

УДК 576.343

БИОХИМИЯ

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

БИОСИНТЕЗ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЦИКЛИЧЕСКОГО ТЕТРАПИРРОЛЬНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА ВИТАМИНА В₁₂

Биосинтез корринового кольца молекулы витамина В₁₂ является одной из значительных проблем современной биохимии. В 1957 г. было показано ⁽¹⁾, что δ-аминолевулиновая кислота (δ-АЛК), образующаяся в результате конденсации глицина и янтарной кислоты, служит общим предшественником как в биогенезе витамина В₁₂, так и других тетрапиррольных соединений — порфиринов, гема и хлорофилла. Следующим общим предшественником всех соединений этой группы оказался продукт энзиматической конденсации двух молекул δ-АЛК — порфобилиноген (ПБГ) ⁽²⁾. Однако дальнейшая последовательность биосинтетических реакций между ПБГ и первым из обнаруженных простейших корриноидов — кобириновой кислотой, оставалась невыясненной.

Согласно гипотезе Мэчезона и Корвина ⁽³⁾, предполагается, что общим предшественником как для витамина В₁₂, так и для порфиринов серии III является гибкий тетрапиррольный промежуточный продукт с открытой цепью. Экспериментальных данных, подтверждающих это предположение, пока нет. Гипотеза, выдвинутая Дольфином ⁽⁴⁾, обосновывает специфическую роль кобальтопорфиринов в качестве промежуточных соединений при биосинтезе витамина В₁₂. Однако каких-либо непосредственных экспериментальных доказательств в пользу этой гипотезы представлено не было. В 1965 г. Порра ⁽⁵⁾ предположил, что возможным предшественником витамина В₁₂ является уропорфириноген III. Гипотеза, выдвинутая Порра, получила свое развитие в недавних работах группы американских исследователей ⁽⁶⁻⁹⁾. Им удалось показать значительное включение (до 2,56%) меченного по углероду уропорфириногена в молекулу витамина В₁₂, синтезируемого *Propionibacterium shermanii* ⁽⁸⁾. Авторы предполагают, что биосинтетические превращения уропорфириногена протекают через последовательную серию реакций, приводящих к образованию бескобальтового корриноида. Включение кобальта в этот продукт дает кобириновую кислоту. Следует указать, что авторы пока не обнаружили каких-либо соединений, образующихся между уропорфириногеном III и кобириновой кислотой, в том числе и бескобальтового корриноида.

В 1964 г. нами было показано, что покоящиеся клетки *P. shermanii*, подвергнутые предварительному голоданию путем 24-часовой инкубации на минеральной среде, не содержащей глюкозы и солей кобальта, активно используют добавленную δ-АЛК для биосинтеза витамина В₁₂ ⁽¹⁰⁾.

В ходе проводимых исследований отмечено, что при всех экспериментах подобного рода инкубационная среда, в которой проводилось голодание, приобретала синеватую окраску. Эта окраска вызвана выделением какого-то пигмента или пигментов, происходящим вследствие нарушения обмена в отсутствие энергетического субстрата (глюкозы). Добавление δ-АЛК стимулировало накопление этих пигментов. Изучение природы выделяемых пигментов показало, что они разделяются на две фракции. Первая фракция экстрагируется из инкубационной среды, подкисленной уксусной кислотой до pH 5, серным эфиром. Из серного эфира пигмент легко извлекается разбавленной HCl, образуя сиренево-красные растворы, обладающие при освещении ультрафиолетом интенсивной красной флуоресценцией. Этот пигмент был идентифицирован как копропорфирин III.

