР/γ белка, фракции 1,0—14 γР/γ белка.

Гексокиназная же активность обнаруживалась только во фракции 0,3. Поэтому фракция 0,3 была исследована более подробно. Картофельный экстракт доводили до 0,3 насыщения серноокислым аммонием, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали серноокислым аммонием 0,3 насыщения, растворяли в воде. Значительная часть осадка не растворялась. Ее отфильтровывали и суспендировали в небольшом объеме воды, обозначая как «осадок 1 фракции 0,3». Фильтрат диализировали против дистиллированной воды на холоду, образовавшийся осадок отфильтровывали и также суспендировали в небольшом объеме воды, обозначив как «осадок 2 фракции 0,3», а фильтрат — как «раствор фракции 0,3».

На рис. 1 показана гексокиназная активность этих трех подфракций насыщения 0,3 серноокислым аммонием картофельного экстракта. Как видно из рисунка, наибольшей гексокиназной активностью обладал осадок 1 фракции 0,3 и такое распределение активности наблюдалось для всех исследованных нами экстрактов.

В табл. 2 представлены данные по гексокиназной активности осадка 1 фракции 0,3.

Хотя, как мы нашли, апиразная активность во фракции 0,3 была наименьшей по сравнению с другими фракциями, все же оказалось, что

Таблица 2

Гексокиназная активность осадка 1 фракции 0,3 экстрактов клубней картофеля (АТФ ~ 0,001 М, MgSO₄ 0,003 М, NaHCO₃ 0,03 М; температура 35°)

№ опыта	№ исходного экстракта картофеля	Осадок 1 фракции 0,3 в пробе в мл	Время инкубации пробы в мин.	Глюкозы в пробе в мл.		NaF в пробе в мл.	Найдено		Перенос Р на глюкозу в % лабильн. Р контроля	Отщепилось Р в % лабильн. Р контроля
							лабильн. Р + неорг. Р в γ	неорг. Р в γ		
433	1	0,25	30	0,01	Проба Контр.	0,074	92,5 108	29 16	17 —	14 —
434	1	0,25	30	0,01	Проба Контр.	0	93,5 104,5	60 11,5	12 —	53 —
436	1	0,25	60	0,01	Проба Контр.	0,079	93 118,5	31,5 16	25 —	15 —
	1	0,5	60	0,01	Проба Контр.	0,079	89 117,5	61 22,5	30 —	40,5 —
451	2	0,25	60	0,01	Проба Проба Контр.	0,074	82	39	34	21
							112	53	2,5	36
455	3	0,25	60	0,01	Проба Контр.	0,074	88	32	23,5	15
							109,5	18	—	—
458	4	0,25	60	0,01	Проба Контр.	0,074	115	68	26	35
							147	26	—	—
460	5	0,25	60	0,01	Проба Контр.	0,074	94	41	22	17
							114	20	—	—

без применения NaF в осадке 1 фракции 0,3 она слишком велика и подавляет активность гексокиназы. Так, в опыте 433 в присутствии 0,074 М NaF перенос Р на глюкозу составлял 17%, отщепление фосфата 14%. В опыте 434 с тем же препаратом осадка 1 фракции 0,3 без NaF перенос составил 12%, отщепление за счет апиразы 53%. При увеличении времени инкубации до 60 мин. в присутствии 0,07—0,08 М NaF перенос на глюкозу составлял от 22 до 34% лабильного фосфата АТФ, что в ряде опытов уже было близко к теоретическим величинам, соответствующим переносу одного лабильного фосфата АТФ, если принять во внимание одновременное отщепление фосфата за счет апиразы. Увеличение количества фермента вдвое (опыт 436) увеличивало гексокиназную реакцию значительно меньше, чем апиразную. В опыте 451 показано, что без глюкозы уменьшения легко гидролизуемого фосфата почти не наблюдается, т. е. гексокиназная реакция не идет.

На рис. 2 представлены кривые изменения легко гидролизуемого фосфата (гексокиназная реакция) и неорганического фосфата (апиразная реакция) во времени. Через 1 час 30 мин. перенос фосфата на глюкозу соответствовал 100% переносу одного лабильного фосфата АТФ, учитывая апиразную реакцию.

Таким образом, фракционированием картофельного экстракта серно-кислым аммонием удастся получить фракцию, содержащую гексокиназу, активность которой вполне ясно обнаруживается, если подавить значительную часть оставшейся апиразной активности фтористым натрием.

Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
30 III 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ J. Bonner, Arch. Biochem., 17, 311 (1948). ² M. Griffiths, Arch. Biochem., 20, 451 (1949).