

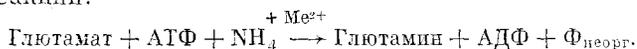
Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Е. А. ГРОМЫКО,
З. Г. ЕВСТИГНЕЕВА

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛЮТАМИНСИНТЕТАЗЫ ХЛОРЕЛЛЫ

Синтез глутамина из глутамата, аммония и АТФ, катализируемый глутаминсинтетазой (6.3.1.2, *L*-глутамат : аммиак — лигаза (АДФ)), имеет первостепенное значение в процессе усвоения растениями неорганического азота (¹⁻³). Как амидный, так и аминный азот глутамина используется в клетках растений (⁴) и микроорганизмов (⁵) для биосинтеза ряда важнейших метаболитов. Таким образом, реакция синтеза глутамина занимает центральное место в азотном метаболизме клетки и играет важную роль в его регуляции (⁶).

Ранее нами из автотрофной хлореллы был получен препарат глутаминсинтетазы. Фермент наиболее активен в присутствии Mg^{2+} , активность с Mn^{2+} в 6—8 раз ниже, чем активность с Mg^{2+} . Оптимум рН с Mg^{2+} 7,0—7,2 с Mn^{2+} 6,0—6,2.

Целью данной работы явилось изучение кинетических свойств глутаминсинтетазы (ГС), выделенной нами из хлореллы и очищенной в 170 раз. Хлорелла была выращена в течение 3 суток на свету на среде Таммля, содержащей нитрат в качестве единственного источника азота. Клетки хлореллы отделяли от питательной среды на суперцентрифуге С-44. После разрушения в дезинтеграторе получали ферментный экстракт центрифугированием при 110 000 *g*. Затем проводили фракционирование сернокислым аммонием. Отделанную фракцию 30—50% $(NH_4)_2SO_4$ наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой-22. Фермент элюировали 0,05 *M* трис-НСI-буфером и хранили при -10° . Активность ГС определяли по образованию фосфата в реакции:



Опытная смесь конечного объема 1 мл имела следующий состав: 0,012 *M* имидазол — НСI-буфер; 0,125 *M* моноглутамат Na; 0,05 *M* NH_4Cl ; 0,005 *M* динатриевая соль АТФ; 0,005 *M* $MnCl_2$ или 0,025 *M* $MgSO_4$; рН опытной смеси с Mg^{2+} 7,2; рН опытной смеси с Mn^{2+} 6,2. Фермент добавляли из расчета, чтобы количество образующегося фосфата было не более 0,6 $\mu\text{мол}$ в пробе. Время инкубации 10 мин. при 37° . Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл свежеряготовленного раствора 0,8% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в 0,3 *N* H_2SO_4 . После этого к реакционной смеси добавляли 0,25 мл раствора, содержащего 6,6% $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ в 7,5 *N* H_2SO_4 ; в течение 10 мин. происходит образование комплексного окрашенного соединения, количество которого определяли спектрофотометрически при 700 $\mu\text{м}$ на СФ-4А.

Опыт и контроль на образование фосфата, не связанное с синтезом глутамина, проводили не менее чем в трех повторностях. Стандартная кривая была построена путем добавления фосфата (KH_2PO_4) в опытную смесь при стандартных условиях. Белок определяли по Лоурри (стандартная кривая построена с использованием бычьего сывороточного альбумина). В процессе очистки фермента белок ориентировочно определяли по поглощению при 280 $\mu\text{м}$ на СФ-4А. Удельную активность выражали в $\mu\text{молях}$ фосфата, образованного за 1 мин. на 1 мг белка.

На рис. 1А, а представлена зависимость скорости реакции синтеза глутамина от концентрации глутамата в присутствии Mg^{2+} . Как можно видеть, полученная кривая имеет гиперболическую форму и в координатах Лайнуивера — Бэрка дает прямую. Константа, полученная на основании этих данных, равна $S_{0,5} = 7,45 \cdot 10^{-3}$.

При активации реакции ионами Mn^{2+} (рис. 1А, б) наблюдается ингибирование при концентрациях глутамата $0,015 M$ и выше. Величина, определенная из графических данных, полученных по Лайнуиверу — Бэрку, равна

