

О. В. Ястребова, Л. П. Панченко, член-кореспондент НАН України
І. Г. Скрипаль

Властивості позаклітинної фруктозо-1,6-бісфосфатази *Bacillus subtilis*

Extracellular fructose bisphosphatase (FBFase) (EC 3.1.3.11) from spore-forming bacterium Bacillus subtilis is obtained. The enzyme is inactivated in the absence of Mg^{2+} or Mn^{2+} . Maximum activity of the enzyme is observed with substrate at the 2mM concentration. AMP inhibits FBFase activity, but the presence of PEP reduces this effect. Heavy metal ions at a concentration of 0.1 mM in the presence of Mg^{2+} are not inhibitors. Effect of Zn^{2+} ions on the enzyme activity is different depending on pH and the presence of Mg^{2+} and EDTA. Monovalent cations are insignificant effectors of extracellular FBFase only at their low concentrations. The subunit size determined by SDS-PAGE analysis was 63 kDa, which was confirmed by gel-filtration (230 kDa).

Фруктозо-1,6-бісфосфатаза (ФБФаза) (КФ 3.1.3.11) є одним із чотирьох головних ферментів глюконеогенезу, що каталізують незворотні реакції в клітині [1]. Дослідженню властивостей внутрішньоклітинних ФБФаз тварин, рослин, мікроорганізмів присвячено багато робіт [2–4]. Встановлено, що ФБФазі, ізольованій із прокаріотичних та еукаріотичних джерел, властива абсолютна залежність від катіонів Mg^{2+} або Mn^{2+} , регуляція активності субстратом, аденозинмонофосфатом (АМФ), фосфоенолпіруватом (ФЕП), моновалентними і дво-валентними катіонами. ФБФаза різниться за молекулярною масою, рН-оптимумом [5–8]. Про наявність і властивості позаклітинної ФБФази відомості майже відсутні. За даними літератури, лише для одного представника класу Mollicutes — *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118, охарактеризовано позаклітинну ФБФазу [9]. Крім того, нами встановлено, що бактерії роду *Bacillus* теж продукують у середовище культивування ФБФазу [10].

Оскільки ФБФаза відіграє важливу роль в регуляції глюконеогенезу в клітині, ми вважали за доцільне вивчити властивості позаклітинної ФБФази, що продукується представниками роду *Bacillus*.

Бактерії *Bacillus subtilis* 668 вирощували періодичним способом на рідких середовищах — мінеральному [6] і Гаузе (г/л: бульйон Хоттінгера — 30,0 мл; пептон — 5,0; NaCl — 5,0; рН середовища 6,0). Дослідні середовища вміщували один із зазначених джерел вуглецю (1% до об'єму) гліцерин, галактозу, мальтозу, глюкозу. Культуральну рідину звільняли від клітин за допомогою центрифугування при 8000 g протягом 10 хв і використовували для одержання позаклітинної ФБФази. Очищення позаклітинної ФБФази проводили як описано в роботі [10].

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [11].

Активність ФБФази обчислювали при рН 8,6 і 30 °С за швидкістю накопичення неорганічного фосфору (Φ_H) [12], який визначали з молібдатним реагентом на мікроколориметрі МКМФ-1 при D_{610} нм. За одиницю активності вважали таку кількість ферменту, що забезпечувала звільнення 1,0 мкМ Φ_H за 1 хв при 30 °С.

Вплив ефекторів на активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 визначали як описано в роботі [9], у діапазоні концентрацій реагентів від 0,1 до 50 мМ у реакційній суміші

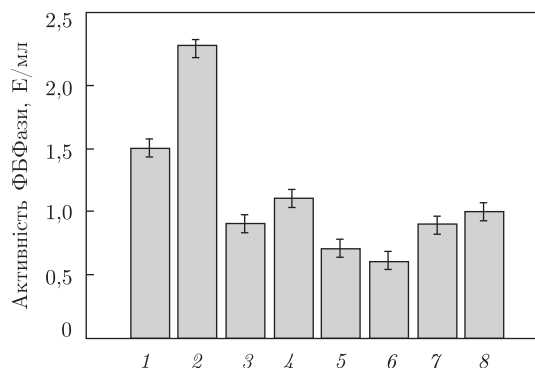


Рис. 1. Накопичення позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 в залежності від джерела вуглецю: 1 – мінеральне середовище + гліцерин; 2 – середовище Гаузе + гліцерин; 3 – мінеральне середовище + глюкоза; 4 – середовище Гаузе + глюкоза; 5 – мінеральне середовище + галактоза; 6 – мінеральне середовище + мальтоза; 7 – середовище Гаузе + мальтоза; 8 – середовище Гаузе + галактоза)

при рН 8,5. За контроль приймали результат реакції без внесення в реагуючу суміш того чи іншого ефектора.

