



УДК 547.962; 577.156.3

ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ *

*Прасолов В. С., Фаворова О. О., Киселев Л. Л.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Нативная триптофанил-ТРНК-синтетаза из поджелудочной железы быка (ферментная форма Е₂) состоит из двух субъединиц с M 60 000±2000. Инкубация очищенного фермента с трипсином в пессимальных условиях приводит к расщеплению каждой субъединицы до ферментативно неактивной полипептидной цепи с M 24 500±±1500. В ходе протеолиза образуются две дискретные промежуточные формы с M 51 000±2000 и 40 000±2000 и фрагменты с M 14 000±2500. Полипептидная цепь M 24 500 содержит значительно меньше дикарбоновых аминокислот, чем нативная субъединица. Количество пептидов, выявляемое после исчерпывающего гидролиза трипсином, позволяет сделать вывод об отсутствии больших повторяющихся аминокислотных последовательностей в каждой субъединице в отличие от некоторых бактериальных синтетаз.

Аминоацил-ТРНК-синтетазы (К.Ф.Б.1.1.) относятся к ключевым ферментам клетки, так как с их помощью осуществляется вовлечение аминокислот в биосинтез белков, однако об их структуре почти ничего не известно [1]. Ранее в нашей лаборатории была выделена высокоочищенная ТРСаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота и было показано, что фермент состоит из двух субъединиц с M 60 000±2000 [2].

В данной работе исследовали ТРСазу с помощью ограниченного протеолиза трипсином с целью получения сведений о пространственной структуре и некоторых элементах первичной структуры фермента.

На рис. 1 представлена кинетика расщепления субъединицы ТРСазы трипсином (150 : 1, по весу) при 37°, прослеженная методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС. Видно, что исчезновение полосы А, соответствующей нативной субъединице с M 60 000 [2], сопровождается появлением трех новых белковых полос, обозначенных как Б, В и Г. Форма Б является промежуточной; в ходе протеолиза она вначале энергично накапливается, а затем полностью расщепляется. Параллельно происходит накопление белковых полос В и Г. Процесс заканчивается за 1 ч, и картина не меняется при удлинении времени инкубации с трипсином по меньшей мере до 2 ч.

При снижении температуры инкубации ТРСазы с трипсином с 37 до 25° удается выявить еще одну дискретную промежуточную форму. На рис. 2 показана сканограмма геля, отражающая один из моментов расщепления субъединицы ТРСазы трипсином при 25°, когда представлены все возникающие белковые полосы. Помимо описанных форм А, Б, В и Г видна еще одна дополнительная полоса, обозначенная А'.

* Принятые сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин, ДДС – додецилсульфат натрия; ТРСаза – триптофанил-ТРНК-синтетаза.

