

Г. Я. ВИЛЕНКИНА

**О МЕХАНИЗМЕ РАСЩЕПЛЕНИЯ β -ОКСИАМИНОКИСЛОТ
ГЛИЦИНОГЕНАЗОЙ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 IX 1949)

В предшествующей работе А. Е. Браунштейн и автор⁽¹⁾ сообщили об открытии в тканях печени и почек различных животных энзима, расщепляющего серин, треонин и другие β -оксиаминокислоты с образованием глицина и названного глициногеназой.

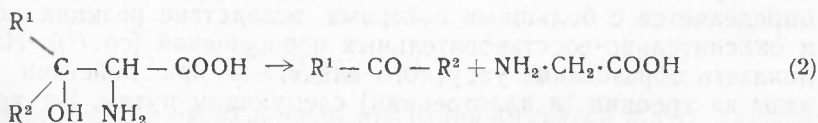
В работе⁽¹⁾ было установлено, что распад β -оксиаминокислот протекает с одинаковой интенсивностью в аэробных и анаэробных условиях. Это обстоятельство противоречит гипотезе Кноопа, согласно которой оксиаминокислоты подвергаются β -окислению с образованием глицина и жирных кислот с укороченной на 2 атома углеродной цепью. К гипотезе Кноопа склоняются и другие авторы, например Шимин⁽²⁾, приводящий в качестве возможного пути превращения серина в глицин в организме животных реакцию по уравнению



Помимо анаэробного характера действия глициногеназы, с данной гипотезой не согласуется также факт отщепления глицина от β -оксисвалина, у которого гидроксил расположен у третичного углеродного атома, что исключает возможность β -окисления по схеме Кноопа.

В целях выяснения характера реакции, катализируемой глициногеназой, мы предприняли исследование природы второго продукта, образующегося из оксиаминокислот под влиянием этого энзима.

В постановке опытов мы исходили из предположения А. Е. Браунштейна о том, что действие глициногеназы протекает по типу реакции альдольного разуплотнения и, следовательно, из β -оксиаминокислот наряду с глицином образуются соответствующие альдегиды или кетоны по схеме:



($\text{R}^1 = \text{H}$ или CH_3 ; $\text{R}^2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_6\text{H}_5$ и т. д.)

Полученные нами экспериментальные данные подтвердили это предположение.

В первую очередь мы исследовали действие глициногеназы на β -оксисвалин, из которого по схеме (2) должен образоваться ацетон. При этом мы руководствовались тем, что ацетон значительно труднее альдегидов подвергается дальнейшим превращениям в ткани печени и рассматривается обычно как конечный продукт обмена (см., одна-

ко, (3)). В качестве фермента был использован гомогенат печени морской свинки.

Как показано в табл. 1, при действии гомогената печени на β -оксивалин образуется ацетон в количестве, составляющем 80—91% от эквивалента отщепленного глицина. Ацетон был идентифицирован и определен количественно посредством специфической цветной реакции с салициловым альдегидом по методу Бере (4)).

Таблица 1

Продукты расщепления β -оксиаминокислот глициногеназой печени морской свинки. (Условия опытов—см. в тексте и в сообщении (1) Все величины выражены в микромолях на 1 г исходного веса ткани печени)

С у б с т р а т ы								
оксивалин			треонин			фенилсерин		
П р о д у к т ы р е а к ц и и								
ацетон		глицин		уксусный альдегид		бен-зальдегид		глицин
контроль без суб-страта	опыт	при-рост	при-рост	контроль без суб-страта	опыт	при-рост	опыт	при-рост
2,6	6,0	3,4	3,9					
1,6	7,5	5,9	7,3	0	11,0	29,1	++++	9,6
2,6	8,6	6,0	6,6	0	7,0	30,6	++++	14,0

Более трудную задачу представляло обнаружение и определение альдегидов, образующихся при действии глициногеназы на другие β -оксиаминокислоты. Большая реактивность альдегидов, легко доступных вторичным превращениям, как энзиматическим (дисмутация, окисление), так и спонтанным (окисление, реакции конденсации), не позволяет определить их в присутствии ткани с количественным выходом, даже при использовании приемов, направленных на удаление альдегидов из сферы реакции. От мысли „фиксировать“ альдегид путем добавления к энзиматическим пробам реагентов, связывающих СО-группы, пришлось отказаться ввиду токсического действия этих реагентов на глициногеназу (см. ниже). Учитывая общеизвестную трудность открытия формальдегида в присутствии белковых веществ, с которыми он энергично конденсируется, мы воздержались пока от попыток обнаружить его при расщеплении серина.

