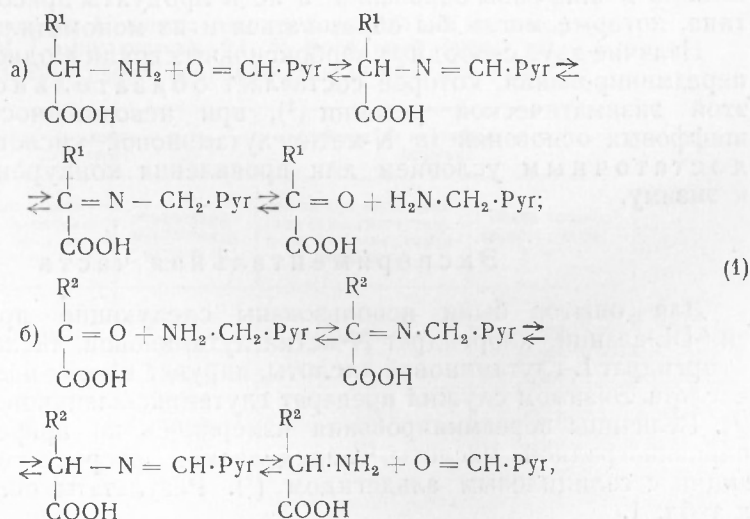


Ц. Д. ОСИПЕНКО

О ХИМИЗМЕ РЕАКЦИИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ПЕРЕАМИНИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ

(Представлено академиком А. И. Опариным 6 IX 1950)

Как известно, простетической группировкой аминофераз — энзимов, осуществляющих открытую А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман (¹) в 1937 г. реакцию переаминирования, служит фосфопиридоксаль (^{2, 3}). В настоящее время большинство исследователей считает, что простетическая группировка аминофераз играет роль промежуточного переносчика аминокрупп при переаминировании. По современным представлениям, реакция переаминирования протекает в две ступени, по схеме 1, где символом $O = CH \cdot Pyr$ обозначен фосфопиридоксаль-протеид (аминофераз)

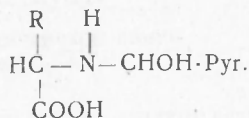


т. е. аминокруппа сначала переносится, путем образования и превращения шиффова основания, на активную группу аминоферазы, образуя фосфопиридоксамин, который, реагируя с кетокислотой, образует новую аминокислоту, причем вновь регенерируется фосфопиридоксаль (^{4, 6}).

В исследованиях с α -дейтероаминокислотами было показано, что при взаимодействии с аминоферазой водород аминокислоты подвергается диссоциации и обмену на водород водной среды (^{5, 6}). Обмен водорода, в соответствии с обратимым характером приведенной выше реакции, протекает и в отсутствие кетокислоты (⁶).

Формулировка промежуточных энзим-субстратных соединений как шиффовых оснований оставалась гипотетической. Нельзя заранее было

исключить возможность, что при энзиматическом переаминировании промежуточные соединения построены иначе, например, по типу гидратированных шиффовых оснований (замещенных альдегид-аммиаков):



Конденсации этого рода возможны и при замещенной аминогруппе, тогда как только незамещенные аминогруппы могут давать шиффовы основания,

Наши опыты касались следующих вопросов:

1. Возможна ли реакция энзиматического переаминирования между N-метиламинокислотами и α -кетокислотами?

2. Могут ли N-метиламинокислоты как структурные аналоги вызывать конкурентное торможение переаминирования одноименных свободных аминокислот?

3. Подвергается ли α -водород N-метиламинокислот диссоциации и обмену в присутствии аминотрансферазы?

Результаты наших экспериментов дали однозначный отрицательный ответ на все три вопроса. Следовательно, замещение на CH_3 -группу одного H-атома в аминогруппе специфических субстратов аминотрансферазы, исключающее возможность образования шиффовых оснований, полностью устраняет и все проявления сродства этих субстратов к энзиму.

Полученные нами данные согласуются с изложенной точкой зрения, что аминокислоты конденсируются с активной СО-группой аминотрансферазы именно в шиффовы основания, а не в продукты присоединения иного типа, которые могли бы образоваться и из монометиламинокислот.

