



УДК 577.155.04

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ РИБОНУКЛЕАЗА C_2
ASPERGILLUS CLAVATUS

I. ФОТООКИСЛЕНИЕ И КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАНИЕ*

Грищенко В. М., Белецкая О. П., Безбородова С. И.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, Пущино

Изучено влияние фотоокисления и карбоксиметилирования бромацетатом па ферментативную активность РНКазы C_2 . Фотоинактивация в присутствии метиленовой синей и бенгальского розового сопровождается окислением двух остатков гистидина из трех, имеющих в нативной молекуле фермента. Ингибирование реакции фотоокисления аналогами субстрата позволило сделать вывод, что один или два остатка гистидина непосредственно входят в активный центр РНКазы C_2 . Зависимость инактивации РНКазы C_2 бромуксусной кислотой от рН свидетельствует об участии в реакции карбоксиметилирования функциональной группы с $pK \sim 4$. Этой группой, возможно, является β - или γ -карбоксил дикарбоновой аминокислоты. Реакция ингибируется аналогами субстрата, 2'(3')-GMP и 2'(3')-AMP. Рассматриваются данные, указывающие на возможность сходства в структуре активных центров ряда гуанилспецифичных рибонуклеаз.

Большинство известных в настоящее время гуанилспецифичных рибонуклеаз обладают небольшим молекулярным весом, довольно высокой стабильностью и могут быть сравнительно легко получены с высокой степенью чистоты. Поэтому рибонуклеазы этого типа являются весьма привлекательными объектами для исследования ферментов в сравнительно-эволюционном и структурно-функциональном аспектах, а также для изучения общих закономерностей процессов ферментативного катализа.

Внеклеточная гуанилспецифичная рибонуклеаза C_2 *Aspergillus clavatus* (КФ 3.1.4.8) была выделена и описана Безбородовой и соавт. [1]. Сравнение ее некоторых физико-химических свойств и аминокислотного состава с аналогичными характеристиками рибонуклеаз T_1 *Aspergillus oryzae* [2], N_1 *Neurospora crassa* [3], U_1 *Ustilago sphaerogena* [3], *Aspergillus fumigatus* [4], *Penicillium chrysogenum* [5], *Penicillium claviforme* [5], *Chalaropsis species* [6] позволило выявить некоторые общие черты этой группы ферментов: M 10 000—12 000, близкие значения изоэлектрической точки и оптимума рН, высокую термостабильность, наличие двух дисульфидных связей, весьма близкое содержание остатков гистидина, дикарбоновых аминокислот, тирозина и ряда других аминокислот.

Значительный интерес представляет исследование роли функциональных групп аминокислот, существенных для проявления каталитических свойств гуанилспецифичных рибонуклеаз. Наиболее изученной в этом отношении является рибонуклеаза T_1 *Aspergillus oryzae* [2].

* Результаты данной работы были доложены на I Международном симпозиуме по рибосомам и метаболизму РНК (Смоляницы, Чехословакия).

Таблица 1

Аминокислотный состав фотоокисленной РНКазы С₂ (моль на моль-белка)

Аминокислоты	Контроль	Сенсибилизатор			
		метиленовая синяя *		бенгальский розовый **	
Trp	1	Не определяли	Не определяли	0,6	Не определяли
Lys	1	1	(1)	1	(1)
His	3	1	(3)	1	(3)
Arg	3	3	(3)	3	(3)
Asp	11	11	(11)	11	(12)
Thr	3	3	(4)	3	(3)
Ser	13	14	(14)	13	(14)
Glu	6	6	(6)	6	(6)
Pro	4	5	(4)	5	(5)
Gly	14	14	(14)	14	(13)
Ala	8	8	(8)	8	(8)
Val	4	5	(5)	4	(5)
Met	0	0	(0)	0	(0)
Ile	2	2	(2)	2	(2)
Leu	4	3	(4)	4	(4)
Tyr	10	9	(9)	9	(9)
Phe	3	3	(3)	3	(3)

* В скобках приведены результаты фотоокисления в присутствии 2'(3')-АМР.

