



УДК 577.152.611*2'13

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПИРОФОСФОРИЛИРОВАННОЙ
ФОРМЫ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК—СИНТЕТАЗЫ*Ковалева Г. К., Нурбеков М. Б., Меркулова Т. И.,
Киселев Л. Л.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Высокоочищенная триптофанил-тРНК-синтетаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота при инкубации с неорганическим пирофосфатом образует пирофосфофермент (E-PP). Пирофосфатный остаток связан фосфоангидридной связью с карбоксильной группой остатка дикарбоновой кислоты белковой молекулы. Триптофанспецифичная тРНК вызывает частичное дефосфорилирование E-PP-формы синтетазы, причем в присутствии еще и неорганической пирофосфатаз отщепляется до 80% связанного пирофосфата. Пирофосфофермент полностью сохраняет активность в реакции триптофанзависимого АТР— ^{32}P PP₁-обмена. Дефосфорилирование E-PP-формы под действием гидроксилламина приводит к активации фермента в этой реакции без изменения величины K_m для триптофана и АТР. Стехиометрия в комплексе триптофаниладенилат — фермент для пирофосфорилированного и нативного препаратов примерно одинакова (1:1), дефосфорилированный под действием гидроксилламина препарат образует в тех же условиях 1,5 моль триптофаниладенилата на 1 моль димерной молекулы фермента. Обнаруженные различия обусловлены, по-видимому, конформационными изменениями в дефосфорилированном ферменте, которые могут ослаблять отрицательную кооперативность, характерную для нативной триптофанил-тРНК-синтетазы при связывании аденилатов.

Триптофанил-тРНК-синтетаза (триптофан: тРНК-лигаза, АМР-образующая, КФ 6.1.1.2) из поджелудочной железы крупного рогатого скота — наиболее изученная аминоксил-тРНК-синтетаза из многоклеточных (см. обзоры [1–3]). В частности, для этого фермента обнаружено ковалентное производное с субстратной аминокислотой — триптофаном [4, 5] и показано, что при обработке фермента избытками ^{32}P пирофосфата образуется стабильное ^{32}P -радиоактивное производное, сохраняющее ферментативную активность и кинетические характеристики нативного фермента [6]. В этой работе мы поставили целью исследовать свойства триптофанил-тРНК-синтетазы, модифицированной ^{32}P пирофосфатом.

Прежде всего было необходимо выяснить, происходит ли при взаимодействии пирофосфата с ферментом расщепление пирофосфата до ортофосфата, приводящее к образованию фосфофермента, или образуется пирофосфофермент, как в случае неорганической пирофосфатазы из дрожжей [7]. Для этого неорганический остаток отщепляли от модифицированного белка в присутствии NH_2OH и образующиеся радиоактивные продукты анализировали по методу [8], основанному на том, что ортофосфат в присутствии пирофосфата избирательно взаимодействует в кислой среде с молибдатом аммония с образованием фосфомолибдатаммониевого комплекса. Мы не наблюдали образования такого комплекса; в то же время после обработки пирофосфофермента неорганической пирофосфатазой был открыт почти количественно ^{32}P ортофосфат. Кроме того, при анализе ТСХ на полиэтиленимицицеллюлозе ^{32}P -меченой E-PP-формы синтетазы, дефосфорилированной инкубацией при pH 3,5 (30 мин, 37°C), обнаружен ^{32}P пирофосфат. Эти данные позволили заключить, что в ^{32}P -меченом ферменте с белком связан остаток пиро-, а не ортофосфата. Возможные причины ковалентного связывания целой молекулы пирофосфата с ферментом обсуждались ранее [6]. Наблюдаемая стехиометрия связывания (1 моль пирофосфата на 1 моль димерной молекулы белка) свидетельствует о способности лишь половины активных центров фермента к связыванию пирофосфата.

