

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
НАУЧНЫЙ СОВЕТ
ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

БИОФИЗИКА
И
БИОХИМИЯ
МЫШЕЧНОГО
СОКРАЩЕНИЯ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА» МОСКВА 1976

летных мышцах снижается уровень МП и величины ПД (рис. 5) при соответствующем снижении содержания суммарного белка в мышцах до 18—16 г%. Постепенно скелетные мышцы теряют способность реализовывать 2-ю форму избыточного анаболизма, которая нами оценивалась по выраженности начального расслабления, следовой гиперполяризации и гиперрелаксации, что приводило к снижению ПР мышц. Снижение двигательной активности при старении приводит к постепенной атрофии скелетных мышц и, следовательно, к падению относительной величины общей мышечной массы (до 34—38%).

Л и т е р а т у р а

1. I. Prigogin, J. M. Weame.— *Experientia*, 1946, 2, 11, 451.
2. И. Пригожин.— В кн.: Возникновение жизни на Земле. М., Изд-во АН СССР, 1959, с. 408.
3. И. А. Аршавский.— *Ж. эволюц. биохим. и физиол.*, 1966, 2, 511.
4. И. А. Аршавский.— *Очерки по возрастной физиологии*. М., «Медицина», 1967.
5. И. А. Аршавский.— *Усп. физiol. наук*, 1971, 2, 100.
6. В. П. Скулчев.— *Трансформация энергии в биомембранах*. М., «Наука», 1972.
7. И. И. Иванов, В. А. Юрьев.— *Биохимия и патобиохимия мышц*. Л., Медгиз, 1961.
8. И. И. Иванов, Ю. Ю. Кееринг, В. И. Брагин.— *Ж. эволюц. биохим. и физиол.*, 1967, 3, 193.
9. S. Schiaffino, A. Margaret.— *J. Cell Biol.*, 1969, 41, 855.
10. D. L. Holland, S. V. Perry.— *Biochem. J.*, 1969, 114, 161.
11. M. Szabolcs, A. Köver, L. Kovacs.— *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. Hung.*, 1967, 2, 409.
12. Н. В. Даринский.— *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1973, 9, 19.

МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

В. И. ДЕЩЕРЕВСКИЙ

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

В последние годы достигнут определенный прогресс в понимании молекулярного механизма, регулирующего сокращение мышц. Выявлены белковый состав регуляторного комплекса, роль отдельных компонент [1] и даже геометрия конформационной перестройки, индуцируемой кальцием [2, 3]. В результате этих структурных по своей сути исследований была сформулирована механическая модель, согласно которой тропомиозиновый тяж в отсутствие кальция стерически блокирует актиновые центры. Когда же тропоин связывает кальций, тяж сдвигается и уже не препятствует взаимодействию актина с миозином. Эта модель

чрезвычайно привлекательна своей простотой, однако при исследовании кинетики гидролиза АТФ актомиозиновыми (АМ) системами, содержащими регуляторные белки, были обнаружены факты, которые не укладываются в столь простую схему.

В работах [4, 5] показано, что: 1) кооперативный характер кинетики гидролиза сохраняется и в том случае, когда используется одноцентровый фрагмент молекулы миозина (S1); 2) при низкой концентрации субстрата ($Mg - АТФ$) система полностью активирована даже в отсутствие кальция; 3) даже избыток кальция не способен полностью предотвратить субстратное ингибирование, а лишь сдвигает его в область более высоких концентраций субстрата. Если эти факты интерпретировать в терминах механической модели, о которой говорилось выше, то из них следует, что, во-первых, смещение тропомиозина может происходить и без участия кальция и, во-вторых, кальций сам по себе не способен вызвать смещение тропомиозинового тяжа, достаточное для полного освобождения актиновых центров.

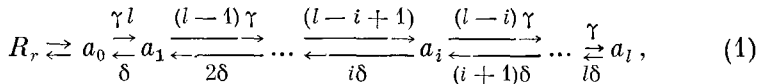
Для объяснения кинетических экспериментов Бремелю и сотрудникам [5] пришлось постулировать сложную картину взаимодействия белков в тонких нитях, резко контрастирующую с простотой механической модели. В настоящей работе предлагается простая и естественная с физической точки зрения модификация этой модели, которая позволяет рассчитывать ферментативную и сократительную активности мышечных белков (и эти расчеты согласуются с известными экспериментальными данными) и не противоречит результатам структурных исследований.

