

В. Р. ШАТИЛОВ, М. А. КАСПАРОВА,  
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

**ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЕ НАКОПЛЕНИЕ АЛАНИНА И АКТИВНОСТЬ  
ПИРУВАТКИНАЗЫ В КЛЕТКАХ ХЛОРЕЛЛЫ  
ПРИ АССИМИЛЯЦИИ АММОНИЯ**

Хорошо известно, что уже в первые минуты ассимиляции  $\text{NH}_4^+$  голодавшими по азоту клетками хлореллы происходит быстрое и преимущественное накопление аланина (<sup>1-3</sup>). При ассимиляции  $\text{NO}_3^-$  в наибольшем количестве образуется глутаминовая кислота. Причина такого различия оставалась неясной. Бейкер и Томпсон (<sup>3</sup>) считают, что образование аланина осуществляется путем переаминирования пирувата с глутаминовой кислотой. Этим авторам не удалось обнаружить активность аланиндегидрогеназы. Позднее нами было показано

Т а б л и ц а 1

Влияние  $\text{NH}_4^+$  *in vivo* на аланин-амино-  
трансферазу

Время инкубации на среде с $\text{NH}_4^+$ , час.	Активность		Белок, мг/мл
	мкмол. на 1 мг белка	мкмол/мл	
Контроль	5,3	48,8	9,2
1/4	5,4	49,2	9,1
5	5,5	50,1	9,2

в присутствии этого фермента в клетках *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82Т. Однако роль аланиндегидрогеназы в преимущественном образовании аланина, по видимому, невелика, поскольку опыты с  $\text{N}^{15}\text{H}_4^+$  показали, что включение  $\text{N}^{15}$  происходило в первые минуты главным образом в глутамин и глутаминовую кислоту, а не в аланин (<sup>4</sup>). Таким образом, аланин действительно образуется в основном путем переаминирования. В таком случае, активность аланин-аминотрансферазы должна усиливаться при ассимиляции  $\text{NH}_4^+$ . Это возможно за счет усиления синтеза фермента, его активации или же вследствие возрастания концентрации субстрата, лимитирующего скорость реакции. Таким субстратом является пируват, так как его содержание в клетках хлореллы во много раз меньше, чем содержание глутаминовой кислоты (<sup>2, 3, 5</sup>). Кроме того, концентрация пирувата действительно резко возрастает под влиянием  $\text{NH}_4^+$  (<sup>6, 7</sup>), тогда как содержание глутаминовой кислоты остается довольно стабильным (<sup>1, 3</sup>). Можно предположить, что возрастание концентрации пирувата происходит за счет активации пируваткиназы под влиянием  $\text{NH}_4^+$  (<sup>7</sup>). Однако экспериментально это не было показано. Учитывая перечисленные выше данные, представлялось необходимым выяснить влияние  $\text{NH}_4^+$  *in vivo* и *in vitro* на активность аланин-аминотрансферазы и пируваткиназы. Для этой цели клетки *Ch. pyrenoidosa* Pringsheim 82Т выращивали в фотоавтотрофных условиях на среде Таммий с  $\text{KNO}_3$  как источником азота. Выращенные клетки собирали центрифугированием, промыли дистиллированной водой. Равные весовые количества суспендировали в равных объемах свежей среды, содержащей в одном случае  $\text{NO}_3^-$ , а в другом  $\text{NH}_4^+$  из расчета 69 мг N на 1 л. Инкубацию проводили на свету при продувании смесью воздуха и 1%  $\text{CO}_2$ . Через 15 мин. и 5 час. определяли активность ферментов. В процессе инкубации сдвиг pH, происходящий при ассимиляции  $\text{NH}_4^+$ , компенсировали добавлением концентрированного раствора NaOH. Бесклеточные экстракты получали по ранее описанной методике (<sup>8</sup>), исключая замораживание и ультра-

