
Рибосома

А.С. Стирин, Л.П. Гаврилова

Академия наук СССР

Ордена Ленина

Институт биохимии им. А. Н. Баха

Институт белка

Предисловие к первому изданию

Настоящая монография не является ни историческим очерком развития представлений о биосинтезе белка и структуре и функциях рибосом, ни исчерпывающим обзором литературы по этим вопросам. Основу монографии составляет анализ современных тенденций в данной области. Цель монографии — попытка сформулировать более или менее обобщенные представления о структуре и функционировании рибосомы, как они нам вырисовываются на сегодняшний день. Возможно, что эта попытка по целому ряду пунктов преждевременна, и представления, здесь изложенные, будут очень скоро пересмотрены. Тем не менее, несмотря на такой риск, мы считали целесообразным предпринять эту попытку по следующим соображениям: во-первых, предпринятый анализ может помочь разобраться в имеющейся значительной массе весьма разрозненных экспериментальных данных по рибосомам; во-вторых, при всех обстоятельствах, даже если большая часть изложенных представлений быстро устареет, они могут еще успеть явиться стимулом для постановки целого ряда экспериментов; и, в-третьих, мы надеемся, что кое-что из изложенных представлений все же окажется в основном правильным и относительно стабильным.

В связи с вышесказанным необходимо сделать следующие оговорки. Прежде всего мы не стремились полно цитировать всю литературу по рассматриваемым вопросам, а считали достаточным проиллюстрировать то или иное положение одной или несколькими работами в качестве примера. Разумеется, при этом мы старались выбирать наиболее яркие и доказательные работы. Тем не менее, многие даже очень яркие работы, сыгравшие большую роль в развитии современных представлений о биосинтезе белка, все же не попали в список цитируемой литературы — либо потому, что в значительной мере сейчас представляют лишь исторический интерес, либо пото-

му, что и так очень хорошо известны научному читателю. Наконец, не все вопросы, связанные с рибосомами, рассмотрены в монографии. Например, мы совсем не затронули вопроса о полирибосомах — их распространении в клетках, структурной организации, биологическом значении. Не затронут и вопрос о прикреплении рибосом к мембранам. И так далее. Ведь монография названа «Рибосома», а не «Рибосомы», и не случайно: мы стремились сосредоточиться именно на структурной организации и способе функционирования *индивидуальной* рибосомной частицы как таковой, как полной молекулярной машины.

Целый ряд из перечисленных и сознательно допущенных «пробелов» монографии может быть восполнен имеющейся литературой. Полная сводка работ, опубликованных до 1964 г. включительно, по физическим и химическим свойствам рибосом дана в монографии М. Петерманн (Petermann, 1964). Результаты оригинальных исследований свойств, строения и, особенно, биогенеза рибосом собраны в сборнике под редакцией Р. Робертса (Roberts, 1964). Блестящее изложение проблем структуры и, особенно, функционирования рибосом можно найти в статьях и лекциях Дж. Уотсона (Watson, 1963, 1964, 1965). Полирибосомы, их структура и функция подробно рассматривались в ряде статей А. Рича и Г. Нолля (Rich, 1963; Rich et al., 1963; Noll, 1965). Фундаментальные вопросы генетического кодирования в связи с проблемой трансляции на рибосоме были поставлены и решены в классических работах Ф. Крика (Crick, 1958, 1966). В монографии мы старались не повторять перечисленные обзоры и теоретические статьи.

Мы готовы выслушать любые замечания и критику по всем вопросам, затронутым в монографии.

А. С. Спирип
Л. П. Гаврилова

Январь 1968 г.

Предисловие ко второму изданию

После выхода первого издания этой книги прошло три года. Конечно, за прошедшее время в такой быстро развивающейся отрасли науки, как «молекулярная биология рибосомы», появилось много новых работ и, соответственно, новых данных. Но нас радует то, что основные представления о структуре и функционировании рибосомы, сформулированные в первом издании книги, сохранили свою силу и не подверглись коренной ревизии. Поэтому здесь мы оставили прежнюю планировку и прежний костяк книги.

Тем не менее, во второе издание мы внесли целый ряд крупных изменений. Некоторые из них прямо обусловлены новыми открытиями в исследовании рибосом и биосинтеза белка. Эти изменения носят характер важных фактических дополнений и уточнений к нашим прежним знаниям. Другая часть изменений введена нами как результат более тщательного осмысливания экспериментального материала, о котором шла речь в первом издании. Так, здесь нами впервые сделана попытка сформулировать главные принципы строения рибосомы. Эти принципы мы попытались связать с основными функциональными особенностями рибосомы. По-новому написана глава о подразделении рибосомы на две неравные субчастицы, которая объединена с главой о диссоциации рибосом, и все это выделено в отдельный большой раздел. Значительной ревизии подвергся раздел «Рибосомальные белки». Много новых данных добавлено в отношении функциональной роли всех белковых факторов трансляции. Пересмотрена планировка прежнего раздела «Ассоциация рибосомы с компонентами белок-синтезирующей системы»; он заменен на раздел «Функциональные центры рибосомы». В связи с открытием ГТФ-зависимого связывания аминоксил-тРНК с рибосомой соответствующие главы книги переработаны и дополнены. Значительно дополнен раздел о механизме действия антибиотиков. Наоборот, глава о межцистроновой пунктуации в поли-

цистроновых мРНК полностью исключена, так как прежние концепции оказались неправильными, а новые еще не выработаны.

Мы благодарны всем тем, кто высказывал нам свои замечания, и постарались их учесть здесь. Особую признательность мы хотели бы выразить сотрудникам Лаборатории научной информации Института белка АН СССР за громадную помощь в подготовке как первого, так и второго изданий книги.

А. С. Спирин
Л. П. Гаврилова

Январь 1971 г.

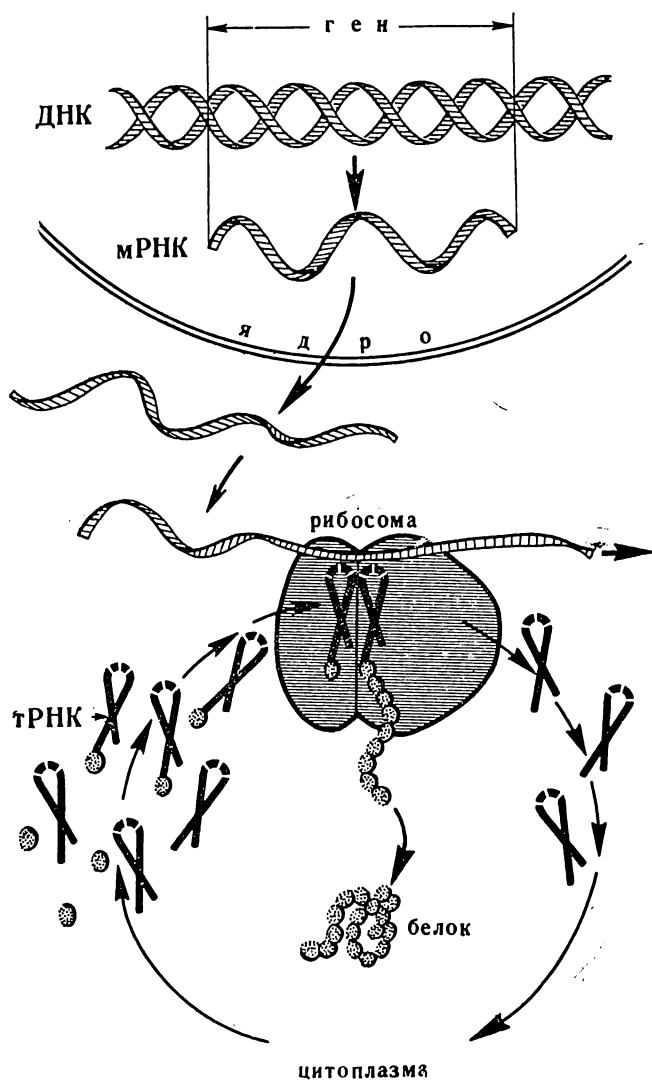
Популярное введение

1. Общая схема биосинтеза белков

Одним из основополагающих достижений биологии в развитии представлений о биосинтезе белка было утверждение того, что решающая роль в осуществлении этого процесса принадлежит нуклеиновым кислотам. Это произошло уже в начале 40-х годов нашего столетия. С тех пор решение проблемы биосинтеза белков неразрывно связано с исследованиями нуклеиновых кислот и их комплексов с белками.

В настоящее время на основании современных представлений о биосинтезе белков можно дать следующую общую принципиальную схему этого сложного и многоступенчатого процесса (рис. 1).

Главная «командная» роль в определении специфической структуры белков принадлежит так называемой *дезоксирибонуклеиновой кислоте* — ДНК. Молекула ДНК представляет собой чрезвычайно длинную линейную структуру, состоящую из двух взаимозакрученных полимерных цепей. Составными элементами — мономерами — этих цепей являются четыре сорта дезоксирибонуклеотидов, чередование или последовательность которых вдоль цепи уникальна и специфична для каждой молекулы ДНК и каждого ее участка. Различные достаточно длинные участки молекулы ДНК ответственны за синтез разных белков. Тем самым одна молекула ДНК может определять синтез большого числа функционально и химически различных белков клетки. За синтез каждого одного типа белков ответствен лишь определенный участок молекулы ДНК. Такой участок молекулы ДНК, связанный с синтезом одного какого-либо белка в клетке, часто обозначают термином *цистрон*. В настоящее время понятие цистрон рассматривают как эквивалентное понятию *ген*. В уникальной структуре гена — в определенном последовательном расположении его нуклеотидов вдоль цепи — заключена вся информация о структуре одного соответствующего белка.



Р и с. 1.
Общая принципиальная схема биосинтеза белка

Однако ДНК и отдельные ее функциональные участки, несущие информацию о структуре белков, сами непосредственного участия в процессе создания белковых молекул не принимают. Первым этапом на пути к реализации этой информации, записанной в цепях ДНК, является так называемый процесс *транскрипции*, или «переписывания». В этом процессе на цепи ДНК как на матрице происходит синтез химически родственного полимера — *рибонуклеиновой кислоты* (РНК). Молекула РНК представляет собой одну цепь, мономерами которой являются четыре сорта рибонуклеотидов, могущих рассматриваться как небольшая модификация четырех сортов дезоксирибонуклеотидов ДНК. Последовательность расположения четырех сортов рибонуклеотидов в образующейся цепи РНК в точности повторяет последовательность расположения соответствующих дезоксирибонуклеотидов одной из двух цепей ДНК. Таким путем нуклеотидная последовательность генов копируется в виде молекул РНК, т. е. информация, записанная в структуре данного гена, целиком переписывается на РНК. С каждого гена может сниматься большое, теоретически неограниченное количество таких «копий» — молекул РНК. Эти молекулы РНК, являющиеся переписанными во многих экземплярах «копиями» генов и, стало быть, несущие ту же информацию, что и гены, расходятся по клетке. Они уже непосредственно входят в связь с белок-синтезирующими частицами клетки и принимают «личное» участие в процессах создания белковых молекул. Другими словами, они являются переносчиками информации от места, где она хранится, в места ее реализации. Соответственно, эти РНК обозначают как *информационные* РНК, или *матричные* РНК, сокращенно — мРНК.

