

УДК 577.150.6

БИОХИМИЯ

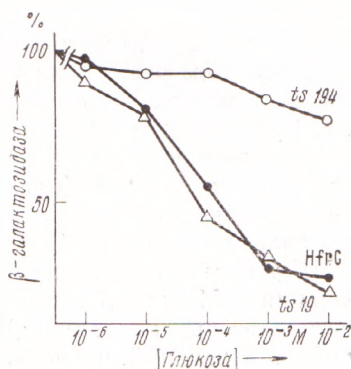
Г. И. БУРД, Р. С. ЕРЛАГАЕВА, Т. Н. БОЛЬШАКОВА,
В. Н. ГЕРШАНОВИЧ

РАЗОБЩЕНИЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ α -МЕТИЛГЛЮКОЗИДА У МУТАНТА *ESCHERICHIA COLI* К 12, РЕЗИСТЕНТНОГО К КАТАБОЛИТНОЙ РЕПРЕССИИ ГЛЮКОЗОЙ

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 2 I 1974)

Трансмембранный перенос многих углеводов у *E. coli*, сопряженный с их фосфорилированием, осуществляется ФЕП*-зависимой ФТС (^{1,2}). Система состоит из нескольких компонентов. Низкомолекулярный белок НРг и фермент I (последний катализирует фосфорилирование НРг за счет ФЕП) необходимы для утилизации всех углеводов, транспортируемых через ФТС. Мембранный фермент II, специфичный по отношению к отдельным углеводам, катализирует перенос с фосфо ~НРг непосредственно на углевод (²). Эта реакция может осуществляться при участии цитоплазматического фактора III ФТС (³). Мутанты по ферменту I или НРг (pts-мутанты) теряют способность утилизировать большую группу углеводов (¹⁻⁵). Мутанты с утратой субстратспецифичного фермента II прекращают потребление только данного углевода (⁶).

Рис. 1. Влияние глюкозы на синтез β -галактозидазы у бактерий ts 19, ts 194 и Hfr C. Бактерии выращивали на качалке до середины логарифмической фазы на среде М-9 с 0,4% казаминовых кислот, после чего суспензию каждой культуры разделяли на две части, к одной из которых добавляли индуктор изопропил- β -D-галактозид (ИПГТ) (10^{-4} М), а к другой — ИПГТ и глюкозу. Инкубировали 60 мин., разрушали клетки толдуолом и определяли активность β -галактозидазы по методу (¹⁴). Данные представлены в процентах по отношению к безглюкозной пробе



Недавно стало известно (^{7,8}), что у бактерий *E. coli* существует два фермента II для глюкозы. Один (gpt A) имеет высокое сродство к α -МГ (аналогу глюкозы, который фосфорилируется в клетках *E. coli* без дальнейшей утилизации) и транспортирует около 40% добавленной глюкозы (⁷). Другой (gpt B) имеет слабое сродство к α -МГ. С его помощью утилизируется около 60% всей глюкозы (⁷). Мутации по первой системе картируются на 23-й мин. хромосомы *E. coli* (⁸). Они приводят к замедлению роста микробов на глюкозе и утрате способности к фосфорилированию и транспорту α -МГ (⁷⁻⁹). Выяснилось, что описанные ранее (¹⁰⁻¹²) мутанты, резистентные к катаболитной репрессии глюкозой, утрачивают актив-

* В работе приняты следующие сокращения: ФЕП — фосфоенолпируват; α -МГ — метил- α -D-глюкопиранозид, ФТС — ФЕП-зависимая углевод-фосфотрансферазная система; pur B, his и met — генетические индексы пуринового, гистидинового и метионинового локусов соответственно, ИПГТ — изопропилтио- β -D-галактопиранозид.

ность gpt A⁽⁷⁾. Таким образом, считается, что один из глюкозных ферментов II ФТС катализирует сопряженный с фосфорилированием транспорт глюкозы и α -МГ в клетки *E. coli* K12. Поэтому мутационное повреждение этого фермента приводит к подавлению как транспорта α -МГ в целые клетки, так и фосфотрансферазной активности в экстрактах из мутантных бактерий^(8, 9, 12).

