



УДК 547.963.3.04

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ *E. COLI* MRE-600 С ПОМОЩЬЮ $\text{Ac}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tРНК}^{\text{Phe}}$ Безнедельная Н. И., Горшкова И. И., Лаврик О. И.,
Ходырева С. Н.

Институт органической химии СО Академии наук СССР, Новосибирск

Исследована аффинная модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 с помощью $\text{Ac}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tРНК}^{\text{Phe}}$. Показано, что реагент является конкурентным ингибитором в реакции аминоацилирования по отношению к тРНК^{Phe} и неконкурентным по отношению к *L*-фенилаланину. тРНК^{Phe} вытесняет реагент из комплекса с ферментом при концентрациях, близких к значению K_m , *L*-фенилаланин — только при концентрациях, превышающих K_m для *L* фенилаланина на 3 порядка. Обработка фермента реагентом вызывает глубокую инактивацию его в реакции аминоацилирования и ковалентное присоединение аналога тРНК к ферменту. Удаление остатка тРНК с помощью щелочного гидролиза приводит к частичному восстановлению активности и к частичному удалению радиоактивной метки из белка, что свидетельствует о возможном алкилировании карбоксильной группы. Удаление остатка тРНК с помощью гидролиза рибонуклеазой не приводит к восстановлению активности, при этом метка в белке полностью сохраняется. Показано, что метка количественно локализована в β -субъединице фермента. Сделан вывод о локализации тРНК-узнающего остатка на β -субъединице. Предположено, что остаток Phe в составе аминоацил-тРНК размещается вблизи участка контакта между субъединицами.

Фенилаланил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.20) имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta_2$. Метод аффинной модификации является одним из самых информативных для локализации центров узнавания субстратов на субъединицах ферментов. Ранее Бартманом и соавт. [1] было показано, что использование аналога Phe-тРНК^{Phe}, $\text{Ac}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tРНК}^{\text{Phe}}$, приводит к модификации β -субъединицы фермента из *E. coli* K-10. Однако в последнем случае перед разделением модифицированного фермента на субъединицы не был удален остаток тРНК. Это усложняло интерпретацию полученных данных.

Для уточнения вопроса о размещении остатка фенилаланина в составе Phe-тРНК^{Phe} на субъединицах фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* MRE-600 мы провели аффинную модификацию фермента с помощью $\text{Ac}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tРНК}^{\text{Phe}}$ и для получения более четкой картины при разделении субъединиц остаток тРНК удалили гидролизом рибонуклеазой.

Модификация фермента с помощью $\text{Ac}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tРНК}^{\text{Phe}}$ представляет также интерес для изучения кинетики аффинной модификации, выявляющей возможную кооперативность центров узнавания тРНК. Механизм алкилирования в этом случае относительно прост: в процессе модификации не образуется активных промежуточных частиц [2] и реагент стабилен в водном растворе в условиях модификации (константа гидро-

* $\text{Ac}(\text{Br})$ — бромацетил-, $\text{Ac}(\text{Br})\text{-Phe-tРНК}^{\text{Phe}}$ — N-бромацетилфенилаланил-транспортная фенилаланиновая РНК.