Таким образом, рассмотренная часть схемы описывает поток информации, идущий от ДНК в виде молекул мРНК к внутриклеточным частицам, синтезирующим белки. Теперь мы обратимся к потоку иного рода — к потоку того материала, из которого должен создаваться белок. Элементарными единицами — мономерами — белковой молекулы являются аминокислоты, которых имеется 20 различных сортов. Для создания (синтеза) белковой молекулы свободные аминокислоты, присутствующие в клетке, должны быть вовлечены в соответствующий поток, поступающий в белок-синтезирующую частицу, и уже там расставлены в цепочку определенным уникальным образом, диктуемым информационной РНК. Такое вовлечение аминокислот — строительного материала для создания белка — осуществляется через присоединение свободных аминокислот к особым молекулам РНК относительно

небольшого размера. Эти РНК, служащие для присоединения к ним свободных аминокислот, не являются информационными, а несут иную — адапторную — функцию, смысл которой будет виден дальше. Аминокислоты присоединяются к одному из концов небольших цепочек *адапторных*, или *трансферных* РНК (тРНК), по одной аминокислоте на одну молекулу РНК. Для каждого сорта аминокислоты в клетке существуют свои специфические, присоединяющие только этот сорт аминокислоты, молекулы адапторных РНК. В таком навешенном на РНК виде аминокислоты и поступают в белок-синтезирующие частицы.

Центральным моментом процесса биосинтеза белка является слияние этих двух внутриклеточных потоков — потока информации и потока материала — в белок-синтезирующих частицах клетки. Эти частицы называются *рибосомами*. Рибосомы представляют собой ультрамикроскопические биохимические «машины» молекулярных размеров, где из поступающих аминокислотных остатков, согласно плану, заключенному в информационной РНК, собираются специфические белки. Хотя на данной схеме (рис. 1) изображена лишь одна частица, каждая клетка содержит тысячи рибосом. Количество рибосом определяет общую интенсивность белкового синтеза в клетке. Диаметр одной рибосомной частицы — около 200 Å. По своей химической природе рибосома является рибонуклеопротеидом: она состоит из особой *рибосомальной* РНК (это — третий, известный нам класс РНК, в дополнение к информационным и адапторным РНК) и молекул структурного рибосомального белка. Вместе это сочетание нескольких десятков макромолекул образует идеально организованную и надежную «машину», обладающую свойством прочитывать информацию, заключенную в цепи мРНК, и реализовать ее в виде готовой белковой молекулы специфического строения. Поскольку существо процесса состоит в том, что линейная расстановка 20 сортов аминокислот в цепи белка однозначно детерминируется расположением четырех сортов нуклеотидов в цепи химически совсем иного полимера — нуклеиновой кислоты (мРНК), то этот процесс, происходящий в рибосоме, принято обозначать термином *трансляция*, или «перевод» — перевод как бы с 4-буквенного алфавита цепей нуклеиновых кислот на 20-буквенный алфавит белковых (полипептидных) цепей. Как видно, в процессе трансляции участвуют все три известных класса РНК — информационная РНК, являющаяся объектом трансляции, рибосомальная РНК, играющая роль организатора белок-синтезирующей рибонуклеопротеидной частицы — рибосомы, и адапторные РНК, осуществляющие функцию пере-

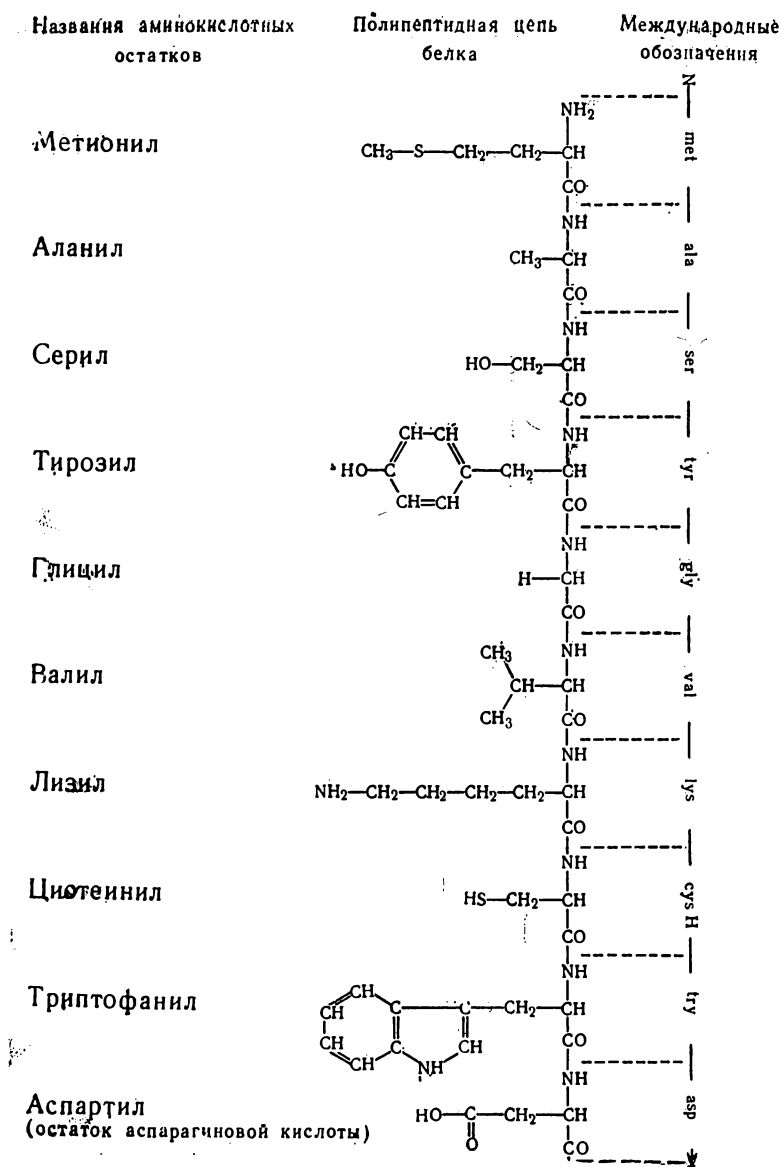
водчика. Рибосома в целом является той минимальной биологической частицей, в пределах которой осуществляется необходимая организация всех ступеней процесса синтеза в пространстве и времени.

Вслед за таким общим наброском принципиальной схемы биосинтеза белков теперь целесообразно кратко рассмотреть те более частные проблемы, каждая из которых за последние годы была центром сосредоточения громадного исследовательского труда и мысли и решение которых составило фундамент современных представлений.

2. Кодирование информации (генетический код)

В качестве первой частной проблемы, с которой можно начать рассмотрение и решение которой за последние годы шло исключительно быстрыми темпами и сопровождалось важными открытиями, можно выдвинуть проблему генетического кода. Эта проблема встает из того простого факта, что белки состоят из аминокислот, а нуклеиновые кислоты — из нуклеотидов, мономеров совсем другой химической природы. Вместе с тем последовательность расположения нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты однозначно детерминирует последовательность расположения аминокислот в цепи белка. Аминокислот в белке при этом 20 разных сортов (рис. 2), а нуклеотидов в нуклеиновых кислотах всего 4. В ДНК этими четырьмя видами нуклеотидов являются адениловый, гуаниловый, цитидиловый и тимидиловый дезоксирибонуклеотиды — сокращенно их обозначают соответственно как А, Г, Ц и Т (рис. 3). РНК построена из подобных же нуклеотидов — адениловых, гуаниловых, цитидиловых и уридилловых рибонуклеотидов, обозначаемых так же, как А, Г, Ц и У, соответственно (рис. 4). (Тимин, входящий в состав тимидилового нуклеотида в ДНК, является метилированным производным урацила в РНК, и в функционировании Т принципиально эквивалентен У.) Вопрос заключается в следующем: каким образом линейная последовательность из 4 сортов элементов (нуклеотидов) определяет линейную последовательность из 20 сортов элементов совсем другой химической природы?

Еще в 50-х годах было выдвинуто представление, нашедшее сейчас всестороннее подтверждение, что определенные различные сочетания из нескольких нуклеотидов соответствуют различным аминокислотам (Gamow, 1954; Gamow et al., 1956;



Р и с. 2.
Аминокислотные остатки, входящие в белок

Названия аминокислотных
остатков

Полипептидная цепь
белка

Международные
обозначения

Фенилаланил



phe

Лейцил



leu

Изолейцил

ileu

Треонил

thr

Аспарагинил
(остаток аспарагина)



asp N

Аргинил



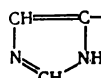
arg

Пролил



pro

Гистидил



his

Глютамил
(остаток глутаминовой кислоты)



glu

Глутаминил
(остаток глутамина)

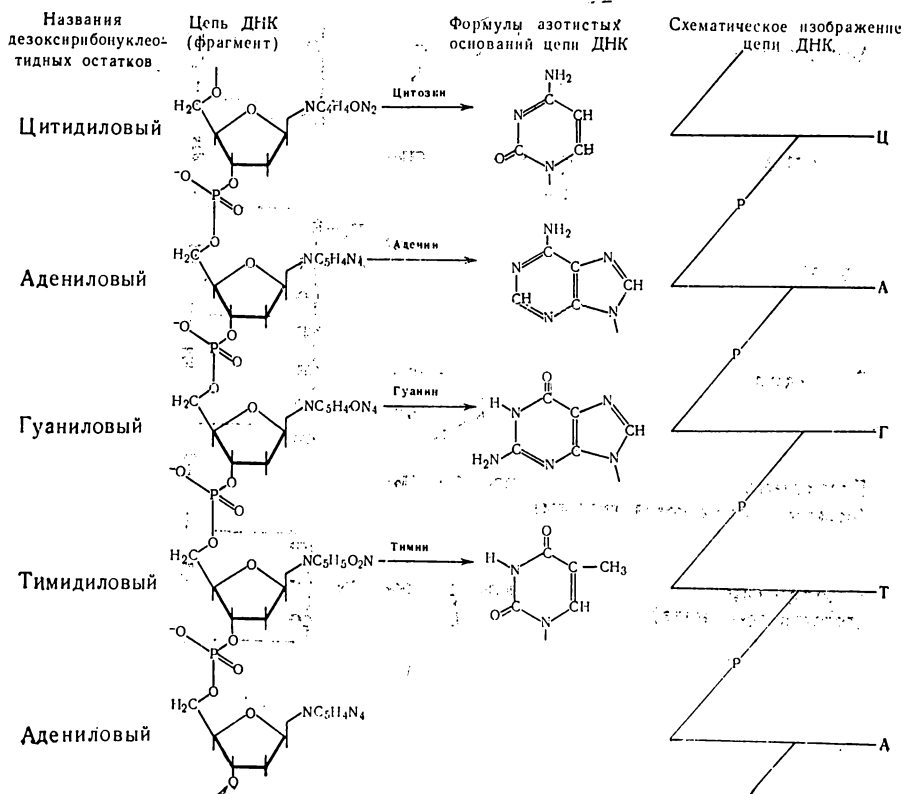


glu N

Crick et al., 1957; Crick, 1958). Другими словами, для каждой аминокислоты есть свое определенное сочетание из нескольких нуклеотидов, химически не имеющее ничего общего с аминокислотой. Получается своего рода код, в котором каждой букве 20-буквенного алфавита соответствует определенное сочетание нескольких букв 4-буквенного алфавита. В настоящее время с достаточной достоверностью показано, что каждой одной аминокислоте в белке соответствует именно триплет нуклеотидов (три последовательно связанных нуклеотида) в цепи нуклеиновой кислоты (Crick et al., 1961; Crick, 1963). Количество возможных различных комбинаций из 4 сортов нуклеотидов по 3 равно 64, а различных аминокислот всего

Р и с. 3.