центрифугирование. Кроме того, для экстракции использовали другую смесь: 0,05 M трис-НСl-буфер, содержащий 1 мМ ЭДТА и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Определение активности аланин-аминотрансферазы проводили следующим образом: 0,2 мл диализованного в течение 5 час. против 0,05 M фосфатного буфера рН 7,4 экстракта предынкубировали с 0,04 мкмол. пиридоксальфосфата в 0,1 M фосфатном буфере рН 8,5 при 37° в течение 10 мин. Затем добавляли 30 мкмол. пирувата Na и 20 мкмол. глутамата Na и продолжали инкубацию еще в течение 20 мин. Общий объем реакционной смеси равнялся 1 мл. После инкубации к смеси добавляли 2 капли ледяной

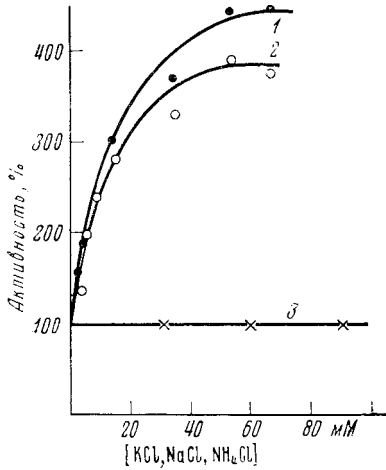


Рис. 1

Рис. 1. Влияние *in vitro* K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> и NH<sub>4</sub><sup>+</sup> на активность пируваткиназы из клеток хлореллы. 1 — KCl, 2 — NH<sub>4</sub>Cl и 3 — NaCl

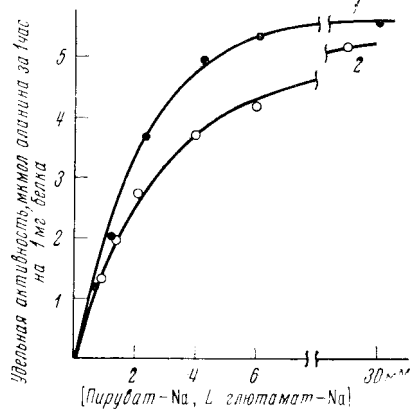


Рис. 2

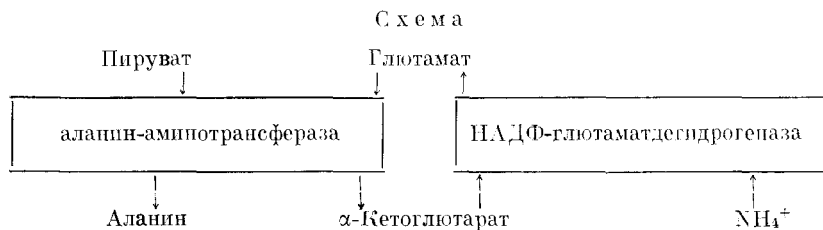
Рис. 2. Зависимость активности аланин-аминотрансферазы от концентрации пирувата (1) и глутамата (2)

CH<sub>3</sub>COOH, прогревали в течение 1 мин. на кипящей водяной бане, охлаждали, удаляли осадок центрифугированием и в надосадочной жидкости определяли количество образовавшегося аланина методом хроматографии на бумаге<sup>(9)</sup>, используя в качестве растворителя смесь этапол — вода в соотношении 95 : 5. Активность рассчитывали как количество мкмолей аланина, образовавшегося за 1 час под влиянием 1 мг белка или 1 мл экстракта. Активность пируваткиназы определяли спектрофотометрически с помощью лактатдегидрогеназы из сердечной мышцы свиньи. Реакционная смесь в объеме 3 мл содержала 1 мкмоль фосфоенолпирувата, 1 мкмоль АДФ, 0,2 мкмоль НАД-Н, 24 мкмоль MgCl<sub>2</sub>, 1, 2 единицы лактатдегидрогеназы и экстракт в 0,05 M трис-НСl-буфере рН 7,4. Старт реакции осуществлялся добавлением фосфоенолпирувата и отсчет производился против смеси без этого субстрата; кроме того, учитывался контроль на фосфатазу (определение в отсутствие АДФ<sup>(11)</sup>). Удельная активность пируваткиназы рассчитывалась как количество мкмолей НАД-Н, окисленных за 1 мин. 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури<sup>(10)</sup>.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что активность аланин-аминотрансферазы практически не изменяется под влиянием NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. На активность фермента *in vitro* NH<sub>4</sub> также практически не оказывал влияния. Следовательно, усиление скорости синтеза аланина не объясняется индукцией или активацией аланин-аминотрансферазы. Принимая это во внимание, вполне определенно можно сказать, что возрастание скорости переминирования пирувата с глутаматом является результатом быстрого и резкого повышения концентрации пирувата, лимитировавшего до этого скорость реакции. Концентрация пирувата увеличивается за счет акти-