Суть ее заключается в признании того факта, что белковые макромолекулы, в частности молекулы тропомиозина, являются микрообъектами и вследствие этого подвержены тепловым флуктуациям. Поэтому те два положения тропомиозинового тяжа, которые он занимает в присутствии и в отсутствие кальция, не являются строго фиксированными. Эти положения являются равновесными, и тропомиозин проводит в них большую часть времени (поэтому они и выявляются при рентгеновском исследовании), но в результате флуктуаций тропомиозиновый тяж может смещаться из равновесных положений.

Модель основана на двух предположениях: первое — актиновые центры открыты для взаимодействия с миозином («включены») только во время флуктуационного смещения тропомиозинового тяжа в равновесное положение, и второе — все соседние актиновые центры, которыми управляет один и тот же тропонин — тропомиозиновый комплекс, оказываются включенными, независимо от того, связан с тропонином кальций или нет.

Будем считать, что тонкая нить состоит из независимых функциональных единиц (ФЕ) [4], каждая из которых содержит l актиновых (А) центров, управляемых одним тропонином — тропомиозиновым комплексом (l обычно считается равным 7 [4]). Наша модель приводит к линейной кинетической диаграмме переходов

ФЕ между $(l + 2)$ состояниями:



где R — это релаксированное состояние ФЕ, в котором все А-центры выключены. В результате флуктуации ФЕ переходит в состояние a_0 , в котором все А-центры включены, но ни один еще не связан с миозином. Вероятность этого перехода тем больше, чем меньше величина Са-зависимой константы ингибирования r . Если к ФЕ в состоянии a_0 присоединяется S1, то она переходит в состояние a_1 , в котором все А-центры включены и один из них связан с миозиновой головой. Поскольку в состоянии a_0 все l А-центров свободны, то константа скорости перехода в a_1 будет в l раз больше, чем γ -константа скорости присоединения S1 к одному А-центру. Эта последняя константа отражает бимолекулярный процесс и потому должна быть пропорциональна концентрации свободных миозиновых голов [M]:

$$\gamma = K_1 [M]. \quad (2)$$

При дальнейшем присоединении миозиновых голов к свободным А-центрам ФЕ переходит в состояния a_2 , a_3 и т. д. до a_l . При отсоединении миозиновых голов происходят переходы в обратном направлении с константой скорости, пропорциональной числу связанных с субфрагментом-1 А-центров в ФЕ. Вычисление скорости расщепления АТФ основано на предположении, что каждый цикл образования и распада АМ-комплекса сопряжен с гидролизом одной молекулы. Это предположение было выдвинуто в работе [6], и там же было показано, что эффективная константа скорости диссоциации отдельного АМ-комплекса δ зависит от концентрации субстрата S. Анализ схемы Лимна и Тейлора [7] показывает, что эта зависимость выражается кривой типа Михаэлиса — Ментен:

$$\delta = \frac{K_2 K_3 S}{K_2 + K_3 S}, \quad (3)$$

где K_2 — константа скорости отсоединения продуктов гидролиза от АМ-комплекса, а K_3 — константа скорости присоединения к нему Mg — АТФ.

Из формулы (1) нетрудно рассчитать стационарные концентрации АМ-комплексов a и свободных «включенных» А-центров α , а также частоту образования или распада АМ-комплексов, т. е. скорость гидролиза АТФ v :

$$a = [A_0] \frac{g(1+g)^{l-1}}{r+(1+g)^l}, \quad (4)$$

$$\alpha = [A_0] \frac{(1+g)^{l-1}}{r+(1+g)^l} = a/g, \quad (5)$$

$$v = \gamma [A_0] \frac{(1+g)^{l-1}}{r+(1+g)^l} = \gamma \alpha, \quad (6)$$

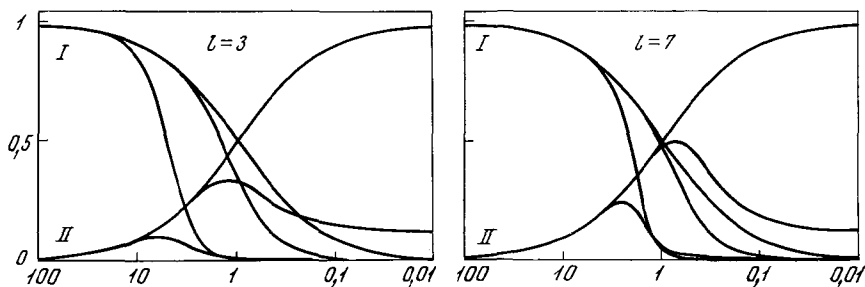


Рис. 1. Зависимость доли актомиозиновых комплексов a/A_0 (семейство кривых I) и относительной скорости гидролиза АТФ $v/\gamma A_0$ (семейство кривых II) от эффективной равновесной константы ассоциации актомиозинового комплекса g при разных величинах параметра ингибирования l

