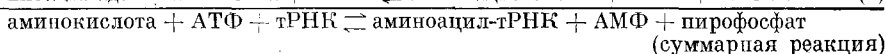
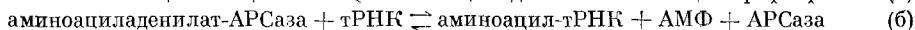
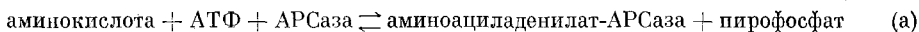


И. Г. СУРГУЧЕВА, А. П. СУРГУЧЕВ

РАЗДЕЛЕНИЕ ГЛИЦИНАКТИВИРУЮЩЕЙ И тРНК-АЦИЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИЙ ГЛИЦИЛ-тРНК-СИНТЕАЗЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 6 I 1975)

Аминоацил-тРНК-синтетазы (АРСаза), как известно, катализируют образование аминоацил-тРНК на первых этапах белкового синтеза. Эти ферменты устанавливают соответствие между аминокислотой и тРНК, определяя таким образом точность трансляции. Реакция аминоацилирования состоит из двух этапов — активации аминокислоты с образованием аминоксиладенилата (а) и переноса амноацильного остатка из аминоксиладенилата на соответствующую тРНК (б):



Очевидно, что раздельное изучение активирующей и аминоацилирующей функций АРСаз является удобным подходом для исследования механизма катализа, изучения структуры субстратсвязывающих участков АРСаз, решения проблемы «узнавания» в системе тРНК — АРСаза и т. д. В связи с этим предпринимались попытки получения монофункциональной АРСазы, активной лишь в одной реакции. Для этого использовали обработку нативного фермента химическими агентами, избирательно ингибирующими аминоацилирующую функцию АРСаз: *n*-хлормеркурийбензоатом ⁽¹⁾, 2-меркаптоэтанолом ⁽²⁾. Недостатком такого подхода является то, что модифицирующие агенты могут изменять пространственную структуру фермента, влиять на связывание низкомолекулярных субстратов (АТФ и аминокислоты) и т. п.

В настоящей работе показана возможность разделения активирующей и аминоацилирующей функций АРСазы с помощью иного подхода. Установлено, что функцию связывания низкомолекулярных субстратов (АТФ и аминокислоты) и активацию аминокислоты выполняют малые субъединицы глицил-тРНК-синтетазы.

Ранее ⁽³⁾ нами было показано, что глицил-тРНК-синтетаза (ГРСаза) из *Bacillus brevis* представляет собой тетрамер, состоящий из двух больших и двух малых субъединиц, аналогично ранее изученному ферменту из *Escherichia coli* той же специфичности ⁽⁴⁾. Молекулярный вес фермента равен 226 000. Эта форма ГРСазы, соответствующая структуре $\alpha_2\beta_2$, обозначенная нами как E_1 , активна в реакции аминоацилирования тРНК глицином, но не катализирует образования глицилгидроксаматов ⁽⁵⁾ (фракция 8, рис. 1), подобно глицил-тРНК-синтетазе из печени крысы ⁽⁶⁾. В то же время, активность в реакции образования глицилгидроксаматов обнаруживается в более «легкой» области сахарозного градиента (фракция 16, рис. 1). Фермент, катализирующий эту реакцию, обозначен нами как E_2 ; молекулярный вес его найден равным 66 000 ⁽⁷⁾. Как E_1 , так и E_2 обнаруживаются в неочищенных экстрактах *Bac. brevis* методами ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте (рис. 1) и другими методами ⁽⁸⁾. E_1 и E_2 были очищены нами до гомогенного состояния ⁽⁷⁾. Для очищенных ферментов E_1 и E_2 характерны принципиально те же каталитиче-

ские свойства, что и для неочищенных препаратов: E_1 катализирует реакцию аминокислирования и неактивен в реакции образования глицилгидроксаматов; E_2 стимулирует образование глицилгидроксамовых кислот и не обладает активностью в реакции образования глицил-тРНК. Возможные причины неактивности E_1 в реакции образования глицилгидроксаматов, а также влияние тРНК на активность E_1 в этой реакции рассмотрены нами ранее ⁽⁷⁾ с учетом работы ⁽⁸⁾.

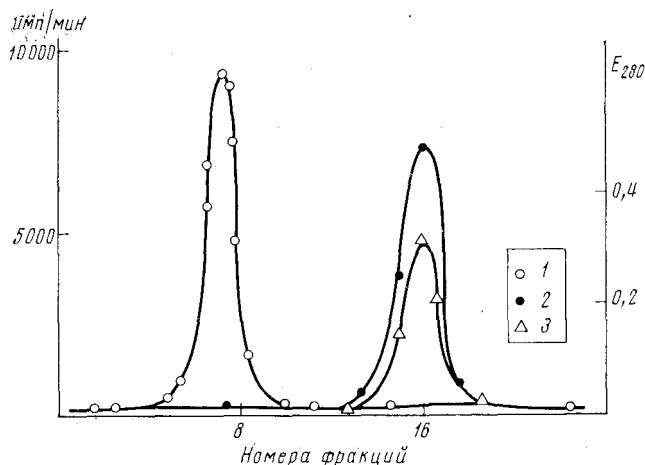


Рис. 1. Ультрацентрифугирование в градиенте концентрации сахарозы (5–20%) неочищенного экстракта *Bac. brevis*. 1 – активность ГРСазы *Bac. brevis* в реакции аминокислирования; 2 – ферментативная активность в реакции образования глицилгидроксаматов; 3 – бычий сывороточный альбумин (использован в качестве маркера)

