

В. В. ЮРКЕВИЧ, Г. Т. КОЗЫРЕВА

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭФФЕКТА РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА
 α -АМИЛАЗЫ УРОВНЕМ АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА СРЕДЫ
У *ASPERGILLUS ORYZAE***

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 15 VI 1972)

Ранее нами сообщалось, что образование секретируемой α -амилазы у *A. oryzae* может полностью репрессироваться добавлением в среду препарата этого фермента ⁽¹⁾. Эффект характеризуется абсолютной специфичностью в отношении действующего фактора и репрессирваемого процесса и имеет регуляторное значение, являясь выражением принципа обратной связи ^(1, 2). Установлено, что фермент среды при этом не потребляется клетками и оказывает влияние на образование активной α -амилазы, имея лишь контакт с клеточной поверхностью ^(1, 2). Важная роль в осуществлении регуляции принадлежит клеточной оболочке, удаление которой снимает репрессирующее действие фермента среды ⁽³⁾. Настоящая работа посвящена выяснению локализации описанного эффекта в клетке.

При решении поставленной задачи мы использовали специфическое блокирование определенных этапов белкового синтеза. Объектом был *Aspergillus oryzae* 3-9-15, выращиваемый при 30° на полной среде Роленга с крахмалом и с таким количеством винной кислоты, чтобы исходный pH был 5,0 (среда 1): для опытов с 8-азагуанином (АГ) — в 50 мл среды в течение 40 час., для опытов с актиномицином D (АМ) и циклогексимидом (ЦГИ) — 5 мл той же среды в течение 24 час. Посев производился спорами, вносимыми в каждый вариант опыта в одинаковом количестве. Выросший мицелий стерильно промывали и переносили на 5 час. в среду Роленга без фосфатов (среда 2), с pH 5,0 (pH среды 2 не изменялся в течение опыта): в опытах с АГ в 50 мл, в опытах с АМ и ЦГИ в 2,5 мл. Концентрация АГ 200 мкг/мл, АМ 150 мкг/мл, ЦГИ 120 мкг/мл. Данные концентрации АГ, АМ и ЦГИ полностью блокируют прорастание спор и рост мицелия. Однако споры и клетки мицелия сохраняют жизнеспособность и хорошо развиваются на питательных средах после отмывания от антиметаболитов. Активность α -амилазы определяли по методу Меннинга и Кемпбелла ⁽⁴⁾, модифицированному нами применительно к объекту с подбором условий работы на начальной скорости реакции при оптимальной концентрации субстрата. Активность культуральной жидкости определяли после отделения мицелия, активность в мицелии — после растирания со стеклянным порошком и настаивания в течение часа с 0,1 N ацетатным буфером с pH 5,0, взятым в объеме культуральной среды. Активность выражена в единицах экстинкции на 1 мл раствора. Гомогенный препарат α -амилазы *A. oryzae* был получен по методу Ш. Акабори, пропись Р. В. Фениксовой и Г. А. Молодой ⁽⁵⁾ без применения ацетата свинца. Количество белка определяли методом Лоури.

Известно, что образование активного фермента в клетке может изменяться вследствие действия регуляторных механизмов: на уровне транскрипции, на уровне трансляции, при превращении неактивной формы фермента в активную и обратно и на уровне поступления веществ в клетку.

Изучаемый нами регуляторный эффект не может быть объяснен тем, что при действии на клетки фермента среды происходит задержка поступ-

ления необходимых для его синтеза веществ. Использование находящихся в среде с препаратом α -амилазы продуктов деполимеризации крахмала или мальтозы, способных обеспечить индукцию синтеза α -амилазы ⁽⁶⁾, а также потребление других компонентов происходит не в меньшей мере, чем на среде без добавления препарата. Гриб развивается на среде с препаратом фермента даже несколько лучше, чем без него ⁽¹⁾.

Можно было предположить, что под действием фермента среды на клетки происходит каким-то образом инактивация синтезированной активной α -амилазы. Для выяснения этого мицелий, выращенный на среде 1 и содержащий активную α -амилазу, переносился в среду 2 с циклогексимидом и препаратом α -амилазы и параллельно в те же условия без препарата фермента. После 5-часовой инкубации содержание фермента в мицелии обоих вариантов было одинаковым. Следовательно, после выключения биосинтеза α -амилазы действием циклогексимида на рибосомы ⁽⁷⁾ наличие в среде активного фермента в необходимом для регуляторного эффекта концентрации не изменило активности α -амилазы в клетках. Однако это всегда имеет место без антибиотика в тех же условиях. Таким образом, изучаемый нами регуляторный эффект не касается фермента, уже синтезированного клеткой.