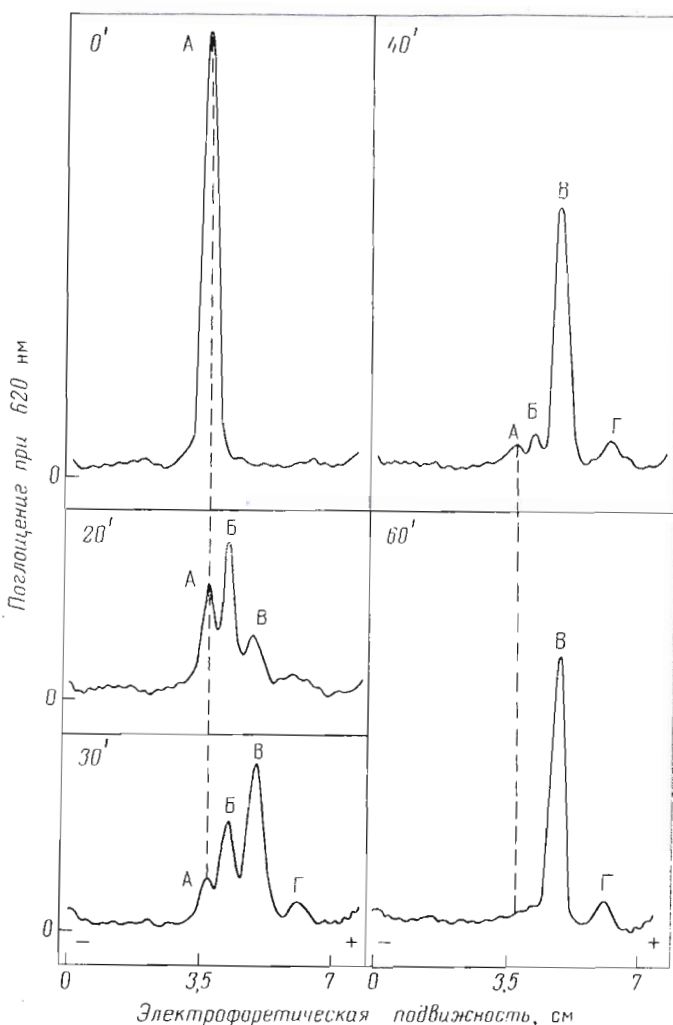


Рис. 1. Кинетика расщепления полипептидных цепей ТРСазы трипсином (150:1, по весу) при 37°. Представлены денситограммы гелей. Время отбора проб указано на рисунке

Молекулярный вес полученных пептидных фрагментов определяли, как описано в работе [3] (рис. 3). Если нативная субъединица ТРСазы (форма А) характеризуется $M 60\,000 \pm 2000$, то формы А', Б, В, Г имеют соответственно $M 51\,000 \pm 2000$; $40\,000 \pm 2000$, $24\,500 \pm 1500$ и $14\,000 \pm 2500$. Разброс в значениях молекулярных весов, полученных для форм А', Б и В в большом числе экспериментов, невелик и лежит в пределах ошибки метода определения, что в сочетании с узостью и симметричностью соответствующих пиков свидетельствует о локализации триптических разрывов у всех или большинства молекул фермента в одних и тех же местах.

На основании приведенных данных мы сделали вывод, что в ходе ограниченного протеолиза происходит последовательная деградация полипептидной цепи ТРСазы с $M 60\,000$ через промежуточные формы ($M 51\,000$ и $40\,000$) до устойчивого к протеолизу «ядра» $M 24\,500$ и фрагментов с $M 14\,000 \pm 2500$.

В таблице приведены результаты анализа общего количества полипептидного материала после электрофореза в гелевых трубках в разные моменты инкубации с трипсином при 25°. Мерой окрашенного кумасси мате-

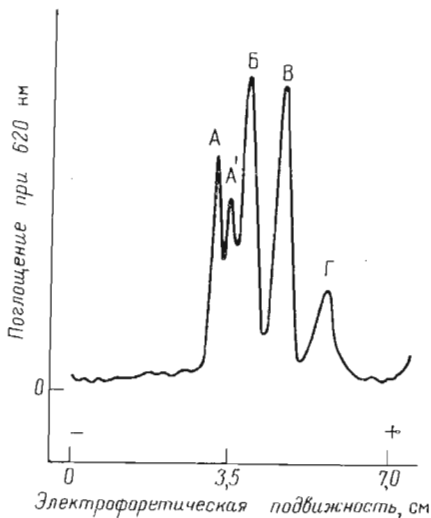


Рис. 2

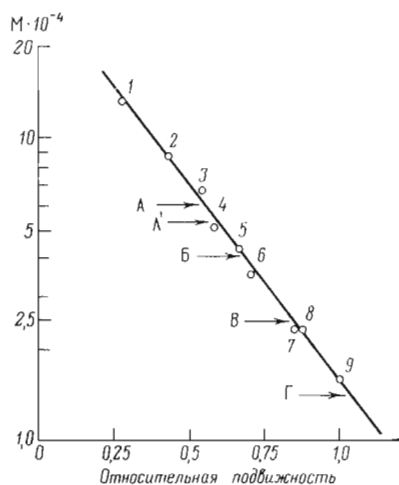


Рис. 3

Рис. 2. Денситограмма геля после электрофореза продуктов ограниченного протеолиза ТРСазы (ТРСазы : трипсин – 150 : 1, по весу, время инкубации 2,5 ч, 25°): А – исходная субъединица, Б, В и Г идентичны по молекулярным весам соответствующим продуктам трипсинолиза при 37°. Форма А' при 37° не выявляется

