

ВЗАИМОСВЯЗЬ АРГИНАЗЫ И ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА
 ПРОЛИНА У ЖУКОВ ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ
 ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY

А. Х. АГАДЖАНЯН, Л. М. АРУТЮНЯН, Дж. Г. ГУКАСЯН

Исследовались биосинтез пролина из различных предшественников, динамика активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина, ингибирование аргиназы, а также локализация ферментов биосинтеза пролина у жуков фасолевой зерновки. Установлена коррелятивная зависимость между аргиназой и ферментами биосинтеза пролина. Эффективными ингибиторами для аргиназы жуков являются орнитин и разветвленные аминокислоты. Ферменты биосинтеза пролина локализованы в надосадке.

Ключевые слова: аргиназа, пролин, фасолевая зерновка.

В природе существуют две формы аргиназы—уреотелическая, участвующая в механизме нейтрализации аммиака, и неуреотелическая. Последняя встречается во всех организмах вне зависимости от типа экскреции азота. Предполагается, что неуреотелическая аргиназа лимитирует в тканях содержание аргинина, других однозамещенных гуанидиновых соединений (в том числе фосфогенов) и биосинтез аргининбогатых гистонов [13].

В последнее время между активностями ферментов биосинтеза пролина и аргиназой выявлена взаимосвязь, которая четко проявляется в молочной железе лактирующих крыс [15], в жировом теле шелковичной моли [13], у цыплят [6], в тканевых культурах [7], а также в течение онтогенетического развития тутового шелкопряда [1].

В литературе имеется сравнительно много работ относительно ингибирования аргиназы аминокислотами, особенно эффективно орнитин, лизином [10], из разветвленных аминокислот—валином, лейцином, изолейцином [11]. Имеются интересные данные об ингибировании аргиназы пролином, в частности, очищенной аргиназы печени и почек крысы [10], печени овцы [11], опухолей молочной железы мышей [12], инфузорий *P. multimicronucleatum* [4]. В последнем случае ингибирование пролином носит неконкурентный характер.

В настоящей работе исследованы биосинтез пролина из различных предшественников, динамика активности аргиназы и ферментов биосинтеза пролина, ингибирование аргиназы, а также локализация ферментов биосинтеза пролина у жуков фасолевой зерновки.

Материал и методика. Объектом исследования служили жуки фасолевой зерновки *Acanthoscelides Obtectus* Say, откладывающие яйца на бобах фасоли. Продолжительность развития яиц при 28°—7 дней. При этой температуре и 75%-ной влажности воздуха выход имаго длится 28—30 дней. Самка начинает откладывать яйца через 2—3 ч после выхода в продолжении 10—12 дней. Среднее число отложенных яиц—90.

Методы определения активности аргиназы [4] и ферментов биосинтеза пролина [1] нами описаны ранее.

Для извлечения свободных аминокислот жуков растирали в ступке с 8-кратным количеством 75%-ного этанола. Образцы фиксировали на водяной бане при 80° в течение 20 мин. Экстракцию повторяли 4 раза.

Результаты и обсуждение. Согласно приведенным данным (табл. 1), количество большинства аминокислот—лиз, арг, глу, асп-сер, гли, ала, про—в процессе развития жуков удваивается, а некоторых даже утраивается. Это объясняется усилением гидролитических процессов при старении жуков.

Таблица 1
Динамика свободных аминокислот у жуков фасолевой зерновки,
мкм на 1 г свежей ткани

Аминокислоты	Д н и			
	II	V	VIII	XII
лиз	5,15	5,04	5,23	5,4
лиз	4,46	5,24	7,80	8,20
арг	3,38	4,68	7,27	7,20
глю-NH ₂	1,70	2,32	4,90	6,28
асп-сер	3,02	4,76	8,50	8,60
гли	7,40	9,20	17,9	21,50
глу	9,60	9,50	10,10	10,00
тре	1,19	1,29	1,75	1,70
ала	1,94	1,05	0,90	0,70
про	6,20	8,40	9,90	10,50
тир	0,57	0,53	1,16	1,11
вал-мет	1,11	1,20	0,91	0,07
фен	следы	следы	следы	следы
лей-илей	1,74	1,46	1,00	0,63

Биосинтез пролина из различных аминокислот. Все испытанные аминокислоты, за исключением аргинина,—субстраты для биосинтеза пролина. Однако наилучшим из них, как и у изученных нами других организмов (тутовый шелкопряд, крысы, инфузории), является L-орнитин (табл. 2).

Таблица 2
Биосинтез пролина из различных предшественников у жуков фасолевой зерновки,
мкм/час/1 г свежей ткани

Дни	Аминокислоты			
	L-орн	L-арг	L-цит	L-глу
IV	176,4	0	75,8	45,4
VI	124,2	0	58,2	58,2

Отсутствие синтеза пролина из аргинина можно объяснить, вероятно, тем, что в условиях, оптимальных для протекания биосинтеза пролина, аргиназа не активна (низкое рН, отсутствие ионов Mg^{2+}).

