

Б. М. МЕДНИКОВ, А. Б. ОВЧИННИКОВА, Л. М. ГАЛИМОВА,
И. КУЛЫБЕВ, академик А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

О НЕРИБОСОМНОМ ВКЛЮЧЕНИИ АМИНОКИСЛОТ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ИЗ ШЕЛКОУДЕЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Значительная часть молекулы фиброина тутового шелкопряда (так называемый кристаллический фиброин) состоит из монотонно повторяющейся последовательности $(X - \text{гли} - \text{ала} - \text{гли} - \text{ала} - \text{гли})_n$, где X — может быть серин, тирозин, валин ⁽¹⁾. Вполне вероятно, что такой простой полипептид образуется нерибосомным путем, без матрицы и РНК. В пользу этого свидетельствуют следующие косвенные данные: 1) несмотря на тщательные поиски, иРНК с преобладанием кодонов глицина и аланина (т. е. богатая гуанином и цитозином) не была обнаружена в железе; состав быстрометящейся РНК железы близок к составу ДНК ⁽²⁾; 2) аминокислотный состав фиброинов близких видов шелкопрядов сильно варьирует ⁽³⁾, что противоречит матричной теории; 3) в отличие от аминокислотного состава серицина ⁽⁴⁾, состав фиброина не подвергается стрептомициновой модификации. Не исключена возможность, что глицил-аланиновый олигопептид является промежуточным звеном в синтезе фиброина; в дальнейшем он полимеризуется ферментами типа лигаз и присоединяется к так называемой аморфной части фиброина, синтезирующейся обычным, т. е. матричным, путем.

Для проверки этой гипотезы нами была предпринята попытка обнаружить включение глицина и аланина в осаждаемый трихлоруксусной кислотой материал в гомогенатах шелкоуделительной железы, освобожденных центрифугированием от микросомной фракции. В опытах использовались гусеницы тутового шелкопряда разных пород, как правило, во второй половине пятого возраста, когда в шелкоуделительной железе *in vivo* происходит наиболее интенсивное включение глицина и аланина ⁽⁵⁾.

У живых гусениц отделяли фиброиновый отдел железы, промывали, замораживали в жидком азоте, после чего растирали в ступке до пылевидного состояния и экстрагировали 2 объемами трис-НСI-буфера 0,05 M, рН 7,5, с добавлением 0,05 M MgCl₂, 0,1 M KCl и 0,25 M сахарозы. Ядра, митохондрии, обрывки мембран осаждали центрифугированием при 15 000 g 15 мин., затем из супернатанта осаждали микросомную фракцию центрифугированием при 105 000 g 2 часа (осаждаются не только микросомы, но и рибосомы). Конечный супернатант хранили при -70°. Однако после 6—7 дней хранения из оттаиваемого супернатанта выпадает осадок фиброина, и включение аминокислот сильно уменьшается. Возможно, это связано с тем, что с осадком фиброина выпадают и ответственные за включение ферменты. Оптимальная концентрация белка в инкубационной смеси 1 мг. Среда для инкубации содержит трис-НСI 0,05 M рН 7,5; NH₄Cl 0,1 M; NaCl 0,04 M; MgCl₂ 0,003—0,05 M; 4 μM Na-соли АТФ (производства Nutritional Biochem. corporation); 0,5 μM дитиотрептола (ДТТИ); 0,5 M фенилтиомочевины (ФТМ); по 1 μM немеченых аминокислот (кроме глицина и аланина). В некоторые пробы добавляли по 1 мг панкреатической РНКазы («Reanal»),

200 мг хлорамфеникола, 50 мг пурамицина. Объем инкубационной смеси составлял 0,5 мл. Пробы инкубировали 30 мин. при 30°, затем фиксировали равным объемом 10% ТХУ с избытком соответствующей немеченой аминокислоты, отмывали один раз холодной 5% ТХУ, затем кипятили в 5% ТХУ, наносили на ультрафильтры RUF5 и отмывали 100 мл 5% ТХУ и 10 мл спирта. Включение считали в толуоловом сцинтиляторе на сцинтиляционном счетчике Mark I. В опытах использовали гли-

