



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 547.96

БЕЛКИ МЕМБРАН И СИСТЕМЫ ПАССИВНОГО ТРАНСПОРТА
НЕЭЛЕКТРОЛИТОВ

II. СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Антонов В. К., Александров С. Л.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР*

Дан обзор литературы по идентификации, методам выделения и свойствам связывающих белков микроорганизмов. Обсуждается роль этих белков в транспорте метаболитов. Связывающие белки, по-видимому, выполняют рецепторные функции в системах транспорта моносахаридов, аминокислот, некоторых ионов и других метаболитов.

Постоянство внутриклеточной среды у микроорганизмов обеспечивается работой целого ряда транспортных систем, переносящих различные метаболиты через клеточную мембрану. Транспортная система является, как правило, весьма сложной биохимической машиной, осуществляющей, по крайней мере, три функции: а) специфическое узнавание и рецепцию метаболита, б) транслокацию (перенос) его через мембрану, в) диссоциацию метаболита во внутриклеточную среду (рис. 1). В случае активного транспорта, очевидно, также должен существовать механизм, сопрягающий транспортные функции с системой генерации энергии.

Каждая из перечисленных стадий транспорта может нуждаться в особом компоненте системы, однако не исключено, что все стадии выполняются одним и тем же компонентом, способным изменять свои свойства от стадии к стадии.

Успехи, достигнутые за последние годы во фракционировании составляющих клеточных мембран, позволяют довольно определенно связать первую стадию транспорта, рецепцию, со специфическими белками, обнаруженными в бактериальных клетках. Это так называемые связывающие белки (*Binding proteins*), которые иногда называют еще и транспортными белками или трансферами (см. обзоры [1—9]).

I. Связывающие белки, их локализация в клетке
и способы выделения

В настоящее время в достаточно чистом состоянии выделено уже около 30 связывающих белков, причем ряд из них удалось получить в кристаллическом виде (табл. 1). Сюда относятся белки, связывающие некоторые моносахариды и гликозиды, аминокислоты, неорганические ионы и т. п. Единственная до сих пор обнаруженная функция этих белков заключает-

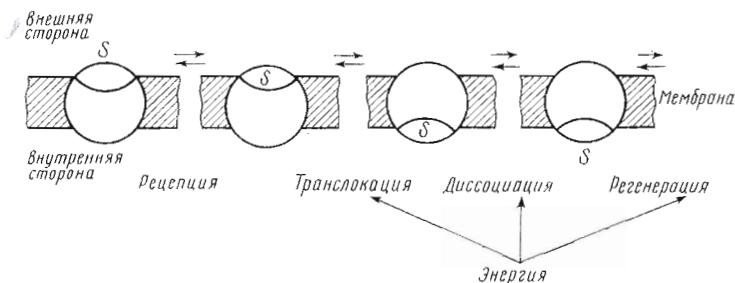


Рис. 1. Схема транспорта метаболита (S) с участием переносчика

ся в способности связывать соответствующие субстраты. Особое место занимают белки, входящие в так называемую фосфоенолпируватзависимую систему переноса моносахаридов, а также металлзависимые АТР-азы. Эти белки обладают каталитическими функциями и здесь рассматриваться не будут (см. обзоры [2, 10]).

По своей локализации в клетке связывающие белки можно разделить на две группы. Белки первой группы локализованы, по-видимому, в периплазматическом пространстве и легко могут быть переведены в раствор холодным осмотическим шоком [11, 12]. Именно эти белки в настоящее время исследованы наиболее полно. Осмотический шок проводится обычно следующим образом: промытые Трис-буферным раствором клетки суспендируют при комнатной температуре в 40—80 объемах раствора сахарозы (20% по весу), содержащего EDTA и Трис-буфер (рН 7,3), размешивают 10 мин и отделяют. Затем нагруженные сахарозой клетки быстро суспендируют в 80 объемах холодной воды с добавкой $MgCl_2$. Клетки размешивают 10 мин, отделяют и получают супернатант — так называемую шоковую жидкость, содержащую связывающие белки.

Подвергнутые шоку клетки не теряют жизнеспособности и после более или менее длительного лаг-периода могут размножаться, будучи помещены на питательную среду [13]. При соблюдении необходимых предосторожностей лишь незначительная часть (~4%) клеточных белков и некоторая часть нуклеотидов переходит в «шоковую» жидкость. Как правило, подвергнутые шоку клетки снижают свои транспортные функции, однако степень этого снижения различна для разных транспортных систем (подробнее см. ниже).

Белки второй группы весьма прочно ассоциированы с клеточной мембраной. Лишь немногие из них получены в чистом виде. Классическим примером белков этой группы является М-белок системы транспорта β -галактозидов кишечной палочки [14]. М-белок впервые был выделен [15] в неактивном состоянии методом двойной радиоактивной метки. Этот метод заключается в том, что клетки, содержащие связывающий белок, обрабатывают каким-либо ^{14}C -меченым реагентом (например, $[^{14}C]$ -N-метилмалеинимидом) в присутствии обратимого ингибитора транспорта, а затем тем же реагентом, содержащим тритиевую метку, но в отсутствие ингибитора. Таким образом, связывающий белок метится преимущественно тритиевой меткой, а все остальные — ^{14}C и 3H поровну. Белки из обоих опытов затем фракционируют и собирают фракцию с максимальным отношением $^3H : ^{14}C$. Другой способ выделения М-белка заключается в обработке мембранной фракции неионными (третон X-100) или ионными (додецилсульфат) детергентами [16].

Кроме М-белка прочно ассоциированы с мембраной, по-видимому, белки системы транспорта глицина и пролина [17, 18], фенилаланинсвязывающий белок из дрожжей [19], а также некоторые другие белки [20, 21]. Недавно [22] из мембранных пузырьков штамма *E. coli*, дефектного по галактозосвязывающему белку [23], удалось выделить и частично очистить

Связывающие белки микроорганизмов

№ п. и.	Микроорганизм	Субстрат	Название белка	K_D , М	Мол. вес	Степень очистки	Литература
1	<i>E. coli</i> К 12 и др.	β -Галактозиды, лактоза	М-белок	$7 \cdot 10^{-5}$	31 000	Гомоген.	15, 16
2	<i>E. coli</i> К 12	D-Галактоза	Gal-связывающий белок (Gal-SB)	$1 \cdot 10^{-6}$	35 000	Кристал.	25, 84
3	<i>E. coli</i> (транспорт-нетип. мутант)	»	Дефектный Gal-SB	$1 \cdot 10^{-4}$	35 000	Гомоген.	85
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	»	Дрожжевой Gal-SB	$6 \cdot 10^{-4}$	—	Частич. очищен	99
5	<i>E. coli</i> К 12, В/г	L-Арабиноза, D-фукоза, D-ксилоза	Ara-связывающий белок (Ara-SB)	$2 \cdot 10^{-6}$	38 000	Кристал.	100-102
6	<i>Salmonella typhimurium</i>	D-Рибоза	Rib-связывающий белок (Rib-SB)	$3,3 \cdot 10^{-7}$	31 000	»	103
7	<i>E. coli</i> E 15	Глюкозо-6-фосфат	Glc-6-P-белок	—	—	Не очищен	104
8	<i>Agrobacterium tumefac.</i>	Глюкозо-1-фосфат	Glc-1-P-белок I Glc-1-P-белок II	$8 \cdot 10^{-7}$ $1,3 \cdot 10^{-6}$	35 000 42 000	Гомоген. »	45 45
9	<i>E. coli</i> К 12	L-Лейцин, L-изолейцин, L-валин	LIV-белок	$2 \cdot 10^{-7}$	34 000	Кристал.	33, 36, 25 105, 106
10	<i>E. coli</i>	L-Лейцин	Leu-специфичный белок (L-белок)	$7 \cdot 10^{-7}$	37 000	»	106, 107
11	»	L-Изолейцин	Ile-связывающий белок (I-белок)	—	—	Очищен	108
12	<i>Salmonella typhimurium</i>	L-Гистидин	His-связывающий белок (J-белок)	$2 \cdot 10^{-7}$	25 000	Гомоген.	34, 109
13	»	»	His-связывающий белок (связывает S-содержащие аминокислоты)	$4,5 \cdot 10^{-6}$	25 000	»	20

