

С. Р. МАРДАШЕВ и Н. Н. ЛЕСТРОВАЯ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ АСПАРАГИНА И ГЛЮТАМИНА ПУТЕМ ПЕРЕАМИДИРОВАНИЯ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 21 III 1951)

Обнаружение аспарагина (^{1,2}) и определение его содержания в жидкостях и тканях животного организма (³) с несомненностью указывают, что аспарагин, как и глютамин, является нормальной составной частью не только растений, но и животных. Широкое распространение указанных амидов в живом мире вызывает значительный интерес к вопросу об их биологической роли.

Работами Кребса (⁴), Фердмана (⁵), Эпштейн (⁶), Спека (⁷) и других было показано, что в срезах, кашацах, гомогенатах и экстрактах некоторых органов животных биологический синтез глютамина происходит за счет глютаминовой кислоты и аммонийных солей.

Образование глютамина в этих опытах имеет место только при наличии одновременно идущих процессов, поставляющих энергию для синтеза амидной связи. Исследования последнего времени показали, что значение глютамина, повидимому, не исчерпывается его ролью в процессах биологической нейтрализации и резервирования аммиака. Однако мы еще не располагаем достаточными данными по этому вопросу. Что касается сведений о биологическом синтезе аспарагина и его превращениях, то они ограничиваются исследованиями почти исключительно растительных организмов (^{8,9}).

В связи с появившимся за последнее время большим числом работ, указывающих на наличие обратимого переноса некоторых химических группировок непосредственно с одних соединений на другие и большую распространенность реакций такого типа, казалась вероятной возможность образования амидов путем переноса амидных групп на соответствующие кислоты. Этот вопрос и явился предметом данного исследования.

В качестве экспериментальных животных были использованы белые крысы. Срезы печени, приготовленные на холоду, общим весом 400 мг, помещались в сосудик Варбурга, предварительно заполненный соответствующими растворами. Аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, аспарагин, глютамин и хлористый аммоний брались в концентрациях 0,05 М. Общий объем раствора в сосудике Варбурга — 4 мл. Сосудики насыщались кислородом и содержимое их инкубировалось в течение 1—1,5 часа при 30 или 37° в аппарате Варбурга. Одновременно в тех же условиях обрабатывалась контрольная проба (печень без добавления аминокислот, амидов и хлористого аммония). Срезы суспензировались в щелочном (рН 8) или кислом (рН 6) фосфатном буфере. По окончании инкубационного периода содержимое сосудиков разливалось в центрифужные пробирки и центрифугировалось.

В опытах, проводимых в щелочной среде, реакционная смесь перед центрифугированием нейтрализовалась несколькими каплями H_3PO_4 , приблизительно до pH 5—6. Затем в центрифугате определялись аспарагин и глютамин при помощи препаратов бактериальных дезамидаз *Mycobacterium* и *Clostridium Welchii* SR 12 по методу, разработанному в нашей лаборатории (¹⁰). Результаты, полученные в этих опытах, приводятся в табл. 1—4.

Таблица 1

Синтез глютамина в щелочной среде

Реакционная смесь	Глютамин в мг на пробу											
Глютаминовая к-та + хлористый аммоний	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	0*	0*
Глютаминовая к-та + аспарагиновая к-та	1,0	0,5	0,5	1,0	0,3	0	—	0,5	0,5	1,0	0,7	1,0
Глютаминовая к-та + аспарагин	1,7	1,0	3,0	2,0	1,4	1,7	2,0	2,2	2,2	2,5	3,6	3,9

* Эти данные, так же как и отмеченные аналогично в других таблицах, получены в опытах на крысах, получавших добавку казеина в пищу.

Таблица 2

Синтез глютамина в кислой среде

Реакционная смесь	Глютамин в мг на пробу									
Глютаминовая к-та + хлористый аммоний	0	0	0	0	0	—	—	0	0*	0*
Глютаминовая к-та + аспарагиновая к-та	0,8	0,2	0	1,0	0,2	0,5	0,7	1,0	1,9	1,9
Глютаминовая к-та + аспарагин	2,1	1,0	1,0	1,7	1,6	—	—	—	5,1	6,5

Данные, приведенные в таблицах, ясно показывают, что в указанных условиях опыта печень крыс не синтезирует амиды из аммиака и дикарбоновых кислот. Синтез амидов из аммиака и кислот не наблюдается ни в кислой, ни в щелочной среде.

Совершенно другая картина наблюдается в тех случаях, когда донатором амидогруппы служит соответствующий амид. Глютамин синтезируется с довольно большой скоростью из глютаминовой кислоты и аспарагина, причем в кислой среде (в опытах с добавкой казеина к диете) синтез глютамина был больше, чем в щелочной среде.

Изучение биосинтеза аспарагина показало, что аспарагин синтезируется из аспарагиновой кислоты и глютамина только в кислой среде. Наличие синтеза аспарагина в щелочной среде нам с достоверностью установить не удалось.

Таблица 3

Синтез аспарагина в щелочной среде

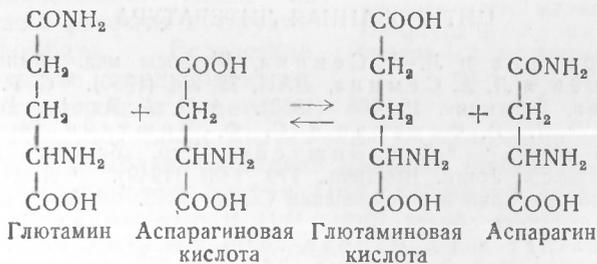
Реакционная смесь	Аспарагин в мг на пробу											
Аспарагиновая к-та + хлористый аммоний	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—*	0*
Аспарагиновая к-та + глутаминовая к-та	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0
Аспарагиновая к-та + глутамин	0	0	0,9	0	0,9	0	0	0	0	—	—	—

Таблица 4

Синтез аспарагина в кислой среде

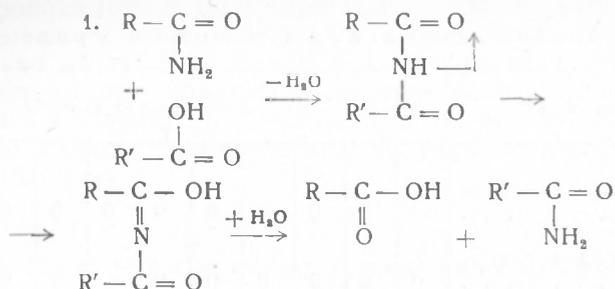
Реакционная смесь	Аспарагин в мг на пробу										
Аспарагиновая к-та + хлористый аммоний	—	0	0	0	—	0	0	0*	0*	0*	0*
Аспарагиновая к-та + глутаминовая к-та	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аспарагиновая к-та + глутамин	2,2	0,7	2,0	1,8	—	0	0	1,7	1,0	2,0	2,0

Предварительные опыты показали также, что прибавление АТФ не оказывает существенного влияния на синтез. Полученные нами данные дают основание считать, что биологический синтез аспарагина и глутамина в животных тканях может протекать путем переноса амидной группы с аспарагина или глутамина на глутаминовую или аспарагиновую кислоту.



Эта ферментативная реакция, которую мы предлагаем назвать переамидированием, осуществляется при помощи специальной амидоферазной системы, которую предстоит изучить. Предположительная схема переамидирования включает в качестве начального этапа реакции конденсацию аминокислоты с амидом, с последующим внутримолекулярным переносом водорода, перегруппировкой связей и распадом продукта конденсации с образованием нового амида дикарбоновой кислоты.

Схема переамидирования



Механизм образования глутамина из аспарагиновой и глутаминовой кислот не ясен. Однако вряд ли можно сомневаться в том, что здесь имеется другая реакция, отличающаяся от переамидирования. Отсутствие синтеза аспарагина в аналогичных условиях дает основание полагать, что аспарагиновая кислота играет особую роль. Возможно, что глутамин образуется в результате переноса аминогруппы с аспарагиновой кислоты по типу, близкому к реакции синтеза аргинина из цитруллина и аспарагиновой кислоты (¹¹). Во всяком случае, скорость этой реакции значительно меньше скорости реакции переамидирования.

При изучении ферментатического синтеза гликокола (¹²) было установлено, что представление о «биохимической инертности» азота в амидной группе глутамина и аспарагина не обосновано. Результаты, полученные нами, еще больше убеждают в том, что функции аспарагина и глутамина в процессах обмена отнюдь не сводятся только к нейтрализации, резервированию и транспорту аммиака.

Опубликованные в 1950 г. работы (^{13, 14}) показали возможность ферментатического замещения амидогруппы в аспарагине и глутамине изотопной амидогруппой (за счет меченых по азоту аммонийных солей) или остатком гидроксилamina. В других исследованиях было установлено наличие ферментативной реакции подстановки в смесях глутатиона с аминокислотами (¹⁵). Упомянутые работы имеют несомненное значение для проблемы синтеза пептидной связи. Весьма вероятно, что и обнаруженная нами реакция переамидирования тесно связана с указанной проблемой.

Поступило
21 III 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Р. Мардашев и Л. А. Семина, Вопросы мед. химии, **1**, 67 (1949).
² С. Р. Мардашев и Л. А. Семина, ДАН, **73**, 351 (1950). ³ С. Р. Мардашев и В. В. Мамаева, Биохимия, **15**, 465 (1950). ⁴ Н. А. Krebs, Biochem. Journ., **29**, 1951 (1935). ⁵ Д. Л. Фердман и С. Ф. Эпштейн, Булл. эксп. биол. и мед., **25**, 239 (1948). ⁶ С. Ф. Эпштейн, Укр. биохим. журн., **20**, 138 (1948). ⁷ J. F. Speck, Journ. Biochem., **179**, 1387 (1949). ⁸ Д. Н. Прянишников, Азот в жизни растений и в земледелии СССР, 1945. ⁹ А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, 1949. ¹⁰ Н. Н. Лестровая, Вопросы мед. хим., **4** (1951). ¹¹ S. Ratner and A. Pappas, Journ. Biol. Chem., **179**, 1183, 1199 (1949). ¹² С. Р. Мардашев и Л. А. Семина, ДАН, **74**, 537 (1950). ¹³ H. Waelsch, Ph. Owades, E. Borek, N. Grossowicz and M. Schou, Arch. Bioch., **27**, 237 (1950). ¹⁴ J. Fruton, Yale, Journ. Biol. and Med., **22**, 263 (1950); R. Johnston, M. Muscek and J. Fruton, Journ. Biol. Chem., **185**, 629 (1950). ¹⁵ C. Hanes, F. Hird and F. Ischerwood, Nature, **166**, 288 (1950).