Таблица 1

№ № п. п.	Варианты	Включение, % от контроля						t	P
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	x		
1	Супернатант (С)	100	100	90	105	100	100	0,1	<0,1
2	С + АТФ + ала-С ¹⁴ + гли-Н ³	290/215	100	—	215	—	201	—	—
3	С + АТФ + ХФН	111	—	—	—	—	—	2,3	>0,05
4	С + АТФ + ФТМ	—	122	—	—	—	—	2,0	<0,05
5	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ	—	137	151	130	—	139	2,76	>0,05
6	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ + РНКазы	—	106	104	80	108	99,5	0,3	<0,1
7	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ + ХФН	—	110	—	—	—	—	1,15	<0,1
8	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ + ПМ	—	—	—	137	—	—	2,99	>0,02
9	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ + рибосомы	—	101	—	—	—	—	0,2	<0,1
10	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ + Mg ²⁺ 0,003 M	—	—	—	139	180	160	13,3	>0,001
11	С + АТФ + ФТМ + ДТТИ + Mg ²⁺ 0,003 M + ХФН	—	—	—	149	—	—	2,8	>0,05
12	С + ФТМ + ДТТИ	—	—	—	88	—	—	—	—

цин-Н³ с удельной активностью 90 мС/мМ чешского производства. Контролем служили пробы с нулевым временем инкубации. Результаты представлены в табл. 1.

Каждый вариант опыта был представлен не менее чем 5 параллелями. В табл. 1 указаны средние значения по вариантам, а также средние значения по ряду опытов (№№ 1—5), критерий Стьюдента *t* и уровень достоверности разницы между опытом и контролем *P*.

Из результатов опытов можно сделать следующие заключения. В безрибосомном супернатанте фибринового отдела железа наблюдается незначительное (130% от контроля), но достоверное включение глицина и аланина. Это не образование белок-хинон-иминных комплексов (6), так как требует источника энергии — АТФ (вариант № 12) и не ингибируется, а, наоборот, стимулируется фенилтиомочевинной (варианты №№ 4, 5, 10, 11). Это и не эндогенное включение, обусловленное оставшимися после центрифугирования рибосомами, так как не ингибируется пурамицином (вариант № 8) и стимулируется низкими концентрациями Mg²⁺ (варианты №№ 10, 11). В то же время оно ингибируется РНКазой почти на 100%, что позволяет предположить, что промежуточным звеном в этом синтезе является аминоксил — тРНК. В этом отношении обнаруженное включение напоминает N-концевое присоединение аминокислот, открытое Соффером у *E. coli*. По-видимому для включения нужен дитиотреитол или аналогичное ему соединение (β-меркаптоэтанол, восстановленный глутатион). Впрочем, в одном опыте (опыт № 1, вариант № 2, шелкопряд скорпионеровой линии) очень высокое включение наблюдалось и без этих добавок. Любопытно, что хлорамфеникол как будто не ингибирует, а стимулирует это включение (варианты №№ 3, 7, 11), хотя известно (7), что *in vivo* этот антибиотик тормозит биосинтез белков гусениц пятого возраста.

Как нам кажется, можно заключить, что результаты наших опытов не опровергают гипотезы о нерибосомном (нематричном) механизме биосинтеза кристаллической части молекулы фибрина тутового шелко-

пряда. Однако наши данные должны считаться предварительными до идентификации конечного продукта.

В заключение мы выражаем глубокую признательность Г. В. Самохваловой и директору Пятигорской шелкостанции П. Ф. Белову за любезное предоставление гусениц шелкопряда и А. А. Богданову за интерес к работе и ценные указания.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 I 1971

Институт зоологии
Академии наук ТуркмССР
Ашхабад

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. Г. Иоффе и др., Шелк, № 3, 38 (1964). ² I. Hosoda et al., Biochim. et biophys. acta, 72, 544 (1963). ³ F. Lucas et al., Shirley Institute Memoirs, 28, 77 (1955). ⁴ Б. М. Медников и др., ДАН, 188, 1176 (1969). ⁵ Н. В. Бирюкова и др., Изв. АН ТуркмССР, сер. биол., № 1, 58 (1966). ⁶ Е. Б. Куваева и др., ДАН, 167, 695 (1966). ⁷ Л. М. Тарасевич, Е. Ф. Уланова, ДАН, 166, 970 (1966).