

Н. М. МИТЮШОВА, член-корреспондент АН СССР А. М. УГОЛЕВ

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИНВЕРТАЗЫ В ДРОЖЖЕВОЙ КЛЕТКЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКАЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНАЯ ПОЛОСТЬ

Для понимания процессов пищеварения и питания существенным является выяснение локализации ферментов в клетке и связи их с теми или иными клеточными структурами. После того как мембранное пищеварение было описано не только у позвоночных, но также и у беспозвоночных ⁽¹⁾, этот вопрос становится особенно актуальным.

На основании первых исследований распределения гидролитических ферментов в дрожжах было сделано заключение, что они находятся на поверхности клетки. При этом под термином «поверхность» подразумевались вообще периферические слои клеток, без какого-либо четкого разграничения отдельных цитологических структур ⁽²⁾. Однако у дрожжей кроме мембраны, окружающей протопласт, есть клеточная оболочка, которая сохраняет постоянной форму клетки и может быть отделена от протопласта при плазмоллизе. Это дает основание предполагать по крайней мере три возможных положения фермента в поверхностном слое клетки: 1) на клеточной оболочке, 2) на цитоплазматической мембране, 3) в пространстве между оболочкой и мембраной (рис. 1).

В дальнейшем рядом авторов были предприняты попытки более точно локализовать дисахаридазы в дрожжах. Так, во фракции клеточных оболочек была обнаружена значительная инвертазная активность, однако она уменьшалась при отмывании препарата ⁽³⁾. Есть указание на то, что инвертаза, секретируемая клеткой, улавливается структурным каркасом клеточной стенки ⁽⁴⁾. О связи инвертазы с последней говорит тот факт, что в очищенных препаратах этого фермента найден маннан — основной компонент клеточной оболочки дрожжей ⁽⁵⁾. Вместе с тем, высказано предположение о том, что инвертаза находится в растворенной форме между клеточной оболочкой и цитоплазматической мембраной ⁽⁶⁾. Существует мнение, что гидролитические энзимы локализованы в нуклеопротеидном слое, расположенном между оболочкой клетки и мембраной и, возможно, объединяющем их ⁽⁷⁾. Некоторые авторы полагают, что дисахаридазы находятся на клеточной мембране ⁽⁸⁾. Таким образом, вопрос о точной локализации гидролитических ферментов, и в частности инвертазы, в дрожжевой клетке не решен.

В последние годы разработано большое число методических приемов, позволяющих более тонко выявить локализацию ферментов в клетках как высших, так и низших организмов. В частности, было продемонстрировано, что различные гидролитические ферменты, прочно связанные со структурой мембран, могут быть солибилизованы при помощи протеолитических ферментов и детергентов. Особенно эффективным в этом отношении оказался тритон X-100 ⁽⁹⁾.

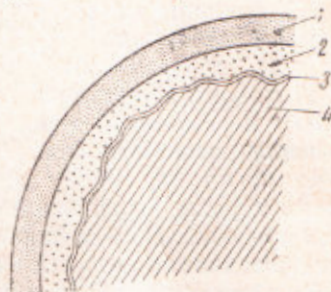


Рис. 1. Схема поверхности дрожжевой клетки. 1 — клеточная оболочка, 2 — цитоплазматическая мембрана, 3 — пространства между оболочкой и мембраной, 4 — цитоплазма

Важным критерием наличия или отсутствия связи фермента с клеточными структурами является поведение его при дифференциальном центрифугировании. Ферменты, локализованные на интактных мембранах и оболочках, седиментируются при низких скоростях вращения (500—1000 g). Ферменты, связанные с фракцией микросом, осаждаются при 50 000—60 000 g. Подобным же образом ведут себя ферменты, связанные с разрушенной клеточной мембраной. Супернатанты, полученные при 100 000 g, содержат ферменты, которые не были интегрированы с клеточными структурами или отделились от них.

Таким образом, в настоящее время представляется возможным более точно проанализировать локализацию инвертазы в дрожжевой клетке, что и составило задачу настоящей работы. Решение этого вопроса имеет существенное значение не только для характеристики процесса питания дрожжей, но и для понимания происхождения и эволюции основных типов пищеварения.

