

3. Арутюнян Т. Г., Карапетян С. А., Байдков В. А. Биолог. ж. Армении, 34, 8, 1981.
4. Габриелян Г. А., Акопян Б. А., Дагян М. А. Биолог. ж. Армении, 30, 8, 1977.
5. Дагян М. А., Варданян Дж. А. Биолог. ж. Армении, 35, 3, 1982.
6. Диксон, Уэбб, Ферменты, М., 1966.
7. Заробян Т. Я., Агаджанян А. Х., Дагян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 6, 1976.
8. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 156, 121, 1944.
9. Carvajal N., Venegas O., Oestraelcher G., Plaza M. Biochem. Biophys. Acta, 250, 2, 1971.
10. Dumitru I. F. Acta vitamin enzymol., 27, 207, 1973.
11. Gasiotowska I., Porembska Z., Vachimowicz J., Mochnacka J. Biochim. Polon., 17, 19, 1970.
12. Kaysen G. A., Strecker H. J. J. Biochem., 133, 779, 1973.
13. Kesava Rao R. V., Reddy S. R. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 62, 1973.
14. Kesava Rao R. V., Pal S. R., Gupta C. V. Br. J. Cancer, 30, 129, 1974.
15. Legaz E., Vicente C. Cryptogamie, Bryol., Lichenol., 1, 4, 1980.
16. Muszynska G., Severina L. O., Lohyeva L. W. Acta Biochim. Polon., 19, 2, 1972.
17. Mora J., Turrah B., Martuscelli J., Soberon G. Biochem. L., 9, 588, 1965.
18. Mora J., Turrah B., Bofalini L. F. Biochim. Biophys. Acta., 118, 206, 1966.
19. Nakamura N., Fujita M., Kimura K. Agr. Biol. Chem., 37, 2827, 1973.
20. Ratner S., Pappas A. Biochem. J., 179, 1183, 1949.
21. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Biochem. Biophys. Acta, 159, 537, 1968.
22. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Biochem. L., 115, 495, 1969.
23. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Comp. Biochem. Physiol., 32, 499, 1970.
24. Vielle-Brethaud F., Orth G. J. Biol. Chem., 247, 1227, 1972.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 1, 1984

УДК 591.1.05

ИЗОЭНЗИМЫ АРГИНАЗЫ И ИХ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА У ГУСЕНИЦ И КУКОЛОК ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ *ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY

А. Х. АГАДЖАНИ

У гусениц и куколок фасолевой зерновки обнаружены все ферменты орнитинового цикла. При гельфильтрации экстракта обнаружены два изофермента аргиназы у гусениц и один — у куколок. Сродство изоферментов к субстрату выше у гусениц. По характеру и константе ингибирования резко отличаются изоферменты аргиназы гусениц и куколок. По-видимому, 1 изоэнзим гусеницы участвует в процессе биосинтеза пролина.

Ключевые слова: зерновка фасолевая, изоэнзимы аргиназы, орнитиновый цикл.

Аргиназа обнаружена практически у всех насекомых. Однако ферменты орнитинового цикла и их субстраты найдены лишь у некоторых из них [6, 12]. Паулс и сотр. [13], изучая ферменты цикла мочевины у овощного жука *Nezara viridula*, обнаружили активную орнитин-транскарбамилазу, активность же карбамилфосфатсинтетазы у этого насекомого значительно ниже, ее удается обнаружить лишь при использовании радиоактивного субстрата. По мнению указанных авторов, наличие мочевины у насекомых обуславливается излишком аргинина в пище, расщепляемого аргиназой.

В жировом теле тутового шелкопряда обнаружены три изоэнзима аргиназы, активность которых меняется в течение развития [4].

Физико-химические свойства аргиназы насекомых изучены недостаточно. Установлено, что K_m аргиназы гомогената шелковичной моли [15] колеблется в пределах 2—4 мМ, а для I изоэнзима аргиназы жирового тела тутового шелкопряда этот показатель составляет 40—50 мМ [4].

В данной работе приводятся результаты исследования изоэнзимного спектра и некоторые физико-химические свойства аргиназы гусениц и куколок фасолевой зерновки.

