

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

А. А. ИВЛЕВ, М. Я. КОРОЛЕВА

О ФРАКЦИОНИРОВАНИИ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 VIII 1973)

Вопросы фракционирования изотопов в живых организмах еще мало изучены. Экспериментально установлено ⁽¹⁾, что при фотосинтезе карбоксильная группа аминокислот оказывается обогащенной по изотопу углерода C^{13} относительно декарбоксилированного остатка. Степень обогащенности меняется в зависимости от типа аминокислоты и от вида ассимилирующего CO_2 организма. Для решения вопроса о том, являются ли наблюдаемые изотопные различия следствием фракционирования, сопровождающего ассимиляцию атмосферной углекислоты организмом, или физико-химическими изотопными эффектами, сопровождающими процессы метаболизма, нами рассмотрены основные пути ассимиляции CO_2 и связанные с ними метаболические циклы, в ходе которых происходит биосинтез углеводов и аминокислот. Мы исходили из экспериментально установленного факта (^(1, 5) и др.), что изотопный состав биогенного углерода легче изотопного состава углерода CO_2 . В этой статье мы не анализируем причин возникновения «исходных» различий, а рассматриваем лишь причины сохранения их, несмотря на многократное прохождение атмосферного углерода через метаболические циклы в процессе круговорота.

Обнаружено, что основными факторами, обуславливающими сохранение различий изотопного состава углерода в живых организмах и в атмосфере, являются практическая необратимость биохимических процессов и строгая стереоспецифичность взаимодействий субстратов с ферментами. Концентрирование тяжелого изотопа C^{13} в карбоксильных группах аминокислот не связано в основном с физико-химическими изотопными эффектами, а является следствием действия указанных факторов в процессах фиксации CO_2 в реакции Вуда — Веркмана и фотосинтетическом цикле.

Опыты с $C^{13}O_2$, добавленной вместе с пировиноградной кислотой к препарату, содержащему ферменты карбоксилирования и ферменты, катализирующие реакции цикла Кребса, показали ⁽²⁾, что вся метка оказывается лишь в одном из карбоксильных атомов α -кетоглутаровой кислоты. Анализ этого эффекта ^(3, 4) приводит к выводу, что он связан со стереоспецифичностью фермента, которая делает пространственно различимыми карбоксильные группы лимонной кислоты, являющейся продуктом фиксации CO_2 (эффект Огстона). Эта абсолютная стереоспецифичность является существенной в отношении биосинтеза неравномерно изотопномеченных соединений. Поскольку атмосферная углекислота обогащена по C^{13} относительно биокomпонентов, то механизм типа эффекта Огстона при фиксации CO_2 приводит к возникновению изотопных эффектов Δ между карбоксильной группой аспарагиновой и глутаминовой кислот и декарбоксилированным остатком. Эти эффекты являются псевдоизотопными, так как не связаны с нормальными физико-химическими изотопными эффектами. Поступление экзогенного углерода в карбоксильную группу аспарагиновой кислоты возможно благодаря функционированию

цикла не только в сторону образования α -кетоглутаровой кислоты, но и в направлении от щавелевоуксусной через яблочную и фумаровую к янтарной кислоте. При этом C^{13} оказывается равномерно распределенным между симметричными карбоксильными группами фумаровой кислоты, и это распределение наследуется остальными дикарбоновыми кислотами. Тем самым обе карбоксильные группы дикарбоновых кислот оказываются обогащенными по C^{13} . На псевдоизотопные эффекты накладываются меньшие по масштабу реальные эффекты, связанные с процессами ассимиляции CO_2 , что приводит к изотопным различиям углерода карбоксильных групп и поглощаемой углекислоты (табл. 1). В некоторых случаях эти

Таблица 1

Изотопные эффекты углерода (δC^{13}) в аминокислотах, связанных с циклом Кребса (по данным (1)) *

Аминокислота	Chlorella	Anacystis	Scenedesmus	Chromatium	Eyglena	Gracilaria
Глутаминовая кислота					1,019	
радикал	-21,1	-16,7	-26,6	-20,1		-19,3
карбоксил	-8,8	+11,7	-5,6	+2,2	-21,5	-8,4
Δ	1,012	1,028	1,021	1,022	-0,2	1,011
Аргинин					1,021	
радикал	-22,6	—	—	—		-15,9
карбоксил	-2,6	—	—	—	-19,8	-3,6
Δ	1,020	—	—	—	+3,6	1,011
Аспарагиновая кислота					1,023	
радикал	-15,6	-22,1	-24,3	-27,6		-18,4
карбоксил	+2,2	+2,8	-0,8	-15,9	-20,3	-5,3
Δ	1,018	1,025	1,023	1,012	+1,9	1,013
Серин					1,021	
радикал	-9,9	—	—	-8,4		-10,8
карбоксил	-2,5	—	—	-2,8	-9,5	-8,8
Δ	1,007	—	—	1,005	-6,1	1,002
Аланин					1,003	
радикал	-11,8	-14,2	-20,8	—		-17,2
карбоксил	-7,3	+0,2	-13,5	—	-14,6	-11,5
Δ	1,005	1,014	1,007	—	-13,8	1,006
Лейцин					1,001	
радикал	-26,0	-17,8	-22,2	-23,7		-25,1
карбоксил	-16,3	-15,0	-17,8	-22,5	-25,6	-24,1
Δ	1,010	1,003	1,004	1,001	-13,6	0,998

* Величины δC^{13} приведены относительно ассимилируемой CO_2 , для которой принято $\delta C^{13} = 0$, $\Delta = 1 + (\delta C^{13}R - C^{13}OON - \delta C^{13}R - COON) \cdot 10^3$.

