

Л. Л. КИСЕЛЕВ, Л. Л. КОЧКИНА

МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ АМИНОКИСЛОТ ПРИ БИОСИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

МАКРОЭРГИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА С АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗОЙ

(Представлено академиком А. А. Бавым 13 IX 1973)

Карбоксильная активация аминокислот при биосинтезе белков, как было установлено (^{1, 2}), происходит за счет энергии гидролиза макроэргической связи АТФ и катализируется ферментами аминоксил-тРНК-синтетазами (КФ 6.1.1). В отсутствие тРНК продуктами реакции являются аминоксиладенилат и пирофосфат, в присутствии тРНК — аминоксил-тРНК, АМФ и пирофосфат. Рассматривая химические свойства компонентов этих и других модельных реакций, пришли (³) к гипотезе, согласно которой синтезу аминоксиладенилата должен предшествовать гидролиз АТФ в активном центре фермента с образованием промежуточного продукта — аденозинмонофосфата, ковалентно соединенного макроэргической связью с функциональной группой белковой молекулы фермента, и пирофосфата:



где E — аминоксил-тРНК-синтетаза и ПФ — пирофосфат. Цель этой работы состояла в экспериментальной проверке возможности обнаружения соединения E~АМФ.

Опыты проводили с триптофанил-тРНК-синтетазой (ТРСаза) из поджелудочной железы быка, выделенной в форме электрофоретически гомогенного белка с молекулярным весом 120 000 (⁴). Использовали [¹⁴C]АТФ с удельной активностью 50 С/моль фирмы «Amersham» и [¹⁴C]АМФ с удельной активностью 250 С/моль (Чехословакия). Для анализа использовали электрофорез на бумаге FN-11 в 0,03 M цитратном буфере, рН 4,0, 16 в/см, разделение 2,5 часа в присутствии свидетелей: АМФ, АДФ, АТФ, триптофаниладенилата, которые хорошо разделяются в этих условиях. Радиоактивность определяли после разрезания электрофореграммы на полосы шириной по 5 мм и просчета их в толуольном сцинтилляторе на автоматическом спектрометре «Интертекник» СЛ-30.

Концентрация компонентов при инкубации ТРСазы с АТФ (M): ТРСаза $7 \cdot 10^{-6}$, АТФ $7 \cdot 10^{-5}$, трис-НСl, рН 7,5, 0,05, MgCl₂ $0,3 \cdot 10^{-3}$. Конечный объем 0,2 мл, инкубация 20 час при 37°. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гель-фильтрацию вели на колонке с сефадексом G-50 (тонкий), 1×20 см, элюцию проводили 0,02 M трис-НСl, рН 7,5, $\div 10^{-3}$ M дитиотреитолом, пробы перед разделением обрабатывали ТХУ. Ниже показан состав продуктов, образующихся после инкубации фермента с [¹⁴C]АТФ (10^4 имп/мин).

Условия инкубации	Исходное содержание АТФ	АТФ	АМФ	Триптофаниладенилат
Исходная АТФ	9,9	9,4	0,5	0
После инкубации без фермента	9,9	9,3	0,6	0
После инкубации с ферментом	9,9	6,9	2,5	0,3

Из равенства взятой в опыт и обнаруженной электрофоретическим анализом радиоактивности следует, что после осаждения белка ТХУ в надосадочную жидкость переходят все радиоактивные продукты и, следовательно, использованный способ позволяет полностью выявить взаимопревращения нуклеотидов. Видно, что четвертая часть внесенной АТФ превращается в АМФ, АДФ практически не образуется, так как сумма полученной радиоактивности АТФ+АМФ+триптофаниладенилат соответствует внесенной. Кроме того, в опытах, где АДФ брали в качестве свидетеля, радиоактивность в опытных пробах на уровне пятна АДФ не обнаруживали. Наблюдается незначительное образование триптофаниладенилата, составляющее всего несколько процентов от внесенной АТФ, по-видимому, за счет возможной примеси эндогенного триптофана в препарате фермента. Однако, поскольку аденилат триптофана достаточно лабилен (время его полужизни равно 6 час. при 0° (5)), даже незначительного образования и последующего распада аденилата до АМФ и свободной аминокислоты может быть в принципе достаточно для того, чтобы объяснить накопление АМФ при длительной инкубации фермента с АТФ.