ДНК: полидезоксирибонуклеотидная цепь (фрагмент) и формулы ее азотистых оснований

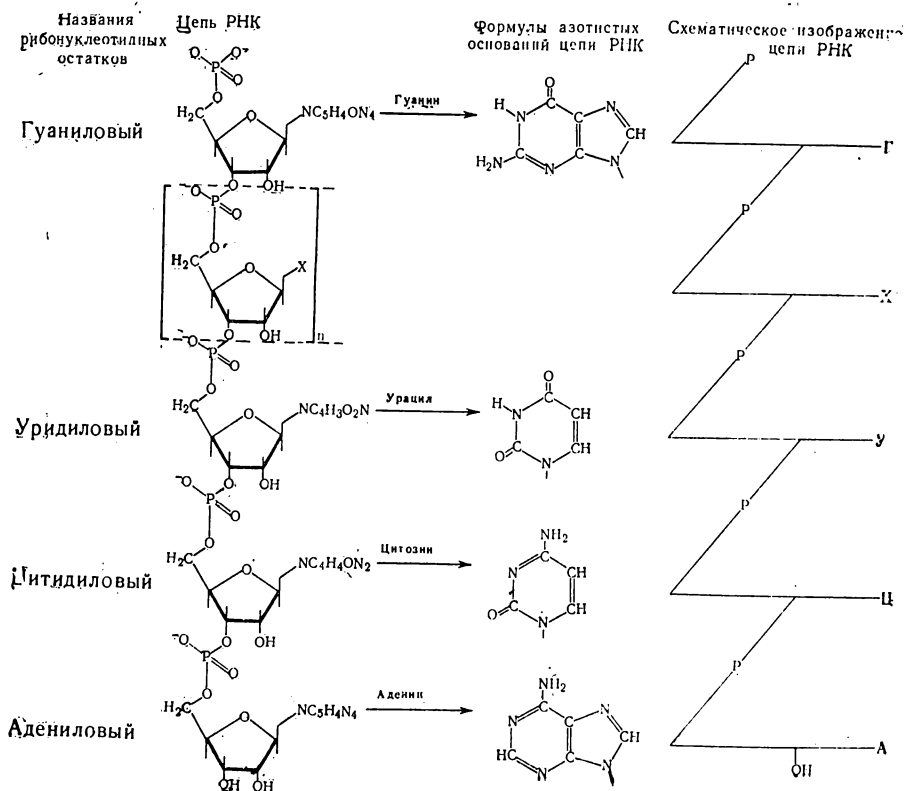


20. Таким образом, количества возможных триплетов вполне достаточно, и даже есть большой избыток, для кодирования 20 аминокислот.

Одним из наиболее крупных достижений биологии последних лет была экспериментальная расшифровка генетического кода, т. е. установление конкретного нуклеотидного состава и последовательности триплетов нуклеотидов для всех 20 аминокислот, входящих в состав белков. Первый решающий эксперимент в этом направлении, проведенный М. Ниренбергом и Г. Маттеи (Nirenberg, Matthaei, 1961), показал, что если в белковом синтезе в качестве информационной РНК присутствует цепочка только из уридилowych нуклеотидов — поли У,

Р и с. 4.

РНК: полирибонуклеотидная цепь и формулы ее азотистых оснований



то синтезируемая полипептидная цепь состоит только из одного сорта аминокислоты, и именно только из аминокислоты фенилаланина. Отсюда стало ясно, что в принципе триплет нуклеотидов УУУ кодирует именно данную аминокислоту — фенилаланин.

Дальнейшее развитие работ по расшифровке кода шло по двум линиям: во-первых и главным образом, по линии использования синтетических полирибонуклеотидов известного состава и последовательности в качестве информационных РНК в белок-синтезирующей системе (Speyer et al., 1963; Nirenberg et al., 1963, 1965; Morgan et al., 1966); во-вторых, по линии изучения аминокислотных замен в белке в результате му-

Р и с. 5.

РНК-аминокислотный код

		Второй нуклеотид кодона					
		У	Ц	А	Г		
Первый нуклеотид кодона	У	УУУ } фенилаланин (phe)	УЦУ }	УАУ } тирозил (tyr)	УГУ } цистеинил (cys)	У	Третий нуклеотид кодона
		УУЦ }	УЦЦ } серил (ser)	УАЦ }	УГЦ }	Ц	
		УУА } лейцил (leu)	УЦА }	УАА }	УГА }	А	
		УУГ }	УЦГ }	УАГ }	УГГ } триптофанил (try)	Г	
	Ц	ЦУУ }	ЦЦУ }	ЦАУ } гистидил (his)	ЦГУ }	У	
		ЦУЦ } лейцил (leu)	ЦЦЦ } пролил (pro)	ЦАЦ }	ЦГЦ } аргинил (arg)	Ц	
		ЦУА }	ЦЦА }	ЦАА } глютаминил (glu N)	ЦГА }	А	
		ЦУГ }	ЦЦГ }	ЦАГ }	ЦГГ }	Г	
	А	АУУ }	АЦУ }	ААУ } аспарагинил (asp N)	АГУ } серил (ser)	У	
		АУЦ } изолейцил (ileu)	АЦЦ } треонил (thr)	ААЦ }	АГЦ }	Ц	
		АУА }	АЦА }	ААА } лизил (lys)	АГА } аргинил (arg)	А	
		АУГ } метионил (met)	АЦГ }	ААГ }	АГГ }	Г	
	Г	ГУУ }	ГЦУ }	ГАУ } аспартил (asp)	ГГУ }	У	
		ГУЦ } валил (val)	ГЦЦ } аланил (ala)	ГАЦ }	ГГЦ } глицил (gly)	Ц	
		ГУА }	ГЦА }	ГАА } глютаминил (glu)	ГГА }	А	
		ГУГ }	ГЦГ }	ГАГ }	ГГГ }	Г	

таций, вызываемых химическими воздействиями на нуклеиновую кислоту (Wittmann, Wittmann-Liebold, 1963; Yanofsky, 1963; Brenner et al., 1965). В настоящее время можно дать полную кодовую таблицу, содержащую все 64 возможных триплета нуклеотидов (рис. 5); из них 61 — «смысловые кодоны», т. е. триплеты, кодирующие ту или иную аминокислоту; 3 триплета, или «кодона» (УАГ, УАА и УГА), оказались «бессмысленными», т. е. не кодируют ни одну из известных аминокислот. Код, как видно, сильно вырожден: большинство аминокислот кодируется более чем одним кодоном.

3. Хранение и воспроизведение закодированной информации

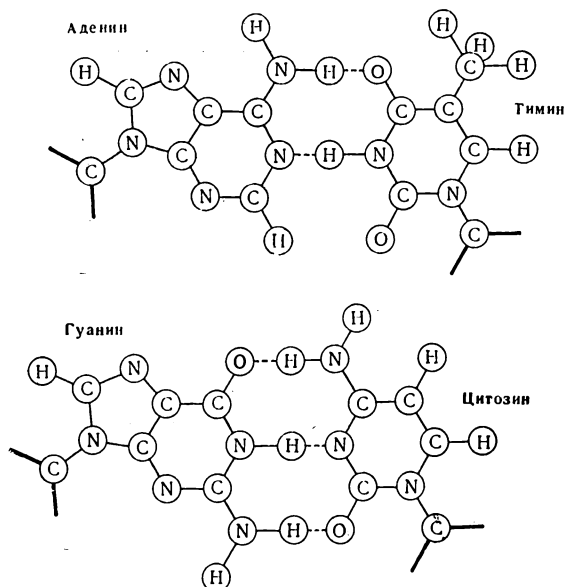
Вторая проблема, связанная с «кибернетической» стороной биосинтеза белков, есть проблема хранения и воспроизведения закодированной генетической информации. Из общей схемы белкового синтеза можно видеть, что начальным пунктом, с которого начинается поток информации для биосинтеза белков в клетке, является ДНК. Следовательно, именно ДНК содержит ту первичную запись, которая должна сохраняться и воспроизводиться от клетки к клетке, из поколения в поколение.

Кратко касаясь вопроса о месте хранения генетической информации, т. е. о локализации ДНК в клетке, можно сказать следующее. Уже давно известно, что в отличие от всех прочих компонентов белок-синтезирующего аппарата, универсально распределенных по всем частям живой клетки, ДНК имеет особую, весьма ограниченную локализацию: местом ее нахождения в клетках высших (эукариотических) организмов является клеточное ядро. У низших (протокариотических) организмов, не имеющих оформленного клеточного ядра — бактерий и синезеленых водорослей, — ДНК также отmeshана от остальной части протоплазмы в виде одного или нескольких компактных нуклеоидных образований. В полном соответствии с этим ядро Eukaryotes или нуклеотид Protokaryotes издавна рассматриваются как вместилище генов, как уникальный клеточный органоид, контролирующий реализацию наследственных признаков организмов и их передачу в поколениях. Генетические данные о «единоначалии» ядра в клетке всегда непосредственно объединялись с биохимическими данными об уникальной локализации ДНК в ядре. За последние годы ста-

ло известно, однако, что такие множественные клеточные органоиды, как митохондрии и растительные хлоропласты, содержат свою собственную ДНК, представляя собой, таким образом, до известной степени генетически «автономные» системы внутри единой клетки, в целом «подчиняющейся» ядру.

Один из кардинальных вопросов генетики на молекулярном уровне — воспроизведение генетической информации. Разгадка молекулярного механизма точного воспроизведения наследственной информации пришла в 1953 г., когда Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель макромолекулярной структуры ДНК (Watson, Crick, 1953 a, b). Формулирование основных положений, лежащих в основе модели, было подготовлено химическими исследованиями состава ДНК, проведенными Э. Чаргаффом (Chargaff, 1950, 1951), и непосредственно рентгеноструктурными исследованиями М. Уилкинса, Р. Франклин и др. (Wilkins et al., 1953; Franklin, Gosling, 1953). Этот момент можно считать «официальной» датой рождения молекулярной биологии. Действительно, впервые на основании чисто структурных соображений, исходя только из структуры молекулы ДНК, удалось понять механизм одного из фундаментальных биологических явлений — воспроизведения себе подобного.

