

Ц. Д. ОСИПЕНКО

## О ХИМИЗМЕ РЕАКЦИИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 IX 1950)

Некоторые органы животных, а также ряд растений и бактерий содержат специфические ферменты, декарбоксилирующие определенные аминокислоты *L*-ряда с образованием первичных аминов. В последние годы установлено, что большинство аминокислотных декарбоксилаз представляет собой протеиды фосфопиридоксала (<sup>1-4</sup>); возможно, что исключением является бактериальная гистидин-декарбоксилаза (<sup>4</sup>). Еще до идентификации активной группировки декарбоксилаз на основании отношения этих ферментов к химическим реагентам было высказано мнение о наличии в них карбонильной группы, на конденсации которой с  $\text{NH}_2$ -группой аминокислоты основано образование фермент-субстратного комплекса.

Многое говорит в пользу того, что этот комплекс носит характер шиффового основания, способного к обратимым таутомерным перегруппировкам. При взаимодействии аминокислот с ферментами переаминирования, также принадлежащими к протеидам фосфопиридоксала, образование шиффовых оснований можно считать установленным (<sup>2, 5, 6</sup>). Метилирование  $\text{NH}_2$ -группы аминокислот, исключаящее образование шиффовых оснований, препятствует как переаминированию (<sup>5</sup>), так и декарбоксилированию (<sup>4</sup>).

Декарбоксилирование, наблюдаемое при модельных реакциях между  $\alpha$ -аминокислотами и кетонами (например, при реакциях с аллоксаном или нингидрином) или между  $\alpha$ -кетокислотами и первичными аминами («искусственными карбоксилазами» Лангенбека), обычно объясняют промежуточным образованием шиффовых оснований с двойной связью между  $\alpha$ -углеродом декарбоксилируемой кислоты и азотом, т. е. замещенных  $\alpha$ -иминокислот, в которых связь между карбоксилем и  $\alpha$ -углеродом ослаблена (<sup>2</sup>, стр. 20), как и в незамещенных  $\alpha$ -иминокислотах (Виланд, см. (<sup>2</sup>), стр. 19). С другой стороны, при неэнзиматической реакции переаминирования между  $\alpha$ -аминокислотами и  $\alpha$ -кетокислотами, сопровождающейся отщеплением  $\text{CO}_2$  от аминокислоты, декарбоксилирование и таутомерная перегруппировка шиффового основания, согласно схеме Хербста (<sup>8</sup>), протекают одновременно. Подтверждением этой схемы служат изотопные опыты (<sup>7</sup>), показавшие, что реакция не сопровождается диссоциацией и обновлением водорода, стоявшего при  $\alpha$ -углеводороде аминокислоты (при ферментатическом переаминировании  $\alpha$ -водород обменивается на водород водной среды (<sup>6, 5</sup>)).

В соответствии с упомянутыми модельными реакциями, наиболее вероятные пути ферментатического декарбоксилирования аминокислот могут быть выражены следующими двумя схемами, в которых симво-

лом  $O = CH\text{Pyr}$  обозначен фосфопиридоксальпротеид (декарбоксилаза):

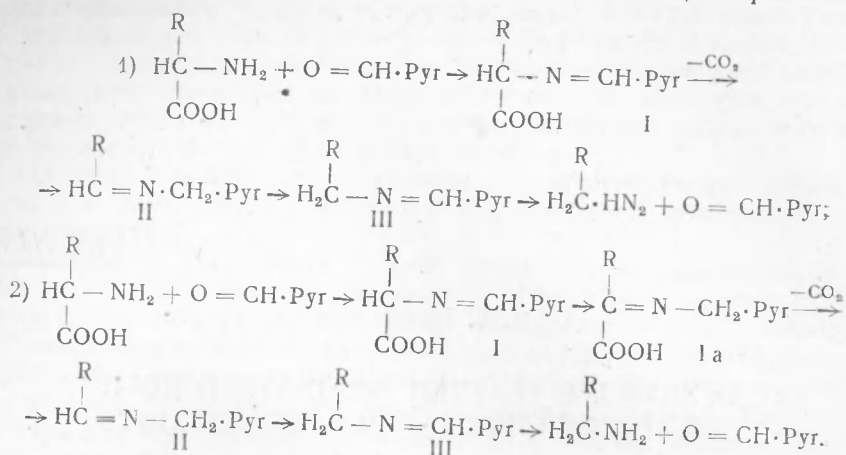


Схема 1 (<sup>2</sup>, ср. 26) представляет непосредственную аналогию механизма неэнзиматического переаминирования по Хербсту (<sup>8</sup>). Схема 2 соответствует химизму расщепления  $\alpha$ -кетокислот «искусственными декарбоксилазами» Лангенбека. Обе схемы предусматривают вторичное таутомерное превращение образующегося замещенного имина ( $\text{II} \rightarrow \text{III}$ ) с последующим гидролизом на амин и фосфопиридоксаль-протеид.