Таблица 1

Стабильность E-PP-формы синтетазы в присутствии различных лигандов в отсутствие (А) и в присутствии (Б) пирофосфатазы (0,01 мг/мл)

Лиганды (концентрация, мМ)	Связанный [32 P]PP ₁ , моль/моль белка	
	А	Б
—	1,0	0,9
Trp (0,1) + АТР — Mg ²⁺ (2)	0,8	0,5
tРНК ^{Trp} (1·10 ⁻³)	0,6	0,2

Таблица 2

Включение 14 C-радиоактивности в белок в процессе дефосфорилирования [32 P] E-PP-формы синтетазы под действием [14 C]NH₃ОН₂ по данным гель-фильтрации

Время инкубации, мин	Связанный [32 P]PP ₁ , моль/моль белка	Включение 14 C в белок, моль/моль белка
0	1,0	0
2	0,5	0,20
10	0,38	0,36
30	0,25	0,40
60	0,20	0,40

Для выделенной пирофосфорилированной формы фермента наблюдается отщепление в той или иной степени пирофосфатного остатка в присутствии субстратов. В присутствии АТР—Mg²⁺ и L-триптофана происходит незначительное освобождение 32 P-радиоактивности, tРНК^{Trp} обладает более выраженным действием (табл. 1). При одновременном добавлении субстратов и неорганической пирофосфатазы степень дефосфорилирования возрастает, причем в присутствии tРНК в сочетании с пирофосфатазой отщепляется до 80% пирофосфатата. Известно, что tРНК^{Trp} индуцирует в синтетазе конформационные изменения, меняющие чувствительность фермента к протеолизу и резко ослабляющие связь белка с триптофаниладенилатом [9, 10]. По-видимому, tРНК^{Trp} индуцирует такое конформационное изменение в пирофосфоферменте, которое делает связь пирофосфатного остатка с белком доступной для гидролиза и водой, и пирофосфатазой.

Исследование дефосфорилирующего действия лигандов мы провели на двух типах препаратов: «свежих» (1–5 ч после обработки пирофосфатом) и «постаревших» (15–20 ч при 25°С или несколько суток при 4°С после инкубации с пирофосфатом). Оказалось, что степень дефосфорилирования, вызываемого лигандами, существенно снижается по мере «старения» пирофосфосинтетазы. Поэтому расхождение в характере действия лигандов на E-PP-форму синтетазы между этой и предыдущей [6] работами объясняется использованием «постаревшей» [6] и свежесыделенной форм пирофосфофермента. Учитывая эти обстоятельства, все дальнейшие эксперименты проводили на свежеполученных препаратах E-PP-синтетазы (не более 5 ч после инкубации с [32 P]пирофосфатом).

Индукция дефосфорилирования под действием специфических лигандов (табл. 1) может рассматриваться как косвенный аргумент в пользу высказанного ранее [6] предположения о том, что пирофосфатный остаток связывается поблизости от активного центра фермента или непосредственно в нем. Способность половины активных центров к ковалентному связыванию пирофосфата, отмеченная выше, свидетельствует о том же, поскольку известно, что аналогичное явление наблюдается и с tРНК^{Trp} [11], и с триптофаном [12], и с триптофаниладенилатом [13, 14].

Для выяснения природы группы аминокислотного остатка белка, с которой связан остаток пирофосфата, мы исследовали действие NH₂ОН и

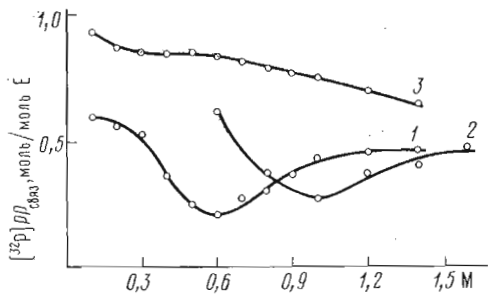


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость дефосфорилирования E-PP-формы синтетазы (1 мкМ) в присутствии NH_2OH (1), NH_2OCH_3 (2) и KCl (3) от их концентрации. На оси абсцисс — остаточное количество $[^{32}\text{P}]$ пирофосфата, связанного с ферментом. Условия см. в «Экспер. части»