Наличие двух свободных карбоксильных групп в одном из субстратов переаминирования, которое составляет обязательное условие для этой энзиматической реакции (¹), при невозможности образования шиффовых оснований (в N-метилглутаминовой кислоте) не является достаточным условием для проявления конкурентного сродства к энзиму.

Экспериментальная часть

Для опытов были использованы следующие препараты: N-метил-DL-аланин, хлоргидрат N-метилглутаминовой кислоты, DL-аланин, хлоргидрат L-глутаминовой кислоты, пируват натрия и α -кетоглутаровая кислота. Энзимом служил препарат глутамино-аланиновой аминотрансферазы (²). Величины переаминирования измерялись по приросту или убыли пировиноградной кислоты, определяемой посредством цветной реакции с салициловым альдегидом (³). Результаты опытов приведены в табл. 1.

Из этой таблицы видно, что N-метиламинокислоты совершенно не подвергаются переаминированию в условиях, когда с незамещенными аминокислотами энзиматическая реакция доходит до равновесия.

В табл. 2 приведены примеры опытов, из которых видно, что в стандартных энзиматических пробах, в которых протекает переаминирование аланина или глутаминовой кислоты с соответствующими кетокислотами, добавление одноименных N-монометиламинокислот в количестве от 1 до 30 эквивалентов не вызывает ни малейшего торможения энзиматического превращения. Следовательно, N-метиламинокислоты не проявляют к энзиму сродства, за счет которого могло бы произойти конкурентное вытеснение специфического субстрата. Здесь необходимо указать, что первоначальные наблюдения

Таблица 1

Влияние метилирования NH_2 -группы на доступность аминокислот переаминированию

(Состав проб: глутамико-аланиновая аминифераза 8 единиц (?), 0,017 М пируват, соответственно кетоглутарат, 0,017 М N-метил-L-глутаминовая кислота, соответственно 0,034 М N-метил-DL-аланин (или соответствующие аминокислоты), 0,1 М фосфатный буфер; рН 7,3. Объем проб 2 мл. Инкубация 4 часа при 38°)

Субстраты	Образование пировиногр. к-ты в мг на всю пробу	Субстраты	Убыль пировиногр. к-ты в мг на всю пробу
а) Кетоглут. + аланин	+1,52	Пируват + глутамин. к-та .	-1,45
б) Кетоглут. + N-метилаланин	0	Пируват + N-метилглут. к-та	0
а) Кетоглут. + аланин	+1,51	Пируват + глутамин. к-та .	-1,46
б) Кетоглут. + N-метилаланин	0	Пируват + N-метилглут. к-та	0

А. Е. Браунштейна (1) о возможности конкурентного торможения переаминирования различными дикарбоновыми кислотами не получили подтверждения при последующей проверке в его лаборатории с использованием более специфичной методики.

Таблица 2

Влияние N-метиламинокислот на переаминирование свободных аминокислот

(Состав проб: 1 единица аминиферазы; 0,017 М кетокислота; 0,017 М L-аминокислота; 0,1 М фосфатный буфер; рН 7,3. Объем проб 2 мл. Инкубация 15 мин. при 38°)

Субстраты: аланин + кетоглутарат		Субстраты: глутамин. к-та + пируват	
добавлено эквивалентов N-метилаланина на 1 экв. аланина	образование пировиногр. к-ты в мг	добавлено эквивалентов N-метилглутам. к-ты на 1 экв. глутамин. к-ты	убыль пировиногр. к-ты в мг
Контроль	+0,98	Контроль	-0,99
1	0,98	1	0,98
3	0,99	3	0,98
5	0,99	5	0,99
10	0,98	10	0,98
30	0,99	30	0,98

Поведение α -водорода глутаминовой и N-метилглутаминовой кислот в условиях реакции энзиматического переаминирования изучалось следующим образом.