Рис. 3. Определение молекулярного веса продуктов ограниченного трипсинолиза ТРСазы методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС. Используются белки-маркеры: 1 – бычий сывороточный альбумин (димер), 2 – яичный альбумин (димер), 3 – бычий сывороточный альбумин (мономер), 4 – иммуноглобулин, H-цепь, 5 – яичный альбумин (мономер), 6 – пепсин, 7 – иммуноглобулин, L-цепь, 8 – трипсин, 9 – гемоглобин (субъединица). Стрелками указаны положения субъединицы ТРСазы и ее фрагментов: А – исходной субъединицы; А' – промежуточной формы, возникающей в ходе расщепления при 25°; Б, В и Г – продуктов ограниченного трипсинолиза при 37 и 25°. Ось ординат дана в логарифмическом масштабе. На оси абсцисс отложена подвижность белков по отношению к подвижности гемоглобина

риала служила площадь всех пиков над базовой линией на сканограммах. За единицу принята площадь пика нативного фермента (0' протеолиза). Видно, что в каждый данный момент протеолиза общее количество окрашиваемого кумасси материала, слагающееся из суммы всех дискретных полос, практически не отличается от содержания окрашиваемого материала в исходной субъединице ТРСазы до начала инкубации (0' протеолиза). Это означает, что в ходе протеолиза при 25° не образуется значительного

Эксперимент	Длительность протеолиза, мин						
	0	30	60	90	120	150	180
1	1	1,03	0,95	1,04	1,13	0,91	1,05
2	1	1,02	0,90	1,06	Не опр.	1,10	1,10

количества низкомолекулярного материала, диффундирующего из геля. В таком случае белковые фрагменты, образующиеся при расщеплении цепи с M 60 000 до цепей с M 51 000, 40 000 и 24 000, должны иметь близкие значения M (10 000–15 000) и могут не разделяться в ходе электрофореза. Вероятно, все они попадают в зону пика Г ($14\ 000 \pm 2500$), который довольно широк и асимметричен.

Следует отметить, однако, что протеолиз при 37° , в отличие от протеолиза при 25° , сопровождается исчезновением из гелей в начальные моменты инкубации (до 20 мин) некоторого количества окрашиваемого кумасси материала. Вероятно, расщепление формы А до Б в условиях повышенной температуры сопровождается появлением низкомолекулярного материала, диффундирующего из геля.

Расщепление нативной ТРСазы трипсином сопровождается постепенным падением способности катализировать образование триптофанил-

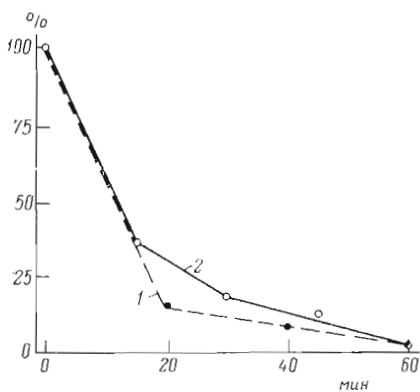


Рис. 4

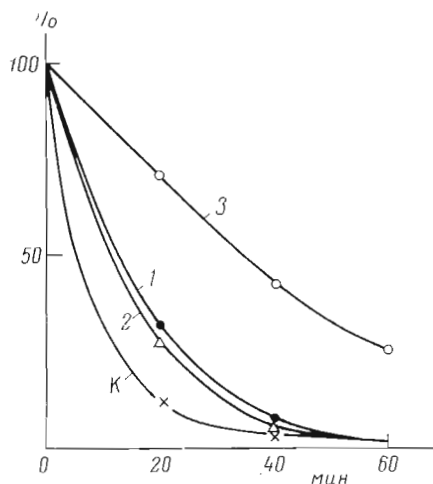


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость ферментативной активности (1) и доли негидролизированных субъединиц (2) от времени протеолиза. Долю негидролизированных субъединиц рассчитывали, исходя из площади соответствующего пика на денситограммах гелей, принимая площадь исходного (в 0') пика за 100%. За 100% принимали активность ТРСазы по гидроксаламному тесту в 0' инкубации с трипсином

