

Л. Б. РЕБРОВ, В. А. АРБУЗОВ, С. С. ДЕБОВ,
действительный член АМН СССР С. Р. МАРДАШЕВ

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОЙ
И ФОСФОРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗЫ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*
АТСС № 7020 НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА КУЛЬТУРЫ**

Несмотря на многочисленные работы, посвященные изучению полинуклеотидфосфорилазы (ПНФаза, нуклеозиддифосфат: полинуклеотид-нуклеотидилтрансфераза, К.Ф. 2.7.7.8) со времени ее открытия Очоа и Грунберг-Маного в 1955 г. (1), физиологическая роль этого фермента в клетке остается неизвестной. Обнаружение ПНФазы в рибосомах некоторых микроорганизмов (2-6) рядом авторов связывается с возможным ее участием в разрушении иРНК (7, 8).

Предпосылкой для нашей работы являлось предположение о том, что ПНФаза наряду с деградацией иРНК осуществляет в клетке и функцию синтеза полирибонуклеотидов. С этой целью было проведено сравнитель-

Таблица 1

Распределение синтетической и фосфоролитической активностей ПНФазы в различных фракциях рибосом

Исследуемая реакция	Фракция	Активность, ед.	Удельная активность, ед. на 1 мг белка	% активности *
Фосфоролитиз поли-А	S-30	—	0,102	—
	Полисомы	0,01	0,011	3,6
	Моносомы	0,018	0,02	6,4
	Пострибосомальная фракция	0,252	0,09	90
Синтез поли-А	S-30	—	0,27	—
	Полисомы	0,064	0,07	16,4
	Моносомы	0,243	0,274	62,3
	Пострибосомальная фракция	0,082	0,045	21,3

Примечание. Суммарная активность всех полученных с градиента фракций принята за 100%.

ное изучение синтетической и фосфоролитической активностей ПНФазы в различных рибосомных фракциях *E. coli* АТСС № 7020, полученных на разных стадиях роста этого микроорганизма.

Культуру *E. coli* АТСС № 7020 на определенной фазе роста быстро охлаждали в бане с ацетоном и сухим льдом, клетки собирали центрифугированием при +3°, разрушали растиранием с Al_2O_3 и суспендировали в стандартном буфере (9) с добавлением ДНКазы (25 мкг/мл). Полученную после центрифугирования при 30 000 *g* в течение 20 мин. надосадочную жидкость (фракция S-30) использовали в дальнейшем для получения рибосом центрифугированием при 105 000 *g* в течение 2,5 час., а также фракций рибосом путем центрифугирования фракции S-30 в градиенте плотности сахарозы (15—30%) при 39 000 об/мин в течение 195 мин. на ультрацентрифуге «Spinco» L-2, ротор SW-39. Активность фермента во всех полученных фракциях определяли по скорости фосфоролита поли-А в присутствии $Na_2H_2P^{32}O_4$ и по скорости синтеза поли-А из АДФ-С¹⁴.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что основная фосфоролитическая активность ПНФазы связана с пострибосомальной фракцией (90% активности) и только 10% активности приходится на полисомную и моносомную фракции. Синтетическая активность фермента обнаруживается главным образом в рибосомах: моносомах и полисомах (62,3% и 16,4% соответственно) и лишь 21% активности остается связанной с пострибосомальной фракцией. Интересно отметить также, что в реакции полимеризации удельная активность моносомной и полисомной фракций значительно выше, чем пострибосомальной фракции, и в случае моносом она совпадает с удельной активностью фракции S-30. В реакции фосфорилиза поли-А наивысшей удельной активностью, сравнимой с удельной активностью фракции S-30, обладает пострибосомальная фракция.

В связи с полученными данными в дальнейшем было проведено сравнительное изучение синтетической и фосфоролитической активности ПНФазы в рибосомной и пострибосомальной фракциях сахарозного градиента в зависимости от стадии роста *E. coli* ATCC № 7020. Прежде всего мы исследовали, каким образом изменяется процентное соотношение полирибосом и моносом в клетке в процессе роста культуры. Как видно из табл. 2, наибольшее количество полисом (60%) определялось в начале ло-

Таблица 2

Процентное соотношение полирибосом и моносом в клетках в зависимости от фазы роста культуры

Фаза роста	Полирибосомы, %	Моносомы, %
Фаза ускорения (3 часа)	40	60
Начало логарифмической фазы (3 $\frac{1}{2}$ часа)	60	40
Середина логарифмической фазы (4 $\frac{1}{2}$ часа)	50	50
Стационарная фаза (8 час.)	38	62

Примечание. Общее количество единиц оптической плотности при 260 м μ полисомной и моносомной областей градиента принимали за 100%.

