

Ю. Г. ЮРОВИЦКИЙ, Л. С. МИЛЬМАН

ОСОБЫЙ ТИП РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ В ООЦИТАХ И ЗАРОДЫШАХ ВЬЮНА

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 28 III 1972)

В большинстве объектов: печени, скелетных мышцах и мозгу млекопитающих (¹⁻⁴), дрожжах (⁵) и микроорганизмах (⁶) гликогенсинтаза (гликоген-1,4-глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11) существует в двух взаимопревращающихся формах. Активность одной из этих форм, которая получила название гликогенсинтазы-*b* или *D*-формы, может быть обнаружена только в присутствии глюкозо-6-фосфата (Глю-6-Ф); активность другой формы, называемой *a*-формой или *I*-формой, от присутствия Глю-6-Ф практически не зависит.

Исследования группы Херса (^{7, 8}), проведенные на печени млекопитающих, установили, что гликогенсинтаза-*a* является дефосфорилированной формой, а гликогенсинтаза-*b* — фосфорилированной формой фермента. Одновременно было показано (^{8, 9}), что фосфатаза фосфорилазы (КФ 3.1.3.17) в различных тканях превращает гликогенсинтазу-*b* в *a*-форму, т. е. в «активную» форму фермента. Киназа фосфорилазы (КФ 2.7.1.38) обеспечивает обратное превращение. Таким образом, регуляция активности ферментов-антагонистов: гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы (КФ 2.4.1.1) осуществляется системами фосфатазы и киназы фосфорилазы: процесс фосфорилирования приводит к преобладанию «активной» фосфорилазы и «неактивной» гликогенсинтазы, а процесс дефосфорилирования — к обратному соотношению.

Согласно расчетам Мерсмана (²), внутриклеточные концентрации Глю-6-Ф и уридиндифосфоглюкозы (УДФГ) слишком низки для того, чтобы обеспечить функционирование гликогенсинтазы-*b* в печени. Поэтому, по широко распространенному мнению, превращение гликогенсинтазы-*b* в *a*-форму является обязательным условием интенсивного синтеза гликогена. Однако в некоторых объектах группы Ларнера (¹⁰) и Кима (¹¹) обнаружили только *b*-форму.

В настоящей работе показано, что ооциты и зародыши вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) полностью лишены гликогенсинтазы-*a* (или *I*-формы), а ферменты, осуществляющие взаимные превращения двух форм фосфорилазы в этом объекте (¹²), не оказывают действия на гликогенсинтазу. Контроль внутриклеточной активности последней в этом объекте осуществляется через изменения концентрации УДФГ, Глю-6-Ф, АТФ, некоторых гормонов (инсулин) и через количество фермента.

Определения активности гликогенсинтазы проводили по Лелуару и Гольдemberг (¹³). Изучение кинетики ингибирования фермента проводили на частично очищенном препарате гликогенсинтазы. В качестве последнего использовали гранулярную фракцию экстракта ооцитов, осаждаемую путем центрифугирования при 144 000 *g* в течение 1 часа. Последняя содержала, примерно 90% активности фермента экстракта.

Оогенез, созревание ооцита и ранний эмбриогенез сопровождаются значительными изменениями активности гликогенсинтазы. На стадии начала вителлогенеза активность гликогенсинтазы составляет 0,42 Е на 10⁴ ооцитов, в конце вителлогенеза активность возрастает несколько более