** В скобках приведены результаты фотоокисления в присутствии 2'(3')-ГМР.

Таблица 2

Фотоинактивация РНКазы С₂ (%) в присутствии 2'(3')-мононуклеотидов

Нуклеотид	Сенсибилизатор	
	метиленовая синяя *	бенгальский розовый **
Без нуклеотида	87	100
GMP	15	12
AMP	12	44
UMP	77	70
CMP	79	85

* Облучение в течение 1 ч.

** Облучение в течение 15 мин.

Настоящая работа посвящена изучению влияния реакций фотоокисления и карбоксиметилирования на ферментативную активность рибонуклеазы С₂. Окисление в присутствии фотосенсибилизаторов и алкилирование моногалогидпроизводными уксусной кислоты широко применяются в настоящее время для исследования функциональных групп ферментов [7]. Эти приемы были успешно использованы в изучении структуры активного центра рибонуклеазы Т₁ [8, 9].

Фотоокисление РНКазы С₂ проводили в присутствии фотосенсибилизаторов метиленовой синей и бенгальского розового (рис. 1). Общая интенсивность процесса в присутствии бенгальского розового выше [10]. Несмотря на различие в скоростях фотоинактивации фермента с метиленовой синей и бенгальским розовым, характер зависимости от pH в обоих случаях одинаков; обе кривые имеют перегиб в области pH 6,5—7,0.

Сравнение полученных нами данных с зависимостью фотоокисления от pH для РНКазы Т₁ *Aspergillus oryzae* [11] и РНКазы U₁ *Ustilago spheae-*

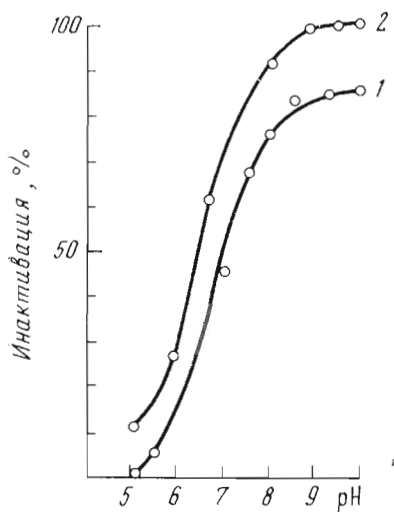


Рис. 1

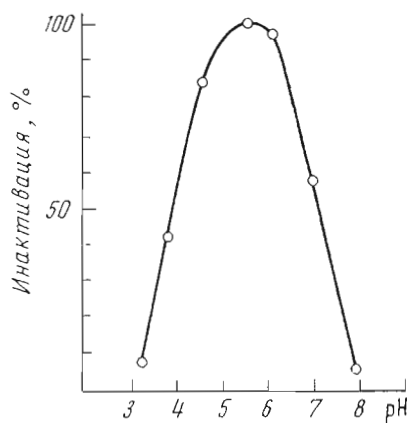


Рис. 2

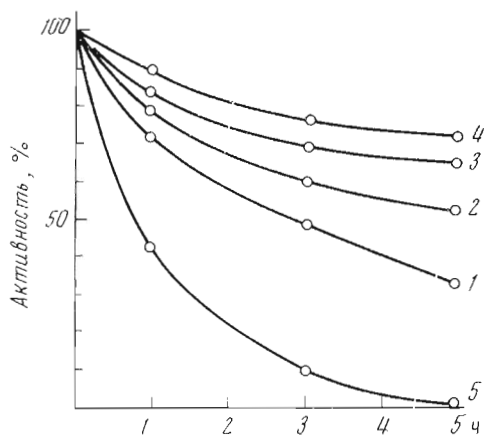


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость фотоинактивации РНКазы C_2 от pH: 1 — с метиленовой синей (время реакции — 1 ч), 2 — с бенгальским розовым (время реакции — 15 мин)

Рис. 2. Влияние pH на инактивацию РНКазы C_2 бромуксусной кислотой (время реакции — 3 ч)