Визначення молекулярної маси позаклітинної ФБФази в нативних умовах здійснювали на колонці з наповнювачем Sephadex G-200 (“Pharmacia”, Швеція). Систему електрофорезу в 10%-му ПААГ з 0,1% DS-Na за методикою Laemmli [13] застосовували для встановлення чистоти та молекулярної маси ферменту.

Як відомо, до зовнішніх факторів, що впливають на біосинтетичну активність бактерій, належать склад живильного середовища, природа і концентрація джерел вуглецю, а також температура культивування.

При дослідженні умов, за яких клітинами *B. subtilis* 668 у середовищі культивування інтенсивно накопичується ФБФаза, були використані мінеральне середовище [6] і середовище Гаузе з різними джерелами вуглецю (галактозою, глюкозою, мальтозою, гліцерином). Встановлено, що найбільш сильним індуктором ферментативної активності є гліцерин, тобто глюконеогенезне джерело (рис. 1). Тому в подальших дослідженнях властивостей позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 використовували лише середовище Гаузе з 1% гліцерину як джерела вуглецю.

Згідно з одержаними даними, активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 збільшувалась паралельно накопиченню біомаси. Максимальне накопичення ферменту відзначено у фазі уповільнення росту культури (21 год росту) (рис. 2).

Температура культивування є досить вагомим фактором при визначенні кількісних параметрів динаміки накопичення ФБФази. Для досліджуваного представника роду *Bacillus* температура 37 °C виявилась оптимальною як для росту, так і для біосинтезу позаклітинної ФБФази. Відхилення температури культивування від оптимального значення негативно впливало на біосинтетичну активність *B. subtilis* 668. Так, за умов вирощування клітин бацили при супраоптимальній температурі (42 °C) рівень активності ізольованого ферменту дещо знижувався. При субоптимальній температурі (30 °C) зниження активності ферменту відбувалося більшою мірою.

Інтенсивне вивчення клітинних ФБФаз автотрофних і гетеротрофних організмів показало, що проявлення каталітичних властивостей цього ферменту в реакції гідролізу фруктозо-1,6-дифосфату (ФДФ) відбувається при оптимальному значенні рН, є індивідуальним для кожного ферменту і не залежить від його походження. На підставі цієї ознаки ФБФази

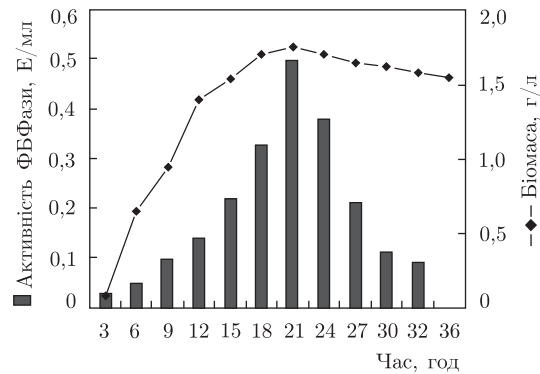


Рис. 2. Біосинтез позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 на середовищі Гаузе з 1% гліцерину

були поділені на три групи: лужні (оптимум рН 9,0), нейтральні (оптимум рН 7,5) і кислі (оптимум рН 6,5) [1].

Найвища активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 відзначена при рН 9,0. За цією ознакою досліджуваний фермент *B. subtilis* 668 було віднесено до групи “лужних” ферментів [1]. За даними літератури, клітинні ФБФази, що продукуються іншими представниками роду *Bacillus*, активні при рН 8,0–8,5 [8], рН для *Escherichia coli* — 7,5–7,8 [4, 15]. Позаклітинна ФБФаза *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 має оптимум при нейтральних значеннях рН (7,3–7,5) [9]. ФБФази тварин, цитозольна ФБФаза рослин в основному є слабколужними, як і клітинні ферменти *Candida utilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pyrococcus furiosus* [1, 5, 7, 15]. Зміна рН у той або інший бік може мати часто несподіваний вплив на ферментативну активність. Так, показано, що клітинна ФБФаза *B. licheniformis* при нейтральному рН (оптимум рН 8,0–8,5) переходила в неактивну форму, тобто відбувалась інактивація ферменту [8]. Іншими дослідженнями було показано, що рН-оптимум залежить від буфера та наявності в реакційних сумішах іонів металів [14]. У більшості випадків, описаних у літературі, криві залежності ферментативних активностей від рН дуже схожі на криві титрування і тільки для окремих ферментів, у тому числі і для позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668, вони мають дзвоноподібні профілі, що є наслідком іонізації окремих груп в молекулах ферментів під час зміни рН у системі *in vitro* [9].

