

УДК 576.809.3:576.809.53

БИОХИМИЯ

Ю. А. ТРОЦЕНКО, Н. В. ЛОГИНОВА, В. Н. ШИШКИНА

МЕТАБОЛИЗМ МЕТИЛАМИНА У ГИФОМИКРОБОВ

(Представлено академиком А. А. Баевым 20 III 1974)

Согласно немногочисленным сообщениям (1-3), ассимиляция гифомикробами углерода метанола осуществляется сериновым путем. Информация о метаболизме метиламина этими бактериями отсутствует. Настоящая работа проведена с целью получения данных о путях использования метиламина новым штаммом *Norphomicrobium vulgare* N 3.

Выращивание бактерий, постановку кратковременных опытов и радиохроматографический анализ продуктов ассимиляции ^{14}C -метиламина (уд. активность 22,4 мС/ммоль, «Amersham») осуществляли по описанной методике (4, 5). Экстракты получали, разрушая клетки на прессе Хьюза с рабочим давлением 3000 кг/см². Вязкие суспензии обрабатывали дезоксирибонуклеазой (5 мкг на 1 мл экстракта) в течение 20 мин. при 20° и центрифугировали (9000 g, 10 мин.). В полученной при повторном центрифугировании (30 000 g, 40 мин.) надосадочной жидкости определяли активность формальдегиддегидрогеназы и формиатдегидрогеназы (6), аминоксидазы (7), аминдегидрогеназы (8), N-метилглутаматсинтазы и γ -глутамил-метиламидсинтазы (9). Об активности N-метилглутаматдегидрогеназы судили по образованию формальдегида и глутамата (10), а также по восстановлению НАД. 2 мл реакционной смеси содержали (мкМ): трис-HCl-буфер (рН 8,5) 150, НАД 1,5 и экстракт. Реакцию начинали, добавляя N-метил-L-глутамат (5 мкМ). Активность других ферментов определяли по ранее описанным методикам (5, 11). Спектрофотометрические измерения проводили с помощью «Specord UV-VIS» и СФ-4А, радиометрические — на сцинтилляционном счетчике SL-30 «Intertechnique». Белок определяли по Лоури (12). Необходимые для опытов γ -глутамил-метиламид (γ -ГМА) и N-метил-L-глутамат (N-МГ) синтезировали по (13, 14). Кроме того использовали препарат N-метил-DL-глутаминовой кислоты фирмы «Sigma».

В опытах с растущими культурами и суспензиями клеток было отмечено, что при использовании *N. vulgare* 3 метанола в среду выделяется свободный формальдегид, тогда как при росте на среде с метиламином это соединение отсутствовало. Соответственно, не удалось обнаружить у изучаемых бактерий аминоксидазу и аминдегидрогеназу. Из этого следовало, что прямого окисления метиламина не происходит.

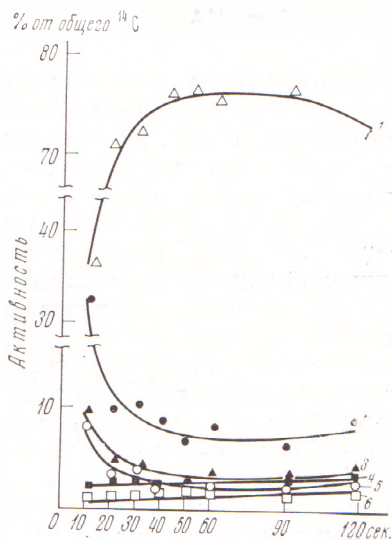


Рис. 1. Распределение активности в продуктах кратковременной ассимиляции *N. vulgare* 3 ^{14}C -метиламина. 1 — N-МГ; 2 — γ -ГМА; 3 — сериин + глицин; 4 — глутамат; 5 — саркозин; 6 — α -аланин

Радиохроматографический анализ продуктов кратковременной ассимиляции ^{14}C -метиламина (рис. 1) выявил раннее и преимущественное образование N-метилированных аминокислот и их производных, а именно γ -ГМА, N-МГ и саркозина (N-метилглицин). Это свидетельствует о функционировании у *H. vulgare* 3 N-метилглутаматного пути (⁵, ⁹). Отрицательный наклон кривой γ -ГМА указывает на его первичное образование,

Т а б л и ц а 1

Синтез γ -ГМА и N-МГ экстрактами клеток *H. vulgare* 3

Субстраты	Добавка в реакционную смесь	Радиоактивность, имп/мин	
		γ -ГМА	N-МГ
$^{14}\text{CH}_3\text{NH}_2 + L$ -глутамат	—	350	380
	АТФ	360	480
	Mn^{2+}	369	370
	АТФ + Mn^{2+}	11186	5490
	АТФ + Mg^{2+}	853	361
^{14}C - γ -ГМА	—	20702	250
	Глутамат	12133	6517

а реципрокный характер кинетики N-МГ позволяет предполагать возможность взаимопревращений этих соединений. Глицин и серин, ключевые метаболиты серинового пути ассимиляции метанола, имели значительно меньшую долю активности, что подразумевает их вторичный синтез при использовании *H. vulgare* 3 метиламина.

Экстракты клеток способны катализировать включение ^{14}C -метиламина в γ -ГМА и N-МГ в присутствии *L*-глутамата (табл. 1). Синтез обоих соединений заметно усиливается при добавлении в реакционную смесь АТФ и Mn^{2+} , что свидетельствует об их последовательном превращении. Прямым доказательством того, что γ -ГМА, по-видимому, является предшественником N-МГ, служит факт миграции метки из ^{14}C - γ -ГМА в N-МГ при наличии глутамата. Поскольку о превращении γ -ГМА в N-МГ до сих пор не сообщалось, представляет интерес выяснение механизма этой реакции и ее физиологического значения.

