

М. Г. КРИЦМАН и О. П. САМАРИНА

АСПАРТИКО-АЛАНИНОВАЯ АМИНОФЕРАЗА

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 IX 1948)

Одним из нас ⁽¹⁾ было показано, что тканевой сок из мышцы сердца свиньи активно катализирует реакцию переаминирования между аспарагиновой и пировиноградной кислотами.

Для действия очищенных и диализованных энзимных препаратов требовалось добавление кипяченого сока из животных тканей или концентрата из последнего, полученного по прописи Браунштейна и Крицман ⁽²⁾.

Эти данные давали основание предположить наличие в упомянутых энзимных препаратах легко диссоциирующей при диализе аспартико-аланиновой аминиферазы.

Грин, Лелуар и Носито ⁽³⁾ при выделении индивидуальных энзимов переаминирования аминодикарбоновых кислот не обнаружили в экстрактах из свиных сердец самостоятельного энзима, аспартико-аланиновой аминиферазы, и высказали предположение, что переаминирование в наших опытах происходило в результате следующих реакций:

1. Глютаминовая кислота + пировиноградная кислота \rightleftharpoons α -кетоглутаровая кислота + аланин.

2. Аспарагиновая кислота + α -кетоглутаровая кислота \rightleftharpoons щавелевоуксусная кислота + глютаминовая кислота.

1 + 2. Аспарагиновая кислота + пировиноградная кислота \rightleftharpoons щавелевоуксусная кислота + аланин.

О'Кэн и Гунсалус ⁽⁴⁾ показали, что концентрат, приготовленный по прописи Браунштейна и Крицман ⁽²⁾, содержит значительное количество глютаминовой кислоты; в связи с этим высказанное Грином с соотр. предположение о ступенчатом пути переаминирования аспарагиновой кислоты заслуживало внимания. Однако это представление трудно согласовалось с фактом, что из ростков гороха могут быть получены препараты, катализирующие переаминирование между аспарагиновой и пировиноградной кислотами, не обладающие способностью осуществлять переаминирование между глютаминовой и пировиноградной кислотами ⁽¹⁾.

Считая вопрос о существовании самостоятельного энзима аспартико-аланиновой аминиферазы нерешенным, мы предприняли выделение этого энзима.

В настоящем сообщении мы приводим некоторые данные, указывающие на наличие в печени голубя и других животных самостоятельной аспартико-аланиновой аминиферазы.

Экспериментальная часть

Исходным материалом для получения энзима служили печень голубя и печень кур.

Энзимные препараты готовились двумя способами.

Один из них состоит в том, что печень голубя (соответственно кур) измельчают в тканевой мельнице, полученную массу экстрагируют 8-кратным объемом воды в течение 30 мин., а затем круто отцентрифуговывают, осадок отбрасывают, фугат подкисляют уксусной кислотой до $pH = 5$; осадок отбрасывают, фугат вторично подкисляют до $pH = 1$, преципитат суспендируют в воде и диализируют против дистиллированной воды 12—16 час. (энзим А).

Таким приемом мы получали энзимные препараты узко специфичные, катализировавшие только переаминирование между аспарагиновой и пировиноградной кислотами.

По другому способу измельченную печень тех же животных обрабатывали дважды 5-кратным объемом ацетона и отсасывали на нуче. 5 г такого ацетонового препарата печени растирали в ступке с 40 мл воды или фосфатного буфера $pH = 7,5$, $1/15 N$ и центрифугировали.

Фугат подкисляли разведенной уксусной кислотой до $pH = 4,8$ и сорбировали на Ca_3PO_4 (беря 2 объема последнего на 1 объем энзимного раствора).

Остаток (фугат) после адсорбции высаливали сернокислым аммонием 70% насыщения, фильтровали, осадок растворяли в воде и диализировали против дистиллированной воды 12—16 час. (энзим Б).

Таким путем были получены энзимные препараты, содержавшие преимущественно аспартико-аланиновую аминотрансферазу. Скорость переаминирования в таких препаратах между глутаминовой и пировиноградной кислотами весьма невелика (опыты №№ 11—12), а в части опытов не обнаруживалась вовсе.

В опытах по переаминированию между аминокислотами и пировиноградной кислотой об активности аминотрансфераз мы судили по образованию аланина, определяемого специфическим методом Александра (5). О переаминировании между аспарагиновой кислотой и

Таблица I

Образование аланина в γ

Состав проб: 2 мл ферментного раствора, 3 мг нейтрализованной аспарагиновой и, соответственно, 3,5 мг глутаминовой кислоты и 8 мг пировиноградной кислоты. Время опыта 2—3 часа, $T = 38^\circ$, объем пробы 4 мл

№ пробы	Объект исследования	Аспарагиновая + пировиноградная кислоты	Глутаминовая + пировиноградная кислоты
1	Экстракт из печени голубя до обработки (очистки)	1700	1620
2		1775	1000
3	То же из печени курицы	1537	1102
4		1245	860
5	Экстракт из печени крысы	390	1300
6		293	862
7	То же из печени свиньи	390	1333
8		390	1440
9	Энзим А из печени голубя	397	0
10		389	0
11	Энзим Б из печени голубя	322	80
12		420	76

α -кетоглутаровой, равно как о наличии в наших препаратах преобразованной глутаминовой кислоты мы судили по данным, полученным методом одномерной хроматографии распределения на бумаге (6).

Данные наших опытов приведены в табл. 1.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, в исходных экстрактах из печени птиц и других животных происходит переаминирование обеих аминокислот в присутствии пировиноградной кислоты, причем в экстрактах из печени крыс интенсивность образования аланина из глутаминовой и аспарагиновой кислот в результате переаминирования их с пировиноградной кислотой практически одинакова.

В экстрактах из печени крыс и свиней переаминирование аспарагиновой кислоты протекает весьма медленно по сравнению с глутаминовой кислотой. После очистки энзимных препаратов из печени голубя, как видно из опытов (№№ 9—10), переаминирование происходит только между аспарагиновой и пировиноградной кислотами.

Результаты этих опытов дают основание прийти к заключению о наличии в печени узко специфического энзима, катализирующего переаминирование между аспарагиновой и пировиноградной кислотами, и пересмотреть указание Грина с сотр. (3) и О'Кэн (4), что фермент аспартико-аланиновая аминокераза является артефактом и что образование аланина из аспарагиновой кислоты в присутствии пировиноградной является результатом совместного действия глутамино-аспарагиновой и глутамино-аланиновой аминокераз, где глутаминовая кислота служит промежуточным переносчиком аминокерп, тем более, что методом одномерной хроматографии распределения аминокислот на бумаге (6) нами установлено, что диализированные ацетоновые ферментные препараты, даже первой стадии очистки, не содержат глутаминовой кислоты.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
19 VII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Г. Крицман, Биохимия, 4, 691 (1939). ² А. Е. Браунштейн и М. Г. Крицман, Биохимия, 8, 1 (1943). ³ D. E. Green, L. F. Leloir and V. Nocito, J. Biol Chem., 161, 559 (1945). ⁴ D. O' Kane and I. C. Gunsalus, *ibid.*, 170, 425 (1947). ⁵ B. Alexander and A. M. Seligman, *ibid.*, 159, 9 (1945). ⁶ R. Consdan, A. N. Gordon and A. I. P. Martin, Biochem. J., 38, 224 (1944).