



УДК 577.158.4

**СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБИЛИЗАЦИЯ ПРОТОНА  
ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ ПЕРЕАМИНИРОВАНИИ  
4-АМИНОБУТИРАТА***Васильев В. Ю., Северин Е. С.**Кафедра биохимии Ленинградского государственного университета,  
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен ферментативный синтез (*R*)- и (*S*)-4-[4-<sup>3</sup>H]аминобутиратов. Методом изотопного уравнивания полученных энантиомеров с янтарным полуальдегидом и 4-аминобутират-трансминазой на основании анализа распределения метки в продуктах ферментативной реакции показано, что лабилизируемый протон 4-аминобутирата имеет *S*-симметрию.

В последние годы достигнуты значительные успехи в понимании стереохимии многих реакций азотистого обмена, катализируемых пиридоксальными ферментами [1—3]. В первую очередь это относится к ферментативному переаминированию [4]. Для трансминаз  $\alpha$ -аминокислот конфигурация заместителей при  $\alpha$ -углероде определяется принадлежностью аминокислот к *L*- или *D*-ряду. Напротив, для трансминаз  $\omega$ -аминокислот положение лабилизируемого протона при  $\omega$ -углероде неочевидно. В результате реакции энзиматического переаминирования происходит стереоспецифическое удаление протона у  $\alpha$ -углеродного атома. Наличие у субстратной  $\omega$ -аминокислоты двух энантиотопных водородных атомов у  $\omega$ -углеродного атома и несомненно стереоспецифический характер реакции требуют выяснения симметрии лабилизируемого протона при ферментативном переаминировании  $\omega$ -аминокислот.

Для решения этой задачи нами была выбрана 4-аминобутират-трансминаза (КФ 2.6.1.19), катализирующая обратимый перенос аминогруппы между 4-аминобутиратом и 2-оксоглутаратом. Продуктами прямой реакции являются янтарный полуальдегид и *L*-глутамат. Этот фермент удобен тем, что энантиомерные формы его аминокислоты — (*R*)- и (*S*)-4-[4-<sup>3</sup>H]-

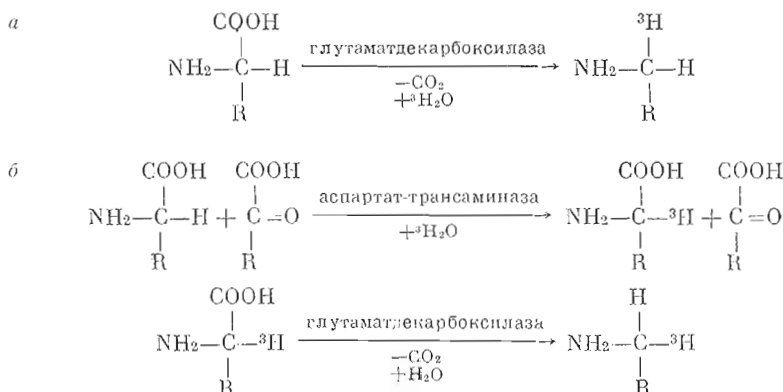
**Распределение метки между компонентами 4-аминобутират-трансминазной реакции \***

Энантиомер 4-[4- <sup>3</sup> H]аминобутирата	4-Аминобутират	Янтарный полуальдегид	Вода
<i>R</i>	59	37	<2
<i>S</i>	<2	<2	95

\* Данные выражены в процентах от общего содержания трития в инкубационной среде.

аминобутираты могут быть получены ферментативно согласно схемам 1 а и б соответственно:

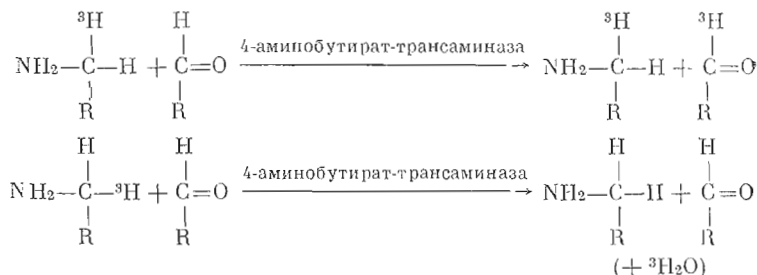
Схема 1



где R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH.

Положение лабильзуемого протона у меченых энантимеров определяли методом их изотопного уравнивания с янтарным полуальдегидом в присутствии 4-аминобутират-трансаминазы. После достижения равновесия в ферментативной системе компоненты реакции (4-аминобутират и янтарный полуальдегид) и растворитель (вода) были разделены с помощью ионообменной хроматографии. Процентное распределение метки в этих веществах (таблица) доказывает стереоспецифический перенос протона и соответствует следующим схемам реакций:

Схема 2



где R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH.

Таким образом, в реакции ферментативного переаминирования лабильзуемый протон 4-аминобутирата имеет *pro*-(*S*)-конфигурацию. В случае *L*-глутамата также наблюдается лабильзация протона α-углеродного атома, имеющего (*S*)-симметрию.

На основе этих данных и постулата Данатана [1] можно считать доказанной аналогичную ориентацию аминокислотных радикалов 4-аминобутирата и *L*-глутамата в активном центре 4-аминобутират-трансаминазы. Такое заключение согласуется с высказанным нами ранее предположением о пространственной ориентации субстратных участков активного центра этого фермента [5].

### Экспериментальная часть

**Ферменты.** 4-Аминобутират-трансаминаза была выделена из почек свиньи согласно ранее описанной методике [6]. Глутаматдекарбоксилаза из *E. coli* 50%-ной степени чистоты и аспарат-трансаминаза из сердца

свиньи ( $\alpha$ -форма) были любезно предоставлены Б. С. Сухаревой и Ю. М. Торчинским, за что авторы выражают им благодарность.

(*R*)-4-[4- $^3\text{H}$ ]аминобутират. Этот энантиомер получали путем декарбосилирования *L*-глутамата в  $^3\text{H}_2\text{O}$  [4] (схема 1 а). Инкубационная смесь в объеме 2 мл содержала 0,2 ммоль *L*-глутамата, 0,5 мг глутаматдекарбосилазы и 100 мКи  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Вещества были растворены в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,6. Пробу инкубировали 18 ч при 30°. О завершении реакции декарбосилирования судили по результатам тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol 240». Разделение аминокислот проводили в системе этанол — вода (2 : 3) с последующим проявлением пятен нингидриновым реактивом. Значения  $R_f$  для *L*-глутамата и 4-аминобутирата составляли 0,84 и 0,62 соответственно. После прогревания (5 мин, 95°) и отделения белкового осадка фильтрованием инкубационную смесь наносили на колонку с дауэксом 50  $\times$  8 в  $\text{H}^+$ -форме, промывали большим количеством воды и меченый 4-аминобутират элюировали 2%-ным раствором аммиака. Аминокислоту хранили в лиофилизованном состоянии. Удельная радиоактивность 4 (*R*)-4-[4- $^3\text{H}$ ]аминобутирата составила 0,3 мКи/ммоль.

(*S*)-4-[4- $^3\text{H}$ ]аминобутират. Это соединение получали в два этапа (схема 1 б). На первом этапе производили замену лабильзируемого протона *L*-глутамата на тритий в системе, содержащей аспаргат-трансаминазу и 2-оксоглутарат. Инкубационная среда содержала *L*-глутамат и 2-оксоглутарат в концентрациях 0,2 и 0,02 мМ соответственно, аспаргат-трансаминазу (0,5 мг) и  $^3\text{H}_2\text{O}$  (12 мКи). Все вещества были растворены в 2 мл 0,05 М фосфатного буфера, рН 8,0. Реакцию изотопного уравнивания вели 36 ч при 20°. Меченый глутамат выделяли из инкубационной среды с помощью хроматографии на дауэксе 50  $\times$  8 в  $\text{H}^+$ -форме с последующей лиофилизацией. На втором этапе полученный глутамат ферментативно декарбосилировали в среде, не содержащей  $^3\text{H}_2\text{O}$ , и выделяли в условиях, описанных выше, (*S*)-4-[4- $^3\text{H}$ ]аминобутират с удельной радиоактивностью 0,05 мКи/ммоль.

*Фракционирование продуктов 4-аминобутират-трансаминазной реакции.* Реакцию изотопного уравнивания проводили в инкубационной среде, содержащей один из меченых энантиомеров 4-аминобутирата (0,02 ммоль  $\approx$  0,1 мКи), янтарный полуальдегид (0,02 ммоль), 4-аминобутират-трансаминазу (1 мг), трис-НСI, рН 8,6 (0,1 ммоль). Общий объем пробы 1 мл. После инкубации (24 ч, 30°) пробу прогревали (5 мин, 95°), белковый осадок отделяли фильтрованием и инкубационную смесь наносили на колонку общим объемом 1,5 мл с дауэксом 50  $\times$  8 в  $\text{H}^+$ -форме. Колонку промывали 8 мл воды и аминокислоту элюировали 2%-ным аммиаком. Вещества, не задерживающиеся при хроматографии, наносили на колонку с дауэксом 1  $\times$  8 в  $\text{OH}^-$ -форме. Колонку промывали 8 мл воды и янтарный полуальдегид элюировали 1 н. НСI. Во фракции, не задерживающейся при элюции, содержалась инкубационная вода. Радиоактивность в аликвотах полученных фракций определяли в диоксановом сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Авторы приносят благодарность Е. Б. Крыловой за помощь в проведении опытов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dunathan H. C. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 712—716.
2. Braunstein A. E. (1973) The Enzymes (Boyer P., ed.), 3rd Ed., vol. 9, pp. 379—481.
3. Северин Е. С., Ковалева Г. К., Туманян В. Г., Хомутов Р. М. (1974) в сб. Структура и функция активных центров в ферментах, с. 108—139, «Наука», М.
4. Dunathan H. C. (1970) Vitamins and Hormones, 28, 399.
5. Васильев В. Ю., Николаева З. К., Сащевко Л. П., Северин Е. С. (1973) Биохимия, 38, 1192—1197.
6. Николаева З. К., Васильев В. Ю. (1972) Биохимия, 37, 572—578.

Поступила в редакцию  
3.X.1975

STEREOSPECIFIC LABELIZATION OF THE PROTON IN THE COURSE  
OF ENZYMIC TRANSAMINATION OF 4-AMINOBUTYRIC ACID

VASILIEV V. Yu., SEVERIN E. S.

*Department of Biochemistry, State University, Leningrad,  
and Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

By enzymatic decarboxylation of *L*-glutamic acid in  $^3\text{H}_2\text{O}$  and *L*-[2- $^3\text{H}$ ]glutamic acid in  $\text{H}_2\text{O}$  enantiomeric (*R*)- and (*S*)-4-[4- $^3\text{H}$ ]aminobutyric acids were formed. Isotopic equilibration of the obtained compounds with succinic semialdehyde and 4-aminobutyric transaminase followed by the analysis of label distribution in the products of enzymic reaction were employed to demonstrate *S*-symmetry of 4-carbon atom of 4-aminobutyrate.

---