

М. Н. ЛЮБИМОВА и Э. Ш. МАТЛИНА

СВОЙСТВА ДЕЗАМИНАЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ МИОЗИНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 XII 1953)

В предыдущей работе (1) было сообщено об отделении от миозина дезаминазы адениловой кислоты и отмечено, что дезаминаза не участвует в образовании акто-миозинового комплекса.

Задачей настоящего исследования было изучение ферментативных свойств отделенной от миозина дезаминазы. Все немногочисленные данные, касающиеся свойств этой дезаминазы, в основном, относятся к дезаминазе, комплексированной с миозином (2-6). В этих работах исследовались удельная ферментативная активность (Q_N), ее зависимость от кислотности среды (оптимум pH), присутствия катионов и состояния сульфгидрильных групп. Некоторые из полученных данных противоречивы.

В отношении свойств отделенной от миозина дезаминазы АК сведения ограничиваются описанием метода ее выделения из миозина (4, 7) и изменения удельной активности при этом выделении. В одной работе (4) при выходе фермента 10—15% удельная активность повышалась в 2—3 раза, в другой (7) без описания метода выделения указывается на повышение активности в 20 раз. Кроме того, указывается, что такая дезаминаза активируется сывороточным альбумином и не разрушается трипсином. В нашей работе (1) выход фермента был 70—80%, средняя активность $Q_N = 17000$.

Таблица 1

Добавки при выделении миозина	Время хранения миозина	Активность миозина Q_N	Активность дезаминазы Q_N
Гликокол + АТФ	0	25080	85000
Гликокол	0	30720	
	48 час.	11264	51200
Гликокол + АТФ	0	31200	
	48 час.	18000	
	1½ мес.	15360	66560

В настоящей работе методы получения миозина и дезаминазы были немного изменены. Миозин осаждался из растворов разбавлением не водой, а 0,01 M раствором гликокола, применяемого для связывания ионов тяжелых металлов, могущих содержаться в дистиллированной воде, даже перегнанной в стеклянных дистилляторах и хранящейся в дальнейшем в бутылках обычного стекла или стекла типа пирекс (9); в некоторых случаях акто-миозин удалялся из раствора добавлением АТФ (10). Ферментативная характеристика полученных миозинов была: для АТФ-азы $Q_P = 6 - 7 \cdot 10^3$, для дезаминазы $Q_N = 20 - 25 \cdot 10^3$.

Изменение метода получения дезаминазы выразилось в снижении температуры прогрева раствора миозина до 50°, в прогреве миозина без

перемешивания и в уменьшении слоя жидкости при прогреве до 1 см. Активность таких растворов была в пределах Q_N от 50 до $85 \cdot 10^3$ (см. табл. 1).

Ферментативная активность выделенной из миозина дезаминазы

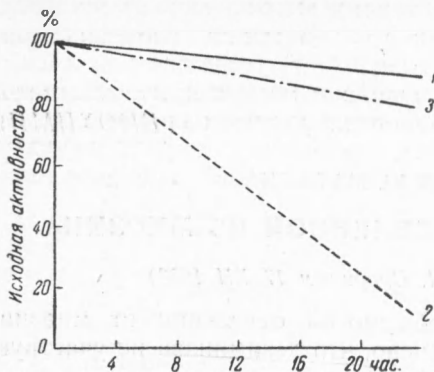


Рис. 1. Диализ против 0,5 М КСl (перемешивание качанием, 3—5°). Дезаминазная активность: 1 — миозина; 2 — дезаминазы; 3 — дезаминазы, качаемой не в диализаторе, а в стеклянной пробирке (контроль на степень денатурации дезаминазы термической обработкой и механическим качанием)

менее устойчива при хранении, чем дезаминазная активность самого миозина. Такая дезаминаза хранится при 3—4° 10—12 дней, миозин — более месяца. При прогреве при 37° без субстрата в течение 4 час. дезаминаза теряет 50% активности. В присутствии же субстрата и при достаточной забуференности среды, обеспечивающей сохранность постоянства кислотности, за те же 4 часа активность дезаминазы не меняется. Оптимум рН для ферментативной реакции 6,2. При этой же кислотности дезаминаза наиболее устойчива при хранении.

Дезаминаза относится к группе ферментов, содержащих SH. Р-хлормеркурибензоат в концентрации $1 : 10^{-3}$ М и азотистое серебро в концентрации $1 : 10^{-5}$ полностью снимают ферментативное действие. Дез-

аминаза, на основании данных изменения ее ферментативной активности при диализе против растворов разных веществ (вода, КСl, АТФ и др.), нуждается в низкомолекулярном активаторе или системе активаторов. В присутствии миозина дезаминазная активность падает значительно медленнее. Очевидно, в этих условиях диализуемое вещество более прочно связано (см. рис. 1).