Рис. 5. Влияние АТФ (1), триптофана (2) и смеси АТФ, триптофана и Mg^{2+} (3) на кинетику трипсинолиза (ТРСазы при 37°). Инкубацию ТРСазы с трипсином проводили в стандартных условиях (кривая К — контроль) и в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М АТФ + $2 \cdot 10^{-4}$ М триптофана + $2 \cdot 10^{-2}$ М $MgCl_2$

гидроксамата, которая полностью исчезает к 1 ч инкубации, что согласуется с кинетикой расщепления, определяемой методом электрофореза. Остаточная активность практически отражает содержание в препарате в каждый момент трипсинолиза доли негидролизованной субъединицы с M 60 000 дальтон. На основании данных рис. 4 можно предполагать, что уже промежуточная трипсино-модифицированная форма Б с M 40 000 не способна катализировать активацию триптофана.

Кинетика расщепления трипсином нативной ТРСазы до неактивных продуктов замедляется в присутствии триптофана или АТФ и особенно в присутствии смеси триптофана, АТФ и $MgCl_2$, т. е. в условиях образования триптофаниладенилата (рис. 5). Однако белковые фрагменты, образующиеся в присутствии субстратов, неотличимы по молекулярному весу от полос Б, В и Г, описанных ранее.

После инкубации с трипсином (1 ч при 37°) электрофорезом в полиакриламидном геле были обнаружены только белковые полосы В и Г. При гель-фильтрации этих конечных продуктов ограниченного протеолиза на колонке с сефадексом G-100 выявляется только один симметричный пик (рис. 6), объем элюции которого соответствует кажущемуся M 80 000 (см., калибровочную кривую на рис. 7). Анализ этого материала методом электрофореза в присутствии ДДС выявляет лишь полипептидные цепи — поло-

сы В и Г (рис. 8, а). Это означает, по-видимому, что после ограниченного протеолиза трипсин-модифицированная ТРСазы в растворе представляет собой ассоциат, состоящий из двух полипептидных цепей с M $24\,500 \pm 1500$ и двух — с M $14\,000 \pm 2500$, что и дает в сумме $M \sim 80\,000$ в согласии с данными гель-фильтрации. Согласно этим данным, при ограниченном трипсинолизе нативной молекулы ТРС-азы, состоящей из двух субъединиц по M $60\,000$, не только не нарушается связь между негидролизуемыми «ядрами» (M $24\,500$), но и сохраняется ассоциация с отщепленными фраг-

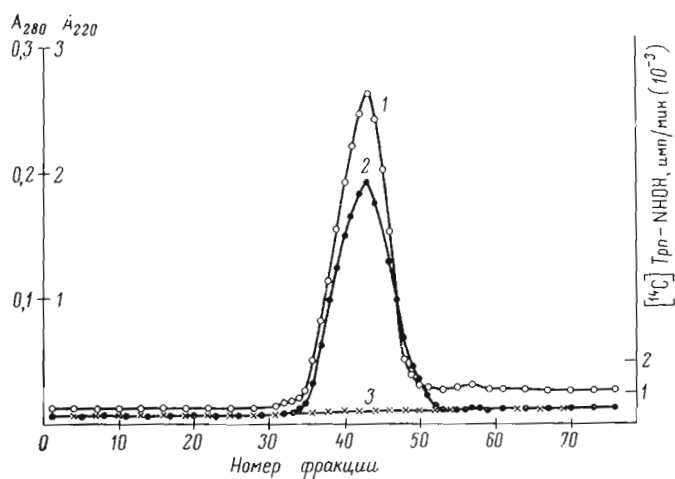


Рис. 6. Гель-хроматография модифицированной трипсином при 37° ТРСазы на колонке с сефадексом G-100

ментами по M $14\,000$. После блокирования свободных аминогрупп полипептидов малеиновым ангидридом и последующего диализа анализ выявляет только одну полосу с M $24\,500$ (рис. 8, б). На основании этого опыта был сделан вывод, что связь между фрагментами В и Г осуществляется преимущественно за счет ионных взаимодействий и что сохранение свободных аминогрупп существенно для поддержания фрагментов В и Г в ассоциированном состоянии.