В настоящей работе мы приводим описание резистентного к катаболической репрессии мутанта ts 194, у которого впервые зарегистрировано подавление транспорта α -МГ без снижения фосфорилирующей активности. Спонтанный мутант ts 194 отбирали из изученных нами ранее⁽¹³⁾ бактерий ts 19 (derivat штамма Hfr C(met)) с термочувствительным ферментом I ФТС. Суспензию клеток ts 19 высевали на чашки с минимальным агаром, в который добавляли метионин (20 мкг/мл), 0,4% маннита, 0,4% лактозы,

Таблица 1

Потребление C¹⁴-глюкозы и C¹⁴- α -МГ бактериями ts 19 и ts 194
(10³ имп/мин на 1 мг белка) *

C ¹⁴ -глюкоза		C ¹⁴ - α -МГ		C ¹⁴ -глюкоза		C ¹⁴ - α -МГ	
ts 19	ts 194	ts 19	ts 194	ts 19	ts 194	ts 19	ts 194
210	168	21	9,2	85	62	69,5	21
147	143	65	4,75	—	—	52,2	5,4
240	178	80	7,1	—	—	31,3	2,9

* Клетки выращивали до середины логарифмической фазы в среде М-9 + 0,4% казеино-вых кислот + 0,4% глюкозы. Концентрация C¹⁴-глюкозы и C¹⁴- α -МГ (препараты фирмы «Amersham») 10⁻⁵ М. Определение проводили по стандартной методике⁽¹³⁾.

10⁻³ М α -МГ и инкубировали 48 час при 27°. Среди выросших колоний, нечувствительных к бактериостатическому действию α -МГ, был отобран штамм ts 194. Бактерии ts 194 хорошо росли при 27° в минимальной среде с добавлением различных углеводов. Например, время удвоения в среде с глюкозой или маннитом составляет соответственно 89 и 120 мин., что равнялось времени генерации для штамма ts 19 (90 и 115 мин.). Однако синтез β -галактозидазы у мутанта ts 194 был значительно менее чувствителен к репрессии глюкозой (рис. 1) по сравнению с ts 19 и Hfr C. При этом скорость утилизации глюкозы у мутанта ts 194 лишь незначительно отличалась от таковой штамма ts 19 (табл. 1). В то же время уровень аккумуляции α -МГ у него существенно снижается. Оказалось, что скорость фосфорилирования α -МГ экстрактами из бактерий ts 194 несколько превышает скорость фосфорилирования α -МГ в экстрактах из ts 19. Средний результат из 12 определений, проведенных по методу⁽¹⁵⁾, составил 6,51 и 4,48 нмоля на 1 мг белка за 60 мин. соответственно.

Эти данные подтверждались в опытах по определению уровня фосфорилирования α -МГ в интактных клетках обоих типов. Бактерии ts 19 за 20 мин. инкубации при 27° накапливали 13,3 нмоля на 1 мг белка C¹⁴- α -МГ, из которых 87% обнаруживались в виде МГ-фосфата. Мутант ts 194 за это же время аккумулялировал лишь 0,99 нмоля на 1 мг белка C¹⁴- α -МГ, однако и в этом случае около 90% метки определялось в виде фосфорного эфира.

Таким образом, мы обнаружили, что клетки ts 194 утрачивают способность к активному транспорту α -МГ, причем этот дефект не сопровождается снижением фосфотрансферазной активности. Обнаруженный эффект можно было связать с увеличением активности фосфатазы α -МГ-фосфата, что могло бы привести к увеличению скорости выхода α -МГ из клеток⁽¹⁶⁾. Однако в специальных опытах было установлено, что скорость выхода α -МГ и, следовательно, определяющая ее фосфатазная активность у мутанта ts 194 не увеличена.

Было проведено скрещивание ts 194×AB 470 (pur B, his) и отобрано два типа рекомбинантов: pur B⁺ и his⁺. Среди 262 колоний типа pur B⁺ 68% оказались резистентными к репрессии глюкозой (резистентность определялась на чашках по методу Магасаника (¹⁰)). В то же время среди 107 his⁺-колоний было выявлено только 11% резистентных форм. Можно думать, что мутация ts 194 картируется в районе pur B локуса, т. е. там же, где были ранее локализованы мутации, вызывающие резистентность к каталитической репрессии (cat) (¹¹) и снижение транспорта α-МГ (umg, gpt A) (^{7, 8}).