Рис. 3. Инактивация РНКазы C_2 бромуксусной кислотой в присутствии 2'(3')-CMP (1), 2'(3')-UMP (2), 2'(3')-GMP (3), 2'(3')-AMP (4) и в отсутствие мононуклеотидов (5)

rogena [12] показывает значительное сходство этих трех ферментов и позволяет предположить, что в реакцию вовлечены функциональные группы с рК 6,0—7,0, которые, возможно, относятся к имидазольным группам гистидина. Подобие зависимости фотоокисления свободного гистидина от pH [10] с таковой для РНКазы C_2 подтверждает возможность такого предположения.

С целью проверки правильности этого предположения был определен аминокислотный состав образцов РНКазы C_2 , инактивированных в присутствии метиленовой синей и бенгальского розового (табл. 1). Как следует из приведенных выше результатов, при фотоинактивации в присутствии указанных выше красителей происходит окисление двух остатков гистидина из трех, имеющих в нативной молекуле фермента; при этом наблюдается практически полная потеря активности РНКазы C_2 .

Наряду с окислением остатков гистидина в процессе фотоинактивации наблюдается также уменьшение содержания триптофана (до 0,6 моль на моль белка). Однако меньшая скорость фотоокисления триптофана по сравнению с гистидином и довольно хорошее сохранение его в полностью инактивированном ферменте (до 60% от исходного содержания) дают

основание предположить, что единственный остаток триптофана не вовлечен непосредственно в процесс фотоинактивации РНКазы C_2 .

Некоторые расхождения в аминокислотном составе нативной и фотоокисленной РНКазы C_2 можно объяснить неполнотой кислотного гидролиза и отсутствием поправки на гидролитическое разрушение аминокислот.

Фотоокисление РНКазы C_2 в присутствии 2'(3')-мононуклеотидов, аналогов субстрата, показало, что они предотвращают инактивацию фермента, однако эффективность защиты разными нуклеотидами неодинакова (табл. 2). По степени влияния на процесс фотоинактивации мононуклеотиды можно расположить в следующий ряд: 2'(3')-AMP \geq 2'(3')-GMP $>$ 2'(3') UMP $>$ 2'(3')-CMP (фотоокисление с метиленовой синей), 2'(3')-GMP $>$ 2'(3')-AMP $>$ 2'(3')-UMP $>$ 2'(3')-CMP (фотоокисление с бенгальским розовым).

Эффективность защиты нуклеотидами находится в соответствии со специфичностью РНКазы C_2 , расщепляющей молекулы РНК преимущественно по связям, образованным гуаниловыми нуклеотидами. Аминокислотный состав РНКазы C_2 , фотоокисленной в присутствии 2'(3')-GMP и 2'(3')-AMP (табл. 1), существенно не отличается от такового для нативного фермента.

Суммируя изложенные выше экспериментальные данные, можно сделать вывод, что один или два имидазола гистидина непосредственно входят в активный центр РНКазы C_2 , возможно участвуя в связывании субстрата и (или) в каталитическом акте. Третий остаток гистидина сохраняется в полностью инактивированном ферменте и, вероятнее всего, не имеет существенного значения для каталитических функций. Недоступность этого остатка гистидина процессу фотоокисления, возможно, обусловлена либо специфическим зарядовым окружением, снижающим его реакционную способность, либо такой ориентацией соседних боковых групп, которая создает стерические препятствия для данной реакции. Можно предположить также, что единственный остаток триптофана не вовлечен в ферментативные функции РНКазы C_2 , однако не исключена возможность участия триптофана в формировании структуры активного центра.

Полученные нами данные во многом аналогичны результатам фотоокисления РНКазы T_1 *Aspergillus oryzae* [8, 11, 13] и РНКазы U_1 *Ustilago sphaerogena* [12]. Это в свою очередь наводит на мысль о сходстве в строении активных центров этих трех ферментов.

