

Член-корреспондент АН СССР В. А. ЭНГЕЛЬГАРТ, М. Н. ЛЮБИМОВА
Т. В. ВЕНКСТЕРН, М. Я. ТИМОФЕЕВА и Ю. Б. БАБСКАЯ

К ЭНЗИМОЛОГИИ МИОЗИНА.

РАЗДЕЛЕНИЕ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ И ДЕЗАМИНАЗЫ

Д. Л. Фердманом и С. Нечипоренко ⁽¹⁾ было обнаружено, что препараты миозина, помимо аденозинтрифосфатазных (АТФ-азных) свойств, обладают также и свойствами дезаминазы адениловой кислоты. Дезаминазная активность сохраняется неизменной и при многократных переосаждениях миозина. Эти результаты были подтверждены Херманном и Иозеповицем ⁽²⁾, которые подчеркивают, что дезаминазная активность столь же постоянно присуща препаратам миозина, как и АТФ-азная.

Переосажденные и освобожденные от актомиозина препараты миозина, по данным ряда авторов, при исследовании в ультрацентрифуге или методом катафореза представляются практически гомогенными, и во всяком случае нет указаний на наличие в этих препаратах каких-либо постоянно присутствующих обособленных фракций, содержащихся в постоянных количествах. Возникает вопрос, принадлежат ли указанные выше две энзиматические активности двум отдельным, индивидуальным белкам, неразличимым по седиментации и катафорезу, или, быть может, мы здесь имеем случай энзиматически-поливалентного белка, обладающего одновременно как АТФ-азными, так и дезаминазными свойствами. Такая возможность не может быть априорно отвергнута. Ее допущение облегчило бы ответ на вопрос о том, каким образом в ограниченном количестве клеточного белка «размещается» все огромное число отдельных ферментов. Существуют указания в пользу такой возможности. Так, гемоглобин обладает двумя каталитическими свойствами: способностью переносить кислород и пероксидазной способностью (хотя и слабой). Хартинг и Велик ⁽³⁾ сообщают о способности кристаллической дегидразы фосфоглицеральдегида катализировать и ряд превращений ацетилфосфата; для химотрипсина известно, что он способен осуществлять разрыв не только пептидных, но и сложноэфирных связей ⁽⁴⁾.

Задачей настоящей работы было выяснение этого вопроса в отношении миозина: возможно ли препаративно разделить дезаминазную и АТФ-азную активность? Это оказалось возможным сделать, хотя в весьма неодинаковой степени в количественном отношении. В то время как получить дезаминазу, лишенную АТФ-азных свойств, легко удается, иногда почти со 100% выходом начальной активности, получение бездезаминазной АТФ-азы значительно труднее и было пока осуществлено лишь с малыми выходами.

Применение фракционированного высаливания, как это делалось Калкарром ⁽⁵⁾ для приготовления препаратов дезаминазы из миозина для аналитических целей, не обещало особенного успеха, судя по величинам активности получавшихся Калкарром препаратов. Неприменимым оказалось и фракционирование спиртом и ацетоном, ибо даже при применении сильного охлаждения дезаминаза инактивировалась одновременно с АТФ-азой. Некоторое разделение могло быть достигнуто путем вы-

держивания препарата миозина в слабо кислой среде. При рН 4,5 дезаминазная активность утрачивается полностью, но при рН 5,8 она еще сохраняется, хотя и падает примерно на 50%. В то же время АТФ-азная активность падает в 5—10 раз.

Весьма эффективным путем для получения дезаминазы, совершенно лишенной АТФ-азных свойств, оказалась термическая обработка препаратов миозина. Дезаминазная активность и АТФ-азная активность обнаружили весьма большое различие в отношении температурной устойчивости.

Крайняя термолабильность АТФ-азных свойств известна давно (6). В отличие от этого дезаминазные свойства оказались гораздо устойчивее. Дезаминазная активность практически полностью сохраняется при нагревании до 50° в течение 5 мин., снижается до 30—40% при 55°, и полная инактивация наступает при таком же нагревании до 60° (рис. 1). При умеренном нагревании происходит коагуляция главной массы белка миозинового препарата, дезаминаза же остается в растворе. В результате этого дезаминазная активность, в расчете на единицу белка, возрастает в 5—10 и более раз. АТФ-азная активность полностью отсутствовала уже в пробе, нагреваемой до 50°.

