

В. Н. ГЕРШАНОВИЧ, Н. В. ЮРОВИЦКАЯ, Т. П. САПРЫКИНА, В. В. КЛЮЧЕВА

**РЕПРЕССИЯ КАТАБОЛИТАМИ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ
У МУТАНТОВ *ESCHERICHIA COLI* С ДЕФЕКТОМ
В СИСТЕМЕ ТРАНСПОРТА УГЛЕВОДОВ**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 12 V 1969)

Известно, что процесс транспорта углеводов в бактерии связан с их конкуренцией на уровне общего переносчика (1-4). Поэтому явление угнетения синтеза индуцибельных ферментов, участвующих в утилизации сахаров, в присутствии глюкозы может быть обусловлено двумя причинами: а) непосредственным влиянием катаболитов, образующихся из этого соединения, на белоксинтезирующую функцию клетки (5, 6) или б) конкурентными взаимоотношениями между глюкозой и соответствующим углеводным индуктором при переносе обоих веществ в бактерии (5, 7, 8). В на-

Таблица 1

Влияние глюкозы на синтез катаболитических ферментов у бактерий J-62 и транспортных мутантов П-34 и ГТ-17 (дифференциальная скорость синтеза ферментов в процентах от дифференциальной скорости синтеза в пробах, не содержащих глюкозу)

	β-Галактозидаза	Триптофаназа	Сериндезаминаза
J-62	1; 1; 23*; 19*	1; 1	11; 18
П-34	33; 23; 67*; 51*	111; 120	111; 120
ГТ-17	3	28	40; 53

* Лактатно-солевая среда. Во всех остальных опытах среда содержала 0,5% казиминовых кислот.

шей лаборатории в 1967 г. был выделен мутант *E. coli* П-34, у которого отсутствует конкуренция между различными углеводами в процессе их транспорта (4, 9, 10). Этот мутант был лишен фермента I и белка НРг фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы, участвующей в транспорте и аккумуляции углеводов (11, 12). Использование этого мутанта для изучения феномена катаболитной репрессии могло внести ясность в решение вопроса, какой из вышеуказанных механизмов доминирует в процессе предотвращения индукции ферментов лактозного оперона в среде, содержащей глюкозу.

Для работы были взяты Lac⁺-рекомбинанты, производные бактерий *E. coli* K12 (J-62): П-34 и ГТ-17 (последний мутант был лишен ферментов I и II фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы (13)). Все использованные штаммы были ауксотрофами и имели генотип: his⁻, pro⁻, try⁻. Рост бактерий осуществляли при аэрации в солевой среде pH 7,2, содержащей (в г/л): NaCl 1; KН₂PO₄ 1; K₂HPO₄ 1; MgSO₄ 7; H₂O 0,4; (NH₄)₂SO₄ 4; Na-цитрат 0,5. Дополнительно к солевой среде добавляли казиминовые кислоты — 5 г/л, а в ряде опытов, вместо казиминовых кислот, 0,4% Na-лактата и по 20 мкг/мл следующих аминокислот: l-гистидина, l-пролина, l-триптофана. В опытную пробу вносили перед засевом одно из следующих углеводистых соединений: глюкозу (0,4%), глюкозо-6-фосфат (0,3%), пируват (0,5%). Через 3 часа роста начинали индукцию соответствующих ферментов. Индукцию синтеза β-галактозидазы осуществ-

вляли 10^{-3} M метилтиогаляктозидом (МТГ) в течение 1 часа; триптофаназу индуцировали 1 час *dl*-триптофаном (500 $\mu\text{г}/\text{мл}$); *D*-сериндезаминазу — 45 мин. *dl*-серином (330 $\mu\text{г}/\text{мл}$). Определение активности β -галактозидазы производили по Парди и др. (14) в разрушенных толuoloом клетках; триптофаназы в целых бактериях по скорости образования индола из триптофана (15); сериндезаминазы — в бактериальных гомогенатах, исследуя накопление пирувата из *dl*-серина (15). Учитывали дифференциальную скорость синтеза, т. е. прирост активности фермента по отношению к увеличению клеточной массы (измеряемой путем учета мутности бактериальной взвеси при 650 $\mu\text{м}$).