вазии пируваткиназы под влиянием  $\text{NH}_4^+$  (рис. 1). На синтез фермента  $\text{NH}_4^+$  не оказывал влияния, что было установлено на синхронной культуре используемого нами штамма хлореллы (<sup>12</sup>). Такое же активирующее действие оказывает  $\text{K}^+$ , в то время как  $\text{Na}^+$  не активировал пируваткиназу. Поскольку содержание пирувата в клетках хлореллы очень низкое, по сравнению с концентрацией глутамата, то колебания в концентрации пирувата будут сильно отражаться на скорости его переаминирования. Это исходит из зависимости активности аланин-аминотрансферазы от концентрации субстратов (рис. 2).

Система, обеспечивающая преимущественный синтез аланина при ассимиляции  $\text{NH}_4^+$ , по-видимому, является одним из узлов механизма, обеспечивающего быстрое связывание последнего. Другим узлом является индуцируемая под влиянием  $\text{NH}_4^+$  НАДФ-глутаматдегидрогеназа (<sup>13</sup>). Согласно работе этих узлов можно представить в виде следующей схемы:



Согласно этой схеме, аланин-аминотрансфераза регенерирует  $\alpha$ -кетоглутарат, необходимый для функционирования индуцируемой глутаматдегидрогеназы как синтетического фермента (<sup>13</sup>). Усиленное образование пирувата обеспечивается пируваткиназой, а другие потребности удовлетворяются за счет усиления фотосинтеза (<sup>14</sup>), пентозофосфатного цикла (<sup>15</sup>) и других процессов под влиянием  $\text{NH}_4^+$ .

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

Поступило  
2 IX 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. S. Reisner, R. K. Gering, J. F. Tompson, *Plant Physiol.*, v. 35, 48 (1960). <sup>2</sup> Н. Г. Томова, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Крегович, *Физиол. раст.*, № 11, 988 (1964). <sup>3</sup> J. E. Basker, J. F. Tompson, *Plant Physiol.*, v. 36, 208 (1961). <sup>4</sup> В. Р. Шапилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Крегович, *ДАН*, т. 178, 482 (1968). <sup>5</sup> В. Р. Шапилов, Н. С. Гейко и др., *ДАН*, т. 172, 731 (1967). <sup>6</sup> T. Kanasawa, M. R. Kirk, J. A. Bassham, *Biochim. et biophys. acta*, v. 205, 401 (1970). <sup>7</sup> T. Kanasawa, M. R. Kirk, J. A. Bassham, *Biochim. et biophys. acta*, v. 256, 656 (1972). <sup>8</sup> В. Р. Шапилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Крегович, *Прикл. биохим. и микробиол.*, т. 2, 667 (1966). <sup>9</sup> Ж. В. Успенская, В. Л. Крегович, *Изд. АН СССР*, 1962. <sup>10</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosenbough et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265 (1951). <sup>11</sup> R. Duggleby, D. T. Dennis, *Plant Physiol.*, v. 52, 312 (1973). <sup>12</sup> N. Tomova, M. Setchenska et al., *FEBS Abstracts*, Varna, 1971, p. 125. <sup>13</sup> В. Р. Шапилов, В. Г. Амбарцумян, В. Л. Крегович, *ДАН*, т. 207, 1229 (1972). <sup>14</sup> P. J. Syrett, *In: Physiol. and Biochem. of Algae*, 1962, p. 171. <sup>15</sup> A. Okuda, Sh. Ida, *Radioisotopes*, v. 11, 195 (1962).