

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, А. В. ПУШКИН,
З. Г. ЕВСТИГНЕЕВА

***D*-ГЛЮТАМИНОВАЯ КИСЛОТА КАК СУБСТРАТ ДЛЯ ГЛЮТАМИНСИНТЕТАЗЫ ИЗ СЕМЯН ГОРОХА**

Глютаминсинтетаза (ГС) (Н. Ф. 6.3.1.2) — один из важнейших ключевых ферментов азотного обмена растений, микроорганизмов и животных, катализирует синтез глутамина: L -глутамат + NH_3 + АТФ \rightleftharpoons L -глутамин + АДФ + $\Phi_{\text{неорг}}$ (¹). Рядом работ показано (¹⁻³), что ГС, выделенная из различных объектов, не строго оптически специфична в отношении глутамата и проявляет активность как с L -, так и с D -глутаматом, однако активность с D -глутаматом значительно ниже, чем с L -глутаматом. Для ГС из мозга овцы установлено, что первая стадия синтеза глутамина — активация глутамата — оптически не специфична, но за ней следует стадия взаимодействия активированного глутамата (фосфорилированный глутамат) с аммиаком. По-видимому, в этом случае именно вторая стадия является оптически специфичной и, таким образом, она лимитирует скорость реакции с D -глутаматом.

Известно, кроме того, что активность ГС в синтезе как L -, так и D -глутамина зависит от природы двухвалентного катиона. Так, ГС из *B. subtilis* (³) катализирует синтез D -глутамина только в присутствии Mn^{2+} , но не Mg^{2+} , причем активность составляет 23% от контроля с L -глутаматом.

Целью настоящей работы явилось изучение кинетики действия ГС из семян гороха при использовании D -глутамата в качестве субстрата. В задачу работы входило, кроме того, выяснение характера ингибирующего действия на ГС D -глутамата при его добавлении в опытную смесь, содержащую L -глутамат.

Инкубационная смесь для определения активности фермента с Mg^{2+} состояла из: 0,011 *M* трис-НСI-буфера; 0,0625 *M* моноглутамата Na; 0,0625 *M* NH_4Cl ; 0,00625 *M* АТФ; 0,044 *M* MgSO_4 ; ферментного экстракта в количестве, необходимом для образования 0,04–0,8 $\mu\text{моля}$ фосфата в пробе объемом 1,6 мл за 15 мин. инкубации при 37°; рН инкубационной смеси 7,2.

Инкубационная смесь для определения активности фермента в присутствии Mn^{2+} состояла из 0,011 *M* трис-НСI-буфера; 0,0625 *M* моноглутамата натрия; 0,0625 *M* NH_4Cl ; 0,0016 *M* АТФ; 0,0016 *M* MnSO_4 ; ферментного препарата в количестве, необходимом для образования 0,04–0,8 $\mu\text{моля}$ фосфата в пробе объемом 1,6 мл за 15 мин. инкубации при 37°; рН инкубационной смеси 5,5.

Определение активности глютаминсинтетазы проводили по образованию неорганического фосфата, выделяющегося в эквивалентных количествах в реакции 1 (⁴). В качестве ферментного препарата использовали очищенный в 750 раз препарат глютаминсинтетазы из семян гороха с удельной активностью 27 $\mu\text{мол}$. фосфата на 1 мг белка в 1 мин.; 1 мл ферментного препарата содержал в среднем 0,05 мг белка.

