



УДК 577.150.7

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРИПТОФАНИЛ-ФЕРМЕНТА, ПОЛУЧЕННОГО ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ АКТИВНОГО ТРИПТОФАНИЛИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ

Мороз С. Г., Краусе Р, Ковалева Г. К.,
Фаворова О. О.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

При денатурации активного триптофанилированного производного триптофанил-ТРНК-синтетазы в 8 М мочеvine происходит медленный перенос триптофанильного остатка с карбоксильной группы белковой молекулы на другую группу фермента с заменой кислотолabileй связи на кислотостабильную. Полученное триптофанил-ферментное производное реагирует с гидроксиламином с образованием триптофанил-гидроксиамата, лабильно при щелочных рН и при окислении надмуравьиной кислотой. Химические свойства полученного производного свидетельствуют о том, что основной функциональной группой белка, акцептирующей в ходе денатурации триптофанильный остаток, является SH-группа. Методом диагонального электрофореза из триптического гидролизата выделен цистеинсодержащий пептид, с которым связан триптофанильный остаток, и установлен его аминокислотный остаток.

Триптофанил-ТРНК-синтетаза (триптофан: ТРНК-лигаза, АМР-образующая, КФ 6.1.1.2) является одним из ключевых ферментов белкового синтеза и катализирует реакцию триптофанилирования специфической ТРНК с использованием энергии расщепления АТФ. Мы разработали эффективный метод выделения высокоочищенной триптофанил-ТРНК-синтетазы из поджелудочной железы крупного рогатого скота [1] и показали, что полученный препарат является триптофанилированным ферментом [2, 3]. Остаток триптофана в этом соединении активирован — он может обмениваться на свободный триптофан, но не на другие аминокислоты, реагировать с гидроксиламином с образованием триптофанил-гидроксиамата и специфически аминоацилировать ТРНК^{Trp} в отсутствие АТФ [3]. Было установлено, что триптофанильный остаток в триптофанил-ферменте связан ангидридной связью с карбоксильной группой белка [4].

При денатурации с помощью 8 М мочевины или 1% додецилсульфата натрия [¹⁴C]триптофанил-фермента, полученного в результате замены нерадиоактивного триптофанильного остатка радиоактивным, ¹⁴C-метка остается связанной с белковой молекулой [2, 3]. Целью настоящей работы было выяснение характера связи между триптофаном и молекулой триптофанил-ТРНК-синтетазы после денатурации триптофанил-фермента.

В табл. 1 представлены некоторые свойства денатурированного [¹⁴C]триптофанил-фермента. В отличие от нативного триптофанил-фермента, нестабильного в 5%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) [3], в денату-

* Постоянный адрес: Институт биохимии растений, Халле (Заале), ГДР.

Некоторые свойства денатурированного [^{14}C]триптофанил-фермента

Метод регистрации *	Условия предшествующей обработки	Связанный с белком [^{14}C]триптофан, имп/мин
Удерживание на нитроцеллюлозных фильтрах HUF5	—	16000
Осаждение 5%-ной ТХУ	—	14300
»	0,25 М трис-НСl-буфер (рН 9), 15 мин, 37°	3000
»	0,25 М КОН, 5 мин, 4°	650
»	0,7 М NH_2OH , 15 мин, 37°	200
»	$\text{HCOOH}+30\% \text{H}_2\text{O}_2$ (1:10 по объему), 8 ч, 4°	4500
»	0,5 М меркаптоэтанол, 12 ч, 4°	7000

* Нитроцеллюлозные фильтры HUF5 после сорбции на них белка промывали 20 мл 0,02 М К-фосфатного буфера, рН 7,5. Осадки белка после добавления ТХУ промывали на фильтрах АUF5 20 мл 3% ТХУ. При окислении надмуравьиной кислотой в качестве контроля использовали пробы, к которым вместо перекиси добавляли равный объем воды.

Таблица 2

Образование [^{14}C]триптофанилгидроксаматов при реакции денатурированного [^{14}C]триптофанил-фермента с гидроксилмином

Гидроксил-амин, М	[^{14}C]триптофанил-фермент, пмоль	Выход [^{14}C]триптофанилгидроксамата	
		пмоль	%
0,7	36	32	89
1,4	36	33	92
2,8	36	32	89

рированной триптофанил-тРНК-синтетазе [^{14}C]триптофанильный остаток остается количественно связанным с белком при осаждении трихлоруксусной кислотой. В то же время эта связь характеризуется лабильностью при щелочных рН (табл. 1, рис. 1).

