

ЦИКЛИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ АКТОМИОЗИНОВОЙ АТФазы

А. Е. БУКАТИНА, В. И. ДЕЩЕРЕВСКИЙ

Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино (Московская область)

В данной работе рассмотрены некоторые биохимические свойства актомиозиновых систем в предположении, что ферментативный акт гидролиза АТФ является следствием полного цикла взаимодействия актина и миозина, и, следовательно, АТФ-азная активность актомиозинового типа не может быть приписана ни одной из отдельных стадий цикла (например, ассоциированному состоянию актина и миозина). Показано, что на основании такого предположения возможно определение существенных кинетических параметров взаимодействия актина и миозина по кинетике гидролиза АТФ. Эти кинетические параметры (константы скоростей процессов взаимодействия актина и миозина) определены из имеющихся в литературе данных. Сопоставление соответствующих параметров для растворов мышечных белков и интактной мышцы позволяет оценить роль структурной надмолекулярной организации в элементарном механо-химическом акте.

Прямым следствием скольжения нитей при сокращении поперечнополосатой мышцы является представление о том, что в процессе сокращения мышцы поперечные мостики должны работать циклически — замыкаться и размыкаться. Поэтому элементарным сократительным актом следует считать цикл взаимодействия одного миозинового мостика с актином. Так как энергопродукция мышцы возрастает во время ее укорочения, т. е. при увеличении числа элементарных сократительных актов, то можно считать, что определенное число молекул АТФ гидролизуются в ходе каждого цикла взаимодействия актина и миозина [12].

Естественно предположить, что основные закономерности ферментативной кинетики расщепления АТФ растворами мышечных белков также определяются циклическим характером взаимодействия актина и миозина. Подобное предположение было высказано А. Г. Сцент-Дьердьи еще в 1968 г. [3], однако при количественном описании кинетики гидролиза АТФ эти представления до сих пор не используются, а актин рассматривается как аллостерический регулятор, увеличивающий активность миозина [4—6].

В данной работе рассматриваются некоторые энзиматические свойства актомиозиновых систем в предположении, что ферментативный акт гидролиза АТФ является следствием полного цикла взаимодействия актина и миозина и, следовательно, АТФазная активность актомиозинового типа не может быть приписана ни одной из отдельных стадий цикла (например, ассоциированному состоянию актина и миозина).

Элементарный механохимический цикл мышечных белков состоит из большого числа стадий взаимодействия актина и миозина с низкомолекулярными компонентами и друг с другом. В аналитических целях необходимо выделить существенные стадии этого цикла, причем «существенность» может определяться по различным признакам.

Актомиозиновые системы в зависимости от состояния миозина можно разделить на два основных типа: I — структурированные системы и II — неструктурированные.

К системам I типа относятся все системы, в которых миозин, как и в мышце, организован в нити. Это актомиозин при ионных силах $< 0,3$, миофибриллы, глицеринизированные волокна, интактные мышцы. К системам II типа относятся системы, в которых миозин существует в виде отдельных молекул. Это актомиозин при ионных силах $> 0,3$, акто-ТММ, акто-субфрагмент-I.

Для всех структурированных систем по аналогии с поперечнополосатой мышцей [7, 8] можно ввести цикл из трех существенных состояний.



где α — концентрация свободного миозина, n и m — два различных конформационных состояния актомиозинового комплекса — «устойчивое» и «напряженное» («неустойчивое»), т. е. $K_2 \gg K'$. Переход между этими состояниями, аналогичными «тянущему» и «тормозящему» состояниям миозинового мостика [7], осуществляется вследствие относительного движения актиновых и миозиновых нитей со скоростью V (δ — величина структурной перестройки).

В структурированных системах процесс образования связи между актином и миозином подчиняется мономолекулярной кинетике, так как около свободного миозинового центра может находиться только не связанный с миозином актиновый центр [7]. Поэтому в цикл (*) не входит концентрация актина.

Для неструктурированных систем состояние m отсутствует, а концентрация актина существенна. Следовательно, для этих систем цикл имеет вид:



где β — концентрация свободного актина.

