

## НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФЕРМЕНТОВ АРГИНАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

М. А. ДАВТЯН, Т. Г. АРУТЮНЯН, М. А. ХАЧАТРЯН, А. Р. ПЕТРОСЯН

Изоферменты аргиназы (I, II, III), выявленные на разных стадиях развития тутового шелкопряда, отличаются по молекулярным весам, значениям  $K_m$  к L-аргинуину и характеру ингибирования L-лизином, L-орнитином и L-пролином. II изофермент, резко индуцируемый на стадии гусеницы, когда проявляется активность всех ферментов орнитинового цикла, в отличие от I, конкурентно ингибируется L-пролином и неконкурентно L-лизином и L-орнитином.

*Ключевые слова:* аргиназа, тутовый шелкопряд

Тутовый шелкопряд (*Bombyx mori* L.) является типичным урико-телическим организмом, однако в жировом теле гусеницы обнаружены все ферменты орнитинового цикла (карбамилфосфатсинтетаза, орнитинтранскарбамилаза, аргининсукцинатсинтетаза, аргининсукциназа, аргиназа). Аргиназа— один из ферментов этого цикла, расщепляющая аргинин, выявлена во многих тканях насекомого и во все сроки его развития [2, 7, 8].

В предыдущих наших исследованиях было показано, что для каждой стадии онтогенеза тутового шелкопряда (грена, гусеница, куколка, бабочка) характерен определенный набор изоферментов аргиназы. В общей сложности выявляются три изоэнзима фермента. Один из изоферментов, четко представленный на стадии гусеницы, вероятно, является уреотелической формой, ибо сочетается с активностями остальных ферментов орнитинового цикла, другие изоэнзимы— неуреотелические и имеют другие метаболические функции [1, 18]. Можно предположить, что изоферменты аргиназы разных стадий онтогенеза насекомого соответственно их метаболической роли будут отличаться физико-химическими свойствами.

*Материал и методика.* Объектом исследования служили развивающаяся грена, гусеница, куколка и бабочка тутового шелкопряда породы АРС-43. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема с тефлоновым пестиком. Гомогенат готовили на малесинатном буфере (20%). Изоэнзимный спектр аргиназы и молекулярные веса выявленных молекулярных форм определяли методом гельфильтрации на сефадексе G-200, последние— на основании элюционного графика белков с известными молекулярными весами (пепсина, гемоглобина, алкогольдегидрогеназы, уреазы). Объем колонки— 2,5×60 см, объем собираемых фракций— 4 мл. Концентрацию белка определяли по интенсивности поглощения света при 280 нм.

Из кинетических свойств выявленных молекулярных форм аргиназы определены константы Михаэлиса ( $K_m$ ) на L-аргинин и константы ингибирования ( $K_i$ ). Величину  $K_m$  (инкубационная среда: глициновый буфер—0,05 М, рН 9,5,  $MnCl_2$ —5 мкмоль, объект—1 мл, L-аргинин—30—400 мкмоль, общий объем—3 мл) определяли методом Лайнуивера-Берка,  $K_i$ —графическим методом Диксона [5]. Инкубационная среда та же. L-Аргинин применяли в концентрациях 30—150 мкмоль. В качестве ингибиторов аргиназы использовали L-лизин, L-орнитин, L-пролин (1—20 мкмоль).

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 представлены молекулярные веса аргиназ разных стадий онтогенеза тутового шелкопряда. Видно, что первый изоэнзим, встречающийся на стадиях грены, гусеницы, бабочки, имеет молекулярный вес порядка 220000—280000, второй изоэнзим—80000—100000. Молекулярный вес третьего изоэнзима, выявленного лишь у куколок, равен 60000. Таким образом, изоэнзимы аргиназы тутового шелкопряда по молекулярному весу значительно разли-

Таблица 1  
Молекулярные веса изоэнзимов аргиназы тутового шелкопряда

Дни развития	I изоэнзим	II изоэнзим	III изоэнзим
Грена			
7-й день инкубации	280000	80000	
Гусеница			
3-й возраст	270000	80000	
5-й возраст	200000	80000	
Куколка			
5-й день		100000	
15-й день		100000	60 000
Бабочка			
1-й день	220000	80000	

чаются. Согласно литературным данным, молекулярный вес большинства аргиназ различного происхождения имеет величины порядка 100000—120000 независимо от типа экскреции [16], хотя и обнаружены организмы с более высокими или низкими молекулярными весами. Так, аргиназы урикоотлических организмов (птиц, рептилий, насекомых) имеют молекулярный вес выше 200000, тогда как у земляного червя он составляет 27000, в молочной железе крысы—42000 [10], в жировом теле таракана—70000, у головастика *Rana esculenta*—80000 [17]. Необходимо подчеркнуть, что лишь у земляного червя аргиназа является уреотелическим ферментом, остальные—неуреотелические.