Обработка денатурированного [^{14}C]триптофанил-фермента гидроксилмином приводит к освобождению радиоактивной метки (табл. 1). Полученный при этом радиоактивный продукт идентифицировали как [^{14}C]триптофанилгидроксамат сравнением его по подвижности на СМ-целлюлозной бумаге с синтезированным триптофанилгидроксаматом. Количественное определение образовавшегося [^{14}C]триптофанилгидроксамата проводили с помощью метода сорбции на дисках СМ-целлюлозной бумаги, предложенного в работе [5] (табл. 2).

Наблюдаемые свойства денатурированного комплекса триптофана с ферментом позволили предположить, что связь между ферментом и триптофанильным остатком может быть сложноэфирной или ацилтиоэфирной. Известно, что ацилтиоэфиры окисляются надмуравьиной кислотой до соответствующих сульфоновых кислот с освобождением карбоновых кислот [6]. Поэтому разрушение различных ацилферментов при окислении надмуравьиной кислотой используется для доказательства того, что ацильная группа ковалентно связана с тиоловой группой белковой молекулы [7–10]. Освобождение триптофана при обработке надмуравьиной кислотой [^{14}C]триптофанил-фермента, выделенного в денатурирующих условиях (табл. 1), показывает, что после денатурации триптофанильный остаток связан с триптофанил-тРНК-синтетазой ацилтиоэфирной связью. Инкубация триптофанил-фермента с 0,5 М меркапто-

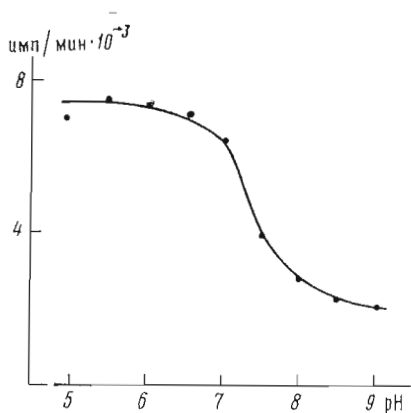


Рис. 1

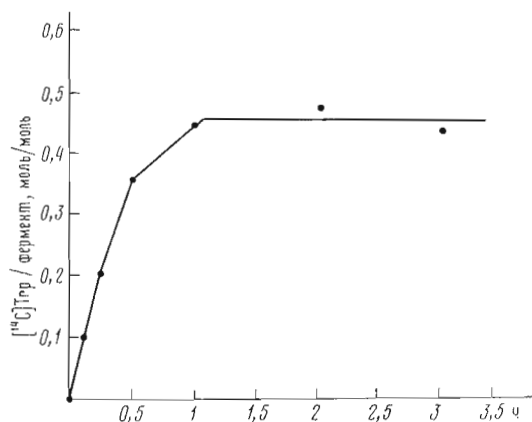


Рис. 2

Рис. 1. pH-Стабильность денатурированного [¹⁴C]триптофанил-фермента. Пробы инкубировали 5 мин при 4° в 0,5 М Na-ацетатном (pH 5,0–6,5), K-фосфатном (pH 7,0–8,5) или трис-HCl (pH 9) буферах. Белок осаждали добавлением равного объема 10% ТХУ и промывали на фильтрах 3% ТХУ

Рис. 2. Кинетика образования стабильного при осаждении ТХУ денатурированного [¹⁴C]триптофанил-фермента. Триптофанил-гРНК-синтезазу (0,13 мкМ) инкубировали с [¹⁴C]триптофаном (1,3 мкМ) (см. «Эксперимент. часть») и выдерживали в 8 М мочеvine при 25°. Аликвоты, отобранные в разное время, обрабатывали как в подлиси к рис. 1

этанолом приводит к медленному освобождению [¹⁴C]триптофана из белковой фракции (табл. 1), что свидетельствует о переносе ацильной группы на SH-группу меркаптоэтанола за счет реакции трансацилирования.

Следует отметить, однако, что в денатурированном триптофанил-ферменте присутствует устойчивая при щелочных значениях pH фракция (см. табл. 1, рис. 1), доля которой достигала для некоторых препаратов фермента 20%. Соответственно мы не могли получить для таких препаратов полного освобождения триптофанильного остатка при обработке надмуравьиной кислотой. Это означает, что акцепторами триптофанильного остатка наряду с SH-группой цистеина могут быть и другие функциональные группы белковой молекулы.

