

Е. С. ПАНЦХАВА, Е. Ю. СЫРОМЯТНИКОВ

**УЧАСТИЕ СУБКЛЕТОЧНЫХ ЧАСТИЦ В ОБРАЗОВАНИИ МЕТАНА
ИЗ CH_3V_{12} БЕСКЛЕТОЧНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ
*METHANOBACILLUS KUZNESEOVII***

(Представлено академиком А. И. Опариным 29 I 1973)

Бесклеточные экстракты термофильной метанобразующей культуры *Methanobacillus kuzneseovii* образуют метан из CH_3V_{12} ⁽¹⁾. В транспорте CH_3 -группы с метил- V_{12} до CH_4 принимают участие несколько ферментных систем. Метильная группа с метил- V_{12} переносится кобаламинсодержащим ферментом метилтрансферазой на КоМ с образованием метилированного соединения $\text{CH}_3\text{КоМ}$. Последнее переносит CH_3 -группу к ферментной системе, восстанавливающей ее до CH_4 . Полагают, что метильная группа транспортируется либо в виде карбоний-иона (CH_3^+), или в виде радикала ($\text{CH}_3^\cdot$). В том и другом случае для образования CH_4 необходим транспорт протонов и электронов.

Определенный интерес представляет локализация перечисленных ферментных систем в клетке метанобразующих бактерий. Относительно КоМ известно, что это низкомолекулярное соединение легко удаляется из бесклеточного экстракта диализом ⁽²⁾. О других ферментных системах известно, что они переходят в бесклеточный экстракт при разрушении клеток на френч-прессе или прессе Хьюза с последующим удалением крупных осколков клеток центрифугированием при 20 000—30 000 *g* в течение 30—60 мин. При изучении культуры *Mbac. kuzneseovii* установлено, что в определенных условиях разрушения и при дальнейшем центрифугировании грубого экстракта со скоростью 20 000 *g* в течение 15 мин. и более получаемые препараты бесклеточных экстрактов теряют полностью метилредуктазную активность, но сохраняют метилтрансферазную активность. Результаты исследования указанного явления приведены ниже. Грубые экстракты получались из культуры *Mbac. kuzneseovii* по ранее описанному методу с небольшим дополнением ⁽¹⁾. Суспензии целых клеток полностью отмывались от прокаленного асбеста. Экстракты подвергались центрифугированию при разных режимах. Бесклеточный экстракт, полученный при центрифугировании грубого экстракта при 10 000 *g*, образуется за 90 мин. из CH_3V_{12} в отсутствие АТФ 80 нмол. CH_4 в присутствии АТФ 170 нмол. Бесклеточные экстракты, полученные при 15 000 *g*, образуют соответственно 6 и 11,5 нмол. метана. Реакции проводились в атмосфере H_2 . Инкубационная смесь содержала 0,05 *M* калийфосфатный буфер pH 6,8, 1 *mM* $\text{NaS} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 5 *mM* $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,56 μ моля CH_3V_{12} , температура инкубации 54°, количество белка 32 и 28 мг, объем смеси 2,6 мл.

Увеличение скорости и времени центрифугирования приводит к резкому снижению метилредуктазной активности.

Возможно, что уменьшение активности связано с оседанием субклеточных частиц при скоростях более 10 000 *g*. Этот вывод был подтвержден дифференцированным центрифугированием грубого экстракта.

Экстракт центрифугировался при скорости 10 000 *g* 10 мин. для удаления неразрушенных клеток и крупных клеточных осколков. Полученная первичная надосадочная жидкость подвергалась вторичному центри-

фугированию в режиме 20 000 *g* в течение 25 мин. В результате образовался осадок и прозрачная надосадочная жидкость коричневого цвета. Измерение метилредуктазной активности было проведено по обычной методике с использованием CH_3V_{12} в качестве субстрата. Осадок субклеточных частиц дважды промывался 0,05 *M* калийфосфатным буфером pH 6,8 с 5 *mM* $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на холоду. Первичная надосадочная жидкость образует 23 нмоля CH_4 . Вторичная надосадочная жидкость образует только 3 нмоля метана, субклеточные частицы — 2 нмоля CH_4 . Объединение вторичной надосадочной жидкости с субклеточными частицами восстанавливало синтез метана, выход которого составил 60 нмол.

Условия реакции. Объем инкубационной смеси 2,3 мл, 0,05 *M* калийфосфатный буфер pH 6,8, 1 *mM* $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 5 *mM* $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,76 μ моля CH_3V_{12} , белок первичной надосадочной жидкости 37,5 мг, белок вторичной надосадочной жидкости 32,5 мг, белок субклеточных частиц 6 мг, атмосфера H_2 , 54°, время инкубации 90 мин.

Вторичное центрифугирование надосадочной жидкости и удаление осевших субклеточных частиц приводит к потере метилредуктазной активности во вторичной надосадочной жидкости. Добавление к такой надосадочной жидкости осадка субклеточных частиц восстанавливает метилредуктазную активность.

