

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

ВЛИЯНИЕ МАГНИЯ И МАРГАНЦА НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮТАМИНСИНТЕТАЗЫ ИЗ СЕМЯН ГОРОХА

Глутаминсинтетаза (ГС) (Н.Ф. 6.3.1.2.) — один из ключевых ферментов азотного обмена растений, микроорганизмов и животных — катализирует синтез глутамина из глутаминовой кислоты и аммония в присутствии АТФ и ионов Me^{2+} :



В работах (¹⁻¹⁰) и других исследователей было изучено влияние ионов Me^{2+} на активность ГС животного, растительного и бактериального происхождения. Из этих работ можно сделать вывод о том, что ионы металлов необходимы как для образования активной конформации фермента, так и для участия непосредственно в каталитическом процессе в виде комплекса металла с АТФ. В недавно вышедших работах Гинзбург (^{11, 12}) было показано, что присоединение Mg^{2+} и Mn^{2+} к ГС из *E. coli* происходит в течение определенного промежутка времени, причем на ферменте можно выделить два вида центров для связывания как Mg^{2+} , так и Mn^{2+} , которые различаются по степени сродства к данному катиону металла. Для ГС из семян гороха было установлено (⁹), что Mn^{2+} имеет значительно более высокое сродство к ферменту, чем Mg^{2+} ; в то же время ГС гороха в присутствии Mg^{2+} в 3 раза активнее, чем с Mn^{2+} . Кроме того, было показано, что активирование ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} зависит от соотношения концентраций катиона металла и АТФ, а именно: для Mn^{2+} и АТФ оптимальным является соотношение их концентраций 1:1, для Mg^{2+} и АТФ 5:1.

Активность ГС гороха ингибируется при добавлении Mn^{2+} в опытную смесь, содержащую Mg^{2+} , причем это ингибирование происходит не за счет уменьшения концентрации комплекса Mg^{2+} — АТФ (⁹).

Аналогичный эффект наблюдается и при добавлении Mg^{2+} в смесь, оптимальную для проявления активности с Mn^{2+} .

Совокупность приведенных выше данных о характере активирующего действия Mg^{2+} и Mn^{2+} свидетельствует в пользу существования двух конформаций ГС — одна конформация существует и активна в присутствии Mg^{2+} , другая — Mn^{2+} .

Поскольку клетка, как правило, содержит как Mg^{2+} , так и Mn^{2+} , изучение активирования ГС при одновременном присутствии Mg^{2+} и Mn^{2+} в опытной смеси представляет определенный интерес.

Данная работа посвящена исследованию влияния Mg^{2+} и Mn^{2+} при одновременном их присутствии в опытной смеси на активность ГС из семян гороха. Были использованы различные количественные соотношения Mg^{2+} и Mn^{2+} и определены для них соответствующие оптимумы pH.

Определение активности ГС проводили по образованию ортофосфата (¹³), выделяющегося в эквимоллярных количествах с глутамином в реакции (1). В качестве ферментного препарата использовали очищенный в 750 раз препарат фермента из семян гороха с удельной активностью 400 $\mu\text{мол}$ ортофосфата на 1 мг белка за 15 мин. 1 мл ферментного препарата содержал в среднем 0,05 мг белка.

Инкубационная смесь для определения активности ГС в присутствии Mg^{2+} состояла из: 0,125 *M* трис- HCl буфера; 0,0625 *M* моноглутамата Na ; 0,0625 *M* NH_4Cl ; 0,00625 *M* АТФ; 0,030 *M* $MgSO_4$, ферментного препарата в количестве, необходимом для образования 0,04—0,8 μ мол фосфата в пробе объемом 1,6 мл за 15 мин. инкубации при 37°; pH инкубационной смеси 7,2.

Инкубационная смесь для определения активности энзима в присутствии Mn^{2+} состояла из: 0,125 *M* трис- HCl буфера; 0,0625 *M* моноглутамата Na ; 0,0625 *M* NH_4Cl ; 0,0016 *M* АТФ; 0,0016 *M* $MnSO_4$; ферментного препа-

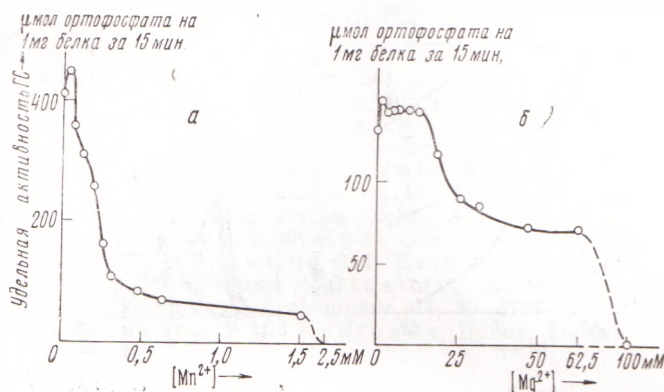


Рис. 1. Влияние Mn^{2+} (а) и Mg^{2+} (б) на активность ГС гороха

рата в количестве, необходимом для образования 0,04—0,8 μ мол фосфата в пробе объемом 1,6 мл за 15 мин. инкубации при 37°; pH инкубационной смеси 5,5.

