

Действительный член Академии медицинских наук А. Е. БРАУНШТЕЙН  
и Г. Я. ВИЛЕНКИНА

### ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ГЛИЦИНА ИЗ СЕРИНА, ТРЕОНИНА И ДРУГИХ ОКСИАМИНОКИСЛОТ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Глицин (гликоколл) легко синтезируется в организме млекопитающих и человека и является в их питании заменимой аминокислотой. При нагрузке бензойной кислотой организм может поставлять для синтеза гиппуровой кислоты от 9 мг глицина в час на 1 кг веса тела у человека до 25 мг/кг·час у кролика. В этих условиях в глицин переходит и выделяется в форме гиппуровой кислоты значительная часть азота, в норме выводимого в виде мочевины (1).

О путях и источниках образования глицина в животном и растительном организме мало достоверных данных. Животные, очевидно, не синтезируют его путем аминирования глиоксильной, гликолевой или уксусной кислот. Кнооп (2) высказывал предположения об образовании глицина путем  $\beta$ -окисления глутаминовой кислоты или  $\beta$ -оксисаминокислот, но не обосновал этих гипотез прямым экспериментом. В опытах с переживающими срезами печени и почек Лейтгардт (3) получил указания на возможность образования гиппуровой кислоты из глутаминна и из серина, в то время как Борсук и Дубнов (4) в аналогичных опытах нашли, что глутаминовая кислота и треонин не заменяют глицина в синтезе гиппуровой кислоты, а из серина и из оксипролина синтезируется продукт, не являющийся гиппуровой кислотой. Шимин (5) вводил крысам и морским свинкам бензойную кислоту вместе с мечеными препаратами аминокислот ( $N^{15}$ -глутаминовой кислотой или  $N^{15}$ -серином, содержавшим  $C^{13}$  в карбоксиле) и установил, что для образования глицинового остатка гиппуровой кислоты активно используется азот, карбоксильный и  $\alpha$ -углерод *L*-серина и, в меньшей степени, азот *L*-глутаминовой кислоты.

Вопрос о механизме и о месте образования глицина в организме оставался нерешенным. Для решения этого вопроса нами впервые применен специфический и чувствительный метод количественного определения глицина, а именно, колориметрический микрометод Александра (6).

Опыты ставились с переживающими срезами, кашицами и ферментными вытяжками из органов различных животных, которые инкубировались при 37° в фосфатных и бикарбонатных буферных растворах (рН = 7,4) без добавок (контрольные пробы) и с исследуемыми аминокислотами. В фильтратах после осаждения белков трихлоруксусной кислотой определялось содержание свободного гликоколла или общего небелкового гликоколла после гидролиза с конц. HCl. В некоторых опытах к срезам добавляли бензойную кислоту и определяли, кроме

общего гликокола, глицин гиппуровой кислоты после экстракции ее эфиром и кислотного гидролиза.

Результаты опытов, сведенные в табл. 1, показывают, что *L*-глутаминовая кислота (0,02 *M*) не вызвала прироста глицина по сравнению с контролем в опытах со срезами почек всех животных и печени крысы или кролика. С тканью печени кошек и морских свинок мы получили непостоянные результаты — во многих опытах образование глицина не выходило за пределы ошибок анализа, но в нескольких случаях был отмечен довольно значительный прирост глицина (и гиппуровой кислоты в пробах, содержащих бензойную кислоту). Вопрос о превращении глутаминовой кислоты в глицин требует поэтому дальнейшего изучения.

С другой стороны, при инкубировании срезов печени и почек всех исследованных животных с *DL*-серинном в 0,02 *M* растворе регулярно наблюдается прирост свободного глицина (и равный по величине прирост общего небелкового глицина), достигающий в печени морской свинки 18  $\mu$ мол на 1 г сырого веса ткани при 2—4-часовой инкубации. Новым и неожиданным фактом явилось то, что те же ткани образуют глицин в значительно больших количествах из незаменимой  $\beta$ -оксиаминокислоты — треонина. Максимальный прирост глицина соответствовал превращению 18% добавленного *DL*-треонина (или 36% в расчете на один оптический изомер).

