

ИЗОЭНЗИМНЫЙ СПЕКТР И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АРГИНАЗЫ В СЕМЕНАХ ГОРОХА *PISUM SATIVUM* L.

А.Х. АГАДЖАНЯН, М.Б. МОЛАН РАД, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Активность аргиназы в стебелях и корешках гороха резко падает как в темноте, так и на свету. При выращивании в среде с фруктозой в стебелях она подавляется, и наоборот, стимулируется в среде с хлористым натрием и гидроксиламином более чем 3,5 раза. При гельфильтрации бесклеточного экстракта корешков гороха обнаружены два пика аргиназной активности. Определена константа Михаэлиса (K_m) и ингибирования (K_i) для двух изоэнзимов. Валин заметно подавляет активность аргиназы, в то время как пролин и орнитин оказывают слабое влияние.

Ոլոռի ցողուններում և արմատներում արգինազի ակտիվությունը խիստ ընկնում է ինչպես մութ այնպես էլ լույսի պայմաններում: Ֆրուկտոզի միջավայրում աճեցնելիս ցողուններում ֆերմենտի ակտիվությունը ճնշվում է ընդհակառակը, խթանվում է ավելի քան 3,5 անգամ NaCl-ի հիդրոքսիլամինի միջավայրում աճեցնելիս: Ոլոռի արմատների ոչ բջջային մզվածքը հեղիտրացիայի ենթարկելուց հայտնաբերվում է արգինազի ակտիվության 2 գագաթ: Որոշվել է Սիխալիսի (K_m) և ինհիբիդայի (K_i) հաստատունը երկու իզոէնզիմների համար: Վալինը զգալի ճնշում է արգինազի ակտիվությունը, իսկ պրոլինը և օրնիտինը ֆերմենտի ակտիվության վրա ունենում են թույլ ազդեցություն:

Arginase activity of root and stalk of pea *Pisum sativum* L. sharply falls in dark as in light. By cultivation peas in fructose containing medium it is depressed at stalk and on the contrary, is stimulated in NaCl and hydroxylamine containing media more than 3,5 times. Gel-filtration of pea root extract revealed two peaks showing arginase activity. Michaelis constant (K_m) and kinetic of inhibition (K_i) of these isoenzymes are detected. Valine strongly depresses arginase activity, in that time, proline and ornithine weakly affect.

Растения гороха - аргиназа - изоэнзимный спектр

На основании результатов собственных исследований Давтян [6] выдвинул и обосновал положение о существовании в природе двух различных ферментов аргиназ: уреотелической, участвующей в механизме нейтрализации аммиака через цикл мочевины, и неуреотелической, не связанной с указанным механизмом и имеющей широкое биологическое распространение. В дальнейшем было установлено, что роль неуреотелической аргиназы сводится главным образом к обеспечению процесса образования орнитина путем гидролиза аргинина [2], полиаминов (спермина и спермидина) [13], возможно, и других соединений.

Основным аргументом в пользу представления о функционировании неуреотелической аргиназы в ферментативной системе биосинтеза пролина является выявленная корреляция между активностями аргиназы и ферментов биосинтеза пролина из аргинина у неуреотелических организмов и в непеченочных органах уреотелических животных, где орнитиновый цикл не действует [2].

Аргиназа растений расщепляет аргинин, обеспечивая потребности организма в азоте [8]. Во многих растениях обнаружен весь набор ферментов

орнитинового цикла, и, следовательно, аргиназа в них носит уреотелический характер [15]. Исследования, касающиеся изоэнзимного спектра аргиназы у растений, малочисленны.

Осуществлена очистка аргиназы семян гороха сорта Рамонский-77 [4]. Считается перспективным применение высокоочищенных препаратов аргиназы различного происхождения в качестве противоопухолевого средства [9].

