

Н. А. КИСЕЛЕВ, В. Я. СТЕЛЬМАЩУК, И. Г. СУРГУЧЕВА,
А. П. СУРГУЧЕВ

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ГЛИЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ *BACILLUS BREVIS*

(Представлено академиком А. С. Спириным 5 IV 1976)

Аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют реакцию аминоацилирования тРНК соответствующей аминокислотой, выполняя важнейшую функцию на первых этапах биосинтеза белка. Эти ферменты, по существу, определяют точность и безошибочность трансляции, так как ошибка на уровне аминоацилирования уже не может быть исправлена в ходе синтеза белка на рибосоме. В связи с ключевой ролью этих ферментов в биосинтезе белка они активно изучаются с функциональной точки зрения: исследуется механизм и кинетика реакции, катализируемой аминоацил-тРНК-синтетазами, их взаимодействие с субстратами (и прежде всего, с тРНК), разрабатываются подходы к изучению активного центра этих ферментов и т. д. В то же время структурная характеристика аминоацил-тРНК-синтетаз ограничивается, как правило, данными по молекулярному весу и числу входящих в их состав субъединиц. Данные же по пространственной структуре и надмолекулярной организации аминоацил-тРНК-синтетаз весьма ограничены. В связи с этим попытки исследования кристаллов аминоацил-тРНК-синтетаз, а также кристаллических форм этих ферментов физическими методами представляются весьма перспективными⁽¹⁻⁴⁾.

Глицин-тРНК-синтетаза (из *Bacillus brevis*) катализирует образование глицил-тРНК, взаимодействуя при этом с тремя субстратами: глицином, АТФ и тРНК^{гли}. Образующаяся в реакции глицил-тРНК служит донором аминоацильного остатка в ходе трансляции в рибосоме. Глицил-тРНК-синтетаза (ГРС) была очищена из «грубых» экстрактов *Bacillus brevis* в 400 раз до гомогенного состояния, что подтверждалось данными электрофореза в полиакриламидном геле и аналитического центрифугирования. Методика очистки и характеристика полученного препарата описана нами ранее⁽⁵⁾.

Молекулярный вес ГРС найден равным 225 000. При диссоциации молекулы ГРС в присутствии додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле обнаруживаются два типа полипептидных цепей с молекулярным весом 81 000 и 30 000, присутствующих в эквимоларных количествах. В более мягких условиях молекула ГРС диссоциирует на два компонента с молекулярным весом около 160 000 и 66 000. На основании этих данных сделан вывод о том, что молекула ГРС состоит из двух малых и двух больших субъединиц⁽⁵⁾. Помимо такой функционально активной высокомолекулярной формы ГРС в бесклеточных экстрактах обнаружена относительно низкомолекулярная форма ГРС, катализирующая активацию глицина (активность определяли по накоплению меченых глицилгидроксаматов). Эта форма ГРС также была очищена до состояния, близкого к гомогенному и идентифицирована как компонент ГРС, состоящий из двух малых субъединиц. Из полученных данных по структуре ГРС можно сделать вывод, что эта аминоацил-тРНК-синтетаза принадлежит к относительно редкому типу высокомолекулярных аминоацил-тРНК-синтетаз, состоящих из субъединиц двух типов⁽⁵⁾. Ис-

следование аминоксил-тРНК-синтетаз, построенных из разных субъединиц, представляет особый интерес в связи с бифункциональной природой этих ферментов.

Контрастирование препаратов для электронной микроскопии осуществлялось негативным методом с использованием 2% раствора уранилацетата. Препараты исследовали в электронном микроскопе JEM-100В при ускоряющем напряжении 80 кв. На микрофотографиях можно наблюдать частицы двух основных типов: кольцеобразные и прямоугольные (рис. 1а, б). Кольцеобразные частицы обычно имеют несколько удлиненную форму: в одном направлении их размер 95—100 Å, в поперечном — на 10—15 Å уже (рис. 1а). В средней части они, судя по микрофотографиям, имеют полость, в которую проникает уранилацетат. Когда полость заполнена контрастером, она имеет очертания неправильной шестиконечной звезды. Эти очертания могут быть сформированы при наложении друг на друга двух треугольников со сторонами примерно $60 \times 60 \times 45$ Å. Наблюдается два варианта очертаний полости: 1) когда воображаемые треугольники накладываются друг на друга с поворотом примерно на 70° и 2) когда треугольники повернуты на 180° . В некоторых случаях, очевидно, когда контрастер заполняет лишь входные отверстия в полость, наблюдаются как бы только вершины треугольников, отмеченные точками контрастера. Значительно реже встречаются индивидуальные прямоугольные частицы размером около $80 \times (95-110)$ Å. При попытках кристаллизации ГРС по методу ⁽⁹⁾ прямоугольные частицы агрегировали, формируя длинные палочки, длина которых достигала 5000 Å (рис. 1б). Они укладывались бок о бок, образуя паракристаллические пачки. Иногда частицы такого типа кажутся состоящими из четырех субъединиц, расположенных по вершинам прямоугольника. В средней части у них также наблюдается полость, заполненная контрастером. Судя по размерам, наличию внутренней полости и другим признакам, шайбы и прямоугольники являются различными проекциями одних и тех же частиц фермента. Учитывая гомогенность препарата, а также сравнивая размеры частиц с размерами молекул сходного молекулярного веса и близких очертаний (например, глутаматдегидрогеназы ⁽⁷⁾), можно считать, что частицы являются отдельными молекулами.