Чтобы различить, является ли обнаруженная АМФ свободной или связанной с белком, были выполнены опыты с гель-фильтрацией фермента после его инкубации с АТФ. Если образование АМФ является следствием гидролиза аденилата до свободных АМФ и триптофана, то следует ожидать отделения АМФ от белковой фракции. Действительно, когда в модельном опыте ТРСазы была смешана с [C¹⁴]АМФ и подвергнута гель-фильтрации, менее 0,02% радиоактивности обнаружилось в белковой фракции. Если же свободная АМФ обнаруживается при электрофорезе в кислоторастворимой фракции вследствие предшествующего гидролиза Е~АМФ под действием ТХУ, то после гель-фильтрации в нейтральной среде АМФ должна остаться вместе с белковой фракцией. Измерения показали, что действительно в белковой фракции обнаруживается [C¹⁴]АМФ, причем АТФ в комплексе с ферментом отсутствует или обнаруживается в крайне незначительном количестве. Данные электрофоретического анализа радиоактивных продуктов, связанных с ТРСазой после гель-фильтрации инкубированного Е~АТФ-комплекса, следующие (10³ имп/мин):

АТФ	АМФ	Триптофаниладенилат
0	3	0.6
0	5	0.7
0.5	4.5	0.8
0.6	2.5	1.0

Для доказательства макроэргического характера связи Е~АМФ выделенную гель-фильтрацией белковую фракцию, инкубированную с АТФ, подвергли обработке пирофосфатом с тем, чтобы провести реакцию (см. уравнение (1)) в обратном направлении, т. е. получить АТФ из Е~АМФ и пирофосфата. В этих опытах концентрация ТРСазы составляла $2 \cdot 10^{-6}$ М, MgCl₂ $1,5 \cdot 10^{-3}$ М, а ПФ — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М. Пробы инкубировали 10 мин. при 37° и перед электрофорезом обрабатывали ТХУ (табл. 1).

В опыте 1 образуется вдвое больше АТФ, чем исходно содержалось в сумме АТФ+триптофаниладенилат, содержание АМФ при этом резко падает. В опытах 2 и 3 появляется АТФ, которой не было после гель-фильтрации, а содержание АМФ уменьшается в 2—4 раза.

Макроэргическая природа соединения ТРСазы с АМФ хорошо иллюстрируется расчетом числа макроэргических связей до и после реакции с ПФ (среднее из 3 опытов по пирофосфоролизу в усл. ед.):

Соединения	Количество макроэргических связей	
АТФ + Е · (Трп ~ АМФ)	1.9	4.3
АТФ + Е · (Трп ~ АМФ) + Е ~ АМФ	6.0	5.6

Если считать, что $E \sim AMF$ содержит макроэргическую связь, то незначительное уменьшение общего количества макроэргов после инкубации легко объяснить гидролизом. Если же не учитывать $E \sim AMF$ в качестве макроэргического соединения, то значительное увеличение общего количества макроэргов в системе становится совершенно необъяснимым.

Таблица 1

Электрофоретический анализ радиоактивных
продуктов пирофосфоролиза $E \sim AMF$ -комплекса,
(10^3 имп/мин)

№ опыта	После гель-фильтрации			После обработки пирофосфатом		
	АТФ	АМФ	аденилат	АТФ	АМФ	аденилат
1	1,0	4,2	0,7	3,2	1,1	0,7
2	0	4,4	2,6	3,2	1,0	2,6
3	0	3,6	1,5	1,7	1,8	1,5

При добавлении пирофосфата к $E \sim AMF$, содержащему триптофанил-аденилат, уровень аденилатов не меняется, как видно из приведенных данных. Это может объясняться либо кинетическими особенностями системы (равновесие нескольких реакций), либо отсутствием пирофосфоролиза аденилатов в данных условиях. Так как при любом из этих объяснений интерпретация опыта в отношении природы $E \sim AMF$ не меняется, мы в данной работе не выясняли причин наблюдающегося сохранения уровня аденилатов в присутствии ПФ.

Таким образом, накопление АТФ в опытах с пирофосфоролизом $E \sim AMF$ доказывает, что АМФ связана с ферментом макроэргической связью. Из контрольных опытов, здесь не приведенных, было показано, что после инкубации смеси ТРСазы, АМФ и ПФ с триптофаном или без него, как и следовало ожидать, АТФ не образуется.

Авторы благодарны А. А. Краевскому за ценные советы.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
5 IX 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ M. Hoagland, Biochim. et biophys. acta, 16, 288 (1955). ² P. Berg, J. Biol. Chem., 222, 1025 (1956). ³ А. А. Краевский, Л. Л. Киселев, Б. П. Готтих, Молекулярная биология, 7, № 5, 796 (1973). ⁴ О. О. Фаворова, Л. Л. Кочкина и др., Молекулярная биология, 8, № 4 (1974). ⁵ A. V. Parin, E. P. Saveliev et al., Studia Biophysica, 24/25, 391 (1970).