Таким образом, у тутового шелкопряда представлены как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные изоэнзимы аргиназы, которые встречаются и в других организмах.

Разумеется, трудно судить о характере аргиназы, основываясь лишь на данных о молекулярных весах, ибо неизвестны закономерности, указывающие на взаимообусловленность между метаболической ролью аргиназы и ее молекулярным весом. Тем не менее, II изоэнзим, который,

очевидно, участвует в процессе мочевинообразования, по своему молекулярному весу близок к большинству уреотелических аргиназ.

Изучение кривых зависимости активностей молекулярных форм аргиназы от концентрации субстрата (30—400 мкмоль L-аргинина) показало, что аргиназы изученных фаз развития тутового шелкопряда соот-

Таблица 2  
Кинетические свойства изоэнзимов аргиназы тутового шелкопряда

Дни развития	I изоэнзим			II изоэнзим			III изоэнзим						
	$K_m \cdot 10^{-2}$	$K_i \cdot 10^{-3} \text{ M}$			$K_m \cdot 10^{-2}$	$K_i \cdot 10^{-3} \text{ M}$			$K_m \cdot 10^{-2}$	$K_i \cdot 10^{-3} \text{ M}$			
		L-лиз	L-ори	L-про		L-лиз	L-ори	L-про		L-лиз	L-ори	L-про	
Грена													
7-й день	5,0	0,75	0,3	5,0	1,3	2,7	2,5	—					
Гусеница													
У возраст,													
7-й день	4,8	0,8	0,5	3,5	1,0	2,8	2,0	0,6					
Куколка													
15-день									4,7	4,5	3,5	3,5	
Бабочка													
1-й день	4,0	0,9	0,5	1,5	1,1	3,5	3,2	0,7					

ветствуют кинетике Михаэлиса-Ментена. Данные табл. 2 показывают, что  $K_m$  для I изоэнзима равняется  $4,0—5,0 \cdot 10^{-2}$ , для II— $1,0—1,3 \cdot 10^{-2}$ , а для III— $4,7 \cdot 10^{-2}$  М. Итак, все изоэнзимы тутового шелкопряда близки по сродству к L-аргинину. Можно лишь отметить более выраженное сродство второго изоэнзима, который имеет  $K_m$  со значениями в 3—5 раз меньше по сравнению с таковыми I и III изоэнзимов. Как известно,  $K_m$  для большинства уреотелических животных имеет значение порядка  $10—30 \text{ mM}$ , а аргиназа печени многих урикоотелических животных (птиц, рептилий) и *Neurospora crassa*—порядка  $100—200 \text{ M}$ . II Изоэнзим, который резко индуцируется по мере развития гусениц вместе с остальными ферментами орнитинового цикла, по своему высокому сродству к субстрату, близок к уреотелическим ферментам. Тем не менее,  $K_m$  не является абсолютным критерием, позволяющим определять характер фермента, так как имеются также примеры неуреотелических аргиназ (мозга быка и крыс, почек крыс, индуцируемая аргиназа печени кур) с высоким сродством к субстрату [4, 11].

Известно, что L-лизин, L-орнитин, L-пролин являются ингибиторами аргиназ различного происхождения. В наших исследованиях все испытанные аминокислоты оказывали сильный ингибирующий эффект на изоэнзимы аргиназы тутового шелкопряда. Определенный интерес

представляет ингибирующее влияние пролина, которое было доказано в отношении немногочисленных объектов (печени и почек крысы, печени овец, опухоли молочной железы мышей, аэробных инфузорий [2, 5, 12, 13]).