Таблица 1 (продолжение)

№ п. п.	Микроорганизм	Субстрат	Название белка	К _D · М	Мол. вес	Степень очистки	Литература
14	<i>E. coli</i> W	L-Аргинин, L-лизин, L-орнитин	Al-белок	$1,5 \cdot 10^{-6}$	30 000	Гомоген.	24
15	<i>E. coli</i>	L-Аргинин	Arg-связывающий белок (Arg-СБ)	$3 \cdot 10^{-8}$	27 700	»	24, 110, 111
16	<i>Neurospora crassa</i>	»	Arg-связывающий глико- протеин (Arg-СГП) (фракция В)	—	~50 000	Частич. очищен	44
17	<i>E. coli</i>	L-Глутамин	Gln-связывающий белок (Gln-СБ)	$4,5 \cdot 10^{-7}$	29 000	Гомоген.	24, 112
18	<i>E. coli</i> К 12	L-Глутаминовая ки- слота	Gln-связывающий белок (Gln-СБ)	$6,7 \cdot 10^{-6}$	—	»	46, 113
19	<i>E. coli</i> W	L-Цистин	Cys-связывающий белок (Cys-СБ)	$1 \cdot 10^{-8}$	28 000	»	24, 43
20	<i>Comamonas</i> sp.	Диаминопимелино- вая кислота L-Фенилаланин	Phe-связывающий белок (Phe-СБ)	$2 \cdot 10^{-7}$	24 000	Гомоген.	42
21	<i>Saccharomyces cerevi- siae</i>	»	Дрожжевой Phe-СБ	—	—	Частич. очищен	19
22	<i>Neurospora crassa</i>	L-Триптофан	Trp-связывающий белок (Trp-СБ)	$8 \cdot 10^{-5}$	>200 000	»	114
23	<i>E. coli</i> W	Тиамин	Тиаминсвязывающий бе- лок (тиамин-СБ)	$2 \cdot 10^{-8}$	36 000	Гомоген.	87, 115

Таблица 1 (окончание)

№ п. п.	Микроорганизм	Субстрат	Название белка	К _D , М	Мол. вес	Степень очистки	Литература
24	<i>E. coli</i> В	Витамин В ₁₂	В ₁₂ -связ. белок (В ₁₂ -СБ) I В ₁₂ -СБ II	0,5·10 ⁻⁸ —	22 000 200 000	Очищен Частич. очищен	116, 117 116, 117
25	<i>E. coli</i>	Янтарная кислота	Суc-связывающий белок (Суc-СБ)	—	—	»	118
26	»	Фосфат	Фосфатсвязывающий белок (P _r -СБ)	8·10 ⁻⁷	42 000	Очищен	68
27	»	Магний	Магнийсвязывающий белок (Mg-СБ)	3·10 ⁻⁶ (?)	—	Не очищен	102
28	<i>Salmonella typhimurium</i>	Сульфат	Сульфатсвязывающий белок (S-СБ)	2·10 ⁻⁵	32 000	Кристал.	77
29	<i>E. coli</i> W 3092	D-Рибоза	Риб-связывающий белок (Rib-СБ)	1,7·10 ⁻⁷	29 500	Гомоген.	119
30	<i>Aspergillus nidulans</i>	D-Глюкоза	Glс-связывающий белок	5,26·10 ⁻⁴	29 200	»	120
31	<i>E. coli</i> W 3092	L-Аспарат, L-глютамат	Glу, Asp-связывающий белок (GA-белок)	1·10 ⁻⁶	31 000	»	52
32	<i>E. coli</i>	Мальтоза	Mal-связывающий белок (Mal-СБ)	1,2·10 ⁻⁶	—	»	37
33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Σ 1278 b	L-Аргинин, L-лизин	Arg-связывающий белок (AL-белок)	4·10 ⁻⁴	5000	—	38
34	<i>Lactobacillus casei</i>	Фолат	Фолатсвязывающий белок	3,6·10 ⁻⁸	230 000	Гомоген.	121

Схема очистки LIV-белка из *E. coli* [25]

Стадия	Объем, мл	Белок, мг/кг	Связывающая активность %, ед/мл	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Концентрированная «шоковая» жидкость	400	6,0	3,5	0,58	100
Обработка протаминсульфатом	420	5,6	3,10	0,56	93
Осаждение сульфатом аммония	52	32,0	23,5	0,75	87
Хроматография на DEAE-целлюлозе	10,8	41,0	99,0	2,40	75
Хроматография на гидроксил-апатитцеллюлозе	7,9	41,4	122	10,7	68
Хроматография на DEAE-сефадексе	6,1	10,0	155	15,5	66

* Единица активности соответствует 1 нмоль связывающего белка (при условии связывания 1:1).

низкомолекулярный белок, связывающий пролин, глицин и ряд других аминокислот.

Переведенный в раствор белок очищают далее обычными методами белковой химии. Чаще всего используют хроматографию на ионообменниках, особенно на DEAE-целлюлозе. Некоторые из связывающих белков такими смолами, однако, не сорбируются [24]. В качестве примера в табл. 2 дана схема очистки LIV-белка [25]. Кроме этих обычных методов весьма перспективна также аффинная хроматография [26]. Этот метод был успешно использован для очистки тиаминасвязывающего белка [27].

II. Комплексообразование связывающими белками

Было предложено несколько методов для тестирования связывающей активности белков. Наиболее распространен метод равновесного диализа (см., например, [28]), применимый в тех случаях, когда константа диссоциации комплекса белка с метаболитом достаточно низка (меньше $1 \cdot 10^{-6}$ М).

Для заряженных субстратов, особенно ионов, удачным является использование ионообменных смол [29]. Введение связывающегося иона в систему, содержащую ионообменник и белок, сдвигает равновесие между ними, и часть белка переходит в раствор. Повышение концентрации белка в растворе пропорционально связывающей активности по отношению к введенному субстрату. Для определения связывающей активности можно также использовать хроматографию на сефадексах [30]. В тех случаях, когда образование комплекса приводит к изменению физико-химических параметров белка, это изменение может служить мерой связывающей активности (см., например, [31, 32]).

Большинство связывающих белков обладает высокой связывающей способностью. Константы диссоциации (K_D) их комплексов с субстратами составляют обычно от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ М (см. табл. 1). Специфичность связывания у них весьма узкая. Обычно они специфичны или к одному субстрату, или к группе сходных по строению веществ (см. ниже).