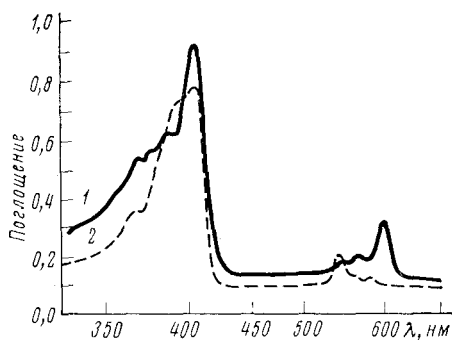


Рис. 1

Рис. 1. Абсорбционные спектры пигментов, выделяемых в среду суспензией клеток из 3-суточной культуры *P. shermanii* при голодании (в 12% HCl). 1 — коррифин; 2 — копропорфин III

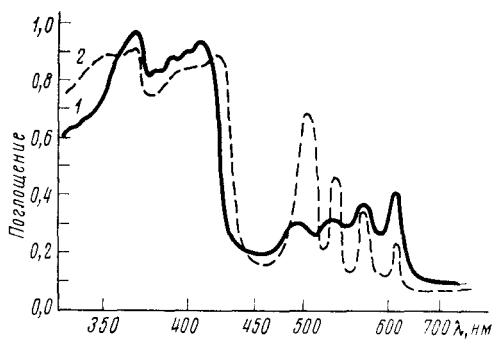


Рис. 2

Рис. 2. Абсорбционные спектры метиловых эфиров коррифина (1) и уропорфина (2) (в хлороформе)

Другая фракция экстрагировалась подобно уропорфину этил-ацетатом при pH 4. Из этил-ацетата пигмент выводился в 12% HCl в виде голубовато-синего раствора с оранжево-красной флуоресценцией при освещении ультрафиолетом. Растворы уропорфина в 12% HCl имеют, подобно растворам копропорфина сиренево-красный цвет.

Абсорбционный спектр в 12% HCl выделенного синего пигмента, называемого в дальнейшем коррифином, позволил выявить принципиальное отличие этого соединения от других порфиринов (уро-, копро- и протопорфина), спектры которых весьма идентичны (рис. 1). Обладая интенсивным поглощением в полосе Соре при 403 нм, характерным для многих тетрапиррольных соединений с закрытой цепью, коррифин отличался от них ярко выраженной абсорбцией в области 609 нм, а также дополнительным пиком при 386 нм. Эти спектральные различия, и особенно сильное поглощение в длинноволновой области, вызывают предположение о большей восстановленности молекулы коррифина и каких-то изменениях в боковых заместителях тетрапиррольного макрокольца.

Выявленные спектральные отличия коррифина от других порфиринов подтверждаются при рассмотрении абсорбционного спектра его метилового эфира в хлороформе (рис. 2). Являясь в видимой области 4-полосным, спектр коррифина характеризовался необычным соотношением максимумов абсорбции, а именно $I > II > III > IV$, которое ранее где-либо не отмечалось. Спектр большинства природных порфиринов относится к так называемому этио-типу с соотношением полос $IV > III > II > I$.

Спектр флуоресценции метилового эфира коррифина в хлороформе также отличался от спектров флуоресценции метиловых эфиров уро-, копро- и протопорфина, в основном между собой идентичных (рис. 3).

Электрофорез коррифина в 0,04 M растворе Na_2CO_3 , содержащем 10^{-4} M ЭДТА, на бумаге Ватман 3 мм при градиенте потенциала 10 в/см в течение 4 час. показал, что это соединение мигрировало по направлению к аноду в виде одного пятна, несколько отставая от уропорфина III (относительная подвижность по отношению к последнему 0,82), т. е. вело себя подобно тетрапирролу, содержащему 7 карбоксильных групп. При электрофорезе на бумаге Ватман 3 мм в 0,5 M CH_3COOH коррифин значительно мигрировал к катоду, чем отличался как от уропорфина (оставался на старте), так и от копропорфина (слабая подвижность).

Необычность обнаруженного соединения, выделяемого в особых условиях микроорганизмом, осуществляющим одновременно интенсивный биосинтез витамина B_{12} и порфиринов, вызвала предположение о возможной