Для трактовки наблюдаемых типов изображений молекул, и в частности характерных очертаний внутренней полости в их средней части, подходит модель, в которой шесть субъединиц располагаются с точечной группой симметрии 32 в вершинах двух антипараллельных треугольников (можно также сказать, что шесть субъединиц располагаются по вершинам трехгранной антипризмы, или неправильного октаэдра). Однако в молекуле ГРС не шесть субъединиц, а четыре. Как известно, в ГРС две больших субъединицы и две малых, вдвое меньшего молекулярного веса. Высказывались соображения ⁽⁶⁾ о том, что большие субъединицы (протомеры) некоторых аминоксил-тРНК-синтетаз построены из двух структурных «доменов», образованных из единой полипептидной цепи, состоящей из двух гомологичных участков. Высказывается предположение о том, что наиболее вероятным элементом симметрии, связывающим два структурных домена в протомере, является псевдоось симметрии 2-го порядка или псевдовинтовая ось. Исходя из этих представлений, можно предположить, что по вершинам каждого антипараллельного треугольника располагаются два «домена» большой субчастицы и одна малая. Если допустить, что расстояние между «доменами» внутри большой субчастицы меньше на 10—15 Å, чем расстояние «домен» — малая субчастица, то появляется возможность объяснить пропорции треугольников, наблюдаемых во внутренней полости, и вытянутость кольцеобразных частиц. Однако в этом случае нарушается точная антипараллельность в треугольниках, по вершинам которых располагаются «домены» и малые субчастицы. Такие сравнительно малые отклонения от истинной симметрии при описании биологических

структур Клуг ⁽⁸⁾ назвал псевдосимметрией. Таким образом, в предлагаемой модели молекулы ГРС располагаются с псевдосимметрией 32 по вершинам искаженной антипризмы, или неправильного октаэдра.

При просмотре вдоль псевдооси вращения третьего порядка (рис. 1а), модель молекулы выглядит как кольцеобразная частица, если учесть, что внутри нее имеется полость. Окончания субъединиц частично проникают в эту полость. Между субъединицами остаются «дырки», в которых может скапливаться контрастер. Если он дальше не проходит, то на изображениях наблюдаются пятна контрастера, образующие неправильный шестиугольник. Если же контрастер полностью заполняет полость, возникают очертания двух треугольников, повернутых примерно на 70°. Конфигурация полости смоделирована путем заполнения пустого пространства внутри модели пластелином, после чего модель была разобрана. Таким образом, мы получили возможность как бы наблюдать полость отдельно и в разных проекциях. На рис. 1а модель показана в трех разных проекциях. Рядом с ними приведены уменьшенные изображения модели, в средней части которых расположено изображение полости в соответствующих проекциях. На левом рис. 1а видно, что в изображении полости можно выделить как бы два треугольника, повернутых примерно на 70° по отношению друг к другу. На среднем рис. 1а показан второй вариант очертаний полости, когда треугольники повернуты на 180°. Когда модель просматривается поперек псевдооси 3-го порядка (правый рис. 1а), она имеет прямоугольные очертания и целый набор проекций внутренней полости, одна из которых показана на уменьшенном изображении модели. Выше отмечено, что молекулы ГРС формируют палочкообразные агрегаты из прямоугольных частиц. Из предлагаемой модели следует, что молекулы в этих агрегатах ориентированы псевдоосью 3-го порядка вдоль оси палочки (рис. 1 см. вкл. к стр. 192).

Четвертичная структура с точечной группой симметрии 32 предложена Джозефом для глутаматдегидрогеназы ⁽⁷⁾, фермента с молекулярным весом 312 000, состоящего из шести субъединиц. В цитированной работе наблюдались кольцеобразные структуры и прямоугольные частицы, в дополнение к этому были отмечены и крестообразные частицы. Вообще же точечная группа симметрии наиболее характерна для четвертичной структуры ферментов ⁽⁸⁾.

Авторы благодарны акад. А. С. Спирину и чл.-корр. АН СССР Б. К. Вайнштейну за постоянную помощь в работе.