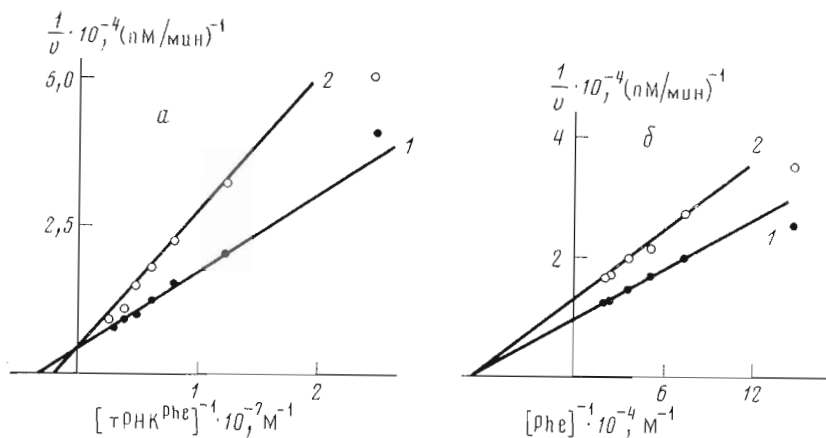


Рис. 1. Зависимость начальной скорости аминоацилирования тРНК^{Phe} от концентрации тРНК^{Phe} (а) и L-Phe (б) в обратных координатах в отсутствие (1) и присутствии (2) Ac(Br)-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} при ее концентрации 3·10⁻⁷ М (а) и 10⁻⁶ М (б), концентрации тРНК^{Phe} 10⁻⁵ М (б)

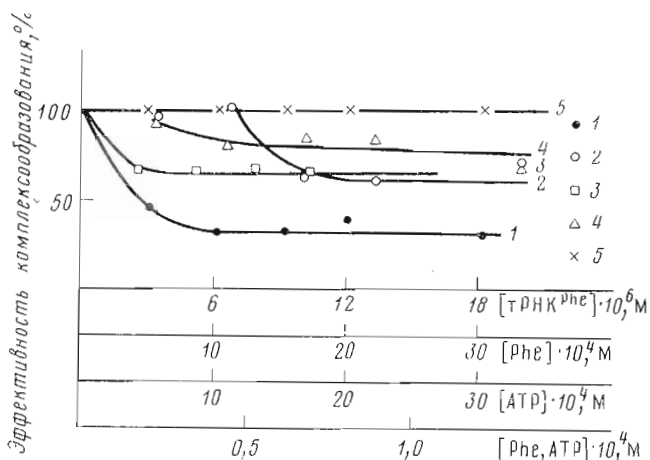


Рис. 2. Связывание Ac(Br)-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} с ферментом в присутствии тРНК^{Phe} (1), Phe (2), Phe+АТР (моль/моль) (3), АТР (4); в отсутствие субстратов (5)

лиза $\approx 0,003 \text{ ч}^{-1}$). В данной работе изучена аффинная модификация фермента с помощью Ac(Br)-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}, локализовано место остатка фенилаланина в составе Phe-тРНК на субъединицах фермента и идентифицирована одна из групп, подвергающихся модификации.

тРНК^{Phe} из *E. coli* содержит в своем составе основание X со свободной аминогруппой, реакционная способность которой близка к реакционной способности α -аминогруппы фенилаланина в составе Phe-тРНК. Аминогруппа основания X способна взаимодействовать с N-оксисукцинимидными эфирами различных кислот [3–6]. Поскольку при получении бромацетильного производного [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} мы использовали соответствующий N-оксисукцинимидный эфир, необходимо было оценить влияние такой обработки на взаимодействие тРНК с ферментом. Оказалось, что тРНК, обработанная N-оксисукцинимидным эфиром бромуксусной кислоты, является субстратом реакции аминоацилирования с величиной K_m 3,0·10⁻⁶ М (25°С), на порядок превышающей величину K_m для нативной тРНК^{Phe}, равную 2,6·10⁻⁷ М в таких же условиях. Величина максимальной скорости при такой обработке тРНК не изменяется, а ацепторная активность падает приблизительно на 20%. Следовательно,

**Соотношение между активностью фермента в реакции
аминоацилирования и включением радиоактивной
метки в белок**

Условия модификации	Остаточная активность, %	Включение метки в белок ^{14}C Phe, моль на моль фермента
Смесь I*	20 ± 5	$0,6 \pm 0,1$
Смесь I после щелочного** гидролиза (14, 16, 20 ч)	50 ± 5	$0,3 \pm 0,1$

* См. «Экспериментальную часть».

** К аликвоте реакционной смеси добавляли $1/10$ часть объема 2 М раствора трис-НСI (рН 8,9), активность контрольного фермента при такой обработке не изменялась.