Примечательно, что уровни активностей ферментов, осуществляющих синтез γ -ГМА и N-МГ, значительно выше у «метиламиновых», нежели «метанольных» клеток (табл. 2). Экстракты клеток также катализировали окислительный распад N-МГ до формальдегида и глутамата при участии растворимой N-метилглутаматдегидрогеназы, проявляющей активность с НАД. Как и в случае синтаз γ -ГМА и N-МГ, активность N-метилглутаматдегидрогеназы выше у клеток, выросших на среде с метиламином, чем на среде с метанолом. Это указывает на индуцибельность данных ферментов. В экстрактах клеток *H. vulgare* 3, выросших на средах с метанолом и метиламином, обнаружены дегидрогеназы формальдегида и формиата (табл. 2). Ассимиляция формальдегида, образующегося при окислении метанола или N-МГ, как следовало из данных изотопных опытов, происходит сериновым путем, что подтверждается наличием у изучаемых бактерий соответствующих ключевых ферментов (табл. 2).

Полученные данные позволяют охарактеризовать пути использования метанола и метиламина *H. vulgare* 3. Окисление этих субстратов до CO_2 осуществляется через формальдегид и формиат, что обеспечивает клетки энергией. Ассимиляция углерода метанола и метиламина происходит как в виде CO_2 , так и на уровне формальдегида. Но если углерод метанола поступает в сериновый цикл сразу после окисления до формальдегида, то в случае использования метиламина сначала происходит N-метилирование аминокислот, прежде всего глутамата, при участии синтаз γ -ГМА и N-МГ.

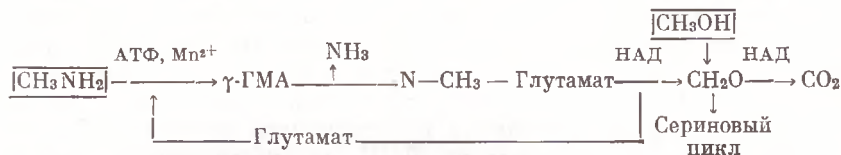
Образовавшаяся аминотетильная группа затем окисляется N-метилглутаматдегидрогеназой до формальдегида (в связанной форме), который вовлекается в сериновый цикл, видимо, посредством оксиметилирования глицина. Следовательно, замена в C₁-субстрате гидроксильной группы на аминную вызывает существенные изменения в метаболизме *H. vulgare* 3,

Таблица 2

Активность ферментов, участвующих в метаболизме метиламина и метанола у *H. vulgare* 3 (нмол. субстрата на 1 мг белка в 1 мин.)

Фермент	Субстрат для роста	
	метиламин	метанол
γ-Глутамил-N-метиламидсинтаза	29,1	1,5
N-Метилглутаматсинтаза	10,1	0,9
N-Метилглутаматдегидрогеназа (НАД)	71	14
Формальдегиддегидрогеназа (НАД) НФ 1.2.1.1	42	73
Формиатдегидрогеназа НФ 1.2.1.2	294	360
Оксипируватредуктаза НФ 1.1.1.29	362	270
Серин-гликоксилат-аминотрансфераза	500	362
Малат-лиаза	22	30

индуцируя синтез специфических ферментов N-метилглутаматного пути, осуществляющих первичное вовлечение метиламина в сериновый цикл:



Следует отметить, что N-метилглутаматный путь до сих пор был обнаружен только у представителей рода *Pseudomonas* (⁵, ⁹). Кроме *H. vulgare* 3 возможность функционирования N-метилглутаматного пути установлена нами также у *H. vulgare* ZV (²). Очевидно, этот механизм имеет достаточно широкое распространение у метилотрофов и является альтернативой прямого окисления аминов.

Авторы благодарят проф. Е. Н. Кондратьеву за ценные замечания.

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушчино-на-Оке

Поступило
20 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. J. Large, D. Peel, J. R. Quayle, *Biochem. J.*, v. 81, 470 (1961). ² Н. Г. Доман, Э. А. Васильева и др., *Микробиология*, т. 34, 1 (1965). ³ W. Harder, M. M. Attwood, J. R. Quayle, *J. Gen. Microbiol.*, v. 78, 155 (1973). ⁴ Н. Н. Курикова, Ю. А. Троценко, Е. Н. Кондратьева, *Микробиология*, т. 41, 5 (1972). ⁵ Ю. А. Троценко, Н. В. Логинова, *Микробиология*, т. 42, 783 (1973). ⁶ P. A. Johnson, J. R. Quayle, *Biochem. J.*, v. 93, 281 (1964). ⁷ R. R. Eady, T. R. Jarman, P. J. Large, *Biochem. J.*, v. 125, 449 (1971). ⁸ R. R. Eady, P. J. Large, *Biochem. J.*, v. 106, 245 (1968). ⁹ C. Wagner, J. R. Quayle, *J. Gen. Microbiol.*, v. 73, 485 (1972). ¹⁰ L. B. Hersh, J. A. Peterson, A. A. Thomson, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 145, 115 (1971). ¹¹ Ю. А. Троценко, С. В. Быковская, Н. Н. Курикова, *ДАН*, т. 211, 1230 (1973). ¹² O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, 265 (1951). ¹³ N. Lichtenstein, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 64, 1021 (1942). ¹⁴ W. V. Shaw, L. Tsai, E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.*, v. 241, 935 (1966).