В данной работе приводятся результаты изучения аргиназной активности в стебельках и корешках гороха в различных условиях выращивания, а также изоэнзимного спектра фермента и некоторых физико-химических свойств его.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха *Pisum sativum* сорта Краснодарский. Органы растений гороха гомогенизировали в 0,1М калий-фосфатном буфере, pH 7,4. Готовили 10%-ный гомогенат. Аргиназную активность определяли методом Ратнер [14]; мочевины - методом Арчибалда [10]. Гельфильтрацию экстрактов для изучения изоэнзимного спектра аргиназы проводили на колонке с сефадексом G-150.

Константу Михаэлиса (Km) и константу ингибирования (Ki) для аргиназы определяли графическим методом Лайнуивера-Бэрка [7].

Результаты и обсуждение. Данные о динамике аргиназной активности в стебельках и корешках гороха, выращенных на свету и в темноте, приведены в табл.1

Таблица 1. Динамика аргиназной активности в стебельках и корешках гороха, мкМ на 1г

Дни прорастания	На свету		В темноте	
	стебельки	корешки	стебельки	корешки
5	33,5 ± 0,88	27,0 ± 0,80	44,3 ± 1,2	35,0 ± 1,0
7	21,5 ± 0,74	18,3 ± 0,79	31,2 ± 0,9	24,3 ± 0,9
9	9,5 ± 0,48	7,3 ± 0,44	15,3 ± 0,8	11,4 ± 0,48
11	5,2 ± 0,32	4,1 ± 0,30	10,2 ± 0,7	6,3 ± 0,35
14	2,6 ± 0,15	1,6 ± 0,15	7,4 ± 0,7	2,8 ± 0,18
18	1,8 ± 0,10	0,8 ± 0,10	5,9 ± 0,5	1,6 ± 0,11

Полученные данные показали, что аргиназная активность в стебельках и корешках гороха сравнительно низка. В стебельках по сравнению с корешками она несколько выше. В процессе прорастания семян активность аргиназы резко падает как в темноте, так и на свету. На 18 день прорастания активность фермента на свету в стебельках и корешках составляла соответственно 1,8 и 0,8 мкМ, а в темноте - 5,9 и 1,6 мкМ. Подобная закономерность выявлена также у гороха сортов V.faba, Рамонский - 77 [4].

Наблюдаемые различия в динамике активности аргиназы на свету и в темноте объясняются тем, что аргиназа семян гороха является ферментом, активность которого в наибольшей степени проявляется в темноте, на свету же она не индуцируется.

В следующей серии экспериментов мы изучали изменение активности аргиназы в стебельках и корешках гороха в зависимости от среды роста (табл.2).

Данные, приведенные в табл.2, показывают, что аргиназная активность стебельков гороха подавляется при выращивании семян в среде с фруктозой, а в среде с хлористым натрием и гидроксиламином, наоборот, фермент проявляет значительную активность. Аналогичная картина

обнаруживается также в корешках, однако здесь активирующее влияние этих соединений значительнее. На 6-й день роста семян под действием хлористого натрия и гидроксиламина активность фермента удваивается, а на 12-й повышается более чем в 3,5 раза. Столь ощутимое активирование аргиназы можно объяснить тем, что в неблагоприятных для организма условиях как приспособительная реакция для биосинтеза пролина субстрат орнитин образуется из аргинина, расщепляемого аргиназой.

Таблица 2. Влияние среды роста на активность аргиназы в стебельках и корешках гороха, мкМ мочевины на 1г ткани

Среда выращивания	Дни прорастания			
	Стебельки		Корешки	
	6	12	6	12
Контроль	33,5 ± 1,65	21,5 ± 1,21	27,0 ± 1,29	17,5 ± 1,04
Фруктоза	27,5 ± 1,33	26,5 ± 1,30	21,0 ± 1,19	19,0 ± 1,12
NaCl	39,0 ± 1,68	64,0 ± 2,1	51,5 ± 2,01	77,0 ± 2,38
Гидроксиламин	36,1 ± 1,62	32,0 ± 1,60	56,0 ± 1,98	64,0 ± 2,11

Нами исследовалась также активность аргиназы в разных частях корешков гороха, выращиваемого на свету и в темноте (табл.3).

