

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ,
Т. Л. АУЭРМАН, Т. Г. ГЕНЕРАЛОВА

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛЮТАМИНСИНТЕТАЗЫ КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ
CANDIDA TROPICALIS

Глютаминсинтетаза (*L*-глутамат: аммиаклигаза (АДФ); 6.3.1.2) — один из ключевых ферментов азотного обмена у растений и микроорганизмов — катализирует реакцию биосинтеза глутамина из глутамата и аммиака (с участием АТФ и ионов Mg^{2+}), а также реакцию переноса глутамильного остатка глутамина на соответствующие акцепторы. Наиболее обстоятельно изучена глютаминсинтетаза *Escherichia coli* (¹⁻³). В клетках этого организма регуляция глютаминсинтетазы осуществляется с помощью нескольких различных механизмов. Ионы аммония репрессируют синтез глютаминсинтетазы *E. coli* и, кроме того, быстро ингибируют этот фермент *in vivo* при крайне низких концентрациях (10^{-4} — 10^{-7} *M* NH_4^+), не оказывая заметного действия на активность бесклеточных ферментных экстрактов (⁴).

Регуляция глютаминсинтетазы у других организмов изучена значительно меньше. Имеются лишь отдельные указания о существенных различиях регуляторных механизмов в клетках высших растений, водорослей, дрожжей и некоторых бактерий (^{2, 5-8}).

Настоящая работа имела целью получить данные о регуляции глютаминсинтетазы у кормовых дрожжей *Candida tropicalis* Kg-14, в азотном метаболизме которых глутамину и ферментам глутаминового обмена принадлежит важная роль.

Чтобы выяснить влияние ионов аммония на активность глютаминсинтетазы, дрожжи выращивали в течение 36 час. при 30° на солодовом пехмеленном сусле с добавлением различных количеств двухзамещенного фосфата аммония. Исходное сусло содержало аммиак в концентрации $1,33 \cdot 10^{-3}$ *M*. Дрожжевые клетки отделяли от среды центрифугированием и разрушали в замороженном состоянии на прессе Хьюза — Итона. В полученном бесклеточном экстракте определяли активность глютаминсинтетазы по Эллиотту (⁹). Подробности методики описаны в наших предыдущих статьях (^{10, 11}).

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что повышение концентрации NH_4^+ в среде до 10^{-2} *M* не репрессирует синтез фермента, общая активность которого заметно растет параллельно накоплению бел-

Таблица 1
Влияние концентрации NH_4^+ в среде на активность глютаминсинтетазы кормовых дрожжей

Концентрация oNH_4^+ , <i>M</i>	Белок в экстракте, мг/мл	Активность глютаминсинтетазы	
		общая *	удельная **
$1,33 \cdot 10^{-3}$	1,29	3,1	2,40
$2,33 \cdot 10^{-3}$	1,90	3,6	1,89
$1,13 \cdot 10^{-2}$	4,12	6,7	1,63
$5,13 \cdot 10^{-2}$	4,67	5,2	1,12

* Общая активность выражена в μ молях на 1 μ глютамингидроксамовой кислоты, синтезированной 1 мл дрожжевого экстракта за 1 мин. в стандартных условиях.

** Удельная активность: количество μ молей того же продукта, отнесенное к 1 мг белка.

ка в клетках. Только при концентрации NH_4^+ порядка $5 \cdot 10^{-2} M$ наблюдается репрессирование синтеза или ингибирование фермента. В то же время удельная активность глутаминсинтетазы все время закономерно снижается вначале вследствие быстрого накопления белка в клетках, а затем в результате ингибирования фермента ионами аммония.

В другом опыте дрожжи, выращенные на обычном сусле, были помещены на 1 час в дистиллированную воду для азотного голодания, а затем

Таблица 2

Активность глутаминсинтетазы в дрожжах после азотного голодания (1 час) и последующего инкубирования в течение 2 час. в $1/15 M$ фосфатном буфере с разной концентрацией NH_4^+