Полный триптический гидролиз нативного фермента и фрагмента В (M $24\,500$) и последующий анализ продуктов гидролиза методом пептидных карт проводили после их малеинирования, восстановления и карбоксиметилирования. Известно, что у денатурированных и малеинированных белков трипсином расщепляется пептидная связь у остатков аргинина, тогда как связь у модифицированных лизиновых остатков становится резистентной [4], что позволяет получать пептидные карты с меньшим числом пятен по сравнению с немалеинированными белками. Как видно из рис. 9, для целой малеинированной и денатурированной молекулы ТРСазы получено 22 пептидных пятна (по сравнению с 46 пятнами, обнаруженными без блокирования аминогрупп малеиновым ангидридом) [2]. Этот результат еще раз подтверждает сделанный ранее [2, 5] вывод об идентичности двух субъединиц ТРСазы, поскольку, исходя из аминокислотного состава (46 аргининовых остатков на моль нативного фермента), для малеинированного белка, состоящего из двух идентичных субъединиц, следовало ожидать 24 пептида. Устойчивый к ограниченному протеолизу фрагмент В дает после малеинирования и денатурации 11 пептидов, что пропорционально уменьшению молекулярного веса полипептида от $60\,000$ до $24\,500$. Эти данные указывают на гомогенность фрагмента В и подтверждают схему образования одного «ядра» из одной исходной субъединицы.

Из рис. 9 видно, что фрагмент В содержит все разделяемые в использованной системе пятна нейтральных пептидов исходной субъединицы. Этот результат свидетельствует о высоком содержании неполярных аминокислот в устойчивом к протеолизу «ядре» у ТРСазы. Кроме того, полярные аминокислоты распределены в ТРСазе также неравномерно, и фрагмент В практически не содержит кислых пептидов. Из сопоставления этих результатов и приведенных выше данных легко прийти к выводу, что

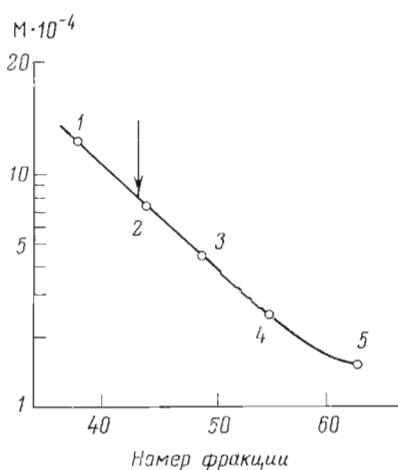


Рис. 7

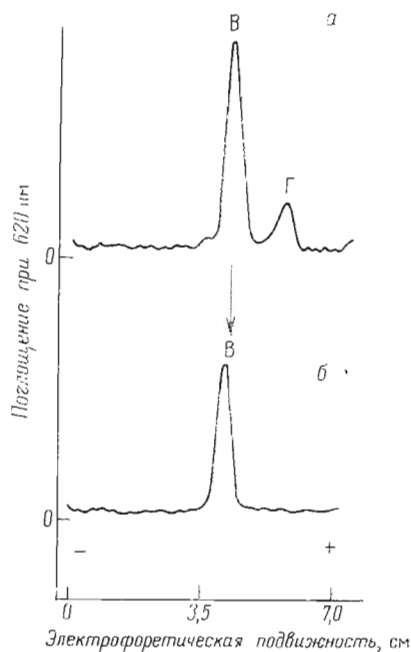


Рис. 8

Рис. 7. Определение молекулярного веса модифицированной ТРСазы с помощью следующих белков маркеров: 1 — бычий сывороточный альбумин (димер), 2 — бычий сывороточный альбумин (мономер), 3 — яичный альбумин (мономер), 4 — трипсин, 5 — цитохром С. Стрелкой показано положение модифицированной ТРСазы

Рис. 8. Денситограммы гелей, содержащих продукты В и Г ограниченного протеолиза: а — денситограмма геля после электрофореза в присутствии ДДС белкового материала из пика, полученного при геле-фильтрации на сефадексе G=100, трипсин-модифицированной ТРСазы (см. рис. 6); б — денситограмма геля после электрофореза в присутствии ДДС белкового материала того же пика после маленирования и диализа

фрагмент, ассоциирующий с «ядром» В при нейтральных рН и характеризующийся M 14 000, несет суммарный отрицательный заряд.