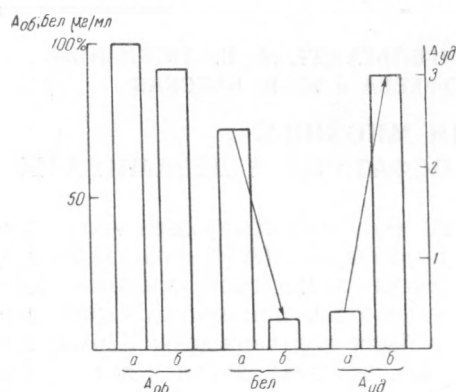


Рис. 1. Изолирование дезаминазы из миозина. $A_{об}$ — активность общая, $A_{уд}$ — активность на мг белка, Бел. — содержание белка: а — без нагревания, б — после 5 мин. при 53°

«Молярная активность» наиболее чистых препаратов дезаминазы, получавшихся при нагревании до 53° в течение 5 мин., выражается величинами порядка 2000—3000 мол. субстрата, расщепленных на 10^5 г белка в 1 мин. Это величины, близкие по порядку к тем, которые были получены Энгельгардом, Саковым и Смирновым (7), а затем и рядом других авторов (Мейергоф, Кори, Барановский) для кристаллической альдолазы мышц («миогена»).

Отделенная от АТФ-азы дезаминаза обнаруживает, как и исходный миозин, свойства глобулина. При непродолжительном диализе она выпадает из раствора. Более продолжительный диализ ведет к значительному снижению активности очищенных препаратов дезаминазы, вплоть до почти полной инактивации. Пока еще остается невыясненным, является ли это результатом удаления какой-либо простетической группы, содержащейся в дезаминазе и начинающей сильнее диссоциировать, когда дезаминаза освобождена из своего природного состояния, т. е. из связи с АТФ-азой, или же тут причина какая-либо иная.

Как уже указывалось, значительно труднее было осуществить получение бездезаминазных препаратов АТФ-азы. Главным препятствием тут является крайняя лабильность АТФ-азы, делающая невозможным применение сколько-нибудь энергичных воздействий и ведущая к большим потерям активности даже в процессе наиболее щадящих манипуляций.

Приемом, который дал нам положительный результат, явилось осаждение препаратов миозина в очень разведенных растворах малыми концентрациями солей лантана. Лантан был применен в свое время Мейергофом и Полисом (8) в опытах по получению из миозина препаратов с повышенной АТФ-азной активностью. Мы нашли, что в то время как 0,004 М раствор лантановой соли осаждает препарат, содержащий то же соотношение дезаминазной и АТФ-азной активностей, что и в исход-

ном миозине, по мере снижения концентрации лантана осаждаются препараты со все меньшим содержанием дезаминазы. Путем тщательного подбора условий удалось получить препараты АТФ-азы, которые имели АТФ-азную активность, при пересчете на единицу веса белка близкую к таковой исходного миозина, и в то же время показывали лишь следы дезаминазной активности, не превышавшей 5% от исходной величины (см. рис. 2).

С точки зрения препаративной это получение бездезаминазной АТФ-азы еще нельзя считать успешным, так как по отношению к суммарной АТФ-азной активности выход составляет не более 10%. Тем не менее достигнутые результаты достаточны для демонстрации принципиальной возможности разделения двух энзиматических активностей миозина. Эти результаты дали также возможность для решения дальнейшего вопроса о том, принадлежит ли способность реагировать с актином обоим энзиматически различным компонентам миозина — АТФ-азному и дезаминазному — или же лишь которому-нибудь одному из них, и в таком случае какому именно.

Опыты вполне однозначно показали, что полученная указанным выше способом без-АТФ-азная дезаминаза совершенно лишена способности реагировать с актином. Для точной сравнимости в опыты брались такие растворы исходного миозина и дезаминазы, которые содержали одинаковое количество белка. При этом оказалось, что в то время как раствор исходного миозина при добавлении актина дает характерное повышение вязкости, которая возвращается к исходной величине при добавлении АТФ, раствор дезаминазы (с той же концентрацией белка) при добавлении актина показывает вязкость, соответствующую простой смеси обоих компонентов, и добавление АТФ никак не влияет на вязкость (см. рис. 3).

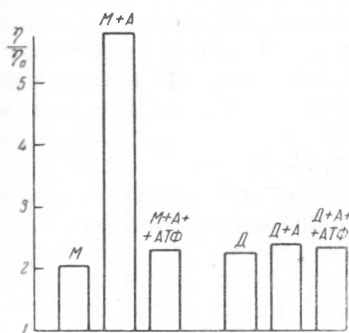


Рис. 3. Взаимодействие миозина (М) и дезаминазы (Д) с актином (А)

В противоположность этому, раствор бездезаминазной АТФ-азы реагирует с актином в точности так же, как той же концентрации раствор исходного миозина: происходит в обоих случаях практически совершенно одинаковое возрастание вязкости и возвращение ее к почти исходной величине под влиянием АТФ (см. рис. 4). Следовательно, способность реагировать с актином присуща той части миозинового комплекса, которая является носителем АТФ-азных свойств.

