

А. П. СУРГУЧЕВ, И. Г. СУРГУЧЕВА, Г. Н. ЗАЙЦЕВА

**О ВОЗМОЖНОЙ ПРИРОДЕ МНОЖЕСТВЕННОСТИ
МЕТИОНИЛ-сРНК-СИНТЕТАЗ У *BACILLUS BREVIS* GB**

(Представлено академиком А. Н. Беловерским 1 VIII 1969)

В последние годы появился ряд сообщений о существовании в клетках организмов разного происхождения нескольких форм аминоксил-сРНК-синтетаз, специфичных для одной и той же аминокислоты. Такая множественность или гетерогенность найдена для лейцил-, фенилаланил-, аспартил-, метионил- и глицил-сРНК-синтетаз.

Множественность может быть связана с органоидной специфичностью этих ферментов в клетке. Так, например, у нейроспоры (6) и тетрахимены (7) в митохондриях были обнаружены ферменты, отличающиеся по своим свойствам от цитоплазматических. Однако данные по множественности синтетаз, обнаруженной у некоторых организмов, в ряде случаев бывает трудно объяснить исходя только из их органоидной специфичности (2-5). Особенно это касается аминоксил-сРНК-синтетаз бактерий, в клетках которых нет оформленных структур.

Ранее (8) нами было высказано предположение о том, что одной из причин наблюдаемой множественности ферментов может быть разная степень олигомерности аминоксил-сРНК-синтетаз.

В настоящей работе проведена экспериментальная проверка этого предположения на примере изучения метионил-сРНК-синтетазы.

Для выделения фермента была использована синхронизированная культура *Bac. brevis* (P-вариант). Условия выращивания культуры описаны нами ранее (4). Синхронизацию клеточного деления проводили в основном по методу (8), который был нами несколько модифицирован для выращивания клеток в большом объеме среды (30 л). При этом синхронизация клеточного деления достигала в среднем 80-90%. Биомассу собирали центрифугированием в начале третьего цикла деления клеток.

Суммарный фермент получали описанным ранее способом (4). Для электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ) использовали электродный буфер и буфер в геле (буфер А, pH 8,7), приготовленные согласно методу (5). Концентрация акриламида составляла 7%. Электрофорез проводили в течение 2 час. при силе тока 3 ма на трубку. На гель наносили 300-400 мкг белка препарата фермента. После того как фронт достигал конца трубки, гель вынимали и разрезали на диски толщиной 0,5 мм при помощи специального приспособления. Срезы геля, содержащие белок, помещали в пробирки для элюции (0,15 мл 0,01 M трис-НС, pH 7,5), которую проводили в течение 1 часа на холоду. В полученных белковых фракциях определяли активность фермента в двух последовательных реакциях, катализируемых метионил-сРНК-синтетазой: 1) активация метионина (по образованию меченых метионилгидроксамовых кислот), 2) аминоксил-ирование (по включению C^{14} -метионина в сРНК).

Активность фермента в 1-й реакции определяли в основном по методу (9), используя сорбцию C^{14} -метионилгидроксамата на карбоксиметилцеллюлозных фильтрах. Бессолевым гидроксилламин получали по методу (10); его концентрацию определяли с 8-оксихинолином (11). В работе использовали C^{14} -метионин (удельная радиоактивность 36 мС/г), очищенный хроматографически на бумаге ватман 3 ММ.

Для определения активности синтетаз после их разделения в ПАГ нами был опробован вариант без предварительной элюции фермента из геля; при этом диски помещались непосредственно в 250 μ л инкубационной смеси для образования гидроксамата (9). Однако в этом случае удельная активность фермента оказалась несколько заниженной, вследствие чего в дальнейшем мы использовали в основном вариант с предварительной элюцией фермента из гелевых дисков. Пробы с ферментом инкубировали 60 мин. при 37° в оптимальных условиях образования C^{14} -метионилгидроксамата. Содержание в среде гидросиламина составляло 600 μ мол.,

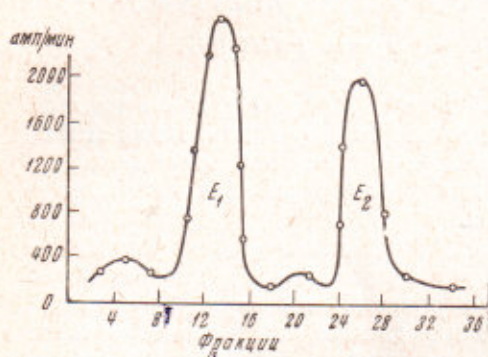


Рис. 1

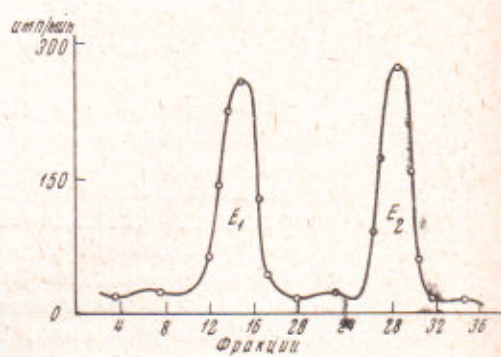


Рис. 2

Рис. 1. Фракционирование метионил-сРНК-синтетазы методом электрофореза в ПАГ (активность фермента определяли по образованию C^{14} -метионилгидроксамата)

Рис. 2. Фракционирование комплексов C^{14} -метиониладенилат — фермент в ПАГ

АТФ 5 μ мол. при pH 7,5. После окончания реакции на карбоксиметил-целлюлозные фильтры наносили 50 μ л инкубационной смеси. Радиоактивность продукта реакции измеряли в жидком сцинтилляторе (толуол) на счетчике Магк-1 фирмы «Nuclear Chicago».