В работе были использованы следующие реактивы: *L*-моноглутамат Na фирмы «Адзеномото», АТФ — натриевая соль, этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль (ЭДТА) фирмы «Reanal»; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ фирмы «Laborchemie Apolda».

На рис. 1а представлена кривая зависимости ГС от концентрации Mn^{2+} , добавленного в инкубационную смесь, оптимальную для проявления активности с Mg^{2+} , т. е. содержащую 30 мМ Mg^{2+} . Как видно из рисунка, Mn^{2+} в концентрации 0,03 мМ вызывает активирование фермента. Однако при концентрации Mn^{2+} выше 0,03 мМ, происходит резкое падение активности ГС до 25% от исходной, после чего при дальнейшем повышении концентрации Mn^{2+} активность уменьшается значительно медленнее.

На рис. 1б представлена кривая зависимости активности ГС от концентрации Mg^{2+} , добавленного в инкубационную смесь, оптимальную для проявления активности с Mn^{2+} , т. е. содержащую 1,6 мМ Mn^{2+} . Как видно из рисунка, Mg^{2+} при его концентрации до 1 мМ вызывает увеличение активности фермента, однако дальнейшее увеличение концентрации этого катиона в инкубационной смеси вызывает падение активности ГС и при концентрации Mg^{2+} 100 мМ активность энзима равна 0.

Из сравнения данных, представленных на рис. 1а, б, можно видеть, что активность ГС в присутствии Mg^{2+} примерно в три раза выше, чем в присутствии Mn^{2+} . Добавление незначительных количеств другого катиона в обоих случаях приводит к некоторому возрастанию активности, но дальнейшее увеличение концентрации добавляемого катиона вызывает ингибирование фермента.

Можно думать, что ингибирование, наблюдаемое при добавлении Mn^{2+} в опытную смесь, содержащую Mg^{2+} , обусловлено изменением конформации ГС, в то время как ингибирование, наблюдаемое при добавлении Mg^{2+} в смесь с Mn^{2+} , связано и с изменением конформации энзима, и с на-

рушением соотношения концентраций Mg^{2+} и АТФ за счет конкуренции между Mg^{2+} и Mn^{2+} за связывание АТФ. Эти предположения основаны на том, что количества добавляемого Mn^{2+} (рис. 1) значительно меньше, чем количества присутствующего Mg^{2+} , и Mn^{2+} практически не может влиять на соотношение концентраций Mg^{2+} и АТФ. При добавлении же Mg^{2+} в смесь, оптимальную для проявления активности ГС с Mn^{2+} , уменьшение активности происходит при концентрациях Mg^{2+} много больших,

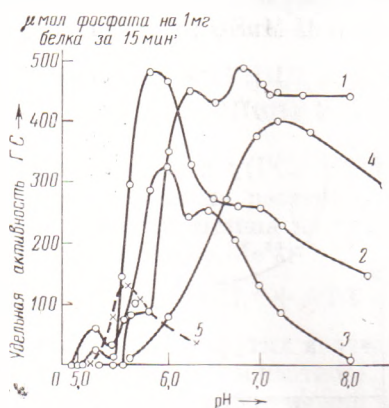


Рис. 2

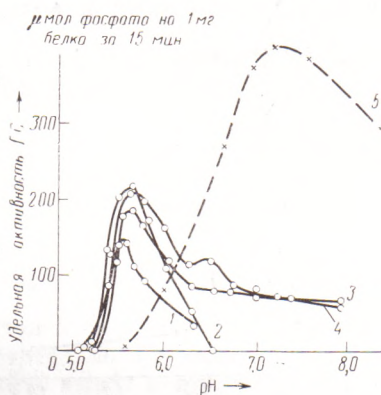


Рис. 3

Рис. 2. pH-кривые для смеси, оптимальной для проявления активности с Mg^{2+} , содержащей добавки Mn^{2+} . 1 — $[\text{Mg}^{2+}] = 30 \text{ мМ}$; $[\text{Mn}^{2+}] = 0,03 \text{ мМ}$; $[\text{АТФ}] = 6,25 \text{ мМ}$; 2 — 30; 0,125; 6,25; 3 — 30; 0,625; 6,25; 4 — 30; 0; 6,25; 5 — 0; 1,6; 1,6