Как уже упоминалось выше, алкилирование моногалоидпроизводными уксусной кислоты широко используется в изучении функциональных групп ферментов. Для дальнейшего исследования реакционной способности функциональных групп РНКазы C_2 нами было проведено изучение реакции карбоксиметилирования монобромуксусной кислотой. На рис. 2 показана зависимость инактивации РНКазы C_2 бромуксусной кислотой от рН. Максимальная инактивация фермента наблюдалась при рН 5,5. Из представленной зависимости от рН следует, что в реакции карбоксиметилирования, по-видимому, участвуют функциональные группы с значениями $pK \sim 4$ и 7. Аналогичные зависимости карбоксиметилирования от рН известны для РНКазы T_1 *Aspergillus oryzae* [14], РНКазы U_1 *Ustilago sphaerogena* [15], РНКазы *Aspergillus fumigatus* [14] и РНКазы *Chalaropsis species* [6].

В дальнейшем реакция карбоксиметилирования РНКазы C_2 проводилась при рН 5,5. С целью идентификации остатков аминокислот, модифицированных бромуксусной кислотой, был определен аминокислотный состав инактивированного производного РНКазы C_2 (табл. 3). На основании приведенных в табл. 3 данных можно сделать вывод, что карбоксиметилирование не приводит к количественному изменению аминокислотного состава фермента, не обнаружено также новых соединений, дающих

Аминокислотный состав карбоксиметилированной РНКазы С₂

Аминокислоты	Количество остатков, моль на моль белка		Аминокислоты	Количество остатков, моль на моль белка	
	модифицированная РНКазы С ₂	контроль		модифицированная РНКазы С ₂	контроль
Lys	1	1	Gly	14	14
His	3	3	Ala	8	8
Arg	3	3	Val	5	5
Asp	11	11	Met	0	0
Tbr	4	3	Ile	2	2
Ser	14	13	Leu	4	4
Glu	6	6	Tyr	9	10
Pro	4	4	Phe	2	3

Таблица 4

Влияние мочевины на инактивацию РНКазы С₂ бромцетатом (время реакции 3,5 ч)

Концентрация мочевины, М	Остаточная активность РНКазы С ₂ , %	Концентрация мочевины, М	Остаточная активность РНКазы С ₂ , %
0	1	6	74
2	2	8	80
4	26		

положительную реакцию с нингидрином. Исключение вероятности модификации остатков гистидина вполне правомерно, так как в противном случае следовало бы ожидать уменьшения количественного содержания гистидина и появления новых соединений — карбоксиметильных производных гистидина, что, например, показано для панкреатической РНКазы А [16].

Такахаши, Штейн и Мур [9] обнаружили, что при инактивации РНКазы Т₁ йодуксусной кислотой при pH 5,5 идет этерификация γ-карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты-58, сопровождающаяся образованием соответствующего эфира, который разлагается в условиях кислотного гидролиза до гликолевой кислоты, не взаимодействующей с нингидрином. Авторы отметили также, что реакция специфического алкилирования карбоксильных групп маловероятна при pH, близком к нейтральной области, и требует особого конформационного окружения, создающего повышенную реакционную способность карбоксильной группы.

В связи с этим значительный интерес представляет исследование влияния третичной структуры фермента на реакцию карбоксиметилирования. При обработке РНКазы С₂ бромуксусной кислотой в присутствии мочевины (табл. 4) мы выяснили, что в 2 и 4 М растворах мочевины, где практически нет денатурации или она незначительная [17], карбоксиметилирование приводит к почти полной инактивации РНКазы С₂, как и в случае проведения реакции в водном растворе. При использовании 6 и 8 М растворов мочевины, обратимо денатурирующих РНКазу С₂, обработка фермента бромуксусной кислотой не сопровождается значительным изменением активности, т. е., вероятнее всего, в этих условиях реакция карбоксиметилирования не идет. По-видимому, разворачивание молекулы РНКазы С₂ в 8 М растворе мочевины препятствует модификации функциональной группы с $pK \sim 4$. Это свидетельствует о том, что функциональная группа, участвующая в карбоксиметилировании, обладает уникаль-

ной реакционной способностью лишь в нативной конформации молекулы, а также подтверждает специфичность реакции карбоксиметилирования.