Основной принцип, лежащий в основе макромолекулярной структуры ДНК, — это так называемый *принцип комплементарности*. Существо этого принципа представлено на рис. 6 и 7. Как уже упоминалось, молекула ДНК состоит из двух взаимозакрученных цепей. Эти цепи связаны друг с другом посредством взаимодействия их противоположащих нуклеотидов. При этом по структурным соображениям существование такой двутяжной структуры оказывается возможным только в том случае, если противоположащие нуклеотиды обеих цепей будут стерически комплементарны, т. е. будут своей пространственной структурой дополнять друг друга. Такими взаимодополняющими — комплементарными — парами нуклеотидов являются пара А — Т и пара Г — Ц (рис. 6). Другие варианты взаимодействия между 4 сортами противоположащих нуклеотидов в молекуле нативной ДНК невозможны. Следовательно, согласно этому принципу комплементарности, если в одной цепи молекулы ДНК мы имеем некую последовательность четырех сортов нуклеотидов, то во второй цепи последовательность нуклеотидов будет однозначно детерминирована, так что каждому А первой цепи будет соответствовать Т во второй цепи, каждому Т первой цепи — А во второй цепи, каждому Г первой цепи — Ц во второй цепи и каждому Ц первой цепи — Г во второй цепи (рис. 6 и 7).



Р и с. 6.

Спаривание азотистых оснований в ДНК: пары А — Т и Г — Ц

Видно, что указанный структурный принцип, лежащий в основе двутяжного строения молекулы ДНК, позволяет легко понять точное воспроизведение исходной структуры, т. е. точное воспроизведение информации, записанной в цепях молекулы в виде определенной последовательности из 4 сортов нуклеотидов. Действительно, синтез новых молекул ДНК в клетке происходит только на базе уже имеющихся молекул ДНК. При этом две цепи исходной молекулы ДНК начинают с одного из концов расходиться, и на каждом из разошедшихся одностяжных участков начинает собираться из присутствующих в среде свободных нуклеотидов вторая цепь, в точном соответствии с принципом комплементарности (рис. 7). Процесс расхождения двух цепочек исходной молекулы ДНК продолжается, и, соответственно, обе цепи дополняются комплементарными цепями. В результате, как видно на схеме, вместо одной возникают две молекулы ДНК, в точности идентичные исходной. В каждой получившейся «дочерней» молекуле ДНК одна цепь, как видно, целиком происходит от исходной, а другая является заново синтезированной (Meselson, Stahl, 1958).

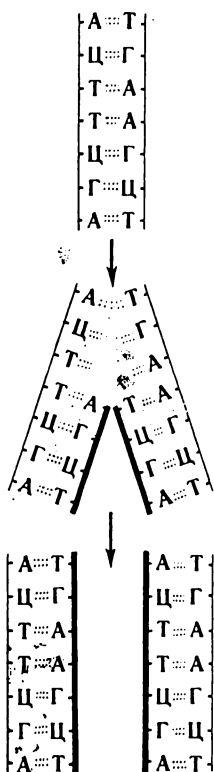


Рис. 7.

Принцип комплементарности и
схема редупликации ДНК

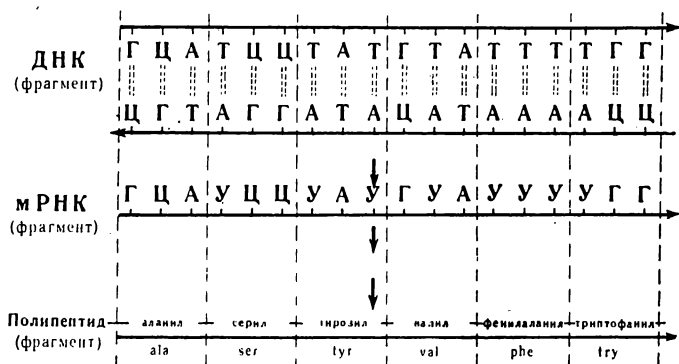
Главное, что еще раз необходимо подчеркнуть, это то, что потенциальная способность к точному воспроизведению заложена в самой двутяжной комплементарной структуре ДНК как таковой, и открытие этого, безусловно, составляет одно из главных достижений современной биологии.

Однако проблема воспроизведения — *редупликации* — ДНК не исчерпывается констатацией потенциальной способности ее структуры к точному воспроизведению своей нуклеотидной последовательности. Дело в том, что ДНК сама по себе вовсе не является самовоспроизводящейся молекулой. Для осуществления процесса синтеза — воспроизведения — ДНК по описанной выше схеме необходима деятельность специального белка-фермента, носящего название ДНК-полимеразы (Bessman et al., 1958; Lehmann et al., 1958; Bollum, 1963). По-видимому, именно фермент осуществляет последовательно идущий от одного конца молекулы ДНК к другому процесс расхождения двух цепей с одновременной полимеризацией на них свободных нуклеотидов по комплементарному принципу. Таким образом, ДНК, подобно матрице, лишь задает порядок расположения нуклеотидов в синтезирующихся цепях, а сам процесс ведет белок. Работа белка-фермента в ходе редупликации ДНК представляет собой одну из наиболее интересных проблем сегодняшнего дня. По-видимому, белок как бы активно ползет вдоль двутяжной молекулы ДНК от одного ее конца к другому, оставляя позади себя раздвоенный редуплицированный «хвост». Физические принципы такой работы данного белка пока неясны.

4. Передача информации (транскрипция)

Следующая узловая проблема, определяющая одну из важнейших сторон биосинтеза белков,— это проблема передачи информации от ДНК к белок-синтезирующим частицам — рибосомам. Первым и основным моментом этой передачи информации является *транскрипция* — синтез информационных РНК на участках цепей ДНК (генах).

Сама идея о том, что ДНК не является непосредственным участником процесса биосинтеза белков, а осуществляет свою «направляющую» функцию так или иначе через посредство РНК, возникла сравнительно давно, будучи, по-видимому, впервые высказана еще в 40-х годах Т. Касперсоном (Caspersson, 1941). Тогда родилась знаменитая иерархическая схема «ДНК — РНК — белок». Впоследствии выяснилось, что



Р и с. 8.

Колинеарные соотношения последовательности мономеров в цепях ДНК, РНК и белка

посредником, «копирующим» ДНК, служит далеко не вся клеточная РНК, а лишь ее особая фракция, количественно составляющая небольшую долю от всей РНК (Спирин и др., 1957; Belozersky, Spirin, 1958, 1960; Brenner et al., 1961; Gros et al., 1961 a, b; Spiegelman, 1961; Jacob, Monod, 1961). Эта фракция и получила название информационной РНК (мРНК).

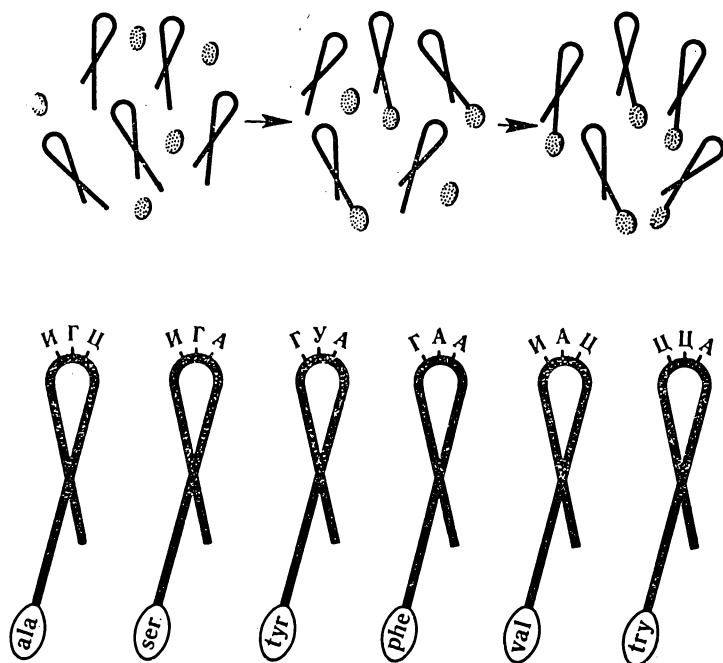
Выяснено, что цепь информационной РНК синтезируется, прямо используя соответствующий участок ДНК в качестве матрицы (Weiss, Nakamoto, 1961; Geiduschek et al., 1961; Hurwitz et al., 1962; Hurwitz, August, 1963). Синтезируемая цепь мРНК при этом точно копирует по своей нуклеотидной последовательности одну из двух цепей ДНК (принимая, что

У в РНК соответствует его производное Т в ДНК). Это происходит на основе того же структурного принципа комплементарности, который определяет редупликацию ДНК (рис. 8). Оказалось, что когда происходит синтез мРНК на ДНК в клетке, то в качестве матрицы для образования цепи мРНК используется лишь одна цепь ДНК (Maguir et al, 1963). Тогда каждому Г этой цепи ДНК будет соответствовать Ц в строящейся цепи РНК, каждому Ц цепи ДНК — Г в цепи РНК, каждому Т цепи ДНК — А в цепи РНК и каждому А цепи ДНК — У в цепи РНК. В итоге получающаяся цепь РНК будет строго комплементарна матричной цепи ДНК и, следовательно, идентична по последовательности нуклеотидов (принимая $T = U$) второй цепи ДНК. Таким образом происходит «переписывание» информации с ДНК на РНК, т. е. транскрипция. «Переписанные» сочетания нуклеотидов в цепи РНК уже непосредственно определяют расстановку соответствующих, кодируемых ими аминокислот в цепи белка (рис. 8).

И снова, как и при рассмотрении редупликации ДНК, в качестве одного из наиболее существенных моментов процесса транскрипции необходимо указать на его ферментативный характер. ДНК, являющаяся матрицей в этом процессе, целиком определяет расположение нуклеотидов в синтезирующей цепи мРНК, всю специфичность образуемой РНК, но сам ход процесса осуществляется особым белком-ферментом (Hurwitz et al., 1960, 1961; Weiss, 1960; Stevens, 1960). Этот фермент называется РНК-полимеразой. Его молекула имеет сложную организацию, позволяющую ему активно продвигаться вдоль молекулы ДНК, одновременно синтезируя цепочку РНК, комплементарную к одной из цепей ДНК. Молекула ДНК, служащая матрицей, при этом не расходуется и не изменяется, сохраняясь в прежнем виде и будучи всегда готова для такого переписывания с нее неограниченного количества «копий» — мРНК. Поток этих мРНК от ДНК к рибосомам и составляет тот поток информации, который обеспечивает программирование белок-синтезирующего аппарата клетки, всей совокупности ее рибосом.

5. Вовлечение аминокислот в биосинтез белков

Среди разбираемых узловых проблем биосинтеза белков в живой клетке особое место принадлежит вопросам, связанным не с «генетическим», или «программным» обеспечением белкового синтеза, а с вовлечением и потоком самого мате-



Р и с. 9.

Присоединение аминокислотных остатков к молекулам адапторной РНК (тРНК)
Внизу — специфическое распределение аминокислот по определенным тРНК (И, встречающийся в тРНК,— это инозиновый нуклеотид, представляющий собой дезаминированное производное А)

риала и энергии для построения белков. Очевидно, что эта «материальная» сторона белкового синтеза является не менее важной и решающей, чем его «кибернетическая» сторона. Именно на уровне подготовки и вовлечения аминокислот в процесс белкового синтеза решаются две узловые задачи биосинтеза: энергетическое обеспечение процесса и первичное «узнавание» аминокислотами соответствующих им нуклеотидных сочетаний.

