

РАЗДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ТРИМЕТАФОСФАТАЗЫ

И. Г. АСЛАНЯН, Г. К. ПАРСАДАНЯН, Г. Т. АДУНЦ, А. А. ГАСПАРЯН

Изучалась активность триметафосфатазы в очищенных фракциях мозга и сердца белых крыс. Выявлено 5 пиков триметафосфатазы в мозге и 8 пиков в сердечной мышце. Обнаружен ингибитор триметафосфатазы во фракциях, не обладающих триметафосфатазной активностью. Изучены некоторые физико-химические свойства ингибитора. Установлено, что последний является низкомолекулярным соединением.

Ключевые слова: неорганическая триметафосфатаза.

Процессы деградации неорганических полифосфатов в обмене веществ осуществляются разными путями. В настоящее время выявлено большое количество ферментов, принимающих участие в этих процессах. Ферменты обмена полифосфатов, в частности поли- и метафосфатазы, широко распространены как у высших растений, так и у животных. Тем не менее их роль в фосфорном обмене высших организмов пока не выяснена. В литературе описаны примеры, когда пути биосинтеза и распада неорганических полифосфатов находятся под контролем строго специфических ферментов, принципиально отличающихся друг от друга по механизму действия [11, 13, 15, 18, 19].

Одним из компонентов ферментативной системы, участвующей в модификации молекул неорганических полифосфатов, является триметафосфатаза, осуществляющая гидролиз циклического триметафосфата с выделением примерно такого же количества энергии, как и при гидролизе терминальных фосфоангидридных связей в молекуле АТФ [17]. Хотя триметафосфатаза выявлена у самых различных организмов (дрожжи, высшие растения, животные) [4], субстрат ее—триметафосфат—до сих пор ни у одной из групп организмов достоверно не обнаружен.

Ранее нами уже были изучены некоторые свойства триметафосфатазы [1—3].

Целью настоящей работы явилась частичная очистка триметафосфатазы мозга и сердца белых крыс и изучение некоторых ее свойств.

Материал и методика. В опытах использовались самцы белых крыс массой 120—140 г. Мозг и сердце животных сразу после обезглавливания помещали на лед и гомогенизировали в условиях холода в стеклянном гомогенизаторе Поттера в 0,05 М боратном буфере pH 6,2 с разведением 1/5 (в/в). Триметафосфатазу выделяли по следующей схеме. Гомогенат соответствующей ткани центрифугировали при 14,5 тыс. обо-

ротов в мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость помещали на термостатированную колонку (20×3 см) с сефадексом А-50, уравновешенную 0,05 М боратым буфером при температуре 5—6°. Элюирование белков с анионообменника осуществляли в ступенчатом градиенте ионной силы от 0,05 М до 2 М. В диапазоне 0,05—0,2 М необходимая ионная сила растворов обеспечивалась боратым буфером соответствующей концентрации, а более высокая ионная сила—добавлением КСl. Фракции белков собирали на польском коллекторе «Pzemed» типа 30 1В. Объем каждой фракции составлял 10 мл.

Активность триметафосфатазы определяли методом Берга [7], β-глицерофосфатазы—методом Боданского [8]. Инкубационная смесь во всех случаях содержала 1 мл фракции, 1,25 мл субстрата (конечная концентрация в смеси 6,6 мМ), приготовленного на 0,1 М медиаловом буфере рН 5. Реакцию останавливали после часовой инкубации при 37° 0,4%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) на холоду. Активность фосфопротеинфосфатазы (ФПФ-азы) во фракциях определяли методом Файнштейна и Фолька [12]. Инкубационная смесь содержала 2 мл 1%-ного раствора казеина на боратном буфере рН 6,2 и 1 мл соответствующей фракции, содержащей фермент. Инкубация длилась 1 час при 37°. ФПФ-азную реакцию останавливали 1 мл 30%-ного раствора ТХУ на холоду.

Во всех случаях количество неорганического фосфора определяли методом Тауски и Шора [20]. Диализ фракций, содержащих ингибитор триметафосфатазы, проводили в течение 24 ч при температуре 4° против Н₂О.

Результаты и обсуждение. Профиль элюции триметафосфатазы мозга и сердца белых крыс из колонки с анионообменной смолой свидетельствует о существовании множественных форм фермента в этих тканях (рис. 1 и 2). Основные пики триметафосфатазной активности элюировались при ионной силе буфера 0,05; 0,2 (2 пика); 0,4 и 1,0 М (мозг), и 0,05; 0,2; 0,4 (2 пика); 0,8 (3 пика) и 2 М (сердце). Максимальная удельная активность фермента в мозге наблюдалась при (пик 5) 1,2 М—4,2 Е/А₂₈₀, в сердце—20 Е/А₂₈₀ (пик 2) при 0,2 М. Различия в профиле элюции пиков триметафосфатазы мозга и сердца крыс свидетельствуют о наличии индивидуальных форм триметафосфатазы в различных тканях животного.