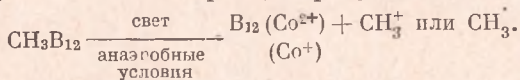
Изолированные субклеточные частицы не способны образовывать CH_4 из CH_3V_{12} . Они проявляют свой эффект только в присутствии надосадочной жидкости, в которой локализованы ферментные системы, осуществляющие перенос CH_3 -группы с CH_3V_{12} .

Было предположено, что субклеточные частицы синтезируют CH_4 из карбоний-иона или метил-радикала, которые образуются в результате метилтрансферазной активности надосадочной жидкости. Ранее было установлено, что карбоний-ион или метил-радикал также могут образовываться из CH_3V_{12} под воздействием света в анаэробных условиях⁽³⁾. Световой эффект был применен с целью выяснения способности субклеточных частиц в отсутствие надосадочной жидкости синтезировать CH_4 из карбоний-иона или метил-радикала, находящихся в инкубационной среде в свободном состоянии.

Условия реакции. Объем инкубационной смеси 1,8 мл, 0,05 *M* калийфосфатный буфер pH 6,8, 1 *mM* $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 5 *mM* $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,76 μ моля CH_3V_{12} , белок надосадочной жидкости 16,2 мг, белок субклеточных частиц 4 мг, атмосфера H_2 , 54°, мощность источника света 200 вт, расстояние осветителя до объекта 20 см. Под влиянием света в контрольном варианте (буфер) за 30 мин. инкубации образуется 100 нмол. CH_4 , за 90 мин. 100 нмол. CH_4 .

В опыте надосадочная жидкость образует за 30 мин. инкубации 160 нмол. CH_4 , за 90 мин. 210 нмол. CH_4 . Субклеточные частицы синтезируют за 30 мин. инкубации 100 нмол. CH_4 , за 90 мин. также 100 нмол. CH_4 . В этих условиях надосадочная жидкость и субклеточные частицы за 30 мин. образуют 240 нмол. CH_4 , за 90 мин. 320 нмол. CH_4 .

Метан, образующийся в контроле, — продукт абиогенного синтеза⁽³⁾:



Добавление субклеточных частиц к контрольной смеси не приводит к увеличению синтеза CH_4 . Очевидно, образования свободного карбоний-иона или метил-радикала недостаточно для их восстановления в CH_4 субклеточными частицами. Субклеточные частицы проявляют свой эффект только в присутствии надосадочной жидкости. Возможно, в результате метилтрансферазной реакции образуется низкомолекулярное метилированное соединение — CH_3CoM , которое переносит CH_3 -группу в субклеточные частицы. И только в этом случае последние способны восстанавливать метил до метана.

Таким образом, синтез CH_4 из CH_3B_{12} осуществляется несколькими ферментными системами, имеющими различную пространственную локализацию. Фермент метилтрансфераза и низкомолекулярный кофактор КоМ — переносчики CH_3 -группы локализованы в водорастворимой фракции клеток, тогда как ферментная система, обладающая метилредуктазной активностью, локализована в субклеточных частицах (рис. 1).

Выше было указано, что восстановление метильной группы до метана требует транспорта электронов и протона. Можно предположить, что локализация метилредуктазной системы в субклеточных частицах связана с

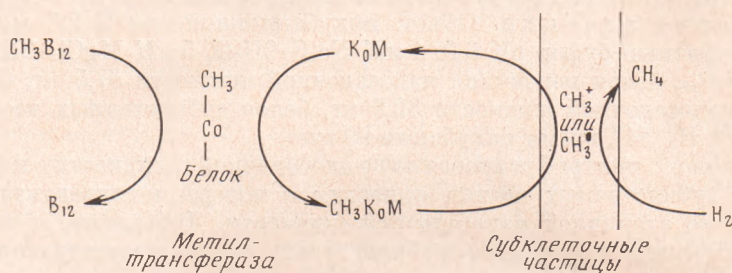


Рис. 1. Предполагаемая схема образования метана из CH_3B_{12} бесклеточными экстрактами *Mbас. kuznesceovii*

локализацией последних звеньев электронтранспортной цепи в этих частицах.

Изучение оптических свойств бесклеточных экстрактов *Mbас. kuznesceovii* на двухлучевом спектрофотометре в системе дитионит — ферриционид выявило ряд характерных максимумов. Бесклеточный экстракт (10 000 g) имеет три максимума поглощения в следующих областях длин волн: 475, 550, 570 мμ. Бесклеточный экстракт (20 000 g) имеет только два максимума поглощения: 475, 550 мμ, субклеточные частицы — один максимум поглощения, 570 мμ. Природа этих максимумов поглощения неизвестна. Предполагается, что эти максимумы принадлежат клеточным пигментам, функции которых, возможно, связаны с образованием метана.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
18 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. С. Панцхава, В. Н. Букин, ДАН, 206, № 2 (1972). ² В. С. McBride, R. S. Wolfe, Biochemistry, 10, 2317 (1971). ³ Е. С. Панцхава, ДАН, 208, № 3 (1973).