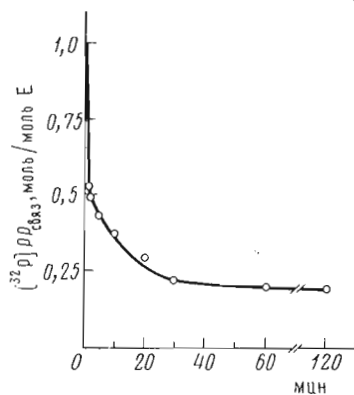


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость дефосфорилирования E-PP-формы синтетазы (4 мкМ) от времени инкубации с 0,6 М NH_2OH

NH_2OCH_3 на E-PP-форму фермента. Из рис. 1 видно, что при низких концентрациях реагентов пирофосфофермент расщепляется незначительно. Максимальное дефосфорилирование (более 80%) происходит в присутствии 0,6 М NH_2OH и 1 М NH_2OCH_3 , что свидетельствует об ограниченной доступности исследуемой связи действию NH_2OH и в особенности более гидрофобного NH_2OCH_3 . На рис. 1 приведена также в качестве контроля зависимость степени дефосфорилирования пирофосфосинтетазы от концентрации KCl , который, являясь продуктом нейтрализации хлоргидратов используемых гидросиламинов KOH , находится в реакционной смеси в тех же концентрациях, что и сами реагенты. Видно, что присутствие KCl почти не влияет на стабильность пирофосфофермента.

Изменение концентрации E-PP-формы синтетазы от 1 до 10 мкМ почти не влияет на степень дефосфорилирования в присутствии 0,6 М NH_2OH . Наблюдаемое незначительное (на 15%) ее снижение вызвано, возможно, ассоциацией белковых молекул, несколько затрудняющей дефосфорилирование.

В случае как NH_2OH (рис. 2), так и NH_2OCH_3 (табл. 2) процесс дефосфорилирования практически заканчивается через 20 мин после начала инкубации, причем за 2 мин отщепляется более 50% связанного пирофосфата. Такое относительно быстрое дефосфорилирование пирофосфофермента в присутствии гидросиламинов при нейтральных pH характерно для ацилфосфатов [15]. Из табл. 2 видно, что в присутствии $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{O}^+\text{NH}_2$ наряду с дефосфорилированием происходит также ^{14}C -мечение белка, однако не весь белок при дефосфорилировании переходит в соответствующий гидроксамат. По-видимому, NH_2OCH_3 , как сильный нуклеофил, разрывает фосфоангидридную связь не только по карбонильному атому углерода, но и, при наличии вблизи него объемных заместителей, по Р-атому с образованием N-пирофосфорилированного производного NH_2OCH_3 и освобождением карбоксильной группы белка. Нельзя исключить также и вклад в процесс дефосфорилирования гидролиза фосфоангидридной связи водой при высокой ионной силе (1,2 М KCl) в том случае, когда доступность этой связи действию NH_2OCH_3 ограничена.

Образование O- ^{14}C производных синтетазы в присутствии $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{O}^+\text{NH}_2$ наблюдали ранее для триптофанальной формы фермента [3, 5]. Однако исследуемые препараты пирофосфосинтетазы, как было отдельно показано, не содержат ковалентно связанного триптофана. Кроме того, перед пирофосфорилированием препараты фермента дополнительно очищали пересаживанием при pH 4,5, разрушающим триптофанилфермент [1].

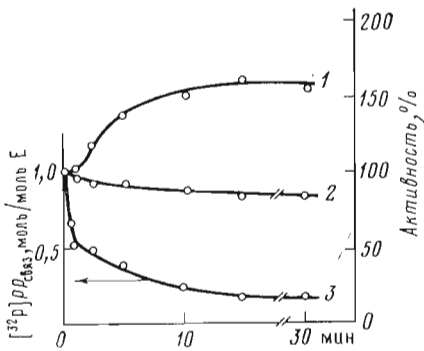


Рис. 3

Рис. 3. Влияние инкубации *E-PP* формы синтетазы с 0,6 М NH_2OH на активность фермента в реакциях АТФ — $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ -обмена (1) и аминоацилирования тРНК^{Trp} (2), а также на дефосфорилирование ^{32}P -меченой *E-PP*-формы фермента (3). За исходный уровень активности в каждый момент времени принимали активность исходного фермента, инкубированного с 0,6 М NH_2OH