Материал и методика. Объектом исследования служили гусеницы и куколки фасолевой зерновки *Acanthoscelides oblectus* Say, откладывающие яйца на бобах фасоли. Продолжительность развития яиц при 28° длится 7 дней. При указанной температуре и 75%-ной влажности воздуха гусеничная стадия длится 30 дней. Самка начинает откладывать яйца через 2—3 ч после выхода из яиц в течение 10—12 дней. Среднее число отложенных яиц—90.

Активность аргиназы определялась по методу Ратнер [14], мочевины—по Арчибальду [8].

Синтез цитруллина изучали в условиях, описанных Браунштейном и сотр. [3]: клетки разрушали в изотоническом растворе KCl. Центрифугировали 10 мин при 2500 об/мин. Осадок суспендировали в изотоническом растворе KCl и выносили 0,7 мл полученной суспензии в опытную пробу, которая в общем объеме (3,5 мл) содержала следующие добавки (мкМ): 30— $MgSO_4$, 35— NH_4Cl , 25—L-орнитина, 40—DL-глутамата, 120—АТФ, 10—калий-фосфатного буфера (рН 7,2)—0,017 М (конечная концентрация) и KCl—до изотонической концентрации среды.

Инкубацию проводили при 37,5° в течение 60 мин. Цитруллин определяли как колориметрическим методом Арчибальда [8], так и методом хроматографии на бумаге.

В качестве дополнительного метода определения орнитинтранскарбамилазной активности нами была изучена реакция арсенолиза цитруллина в гомогенате по методу Кребса и сотр. [10].

Аргининуксинацетатазная и аргининсукцинатазная активности определяли методом Ратнер [14]. Гомогенат, приготовленный на 0,05 М калий-фосфатном буфере, инкубировали в присутствии 20 мкМ L-аспартата, 20 мкМ L-цитруллина, 10 мкМ АТФ, 5 мкМ $MgSO_4$, 20 мкМ янтарной кислоты и 1 мг (20 ед.) аргиназы при 37° в течение 60 мин. Образовавшуюся при этом мочевины определяли уреазным методом.

Гельфильтрация белков проводилась на сефадексе G-150. Константы ингибирования определялись по методу Диксона [5], при этом для I изоэнзима аргиназы гусениц брались 30, 60 мкМ аргинина, для II изоэнзима—120, 300, а для единственного энзима куколок—50 и 120 мкМ. Аммиокислоты—ингибиторы применялись в концентрациях 6, 12, 20, 30 и 60 мкМ.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов изучали активность ферментов орнитинового цикла в гомогенатах гусениц и куколок фасолевой зерновки. Данные приведены в табл. 1, согласно которой гомогенаты гусениц и куколок обладают выраженной активностью арсенолиза цитруллина, катализируемой орнитинтранскарбамилазой. Гомогенаты, хотя и очень слабо, катализируют биосинтез цитруллина из CO_2 , NH_3 и орнитина с использованием АТФ. Очевидно, процесс биосинтеза цитруллина лимитируется карбамилфосфатсинтетазой, ибо орнитинтранскарбамилаза (арсенолиз цитруллина) обладает высокой активностью. В гомогенатах протекает активный процесс биосинтеза аргинина из цитруллина и аспартата, катализируемый аргининсукцинатсинтетазой и аргининсукциназой. Учитывая данные нашей ла-

Таблица 1

Ферменты орнитинового цикла гусениц и куколок фасолевой зерновки

Объекты	Карбамилфосфатсинтетаза и орнитинтранскарбамиллаза, мкМ на 1 г ткани	Арсенолиз цитрулина, NH_3 на 1 г ткани	Аргининсукцинатсинтетаза и аргининсукциназа, NH_3 на 1 г ткани
Гусеницы	$0,25 \pm 0,03$	$313 \pm 6,0$	$157 \pm 2,5$
Куколки	$0,24 \pm 0,02$	$290 \pm 5,5$	$191 \pm 3,5$

Число опытов—7.

боратории о наличии в изучаемом объекте выраженной активности аргиназы [1], можно заключить, что подобно тутовому шелкопряду [6] и *S. gifyognis* [12] гусеницы и куколки фасолевой зерновки обладают активностью всех ферментов орнитинового цикла.