Методика. Опыты были проведены на трехсуточный культуре дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамм Мегри 139-Б, выращенной на жидком сусле. Для солюбилизации инвертазы с поверхности ⁽⁹⁾ дрожжи обрабатывали 0,4% М раствором тритона X-100 в течение 30 мин. при комнатной температуре.

Разрушение клеток осуществляли на установке, предложенной Мильнером с соавторами ⁽¹⁰⁾. Для этого водную взвесь дрожжей (400 млн кл./мл) продавливали через узкую щель установки при давлении 2000 кг/см². Суспензию раздавленных клеток центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин., и затем полученный осадок дважды промывали дистиллированной водой. Этот способ наряду с высоким процентом разрушенных клеток (90%) давал возможность получать в осадке морфологически хорошо выраженную при световой микроскопии фракцию клеточных оболочек. В этой фракции могли находиться также и участки мембраны протопласта, который как было показано недавно ⁽¹¹⁾, связан с оболочкой клетки тонкими нитями.

Для выделения инвертазы в растворенной форме (без клеточных структурных элементов) полученный супернатант центрифугировали еще раз при 97 500 g на препаративной ультрацентрифуге типа VAG-60 (ГДР) в течение 30 мин. Все процедуры проводили на холоде. При определении инвертазной активности дрожжи вносили в 1,5% раствор сахарозы в цитратно-фосфатном буфере (рН 5,2) из расчета 50 млн клеток на 1 мл среды. Инкубацию продолжали в течение 15 мин. при 30°. Исследование инвертазной активности различных фракций дрожжевых клеток проводили в тех же условиях. Количество образовавшихся редуцирующих сахаров определяли методом Нельсона.

Результаты. Как уже было отмечено, одним из возможных мест локализации инвертазы в дрожжевой клетке является клеточная оболочка, в частности ее внешняя поверхность. Однако обработка клеток тритоном X-100, который вызывает солюбилизацию структурированной инвертазы, и последующее осаждение клеток при центрифугировании не приводило к появлению инвертазы в супернатанте. Это дает основание предположить, что инвертаза не находится на внешней поверхности клеточной оболочки.

В следующем цикле экспериментов сравнивались инвертазные активности фракции клеточных оболочек и супернатанта, полученных при центрифугировании разрушенных клеток с ускорением 1000 g (рис. 2). Инвертазная активность фракции оболочек составляла лишь 17% активности интактных клеток, основное же количество инвертазы обнаруживалось в надосадочной жидкости. При этом следует учесть, что более половины активности осадка принадлежало неразрушенным клеткам (10% от общего количества клеток).

Таким образом, результаты этой серии опытов показывают, что не только внешняя, но и внутренняя поверхность клеточной оболочки не являются

основным местом локализации инвертазы. Этот вывод не согласуется с данными других авторов, которые обнаружили значительное количество инвертазы в препаратах клеточных оболочек. Не исключено, что указанные различия обусловлены неодинаковой локализацией инвертазы у разных штаммов.

Все структурные элементы клетки, в том числе и остатки цитоплазматической мембраны, были осаждены при центрифугировании супернатанта с ускорением 97 000 g. Как видно из рис. 2, активность осадка была близка к нулю, и практически вся инвертаза обнаруживалась в супернатанте. Эти данные позволяют заключить, что инвертаза не связана со структурами клетки, а растворена или в интрацеллюлярной жидкости, или в жидкости пространства между клеточной оболочкой и цитоплазматической мембраной.

Ранее было показано (⁴), что надежным признаком внутриклеточной локализации фермента является увеличение его активности после разрушения цитоплазматической мембраны. Сравнение инвертазной активности целых и разрушенных дрожжевых клеток (рис. 2) не позволяет говорить о существенных количествах интрацеллюлярной инвертазы у дрожжей.

Таким образом, наиболее вероятным является предположение о том, что инвертаза в дрожжевых клетках находится в пространстве между клеточной оболочкой и цитоплазматической мембраной. Если такое предположение правильно, то клеточная оболочка должна препятствовать диффузии ферментов в среду. Действительно, эксперименты показали, что протопласты дрожжевых клеток, лишенные клеточной оболочки, неспособны удерживать инвертазу, и большая ее часть обнаруживается в среде (^{3, 12}).

Итак, сопоставление наших результатов и наблюдений других авторов позволяет думать, что инвертаза дрожжей локализуется в пространстве между оболочкой и цитоплазматической мембраной. Нам не удалось обнаружить каких-либо признаков того, что фермент связан со структурами оболочки или цитоплазматической мембраны дрожевой клетки. Таким образом, по крайней мере у этого штамма гидролиз сахарозы, скорее, должен быть отнесен не к мембранному типу пищеварения, а к полостному.

В настоящее время нет достаточных сведений для того, чтобы охарактеризовать значение пространства между оболочкой и цитоплазматической мембраной. Очевидно, перед нами пример примитивной пищеварительной полости. Если это так, то полостное пищеварение не является исключительной принадлежностью млекопитающих, как это предполагали ранее (¹¹⁻¹³). По-видимому, полостное пищеварение первично возникло у одноклеточных организмов в периферической полости, ограниченной внутри цитоплазматической мембраной, а снаружи клеточной оболочкой. Возможно, этот механизм играет важную роль в питании не только дрожжей, но и других микроорганизмов и растений. Важной функцией периферической полости может быть также гомеостатирование, или, точнее, буферная функция, обеспечивающая относительное постоянство среды в непосредственной близости протопласта.

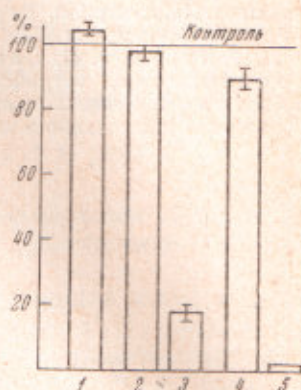


Рис. 2. Распределение инвертазной активности между различными фракциями дрожжевых клеток (контроль — intactные клетки). 1 — раздавленные клетки, 2 — супернатант и 3 — осадок, полученные при центрифугировании с ускорением 1000 g; 4 — супернатант и 5 — осадок, полученные при центрифугировании с ускорением 97 500 g

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. М. Уголев, Физиология и патология пристеночного пищеварения, Л., 1967.
- ² A. Rothstein, *Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforsch.*, 2, Cytoplasma, E 4, 1 (1954).
- ³ D. D. Sutton, J. O. Lampen, *Biochim. et biophys. acta*, 56, 303 (1962).
- ⁴ J. Friis, P. Ottolenghi, *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.*, 31, 259 (1959).
- ⁵ D. O. McClary, *Bot. Rev.*, 30, 167 (1964).
- ⁶ M. Burger, E. E. Bacon, I. S. D. Bacon, *Biochem. J.*, 78, 504 (1961).
- ⁷ C. C. Lindegren, *Nature*, 198, 1325 (1963).
- ⁸ J. C. Kaplan, W. Tacreiter, *J. Gen. Physiol.*, 50, 9 (1966).
- ⁹ E. Eggermont, *The Biochemical Defects in Sucrose Intolerance and in Glucose-galactose Malabsorption*, Belgium, 1968.
- ¹⁰ H. W. Milner, W. S. Lawrence, C. S. French, *Science*, 111, 633 (1950).
- ¹¹ E. Streiblova, *J. Bacteriol.*, 95, 700 (1968).
- ¹² M. F. Islam, J. O. Lampen, *Biochim. et biophys. acta*, 58, 294 (1962).
- ¹³ W. Buddenbrock, *Vergleichende Physiologie*, 3, Basel — Stuttgart, 1956.
- ¹⁴ X. C. Коптоянц, *Основы сравнительной физиологии*, Изд. АН СССР, 1957.
- ¹⁵ А. М. Уголев, *Пищеварение и его приспособительная эволюция*, М., 1961.