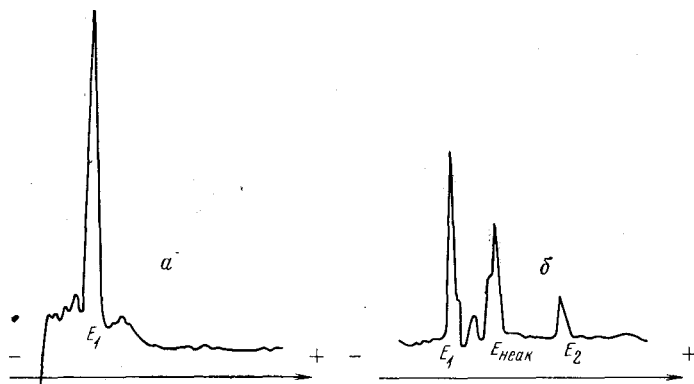


Рис. 2. Сканирование полиакриламидного геля. На 7% гель наносили 10 мкг очищенного препарата E_1 ; электрофорез проводили, как описано в работе ⁽⁷⁾. а – нативная форма E_1 ГРСазы, б – диссоциация E_1 при хранении препарата E_1 (4°, 10 дней)

Структурные исследования E_1 и E_2 показали ⁽⁷⁾, что E_1 является тетрамером со структурной формулой $\alpha_2\beta_2$, а E_2 – его компонентом, соответствующим формуле α_2 . Таким образом, из приведенных данных по каталитическим и структурным свойствам ГРСазы очевидно, что функцию связывания низкомолекулярных субстратов (АТФ и глицина) и активации аминокислоты способен выполнять относительно небольшой компонент ГРСазы, состоящий из двух малых субъединиц (E_2). Для отделения компонента ГРСазы, активирующего глицин (E_2), от молекулы тетрамера

(E_1) достаточно одной стадии гель-фильтрации или ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте.

Ранее (⁷) нами было показано, что помимо E_1 и E_2 в экстрактах *Vas. brevis* обнаруживается ферментативно неактивный компонент ГРСазы с молекулярным весом около 160 000, состоящий из двух, очевидно идентичных, субъединиц. При хранении разбавленного раствора очищенного препарата E_1 происходит диссоциация молекулы E_1 ($\alpha_2\beta_2$) на E_2 и $E_{неак}$ (рис. 2); подкисление исходного раствора сдвигает равновесие в сторону диссоциации. Исходя из структурных и каталитических данных ГРСазы *Vas. brevis* и ее компонентов (E_1 и $E_{неак}$), можно предположить, что каталитическому акту, в результате которого образуется глицил-тРНК, предшествует связывание молекулой E_2 низкомолекулярных субстратов — глицина и АТФ, независимое связывание молекулой $E_{неак}$ тРНК^{гли}, после чего следует ассоциация E_2 и $E_{неак}$ с образованием ферментативно активного тетрамера E_1 . После завершения каталитического акта и освобождения продуктов реакции происходит диссоциация тетрамера E_1 на E_2 и $E_{неак}$, после чего цикл может возобновиться. Следует подчеркнуть, что предложенный механизм функционирования ГРСазы является гипотетическим и основан на допущении, что *in vivo* присутствуют не только E_1 , но и оба обнаруженных нами *in vitro* компонента ГРСазы.

В заключение следует отметить, что в настоящей работе впервые установлена локализация участков, связывающих низкомолекулярные субстраты, на субъединицах определенного типа. Это расширяет наши представления о связи между структурой и функцией АРСаз, а также создает предпосылку для более детального изучения субстратсвязывающих участков фермента и механизма каталитического акта.

Авторы приносят благодарность Ж.-П. Валлеру и Л. Л. Киселеву за чтение рукописи и критические замечания.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
26 XI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. Cassio, *Europ. J. Biochem.*, v. 4, 222 (1968). ² А. В. Парин, Л. Л. Киселев, *Молекулярная биология*, т. 3, 639 (1969). ³ А. П. Сургучев, И. Г. Сургучева, *ДАН*, т. 218, № 4 (1974). ⁴ D. L. Ostrem, P. Berg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 67, 1967 (1970). ⁵ А. В. Парин, М. Р. Кузнецова, Л. Л. Киселев, *Биохимия*, т. 32, 735 (1967). ⁶ О. О. Фаворова, Т. Н. Спасокукоцкая, Л. Л. Киселев, *Молекулярная биология*, т. 2, 69 (1968). ⁷ А. Surguchev, I. Surgucheva, *Europ. J. Biochem.*, in press. ⁸ А. П. Сургучев, И. Г. Сургучева, *Биохимия*, т. 6, 1270 (1974). ⁹ O. Favorova, L. Kisselev, *FEBS Letters*, v. 6, 65 (1970).