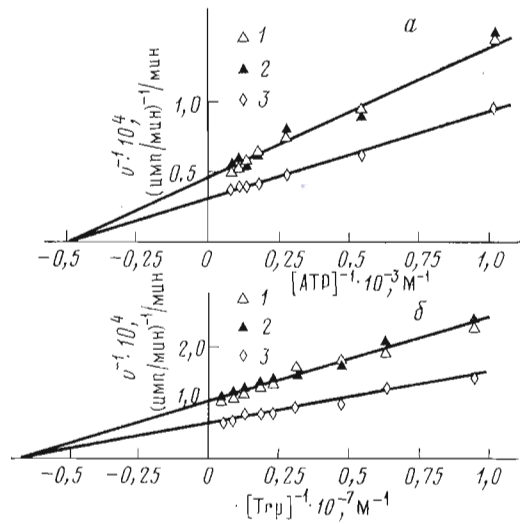


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость скорости реакции АТФ — $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ -обмена от концентрации АТФ (а) и триптофана (б) для исходного фермента (1), *E-PP*-формы (2) и *E-PP*-формы, дефосфорилированной в присутствии 0,6 М NH_2OH (3). Концентрации в реакционной смеси (мМ): АТФ — Mg^{2+} 0,92–13,6; *L*-триптофана $1,1\text{--}21,3 \cdot 10^{-4}$; фермента $4 \cdot 10^{-5}$

В триптофанил-тРНК-синтетазе не обнаружено чувствительных к гидроксилламинам пептидных связей [5]. Следовательно, наблюдаемое ^{14}C -мечение белка при взаимодействии с $[\text{}^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{ONH}_2$ в процессе дефосфорилирования *E-PP*-формы прямо указывает на наличие фосфоангидридной связи между пирофосфатом и COOH -группами белковой молекулы. Этой интерпретации соответствует также дефосфорилирование пирофосфосинтетазы в присутствии щелочной фосфатазы [6].

Дефосфорилирование *E-PP*-формы синтетазы под действием NH_2OH сопровождается возрастанием ферментативной активности в реакции АТФ — $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ -обмена (рис. 3); в реакции аминоацилирования тРНК^{Trp} активность почти не изменяется или незначительно падает.

Обнаруженное ускорение АТФ — $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ -обмена могло быть следствием изменения кинетических констант у дефосфорилированного под действием NH_2OH фермента по сравнению с исходным. Как видно из рис. 4, K_m для АТФ и *L*-триптофана у этих двух форм фермента практически не различаются, а возрастание скорости обмена является следствием возрастания максимальной скорости реакции (V). Сравнение свойств исходного, пирофосфорилированного и дефосфорилированного под действием NH_2OH препаратов фермента показало, что последний обладает большей способностью к образованию аденилатов. Если нативный фермент и его *E-PP*-форма образуют 1 моль триптофаниладенилата, то пирофосфосинтетаза, дефосфорилированная под действием NH_2OH , образует в тех же условиях 1,5 моль триптофаниладенилата на 1 моль димерной молекулы фермента. Триптофанил-тРНК-синтетаза обладает выраженной отрицательной кооперативностью в отношении связывания триптофаниладенилатов по двум активным центрам [13, 14], что делает невозможным одновременное связывание двух аденилатов по двум активным центрам и их одновременное участие в АТФ — $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ -обмене. В *E-PP*-форме фермента, дефосфорилированного под действием NH_2OH , вероятно, происходит включение второго центра в реакцию АТФ — $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ -обмена, что и приводит к возрастанию величины V . Учитывая, что дефосфорилирование