аминогруппа основания X может взаимодействовать с N-оксисукуцинимидным эфиром бромуксусной кислоты. В условиях получения аналога аминоацил-тРНК это может приводить к бифункциональному реагенту. Поэтому мы защищали аминогруппу основания X, обрабатывая тРНК уксусным ангидридом. Известно, что ацетилирование основания X в составе тРНК^{Phe} не изменяет параметров тРНК^{Phe} в реакции аминоацилирования [6].

Из рис. 1 видно, что используемый реагент Ac(Br)-[^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} является конкурентным ингибитором по отношению к тРНК^{Phe} в реакции аминоацилирования с K_i $1 \cdot 10^{-7}$ М (37°С) и неконкурентным по отношению к L-фенилаланину.

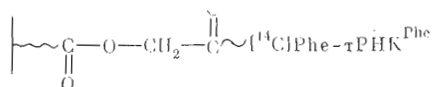
С помощью сорбции комплексов фермента с аминоацил-тРНК и ее аналогом на нитроцеллюлозных фильтрах при 4°С было показано, что присоединение бромацетильного остатка к α -аминогруппе фенилаланина в составе аминоацил-тРНК ухудшает на порядок ее связывание с ферментом.

тРНК^{Phe} вытесняет реагент из комплекса с ферментом, что свидетельствует об идентичности центров связывания тРНК и аналога (рис. 2). Фенилаланин при концентрациях, близких к значению K_m в реакции аминоацилирования, не вытесняет реагент из комплекса. Это также подтверждает неконкурентный характер связывания аналога аминоацил-тРНК к участку, узнающему фенилаланин. Уменьшение устойчивости комплекса в присутствии фенилаланина наблюдается только при концентрациях, приблизительно на 3 порядка превышающих значение K_m , т. е. в условиях, когда возможно неспецифическое связывание фенилаланина с ферментом в участке локализации остатка фенилаланина в составе N-ацил-аминоацил-тРНК. В свете этих данных кажется мало вероятным связывание производных N-ациламиноацил-тРНК по типу, предложенному Холлером и соавт. [7] — преимущественное связывание фенилаланил-тРНК по участку, узнающему фенилаланин. В нашем случае модификация α -аминогруппы фенилаланина, по-видимому, препятствует посадке реагента в аминокислотный центр, так как стерические требования этого участка к α -аминогруппе субстрата весьма высоки [8]. АТР вытесняет реагент из комплекса с ферментом при концентрациях, близких к значению K_m для АТР в реакции аминоацилирования. Это может свидетельствовать о взаимодействии или структурном перекрытии центров узнавания тРНК^{Phe} и АТР. Совместное присутствие L-фенилаланина и АТР в концентрациях, при которых данные субстраты в отдельности не влияют на связывание реагента с ферментом, заметно препятствует образованию комплекса. Последнее говорит о существенном влиянии аминоацилацидетила на устойчивость комплекса фермента с аналогом аминоацил-тРНК.

Модификация фермента с помощью Ac(Br)-[^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} приводит к инактивации фермента в реакции аминоацилирования (таблица) и в конечном итоге включению радиоактивной метки в белок. Наблюдаемая

инактивация фермента может быть следствием как алкилирования функционально важных остатков аминокислот в районе активного центра, так и фиксации тРНК в комплексе с ферментом. Чтобы выяснить причину инактивации, мы проводили щелочной гидролиз сложноэфирной связи между N-ацетиламиноацильным остатком и концевым аденозином тРНК. Ранее нами было показано, что в таких условиях остаток тРНК полностью удаляется из комплекса с ферментом, при этом активность фермента полностью сохраняется [4].

В результате щелочного гидролиза происходит частичное восстановление активности фермента, коррелирующее с потерей радиоактивной метки в белке (таблица). Последнее свидетельствует о том, что модификации подвергаются по крайней мере две группы в составе фермента. Щелочлабильная сложноэфирная связь может возникать только при модификации карбоксильной группы [9]:



Результат щелочного гидролиза ковалентного соединения не позволяет сделать заключения о функциональной важности карбоксильной группы. Что касается второй группы, подвергающейся модификации, она является существенной для каталитической активности фермента, так как полное удаление тРНК из комплекса не приводит к полному восстановлению активности.