В циклах (*) и (**) введены только существенные состояния, и очевидно, что переходы между этими состояниями включают целый ряд элементарных процессов. Поэтому константы скоростей переходов заведомо не являются элементарными.

Считая, что в каждом цикле гидролизуется строго определенное число молекул АТФ (Z), получим стационарную скорость циклической (актомиозиновой) АТФазы в виде:

$$\dot{S}_{\text{ц}} = NZ, \quad (1)$$

где N — частота актов взаимодействия актина и миозина.

При этом для цикла (*)

$$\dot{S}_{\text{ц}}^* = \frac{K_1 \left(K' + K_2 \frac{V}{V_{\text{max}}} \right)}{K_1 + K' + (K_1 + K_2) \frac{V}{V_{\text{max}}}} \alpha_0 Z, \quad (2)$$

и для цикла (**)

$$\dot{S}_{\text{ц}}^{**} = K'/2 \left(\alpha_0 + \beta_0 + K'/K_1 - \sqrt{(\alpha_0 + \beta_0 + K'/K_1)^2 - 4\alpha_0\beta_0} \right) \cdot Z, \quad (3)$$

где α_0 и β_0 — полные концентрации миозина и актина соответственно, V — скорость взаимного движения миозиновых и актиновых нитей, V_{max} — максимальная скорость взаимного движения активных и миозиновых нитей [7].

Полная скорость гидролиза АТФ (\dot{S}) в актомиозиновых системах является суммой циклической и миозиновой АТФаз

$$\dot{S} = \dot{S}_c + \alpha_0 \dot{s}_a, \quad (4)$$

где \dot{s}_a — удельная АТФазная активность свободного миозина.

Формула (2) описывает АТФазную кинетику структурированных актомиозиновых систем как функцию скорости относительного движения актиновых и миозиновых нитей.

Из (2) следует, что при $V=0$

$$\dot{S}_c^* = \frac{K_1}{K_1 + K'} \alpha_0 K' Z. \quad (5)$$

Формула (5) описывает кинетику АТФазной реакции актомиозина, миофибрилл и мышечных волокон при условии отсутствия в них механических изменений в процессе гидролиза АТФ. В нативной мышце в условиях максимальной активации $K' \ll K_2$, а $K_1 \approx K_2$ [8]. В этих условиях АТФазная активность сократительного аппарата мышц, как вытекает из (2), должна быть тем выше, чем больше скорость сокращения, что согласуется с данными по энергопродукции мышцы [9]. Аналогичным механизмом, по-видимому, объясняется повышенная АТФазная активность миофибрилл [10, 11] и актомиозина [12] в первый период после начала АТФазной реакции, сопровождающийся механическими изменениями этих систем (укорочение миофибрилл, суперпреципитация актомиозина). Кроме того, механически равновесное состояние структурированной актомиозиновой системы должно быть аналогично суперсокращенному состоянию саркомера в следующем смысле: механическое равновесие в такой системе наступает тогда, когда активная движущая сила, пропорциональная числу контактов между данной актиновой и миозиновой нитями, оказывается скомпенсированной встречными упругими силами, возникающими при сминании неперекрывающихся концов нитей. Очевидно, что число актомиозиновых контактов в этом состоянии должно быть меньше, чем в исходной случайно перемешанной, а возможно, в определенной мере ориентированной ван-дер-ваальсовыми и электростатическими силами системе актиновых и миозиновых нитей. Это явление также может быть ответственно за снижение стационарной скорости АТФазы по сравнению с нестационарной в структурированных системах.

