

Действительный член Академии медицинских наук СССР А. Е. БРАУНШТЕЙН
и Р. М. АЗАРХ

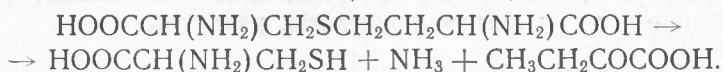
РОЛЬ ФОСФОПИРИДОКСАЛЯ В АНАЭРОБНОМ ДЕЗАМИНИРОВАНИИ ГОМОСЕРИНА И СЕРИНА

В 1949 г. нами (1, 2) было отмечено близкое сходство между реакциями, катализируемыми сериндегидратазой (сериндезаминазой), цистеиндесульфгидразой и бактериальной триптофаназой. При действии всех этих ферментов происходит анаэробный распад β -замещенных α -аминокислот с отщеплением заместителя, находящегося при β -углероде, и образованием аммиака и пировиноградной кислоты.

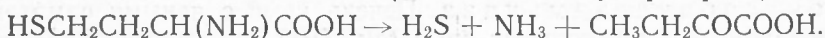
Мы предположили, что сериндезаминаза и цистеиндесульфгидраза подобно триптофаназе являются протеидами фосфопиридоксаля (2). Это было доказано нами по отношению к цистеиндесульфгидразе животных тканей и молочнокислых бактерий *Str. fecalis* (1-3). Активность сериндегидратазы в тканях животных оказалась слишком низкой для постановки соответствующих исследований. Позднее было показано, что ферментативное расщепление тиоэфиров цистеина (аллоцистатионина, лантионина, дженколовой кислоты) принадлежит к тому же типу реакций и также катализируется пиридоксальевым энзимом (4, 5).

С упомянутыми реакциями сходно анаэробное расщепление некоторых γ -замещенных α -аминокислот, а именно, расщепление цистатионина при пересульфировании (4, 6), десульфирование гомоцистеина (7) и дезаминирование гомосерина (8). При всех этих реакциях отщепление заместителя, находящегося при γ -углероде аминокислоты, ведет к образованию аммиака и α -кетомасляной кислоты.

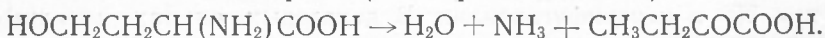
1. Расщепление цистатионина (« γ -тионаза»):



2. Расщепление гомоцистеина (гомоцистеиндесульфгидраза):



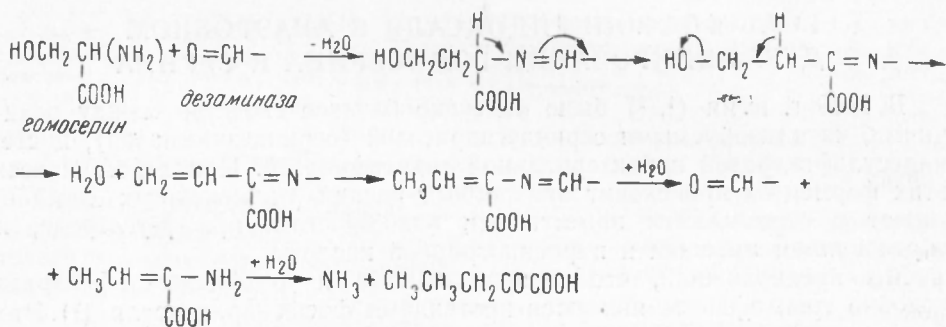
3. Расщепление гомосерина (гомосериндезаминаза):



Е. В. Горяченкова (4) показала, что « γ -тионаза» (как и « β -тионаза», расщепляющая тиоэфиры цистеина) представляет собой протеид фосфопиридоксаля. Пиридоксальпротеидная природа гомоцистеиндесульфгидразы установлена Каллио (7).

В настоящей работе нами доказана роль фосфопиридоксаля как протетической группы гомосериндезаминазы. В печени нормальных крыс дезаминаза гомосерина относительно устойчива и весьма активна (в отличие от сериндезаминазы). При B_6 -авитаминозе активность этого фермента в экстрактах печени падает до очень низких величин; добавление фосфопиридоксаля (ФП) в пробирке дает лишь незначительную активацию таких экстрактов, но полностью восстанавливает активность растворов апофермента, полученных путем диализа экстрактов из печени нормальных крыс.

Механизм расщепления гомосерина и других γ -замещенных α -аминокислот соответствующими ФП-энзимами легко может быть объяснен на основе теоретических представлений, разработанных А. Е. Браунштейном и М. М. Шемякиным (9). Согласно этим представлениям, действие пиридоксалевого энзима обусловлено конденсацией аминокислот с альдегидной группой энзима в шиффовы основания и перераспределением электронной плотности в этих промежуточных продуктах, в которых у α -углеродного атома стоят сильные электроноакцепторные заместители. В случае дезаминирования гомосерина вероятный механизм энзиматического превращения может быть выражен следующей схемой (ср. (9)):



У *Str. fecalis* активность гомосериндезаминазы, по нашим данным, очень невелика. Мы исследовали также дезаминирование серина у *Str. fecalis*. Активность сериндезаминазы, довольно значительная у *Str. fecalis* в норме, исчезала при недостаточности витамина В₆, но добавление ФП не восстанавливало ее. Уже после проведения этих опытов появились работы Яновского (10) и Рейсига (11), которым удалось активировать при помощи ФП апоэнзим сериндезаминазы из *Neurospora* (а также треониндезаминазы (11)); тем самым наше предположение о природе этого фермента (1, 2) получило полное подтверждение. К установленным функциям фосфопиридоксалевого фермента в обмене аминокислот (9), следовательно, должно быть причислено дезаминирование γ - и β -оксааминокислот — гомосерина (настоящая работа), серина (10, 11) и треонина (11); судя по их распределению и свойствам, ферменты, расщепляющие эти три оксааминокислоты, различны.

Экспериментальная часть

Гомосериндезаминаза. Печень крыс с явными симптомами В₆-авитаминоза и контрольных крыс (см. (12)) гомогенизировали на холоду с 10 объемами 0,9% раствора NaCl, прогревали 5 мин. на водяной бане при 55° и центрифугировали. В некоторых опытах использовали также прогретые экстракты, инактивированные путем 48-часового диализа против 0,01 M ацетатного буфера с рН 4,0 («апофермент»).

Опытные пробы, содержащие 1 мл ферментного экстракта, 4,5 мг DL-гомосерина* и 1 мл фосфатного буфера (0,1 M, рН 7,4) в общем объеме 4 мл, инкубировали 2 часа при 38° в атмосфере N₂; параллельно ставились контрольные пробы без гомосерина. После удаления белков в фильтратах инкубированных проб определяли содержание NH₃ по методу Конвей. В некоторых опытах исследовалось образование α -кетомасляной кислоты путем прямого колориметрического определения 2,4-динитрофенилгидразонов кетокислот: к 0,1 мл безбелкового фильтрата добавляли 1 мл 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 M HCl и 5 мл

* DL-гомосерин был синтезирован Е. В. Горяченковой, которой приносим искреннюю благодарность за предоставление препарата.

2,5 N NaOH. Полученную розовую окраску измеряли в абсорбциометре Спеккера; калибровочный график был установлен по стандартному раствору динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты.

Данные наших опытов по дезаминированию DL-гомосерина в экстрактах печени контрольных и В₆-авитаминозных крыс приведены в табл. 1. Прирост N — NH₃ за счет дезаминирования гомосерина в экстрактах печени нормальных крыс весьма значителен и составляет от 0,8 до 2,2 мг на 1 г исходной ткани печени. В тех же условиях в экстрактах печени В₆-авитаминозных крыс прирост N — NH₃ не превышает 0,24 мг/г; в большинстве случаев он отсутствует полностью.

Добавление ФП к экстрактам из печени В₆-авитаминозных крыс лишь в незначительной мере восстанавливает активность гомосериндезаминазы (см. табл. 2). В экстрактах из печени контрольных крыс активность фермента резко снижается при диализе против слабо кислого буферного раствора; добавление к таким диализованным экстрактам (апоферменту) фосфопиродоксаля (0,1—5,0 γ/4 мл) восстанавливает активность почти до исходных величин; добавление пиридоксаль-гидрохлорида (4 γ/4 мл) не повышает активности фермента. На рис. 1 приведены кривые, показывающие зависимость активности гомосериндезаминазы от количества ФП, добавленного к диализованному экстракту печени.

В этих опытах определялось, кроме прироста N — NH₃, образование α-кетомасляной кислоты; кривые иллюстрируют эквивалентность прироста NH₃ и кетокислоты в каждой из проб.

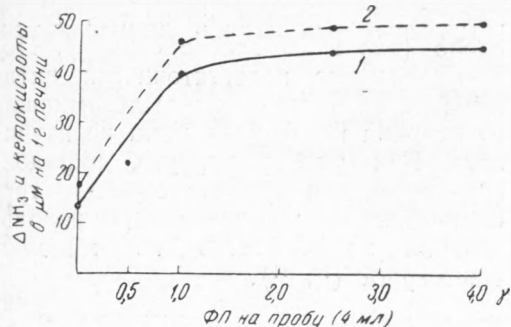


Рис. 1. Дезаминирование DL-гомосерина в диализованном экстракте печени в зависимости от количества добавленного ФП. 1 — NH₃, 2 — кетокислота

растирании бактерий или обезвоживании их ацетоном. При высушивании бактерий в вакуум-эксикаторе незначительная активность сохраняется при добавлении к бактериальной пасте глутатиона (1 мг/мл); потерявшая активность бактериальная сериндезаминаза не восстанавливается добавлением описанных для этого фермента кофакторов (Mg⁺⁺, адениловая кислота, глутатион) или ФП.

* Условия выращивания полноценных и В₆-дефицитных культур *Str. fecalis* см. в нашей работе (3). За предоставление культур приносим благодарность В. Н. Гладковой.

Таблица 1

Дезаминирование DL-гомосерина в экстрактах из печени крыс (образование N — NH₃ в мг на 1 г ткани печени)

Печень контрольных крыс	Печень В ₆ -авитаминозных крыс
2,25	0,24
2,12	0,12
1,92	0
1,84	0
1,39	0
1,02	—
0,98	—
0,86	—
0,82	—
Средн. 1,44	0,07

Результаты описанных опытов не оставляют сомнения в том, что ФП является коферментом гомосериндезаминазы.

Сериндезаминаза *Str. fecalis**. Суспензии эмульгированных бактериальных клеток, свежих или высушенных, инкубировали 2 часа в атмосфере N₂ с DL-серином (30 мг/4 мл) и фосфатным буфером pH 7,4; дезаминирование измерялось по приросту N — NH₃ по сравнению с суспензией бактерий, инкубированной без серина. Сериндезаминаза *Str. fecalis* оказалась весьма нестойкой; она полностью инактивируется при

Активирование фосфопиридоксалем гомосериндезаминазы в экстрактах из печени В₆-авитаминозных крыс и диализованных экстрактах нормальной печени (образование N — NH₃ в мг на 1 г печени)

Экстракт из печени В ₆ -авитаминозных крыс			Экстракт из печени нормальных крыс			
№№ пп	без добавок	с 5 γ ФП	№№ пп	до диализа	после диализа	
					без добавок	с ФП
1	0	0,12	5	1,02	0,51	0,92 (5 γ ФП)
2	0,12	0,34	6	0,81	0,18	0,80 (5 γ)
3	0	0,10	7	0,86	0,26	0,84 (4 γ)
4	0,23	0,19	8	0,96	0,20	0,61 (4 γ) ¹
			9	—		0,31 (0,5 γ)

Таблица 3

Деаминарование DL-серина в суспензиях *Str. fecalis* (прирост N — NH₃ в γ на пробу)

Полноценные бактерии		В ₆ -дефицитные бактерии
суспензия свежих клеток	суспензия клеток, высуш. в вакууме с глутатионом	суспензия свежих клеток
852	117	46
562	72	41
432	—	24
203	—	21
109	—	0
91	—	—

Как видно из данных табл. 3, полноценные свежие клетки *Str. fecalis* довольно энергично деаминаруют DL-серин в анаэробных условиях; В₆-дефицитные клетки при такой же густоте суспензии (20—30 мг сухого веса бактерий в 4 мл) почти не проявляют сериндезаминазной активности; повысить ее добавлением пиридоксала или ФП к суспензиям или вытяжкам В₆-дефицитных бактерий нам не удалось.

DL-гомосерин и DL-треонин даже свежими полноценными суспензиями *Str. fecalis* деаминировались очень слабо (раз в 10 слабее серина). Поэтому влияние недостаточности витамина В₆ на бактериальные деаминазы гомосерина и треонина нами не изучалось. Как уже упомянуто, пиридоксальпротеидная природа серин- и треониндезаминазы доказана при использовании апоферментов из мицелия *Neurospora* (¹⁰, ¹¹).

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
5 V 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Браунштейн, Доклад на 2-й сессии Отд. мед.-биол. наук АМН СССР, тезисы докладов, 1949, стр. 32. ² А. Браунштейн и Р. Азарх, ДАН, 71, 93 (1950). ³ Р. Азарх и В. Гладкова, ДАН, 85, № 1 (1952). ⁴ А. Браунштейн и Е. Горяченкова, ДАН, 74, 529 (1950); Е. Горяченкова, ДАН, 85, № 3 (1952). ⁵ F. Binkley et al., J. Am. Chem. Soc., 73, 3538 (1951); J. Biol. Chem., 194, 109 (1952). ⁶ W. Carrol et al., ibid., 180, 375 (1949); F. Binkley, ibid., 192, 209 (1951). ⁷ R. Kallio, ibid., 192, 403 (1951). ⁸ F. Binkley and C. Olson, ibid., 185, 831 (1950). ⁹ А. Браунштейн и М. Шемякин, ДАН, 85, № 5 (1952). ¹⁰ С. Yanofsky, J. Biol. Chem., 194, 279 (1952). ¹¹ J. Reissig, Arch. Biochem. Biophys., 36, 234 (1952). ¹² А. Браунштейн и Е. Горяченкова, Биохимия, 14, 163 (1949).