Для некоторых связывающих белков было установлено [25, 33, 34] наличие в молекуле одного центра, связывающего субстрат, и независимость констант связывания от концентраций белка и субстрата. Однако для галактозосвязывающего белка было затем найдено [31, 35], что константа диссоциации комплекса зависит от концентрации субстрата, увеличиваясь примерно на два порядка при переходе от низких ($\sim 10^{-8}$ М) к вы-

Влияние внешних условий на связывание субстратов различными белками

Добавки или воздействия	Связывание, % к контролю		
	LIV-белок [25]	Gal-СБ [25]	Phe-СБ [42]
CaCl ₂ (5 мМ)	70	100	
CoCl ₂ (5 мМ)	95	109	
CuSO ₄ (5 мМ)	104	107	
NaN ₃ (30 мМ)	80	80	
EDTA (4 мМ)	81	103	
NaCl (1 мМ)	200	100 (0,2 М) ***	155
Мочевина (3 мМ)	70	1 (0,5 М)	64
Сахароза (10%)	156	7	
Этанол (30%)	174	103	
0,1 н. HCl, 2 ч, 22° *	100	84 (0,01 н.)	77
0,1 н. NaOH, 2 ч, 22° *	14	15 (0,01 н.)	94
Температура **			
100°, 10 мин	77	56 (3 мин)	13
80°, 10 мин	85	91 (3 мин)	17
60°, 10 мин	96	95 (3 мин)	27

* С последующей нейтрализацией.

** С последующим быстрым охлаждением в ледяной бане.

*** В скобках указаны условия, отличные от приведенных в 1-й графе.

соким ($\sim 10^{-5}$ М) концентрациям галактозы. Этот белок имеет два связывающих центра на молекулу и представляет собой, по мнению авторов [31], смесь двух конформеров. Подробное исследование связывающей активности неспецифического лейцинсвязывающего белка (LIV-белка) [36] показало, что как константа диссоциации комплекса, так и кажущееся число связывающих субстрат центров зависит от концентрации и белка, и субстрата. Предполагается, что такое поведение LIV-белка обусловлено его склонностью к ассоциации, причем образование олигомеров маскирует часть связывающих участков. Возможно, что сходные причины обуславливают аномальную зависимость связывающей активности от концентрации белка в случае мальтозосвязывающего [37] и дрожжевого аргининсвязывающего [38] белков. Аномалии в зависимости связывания субстрата от концентрации последнего были обнаружены в случае фенилаланинсвязывающего белка из дрожжей [19].

Ришарм и Кепес [39] недавно привели ряд аргументов в пользу того, что наблюдаемые для галактозосвязывающего белка отклонения от гиперболической зависимости связывающей активности от концентрации субстрата объясняются механизмом обменного процесса между прочно связанной с белком глюкозой (так называемый запертый (hidden) лиганд) и вводимой в систему радиоактивной галактозой. Однако исследования скорости диссоциации глюкозы из ее комплекса с галактозосвязывающим белком показали [40], что этот процесс весьма быстрый ($\tau_{1/2} \sim 5$ с), что противоречит представлению о «запертом» субстрате.

Исключительный интерес представляет вопрос о механизме связывания рассматриваемыми белками субстратов. Хотя в настоящее время отсутствуют какие-либо экспериментальные данные по этому вопросу, можно полагать, что значительная специфичность связывания должна быть обусловлена уникальной геометрией связывающего участка. В случае белков, связывающих ионы, механизм комплексообразования может быть аналогичен тому, который был установлен [41] для низкомолекулярных ионофоров типа валиномицина. Связывание аминокислот, по-видимому, происходит за счет как электростатических взаимодействий амфотерного субстрата с соответствующими заряженными группами белка

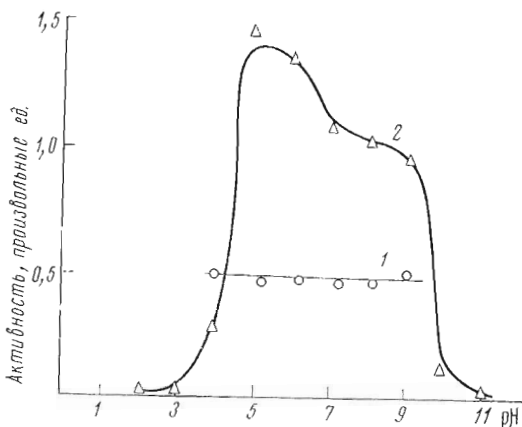


Рис. 2. pH-Зависимость связывания лейцина LIV-белком [33] (1) и связывания фенилаланина Phe-CB [42] (2).

pH-зависимость связывания была изучена в интервале от 4 до 9, что не перекрывает значений pK_a карбоксильной и аминогруппы лейцина (2,36 и 9,60). Что касается фенилаланинсвязывающего белка, то для него было обнаружено резкое падение связывающей способности при pH ниже 5 и выше 9 (рис. 2) [42]. Широкий оптимум pH был обнаружен у цистинсвязывающего [43] и глутаминсвязывающего белков [47], тогда как белок I из *Agrobacter tumefaciens*, связывающий глюкозо-1-фосфат, имеет резкий оптимум pH при 8,0—8,4 [45].

Как уже отмечалось, связывающие белки проявляют весьма большую избирательность к структуре субстратов. Наряду с существованием белков, специфичных к одному субстрату, как, например, лейцин-специфичный белок (L-белок), есть белки, связывающие ряд структурно-подобных субстратов: лейцин, валин, изолейцин (LIV-белок) или аргинин и лизин (AL-белок). Модификация функциональных групп субстрата, как правило, приводит к резкому снижению способности связываться с соответствующим белком, однако наблюдаются и исключения. Так, например, эфиры L-глутаминовой кислоты являются эффективными ингибиторами связывания глутамата соответствующим белком [46]. Ряд примеров влияния структурных изменений субстрата на связывание с LIV- и L-белками приведен в табл. 4.

Таблица 4

Связывание LIV- и L-белками аналогов субстратов [106] (% к контролю)

Аналог	Концентрация аналога, мкМ	LIV	L
—	—	100	100
Изоамиламин	500	110	130
D-Лейцин	500	82	130
DL-1,3-диметилбуттиламин	500	100	130
L-Лейцилглицин	500	84	140
L-Изовалин	500	95	120
L- α -Аминобутират	50	54	
L-Норвалин	50	59	
L-Норлейцин	500	99	120
L-Алдоизолейцин	50	45	
DL-3,3,3-триметил-2-аминопропионат	1000	98	120
DL-Аллотреонин	1000	100	
DL-4-Азалеяцин	1000	140	81
L- α , γ -Диаминобутират	500	76	120

(см., однако, [25]), так и за счет взаимодействия боковой цепи субстрата с неполярным локусом связывающего участка. Этот локус должен, очевидно, геометрически точно соответствовать структуре боковой цепи.

Плодотворным подходом при изучении механизма связывания является выяснение влияния внешних условий (pH среды, ионной силы и т. д.) на связывающую активность. Для некоторых белков такие данные были получены (см. табл. 3). Однако их еще недостаточно для суждения о механизме процесса комплексообразования. В частности, для LIV-белка

В случае сахаров в образовании комплекса, вероятно, участвуют группы белка, способные служить акцепторами в образовании водородных связей с гидроксильными группами сахара. Анализ субстратной специфичности галактозосвязывающего белка [25] позволяет заключить, что для комплексообразования важно наличие свободной 5-оксиметильной группы и свободных $C_{(1)}$ -, $C_{(2)}$ -, $C_{(3)}$ -гидроксильных, причем последние два должны быть в аксиальном положении.