Таким образом, показано, что ТРСаза подвержена ограниченному протеолизу; в ходе инкубации фермента с трипсином накапливаются дискретные фрагменты белковой цепи, устойчивые к дальнейшему расщеплению в данных условиях. В ходе ограниченного протеолиза при 25° мы не наблюдали накопления низкомолекулярных пептидов, образуются только сравнительно большие дискретные полипептидные фрагменты с M 10 000—15 000, что отражает наличие в структуре ТРСазы всего нескольких доступных действию трипсина связей, т. е. свидетельствует об отсутствии протяженных участков белковой молекулы, полностью доступных трипсину.

Наличием всего нескольких расщепляемых участков ТРСаза сходна с лейцил-тРНК-синтетазой из *E. coli* [6], у которой протеазы в неспециальных условиях расщепляют две определенные связи в средней полипептидной цепи. Однако если у лейцил-тРНК-синтетазы фрагменты, полученные после выщелачивания участка с $M \sim 3000$, скорее всего идентичны и можно говорить о «двуядерности» этого белка, то у ТРСазы отсутствуют большие повторяющиеся последовательности аминокислот в белковой цепи

субъединицы с M 60 000. Об этом говорит как характер протеолиза ($60\ 000 \rightarrow 40\ 000 \rightarrow 25\ 000$), так и резкое уменьшение количества пептидов на фингерпринте — фрагмента M 25 000 по сравнению с исходной субъединицей. Эти данные показывают, что ТРСаза из поджелудочной железы не

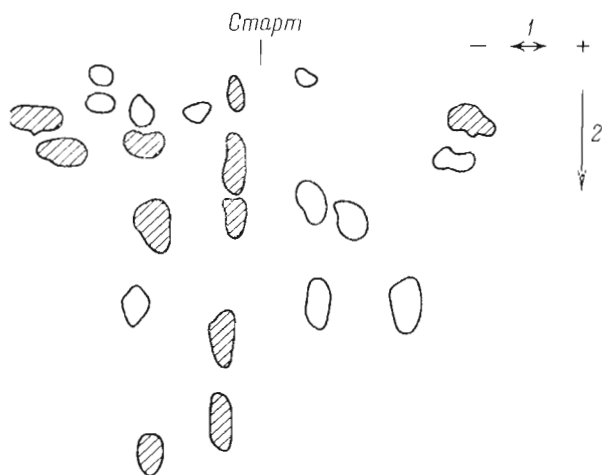


Рис. 9. Пептидные карты ТРСазы и устойчивого к протеолузу фрагмента с M 24 500 (заштрихованы). Оба препарата предварительно маленированы

принадлежит к постулированной Харгли [7] группе аминоксил-ТРНК-синтетаз, полипептидные цепи которых содержат идентичные повторяющиеся последовательности вследствие дубликации соответствующих генов.

Экспериментальная часть

Материалы. Использовали [^{14}C]-*DL*-триптофан, удельная активность 1,2 Кп/моль (контора «Изотоп»), *L*-триптофан, динатриевая соль АТР, литиотриетол (A-grade) и дивизоронилфторфосфат («Calbiochem»), бычий сывороточный альбумин («Koch-Light»), трипсин TRTPCK (PL), додещилсульфат Na («Schuchardt»), меркаптоэтанол («Merck»), кумасии бриллиантовый голубой G-250 и реактивы для электрофореза фирмы «Serva». Акриламид и NN' -метилбисакриламид были перекристаллизованы соответственно из хлороформа и ацетона. ДЭАЕ-целлюлоза DE-52, бумага CM82 и 3MM фирмы «Whatman».

