

Биология

УДК 577.15:582.282.23:547.466

Г. Г. ЖАМГАРЯН, Э. А. МАНТАШЯН

**К ВОПРОСУ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В
РЕАКЦИЯХ ПЕРЕНОСА АМИДИНОВОЙ ГРУППЫ С УЧАСТИЕМ
АМИДИНОТРАНСФЕРАЗЫ**

Изучена субстратная специфичность дрожжевой и плесневой амидинотрансферазы на примере ряда штаммов *Saccharomyces cerevisiae* и красной хлебной плесени *Neurospora crassa*. Показана высокая скорость трансамидинирования аргинина дрожжевой амидинотрансферазой с лизинном, β -аланином (штамм Y-512), гамма-аминомасляной кислотой (штамм 2118 Y-50) в качестве амидиноакцепторов. Экстракты *N. crassa* переносят амидиновую группу с высокой скоростью лишь на глицин.

Амидинотрансфераза катализирует обратимый перенос амидиновой группы ($-\text{C}=\text{NH}-\text{NH}_2$) ряда природных гуанидинов, в первую очередь L-аргинина, на некоторые субстраты-акцепторы (глицин). К настоящему времени подробно изучены лишь две амидинотрансферазы: L-аргинин:глицинамидинотрансфераза (КФ 2.1.4.1) (тривиальное название—трансамидиназа), катализирующая первую стадию биосинтеза креатина у позвоночных [1, 2], и L-аргинин:инозамин—II амидинотрансфераза, катализирующая трансамидинирование на двух этапах биосинтеза стрептомицина почвенными бактериями *Streptomyces* [3].

Вместе с тем реакция трансамидинирования может протекать как между аргинином и другими различными амидиноакцепторами, так и между другими донорно-акцепторными парами [2]. Имеются данные о высокой скорости трансамидинирования между аргинином и гидроксиламином у *Str. griseus* [4, 5], аргинином и гамма-аминомасляной кислотой в тканях млекопитающих [6] и в агариковом грибе *Rapuz tigrinus* [7]. В почках свиньи с высокой скоростью осуществляется трансамидинирование между канаванином и орнитинном [8].

Нами сообщалось о выявленной трансамидиназной активности в дрожжах рода *Saccharomyces*, грибах, семенах высших растений [9].

В настоящем сообщении приводятся экспериментальные данные о субстратной специфичности трансамидиназы из дрожжей и плесневого гриба *N. crassa*, обладающих выраженной ферментативной активностью.

Материал и методика. В работе были использованы дрожжи рода *Saccharomyces* и плесневый гриб *Neurospora crassa* ВКМ F-184 из Всесоюзной коллекции микроорганизмов. Способ культивирования культур, экстракция фермента, определение ферментативной активности описаны в предыдущем сообщении [9]. Состав реакционной смеси: 0,5 мл ферментной пробы, 0,5 мл 0,067 М фосфатного буфера pH 7,4 и по

20 мкмоль донорно-акцепторной пары субстратов. В контрольные пробы субстраты добавляли непосредственно перед остановкой реакции. Смесь инкубировали над воздушной фазой при постоянном перемешивании при 37°C. Остановка реакции—10-минутным кипячением. Непрореагировавший аргинин удаляли коммерческим препаратом аргиназы. Трансамидиназная активность выражалась в мкмоль синтезированного гуанидинового производного на 1 г сырой ткани, определяемого по цветной реакции Сакагучи [10]; все приведенные экспериментальные данные статистически достоверны; относительная скорость—в условных единицах: 100—скорость переноса на глицин.

Результаты и обсуждение. Установлено, что трансамидинирование между аргинином и глицином катализируется экстрактами всех изученных дрожжей (табл. 1) Из испытанных других амидиноакцепторов для культуры *Sacch. cerev. Y-512* в 2 раза активнее β-аланин, несколько меньше—лизин. Существенно уступают глицину α-аланин и таурин. Для представленных в таблице культур характерна низкая по сравнению с глицином скорость переноса, прежде всего, с α-аланином, а также с таурином. Для культуры *Sacch. cerev. 2118 Y-50* равноценным с глицином акцептором является гамма-аминомасляная кислота. Для культуры *Sacch. cerev. Y-356* и *Y-63* лизин, α-аланин в качестве субстратов для трансамидиназы непригодны.

Таблица 1
Относительные скорости переноса амидиновой группы дрожжевой трансамидиназой

Объект	Амидино-донор	Амидиноакцепторы					
		Гли	Лиз	α-ала	β-ала	ГАМК	Таурин
<i>Sacch. cerev. Y-512</i>	Аргинин	100	147	23	221	75	22
<i>Sacch. cerev. Y-356</i>		100	24	0	32	30	29
<i>Sacch. cerev. 2123 Y-63</i>		100	0	0	42	25	57
<i>Sacch. cerev. 2118 Y-50</i>		100	67	0	68	105	54

Таблица 2
Субстратная специфичность трансамидиназы из *N. crassa*

Объект	Амидино-донор	Амидино-акцептор	Относительная скорость переноса амидиновой группы
<i>Neurospora</i>	Аргинин	Глицин	100
	» »	ГАМК	36
	» »	β-ала	30
<i>crassa</i>	» »	Таурин	24
	» »	Лизин	22
	» »	Саркозин	20
	» »	α-ала	6

Как показали наши данные, для всех испытанных культур неактивными в качестве амидиноакцепторов субстратами являются L-аспарагиновая кислота, L-валин, N-метилглицин (саркозин), гидроксил-амин. Найдена высокая скорость трансамидинирования между канаванином и орнитинном для всех испытанных культур.