Обе эти задачи решаются через образование соединений аминокислот с молекулами адапторных РНК, или тРНК (Hoagland et al., 1957, 1958; Ogata et al., 1957; Hoagland, 1960). При этом сначала происходит энергетическая «активация» аминокислоты за счет ее ферментативной реакции с молекулой аденозинтрифосфата (АТФ), а затем «активиро-

ванная» аминокислота соединяется с концом относительно недлинной цепочки тРНК; приращение химической энергии активированной аминокислоты запасается при этом в виде энергии химической связи между аминокислотой и тРНК. Количества этой энергии достаточно для последующего образования пептидной связи между аминокислотами при построении белка в рибосоме. Таким путем обеспечивается энергетическая сторона процесса полимеризации аминокислот в белковую цепь.

Но одновременно с этим решается и вторая задача. Дело в том, что реакцию между аминокислотой и молекулой тРНК ведет фермент, обозначаемый как аминоацил-тРНК-синтетаза. Для каждого из 20 сортов аминокислот существуют свои особые ферменты, осуществляющие реакцию с участием только данной аминокислоты. Таким образом, существует не менее 20 групп ферментов (аминоацил-тРНК-синтетаз), каждая из которых специфична для одного сорта аминокислоты. С другой стороны, каждый из этих ферментов может вести реакцию не с любой молекулой тРНК, а лишь с теми, которые несут строго определенное сочетание нуклеотидов в своей цепи. Для каждого фермента эти сочетания нуклеотидов в цепи тРНК различны. Таким образом получается, что, например, фермент фенилаланил-тРНК-синтетаза ведет реакцию лишь с участием аминокислоты фенилаланина и специальной тРНК, которая, в частности, несет в середине цепи сочетание нуклеотидов ГАА; отсюда фермент может присоединить фенилаланин только к этой и ни к какой другой тРНК. Точно так же фермент триптофанил-тРНК-синтетаза ведет реакцию лишь с участием аминокислоты триптофана и другой специфической тРНК, которая, в частности, имеет сочетание ЦЦА в середине цепи; соответственно в ферментативной реакции будет образовываться лишь соединение триптофана с данной тРНК, и т. д. Эти однозначные соотношения, обусловленные субстратной специфичностью соответствующих белков-ферментов, схематически представлены на рис. 9. Таким образом, благодаря существованию набора столь специфических ферментов, различающихся, с одной стороны, природу аминокислоты, и с другой — нуклеотидную последовательность тРНК, каждый из 20 сортов аминокислот оказывается «приписанным» только определенным тРНК с данным характерным нуклеотидным сочетанием. (Это вовсе не значит, однако, что фермент «узнает» тРНК именно по данному нуклеотидному сочетанию; скорее всего фермент узнает свою тРНК по другим участкам нуклеотидной последовательности, но они, как правило, коррелируют с наличием указанных триплетов.)

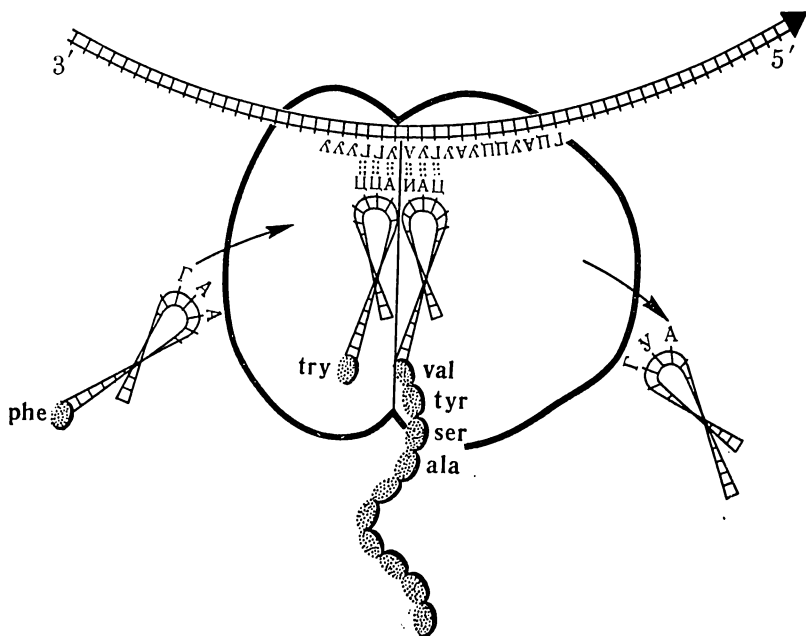
6. Синтез белка в рибосоме (трансляция)

Именно благодаря такой специфической «посадке» аминокислот на молекулы тРНК перед их вхождением в рибосому оказывается возможным выполнение молекулами тРНК их функций адапторов при взаимодействии с триплетами информационной РНК в процессе трансляции в рибосоме. Здесь мы переходим к центральной проблеме белкового синтеза — механизму синтеза белковой цепи при участии рибосомы, информационной РНК и адапторных РНК с присоединенными аминокислотами (аминоацил-тРНК). Схематически некоторые моменты этого процесса, насколько мы их представляем на сегодняшний день, даны на рис. 10.

На рис. 10 прежде всего видно, что молекула информационной РНК соединена с рибосомой или, как говорят, рибосома «запрограммирована» информационной РНК. В каждый дан-

Р и с. 10.

Схема функционирующей рибосомы



ный момент непосредственно в самой рибосоме находится лишь относительно короткий отрезок цепи мРНК. Но именно этот отрезок при участии рибосомы может взаимодействовать с молекулами адапторных РНК. И здесь снова главную роль играет уже дважды разбиравшийся выше принцип комплементарности. Так, если отрезок цепи мРНК, располагающийся в соответствующем месте рибосомы, имеет нуклеотидную последовательность УГГ (читаемую в направлении от начала цепи мРНК к концу¹), то к этому триплету автоматически присоединится цепь тРНК, несущая в своем «контактном» участке (антикодоне) комплементарный триплет ЦЦА. Но поскольку, как уже выше указывалось, на молекулу тРНК с таким триплетом ЦЦА может быть навешена лишь аминокислота триптофан, то, стало быть, триплет УГГ информационной РНК определяет вхождение в рибосому и связывание по комплементарному принципу именно тРНК с триптофаном. В этом и состоит объяснение механизма того, почему данному триплету цепи мРНК соответствует строго определенная аминокислота. Видно, что необходимым промежуточным звеном, или адаптором, при «узнавании» каждой аминокислотой своего триплета на мРНК является адапторная РНК (тРНК)².

Далее, на схеме (рис. 10) видно, что в рибосоме, помимо рассмотренной только что молекулы тРНК с навешенной аминокислотой, находится еще одна молекула тРНК. Но в отличие от рассмотренной выше молекулы тРНК, эта молекула тРНК своим концом присоединена к концу находящейся в процессе синтеза белковой (полипептидной) цепочки. Такое положение отражает динамику событий, происходящих в рибосоме в процессе синтеза белковой молекулы. Эту динамику можно

¹ Любая полинуклеотидная цепь полярна. Поэтому один из ее концов можно обозначить как начало цепи, а другой — как терминальный конец цепи. За начало цепи принимают так называемый 5'-конец полинуклеотида; другой конец полинуклеотида — 3'-конец — рассматривается как терминальный (см. часть II, раздел III).

² Необходимо отметить, что во взаимодействии триплета мРНК с тРНК комплементарность является не совсем такой строгой, как в явлениях репликации и транскрипции. Так, здесь, кроме канонических пар Г — Ц и А — У, при одном из крайних положений триплета возможно, по-видимому, образование пар Г — У, И — У, И — Ц и И — А (И — инозиновый нуклеотид, представляющий собой дезаминированное производное А и встречающийся в тРНК) (Crick, 1966). Поэтому триплет ГЦА на мРНК связывает сочетание ИГЦ аланил-тРНК, триплет УЦЦ связывает ИГА серил-тРНК, триплет УАУ связывает ГУА тирозил-тРНК, триплет ГУА связывает ИАЦ валил-тРНК и триплет УУУ связывает ГАА фенилаланил-тРНК (см. рис. 9 и 10).

представить себе следующим образом. Начнем с некоего промежуточного момента, отраженного на схеме и характеризующегося наличием уже начавшей строиться белковой цепочки, присоединенной к ней тРНК и только что вошедшей в рибосому и связавшейся с триплетом новой молекулы тРНК с соответствующей ей аминокислотой. По-видимому, сам акт присоединения молекулы тРНК к расположенному в данном месте рибосомы триплету мРНК приводит к такой взаимной ориентации и тесному контакту между аминокислотным остатком и строящейся цепью белка, что между ними возникает ковалентная связь. Связь возникает таким образом, что конец строящейся белковой цепи, на схеме присоединенный к тРНК, переносится от этой тРНК на аминокислотный остаток поступившей аминоацил-тРНК. В результате «правая» тРНК, сыграв роль «донора», окажется свободной, а белковая цепь окажется переброшенной на «акцептор» — «левую» (поступившую) аминоацил-тРНК; в итоге белковая цепь окажется удлиненной на одну аминокислоту и присоединенной к «левой» тРНК. Вслед за этим происходит переброска «левой» тРНК вместе со связанным с ней кодоном мРНК «вправо»; тогда прежняя «донорная» молекула тРНК окажется вытесненной отсюда и уйдет из рибосомы, на ее месте окажется новая тРНК со строящейся цепью белка, удлиненной на один аминокислотный остаток, а цепь мРНК будет продвинута относительно рибосомы на один триплет вправо. В результате продвижения цепи мРНК на один триплет вправо в рибосоме появится следующий вакантный триплет (на схеме — УУУ) и к нему немедленно по комплементарному принципу присоединится соответствующая тРНК с аминокислотой (фенилаланил-тРНК). Это опять вызовет образование ковалентной (пептидной) связи между строящейся цепью белка и фенилаланиновым остатком и вслед за этим продвижение цепи мРНК на один триплет вправо со всеми вытекающими отсюда последствиями и т. д. Таким путем осуществляется последовательное, триплет за триплетом, протягивание цепи информационной РНК через рибосому, в результате чего цепь мРНК «прочитывается» рибосомой целиком, от начала до конца. Одновременно и сопряженно с этим происходит последовательное, аминокислота за аминокислотой, наращивание белковой цепочки. Соответственно, в рибосому одна за другой поступают молекулы тРНК с аминокислотами и выходят молекулы тРНК без аминокислот. Оказываясь в растворе вне рибосомы, свободные молекулы тРНК снова соединяются с аминокислотами и опять несут их в рибосому, сами же таким образом циклично обращаясь без разрушения и изменения,

Конечно, самым поразительным и таинственным моментом в описанной динамической модели трансляции, да, пожалуй, и во всей проблеме биосинтеза белка, является столь координированная, надежная и многогранная работа маленькой частицы, называемой рибосомой и состоящей всего из нескольких десятков макромолекул. Это заставляет очень серьезно задуматься над неизвестными структурными принципами, лежащими в основе организации рибосомы, этой удивительной молекулярной «машины».