Мы применили для выяснения вопроса о химизме энзиматического декарбоксилирования изотопный индикатор — дейтерий, проводя декарбоксилирование *L*-тирозина тирозин-декарбоксилазой (бактериальной) в среде, содержащей тяжелую воду.

Если процесс декарбоксилирования протекает по схеме 1, то в образующийся тирамин должен входить один атом меченого водорода, в результате диссоциации одного из атомов водорода метиленовой группы кодекарбоксилазы и обмена его на водород водной среды при таутомерном превращении  $\text{II} \rightarrow \text{III}$ . Второй H-атом при углероде, несущем аминогруппу тирамина (исходный  $\alpha$ -водород тирозина), при этом механизме реакции не обменивается.

Согласно схеме 2, при декарбоксилировании тирозина в молекулу должен вступать один меченый атом водорода на место отщепляемого карбоксила (в реакции  $\text{Ia} \rightarrow \text{II}$ ) и второй — указанным выше путем при превращении  $\text{II} \rightarrow \text{III}$ . Таким образом, изотопный состав тирамина, полученного при действии декарбоксилазы, должен отвечать обновлению двух H-атомов за счет водной среды.

Найденное нами содержание дейтерия в тирамине, полученном при энзиматическом декарбоксилировании тирозина в среде тяжелой воды и изолированном в виде *O*, *N*-дibenзоилтирамина, в пересчете соответствовало обновлению 1,80 стабильно связанных H-атомов на молекулу. Истинная величина обновления водорода несколько больше, так как принятое для расчета содержание дейтерия в инкубационной среде немного завышено (по ошибке оно было определено до внесения тирозина и бактериального препарата и не было учтено небольшое разведение D лабильным водородом этих веществ).

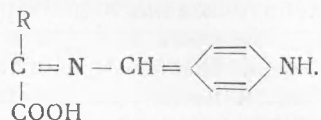
Таким образом, обновление водорода в продукте декарбоксилирования в нашем опыте приближалось к двум атомам на молекулу. Этот результат хорошо согласуется со схемой 2 и позволяет исключить путь реакции, предусмотренной схемой 1, равно как и любой другой механизм декарбоксилирования, при котором  $\alpha$ -водород аминокислоты не диссоциирует и сохраняется в составе образующегося амина (см., например, (<sup>1</sup>)).

В непрореагировавшем тирозине, выделенном из реакционной смеси, содержание избыточного дейтерия почти не выходило за пределы ошибки денсиметрического определения. В тирамине, инкубированном с препаратом декарбоксилазы в параллельном опыте, обновление водорода оказалось крайне незначительным ( $< 0,1$  атома).

Эти два контроля показывают, что кинетические условия процесса декарбоксилирования таковы, что его начальная и конечная фазы (схема 2, реакции  $I \rightarrow Ia$  и  $II \rightarrow III$ ), как и все превращения в целом, протекают практически необратимо.

Эти контроли, кроме того, доказывают, что при определении количества обмениваемого при декарбоксилировании водорода нами не было допущено ошибки в результате недостаточной тщательной отмывки выделенных веществ от лабильно или полулабильно связанного дейтерия и что при инкубировании не происходило лабилизации водорода тирозина или тирамина другими ферментами, присутствующими в бактериальном препарате (например, аминотрансферазами<sup>(6)</sup>).

Нужно указать, что полученные нами данные не решают окончательно вопроса о деталях химизма ферментативного декарбоксилирования. Так, в 1949 г. Верле и Кохом (цит. по<sup>(1)</sup>) предложена схема, отличающаяся от схемы 2 тем, что в ней вместо промежуточного продукта Ia фигурирует другая форма шиффа основания, в которой ядро декарбоксилазы имеет «пиридоидную» форму:



Образование этой структуры, как и продукта Ia, связано с перемещением  $\alpha$ -водорода аминокислоты и, следовательно, также влечет за собой обмен двух H-атомов в образующемся амине. Поскольку «пиридоидная» форма связана со структурой Ia отношениями мезомерии и тоже представляет замещенную  $\alpha$ -аминокислоту, между механизмом реакции, постулированным Верле и Кохом, и схемой 2 нет принципиального различия.