О получении из миозина высокоактивных препаратов дезаминазы сообщалось в кратком реферате Гергели (9). Никаких деталей о способах получения препаратов не приводится, и способность реагировать с актином не исследовалась. Когда настоящая работа уже была закончена, появилось такое же краткое сообщение Сцент-Дьердьи мл. (10),

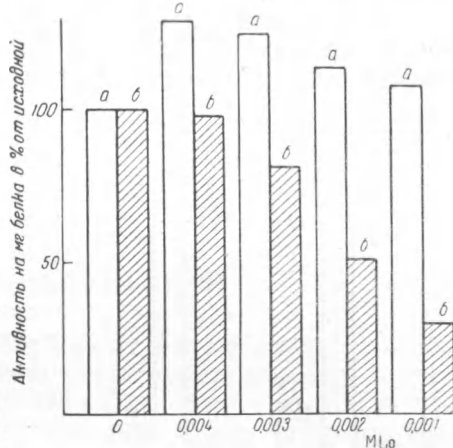


Рис. 2. Отделение АТФ-азы от дезаминазы лантаном. а — АТФ-аза, б — дезаминаза

в котором излагаются результаты, принципиально полностью согласующиеся с нашим заключением о связи АТФ-азных свойств и способностью реагировать с актином. Именно, при обработке препаратов миозина трипсином способность реагировать с актином обнаруживается у той фракции, которая сохраняет АТФ-азную активность, и отсутствует у фракции, этой активности не имеющей. В связи с этим следует добавить, что при фотохимическом окислении миозина в присутствии метиленовой сини, которое сопровождается значительным снижением АТФ-азной активности, одновременно снижается и способность реагировать с актином.

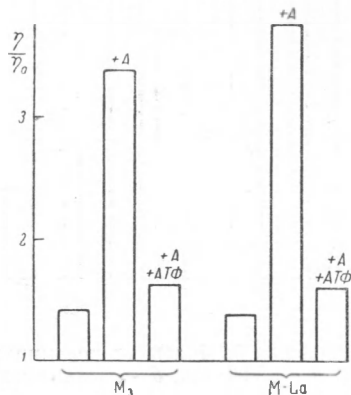


Рис. 4. Взаимодействие миозина и АТФ-азы с актином

В заключение следует уделить некоторое внимание вопросу о возможной роли дезаминазы в функциональном обмене мышцы. Роль процессов, ведущих к образованию аммиака в мышце при ее работе, одно время считалась весьма важной, но затем была совершенно отеснена на задний план фосфатом, занявшим главенствующее положение во всех теориях мышечного сокращения. Повидимому, своевременно коренным образом пересмотреть эту точку зрения.

Тесная, в весьма постоянных количественных отношениях обнаруживаемая связь дезаминазы с сократительным веществом мышечного волокна, высокая активность фермента, значительное его содержание (того же порядка, что и АТФ-азы) — все это не оставляет сомнения в

том, что дезаминазе и катализируемому ею процессу отщепления аммиака («аммониогенезу») принадлежит существенная роль в функции мышцы. Мало правдоподобным было бы ограничивать значение дезаминазы в мышце ролью «предохранительного клапана», вступающего в действие лишь в условиях крайних состояний, для удаления избыточно образующихся продуктов мышечного метаболизма. Если для АТФ-азы на первый план выступает энергетическая роль катализируемой ею реакции, то в отношении дезаминазы положение пока менее ясно. В первую очередь можно думать о локальных смещениях рН или же, что особенно важно, о высокой биологической активности иона аммония. Убедительным подтверждением того, что процессам дезаминирования в мышце принадлежит важная роль, являются наблюдения⁽¹¹⁾, установившие чрезвычайно большую скорость обновления азота аминокруппы адениловой кислоты в мышцах. Первоочередную важность приобретает в связи с этим изучение путей, какими совершается обратная фаза, процесс реаминирования инозинового остатка. Это должно будет явиться предметом дальнейших исследований.

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

Поступило
11 VI 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Д. Л. Фердман и С. Нечипоренко, Укр. биохим. журн., 18, 105 (1946).
- 2 V. Sz. Hermann, G. Josepovitz, Hungar. Acta Physiol., 2, 1, 64 (1949); Nature, 164, 845 (1949).
- 3 J. Harting, S. Velick, Feder. Proc., 11, 226 (1952).
- 4 S. Kaufmann, G. W. Schwert, H. Neurath, Arch. Biochem., 17, 203 (1948).
- 5 H. Kalckar, J. Biol. Chem., 167, 461 (1947).
- 6 М. Н. Любимова и В. А. Энгельгардт, Биохимия, 4, 716 (1939).
- 7 В. Энгельгардт, Усп. совр. биол., 14, 177 (1941).
- 8 B. D. Polis, O. Meyerhof, J. Biol. Chem., 169, 389 (1947).
- 9 J. Gergely, Feder. Proc., 10, 188 (1951).
- 10 Andr. Szent-Györgyi, ibid., 11, 296 (1952).
- 11 H. Kalckar, D. Rittenberg, J. Biol. Chem., 170, 455 (1947).