ТРСаза выделена из поджелудочной железы быка, как описано в работе [2]. Использовали форму E_2 (молекулярный вес, определенный по данным гель-фильтрации на колонках сефадекса G-100 и G-200 и по скорости седиментации в аналитической центрифуге, $120\ 000 \pm 5000$ [2]). Концентрацию белка определяли по поглощению растворов при 280 нм. Коэффициент экстинкции ($\text{E}_{1\%}^{1\text{cm}}$) для нативной ТРСазы принимали равным 0,90 [2]. Фермент хранили замороженным при -70° в растворе 0,02 М буфера трис-НСl (рН 7,5) в концентрации 10–15 мг/мл. Активность ТРСазы определяли гидроксамитным методом. Количество образующегося [^{14}C]-триптофангидроксамата определяли после сорбции на КМ-целлюлозной бумаге [8]. Радиоактивность дисков измеряли в толуольном скintилляторе на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique» SL-30, эффективность счета на дисках составляла 60%.

Ограниченный трипсинолиз ТРСазы. Инкубацию фермента (1,2 = 2,5 мг/мл) с трипсином (150 : 1, по весу) проводили в 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7, 5), содержащем 1,0 мМ 2-меркаптоэтанол. Для электрофорети-

ческого анализа продуктов протеолиза реакцию останавливали добавлением ДДС до концентрации 1%; далее пробы обрабатывали, как указано ниже. В остальных случаях реакцию останавливали добавлением диизопропилфторфосфата в 150-кратном молярном избытке по отношению к трипсину. Полное превращение в конечные продукты ограниченного протеолиза В и Г достигалось при 37° за 1—1,5 ч.

Электрофорез в полиакриламидном геле в 0,1%-ном ДДС проводили по методу Вебера и Осборна [3]. Образцы перед нанесением обрабатывали 3 ч при 37° раствором, содержащим 1%-ный меркаптоэтанол и 1%-ный ДДС. Каждый наносимый образец (10—20 мкг белка в 30%-ном этиленгликоле) содержал также 3 мкл 0,07%-ного раствора бромфенолового синего и, где указано, 10 мкг гемоглобина, обработанного меркаптоэтанолом и ДДС так же, как ТРСаза. Электрофорез проводили в трубках 5%-ного геля, содержащего 0,1 М трис-НСl буфер (рН 7,5) и 0,1% ДДС. Разделение длилось 3,5 ч. при токе 5—8 мА на трубку при комнатной температуре. Столбики геля окрашивали в течение 1 ч 0,25%-ным раствором кумасси, содержащим 7%-ную CH_3COOH и отмывали 7%-ную CH_3COOH , многократно меняя жидкость. Сканирование проводили на денситометре «Сигма-скап».

Гель-хроматография модифицированной трипсином ТРСазы. К смеси, содержащей конечные продукты ограниченного протеолиза, добавляли насыщенный раствор сульфата аммония до 60% насыщения. Осадок растворяли в 0,3 М NaCl+0,05 М буфера трис-НСl (рН 7,5). Раствор (0,5 мл), содержащий 3,5 ОЕ при 280 нм, наносили на колонку с сефадексом G-100 (1×46 см), уравновешенную 0,3 М NaCl и 0,05 М трис-НСl буфером (рН 7,5). Элюцию проводили со скоростью 3 мл/ч, объем фракции — 0,5 мл.

Белки-свидетели для определения молекулярного веса. Для определения кажущегося молекулярного веса модифицированной ТРСазы методом гель-хроматографии по Эндриусу [9] использовали следующие белки — маркеры; бычий сывороточный альбумин (среднее значение M 66 500), яичный альбумин (M 45 000), трипсин (M 23 300), цитохром С (M 13 400).

При электрофорезе в присутствии ДДС, помимо перечисленных белков, использовали также иммуноглобулин G человека (молекулярный вес H -цепи — 50 000, L -цепи — 23 000) и пепсин (M 35 000). Перед электрофорезом белки-свидетели обрабатывали 1%-ным ДДС и 1%-ным меркаптоэтанолом 3 ч при 37°. Молекулярные веса даны по справочнику [10].