При дослідженні стабільності ферменту в залежності від рН середовища ми встановили, що активність ферменту практично не змінюється протягом 3 год при оптимальних значеннях рН (9,0). Більш ніж 40% активності зберігається при нейтральних значеннях рН протягом 1 год.

Дослідження термостабільності позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 показали, що в інтервалі значень температур 45–50 °С активність позаклітинної ФБФази найвища. При 45 °С фермент стабільний протягом 1 год, а через 2 год втрачає майже 50% від максимальної активності. При –4 °С фермент не втрачає активності протягом 30 діб.

При визначенні субстратної специфічності встановлено, що фермент гідролізує ФДФ і його максимальна активність спостерігається, коли концентрація субстрату становить 2 мМ. За концентрації ФДФ 20 мМ відбувається інгібування активності досліджуваного ферменту. Зазначимо, що інгібування субстратом для клітинної ФБФази еукаріотів становить 10^{-5} – 10^{-6} М, для представників роду *Candida* — 10^{-4} М, для *Escherichia coli* — 10^{-3} М [1, 4, 14]. Проте, за даними літератури, інгібування субстратом може не спостерігатися [9].

За умов впливу двовалентних катіонів Mn^{2+} або Mg^{2+} на активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 більш значними активаторами ферментативної активності виявились катіони Mg^{2+} . Наявність Mg^{2+} в реакційній суміші в діапазоні концентрацій від 2,0 до 20,0 мМ підвищувала активність досліджуваного ферменту на 40% порівняно з контролем. Проте при концентрації катіонів Mg^{2+} 40,0 мМ активність ФБФази *B. subtilis* 668 пригнічувалась. При концентрації Mn^{2+} 5,0 мМ активність ферменту підвищувалась лише на 15% порівняно з контролем, а при концентрації 10,0 мМ — знижувалась. Зменшення спорідненості до катіонів Mn^{2+} або Mg^{2+} спостерігали за наявності в реагуючих сумішах АМФ.

Не впливала на активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 наявність у реакційній суміші катіонів Ca^{2+} в діапазоні концентрацій 2,0–20,0 мМ.

Випробування катіонів важких металів як ефекторів позаклітинного ферменту показало, що катіони Fe^{2+} , Cu^{2+} у концентрації 0,01 мМ не були інгібіторами активності ФБФази *B. subtilis* 668 за наявності Mn^{2+} , а за наявності Mg^{2+} зазначені катіони навіть у концентрації 0,05 мМ не виявляли своєї інгібуючої дії. Zn^{2+} залежно від рН та наявності іонів Mg^{2+} або Mn^{2+} по-різному впливав на активність ФБФази.

Г. А. Теjwаnі [1], класифікуючи ефектори для ФБФаз, відносить катіони Mn^{2+} , Mg^{2+} і Zn^{2+} до групи інгібіторів цих ферментів, зауважуючи, що Mn^{2+} і Mg^{2+} проявляють себе такими тільки при високих концентраціях, а Zn^{2+} , навпаки, веде себе як активатор і може з успіхом замінити катіони перших двох у складі реагуючих сумішей. Проте, як встановили інші дослідники, катіони цинку не замінюють магній і не активують клітинну ФБФазу *Escherichia coli* [14], *Pyrococcus furiosus* [7].

Інгібуюча дія катіонів може бути зумовлена декількома причинами. Відомо, що катіони здатні конкурувати із субстратом за місця зв'язування в активному центрі. Водночас вони можуть взаємодіяти з різними групами білкової молекули, які знаходяться поза активним центром, але впливають на каталітичні функції ферменту, тобто зв'язуватись з алостеричним центром ферменту [2]. Що із співавт. [3] вважають, що ФБФаза еукаріот для досягнення максимальної активності *in vivo* відбирає із великої кількості катіонів металів (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} і Li^{+}) окремі катіони при їх фізіологічній концентрації і комбінує їх разом з продуктами або субстратом.