Как и при фотоокислении, аналоги субстрата подавляют реакцию РНКазы C_2 с бромуксусной кислотой. Из рис. 3 видно, что по степени эффективности ингибирования реакции мононуклеотиды располагаются в следующем порядке: $2'(3')\text{-AMP} \geq 2'(3')\text{-GMP} > 2'(3')\text{-UMP} > 2'(3')\text{-CMP}$. И в данном случае эффект защиты аналогами субстрата хорошо согласуется со специфичностью действия РНКазы C_2 и еще раз подтверждает, что в реакцию карбоксиметилирования вовлечены функциональные группы активного центра.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные о карбоксиметилировании РНКазы C_2 , а именно: зависимость инактивации от рН, аминокислотный состав карбоксиметильного производного фермента, эффект ингибирования реакции пуриновыми нуклеотидами — практически идентичны аналогичным результатам карбоксиметилирования рибонуклеаз T_1 *Aspergillus oryzae* [9, 14], U_1 *Ustilago sphaerogena* [15], *Aspergillus fumigatus* [4], *Chalaropsis species* [6]. На основании этого естественно предположить, что в активном центре этих гуанилспецифичных рибонуклеаз локализована функциональная группа с рК в области 4—5, имеющая существенное значение для каталитических функций. Вероятнее всего, что и в РНКазе C_2 такой группой является β - или γ -карбоксил дикарбоновой аминокислоты, что уже было показано для рибонуклеаз T_1 *Aspergillus oryzae* [9, 14], U_1 *Ustilago sphaerogena* [15], *Aspergillus fumigatus* [4], *Chalaropsis species* [6].

Экспериментальная часть

РНКазы C_2 получена по ранее описанному методу [1]. Активность фермента определяли спектрофотометрически [18]. Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот ААА 881 (Чехословакия), используя ускоренный метод Спакмана, Штейна и Мура [19]. Образцы белка гидролизовали трижды перегнанной 6 н. НСl при 110° в течение 24 ч в ампулах, запаянных в вакууме.

Количество остатков аминокислот в модифицированных образцах и в нативной РНКазе C_2 (контроль) рассчитывали по аминокислотному анализу 24-часового гидролизата, принимая количество аргинина равным 3 моль на моль белка. Поправки на разрушение аминокислот и на скорость их выщепления при гидролизе не вводили.

Количество триптофана в РНКазе C_2 определяли по методу Списа и Чамберса [20], цистин не определяли. Фотоокисление РНКазы C_2 проводили по методу, описанному Ирие [11] и Такахаши [13]. Реакционная смесь состояла из 2 мл трис-ацетатного или трис-НСl буфера с различными рН, содержащего фермент, метиленовую синюю или бенгальский розовый в конечных концентрациях 0,03—0,05, 0,03 и 0,005% соответственно. Раствор облучали при 22° лампой накаливания мощностью 500 Вт с высоты 20 см. Через определенные интервалы времени отбирали аликваты для определения ферментативной активности. Все последующие опыты проводили при рН 7,5. Влияние аналогов субстрата (2'(3')-мононуклеотидов) на фотоокисление РНКазы C_2 изучали в присутствии их 1000-кратного молярного избытка.

С целью препаративного получения фотоокисленной РНКазы C_2 раствор 2 мг фермента, 0,5 мг метиленовой синей или 0,05 мг бенгальского розового и 4 мг 2'(3')-АМР или 2'(3')-ГМР в 2 мл 0,2М трис-НСl буфера (рН 7,5) обрабатывали в указанных выше условиях. Затем реакционную смесь пропускали через колонку с сефадексом G-25 ($1,8 \times 10$ см), предварительно промытую бидистиллированной водой, элюцию белка вели также бидистиллятом.