Для верхней кривой каждого семейства $r = 0$, для средней $r = 8$ и для нижней $r = 2000$. Семейство кривых II отражает также зависимость доли свободных включенных актиновых центров α/A_0 от g . Величина параметра «кооперативности» l равна числу актиновых центров в функциональной единице тонкой нити

где $[A_0]$ — полная концентрация А-центров, $g = \gamma/\delta$ — эффективная равновесная константа ассоциации А и М, зависящая от концентрации S1 и Mg — АТФ. Зависимости $a/[A_0]$ и $\alpha/[A_0] = v/\gamma[A_0]$ от величины этой константы приведены на рис. 1.

Пользуясь формулами (4) — (6), можно для каждого заданного g рассчитать скорость гидролиза АТФ и полную концентрацию субстрата при любых соотношениях актина и миозина. Для этой цели последовательно вычисляются следующие величины.

1. Концентрация АМ-комплексов a определяется по формуле (4).
2. Концентрация не связанных с актином М-центров составляет $[M] = [M_0] - a$.
3. Эффективная константа скорости образования АМ-комплексов равна $\gamma = K_1[M]$. В настоящей работе не учитываются возможные различия в кинетике присоединения к актину свободного от нуклеотида миозина, продуктного и интермедиатного комплексов миозина с фосфатом и АДФ.
4. Скорость гидролиза АТФ вычисляется по формуле (6).
5. Эффективная константа скорости диссоциации АМ-комплексов $\delta = \gamma/g$.
6. Концентрация свободного субстрата $S = K_2\delta/K_3(K_2 - \delta)$ в соответствии с формулой (3).
7. Концентрация связанного с М и АМ нуклеотида равна

$$S_M = \frac{K_3 S}{K_3 S + v/[M_0]} [M_0].$$

При выводе этой формулы предполагается, что константа скорости связывания Mg — АТФ с М и АМ одинакова и равна K_3 , диссоциацией субстрата и скоростью миозиновой АТФ-азы можно пренебречь по сравнению со скоростью гидролиза АТФ актомиозином v , которая и обуславливает полностью диссоциацию нуклеотида от белка.

8. Полная концентрация нуклеотида в системе,

которая равна экспериментально задаваемой концентрации субстрата, определяется как $S_{\text{экс}} = S + S_M$. (Считается, что весь свободный нуклеотид находится в форме Mg — АТФ благодаря наличию регенеративной системы, например, креатинфосфата и креатинкиназы.)

Таким образом, вычисляя v и $S_{\text{экс}}$ для последовательного ряда значений g , можно получить зависимость стационарной скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата при разных концентрациях А и М и при разных значениях константы ингибирования r . На рис. 2 приведены рассчитанные таким образом кривые и экспериментальные точки из работ [4] и [5], указаны экспериментальные условия и величины констант, при которых производились расчеты.

Из рисунка видно, что расчетные кривые воспроизводят основные кинетические особенности системы, обнаруженные в работах [4] и [5]. В том случае, когда актин не содержит регуляторных белков (рис. 2, а, б), зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата описывается кривой с насыщением типа Михаэлиса — Ментен, чему соответствует $r = 0$, т. е. ингибирование отсутствует, и все актиновые центры свободно взаимодействуют с миозином. Если актин содержит регуляторные белки, поведение системы зависит от уровня кальция и в еще большей степени от концентрации субфрагмента-1 миозина.

Низкому уровню кальция соответствует величина параметра ингибирования $r = 2000$ (рис. 2, в, г), а высокому — $r = 8-10$. Концентрация «включенных» актиновых центров может меняться от $1/r$ до единицы при изменении степени связывания актина с миозином, которая зависит как от концентрации свободного S1, так и от уровня Mg — АТФ. При низкой концентрации субстрата константа скорости диссоциации АМ близка к нулю. Если при этом миозина достаточно для того, чтобы на каждую ФЕ приходилось хотя бы по одному А-центру, связанному с миозином, то весь актин находится во «включенном» состоянии. С ростом концентрации Mg — АТФ константа скорости диссоциации АМ-комплекса увеличивается. Когда она сравнивается по величине с константой ассоциации А и М, которая пропорциональна концентрации свободных миозиновых центров, происходит резкий переход ФЕ в выключенное состояние, и скорость гидролиза уменьшается (см. рис. 1). Этим объясняется колоколообразная форма кривых зависимости скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата.

