

В. В. ЮРКЕВИЧ, З. И. ГАЛЧЕВА-ГАРГОВА

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭФФЕКТА РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА β-ФРУКТОЗИДАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ УРОВНЕМ АКТИВНОГО ФЕРМЕНТА СРЕДЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 VII 1975)

Ранее нами сообщалось, что образование секретируемой β-фруктозидазы у дрожжей регулируется уровнем этого фермента в среде (¹, ²). Фермент среды при этом не потребляется клетками в количествах, улавливаемых анализом активности, имеется лишь контакт его с клеточной поверхностью. Протопласты дрожжей синтезируют и секретируют значительные количества β-фруктозидазы, однако они лишены данного эффекта регуляции. После частичной регенерации клеточной стенки эффект возобновляется (²). Далее, нами показано, что лишь отдельные места клеточной поверхности специфически связывают β-фруктозидазу среды при осуществлении регуляторного акта (³).

Настоящая работа посвящена выяснению вопроса о локализации эффекта в клетках, т. е. выявлению биологической мишени в данном способе регуляции.

Объектом служили дрожжи *S. Carlsbergensis*, выращиваемые на среде Ридер с 0,5% глюкозы и с дрожжевым экстрактом. 5%-ную суспензию клеток инкубировали в течение 4 или 6 час. с актиномицином D (150 мкг/мл) на среде Ридер с 0,1 M фруктозой. Указанная концентрация антибиотика являлась фунгистатической для данного штамма. Опыты проводили с добавлением в среду препарата β-фруктозидазы фирмы Calbiochem. Активность секретируемого фермента в среде измеряли после полного удаления клеток, а в клетках — после их толерантного автолиза динитросалициловым методом (⁴). Активность выражали в Е на 1 мг сырого веса биомассы (центрифугирование в стандартных условиях). Включение ¹⁴C-урацила (0,4 мк С/мл) в суммарную РНК измеряли на скитилиационном счетчике Unilux в надосадочной жидкости после 18-часового щелочного гидролиза биомассы. Включение ¹⁴C-валина (0,6 мк С/мл) в клетки дрожжей измеряли после их промывания и нанесения на фильтры Синпор, в гетерогенной системе того же счетчика.

Известно, что образование активного фермента в клетке может изменяться вследствие действия регуляторных механизмов на уровне транскрипции, на уровне трансляции или на посттрансляционном уровне.

Чтобы изучить участие процесса транскрипции в изучаемом способе регуляции, суспензию клеток инкубировали на среде с актиномицином D. После 4-часовой инкубации в присутствии этого антибиотика, в суспензию добавляли ¹⁴C-урацил. Включение метки в суммарную фракцию РНК при этом не наблюдали, в то время как контрольные клетки, выдержанные на той же среде без антибиотика, хорошо включали меченый урацил (табл. 1). Таким образом, было найдено, что выдерживание клеток в среде с актиномицином D (150 мкг/мл) полностью блокирует процесс транскрипции.

Далее, дрожжевую суспензию, выдержанную в течение 4 час. в присутствии актиномицина D, инкубировали в питательной среде с добавлением препарата β-фруктозидазы или без него в течение 2 час. Данные табл. 2 показывают, что дрожжевые клетки сохраняют при этом способ-

ность к синтезу фермента, что говорит о наличии долгоживущей мРНК для β -фруктозидазы; вместе с тем сохраняется и эффект регуляции образования фермента клетками уровнем его в среде: при добавлении фермента в среду с актиномицином клетки прекращают образование активного секретируемого фермента, так же как и клетки без антибиотика, в то же время клетки без препарата фермента секретировали фермент в среду также независимо от наличия антибиотика.