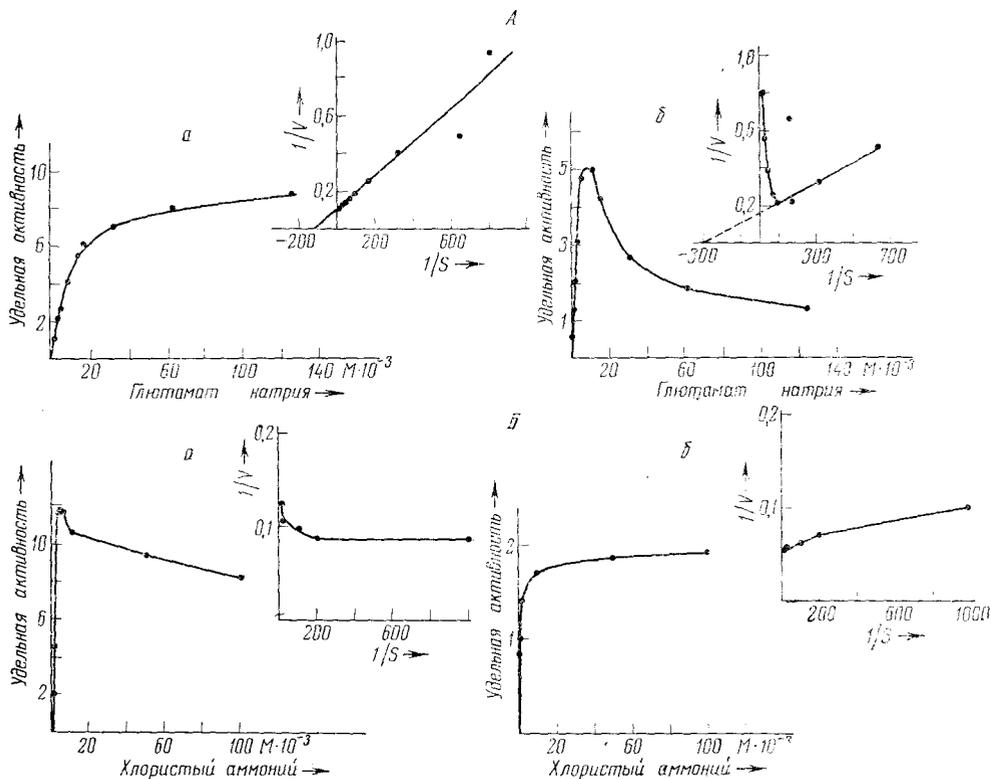


Рис. 1. Зависимость скорости реакции синтеза глутамина от концентрации глутамата (А) и от концентрации аммония (Б). а — в присутствии Mg^{2+} ; б — в присутствии Mn^{2+}

$3,40 \cdot 10^{-3}$, т. е. в присутствии Mn^{2+} сродство данного субстрата к ферменту в 2 раза меньше, чем с Mg^{2+} , и характер зависимости иной.

Таким образом, зависимость активности ГС от концентрации глутамата с Mg^{2+} и Mn^{2+} имеет различный характер: с Mn^{2+} имеет место субстратное ингибирование, с Mg^{2+} кривая зависимости имеет гиперболическую форму.

Зависимость скорости реакции от концентрации аммония при активации Mg^{2+} (рис. 1Б, а) характеризуется высокой активностью ГС при низких концентрациях этого субстрата и ингибированием при концентрациях субстрата выше $3 \cdot 10^{-3} M$. Ориентировочно величина $S_{0,5}$ для малых концентраций данного субстрата равна $1,5 \cdot 10^{-3} M$. Характер зависимости от концентрации аммония в присутствии Mn^{2+} представлен на рис. 1Б, б. Полученные данные в координатах Лайнуивера — Бэрка свидетельствуют о наличии отрицательной кооперативности; $S_{0,5} = 7,5 \cdot 10^{-4} M$.

Таким образом, зависимость скорости реакции синтеза глутамина от концентрации субстратов имеет сложный характер и определяется природой кофактора, активатора-металла, что показано также для ГС *Bacillus subtilis* (7) и ГС из семян гороха (8).

Следует отметить, что ингибирование ГС аммонием (в присутствии Mg^{2+}) имеет физиологическое значение, поскольку таким образом регулируется образование глутамина и расход АТФ. Известно, что у хлореллы, выращенной на аммиаке в качестве единственного источника азота, аммоний индуцирует синтез НАДФ-глутаматдегидрогеназы (⁹, ¹⁰) и ассимиляция аммония осуществляется путем интенсивного синтеза глутаминовой кислоты при одновременном ингибировании и репрессии ГО (¹¹). Однако при низких концентрациях аммония, в пределах $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ М, ГС хлореллы весьма активна и ассимиляция аммония может осуществляться путем интенсивного синтеза глутамина, используемого затем в качестве донора азота в различных биосинтетических процессах.

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

Поступило
17 III 1972

Московский технологический институт
пищевой промышленности

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, К. Б. Асеева, Физиол. раст., 6, 1, 13 (1959). ² В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, К. Б. Асеева, Биохимия, 25, 3, 476 (1960). ³ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, К. Б. Асеева, Физиол. раст., 11, 6, 988 (1964). ⁴ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, ДАН, 93, № 5, 879 (1953). ⁵ С. А. Woolfolk, E. R. Stadtman, Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 4, 313 (1964). ⁶ E. R. Stadtman, B. M. Shapiro et al., Adv. Enzym. Reg., 6, 257 (1967). ⁷ T. F. Deuel, E. R. Stadtman, J. Biol. Chem., 245, 20, 5206 (1970). ⁸ З. Г. Евстигнеева, А. В. Пушкин, В. Л. Кретович, Физиол. раст., 19, № 4, 729 (1972). ⁹ W. L. Kretovich, Z. G. Evstigneeva, N. G. Tomova, Canad. J. Bot., 48, 1179 (1970); В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева, Н. Г. Томова, Биохимия, 35, 278 (1970). ¹⁰ В. Р. Шатилов, Г. С. Калошина, В. Л. Кретович, ДАН, 194, 964 (1970). ¹¹ З. Г. Евстигнеева, К. Б. Асеева и др., Биохимия, 36, в. 2, 388 (1971).