

А. Н. ПЕТРОВА

## О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ КОФАКТОРА, УСКОРЯЮЩЕГО ПРОЦЕСС РАСПАДА ГЛИКОГЕНА В МЫШЦАХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 24 VI 1952)

В настоящем сообщении приводятся исследования, касающиеся механизма действия описанного нами добавочного фактора, ускоряющего процесс распада гликогена в мышцах и обладающего свойствами коэнзима (1).

Исследования показали, что этот кофактор оказывает влияние на действие изомеразы амилозы — фермента, который расщепляет  $\alpha$ -1,6-связи в полисахаридах, как это было установлено нашими предыдущими работами (2).

Опыты были поставлены с очищенным от ферментов препаратом кофактора, для чего мышечный экстракт, приготовленный на холоду, подщелачивался до рН 7,0—7,3 и подвергался нагреванию в кипящей водяной бане в течение 3 мин.; свернувшиеся при этом белки удалялись центрифугированием, и полученный препарат, представляющий бесцветную и прозрачную жидкость, не содержащий примеси фосфоролазы, амилазы и изомеразы амилозы, подвергался исследованию.

Опыты проводились с автолизированными и диализированными экстрактами мышц, а также с очищенными препаратами ферментов. Экстракты мышц использовались нами, главным образом, как источник фосфоролазы, так как при автолизе и диализе активность изомеразы амилозы значительно ослабляется. Действие кофактора изучалось при исследовании фосфоролитического распада гликогена и  $\beta$ -декстрина (полученного действием  $\beta$ -амилазы на гликогены). Опыты были поставлены таким образом, что готовились различные смеси из экстракта (или фосфоролазы), изомеразы и кофактора. Препарат изомеразы амилозы готовился по ранее описанной нами методике и проверялся на чистоту (3).

Данные этих исследований представлены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что наиболее быстрый распад как гликогена, так и  $\beta$ -декстрина наблюдался в смеси экстракта, изомеразы амилозы и кофактора.

Так, в опытах, где в качестве субстрата применялся гликоген, в смеси № 1 (экстракт + изомераза амилозы + кофактор) опыт № 2 убыль фосфатов через 30 мин. инкубации была 281  $\gamma$  в 0,5 мл, в то время как в остальных смесях (№№ 2 и 3, когда отсутствовал один из двух последних ингредиентов) фосфоролитиз был значительно слабее и выражался в убыли фосфатов, равной 125—143  $\gamma$ , мало отличаясь от таковой контроля (смесь № 4 — экстракт + вода). Та же картина наблюдалась и в опытах №№ 1 и 3.

Аналогичные результаты были получены в исследованиях с  $\beta$ -декстри-

Действие кофактора на процесс расщепления гликогена и  $\beta$ -декстрина в опытах с экстрактами мышц

Инкубационные смеси: 1,5 мл автодиализированного экстракта + 0,5 мл кофактора + 10 мл гликогена + 0,5 мл изомеразы амилозы (или 4 мг  $\beta$ -декстрина) + 0,3 мл фосфатного буфера + 1 мл адениловой кислоты +  $H_2O$  до 3 мл; рН 6,8—6,9; инкубация при 35°)

№№ смесей	Исследуемые смеси ферментативных препаратов	Опыты с гликогеном			Опыты с $\beta$ -декстрином		
		Убыль неорганич. фосфата в $\gamma$ в 0,5 мл через 30 мин. инкубации					
		оп. № 1	оп. № 2	оп. № 3	оп. № 4	оп. № 5	оп. № 6
1	Автодиализир. экстракт, изомеразы амилозы, кофактор . . . . .	181	281	327	110	90	181
2	Автодиализир. экстракт, кофактор . . . . .	112	143	193	35	50	35
3	Автодиализир. экстракт, изомеразы амилозы . .	125	125	175	0	25	35
4	Автодиализир. экстракт, вода . . . . .	125	140	190	0	0	40

ном. В смесях, содержащих экстракт + изомеразы амилозы + кофактор, наблюдалось более сильное расщепление  $\beta$ -декстрина. Во всех трех опытах (№№ 4, 5 и 6) убыль фосфатов в смеси № 1 была в 2—3 раза больше, чем в смесях №№ 2 и 3, где отсутствовал один из двух последних ингредиентов, или в смеси № 4, где отсутствовали оба указанные ингредиента.

Таким образом, опыты как с гликогеном, так и с  $\beta$ -декстрином показали, что действие кофактора проявляется в той смеси, где имеется изомеразы амилозы, так как прибавление кофактора к одному экстракту (смесь № 2), который содержал преимущественно фосфоролазу, не вызвало усиления фосфоролитического расщепления исследуемых субстратов. Добавление к экстракту только изомеразы амилозы также не ускорило процесс распада гликогена (смесь № 3), что указывало на зависимость этого процесса от воздействия кофактора на изомеразы амилозы.

Опыты с  $\beta$ -декстрином особенно показательны в этом отношении.  $\beta$ -декстрин, резистентный к действию фосфоролазы, может подвергаться ее воздействию лишь после того, как будут расщеплены  $\alpha$ -1,6-связи в полисахаридах. Фосфоролитический распад  $\beta$ -декстрина, наступающий по мере того, как будут расщепляться связи  $\alpha$ -1,6, зависит, таким образом, от действия изомеразы амилозы, катализирующей распад  $\alpha$ -1,6-связей, в полисахаридах.