Представляет интерес также биосинтез пролина из цитруллина. Расщепление этой аминокислоты, вероятно, происходит орнитинтранскарбамилазой, и образовавшийся орнитин служит субстратом для биосинтеза пролина. Об орнитинтранскарбамилазной активности мы судили по довольно выраженному арсенолиту цитруллина у жуков. Синтез пролина из глутамата, по-видимому, происходит иным путем, так как глутамилкиназную активность у жуков мы не обнаружили.

Динамика аргиназы у жуков фасолевой зерновки. Данные об аргиназной активности и ее ингибировании различными аминокислотами у жуков фасолевой зерновки приведены в табл. 3, 4.

Динамика аргиназы у жуков фасолевой зерновки,
мкм/час/1 г свежей ткани

Таблица 3

Показатели	Дни							
	I	II	III	V	VI	VII	IX	XI
Активность фермента	43,3	36,0	25,0	30,1	32,0	44,9	64,4	128,3

Ингибирование аргиназы у жуков фасолевой зерновки, %

Таблица 4

Дни	Активность, мкм	Аминокислоты										
		L-орп	L-лиз	L-про	α -АМК	ГАМК	ААМК*	ДАВК**	L-глу	L-вал	L-лей	L-илей
II	32,7	66,6	22,1	9,2	25,7	0,7	0	21,1	21,1	36,0	37,6	56,5
III	24,1	56,1	42,3	14,0	14,0	0	0	17,8	24,4	38,5	38,5	51,4

*—ААМК— α -аминоизомасляная кислота.

**—ДАВК — δ -аминовалерьяновая кислота.

Полученные данные показывают, что активность аргиназы уменьшается на 3—5-е дни, после чего вновь постепенно повышается по 11-й день развития. Причем на 11-й день развития она удваивается по сравнению с 9-м днем. Это, вероятно, объясняется тем, что в последние дни жизни жуков усиливаются гидролитические процессы с целью обеспечения необходимыми субстратами для биосинтеза пролина. Об этом свидетельствуют данные о значительном увеличении свободных аминокислот (табл. 1). Вероятно, аргиназа обеспечивает субстратом-орнитином биосинтез пролина, этот факт подтверждается также наличием высокой ферментативной активности биосинтеза пролина на 11-й день развития жуков.

Данные табл. 4 показывают, что эффективными ингибиторами для аргиназы жуков являются орнитин и разветвленные аминокислоты— лейцин, валин и изолейцин. Однако последние сравнительно слабо ингибируют аргиназу у жуков, в то же время известно, что они в значительной степени ингибируют аргиназу различных органов крыс [12]. Интересен тот факт, что α -аминоизомасляная кислота и ГАМК не являются ингибитором аргиназы жуков. Последняя не ингибирует также аргиназу различных органов крыс в онтогенезе [2]. У инфузорий *P. multimicronucleatum* [4], наоборот, ГАМК является ингибитором аргиназы, а α -АМК вовсе не ингибирует ее активность. Примечательно также ингибирование аргиназы жуков глутаматом и δ -аминовалерьяновой кислотой, тогда как, согласно нашим предварительным данным, у других изученных нами объектов не обнаружено ингибирования указанными аминокислотами [2]. Интересно, что пролин сравнительно слабо ингибирует аргиназную активность жуков.

Динамика ферментов биосинтеза пролина (ОТА и П5КР) у жуков фасолевой зерновки. Полученные данные приведены в табл. 5. Согласно полученным данным, активность ферментов биосинтеза пролина у жуков подвергается почти такой же закономерности, что и аргиназа (табл. 5). Таким образом, установлена коррелятивная зависимость между ферментами биосинтеза пролина и аргиназой. Подобная закономерность установлена нами в молочной железе крысы [2].

Таблица 5

Динамика ферментов биосинтеза пролина у фасолевой зерновки,
мкм/час/1 г свежей ткани

Показатели	Д н и							
	I	II	III	V	VI	VII	IX	XI
Активность ферментов	188	294	261	227	149	227	272	334
Содержание эндогенного пролина	6,2	8,4	8,4	5,8	7,2	9,9	9,6	9,7

У жуков активность ферментов биосинтеза пролина в несколько раз превышает активность аргиназы, тогда как у изученных нами других объектов (шелкопряд, инфузории, крысы) обнаруживается обратная картина [1, 2, 4]. Высокая активность ферментов биосинтеза пролина у жуков, по-видимому, объясняется тем, что они, по сравнению с бабочками тутового шелкопряда, летают более интенсивно и, следовательно, расходуют значительные количества пролина в качестве энергетического субстрата.

Наш вывод находится в соответствии с наблюдениями Реди и сотр. [14]. Низкую аргиназную активность в жировом теле взрослых особей таракана и высокую—в теле павлиноглазки авторы связывают с ограниченными способностями этих насекомых к полету.

В табл. 5 приведены также данные по эндогенному содержанию пролина, которое уменьшается по 5—6-е дни развития, после чего вновь

увеличивается. Однако с увеличением активности ферментов биосинтеза пролина не происходит коррелятивного увеличения содержания эндогенного пролина. Вероятно, у жуков, наряду с усилением активности ферментов биосинтеза пролина, происходит также повышение пролин-оксидазной активности, благодаря чему образовавшийся пролин быстро вовлекается в метаболический путь.