Формула (3) описывает стационарную циклическую АТФазу «неструктурированных» актомиозиновых систем. При сильно различающихся концентрациях актина и миозина она упрощается. С учетом АТФазной активности свободного миозина получим:

при $\alpha_0 \gg \beta_0$

$$\dot{S} = \frac{\alpha_0 K_1}{\alpha_0 K_1 + K'} \beta_0 K' Z + \alpha_0 \dot{s}_a, \quad (6)$$

при $\beta_0 \gg \alpha_0$

$$\dot{S} = \frac{\beta_0 K_1}{\beta_0 K_1 + K'} \alpha_0 K' Z + \frac{K'}{\beta_0 K_1 + K'} \alpha_0 \dot{s}_a. \quad (7)$$

Удельная АТФазная активность актомиозиновой системы (\dot{s}) в последнем случае в расчете на миозин равна:

$$\dot{s} = \frac{\beta_0 K_1}{\beta_0 K_1 + K'} K' Z + \frac{K'}{\beta_0 K_1 + K'} \dot{s}_a. \quad (8)$$

Из (8) следует, что при $\beta_0 \rightarrow \infty$, $\dot{s} \rightarrow \dot{s}_\infty$ и

$$\dot{s}_\infty = K' Z. \quad (8^*)$$

$$\dot{s} - \dot{s}_\alpha = \frac{\beta_0 K_1}{\beta_0 K_1 + K'} (K'Z - \dot{s}_\alpha), \quad (9)$$

то актин будет активировать АТФазную активность миозина при $K'Z > \dot{s}_\alpha$ и ингибировать ее при $K'Z < \dot{s}_\alpha$. Известно, что при низких концентрациях Mg^{++} актин ингибирует АТФазную активность ТММ [5]. Поскольку предполагается [13], что для распада актомиозинового комплекса необходим $Mg - АТФ$, то уменьшение $[Mg^{++}]$ приведет к уменьшению K' . Поэтому в этой схеме ингибирование АТФазной активности миозина актином получает простое объяснение.

Из формулы (9) следует линейная зависимость $1/(\dot{s} - \dot{s}_\alpha)$ от $1/\beta_0$:

$$\frac{1}{\dot{s} - \dot{s}_\alpha} = \frac{K_{\text{дис}}}{K'Z - \dot{s}_\alpha} \frac{1}{\beta_0} + \frac{1}{K'Z - \dot{s}_\alpha}, \quad (10)$$

где $K_{\text{дис}} = K'/K_1$.

При сильной активации миозиновой АТФазы актином, т. е. при $K'Z \gg \dot{s}_\alpha$ (10) переходит в (11):

$$\frac{1}{\dot{s}} = \frac{K_{\text{дис}}}{K'Z} \frac{1}{\beta_0} + \frac{1}{K'Z}. \quad (11)$$

Поскольку в эксперименте наблюдаются такие линейные зависимости [4—6], метод обратных координат позволил нам определить численные значения констант предлагаемой схемы (см. рисунок).

При вычислениях были приняты молекулярные веса для ТММ — 350 000, для актина — 46 000 [5], $Z=1$. Из работы [4] вычислены K' и K_1 при различных концентрациях АТФ (см. табл. 1). Видно, что увеличение концентрации АТФ от 1,8 до 10 *мкм* увеличивает K' и не влияет на K_1 . Следовательно, константа диссоциации актомиозинового комплекса под действием АТФ при больших концентрациях Ca^{++} [4, рис. 6] определяется влиянием АТФ только на процесс распада комплекса. Увеличение скорости гидролиза АТФ при повышении $[АТФ]$ [4, рис. 6] с точки зрения предложенной схемы является следствием увеличения скорости распада комплекса.

Интересные выводы позволяет получить анализ температурной зависимости активации ТММ актином. В работе [6] показана сильная температурная активация АТФазы при концентрации актина $\beta_0 \rightarrow \infty$. Поскольку $\dot{s}_\infty = K'Z$ (8*), это означает высокую энергию активации процесса диссоциации акто-ТММ под действием АТФ (~ 28 ккал/моль). Интересно отметить, что величина константы скорости этого процесса не зависит от ионной силы [5, рис. 1], а его энергия активации не меняется при изменении температуры от 5 до 30° С и ионной силы от 0,017 до 0,045 [6]. В то же время логарифм равновесной константы диссоциации (K'/K_1) зависит от температуры нелинейно, и эта зависимость изменяется при изменении ионной силы [6, рис. 3]. Это указывает на сложность процесса ассоциации и на зависимость его параметров от ионной силы. Уменьшение константы скорости ассоциации (K_1) и увеличение средней энергии активации этой константы с ростом ионной силы видно из табл. 2.

