

М. А. НЕСМЕЯНОВА, О. Б. МАРАЕВА, А. И. СЕВЕРИН,
И. С. КУЛАЕВ

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛИФОСФАТАЗЫ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* С РЕПРЕССИРОВАННЫМ И ДЕРЕПРЕССИРОВАННЫМ БИОСИНТЕЗОМ ЭТОГО ФЕРМЕНТА

(Представлено академиком А. А. Баевым 23 IV 1975)

Нами (¹) было установлено присутствие у *Escherichia coli* специфической фосфогидролазы — полифосфатазы, гидролизующей до ортофосфата высокополимерные полифосфаты. Дальнейшие исследования показали, что регуляция биосинтеза этого фермента осуществляется экзогенным ортофосфатом параллельно с щелочной фосфатазой и триполифосфатазой под контролем общих регуляторных генов (^{2, 3}). Это свидетельствует об общности их функций у бактерий, связанной со снабжением клеток ортофосфатом при его дефиците в среде.

Важным в понимании функции и регуляции этого фермента представляется выявление его внутриклеточной локализации.

Известно, что у *E. coli* многие гидролитические ферменты локализованы в периплазматическом пространстве, снаружи от цитоплазматической мембраны (⁴). Среди них — и щелочная фосфатаза, тесно связанная в своем функционировании с полифосфатазой. В связи с этим в настоящей работе была сделана попытка сравнительно изучить полифосфатазную активность в целых клетках и в лишенных клеточных стенок сферопластах *E. coli* в условиях репрессии и дерепрессии биосинтеза этого фермента.

Сферопласты из клеток *E. coli* выделяли как описано ранее. Обычно до 95% клеток превращалось в сферопласты, которые осаждали при 16 000 об/мин. в течение 20 мин. Надосадочная жидкость, полученная при осаждении сферопластов, содержала периплазматический материал. Осадок сферопластов дважды промывали в среде выделения сферопластов. При этом наблюдали их частичный лизис, что учитывали при расчете активности субклеточных фракций. Лизис сферопластов осуществляли с помощью осмотического шока, из лизата сферопластов центрифугированием осаждали микросомы — суммарную частичковую фракцию — при 105 000 g в течение 90 мин. Полученная при этом надосадочная жидкость содержала цитоплазматический материал, так называемый клеточный сок. Фракционировали клетки как с репрессированным (при избытке ортофосфата), так и с дерепрессированным (при дефиците ортофосфата) биосинтезом фосфогидролаз. Результаты анализа активности полифосфатазы и, в качестве контроля, щелочной фосфатазы представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, большая часть полифосфатазной активности в дерепрессированных клетках распределялась между фракцией, содержащей периплазматический материал, и промывными водами, составляя в сушке до 85% от общей активности клетки. При этом до 40% активности обнаруживалось уже во фракции периплазмы. Небольшое количество фермента содержалось также в цитоплазматических фракциях — клеточном соке и микросомах. В клетках с более низким уровнем синтеза полифосфатазы (в случае репрессии) распределение фермента было иным. Во фракции, содержащей периплазматический материал, активность полифосфатазы либо отсутствовала, либо содержалась в значительно меньшем количестве, чем в соответствующей

фракции дерепрессированных клеток. Однако фермент в значительной степени извлекался в течение первой и особенно во время второй отмывки. В репрессированных клетках содержание фермента в цитоплазматических фракциях — микросомах и клеточном соке — было выше, чем в дерепрессированных. Что касается щелочной фосфатазы (локализацию которой во всех фракциях мы тоже определяли для контроля), то основная часть этого фермента как в репрессированных, так и в дерепрессированных клетках обнаруживалась во фракции периплазматического материала и в значительно меньшем количестве в отмывках сферопластов.

Однако в микросомах и клеточном соке из репрессированных клеток содержание щелочной фосфатазы, так же как и в случае полифосфатазы, сохранялось более высоким, чем в дерепрессированных клетках.

Полученные данные свидетельствуют о том, что, во-первых, полифосфатаза, по-видимому, в значительной степени локализована на внешней поверхности цитоплазматической мембраны, медленно диссоциируя с нее при промывании сферопластов. Во-вторых, совершенно ясно, что полифосфатаза более прочно связана с цитоплазматической мембраной, чем щелочная фосфатаза. Кроме того, важно отметить, что большая часть полифосфатазы находится в связи с мембраной и эта связь более прочна в репрессированных клетках, чем в дерепрессированных. Таким образом, количество прочно связанного с мембраной фермента становится выше в репрессированных клетках. Та же тенденция выявлена и в случае щелочной фосфатазы.

