

А. Н. ПЕТРОВА, А. А. КОБЗЕВА

ОБРАТИМОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ВЕТВЯЩЕГО ЭНЗИМА МЫШЦ И РЕГУЛИРУЮЩАЯ РОЛЬ РНК

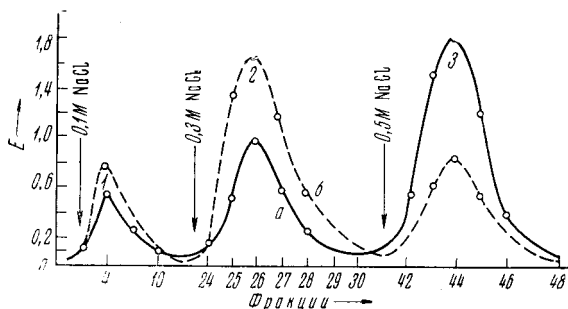
(Представлено академиком А. И. Опариным 2 VII 1971)

В настоящей работе показана обратимость действия изомеразы амилозы (ИА), ветвящего энзима мышц (К.Ф. 2.4.1.18), т. е. его способность переносить части цепей α -глюкана не только из положения 4 в положение 6, но осуществлять перенос и в обратном направлении согласно уравнению $\alpha - 1,4 \rightleftharpoons \alpha - 1,6$.

Эти данные подтвердили ранее полученные нами результаты исследования на малоочищенных препаратах ИА [1].

Опыты проводили с фракциями ИА, содержащими РНК и не имеющими таковой в своем составе. Оказалось, что не только реакция в направлении $4 \rightarrow 6$, т. е. образование точек ветвлений (2), но и обратный процесс $6 \rightarrow 4$ находятся под контролем РНК (3S), содержащейся в препаратах ИА.

Рис. 1. Профиль элюции ИА на ДЕ-52. 1, 2, 3 — первый, второй и третий пики соответственно. а = E_{260} , б = E_{280}



Для получения очищенных фракций фермента, ИА хроматографировали на колонке ДЕ-52 ($1,5 \times 4$), уравновешенной 0,05 M NaCl в 0,01 M трис-HCl, pH 7,5. Элюцию проводили 0,1; 0,3 и 0,5 M NaCl в 0,01 M трис-HCl-буфере pH-7,5, фракции исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле по модифицированному методу (3, 4). Продолжительность электрофореза 1,5 час, на столбик геля наносили 0,2 мл раствора фермента, содержащего 100 мкг белка.

У.-ф. спектры фракций ИА определяли на самопишущем спектрофотометре «Spectord».

Образование связей ветвлений, т. е. перенос части цепи α -глюкана в направлении $4 \rightarrow 6$, определяли по ранее разработанной методике (5), принцип которой состоит в определении понижения экстинкции иодкрахмального или иодамилазного комплексов после 30 мин. инкубации ИА с полисахаридом. Удельную активность выражали в единицах активности ИА на 1 мг белка.

Реакцию переноса части цепи α -глюкана в направлении $6 \rightarrow 4$ определяли по расщеплению β -декстрина, резистентного к действию β -амилазы. Об активности фермента в данном случае судили по степени расщепления β -декстрина в присутствии ИА и β -амилазы, вычитая из полученных величин таковые контрольных проб, инкубированных лишь с β -амилазой. Расщепле-

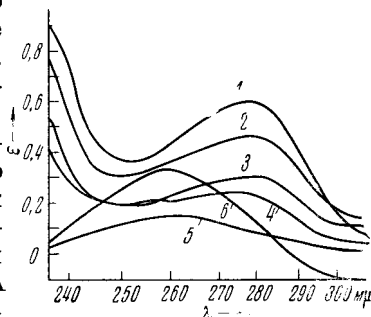


Рис. 2. У.-ф. спектры фракций ИА.

ние β -декстрина определяли по нарастанию редукции или понижению экстинкции комплексов β -декстрина с иодом. Удельную активность выражали в процентах расщепления β -декстрина на 1 мг белка. Белок определяли по Лоури.