На рис. 2 представлена кинетика переноса аминокислотного остатка в ходе инкубации нативного триптофанил-фермента в мочеvine, измеряемая по превращению ТХУ-лабильного соединения в ТХУ-стабильное. Образование ацилтиоэфира происходит достаточно медленно, завершаясь в течение 1 ч при 25°. Фактором, лимитирующим скорость переноса, является, по-видимому, медленно происходящее разрушение нативной конформации белковой молекулы. В пользу этого предположения свидетельствует другой наблюдавшийся нами факт, что при инкубации в мочеvine триптофаниладенилат-ферментного комплекса его разрушение происходит со скоростью, близкой к скорости переноса триптофанильного остатка в триптофанил-ферменте. В результате денатурации может происходить как пространственное сближение реакционно-способной тиоловой группы с карбоксильной группой, несущей триптофанильный остаток, так и повышение реакционной способности близко расположенной тиоловой группы за счет уменьшения ее рK_a, как это наблюдалось при денатурации альдолазы [11].

Пептид, содержащий SH-группу, акцептирующую триптофанильный остаток при денатурации, был выделен из триптического гидролизата методом диагонального электрофореза после окисления надмуравьиной кислотой, как было предложено для выделения цистинсодержащих пептидов

(12). Определен аминокислотный состав пептида: (2 Asx, Thr, Ser, Pro, Glx, Val, Ala, Gly (Cys-SO₃H, 2Leu)-Lys.

Для ряда ферментов тиоэфирное соединение с субстратом является истинным промежуточным в катализируемой реакции [7—10, 13]. В случае аминоксил-тРНК-синтетаз была теоретически постулирована возможная роль SH-группы белковой молекулы в образовании активного промежуточного аминоксил-фермента, переносящего активированную аминокислоту на специфическую тРНК [14, 15].

В отличие от нативного триптофанил-фермента [2, 3] триптофанил-фермент, инкубированный в 8 М мочевины и затем диализованный против буфера без мочевины, не способен переносить триптофан на тРНК^{Trp}. Однако, поскольку триптофанил-тРНК-синтетаза после такой обработки теряет активность в реакциях АТР-[³²P]пирофосфатного обмена и аминокислотирования тРНК, отсутствие прямого переноса триптофана на тРНК^{Trp} не исключает возможного участия SH-группы, связывающей триптофан, в катализе образования триптофанил-тРНК.

Против каталитической роли SH-групп триптофанил-тРНК-синтетазы могут свидетельствовать, однако, опыты по алкилированию цистеиновых остатков N-этилмалеимидом. Наблюдаемая при этом инактивация фермента обусловлена диссоциацией белка на неактивные субъединицы за счет химического блокирования SH-групп, ответственных за поддержание димерной структуры [16].

В то же время в опытах с N-этилмалеимидом выявлен цистеиновый остаток, по-видимому, близкий к месту связывания триптофана, так как его модификация приводит к увеличению K_m для триптофана, не изменяя значения K_m для других субстратов [17]. Можно полагать, что триптофанильный остаток функционально активного триптофанил-ферментного производного, занимающий субстратсвязывающий центр фермента [3], переносится при денатурации именно на эту расположенную в непосредственной близости от активного центра SH-группу. В таком случае перенос в ходе денатурации активированного триптофанильного остатка на близлежащую SH-группу можно использовать как подход к исследованию активного центра триптофанил-тРНК-синтетазы или его окружения, по существу близкий к аффинной модификации.

Экспериментальная часть

В работе использовали L-[метилен-¹⁴C]триптофан (52 Ки/моль) (Amersham, Англия), дитиотреит (Reanal, Венгрия), сефадекс G-50 (тонкий, Pharmacia, Fine Chemicals, Швеция), CM-целлюлозную бумагу CM 82 и бумагу ЗММ (Whatman, Англия), цетилтриметиламмонийбромид (цетавлон), нитроцеллюлозные фильтры АУФС и НУФС (Chemarol, ЧССР), угольные фильтры (Ederol, ФРГ), трипсин TRTPCK (PL, США), пластины для ТСХ Silufol UV₂₅₄ (Cavalier, ЧССР). Раствор мочевины деионизовали на колонках с дауэксом 50 и дауэксом 1 и, в случае необходимости, высушивали на роторном испарителе.

