

Ю. Б. ФИЛИПОВИЧ, С. М. КЛУНОВА, Н. И. ЖУКОВА

ПУТИ СИНТЕЗА ГЛАВНЫХ АМИНОКИСЛОТ ШЕЛКА В ШЕЛКООТДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 III 1974)

Соотношение путей биосинтеза глицина, аланина, серина и тирозина, составляющих 90% белков шелкового волокна тутового шелкопряда, изучено крайне неполно. Между тем исследование этого вопроса имеет принципиальное значение для более глубокого понимания как механизма биосинтеза белков шелка, так и путей обеспечения высокой продуктивности шелкопряда. В настоящей работе предпринята попытка количественно оценить вклад различных ферментативных реакций в биосинтез глицина, аланина, серина и тирозина в шелкоотделительной железе тутового шелкопряда с помощью высокоэффективных методов анализа: энзимэлектрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и ионообменной хроматографии с применением автоматического анализатора аминокислот.

В работе использованы образцы целой шелкоотделительной железы и ее фибринового и серицинового отделов гусениц тутового шелкопряда пород Азад и Саниш 21 середины V возраста личиночной фазы и 1-го дня завивки кокона. Получение препаратов шелкоотделительной железы и экстракцию из них ферментов осуществляли в соответствии с прописью, опубликованной ранее (^{1, 2}). Определение активности аланин-глиоксалат-аминотрансферазы, аспартат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), глутамат-пируват-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), серин-оксиметилтрансферазы (КФ 2.1.2.1), треонинальдолазы (КФ 4.1.2.5) и аспартат- β -декарбоксилазы (КФ 4.1.1.12) проводили методом ионообменной хроматографии с использованием аминокислотного анализатора фирмы «Хитачи» (модель KLA-3B). Составы реакционных смесей для выявления активности каждого из перечисленных ферментов подробно описаны в предыдущих статьях (¹⁻³). Количественное содержание образующихся в результате ферментативных реакций соответствующих аминокислот рассчитывали, пользуясь коэффициентами пересчета, полученными при работе со стандартными растворами аминокислот, рекомендуемых фирмой.

Активность ферментов выражали числом микромолей аминокислоты, образующейся в течение 1 мин. при 37°, на 1 мг белка ферментного препарата. Оптимальные для фермента концентрации субстратов и временной интервал, в течение которого кривая $\Delta[S]$ -зависимости имела линейный характер, устанавливали в предварительных опытах. Активность аспартат-кетомалонатаминотрансферазы, аспартат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), оксималонатдегидрогеназы, 3-фосфоглицератдегидрогеназы (КФ 1.1.1.29) и фенилаланингидроксилазы (КФ 1.14.3.1) определяли методом энзимэлектрофореза в ПААГ. Выявление на полиакриламидных колонках аспартат-аминотрансферазы и аспартат-кетомалонатаминотрансферазы проводили по методу Бабсона с сотрудниками (⁴). Для тестирования фенилаланингидроксилазы непосредственно на гелевой колонке осуществляли реакцию сочетания тирозина, возникшего в результате ферментативного окисления фенилаланина, с диазотированным сафранином, который получали по Берстону (⁵). Для обнаружения на колонке белковых зон, обладающих дегидрогеназной активностью, использовали тетразолиевый метод (⁶).

Таблица 1

Активность ферментов аминокислотного обмена в фиброэпителиальном и серициновом отделах шелкоотделительной железы тутового шелкопряда, выявленная на аминокислотном анализаторе (10^{-3} мкмол. аминокислоты на 1 мг белка в 1 мин.) и методом энзимэлектрофореза в ПААГ (усл. ед. по Покровскому и сотр.)

Фермент	Серициновый отдел	Фиброэпителиальный отдел
Аминокислотный анализатор		
Аспартат-β-декарбоксилаза	1,4	2,3
Глутамат-пируватаминотрансфераза	37,5	26,1
Аланин-глиоксалатаминотрансфераза	15,0	47,5
Серин-оксиметилтрансфераза	0,7	1,9
Тренинальдолаза	4,3	7,4
Аспартат-кетоглутаратаминотрансфераза	18,2	18,5
Энзимэлектрофорез в ПААГ		
Оксималонатдегидрогеназа	4,0	11,0
Аспартат-кетомалонат-аминотрансфераза	15,0	10,0
3-Фосфоглицератдегидрогеназа	11,0	23,0
Фенилаланингидроксилаза	—	8,0
Аспартат-кетоглутарат-аминотрансфераза	28,0	31,0

Количественную оценку полученных энзимграмм осуществляли посредством денситометрирования их на микрофотометре МФ-4. Активность ферментов, выявленных методом энзимэлектрофореза в ПААГ, выражали в условных единицах, полученных при аппроксимировании пиков денситограмм по Покровскому с сотрудниками (7).

