

Л. Л. КИСЕЛЕВ, О. О. ФАВОРОВА, А. В. ПАРИН,
В. Я. СТЕЛЬМАЩУК, Н. А. КИСЕЛЕВ

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ (ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ) КОМПЛЕКСА ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ С ТРИПТОФАНОМ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 2 XI 1970)

Аминоацил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1; АРСазы) катализируют ключевую реакцию белкового синтеза — высокоспецифическое присоединение аминокислоты к соответствующей транспортной РНК (¹). Пространственная структура АРСаз представляет существенный интерес для решения проблемы взаимного узнавания АРСаз и тРНК, и один из возможных подходов к ее изучению состоит в исследовании кристаллических препаратов фермента и его комплексов с субстратами (тРНК, аминокислотой, АТФ). Однако, хотя из разных источников выделен ряд высокоочищенных АРСаз, специфичных к разным аминокислотам, кристаллов, пригодных для структурного анализа, еще не получено. Сообщалось о кристаллизации триптофанил- (^{2, 3}) и серил- (⁴) РНК-синтетаз, но эти утверждения не были достаточно документированы.

Появились данные (⁵) о получении кристаллов лизил-РНК-синтетазы из дрожжей; авторы надеются использовать эти препараты для рентгеноструктурного анализа.

Мы описываем полимеризацию триптофанил-РНК-синтетазы (ТРС) с триптофаном в палочкообразные частицы с последующим образованием паракристаллических агрегатов.

ТРС была получена в высокоочищенном состоянии из поджелудочной железы быка. Первые три стадии очистки (обработка стрептомицин-сульфатом, рН-фракционирование и дробное осаждение сульфатом аммония) представляли собой модификацию метода Дэви и др. (²), затем фермент подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом Г-100. Согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле и ионнообменной хроматографии, чистота фермента была равна не менее 80 %.

Активность фермента определяли по образованию C^{14} -триптофанил-гидроксаматов (⁶) и по включению C^{14} -триптофана в тРНК (⁷). Все растворы непосредственно перед опытом фильтровали через стеклянный фильтр № 4. 5 спектрофотометрических единиц (при 280 мμ) белка в 2 мл 0,1 М NaCl, 0,01 М трис-HCl, pH 7,5, инкубировали при комнатной температуре с триптофаном (10^{-3} М) в течение 1 часа и затем осаждали сульфатом аммония (AmS) на холоду, добавляя раствор AmS до 58,5 % насыщения. Отцентрифугированный осадок последовательно экстрагировали понижающимися концентрациями AmS в диапазоне 60—40 % насыщения в присутствии триптофана (10^{-4} М) по методу (⁸). Во фракциях, экстрагированных 55—45 % AmS, через 10—30 мин. наблюдали помутнение растворов. После центрифугирования суспензий, полученных при экстракции разными концентрациями AmS, выяснилось, что активность фермента обнаруживается в осадках, но не в надосадочной жидкости. Сопоставление активностей осадков из разных фракций обнаружило максимум активности при 45—50 % насыщения AmS, т. е. в тех же фракциях, где обнаруживаются

паракристаллические структуры, описываемые в этой работе. При проведении опыта без субстрата ТРС, т. е. без триптофана, образующиеся осадки имеют аморфный характер и полимерных форм фермента выявить не удастся. На основании этих данных можно полагать, что обнаруженные структуры являются комплексом ТРС с триптофаном.

Препараты для электронной микроскопии готовили методом негативного контрастирования. В качестве контрастеров использовали растворы 2% фосфорновольфрамовой кислоты, 5% молибдат аммония, pH 6,5, 2% и 6% уранилацетат, pH 4,5. Препараты исследовали в электронном микроскопе JEM-6С при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении $50\,000\times$.

Электронная микроскопия негативно контрастированного материала выявляет палочкообразные частицы длиной до 1μ (рис. 1а, см. вкл. к стр. 1173), а также агрегаты из этих частиц, уложенных бок о бок (рис. 1б). В некоторых случаях видно, что эти паракристаллические агрегаты включают в себя 10—15 отдельных «палочек». Диаметр «палочки» равен $125 \pm 10 \text{ \AA}$ и может несколько изменяться в результате деформации частицы на подложке. На отдельных участках выявляется периодичность 40—50 $\text{\AA}$ вдоль длинной оси частиц. Внутреннего капала, характерного для многих частиц со спиральной симметрией, имеющих биологическое происхождение, выявить не удается.