В следующей серии экспериментов изучался изоэнзимный спектр аргиназы в экстрактах гусениц и куколок. Соответствующие кривые (рис. 1) показывают, что у гусениц обнаруживаются два пика аргиназ-

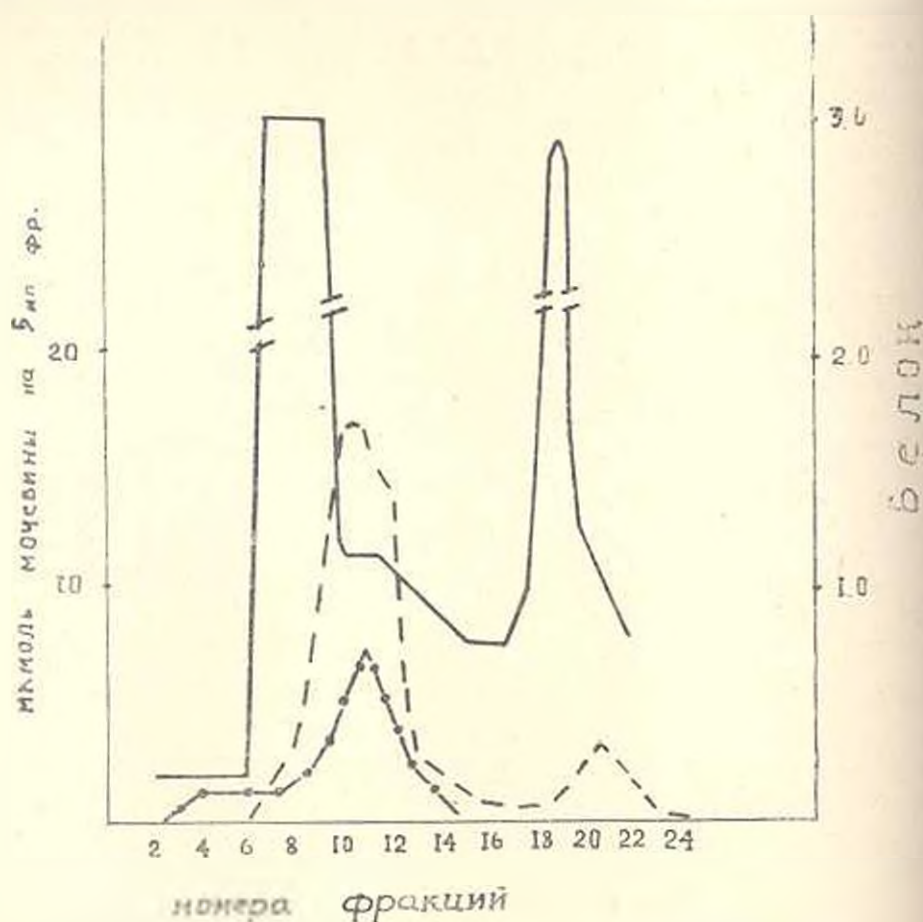


Рис. 1. Изоэнзимы аргиназы гусениц и куколок фасолевой зерновки (30-й день развития). — белок, ---- гусеницы, —•— куколки.

ной активности: первый пик фильтруется в 11-й фракции, второй — в 21-й, активность 1 пика значительно превышает таковую второго. У

куколок обнаруживается лишь один пик аргиназной активности, фильтруемый в 11-й фракции, т. е. он соответствует I пику аргиназы гусениц, однако активность его почти в 3 раза ниже соответствующего пика у гусениц.

Исследовалось также сродство субстрата к изоэнзимам (K_m). Для I изоэнзима гусениц K_m составляет 20 мМ, а для II—10 мМ. K_m же энзима куколок—200 мМ. Таким образом, сродство I изоэнзима у гусениц в 10 раз выше по сравнению с изоэнзимом куколок.

В табл. 2 и 3 и на рис. 2, 3 приводятся данные о константах и характере ингибирования аргиназы аминокислотами у гусениц и куколок фасолевой зерновки.

