

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 β -окисления глутаминовой кислоты или β -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 α -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 вызывала 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 μM 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 β -оксиаминокислоты — треонина. Максимальный прирост глицина соответствовал превращению 18% добавленного *DL*-треонина (или 36% в расчете на один оптический изомер).

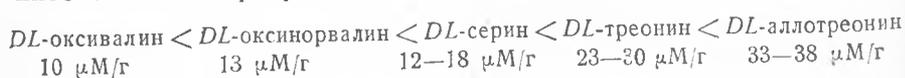
Таблица 1

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

Вид животных	Субстрат	Прирост глицина в μM 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 β -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:



(Все препараты β -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 β -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 μ 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 β -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 μM на 1 г исходной ткани
Срезы печени морской свинки	O ₂	23,5; 27
То же	N ₂	22,5; 24; 23
Гомогенат печени голубя	N ₂	33,5; 40,5; 45,0
Экстракт ацетонированной печени морской свинки	O ₂	15,9; 18,9
То же	N ₂	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

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