Л и т е р а т у р а

- Спирин А. С., Белозерский А. Н., Шугаева Н. В., Ванюшин Б. Ф. 1957. Биохимия, 22, 744.
- Belozersky A. N., Spirin A. S. 1958. Nature, 182, 111.
- Belozersky A. N., Spirin A. S. 1960. The Nucleic Acids, 3, 147. Acad. Press, New York. Русский перевод: «Нуклеиновые кислоты», М., ИЛ, 1962, стр. 123.
- Bessman M. J., Lehmann I. R., Simms E. S., Kornberg A. 1958. J. Biol. Chem., 233, 171.
- Bollum F. J. 1963. Progress in Nucleic Acid Research, 1, 1. Acad. Press, New York. Русский перевод: «Нуклеиновые кислоты», М., «Мир», 1965, стр. 9.
- Brenner S., Jacob F., Meselson M. 1961. Nature, 190, 576.
- Brenner S., Stretton A. O. W., Kaplan S. 1965. Nature, 206, 994.
- Caspersson T. 1941. Naturwissenschaften, 28, 33.
- Chargaff E. 1950. Experientia, 6, 201.
- Chargaff E. 1951. J. Cellular Comp. Physiol., 38, Suppl. 1, 41.
- Crick F. H. C. 1958. Symp. Soc. Exptl. Biol., 12, 138. Русский перевод: «Биологическое воспроизведение макромолекул», М., ИЛ, 1960, стр. 209.
- Crick F. H. C. 1963. Progress in Nucleic Acid Research, 1, 163. Acad. Press, New York. Русский перевод: «Нуклеиновые кислоты», М., «Мир», 1965, стр. 185.
- Crick F. H. C. 1966. J. Mol. Biol., 19, 548.
- Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J. 1961. Nature, 192, 1227.
- Crick F. H. C., Griffith J. S., Orgel L. E. 1957. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 43, 416.
- Franklin R. E., Gosling R. G. 1953. Nature, 171, 737.
- Gamow G. 1954. Nature, 173, 318.
- Gamow G., Rich A., Ycas M. 1956. Advances Biol. Med. Physics, 4, Acad. Press, New York. Русский перевод: «Вопросы биофизики», М., ИЛ, 1957, стр. 205.
- Geiduschek E. P., Nakamoto T., Weiss S. B. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 1405.
- Gros F., Gilbert W., Hiatt H. H., Attardi G., Spahr P. F., Watson J. D. 1961a. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 111. Русский перевод: «Регуляторные механизмы клетки», М., «Мир», 1964, стр. 164.

- Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Risebrough R. W., Watson J. D. 1961b. *Nature*, **190**, 581.
- Hoagland M. B. 1960. *The Nucleic Acids*, **3**, 349. Acad. Press, New York, Русский перевод: «Нуклеиновые кислоты», М., ИЛ, 1962, стр. 291.
- Hoagland M. B., Stephenson M. L., Scott J. F., Hecht L. I., Zamecnik P. C. 1958. *J. Biol. Chem.*, **231**, 241.
- Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Stephenson M. L. 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 215.
- Hurwitz J., August J. T. 1963. *Progress in Nucleic Acid Research*, **1**, 59. Acad. Press, New York. Русский перевод: «Нуклеиновые кислоты», М., «Мир», 1965, стр. 74.
- Hurwitz J., Bresler A., Diring R. 1960. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 15.
- Hurwitz J., Furth J. J., Anders M., Evans A. H. 1962. *J. Biol. Chem.*, **237**, 3752.
- Hurwitz J., Furth J. J., Anders M., Ortiz P. J., August J. T. 1961. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 91. Русский перевод: «Регуляторные механизмы клетки», М., «Мир», 1964, стр. 134.
- Jacob F., Monod J. 1961. *J. Mol. Biol.*, **3**, 318.
- Lehmann I. R., Zimmermann S. B., Adler J., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A. 1958. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **44**, 1191.
- Marmur J., Greenspan C., Palecek F., Kahan F. M., Levine J., Mandel M. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 191.
- Meselson M., Stahl F. W. 1958. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **44**, 671.
- Morgan A. R., Wells R. D., Khorana H. G. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1899.
- Nirenberg M. W., Bernfield M., Brimacombe R., Trupin J., Rottman F., O'Neal C. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**, 1161.
- Nirenberg M. W., Jones O. W., Leder P., Clark B. F. C., Sly W. S., Pestka S. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 549. Русский перевод: «Биосинтез белка и его регуляция», М., «Мир», 1967, стр. 105.
- Nirenberg M. W., Matthaei J. H. 1961. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 1588.
- Noll H. 1965. *Proc. 19th Symp. on Fundamental Cancer Research (Information Exchange Group N 7, Scientific Memo N 99)*.
- Ogata K., Nohara H., Morita T. 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 657.
- Petermann M. L. 1964. *The physical and chemical properties of ribosomes*. Elsevier Publ. Co. Amsterdam — London — New York. Русский перевод: «Физические и химические свойства рибосом», М., «Мир», 1967.
- Rich A. 1963. *Scientific American*, December, **44**. Русский перевод: «Структура и функция клетки», М., «Мир», 1964, стр. 197.
- Rich A., Warner J. R., Goodman H. M. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 269. Русский перевод: «Биосинтез белка и его регуляция», М., «Мир», 1967, стр. 160.
- Roberts R. B. 1964. *Studies of macromolecular biosynthesis*. Carnegie Institution, Washington.
- Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C., Wahba A. J., Gardner R. S., Ochoa S. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 559.
- Spiegelman S. 1961. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 75. Русский перевод: «Регуляторные механизмы клетки», М., «Мир», 1964, стр. 111.
- Stevens A. 1960. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 92.
- Watson J. D. 1963. *Science*, **140**, 17.
- Watson J. D. 1964. *Bull. soc. chim. biol.*, **46**, 1399.

- Watson J. D.* 1965. *Molecular biology of the gene*. Benjamin, New York — Amsterdam. Русский перевод: «Молекулярная биология гена», М., «Мир», 1967.
- Watson J. D., Crick F. H. C.* 1953a. *Nature*, **171**, 737.
- Watson J. D., Crick F. H. C.* 1953b. *Nature*, **171**, 964.
- Weiss S. B.* 1960. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 1020.
- Weiss S. B., Nakamoto T.* 1961. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 1400.
- Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Wilson H. R.* 1953. *Nature*, **171**, 739.
- Wittmann H. G., Wittmann-Liebold B.* 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 589.
- Yanofsky C.* 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 581. Русский перевод: «Биосинтез белка и его регуляция», М., «Мир», 1967, стр. 141.

Часть первая

Структура рибосомы

Физические свойства и химический состав рибосомы

1. Форма и размеры

На ультратонких срезах тканей и клеток рибосомы видны в электронный микроскоп как плотные *округлые* гранулы диаметром порядка 200 Å.

Электронномикроскопическое изучение выделенных препаратов рибосом позволяет более точно определить их форму и размеры. В первом приближении рибосому можно описать как *слегка сплюснутый эллипсоид вращения* с соотношением осей не более 1,5. На самом деле детальная форма рибосомы более сложная, специфическая и не может быть описана простой геометрической фигурой. Форма рибосом очень мало варьирует от объекта к объекту.

По размерам и молекулярному весу все изученные до сих пор рибосомы распадаются на две четкие группы, в зависимости от их биологического источника. Одну группу образуют относительно мелкие бактериальные рибосомы; сюда же относятся, по-видимому, рибосомы актиномицетов и синезеленых водорослей, а также рибосомы хлоропластов и митохондрий. Другая группа — это несколько более крупные цитоплазматические рибосомы всех остальных организмов, имеющих оформленное клеточное ядро, т. е. рибосомы всех эукариотических организмов, включая животных, высшие растения, водоросли, грибы. Несколько большие размеры эукариотических рибосом по сравнению с бактериальными рибосомами связаны с двумя обстоятельствами: 1) абсолютное содержание РНК в них больше, чем в бактериальных рибосомах, приблизительно на 30—40%; 2) они больше нагружены белком, чем бактериальные рибосомы, т. е. имеют большее относительное содержание белка (см. ниже, разделы I, 3; II; III и IV).

а. 70 S рибосомы Protokaryotes (бактерий и синезеленых водорослей)

Одной из наиболее широко принятых характеристик рибосом является коэффициент седиментации, прямо коррелирующий с их размером и молекулярным весом. Специальное сравнительное исследование препаратов рибосом из 25 видов бактерий, 2 видов синезеленых водорослей и 26 видов грибов (Taylor, Storck, 1964) показало, что у всех изученных протокариотов (бактерии и синезеленые водоросли) коэффициент седиментации рибосом, $S_{20, w}^0$, составляет около 70 ед. Сведберга (среднее значение 69 ед. Сведберга).

Типичным и наиболее изученным представителем является, конечно, бактерия *Escherichia coli*, рибосомы которой, как было хорошо показано в классических исследованиях Тиссьера, Уотсона и др. (Tissières, Watson, 1958; Tissières et al., 1959), имеют коэффициент седиментации 69 ед. Сведберга и молекулярный вес, рассчитанный из коэффициента седиментации и коэффициента диффузии, около $2,6 \times 10^6$. Позднее методом седиментационного равновесия молекулярный вес 70 S рибосом *E. coli* был определен равным $2,65 (\pm 0,2) \times 10^6$ (Hill et al., 1969).

Согласно данным электронной микроскопии, размеры сухой частицы составляют около $200 \times 170 \times 170 \text{ \AA}$ (Hall, Slayter, 1959; Nuxley, Zubay, 1960); при аппроксимации частицы эллипсоидом ее «сухой» молекулярный объем составит, следовательно, около $3 \times 10^6 \text{ \AA}^3$. Та же величина «сухого» объема рибосомы получается из ее парциального удельного объема и молекулярного веса. Однако, очевидно, при высушивании на подложке частицы могут в той или иной мере сжиматься, так что размеры 70 S рибосомы в водной среде могут быть существенно больше. Так, размеры 70 S рибосом *E. coli*, высушенных из замороженного состояния, составляют, по данным электронной микроскопии, $250 \times 230 \times 170 \text{ \AA}$ (Vasiliev, 1971), что соответствует при аппроксимации эллипсоидом объему $5 \times 10^6 \text{ \AA}^3$. Еще большие значения объема 70 S рибосом ($7-10 \times 10^6 \text{ \AA}^3$) получаются из данных по характеристической вязкости и коэффициенту диффузии (см. ниже). Можно предположительно принять поэтому, что в водной среде 70 S рибосома *E. coli* имеет длину (малая ось эллипсоида вращения) порядка 200 \AA и ширину (большие оси эллипсоида) порядка 300 \AA .

Сходство коэффициентов седиментации рибосом из всех изученных видов бактерий и синезеленых водорослей позволяет думать, что все они характеризуются приблизительно той

же формой и размерами, как и рибосома *E. coli*. Таким образом, молекулярный вес 70 S рибосом протокариотических организмов составляет несколько менее 3×10^6 , и они могут быть аппроксимированы эллипсоидом вращения с размерами около $200 \times 170 \times 170 \text{ \AA}$ в сухом состоянии и $\sim 300 \times \sim 300 \times \sim 200 \text{ \AA}$ в растворе.