различия обусловлены попаданием в карбоксильную группу легкого по изотопному составу углерода алкильного радикала аминокислот при метаболизме. В глутаминовой кислоте лишь одна карбоксильная группа утяжелена вследствие эффекта Огстона. В известных биохимических процессах, приводящих к образованию аргинина, легкая карбоксильная группа глутаминовой кислоты переходит в алкильный радикал, и, таким образом, у аргинина псевдоизотопный эффект проявляется в чистом виде, что позволяет дать его оценку. По экспериментальным данным величины эффекта в различных организмах варьируют в широких пределах от 1,011 до 1,023 (табл. 1). Кроме того, поскольку суммарный карбоксильный углерод глутаминовой кислоты включает изотопнолегкую (α) и изотопнотяжелую (γ) группу, то вследствие взаиморазбавления изотопный состав суммарного карбоксильного углерода глутаминовой кислоты должен быть беднее по C^{13} изотопного состава аргинина, что и наблюдается во всех изученных случаях. Нетрудно оценить изотопное распределение и в других аминокислотах, генетически связанных с кетокислотами цикла Кребса (табл. 1).

Однако наряду с рассмотренными аминокислотами есть другие, которые не имеют непосредственного отношения к циклу Кребса. Это серин, глицин, аланин, ароматические аминокислоты и др. Для них также наблюдается обогащенность карбоксильных групп по C^{13} по сравнению с алкильными радикалами. Известные опыты Кальвина по ассимиляции углерода при фотосинтезе ⁽⁶⁾ показывают, что важной причиной неравномерного распределения изотопов при биосинтезе является специфичность

Таблица 2
Распределение метки в опытах Кальвина ⁽⁶⁾

№ С-атома	Группа	ФГК		Гемеза		Рибулоза 3 сек.
		5 сек.	15 сек.	5 сек.	15 сек.	
1	Карбоксил	82	49	3	13	41
2	α -углерод	6	25	3	12	40
3	β -углерод	6	25	43	24	69
4				42	24	5
5				3	12	3
6				3	13	—

химических взаимодействий. Соединение меченой CO_2 с рибулезо-1,5-дифосфатом возможно лишь в определенном месте, поэтому метка, поступающая с ассимилируемой $C^{14}O_2$, оказывается сконцентрированной в карбоксильной группе ФГК, а затем в третьем и четвертом атомах глюкозы соответственно (табл. 2). После прекращения введения $C^{14}O_2$, при многократном повторении циклов, транскетолазные реакции приводят к рандомизации метки в соединениях.

В процессе ассимиляции атмосферной CO_2 при фотосинтезе из-за различия содержания C^{13} в углекислоте и организме, как и в цикле Кребса, должен наблюдаться псевдоизотопный эффект. В естественных условиях рандомизации изотопа C^{13} не происходит, поскольку организм, являясь открытой системой, непрерывно ассимилирует экзогенный углерод. В силу этого сохраняются изотопные различия. Они объясняется экспериментально найденное обогащение по C^{13} карбоксильных групп серина, глицина, аланина и др. (табл. 1). Действительно, если проследить за судьбой обогащенных по C^{13} карбоксильных атомов углерода ФГК, то можно убедиться, что они попадают в карбоксильную группу пирувата в гликолитических реакциях, а затем в указанные аминокислоты. Следовательно, в результате существования стереоспецифичных ферментов и практической необратимости биохимических превращений вопрос о термодинамическом характере внутримолекулярного распределения изотопов в биохимических компонентах не возникает.

Подтверждением того, что рассматриваемые изотопные различия не являются истинными физико-химическими изотопными эффектами, являются опыты по гетеротрофному выращиванию фотосинтезирующих организмов, в которых источником питания являлась исключительно глюкоза ⁽¹⁾. В отсутствие ассимиляции CO_2 изотопные эффекты между карбоксильными группами и декарбоксилированным остатком всех изученных аминокислот исчезали. С этих позиций легко объяснить вызывавший недоумение факт, что на фоне общей картины распределения изотопов в аминокислотах выделялся лейцин, у которого карбоксильная группа оказалась значительно легче карбоксильного углерода других аминокислот. Дело в том, что в соответствии с изученной цепочкой превращений карбоксильная группа лейцина происходит от изотопнолегкого атома углерода алкильного радикала.

Таким образом, внутримолекулярная изотопная неоднородность, обнаруженная в аминокислотах и углеводах, является следствием стереоспецифичности взаимодействия ферментов с субстратом и различия изотопного состава ассимилируемой CO_2 и организма. Изотопные различия индивидуальных соединений определяются конкретными путями их биосинтеза.

Научно-исследовательский
геологоразведочный нефтяной институт
Москва

Поступило
17 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Н. Abelson, T. C. Hoering, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 623 (1961).
² H. C. Wood, C. H. Werkmann et al., J. Biol. Chem., 139, 483 (1941). ³ A. G. Ogston, Nature, 162, 963 (1948). ⁴ С. З. Рогинский, С. Э. Шноль, Изотопы в биохимии, Изд. АН СССР, 1963, стр. 178. ⁵ E. T. Degens, Biogeochemistry of Stable Carbon Isotopes, In: Organic Geochemistry Methods and Results, 1963, p. 304.
⁶ М. Кальвин, Углеродный цикл при фотосинтезе. Сборн. Современные проблемы биохимии, ИЛ, 1957, стр. 446.