Наиболее быстрый фосфоролитический распад, наблюдаемый нами в случае исследования  $\beta$ -декстрина в смеси № 1, т. е. в присутствии экстракта + изомеразы амилозы + кофактора, и значительно более медленное его расщепление в других смесях, где отсутствовали или кофактор или изомеразы амилозы, привел нас к заключению о том, что кофактор действует на изомеразы амилозы.

Однако это важное заключение, сделанное на основании опытов с экстрактами, необходимо было подтвердить с очищенными препаратами ферментов. Требовалось показать, что расщепляющее действие очищенных препаратов фосфоролазы не ускоряется кофактором, а активность изомеразы амилозы усиливается в его присутствии. Для более яркого выявления расщепляющего действия изомеразы амилозы в этих опытах прибавлялась фосфоролаза или  $\beta$ -амилаза; в первом случае исследовался фосфоролитический распад, а во втором — гидролитическое расщепление  $\beta$ -де-

кстрина по накоплению редуцирующих веществ, определяемых методом Хагедорна — Иенсена. Все исследуемые ферменты проверялись на чистоту ранее описанными методиками. Данные этих исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Действие кофактора на процесс расщепления гликогена и  $\beta$ -декстрина в опытах с очищенными ферментами

Инкубационные смеси: 1 мл фосфоролазы (изомеразы амилозы) + 0,5 мл кофактора + 10 мл гликогена (или 4 мг  $\beta$ -декстрина) + 0,3 мл фосфатного буфера м/з + 8 мл хлор. цистеина +  $H_2O$  до 3 мл; pH 7,0—7,3; t-ра инкубации 35°)

Опыты с фосфоролазой

№№ опытов	Исслед. с гликогеном				Исслед. с $\beta$ -декстрином			
	1. фосфоролаза, кофактор		2. фосфоролаза, вода		3. изомераза амилозы, фосфоролаза, кофактор		4. изомераза амилозы, фосфоролаза	
	Убыль неорганического фосфора в $\gamma$ в 0,5 мл через 30 мин. и 2 часа инкубации							
	30 м.	2 ч.	30 м.	2 ч.	30 м.	2 ч.	30 м.	2 ч.
1	50	125	43	131	43	102	0	37
2	—	143	—	135	—	94	—	37
3	125	140	125	145	75	145	31	68

Опыты с  $\beta$ -амилазой

	Исслед. с гликогеном				Исслед. с $\beta$ -декстрином			
	1. $\beta$ -амилаза, кофактор		2. $\beta$ -амилаза, вода		3. изомераза амилозы, $\beta$ -амилаза, кофактор		4. изомераза амилозы, $\beta$ -амилаза	
	Редуцирующие вещества в мл в 1 мл через 30 мин. и 2 часа после инкубации							
	30 м.	2 ч.	30 м.	2 ч.	30 м.	2 ч.	30 м.	2 ч.
4	0,230	0,352	0,220	0,354	0,042	0,102	0,012	0,042
5	0,368	0,398	0,394	0,402	0,088	0,180	0,044	0,102

Из приведенных данных видно, что расщепление гликогена под влиянием действия одной фосфоролазы или  $\beta$ -амилазы происходит совершенно так же, как при воздействии этих ферментов в смеси с кофактором — как убыль фосфатов, так и нарастание редуцирующих веществ в смесях №№ 1 и 2 (опыты №№ 1—5) происходит одинаково.

Другая картина наблюдалась в исследованиях с изомеразой амилозы. При добавлении того же кофактора к смеси изомераза амилозы + фосфоролаза или изомераза амилозы +  $\beta$ -амилаза (см. смеси № 3 всех опытов) наблюдался более сильный распад  $\beta$ -декстрина, чем в отсутствие кофактора (см. смеси № 4); так, убыль фосфатов в первом случае была в 2—3 раза больше, чем во втором. Накопление редуцирующих веществ в смесях № 3 (опыты №№ 4 и 5) было значительно больше, чем в смесях № 4 тех же опытов, что указывало на усиление расщепляющего действия изомеразы амилозы в присутствии кофактора. (Как уже указывалось нами раньше (1), расщепление  $\beta$ -декстрина в опытах *in vitro* происходит более медленно, чем распад гликогена, что особенно заметно в настоящих исследованиях с  $\beta$ -амилазой.)

Таким образом, опыты с изолированными ферментами подтвердили правильность нашего заключения о том, что кофактор не изменяет активности фосфоролазы, но усиливает расщепляющее действие изомеразы амилозы.

На основании опытов как с экстрактами, так и с очищенными ферментами мы пришли к выводу, что кофактор участвует в процессе расщепления  $\beta$ -1,6-связей в полисахаридах, активируемых изомеразой амилозы.

Лаборатория физиологической химии  
Академии наук СССР

Поступило  
20 V 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> А. Н. Петрова, ДАН, 78, 551 (1951). А. Н. Петрова, ДАН, 58, 431 (1947); Биохимия, 13, 244 (1948). <sup>3</sup> А. Н. Петрова, Биохимия, 14, 156 (1949).