Более детальные физические характеристики рибосом *E. coli* перечислены в табл. 1.

Таблица 1
Физические свойства рибосом

Свойства	70 S рибосомы <i>E. coli</i> *	80 S рибосомы Eukaryotes**
Коэффициент седиментации $S_{20,w}^\circ$, ед. Сведберга	69,1 — 70,5	81 ± 4
Характеристическая вязкость $[\eta]$, $\text{см}^3/\text{г}$	6,1 — 6,8	4,5 — 8
Коэффициент поступательной диффузии $D_{20,w}^\circ \times 10^7$, $\text{см}^2/\text{сек}$	1,83	1,3 — 1,4
Парциальный удельный объем \bar{v} , $\text{см}^3/\text{г}$	0,64 — 0,60	0,66 — 0,67
Молекулярный вес		
из седиментации и диффузии	$2,6 \times 10^6$	$4,1 - 4,7 \times 10^6$
из седиментации и характеристической вязкости	$3,1 \times 10^6$	$4,1 - 4,5 \times 10^6$
из седиментационного равновесия	$2,65 \times 10^6$	$4,8 - 5,2 \times 10^6$
Размеры в высушенном состоянии, из данных электронной микроскопии		
линейные, \AA	$200 \times 170 \times 170$	$250 \times 200 \times 200$
объем, \AA^3	3×10^6	5×10^6
Размеры в лиофильно высушенном состоянии, из данных электронной микроскопии		
линейные, \AA	$250 \times 230 \times 170$	—
объем, \AA^3	5×10^6	—
Размеры в водной среде (предположительно)		
линейные, \AA	$\sim 300 \times \sim 300 \times \sim 200$	—
объем, \AA^3	$7 - 10 \times 10^6$	—

* По данным Tissières et al., 1959; Hall, Slayter, 1959; Hill et al., 1969; Vasiliev, 1971.

** По литературным данным, цитируемым в тексте.

6. 80 S рибосомы Eukaryotes

Коэффициенты седиментации цитоплазматических рибосом из эукариотических организмов оказываются существенно выше 70 ед. Сведберга. Например, среднее значение коэффициента седиментации S_{20}^w для рибосом из 26 видов грибов было найдено равным 81 ед. Сведберга, с размахом варьирования от 79 до 85 ед. Сведберга (Taylor, Storck, 1964). Согласно наиболее надежным данным, коэффициенты седиментации очищенных рибосом из тканей млекопитающих также составляют около 80 ед. Сведберга. Так, для рибосом из печени крысы и саркомы Иенсена печени крысы тщательно выполненное определение коэффициента седиментации дает величину 83 ед. Сведберга (Hamilton et al., 1962; Petermann, 1960); для рибосом из крысиной гепатомы Новикова другими авторами были получены значения коэффициента седиментации 79—81 ед. Сведберга (Kuff, Zeigel, 1960); значение 77 ед. Сведберга получено для рибосом из печени морской свинки (Tashiro, Siekevitz, 1965); рибосомы из ретикулоцитов кролика имеют коэффициент седиментации около 80 ед. Сведберга (Dintzis et al., 1958). К сожалению, никто не проводил еще широкого сравнительного анализа рибосом животных тканей, так что на сегодняшний день приходится довольствоваться весьма разрозненными данными, полученными в разное время и в разных лабораториях. Отсюда, конечно, возрастает кажущаяся вариабельность величин. Наиболее низкие значения коэффициентов седиментации были сообщены для рибосом из поджелудочной железы телят — 75 ед. Сведберга (Keller et al., 1963), и для рибосом из зобной железы телят — 74 ед. Сведберга (Hess, Lagg, 1963). Неизвестно, однако, насколько это отражает реальный размах варьирования, а не разброс данных вследствие экспериментальных ошибок. Во всяком случае, для рибосом из поджелудочной железы телят и из ядер зобной железы телят другими исследователями были получены более высокие значения — 80 ед. Сведберга (Madison, Dickman, 1963) и 78 ед. Сведберга (Pogo et al., 1962), соответственно. В общем для всех тканей млекопитающих можно принять среднюю величину коэффициента седиментации их рибосом около 80 ± 3 ед. Сведберга.

Те же величины седиментационных коэффициентов оказались свойственны рибосомам из цитоплазмы клеток высших растений: ещё Тсо, Боннер и Виноград (Ts'o et al., 1956, 1958) показали, что рибосомы из проростков гороха имеют коэффициент седиментации 80 ± 1 ед. Сведберга, а затем близкие величины коэффициентов седиментации (80—83 ед. Сведберга)

были получены для цитоплазматических рибосом капусты, клевера, райграсса, табака, шпината, фасоли (Lyttleton, 1960, 1962; Clark et al., 1964; Spencer, 1965; Boardman et al., 1965; Одинцова и др., 1967).

В соответствии с более высокими коэффициентами седиментации рибосом из эукариотических организмов по сравнению с бактериальными рибосомами находятся и несколько более высокие значения их молекулярного веса и размеров. Значения молекулярного веса 80 S рибосом, рассчитываемого различными способами (из седиментации и характеристической вязкости; из седиментации и диффузии; из данных по седиментационному равновесию; из электронномикроскопических измерений размеров сухих частиц), почти всегда ложатся в пределы от 4 до 5 млн. (Chao, Schachman, 1956; Ts'o et al., 1956, 1958; Dintzis et al., 1958; Kuff, Zeigel, 1960; Tashiro, Yphantis, 1965); наиболее низкое значение — 3,6 млн. было получено из данных по светорассеянию (Hamilton et al., 1962).

Максимальный линейный размер частиц, видимый на электронных микрофотографиях сухих оттененных 80 S рибосом животных и высших растений, составляет 200—240 Å при высоте частиц около 180 Å для обычно высушенных рибосом (Hall, цит. по Dibble, Dintzis, 1960; Kuff, Zeigel, 1960) и до 350 Å при той же высоте 160—180 Å для частиц, высушенных из замороженного состояния (Ts'o et al., 1958). Негативно контрастированные 80 S рибосомы из клеток млекопитающих имеют на электронных микрофотографиях длину около 280—300 Å и ширину около 220 Å (Shelton, Kuff, 1966). При негативном контрастировании 80 S рибосом высших растений измеренная длина частиц была найдена равной 260 ± 10 Å и ширина — 190 ± 10 Å — 200 ± 10 Å (Одинцова и др., 1967). На основании перечисленных электронномикроскопических данных и принимая во внимание неизбежное уменьшение объема при высушивании, особенно в отсутствие контрастирующего вещества, можно считать, что 80 S рибосомы высших организмов имеют в сухом состоянии длину около 250 Å и ширину около 200 Å, а в водной среде — существенно больше, возможно до $400 \times 400 \times 200$ Å.

в. 70 S рибосомы хлоропластов и митохондрий

У всех высших — эукариотических — организмов рибосомы содержатся не только среди основной массы цитоплазмы и ядра, но и в «энергетических» клеточных органоидах — хлоропластах и митохондриях.

Показано, что рибосомы хлоропластов зеленых высших

и низших растений четко отличаются от цитоплазматических 80 S рибосом тех же клеток: они имеют несколько меньшие размеры и относятся к 70 S типу, чем обнаруживают удивительно большое сходство с бактериальными рибосомами (Lyttleton, 1960, 1962; Clark et al., 1964; Spencer, 1965; Boardman et al., 1965, 1966; Светайло и др., 1966; Svetailo et al., 1967; Одинцова и др., 1967; Sager, Hamilton, 1967; Rawson, Stutz, 1969). Точный коэффициент седиментации $S_{20,w}^0$ рибосом из хлоропластов табака и гороха составляет $69,8 \pm 0,1$ ед. Сведберга (Boardman et al., 1966; Светайло и др., 1966; Svetailo et al., 1967). Размеры 70 S рибосом, выделенных из хлоропластов высших растений, были определены путем электронной микроскопии негативно контрастированных образцов и оказались равными $220 \pm 10 \text{ \AA} \times 170 \pm 10 \text{ \AA}$ (Одинцова и др., 1967).

Митохондриальные рибосомы эукариотических клеток также относятся не к 80 S типу, как все цитоплазматические рибосомы, а к 70 S типу (Küntzel, Noll, 1967; Küntzel, 1969).

2. Компактность

Так как рибосома по своей форме мало отличается от сферы, то прежде всего возникает соблазн попытаться определить степень компактности и набухаемости рибосомной частицы на основании определения характеристической вязкости. Действительно, известно, что удельная вязкость идеальных негидратированных шарообразных частиц не зависит от их размера и равна объемной доле этих частиц, помноженной на 2,5. Отклонение вязкости в большую сторону может определяться либо отклонением от шарообразности, либо иммобилизацией части растворителя (за счет гидратации, пористости структуры и т. п.). Измеренная характеристическая вязкость рибосом, естественно, всегда оказывается заметно больше, чем следовало бы ожидать для идеальных негидратированных сфер.

Однако измерение удельной вязкости рибосом чревато большими опасностями: наличие малейших вязких примесей в препаратах, агрегация частиц и т. п. легко вносят большую относительную ошибку в низкие значения удельной вязкости рибосом, завышая их.

По-видимому, в случае расчетов, основанных на величинах характеристической вязкости рибосом, надо стараться принимать во внимание только *наиболее низкие* из получаемых в опыте значений. С этой точки зрения меньше всего сомнений для 70 S рибосом *E. coli* вызывают значения характери-

ческой вязкости $[\eta] = 6,1\text{—}6,8 \text{ см}^3/\text{г}$, полученные Тиссьером и др. (Tissières et al., 1959) и позднее Хиллом и др. (Hill et al., 1969). Для сферических частиц $[\eta] = 2,5 N_A V/M$, где N_A — число Авогадро, а V — объем частицы в растворе. Из приведенных выше значений $[\eta]$ и M для 70 S рибосом получаем $V \simeq 10 \times 10^6 \text{ Å}^3$, что втрое превосходит «сухой» объем рибосомы. Иными словами, около 70% объема рибосомы занято водой. Из данных по коэффициенту диффузии 70 S рибосом $D = 1,83 \times 10^{-7}$ (Tissières et al., 1959) получается несколько меньшее значение объема $V \simeq 7 \times 10^6 \text{ Å}^3$, что соответствует около 60% воды.

Сходные результаты получаются для 80 S рибосом. Если взять для характеристической вязкости низшие из имеющихся в литературе значений, например, значение $5 \text{ см}^3/\text{г}$ для рибосом дрожжей (Chao, Schachman, 1956), то объем этих частиц получается равным $15 \times 10^6 \text{ Å}^3$ (близкие значения объема следуют и из коэффициента диффузии). Так как сухой объем этих частиц равен $5 \times 10^6 \text{ Å}^3$, то и в этом случае рибосома примерно на $2/3$ состоит из воды.

На основании приведенных выше данных можно думать, что, по-видимому, реальное количество иммобилизованной воды должно составлять около двух третей рибосомной частицы, рассматриваемой в водной среде.

