

УДК 547.963.3

БИОХИМИЯ

В. Г. БУДКЕР, А. С. ГИРШОВИЧ, Л. М. СКОБЕЛЬЩИНА

**СПОСОБНОСТЬ N-АЦИЛАМИНОАЦИЛ-тРНК,
КОВАЛЕНТНО ФИКСИРОВАННОЙ N-АЦИЛЬНЫМ РАДИКАЛОМ
НА РИБОСОМЕ ВБЛИЗИ ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНОГО ЦЕНТРА,
ИНИЦИИРОВАТЬ ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 11 II 1972)

Нами было показано, что N-ацилфенилаланил-тРНК, содержащая в качестве N-ацильного радикала остаток бифункционального ароматического азотистого иприта — хлорамбуцил*, является нормальным субстратом, способным образовывать специфический комплекс с рибосомой в присутствии полнуридиловой кислоты⁽¹⁾. При инкубации такого комплекса при 25° в буфере, используемом при образовании комплекса, имеет место алкилирование рибосомы. Эффективность реакции достаточно высока: примерно 30—35% от связанной N-хлорамбуцил-С¹⁴-фенилаланил-тРНК, причем атакуются преимущественно звенья рибосомальной РНК. Анализ распределения ковалентно связанной с рибосомой радиоактивности показал высокую специфичность алкилирования 50S субъединицы при отсутствии модификации 30S субъединицы⁽²⁾. Эти факты позволили заключить, что алкилирование должно идти вблизи пептидил-трансферазного центра рибосомы.

В настоящем сообщении приведены некоторые результаты исследования функциональной активности N-хлорамбуцилфенилаланил-тРНК в составе специфического матрично-рибосомального комплекса. В работе использованы рибосомы и тРНК из *E. Coli* MRE 600.

Исходной предпосылкой исследования было предположение, что N-хлорамбуцилфенилаланил-тРНК, по аналогии с другими N-ациламиноацил-тРНК, должна занимать на рибосоме донорный тРНК-связывающий участок. Для доказательства такой локализации был использован обычно применяемый для этих целей пуромпидиновый тест с последующей экстракцией N-ациламиноацилпуромидина в этилацетат при pH 5,2⁽³⁾. Для сравнения в качестве обычного субстрата был выбрана ацетил-С¹⁴-фенилаланил-тРНК. Результаты, представленные в табл. 1, позволяют заключить, что N-хлорамбуцилфенилаланил-тРНК и N-ацетилфенилаланил-тРНК являются субстратами, сравнимыми по специфичности и сродству к донорному тРНК-связывающему участку пептидил-трансферазного центра рибосомы.

Особый интерес представляет, по нашему мнению, выяснение следующего вопроса; способна ли N-ациламиноацил-тРНК, локализованная в донорном тРНК-связывающем участке и ковалентно фиксированная N-ацильным радикалом вблизи пептидилтрансферазного центра, функционировать в качестве инициатора полипептидного синтеза? Поскольку, как уже отмечалось, алкилирование рибосомы идет преимущественно по рибосомальной РНК⁽²⁾, ответ на поставленный вопрос можно получить, анализируя радиоактивность выделенной 23S рРНК. Для этого инкубацион-

* Хлорамбуцил — *n*-ди-(2-хлорэтил)-аминофенилмасляная кислота.

ную смесь, содержащую комплекс N-хлорамбуцил- C^{14} -фенилаланил-тРНК с рибосомой и полиуридиловой кислотой, после стадии алкилирования (²) разделили на две части, одну из которых анализировали на синтетическую активность (⁴) в присутствии C^{14} -фенилаланина (опыт), а другую — в присутствии C^{12} -фенилаланина (контроль). Затем смесь в обеих пробах диализовали против буфера, содержащего 0,001 M $Mg(NO_3)_2$, 0,05 M NH_4NO_3 и 0,01 M трис- HNO_3 , pH 7,4 и 50S субъединицы выделяли центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы, 5—20%, в том же буфере на ультрацентрифуге VAC-601 (ГДР). После гидроксиламинолиза (0,1 M NH_2OH , pH 10,5, 37°, 60 мин.) и последующей 4-кратной экстракции фракции 50S субъединиц фенолом в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия была выделена 23S рРНК. Радиоактивность 23S рРНК в контроле и опыте определялась после удаления из водного слоя фенола 3-кратным переосаждением РНК этанолом и оценивалась в расчете на 1 о.е. (260 мμ).