Мы изучали также локализацию ферментов биосинтеза пролина и ингибирование их активностей валином и α -аминоизомасляной кислотой у жуков (табл. 6).

Таблица 6

Локализация ферментов биосинтеза пролина у жуков фасолозой зерновки,
мкм/час/1 г свежей ткани

Фракции	Актив-ность	% рас-пределе-ния	А м и н о к и с л о т ы			
			L-вал	% ингиби-рования	α -аминоизо-масляная кислота	% ингиби-рования
Целый гомогенат	176,4	100	97,2	29	137	0
Надосадок	137,0	79				
Осадок	36,9	21				

Полученные данные показывают, что ферменты биосинтеза пролина локализованы в основном в надосадке (центрифугирование гомогенатов проводилось при 18000 г). У гусениц тутового шелкопряда также была установлена цитоплазматическая локализация этих ферментов [1]. L-валин оказывает ингибирующее влияние на процесс биосинтеза пролина. Так как валин ингибирует орнитин- δ -трансаминазную активность [8], а также является строгим ингибитором аргиназы [11], то предполагается, что имеются узловые точки в метаболических путях обмена аргинина, пролина, орнитина и глутамата. α -Аминоизомасляная кислота не оказывает влияния на активность аргиназы. Однако, по нашим данным, эта аминокислота в молочной железе крыс значительно ингибирует как активность ферментов биосинтеза пролина, так и аргиназу [2].

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 2.VII 1979 г.

**ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԵՎ ՊՐՈԼԻՆԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՓՈԽԱԳԱՐԶ
ԿԱՊԸ ԼՈՐՈՒ ԸՆԴՍԿԵՐԻ ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY
ՏԵՍԱԿԻ ԲԶԵԶՆԵՐԻ ՄՈՏ**

Ա. Խ. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ, Լ. Մ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Զ. Գ. ՂՈՒԿՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է արգինազայի և պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների գինամիկան, պրոլինի բիոսինթեզը տարբեր նախանյութերից, արգինազայի ընկճումը տարբեր ամինաթթուներով, ինչպես նաև՝ պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների լոկալիզացիան լոբու ընդակերի բզեզների մոտ: Հաստատվել է, որ պրոլինի բիոսինթեզի համար արդյունավետ սուբստրատներ կարող են համարվել օրնիտինը, ցիտրուլինը և գլյուտամատը:

Հետաքրքրական է, որ այս միջատների մոտ պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների ակտիվությունը մի քանի անգամ գերազանցում է արգինազայի ակտիվությանը այն դեպքում, երբ մեր ուսումնասիրած մյուս օրգանիզմների մոտ (թթենու շերամ, առնետներ, ինֆուզորիաներ) նկատվել է հակառակ պատկերը: Պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտները լուկալիզացված են վերնըստվածքում:

Բղեղների արգինազայի համար արդյունավետ ընկճող են համարվում օրնիտինը, իսկ ճյուղավորված ամինաթթուներից՝ լեյցինը, իզոլեյցինը և վալինը: Բղեղների արգինազան նշանակալի ընկճվում է նաև α -ամինաիրոկարազաթթվով, և գլյուտամատով:

RECIPROCITY OF ARGINASE AND ENZYMES OF PROLINE BIOSYNTHESIS IN HARICOF-BEETLES ACANTHOSCELIDES OBTECTUS SAY

A. Kh. AGADJANIAN, L. M. ARUTYUNIAN, D. G. GIUKASIAN

Biosynthesis of proline from various predecessors, changes of arginase activity and enzymes of proline biosynthesis, inhibition of arginase as well as localisation of proline biosynthesis enzymes in haricof-beetle have been studied. The activity of arginase decreases to the 3—4 day after which again gradually increases to the 11-th day of development. Similar regularity is characteristic for enzymes of proline biosynthesis. The effective inhibitors for arginase of beetles are ornithine and branched aminoacids.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 26, 5, 1974.
2. Агаджанян А. Х., Арутюнян Л. М. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1979.
3. Давтян М. А. Вопросы биохимии мозга. 4. Ереван, 1968.
4. Заробян Т. Я., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 10, 1976.
5. Archibald R. M. J. Biol. chem., 121, 1956, 1944.
6. Austic R. E. J. Nutr., 103, 999, 1973.
7. Eagle H., Waschington C. L., Lewy M. J. Biol. chem., 240, 3944, 1965.
8. Hill L. J., Chambers P. Biochem. Biophys. Acta, 448, 435, 1967.
9. Hrabetowa E., Tupy J. J. Chromatogr., 3, 199, 1960.
10. Kaysen C. A., Streckor H. J. Biochem. J., 133, 779, 1973.
11. Kesava R. R. V., Reddy S. R. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 62, 1973.
12. Kesava R. R. V., Pai S. R., Bapat C. V. Br. J. Cancer, 30, 129, 1974.
13. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Biochem J., 115, 495, 1969.
14. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Experientia, 33, 160, 1977.
15. Jip M. C., Knox W. E. Biochem J., 127, 893, 1972.