

УДК 557.152.361

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ КИСЛЫЕ ФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*. КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. СЕКРЕЦИЯ

С. Н. Егоров^{1*}, Е. В. Петрова², А. В. Левашов²

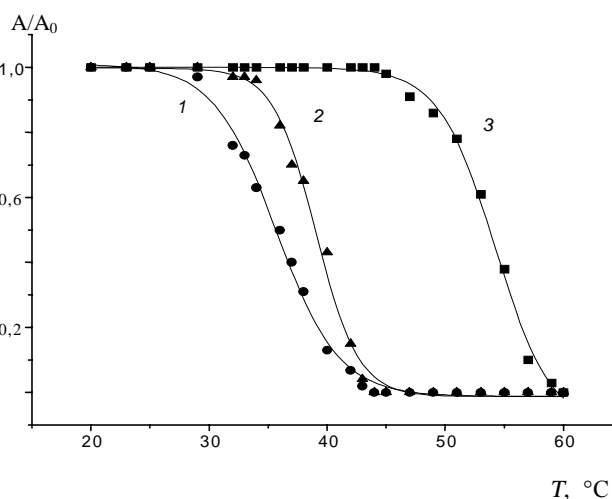
(¹биологический и ²химический факультеты Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; тел./факс (095)939-46-58; e-mail: sne@protein.bio.msu.su)

В работе проведен сравнительный анализ нативных внеклеточных кислых фосфатаз и гомомерных форм репрессибельной кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучена их субстратная специфичность, термостабильность, рН-зависимость. Продемонстрировано отсутствие взаимосвязи между секрецией фермента, состоящего только из минорных субъединиц репрессибельной кислой фосфатазы, транспортом белков в почку дрожжей. Высказана гипотеза о роли минорных субъединиц репрессибельной кислой фосфатазы в сортинге фермента.

Два пула кислых фосфатаз определяют в среде культивирования дрожжей. Фермент, синтезируемый при высокой концентрации ортофосфата в среде, называют конститутивным (кКФ), он является гомомером и кодируется геном РНО3. При низком содержании ортофосфата в среде происходит синтез репрессибельной кислой фосфатазы (рКФ), которая кодируется тремя структурными генами: РНО5, РНО10 и РНО11. Гетеромерная организация репрессибельной кислой фосфатазы не нашла убедительного объяснения в литературе. Высказывались предположения о копировании гена РНО5 вместе с регуляторными областями в других хромосомах дрожжей [1]. В нашей работе высказана гипотеза о функциональном различии субъединиц, входящих в состав рКФ, что подтверждается кинетическими характеристиками гликопротеинов, кодируемых отдельными структурными генами репрессибельной кислой фосфатазы.

Методы исследования

В работе использовали следующие штаммы дрожжей *S. cerevisiae*: S 288C(a MAL, GAL2), YMR4 (α his 11, 3-15 leu2-3, 2-112 can^R pho5-pho3::ura3 Δ 1 ura3 Δ 5), YMR44(α his 11, 3-15 leu2-3, 2-112 can^R pho5-pho3::ura3 Δ 1 ura3 Δ 5 pho11::URA3), YMR46(α his11, 3-15 leu2-3, 2-112 can^R pho5-pho3::ura3 Δ 1 ura3 Δ 5 pho10::URA3). Они были любезно предоставлены профессором Хинненом (Prof. A. Hinnen. Hans-Knoll-Institut fur Naturstoff-Forschung, Jena, Germany). Культуры дрожжей поддерживали на твердой YPD-среде. Выращивание клеток в жидкой среде проводили по приведенной ранее методике [2]. Трансформацию клеток дрожжей плазмидами pDP34-gapfl-РНО5, pDP34-gapfl-РНО10 и pDP34-gapfl-РНО11 проводили по методу [3]. Выделение кислых фосфатаз проводили по схеме, предложенной ранее [4]. Кинетические исследования кислых фосфатаз проводили на приборе, регистри-



Термостабильность гомомерных форм внеклеточных кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: 1 – С-форма репрессибельной кислой фосфатазы; 2 – В-форма репрессибельной кислой фосфатазы; 3 – А-форма репрессибельной кислой фосфатазы. Мерой оценки термостабильности являлось отношение активности ферментного препарата, после 30-минутной инкубации при заданной температуре в 0,1 М Na-цитратном буфере при рН 5,0 (А), к его начальной активности (А₀). В качестве субстрата использовали 4-нитрофенилфосфат

рующем изменение концентрации ортофосфата в пробе. За основу была взята работа [5]. Наши модификации метода касались использования микрокамеры для смешивания реагентов *Reacti-Vials 0.3ml* фирмы (*Pierce, США*). Непрерывную регистрацию изменения оптической плотности образца проводили на спектрофотометре «*Ultraspec 4050*» (*LKB, Швеция*) с выводом результатов на самописец, используя проточную кювету (0,2 мл). Определение активности кислых фосфатаз в отдельной

*Адресат для переписки.