Колоколообразность исчезает в двух предельных случаях: 1) при очень низкой (абсолютно или относительно актина) концентрации S1, в этом случае степень занятости ФЕ миозином ниже критического уровня, и во «включенном» состоянии при любом уровне субстрата находится $1/r$ доля всего актина; 2) при очень высокой (абсолютно и относительно актина) концентрации S1, в этом случае даже при насыщающей концентрации субстрата, когда константа

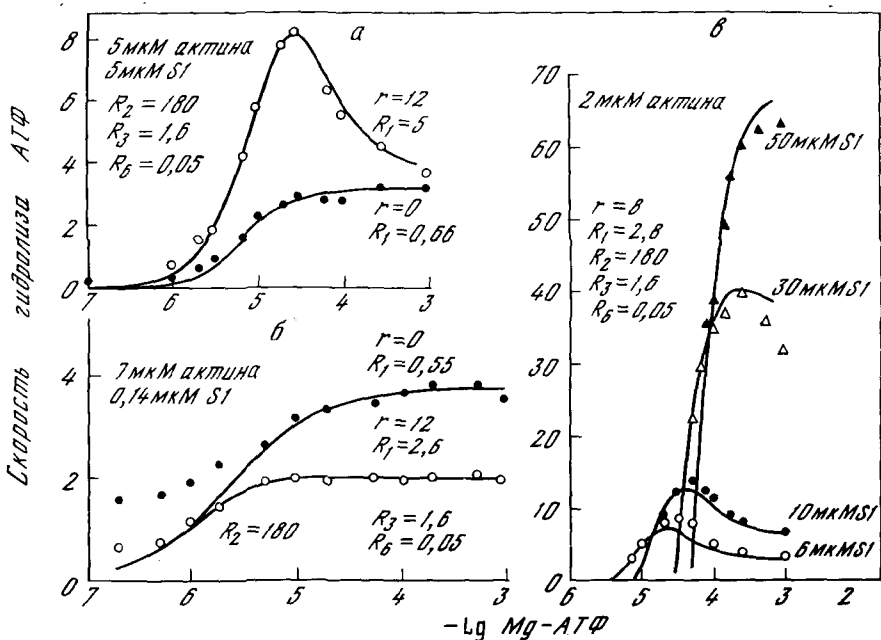


Рис. 2. Зависимость стационарной скорости гидролиза АТФ от концентрации субстрата

а, в — скорость выражена в молях АТФ, гидролизованной за 1 сек., на моль активных центров; б, г — в молях АТФ, гидролизованной за 1 сек., на моль субфрагмента-1. Сплошные линии — расчетные кривые. Точки — экспериментальные данные из работ [4, 5]. Величины констант, использованные при расчетах, и концентрации актина и субфрагмента-1 (S1) приведены около соответствующих кривых. Черные кружки на а, б получены на актине, не содержавшем регуляторных белков; белые кружки на в, г получены при концентрации Ca^{2+} менее 10^{-8} М. Остальные кривые получены при концентрации Ca^{2+} 10^{-4} М

скорости диссоциации АМ-комплекса достигает максимальной величины, степень занятости ФЕ миозином достаточна для их полной активации. При увеличении концентрации S1 в промежуточной области максимальная скорость гидролиза АТФ растет, и положение максимума сдвигается в зону более высоких концентраций субстрата.

Таким образом, выводы модели качественно согласуются с экспериментальными данными. Кроме того, удается получить удовлетворительное соответствие расчетных и экспериментально наблюдаемых скоростей гидролиза АТФ в разных условиях при незначительном изменении элементарных констант скоростей. Разброс значений этих констант и систематическое отклонение расчетных кривых от экспериментальных в области малых концентраций субстрата, по мнению Бремеля, обусловлено гетерогенностью препаратов белков, которая не учитывается в данной модели.

