

Ю. Г. ЮРОВИЦКИЙ, Л. С. МИЛЬМАН

**ПЕРЕНОС ГЛИКОГЕН-ФОСФОРИЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА
В БЛАСТОДЕРМУ — ОСНОВНОЙ ФАКТОР АКТИВАЦИИ
ГЛИКОГЕНОЛИЗА ПРИ РАЗВИТИИ ЗАРОДЫША**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 5 VI 1972)

Механизмы активации гликогенолиза после оплодотворения яиц костистых рыб существенно отличаются от активации этого процесса в мышцах или других органах. Усиление гликогенолиза в мышцах обязательно обусловлено переходом «неактивной» формы фосфорилазы (КФ 2.4.1.1) — фосфорилазы *b* — в «активную» фосфорилазу *a* (¹, ²). Аналогичное превращение неактивной фосфорилазы в активную форму фермента происходит также и в печени под влиянием некоторых факторов, например адреналина или глюкогона (³).

Однако, как это было показано нами ранее (⁴, ⁵), активация гликогенолиза после начала эмбрионального развития не сопровождается какими-либо изменениями активности фосфорилазы или изменениями соотношения между активной и латентной формами. Манзур (⁶) также не обнаружил активации фосфорилазы при оплодотворении и дроблении яиц морского ежа. Ооцит вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) непосредственно перед овуляцией, зрелое неоплодотворенное яйцо и интактный зародыш с момента оплодотворения и до окончания гастрюляции обладает постоянной активностью фосфорилазы. При оптимальных условиях определения последняя составляла 10 $\mu\text{мол.}$ на 10⁴ зародышей в 1 мин. На этих же стадиях развития не было найдено увеличения доли активной формы фосфорилазы. Тем не менее, после оплодотворения «включается» какой-то неизвестный механизм активации гликогенолиза. Это заключение основано на том, что при постоянной активности фосфорилазы уровень гексозо-монофосфатов (ГМФ) в зрелом неоплодотворенном яйце составляет 12 $\mu\text{мол.}$ на 100 яиц, а в зародыше на стадии бластулы он уже вдвое превышает эту величину. Необходимо отметить, что в рассматриваемом объекте полностью отсутствует гексокиназа (КФ 2.7.1.1) и свободная глюкоза (⁴, ⁵), и поэтому гликогенолиз является единственным процессом генерирования ГМФ. Скорость дыхания и гликолиза в зародыше также значительно выше, чем в неоплодотворенном яйце (⁴⁻⁶).

Казалось, что подъем уровня ГМФ после оплодотворения можно отчасти объяснить снижением скорости превращения ГМФ в рибозо-5-фосфат вследствие снижения активности ферментов ГМФ пункта (⁴, ⁵). Однако нами было показано, что в неоплодотворенных яйцах после их активации, уровень ГМФ повышается в значительно меньшей степени, чем в оплодотворенных, нормально развивающихся зародышах, несмотря на одинаковую скорость деградации глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) после оплодотворения или активации неоплодотворенного яйца (⁷).

Специальные определения (табл. 1) показали, что изолированный от желтка зародыш (бластодерма) содержит относительно небольшое (примерно $\frac{1}{10}$) количество фосфорилазы от общей активности этого фермента в интактном зародыше. Учитывая это, мы предположили, что повышение скорости гликогенолиза и связанное с ним увеличение уровня ГМФ обусловлено переносом гликоген-фосфорилазного комплекса из структур желт-

Таблица 1

Активность фосфорилазы и гликогенсинтазы и содержание гликогена и гексозомонофосфатов в раннем развитии вьюна (при 21°)