Исследование комплексообразования галактозы и других субстратов галактозосвязывающего белка методами дифференциальной УФ-спектроскопии и флуоресценции [32] позволило заключить, что в связывании субстрата принимает участие один из остатков триптофана.

В настоящее время трудно ответить на вопрос об энергетическом балансе комплексообразования. Константа диссоциации комплекса порядка 10^{-7} М соответствует изменению свободной энергии системы примерно на 10 ккал/моль. Если связывающий центр белка расположен на поверхности белковой глобулы, т. е. доступен молекулам воды, электростатические взаимодействия и водородные связи будут значительно ослаблены и вряд ли смогут обеспечить наблюдаемую эффективность комплексообразования. Вероятно, процесс комплексообразования достаточно сложен и здесь нужны углубленные термодинамические и кинетические исследования.

Первые данные о кинетике комплексообразования глутаминсвязывающего белка были получены [47] методом остановленного потока. Оказалось, что комплекс образуется очень быстро ($k_1 = 9,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) а диссоциирует сравнительно медленно ($k_{-1} = 16 \text{ c}^{-1}$).

Измерения зависимости связывающей активности LIV-белка от температуры [48] показали, что в области 5—50° сохраняется линейность аррениусовского графика. Вычисленные из этого графика термодинамические параметры комплексообразования (ассоциация) оказались следующими: $\Delta F_0 = -8,5$ ккал/моль, $\Delta H_0 = -5,06$ ккал/моль, $\Delta S_0 = +11,3$ э.е. (ΔF_0 и ΔS_0 вычислены для 30°).

Наконец, важную роль в понимании структурных основ комплексообразования могут иметь работы по химической модификации связывающих белков. Отдельные сообщения о такого типа работах уже появились в печати [42, 49—51]. Так, например, в случае глутамат-аспартатсвязывающего белка [52] активность не зависит от состояния SH-групп (—SH или —S—S—) в нем. Активность определялась в присутствии и в отсутствие дитиотрепта. При инкубировании же белка с мочевиной и дитиотрептом одновременно и с последующим удалением последних активность не восстанавливалась, что указывало на маскирование дисульфидных или SH-групп, важных для поддержания активной конформации белка.

III. Структура и конформационные переходы

Аминокислотный состав связывающих белков в тех случаях, когда он определялся, не показывает каких-либо особенностей, отличающих эти белки от обычных глобулярных белков (см. табл. 5).

Последовательность аминокислот ни в одном белке этой группы еще не расшифрована, хотя имеется несколько сообщений о структурных исследованиях сульфатсвязывающего белка [53—55] и LIV-белка [56].

Имеются также сообщения о начальных этапах рентгеноструктурного изучения сульфатсвязывающего [49] и арабинозосвязывающего белков [57]. Оказалось, что эти белки значительно различаются по форме. Если первый является вытянутым эллипсоидом с соотношением полуосей 1 : 4, то второй имеет почти сферическую симметрию.

Большинство выделенных в чистом виде связывающих белков имеют очень близкие молекулярные веса (табл. 1), колеблющиеся от 25 000 до 45 000. Исключениями являются, по-видимому, лишь триптофансвязывающий белок из нейроспоры, молекулярный вес которого превышает 200 000,

Аминокислотный состав транспортных белков

Аминокислота	S-СВ [1]	LIV-белок [1]	Gal-СВ [1]	Phe-СВ [42]	GA-белок [52]	AL-белок [38]
Ala	23	42	42	28	23	4
Asx	30	38	49	18	46	5
Arg	8	7	6	6	9	2
Cys	--	1	--	--	1	--
Glx	21	36	28	16	30	5
Gly	17	33	22	14	16	4
His	4	4	3	--	2	1
Ile	12	18	15	5	11	2
Leu	16	22	24	14	22	3
Lys	19	28	30	20	31	3
Met	1	4	6	3	8	1
Phe	9	10	7	2	13	2
Pro	9	14	9	9	14	2
Ser	13	11	13	11	16	3
Thr	11	16	12	8	14	3
Trp	5	3	4	4	4	--
Tyr	9	12	6	3	4	1
Val	17	23	29	27	10	3

и фолатсвязывающий белок с M 230 000. Исключением с противоположной стороны является дрожжевой аргининсвязывающий белок с M 5000 [38].

Для некоторых белков отмечены значительные различия в величине молекулярного веса, определяемой разными методами. Так, ультрацентрифугирование LIV-белка [33] дает значение M 24 000, а метод гель-фильтрации — 36 000. Для фенилаланинсвязывающего белка из *Comamonas* sp. [42] молекулярный вес, полученный методом гель-фильтрации на сефадексе G-100, равен 5000—6000, добавление субстрата дает в тех же условиях значение 24 000, а седиментация — 27 000.

Для понимания функций связывающих белков важное значение имеет проблема их конформационных переходов. Большинство изученных белков этой группы весьма устойчивы к воздействиям температуры и денатурирующих агентов (см. табл. 3). Действие мочевины на LIV-белок [50] вызывает разворачивание белковой глобулы, сопровождающееся увеличением числа доступных остатков тирозина и изменением оптических характеристик. Однако удаление мочевины приводит к полному восстановлению нативной структуры и связывающих свойств. Было показано также [31, 35], что галактозосвязывающий белок существует в двух взаимопревращающихся формах, различающихся по связывающей активности. Эти формы различаются по подвижности при электрофорезе в акриламидном геле, если опыт проводить в присутствии субстрата [31]. Два состояния, различающихся по чувствительности к SH-реагентам, были обнаружены у M-белка [58]. Было показано также, что цистинсвязывающий белок выходит двумя активными пиками при хроматографии на DEAE-целлюлозе [43]. Исследование обеих фракций не выявило каких-либо различий между ними.

Что касается конформационных изменений при связывании субстратов, то во многих случаях их не удалось зарегистрировать [49, 50]. Однако в случае глутаминсвязывающего белка было обнаружено [24], что связывание субстрата приводит к изменению конформации белка. Этот эффект регистрируется по изменению спектров флуоресценции триптофановых остатков, причем он носит весьма специфический характер: другие аминокислоты, кроме глутамина, не вызывают изменения конформации связывающего белка. Аналогичные изменения флуоресценции наблюдаются у галактозосвязывающего белка [31].

IV. Функции связывающих белков

Согласно широко распространенной точке зрения, связывающие белки входят в транспортные системы клеток. В пользу этого свидетельствует ряд фактов.

1. *Осмотический шок приводит к снижению транспортных свойств клетки. Связывающая активность обнаруживается в шоковой жидкости.* Выше уже указывалось, что большинство связывающих белков локализовано в периплазматическом пространстве. Так, например, было показано [59], что диазо-7-амино-1,3-нафталиндисульфокислота, способная проникать через клеточные стенки, но не проникающая через плазматическую мембрану, инактивирует сульфатсвязывающий белок. Аналогичные результаты были получены для LIV-белка с использованием специфической антисыворотки [60].

