

Член-корреспондент АН СССР В. Л. РЫЖКОВ и Г. И. ЛОЙДИНА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСА МОЗАИЧНОЙ БОЛЕЗНИ ТАБАКА С МИОЗИНОМ И АКТИНОМ

В литературе имеются данные о взаимодействии вируса мозаичной болезни табака (ВТМ) с протаминами, некоторыми белковыми ферментами и сывороточными белками (1-3). Из этих данных явствует, что поведение ВТМ не отличается от поведения других белков и что между изоэлектрическими точками ВТМ и взаимодействующего с ним белка по большей части можно наблюдать образование нерастворимого комплекса.

Мышечные белки существенно отличаются от тех белков, взаимодействие которых с ВТМ изучалось раньше. Открытие А. В. Энгельгардтом и М. Н. Любимовой ферментативной активности миозина (4) и своеобразии взаимоотношений миозина с актином делает особенно интересным исследование взаимодействия этих белков с ВТМ.

Во всех опытах мы пользовались раствором миозина в 0,5 М КСl, который содержал около 1,3% миозина. Очищенный препарат ВТМ употреблялся в водном 0,2% растворе. В опытах, в которых определялось влияние взаимодействия миозина с ВТМ на титр ВТМ, титр определялся по числу некрозов на листьях *N. glutinosa*, причем контрольным раствором ВТМ служил раствор вирусного белка, к которому вместо миозина прибавлялся раствор КСl. Само собой разумеется, что строго соблюдалось, чтобы в опытном и контрольном растворе концентрация этой соли была одинакова. Раствор актина приготавливался в 0,1 М КСl путем растворения 1 г актина в 20 мл жидкости. Для полимеризации актина прибавлялся также 0,001 М $MgCl_2$.

В первом опыте 0,5 мл миозина были соединены с 0,5 мл ВТМ и постепенно добавлялась вода до образования осадка. Этот осадок получился при концентрации КСl 0,178 М. Во втором опыте 0,4 мл миозина были соединены с 0,1 мл ВТМ, после чего добавлялась вода и осадок получился при 0,2 М КСl. Чистый миозин выпадает из раствора только при 0,05 М КСl (5). Полученный результат давал основание предположить, что миозин образовал комплекс с ВТМ. Образовавшиеся осадки были отцентрифугированы и затем взвешены в 0,5 мл воды. В осадке и надосадочной жидкости был определен титр вируса (табл. 1). Это определение титра подтвердило наше предположение, что часть вируса перешла в осадок.

Была сделана попытка получить нити из комплекса миозин + ВТМ. Для этой цели смесь растворов названных белков через пастеровскую пипетку выдувалась в воду. Образовавшаяся нить быстро распадалась. Прочных нитей подобно актомиозиновым получить не удалось. Комплекс ВТМ и миозина под влиянием раствора аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) сокращался наподобие актомиозина.

Далее были поставлены опыты с целью выяснить, как влияет актин на взаимодействие миозина с ВТМ, для чего соединялись все три компо-

нента в равных отношениях, причем в одном опыте ВТМ прибавлялся к миозину раньше актина, а в другом раньше прибавлялся актин. В этих опытах брался актин F (полимеризованный актин). К 0,3 мл смеси добавлялось 0,7 мл воды, причем образовался осадок, который отделялся, и титр вируса определялся только в надосадочной жидкости. Кроме этих смесей была взята смесь: 0,1 мл ВТМ + 0,1 мл актина + 0,8 мл воды. Из таблицы 2 можно видеть, что присутствие актина не препятствовало подавлению титра вируса. Мало того, актин сам оказался способным сильно подавлять вирус.

Таблица 1

Взаимодействие ВТМ с миозином (титр вируса выражен в количестве некрозов на 10 половинках листьев *N. glutiposa*)

№№ п/п.	Титруемая фракция	Титр вируса		
		опыт	контроль	% сохранения активности вируса
1	Осадок	80	213	37,5
	Жидкость	123	231	53,2
2	Осадок	55	226	24,3
	Жидкость	41	91	45,0

Таблица 2

Взаимодействие ВТМ с миозином и актином (титр вируса выражен количеством некрозов на 10 половинках листьев *N. glutiposa*)

Смесь	Титр вируса		
	опыт	контроль	% сохранения активности вируса
Миозин + ВТМ + + актин	40	101	39,6
Миозин + актин + + ВТМ	34	83	40,9
ВТМ + актин	17	107	15,8

Вопрос о взаимодействии актина с ВТМ был изучен более подробно. Было установлено, что неполимеризованный актин (актин G) подавляет вирус наподобие актина F. Так, в одном опыте с актином мы получили 52 некроза при 785 некрозах в контроле, т. е. сохранение активности было равно 6,6%. Дальнейшие опыты велись с актином. При взаимодействии ВТМ с этим белком в дистиллированной воде (рН около 6,2) активность вируса в отдельных опытах сохранялась на 19,6%, 20,0%, 22,1%, 23,9%. С целью выяснить, как влияет рН на подавление вируса актином были поставлены опыты с гликоколовым буфером, причем при рН 7 в разных опытах мы нашли следующее сохранение активности: 8,5%, 16,5%, 27,1%, а при рН 4,6 соответственно 37,1%, 25,4%, 62%. Таким образом, наиболее сильно подавляет вирус актином при нейтральной реакции среды и наименее при рН 4,6. Последнее рН очень близко к изоэлектрической точке актина и при нем можно было наблюдать помутнение раствора.