В табл. 1 приведены данные, показывающие, что у мутанта П-34, растущего в среде с казаминовыми кислотами, репрессия β -галактозидазы, хотя и снижается по сравнению с бактериями исходного штамма, но все еще сохраняется на достаточно высоком уровне. Несколько большее снижение величины репрессивного эффекта мы наблюдали при культивировании бактерий П-34 в минимальной среде с лактатом. Обращает на себя внимание следующее явление: у мутанта ГТ-17 репрессивный эффект глюкозы в отношении β -галактозидазы практически выражен в такой же степени, как у бактерий J-62.

Указанные различия между двумя штаммами могут быть объяснены, исходя из факта, что у бактерий ГТ-17 сохраняется конкуренция на уровне входа углеводов в клетку (13), между тем как у мутанта П-34 этот эффект отсутствует (4). Если исходить из такого представления и допустить, что внутриклеточная аккумуляция глюкозы одинаковая у обоих мутантов, то нетрудно из данных табл. 1 рассчитать, что ингибирование синтеза β -галактозидазы за счет нарушения транспорта индуктора у бактерий П-34 не превышает 20—30% от общей величины снижения дифференциальной скорости образования фермента при добавлении в среду роста указанного углевода. Однако приведенная выше величина может оказаться еще меньше. Это следует из анализа данных, приведенных на рис. 1. Оба мутанта аккумулялировали внутри клетки C^{14} -глюкозу в относительно небольших количествах по сравнению с исходными бактериями J-62. Однако уровень накопления метки C^{14} у бактерий ГТ-17 был примерно в 5 раз большим, чем у П-34. Следовательно, интенсивное угнетение синтеза β -галактозидазы у мутанта ГТ-17 могло быть результатом истинной катаболитной репрессии за счет аккумуляции относительно высоких концентраций глюкозы и конкуренции между МТГ и глюкозой на уровне входа этих соединений в клетку.

Анализ данных табл. 1 показывает также, что у мутанта П-34, несмотря на ингибирование синтеза β -галактозидазы в среде с глюкозой, отсутствует катаболитная репрессия триптофаназы и сериндезаминазы. Снижение величины аккумуляции глюкозы у бактерий ГТ-17 приводило к увеличению дифференциальной скорости триптофаназы и сериндезаминазы по сравнению с исходным штаммом J-62. Эти данные позволяют, видимо, считать, что существует не менее чем два уровня чувствительности катаболических ферментов к действию углеродистых соединений, генерируемых из глюкозы.

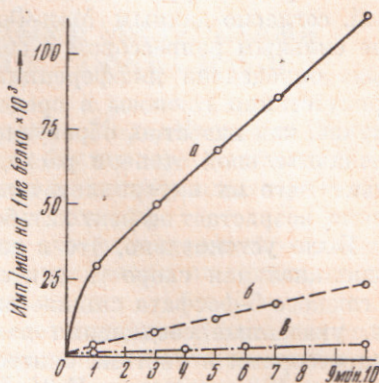


Рис. 1. Аккумуляция C^{14} -глюкозы бактериями J-62 (а), ГТ-17 (б) и П-34 (в). Клетки после отмывания инкубировали в солевой среде в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ M C^{14} -глюкозы (0,6 мКи/ммоль). Бактерии собирали на фильтрах HUF5 (0,45 μ) и промывали 5-кратным объемом солевой среды. Сушили при 60° и считали в счетчике Гейгера. Белок определяли по методу Лоури

Отсутствие репрессии триптофаназы и сериндезаминазы у мутанта П-34 вероятнее всего могло быть связано со снижением уровня аккумуляции и катаболизма глюкозы. Но при этом требовались доказательства, что у мутанта П-34 не повреждены регуляторные системы, ответственные за репрессивный эффект, вызываемый катаболитами. Для решения этого вопроса мы, во-первых, изучили возможность репрессии синтеза триптофаназы у мутанта П-34 глюкозо-6-фосфатом, — соединением, которое нормально утилизируется этими бактериями⁽¹⁰⁾, а также пируватом, который, согласно данным Мак-Фолл и Мандельштама⁽¹⁶⁾, является наиболее сильным репрессором в системе синтеза этого фермента; во-вторых, была определена дифференциальная скорость синтеза триптофаназы в присутствии глюкозы в среде, лишенной источника азота. В последнем случае, как известно, образующиеся в клетке катаболиты только в крайне незначительной степени расходуются для биосинтетических нужд, вследствие чего их внутриклеточный фонд резко увеличивается и, соответственно, возрастает эффект катаболической репрессии⁽⁶⁾.