Результаты опытов показывают (табл. 2), что степень ингибирования активности отдельных изоэнзимов несколько варьирует в течение развития насекомого. Так, если ингибция первого изоэнзима под влиянием пролина на стадии грены составляет 74,0%, то на стадии бабочки—31,0% и т. д. Можно допустить, что эти колебания являются отражением возможных модификационных изменений изоэнзимов в зависимости от внутриклеточных условий, специфических для данной стадии.

Характер ингибирования изоэнзимов аргиназы аминокислотами, а также константу ингибирования ( $K_i$ ) определяли графическим методом Диксона и Уэбба [6] в условиях влияния различных концентраций ингибиторов (L-орнитин, L-лизин, L-пролин, 1—20 мкмоль) при двух концентрациях L-аргинина (30—150 мкмоль на пробу).

Интересно, что на всех стадиях развития при воздействии на первый изоэнзим L-лизин, L-орнитин и L-пролин одинаково проявляют конкурентный характер ингибирования. Вторым изоэнзимом по характеру ингибирования указанными аминокислотами отличается от первого тем, что конкурентным ингибитором для него является только L-пролин. Для третьего изоэнзима (свойственного стадии куколки), как и для первого, все три аминокислоты являются конкурентными ингибиторами.

Таким образом, выявленные изоэнзимы значительно различаются по характеру ингибирования их активностей испытанными аминокислотами. Заслуживает внимания неконкурентный характер ингибирования L-лизинем и L-орнитином активности второго изоэнзима на всех стадиях развития тутового шелкопряда. Столь существенная особенность кинетики этого изоэнзима, сохраняющаяся в течение всего процесса развития, подчеркивает его индивидуальность и идентичность на разных стадиях онтогенеза тутового шелкопряда.

Следует подчеркнуть, что неконкурентный характер ингибирования L-лизинем и L-орнитином является редко встречающимся явлением. Согласно данным литературы, в большинстве случаев аргиназы различного происхождения и ее изоферменты ингибируются аминокислотами конкурентно [12, 7, 6]. С другой стороны, все изоэнзимы тутового шелкопряда ингибируются L-пролином конкурентным механизмом, хотя в литературе имеются сведения о неконкурентном характере ингибирования L-пролином аргиназ некоторых организмов: аэробных инфузорий [6] и молочной железы мышей при низкой концентрации субстрата [13].

Полученные величины  $K_i$  изоэнзимов приводятся в табл. 2, согласно которой и по этому показателю изученные изоэнзимы значительно разнятся.

Следует подчеркнуть, что величины  $K_i$  варьируют незначительно в процессе развития насекомого, что свидетельствует о несущественных модификационных изменениях изоэнзимов.

Выявленные величины  $K_i$  для L-орнитина и L-лизина близки соответствующим значениям аргиназ различного происхождения: для L-орнитина—в пределах  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М для печеночной аргиназы человека и крыс [3], аэробных инфузорий [6] и ряда других организмов, для L-лизина—в большинстве случаев в пределах  $2,5 \cdot 10^{-3}$  и  $6,3 \cdot 10^{-3}$  М. Что касается полученной нами величины  $K_i$  для L-пролина (0,6—5,0), то она близка соответствующим величинам аргиназ аэробных инфузорий— $8,6 \cdot 10^{-3}$  М [6] и значительно ниже значений для почек крыс ( $35 \cdot 10^{-3}$  М) [2]. При оценке полученных данных следует учесть, что, согласно данным литературы, факт ингибирования аргиназы L-пролином в ряде случаев интерпретируется как доказательство участия фермента в механизме биосинтеза пролина из аргинина [23]. Исходя из того, что аргиназа *Neurospora crassa* и печеночная аргиназа амфибий до метаморфоза не гидролизует эндогенный аргинин, авторы предположили возможность функционирования их в системе биосинтеза пролина из аргинина [1, 13]. В отношении аргиназы печени цыплят также высказывалось подобное мнение [9]. У крыс в молочной железе в период лактации параллельно с аргиназой активируется и орнитинтрансаминаза, способствующая превращению аргинина в пролин [15]. У аэробных инфузорий один из изоферментов находится под двойным контролем пролина: не только активность ингибируется пролином, но и репрессируется биосинтез фермента при выращивании в среде, содержащей пролин.