Карбоксиметилирование РНКазы C_2 бромуксусной кислотой проводили, как описано в работе Такахаши [14]. Реакционную смесь объемом

1 мл, содержащую 0,06 мг фермента, 18 мг бромуксусной кислоты в 0,2 М трис-ацетатном или трис-HCl буфере с различными рН, инкубировали при 37°, отбирая через определенные интервалы времени аликвоты для определения активности фермента. Все последующие опыты проводили при рН 5,5. Для изучения эффекта ингибирования реакции использовали 1000-кратный молярный избыток 2'(3')-моонуклеотидов. Для препаративного получения карбоксиметильного производного РНКазы C_2 в описанных выше условиях обрабатывали реакционную смесь, содержащую 1,5 мг белка и 15 мг бромацетата в 3 мл 0,2 М трис-ацетатного буфера, рН 5,5. Избыток бромацетата удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (0,9 × 15 см), элюцию вели бидистиллированной водой.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность Н. С. Феофановой за большую помощь в выполнении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозова В. Г., Грищенко В. М., Безбородова С. И. (1972) Изв. АН СССР. Сер. биол., 865—871.
2. Uchida T., Egami F. (1971) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed) vol. 4, pp. 205—250.
3. Hashimoto J., Uchida T., Egami F. (1970) *J. Biochem.*, 70, 903—911.
4. Glitz D. G., Angel L., Eichler D. C. (1972) *Biochemistry*, 11, 1746—1754.
5. Безбородова С. И. (1974) в сб. *Нуклеазы микроорганизмов* (под ред. Безбородова А. М.), стр. 224—228, «Наука», М.
6. Fletcher P. L., Nash J. H. (1972) *Biochemistry*, 11, 4274—4285.
7. Means G. E., Feeney R. E. (1971) *Chemical Modification of Proteins*, p. 105—110, 165—169, Holden-Day, Inc., San-Francisco.
8. Takahashi K. (1971). *J. Biochem.*, 69, 331—338.
9. Takahashi K., Stein W. H., Moore S. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 4682—4690.
10. Кобылянская К. Р., Кочетов Г. А. (1971) в сб. *Успехи биологической химии* (под ред. Степаненко Б. Н.), т. 12, стр. 97—118, «Наука», М.
11. Irie M., (1970) *J. Biochem.*, 68, 69—79.
12. Hashimoto J., Takahashi K., Uchida T. (1973) *J. Biochem.*, 73, 13—22.
13. Takahashi K. (1970) *J. Biochem.*, 67, 833—839.
14. Takahashi K. (1970) *J. Biochem.*, 68, 517—527.
15. Kenney W. C., Dekker C. A. (1971) *Biochemistry*, 10, 4962—4970.
16. Heinrikson R. L. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 1393—1405.
17. Морозова В. Г., Безбородова С. И. (1973) *Научн. докл. высш. школы. Биол. н.*, 100—105.
18. Безбородова С. И., Бородаева Л. И., Панкова Л. Н. (1968) *Микробиология*, 37, 10—14.
19. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) *Anal. Chem.*, 30, 1190—1206.
20. Spies J. R., Chambers D. C. (1949) *Anal. Chem.*, 21, 1249—1257.

Поступила в редакцию
18.III.1975

EXTRACELLULAR RIBONUCLEASE C_2 FROM *ASPERGILLUS CLAVATUS*. PHOTO-OXIDATION AND CARBOXYMETHYLATION

GRISHCHENKO V. M., BELETSKAYA O. P., BEZBORODOVA S. I.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The effect of photo-oxidation and carboxymethylation on the RNase C_2 activity has been studied. Photoinactivation in the presence of methylene blue and rose bengal results in the selective oxidation of two of the three His residues of the native enzyme, the process being inhibited by the nucleotide substrate analogs. This allowed the conclusion to be made that one or two His residues might be at the active site of RNase C_2 . The pH dependence of the enzyme inactivation with bromoacetic acid indicates the contribution of the group with pK_a 4.0 which may be β - or γ -carboxyl group of dicarboxylic amino acid. The reaction is inhibited by the substrate analogs 2'(3')GMP and 2'(3')AMP. The possible homology between the active site structures of some RNases is discussed.