Участие карбоксильной группы в катализе можно оценить, удалив остаток тРНК^{Phe} из комплекса с помощью гидролиза рибонуклеазой. В этом случае радиоактивная метка, связанная с белком, полностью сохраняется, однако активность фермента не восстанавливается. Это может свидетельствовать о существенной роли карбоксильной группы в катализе, тем более что нами ранее были обнаружены карбоксильные группы, существенные для каталитической активности фермента при его химической модификации водорастворимым карбодимидом [10]. Однако доказательство функциональной значимости предполагаемой карбоксильной группы с помощью гидролиза не является абсолютным, так как в этом случае концевой аденозин тРНК^{Phe} остается связанным с ферментом и может служить причиной отсутствия восстановления активности.

Для структурной локализации участка связывания *L*-фенилаланина в составе Phe-тРНК на субъединицах фермента из *E. coli* MRE-600 мы провели идентификацию алкилированной субъединицы фермента, предварительно удалив остаток тРНК^{Phe} из комплекса с помощью гидролиза рибонуклеазой. Модифицированный фермент отделяли от образовавшихся олигонуклеотидов и рибонуклеазы гель-фильтрацией на сефадексе G-100 и анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующей радиоавтографией. Выяснилось, что радиоактивная метка связана исключительно с β-субъединицей фермента (рис. 3).

Ранее для определения субъединиц, участвующих в связывании тРНК^{Phe} и Phe-тРНК^{Phe}, мы применяли аффинную модификацию фермента аналогом тРНК^{Phe}, в котором фотоактивные группы статистически распределены по различным положениям тРНК^{Phe}, но в каждой отдельной молекуле находятся в небольшом числе, не нарушающем сродства аналога к ферменту (азидо-тРНК) [11]. Кроме того, применяли также аналог Phe-тРНК^{Phe}, содержащий активную алкилирующую группу (хлорамбуцил), присоединенную к α-аминогруппе аминоацильного остатка Phe-тРНК^{Phe} (хб-тРНК) [2]. Под действием азидо-тРНК модификации подвергалась β-субъединица, а под действием хб-тРНК — α-субъединица фермента. Эти данные свидетельствуют о размещении участка, узнающего тРНК,

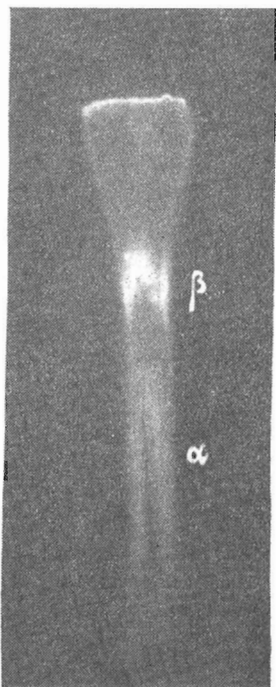


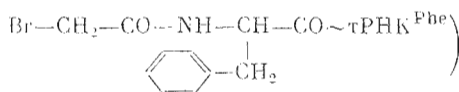
Рис. 3. Радиоавтографы полиакриламидного геля после разделения субъединиц с помощью электрофореза в денатурирующих условиях

группы X-основания в тРНК^{Phe}. Для этого к 5 мл раствора тРНК (6 мг/мл) добавляли 250 мкл свежеперегнанного уксусного ангидрида в абс. диметилформамиде (16 мкл уксусного ангидрида на 2 мл диметилформамида) и 2,5 мл 0,1 М вероналового буфера, pH 9,5. Доводили pH до 7,0 уксусной кислотой и выдерживали 30 мин при 0° С и постоянном pH. тРНК из раствора осаждали трехкратным избытком этанола в 2% ацетате натрия. Раствор модифицированной тРНК перед препаративным аминокислотированием диализовали против насыщенного раствора EDTA.