Таблица 1

Образование глицина из *L*-глутаминовой кислоты, *DL*-серина и *DL*-треонина в срезах почек и печени различных животных

| Вид животных   | Субстрат                       | Прирост глицина в $\mu$ М на 1 г ткани |                           |
|----------------|--------------------------------|--|---------------------------|
|                |                                | Печень                                 | Почки (корковое вещество) |
| Морская свинка | <i>L</i> -глутаминовая кислота | 0,9; 0; 11,5; 9,4                      | 0                         |
| »              | <i>DL</i> -серин               | от 11,3 до 17,8                        | 4,1; 4,0                  |
| »              | <i>DL</i> -треонин             | от 23,5 до 30,5                        | 23,6                      |
| Крыса          | <i>L</i> -глутаминовая кислота | 2,5; 0                                 | 0                         |
| »              | <i>DL</i> -серин               | 4,7; 7,0                               | 5,0                       |
| »              | <i>DL</i> -треонин             | 21,7                                   | 15,0                      |
| Кошка          | <i>L</i> -глутаминовая кислота | 2,5; 10,7                              | 0                         |
| »              | <i>DL</i> -серин               | от 4,8 до 18,5                         | 6,2                       |
| Кролик         | <i>L</i> -глутаминовая кислота | 0,9                                    | 0                         |
| »              | <i>DL</i> -серин               | 4,8                                    | 0                         |
| Голубь         | <i>DL</i> -треонин             | 31,5                                   | 15,8                      |
| Свинья *       | <i>DL</i> -треонин             | 18,9                                   | —                         |

\* Ткань печени, дегидратированная ацетоном.

Опыты, поставленные с рядом чуждых белку  $\beta$ -оксиаминокислот и тканью печени морской свинки, показали, что все эти гомологи серина расщепляются в ткани с образованием глицина, располагаясь по интенсивности превращения в следующий восходящий ряд:

*DL*-оксивалин < *DL*-оксинорвалин < *DL*-серин < *DL*-треонин < *DL*-аллотреонин  
 10  $\mu$ М/г      13  $\mu$ М/г      12—18  $\mu$ М/г      23—30  $\mu$ М/г      33—38  $\mu$ М/г

(Все препараты  $\beta$ -оксиаминокислот были синтезированы проф. М. М. Ботвинник). Ввиду отсутствия препаратов оптически активных оксиаминокислот стереохимическая специфичность ферментной системы не могла быть исследована, но, по данным опытов Шимина (5), в теле живой крысы глицин образуется только из *L*-формы глутаминовой кислоты и серина, но не из *D*-формы.

Другие испытанные нами аминокислоты, а именно, *L*-цистеин, *L*-оксипролин, *L*-пролин, *DL*-аланин, *DL*-аминомасляная кислота, *DL*-валин, *DL*-орнитин, а также *L*-глутамин, не переходят в глицин в срезах печени. В опытах с *DL*-треонином оказались неактивными следующие животные ткани: скелетные мышцы, сердце, мозг, кишечная слизистая, кровь. Небольшие количества глицина образуются из треонина при инкубировании с плазмоллизированными дрожжами.

В противоположность Борсуку и Дубнову (4) мы наблюдали значительное увеличение синтеза гиппуровой кислоты из бензойной кислоты в срезах печени морской свинки и крысы при добавлении серина или треонина. Определение общего небелкового глицина показало при этом, что добавленная бензойная кислота в тканевых срезах и гомогенатах вызывает крайне незначительное повышение образования глицина из предобразованных в печени предшественников и не стимулирует превращения  $\beta$ -оксиаминокислот (и глутаминовой кислоты) в глицин (пример такого опыта приведен в табл. 2). Бензойная кислота, таким образом, не оказывает в переживающей ткани влияния, сравнимого с тем переключением предшественников мочевины на образование глицина, какое наблюдается при нагрузке бензойной кислотой у живых млекопитающих (1).

Таблица 2

Влияние бензойной кислоты на образование глицина из серина в срезах печени морской свинки

| Количество глицина после инкубации в $\mu$ М на 1 г ткани |               |                 |                      |               |                 |
|---|---------------|-----------------|----------------------|---------------|-----------------|
| Без бензойной кислоты                                     |               |                 | С бензойной кислотой |               |                 |
| ткань   | ткань + серин | прирост глицина | ткань                | ткань + серин | прирост глицина |
| 38,0  | 51,0          | 13,0            | 39,6                 | 50,0          | 10,4            |

Дальнейшие опыты (с треонином в качестве субстрата и тканей печени) показали, что исследуемое нами превращение не связано с сохранностью клеточной структуры: образование глицина происходит с неизменной или слегка ослабленной интенсивностью в гомогенизированной ткани, в ткани, дегидратированной ацетоном, а также в водно-солевых, водных и глицериновых вытяжках из свежей, замороженной или высушенной ацетоном ткани печени. Активность свежей печени не снижается при хранении в течение нескольких часов при комнатной температуре или нескольких суток при 0°; активность водной вытяжки в рефрижераторе падает на 50% за 24 часа; кипяченая вытяжка неактивна. Путем осаждения водных вытяжек холодным ацетоном могут быть получены активные, относительно стойкие сухие препараты.