Используя метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле, мы обнаружили по образованию метионилгидроксамата две ферментативные зоны с максимальной активностью во фракциях 12—13 (фермент E_1) и 25—26 (фермент E_2) (рис. 1).

Специфичность реакции и ее ферментативный характер подтверждаются специальными контрольными опытами, в которых инкубационная смесь не содержала одного из компонентов реакции (АТФ или гидросиламина). Кроме того, в качестве контроля в полную инкубационную смесь добавляли немеченый метионин или избыточное количество АТФ. Во всех этих случаях образования C^{14} -метионилгидроксамата не наблюдалось.

Известно, что при помощи электрофореза от свободного фермента может быть отделен комплекс фермент-сРНК (12). Однако в нашем случае существование двух метионил-сРНК-синтетаз, видимо, не связано с образованием такого комплекса, поскольку предварительная инкубация суммарного фермента с рибонуклеазой, а также обработка препарата сульфатом стрептомицина перед нанесением его на гель не влияли существенно на распределение ферментативной активности в ПАГ. При изучении некоторых свойств оказалось, что ферменты E_1 и E_2 значительно различаются по своей стабильности. Так, при хранении суммарного фермента в течение 2—3 недель при -20° происходит частичная инактивация (на 30—50%) фермента E_1 по сравнению с препаратом, выделенным из свежесобранных клеток без их замораживания и оттаивания. Кроме того, фермент E_1 оказался более термолabileм; он почти полностью терял активность при нагревании до 55° в течение 15 мин.

Нами было показано, что оба фермента — E_1 и E_2 способны образовывать комплекс S^{14} -метиониладенилат-фермент (рис. 2). Получали этот комплекс в основном по методу (13). Образованный радиоактивный продукт — метиониладенилат-фермент отделяли от свободного метионина гель-фильтрацией через сефадекс Г-50 (грубый) и наносили на полиакриламидный гель. После окончания электрофореза гель разрезали на диски и проводили экстракцию радиоактивного продукта при помощи 1% раствора додецилсульфата в течение ночи. Радиоактивность образцов в этом случае определяли в диоксановом сцинтилляторе.

Таким образом, электрофорезом в полиакриламидном геле нами были выявлены две метионил-сРНК-синтетазы, катализирующие активацию метионина и образующие комплекс с метиониладенилатом.

Очень важно отметить, что ферментативной активностью во 2-й реакции (аминоацилирование) обладает лишь фермент E_2 (рис. 3). Фермент E_1 , катализирующий активацию метионина, оказался неспособным включить его в метиониновые сРНК. В этом опыте мы использовали обычный метод получения аминоксил-сРНК. (4). Это дало возможность предположить, что «неполноценная» метионил-сРНК-синтаза E_1 является активной субъединицей фермента E_2 , состоящего из двух или нескольких таких мономеров.

Для проверки этого предположения нами было проведено определение молекулярных весов ферментов E_1 и E_2 при помощи ультрацентрифугирования в линейном градиенте концентрации сахарозы (5—20%), приготовленной на 0,01 M трис-буфере, содержащем 0,01 M β -меркаптоэтанол и 0,001 M ЭДТА. Центрифугирование проводили в бакет-роторе 3×5 мл центрифуги «Суперспид-50» в течение 12 час. при 39 000 об/мин и 2°. В качестве метчиков с известным молекулярным весом были взяты: каталаза из сердца быка (м. в. 248 000) и бычий гемоглобин (м. в. 68 000). После окончания центрифугирования пробирки прокалывали и собирали по три капли фракции, определяя в них активность фермента по образованию S^{14} -метионилгидроксамата. Характер разделения метионил-сРНК-синтетаз и двух белков-метчиков в градиенте концентрации сахарозы показан на рис. 4. Молекулярный вес фермента E_1 оказался равным примерно 100 000, а фермента E_2 200 000.

Для проверки полученных результатов нами был поставлен специальный опыт по определению молекулярного веса двух метионил-сРНК-синтетаз *Vac. brevis* (при сравнении с известными белками) при помощи гель-фильтрации через сефадекс Г-200. При этом также было установлено, что молекулярный вес тяжелого компонента E_2 составлял около 200 000.

Таким образом, описанные выше опыты подтвердили наше предположение о том, что, по-видимому, фермент E_2 является димером фермента E_1 .