Устойчивость константы K' к внешним воздействиям, по-видимому, свидетельствует об относительной простоте процесса диссоциации ком-

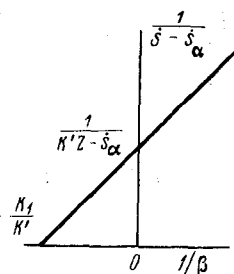


Иллюстрация способа определения кинетических констант схемы из зависимости скорости гидролиза АТФ от концентрации актина. Обозначения см. в тексте

плекса под действием АТФ (см. табл. 1) по сравнению с процессом ассоциации.

Таким образом, можно предполагать, что диссоциация акто-ТММ является одноступенчатым высокобарьерным процессом.

Диссоциация актомиозинового комплекса в структурированных системах может иметь значительно меньший барьер в условиях, когда возможны относительные перемещения миозиновых и актиновых нитей, так как в этих условиях возможно использование энергии гидролиза АТФ на одном активном центре для создания «напряженной» конформации (см. схему (*)) на другом центре ассоциации [7]. Действительно, энергия активации процесса диссоциации «напряженного» состояния актомиозинового комплекса, определяемая из зависимости максимальной скорости сокращения мышцы ($V_{\max} = K_2 \delta$) [7] от температуры [9] равна 13 ккал/моль, что значительно меньше энергии активации процесса диссоциации «устойчивого» состояния этого комплекса.

Снижение барьера для процесса диссоциации комплекса, ускорение этого процесса при деформации комплекса вследствие относительного перемещения актиновых и миозиновых нитей имеет, по-видимому, важное значение для функционирования сократительного аппарата мышц.

Таблица 1

Зависимость K_1 , K' и $K_{\text{дис}}$ от концентрации АТФ.
Вычисления приведены по [4, рис. 6]

АТФ (мкМ)	K' , сек ⁻¹	$K_1 \cdot 10^5$ моль ⁻¹ сек ⁻¹	$K_{\text{дис}} \cdot 10^5$ моль
1,8	5,8	3,0	1,9
2,5	7,4	3,0	2,5
4,0	10,0	3,0	3,4
10,0	14,8	3,0	5,0

Таблица 2

Зависимость константы скорости процесса ассоциации актина и миозина (K_1) и его средней энергии активации (E_1) от ионной силы. Вычисления проведены по данным [6, рис. 2 и рис. 3] для 15° С. При этом константа скорости процесса диссоциации актина и миозина (K') и его энергия активации (E') не зависят от ионной силы и равны 7,4 сек⁻¹ и 28 ккал/моль соответственно

Ионная сила	0,017	0,027	0,036	0,045
$K_1, 10^5 \cdot$ моль ⁻¹ сек ⁻¹	11,7	4,2	1,7	1,0
E_1 , ккал/моль	19,0	22,0	26,0	27,0

Этот механизм увеличивает коэффициент полезного действия при трансформации энергии гидролиза АТФ в механическую работу, поскольку он делает маловероятным размыкание поперечного мостика до завершения активной конформационной перестройки актомиозинового комплекса, являющейся источником движущей силы.

Предложенный механизм, согласно которому ферментативный акт гидролиза АТФ требует полного цикла взаимодействия актина и миозина, не противоречит экспериментальным данным и дает простое объяснение ряду явлений (ингибирование актином при низких $[Mg^{++}]$, одновременное увеличение скорости гидролиза АТФ и константы диссоциации актомиозинового комплекса при повышении $[АТФ]$ [4] или температуры [6]).

Однако все эти явления могут быть интерпретированы и в рамках традиционных представлений [4—6]. Действительно, если высокой ферментативной активностью обладает комплекс актомиозина, то стационарная скорость гидролиза АТФ выражается следующим образом:

$$\dot{s} = \frac{n}{\alpha_0} \dot{s}_n + \frac{\alpha}{\alpha_0} \dot{s}_a = \frac{\beta_0 K_1}{\beta_0 K_1 + K'} \dot{s}_n + \frac{K'}{\beta_0 K_1 + K'} \dot{s}_a, \quad (12)$$

где \dot{s}_n — скорость гидролиза АТФ стабильным комплексом актомиозина.

