

Г. А. КРИТСКИЙ

О РЕАКЦИИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ПЕНТОЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 IX 1951)

В предыдущих исследованиях (1, 2) нами впервые была описана реакция «транспентозидации», а именно, реакция энзиматического синтеза инозина из гипоксантина и гуанозина путем переноса пентозы из гуанозина на гипоксантин с помощью препаратов фосфорилазы нуклеозидов (нуклеозидфосфазы). При этом, хотя неорганический фосфат и не добавлялся к реакционной смеси, однако вопрос о том, протекает ли вышеупомянутая реакция через промежуточное образование рибозо-1-фосфата, оставался открытым ввиду того, что обычные препараты фосфорилазы нуклеозидов (нуклеозидфосфазы), как и фосфорилазы крахмала (амилофосфазы), содержат некоторое количество лабильно связанного фосфата (2), который и мог использоваться для образования рибозо-1-фосфата. Появившееся в дальнейшем сообщение Мак-Нутта (3) о реакции энзиматического переноса дезоксирибозы, которая, по мнению автора, протекает без промежуточного образования пентозо-1-фосфата, нельзя считать убедительным, так как использованные автором энзиматические препараты были «сырыми энзиматическими препаратами» и, следовательно, могли содержать то или иное количество фосфата.

Таким образом, вопрос об участии фосфата в реакции транспентозидации до настоящего времени еще в достаточной мере не выяснен. В связи с этим нами и были выполнены описанные ниже исследования о механизме действия нуклеозидфосфазы и об участии фосфата в реакции транспентозидации.

Прежде всего представляло интерес выяснить, протекает ли реакция транспентозидации при полном исключении неорганического и лабильно связанного фосфата из реакционной смеси.

В результате ряда попыток, направленных на удаление лабильно связанного фосфата без инактивации фермента, удалось выяснить, что хотя при многократных переосаждениях нуклеозидфосфазы ее лабильно связанный фосфат довольно прочно удерживается в связи с ферментом, однако количество его постепенно уменьшается и после 15—17 переосаждений практически равно нулю.

Уже 10 переосаждений фермента насыщенным раствором перекристаллизованного сульфата аммония с рН 7,0 из объема 0,4—0,5 л достаточно для того, чтобы получить препарат фермента, который после его диализа до удаления сульфата аммония обладает уже в значительно меньшей мере способностью катализировать реакцию транспентозидации, чем нуклеозидфосфаза, без специальной обработки для удаления лабильно связанного фосфата.

После 19-кратного переосаждения нуклеозидфосфазы перекристаллизованным сульфатом аммония, когда в нуклеозидфосфазе уже совер-

шенно не удается обнаружить лабильно связанного фосфата, нуклеозидфосфаза попрежнему обладает некоторой транспентозидазной активностью и без добавления неорганического фосфата. Так как транспентозидазная активность фермента без лабильно связанного фосфата в несколько раз ниже, чем с лабильно связанным фосфатом, то при сравнительно коротких сроках инкубации реакционной смеси можно наблюдать кажущийся факт отсутствия транспентозидазной активности без неорганического и лабильно связанного фосфата.

Описание условий экспериментов приводится ниже.

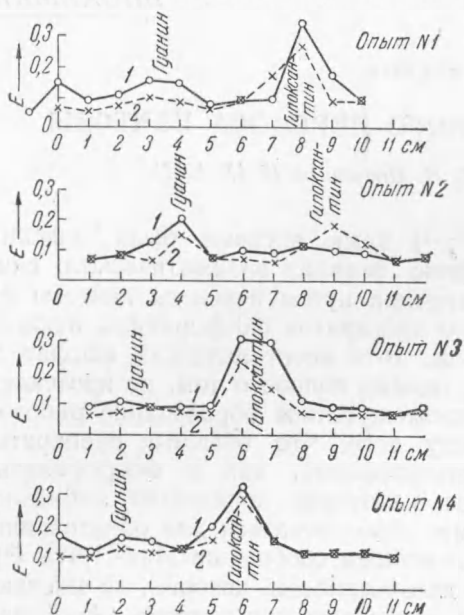


Рис. 1. Опыты №№ 1 и 2 — длина хроматограммы свыше 40 см; опыт № 3 — длина хроматограммы 32 см; опыт № 4 — длина 40 см. 1 — хроматография гидролизата, 2 — хроматография смеси гуанина и гипоксантина (контроль)

+ H₂O 25 мл + несколько капель толуола. Инкубация в термостате 12 час. при 30°.

После инкубации опытных смесей в термостате в каждую опытную смесь добавлялось по 5—6 мл *n*-бутанола для денатурации белков, и смеси встряхивались 2—3 часа.

