

УДК 576.343

БИОХИМИЯ

В. Я. БЫХОВСКИЙ, Н. И. ЗАЙЦЕВА, член-корреспондент АН СССР В. Н. БУКИН

РОЛЬ АММОНИЙНОГО АЗОТА В БИОСИНТЕЗЕ ВИТАМИНА В₁₂ PROPIONIBACTERIUM SHEERMANII

В исследованиях по изучению влияния различных концентраций аммонийных солей на биосинтез витамина В₁₂ и порфиринов суспензиями покоящихся клеток *P. shermanii* на среде, содержащей глюкозу и минеральные соли (¹), было показано, что при исключении из этой среды источника аммонийного азота витамин В₁₂ не образуется. Синтез витамина не происходил даже при наличии в среде его азотсодержащего предшественника δ-аминолевулиновой кислоты (δ-АЛК). Образование порфиринов при этом не нарушалось (табл. 1).

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что даже незначительное добавление диаммонийфосфата, соответствующее 6 мг на 100 мл N—NH₃, было достаточным для образования витамина В₁₂, содержание которого было особенно высоким при наличии в среде δ-АЛК. При дальнейшем возрастании концентраций аммонийного азота увеличивалось накопление витамина В₁₂ в клетках. Количество же синтезируемых внеклеточных порфиринов оставалось постоянным и зависело лишь от присутствия δ-АЛК. В данном и всех последующих экспериментах витамин В₁₂ определялся химическим методом, позволяющим измерить все производные витамина, в том числе и продукты его неполного амидирования — кобировые кислоты (²).

Таблица 1

Влияние различных концентраций диаммонийфосфата на биосинтез витамина В₁₂ и порфиринов суспензией покоящихся клеток *P. shermanii**

Вариант	Витамин В ₁₂ , мкг	Внеклеточные порфирины, мкг
Контроль (К ₁)	Нет	6
К ₁ + (NH ₄) ₂ HPO ₄		
0,3 г на 100 мл	36	5
0,15	257	3
0,30	341	6
0,90	683	10
К ₁ + δ-АЛК (К ₂)	Нет	136
К ₂ + (NH ₄) ₂ HPO ₄		
0,03 г на 100 мл	243	110
0,15	520	107
0,30	580	97
0,90	1050	117

* Инкубация 48 час. при 30°. δ-АЛК добавлялась в количестве 4 мг на 100 мл.

В связи с полученными результатами возник вопрос, является ли наблюдаемое влияние аммонийного азота специфическим или отсутствие биосинтеза витамина В₁₂ при исключении аммонийных солей из инкубационной среды связано с общим нарушением белкового синтеза, в том

числе п синтеза ферментных систем, катализирующих образование витамина.

Для выяснения этого вопроса были проведены опыты по изучению действия ингибитора белкового синтеза — хлорамфеникола — на образование витамина B_{12} и порфиринов суспензиями покоящихся клеток *P. shermanii* (табл. 2).

Результаты опыта показали, что в изучаемых условиях хлорамфеникол не оказывал существенного влияния на биосинтез витамина B_{12} и порфиринов как на фоне δ -АЛК, так и в ее отсутствие. В то же время было установлено, что добавление хлорамфеникола в концентрации 200 μ на 1 мл резко подавляло включение в белок меченного по углероду лейцина. Исключение аммонийного азота из инкубационной среды не влияло на включение меченого лейцина в течение изучаемого короткого срока экспозиции, что указывает на возможное образование белка суспензиями покоящихся клеток за счет эндогенного пула свободных аминокислот (рис. 1).

Полученные результаты показывают, что ферментная система, осуществляющая биосинтез корринового кольца витамина B_{12} , является конститутивной и требует для активации ионов аммония.

Подтверждением этого предположения явились эксперименты по изучению влияния на биосинтез витамина B_{12} и порфиринов некоторых аминокислот, взятых в качестве единственного источника азота (табл. 3).

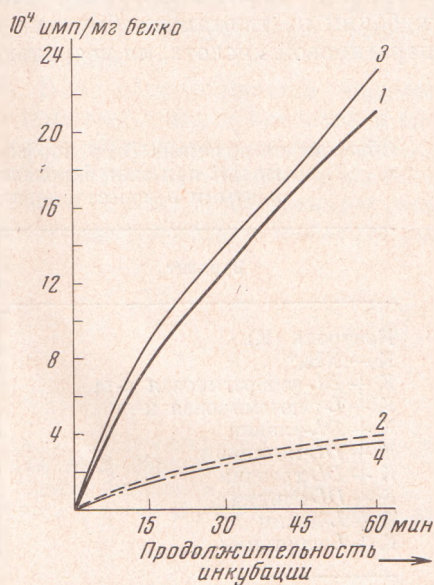


Рис. 1. Влияние хлорамфеникола на включение в белок меченого лейцина суспензиями покоящихся клеток *P. shermanii*. 1 — контроль (K), 2 — K + хлорамфеникол, 3 — K — NH_4^+ , 4 — K — NH_4^+ + хлорамфеникол

Таблица 2

Влияние хлорамфеникола на биосинтез витамина B_{12} и порфиринов суспензией покоящихся клеток *P. shermanii**

Вариант	Витамин B_{12} , μ г/г	Внеклеточные порфирины, μ г/г
Контроль (K_1)	371	13
K_1 + хлорамфеникол	357	12
K_1 — NH_4^+	Нет	5
K_1 — NH_4^+ + хлорамфеникол	Нет	9
K_1 + δ -АЛК (K_2)	533	505
K_2 + хлорамфеникол	590	535
K_2 — NH_4^+	Нет	700
K_2 — NH_4^+ + хлорамфеникол	Нет	750

* Инкубация 48 час. при 30°. В качестве источника аммонийного азота использовался диаммонийфосфат в концентрации 0,3 г в 100 мл. Хлорамфеникол добавлялся в количестве 200 μ г/мл. δ -АЛК добавлялась в количестве 5 мг на 100 мл.