Препаративное аминокислотирование тРНК и определение активности фермента в реакции аминокислотирования проводили согласно [4]. В работе использовали [¹⁴C]фенилаланин (225 мкКи/ммоль, UVVVR, ЧССР). Уд. акт. [¹⁴C]Phe-тРНК составляла не менее 25 000 имп/мин на 1 ОЕ₂₆₀.

Ac(Br)-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (Ac(Br)-X-тРНК^{Phe}) получали реакцией [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (тРНК^{Phe}), растворенной в 0,1 М ацетате триэтиламмония, pH 7,8, с N-оксисукцинимидным эфиром бромуксусной кислоты, растворенным в диоксане [4]. Степень N-ацилирования определяли по количеству радиоактивности, остающейся в N-ациламиноацил-тРНК после выдерживания препарата в 0,1 М растворе CuSO₄ в 0,05 М буфере трис-HCl, pH 7,5 [17]. Степень N-ацилирования составляла 95–98%.

на β-субъединице фермента. Что касается локализации остатка фенилаланина в составе аминокислот-тРНК, то результаты настоящей работы (β-субъединица в составе

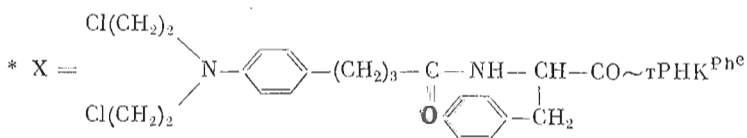


в совокупности с результатами работы по алкилированию фермента с помощью хб-тРНК [12] (α-субъединица в составе X*) позволяют предположить, что он находится вблизи участка контакта между субъединицами.

Экспериментальная часть

Суммарную тРНК из *E. coli* MRE-600 выделяли согласно работе [13], Phe-тРНК-синтазу из *E. coli* MRE-600 — по модифицированному методу Штальберга [14, 15]. N-Оксисукцинимидный эфир бромуксусной кислоты получали конденсацией бромуксусной кислоты с N-оксисукцинимидом под действием диметилформамида в этилацетате [16]. Содержание брома в препарате, определяемое потенциометрическим титрованием, составляло не менее 90% от теоретического.

тРНК, используемую для препаративного аминокислотирования, предварительно обрабатывали уксусным ангидридом для защиты аминокислот, используемых для синтеза тРНК. тРНК, используемую для препаративного аминокислотирования, предварительно обрабатывали уксусным ангидридом для защиты аминокислот, используемых для синтеза тРНК.



Связывание $\text{As}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$ ($[^{14}\text{C}]\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$) с Phe-tPHK -синтетазой проводили в буфере А (0,02 М KH_2PO_4 (рН 6,5), 0,005 М MgSO_4) при 4° С в течение 1 мин. Смесь содержала 14 пмоль фермента и 0–450 пмоль $\text{As}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$ ($[^{14}\text{C}]\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$) в объеме 150 мкл. Влияние субстратов реакции аминоацилирования на связывание реагента с ферментом определяли при мольном соотношении фермент — реагент 1 : 8 в объеме 300 мкл. Концентрации лигандов в реакционной смеси варьировали в следующих пределах: tPHK^{Phe} 0–18 мкМ, $L\text{-Phe}$ 0– $3,3 \cdot 10^{-3}$ М, АТФ 0– $3,3 \cdot 10^{-3}$ М, $L\text{-Phe} + \text{АТФ}$ (при совместном присутствии) 0– 10^{-4} М каждый. Об образовании комплекса судили по количеству радиоактивной метки, сорбирующейся на нитроцеллюлозных фильтрах HUF5. Константу диссоциации комплекса определяли графически по Скэтчарду, с учетом эффективности сорбции [18], которая составляла $\approx 35\%$.