Сниженная диализом активность дезаминазы восстанавливается добавкой центрифугата кипяченого раствора миозина и дезаминазы или внешнего диализата (в этом случае диализ растворов дезаминазы велся против в 10 раз меньших объемов 0,5 М КСl). Нужно отметить, что часто активация диализатом (очевидно, в силу малой концентрации активатора) появляется отчетливо только после их предварительного длительного, совместного выдерживания (см. рис. 2). Восстановление активности тем меньше, чем больше она упала при диализе по сравнению с исходной. Очевидно, при удалении активатора происходит денатурация белковой части фермента (11).

По своей природе активатор является органическим соединением, так как зола его раствора не только не активирует, а скорее даже угнетает дезаминирование. Кроме того, активатор является таким органическим соединением, которое при хранении теряет свое активирующее действие. Хранящиеся растворы активатора активируют хуже, чем свежеприготовленные. Упавшая при хранении дезаминазная активность миозина и раствора дез-

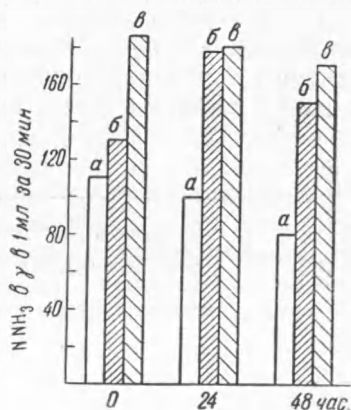


Рис. 2. Реактивация диализованной дезаминазы центрифугатом кипяченого миозина и собственным диализатом. Активность: а — диализованной дезаминазы (д. д.); б — д. д. + диализат; в — д. д. + центрифугат кипяченого миозина. Абсцисса — продолжительность предварительного выдерживания диализованной дезаминазы с активирующим веществом

аминазы восстанавливается при добавлении растворов активатора. Это обстоятельство также указывает на разрушение активатора.

Помимо того, что было обнаружено наличие термостабильного активатора в указанных собственных растворах, было испытано, в соответствии с литературными данными (7), активирующее действие чужеродных белков, их кипяченых экстрактов и, по некоторым соображениям, действие АТФ и ее составных частей.

Указанные вещества при наличии активирующего эффекта обладают разным действием. Одни вещества первоначально усиливают ослаблен-

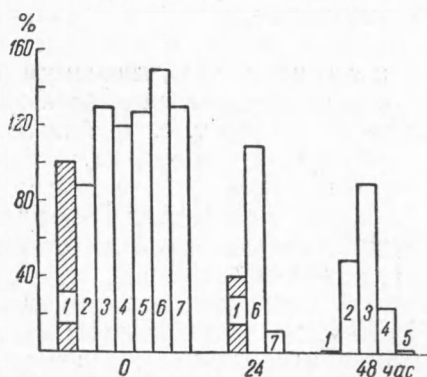


Рис. 3. Активация диализованной дезаминазы чужеродными белками. Активность: 1—диализованной дезаминазы (д. д.); 2—д. д. + желатина; 3—д. д. + кристаллический яичный альбумин; 4—д. д. + прокипяченный кристаллический яичный альбумин; 5—д. д. + центрифугат прокипяченного кристаллического яичного альбумина; 6—д. д. + свежewedенный яичный глобулин; 7—д. д. + центрифугат кипяченого яичного глобулина. Абсцисса— продолжительность предварительного хранения дезаминазы с активирующим веществом

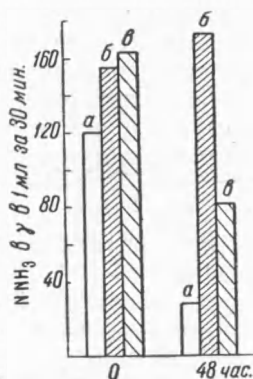


Рис. 4. Активация диализованной дезаминазы растворами АТФ. Активность: а—диализованной дезаминазы (д. д.); б—д. д. + АТФ; в—д. д. + центрифугат кипяченого миозина. Абсцисса— продолжительность предварительного хранения смеси

ную диализом ферментативную активность дезаминазы, но ни в какой степени своим присутствием не тормозят наступающей при дальнейшем хранении инактивации диализованной дезаминазы. Другие вещества не только активируют фермент, но, что особенно обращает внимание, сохраняют активность фермента при дальнейшем совместном выдерживании на том же или более высоком уровне. К первой категории веществ относятся фосфат, кипяченые растворы яичного кристаллического альбумина, яичного глобулина. Ко второй категории относятся АТФ, АДФ, яичный глобулин, кристаллический яичный альбумин, белок яйца в целом и его кипяченный раствор и пиродифосфат (см. рис. 3). Желатина обладает только стабилизирующим действием, и то слабо выраженным. Аденин и аденозин скорее угнетают ферментативную активность или вовсе на нее не влияют.