Наши опыты показали, что при фракционировании ИА на ДЭАЕ фермент разделяется на три пика (рис. 1), два из которых, 2 и 3, резко отличаются друг от друга прежде всего по у.-ф. спектрам. Так, пик 2 содержал «белковый» компонент, имеющий максимум при E_{280} (рис. 2, 1) и соотношение $E_{280}/E_{260} = 1,65$. У.-ф. спектр компонента пика 3 имел ясно выраженный максимум при E_{260} (рис. 2, 6) и соотношение $E_{260}/E_{280} = 1,9$, т. е. представлял собой как бы компонент РНК. Между ними находятся фракции, которые имеют форму у.-ф. кривых, постепенно изменяющихся от первой к шестой фракциям. Так, фракции 2 и 3 (рис. 2) хотя и имеют максимум при E_{280} , но величина E_{280}/E_{260} у них значительно меньше, чем у фракции 1, фракция 4 характеризуется кривой с максимумом при E_{270} , а фракция 5 имеет у.-ф. спектр с ясно выраженным максимумом при E_{260} .

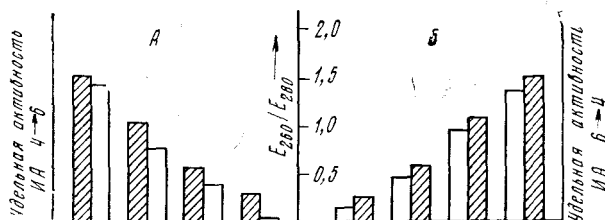


Рис. 3. Удельная активность ИА в направлениях 4→6 (А) и 6→4 (В). Белые столбики — удельная активность, заштрихованные — величины E_{260}/E_{280}

Таким образом, при фракционировании ИА на ДЕ-52 были получены фракции с разными количествами белка и РНК. Фракции пика 2 имели в своем составе большое количество белка и ничтожный процент РНК, а фракции пика 3, наоборот, характеризовались высоким содержанием РНК и небольшим количеством белка. Количество РНК в последних фракциях по отношению к белку составляло 50%, а иногда и превышало это соотношение.

Определение удельной активности показало, что фракции, содержащие большие количества РНК, были гораздо более активными, чем белковые компоненты как в прямой, так и в обратной реакциях ИА. Фракции с высоким содержанием РНК (рис. 3) в 5–6 раз больше понижали экстинкцию иодкрахмальных комплексов (реакция 4→6), чем белковые компоненты. Первые фракции вызывали примерно во столько же раз более сильное расщепление β -декстрина (реакция 6→4), чем последние. Промежуточное положение по активности занимали фракции, находящиеся между первыми и вторыми компонентами ИА по содержанию в них РНК (на рис. 3 фракции расположены по убыванию величины E_{260}/E_{280} , т. е. уменьшалось содержание в них РНК).

Эти опыты позволили нам сделать очень важное заключение о том, что РНК ИА оказывает регулирующее действие как на прямую, так и на обратную реакции ИА.

Доказательством того, что эти реакции (4←6) катализируются одним и тем же ферментом, явились опыты по электрофорезу в полиакриламидном геле фракций ИА, содержащих наибольшее количество РНК (рис. 2, 6). Как показали неоднократные опыты, подобные фракции давали лишь одну полоску при электрофорезе, т. е. были гомогенными (рис. 4).

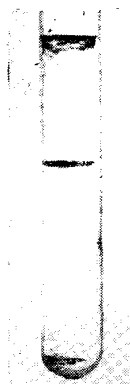


Рис. 4. Электрофорез фракции 6 в полиакриламидном геле

Таким образом, на основании представленных данных мы пришли к выводам о том, что: 1) ИА обладает обратимостью действия; 2) обе реакции — перенос части цепи α -глюкана из положения 4 в положение 6 (образование точек ветвления) и обратная реакция — находятся под контролем РНК, содержащейся в препаратах ИА.

Институт биохимии им. А. И. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Н. Петрова, ДАН, 78, 551 (1951); 86, 133 (1951); 148, 949 (1963). ² А. Н. Петрова, Р. Д. Филиппова, Биохимия, 30, 438 (1965); 31, 1079 (1966). ³ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964). ⁴ J. W. Raymond, A. L. S. Weintraub, Science, 130, 711 (1959). ⁵ Н. Н. Петрова, Т. Т. Болотина, А. Н. Кобзева, Биохимия, 26, 1002 (1961).