Таблица 1

Действие инкубации на активность гликогенсинтазы в ооцитах вьюна

Условия определения	Активность гликогенсинтазы в $\mu\text{мол.}$ на 10^3 ооцитов за 5 мин.		При $1 \cdot 10^{-3}$ М Глю-6-Ф		При $1 \cdot 10^{-3}$ М Глю-6-Ф	
	без Глю-6-Ф	$1 \cdot 10^{-3}$ М Глю-6-Ф	$K_M(\text{УДФГ})$, М	характер зависимости V от (S)	$(S)_{0,5}(\text{УДФГ})$, М	характер зависимости V от (S)
Контроль	Нет	2,2	$1 \cdot 10^{-4}$	Кинетика Михаэлиса; коэффициент кооперативности $n_H = 1$	Около $5 \cdot 10^{-4}$	Кооперативная; коэффициент кооперативности $n_H = 1,5$
Инкубация с 0,01 М глюкозой 60 мин. То же с 0,01 М 2-дезоксиглюкозой То же с 0,001 М 3,5-цикл. АМФ То же с 0,2 ед. инсулина	Нет	2,2	$1 \cdot 10^{-4}$	То же	Около $5 \cdot 10^{-4}$	
	Нет	2,2	$1 \cdot 10^{-4}$	» »	Около $5 \cdot 10^{-4}$	То же
	Нет	2,2	$1 \cdot 10^{-4}$	» »	Около $5 \cdot 10^{-4}$	» »
	Нет	3,0	$1 \cdot 10^{-4}$		Около $5 \cdot 10^{-4}$	» »

Примечание. Инкубация экстрактов (гомогенатов) ооцитов с глюкозой, 2-дезоксиглюкозой, 3,5-цикл. АМФ ($0,1-1,0 \cdot 10^{-3}$ М); АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$ М) и ионами магния (так же как и изолированных неповрежденных ооцитов) не изменяла активности фермента и величины $(S)_{0,5}(\text{УДФГ})$.

чем в 10 раз ($4,8 \text{ Е}$ на 10^4 ооцитов), после чего активность фермента снижается. В периоде вителлогенеза содержание гликогена в ооцитах возрастает в 50 раз. Однако ни на одной из стадий развития мы не обнаружили активности гликогенсинтазы в отсутствие активатора (Глю-6-Ф).

При низких концентрациях активатора Глю-6-Ф ($1,25 \cdot 10^{-3}$ М) зависимость скорости реакции от концентрации субстрата носит сигмоидный характер. Более высокие концентрации Глю-6-Ф превращают эту зависимость в гиперболу Михаэлиса (рис. 1). Соответственно этому изменяется и коэффициент Хилла n_H (рис. 16). Обнаруженная зависимость напоминает регуляторные свойства гликогенсинтазы-*b* скелетных мышц (¹⁴).

Несмотря на наличие фосфатазы фосфорилазы как в ооцитах, так и в зародышах вьюна (¹²) нам не удалось наблюдать превращения гликогенсинтазы-*b* в независимую от Глю-6-Ф форму. Как было показано ранее в аналогичных опытах, фосфорилаза зародыша переходит в неактивную, латентную фосфорилазу, а последняя может быть вновь фосфорилирована посредством тканевой киназы фосфорилазы в присутствии избытка АТФ в активную форму (¹²).

Однако активация фосфатазы фосфорилазы путем инкубации изолированных ооцитов или гомогенатов с глюкозой, 2-дезоксиглюкозой (¹⁵) не оказывала действия на активность гликогенсинтазы и не изменяла величины $K_M(\text{УДФГ})$ (рис. 2, табл. 1), и, таким образом, не переводит синтазу ооцитов в «активную» форму.

Активация киназы фосфорилазы путем введения 3',5'-цикл.АМФ или путем инкубации с АТФ и ионами магния также не влияла на активность и свойства фермента (табл. 1). Стабильность гликогенсинтазы нельзя объяснить присутствием нуклеотидов или гексозофосфатов, — диализ препаратов против трис-буфера при pH 7,5 также не оказывал действия на активность синтазы или величину $K_M(\text{УДФГ})$.