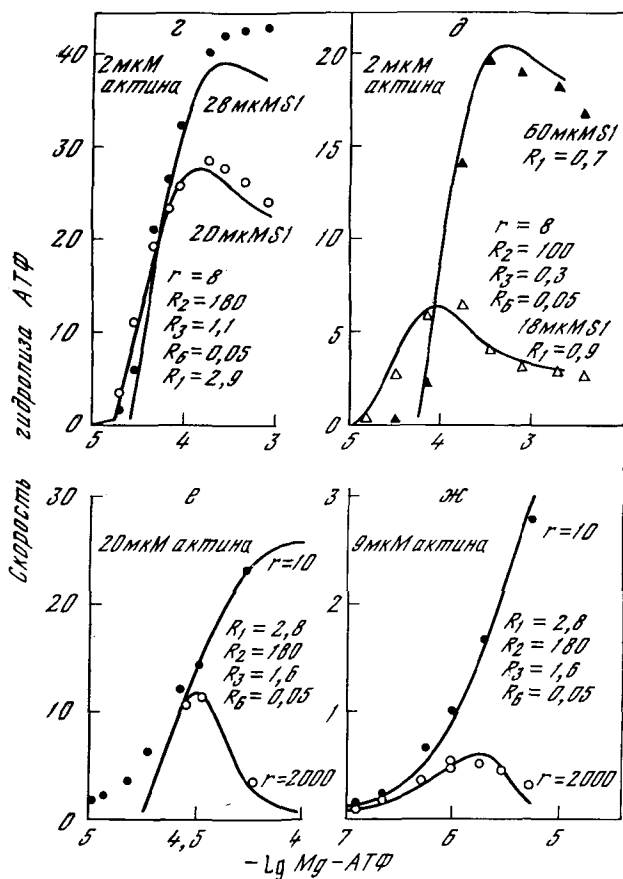


Рис. 2 (окончание)

Интересно отметить следующее обстоятельство. При описании системы приходится предположить, что константа скорости присоединения головы миозина к «включенному» А-центру в ФЕ тонкой нити почти в 5 раз больше, чем к нерегулируемым А-центрам в Ф-актине, не содержащем регуляторных белков (рис. 2, а, б). Кроме того, константа скорости диссоциации продуктов гидролиза от АМ-комплекса в экспериментах Бремеля и сотрундников [4, 5] почти в 10 раз превышает величину этой константы, определяемой из экспериментов Айзенберга и Муса по активации АТФ-азы ТММ нерегулируемым Ф-актином [7]. Величина этой константы оказывается достаточной для объяснения скорости замыкания миозиновых мостиков в сокращающейся без нагрузки мышце.

Анализ показывает, что механизм регуляции состояния актина нативным тропомиозином необходимо учитывать при описании сокращения нативной мышцы даже в состоянии максимальной

активации. В частности, действием регуляторной системы можно объяснить уменьшение скорости энергопродукции мышцы при увеличении скорости сокращения в области малых нагрузок [8]. По-видимому, существенную роль регуляторный механизм играет и в генерации автоколебаний летательными мышцами насекомых.

Приношу искреннюю благодарность профессору Э. Э. Шнолю и Е. А. Умновой из НИВЦ АН СССР за помощь в выполнении расчетов.

Л и т е р а т у р а

1. J. D. Potter, J. Gergely.— *Biochemistry*, 1974, 13, 2697.
2. J. Hanson, V. Ledner, E. J. O'Brien, P. M. Bennett.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1973, 37, 311.
3. J. A. Spudich, H. E. Huxley, J. T. Finch.— *J. Mol. Biol.*, 1972, 72, 619.
4. R. D. Bremel, A. Weber.— *Nature New Biol.*, 1972, 238, 97.
5. R. D. Bremel, J. M. Murrey, A. Weber.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1973, 37, 267.
6. А. Е. Букатина, В. И. Децеровский.— *Биофизика*, 1972, 17, 738.
7. R. W. Lynn, E. W. Taylor.— *Biochemistry*, 1971, 10, 4617.
8. A. V. Hill.— *Proc. Roy. Soc. London*, 1964, B159, 297.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ СОКРАЩЕНИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ

А. С. ДАВЫДОВ

Институт теоретической физики АН УССР, Киев

До настоящего времени нет полного понимания на молекулярном уровне механизма мышечного сокращения. В этой работе делается попытка объяснения механизма сокращения наиболее хорошо изученных поперечно-полосатых мышц.

Каким образом процесс гидролиза молекул АТФ на головках миозиновых молекул приводит к силам, вызывающим скольжение тонких нитей относительно толстых? На этот вопрос было предложено несколько описательных ответов без анализа молекулярного механизма возникновения сил. Наиболее распространено в настоящее время представление о том, что при гидролизе молекулы АТФ головка миозиновой молекулы удлиняется, образует связь с глобулярной молекулой актина, затем поворачивается (или сокращается), передвигая актиновое волокно относительно миозинового, отсоединяется от актиновой молекулы, возвращаясь к прежнему размеру и положению в толстой нити, затем присоединяет новую молекулу АТФ и подготавливается тем самым к новому циклу. Согласно этой «весельной модели», скольжение тонких волокон относительно толстых напоминает движение воды около лодки с гребцами, сидящими на концах лод-