Таблица 2

Характер и константы ингибирования аргиназы гусениц фасолевой зерновки

Аминокислоты	$K_i \cdot 10^{-3} \text{ М}$		Характер ингибирования	
	I изоэнзима	II изоэнзима	I изоэнзима	II изоэнзима
L-ори	4,33	—	неконкурентный	
L-лиз	5,66	6,26	конкурентный	неконкурентный
L-вал	9,39	2,39	конкурентный	конкурентный
L-про	17,42	6,45	неконкурентный	конкурентный

Таблица 3

Характер и константы ингибирования аргиназы куколок фасолевой зерновки

Аминокислоты	K_i для единственного изоэнзима, 10^{-3} М	Характер ингибирования
L-ори	18,7	неконкурентный
L-лиз	4,03	конкурентный
L-вал	7,25	конкурентный
L-про	18,7	неконкурентный

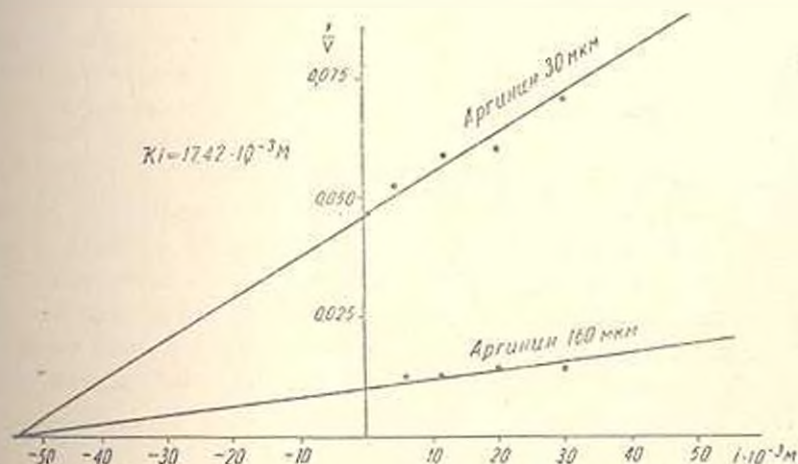


Рис. 2. Ингибирующее влияние пролина на I изоэнзим аргиназы гусениц фасолевой зерновки (30-й день развития).

Полученные данные свидетельствуют о том, что лизин и валин являются конкурентными ингибиторами I изоэнзима гусениц, а пролин и оринтин—неконкурентными. Для II изоэнзима лизин является неконкурентным ингибитором, в то время как валин и пролин—конкурентными. Необычным является неконкурентное ингибирование единственного энзима аргиназы куколок оринтином. Подобный характер ингибирования выявлен Мора и сотр. [11] для аргиназы *Neurospora crassa*. Представляет интерес и неконкурентное ингибирование аргиназы лизинном.

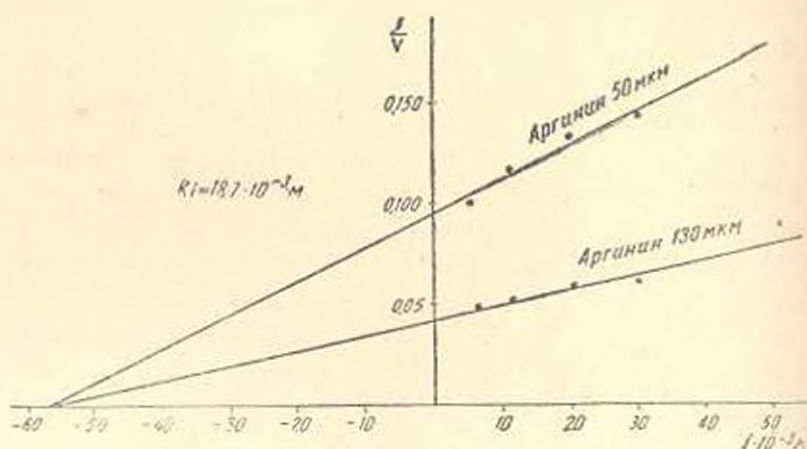


Рис. 3. Ингибирующее влияние пролина на аргиназу куколок фасоловой зерновки.

Относительно ингибирования аргиназы пролином следует сказать, что в гусеничной стадии фасоловой зерновки высокомолекулярный I изоэнзим аргиназы ингибируется этой аминокислотой неконкурентно, а низкомолекулярный—конкурентно. Обнаруженный у куколок единственный энзим ингибируется пролином неконкурентно. Константа ингибирования I изоэнзима аргиназы гусениц пролином имеет очень высокое значение по сравнению с II изоэнзимом.