Таблица 1

Влияние актиномицина D на включение ^{14}C -урацила в суммарную РНК дрожжевых клеток

Время инкубации, мин.	Концентрация актиномицина D, мкг/мл	Радиоактивность, имп/мин на пробу
1	0	2783
	100	140
	150	62
5	0	28 354
	100	305
	150	38
10	0	93 875
	100	1215
	150	45

Таким образом, регуляция образования β -фруктозидазы уровнем ее в среде может осуществляться без участия процесса транскрипции. Следовательно, регуляция может иметь место либо на уровне трансляции, либо на посттрансляционном уровне. При этом или происходит репрессия синтеза ферментного белка, или идет продолжение синтеза, ведущее к об-

разованию неактивной формы фермента.

С целью выявления влияния фермента среды на образование неактивной формы β -фруктозидазы мы изучали включение меченой аминокислоты в клетки дрожжей в условиях, когда наблюдался регуляторный эффект. Для этого 5% суспензию дрожжевых клеток помещали в среду Ридер

Таблица 2

Регуляция образования β -фруктозидазы в присутствии актиномицина D у *S. Carlsbergensis* (активность фермента, Е/мг сырого веса биомассы)

Вариант	№ опыта	Среда			Клетки	
		исходная с препаратом	культуральная с препаратом	культуральная без препарата	с препаратом	без препарата
С актиномицином D (150 мкг/мл)	1	0,68	0,68	0,185	0,375	0,380
	2	0,54	0,54	0,130	0,330	0,335
Контрольные клетки	1	0,68	0,68	0,210	0,370	0,380
	2	0,54	0,54	0,150	0,310	0,315

Таблица 3

Влияние β -фруктозидазы среды на включение ^{14}C -валина в клетки дрожжей

№ опыта	Радиоактивность клеток, имп/мин		Активность фермента, секретируемого контрольными клетками, Е/мг сырого веса
	с препаратом β -фруктозидазы	контрольные клетки	
1	69 725	104 201	0,098
2	79 295	105 969	0,105
3	61 237	78 790	0,020

с фруктозой, дрожжевым экстрактом и с ^{14}C -валином на 2 часа в одном случае с β -фруктозидазой, в другом без фермента. Включение метки в клетки дрожжей на среде с ферментом было примерно на 40% ниже, чем на среде без фермента (табл. 3). Этой разницы не могло быть, если бы синтез

β -фруктозидазы в варианте с препаратом фермента продолжался так же, как и в варианте без препарата, и фермент, синтезированный в варианте с препаратом, переходил бы в неактивную форму.

Подтверждением того, что наблюдаемое различие включения в клетки меченой аминокислоты связано с различиями в синтезе β -фруктозидазы, является корреляция величины включения ^{14}C -валина с величиной активности фермента, секретируемого клетками (табл. 3). Об этом же говорит тот факт, что фермент среды специфически влияет на образование этого фермента клетками и не оказывает влияния на развитие культуры (¹).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что под влиянием β -фруктозидазы среды репрессирован синтез белка этого фермента в клетках на уровне трансляции.

Этот вывод согласуется с данными, полученными для регуляции образования α -амилазы у *Aspergillus oryzae*. И в том и в другом случае осуществляется своеобразный механизм принципа обратной связи в регуляции образования секретируемого фермента (⁵⁻⁸).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Юркевич, Н. В. Шамшурина, Дауда Хамани, Биол. науки, т. 3, № 7, 97 (1973). ² В. В. Юркевич, З. И. Галчева-Гаргова, Журн. общ. биол., т. 36, № 3, 422 (1975). ³ З. И. Галчева-Гаргова, В. В. Юркевич, ДАН, т. 225, № 2 (1975). ⁴ A. D. Jamieson, R. H. Pruitt, R. Caldwell, J. Dental Res., v. 48, № 2, 483 (1969). ⁵ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, ДАН, т. 177, № 1, 240 (1967). ⁶ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, ДАН, т. 204, № 3, 614 (1972). ⁷ В. В. Юркевич, Г. Т. Козырева, ДАН, т. 209, № 6, 1461 (1973). ⁸ В. В. Юркевич, Усп. совр. биол., т. 77, № 3, 360 (1974).