Было установлено, что в лактатно-солевой среде у мутанта П-34 дифференциальная скорость синтеза триптофаназы в присутствии пирувата и глюкозо-6-фосфата снижается соответственно на 81 и 78%. Иначе говоря, указанные соединения являются эффективными катаболитными корепрессорами в системе синтеза триптофаназы. В другой серии экспериментов клетки мутанта П-34 через 3 часа роста собирали центрифугированием, промывали и переносили в лактатно-солевую среду, лишенную $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Триптофаназу индуцировали 120 мин. при аэрации. В пробы был добавлен S^{35} -метионин (1 $\mu\text{Ci}/\text{мл}$). Дифференциальную скорость синтеза в этом опыте учитывали как отношение прироста активности триптофаназы к приросту белка (определяемого по включению во фракцию, осаждаемую трихлоруксусной кислотой, S^{35} -метионина). В присутствии глюкозы дифференциальная скорость синтеза триптофаназы уменьшалась на 89%.

Полученные нами данные можно суммировать следующим образом:

1. При исключении конкурентных взаимоотношений между различными углеводами в процессе их транспорта в клетку и даже при очень низком уровне их аккумуляции эффект угнетения синтеза β -галактозидазы сохраняется; это свидетельствует о том, что ингибирование синтеза β -галактозидазы глюкозой, в основном, обусловлено истинным репрессивным эффектом, распространяющимся на ферменты Лас-оперона.

2. Эффект репрессии синтеза ферментов глюкозой зависит от внутриклеточной концентрации этого углевода. При этом различные катаболические ферменты обладают разной чувствительностью к действию углеродистых корепрессоров, генерируемых из глюкозы.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалея

Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
12 V 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Керес, *Biochim. et biophys. acta*, **40**, 70 (1960). ² A. L. Koch, *Biochim. et biophys. acta*, **79**, 177 (1964). ³ D. P. Kessler, H. V. Rickenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 482 (1963). ⁴ Г. И. Бурд, В. П. Шаболенко, В. Н. Гершанович, *Мол. биол.*, **1**, 713 (1967). ⁵ W. F. Loomis, B. Magasanik, *J. Bacteriol.*, **93**, 1397 (1967). ⁶ D. Nakada, B. Magasanik, *J. Molec. Biol.*, **8**, 105 (1964). ⁷ M. Cohn, K. Horibata, *J. Bacteriol.*, **78**, 601 (1959). ⁸ S. Adhya, H. Echols, *J. Bacteriol.*, **92**, 601 (1966). ⁹ В. Н. Гершанович, Г. И. Бурд, Н. В. Юровицкая и др., *Мол. биол.*, **1**, 104 (1967). ¹⁰ *Ibid.*, *Biochim. et biophys. acta*, **134**, 188 (1967). ¹¹ W. Kundig, F. D. Kundig et al., *J. Biol. Chem.*, **241**, 3243 (1966). ¹² Г. И. Бурд, И. В. Андреева и др., *Мол. биол.*, **2**, 89 (1968). ¹³ Г. И. Бурд, В. П. Шаболенко и др., *Мол. биол.*, **3**, 256 (1969). ¹⁴ A. B. Pardee, F. Jacob, *J. Mol. Biol.*, **1**, 165 (1959). ¹⁵ A. B. Pardee, L. S. Prestidge, *Biochim. et biophys. acta*, **49**, 77 (1961). ¹⁶ E. McFall, J. Mandelstam, *Biochem. J.*, **89**, 391 (1963).