Уксусный альдегид, добавленный к белковым растворам, также определяется с большими потерями вследствие реакции конденсации и окислительно-восстановительных превращений (ср. (5)). Нам удалось показать образование уксусного альдегида при действии глициногеназы на треонин (и аллотреонин) следующим путем. Во время инкубирования через контрольные и опытные смеси пропускался непрерывный ток азота (или воздуха), увлекавший уксусный альдегид по мере его образования; газ проходил затем через барботер с охлажденным 1% раствором бисульфита. По окончании опыта поглощенный в бисульфите ацетальдегид определялся фотометрически посредством реакции с *p*-оксидифенилом (5). Выход уксусного альдегида в опытах с гомогенатом печени морской свинки соответствовал 25—37% по отношению к приросту глицина (табл. 1).

Для идентификации уксусного альдегида был поставлен аналогичный опыт в более крупном масштабе с аллотреонином и гомогенизи-

рованной суспензией из 5 г печени морской свинки. Раствор бисульфита с поглощенным альдегидом был разложен кипячением с углекислым кальцием в колбе с пришлифованным холодильником; отгоняемый альдегид улавливался в охлажденный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (0,6%) в 2*N* HCl. Выпавший желтый осадок собран на следующий день и перекристаллизован из спирта. Выход 2,4-динитрофенилгидразона ацетальдегида 12,2 мг, или 50 μ M, что соответствует 10 μ M альдегида на 1 г ткани (около 30% от образующегося глицина). Т. пл. гидразона 158—159° (некорр.). Ту же точку плавления дал 2,4-дифенилгидразон, полученный нами из достоверного ацетальдегида (по Мейеру⁽⁷⁾, т. пл. 162°). Смесь достоверного и полученного из опытной пробы гидразонов плавилась при 157—158°.

Наконец, нами установлено образование глицина и бензойного альдегида при действии глициногеназы на β -фенил-*DL*-серин*. Энзим образует глицин из фенилсерина с большей скоростью, чем из серина, но медленнее, чем из треонина. Бензальдегид был обнаружен по резкому запаху горького миндаля, который появлялся в суспензиях гомогената печени при инкубировании с фенилсеринном. Идентифицирован он был микрохимически в виде *p*-нитрофенилгидразона.

Инкубирование при 37° производилось в диффузионных приборчиках Конвея с раствором *p*-нитрофенилгидразона (в разбавленной H₂SO₄) в центральном резервуаре. На поверхности этого раствора образовались коричневато-желтые кристаллы, имеющие под микроскопом характерный вид перистых (папоротникообразных) агрегатов из уплощенных изогнутых игл, совпадающих по форме с достоверным *p*-нитрофенилгидразоном бензальдегида, полученным в тех же условиях.

В предварительных опытах по изучению влияния различных химических агентов на активность глициногеназы мы обнаружили интенсивное торможение при добавлении реактивов, блокирующих СО-группы. Бисульфит ($5 \cdot 10^{-3}$ M), семикарбазид и гидроксилламин в концентрациях 10^{-3} M полностью задерживают действие глициногеназы, что указывает на наличие карбонильной группировки в активной группе энзима.

Этим признаком, как известно, характеризуется ряд энзимов, простетической составляющей которых служит фосфопиридоксаль⁽⁸⁾. Ввиду этого, нами была испытана активность глициногеназы в печени крыс с резко выраженными признаками В₆-авитаминоза, содержащихся 2,5 мес. на синтетическом рационе без витамина В₆⁽⁸⁾. Опыты показали, что гомогенаты печени нормальных и В₆-авитаминозных крыс расщепляют β -оксиаминокислоты с одинаковой интенсивностью. Таким образом, мы не получили данных, которые говорили бы в пользу того, что глициногеназа принадлежит к энзимам с пиридоксальной простетической группой.

Выводы

1. Расщепление β -оксиаминокислот глициногеназой носит характер реакции альдольного разуплотнения. Наряду с глицином из β -окси-валина образуется ацетон, из треонина и аллотреонина — уксусный альдегид, из β -фенилсерина — бензойный альдегид.
2. Реагенты на карбонильную группу (бисульфит, семикарбазид, гидроксилламин) резко тормозят действие глициногеназы.
3. Экспериментальный В₆-авитаминоз не сопровождается снижением активности глициногеназы в печени крысы.

* Препарат фенилсерина любезно предоставлен нам проф. М. М. Ботвинник.

Приношу глубокую благодарность действительному члену Академии медицинских наук СССР А. Е. Браунштейну за руководство работой.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
30 VIII 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Браунштейн и Г. Я. Виленкина, ДАН, 66, 243 (1949).
² D. Shemin, Journ. biol. Chem., 139, 25 (1940). ³ E. Vogek and D. Rittenberg, Journ. biol. Chem., 179, 843 (1949). ⁴ J. A. Behre, Journ. biol. Chem., 136, 14 (1940). ⁵ E. Stotz, Journ. biol. Chem., 148, 585 (1943). ⁶ А. Е. Браунштейн и С. М. Бычков, Биохимия, 8, 234 (1943). ⁷ Г. Мейер, Анализ и определение органических соединений, Л., 1937. ⁸ А. Е. Браунштейн и Е. В. Горяченкова, Биохимия, 14, 163 (1949); А. Е. Браунштейн, ДАН, 65, 715 (1949).