Дослідження залежності активності позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 від концентрації моновалентних катіонів Na^{+} , K^{+} , Tl^{+} , NH_4^{+} , Li^{+} показало, що всі вони, за винятком Li^{+} , проявляють себе як активатори (рис. 3; табл. 1). Так, Tl^{+} у концентрації 0,1 мМ на 10% підвищував ферментативну активність ФБФази *B. subtilis* 668, K^{+} — на 12% при концентрації катіонів 1 мМ, а при подальшому збільшенні вмісту K^{+} у реагуючій суміші його дія як активатора помітно зменшувалась. Найбільше зростання активності ФБФази *B. subtilis* 668 (до 20%) спостерігали під впливом NH_4^{+} у концентрації 0,02 мМ (див. рис. 3, а).

Інгібітором активності досліджуваного нами ферменту виявився Li^{+} . При його концентрації 1,0 мМ у реагуючій суміші активність ферменту зменшувалась на 4%, а при концентрації 5,0 мМ — на 10%.

Іншими дослідженнями встановлено, що катіони одновалентних металів не обов'язкові складові реагуючих сумішей, як це вимагається відносно двовалентних катіонів, проте підкреслюється помітна роль у регулюванні *in vivo* активності ФБФаз — вони також необхідні ферменту для досягнення максимальної активності [1, 9].

За нашими даними, АМФ є інгібітором позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668. Вже при концентрації АМФ 0,2 мМ каталітична активність ферменту зменшувалась майже на 50%. Внесення ж у реакційну суміш ФЕП у тих же кількісних співвідношеннях “знімало” ін-

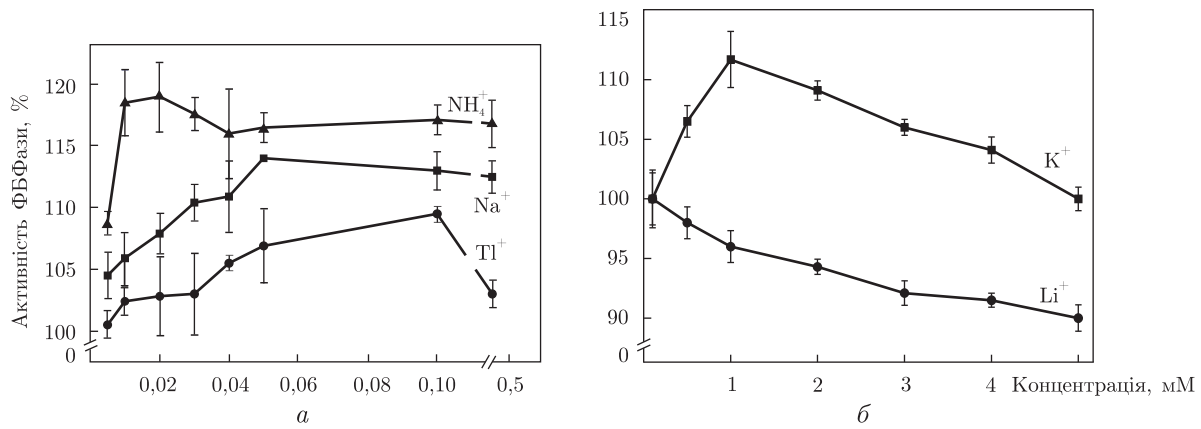


Рис. 3. Вплив катіонів одновалентних металів на активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668: а — Na^+ , Tl^+ і NH_4^+ ; б — K^+ і Li^+

гібуючу дію АМФ. Подібне явище спостерігали Опхейм зі співавт. [8] відносно клітинної ФБФази *B. licheniformis*. Як показали наші дослідження, катіони магнію в концентрації 5–7 мМ знижували чутливість позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 до АМФ.

Незалежно від концентрації катіонів Mg^{2+} для підтримки активності позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 потрібні хелатуючі агенти, такі як імідазол, цитрат (див. табл. 1). Гістидин і цитрат (у концентрації 1–2,5 мМ) активували позаклітинну ФБФазу *B. subtilis* 668 на 4–8%, при цьому оптимум рН не змінювався. Але цитрат у концентрації 50 мМ активував фермент майже на 30%. ЕДТА виявляв інгібуючий вплив на активність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 (див. табл. 1). Так, у концентрації 0,1 мМ ЕДТА інгібував позаклітинну ФБФазу на 44%, а в концентрації 1 мМ — на 28%.