пирофосфосинтетазы без модификации СООН-групп белковой молекулы под действием КСl или щелочной фосфатазы не приводило к активации фермента, можно предположить, что образование второго моля аденилата облегчается при снижении отрицательного заряда (замена СООН-группы на $-\text{CONHOH}$) при дефосфорилировании *E-PP*-формы под действием NH_2OH . Поскольку величины K_m субстратов при этом не изменяются (рис. 4), образование аденилатов может быть облегчено вследствие конформационных изменений в ферменте, ослабляющих отрицательную кооперативность. Сама возможность снятия отрицательной кооперативности вполне реальна: например, на том же ферменте показано, что сильная отрицательная кооперативность при связывании триптофана снимается в присутствии АТФ [16, 17]. Отсутствие влияния модификации фермента при дефосфорилировании пирофосфосинтетазы под действием NH_2OH на скорость суммарной реакции аминоацилирования tRNK^{Trp} может объясняться тем, что у этого фермента скоростьюлимитирующей стадией является, вероятно, реакция переноса триптофанильного остатка из аденилата на tRNK^{Trp} , как это показано для ряда аминоксил- tRNK -синтетаз [18]. В таком случае ускорение обмена не влияет на скоростьлимитирующую стадию реакции. Таким образом, выявленная карбоксильная группа триптофанил- tRNK -синтетазы, способная ковалентно связывать пирофосфат, существенна, очевидно, для взаимодействия активных центров этого фермента в процессе его функционирования.

Параллельно с исследованием пирофосфорилированной триптофанил- tRNK -синтетазы под действием неорганического пирофосфата обнаружено связывание пирофосфата в ходе ферментативного образования триптофаниладенилата за счет пирофосфата, освобождающегося при расщеплении АТФ [19]. Это указывает на неслучайный характер исследуемого явления.

Можно думать, что в аминоксил- tRNK -синтетазах пирофосфат не только один из продуктов реакции, но и значительно более важный компонент функционирующего фермента, о чем свидетельствует ряд данных: пирофосфат в очень низких концентрациях ингибирует активность синтетаз [20, 21], изменяет стабильность комплекса изолейцил- tRNK -синтетазы с аналогами аденилата [22], препятствует образованию второй молекулы триптофаниладенилата на ферменте [14, 23], не обменивается со свободным пирофосфатом, когда один из активных центров триптофанил- tRNK -синтетазы блокирован [23].

Экспериментальная часть

В работе использовали *L*-метилен [^{14}C] триптофан, 52 Ки/моль, [^{32}P] пирофосфат, 33 Ки/моль (Radiochemical Centre, Amersham, Англия); [^{14}C] H_3ONH_2 , 55 Ки/моль («Изотоп», СССР), трис, *L*-триптофан (Sigma, США); динатриевую соль АТФ (Reanal, ВНР); 2-меркаптоэтанол, активированный уголь Norit А (Merck, ФРГ); бромид цетилтриметиламмония (цетавлон), нитроцеллюлозные фильтры «Synrog» № 2 и 3 (Chemapol, ЧССР); сефадекс G-50, тонкий (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция); дрожжевую неорганическую пирофосфатазу и щелочную фосфатазу из *E. coli* (Worthington, США).

Суммарная и 2%-ная tRNK^{Trp} из печени быка получены как описано в работе [24].

Препарат фермента получали по методике, описанной ранее, и перед использованием подвергали кислотному пересаживанию [1]. Препарат гомогенен при электрофорезе в денатурирующих условиях. Активность фермента в реакциях АТФ — [^{32}P] *PP*_i-обмена и аминоацилирования tRNK^{Trp} определяли согласно [1]. Радиоактивность измеряли в толуоловом сцинтилляторе на счетчике (Intertechnique, Франция).

При фосфорилировании препарат триптофанил- tRNK -синтетазы (20–50 мкМ) инкубировали 10 мин при 37° С с [^{32}P] пирофосфатом (3 мМ) в 0,02 М трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,2 мМ 2-меркаптоэтанол. При фосфорилировании в денатурирующих условиях буфер

содержал 2% додецилсульфата натрия. Для удаления избытка радиоактивного PP_1 , не связанного с ферментом, смесь пропускали через колонку (0,9×27 см) с сефадексом G-50, тонкий, уравновешенным 0,02 М трис-HCl-буфером (pH 7,5); скорость элюции 12 мл/ч, объем фракций 0,4 мл.

Количество ^{32}P -радиоактивности, связанной с ферментом, определяли в аликвотах после осаждения белка 3–5%-ной трихлоруксусной кислотой. Пробы выдерживали 5 мин при 4°С, образовавшийся осадок переносили на нитроцеллюлозные фильтры «Synpro» № 3, промывали 6 раз по 10 мл холодной дистиллированной водой, тщательно высушивали и определяли радиоактивность.