Неконкурентный характер ингибирования аргиназы пролином обнаружен нами ранее у инфузорий *Paramecium multimicronucleatum* [8] и в молочной железе беременных и лактирующих крыс [2], а что касается конкурентного ингибирования активности II изоэнзима аргиназы гусениц пролином, оно выявлено в опухолевых клетках молочной железы мышей [9].

Неконкурентный характер ингибирования высокомолекулярного I изоэнзима пролином рассматривается как доказательство возможности функционирования фермента в системе биосинтеза пролина из аргинина, тем более что, как показали наши ранние исследования, в гомогенатах гусениц и куколок фасоловой зерновки обнаруживаются ферменты биосинтеза пролина из оринтина и имеет место корреляция между активностями последних ферментов и аргиназы в ходе развития насекомого [1].

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

Поступило 12.VII 1983 г.

ԱՐԳԻՆԱԶԱՅԻ ԻԶՈՅԻՐՈՆԵՏՆԵՐԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ,
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԼՈՐՈՒ ԸՆԴԱԿԵՐԻ ԹՐԹՈՒՐՆԵՐՈՒՄ ԵՎ
ՀԱՐՍՆՅԱՆՆԵՐՈՒՄ ACANTHOSCEIIDES OBTECTUS SAY

Ա. Խ. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ

Լորու ընդակերի թրթուրներում և հարսնյակներում հայտնաբերվել են օր-
նիտինային ցիկլի բոլոր ֆերմենտները: Մզվածքը հելֆիլտրացիայի ենթարկելուց
թրթուրներում հայտնաբերվել են արգինազայի երկու իզոֆերմենտներ, իսկ
հարսնյակներում՝ մեկ: Իզոֆերմենտների և սուբստրատի ինամակցոմիտուր
ափելի բարձր է թրթուրներում, քան հարսնյակներում: Թրթուրների և հարսնյակ-
ների արգինազայի իզոֆերմենտները նշանակալիորեն տարբերվում են իրենց
քննման բնույթով և հաստատունով: Հաշվարար, թրթուրների առաջին իզո-
ֆերմենտը մասնակցում է պրոլինի բիոսինթեզին:

ISOENZYMES OF ARGINASE AND THEIR KINETIC PROPERTIES
IN LARVAE AND PUPAE OF HARICOT BEETLE
ACANTHOSCEIIDES OBTECTUS SAY.

A. Kh. ACADJANIAN

All enzymes of ornithine cycle are found in larvae and pupae of
haricot beetle. Two isoenzymes of arginase are discovered in larvae and
one in pupae during gel filtration of the extract. Constants of Michaelis
are higher in larvae than in pupae. Arginase isoenzymes of larvae and
pupae are different by their character of inhibition and constant. Appa-
rently, the isoenzyme of larvae takes part in proline biosynthesis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанян А. Х. Биолог. ж. Армении, 34, 845, 1981.
2. Арутюнян Л. М., Агаджанян А. Х. Биолог. ж. Армении, 34, 176, 1981.
3. Браунштейн А. Е., Северина Н. С., Бабская Ю. Е. Биохимия, 21, 738, 1956.
4. Давтян М. А., Арутюнян Т. Г., Хачигрян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 28, 1976.
5. Диксон М., Уелб Э. Ферменты. М., 1966.
6. Карапетян С. А., Арутюнян Т. Г., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 26, 12, 1973.
7. Заробян Т. Я., Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 6, 1976.
8. Archibald R. M. J. Biol. Chem., 1956, 121, 1944.
9. Kesava Rao K. V., Pai S. R., Bapat C. V. Br. J. Cancer, 30, 129, 1974.
10. Krebs H. A., Eggleston L. V., Knevel V. A. Biochem. J., 59, 2, 185, 1955.
11. Mora J., Tarrab R., Bojalil L. F. Biochim. Biophys. Acta, 118, 206, 1966.
12. Pant R., Kumar S. Biochem. J., 174, 341, 1978.
13. Powels M. A., Lanssens P. A., Gilmour D. J. Insect Physiol., 18, 2353, 1972.
14. Ratner S., Pappas A. J. J. Biol. Chem., 179, 1199, 1949.
15. Redoly S. R. R., Campbell J. W. Biochem. J., 115, 495, 1969.