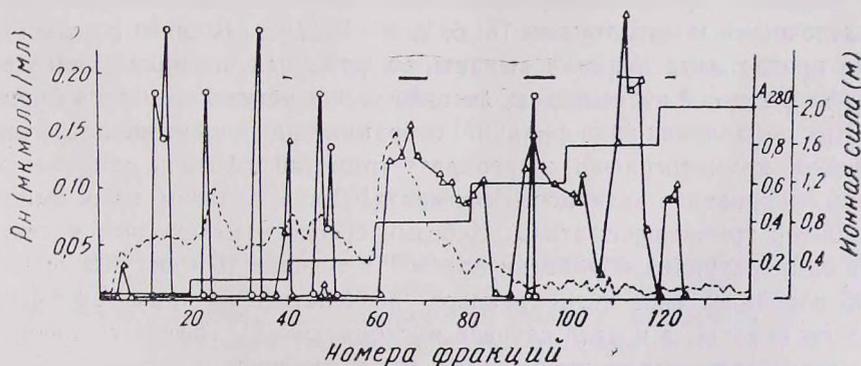


Рис. 1. Ионообменная хроматография на сефадексе G-50 А триметафосфатазы и ФПФ-азы мозга белых крыс. 1. — — — белок (А₂₈₀), 2. о — триметафосфатаза, 3. Δ — ФПФ-аза.

Так как дефосфорилирование фосфоэфиров может осуществляться и такими фосфатазами, как неспецифическая кислая фосфатаза и ФПФ-аза, действующими в кислом диапазоне рН, было сочтено целесообраз-

ным исследовать распределение активности этих ферментов в тех же фракциях. Профиль элюции кислой фосфатазы не совпадает с таковым триметафосфатазы. То же можно сказать и о ФПФ-азе. Из пяти пиков, обладающих триметафосфатазной активностью, лишь один (5) совпадал с пиком ФПФ-азной активности.

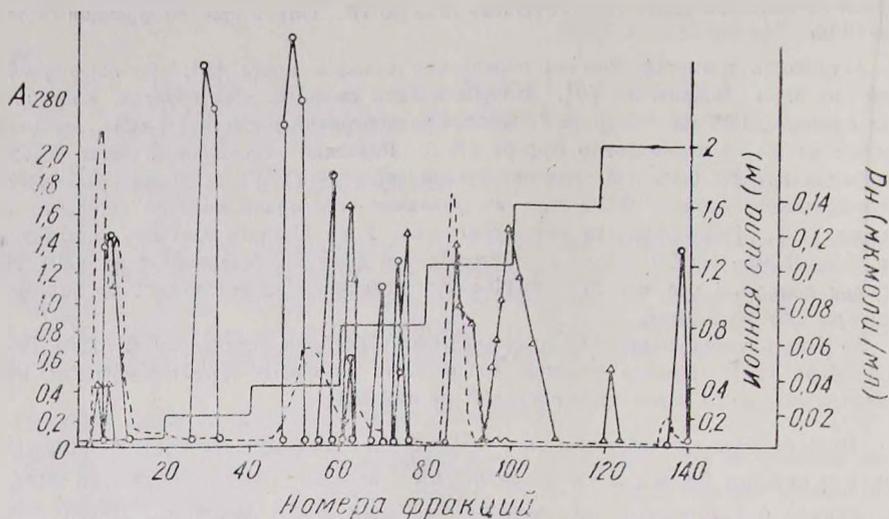


Рис. 2. Ионнообменная хроматография на сефадексе G-50 A триметафосфатазы и ФПФ-азы сердца белых крыс. Обозначения те же.

Пики триметафосфатазы не дефосфорилировали и β -глицерофосфат, что свидетельствовало об их субстратной специфичности.

В имеющейся литературе отсутствуют сведения о специфических механизмах внутриклеточной регуляции неорганической триметафосфатазы. В то же время имеются сведения о том, что активность ряда других фосфатаз (фосфатаза-фосфорилазы, ФПФ-аза) регулируется внутриклеточными модуляторами [5, 6, 9, 10, 14, 16]. В связи с этим нами была предпринята попытка выявить во фракциях, не обладающих триметафосфатазной активностью, специфические регуляторы этого фермента. При добавлении ряда фракций, собранных на коллекторе после ионнообменной хроматографии, к препарату триметафосфатазы отмечено резкое ингибирование активности фермента. Таким образом, нами выявлен ингибитор триметафосфатазы. Небезынтересно отметить, что в результате температурной обработки при 90° в течение 10 мин большинство проб сохраняет свое ингибирующее воздействие на триметафосфатазную активность, а в ряде случаев ингибирующий эффект усиливается, и только некоторые из проб теряют эту способность.