Экспериментальные данные, характеризующие активность ферментов синтеза глицина, аланина, серина и тирозина, представлены в табл. 1.

Таблица 2

Эффективность различных аминокислот в реакциях переаминирования их с глиоксиловой и пировиноградной кислотами в шелкоотделительной железе тутового шелкопряда

Аминокислота	Активность фермента (10^{-3} мкмол. превращаемого субстрата на 1 мг белка в 1 мин.)	
	глиоксалат-аминотрансфераза	пируват-аминотрансфераза
Аланин	43,6	—
Аспарагин	25,1	16,6
Аспарагиновая кислота	36,7	27,6
Глутамин	25,7	18,8
Глутаминовая кислота	41,4	29,5

Пути синтеза глицина в шелкоотделительной железе весьма разнообразны. Первый из них состоит в переаминировании глиоксиловой кислоты с различными аминокислотами. Наиболее эффективным донором аминокрупп в этих реакциях является аланин (табл. 2); за ним, в порядке убывающей активности, следуют глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глутамин и аспарагин, что вполне согласуется с ранее полученными данными (8). Второй путь новообразования глицина в шелкоотделительной железе состоит в декарбоксилировании аминомалоновой кислоты. Аминомалонатдекарбоксилаза была впервые открыта в экстрактах шелкоотделительной железы тутового шелкопряда, а позднее в небольших количествах най-

дена в тканях других животных. С помощью метода энзимэлектрофореза ПААГ нам впервые удалось обнаружить в тканях шелкопряда НАД-зависимую оксималонатдегидрогеназу и, благодаря этому, полностью охарактеризовать этот весьма экзотический путь синтеза глицина. Он заключает-

ся в окислении оксималоновой кислоты, переаминировании образующегося кетомалоната и последующем декарбоксилировании аминомалоновой кислоты. Третий путь биосинтеза глицина в шелкоотделительной железе заключается в преобразовании серина и треонина (⁹, ¹⁰), однако природа реакций, ведущих к образованию из этих оксиаминокислот глицина, подробно не изучалась. В результате проведенных нами опытов обнаружено, что глицин в шелкоотделительной железе тутового шелкопряда образуется путем расщепления серина и треонина. Первый процесс катализирует серин-оксиметилтрансфераза, кофакторами которой являются пиридоксаль-фосфат и тетрагидрофолиевая кислота. Превращение треонина в глицин осуществляется с помощью треонинальдолазы в присутствии пиридоксаль-фосфата.

Из сопоставленных данных, характеризующих активность всех изученных ферментов синтеза глицина (табл. 1), следует, что реакции декарбоксилирования аминомалоновой кислоты и расщепления серина и треонина в количественном отношении не играют существенной роли в процессах образования глицина. Основным путем синтеза в шелкоотделительной железе глицина является переаминирование первичных аминокислот и их амидов с глиоксиловой кислотой.

Аланин может синтезироваться в шелкоотделительной железе путем переаминирования пирувата и β -декарбоксилирования аспарагиновой кислоты. Из табл. 2 видно, что переаминирование пировиноградной кислоты с глутаминовой протекает более энергично, чем с другими аминокислотами. Аналогичные сведения сообщались ранее (¹¹, ¹²). Наши результаты подтвердили данные Бхимсвара (¹³) о существовании в шелкоотделительной железе аспарат- β -декарбоксилазы, наличие которой опсаривалось в работах Сюй Тин-сэна и Ван Эр-ли (¹⁴). β -Декарбоксилаза аспарагиновой кислоты — единственный пример присутствия этого фермента в животных тканях. В отличие от бактериальных клеток, оптимум pH лежит в слабощелочной зоне, что приближает ее к аминокислотным декарбоксилазам животных тканей. Как следует из табл. 1, деятельность β -декарбоксилазы обеспечивает в шелкоотделительной железе небольшой прирост новообразованного аланина. Основное количество его здесь синтезируется за счет реакции переаминирования пирувата с глутаминовой кислотой.