В связи с этим особый интерес представляет действие инсулина на

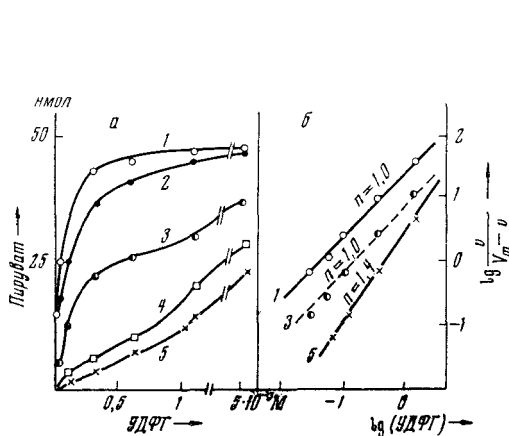


Рис. 1

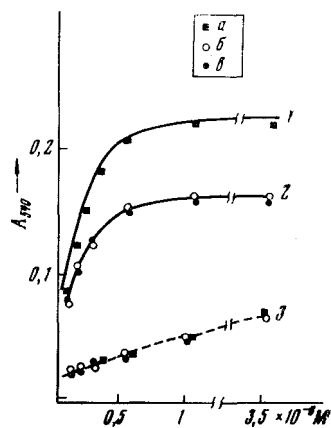


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость активности гликогенсинтазы ооцитов выюна от концентрации глюкозо-6-фосфата (а); значения коэффициента кооперативности (n_H) при различных концентрациях глюкозо-6-фосфата (б); 1— $2 \cdot 10^{-2} M$, 2— $1 \cdot 10^{-2} M$, 3— $5 \cdot 10^{-3} M$, 4— $2,5 \cdot 10^{-3} M$, 5— $1,25 \cdot 10^{-3} M$

Рис. 2. Зависимость активности гликогенсинтазы при действии инсулина и фосфатазы фосфорилата от концентрации субстрата. Активность фермента в изолированных ооцитах после инкубации с инсулином при $1 \cdot 10^{-2} M$ Глю-6-Ф (1), в контрольных партиях ооцитов при $1 \cdot 10^{-2} M$ Глю-6-Ф (2), в опытных и контрольных ооцитах при $1 \cdot 10^{-3} M$ Глю-6-Ф (3). а — ооциты после инкубации с инсулином, б — контрольные ооциты, в — гомогенаты ооцитов, подвергнутые инкубации с глюкозой или 3—4-часовому диализу

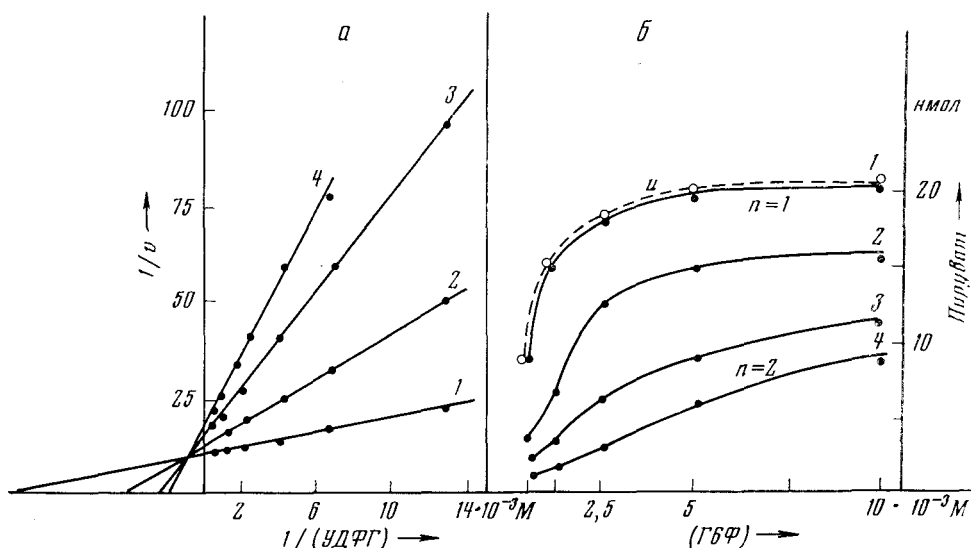


Рис. 3. Ингибирование гликогенсинтазы аденозинтрифосфатом. а — действие АТФ при $2 \cdot 10^{-2} M$ Глю-6-Ф в координатах Лайнуивера и Берка; б — при насыщающей концентрации субстрата УДФГ $4 \cdot 10^{-3} M$. Действие АТФ кооперативно по отношению к активатору Глю-6-Ф. Гликогенсинтаза ооцитов, подвергнутых инкубации с инсулином (и), не ингибируется $5 \cdot 10^{-3} M$ АТФ. 1 — контроль; 2— $1,25 \cdot 10^{-3} M$ АТФ; 3— $2,5 \cdot 10^{-3} M$ АТФ; 4— $5,0 \cdot 10^{-3} M$ АТФ

активность гликогенсинтазы. Инкубация изолированных ооцитов в растворе Рингера с 0,2 ед. инсулина на 1 мл среды в течение 1 часа повышала активность синтазы с 2,2 до 3 $\mu\text{мол}/10^3$ ооцитов в 5 мин., т. е. по меньшей мере на 35% при избытке Глю-6-Ф (рис. 2). При низких концентрациях Глю-6-Ф ($1 \cdot 10^{-3}$ М) инсулин не активировал фермента. В обоих вариантах опытов инсулин не изменял величину $(S)_{0,5(\text{УДФГ})}$ (табл. 1).