Образование витамина B_{12} наблюдалось лишь при наличии в среде аспарагиновой кислоты или глутамина. Остальные аминокислоты, и, что особенно интересно, непосредственные предшественники витамина B_{12} — глицин, метионин и треонин, — были не эффективны. Треонин и глицин

стимулировали порфиринообразование, а метионин оказывал угнетающий эффект.

Изучение содержания аммония (³) в инкубационной среде показало, что из испытанных аминокислот только аспарагиновая подвергалась интенсивному дезаминированию. Концентрация аммонийного азота при инкубации на глутамине была на порядок ниже, чем при инкубации на аспарагиновой кислоте, но несколько выше, чем на других аминокислотах,

Таблица 3

Образование витамина В₁₂ и порфиринов суспензиями покоящихся клеток *P. shermanii* при инкубировании на средах с аминокислотами, взятыми в качестве единственного источника азота *

Вариант	Витамин В ₁₂ , мг/г	Внеклеточные порфирины, мг/г	N—NH ₃ , мкг/мл
Контроль (К)	580	316	113,0
К — NH ₄ ⁺	Нет	314	1,8
К + DL-аспарагиновая к-та	756	362	94,0
К + L-глутаминовая к-та	Нет	533	2,5
К + DL-аланин	»	343	7,0
К + DL-метионин	»	76	4,5
К + DL-треонин	»	580	3,0
К + DL-глицин	»	560	6,3
К + L-лизин	»	423	3,3
К + L-глутамин	765	342	9,5

* Инкубация 36 час. при 30°. δ-АЛК добавляли во всех вариантах опыта в количестве 4 мг на 100 мл. В качестве источника аммонийного азота в контроле был сернокислый аммоний. Все источники азота вносили в среду из расчета 30 мг азота на 100 мл.

включая глутаминовую. По-видимому, дезамидирование глутамина регулируется уровнем аммония в среде.

Согласно современным представлениям, расхождение путей биосинтеза витамина В₁₂ и порфиринов наблюдается после образования монопиррола порфобилиногена (ПБГ), который образуется в результате ферментатической конденсации двух молекул δ-АЛК под действием фермента АЛК-дегидратазы. Дальнейшее превращение ПБГ в циклическую структуру уропорфириногена катализируется ферментным комплексом порфобилиногеназой, который, как полагают, состоит из двух ферментов — уропорфириноген I-синтетазы и уропорфириноген III-косинтетазы (⁴).

Изучение влияния возрастающих концентраций ионов аммония на образование ПБГ и порфиринов из δ-АЛК бесклеточными экстрактами *P. shermanii* показало, что образование ПБГ при этом не изменялось, тогда как синтез порфиринов был подавлен (табл. 4).

Таблица 4

Влияние аммонийного азота на образование ПБГ и порфиринов бесклеточными экстрактами *P. shermanii**

N—NH ₃ , ммол/мл	ПБГ, ммол. на 1 мг белка		Порфирины, ммол. на 1 мг белка	N—NH ₃ , ммол/мл	ПБГ, ммол. на 1 мг белка		Порфири- ны, ммол. на 1 мг белка
	2 часа	21 час			2 часа	21 час	
Нет	18,8	25,4	3,1	25	19,3	25,0	2,6
5	18,8	22,0	2,8	50	20,1	25,4	2,2
10	19,0	22,4	2,7	150	19,5	25,7	1,8

* Инкубация проводилась при 37°. В инкубационную смесь (2 мл) вносили δ-АЛК в количестве 5 ммол. Аммоний вносили в виде диаммонийфосфата.

Проведенные исследования позволяют предположить, что возможной точкой приложения специфического действия ионов аммония на биосинтез витамина В₁₂ является стадия, на которой происходит расхождение путей биогенеза витамина В₁₂ и других тетрапиррольных соединений. Ферментные системы, осуществляющие синтез корринового кольца молекулы витамина В₁₂, до сих пор не известны. Однако не исключено участие в этом процессе порфобилиногеназного комплекса.

Образование уропорфириногена из ПБГ сопровождается выделением аммиака, увеличение концентрации которого при его внесении в среду может привести к смещению реакции в сторону синтеза витамина В₁₂.

Однако, вне зависимости от высказанного предположения, полученные данные свидетельствуют, что ионы аммония играют существенную роль в функционировании ферментных систем, осуществляющих биосинтез витамина В₁₂ после образования ПБГ.

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

Поступило
19 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Я. Быховский, Н. И. Зайцева, В. Г. Мантрова, ДАН, 157, № 3, 692 (1964). ² Г. В. Пронякова, ДАН, 123, № 2, 331 (1958). ³ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Б. Э. Кирштейне, Прикл. биохим. и микробиол., 4, 1, 120 (1968). ⁴ В. Я. Быховский, Н. И. Зайцева, В. Н. Букин, Усп. биол. хим., 10, «Наука», 1969, стр. 199.