

УДК 581.19+574/578

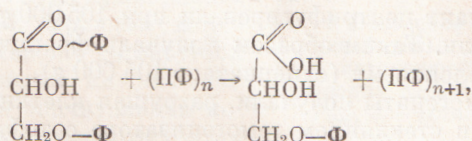
БИОХИМИЯ

И. С. КУЛАЕВ, Г. И. КОНОШЕНКО

О ЛОКАЛИЗАЦИИ 1,3-ДИФОСФОГЛИЦЕРАТ: ПОЛИФОСФАТ- ФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ В КЛЕТКАХ *NEUROSPORA CRASSA*

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 1 XII 1970)

Нами было показано (¹⁻⁴) присутствие у ряда микроорганизмов до сих пор неизвестного фермента, осуществляющего биосинтез высокомолекулярных полифосфатов по следующей реакции:



где Φ — остаток ортофосфата; ПФ — высокополимерный полифосфат.

Этот фермент, названный нами 1,3-дифосфоглицерат:полифосфат-фосфотрансферазой (1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазой), был выявлен, в частности, в мицелии *N. crassa*. При этом оказалось, что ранее известный фермент АТФ-полифосфаткиназа, катализирующий биосинтез высокополимерных полифосфатов за счет терминального фосфата, у этого организма отсутствует (³). В связи с этим казалось вероятным, что у *N. crassa* биосинтез полифосфатов, если не исключительно, то во всяком случае в первую очередь, осуществляется за счет макроэргического фосфата 1,3-дифосфоглицериновой кислоты при помощи выявленной нами ферментативной системы. Исходя из этого, представлялось необходимым выявление локализации 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы в клетках *N. crassa*, что могло бы уточнить место синтеза высокомолекулярных полифосфатов у этого организма. Это казалось тем более существенным, поскольку к настоящему времени вообще очень мало известно о локализации в клетках микроорганизмов биосинтеза высокомолекулярных полифосфатов. Имеется лишь одна работа (⁵), в которой показано, что процесс биосинтеза полифосфатов у дрожжей преимущественно связан не с растворимой фракцией, а с какими-то структурными компонентами клетки.

В настоящей работе объектом исследования является 18-часовая культура дикого штамма плесневого гриба *N. crassa*, которую выращивали, как было описано ранее (⁶).

Активность 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы (¹) определяли в экстрактах из целых клеток и протопластов, а также в полученных из них структурах (ядра, митохондрии, микросомы, гиалоплазма).

Протопласты получали из свежего мицелия с помощью ферментного препарата из виноградной улитки *Helix pomatia*. За основу метода выделения протопластов взята работа Бахмани и Боннера (⁷). Подробно принцип получения протопластов из *N. crassa*, (а также необходимого для это-

го фермента из виноградной улитки) описан ранее (⁶). В настоящей работе в связи с условиями эксперимента мы несколько видоизменили эту методику. В результате выделение протопластов проводили по следующей схеме. К 1 г свежего мицелия добавляли 100 мг ферментного препарата и 5 мл среды выделения (малеатный буфер pH 6,8 0,05 M, 0,6 M маннит, 10 M MgCl₂), затем инкубировали 1—1,5 часа при 30°, изредка осторожно перемешивая. Полученные таким образом протопласты (40% от исходного мицелия) промывали холодной средой выделения и использовали в дальнейших опытах.

Ядра получали из протопластов, как описано ранее (⁸), с использованием метода, предложенного Розин и Тонино, для получения ядер из дрожжей и очистки их в градиенте концентрации сахарозы (⁹).