3. Химический состав: содержание РНК и белка

а. 70 S рибосомы

Химический анализ препаратов 70 S рибосом из *Escherichia coli* показывает, что они состоят только из РНК и белка, в пределах ошибки определения $\pm 3\text{—}4\%$ (Tissières et al., 1959). Количество РНК в рибосомах *E. coli* значительно преобладает над количеством белка. Анализ очищенных препаратов дает величину 60—65% для РНК и соответственно 40—35% для белка. В среднем для рибосом *E. coli* принимается 63% РНК и 37% белка. Таким образом, весовое соотношение РНК/белок составляет около 1,6—1,8.

В соответствии с указанными данными находится и экспериментально определяемая величина парциального удельного объема рибосом *E. coli*: $\bar{v} = 0,64 \text{ см}^3/\text{г}$ (Tissières et al., 1959). Теоретический расчет парциального удельного объема рибосом *E. coli*, сделанный исходя из состава рибосом (63% РНК и 37% белка) и известного парциального удельного объема

рибосомальной РНК ($\bar{v} = 0,57 \pm 0,02 \text{ см}^3/\text{г}$; Kurland, 1960) и белка ($\bar{v} = 0,74 \text{ см}^3/\text{г}$; Spahr, 1962), дает близкую величину: $\bar{v} = 0,63 \text{ см}^3/\text{г}$ (Spahr, 1962). Однако более позднее экспериментальное определение парциального удельного объема рибосом *E. coli* дало гораздо более низкую величину — $\bar{v} = 0,59\text{—}0,61 \text{ см}^3/\text{г}$ (Hill et al., 1969).

Анализ препаратов рибосом из других бактериальных объектов указывает, скорее всего, на универсальность соотношения РНК/белок во всех рибосомах 70 S типа независимо от вида бактерии.

6. 80 S рибосомы

Препараты рибосом 80 S типа, выделяемые из грибов, высших растений или животных, обычно обнаруживают существенно более низкие соотношения РНК/белок. Еще в самых первых исследованиях, проведенных на препаратах рибосом дрожжей, были получены величины 40—44% для содержания РНК; остальные 60—56% приходились на белок; липидов обнаружено не было; парциальный удельный объем составлял $0,67 \text{ см}^3/\text{г}$ (Chao, Schachman, 1956). Величина около 40% РНК была получена и для препаратов рибосом из проростков гороха; для парциального удельного объема была найдена величина $0,66 \text{ см}^3/\text{г}$ (Ts'o et al., 1956, 1958). Первоначально для препаратов 80 S рибосом из печени крысы тоже была сообщена величина содержания РНК около 40%; белок в этих препаратах составлял 50—55%, а остальные 5—10% приходились на липиды (Petermann, Hamilton, 1957; Hamilton, Petermann, 1959). Впоследствии, однако, благодаря лучшей очистке препараты печеночных рибосом были, по-видимому, освобождены от примесей липид-содержащих компонентов; содержание РНК в таких препаратах составило 45%, белка — 55%; парциальный удельный объем был экспериментально определен равным $\bar{v} = 0,664 \text{ см}^3/\text{г}$ (Hamilton et al., 1962). По-видимому, как общее правило, при тщательной очистке препаратов 80 S рибосом от белковых и липид-содержащих примесей соотношение РНК/белок в них приближается к 1. Такое соотношение РНК/белок = $1,0 \pm 0,05$ было получено в тщательно проведенных анализах препаратов рибосом из ретикулоцитов кролика (Ts'o, Vinograd, 1961). Препараты рибосом, содержащие около 50% РНК, были выделены также из печеночных опухолей крысы — из саркомы Иенсена (Petermann, 1960; Petermann, Pavlovic, 1966) и из гепатомы Новикова (Kuff, Zeigel, 1960); в обоих случаях для очистки от мембранных компонентов использовался дезоксихолат натрия. Интересно, что параллельное выделение свободных рибосом из гепатомы Новикова

без применения дезоксихолата давало препараты с меньшим содержанием РНК — 37% (Kuff, Zeigel, 1960). В некоторых случаях сообщалось о выделении из животных тканей препаратов рибосом с более высоким содержанием РНК. Например, в препаратах, полученных из печени морской свинки с использованием дезоксихолата, определения дали $56,4 \pm 2,1\%$ РНК (Tashiro, Siekevitz, 1965). Обработанные дезоксихолатом рибосомы из зобной железы телят показали еще более высокие цифры содержания РНК — 58—62%; вместе с тем, несмотря на двукратную обработку дезоксихолатом, они содержали 9—11% липидов (Hess, Lagg, 1963).

Несмотря на некоторую разноречивость данных по химическому составу 80 S рибосом, на основании анализа всей совокупности имеющихся сведений все же можно попытаться сформулировать целый ряд общих заключений.

1) Соотношение РНК/белок в 80 S рибосомах, очевидно, ниже, чем в бактериальных 70 S рибосомах, и для наиболее чистых препаратов составляет около 1. Парциальный удельный объем этих рибосом равен $\bar{v} = 0,66\text{—}0,67 \text{ см}^3/\text{г}$.

2) Очищенные 80 S рибосомы, как и бактериальные 70 S рибосомы, представляют собой чистый рибонуклеопротеид, т. е. состоят из приблизительно равных количеств РНК и белка и не содержат липидов и полисахаридов в качестве собственной составной части. Однако в ряде случаев препараты 80 S рибосом могут содержать связанный с частицами липид-содержащий компонент, который тем или иным способом может быть удален без разрушения структурной целостности частиц и при сохранении ими биологической активности.

3) Если не всегда, то в целом ряде случаев обработка 80 S рибосом дезоксихолатом или другими детергентами, хотя и сохраняет принципиальную структурную целостность частиц, может приводить к удалению небольшой части лабильно связанного рибосомного белка. Соотношение РНК/белок в таких рибосомах, обработанных дезоксихолатом, повышается до 1,2—1,5, а коэффициент седиментации $S_{20,w}^0$ слегка понижается — до 74—79 ед. Сведберга.

4. Связанные низкомолекулярные катионы

Наиболее существенным низкомолекулярным компонентом любой рибосомы являются ионы двухвалентных металлов, и в основном ионы магния. Абсолютная необходимость ионов двухвалентных металлов, и в первую очередь ионов магния,

для сохранения структурной целостности рибосомы была осознана при первых же попытках выделения и физико-химического изучения препаратов рибосом (Chao, Schachman, 1956; Chao, 1957; Tissières, Watson, 1958; Ts'o et al., 1958; Hamilton, Petermann, 1959; см. также сборник «Microsomal Particles and Protein Synthesis», Pergamon Press, 1958). Постепенное удаление Mg^{++} из рибосом сначала приводило к диссоциации на субчастицы (см. ниже, раздел II), а затем к необратимому разрушению их структуры. Чаще всего это сопровождалось энзиматической деградацией рибосомальной РНК, так как в результате нарушения структуры субчастиц она становилась очень чувствительной к действию примесей нуклеаз, почти всегда присутствующих в рибосомных препаратах. Отсюда уже из первых работ стало ясно, что Mg^{++} в рибосоме необходим не только для связывания субчастиц друг с другом, но и для поддержания структуры самих субчастиц.

Кроме Mg^{++} , в препаратах рибосом иногда обнаруживают некоторые количества Ca^{++} (см., например Ts'o et al., 1958). Ионы Ca^{++} , добавленные в суспензию рибосом, как было показано, также стабилизируют рибосомы и в известной мере могут заменить Mg^{++} (Chao, 1957; Elson, 1959, 1961; Hamilton, Petermann, 1959; Choi, Carr, 1967; Белицина и др., 1971). В литературе имеются указания на стабилизирующую роль Mn^{++} и Co^{++} (Lyttleton, 1960, 1962; Abdul-Nour, Webster, 1960; Белицина и др., 1971). В микроколичествах в препаратах рибосом обнаруживаются, кроме Mn^{++} и Co^{++} , также Fe^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Sr^{++} и некоторые другие металлы (Tal, 1969).

Так или иначе, анализы препаратов рибосом показывают, что основным металлическим катионом в них неизменно является Mg^{++} , в некоторых количествах может присутствовать Ca^{++} , а другие катионы, если иногда и могут быть составной частью естественно выделяемых рибосомных частиц, то присутствуют, по-видимому, лишь в очень малых количествах, в качестве «микроэлементов».

Первые определения содержания металлических катионов были сделаны на препаратах рибосом из проростков гороха (Ts'o et al., 1958). Для препаратов недиссоциированных 80 S рибосом промытых водой, они дали величины около 0,30—0,33 микромоля ионов двухвалентных металлов на 1 микромоль фосфора в рибосоме; из них 0,25—0,29 микромоля приходилось на Mg^{++} и всего около 0,04 микромоля на Ca^{++} . Это значит, что в таких препаратах рибосом содержалось около 1600—1800 атомов Mg на одну 80 S рибосому, или около 10 мг Mg^{++} на 1 г сухого веса рибосом (около 1% от сухого веса рибосомной частицы).

Близкие величины — 0,2—0,3 микромоля Mg^{++} на 1 микромоль фосфора в недиссоциированных 80 S рибосомах — были найдены для промытых рибосомных препаратов из дрожжей (Lansink, 1964) и из ретикулоцитов кролика (Edelman et al., 1960). Более низкие величины — 0,1—0,15 микромоля Mg^{++} на 1 микромоль фосфора были получены для 80 S рибосом эмбрионов лягушки (Brown, Caston, 1962), поджелудочной железы морской свинки (Siekevitz, Palade, 1960), печеночной опухоли (саркома Иенсена) крыс (Petermann, 1960).

При инкубации в средах, содержащих концентрацию солей Mg^{++} , близкую к физиологической (0,005 M — 0,01 M), животные и растительные 80 S рибосомы легко связывают до 0,5 микромоля Mg^{++} на 1 микромоль фосфора (Petermann, 1960; Lansink, 1964). Это значит, что практически вся рибосомальная РНК может присутствовать в рибосоме в виде Mg^{++} -соли.

Бактериальные 70 S рибосомы отличаются от 80 S рибосом в том отношении, что они вполне стабильны лишь в растворах с довольно большой концентрацией Mg^{++} (0,005 M и выше), когда величина содержания Mg^{++} в самих частицах составляет около 0,5 микромоля на 1 микромоль фосфора (Rodgers, 1964; Goldberg, 1966; Choi, Carr, 1967); это соответствует около 2500 атомов Mg на одну 70 S рибосому, или около 20 мг Mg на 1 г сухого веса рибосом (около 2%). При снижении содержания Mg^{++} в 70 S рибосомах наименее стабильные из них уже начинают диссоциировать на субчастицы (см. раздел II). Однако критическое содержание Mg^{++} в рибосомах, ниже которого они диссоциируют, может различаться для рибосом, взятых в разном функциональном состоянии. Это критическое содержание Mg^{++} является своего рода показателем стабильности ассоциации рибосомных субчастиц в полной частице: чем ниже эта критическая концентрация, тем, очевидно, крепче связаны субчастицы друг с другом.

Таким образом, две группы рибосом — 70 S и 80 S — четко различаются по стабильности: первые могут начинать диссоциировать уже при снижении содержания Mg^{++} ниже 0,5 микромоля на 1 микромоль фосфора, тогда как для диссоциации 80 S частиц содержание Mg^{++} требуется обычно понизить до 0,3—0,1 микромоля на 1 микромоль фосфора. