

В. С. Оганесян

Об участии N-ацетил-l-аспарагиновой кислоты в синтезе ацетилхолина

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Буянтяном 22. XI 1960)

Недавно Талланом, Муром и Стейном ⁽¹⁾ в безбелковых экстрактах мозга млекопитающих было обнаружено относительно большое количество связанной аспарагиновой кислоты, которая была идентифицирована как N-ацетил-l-аспарагиновая кислота ⁽²⁾.

Исследуя мозг разных видов животных, Таллан ⁽³⁾ установил, что концентрация ацетиласпарагиновой кислоты составляет: в мозгу млекопитающих и птиц от 80 мг⁰/₀ до 110 мг⁰/₀, в мозгу черепах 1/5 этого уровня, а в мозгу лягушек и беспозвоночных она не была обнаружена вовсе. В центральной нервной системе млекопитающих ацетиласпарагиновая кислота имеется во всех ее отделах и варьирует в концентрациях от 54 мг⁰/₀ в спинном мозгу до 124 мг⁰/₀ в сером веществе головного мозга. В растущем организме крыс и кроликов ее концентрация низка в первый день после рождения и достигает максимального уровня на 20-ый день. Исследование других тканей показало, что в печени и в почках концентрация ацетиласпарагиновой кислоты не превышает соответственно 1 и 3 мг⁰/₀. Между распределением многих ферментов, а также дыхательной активностью и васкуляризацией центральной нервной системы и содержанием ацетиласпарагиновой кислоты имеется полное соответствие.

Попытка Таллана выделить из мозга фермент, который синтезирует ацетиласпарагиновую кислоту, была безуспешной. Опытами Якобсона ⁽⁴⁾ было установлено, что при введении меченой глюкозы и ацетата синтезируется ацетиласпарагиновая кислота. Аналогичные результаты им были получены в опытах *in vitro*.

Гольдштейн ^(5, 6) выделил из мозга крыс частично очищенный фермент—аспартикоацетилазу, который ускоряет синтез ацетиласпарагиновой кислоты из аспарагиновой кислоты и из ацетил-коэнзима А. Он установил, что этот фермент проявляет абсолютную специфичность как к ацетил-коэнзиму А, так и к l-аспарагиновой кислоте.

Роль ацетиласпарагиновой кислоты, столь специфического соединения для нервной ткани высших животных, остается неясной. Из

литературы хорошо известно, что источниками ацетильной группы для синтеза ацетилхолина в экстрактах из головного мозга могут служить как ацетат, так и его предшественники. Опытами Кори, де Браганза и Нахманзона (7) на экстрактах из головных ганглий цефалоподов было установлено, что донатором ацетильной группы могут быть также и N-ацетил производные глицина, l-аланина и l-лизина.

Исходя из вышеуказанного, мы задались целью выяснить участие ацетиласпарагиновой кислоты в синтезе ацетилхолина.

Ферментативная система для синтеза ацетилхолина была получена по методу Кори, де Браганза и Нахманзона (7).

Замороженный мозг кролика гомогенизировался в охлажденном ацетоне. На суспензию, полученную из 10 г мозга, добавляли 1,5 л охлажденного до -2° ацетона. Спустя 10 мин. осадок отфильтровывали через бюхнеровскую воронку и переносили в 1 л ацетона. Через 30 мин. осадок отфильтровывали снова и высушивали при комнатной температуре. Из 10 г свежего мозга получается около 1 г белого тонкого порошка, активность которого сохраняется долгое время при хранении на холоду -10° . Для экстракции на 450 мг ацетонового порошка брали 13,5 мл охлажденного буферного раствора следующего состава: Na_2HPO_4 0,006 м, KCl 0,17 м, MgCl_2 0,00125 м, рН доводили до 7—7,3. Полученную суспензию центрифугировали на холоду при 3000 оборотов в минуту в течение 3 м. Надосадочную жидкость использовали в качестве источника фермента.

Для каждой пробы брали 2 мл надосадочной жидкости и 1,3 мл реакционной смеси, содержащей следующие компоненты в конечной концентрации: холинхлорид 20 $\mu\text{м}$, ацетиласпарагиновая кислота 6,8 $\mu\text{м}$, цистенин 20 $\mu\text{м}$, MgCl_2 1,5 $\mu\text{м}$, KCl 65 $\mu\text{м}$, Na_2HPO_4 3,5 $\mu\text{м}$, эзеринсалицилат 1,5 $\mu\text{м}$, АТФ 6 $\mu\text{м}$ на 1 мл и коэнзим А 25 $\mu\text{кг}$ на весь объем. рН доводили до 7,2. Инкубацию проводили в сосудиках Варбурга при 37° в течение 30 мин., после чего к каждой пробе добавляли 5,7 мл 0,1 м фосфатного буфера и затем 0,5 мл N HCl. Через 20 мин. нейтрализовали 0,5 мл N NaOH и центрифугировали. Надосадочную жидкость испытывали на ацетилхолин.

Ацетилхолин определяли на прямой брюшной мышце лягушки. Эффект сокращения мышцы, вызванный ацетилхолином, зависит и от других компонентов реакционной среды. Поэтому с целью проверки этого влияния к стандартному раствору ацетилхолина добавляли инактивированный раствор инкубированной смеси. Таким образом, учитывали ошибку, которая могла быть обусловлена другими добавочными факторами.

В наших опытах раствор фермента подвергали длительному диализу для устранения из среды других возможных источников ацетата. Диализ проводили при $+1^{\circ}$ — 4° против буферного раствора, используемого для экстракции порошка. Целлофановый мешочек с раствором фермента вращали 20 часов. За это время буферный раствор меняли 1 раз.

N-Ацетил-1-аспарагиновая кислота была синтезирована нами по Баркеру (8). После кристаллизации сиропа, которая длится очень долго, кристаллы промывали водным раствором ацетона. Полученный препарат проверяли на ацетат по методу Кеннеди и Баркера (9).

Аспарагиновую кислоту определяли электрофоретическим методом по Грассману и Ганнингу в модификации Кометиани и Клейн (10).

В наших исследованиях контролем для синтеза ацетилхолина были опыты, где в качестве источника ацетильной группы применялся Na-ацетат. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что в опытах с ацетиласпарагиновой кислотой происходит интенсивный синтез ацетилхолина. Количество синтезированного ацетилхолина как из ацетата, так и из ацетиласпарагиновой кислоты достигает в среднем 960 μg на 1 г порошка за 1 час. Очевидно, что для синтеза ацетилхолина ацетиласпарагиновая кислота так же эффективна, как и ацетат. Как показали наши исследования в опытах, где донатором ацетильной группы служили ацетилглицин и ацетилаланин, выход ацетилхолина составляет соответственно 76,3% и 38,9%. В опытах Кори, де Браганза и Нахмансона (7), приведенных на головных ганглиях цефалпод с этими же донаторами ацетильных групп, выход ацетилхолина оказался в процентном выражении несколько ниже и составлял 62,8% и 25,7%.

Таблица 1

Синтез ацетилхолина при наличии ацетата и N-ацетилпроизводных аминокислот

Субстрат	Концентрация μM на мл	Количество ацетилхолина в μg на 1 г порошка за 1 час					
		1	2	3	4	5	среднее
Контроль (без источника ацетата)	—	0	0	0	0	0	
Na-ацетат	6,8—20	938	938	960	900	1074	962
N-ацетил-1-аспарагиновая кислота	6,8—20	976	976	900	942	1018	960
N-ацетилглицин	6,8	713	750	750	676	780	733
N-ацетил-1-аланин	6,8	375	411	375	336	—	374

Из указанного следует, что для синтеза ацетилхолина из ацетилглицина и ацетилаланина экстракты из мозга кролика являются более активными.

Как показывают данные, представленные в табл. 2, процесс синтеза ацетилхолина сопровождается значительным возрастанием количества аспарагиновой кислоты в инкубационной смеси. Этот факт согласуется с наблюдениями Гольдштейна (6) и Якобсона (4), что в инкубированном экстракте мозга ацетиласпарагиновая кислота подвергается гидролизу. Очевидно, что отщепившийся при гидролизе ацетиласпарагиновой кислоты ацетил-радикал используется для ацетилирования холина.

Из приведенных в табл. 2 данных обращает на себя внимание тот факт, что в инкубированных экстрактах мозга ацетиласпарагиновая кислота подвергается гидролизу, тогда как в контрольных опытах с инактивированным ферментом этого не наблюдается, при кипячении ферментного раствора его гидролизующая активность исчезает.

Таблица 2

Гидролиз ацетиласпарагиновой кислоты экстрактами
мозга кролика
Количество аспарагиновой кислоты в $\mu\text{м}$ на 1 г
порошка за 1 час

До инку- бации	После инкубации	Инактивированный фермент	
		до инкубации	после инкубации
12,66	45,80	10,06	10,66
9,31	33,74	5,73	7,37
Следы	48,13	Следы	Следы
Следы	49,17	Следы	Следы
Следы	32,78	Следы	Следы
8,24	41,86	Следы	Следы

Исходя из этого, можно предположить, что экстракт из мозга кролика обладает ферментативной активностью в отношении гидролиза ацетиласпарагиновой кислоты. Судя по выходу ацетилхолина из ацетилглицина и ацетилаланина, очевидно, что указанные ацетиламинокислоты тоже подвергаются гидролизу, но менее интенсивно, чем ацетиласпарагиновая кислота. По-видимому, ферментативная активность обусловливается наличием в мозгу гидролизующего ацетиласпарагиновую кислоту фермента, который не является строго специфичным к N-ацетиламинокислотам. Поскольку увеличение аспарагиновой кислоты происходит и в тех случаях, когда из среды исключается всякий возможный акцептор ацетильной группы, то мало вероятно, что этот процесс осуществляется трансацетилазным ферментом. Исследование с целью уточнения обсуждаемого вопроса продолжается.

Выводы. 1. В экстрактах мозговой ткани кролика, полученных из ацетонового порошка, ацетиласпарагиновая кислота участвует в синтезе ацетилхолина, как источник ацетильной группы.

2. Для синтеза ацетилхолина ацетиласпарагиновая кислота является таким же эффективным субстратом, как и свободный ацетат.

3. В тех же условиях ацетилглицин и ацеталанин также участвуют в синтезе ацетилхолина, но относительно слабее, чем ацетиласпарагиновая кислота.

4. Полученные данные позволяют заключить, что гидролиз ацетиласпарагиновой кислоты обуславливается в мозговой ткани наличием соответствующего фермента.

Сектор биохимии
Академии наук Армянской ССР

N-ացետիլ-լ-ասպարագինաթթվի մասնակցությունը ացետիլ-խոլինի սինթեզի պրոցեսում

Վերջերս կաթնասունների և թռչունների ուղեղում հայտնաբերվել է համեմատաբար մեծ քանակությամբ N-ացետիլ-լ-ասպարագինաթթուն, որի դերը առայժմ պարզված չէ: Մեր փորձերը ցույց տվեցին, որ ճագարների ուղեղի էքստրակտում (որը ստացվել է ացետոնով շորացված ուղեղի փոշուց), ացետիլասպարագինաթթուն մասնակցում է ացետիլ-խոլինի սինթեզին՝ որպես ացետիլ-խոլինի աղբյուր: Պարզվել է, որ ացետիլ-խոլինի սինթեզի համար ացետիլասպարագինաթթուն հանդես է բերում նույնպիսի էֆեկտիվություն, ինչպես քաղախաթթվական նատրիումը՝ նույն պայմաններում ացետիլ-գլիցինը և ացետիլ-ալանինը մասնակցում են ացետիլ-խոլինի սինթեզին, բայց համեմատաբար ավելի թույլ չափով, քան ացետիլասպարագինաթթուն:

Ացետիլ-խոլինի սինթեզի պրոցեսում ացետիլասպարագինաթթուն հիդրոլիզի է ենթարկվում, այդ համաձայնորեն պայմանավորված է ուղեղում ացետիլասպարագինաթթուն հիդրոլիզող ֆերմենտի առկայությամբ, որը խիստ յուրահատուկ չէ N-ացետիլ-ամինոթթուների նկատմամբ:

ЛИТЕРАТУРА — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

¹ Г. Г. Таллан, С. Мур и В. Т. Стейн, J. Biol. Chem., 211, 927, 1955. ² Г. Г. Таллан, С. Мур и В. Т. Стейн, J. Biol. Chem., 219, 257, 1956. ³ Г. Г. Таллан, J. Biol. Chem., 224, 41, 1957. ⁴ К. Б. Якобсон, J. General Physiology, 43, 323, 1959. ⁵ Ф. Б. Гольдштейн, Biochim. et biophys. acta, 33, 589, 1959. ⁶ Ф. Б. Гольдштейн, J. Biol. Chem., 234, 2702, 1959. ⁷ С. Р. Кори, Б. де Браганза и Д. Нахманзон, J. Biol. Chem., 189, 705, 1951. ⁸ К. К. Баркер, J. Chem. Soc., 453, 1953. ⁹ Е. П. Кеннеди и Г. А. Баркер, Anal. Chem., 23, 1033, 1951. ¹⁰ П. А. Коменгани и Е. Э. Клейн, „Биохимия“, 21, 389, 1956.