Таким образом, один из обнаруженных изоферментов аргиназ тутового шелкопряда, очевидно, участвует в механизме биосинтеза пролина из аргинина. В связи с этим следует упомянуть ранее проведенные исследования, согласно данным которых в жировом теле у взрослых особей (бабочек) резко активируется аргиназа, наряду с повышением потребности последних в основном энергетическом субстрате—пролине [18]. При сравнении полученных нами данных с результатами исследования ферментов биосинтеза пролина из аргинина и орнитина [1] также выявляется коррелятивная связь между ними, указывающая на возможное интенсивное функционирование аргиназы тутового шелкопряда в системе биосинтеза пролина, особенно на стадии бабочки.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии

Поступило 12.XI 1980 г.

**ԹԹՆՆՈՒ ՇՈՐԱՄԻ ՁՆՏՈՒԿՆԵԶՈՒՄ ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ  
ԻԶՈՅԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Տ. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Մ. Հ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Ա. Ռ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

Թթննու շերամի դարձացման տարրեր փուլերում հայտնաբերված ար-  
գինազայի իզոֆերմենտները տարրերվում են իրենց մոլեկուլյար կշռով.  $K_m$ -ի  
նշանակությամբ զեպի L-արգինինը և L-լիզինով, L-օրնիթինով, L-պրոլի-  
նով արգելակման բնույթով: 2-րդ իզոֆերմենտը, որը ինդուկցվում է թրթու-  
րային փուլում, երբ հանդես են գալիս օրնիթինային ցիկլի բոլոր ֆերմենտ-

ներք, ի տարբերություն առաջինի, L-պրոլինով ենթարկվում է մրցակցային արգելակման, այն դեպքում, երբ L-լիզինով և L-օրնիթինով արգելակումը ոչ մրցակցային բնույթի է:

## SOME KINETIC PROPERTIES OF ISOENZYMES OF ARGINASE IN SILKWORM ONTOGENESIS

M. A. DAVTIAN, T. G. HARUTUNIAN, M. H. KHACHATRIAN, A. K. PETROSIAN

Isoenzymes of arginase (I, II, III), revealed in silkworm at different stages of development differ by molecular weights (I—220000—280000, II—80000—100000, III—60000), by values of  $K_m$  to L-arginine (I—4,0—5,0·10<sup>-2</sup>, II—1,0—1,3·10<sup>-2</sup>, III—4,7·10<sup>-2</sup>) and by the character of inhibition with L-lysin, L-ornithine and L-proline. II isoenzyme sharply induced at caterpillar stage when the activities of all enzymes of ornithine cycle are displayed unlike the I isoenzyme, is competitively inhibited by L-proline, whereas L-lysin and L-ornithine show non-competitive character.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 5, 19—23, 1974.
2. Арутюнян Т. Г., Агаджанян А. Х., Аналян Л. Г., Семерджян Г. А., Геворкян А. С., Заробян Т. Я., Хачатрян М. А. Сб. Реф. научн. сообщ. III-го Всесоюзного биохимического съезда, 1, Рига, 1974.
3. Асланян Г. А., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 228, 8—13, 1976.
4. Геворкян Д. М., Кочарян М. Г. Биолог. ж. Армении, 25, 11, 1972.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.
6. Заробян Т. Я., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 6, 1976.
7. Карапетян С. А., Арутюнян Т. Г., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 26, 27, 87—88, 1975.
8. Хачатрян М. А., Арутюнян Т. Г., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 28, 12, 26—29, 1975.
9. Austic R. E. J. Nutr., 103, 999, 1973.
10. Glass R., Knox W. J. B. C., 248, 5785, 1973.
11. Gruzl E., Traniello S., Barsacchi R., Magri E. Biochem. J., 145, 153, 1975.
12. Kaysen G. A., Strecker H. J. Biochem. J., 133, 779—788, 1973.
13. Kesava R. R., Reddy S. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 62, 1973.
14. Mezl V., Knox E. Biochem. J., 164, 105—113, 1977.
15. Morris R., Knox W. J. B. C., 248, 5788, 1973.
16. Poremska Z., Jachimowicz J., Mochnacka J. Acta Biochem. Polon., 17, 19, 1970.
17. Poremska Z. Enzymes, 15, 198—209, 1973.
18. Yip C. M., Knox E. W. Biochem. J., 127, 893—899, 1972.