Состав инкубационной среды	Концентрация NH_4^+ , M	Изменение pH за время инкубации	Белок в экстракте, мг/мл	Активность глутамин-синтетазы	
				общая	удельная
Фосфатный буфер (контроль)	0	7,2→7,2	1,50	4,6	3,03
Фосфатный буфер + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	10^{-8}	7,2→7,1	1,51	3,4	2,22
То же	$5 \cdot 10^{-2}$	7,2→6,9	1,89	0,8	0,40
Фосфатный буфер + глутамат натрия $5 \cdot 10^{-2} M$	0	7,2→7,4	4,25	7,1	1,66
Фосфатный буфер + глутамат натрия $5 \cdot 10^{-2} M$ + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$5 \cdot 10^{-2}$	7,2→7,0	3,13	1,3	0,43

инкубированы в течение 2 час. при 30° в $1/15 M$ фосфатном буфере (pH 7,2) с различным содержанием $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Как видно из табл. 2, в этих условиях ингибирование глутаминсинтетазы началось уже при концентрации NH_4^+ $10^{-8} M$ и было очень значительным при концентрации $5 \cdot 10^{-2} M$ (удельная активность снизилась на 87% от исходной). Инкубация дрожжей в растворе глутамата ($5 \cdot 10^{-2} M$) благоприятствовала синтезу глутаминсинтетазы, однако прибавление ионов аммония резко репрессировало этот синтез.

В следующих опытах изучалось влияние ионов аммония на активность глутаминсинтетазы в бесклеточных дрожжевых экстрактах, к которым добавлялись различные количества двухзамещенного фосфата аммония. По литературным данным, NH_4^+ не ингибирует глутаминсинтетазу в неочищенных экстрактах из клеток *E. coli* (4), тогда как в экстрактах из клеток хлореллы наблюдается такое ингибирование (5).

Наши результаты свидетельствуют о заметном ингибировании глутаминсинтетазы дрожжей *in vitro* теми же концентрациями NH_4^+ , которые снижают активность этого фермента *in vivo*. Так при инкубировании дрожжевых экстрактов, содержащих NH_4^+ в концентрации $2 \cdot 10^{-2} M$, в течение двух часов при комнатной температуре удельная активность глутаминсинтетазы снизилась на 12%. В другом опыте инкубирование экстракта, содержащего $5 \cdot 10^{-2} M$ NH_4^+ , в течение 20 мин. при 40° снизило удельную активность глутаминсинтетазы на 51% от исходного значения.

Следующая серия опытов была посвящена выяснению возможности регуляции глутаминсинтетазы дрожжей конечными продуктами глутаминового обмена посредством механизма обратной связи. Такой тип регуляции хорошо изучен для глутаминсинтетазы *E. coli* (1, 12, 13). В наших опытах изучалось влияние следующих конечных продуктов глутаминового обмена на активность глутаминсинтетазы дрожжей: *L*-аланина, *L*-триптофана, *L*-гистидина, глицина и АМФ. Глутаминсинтетаза была

выделена из дрожжевого экстракта и частично очищена (в 31 раз) с помощью обработки стрептомицином, фракционного осаждения сульфатом аммония, диализа и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Эффекторы в различных концентрациях вводились в инкубационную смесь для стандартного определения активности глутаминсинтетазы по

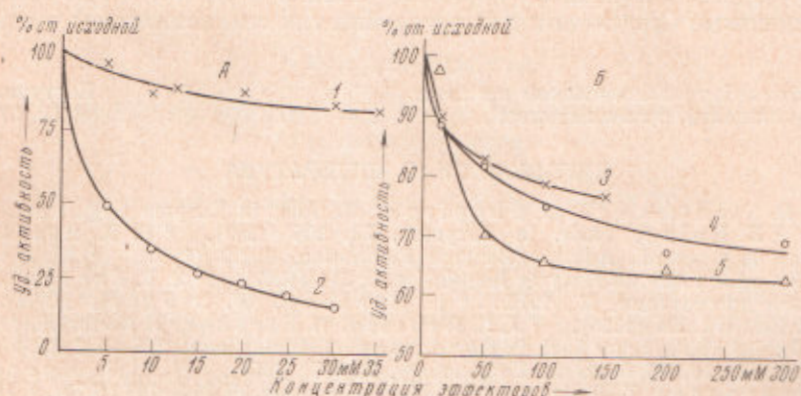


Рис. 1. Ингибирование глутаминсинтетазы кормовых дрожжей *L*-триптофаном и АМФ (А) и *L*-гистидином, *L*-аланином и глицином (Б). 1 — *L*-триптофан, 2 — АМФ, 3 — *L*-гистидин, 4 — *L*-аланин, 5 — глицин

Эллиотту (⁹, ¹¹). Контрольная реакционная смесь отличалась от опытной только отсутствием фермента.

