

УДК 577.150.6

БИОХИМИЯ

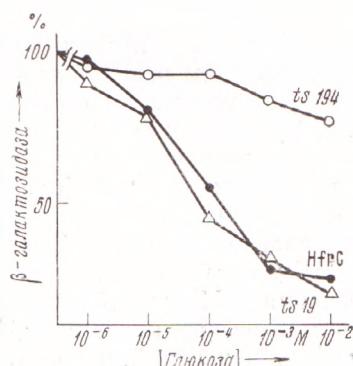
Г. И. БУРД, Р. С. ЕРЛАГАЕВА, Т. Н. БОЛЬШАКОВА,  
В. Н. ГЕРШАНОВИЧ

**РАЗОБЩЕНИЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ  
 $\alpha$ -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<sup>(1, 2)</sup>. Система состоит из нескольких компонентов. Низкомолекулярный белок НПр и фермент I (последний катализирует фосфорилирование НПр за счет ФЕП) необходимы для утилизации всех углеводов, транспортируемых через ФТС. Мембранный фермент II, специфичный по отношению к отдельным углеводам, катализирует перенос с фосфо-~НПр непосредственно на углевод<sup>(2)</sup>. Эта реакция может осуществляться при участии цитоплазматического фактора III ФТС<sup>(3)</sup>. Мутанты по ферменту I или НПр (pts-мутанты) теряют способность утилизировать большую группу углеводов<sup>(1-5)</sup>. Мутанты с утратой субстратспецифичного фермента II прекращают потребление только данного углевода<sup>(6)</sup>.

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



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

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

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

В настоящей работе мы приводим описание резистентного к катаболитной репрессии мутанта ts 194, у которого впервые зарегистрировано подавление транспорта  $\alpha$ -МГ без снижения фосфорилирующей активности. Спонтанный мутант ts 194 отбирали из изученных нами ранее<sup>(13)</sup> бактерий ts 19 (дериват 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  $C^{14}$ -глюкозы и  $C^{14}$ - $\alpha$ -МГ бактериями ts 19 и ts 194  
( $10^3$  имп/мин на 1 мг белка) \*

| $C^{14}$ -глюкоза |        | $C^{14}$ - $\alpha$ -МГ |        | $C^{14}$ -глюкоза |        | $C^{14}$ - $\alpha$ -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 M-9 + 0,4% казаминовых кислот + 0,4% глюкозы. Концентрация  $C^{14}$ -глюкозы и  $C^{14}$ - $\alpha$ -МГ (препараты фирмы «Amersham»)  $10^{-5}$  М. Определение проводили по стандартной методике<sup>(14)</sup>.

$10^{-3}$  М  $\alpha$ -МГ и инкубировали 48 час при 27°. Среди выросших колоний, нечувствительных к бактериостатическому действию  $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\alpha$ -МГ у него существенно снижается. Оказалось, что скорость фосфорилирования  $\alpha$ -МГ экстрактами из бактерий ts 194 несколько превышает скорость фосфорилирования  $\alpha$ -МГ в экстрактах из ts 19. Средний результат из 12 определений, проведенных по методу<sup>(15)</sup>, составил 6,51 и 4,48 нмоля на 1 мг белка за 60 мин. соответственно.

Эти данные подтверждались в опытах по определению уровня фосфорилирования  $\alpha$ -МГ в интактных клетках обоих типов. Бактерии ts 19 за 20 мин. инкубации при 27° накапливали 13,3 нмоля на 1 мг белка  $C^{14}$ - $\alpha$ -МГ, из которых 87% обнаруживались в виде МГ-fosфата. Мутант ts 194 за это же время аккумулировал лишь 0,99 нмоля на 1 мг белка  $C^{14}$ - $\alpha$ -МГ, однако и в этом случае около 90% метки определялась в виде фосфорного эфира.

Таким образом, мы обнаружили, что клетки ts 194 утрачивают способность к активному транспорту  $\alpha$ -МГ, причем этот дефект не сопровождается снижением фосфотрансферазной активности. Обнаруженный эффект можно было связать с увеличением активности фосфатазы  $\alpha$ -МГ-fosфата, что могло бы привести к увеличению скорости выхода  $\alpha$ -МГ из клеток<sup>(16)</sup>. Однако в специальных опытах было установлено, что скорость выхода  $\alpha$ -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<sup>+</sup> и his<sup>+</sup>. Среди 262 колоний типа pur B<sup>+</sup> 68% оказались резистентными к репрессии глюкозой (резистентность определялась на чашках по методу Магасаника (<sup>10</sup>)). В то же время среди 107 his<sup>+</sup>-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 катаболитной репрессии (cat) (<sup>11</sup>) и снижение транспорта  $\alpha$ -МГ (umg, gpt A) (<sup>7, 8</sup>).

Было высказано (<sup>9, 17</sup>) 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- $\sim$ Нрг на  $\alpha$ -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  $\alpha$ -МГ, а фосфорилирование (лимитирующая стадия в процессе транспорта  $\alpha$ -МГ (<sup>9</sup>)) 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 (<sup>3</sup>). (Глюказиназа у бактерий этого вида не имеет средства к  $\alpha$ -МГ (<sup>18</sup>).) Эта гипотеза подтверждается в опытах по конкуренции между глюкозой и  $\alpha$ -МГ (табл. 2).

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

Представленный материал позволяет высказать еще два предположения: 1) ген, детерминирующий синтез переносчика для  $\alpha$ -МГ, тесно спреплен с геном фактора III, и поэтому одна мутация у всех изученных ранее мутантов приводит к утрате обоих белков сразу (<sup>8, 9, 12</sup>); 2) способность глюкозы репрессировать синтез катаболитических 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- $\sim$ Нрг у pts-мутантов также приводит к той или иной степени резистентности к катаболитной репрессии глюкозой (<sup>19, 20</sup>).

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

Поступило  
26 XII 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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

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