Т а б л и ц а 1

Ингибирование α -амилазой (α -А) среды образования этого фермента мицелием *A. oryzae* при действии 8-азагуанина или актиномицина D (активность α -А в усл. ед/мл)

Вариант опыта	№ опыта	Без антиметаболита и антибиотика						С 8-азагуанином или актиномицином D					
		культуральная среда		исх. штат. среда с α -А	мицелий			культуральная среда		исх. штат. среда с препаратом α -А	мицелий		
		без препарата α -А	с препаратом α -А		без препарата α -А	с препаратом α -А	исходный	без препарата α -А	с препаратом α -А		без препарата α -А	с препаратом α -А	исходный
С 8-азагуанином	1	0,50	2,02	2,04	0,35	0,30	0,40	0,50	2,02	2,04	0,35	0,30	0,40
	2	0,60	2,00	2,02	0,30	0,35	0,45	0,55	1,90	2,02	0,30	0,35	0,45
	3	0,55	1,80	1,80	0,35	0,35	0,40	0,55	1,80	1,80	0,35	0,35	0,40
С актиномицином D	4	0,75	2,60	2,65	0,45	0,45	0,50	0,75	2,60	2,65	0,45	0,45	0,50
	5	0,70	2,80	2,80	0,40	0,40	0,45	0,70	2,80	2,80	0,40	0,40	0,45
	6	0,80	2,75	2,70	0,45	0,40	0,50	0,75	2,70	2,70	0,45	0,40	0,50

Все вышеизложенное показывает, что точка приложения репрессирующего действия фермента среды на его образование клетками лежит либо на уровне транскрипции, либо на уровне трансляции. В литературе имеются данные ^(8, 9) о существовании относительно стабильной информационной РНК для α -амилазы *A. oryzae*. Мы повторили эти опыты, изучив образование активной α -амилазы нашим штаммом на питательной среде в условиях блокирования транскрипции актиномицином D и 8-азагуанином. Полученные результаты подтвердили, что образование активного фермента при этом продолжается около 6 час. со скоростью, мало отличающейся от скорости в контрольном варианте.

Таким образом, можно было выяснить, будет ли иметь место ингибирующее действие α -амилазы, добавленной в среду, на образование этого фермента клетками в условиях блокирования транскрипции. Тем самым можно было установить, локализован ли изучаемый эффект на уровне транскрипции или на уровне трансляции. Результаты опытов приведены в табл. 1, из которой видно, что количество фермента, образующееся за 5-часовую инкубацию, выделяется в наших условиях полностью в среду. Эффект торможения ферментом среды его образования в клетках при нарушении транскрипции АГ и блокировании ее АМ происходит совершенно так же, как без антиметаболита и антибиотика. Этот результат был также

подтвержден нами определением белка в среде, который в наших условиях в вариантах без АГ и АМ представлен практически одной α -амилазой (¹).

Следовательно, место приложения изучаемого регуляторного воздействия фермента среды на белоксинтезирующую систему клетки лежит на уровне трансляции.

Можно предположить двоякого характера изменения, которые в данном случае могут происходить на этом уровне: или прекращается синтез белка α -амилазы, или начинается синтез ее неактивной формы вместо активной. Мы предприняли попытки обнаружить неактивную форму α -амилазы после ингибирования образования фермента добавленным в среду его препаратом путем дезинтеграции клеток и автолизом при различных рН и разной длительности. При этом имелось в виду, что в случае физиологически нормального, регуляторного образования неактивной формы фермента эта форма должна быть активируемой. Однако появление активного фермента нами не обнаружено. Следует отметить также отсутствие каких-либо литературных указаний на наличие неактивной формы α -амилазы у *A. oryzae*.

Таким образом, при изучаемом типе регуляции происходит репрессия синтеза активного фермента. Можно предполагать, что механизм данного регуляторного эффекта состоит в связывании α -амилазы среды с рецептором клеточной оболочки, существование которого недавно обнаружили у *A. oryzae* (¹⁰), и что при участии цитоплазматической мембраны, как это предполагается (¹¹) для колицинов, сигнал передается в виде кооперативных конформационных переходов белков и белок-липидных комплексов в непрерывной системе мембран клетки (¹²) на аппарат трансляции.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, ДАН, 177, № 1, 240 (1967). ² В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, Физиология и биохимия здоров. и больн. растений. Сборник Изд. МГУ, 1970, стр. 69. ³ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, ДАН, 204, № 3 (1972). ⁴ G. V. Manning, L. L. Campbell, J. Biol. Chem., 236, 11, 2952 (1961). ⁵ Р. В. Феликсова, Г. А. Молодова, Микробиология, 30, в. 4, 607 (1961). ⁶ А. С. Тихомирова, Микробиология, 28, в. 1, 1959, стр. 45. ⁷ Механизм действия антибиотиков, под ред. Г. Ф. Гаузе, М., 1969. ⁸ Р. В. Феликсова, Г. И. Квеситадзе, А. К. Куликова, Микробиология, 38, в. 6, 994 (1969). ⁹ Ц. С. Турманидзе, Г. И. Квеситадзе, Сообщ. АН ГрузССР, 63, № 2, 444 (1971). ¹⁰ M. Yabuki, S. Fukui, J. Bacteriol., 104, 138 (1970). ¹¹ М. Номура, Сборн. Механизм действия антибиотиков, М., 1969, стр. 658. ¹² С. В. Ковнев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970.