Гидроксиламины получали по методу [18] из его хлоргидрата, перекристаллизованного с версеном. Концентрацию гидроксиламина определяли с 8-оксихинолином [19]. Триптофанилгидроксамат получали по методу [20]. Обогащенный препарат тРНК^{Trp} из дрожжей с акцепторной активностью 620 пмоль на 1 ОЕ₂₆₀ был любезно предоставлен В. Ш. Шейнкером (ИМБ АП СССР).

Чистоту использованных препаратов [¹⁴C]триптофана проверяли ТСХ на пластинах «Silufol».

Препарат триптофанил-тРНК-синтетазы выделяли согласно [1]. Препарат гомогенен при электрофорезе в денатурирующих условиях и представляет собой димер типа α_2 (M 120 000) [1]. Перед использованием препарат фермента пропускали через угольный фильтр, как описано ра-

нее [3]. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм, используя коэффициент $E_{\text{мг/мл}}^{1\text{ см}}$, равный 0,90 [1].

Денатурированный [^{14}C]триптофанил-фермент, 4 мкМ триптофанил-тРНК-синтетазу инкубировали с 80 мкМ [^{14}C]триптофаном в 0,01 М К-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 8 мМ MgCl_2 , 12 мМ KCl и 50 мкМ EDTA, в течение 10 мин при 4°C , как описано для получения нативного [^{14}C]триптофанил-фермента [3], затем добавляли кристаллическую мочевицу до 8 М и выдерживали 2 ч при 25° . Пробу наносили на колонку с сефадексом G-50, уравновешенную 0,02 М К-фосфатным буфером, рН 7,5, содержащим 6,8 М мочевицу, 0,025 М KCl и $1 \cdot 10^{-4}$ М EDTA. Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 1 мл. Фракции, содержащие белок, объединяли и диализовали в течение ночи против 20 мМ К-фосфатного буфера, рН 7,5, содержащего 0,025 М KCl и 0,1 мМ EDTA. Молярное соотношение связанного [^{14}C]триптофана к белку составляло 0,4–0,8.

Образование [^{14}C]триптофанилгидроксаматов при реакции [^{14}C]триптофанил-фермента с гидросиламином. [^{14}C]триптофанил-фермент (0,2–4 мкМ) инкубировали с бессолевым гидросиламином в 10 мМ К-фосфатом буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ MgCl_2 , $5 \cdot 10^{-5}$ М EDTA и 5 мМ KCl в объеме 60 мкл, в течение 5 мин при 25° и далее определяли радиоактивность [^{14}C]триптофанилгидроксаматов, сорбиравшихся на дисках СМ-целлюлозной бумаги, как описано в работе [5]. [^{14}C]триптофанилгидроксамат идентифицировали также с помощью восходящей хроматографии на СМ-целлюлозной бумаге в 10 мМ К-фосфатном буфере, рН 7,0, сравнивая его подвижность с синтезированным в соответствии с работой [20] триптофанилгидроксаматом.

Реакция [^{14}C]триптофанил-фермента с тРНК $^{\text{Trp}}$. Исследовали возможность переноса на тРНК $^{\text{Trp}}$ триптофанильного остатка с денатурированного [^{14}C]триптофанил-фермента. [^{14}C]триптофанил-фермент (0,5–1 мкМ) инкубировали в 20 мМ К-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,025 М KCl и 0,1 мМ EDTA, с 0,1–11,6 мкМ тРНК $^{\text{Trp}}$ в присутствии 10 мМ MgCl_2 от 2 до 30 мин при 25 или 37° (объем пробы 0,1 мл). Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1% цетавлона [3] в присутствии 150 мкг тРНК-носителя.

Выделение [^{14}C]триптофанил-пептидов. [^{14}C]триптофанил-фермент нагревали 15 мин при 50° , охлаждали смесь до 37° , доводили рН до 8,2 с помощью кристаллического бикарбоната аммония, прибавляли трипсин (1/50 по весу) и выдерживали 3 ч при 37° , центрифугировали и лиофилизовали. Остаток растворяли в 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере, рН 7,5, и смесь подвергали двумерному электрофорезу на бумаге Ватман 3 ММ в пиридин-ацетатном буфере, рН 6,5, при градиенте напряжения 80 В/см. Перед вторым разделением бумагу обрабатывали парами надмуравьиной кислоты в вакуум-эксикаторе, как описано в работе [12]. Электрофореграмму обрабатывали флуорескаминном [21]. Пептид, смещенный от диагонали, элюировали водой и лиофилизовали. После полного кислотного гидролиза (6М HCl , 22 ч, 105°) определяли аминокислотный состав пептида на аминокислотном анализаторе ВС-201 (Bioal) одноколочным методом с использованием электронного интегратора Autolab системы АА.