300 мг хлоргидрата N-метилглутаминовой кислоты, нейтрализованного содой, 25 мг пирувата и 30 единиц глутамико-аланиновой аминиферазы (?) инкубировались с фосфатным буфером (0,01 М, рН 7,3) в 4 мл водной среды, содержащей 20% D_2O , при 38° в течение 2,5 час. Из безбелкового фильтра опытной пробы (и контроля, инкубированного без энзима) выделялась N-метилглутаминовая кислота в виде хлоргидрата. После «вымывания» лабильно связанного D повторным растворением в воде и выпариванием и после двух перекристаллизаций хлоргидрат N-метилглутаминовой кислоты (т. пл. 212°) подвергался

сжиганию в токе сухого O_2 . Полученная вода конденсировалась в приемнике, охлажденном сухим льдом с ацетоном, взвешивалась, разводилась 30-кратным количеством обычной воды и очищалась от примесей по методу Бриско⁽⁸⁾. В очищенной воде определялось денсиметрическим методом содержание дейтерия.

Одновременно стабилизировался в идентичных условиях параллельный опыт с незамещенной L-глутаминовой кислотой.

Из результатов этих опытов, представленных в табл. 3, видно, что в условиях, при которых в глутаминовой кислоте обменивался меченый водород 0,56 атома H, что соответствует обновлению α -водорода на 56%, количество дейтерия, внедрившегося в N-метилглутаминовую кислоту, не выходило за пределы погрешности денсиметрического определения.

Таблица 3

Обновление водорода глутаминовой и N-метилглутаминовой кислот в присутствии аминоферазы

Выделенное вещество (субстрат)	Число Н-атомов	D в водной среде в ат. %	Избыток D в водороде вещества в ат. %	Число атомов обменивавшегося стабильно связанного H на молекулу в-ва
Хлоргидрат L-глутамин, к-ты .	10	20	1,12	0,56
Хлоргидрат N-метил-L-глутамин, к-ты	12	20	0,036	0
Контроль: хлоргидрат N-метил-L-глутамин, к-ты без энзима	12	20	0,048	0

Выводы

1. N-метил-L-глутаминовая кислота и N-метил-DL-аланин не подвергаются переаминированию и не тормозят переаминирование одноименных свободных аминокислот.

2. α -водород N-метиলামинокислот не подвергается диссоциации и обмену при инкубации с аминоферазой в среде, содержащей тяжелую воду.

3. Полученные данные подтверждают представление о том, что энзиматическое переаминирование протекает путем конденсации аминокислоты с простетической группировкой энзима в шиффовы основания и перегруппировки последних. Метилирование NH_2 -группы аминокислот, исключающее образование шиффовых оснований, полностью лишает аминокислоту сродства к аминоферазе.

Приношу глубокую благодарность А. Е. Браунштейну за руководство работой и А. С. Кониковой за указания и помощь при постановке изотопных опытов.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
5 IX 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Браунштейн и М. Г. Крицман, Биохимия, **2**, 242, 859 (1937); А. Е. Браунштейн, Сборн. Усп. совр. биохим., **1**, М., 1947, стр. 40.
- ² А. Е. Браунштейн, М. Г. Крицман, О. П. Самарина, Е. Ф. Галей и Н. М. Р. Tomlinson, Биохимия, **11**, 423 (1946). ³ H. C. Lichstein, J. C. Gun-salus and W. W. Umbreit, Journ. Biol. Chem., **161**, 341 (1945); D. E. Green, *ibid.*, **161**, 559 (1948). ⁴ F. Schlenk and A. Fischer, Arch. Biochem., **12**, 69 (1947).
- ⁵ А. С. Коникова, М. Г. Крицман и Р. В. Тейс, Биохимия, **7**, 86 (1942).
- ⁶ А. С. Коникова, Н. Н. Добберт и А. Е. Браунштейн, Биохимия, **12**, 556 (1947). ⁷ P. Lenard and F. B. Straub, Studies from the Inst. of Med. Chem. Univ. of Szeged., **2**, 59 (1942). ⁸ H. J. Emeleus, F. W. James, A. King, T. G. Pearson, R. H. Purcell and H. V. A. Briscoe, Journ. Chem. Soc., **1934**, 1207.