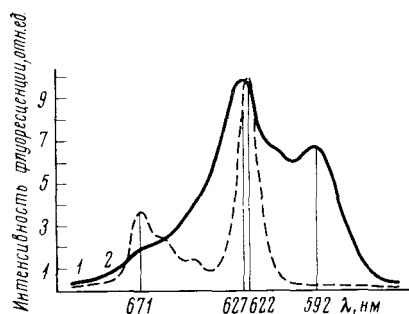


Рис. 3

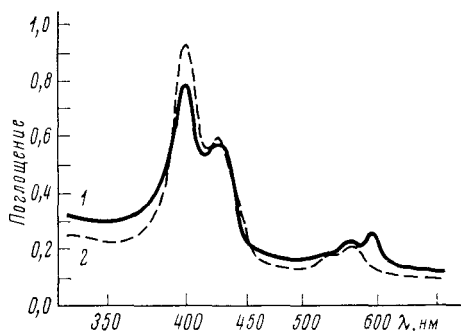


Рис. 4

Рис. 3. Спектры флуоресценции метиловых эфиров коррифина (1) и копропорфина (2) (в хлороформе)

Рис. 4. Абсорбционные спектры кобальтсодержащих производных метиловых эфиров коррифина (1) и уропорфина (2) (в хлороформе)

роли коррифина в качестве промежуточного продукта при биогенезе витамина B_{12} на заключительных стадиях образования корринового макрокольца. При этом наиболее вероятно, что дальнейшим превращениям подвергается не сам коррифин, а его кобальтсодержащее производное (¹¹).

Для выяснения этого вопроса были получены кобальтсодержащие производные метилового эфира коррифина и метиловых эфиров уро-, копро- и протопорфина. Включение кобальта контролировалось по исчезновению флуоресценции образовавшегося комплекса при его освещении ультрафиолетом и по характерным изменениям абсорбционного спектра. Абсорбционный спектр кобальтохелата метилового эфира коррифина в хлороформе отличался от спектров кобальтохелатов других порфиринов (рис. 4).

Исучаемые соединения были добавлены в ледяной CH_3COOH (1,0 мл) к суспензиям покоящихся клеток *P. shermanii* в эквимольных количествах, из расчета 25 мкг кобальта в виде соответствующего металлохелата. Контролем служили варианты, содержащие $Co(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ в количестве 250 мкг Co^{2+} на 100 мл инкубационной среды. В эти варианты также добавляли по 1,0 мл ледяной CH_3COOH . Инкубационная среда содержала, помимо минеральных солей и глюкозы (¹⁰), *DL*-метионин и восстановленный глутатион (по 50 мг на 100 мл среды) для создания условий, способствующих, как было показано нами ранее, биосинтезу витамина B_{12} (¹²). В каждую колбу вносили по 20 мкг глицина и янтарной кислоты ^{14}C и янтарной кислоты $^{14-15}C$. Инкубацию проводили при 30° в течение 45 час. Результаты см. табл. 1.

Полученные результаты показали не только интенсивное использование метилового эфира Co -коррифина в биосинтезе витамина B_{12} , но и принципиально иной характер участия его в биогенезе корринового макрокольца, отличающий его от других кобальтсодержащих тетрапирролов.

Хотя количество кобальта в Co -коррифине составляло 25 мкг, т. е. было в 10 раз меньше, чем в контрольном варианте I, где источником кобальта служила его уксуснокислая соль, биосинтез витамина B_{12} в варианте, содержащем Co -коррифин, превышал контроль на 77% (в 2 раза). При этом наблюдалось почти полное (на 75%) включение кобальта из Co -коррифина в молекулу витамина B_{12} , что свидетельствует о вероятной внутримолекулярной перестройке внесенного соединения. Прямое участие Co -коррифина в биосинтезе витамина B_{12} также подтверждается двукратным разбавлением метки глицина и янтарной кислоты, являющихся непосредственными предшественниками δ -АЛК. Из других испытанных соединений разбавление метки вызывало лишь добавление самой δ -АЛК.