Из сравнения (12) с (8) видно, что они эквивалентны при $K'Z = \dot{s}_n$.

Поэтому в рамках стационарной кинетики эти схемы неразличимы. Исследование определенных нестационарных, режимов, вероятно, дает возможность исключить один из этих механизмов.

Итак, можно считать, что применение предложенной схемы к описанию ферментативных свойств актомиозиновых систем правомерно, хотя пока не доказана ее единственность. Достоинством развиваемого подхода является его общность: сократительные, энергетические и биохимические свойства интактных и экстрагированных мышц и мышечных белков рассматриваются с единой точки зрения.

Исследование зависимостей констант скоростей ассоциации и диссоциации актомиозинового комплекса от физико-химических условий поможет выяснить детальную структуру элементарного механо-химического цикла.

* * *

Авторы благодарны С. Э. Шнолю за ценные дискуссии и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hanson J., Huxley H. E., Symp. Soc. Exptl. Biol., **9**, 228, 1955.
2. Huxley A. F. Progr. Biophys. biophys. Chem., **7**, 255, 1957.
3. Szent-Györgyi A. G., in «Aspects of Cell Motility» (Symp. Soc. Exptl. Biol.), p. 17, Cambridge, Univ. Press., 1968.
4. Eisenberg E., Moos C. J. Biol. Chem., **245**, 2451, 1970.
5. Rizzino A. A., Barouch W. W., Eisenberg E., Moos C., Biochemistry, **9**, 2402, 1970.
6. Barouch W. W., Moos C., Biochim et biophys. acta., **234**, 138, 1971.
7. Deshcherevskii V. J., Biorheology, **7**, 147, 1971.
8. Дещеревский В. И., В сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», **2**, 11, Пушкино, 1971.
9. Hill A. V., Proc. Roy. Soc., **B126**, 136, 1938.
10. Weber A., Hasselbach W., Biochim. et biophys. acta, **15**, 237, 1954.
11. Tonomura Y., Kitagawa S., Biochim. et biophys. acta, **26**, 15, 1957.
12. Jasui T., Watanabe S., J. Biol. Chem., **240**, 98, 1965.
13. Muhlrad A., Kovacs H., Hegyi G., Biochim. et biophys. acta, **107**, 567, 1965.

Поступила в редакцию
22.VII.1971

CYCLIC ACTION OF ACTOMYOSIN ATPase

A. E. BUKATINA, V. I. DESHCHEREVSKY

Institute of Biological Physics, Ac. Sci. USSR, Pushchino (Moscow region)

Enzymatic properties of actomyosin systems are regarded quantitatively in terms of myosin-actin interaction cycle. It is assumed, that each cycle of myosin-actin association — dissociation is coupled with the hydrolysis of one or two ATP molecules: so that the enzymatic activity is the property of the whole cycle, but not any of its single stage, for example the stage of myosin-actin association. Two kinds of actomyosin systems are under the consideration: «structured» ones, in which myosin molecules are organized in the «thick filaments», and unstructured, in which myosin has no quarternery structure. For the first type system (actomyosin suspensions at low ionic strength, myofibrils, glycerinated fibres) the elementary mechanochemical cycle has three significant states, for the «unstructured» systems (actomyosin solutions at high ionic strength, acto-HMM, acto-S₁) the elementary cycle consists of the two significant states. Activation and inhibition (under low Mg⁺⁺ concentration) of myosin ATPase by actin, the rising of actomyosin ATPase coupled with increasing of the dissociation of the actomyosin complex can be naturally understood in terms of this model; its parameters being determined from the experimental data available. However it can't be proved at present that this model is one and only. It is worthy that the contractile and enzymatic properties of muscle and muscle proteins are regarded from the joint point of view.