Рис. 3. pH-кривые для смеси, оптимальной для проявления активности с Mn^{2+} , содержащей добавки Mg^{2+} . 1 — $[\text{Mn}^{2+}] = 1,6 \text{ мМ}$; $[\text{Mg}^{2+}] = 0 \text{ мМ}$; $[\text{АТФ}] = 1,6 \text{ мМ}$; 2 — 1,6; 1,6; 1,6; 3 — 1,6; 18,75; 1,6; 4 — 1,6; 62,5; 1,6; 5 — 0; 30; 6,25

чем концентрация Mn^{2+} , что заставляет учитывать возможное падение активности энзима из-за уменьшения концентрации комплекса Mn^{2+} — АТФ.

Из данных, приведенных на рис. 2 и 3, можно видеть, что при одновременном присутствии в опытной смеси Mg^{2+} и Mn^{2+} происходит не только изменение активности ГС по сравнению с активностью в смеси с одним катионом, отмеченное выше, но и смещение оптимумов pH в область более физиологических значений этого показателя. Так, оптимум pH для ГС, активируемой Mg^{2+} , при добавлении Mn^{2+} сдвигается из слабощелочной области в слабокислую, а для ГС, активируемой Mn^{2+} , при добавлении Mg^{2+} наблюдается изменение оптимума pH в обратном направлении. Проведенные нами определения содержания Mg и Mn в семенах гороха методом эмиссионного спектрального анализа * показали, что количество Mg примерно в 150 раз выше, чем количество Mn, что в какой-то мере коррелирует с соотношением концентраций этих катионов, используемых нами в опытах.

Как известно, Mg^{2+} и Mn^{2+} могут взаимозаменять друг друга в качестве кофакторов ряда ферментов. Наши данные показывают, что одновременное присутствие в опытной смеси обоих кофакторов Mg^{2+} и Mn^{2+} может оказывать и активирующее, и ингибирующее действие на ГС из семян гороха, что, безусловно, имеет значение для внутриклеточной регуляции активности ГС. Характер действия зависит от соотношения концентраций катионов этих металлов. Интересно отметить, что увеличение

* Анализ сделан на кафедре биохимии и зерноведения Московского технологического института пищевой промышленности В. Киреевым.

активности ГС в смеси с двумя катионами по сравнению со смесью с одним происходит при постоянной концентрации АТФ. В условиях активирующего действия двух кофакторов оптимумы рН для Mg^{2+} -смеси и для Mn^{2+} -смеси сдвинуты в область более физиологических значений рН.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Московский технологический институт
пищевой промышленности

Поступило
7 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. S. Hubbard, E. R. Stadtman, J. Bacteriol., **94**, 4, 1007 (1967). ² T. F. Deuel, E. R. Stadtman, J. Biol. Chem., **245**, 20, 5206 (1970). ³ C. A. Woolfolk, B. Shapiro, E. R. Stadtman, Biochem. Biophys. Res. Commun., **116**, 177 (1966). ⁴ S. S. Tate, A. Meister, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **68**, 4, 781 (1971). ⁵ E. M. Lignowski, W. E. Splittstoesser, K. H. Chou, Plant and Cell Physiol., **12**, 733 (1971). ⁶ T. Kanamori, H. Matsumoto, Arch. Biochem. and Biophys., **125**, 404 (1972). ⁷ W. H. Elliott, Biochem. J., **49**, 106 (1951). ⁸ K. Schnackerz, L. Jaenicke, Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem., **347**, 1-3, 127 (1966). ⁹ З. Г. Евстигнеева, А. В. Пушкин, В. Л. Кретович, Физиол. раст., **19**, 4, 729 (1972). ¹⁰ В. Л. Кретович, Е. А. Громыко, З. Г. Евстигнеева, ДАН, **207**, № 6, 1479 (1972). ¹¹ J. B. Hunt, P. D. Ross, A. Ginsburg, Biochemistry, **11**, 20, 3716 (1972). ¹² J. B. Hunt, A. Ginsburg, Biochemistry, **11**, 20, 3723 (1972). ¹³ А. В. Пушкин, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Прикл. биохим. микробиол., **8**, 86 (1972).