Кобальтсодержащие производные других тетрапирролов не приводили к разбавлению метки. Это свидетельствует об ином механизме их исполь-

Таблица 1

Биосинтез витамина В₁₂ суспензиями покоящихся клеток *P. shermanii* на средах, содержащих кобальтохелаты метиловых эфиров тетрапирролов в качестве единственного источника кобальта

№ варианта	Вариант опыта	Биомасса, г на 100 мл	Витамин В ₁₂		Колич. Со в синтезир. витамине В ₁₂ , мкг	Со, % от внесенного в среду	Включение меченых предшественников в витамин В ₁₂	
			мкг	%			имп. на 10 мкг в 1 мин.	%
1	К *+Со ²⁺	0,65	246,0	100	10,6	4,2	2120	100
2	К+Со ²⁺ +δ-АЛК **	0,65	542,0	220	23,4	9,2	752	35,5
3	К+Со-коррифин	0,70	435,0	177	18,7	75,00	1200	56,5
4	К+Со-уропорфин	0,70	83,4	33,8	3,6	14,4	3620	170
5	К+Со-копропорфин	0,67	71,0	28,8	2,56	10,2	3400	160
6	К+Со-протопорфин	0,67	172,0	70,0	6,20	24,8	2550	120

* К — основная среда.

** δ-АЛК вносили в количестве 5 мкг на 100 мл инкубационной среды.

зования, вероятно связанном с высвобождением кобальта из ядер этих соединений с последующим его вовлечением в биосинтез витамина В₁₂. Увеличение включения метки предполагает, что Со-хелаты порфиринов оказывают какое-то каталитическое действие в обменных процессах.

Абсорбционный спектр витамина В₁₂, синтезированного из Со-коррифина, был идентичен спектру стандартного раствора цианокобаламина.

Выявленная роль Со-коррифина в качестве промежуточного соединения в биогенезе корринового макрокольца молекулы витамина В₁₂, наряду с имеющимися спектральными характеристиками, позволила сделать заключения о возможной структуре коррифина, а также о последовательности биосинтетических реакций на заключительной стадии этого биогенеза. Мы предположили, что коррифин является производным уропорфириногена III или уропорфина III, содержащим метильные группы в каких-то положениях. Это подтверждено направленным биосинтезом коррифина суспензией покоящихся клеток *P. shermanii* при инкубировании в течение 45 час. на бескобальтовой среде, содержащей глюкозу, DL-метионин и восстановленный глутатион.

Метилирование, вероятно, изменяет специфичность уропорфириноген-декарбоксилазы таким образом, что декарбоксилирование боковой цепочки молекулы уксусной кислоты происходит лишь при С₁₂ кольца С молекулы уропорфириногена. Последующее включение кобальта в молекулу коррифина, по-видимому, создает необходимые условия для его дальнейшего восстановления, сопровождающегося дополнительным метилированием с разрывом метинового мостика и возникновением прямой —С—С—связи между кольцами А и Д. Образовавшаяся при этом кобириновая кислота подвергается дальнейшему метаболизму, приводя к витамину В₁₂ и его многочисленным производным.

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

Поступило
16 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. W. Corcoran, D. Shemin, Biochim. et biophys. acta, v. 25, 661 (1957).
- ² S. Schwartz, K. Ikeda et al., Science, v. 129, 40 (1959).
- ³ J. H. Mathewson, A. H. Corwin, J. Am. Chem. Soc., v. 83, 135 (1961).
- ⁴ D. Dolphin, Bioorg. Chem., v. 2, 155 (1973).
- ⁵ R. I. Porra, Biochim. et biophys. acta, v. 107, 176 (1965).
- ⁶ A. I. Scott, C. A. Townsend et al., Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, v. 35, 72 (1973).
- ⁷ A. I. Scott, E. Lee, C. A. Townsend, Bioorg. Chem., v. 3, 229 (1974).
- ⁸ A. I. Scott, C. A. Townsend et al., J. Am. Chem. Soc., v. 96, 8069 (1974).
- ⁹ A. I. Scott, C. A. Townsend et al., J. Am. Chem. Soc., v. 96, 8069 (1974).
- ¹⁰ В. Я. Быховский, Н. И. Зайцева, Г. В. Мантрова, ДАН, т. 157, № 3, 692 (1964).
- ¹¹ В. Я. Быховский, Н. И. Зайцева, Г. В. Мантрова, ДАН, т. 180, № 5, 1237 (1968).
- ¹² В. Я. Быховский, Н. И. Зайцева, Г. Н. Хучуа, Прикл. биохим. и микробиол., т. 6, № 1, 75 (1970).