Модификация белкового материала и получение пептидных карт. Фракции, элюированные с колонки с сефадексом G-100, содержащие белок с кажущимся M 80 000, объединяли и добавляли к ним насыщенный раствор сульфата аммония до 60%-ного насыщения. Осадок растворяли в 0,5 М Na-боратном буфере (рН 9,5) и проводили малеинирование свежеевозгнаным малеиновым ангидридом по методу работы [11]. Пробы диализовали через мембрану FZ фирмы «Union carbide corporation» (США) против 0,1 М трис-НСl буфера (рН 8,5) до полного удаления продукта с M 14 000. Контроль осуществляли методом электрофореза в полиакриламидном геле. Полипептидный материал восстанавливали дитиотрептолом и карбоксиметилировали иоацетатом, как описано в работе [2], диализ через карбоксиметилирования проводили против воды. К малеинированным, восстановленным и карбоксиметилированным продуктам ограниченного протеолиза в 0,05 М NH_4HCO_3 (рН 8,4) добавляли трипсин в количестве, составляющем 2% от веса белка, и проводили гидролиз в течение 2—5 ч при 37°. Реакцию останавливали замораживанием, продукт лиофилизовали. Триптические пептиды растворяли в 0,05 М NH_4OH и разделяли на бумаге ватман 3 ММ в первом направлении электрофорезом при рН 6,5 (35 мин при 70 (в/см) и во втором (перпендикулярном) направлении хроматографией в системе бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 12 по объему). Пептидные карты

проявляли, погружая высушенные листья в 0,5% -ный раствор нингидрина в ацетоне. Нативный фермент (А) малеинировали, восстанавливали, карбоксиметилировали и анализировали, как описано выше. Сравнивали пептидные карты, полученные для модифицированной ТРСазы, с пептидными картами нативного фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kisselev L. L., Favorova O. O. (1974) *Advances in Enzymology* (Meister A., ed.), 40, pp. 141-238 John Wiley and Sons, New York.
2. 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.
3. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.
4. Butler P. I. G., Herris J. I., Harley B. S., Leberman R. (1967) *Biochem. J.* 103, 78P.
5. Gros C., Lemaire G., van Papenbusch R., Labouesse B. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2931-2943.
6. Rouget P., Chapeville F. (1971) *Eur J. Biochem.*, 23, 459-467.
7. Hartley B. S. (1973) *Ninth International Congress of Biochemistry, Stockholm, Abstract Book*, p. 1, P. 1.
8. Парин А., Кухалова М., Киселев Л. (1967) *Биохимия*, 32, 375-383.
9. Andrews P. (1965) *Biochem. J.*, 96, 595-605.
10. *Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology, Second Edition* (1970) (Sober H. A. ed.) Cleveland, Ohio, C-11, C-14.
11. Bruton C. J., Hartley B. S. (1968) *Biochem. J.*, 108, 281-288.

Поступила в редакцию
9.VII.1974

LIMITED PROTEOLYSIS OF THE TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE

V. S. PRASOLOV, O. O. FAVOROVA and L. L. KISSELEV

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Earlier studies have shown that beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase is composed of two subunits, each having a molecular weight of $60\,000 \pm 2\,000$. Limited trypsin-catalyzed hydrolysis of the purified enzyme results in splitting of each subunit to form an enzymatically inactive polypeptide chain of molecular weight $24\,500 \pm 1\,500$. During proteolysis, two distinct intermediate forms of molecular weight $51\,000 \pm 2\,000$ and $40\,000 \pm 2\,000$ along with fragments of molecular weight $14\,000 \pm 2\,500$ are formed. Comparison of the finger prints has shown that the trypsin-modified subunit represents a polypeptide with lowered content of dicarboxylic amino acids. The number of peptides revealed after complete proteolysis of native and trypsin-modified subunits does not favour the presence of long repetitive sequences in each subunit at variance with some bacterial aminoacyl-tRNA synthetases.