Алкилирование фермента проводили в буфере А при 37° С в течение 26 ч. Смесь I содержала 1,2 мкМ фермент и 3,8 мкМ реагент в объеме 225 мкл. При локализации участка связывания L -фенилаланина в составе $\text{As}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$ на субъединицах фермента смесь содержала 2 мкМ фермент и 20 мкМ реагент в объеме 700 мкл (смесь II). За глубиной инактивации и ковалентным присоединением следили как описано ранее [4, 19].

tPHK из ковалентного соединения удаляли с помощью щелочного гидролиза [4], а также гидролиза рибонуклеазой А: в реакционную смесь II добавляли $1/10$ объема 2 М NaCl и $1/10$ от веса суммарной tPHK бычьей панкреатической рибонуклеазу А. Гидролиз вели 4 ч при 37° С. Фермент после рибонуклеазного гидролиза выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (сверхтонкий). Колонку (объем 7 мл, высота 30 см) уравнивали буфером 0,1 М трис-HCl, рН 7,5. Перед нанесением на колонку в смесь добавляли $1/10$ объема 2 М трис-HCl, рН 7,5. Элюцию проводили 0,1 М трис-HCl со скоростью 600 мкл/ч. Поглощение элюата при 280 нм непрерывно регистрировали на микроспектрофотометре.

Раствор фермента после гель-фильтрации концентрировали диализом против 30% полиэтиленгликоля, затем ипкубировали 3 ч в 1% растворе додецилсульфата натрия и подвергали электрофорезу в 7,5% полиакриламидном геле в системе I [20]. Гель окрашивали в 0,25% растворе ку-масси в фиксаторе (вода — метанол — уксусная кислота, 5 : 5 : 1), избыток красителя отмывали 7% уксусной кислотой и водой. Затем гель обрабатывали два раза по 40 мин в перегнанном диметилсульфоксиде, выдерживали 1 ч в 20% растворе 2,5-дифенилоксазола (РРО) в диметилсульфоксиде и отмывали водой (3–4 смены в течение нескольких часов). Гель сушили в аппарате «Gel-drier» (Biorad Laboratories, США) на подложке из бумаги ватман 3 ММ, экспонировали с рентгеновской пленкой HS 11 (ГДР) в течение месяца и проявляли.

Величину K_i рассчитывали методом наименьших квадратов по уравнению

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)},$$

где v , $[S]$, $[I]$ — экспериментальные значения скорости аминоацилирования и концентрации tPHK^{Phe} и $\text{As}(\text{Br})\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tPHK}^{\text{Phe}}$ соответственно.

Концентрацию фермента определяли с учетом коэффициента поглощения $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}} = 0,9$ и молекулярного веса фермента 320 000 (данные будут опубликованы позднее).