Таблица 3. Активность аргиназы в разных частях корешков гороха, выращиваемого на свету и в темноте, мкМ мочевины на 1г ткани

Среда выращивания	Кончик		Середина		Основание	
	на свету	в темноте	на свету	в темноте	на свету	в темноте
Контроль	5,0±0,44	11,1±0,84	3,8±0,41	4,4±0,42	5,6±0,48	6,8±0,51
Фруктоза	2,4±0,23	9,2 ±0,74	1,6±0,12	4,5±0,41	4,0±0,37	7,4±0,65
NaCl	3,8±0,36	7,4±0,63	2,0±0,19	6,8±0,55	3,1±0,32	9,4±0,72

Данные табл.3 показывают, что в темноте все части корешка обладают высокой аргиназной активностью, особенно кончики и основания, и это характерно для всех вариантов (включая контрольный). Сравнительно низкая активность фермента отмечалась в средней части корешка. В варианте с фруктозой в кончике и средней части корешка активность аргиназы в темноте была в 3-3,5 раза выше, чем на свету, а у основания активность фермента в темноте превышала этот показатель на свету менее двух раз.

Обнаруженные нами ранее (неопубликованные данные) высокое содержание свободного пролина и активирование аргиназы в корешках гороха, выращиваемого в темноте, являются существенными аргументами в пользу представления о функционировании аргиназы в ферментативной системе биосинтеза пролина для обеспечения последнего орнитином.

Фракционированием на сефадексе G-150 мы изучали изоэнзимный спектр аргиназы в корешках гороха. Полученные данные (рис.1, 2) показывают, что при гельфильтрации экстракта корешков гороха выявляются два четко разграниченных пика аргиназной активности. Максимум первого пика проявляется во фракции 6, второго - во фракциях 16 и 17. Обнаруживаемые два пика активности аргиназы, очевидно, соответствуют двум (I и II) изоэнзимам фермента. На кривой видно также, что при

выращивании семян на свету и в темноте в присутствии фруктозы оба изоэнзима сильно активируются, а в темноте обнаруживается дополнительный пик аргиназной активности, который при гельфильтрации элюируется в 9-й фракции. В семенах контрольного варианта, выращиваемых на свету, также обнаружены два пика аргиназной активности, элюируемых в тех же фракциях, однако активность первого пика почти в 2 раза уступает таковой второго. В темноте же активности обоих пиков равны.

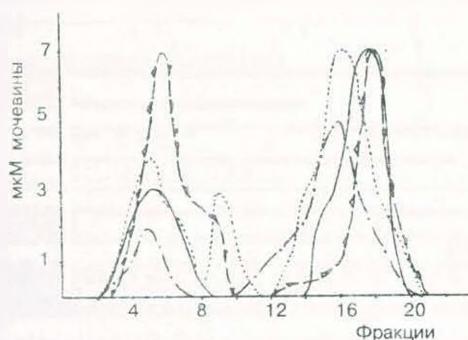


Рис. 1. Изоэнзимный спектр аргиназы в корешках гороха, выращиваемого на свету и в темноте; контроль: на свету (· · · ·), контроль в темноте (— — —), фруктоза: на свету (— · — ·), фруктоза в темноте (— 0 — 0).

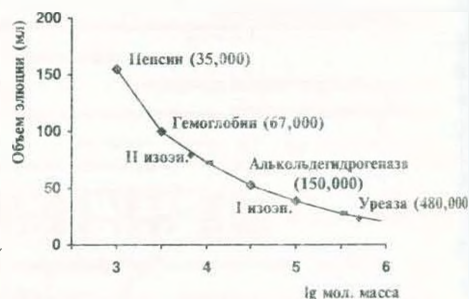


Рис. 2. Калибровочная кривая определения молекулярных масс изоэнзимов аргиназы методом гельфильтрации на сефадекс G-200.

Усиление активности фермента целого гомогената приписывается повышению активности первого высокомолекулярного изоэнзима аргиназы. При гельфильтрации во всех вариантах обнаруживаются два пика белка.

Определена также константа Михаэлиса для двух изоэнзимов аргиназы по графическому методу Лайнуивера-Бэрка [7].

Таблица 4. Ингибирование аргиназы стебельков гороха валином, мкМ мочевины на 1г ткани

Валин, мкмоль	Аргинин, мкмоль	10		50	
		активность аргиназы	% ингибиро- вания аргиназы	активность аргиназы	% ингибиро- вания аргиназы
Контроль		0,880	-	1,55	-
5		0,510	42	0,790	49
10		0,270	69	0,705	55
15		0,260	70	0,580	63
25		0,250	72	0,520	66
35		0,190	78	0,500	68
50		0,170	81	0,400	74

По полученным данным, K_m обнаруживаемых изоэнзимов на свету в присутствии фруктозы составляет: для I - $15,1 \cdot 10^{-3}$, а для II - $26,6 \cdot 10^{-3}$ М. Следовательно, обнаруженные изоэнзимы корешков гороха почти не отличаются по сродству к субстрату - L-аргину. В темноте в присутствии фруктозы K_m для I изоэнзима составляет $8,2 \cdot 10^{-3}$ М, а для II - $21,4 \cdot 10^{-3}$ М. Отсюда следует, что в темноте первый высокомолекулярный изоэнзим

аргиназы не только проявляет высокую активность, но и увеличивается примерно в 2 раза.

Гельфильтрацией на колонке с сефадексом G-200 определена молекулярная масса обнаруженных изоэнзимов (рис.2). Приведенная кривая свидетельствует, что молекулярная масса I изоэнзима составляет 200 кД, а II - 105 кД. Выясняется, таким образом, что по молекулярной массе II изоэнзим аргиназы стебельков гороха близок к большинству аргиназ, а I - к аргиназе ряда уреотелических организмов (печень птиц, рептилий и др.) [12].

В задачу наших исследований входило также изучение характера ингибирования высокомолекулярного (I) изоэнзима аргиназы орнитином, лизином, валином, пролином (L - форма аминокислот). Полученные данные по валину приведены в табл. 4.

Данные таблицы показывают, что валин заметно подавляет аргиназу стебельков гороха (на 70-80%) при наличии субстрата - аргинина в указанных количествах. Известно [1], что влияние орнитина и пролина на активность фермента незначительно. Характер ингибирования валина - конкурентный, а орнитина и пролина - неконкурентный.

Последние две аминокислоты не оказывают никакого влияния на аргиназу гороха сорта Рамонский - 77 [5]. Известно также, что орнитин не ингибирует лишь активность изоферментов аргиназы мозга эмбриона кур [3] и аргиназы *B.subtilis* [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х. Докт.дисс., Ереван, 1990.
2. Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог.ж.Армении, 27, 5, 19-23, 1974.
3. Арутюнян Т.Г., Карапетян С.А., Байков В.А. Биолог.ж.Армении, 34, 8, 813-817, 1981.
4. Варданян Дж.А. Биолог. журн. Армении, 33, 8, 853-856, 1980.
5. Варданян Дж.А., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 37, 1, 36-40, 1984.
6. Давтян М.А. Докт. дисс., Ереван, 1970.
7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Изд. ИЛ., М., 1966.
8. Кретович В.Л. Обмен азота в растениях, М., Наука, 1972.
9. Abdelal R.M. Annu.Rev.Microbiolog, 33, 139, 1979.
10. Archibald R.M. J.Biol.Chem., 156, 121-142, 1944.
11. Nakamura N., Mosako F., Kasuo K. Agr. Biol. Chem, 37, 2827-2833, 1978.
12. Porembska Z. Enzyme., 15, 198-209, 1973.
13. Russel. Biochem J., 130, 71-76, 1972.
14. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1183-1198, 1949.
15. Shen T.E., Rird H.R., Sunde M.Z. Poultry Sci, 52, 676-682, 1973.

Поступила 30.VII.2000