Уменьшение транспортной активности клеток, подвергнутых осмотическому шоку, весьма неодинаково для разных транспортных систем [21] (табл. 6). Транспорт таких субстратов, как аланин, глицин, лизин и некоторые другие, очень мало изменяется после осмотического шока. Сходные результаты показало измерение уровня транспортной активности мембранных пузырьков, полученных Кабаком и сотр. [61] из клеток *E. coli*. Мембранные пузырьки сохраняют весьма низкий уровень транспорта лейцина, изолейцина и валина, но значительно более высокий уровень транспорта лизина, аланина, пролина и некоторых других аминокислот. Это дает основание предположить, что часть связывающих белков остается тесно ассоциированной с мембраной. Однако отсутствуют доказательства того, что остающиеся в мембране связывающие белки и белки, обнаруживаемые в шоковой жидкости, идентичны.

Т а б л и ц а 6

Снижение транспортной активности клеток *E. coli* W 3092 и E 15 после холодного осмотического шока [21]

Субстрат транспорта	Снижение скорости транспорта, % к скорости у интактных клеток	Субстрат транспорта	Снижение скорости транспорта, % к скорости у интактных клеток
Leu	80	Pro	45
Ala	<10	Phe	20
Thr	65	Trp	45
Lys	<10	His	70
Cys	60		

2. *Константы Михаэлиса транспортных систем в интактных клетках, как правило, близки константам диссоциации комплексов соответствующих выделенных белков с субстратами транспорта.* Величины K_m транспорта субстратов интактными клетками обычно близки величинам констант диссоциации соответствующих комплексов, приведенным в табл. 1. Однако имеется ряд исключений. Например, K_m системы транспорта фенилаланина равна $2,0 \cdot 10^{-5}$ M [42]. Наблюдающиеся различия в большинстве случаев можно объяснить различием в условиях измерения или различным состоянием связывающего белка в растворе и на клеточной мембране.

Иногда наблюдается несколько значений K_m для транспорта одних и тех же субстратов в клетку. Так, было показано [62, 63], что транспорт лейцина, изолейцина и валина у *E. coli* K 12 осуществляется двумя системами: LIV-I с $K_m \sim 0,2$ мкМ и LIV-II с $K_m \sim 2$ мкМ. Лишь первая из этих систем отождествляется с LIV-белком. Вудом было показано, что транспортная система LIV-II устойчива к холодному осмотическому шоку. По-видимому, белковые компоненты этой системы прочно ассоциированы с клеточной мембраной [64].

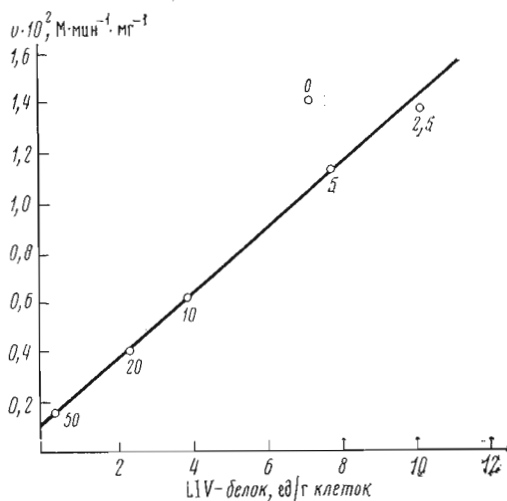


Рис. 3. Зависимость скорости транспорта лейцина и количества LIV-белка от концентрации лейцина в питательной среде при выращивании клеток *E. coli* K 12. Цифры на графике — количество лейцина в мг/л [33]

Измерение кинетики транспорта пролина клетками *E. coli* выявило [65] наличие негиперболической зависимости скорости от концентрации субстрата с двумя значениями K_m , равными 0,44 и 40 мкМ. Авторы [65] объясняют это в рамках мультизлетной модели связывающего центра, проявляющего отрицательную кооперативность.

3. *Репрессия транспортной системы сопровождается снижением количества связывающего белка.* Характерным примером такой зависимости является поведение системы транспорта лейцина, изолейцина и валина у *E. coli* K 12. Эта система репрессируется, если выращивание клеток проводить в присутствии лейцина [33] (см. рис. 3). Ряд экспериментов показывает, что репрессия транспорта аминокислот с разветвленной боковой цепью (например, лейцина) связана с взаимодействием лейцина с аминоксил-тРНК-синтетазой [66].

При увеличении концентрации лейцина в среде уменьшается как транспортная активность, так и содержание LIV-белка. Однако при изменении концентрации лейцина от 0 до 2,5 мг/л транспортная активность практически не меняется, но количество LIV-белка заметно увеличивается. Интересно, что ни изолейцин, ни валин не репрессируют эту систему, однако неприродная (2-аминобицикло [2,2,1]гепта-2-карбоновая) аминокислота репрессирует как транспорт, так и образование LIV-белка [67].

Указанное выше влияние субстрата на транспорт и биосинтез связывающего белка не является общим. Так, клетки вида *Comamonas* транспортируют ароматические аминокислоты более эффективно при выращивании на среде, содержащей фенилаланин [42]. Фосфатное голодание клеток кишечной палочки приводит к усилению поглощения ими фосфата, но не влияет на образование фосфатсвязывающего белка [68, 69]. Транспортная система сульфата у сальмонеллы репрессируется цистеином, однако клетки сохраняют способность связывать сульфат [70, 71]. Это явление обусловлено тем, что транспортная система кодируется тремя цистронами [72], причем изменение условий выращивания, очевидно, влияет на другие компоненты транспортной системы, но не на биосинтез связывающего белка.

4. *Транспорт-негативные мутанты не содержат связывающих белков.* В качестве примера можно привести транспортную систему β -галактозидов. Эта система кодируется Lac-опероном, включающим три цистрона: *y* — регулирующий биосинтез M-белка, *z* — регулирующий биосинтез β -галактозидазы и *i* — характеризующий способность системы к индукции.

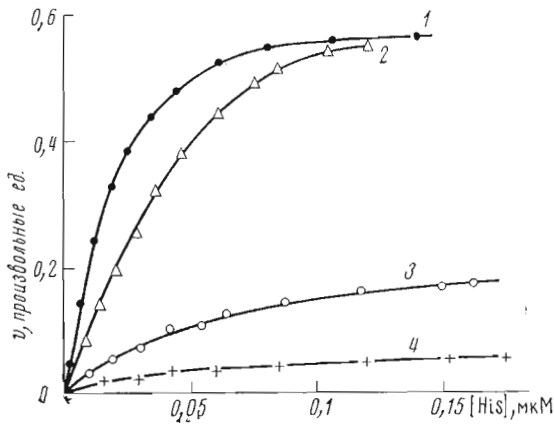


Рис. 4. Скорость транспорта гистидина различными мутантами *Salmonella typhimurium* (в скобках приведено количество J-белка, ед.) [34]: 1 — *dhu A1*(165), 2 — дикий тип (42), 3 — *dhu A1 hisJ 5601* (0,45), 4 — *hisP 1661* (37, Р-белка нет)

Оказалось (табл. 7), что все *y*-отрицательные мутанты кишечной палочки лишены М-белка [73].

Другой характерный пример — система транспорта гистидина у сальмонеллы. Эта система включает три белка, названные J-, К- и Р-белками [34]. Первый является собственно гистидинсвязывающим белком. Для транспорта необходим также Р-белок, кодируемый *hisP*-локусом микроорганизма [74]. Были получены транспорт-негативные мутанты, лишенные J-белка, а также мутанты, лишенные Р-белка, но полностью сохраняющие J-белок [34, 75]. Кроме того, были получены [75] мутанты с повышенной в 5 раз скоростью транспорта. В этом случае количество J-белка в клетке также увеличивается в 5 раз (рис. 4).