Было обнаружено, что инкубация с инсулином полностью снимает ингибирующее действие АТФ на активность гликогенсинтазы. Подобно ферменту других объектов (¹⁶), гликогенсинтаза ооцитов ингибируется АТФ (рис. 3). Кинетика ингибирования по отношению к субстрату может быть отнесена к смешанному типу ингибирования. Однако по отношению к активатору (Глю-6-Ф) наблюдается кооперативная кинетика (рис. 3б). Однако в ооцитах, подвергнутых действию инсулина, активность гликогенсинтазы не зависит от присутствия АТФ (рис. 3б).

Между тем действие инсулина на гликогенсинтазу печени или скелетных мышц млекопитающих совершенно иное. По данным Ларнера (¹⁷) и Голда (¹⁸), действие инсулина заключается в превращении гликогенсинтазы-*b* в форму *a*, т. е. в форму с большим родством к субстрату. При этом доля последней увеличивается с 1–2% до 30%, а суммарная активность обеих форм практически не изменяется (¹⁷).

В ооцитах же и зародышах вьюна, как мы предполагаем, инсулин переводит гликогенсинтазу в форму, десенсибилизированную к действию АТФ и с большей величиной V_m . Однако обе формы обладают одинаковыми величинами $(S)_{0,5(\text{УДФГ})}$, т. е. K_m , и $(A)_{0,5(\text{ГЛЮ-6-Ф})}$.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Rosell-Perez, J. Larner, *Biochemistry*, **1**, 763 (1962). ² H. J. Mersmann, H. J. Segal, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 1688 (1967). ³ R. Traut, F. Lipmann, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1213 (1963). ⁴ W. Stalmans, T. de Barsey et al., *Metabolic Interconversion of Enzymes*, 6 Konferenz Deutsch. Naturforsch. u. Ärzte, Rottach-Egern, 1971, p. 12. ⁵ L. B. Rothman, E. Cabib, *Biochemistry*, **6**, 2407 (1967). ⁶ M. Telez-Inon, H. Terenzi, H. Torres, *Biochim. et biophys. acta*, **191**, 765 (1969). ⁷ H. de Wulf, W. Stalmans, H. G. Hers, *Europ. J. Biochem.*, **6**, 545, 552 (1968); **15**, 1 (1970). ⁸ H. G. Hers, H. de Wulf, W. Stalmans, *FEBS Letters*, **12**, 73 (1970); **14**, 193 (1971). ⁹ J. Larner, F. Sanger, *J. Molec. Biol.*, **11**, 491 (1965). ¹⁰ M. Rosell-Perez, J. Larner, *Biochemistry*, **1**, 769 (1962). ¹¹ K. H. Kim, L. M. Blatt, *Biochemistry*, **8**, 3997 (1969). ¹² Л. С. Мильман, Ю. Г. Юровицкий, В сборн. Ферменты в эволюции животных, «Наука», 1969, стр. 126. ¹³ L. Lelour, S. H. Goldemberg, *J. Biol. Chem.*, **235**, 916 (1960). ¹⁴ C. Villar-Pallasi, M. Rosell-Perez, J. Larner. In: *Methods in Enzymology*, **8**, 374 (1966). ¹⁵ O. Søvic, I. Øle, M. Rosell-Perez, *Biochim. et biophys. acta*, **124**, 26 (1966). ¹⁶ R. Piras, L. B. Lochman, E. Cabib, *Biochemistry*, **7**, 56 (1967). ¹⁷ J. S. Bishop, J. Larner, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1354 (1967). ¹⁸ A. Gold, *J. Biol. Chem.*, **245**, 903 (1970).