Затем смеси отфильтровывались и упаривались в вакууме до объема 0,5—1,0 мл. Этот остаток центрифугировался, и для определения инозина центрифугат хроматографировался на бумаге.

При этом в качестве растворителя употреблялась смесь из 9 объемов *n*-бутанола, предварительно насыщенного водой, и 1 объема муравьиной кислоты. По данным спектрофотометрии при 250 м μ водных экстрактов из различных участков хроматограмм R_F инозина равняется 0,04—0,07. Но так как оказалось, что в этом же интервале лежит R_F гуанозина, то для дальнейшей идентификации производился солянокислый гидролиз экстрактов из участков хроматограмм, соответствовавших $R_F = 0,04—0,07$, и производилась хроматография гидролизата в тех же условиях. Полученные при этом хроматографические кривые * гидролизатов к опы-

В опыт № 1 взято: гуанозина 10 мг + гипоксантина 5 мг + + 0,2 мл раствора тщательно отдиализованной в течение 5—7 дней нуклеозидфосфаза (выделенной из печени крыс по методу Калькара) с общим содержанием белка 4 мг + H₂O 25 мл + несколько капель толуола. Инкубация в термостате 4 часа при 30°.

В опыт № 2 взяты те же компоненты, как и в опыт № 1, но использовался препарат фермента, предварительно пересажженный 10 раз сульфатом аммония. Инкубация в термостате 4 часа при 30°.

В опыт № 3 взяты те же компоненты, как и в опыт № 2, но с добавлением 0,005 мл насыщенного раствора Na₂HPO₄. Инкубация в термостате 4 часа при 30°.

В опыт № 4 взято: гуанозина 10 мг + гипоксантина 5 мг + + 0,2 мл отдиализованной, предварительно 19 раз пересажженной перекристаллизованным сульфатом аммония нуклеозидфосфаза с содержанием белка 4 мг +

* Приношу благодарность И. В. Верещинскому и В. А. Гавриловой за обеспечение спектрофотометрических анализов.

там №№ 1, 2, 3 и 4, а также соответствующие им контрольные кривые приводятся на рис. 1.

Рис. 1 показывает, что в условиях опыта № 1 реакция транспентозидации проходит за 4 часа с теми препаратами нуклеозидфосфазы, из которых лабильно связанный фосфат не удален.

Опыт № 2 показывает, что в аналогичных условиях реакция транспентозидации почти не замечается за 4 часа с теми препаратами нуклеозидфосфазы, из которых значительная часть лабильно связанного фосфата удалена многократным переосаждением сульфатом аммония.

Опыт № 3 показывает активирующее действие небольших добавок неорганического фосфата на реакцию транспентозидации в тех реакционных смесях, где значительная часть лабильно связанного фосфата фермента была удалена.

Опыт № 4 показывает, что при достаточно длительном сроке инкубации (12 час.) реакция транспентозидации все же проходит даже в тех реакционных смесях, в которых никаких обнаруживаемых следов неорганического или лабильно связанного фосфатов не имелось.

Возможно, что реакция транспентозидации без участия фосфата обуславливается специальным еще неизвестным ферментом транспентозидазой, присутствующей в препаратах нуклеозидфосфазы и отличной от последней, подобно тому как изомераза амилозы или энзим Q отличны от амилофосфазы.

Вышеизложенное можно суммировать в следующих выводах:

1. Реакция энзиматического переноса пентозы от одного нуклеинового основания к другому (реакция транспентозидации), хотя и сравнительно медленно, но все же может протекать и без неорганического или лабильно связанного фосфата в реакционной среде.

2. Наличие в препаратах фермента лабильно связанного фосфата или добавление небольших количеств неорганического фосфата к ферменту, не содержащему лабильно связанного фосфата, сильно ускоряет реакцию энзиматического переноса пентозы. Активирующее действие фосфата на реакцию транспентозидации, вероятно, объясняется фосфолизом (т. е. фосфоролизом) одного нуклеозида и рефосфолизом другого с помощью нуклеозидфосфазы.

3. Лабильно связанный фосфат нуклеозидфосфазы может выполнять роль связанного коэнзима или активной протетической группы и, следовательно, противоположность понятий «субстрат» и «протетическая группа фермента» не всегда абсолютна, как в классических случаях.

4. Впервые описаны метод определения инозина с помощью хроматографии на бумаге и метод получения энзиматически активной нуклеозидфосфазы без лабильно связанного фосфата.

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

Поступило
28 VIII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Г. А. Критский, О протетической группе амилофосфазы (фосфорилазы), Диссертация, Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, М., 1949. ² Г. А. Критский, ДАН, 70, № 4 (1950). ³ W. S. MacNutt, Nature, 166, 444 (1950).