Авторы глубоко признательны В. Н. Анкиловой за выделение фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bartmann P., Hanke T., Hammer-Raber B., Holler E. Selective labelling of the β -subunit of *L*-phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* with N-bromoacetyl-*L*-phenylalanyl-tRNA^{Phe}.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, № 2, p. 743—747.
2. Горшкова И. И., Кнорре Д. Г. Начальная скорость аффинной модификации реагентами, образующими активные промежуточные частицы.— Биоорганич. химии, 1980, т. 6, № 2, с. 230—241.
3. Friedman S., Janet L. H., Nakanishi K., van Lear J. 3-(3-Amino-3-carboxy-*n*-propyl)-uridine. The structure of the nucleoside in *Escherichia coli* transfer ribonucleic acid that reacts with phenoxyacetoxysuccinimide.— Biochemistry, 1974, v. 13, № 14, p. 2932—2937.
4. Анкилова В. Н., Горшкова И. И., Кононова Т. А., Лаврик О. И., Ходырева С. И. Блокирование тРНК-узнающего участка фенилаланил-тРНК синтетазы из *Escherichia coli* MRE-600 с помощью N-хлорамбуцил-фенилаланил-тРНК.— Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 5, с. 1085—1095.
5. Hausske F., Watanabe K., Cramer F., Seela F. Photolabile and paramagnetic derivatives of the nucleoside X and of *Escherichia coli* tRNA^{Phe}.— Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, B. 359, № 12, S. 1659—1665.
6. Friedman S. The effect of chemical modification of 3-(3-amino-2-carboxypropyl)uridine.— J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 15, p. 7111—7115.
7. Gunter C., Holler E. Phenylalanyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* K-10. Multiple enzyme-aminoacyl-tRNA complexes as a consequence of substrate specificity.— Biochemistry, 1979, v. 18, № 10, p. 2028—2038.
8. Santy D. V., Danenberg P. V. Phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli*. Analysis of phenylalanine binding site.— Biochemistry, 1974, v. 10, № 25, p. 4813—4820.
9. Wilchek M., Givol D. Haloacetyl derivatives.— In: Methods in Enzymology. New York a.o., 1977, v. 46, p. 153—157.
10. Горшкова И. И., Лаврик О. И., Филиппов В. В. Роль карбоксильных групп во взаимодействии фенилаланил-тРНК синтетазы с субстратами.— Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 1, с. 62—71.
11. Власов В. В., Лаврик О. И., Ходырева С. И., Чижиков В. Е., Швалье А. И. Модификация фенилаланил-тРНК синтетазы *Escherichia coli* производными тРНК^{Phe}, несущими реакционноспособные группы на остатках гуанозина.— Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 3, с. 531—538.
12. Лаврик О. И., Ходырева С. И. Модификация α -субъединицы фенилаланил-тРНК синтетазы из *E. coli* MRE-600 с помощью N-хлорамбуцил-фенилаланил-тРНК.— Биохимия, 1979, т. 44, № 3, с. 570—571.
13. Горшкова И. И., Дацый И. И., Лаврик О. И., Малаев С. В. Роль остатков лизина во взаимодействии фенилаланил-тРНК синтетазы с субстратами.— Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 5, с. 1096—1104.
14. Stulberg M. P. The isolation and properties of phenylalanyl ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli* B.— J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 5, p. 1060—1064.
15. Kosakowsky H. M., Böck A. The subunit structure of phenylalanyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*.— Eur. J. Biochem., 1970, v. 12, № 1, p. 67—73.
16. De Groot N., Lapidot Y., Panet A., Wolman Y. The synthesis of N-acetylphenylalanyl-sRNA.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 25, № 1, p. 17—22.
17. Shofield P., Zamecnic P. C. Cupric ion catalysis in hydrolysis of aminoacyl-tRNA.— Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 155, № 2, p. 410—416.
18. Yarus M., Berg P. On the properties and utility of membrane filter assay in the study of isoleucyl-tRNA synthetase.— Analyt. Biochem., 1970, v. 35, № 2, p. 450—465.
19. Горшкова И. И., Лаврик О. И. Аффинная модификация фенилаланил-тРНК синтетазы в присутствии лигандов.— Молекулярн. биология, 1975, т. 9, № 6, с. 887—892.
20. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.— J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406—4412.

Поступила в редакцию
29.IX.1980

После доработки
5.XI.1980

AFFINITY LABELING OF PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM *E. COLI*
MRE-600 WITH Ac(Br)-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}

BEZNEDELNAYA N. I., GORSHKOVA I. I., LAVRIK O. I.,
KHODYREVA S. N.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Affinity labeling of phenylalanyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE-600 with Ac(Br)-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} was investigated. The reagent was shown to be a competitive inhibitor with respect to tRNA^{Phe} and noncompetitive with respect to *L*-phenylalanine in aminoacylation. tRNA^{Phe} displaces the reagent from the complex with the enzyme at concentrations which are about K_m for tRNA in aminoacylation, whereas *L*-phenylalanine does this only at concentration three orders of magnitude higher than K_m value for *L*-phenylalanine. Enzyme treatment with the reagent almost completely inhibits aminoacylation and leads to covalent binding of tRNA analog with the enzyme. Removal of the tRNA moiety of the reagent by mild alkaline hydrolysis results in partial restoration of the enzyme activity and parallel partial loss of radioactive label from the protein, thus implicating alkylation of a carboxyl group. Detachment of the tRNA moiety with RNase produces no restoration of the aminoacylation activity, radioactive label being completely retained. The label is localized in the β -subunit of the enzyme. A conclusion is made that the recognition site for tRNA resides within the β -subunit. It is hypothesized that phenylalanine residue in aminoacyl-tRNA is localized in the vicinity of subunit contact.