В настоящей работе применяли метод выделения митохондрий из протопластов. Для этого протопласты, не отделяя от мицелия, разрушали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в среде (¹⁰) при 0° 2 мин. Все остальные операции по выделению митохондрий из *N. crassa* проводили так же, как описано ранее (¹¹). Для получения гомогенных и чистых препаратов митохондрий их центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы (¹⁰). Фракцию микросом и гиалоплазму получали из мицелия. Для этого навеску мицелия (1—2 г) растирали с равным по весу количеством Al₂O₃ в глицин-глициновом буфере pH 7, 0,05 M при 0 + 2°. Неразрушенный материал отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 10—15 мин. Затем центрифугировали 15—20 мин. при 30 000 g. Полученный супернатант центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа, а осадок отбрасывали. Таким образом получали фракцию микросом (осадок 105 000 g) и гиалоплазму (супернатант 105 000 g).

Экстракты и гомогенаты получали, разрушая клетки с Al₂O₃, а субклеточные структуры в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Разрушение проводили при 0 + 2° в глицин-глициновом буфере pH 7, 0,05 M.

Полученные гомогенаты клеток и протопластов центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин. и в супернатантах определяли ферментативную активность. В случае других фракций активность фермента определяли прямо в гомогенатах.

Активность 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы выражали в единицах ферментативной активности (Е). Количество белка определяли по методу Лоури (¹²). Определение фосфора проводили по методу Беремблума и Чейна в модификации Вейль-Малербе и Грина (¹³).

Определение содержания в митохондриях цитохрома а, необходимое для расчета доли активности 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы во фракции митохондрий от общей активности этого фермента в целых клетках, проводили на спектрофотометре Чанса, как это описано Моховой (¹⁴). Было проведено несколько аналогичных опытов по выявлению локализации 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы в клеточных структурах *N. crassa*.

Инкубационная среда состояла из глицин-глицинового буфера pH 7,0 15 μмол., MgCl₂ 6 μмол., полифосфата $n = 75$ 0,015 μмол.; дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида 14 μг (белка), НАД 0,6 μмол.; K₂HP³²O₄ 8 μмол.; белка бесклеточных экстрактов и гомогенатов структур 0,2—1 мг. Общий объем составлял 0,6 мл. Время инкубации 30 мин. при 37°.

Данные одного из опытов следующие. Удельная активность 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы в клетках и клеточных структурах *Neurospora crassa* составляет для клеток 170, для протопластов 180, для ядер 0, для митохондрий (осадок 10 000 g) 50, для микросом (осадок 105 000 g) 37, для гиалоплазмы (супернатант 105 000 g) 28 Е · 10⁻⁶ на 1 мг белка.

Как видно, величины удельной активности 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы в экстрактах из клеток и протопластов существенно не отличаются

ся, т. е. активность этого фермента при удалении клеточной стенки не снижается. Это свидетельствует в пользу внутриклеточной его локализации. При дальнейшем анализе было установлено, что в препарате клеточных ядер, очищенных в градиенте концентрации сахарозы, активность фермента вообще не может быть выявлена.

В других же исследованных субклеточных фракциях (митохондрии, микросомы, гиалоплазма) в той или иной степени активность 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы всегда присутствовала. При этом среди вышеперечисленных фракций наибольшая удельная активность этого фермента во всех опытах принадлежала неочищенному препарату митохондрий. Важно было выяснить, какую долю составляет его активность в целых клетках. Для проведения такого анализа мы воспользовались возможностью пересчета величины нашей активности на микромоль цитохрома *a*, присутствующего в клетках только в составе митохондрий. Такой расчет показал, что в разных опытах в среднем 30—40% активности 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы, выявляемой в целых клетках, приходилось на долю неочищенной фракции митохондрий. Этот факт хорошо согласуется с данными, полученными на дрожжах⁽⁵⁾, согласно которым значительная полифосфатсинтетазная активность у этих организмов была присуща субклеточной фракции, осаждаемой при центрифугировании при 7000 *g* и соответствовавшей неочищенной фракции митохондрий.

