

Н. Д. АЛЕХИНА, С. С. АНДРЕЕНКО

ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КОРНЯХ КУКУРУЗЫ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 30 XI 1971)

В настоящее время интенсивно изучаются пути превращения и обмен минерального азота и небелковых азотсодержащих органических соединений в растительном организме. Установлено, что в тканях растений основным путем включения минерального азота в органические соединения является образование глутаминовой кислоты в реакции восстановительного аминирования α -кетоглутарата. Показано также, что путем восстановительного аминирования в растениях может синтезироваться ряд других аминокислот (аланин, серин, глицин, валин) ⁽²⁾. При определенных условиях, например, при недостатке органических акцепторов, значительная часть поступающих извне минеральных соединений азота может связываться в результате синтеза глутамина ⁽³⁾.

Получены данные, позволяющие более или менее полно биохимически характеризовать растительную глутаматдегидрогеназу (КФ 1. 4.1. 2—4) ⁽⁶⁾. Однако данных физиологического характера, дающих представление о функционировании этого фермента в растениях, пока мало. Было найдено, что активность глутамат-ДГ, рассчитанная на единицу белка, в корнях кукурузы примерно в два раза выше, чем в надземных органах ⁽⁷⁾. Определение активности глутамат-ДГ по зонам роста корня кукурузы показало, что по мере дифференцировки клеток удельная активность фермента увеличивается и достигает максимума в поглощающей части корня, т. е. в зоне корневых волосков ⁽⁵⁾.

Нами ранее было показано, что в корнях кукурузы при пониженной температуре замедляются процессы включения тяжелого изотопа в аминную группу аминокислот. Одной из причин снижения скорости образования аминокислоты может быть уменьшение активности фермента, катализирующего процессы синтеза.

В настоящей работе приводятся результаты определения активности глутамат-ДГ в корнях кукурузы, выращенной при различной температуре питательного раствора. В опытах использовали корни 15-дневных проростков кукурузы, выращенных на растворе питательной смеси Приянишникова при 25° (контроль) и 12° (опыт) в зоне корней ⁽¹⁾.

Навеску корней (2 г) замораживали жидким азотом и растирали в фарфоровой ступке. Белки извлекали 0.01 М фосфатным буфером и объем гомогената доводили до 5 мл. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин. при 18 000 g и температуре +2—+4°. Активность глутамат-ДГ определяли в надосадочной жидкости, а также в частично очищенных препаратах белков. Очистку производили следующим образом: 2 мл надосадочной жидкости наносили на колонку с сефадексом Г-25, размером 2,7 × 8 см.

Весь нанесенный белок собирался в двух фракциях общим объемом 5 мл. Часть этого элюата использовали для определения активности фермента, а 3 мл элюата наносили на колонки с сефадексом Г-200 размером 1,8 × 23 см. Активность глутамат-ДГ определяли на спектрофотометре при 340 мμ по уменьшению плотности реакционной среды вследствие восстановительного аминирования α -кетоглутарата ⁽⁷⁾. За единицу

активности фермента было принято такое его количество, которое изменяет плотность реакционной среды по отношению к контролю на 0,001 за 1 мин. в кювете с толщиной поглощающего слоя в 1 см. Удельная активность глутамат-ДГ рассчитывалась на 1 мг белка надосадочной жидкости или элюата. Количество белка в растворе, взятом в качестве источника фермента, по возможности выравнивалось по вариантам опыта. Умножая удельную активность на количество растворимого белка в тканях корня, получали общую глутаматдегидрогеназную активность.

Удельная активность фермента, рассчитанная на единицу белка в 1 мин. растворимого в фосфатном буфере, выше в корнях растений, выращенных при нормальных температурных условиях:

	—ΔE глутамат-ДГ				
25°, контроль	133	120	156	225	164
12°, опыт	127	73	138	170	116

Однако в корнях растений холодного варианта белка, растворимого в фосфатном буфере, примерно в 2,5 раза больше, чем в корнях растений, выращенных при 25°. Поэтому расчет активности (общей) на растворимый белок одного корня показал, что потенциальная возможность растений опытного варианта к осуществлению реакции восстановительного аминирования α-кетоглутарата не ниже, а даже несколько выше, чем у корней контрольных растений:

	—ΔE глутамат-ДГ				
25°, контроль	2121	1472	1424	1712	3075
12°, опыт	2193	1518	1766	1882	3206

Очистка белка надосадочной жидкости от небелковых компонентов на колонке с сефадексом Г-25 приводила к увеличению удельной активности фермента в обоих вариантах опыта, но относительная разница по вариантам опыта сохранялась прежней:

	—ΔE глутамат-ДГ			
Г-25 (25°, контроль)	247	368	282	374
Г-25 (12°, опыт)	223	210	198	268
Г-200 (25°, контроль)	730	416	982	813
Г-200 (12°, опыт)	250	301	733	407

При разделении белков на фракции с различным молекулярным весом было найдено, что глутамат-ДГ активностью обладает только одна фракция белка с молекулярным весом белков меньшим, чем у декстрана синего (м. в. 2 000 000), но значительно большим, чем у гексокиназы (м. в. 102 000). При этом наблюдалось значительное увеличение удельной активности глутамат-ДГ из корней растений контрольного варианта и меньшее увеличение активности фермента из корней растений опытного варианта.

Это можно объяснить разными причинами. Можно предполагать, что в данной фракции элюата относительное содержание белка фермента различно по вариантам опыта. Это подтверждается результатами определения количества белка в данной фракции элюата с колонки с сефадексом Г-200. Как правило, содержание белка в 1 мл элюата из растений опытного варианта примерно на 50% выше, чем в контроле. Кроме того, не исключено, что разница в удельной активности глутамат-ДГ является отражением действительного снижения активности фермента в растениях при низкой температуре. Было показано, что ионы аммония могут регулировать уровень активности глутамат-ДГ ⁽⁴⁾. При исключении аммония из состава питательной среды активность этого фермента у ряда низших растительных организмов снижается, а внесение аммония в питательный раствор вызывает индуцированный синтез глутамат-ДГ ⁽⁸⁾.

Резкое увеличение удельной активности глутамат-ДГ наблюдалось при

инфильтрации фосфата аммония в ткани корней гороха (⁴). В нашем случае содержание аммонийного азота в тканях растений, выращенных при 12°, ниже, чем в контрольных растениях.

Приводим содержание аммонийного азота в корнях кукурузы (мг на 100 мг сух. веса):

При 25°, контроль	118	125	134	133	132	121	129	122
При 12°, опыт	40	37	35	45	42	42	40	38

Исследование изоэнзиматического состава глутамат-ДГ из различных семян высших растений (⁹, ¹⁰), а также коферментной специфичности глутамат-ДГ из корней кукурузы (⁶) показало, что могут существовать различные изоизомы этого фермента, проявляющие разную степень активности при осуществлении реакций восстановительного аминирования.

Представленные результаты определения удельной активности глутамат-ДГ хорошо согласуются с данными ранее проведенных исследований (¹). Было показано, что содержание аминокислот, в том числе и глутаминовой кислоты, выше в растениях холодного варианта, но скорость включения тяжелого изотопа азота в свободные аминокислоты корней значительно замедляется на холоду. При этом уменьшается включение изотопа азота в глутаминовую кислоту по отношению к другим аминокислотам. В то же время относительно увеличивается включение азота в состав глутамина. Все это вместе взятое, с известной долей достоверности, позволяет предположить, что в зависимости от температурных условий выращивания меняется роль отдельных соединений и путей превращения небелковых форм азота.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
29 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. С. Андреевко, Н. Д. Алехина, Е. Д. Ширшова, Научн. докл. высш. школы, биол. науки, № 10 (1969). ² В. Л. Кретович, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5 (1965). ³ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, К. Б. Асеева, Физиол. раст., 11, № 2 (1964). ⁴ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина, Т. Ш. Ткемаладзе, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5 (1969). ⁵ Р. Т. Поликарпочкина, В кн. Рост и клеточная дифференцировка растений, «Наука», 1967. ⁶ В. И. Яковлева, В. Л. Кретович, В. П. Горетов, Биохимия, 31, № 5 (1961). ⁷ В. И. Яковлева, В. Л. Кретович, М. К. Гильманов, Биохимия, 29, № 3 (1964).