	1 час	2 часа	4 часа	6—7 час	8—9 час	12 час	17—20 час
	формирование бластодермы	дробление		бластула		гастрюла	
Активность фосфорилазы в $\mu\text{мол} \cdot 10^4/\text{мин}$							
Интактный зародыш	10,0±1,2	10,0±1,0	10,0±1,0	10,0±1,0	10,0±1,0	10,0±1,0	10,0±1,1
Изолированный от желтка зародыш	0,34±0,01	0,36±0,03	0,45±0,02	0,83±0,1	1,24±0,08	1,50±0,09	1,5±0,1
Изолированная бластодерма из неоплодотворенного активированного яйца	0,35±0,02	0,36±0,02	0,34±0,03	0,34±0,03	—	—	—
Активность гликогенсинтазы в $\mu\text{мол} \cdot 10^3/\text{мин}$							
Интактный зародыш	2,6±0,3	2,3±0,2	2,0±0,25	1,7±0,2	1,4±0,2	1,2±0,15	1,1±0,25
Изолированный от желтка зародыш	1,7±0,24	1,5±0,2	1,3±0,3	1,1±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	0,75±0,1
Изолированная бластодерма неоплодотворенного активированного яйца	1,7±0,2	1,6±0,2	—	—	—	—	—
Содержание гликогена в мг на 10^3 зародышей							
Интактный зародыш	10,6±1,0	10,2±0,7	10,0±0,9	10,9±0,9	10,2±1,2	10,5±1,1	10,8±0,1
Изолированный от желтка зародыш	3,8±0,4	3,9±0,3	4,2±0,4	5,1±0,3	6,1±0,4	6,3±0,2	6,5±0,2
Изолированная бластодерма активированного яйца	3,6±0,4	3,8±0,3	3,8±0,3	3,7±0,3	—	—	—
Содержание гексозомонофосфатов в $\mu\text{мол}$ на 100 зародышей							
Интактный зародыш	12,0±1,0	12±1,2	16±1,2	22,0±1,5	24±1,3	25±1,3	24±1,3
Изолированный от желтка зародыш	7,0±0,7	8,0±0,7	10,0±1,0	14,0±1,2	16,0±1,2	16,0±1,4	16,0±1,3
Изолированная бластодерма неоплодотворенного активированного яйца	6,0±0,8	7,0±0,7	8,0±0,9	10,0±0,8	—	—	—

ка в собственно зародыш. Для этой цели зародыши изолировали от желтка микрохирургически по Трипкаусу (8), начиная с момента формирования бластодермы на анимальном полюсе зародыша, т. е. через 1 час после оплодотворения при 21,5°. Активность фосфорилазы в изолированных зародышах определяли по скорости образования глюкозо-1-фосфата в присутствии 0,5% гликогена, 0,05 М фосфата калия (рН 7,4), 0,05 М фторида натрия, 0,001 М ЭДТА и 0,005 М АМФ. Глюкозо-1-фосфат и содержание гликогена (по глюкозе после кислотного гидролиза) определяли энзиматически (9).

Проведенные определения (табл. 1) показали значительный прирост активности фосфорилазы в изолированных зародышах, начиная со стадии 32 бластомеров (4 часа развития при 21,5°). Одновременно обнаружено увеличение содержания гликогена в бластодерме, которое практически прямо пропорционально приросту активности фосфорилазы в этой части зародыша.

Вывод о перераспределении активной формы фосфорилазы, ассоциированной с гликогеном, подтверждается следующими экспериментальными данными: 1) Увеличение активности фосфорилазы в собственно зародыше (бластодерме) со стадии 32 бластомеров (4 часа развития при 21°) нельзя объяснить синтезом фермента *de novo*, поскольку никакого прироста активности фосфорилазы в интактном зародыше (т. е. включая желток) не наблюдается (табл. 1). 2) По этой же причине прирост активности фосфорилазы в бластодерме нельзя объяснить активацией латентной формы фермента. Кроме того, специальные определения латентной фосфорилазы в присутствии 0,5 М сульфата натрия* показали наличие в бластодермах только активной формы фосфорилазы (5, 10). 3) В зародыше несомненно имеет место перераспределение гликогена, а не его синтез *de novo*, так как содержание гликогена в интактном зародыше не изменяется (табл. 1), а активность гликогенсинтетазы (КФ 2.4.1.11) после оплодотворения снижается. 4) Никаких изменений распределения фосфорилазы и гликогена в активированном неоплодотворенном яйце не происходит.

Описанный выше перенос фосфорилазы происходит в виде гликоген-фосфорилазного комплекса, отличающегося, однако, от гликосом или гликогеновых органелл, обнаруженных в печени или скелетных мышцах млекопитающих (11, 12). Гликоген зародышей может быть разделен на две фракции (табл. 2). Большую часть, около 80%, составляет гранулярный гликоген, аналогичный гранулярному гликогену печени крысы (15, 16). Однако основная активность фосфорилазы (около 90%), в отличие от нормальной печени, локализована во фракции растворимого гликогена. Применение конканавалина А**, т. е. белка, специфически и быстро осаждающего гранулярный гликоген вместе со связанными с ним ферментами синтеза и расщепления гликогена, подтвердило, что фосфорилаза преимущественно локализована во фракции растворимого гликогена. Таким образом, локализация фосфорилазы во фракции растворимого гликогена не является следствием относительно длительного фракционирования гликогена в ультрацентрифуге; результаты осаждения гликосом с помощью конканавалина А в течение 10 мин. практически совпадают с результатами выделения гликогена другими методами (табл. 2).

