

УДК 577.158.2

БИОХИМИЯ

Е. С. ПАНЦХАВА, член-корреспондент АН СССР В. Н. БУКИН

**РОЛЬ ПИРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ОБРАЗОВАНИИ  
МЕТАНА ИЗ  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  БЕСКЛЕТОЧНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ  
МЕТАНОВАКИЛЛУС KUZNECEOVII**

Бесклеточные экстракти *M. kuzneceovii* образуют метан из  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  (1). Метилкобаламин подвергается деметилированию с образованием восстановленного кобаламина и метилированного КоM (2). Метил КоM переносит метильную группу к ферментным системам, восстанавливающим метилкарбониум-ион ( $\text{CH}_3^+$ ) в метан (3). Обе реакции протекают в строго анаэробных условиях и требуют обязательного присутствия молекулярного водорода (1).

Для синтеза  $\text{CH}_4$  из  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  необходимо иметь цепь транспорта электронов, источником которых могут быть либо НАД-Н<sub>2</sub>, либо НАДФ-Н<sub>2</sub>.

Бесклеточные экстракти *M. kuzneceovii* выделялись, как описано ранее (1). В экспериментах использовались препараты АТФ, АМФ, НАД, НАДФ и НАД-Н<sub>2</sub> фирмы «Реанал» (Венгрия) и НАДФ-Н<sub>2</sub> фирмы «Boehringer Mannheim GmbH» (ФРГ). Метилкобаламин синтезировали по Вейсау и Петерковски (4). Дегидрогеназная и гидрогеназная активности определялись по изменению экстинкции восстановленных нуклеотидов в области 340 мкм в инкубированной смеси, содержащей 0,05 M калийфосфатный буфер, рН 7,0, 5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  при температуре 22° и 54°. Скорость деметилирования  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  определялась по изменению соотношения величин экстинкций в области 340 и 350 мкм (специфические максимумы соответственно для метил- и гидроксикобаламина) в инкубационной смеси, содержащей калийфосфатный буфер 0,05 M, рН 6,1, 5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , белок 45 мг, АТФ 10 мкмол. пиридиновые

Таблица 1

Влияние НАД и НАД-Н<sub>2</sub>, НАДФ и НАДФ-Н<sub>2</sub> на деметилирование  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  и образование  $\text{CH}_4$  из  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  бесклеточными экстрактами *M. kuzneceovii*

Газовая среда	Нуклеотид	Скорость деметилирования, нмол.	Скорость образования $\text{CH}_4$ , нмол.	Газовая среда	Нуклеотид	Скорость деметилирования, нмол.	Скорость образования $\text{CH}_4$ , нмол.
$\text{N}_2$	—	41	1,2	$\text{H}_2$	—	620	24,3
	НАД-Н <sub>2</sub>	350	6,6		НАД	125	14,3
	НАДФ-Н <sub>2</sub>	240	17,6		НАДФ	450	15,2

нуклеотиды по 10 мкмол.,  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  910 мкмол. при температуре 54°. Метан, образующийся в реакции, определяли на газожидкостном хроматографе «Цвет-102» с использованием ДПИ.

НАД-Н<sub>2</sub> оказывает значительный стимулирующий эффект на деметилирование  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  бесклеточными экстрактами *M. kuzneceovii* по сравнению с НАДФ-Н<sub>2</sub>.

В атмосфере  $\text{H}_2$  окисленная форма НАД оказывает более сильный ингибирующий эффект на деметилирование  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  по сравнению с НАДФ (табл. 1).

Реакция синтеза  $\text{CH}_4$  из  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  бесклеточными экстрактами *M. kuzneceovii* протекает быстрее при наличии в среде восстановленной формы НАДФ (табл. 1).

Возможно, что реакция деметилирования  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  бесклеточными экстрактами термофильного организма *M. kuzneceovii* является НАД-Н<sub>2</sub>-зависимой, тогда как для непосредственного восстановления метилкарбониума в  $\text{CH}_4$  необходима НАДФ-Н<sub>2</sub>. Восстановленные и окисленные формы пиридиновых нуклеотидов могут функционировать в указанных выше реакциях при наличии у *M. kuzneceovii* гидрогеназной и дегидрогеназной активностей.

Бесклеточные экстракты изучаемого организма с большой скоростью окисляют НАД-Н<sub>2</sub> и НАДФ-Н<sub>2</sub> (рис. 1). Скорость окис-

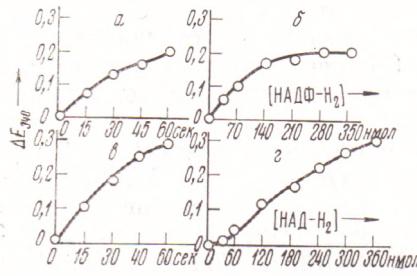


Рис. 1. Окисление НАДФ-Н<sub>2</sub> (а, б) и НАД-Н<sub>2</sub> (в, г) бесклеточными экстрактами *M. kuzneceovii*. а, в — временные зависимости, б, г — зависимость от концентрации субстрата