Для уточнения особенностей ингибитора триметафосфатазы нами произведен диализ его препаратов в течение 24 ч на холоду. Как показали результаты исследований, ингибирующий эффект проб после диализа полностью исчезал, что свидетельствует о низкомолекулярной природе некоторых фракций, проявляющих ингибиторные свойства. Пре-

параты ингибитора не отличались стабильностью при хранении на холоду и к 9-му дню теряли значительную часть своей активности.

Таким образом, установлен факт существования внутриклеточных регуляторов триметафосфатазной активности, отличающихся друг от друга по некоторым физико-химическим параметрам.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 16.11 1981 г.

ԱՆՈՐԳԱՆԱԿԱՆ ՏՐԻՄԵՏԱՖՈՍՓԱՏԱԶԱՋԱՅԻ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱ ՄԻ ՔԱՆԻ ՀԱՏԿԱՆԻՇՆԵՐԸ

Ի. Գ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Գ. Կ. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ, Ա. Ա. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ

Աստամնասիրվել է տրիմետաֆոսֆատազայի ակտիվությունը սպիտակ առնետների ուղեղի և սրտամկանի մաքրված ֆրակցիաներում: Հայտնաբերվել է տրիմետաֆոսֆատազայի 5 պիկ՝ ուղեղում և 8-ը՝ սրտամկանում: Ֆրակցիաներում, որոնք օժտված չեն տրիմետաֆոսֆատազային ակտիվությամբ, հայտնաբերվել է ինհիբիտոր:

Աստամնասիրվել է այդ ինհիբիտորի մի շարք ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները: Պարզվել է, որ այն ցածրամոլեկուլյար միացություն է:

RECOVERY AND PROPERTIES OF INORGANIC TRIMETAPHOSPHATASE

I. G. ASLANYAN, H. K. PARSDANYAN, G. T. ADJUNZ, A. A. GASPARYAN

The activity of trimetaphosphatase in the purified fractions of rat brain and heart has been studied. 5 separate peaks of trimetaphosphatase have been revealed in brain and 8 — in heart muscle extracts. The inhibitor of trimetaphosphatase has been obtained in fractions that did not exhibit trimetaphosphatase activity. Some physico-chemical properties of inhibitor have been studied. The inhibitor has been established to be a low molecular compound.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асланян И. Г., Адунц Г. Т., Гаспарян А. А. Биолог. ж. Армении, 31, 6, 1978.
2. Асланян И. Г., Адунц Г. Т., Гаспарян А. А. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 1979.
3. Асланян И. Г., Адунц Г. Т., Гаспарян А. А. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1979.
4. Кулиев И. С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов. М., 1975.
5. Парсаданян Г. К., Гергей Л., Бот Г. Биолог. ж. Армении, 30, 12, 1977.
6. Парсаданян Г. К., Тер-Татевосян Л. П., Адунц Г. Т. Циклические нуклеотиды, Тез. доклада III Всесоюз. симпозиума, 93, Канев, 1980.
7. Berg G. Cell. Comparativ Physiol, 45, 3, 435, 1955.
8. Bodansky P. JBC, 93, 101, 1933.
9. Brandt H., Lee E. Y. C., Killiea S. D. B. B Res. Comm. 62, 4, 951—953, 1975.

10. *Defrein G. J. Goris, Merlevedew 11-th FEBS meeting Abstr. A 1—9, 102, Copenhagen, 1977.*
11. *Harold R. L. and Harold F. M. J. Gen Microbiol. 31, 241, 1963.*
12. *Feinstein R. N., Folk M. E. J. Biol. Chem., 177, 339, 1949*
13. *Harold F. M. and Harold R. L. J. Bacteriol., 89, 1262, 1965.*
14. *Hung F. L., Dlinsman W. FEBS Lett, 62, 3, 326—329, 1976.*
15. *Hughes D. E., Muhamed A. In book: „Acides Ribonucleiques et poliphosphates Structure, sintese et fonctions., Coll. Yntern. CNRS. Strasbourg, 106, 591, Ed. CNRS, Paris. 1962.*
16. *Khandelwal R. L., Zinman S. M. B. B. Res. Comm., 82, 4, 1340—1345, 1978.*
17. *Mejerhof O., Shates H., Kaplan Biochim. biophys. Acta, 12, 121, 1953.*
18. *Muhamed A. Biochim. Biophys. Acta, 54, 121, 1961.*
19. *Muhamed A., Rodgers A., Hughes D. E. J. Gen. Microbiol., 20, 482, 1959.*
20. *Taussky H. H., Shorr E. JBC., 202, 675, 1953.*