Однако проведенная нами очистка препарата митохондрий из *N. crassa* в градиенте концентрации сахарозы (рис. 1) показала, что активность 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы у этого организма локализована не в самих митохондриях, а в соосаждавшихся с ними более плотных частицах. Как видно из рис. 1, в этих частицах содержится не только исследуемый нами фермент, но также и некоторое количество кислотолabileного фосфора, относящегося, по-видимому, к высокомолекулярным полифосфатам. Подобные полифосфатсодержащие частицы были выявлены нами ранее в неочищенных препаратах митохондрий из *N. crassa* и у дрожжей *Endomycetes magnusii*⁽¹⁵⁾. Мы предположили, что имеем дело с давно известными у микроорганизмов гранулами волютина. В этих же гранулах обнаружена полифосфатсинтезирующая активность. Наличие 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы в волютиноподобных гранулах, хотя и довольно логично, все же является достаточно неожиданным. Действительно, если считать, что этот фермент в клетке осуществляет в первую очередь биосинтез полифосфатов, то тогда становится сомнительным давно устоявшееся представление о том, что биосинтез полифосфатов в клетках микроорганизмов осуществляется только на плазматической мембране в наиболее высокомолекулярной форме^(6, 11).

Правда, пока не исключено, что *in vivo* выявленный нами фермент может работать не только, а может быть и не столько в направлении биосинтеза полифосфатов за счет гликолитического фосфорилирования, сколько в сторону их использования для образования 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, регулируя тем самым процесс гликолиза. Обнаружение 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы в полифосфатсодержащих гранулах может также означать, что эти гранулы могут выполнять в клетках роль регуляторов уровня внутриклеточного ортофосфата и скорости течения

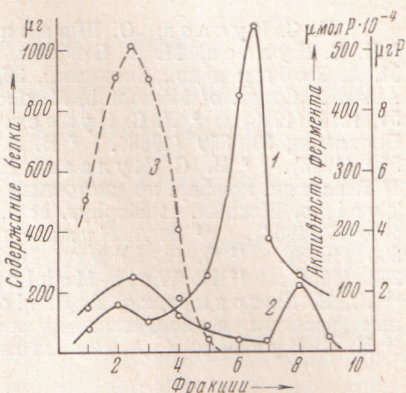


Рис. 1. Поведение 1,3-ДФГК:ПФ-фосфотрансферазы при очистке препарата митохондрий в градиенте концентрации сахарозы. 1 — белок, 2 — Рлаб, 3 — активность фермента

гликолитического процесса. В этом смысле они могут рассматриваться как клеточные органеллы, подобные (а может быть и идентичные) лизосомам, содержащим, как известно, многие ферменты, участвующие в регуляции клеточного метаболизма.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
27 XI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. С. Кулаев, О. Шимона, М. А. Бобык, Биохимия, 33, 419 (1968).
² И. С. Кулаев, М. А. Бобык, Биохимия, 36, № 2 (1971). ³ И. С. Кулаев, М. А. Бобык и др., Биохимия, 36, № 5 (1971). ⁴ I. S. Kulaev, M. A. Bobuk, Abstr. X Congr. of Microbiol., Mexico, 1970. ⁵ A. J. C. Stahl, Bull. Soc. Chim. Biol. 51, 1211 (1969). ⁶ И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, Н. А. Кокурина, Биохимия, 31, 850 (1966). ⁷ V. J. Bachmann, D. M. Bonner, J. Bacteriol., 78, 550 (1963). ⁸ И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, В. Ю. Поляков, II Всесоюз. конфер. по клеточным ядрам, «Наука», 1970. ⁹ T. H. Rozijn, G. J. H. Tonino, Biochim. et biophys. acta, 91, 105 (1964). ¹⁰ D. J. L. Luck, J. Cell. Biol. 16, 483 (1963). ¹¹ И. А. Крашенинников, И. С. Кулаев и др., Биохимия, 33, 800 (1968). ¹² O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 193, 262 (1951). ¹³ H. Weil-Mahlerbe, H. Green, Biochem. J., 49, 286 (1951). ¹⁴ Ю. В. Евтодченко, Е. Н. Мохова, Тр. симп.: Окислительно-восстановительные реакции в процессах дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, М., 1968. ¹⁵ И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников и др., ДАН, 177, 229 (1967).