Превращение  $\beta$ -оксиаминокислот в глицин осуществляется, следовательно, водорастворимым, термолабильным и относительно устойчивым энзимом (или системой энзимов), для которого мы, впредь до более детального выяснения его природы и механизма действия, предлагаем провизорное наименование глициногеназа.

В опытах с вытяжкой глициногеназы из ацетонированной печени мы, совместно с Т. С. Пасхиной, идентифицировали продукт расщепления серина и треонина как гликоколл, пользуясь методом хроматографии распределения на фильтровальной бумаге по Кондену, Гордону и Мартину.

В растворах глициногеназы образование глицина из треонина при 37° протекает почти линейно в течение первого часа, значительно снижается во второй час, доходя до 16—18% превращения, и затем прекращается. Величины превращения возрастают с повышением концентрации субстрата до определенного предела (*DL*-серин насыщает глициногеназу полностью при концентрации 0,015 *M*). рН-оптимум глициногеназы — около 7,6—7,8.

Величины расщепления β-оксиаминокислот глициногеназой одинаковы в атмосфере кислорода и в строго анаэробных условиях (табл. 3), причем опыты, поставленные в манометрах Варбурга, показали, что реакция не сопровождается образованием или поглощением газа.

Таблица 3

Образование глицина из треонина в аэробных и анаэробных условиях

| Препараты глициногеназы                                  | Атмосфера      | Прирост глицина в $\mu M$ на 1 г исходной ткани |
|--|----------------|---|
| Срезы печени морской свинки . . . . .                    | O <sub>2</sub> | 23,5; 27  |
| То же . . . . .  | N <sub>2</sub> | 22,5; 24; 23                                    |
| Гомогенат печени голубя . . . . .                        | N <sub>2</sub> | 33,5; 40,5; 45,0                                |
| Экстракт ацетонированной печени морской свинки . . . . . | O <sub>2</sub> | 15,9; 18,9                                      |
| То же . . . . .  | N <sub>2</sub> | 15,9; 18,9                                      |

Повидимому, действие глициногеназы не носит характера окислительной реакции. Полученные нами результаты, таким образом, не согласуются с представлениями Кноопа об отщеплении гликоколла путем β-окисления, хотя они и доказали справедливость его предположения, что β-оксиаминокислоты служат источником образования глицина.

Следует отметить, что в последнее время получены указания на возможность синтеза треонина из глицина в дрожжах (7) и что методом изотопных индикаторов установлено превращение глицина в серин в дрожжах, в гомогенатах печени и в организме живой крысы (8). Наблюдения, которыми мы пока располагаем, не говорят, однако, в пользу непосредственной обратимости действия глициногеназы. Исследование свойств и механизма действия этого энзима нами продолжается.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
14 III 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. Quick. *J. biol. Chem.*, **92**, 65 (1931); L. Terroine et G. Boy, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **63**, 300 (1939). <sup>2</sup> F. Кнооп, *Z. physiol. Chem.*, **89**, 151 (1914); F. Кнооп et al., *ibid.*, **239**, 30 (1936). <sup>3</sup> F. Leuthardt, *ibid.*, **270**, 113 (1941); *Helv. Chim. Acta*, **25**, 245 (1942). <sup>4</sup> H. Borsook and J. Dubnoff, *J. biol. Chem.*, **132**, 307 (1940). <sup>5</sup> D. Shemin, *ibid.*, **162**, 297 (1946). <sup>6</sup> B. Alexander, G. Landwehr and A. Seligman, *ibid.*, **160**, 51 (1945). <sup>7</sup> F. Kögl u. W. Borg. *Z. physiol. Chem.*, **269**, 97 (1941). <sup>8</sup> G. Ehrensward et al., *J. biol. Chem.*, **169**, 759 (1947); T. Winnick et al., *ibid.*, **175**, 127 (1948); W. Sakami, *ibid.*, **176**, 995 (1948).