В работе были использованы следующие реактивы: L -моноглутамат натрия и D -глутаминовая кислота фирмы «Аджиомото», АТФ-натриевая соль, этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (ЭДТА) фир-

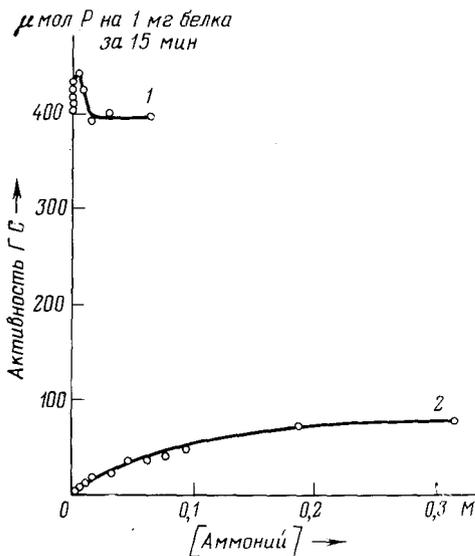


Рис. 1

Рис. 1. Кривые насыщения глутаминсинтетазы аммонием при использовании *L*-глутамата (1) и *D*-глутамата (2) в Mg^{2+} -системе (смесь с Mg^{2+}). [*L*-глутамат] = [*D*-глутамат] = 0,1 M

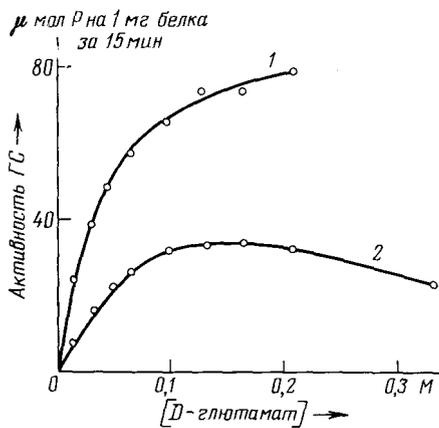


Рис. 2

Рис. 2. Кривые насыщения ГС *D*-глутаматом в Mg^{2+} -системе. Концентрация аммония 0,3 M (1), 0,045 M (2)

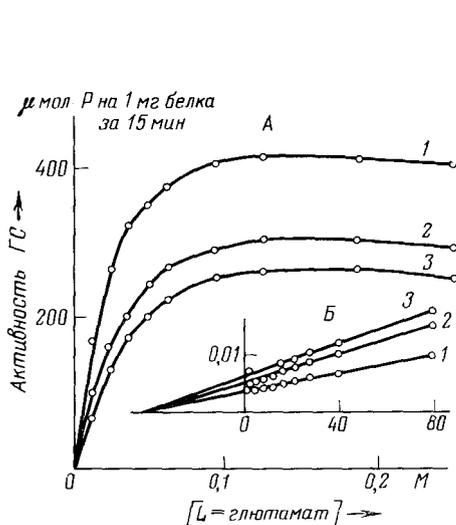


Рис. 3

Рис. 3. Кривые насыщения ГС *L*-глутаматом в присутствии *D*-глутамата и без него в Mg^{2+} -системе в координатах Михаэлиса — Ментен (А) и Лайнвивера — Бёрка (Б). 1 — [*D*-глутамат] = 0; 2 — [*D*-глутамат] = 0,030 M; 3 — [*D*-глутамат] = 0,060 M

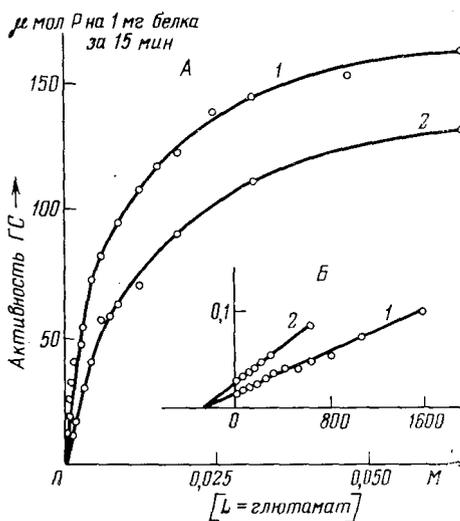


Рис. 4

Рис. 4. Кривые насыщения ГС *L*-глутаматом в присутствии *D*-глутамата и без него в Mn^{2+} -системе (смесь с Mn^{2+}) в координатах Михаэлиса — Ментен (А) и Лайнвивера — Бёрка (Б). 1 — [*D*-глутамат] = 0; 2 — [*D*-глутамат] = 0,006 M

мы «Reanal», $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ фирмы «Laborchemie Arola». Остальные реактивы — отечественные высокой степени чистоты.