Таблица 7

Генетический контроль синтеза М-белка [73]

Штамм	Генотип	Содержание М-белка в осадочной фракции, нмоль/мг белка
ML380	<i>i⁻z⁺y⁺</i>	111
ML3	<i>i⁺z⁺y⁻</i>	0
ML308-225	<i>i⁻z⁻y⁺</i>	119
ML35	<i>i⁻z⁺y⁻</i>	0
ML30	<i>i⁺z⁺y⁺</i>	135
K-12-3000	<i>i⁺z⁺y⁺</i>	80
K-12-УА-470	<i>i⁺z⁺y⁻</i>	0

Аналогичная ситуация наблюдалась [76] для спонтанных мутантов *E. coli*, способных утилизировать *D*-лейцин. В этом случае происходило параллельное увеличение транспортной активности и количества LIV-белка.

Транспорт-негативные мутанты, лишенные соответствующего связывающего белка, были обнаружены также для систем переноса сульфата [77, 78], галактозы [79, 80], аргинина [81] и фосфата [68].

Однако в тех случаях, когда транспорт осуществляется несколькими транспортными системами, уровень поглощения субстрата может не коррелировать с содержанием соответствующего связывающего белка. Так, транспорт галактозы осуществляется двумя системами: галактозо-пермеазой и β-метилгалактозид-пермеазой [82]. Подавление первой из них

Регенерация транспорта галактозы и лейцина клетками *E. coli*, подвергнутыми осмотическому шоку [86]

Клетки	Добавки	Поглощенная галактоза, нмоль	Добавки	Поглощенный лейцин, нмоль
Интактные	Нет	2,80	Нет	4,45
«Шоковые»	»	1,20	»	1,10
	60 мкг Gal-СБ	1,70	30 мкг LIV-белка	2,20
	200 мкг фракции Б	1,60	340 мкг фракции Б	3,15
	60 мкг Gal-СБ+	2,80	30 мкг LIV-белка+	4,20
	+200 мкг фракции Б		+340 мкг фракции Б	
	60 мкг Gal-СБ+	0,1	30 мкг LIV-белка+	0,08
	+200 мкг фракции Б+30 ммоль NaN ₃		+340 мкг фракции Б+30 ммоль NaN ₃	
	60 мкг Gal-СБ+	0,2		
	+200 мкг фракции Б+1 ммоль N-этилмаленимида			

не влияет на содержание галактозосвязывающего белка в клетке [83], по-видимому, входящего во вторую транспортную систему.

5. *Реверсия транспорт-негативных мутантов сопровождается появлением связывающих белков.* Боос и Сарвас [84] подробно исследовали этот вопрос, используя мутанты *E. coli*, не способные к транспорту β -метилгалактозидов и лишённые галактозосвязывающего белка. В опытах по трансдукции, используя то обстоятельство, что ген, кодирующий эту систему, расположен в хромосоме рядом с *his*-локусом, они показали, что в 70% случаев перенос *his*-локуса из одной клетки в другую сопровождается регенерацией транспортной способности. Во всех этих случаях в клетке появляется галактозосвязывающий белок. Более того, в оставшихся 30% случаев, когда транспортная система не регенерируется, не происходит и образования галактозосвязывающего белка.

В дальнейшем было показано [85], что транспорт-негативные мутанты *E. coli* содержат структурно дефектный галактозосвязывающий белок с $K_D \sim 0,1$ мМ. У него отсутствуют конформационные изменения при связывании субстратов, и, по-видимому, он отличается по первичной структуре от белка дикого типа. Реверсия этого мутанта приводит к появлению нормального галактозосвязывающего белка.

Опыты по реверсии транспорт-негативных мутантов были проведены с системой транспорта гистидина. Было выделено [34] большое число ревертантных штаммов *hisJ*-мутанта *Salmonella typhimurium*, и во всех случаях восстановление транспортной способности сопровождалось появлением в клетке J-белка.

6. *Успешные опыты по регенерации транспорта у подвергнутых осмотическому шоку клеток добавлением очищенного связывающего белка.* Такие опыты были проведены [86] с LIV-белком и с галактозосвязывающим белком (табл. 8), и в обоих случаях удалось частично регенерировать транспортные функции подвергнутых шоку клеток. Значительно более полная регенерация достигается, если добавлять не только связывающий белок, но и другой, также содержащийся в шоковой жидкости. Этот последний не обладает связывающей субстраты активностью. Частичного восстановления транспортных функций добавлением связывающего белка удалось добиться в случае системы транспорта аргинина [81], тиамина [87] и глутамата [88].

Наиболее убедительные данные по регенерации транспортной активности были получены [69] с фосфатсвязывающим белком. Было показано, что

транспорт полностью восстанавливается при добавлении этого белка к обработанным шоком клеткам. У мутантов, дефектных по другим компонентам транспортной системы, но содержащим нормальное количество фосфатсвязывающего белка, транспортные функции при добавлении последнего не восстанавливались. Было также показано, что в ходе опытов по регенерации транспорта меченый фосфат включается во внутриклеточные фосфорсодержащие соединения.

Однако попытки восстановить транспорт в случае гистидинсвязывающего белка [20] оказались неудачными.

Все эти факты, будучи каждый в отдельности уязвимы для критики, взятые вместе, с определенностью показывают, что связывающие белки играют роль в транспортных процессах, по-видимому, на стадии рецепции субстрата. Однако эта точка зрения разделяется не всеми исследователями. Например, Кабак [3] привел ряд контраргументов. В частности, он обратил внимание на то, что снижение транспортных свойств у подвергнутых шоку клеток может быть связано с потерей в результате шока части макроэргических соединений (например, АТФ и др.). Он указал также на возможную роль связывающих белков как рецепторов хемотаксиса. В этом отношении довольно подробно были исследованы [89] мутанты *E. coli*, негативные по хемотаксису к галактозе. Оказалось, что эти мутанты также негативны в отношении транспорта галактозы. Было показано, кроме того, что оба свойства теряются в результате единичной мутации. Таким образом, в этом случае хемотаксис и транспорт имеют общий структурный компонент, которым, по-видимому, является галактозосвязывающий белок.

С другой стороны, удалось выделить мутанты, негативные по хемотаксису к некоторым аминокислотам, в частности к серину, но полностью сохраняющие способность к транспорту этих аминокислот [89].

Если связывающие белки являются все же частью транспортной системы, то возникает вопрос о том, как сопряжена рецепторная часть этой системы с собственно переносчиком и с процессом энерговыделения. Ряд авторов [35, 49, 50, 58, 90, 91] считают, что связывающий белок и является переносчиком. Основанием для этого служат данные по конформационным изменениям этих белков (см. выше). Однако эти данные представляются малоубедительными. Кроме того, многочисленные опыты с мутантными штаммами показывают, что большинство транспортных систем состоит из нескольких компонентов. Следует ожидать, что переносчик должен быть значительно жестче связан с мембраной, чем это наблюдается для многих связывающих белков. Таким образом, проблема транслокации еще далека от своего разрешения.

Значительную роль здесь могут сыграть исследования на модельных мембранах — монослоях, бислойных мембранах и липосомах. Недавно было показано [92], что аргининсвязывающий гликопротеин из *Neurospora crassa* увеличивает проницаемость бислойных мембран из липидов этого микроорганизма в отношении аргинина.

