

ИЛО СИБУЛЬ, ЭЭЗИ ВАРЬЕНД

О СУБСТРАТНОМ ИНГИБИРОВАНИИ АТФ-АЗЫ АКТОМИОЗИНА ИЗ МЫШЦЫ ЛЯГУШКИ

ILO SIBUL, EESI VARJEND. Adenosintriifosfataasi substraatsest inhibeerumisest konna lihase aktomüosiinil

ILO SIBUL, EESI VARJEND. Zur Frage der ATP-ase Substrathemmung mit Actomyosin des Froschmuskels

В биоэнергетике мышечного сокращения важное место занимает АТФ-азная активность фибриллярных белков, обнаруженная В. А. Энгельгардтом и М. Н. Любимовой (Engelhardt, Ljubimova, 1939). Для исследования свойств актомиозина, как правило, используются изготовленные из мышц кролика препараты, которые, однако, относительно чувствительны к условиям как их изготовления, так и хранения. В нашем исследовании использовался нативный препарат из лягушечьей мышцы, АТФ-азная активность которого оказалась относительно стабильной и в то же время превосходно реагирующей на изменения в среде рН, на ионы магния, а также на добавление парахлормеркуробензоата.

Методика. Свежие мышцы лягушки измельчали бритвой и тщательно растирали в фарфоровой ступке. Саркоплазму экстрагировали из кашицы 0,1 М раствором КСl в соотношении 1:6 к весу свежей мышцы, после чего нерастворившийся остаток многократно промывали этим же раствором. Затем промытый остаток фибриллярного белка ставили в холодильник в 0,6 М растворе КСl в соотношении 1 : 18 к свежему весу мышцы при 5°С. На следующий день нерастворимые кусочки удаляли центрифугированием и получали прочный вязкий раствор, принятый за актомиозин.

Для определения АТФ-азной активности актомиозина пробирки заполнялись 0,4 мл препарата, 0,6 мл трис-буфера с рН 7,8 (конечная концентрация 0,05 М), 0,3 мл сульфата магния (0,015 М), 0,1 мл АТФ-динатриевой соли (2 мкмоль) и 0,3 мл дистиллированной воды. Количество неорганического фосфора по Фиске и Суббароу в модификации Лоури и Лопеса было определено после добавления 2 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты в одну пробирку до, а в другую после 30-минутной инкубации при 37°. Из полученной разницы вычисляли количество освободившегося при ферментной реакции фосфора, отражающее активность АТФ-азы в микрограммах на 1 г свежей ткани.

Результаты исследований. Исследования показали, что нативный препарат актомиозина, изготовленный из мышцы лягушки, и в частности его АТФ-азная активность, явно реагирует на изменения в среде рН и ионов магния. Оптимальный уровень активности фибриллярной АТФ-азы наблюдался в области слабощелочной реакции при рН 7,4—7,8. Как при пониженной, так и при повышенной рН среды активность явно снижалась, что свидетельствовало об одном рН максимуме, подтверждающем, что примененный нами препарат является актомиозином.

Характер субстратного ингибирования АТФ-азы актомиозина при добавлении в инкубационную среду магния или кальция: 1 — 0,12 М КСl; 2 — 0,12 М КСl + 1 мкмоль CaCl₂; 3 — 0,12 М КСl + 1 мкмоль MgSO₄.

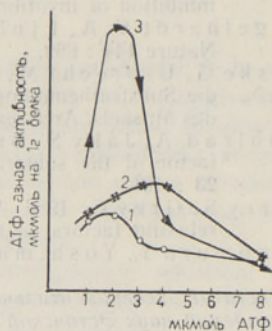
Исследования активности АТФ-азы актомиозина в зависимости от наличия в среде ионов магния и кальция показали, что при оптимальной концентрации АТФ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) только магний почти четырехкратно повышает ее (рисунок). При этом вариации концентрации магния от 1 до 15 мкмоль никаких заметных изменений активности АТФ-азы не вызывали. Ионы кальция в тех же концентрациях и ионы калия в концентрации 0,12 М приводили только к незначительной активации АТФ-азы.

Таким образом, установленные присущие нативному препарату актомиозина различные степени активирования АТФ-азы ионами свидетельствуют о том, что эффективным активатором его является магний.

Особенностью АТФ-азы фибриллярного белка лягушечьей мышцы явилось так наз. субстратное ингибирование, которое наблюдалось в особо выраженной форме в результате применения магния как активатора фермента. Из рисунка видно, что начиная с определенной оптимальной концентрации АТФ в инкубационной среде, как субстрата фермента, при дальнейшем повышении ее уровень активности АТФ-азы уже отчетливо снижался, достигая даже уровня самых низких показателей. При наличии ионов кальция оптимальная активность АТФ-азы оставалась значительно ниже, чем при наличии ионов магния, в связи с чем и кривая субстратного ингибирования оставалась не столь выраженной. Не особо выраженную динамику зависимости АТФ-азной активности от количества АТФ наблюдали и при наличии в среде только ионов калия в концентрации 0,12 М.

Описанное явление субстратного ингибирования в очень заметной форме у нативного актомиозина из лягушечьей мышцы, а также эффективное активирование АТФ-азной активности только ионами магния позволяют рекомендовать этот препарат как своеобразный объект для исследования актомиозинового комплекса. При этом следует отметить, что существующие взгляды о механизме субстратного ингибирования нередко прямо противоположно расходятся, в связи с чем этот вопрос окончательно еще не решен (Perry, Grey, 1956; Geske и др., 1957; Tomotura, Yoshimura, 1960; Viró и др., 1964).

Результаты нашего опыта, в котором изучаемый препарат до растворения в 0,6 М растворе КСl был шестикратно промыт 0,1 М раствором КСl, не показали исчезновения или заметного ослабления эффекта субстратного ингибирования по сравнению с применением однократно про-



мытого препарата. Этот факт привел нас, как и А. Мюлрада и сотрудников (Mühlrad и др., 1963) к небезынтересному выводу, что в основе механизма субстратного ингибирования лежат свойства самой молекулы актомиозина, а не оставшиеся в нем примеси расслабляющего фактора из гранул саркоплазмы.

ЛИТЕРАТУРА

- Biró N., Mühlrad A., Göbel V., Jáky S., 1962. On the mechanism of substrate inhibition of myofibrillar ATPase. *Acta Physiol. Hung.* **21** : 9.
- Engelhardt V. A., Ljubimova M. N., 1939. Myosin and adenosintriphosphatase. *Nature* **144** : 669.
- Geske G., Ulbrecht M., Weber H. H., 1957. Der Einfluß der Mg-Konzentration auf die Substrathemmung der ATP-Spaltung als angebliche Ursache der Erschlaffung des Muskels. *Arch. expl. Pathol. Pharmacol.* **230** : 301.
- Mühlrad A., Jáky S., Biró N., 1963. The independence from the presence of relaxing factor of the substrate inhibition of myofibrillar ATP-ase. *Acta Physiol. Hung.* **23** : 101.
- Perry S., Grey C., 1956. A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factors on the Mg-activated myofibrillar ATP-ase. *Biochem. J.* **64** : 184.
- Топоншурa Y., Yoshimura J., 1960. *Arch. Biochem. Biophys.* **90** : 73.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
8/VIII 1972