пробе проводили с использованием в качестве субстрата 4-нитрофенилфосфата, по методу [6].

Т а б л и ц а 1

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что при трансформации клеток дрожжей отдельными структурными генами репрессибельной кислой фосфатазы в среде культивирования накапливались гомомерные формы фермента [7]. Фермент, кодируемый генами PHO5, PHO10 и PHO11 мы назвали А-, В- и С-формой внеклеточной кислой фосфатазы соответственно.

Молекулярная масса гомомерных ферментов была определена с помощью прибора «HPLC» на колонке «SUPEROSE 6» (Pharmacia, Швеция) и составляла для А-формы 470 kDa, для В- и С-форм – 370 kDa [7]. Зависимости скорости гидролиза 4-нитрофенилфосфата от рН свидетельствуют, что отдельные субъединицы репрессибельной кислой фосфатазы обладают несколько отличающимися рН-оптимумами (табл. 1). Так, если для А-формы он составляет 5,0, то для В- и С-форм – 5,3–5,5 единиц рН. Сравнительная термостабильность гомомерных форм представлена на рисунке. Видно, что А-форма является более стабильным ферментом, чем В- и С-формы. 50%-я активность А-, В- и С-форм сохранялась при 54, 39, и 36° соответственно. Для определения субстратной специфичности внеклеточных кислых фосфатаз было использовано 10 субстратов (табл. 2). Были применены широко используемые при исследованиях кислых фосфатаз такие субстраты, как 4-нитрофенилфосфат, β-глицерофосфат, глюкозо-6-фосфат, АМФ, ЦМФ. Кроме того, мы использовали пирофосфат, АТФ, ГТФ. Для репрессибельной кислой фосфатазы ранее было показано, что высокоочищенный фермент способен дефосфорилировать не только свободные фосфаты аминокислот, но также фосфорилированные полипептиды и некоторые клеточные белки [8]. Для сравнительного опре-

Константы ионизации, контролирующие каталитическую активность гомомерных форм внеклеточных кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Кислые фосфатазы (формы)	pKa	pKb
А	4,4	5,8
В	5,2	5,8
С	4,8	6,1

Примечание. При определении влияния рН на активность гомомерных форм кислой фосфатазы использовали 4-нитрофенилфосфат в качестве субстрата в 0,1М Na-цитратном буфере со значениями рН в диапазоне от 3,5 до 6,5.

деления протеиндефосфорирующей активности различных внеклеточных кислых фосфатаз мы использовали О-фосфо-DL-тирозин и О-фосфо-DL-серин (*Sigma*, США). Из полученных результатов следует, что в целом, как и принято считать, обе нативные формы ферментов имеют широкую субстратную специфичность, хотя для всех изученных субстратов значения V_m для репрессибельной кислой фосфатазы были практически на порядок выше, чем для конститутивного фермента. Отличия в субстратной специфичности показаны для отдельных субъединиц репрессибельной кислой фосфатазы. Так, для тирозинфосфата фосфатазная активность нативной репрессибельной кислой фосфатазы определяется активностью субъединиц, кодируемых генами PHO10 и PHO11, причем в нативном ферменте усиление данной ферментативной активности обусловлено, по-видимому, межсубъединичным взаимодействием. Таким образом, различия в субстратной специфичности гомомерных форм репрессибельной кислой фосфатазы в сочетании с выявленными