^{32}P -содержащий неорганический остаток, ковалентно связанный с белковой молекулой фермента, отщепляли инкубацией ^{32}P -меченного препарата (pH 3,5; 37°С, 30 мин) или инкубацией с 0,6 М NH_2OH (37°С, 30 мин). Содержание $[^{32}P]PP_1$ и $[^{32}P]P_1$ при их возможном совместном присутствии определяли по модифицированному методу [8], а также восходящей хроматографией на полиэтилениминоцеллюлозе в 0,75 М KH_2PO_4 , pH 3,5, с последующей автораддиографией.

Влияние лигандов и неорганической пирофосфатазы на стабильность пирофосфорилированного фермента исследовали, инкубируя последний в концентрации 5 мкМ в течение 30 мин при 37°С в 0,02 М трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 0,2 мМ 2-меркаптоэтанол с субстратами в присутствии неорганической пирофосфатазы или без нее. Конечная концентрация пирофосфатазы 0,01 мг/мл, АТФ- Mg^{2+} — 2 мМ, триптофана — 100 мкМ, тРНК^{Trp} — 10 мкМ. При инкубации с неорганической пирофосфатазой в смесь добавляли 10^{-6} М $ZnCl_2$. Количество $[^{32}P]PP_1$, связанного с белком, определяли как описано выше.

Дефосфорилирование пирофосфорилированной триптофанил-тРНК-синтетазы в присутствии NH_2OH и NH_2OCH_3 проводили, инкубируя фермент (1–10 мкМ) в 0,02 М трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 0,2 мМ 2-меркаптоэтанол, при 37°С с нейтрализованным до pH 7,0 NH_2OH или нейтрализованным до pH 5,5 NH_2OCH_3 . Концентрации фермента, NH_2OH , NH_2OCH_3 и время инкубации варьировали. Количество $[^{32}P]PP_1$, связанного с ферментом, определяли после осаждения белка 3–5%-ной трихлоруксусной кислотой, как описано выше.

Дефосфорилирование триптофанил-тРНК-синтетазы под действием $[^{14}C]H_2ONH_2$ проводили, инкубируя фермент, нативный или пирофосфорилированный, в концентрации 8 мкМ в течение 2, 10 и 30 мин при 37°С с 1,2 М $[^{14}C]H_2ONH_2$ (0,7 Ки/моль) в 0,02 М трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 0,2 мМ 2-меркаптоэтанол. Пробы наносили на колонку (0,9×27 см) с сефадексом G-50, тонкий, уравновешенным 0,02 М трис-HCl-буфером (pH 7,5); скорость элюции 12 мл/ч, объем фракций 0,4 мл. ^{32}P - и ^{14}C -радиоактивность, связанную с белком, определяли в аликвотах в толуоловом сцинтилляторе после осаждения белка 5%-ной трихлоруксусной кислотой, как описано выше.

Величины K_m и V определяли графическим методом Лайнпувера — Берка.

Количество стабильных триптофаниладенилатов, образующихся на ферменте, определяли в соответствии с работой [25].

Авторы глубоко признательны О. О. Фаворовой за полезные критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. In: Methods Enzymol./Eds Moldavc K., Grossman L. N. Y.: Acad. Press. 1979, v. 59, part G, p. 234–257.
2. Малыгин Э. Г., Киселев Л. Л. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 725–746.
3. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. In: Transfer RNA: structure, properties and recognition/Eds Schimmel P., Söll D., Abelson J. Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, p. 235–246.
4. Фаворова О. О., Ковалева Г. К., Мороз С. Г., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 3, с. 588–601.