Згідно з даними літератури, фруктозобісфосфатаза мікроорганізмів може складатись з 2–6 субодиниць [5, 6, 14, 15]. Отримані нами результати дозволяють стверджувати, що позаклітинна ФБФаза *B. subtilis* 668 має молекулярну масу 230 000 Да і містить чотири рівноцінні субодиниці. Порівнюючи отримані результати з даними літератури, зазначимо, що за молекулярною масою і субодиничною структурою позаклітинна ФБФаза *B. subtilis* 668 від-

Таблиця 1. Вплив деяких речовин на ФБФазну активність *B. subtilis* 668

Ефектор	Оптимальна концентрація ефектора, мМ	Залишкова активність ФБФази, %
Контроль		100
Mg^{2+}	5,0	142 ± 3,9
Mn^{2+}	0,1	106 ± 3,3
K^+	1,0	113 ± 3,5
Li^+	5,0	91 ± 2,9
Ag^+	50,0	375 ± 11,7
NH_4^+	0,01	120 ± 3,7
Na^+	0,05	115 ± 3,6
Tl^+	0,05	108 ± 3,4
ЕДТА	1,0	72 ± 2,3
Імідазол	1,0	106 ± 3,3
Цитрат	1,0	105 ± 3,3
Гістидин	1,0	104 ± 3,3

різняється від клітинної ФБФази цього ж мікроорганізму іншого штаму [6]. Фуїта і Фриз [6] виявили, що клітинний фермент асиметричний, має молекулярну масу 380000 Да. У доступній нам літературі не має пояснення, чому головний фермент глюконеогенезу виділяється мікроорганізмом у культуральну рідину.

Таким чином, знання властивостей одного з головних ферментів глюконеогенезу — позаклітинної ФБФази, дозволить її ефективно використати в наукових і прикладних роботах. Проведення зазначених досліджень розширює уявлення про складні метаболічні шляхи, які є основою життєзабезпечення і регуляції функцій мікробного організму, що надзвичайно важливо для активного втручання і керування біологічними процесами.

1. *Tejwani G. A.* Regulation of fructose-bisphosphatase activity // *Adv. Enzymol.* – 1983. – **54**. – P. 121–194.
2. *Nelson S. W., Honzatko R. B., Fromm H. J. et al.* Hybrid tetramers of porcine liver fructose – 1,6-bisphosphatase reveal multiple pathways of allosteric inhibition // *Biol. Chem.* – 2002. – **277**, No 18. – P. 15539–15545.
3. *Choe J.-Y., Fromm H. J., Honzatko R. B.* Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes // *Biochemistry.* – 2000. – **39**, No 29. – P. 8565–8574.
4. *Kelley-Loughnane N., Biolsi S. A., Gibson R. M. et al.* Purification, kinetic studies, and homology model of *Escherichia coli* fructose – 1,6-bisphosphatase // *Biochim. et biophys. acta.* – 2002. – **1594**, No 1. – P. 6–16.
5. *Rittmann D., Schaffer S., Wendish V.F. et al.* Fructose – 1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme // *Arch. Mikrobiol.* – 2003. – **180**, No 4. – P. 285–292.
6. *Fujita Y., Freese E.* Purification and properties of fructose 1,6-bisphosphatase of *Bacillus subtilis* // *J. Biol. Chem.* – 1979. – **254**, No 12. – P. 5340–5349.
7. *Verhees C.H., Akerboom J., Schiltz E. et al.* Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose – 1,6-bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus* // *J. Bacteriol.* – 2002. – **184**, No 12. – P. 3401–3405.
8. *Opheim D. J., Bernlohr R. W.* Purification and regulation of fructose – 1,6-bisphosphatase from *Bacillus licheniformis* // *J. Biol. Chem.* – 1975. – **250**, No 7. – P. 3024–3033.
9. *Скрипаль І. Г., Малиновська Л. П., Токовенко І. П.* Вплив окремих ефекторів на активність позаклітинної фруктозобісфосфатази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 // *Мікробіол. журн.* – 2005. – **67**, № 2. – С. 46–54.
10. *Панченко Л. П., Ястребова О. В., Скрипаль І. Г.* Позаклітинна фруктозобісфосфатаза *Bacillus subtilis*: виділення та очищення // *Доп. НАН України.* – 2006. – № 6. – С. 171–174.
11. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **71**, No 2. – P. 248–254.
12. *Fiske C. H., Subbarow Y.* The colorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* – 1925. – **66**, No 2. – P. 375–400.
13. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, No 5259. – P. 620–685.
14. *Fraenkel D. J., Pontremoli J., Horecker B. L.* The specific fructose disphosphatase of *Escherichia coli*: properties and partial purification // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1966. – **114**, No 2. – P. 4–12.
15. *Rosen O. M., Rosen S. M., Horecker B. L.* Purification and properties of a specific fructose 1,6-diphosphatase from *Candida utilis* // *Ibid.* – 1965. – **112**, No 10. – P. 411–420.

*Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 13.08.2007