Для трансамидинирования экстрактами из *N. crassa* приемлемой донорно-акцепторной парой является аргинин-глицин (табл. 2). Из ос-

тальных изученных амидиноакцепторов обращает на себя внимание реакция с гамма-аминомасляной кислотой. В отличие от дрожжевой трансамидиназы, а также от других испытанных нами источников фермента микробиологического происхождения, фермент из *N. crassa* способен переносить амидиновую группу аргинина на саркозин.

Согласно литературным данным, трансамидиназы обладают широкой субстратной специфичностью. Показано в частности, что только высокоочищенный препарат L-аргинин:глицинамидинотрансферазы почек свиньи способен переносить амидиновую группу помимо глицина на другие амидиноакцепторы (гамма-аминомасляную кислоту, β -аланин) [6]. Однако Ратнер придерживается иного мнения, а именно— существования трансамидиназ с различной субстратной специфичностью в зависимости от биологического происхождения фермента [2]. С этой точки зрения представляют определенный интерес полученные нами факты относительно участия в реакциях трансамидинирования саркозина и α -аланина в качестве акцепторов амидиновых групп у взятых нами объектов. Между тем установлено, что фермент почек свиньи не обладает подобной возможностью [1]. Таким образом, можно заключить, что исследуемые нами ферменты отличаются характерной субстратной специфичностью. Дальнейшие исследования внесут ясность в вопрос о возможности существования различных трансамидиназ в изучаемых организмах.

*Кафедра биохимии,
проблемная лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии*

Поступила 30.03.1987

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ratner S., Rochovansky O.* Biosynthesis of guanidinoacetic acid. I. Purification and properties of transamidinase. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, v. 63, p. 277.
2. *Ratner S.* Transamidination. — *In The Enzymes*, 1962, v. 6, p. 267.
3. *Walker J. B. and Walker M. S.* Amidinotransferase (*Streptomyces bikiniensis*). — *In Methods in Enzymology*, 1970, v. 17A, p. 1012.
4. *Walker J. B.* Further studies on the mechanism of transamidinase action: transamidination in *Streptomyces griseus*. — *JBC*, 1958, v. 231, p. 1.
5. *Walker J. B.* Amidinotransferases. — *In The Enzymes* 2, 1973, v. 9, p. 497.
6. *Pisano J. J., Abraham D. and Udenfriend S.* Biosynthesis and disposition of γ -guanidinobutyric acid in mammalian tissues. — *Arch. Biochem. Biophys.* 1963. v. 100, p. 323.
7. *Uhlemann A.* Argininstoffwechsel in Fruchtkörpern und Myzel von *Panus tigrinus*. — *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1977, v. 171, p. 33.
8. *Walker J. B.* Biosynthesis of arginine from canavanine and ornithine in kidney, 1956, v. 218, p. 549.
9. *Жамгарян Г. Г., Мангашян Э. А.* Аргинин-глицин трансамидинирование в различных биологических объектах.—*Биол. ж. Армении*, 1986, т. 39, с. 803.
10. *Tomlinson G. and Viswanatha T.* Determination of arginine content of proteins by the Sakaguchi procedure. — *Anal. Biochem.*, 1974, v. 60, p. 15.

Ա մ ֆ ո ֆ ու մ

Ուսումնասիրված է խմորասնկային և բորբոսասնկային ամիդինատրանսֆերազայի սուբստրատային յուրահատկությունը *Saccharomyces cerevisiae*-ի մի քանի շտամների և հացի կարմիր բորբոսասնկի՝ *Neurospora crassa*-ի, օրինակով: Ի հայտ է բերված խմորասնկային ամիդինատրանսֆերազայի արգինինի տրանսամիդինացման մեծ արագություն լիզինի, β -ալանինի (շտամ Y-512) և γ -ամինակարագաթթվի (շտամ 2118 Y-50) հետ որպես ամիդինա-րնդունիչների:

N. crassa-ի մզվածքը ամիդինային խումբը մեծ արագությամբ է տեղափոխում միայն գլիցինի վրա:

Summary

The substrate specificity of yeast and mould amidinotransferase has been studied on the example of a series of *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* strains. High reaction rates of transaminase were shown with lysine, β -alanine (strain Y-512), γ -aminobutyric acid (strain 2118 Y-50) as acceptors. Crude extract of *N. crassa* transfers the amidine group at high rates into glycine only.