В отличие от фосфорилазы, гликогенсинтетаза полностью связана с гранулярным гликогеном, так же как и в печени крысы. Распределение этого фермента между различными частями зародыша постоянно (табл. 1,

* Зародыши вьюна содержат фосфорилазу, близкую по регуляторным свойствам к фосфорилазе печени (5). Латентная форма этого типа фермента вообще не обладает каталитической активностью, не активируется АМФ, но активируется 0,5 М сульфатом натрия (10).

** Препарат конканавалина А был любезно предоставлен нам проф. Е. Л. Розенфельд и М. Е. Преображенской.

Распределение активности фосфорилазы, гликогенсинтетазы и гликогена в различных фракциях цитоплазмы в бластодермах вьюна на ранних стадиях развития при 21° (в процентах от суммарной активности)

Фракции цитоплазмы	I		II		III	
	6-7 час.	20-23 час.	6-7 час.	20-23 час.	6-7 час.	20-23 час.
Фосфорилаза						
Растворимая	75	75	90	90	90	90
Осадок при 144 000 g (1 час)	25	25	10	10	10	10
Гликогенсинтетаза						
Растворимая	3	3	4	4	7	7
Осадок при 144 000 g	97	97	96	96	92	92
Гликоген						
Растворимая	15	15	30	30	20	20
Осадок при 144 000 g	85	85	70	70	80	80

Примечание. Способы фракционирования: I — в 0,05 M NaF + 0,003 M ЭДТА, II — в 0,25 M сахарозе, содержащей 0,05 M NaF и 0,003 M ЭДТА, III — при помощи конканавалина А (1,5 мг/мл).

2). В этой связи укажем, что локализация фосфорилазы вне гранулярного гликогена не связана с процессом перестройки мембранного аппарата яйца при оплодотворении. Распределение фосфорилазы между фракциями гликогена в ооците перед овуляцией — такое же, как и в развивающемся зародыше.

Процесс переноса гликоген-фосфорилазного комплекса синхронизирован во времени с переносом рибосом и рибосомоподобных частиц их желтка в бластодерму у зародыша костистых рыб. Указанный процесс у вьюна, по данным Айтхожина и др. (¹³), начинается со стадии 32 бластомеров и заканчивается перед началом гастрюляции. Несколько позднее Хагенмайер (¹⁴) и Томас (¹⁵) также пришли к выводу о наличии транспорта рибосом из желтка в зародыш. У лососевых (¹⁴) и *Branchyodanio rerio* (¹⁵) транспорт рибосом происходит на стадии бластулы и заканчивается перед гастрюляцией.

Таким образом, процесс ускорения гликогенолиза в раннем эмбриональном развитии в значительной степени обусловлен переносом гликоген-фосфорилазного комплекса из структур желтка в собственно зародыш.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
31 V 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Danforth, E. Helmreich, C. F. Cori, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 48, 1191 (1962). ² J. T. Stull, S. E. Mayer, J. Biol. Chem., 246, 5716 (1971). ³ V. T. Maddalah, N. B. Madsen, Biochim. et biophys. acta, 121, 261 (1966). ⁴ Ю. Г. Юровицкий, Л. С. Мильман, Журн. общ. биол., 30, 335 (1969). ⁵ Л. С. Мильман, Ю. Г. Юровицкий, В сборн. Ферменты в эволюции животных, «Наука», 1969, стр. 126. ⁶ J. Bergami, T. E. Mansour, Exp. Cell Res., 49, 650 (1969). ⁷ Ю. Г. Юровицкий, Л. С. Мильман, Онтогенез, 3, 109 (1972). ⁸ J. Trinkaus, Anat. Record, 115, 375 (1953). ⁹ H. U. Bergmeyer, Methoden d. enzym. Analyse, Weinheim, 1962, S. 117, 131. ¹⁰ M. Appleman, E. G. Krebs, E. H. Fisher, Biochemistry, 5, 2101 (1966). ¹¹ R. B. Scott, L. W. Cooper, Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1071 (1971). ¹² E. Helmreich, In: Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, Rottach — Egern, 1971, S. 44. ¹³ М. А. Айтхожин, Н. А. Беличина, А. С. Спирин, Биохимия, 29, 143 (1964). ¹⁴ H. E. Hagenmayer, Wilhelm Roux' Arch., 162, 19 (1969). ¹⁵ R. J. Thomas, J. Embryol. Exp. Morphol., 19, 203 (1968).