гарифмической фазы. К концу роста *E. coli* (стационарная фаза) количество полирибосом составляло только 38% и 62% приходилось на долю моносом. При изучении синтетической активности ПНФазы на разных стадиях роста *E. coli* было обнаружено (рис. 1), что она в основном распределяется между полирибосомальной и моносомной фракциями, причем в логарифмической фазе роста культуры отмечается увеличение синтетической активности ПНФазы именно в полирибосомах (40% активности) на фоне уменьшения ее в моносомах. Увеличение общей и удельной активности ПНФазы (реакция полимеризации) в полирибосомальной фракции совпадало также с высоким содержанием полисом в клетке. Что касается фосфоролитической активности, то здесь наблюдалось иное распределение ее по фракциям на разных стадиях роста *E. coli* (рис. 1). Из рисунка видно, что по мере уменьшения активности фермента в пострибосомальной фракции увеличивается соответственно активность в моносомах, достигая своего максимального значения к середине логарифмической фазы. Фосфоролитическая активность полисомной фракции существенно не менялась на всех стадиях роста культуры.

Полученные данные, с одной стороны, показывают существование в клетке структурного разобщения двух основных активностей ПНФазы и, с другой стороны, позволяют предположить важную роль самой структуры в функционировании этого фермента. В связи с этим представляло интерес изучить синтетическую активность рибосом после промывки их стандартным буфером. Результаты опытов представлены в табл. 3, из которой видно, что активность промытых рибосом резко уменьшена по сравнению с активностью нативных рибосом, причем суммарная активность промытых

рибосом и соответствующей надосадочной жидкости также значительно меньше активности нативных рибосом. Кроме того, отмечается диспропорция между содержанием белка в надосадочной жидкости и ее синтетической активностью. Эти опыты дают возможность предположить, что

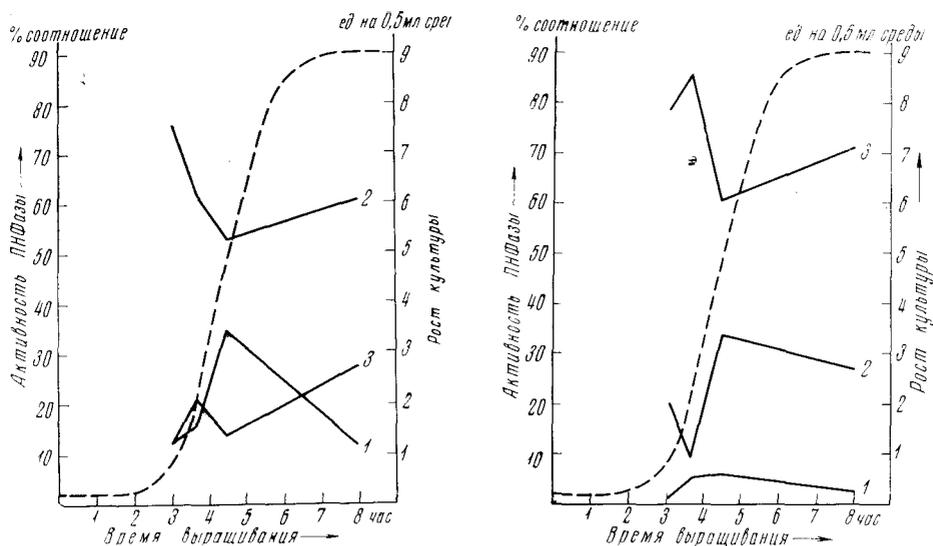


Рис. 1. Синтетическая (слева) и фосфоролитическая (справа) активность ПНФазы в различных фракциях сахарозного градиента на разных стадиях роста *E. coli*. 1 — полисомная фракция, 2 — моносомная фракция, 3 — пострибосомальная фракция. Синтетическая активность ПНФазы определена по скорости включения АДФ-С¹⁴ в поли-А; фосфоролитическая — по скорости фосфороллиза поли-А в присутствии Na₂HP³²O₄. Пунктирной линией обозначен рост культуры *E. coli* в зависимости от времени выращивания

часть ПНФазы с рибосом удаётся удалить отмывкой буфером, но фермент, потеряв связь с рибосомой, становится неактивным в реакции синтеза поли-А. Кроме того, возникло предположение, что роль структуры будет