Было высказано (^{9, 17}) предположение о существовании двух сайтов в молекуле фермента II. На первом происходит связывание субстрата, когда фермент осуществляет стадию облегченной диффузии. Второй сайт вступает в действие, когда фермент II катализирует перенос фосфата с фосфо~Нрг на α-МГ. В свете этой гипотезы можно предположить, что мутация ts 194 приводит к утрате у фермента II (системы gpt A) лишь первого из указанных сайтов. По нашему мнению, проще представить, что данная система (gpt A) работает только как переносчик глюкозы и α-МГ, а фосфорилирование (лимитирующая стадия в процессе транспорта α-МГ (⁹)) осуществляется уже внутри клетки цитоплазматическим фактором III, который дублирует работу фермента II в экстрактах и функция которого в целых клетках *E. coli* до сих пор не ясна (³). (Глюкокиназа у бактерий этого вида не имеет средства к α-МГ (¹⁸).) Эта гипотеза подтверждается в опытах по конкуренции между глюкозой и α-МГ (табл. 2).

Глюкоза подавляет перенос α-МГ в бактерии ts 19 и ts 194, а α-МГ эффективно ингибирует транспорт глюкозы только в клетках ts 19. Видимо, оба вещества конкурируют в основном за фосфо~Нрг вследствие низкого сродства системы gpt A к глюкозе, а системы gpt B к α-МГ (⁷). Поэтому при отсутствии переносчика у мутанта ts 194 α-МГ не может конкурировать с глюкозой за фосфо~Нрг.

Представленный материал позволяет высказать еще два предположения: 1) ген, детерминирующий синтез переносчика для α-МГ, тесно сцеплен с геном фактора III, и поэтому одна мутация у всех изученных ранее мутантов приводит к утрате обоих белков сразу (^{8, 9, 12}); 2) способность глюкозы репрессировать синтез катаболических ферментов у бактерий *E. coli* связана с функционированием одной из систем ее транспорта (gpt A) и системы ее внутриклеточного фосфорилирования (фактор III — фермент I — Нрг). Поэтому мутационное повреждение системы генерации фосфо~Нрг у pts-мутантов также приводит к той или иной степени резистентности к катаболитной репрессии глюкозой (^{19, 20}).

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
26 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Н. Гершанович, Биохимические и генетические основы переноса углеводов в бактериальную клетку, 1973. ² S. Roseman, J. Gen. Physiol., v. 54, 138s (1969). ³ D. L. Oezender, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 777 (1972). ⁴ Г. И. Бурд, И. В. Андреева и др., Мол. биол., т. 2, 89 (1968). ⁵ Г. И. Бурд, В. П. Шаболенко и др., Мол. биол.,

т. 3, 256 (1969). ⁶ T. Ferenci, H. L. Kornberg, FEBS Letters, v. 13, 127 (1971).
⁷ S. J. Curtis, W. Epstein, Federat. Proc. v. 30, Part II, 1123 (1971). ⁸ H. L. Kornberg, J. Smith, FEBS Letters, v. 20, 270 (1972). ⁹ G. Gachelin, Europ. J. Biochem., v. 16, 342 (1970). ¹⁰ W. F. Loomis, B. Magasanik, J. Mol. Biol., v. 23, 487 (1967).
¹¹ B. Tyler, R. Wishnow et al., J. Bacteriol., v. 100, 809 (1969). ¹² I. Pastan, R. L. Perlman, J. Biol. Chem., v. 244, 5836 (1969). ¹³ Г. И. Бурд, Т. Н. Большакова и др., Мол. биол., т. 5, 384 (1971). ¹⁴ A. B. Pardee, F. Jacob, J. Monod, J. Mol. Biol., v. 1, 165 (1959). ¹⁵ S. Tanaka, S. A. Lerner, E. C. C. Lin, J. Bacteriol., v. 93, 642 (1967).
¹⁶ H. H. Winkler, J. Bacteriol., v. 106, 362 (1971). ¹⁷ S. Tanaka, D. G. Fraenkel, E. C. C. Lin, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 27, 63 (1967). ¹⁸ H. H. Winkler, T. H. Wilson, Biochim. et biophys. acta, B. 135, 1030 (1967). ¹⁹ В. Н. Гершанович, Н. В. Юровицкая и др., ДАН, т. 190, 1232 (1970). ²⁰ B. Tyler, B. Magasanik, J. Bacteriol., v. 102, 411 (1970).