В связи с этим интересно выяснить, существуют ли оба фермента в клетках *in vivo* или же фермент E_2 распадается на мономеры в процессе его выделения и последующей обработки. В том случае, если обе метионил-сРНК-синтетазы действительно существуют в клетке *in vivo*, нетрудно себе представить, каким образом их взаимопревращение может регулировать процесс белкового синтеза.

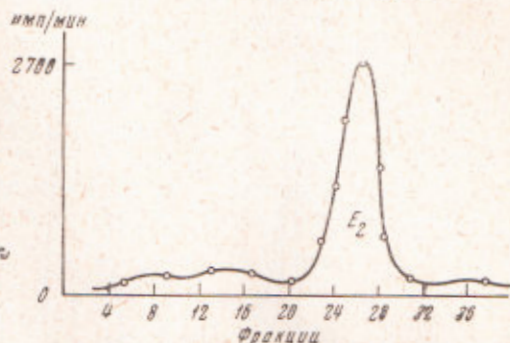


Рис. 3. Фракционирование метионил-сРНК-синтетазы в ПАГ с последующим определением активности по реакции образования S^{14} -метионил-сРНК

Аналогичные данные о наличии различных олигомеров аминокислот-сРНК-синтетаз известны в литературе. Например, после фаговой инфекции в клетках *Escherichia coli* была обнаружена димеризация валил-сРНК-синтетазы⁽¹⁴⁾. Недавно было отмечено превращение мономер⇌димер для пролил-сРНК-синтетазы *E. coli*⁽¹⁵⁾. Известны также примеры, когда множественность молекулярных форм некоторых других ферментов связана с существованием различной степени полимерности исходной активной субъединицы^(16, 17).

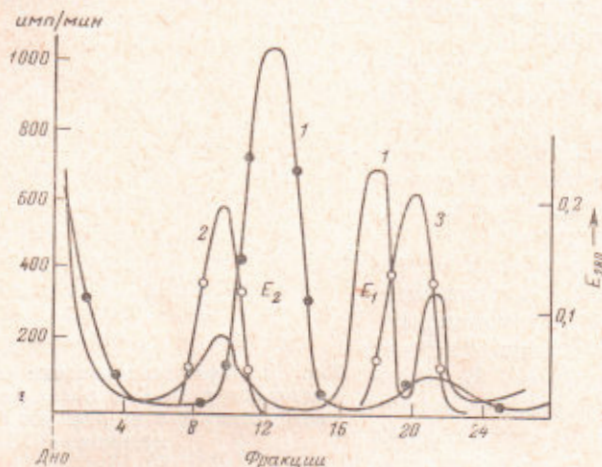


Рис. 4. Фракционирование метионил-сРНК-синтетазы в линейном градиенте концентрации сахарозы. 1 — метионил-сРНК-синтетаза (E_1 и E_2), определенная по образованию C^{14} -метионилгидроксамата; 2 — каталаза; 3 — гемоглобин (E_{280})

* Не исключено, что ассоциация ⇌ диссоциация субъединиц фермента может иметь для клетки физиологическое значение как регуляторный процесс.

Выражаем благодарность Т. М. Ермохиной за большой интерес, проявленный к этой работе.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
28 VII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. E. Barnett, D. H. Brown, J. L. Epler, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 2, 452 (1967). ² С. Т. Юн, Н. Р. Рарпорт, Biochim. et biophys. acta, 123, 134 (1966). ³ О. О. Фаворова, Т. Н. Спасокукоцкая, Л. Л. Киселев, Молекулярная биология, 2, № 1, 69 (1968). ⁴ Г. Н. Зайцева, Т. Н. Ермохина и др., Биохимия, 34, № 2, 325 (1969). ⁵ А. П. Сургучев, И. Г. Сургучева и др., Биохимия, 34, № 2, 334 (1969). ⁶ D. H. Bruton, G. D. Novelli, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 2, 262 (1968). ⁷ Y. Suyama, J. Eyer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 5, 746 (1967). ⁸ М. А. Пешков, А. В. Капитонова, Н. Т. Зубова, Микробиология, 37, 2 (1968). ⁹ А. В. Парни, М. К. Куханова, Л. Л. Киселев, Биохимия, 32, 4, 735 (1967). ¹⁰ H. Beinert, D. E. Green et al., J. Biol. Chem., 203, 1, 35 (1953). ¹¹ D. S. Frear, R. C. Burrell, Anal. Chem., 27, 1664 (1965). ¹² W. Seifert, G. Nass, W. Zillig, J. Mol. Biol., 33, 507 (1968). ¹³ U. Lagerkvist, L. Rybo, J. Waldeström, J. Biol. Chem., 241, 22, 5394 (1966). ¹⁴ M. J. Chrispeels, R. F. Boyd et al., J. Mol. Biol., 31, 3, 463 (1968). ¹⁵ M. L. Lee, K. H. Muench, J. Biol. Chem., 244, 2, 223 (1969). ¹⁶ M. W. Bitensky, K. L. Yielding, G. M. Tomkins, J. Biol. Chem., 240, 3, 1077 (1965). ¹⁷ C. L. Markert, Ann. N. Y. Acad. Sci., 151, 1, 14 (1968).