На рис. 1 показано снижение удельной активности глутаминсинтетазы дрожжей под влиянием возрастающих концентраций всех исследованных эффекторов.

Наиболее сильным ингибирующим действием обладает АМФ, под влиянием которого активность глутаминсинтетазы снижается на 85%. Другие эффекторы в изученных концентрациях ингибируют глутаминсинтетазу на 20—40%.

Полученные результаты соответствуют литературным данным о влиянии тех же соединений на активность глутаминсинтетазы *E. coli*.

Чтобы выяснить характер ингибирования глутаминсинтетазы при совместном действии двух эффектов, были проведены опыты, в которых к инкубационной смеси добавлялось по два соединения во всех возможных комбинациях. Концентрация каждого эффектора была выбрана согласно рекомендациям Стэдмана (¹) для аналогичных опытов с *E. coli*.

Использованные концентрации для триптофана и АМФ близки к насыщающим по ингибированию (рис. 1А). Результаты, представленные

Таблица 3

Кумулятивное ингибирование глутаминсинтетазы дрожжей конечными продуктами глутаминового обмена

Ингибиторы	Концентрация ингибиторов, М	Ингибирование, %	
		получено в опыте	вычислено на основе кумулятивного действия
АМФ	15	74	—
<i>L</i> -Гистидин	10	12	—
<i>L</i> -Аланин	10	12	—
Глицин	10	3	—
<i>L</i> -Триптофан	12,5	13	—
АМФ + <i>L</i> -гистидин	15; 10	78	77
АМФ + <i>L</i> -аланин	15; 10	78	77
АМФ + глицин	15; 10	76	75
АМФ + <i>L</i> -триптофан	15; 12,5	81	78
<i>L</i> -Гистидин + <i>L</i> -аланин	10; 10	16	22
<i>L</i> -Гистидин + глицин	10; 10	15	14
<i>L</i> -Гистидин + <i>L</i> -триптофан	10; 12,5	20	23
<i>L</i> -Аланин + глицин	10; 10	18	14
<i>L</i> -Аланин + <i>L</i> -триптофан	10; 12,5	16	23
Глицин + <i>L</i> -триптофан	10; 12,5	17	15

в табл. 3, показывают, что для каждой пары эффекторов ингибирование фермента, наблюдаемое в опыте, хорошо совпадает с величиной ингибирования, вычисленной на основе кумулятивного характера действия этих эффекторов. Полученные данные подтверждают возможность регуляции глутаминсинтетазы дрожжей конечными продуктами глутаминового обмена посредством механизма обратной связи в соответствии со схемами, предложенными Стэдтманом для регуляции глутаминсинтетазы в клетках *E. coli*.

Московский технологический институт
пищевой промышленности

Поступило
6 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. R. Stadtman, B. M. Shapiro et al., *Adv. in Enzyme Regulation*, 6, 257 (1968). ² H. Holzer, *Adv. in Enzymol.*, 32, 304 (1969). ³ E. R. Stadtman, A. Ginsburg et al., *Adv. in Enzyme Regulation*, 8, 99 (1970). ⁴ H. Holzer, D. Mecke et al., *Adv. in Enzyme Regulation*, 5, 211 (1967). ⁵ З. Г. Евстигнеева, Докторская диссертация, М., 1970. ⁶ G. Kohlhaw, W. Dräger, H. Holzer, *Biochem. Zs.*, 341, 224 (1965). ⁷ J. L. Rebello, N. Strauss, *J. Bacteriol.*, 98, № 2, 683 (1969). ⁸ T. F. Deuel, E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.*, 245, № 2, 5206 (1970). ⁹ W. H. Elliott, *Methods in Enzymology*, 2, 337 (1955). ¹⁰ В. Л. Кретович, Т. Г. Генералова, Т. Л. Ауэрман, *Микробиология*, 39, № 5, 767 (1970). ¹¹ Т. Г. Генералова, Т. Л. Ауэрман, В. Л. Кретович, *Прикладная биохимия и микробиология*, 7, № 1, 83 (1971). ¹² C. A. Woolfolk, E. R. Stadtman, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 17, № 4, 313 (1964). ¹³ H. S. Kingdon, B. M. Shapiro, E. R. Stadtman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, № 4, 1703 (1967).