Определение активности ГС с *D*-глутаматом, вместо *L*-глутамата, показало, что активность ГС в этом случае составляет 10% от активности с *L*-глутаматом в присутствии Mg^{2+} и равна нулю в присутствии Mn^{2+} .

В этом отношении ГС из семян гороха отличается от ГС из *V. subtilis*, которая катализирует реакцию синтеза *D*-глутамина только в присутствии Mn^{2+} .

На рис. 1 представлены кривые насыщения субстратом ГС для аммония при использовании *L*- и *D*-глутамата. Как видно из рис. 1, при увеличении концентрации аммония активность ГС с *D*-глутаматом хотя и возрастает, но остается значительно ниже активности фермента с *L*-глутаматом. Кривые, кроме того, имеют различный характер, а именно, в случае *D*-глутамата не достигалось насыщение субстратом — аммонием, в пределах его концентрации до $0,3 M$, в то время как в присутствии *L*-глутамата концентрация NH_4^+ $10^{-3} M$ является насыщающей.

На рис. 2 представлены кривые насыщения для *D*-глутаминовой кислоты с двумя концентрациями аммония. При низкой концентрации аммония увеличение концентрации *D*-глутамата выше оптимальной приводит к уменьшению скорости реакции, в то время как при концентрации NH_4^+ $0,3 M$ кривая насыщения близка к гиперболе. На основании данных, представленных на рис. 1 и 2, можно предполагать, что аммоний или облегчает присоединение *D*-глутамата к ферменту, или именно концентрация NH_4^+ лимитирует скорость реакции на второй, более оптически специфичной, стадии синтеза глутамина — при взаимодействии активированного глутамата с NH_4^+ (4). На рис. 3 представлены кривые насыщения ГС субстратом для *L*-глутамата с Mg^{2+} в присутствии *D*-глутамата и без него. Как можно видеть из приведенных данных, *D*-глутаминовая кислота снижает скорость реакции с *L*-глутаматом. Характер зависимости между скоростью реакции и концентрацией *L*-глутамата в присутствии *D*-глутамата и без него в координатах Лайнвивера — Бёрка указывает на то, что ингибирование *D*-глутаматом неконкурентно.

На рис. 4 представлено влияние *D*-глутаминовой кислоты на активность фермента с *L*-глутаминовой кислотой в опытной смеси, содержащей Mn^{2+} . Как видно из рисунка, *D*-глутаминовая кислота и в этом случае снижает активность фермента, однако более значительно, чем в опытной смеси, содержащей Mg^{2+} . *D*-глутаминовая кислота и в этом случае является неконкурентным ингибитором активности фермента с *L*-глутаматом.

Полученные данные дают возможность предполагать, что, по сравнению с ГС из мозга овцы, на молекуле ГС из семян гороха есть специфический центр связывания *D*-глутаминовой кислоты, отличающийся от центра связывания *L*-глутаминовой кислоты. Вместе с тем нужно отметить, что два основных фермента, участвующих в процессе ассимиляции аммония растениями — глутаматдегидрогеназа и глутаминсинтетаза обнаруживают различную стереоспецифичность по отношению к *L*- и *D*-формам глутаминовой кислоты, поскольку по данным нашей лаборатории (5) растительная глутаматдегидрогеназа полностью не активна с *D*-глутаминовой кислотой.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Levintow, A. Meister, J. Am. Chem. Soc., 75, 12, 3039 (1953). ² A. Meister, Adv. Enzymol., 31, 183 (1968). ³ T. F. Deuel, E. R. Stadtman, J. Biol. Chem., 245, 20, 5206 (1970). ⁴ А. В. Пушкин, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Прикл. биохим. и микробиол., 8, 86 (1972). ⁵ В. И. Яковлева, В. Л. Кретович, М. К. Гильманов, Биохимия, 29, 5, 896 (1962).