Институт кристаллографии
им. А. В. Шубникова
Академии наук СССР
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Институт кардиологии им. А. Л. Мясникова
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
13 I 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. R. Reid, G. Z. Koch et al., J. Mol. Biol., v. 80, 199 (1973). ² H. H. Paradies, J. Biochem., v. 76, 655 (1974). ³ Л. Л. Куселев, О. О. Фаворова и др., ДАН, т. 199, 1178 (1971). ⁴ U. Lagerqvist, Z. Rymo et al., J. Biol. Chem., v. 12, 3897 (1972). ⁵ A. P. Surguchov, I. G. Surguchova, Europ. J. Biochem., v. 54, 175 (1975). ⁶ S. H. Kim, Nature, v. 256, 679 (1975). ⁷ R. Josepfs, J. Mol. Biol., v. 55, 147 (1971). ⁸ A. Klug, In: Nobel Symposium 11. Symmetry and Function of Biological Systems at the Macromolecular Level, Stockholm, 1970, p. 425. ⁹ J. P. Waller, J. L. Risler et al., FEBS Letters, v. 16, 186 (1971).

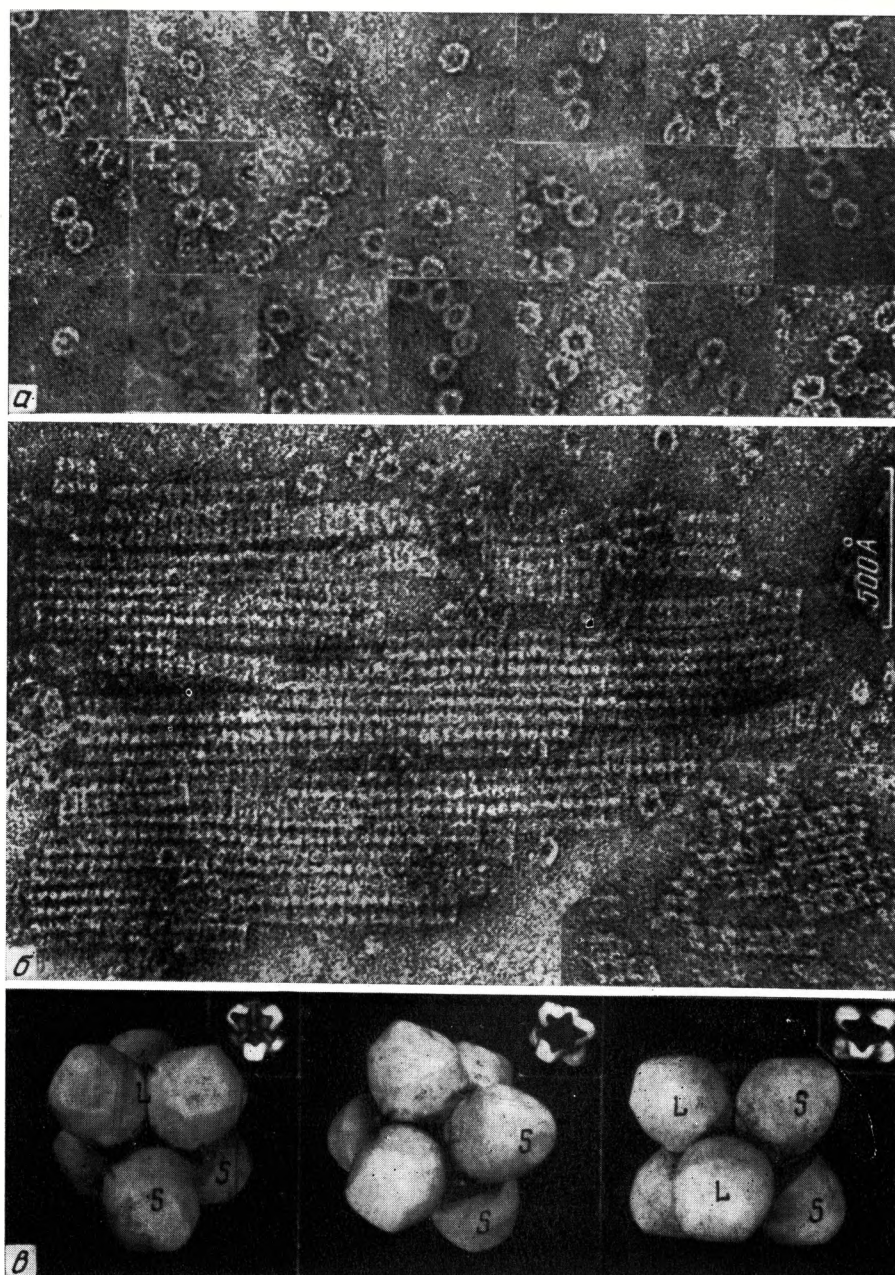


Рис. 1. Глицил-тРНК-синтетаза (ГРС). *а, б* — микрофотографии молекул ГРС. Контрастирование уранилацетатом. 400 000×: *а* — кольцообразные частицы; *б* — палочкообразные агрегаты из прямоугольных частиц и паракристаллы. *в* — модель молекулы ГРС, согласно которой большие субчастицы (*L*) состоят из двух структурных доменов, *S* — малая субчастица. Положение модели слева и на среднем снимке соответствует кольцообразным частицам, справа — прямоугольным. Над моделью показаны аналогичные уменьшенные фотографии с наложенными на них изображениями внутренней полости молекул в соответствующей проекции