Важнейшим промежуточным продуктом при биосинтезе серина в шелкоотделительной железе является 3-фосфооксипировиноградная кислота. Она образуется из 3-фосфоглицериновой кислоты под действием НАД-зависимой 3-фосфоглицератдегидрогеназы. Активность этого фермента, выявленная нами методом энзимэлектрофореза в ПААГ, в фибриноном и серициновом отделах шелкоотделительной железы характеризуется высокими значениями. Очевидно, переаминирование фосфооксипировиноградной кислоты с аминокислотами является основным путем синтеза в шелкоотделительной железе серина. В этом убеждают также и опыты, продемонстрировавшие незначительный выход серина у шелкопряда из C^{14} -глицина и C^{14} -треонина (¹⁰, ¹¹).

Установлено, что в организме шелкопряда меченый фенилаланин превращается в тирозин (¹⁵). Однако механизм этого превращения до настоящего времени не был известен. Используя разработанный нами метод, мы обнаружили (табл. 2) в фибриноном отделе шелкоотделительной железы процесс окисления фенилаланина в тирозин, осуществляемый при посредстве фенилаланин-гидроксилазы. Подобно энзиматическим системам млекопитающих донором электронов при этом служит восстановленная фолиевая кислота.

Из сравнительного анализа активности всех исследованных нами ферментов следует, что доминирующими среди них являются аланин-глиоксаламинотрансфераза, глутамат-пируватаминотрансфераза и аспарат-аминотрансфераза. Это еще раз подчеркивает ведущую роль реакций переаминирования в синтезе главных аминокислот шелка. В отличие от

тканей многих других животных, в шелкоотделительной железе тутового шелкопряда активность аспартат-аминотрансферазы вдвое ниже активности двух вышеупомянутых ферментов. Преобладание активности глутамат-пируватаминотрансферазы и аланин-глиоксалатаминотрансферазы отражает специфику аминокислотного обмена в шелкоотделительной железе тутового шелкопряда, заключающуюся в необходимости наработки в V возрасте экстремальных количеств глицина и аланина для обеспечения сборки полипептидных цепей фибрина шелка. В то же время достаточно высокий уровень активности аспартат-аминотрансферазы свидетельствует об универсальной роли ее в шелкоотделительной железе.

Распределение и активность ферментов аминокислотного обмена в фиброинном и серициновом отделах шелкоотделительной железы строго индивидуальны. Так, в переднем отделе шелкоотделительной железы предпочтительное место занимает глутамат-пируватаминотрансфераза, а в заднем — аланин-глиоксалатаминотрансфераза; в отличие от фиброинового отдела в резервуаре в 1-й день завивки кокона совершенно отсутствуют серин-оксиметилтрансфераза и фенилаланингидроксилаза; и, наконец, в разных отделах шелкоотделительной железы вклад оксиаминнокислот в синтез глицина различен. Различия в распределении и активности ферментов аминокислотного обмена связаны с различной функциональной направленностью метаболических процессов в переднем и заднем отделах шелкоотделительной железы, синтезирующих резко различающиеся по аминокислотному составу серицин и фибрин шелка.

Московский государственный
педагогический институт им. В. И. Ленина

Поступило
12 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Н. И. Жукова, С. М. Клунова, Ю. Б. Филиппович, Биохимия насекомых, Сборн., в. 17, М., 1974. ² Н. И. Жукова, С. М. Клунова, Ю. Б. Филиппович, Биохимия насекомых, Сборн., в. 18, М., 1974. ³ С. М. Клунова, Н. И. Жукова, Ю. Б. Филиппович, Биохимия насекомых. Сборн., в. 18, М., 1974. ⁴ A. L. Babson, P. O. Shapiro et al., Clin. chim. acta, v. 7, 2, 199 (1962). ⁵ М. Берсон, Гистохимия ферментов, М., 1965, стр. 97. ⁶ C. L. Markert, F. Moller, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 45, 5, 753 (1952). ⁷ А. А. Покровский, И. Ф. Абраму и др., Лаб. дело, № 1, 8–12 (1971). ⁸ T. Fukuda, T. Hayashi, J. Biochem., v. 45, 7, 469 (1958). ⁹ T. Fukuda, J. Biochem., v. 47, 6, 720 (1960). ¹⁰ S. Bricteux-Gregoire, A. Dewandre, M. Florkin, Arch. Intern. Physiol. et Biochim., v. 68, 2, 281 (1960). ¹¹ Ю. Б. Филиппович, Докторская диссертация, М., 1963. ¹² B. A. Kilby, E. Neville, J. Exp. Biol., v. 34, 2, 276 (1957). ¹³ B. Bheemeswar, Nature, v. 176, 4481, 555 (1955). ¹⁴ Hsu Ting-seng, Wang Er-lee, Acta Biochem. et Biophys. Sinica, v. 4, 3, 329 (1964). ¹⁵ T. Fukuda, Nature, v. 177, № 4505, 429 (1956).