Что касается механизма сопряжения транспорта с источником энергии, то имеется ряд гипотез, из которых следует упомянуть недавно развитую Кабаком и сотр. [61, 93—97]. Было показано, что *D*-лактат сильно увеличивает скорость и уровень транспорта аминокислот [61] и моносахаридов [93] изолированными мембранными пузырьками кишечной палочки. Другие доноры энергии (сукцинат, *L*-лактат, NAD) не влияют на транспорт или влияют в очень небольшой степени. Характерно, что в этих условиях также не влияют на скорость и уровень поглощения субстратов АТФ и фосфоэволюпируют. Поглощение субстратов в присутствии *D*-лактата требует кислорода и блокируется ингибиторами электронного транспорта, но не ингибиторами окислительного фосфорилирования. Было высказано предположение, что транспорт аминокислот и сахаров сопряжен с системой окисления *D*-молочной кислоты, причем место сопряжения расположе-

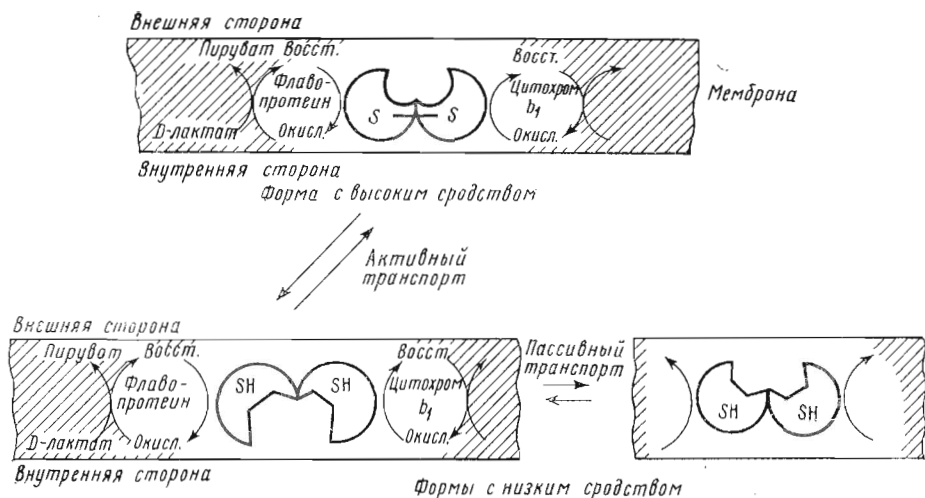


Рис. 5. Схема транспорта с участием переносчика, являющегося одновременно промежуточным соединением в цепи переноса электронов [95]

но между лактатдегидрогеназой и цитохромом b_1 . Предполагается [95], что в системе переноса лактозы М-белок является промежуточным звеном в цепи передачи электронов от лактатдегидрогеназы на цитохром b_1 и перенос электронов связан с изменением конформации М-белка (рис. 5).

Однако эти выводы основаны на данных, полученных не на целых клетках, а на мембранных пузырьках. Согласно Симони и Шаленбергеру [98], в целых клетках *E. coli* окисление *D*-молочной кислоты не обязательно для активного транспорта и система переноса электронов в этом отношении не играет существенной роли. Было показано, что мутанты, дефектные по Са-Mg-зависимой АТФ-азе, лишены транспортных функций.

V. Заключение

Исследования связывающих белков несомненно будут способствовать решению проблемы транспорта метаболитов через клеточные мембраны. Однако необходимо ясно отдавать себе отчет в том, что эти белки лишь одни из компонентов транспортной системы. Очередная задача заключается в выделении и изучении других составляющих этой системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pardee A. B. (1968) *Science*, **162**, 632—634.
2. Roseman S. (1969) *J. Gen. Physiol.*, **54**, 138s.
3. Kaback H. R. (1970) *Annu. Rev. Biochem.*, **39**, 561—598.
4. Антонов В. К. (1970) *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 823—830.
5. Dudek G. (1971) *Post. Biochem.*, **17**, 333—345.
6. Heppel L. A. (1971) in *Membrane Structure and Function* (Rothfield L. I., ed.), Acad. Press, New York.
7. Oxender D. L. (1971) in *Metabolic Transport* (Hokin L. E., ed.), Acad. Press, New York.
8. Oxender D. L. (1972) *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 777—814.
9. Boos W. (1974) *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 123—146.
10. Rothstein A. (1968) *Annu. Rev. Physiol.*, **32**, 15—31.
11. Neu H. C., Heppel L. A. (1966) *J. Biol. Chem.*, **240**, 3685—3692.
12. Anraku Y., Heppel L. A. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 2561—2569.
13. Heppel L. A. (1969) *J. Gen. Physiol.*, **54**, 95s.
14. Kennedy E. P. (1970) in *The Lac Operon* (Beckwith J., Lipser D., eds.), Cold Spring Harbor, New York.
15. Fox C. F., Kennedy E. P. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 891—899.
16. Jones T. H. D., Kennedy E. P. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 5981—5987.
17. Kaback H. R., Deuel T. F. (1968) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **132**, 118—129.