Т а б л и ц а 1
Активность полифосфатазы и щелочной фосфатазы * в субклеточных фракциях E. coli с репрессированным и дерепрессированным биосинтезом этих ферментов

Фракция	Щелочная фосфатаза **		Полифосфатаза **	
	—Р	+Р	—Р	+Р
Периплазма	88	70	32	6
1-я отмывка	2,6	4	40	12
2-я отмывка	0,5	2	13	53
Клеточный сок	8,5	6	12	18
Отмывка микросом	0,1	14	0	0
Микросомы	0,8	1,5	3,5	9

* Активность ферментов выражена в процентах от общей активности клеток, средние цифры из 3 опытов.

** —Р — дефицит ортофосфата в среде, +Р — избыток ортофосфата в среде.

реносили на среду без ортофосфата, в условия, обеспечивающие дерепрессию фосфогидролаз. Как видно из рис. 1, в исходных клетках с репрессированным синтезом полифосфатазы фермент был обнаружен только в мембранах. Однако уже в первые минуты инкубации при дефиците ортофосфата активность фермента в мембранах падает и он обнаруживается в отмывках сферопластов, но не выявляется еще во фракции

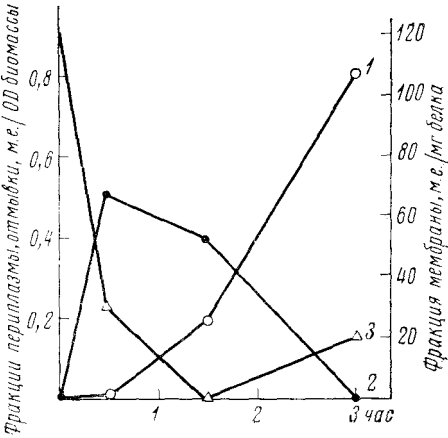


Рис. 1. Динамика изменения активности полифосфатазы в субклеточных фракциях. 1 — фракция периплазмы, 2 — отмывки, 3 — мембраны

Ослабление связи ферментов с мембраной, увеличение их количества на внешней стороне мембраны и снижение доли прочно связанного с мембранами фермента у дерепрессированных клеток, по-видимому, связано с ускорением секреции ферментов.

В следующей части работы была изучена динамика изменения активности полифосфатазы в периплазме, в отмывках сферопластов и мембранах в процессе дерепрессии синтеза полифосфатазы. Клетки, предварительно выращенные на полной среде с ортофосфатом, переносили на среду без ортофосфата, в условия, обеспечивающие дерепрессию фосфогидролаз. Как видно из рис. 1, в исходных клетках с репрессированным синтезом полифосфатазы фермент был обнаружен только в мембранах. Однако уже в первые минуты инкубации при дефиците ортофосфата активность фермента в мембранах падает и он обнаруживается в отмывках сферопластов, но не выявляется еще во фракции

периплазматического материала. В процессе дальнейшего голодания по фосфору снижается количество фермента в отмывках и возрастает его содержание в периплазме. Таким образом, с увеличением продолжительности голодания связь фермента с цитоплазматическим материалом ослабевает и он выявляется в основном уже во фракции периплазмы. Трудно сказать сейчас, какой фактор ответствен за ускорение секреции ферментов при дерепрессии. Нами было замечено, однако, что при лизисе сферопластов из репрессированных клеток в присутствии периплазматического материала из дерепрессированных клеток удельная активность полифосфатазы, связанной с мембранной фракцией, падает по сравнению с мембранами, полученными из тех же сферопластов, лизированных в стандартном буфере.

Возможно, в периплазме дерепрессированных клеток существует какой-то фактор (возможно, белковый), способствующий освобождению связанных с мембранами ферментов. Более того, если предположить, что прочно связанные с мембранами ферменты являются компонентами тройственного комплекса: рибосома — фермент — мембрана ⁽⁶⁾, то выход фермента из этого тройственного комплекса и секреция его способствуют освобождению рибосом для нового синтетического акта и, следовательно, ускорению синтеза соответствующего фермента.

Полученные данные, на наш взгляд, позволяют выдвинуть предположение о возможности регуляции синтеза гидролитических ферментов, секретируемых за пределы цитоплазматической мембраны, на уровне их секреции.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушкино Московской обл.

Поступило
3 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. А. Несмеянова, А. Д. Дмитриев, И. С. Кулаев, Микробиология, т. 10, в. 2, 213 (1973). ² М. А. Несмеянова, С. Г. Гонина и др., Микробиология, т. 43, в. 6, 955 (1974). ³ М. А. Несмеянова, С. А. Гонина, И. С. Кулаев, ДАН, т. 224, № 3 (1975). ⁴ L. A. Heppel, Sci., v. 156, 1451 (1967). ⁵ М. Н. Маламу, В. Л. Ногескер, Biochem., v. 3, 1889 (1964). ⁶ М. А. Несмеянова, В. Н. Витвицкий, А. А. Богданов, Биохимия, т. 31, 906 (1966).