Т а б л и ц а 2

Субстратная специфичность внеклеточных кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Субстраты	K_m (мМ)					V_m (мМ/мин·мг)				
	экспрессируемые гены					экспрессируемые гены				
	PHO5 PHO10 PHO11	PHO3	PHO5	PHO10	PHO11	PHO5 PHO10 PHO11	PHO3	PHO5	PHO10	PHO11
4-НФФ	0,20	0,89	0,35	0,47	0,18	5,12	0,64	1,13	0,86	1,30
Пиро-Ф	0,24	1,89	0,19	0,10	0,09	3,50	0,29	1,25	1,03	1,57
β-Глицеро-Ф	0,36	1,85	0,60	0,76	0/85	7,88	1,92	1,65	1,41	3,14
Глюкозо-6-Ф	0,32	2,20	0,29	0,49	0,97	7,88	1,35	1,61	1,18	4,55
АМФ	0,20	2,08	0,29	3,06	1,51	8,60	0,91	0,96	0,63	0,89
ЦМФ	0,77	1,94	0,91	6,58	4,32	7,67	1,82	3,02	0,86	1,62
АТФ	0,29	0,19	1,29	0,12	0,21	3,18	0,08	0,19	1,25	2,50
ГТФ	0,04	0,03	0,05	1,30	0,01	2,06	0,10	2,71	74,94	0,24
Тирозин-Ф	0,11	0,45	0,18	0,05	0,04	12,46	1,74	0,75	3,82	2,14
Серин-Ф	0,53	4,42	5,10	0,42	0,21	0,58	0,13	0,58	0,12	0,17

Таблица 3

Корреляционная зависимость секреции внеклеточных кислых фосфатаз с процессом почкования клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Штаммы дрожжей	Фосфат в среде	Кислые фосфатазы	Коэффициент корреляции
S288C	+	кКФ	0,72
S288C	–	рКФ	0,21
YMR4 (pDP34–PHO5)	+	А-форма	0,90
YMR44	–	В-форма	0,08
YMR46	–	С-форма	0,16

Примечание. «+» – Среда выращивания, содержащая 10 мМ K_2HPO_4 . «–» – Среда выращивания, лишенная ортофосфата. Коэффициент корреляции рассчитывали с помощью компьютерной программы Statistica v 4.0.

различиями в рН-оптимах и термостабильности, позволяют высказать гипотезу о различной функциональной роли отдельных субъединиц в составе репрессибельной кислой фосфатазы. Высказанное предположение согласуется с результатами по определению взаимосвязи секреции внеклеточных кислых фосфатаз с процессом почкообразования. Было продемонстрировано, что толь-

ко транспорт внеклеточного конститутивного фермента коррелирует с почкованием клетки, т.е. только конститутивная кислая фосфатаза является участником единого транспортного потока, постулированного ранее для внеклеточных белков дрожжей [9]. Секреция нативной репрессибельной кислой фосфатазы никак не могла бы быть связана с почкованием [10]. Этот факт указывает на возможность существования у дрожжей альтернативного транспортного пути для внеклеточных белков. Возможная роль в выборе альтернативного транспортного пути может принадлежать минорным субъединицам репрессибельной кислой фосфатазы, содержание которых во внеклеточном ферменте не превышает 15% [7]. Нами проведено исследование по выяснению зависимости секреции гомомерных форм репрессибельной кислой фосфатазы и процесса почкования клеток [11]. Показано, что А-форма, кодируемая геном PHO5, не имеет сигнала сортировки и так же, как конститутивный фермент, транспортируется в растущую дрожжевую почку в «конститутивном транспортном потоке». В- и С-формы рКФ, кодируемые генами PHO10 и PHO11, экскретируются по альтернативному транспортному пути, т.е. они имеют сигналы сортировки и определяют альтернативный транспортный путь внеклеточной кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (табл. 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Venter U., Horz W. // Nucleic Acids Research. 1989. **17**. P. 1353.
2. Семенова И. Н., Егоров С.Н., Егоров Н.С. // Микробиология. 1986. **55**. С. 796.
3. Keszenman-Pereyra, D., Heida, K. // Agric. Biol. Chem. 1989. **53**. P. 2535.
4. Шнырева М.Г., Цупрун В.Л., Стельмашук В.Я., Егоров С.Н. // Биохимия. 1992. **57**. P. 1100.
5. Baykov A.A., Awaeva S.M. // Anal. Biochem. 1981. **116**. P. 1.
6. Torriani A. // Biochim. Biophys. Acta. 1960. **38**. P. 460.
7. Shnyreva M.G., Petrova, E.V., Egorov, S. N., Hinnen A. // Microbiol. Res. 1996. **151**. P. 291.
8. Lopandic K., Deana, A. D., Barbaric S., Pina L. A. // Biochem. International. 1987. **14**. P. 627.
9. Schekman, R., Novick P. The Molecular Biology of Yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. P. 361.
10. Шнырева М.Г., Егоров С.Н. // Микробиология. 1990. **59**. P. 948.
11. Егоров С.Н., Мирющенко Ф.Л., Максимов В.Н. // Микробиология (в печати).

Поступила в редакцию 20.06.2000