Таблица 3
Синтетическая активность ПНФазы в отмытых рибосомах *E. coli*

Фракции	Белок, %	Активность, %	Удельная активность, ед. на 1 мг белка
S-30	100	100	0,17
S-100	60	31,3	0,089
Рибосомы	40	68,7	0,29
Рибосомы-1 (промытые)	32	45	0,26
Надосадочная жидкость	8	4,3	0,09
Рибосомы-2 (промытые)	24	30	0,21
Надосадочная жидкость	16	6,3	0,08

Примечания. 1. Фракция «рибосомы-1» получена при повторном центрифугировании суспензии рибосом при 105 000g в течение 2,5 час. и суспендировании полученного осадка рибосом в стандартном буфере. 2. Фракция «рибосомы-2» получена при суспендировании рибосом в течение 6 час. в стандартном буфере при 0—3°, повторном центрифугировании суспензии рибосом при 105 000g в течение 2,5 час. и суспендировании полученного осадка рибосом в стандартном буфере. Активность ПНФазы и содержание белка во фракции S-30 принято за 100%.

различной для проявления синтетической и фосфоролитической активности ПНФазы. Для доказательства этого положения был использован метод диализа фракции полирибосом против буфера, содержащего минималь-

ную концентрацию ионов Mg^{2+} (0,02 ммол.), приводящий к разрушению полисомной структуры. Как видно из табл. 4, такой диализ приводит к значительному уменьшению удельной активности фракции полисом в реакции синтеза поли-А и увеличению активности в реакции фосфорилиза поли-А.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в клетке ПНФаза одновременно функционирует как синтетаза, так и фосфорилаза, но проявление этих двух основных активностей зависит, по-видимому, от той структуры, с которой фермент связан, т. е. отмечается структурное разобщение основных активностей фермента. Так, синтетическая активность ПНФазы проявляется только на полисомах и моносомах, причем

Таблица 4

Удельная активность ПНФазы во фракциях полирибосом и моносом, диализованных против буфера с низкой концентрацией ионов

Диализ	Фракции	Удельная активность ПНФазы, ед. на 1 мг белка	
		синтез поли-А	фосфорилиз поли-А
Против стандартного буфера	Полисомы	0,39	0,018
	Моносомы	0,47	0,08
Против буфера с низкой концентрацией ионов Mg^{2+}	Полисомы	0,26	0,029
	Моносомы	0,40	0,10

отмечается прямая взаимозависимость между количеством полирибосом в клетке и связанной с полисомами синтетической активностью ПНФазы. Более того, искусственное разрушение структуры полисом и моносом ведет к значительному уменьшению в них синтетической активности фермента. Можно также предположить, что в период наиболее интенсивного деления клеток *E. coli* (логарифмическая фаза) ПНФаза катализирует в клетке синтез РНК или полирибонуклеотида, возможно, играющего важную роль в белковом синтезе или в его регуляции. Одновременное проявление фосфоролитической активности ПНФазы в пострибосомальной фракции и в моносомах позволяет думать об участии фермента и в разрушении некоторых видов РНК (возможно иРНК). Для объяснения структурного разобщения двух основных активностей ПНФазы можно предложить три возможности: 1) существует два фермента, катализирующих эти реакции; 2) синтетическая и фосфоролитическая активности ПНФазы связаны с разными субъединицами фермента; 3) существует один фермент, но проявлению фосфоролитической активности препятствует структура полирибосом. Дальнейшее исследование этого вопроса позволит сделать определенный выбор между этими возможностями.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
5 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Grunberg-Manago, S. Ochoa, *Federat. Proc.*, **14**, 221 (1955).
² Y. Kimhi, U. Z. Littauer, *Bull. Res. Council Israel*, **A11**, 77 (1962). ³ M. Grunberg-Manago, *Progr. Nucleic Acid. Res.*, **1**, 95 (1963). ⁴ H. E. Wade, S. Lowet, *Biochem. J.*, **81**, 319 (1961). ⁵ S. I. S. Hardy, C. G. Kurland, *Biochemistry*, **5**, № 11, 3676 (1966). ⁶ G. A. Strasdine, L. A. Hogg, J. J. Campbell, *Biochim. et biophys. acta*, **55**, 231 (1962). ⁷ M. Sekiguchi, S. S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, **238**, 349 (1963). ⁸ M. Sekiguchi, S. S. Cohen, *J. Biochem.*, **54**, 339 (1963).
⁹ M. Takana mi, *Methods in Enzymology*, **12**, Part A, 1967, p. 491.