Авторы приносят глубокую благодарность проф. Л. Л. Киселеву за постоянный интерес к работе и полезные советы, а также Л. Г. Николаеву и М. Б. Агаларовой за проведение аминокислотных анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фаворова О. О., Кочкина Л. Л., Шайго М., Парин А. В., Хилько С. Н., Прасолов В. С., Киселев Л. Л. (1974) Молекулярн. биология, 8, 729–741.
2. Ковалева Г. К., Фаворова О. О., Мороз С. Г., Крауспе Р., Киселев Л. Л. (1976) Докл. АН СССР, 229, 492–495.

3. Фаворова О. О., Ковалева Г. К., Мороз С. Г., Киселев Л. Л. (1978) Молекулярн. биология, **12**, 588-601.
4. Kovaleva G. K., Moroz S. G., Favorova O. O., Kisselev L. L. (1978) FEBS Lett., **95**, 81-84.
5. Парин А. В., Руханова М. К., Киселев Л. Л. (1967) Биохимия, **32**, 375-383.
6. Harris I., Merriwether B. P., Hastings-Park J. (1963) Nature, **198**, 154-157.
7. Lynen F. (1967) Biochem. J., **102**, 381-400.
8. Schweizer E., Piccinini F., Duba C., Günther S., Ritter E., Lynen F. (1970) Eur. J. Biochem., **15**, 483-499.
9. D'Agnolo G., Rosenfeld I. S., Vagelos P. R. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 5283-5288.
10. Mizioroko H. M., Clinkenbeard K. D., Reed W. D., Lane M. D. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 5768-5773.
11. Donovan J. W. (1964) Biochemistry, **3**, 67-74.
12. Brown J. R., Hartley B. S. (1966) Biochem. J., **101**, 214-228.
13. Торчинский Ю. М. (1977) Сера в белках, с. 168, «Наука», М.
14. McElroy W. D., De Luca M., Travis J. (1967) Science, **157**, 151-160.
15. Murayama A., Raffin J. P., Remy P., Ebel J. P. (1975) FEBS Lett., **53**, 15-22.
16. Iborra F., Labouesse B., Labouesse J. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 6659-6665.
17. Iborra F., Mourgeon G., Labouesse B., Labouesse J. (1973) Eur. J. Biochem., **39**, 547-556.
18. Beinert H., Green D. E., Hell P., Heift H., Korff R. W. von, Ramakrishnan C. V. (1953) J. Biol. Chem., **203**, 35-45.
19. Frear D. S., Burrell R. C. (1955) Analyt. Chem., **27**, 1664-1665.
20. Safir S. R., Williams J. H. (1952) J. Organ. Chem., **17**, 1298-1302.
21. Weigele M., DeBernardo D. L., Tangil J. P., Leingruber W. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 5927-5928.

Поступила в редакцию
6.XII.1978

CHARACTERIZATION OF THE TRYPTOPHANYL-ENZYME OBTAINED AFTER DENATURATION OF AN ACTIVE TRYPTOPHANYL DERIVATIVE OF TRYPTOPHANYL- tRNA SYNTHETASE

MOROZ S. G., KRAUSPE R., KOVALEVA G. K., FAVOROVA O. O.

Institut of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Upon the 8 M urea denaturation of the tryptophanyl-derivative of the tryptophanyl-tRNA synthetase, a slow transfer of the tryptophanyl residue from a carboxylic group of the protein molecule to some other group takes place with concomitant replacement of the acid-labile bond for acid-stable one. The obtained tryptophanyl-enzyme derivative reacts with NH_2OH forming tryptophanyl-hydroxamate, and is labile at alkaline pH and after performic acid oxidation. The chemical properties of the obtained derivative indicate that, it is the SH-group which is mainly responsible for accepting the tryptophanyl residue in the course of denaturation. By means of diagonal electrophoresis, a cysteine-containing tryptic peptide which comprised the bound tryptophanyl moiety is isolated and its amino acid composition is established.