

БИОХИМИЯ

Ц. Д. ОСИПЕНКО

О ХИМИЗМЕ РЕАКЦИИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО
ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ

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

Некоторые органы животных, а также ряд растений и бактерий содержат специфические энзимы, декарбоксилирующие определенные аминокислоты *L*-ряда с образованием первичных аминов. В последние годы установлено, что большинство аминокислотных декарбоксилаз представляет собой протеиды фосфорицидоксалия⁽¹⁻⁴⁾; возможно, что исключением является бактериальная гистидин-декарбоксилаза⁽⁴⁾. Еще до идентификации активной группировки декарбоксилаз на основании отношения этих энзимов к химическим реагентам было высказано мнение о наличии в них карбонильной группы, на конденсации которой с NH₂-группой аминокислоты основано образование энзим-субстратного комплекса.

Многое говорит в пользу того, что этот комплекс носит характер шиффова основания, способного к обратимым таутомерным перегруппировкам. При взаимодействии аминокислот с энзимами переаминирования, также принадлежащими к протеидам фосфорицидоксалия, образование шиффовых оснований можно считать установленным^(2, 5, 6). Метилирование NH₂-группы аминокислот, исключающее образование шиффовых оснований, препятствует как переаминированию⁽⁵⁾, так и декарбоксилированию⁽⁴⁾.

Декарбоксилирование, наблюдаемое при модельных реакциях между α -аминокислотами и кетонами (например, при реакциях с аллоксаном или нингидрином) или между α -кетокислотами и первичными аминами («искусственными карбоксилазами» Лангенбека), обычно объясняют промежуточным образованием шиффовых оснований с двойной связью между α -углеродом декарбоксилируемой кислоты и азотом, т. е. замещенных α -иминокислот, в которых связь между карбоксилом и α -углеродом ослаблена^(2, стр. 20), как и в незамещенных α -иминокислотах (Виланд, см. ⁽²⁾, стр. 19). С другой стороны, при неэнзиматической реакции переаминирования между α -аминокислотами и α -кетокислотами, сопровождающейся отщеплением CO₂ от аминокислоты, декарбоксилирование и таутомерная перегруппировка шиффова основания, согласно схеме Хербста⁽⁸⁾, протекают одновременно. Подтверждением этой схемы служат изотопные опыты⁽⁷⁾, показавшие, что реакция не сопровождается диссоциацией и обновлением водорода, стоявшего при α -углеводороде аминокислоты (при энзиматическом переаминировании α -водород обменивается на водород водной среды^(6, 5)).

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

лом $O = CHPr_4$ обозначен фосфопиридиоксальпротеид (декарбоксилаза);

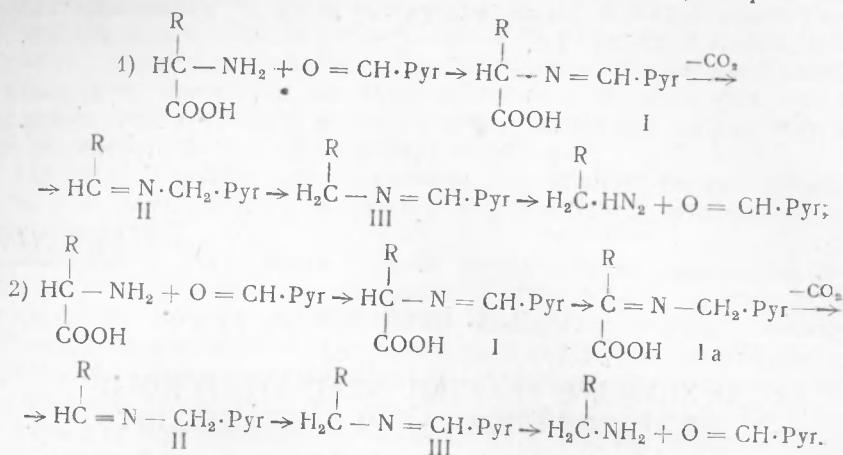


Схема 1 (2, ср. 26) представляет непосредственную аналогию механизма неэнзиматического переаминирования по Хербсту (8). Схема 2 соответствует химизму расщепления α -кетокислот «искусственными декарбоксилазами» Лангенбека. Обе схемы предусматривают вторичное таутомерное превращение образующегося замещенного имина (II \rightarrow III) с последующим гидролизом на амин и фосфорную кислоту.

Мы применили для выяснения вопроса о химизме энзиматического декарбоксилирования изотопный индикатор — дейтерий, проводя декарбоксилирование *L*-тироцина 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 Н-атом при углероде, несущем аминогруппу тирамина (исходный α -водород тирозина), при этом механизме реакции не обменивается.

Согласно схеме 2, при декарбоксилировании тирозина в молекулу должен вступать один меченный атом водорода на место отщепляемого карбоксила (в реакции Ia \rightarrow II) и второй — указанным выше путем при превращении II \rightarrow III. Таким образом, изотопный состав тирамина, полученного при действии декарбоксилазы, должен отвечать обновлению двух Н-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 Н-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).

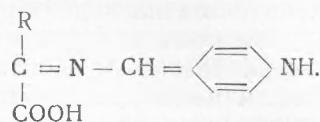
Таким образом, обновление водорода в продукте декарбоксилирования в нашем опыте приближалось к двум атомам на молекулу. Этот результат хорошо согласуется со схемой 2 и позволяет исключить путь реакции, предусмотренной схемой 1, равно как и любой другой механизм декарбоксилирования, при котором α -водород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

В непрореагированном тирозине, выделенном из реакционной смеси, содержание избыточного дейтерия почти не выходило за пределы ошибки денситометрического 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 декарбоксирования 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 обмененного при декарбоксировании водорода нами не было допущено ошибки в результате недостаточной тщательной отмычки выделенных веществ от лабильно или полулабильно связанного дейтерия и что при инкубировании не происходило лабилизации водорода тирозина или тирамина другими энзимами, присутствующими в бактериальном препарате (например, аминоферазами ⁽⁶⁾).

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



Образование этой структуры, как и продукта Ia, связано с перемещением α -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 α -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* ⁽⁹⁾ и 180 мг *L*-тирофина (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 расходилось 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 изоэлектрическим 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 обычной воды и очищались по методу Бриско ⁽¹⁰⁾, после чего в них определялось содержание дейтерия денситометрическим 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 обменявшегося „стабильного“ Н на молекулу вещества
		в водн. среде	в выделен. веществе	
А. L-тироzin + декарбоксилаза				
Тирозин (71 мг)	11	20	0,067	—
О,N-дibenзоилтирамин (150 мг)	19	20	1,890	1,80
Б. Тирамин + декарбоксилаза				
О,N-дibenзоилтирамин (150 мг)	19	20	0,090	< 0,1

Выводы

1. Содержание стабильно связанного дейтерия в тирамине, образующемся при расщеплении *L*-тироzина тирозиндекарбоксилазой *Strept. fecalis* в среде тяжелой воды, близко к величине, соответствующей замене двух Н-атомов каждой молекулы меченным 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

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