18. Kaback H. R., Stadman E. R. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1390—1400.
19. Vorisek J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **290**, 256—266.
20. Rosen B. P., Vasington F. D. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5351—5360.
21. Anraku Y. (1971) *J. Biochem.*, **69**, 243—245.
22. Gordon A. S., Lombardi F. J., Kaback H. R. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 358—362.
23. Kerwar G. K., Gordon A. S., Kaback H. R. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 291—297.
24. Weiner J. H., Berger E. A., Hamilton M. N., Heppel L. A. (1970) *Fed. Proc.*, **29**, 341.
25. Anraku Y. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3116—3127.
26. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 636—643.
27. Matsuura A., Iwashima A., Nose Y. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **51**, 241—246.
28. Colowick S. P., Womack F. C. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 774—777.
29. Briggs F. N., Fleishman M. (1965) *J. Gen. Physiol.*, **49**, 131—134.
30. Hummel J. P., Dreyer W. J. (1962) *Biochim. et biophys. acta*, **63**, 530—532.
31. Boos W., Gordon A. S., Hall R. E., Price H. D. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 917—924.
32. McGowan E. B., Silhavy T. J., Boos W. (1974) *Biochemistry*, **13**, 993—999.
33. Penrose W. R., Nichoalds G. E., Piperno J. R., Oxender D. L. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 5921—5928.
34. Ames G. F., Lever J. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 1096—1103.
35. Boos W., Gordon A. S. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 621—628.
36. Антонов В. К., Воробинцева Т. И., Александров С. И., Гаврилова Н. А., Арсеньева Е. Л. (1975) *Докл. АН СССР*, **221**, 1215—1218.
37. Hazelbauer G. L. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **60**, 445—449.
38. Opekarova M., Kotyk A., Horak J., Kholodenko V. P. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **59**, 373—376.
39. Richarme G., Kepes A. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **45**, 127—133.
40. Silhavy T. J., Boos W. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 163—167.
41. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Antonov V. K., Vinogradova E. I., Shkrob A. M., Malenkov G. G., Evstratov A. V., Laine I. A., Melnik E. I., Ryabova I. D. (1969) *J. Membrane Biol.*, **1**, 402—411.
42. Kuzuya H., Bromwell K. E., Guroff G. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6371—6380.
43. Berger E. A., Heppel L. A. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7684—7694.
44. Stuart W. D., Debusk A. G. (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **144**, 512—518.
45. Fukui S., Isobe K. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **328**, 114—120.
46. Barash H., Halpern Y. S. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **386**, 168—180.
47. Weiner J. H., Heppel L. A. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6933—6941.
48. Berman K., Boyer P. D. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4650—4657.
49. Langridge R., Shinagawa H., Pardee A. B. (1970) *Science*, **169**, 59—61.
50. Piperno J. R., Oxender D. L. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5732—5734.
51. Yariv J., Kalb A. J., Yariv M. (1972) *FEBS Lett.*, **27**, 27—29.
52. Willis R. C., Furlong C. E. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 2574—2580.
53. Imagawa T., Tsugita A. (1972) *J. Biochem.*, **72**, 889—910.
54. Imagawa T., Tsugita A. (1972) *J. Biochem.*, **72**, 911—926.
55. Imagawa T., Tsugita A. (1972) *J. Biochem.*, **72**, 927—949.
56. Гринкевич В. А., Чащин В. Л., Модянов Н. Н., Кравченко З. Б., Митрофанова Х. А., Потапенко Н. А., Алдянова Н. А. (1974) 3-й Всесоюзный симпозиум химии пептидов и белков, Киев, Тезисы, с. 34.
57. Quioco F. A., Phillips G. N., Parsons R. G., Hogg R. W. (1974) *J. Mol. Biol.*, **85**, 491—493.
58. Yariv J., Kalb A. J., Katchalski E., Goldman R., Thomas E. W. (1969) *FEBS Lett.*, **5**, 173—176.
59. Pardee A. B., Watanabe K. (1968) *J. Bacteriol.*, **96**, 1049—1054.
60. Nakane P. K., Nichoalds G. E., Oxender D. L. (1968) *Science*, **161**, 182—183.
61. Kaback H. R., Milner L. S. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 1008—1015.
62. Oxender D. L., Rahmanian M., Claus D. R. (1973) 9th Internat. Congr. Biochem, Stockholm, Abstr. 514, p. 288.
63. Rahmanian M., Claus D. R., Oxender D. L. (1973) *J. Bacteriol.*, **116**, 1258—1266.
64. Wood J. M. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4477—4485.
65. Morikawa A., Suzuki H., Anraku Y. (1974) *J. Biochem.*, **75**, 229—235.
66. Quay S. C., Kline E. L., Oxender D. L. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3921—3924.
67. Christensen H. N., Handlogten M. E., Tager H. S., Sand R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1510—1520.
68. Medveczky N., Rosenberg H. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **211**, 158—168.
69. Medveczky N., Rosenberg H. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **192**, 369—371.
70. Dreyfuss J., Pardee A. B. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **104**, 308—310.
71. Ohta N., Galsworthy P. R., Pardee A. B. (1971) *J. Bacteriol.*, **105**, 1053—1062.
72. Dreyfuss J., Monty R. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 1019—1024.

73. Fox C. F., Carter J. R., Kennedy E. P. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 698—705.
74. Ames G. F., Roth J. R. (1968) *J. Bacteriol.*, 96, 1742—1747.
75. Krajewska-Grynkiewicz K., Walczak W., Klopotoski T. (1971) *J. Bacteriol.*, 105, 28—37.
76. Rahmanian M., Oxender D. L. (1971) *Fed. Proc.*, 30, 1061.
77. Pardee A. B., Prestidge L. S. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55, 189—191.
78. Dreyfuss J. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2292—2297.
79. Anraku Y. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 793—800.
80. Boos W. (1969) *Fed. Proc.*, 28, 463.
81. Wilson O. H., Holden J. T. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 2743—2749.
82. Rotman B., Ganesan A. K., Guzman R. (1968) *J. Mol. Biol.*, 36, 247—260.
83. Wilson D. B. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 553—558.
84. Boos W., Sarvas M. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 13, 526—533.
85. Boos W. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 5414—5424.
86. Anraku Y. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 3128—3135.
87. Nishimune T., Hayashi R. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 244, 573—583.
88. Barash H., Halpern Y. S. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 45, 681—688.
89. Hazelbauer G. L., Mesibov R. E., Adler J. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 64, 1300—1307.
90. Scarborough G. A., Rumley M. K., Kennedy E. P. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 60, 951—958.
91. Winkler H. H., Wilson T. H. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, 135, 1030—1051.
92. Stuart W. D., Debusk A. G. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 52, 1046—1051.
93. Barnes E. M., Kaback H. R. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 66, 1190—1198.
94. Barnes E. M., Kaback H. R. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5518—5522.
95. Kaback H. R., Barnes E. M. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5523—5531.
96. Lombardi F. J., Kaback H. R. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7844—7857.
97. Short S. A., White D. C., Kaback H. R. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7452—7458.
98. Simoni R. D., Shallenberger M. K. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2663—2667.
99. Haskovec C., Kotyk A. (1969) *Eur. J. Biochem.*, 9, 343—347.
100. Hogg R. W., Englesberg E. (1969) *J. Bacteriol.*, 100, 423—432.
101. Schleif R. (1969) *J. Mol. Biol.*, 46, 185—196.
102. Lusk J., Kennedy E. P. (1969) *Fed. Proc.*, 28, 464.
103. Aksamit R., Koshland D. E. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 48, 1348—1353.
104. Dietz G., Anraku Y., Heppel L. A. (1967) *Fed. Proc.*, 27, 831.
105. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гинодман Л. М., Крылова Ю. И. (1973) *Биохимия*, 38, 1294—1297.
106. Amanuma H., Anraku Y. (1974) *J. Biochem.*, 76, 1165—1173.
107. Furlong C. E., Weiner J. H. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 38, 1076—1083.
108. Furlong C. E., Willis R. C., Gerber N. H. (1973) 9th Internat. Congr. Biochem., Stockholm, Abstr. 511, p. 278.
109. Lever J. E. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 4317—4326.
110. Wilson O. H., Holden J. T. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 2737—2742.
111. Rosen B. P. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 1211—1218.
112. Weiner J. H., Furlong C. E., Heppel L. A. (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 142, 715—717.
113. Halpern Y. S., Barash H. (1972) 8th FEBS Meeting, Amsterdam, Abstr. No. 97.
114. Wiley W. R. (1970) *J. Bacteriol.*, 103, 656—666.
115. Nishimune T., Hayashi R. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 328, 124—130.
116. White J. C., Digirolamo P. M., Fu M. L., Preston Y. A., Bradbeer C. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 3978—3986.
117. Taylor R. T., Norrell S. A., Hanna M. L. (1972) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 148, 366—381.
118. Lo T. C. Y., Rayman M. K., Sanwal B. D. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6323—6331.
119. Willis R. C., Furlong C. E. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 6926—6929.
120. Desai J. D., Modi V. V. (1975) *Experientia*, 31, 160.
121. Henderson G. B., Zevely E. M., Huennekens F. M. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 68, 712—717.

Поступила в редакцию
20.IX.1976.

MEMBRANE PROTEINS AND SYSTEMS OF PASSIVE
TRANSPORT OF NON-ELECTROLYTES. II. PROPERTIES
AND FUNCTION OF MICROBIAL BINDING PROTEINS

ANTONOV V. K., ALEXANDROV S. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A review of literature on the identification and isolation methods of microbial binding proteins is presented. The properties and role in transport phenomena are discussed for these proteins, which appear to bear receptor functions in the systems performing a transport of monosaccharides, amino acids, some ions, and other metabolites.