### Экспериментальная часть

К 30 мл ацетатного буфера ( $M/5$ , pH 5,6), содержащего 20%  $D_2O$ , было добавлено 300 мг промытых и обезвоженных ацетоном клеток *Strept. fecalis*<sup>(9)</sup> и 180 мг L-тирозина (опыт А). Эта проба и такая же проба, содержащая вместо тирозина 150 мг тирамина (опыт Б), инкубировались 2,5 часа при 38°. Приближенное газометрическое измерение выделяющегося  $CO_2$  показало, что за это время в пробе А расщепилось около 40% тирозина. По окончании инкубации опытные смеси были освобождены от белка кипячением, профильтрованы и выпарены. Сухие остатки кипятились несколько часов с 10% HCl для удаления полулабильно связанного D из фенольных ядер и отмывались от D повторным добавлением воды и выпариванием. Затем из пробы А изoeлектрическим осаждением был выделен непрореагировавший тирозин и из обеих проб (А и Б) путем бензоилирования по Шоттен-Бауману выделялся O, N-дibenзоилтирамин. Выделенные вещества очищались перекристаллизацией и подвергались сжиганию в токе сухого  $O_2$ . Образующиеся воды количественно собирались путем вымораживания, разбавлялись (по весу) определенным количеством обыкновенной воды и очищались по методу Бриско<sup>(10)</sup>, после чего в них определялось содержание дейтерия денсиметрическим методом. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

„Обновление“ водорода тирозина и тирамина под влиянием тирозин-декарбоксилазы

Выделенное вещество	Число Н-атомов	Избыток D в ат. %		Число атомов обменяющегося „стабильного“ H на молекулу вещества
		в водн. среде	в выделен. веществе	
А. L-тирозин + декарбоксилаза				
Тирозин (71 мг) . . . . .	11	20	0,067	—
О,N-добензоилтирамин (150 мг) . . . . .	19	20	1,890	1,80
Б. Тирамин + декарбоксилаза				
О,N-добензоилтирамин (150 мг) . . . . .	19	20	0,090	< 0,1

### Выводы

1. Содержание стабильно связанного дейтерия в тирамине, образующемся при расщеплении L-тирозина тирозиндекарбоксилазой *Strept. faecalis* в среде тяжелой воды, близко к величине, соответствующей замене двух Н-атомов каждой молекулы меченым водородом водной среды. В непрореагировавшем тирозине водород не обменивается.

2. В тирамине, подвергнутом инкубированию с препаратом бактериальной декарбоксилазы, обмен водорода весьма незначителен (< 0,1 атома).

3. Полученные данные позволяют считать наиболее вероятным химизм реакции энзиматического декарбоксилирования аминокислот, представленный в схеме 2.

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

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
5 IX 1950

### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. Р. Мардашев, Усп. совр. биол., 28, в. 3, 365 (1949). <sup>2</sup> А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949. <sup>3</sup> Е. В. Горяченкова и Р. М. Азарх, Вопросы мед. хим., 2, № 1 (1950). <sup>4</sup> Е. F. Gale et al., Biochem. Joun., 38, 232, 250 (1944); 39, 46, 52 (1945); Nature, 155, 727 (1945). <sup>5</sup> Ц. Д. Осипенко, ДАН, 75, № 1 (1950). <sup>6</sup> А. С. Коникова, М. Г. Крицман и Р. В. Тейсс, Биохимия, 12, 86 (1942). <sup>7</sup> А. С. Коникова, Н. Н. Добберт и А. Е. Браунштейн, Биохимия, 12, 556 (1947). <sup>8</sup> R. M. Herbst and D. Rittenberg, Journ. Org. Chem., 8, 380 (1943); R. M. Herbst, Advances Enzymol., 4, 75 (1944). <sup>9</sup> С. Р. Мардашев и Р. Н. Этингф, Биохимия, 13, 469 (1948). <sup>10</sup> H. J. Emelius, F. W. James, A. King, T. G. Pearson, R. H. Purcell and H. V. A. Briscoe, Journ. Chem. Soc., 1934, 1207.