Таблица 1

Реакция с пурамином N-ацил- C^{14} -фенилаланил-тРНК в составе комплекса с рибосомой и полиуридиловой кислотой
(Отношение радиоактивности, экстрагируемой в этилацетат, к общей радиоактивности в комплексе в процентах)

тРНК	— Пурамицин	+ Пурамицин
N-ацетил- C^{14} -фенилаланил-тРНК	6,0	81,5
N-хлорамбуцил- C^{14} -фенилаланил-тРНК	13,0	67,0

Примечание. Комплекс содержит примерно 90% внесенной N-ацетиламиноацил-тРНК.

Таблица 2

Синтез полифенилаланина, инициируемый N-хлорамбуцил- C^{14} -фенилаланил-тРНК, ковалентно фиксированной N-ацильным радикалом на 23S рРНК рибосомы вблизи пептидил-трансферазного центра

	Синтез полифенилаланина	
	с C^{12} -фенилаланином	с C^{14} -фенилаланином
Радиоактивность в 23S рРНК, имп/мин о.е. (260 мμ)	79	420 (315) *
Доля алкилированных рибосом, участвующих в синтезе полифенилаланина, %	—	18—20
Число синтезированных пептидных связей	—	25

* Радиоактивность кислотонерастворимой фракции после инкубации выделенной после синтеза полифенилаланина 23S рРНК в 5% трихлоруксусной кислоте (0°, 15 мин.).

Результаты приведены в табл. 2*. Очевидно, что радиоактивность в 23S рРНК в контроле (79 имп/мин) соответствует количеству связанной с 23S рРНК N-хлорамбуцил- C^{14} -фенилаланил-тРНК. Увеличение же радиоактивности в опыте (420 имп/мин) обусловлено синтезом фиксированного на 23S рРНК N-хлорамбуцил- C^{14} -полифенилаланина. Отсюда легко оценить среднюю длину синтезированного полипептида; она составляет примерно 5 пептидных связей.

* Приведены и обсуждаются результаты одного из экспериментов.

Однако можно полагать, что истинная средняя длина синтезированного полипептида значительно больше, поскольку известно, что не все рибосомы, участвующие в связывании и, соответственно, алкилируемые N-хлорамбуцилфенилаланил-тРНК, способны инициировать полипептидный синтез. Для оценки доли активных рибосом был осуществлен синтез C^{12} -полифенилаланина (4), инициируемый N-ацетил- C^{14} -фенилаланил-тРНК, связанной с рибосомой в присутствии полиуридиловой кислоты (90% связывания). Анализ радиоактивности кислотонерастворимой фракции (синтезируемый N-ацетил- C^{14} -фенилаланил- C^{12} -полифенилаланин) после инкубации смеси в 5% трихлоруксусной кислоте при 90° в течение 15—20 мин. показал, что в синтезе полифенилаланина участвует 18—20% связанной с рибосомой N-ацетилфенилаланил-тРНК; при этом предынкубация комплекса в условиях алкилирования (15—17 час. при 25°) практически не снижает способности системы инициировать полипептидный синтез.

Отсюда следует, что в синтезируемую полипептидную цепь, инициированную ковалентно фиксированной на 23S рРНК N-хлорамбуцил- C^{14} -фенилаланил-тРНК, должно включаться не более $\frac{1}{5}$ радиоактивности, связанной с 23S рРНК после стадии алкилирования (см. контроль, примерно 16 имп/мин). В этом случае синтезированная полипептидная цепь должна содержать примерно 25 пептидных связей. Подтверждением этого вывода является тот факт, что свыше 90% радиоактивности, появившейся в 23S рРНК после стадии синтеза полифенилаланина в опыте, обнаруживается в кислотонерастворимой фракции при инкубации в 5% трихлоруксусной кислоте при 90° (315 из 341 имп/мин). Результаты оказались сравнимыми при использовании трех препаратов рибосом. Средняя длина синтезируемого полифенилаланина колеблется в пределах 20—25 пептидных связей.

Таким образом, показано, что N-ациламиноацил-тРНК, ковалентно фиксированная N-ацильным радикалом на 23S рРНК вблизи пептидилтрансферазного центра рибосомы, способна инициировать синтез достаточно длинных полипептидов. Отсюда можно заключить следующее. Во-первых, N-хлорамбуцилфенилаланил-тРНК в составе специфического матрично-рибосомального комплекса с высокой эффективностью алкилирует рибосому вблизи донорного тРНК-связывающего участка, не нарушая функциональную активность пептидилтрансферазного центра. Во-вторых, синтез полипептида возможен при фиксации N-конца растущей цепи на рибосоме.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
7 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Е. С. Бочкарева, В. Г. Будкер и др., ДАН, 201, 353 (1971). ² E. S. Bockareva, V. G. Budker et al., FEBS Letters, 19, 121 (1971). ³ J. G. Levin, M. W. Nirenberg, J. Mol. Biol., 34, 467 (1968). ⁴ M. W. Nirenberg, Methods in Enzymology, 6, 17 (1964).