С целью выяснить, как влияет концентрация KCl на изучаемую нами реакцию опыт был поставлен с разным содержанием соли в растворе, причем в 0,1 M KCl активность сохранялась на 21,8%, при 0,25 M — на 49,3% и, наконец, в 0,5 M — на 80,5%. Таким образом, повышение концентрации KCl ведет к разложению комплекса актина с ВТМ.

Были поставлены также опыты по влиянию АТФ на комплекс. Результаты этих опытов приведены в табл. 3, из которой видно, что АТФ сама незначительно подавляет активность вируса, но в то же время уменьшает эффект актина, так как очевидно способна разлагать его комплекс с ВТМ.

Были проведены также вискозиметрические исследования, причем оказалось, что смесь актина F с ВТМ не дает повышения вязкости. Что же касается смеси миозина с ВТМ, то результат получился недостаточно определенный. В некоторых опытах мы наблюдали довольно значительное повышение вязкости, в других же оно отсутствовало или было очень невелико. Там, где повышение вязкости наблюдалось, оно сильно зависело от

соотношений между миозином и ВТМ и достигало максимума при отношении миозина к ВТМ, равном 5:4. В одном опыте при этом соотношении скорость истечения жидкости в вискозиметре равнялась 2 мин. 20 сек., тогда как для ВТМ она была 49,2 сек., для воды 44,2 сек., а для миозина — 1 мин. 44 сек.

Полученные результаты отличаются от того, что раньше было известно о взаимодействии ВТМ с различными белками тем, что в наших опытах образование комплекса удалось наблюдать при рН, лежащих выше изоэлектрических точек взаимодействующих компонентов, а не в интервале, лежащем между этими точками. Как известно, взаимодействие миозина с актином также наблюдается при рН более высоком, чем изоэлектрические точки этих белков, что связано с их избирательной способностью адсорбировать ионы калия, а также другими, еще недостаточно изученными свойствами. Возможно, что вследствие различной способности связывать ионы калия у взаимодействующих белков возникает разница в их заряде, которая и приводит к образованию комплекса (5). Что взаимодействие ВТМ с актином, по крайней мере отчасти, сходно со взаимодействием миозина с этим белком, видно из того, что комплексы ВТМ с актином зависят от концентрации КСl и разлагаются АТФ, как и комплексы миозина с актином.

Мы до сих пор не знаем того субстрата в протоплазме растения, с которым ВТМ вступает в связь, однако было показано, что развитие вирусной инфекции может быть подавлено определенными концентрациями солей калия и магния (6, 7). Возможно, что ВТМ образует комплекс со структурными белками протоплазмы растений, который может быть разложен высокими концентрациями электролитов. Решение этого вопроса, однако, требует дальнейших исследований с белками растений, чувствительных к ВТМ.

В заключение авторы считают приятным долгом поблагодарить М. Н. Любимову за предоставление препаратов миозина и актина, а также за ценную консультацию.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
1 VIII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. C. Bawden, N. W. Pirie, Proc. Roy. Soc., Ser. B, 123, 274 (1937).
² A. Kleczkowski, Biochem. J., 38, 160 (1944). ³ A. Kleczkowski, ibid., 40, 677 (1947). ⁴ М. Н. Любимова, В. А. Энгельгардт, Биохимия, 4, 716 (1939). ⁵ А. Сент-Дьердьи, О мышечной деятельности, М., 1947. ⁶ В. Л. Рыжков, В. А. Смирнова, ДАН, 55, № 3 (1947). ⁷ В. Л. Рыжков, В. А. Смирнова, Микробиология, 17, № 3 (1948).

Таблица 3

Взаимодействие ВТМ с актином и аденозинтрифосфорной кислотой (титр вируса выражен количеством некрозов на 10 половинках листьев)

Смесь	Титр вируса		% сохранения активности вирус/са
	опыт	контроль	
ВТМ + актин	23	115	20,0
ВТМ + 0,05% АТФ	57	77	74,0
ВТМ + актин + 0,05 АТФ	26	79	32,0
ВТМ + актин	79	334	23,9
ВТМ + 0,0125% АТФ	112	180	62,2
ВТМ + актин + 0,0125% АТФ	121	328	36,9
ВТМ + 0,025% АТФ	158	256	61,7
ВТМ + актин + 0,025% АТФ	140	265	52,8