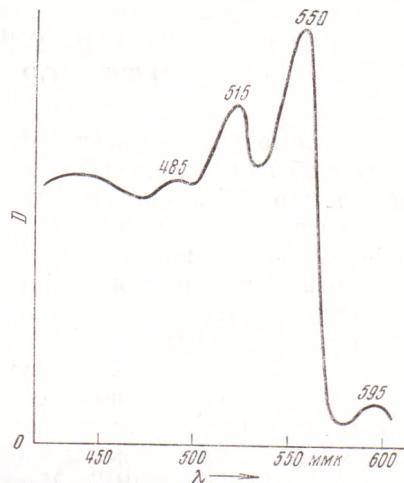


Рис. 2. Низкотемпературный спектр бесклеточного экстракта *M. kuzneceovii*. Спектрофотометр «Hitachi-356», шкала А 0,1

ления зависит от целого ряда условий. Адениловые нуклеотиды оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на окисление НАДФ-Н<sub>2</sub> и НАД-Н<sub>2</sub>. Характер эффекта зависит как от концентрации пиридиновых нуклеотидов, так и от концентрации адениловых нуклеотидов и от времени протекания реакции.

Таблица 2

Влияние дыхательных ядов на синтез метана и на НАДФ-Н<sub>2</sub>- и НАД-Н<sub>2</sub>-дегидрогеназные активности

Вид и концентрация яда	Ингибирование скорости синтеза $\text{CH}_4$ , %		Ингибирование скорости окисления, %	
	из $\text{CO}_2$ и $\text{H}_2$ интактными клетками	из $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ бесклеточными экстрактами	НАДФ-Н <sub>2</sub>	НАД-Н <sub>2</sub>
Ротенон, $10^{-7} M$	43,5	44	33	0
Азид $\text{Na}$ , $10^{-3} M$	59	78	0	0
KCN, $0,7 \cdot 10^{-3} M$	8	26	16	0

НАДФ-Н<sub>2</sub>-дегидрогеназные системы *M. kuzneceovii* имеют 3 оптимума pH 6,3; 7,3; 8,2 — которые близки к оптимумам pH для синтеза  $\text{CH}_4$  из  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ : 6,2; 7,2; 8,2. НАД-Н<sub>2</sub>-дегидрогеназные системы имеют два оптимума pH: 6,9 и 8,2, причем один из них совпадает с оптимумом pH реакции деметилирования 6,8. Оптимумы действия pH для НАДФ-Н<sub>2</sub>-дегидрогеназных систем в нейтральных и слабокислых областях pH отличаются от таких для НАД-Н<sub>2</sub>-дегидрогеназных систем.

Особый интерес представляет средство реакции синтеза  $\text{CH}_4$  к НАДФ- $\text{H}_2$ . Изучение дифференциальных спектров бесклеточных экстрактов *M. kuzneceovii* (восстановленный против окисленного) выявило несколько максимумов поглощения экстракта, близких к максимумам поглощения геминовых пигментов (рис. 2). Возможно, что организм *M. kuzneceovii* имеет электротранспортную систему, содержащую компоненты, близкие к электротранспортным системам у большинства изученных организмов, имеющих цепь транспорта электронов. Ингибирующий эффект таких дыхательных ядов, как ротенон, азид  $\text{Na}$ ,  $\text{KCN}$ , на синтез  $\text{CH}_4$  и окисление НАДФ- $\text{H}_2$  подтверждает это предположение (табл. 2). Бесклеточные экстракты *M. kuzneceovii* обладают гидрогеназной активностью и способны восстанавливать НАД и НАДФ молекулярным водородом (табл. 3). Разница в скоростях восстановления НАД и НАДФ остается пока необъяснимой.

Таким образом, термофильный мета-нообразующий организм *M. kuzneceovii* содержит ферментные системы, обладающие гидрогеназной активностью и НАД- $\text{H}_2$  и НАДФ- $\text{H}_2$ -дегидрогеназными активностями. Реакция деметилирования  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  является НАД- $\text{H}_2$ -зависимой, тогда как синтез  $\text{CH}_4$  — НАДФ- $\text{H}_2$ - зависимым. Ингибиование синтеза  $\text{CH}_4$  и окисления НАДФ- $\text{H}_2$  дыхательными ядами предполагает наличие электротранспортной системы с участием негемин- и геминсодержащих компонентов.

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

Таблица 3

Восстановление НАД и НАДФ  
молекулярным водородом  
бесклеточными экстрактами  
*M. kuzneceovii*

Время инкубации, мин.	НАД- $\text{H}_2$ , нмоль.	НАДФ- $\text{H}_2$ , нмоль.
2	3700	300
5	6100	480
8	6700	430
10	7600	380

Поступило  
11 XII 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Е. С. Панчахаев, В. В. Пчелкина, В. Н. Букин, Биохимия, т. 38, 507 (1973).  
<sup>2</sup> B. C. McBride, R. S. Wolfe, Biochemistry, v. 10, 2317 (1971). <sup>3</sup> Е. С. Панчахаев, ДАН, т. 211, 488 (1973). <sup>4</sup> H. Weissbach, A. L. Peterkofsky et al., J. Biol. Chem., v. 238, 3318 (1963).