

УДК 579.852.11.017.73:577.152.34

БИОСИНТЕЗ СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS* В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

© 2006 г. А. Р. Каюмов*,¹, Н. П. Балабан*, А. М. Марданова*, С. В. Костров**, М. Р. Шарипова*

*Казанский государственный университет

**Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Поступила в редакцию 31.10.2005 г.

Установлено, что биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* повышается в условиях солевого стресса при росте на среде, содержащей 1 М хлорид натрия или 0.25 М цитрат натрия. В рекомбинантном штамме *B. subtilis*, дефектном по регуляторным белкам DegS и DegU, контролирующим биосинтез ферментов деградации, экспрессия гена протеиназы подавлялась. В штамме *B. subtilis degU32(Hy)*, который обеспечивает гиперсинтез продуктов генов, позитивно регулируемых системой DegS-DegU, уровень биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* возрастал в 6–10 раз. Полученные результаты свидетельствуют об участии системы DegS-DegU в позитивной регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* в рекомбинантных штаммах *B. subtilis*.

Ключевые слова: *Bacilli*, субтилизиноподобная сериновая протеиназа, рекомбинантный штамм, солевой стресс, двухкомпонентная система.

В естественных условиях бактерии постоянно подвергаются воздействию различных стрессовых факторов, таких как тепловой, холодовой или солевой шок, недостаток питательных веществ и микроэлементов. Поэтому у микроорганизмов выработались механизмы адаптации к стрессовым воздействиям. В основе формирования бактериями адаптивных ответов лежит механизм сигнальной трансдукции, а именно, двухкомпонентная система регуляции экспрессии генов, включающая сенсорный белок, гистидинкиназу, и регуляторный белок, фосфорилированная форма которого активирует транскрипцию специфических генов [1]. При истощении питательных веществ в среде могут активироваться различные двухкомпонентные системы трансдукции сигнала. Регуляторная система PhoP-PhoR отвечает на недостаток неорганического фосфата в среде образованием ферментов фосфорного обмена [2]. Регуляторная пара DegS-DegU контролирует синтез ферментов деградации и связана с системой ComP-ComA, ответственной за достижение состояния компетентности [3, 4]. Результатом активации этих регуляторных механизмов является синтез и секреция в среду различных внеклеточных гидролаз, антибиотиков и пептидов. Установлено, что на образование ферментов деградации у

Bacillus subtilis существенный эффект оказывает такой фактор как соленость среды. Солевой стресс в 9 раз стимулирует образование внеклеточной левансахаразы *B. subtilis* [5]. Охарактеризован ген *WapA*, кодирующий белок, связанный с клеточной стенкой, который синтезируется бактериями при выращивании на среде с низким содержанием солей. В присутствии 0.7 М сукцината натрия биосинтез *WapA* белка наоборот подавляется, причем установлено, что за подавление экспрессии соответствующего гена отвечает фосфорилированная форма белка регулятора DegU [6].

Бактерии *Bacillus intermedius* секретируют в среду различные протеиназы, среди которых доминирует субтилизиноподобная сериновая протеиназа, кодируемая геном *aprBi* (более 80% от пула внеклеточных протеиназ) [7]. Фермент появляется в среде в фазе замедления роста. Максимальное накопление фермента в культуральной жидкости происходит в поздней стационарной фазе и соответствует стадии созревания эндоспор и освобождения их в среду [7]. Белок был выделен из культуральной жидкости по прошествии 24 и 48 ч выращивания *B. intermedius* и очищен; изучены основные свойства обеих белковых фракций, N-концевые последовательности которых оказались идентичными [8, 9]. Ген протеиназы клонирован и установлена последовательность нуклео-

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: airat_kayumov@rambler.ru).