Оптические дифракционные картины, снятые с одиночной «палочки» (рис. 1б) и с двух уложенных бок о бок частиц (рис. 1в), приведены на рис. 1д и 1е соответственно. На них четко выявляются рефлексы, соответствующие 40 $\text{\AA}$ и примерно 490 $\text{\AA}$. Если первые отражают периодичность вдоль «палочки», обнаруженную, как уже указывалось, непосредственно на микрофотографиях, то вторые могут быть связаны с периодом повторения структуры.

Примерный расчет функции Бесселя, которая дает вклад в рефлексы, близкие к меридиану, указывает на то, что эта функция характеризуется более высоким порядком, чем первый или второй. Это свидетельствует о том, что исследуемая палочкообразная структура может представлять собой многозаходную спираль.

Можно предположить, что «палочка» состоит из отдельных молекул фермента, уложенных спирально. Согласно другой возможности, «палочку» образуют отдельные «шайбы», уложенные в стопку. При этом «шайба» может представлять собой кольцеобразный ассоциат из нескольких молекул фермента. На возможность формирования «шайбы», состоящей из нескольких молекул ТРС, указывает тот факт, что при образовании комплекса ТРС с триптофаном происходит «утяжеление» фермента⁽⁹⁾: помимо основной формы, имеющей молекулярный вес 110 000^(3, 9), появляются формы, имеющие молекулярный вес 200 000 (димер) и более 300 000 (олигомер). Размер этих олигомеров достаточен для того, чтобы образовать «кольцеобразную» структуру, которая может собраться в стопку «шайб». Агрегаты такого типа наблюдались для глютаминсинтетазы, имеющей мол. вес 600 000⁽¹⁰⁾, и при полимеризации белков палочкообразных вирусов^(11, 12). При укладке «шайб» в стопку каждая следующая «шайба» несколько повернута по отношению к предыдущей, что и приводит к образованию спирали. При этом обязательно образуется многозаходная спираль по числу структурных единиц, слагающих «шайбу».

Из изложенного следует, что полученная нами спиральная структура может либо образовываться индивидуальными молекулами фермента, либо состоять из стопки «шайб», причем «шайба» образована олигомером, состоящим из нескольких молекул фермента.

Изложенная интерпретация носит предварительный характер и будет уточнена нами в ходе дальнейших исследований.

Из представленных данных ясно, что ТРС в присутствии триптофана способна к образованию упорядоченных палочкообразных структур, имеющих паракристаллический характер.

Авторы благодарны академику В. А. Энгельгардту и члену-корреспонденту АН СССР Б. К. Вайнштейну за интерес к работе.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР

Поступило
1 X 1970

Институт кристаллографии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. D. Novelli, *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 449 (1967). ² E. W. Davie, V. V. Koningsberger, F. Lipmann, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **65**, 21 (1956). ³ E. C. Preddie, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3958 (1969). ⁴ M. N. Makman, G. L. Cantoni, *Biochemistry*, **4**, 1434 (1965). ⁵ L. Rymo, U. Lagerkvist, *Nature*, **226**, 77 (1970). ⁶ А. В. Парин, М. К. Куханова, Л. Л. Киселев, *Биохимия*, **32**, 734 (1967). ⁷ K. Muench, P. Berg, in: *Procedures in Nucleic Acid Research*, N. Y.—London, 1966. ⁸ W. B. Jacoby, *Anal. Biochem.*, **26**, 295 (1968). ⁹ А. В. Парин, Л. Л. Киселев, *Мол. биол.*, **3**, 901 (1969). ¹⁰ R. C. Valentine, B. M. Shapiro, E. R. Stadman, *Biochemistry*, **7**, 2143 (1968). ¹¹ R. Franklin, B. Commoner, *Nature*, **175**, 1076 (1955). ¹² I. Atabekov, V. K. Novikov et al., *Virology*, **36**, 620 (1968).