5. Kovaleva G. K., Moroz S. G., Favorova O. O., Kisselev L. L. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 1, p. 81-84.
6. Kovaleva G. K., Degtyarev S. Ch., Kisselev L. L. Molec. Biol. Rep., 1981, v. 8, № 1, p. 17-20.
7. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Avaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 481, № 1, p. 184-194.
8. Janson C. A., Degani C., Boyer P. D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 10, p. 3743-3749.
9. Scheinker V. Sh., Beresten S. F., Degtyarev S. Kh., Kisselev L. L. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 3, p. 625-637.
10. Берестень С. Ф., Шейнкер В. Ш., Вологина И. А., Нурбеков М. К., Машкова Т. Д., Авдошина Т. А., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 4, с. 805-815.
11. Akhverdyan V. Z., Kisselev L. L., Knorre D. G., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. J. Mol. Biol., 1977, v. 113, № 3, p. 475-501.
12. Graves P. V., Mazat J. P., Juguelin H., Labouesse J., Labouesse B. Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, № 3, p. 509-518.
13. Ковалева Г. К., Дегтярев С. Х., Фаворова О. О. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 6, с. 1234-1246.
14. Degtyarev S. Kh., Beresten S. F., Denisov L. G., Lavrik O. I., Kisselev L. L. FEBS Lett., 1982, v. 137, № 1, p. 95-99.
15. Stadman E. R. In: Methods Enzymol./Eds Moldave K., Grossman L. N. Y.: Acad. Press, 1957, v. 3, p. 228-231.
16. Дегтярев С. Х., Ковалева Г. К., Зиновьев В. В., Малыгин Э. Г. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, № 1, с. 176-181.
17. Malygin E. G., Kisselev L. L. In: Biology Reviews (Soviet Scientific Reviews, Section D)/Ed. Skulachev V. P., 1982, v. 3, p. 229-274.
18. Baltzinger M., Holler E. Biochemistry, 1982, v. 21, № 10, p. 2460-2467.
19. Kovaleva G. K., Holmuratov E. H., Kisselev L. L. FEBS Lett., 1983, in press.
20. Lui M., Chakraborty K., Mehler A. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 22, p. 8061-8064.
21. Digan J., Deutscher M. Biochemistry, 1979, v. 18, № 14, p. 3165-3170.
22. Flossdorf J., Marutzky R., Kula M.-R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 7, p. 2455-2466.
23. Favorova O. O., Madoyan I. A., Drutza V. L. FEBS Lett., 1981, v. 123, № 2, p. 161-164.
24. Roy K. L., Söll D. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 161, № 2, p. 572-574.
25. Fersht A. R., Ashford J. S., Bruton C. J., Jakes R., Koch G. L. E., Hartley B. S. Biochemistry, 1975, v. 14, № 1, p. 1-4.

Поступила в редакцию
11.1.1983

PREPARATION AND PROPERTIES OF THE PYROPHOSPHORYLATED FORM OF TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE

KOVALEVA G. K., NURBEKOV M. K., MERKULOVA T. I., KISSELEV L. L.

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

After treatment of highly purified beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase (E. C. 6.1.1.2) with pyrophosphate, a pyrophosphorylated enzyme (E-PP) is formed. The phosphoanhydride bond seems to be involved in the E-PP formation as follows from (i) incorporation of the $^{14}\text{C}_3\text{H}_5\text{ONH}_2$ moiety into protein simultaneously with the E-PP dephosphorylation and (ii) dephosphorylation by alkaline phosphatase. The E-PP is partially dephosphorylated in the presence of tRNA^{Trp}; this effect is enhanced by inorganic pyrophosphatase. Other ligands (tryptophan, ATP-Mg²⁺, PP_i, tryptophan+ATP-Mg²⁺) cause no remarkable dephosphorylation. The phosphorylated enzyme retains its activity in the ATP-PP_i exchange and tRNA^{Trp} aminoacylation reactions; the K_m and V values for ATP and tryptophan are close to those for the native enzyme. However, dephosphorylation caused by hydroxylaminolysis leads to activation of the ATP-PP_i exchange due to increase in the V value, whereas K_m for tryptophan and ATP remains the same. The enzyme-adenylate ratios in the native and pyrophosphorylated enzymes are similar, being increased after NH₂OH treatment of the E-PP. It seems likely that the incorporation of the NH₂OH moiety into a protein molecule causes relaxation of the strong negative cooperativity typical of the native enzyme.