Из всех испробованных веществ нужно отметить особое поведение АТФ и АДФ. Оба эти вещества, как и диализат дезаминазы, в зависимости от концентрации не всегда обладают резко выраженным активирующим действием. В ряде случаев раствор кипяченого миозина активирует ту же дезаминазу сильнее. Но иная картина получается при хранении дезаминазы с этими веществами. В этом случае, как правило, сохраняется не только повышенная исходная активность, но в большинстве случаев она еще повышается на 25—30% (см. рис. 4).

Обращает на себя внимание отсутствие у активатора дезаминазы строгой специфичности, так как он может быть получен из белка кури-

ного яйца, а стабилизация ферментативного действия диализованной дезаминазы возможна совершенно чуждом данному животному белком.

Мы не имеем в настоящее время достаточно фактов, чтобы высказаться с полной определенностью о природе активатора дезаминазы, так как приведенные данные имеют качественный характер, получены на растворах дезаминазы после термической коагуляции миозина. В этих растворах может содержаться ряд веществ, не имеющих отношения к дезаминазе. Все же мы располагаем рядом наблюдений, на основании которых можно предположить нуклеотидное строение активатора.

Спектральный анализ * исходных растворов дезаминазы, диализованной дезаминазы, а также наружного диализата при рН 1 показал, что при диализе во внешнюю жидкость переходит вещество, обладающее максимумом поглощения около λ 260 м μ , а соответственно, максимум поглощения диализованной дезаминазы, который до диализа был λ 265 м μ , передвигается в длинноволновую часть λ 273 м μ , т. е. приближается к белковому максимуму.

Схема сдвигов максимумов поглощения при диализе



Поскольку аденин и аденозин не обладают активирующим действием, очевидно, что в том случае, если оно связано с пуриновым или пиримидиновым основанием, активирующим действием обладает более сложное соединение, возможно, нуклеотид. Наиболее простым тестом на нуклеотид является определение пентозы, как это делали некоторые авторы (12), и выделение веществ, дающих соединение с лантаном из раствора (13) активатора или трихлоруксусных фильтратов соответствующих белков.

При сопоставлении ряда дезаминаз по их ферментативной активности и по содержанию пентозы оказалось, что чем выше активность препарата, тем в нем больше пентоз. Из трихлоруксусных фильтратов этих растворов, миозина и яичного белка были выделены лантановые осадки, тщательно промыты для удаления трихлоруксусной кислоты, и их растворы при добавке к растворам дезаминазы вызывали отчетливое повышение активности.

В заключение приносим глубокую благодарность В. А. Энгельгардту за постоянную консультацию по ходу работы.

Поступило
25 VII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Энгельгардт, М. Н. Любимова и др., ДАН, 85, № 2 (1952).
² Д. Л. Фердман, З. Ю. Нечипоренко, Укр. биохим. журн., 18, 107 (1946).
³ Д. Л. Фердман, Усп. биол. хим., 1, 216 (1950). ⁴ G. Acs, Kisér Orvest, 1, 150 (1949); V. Hermann, Chem. Abstr., 46, 3 (1952). ⁵ V. Hermann, Z. G. Josephowit, Nature, 164, 855 (1949). ⁶ G. T. Humphrey, H. L. Webster, Austr. J. Exp. Biol. a. Med. Sci., 23, 33 (1951). ⁷ J. Gergely, Fed. Proc., 10, 188 (1951).
⁸ З. Ю. Нечипоренко, Укр. биохим. журн., 25, 1 (1953). ⁹ G. M. Healy, I. T. Morgan, R. C. Parker, J. Biol. Chem., 198, 305 (1952). ¹⁰ S. S. Spicer, J. Gergely, ibid., 188, 179 (1951). ¹¹ В. А. Энгельгардт, Т. В. Венкстерн, Биохим., 8, 23 (1943). ¹² Г. А. Критский, ДАН, 61, 1061 (1948); 64, 373 (1949). ¹³ T. F. Anderson, Science, 110, 5 (1949).

* Выражаем благодарность М. Я. Тимофеевой за измерение спектров.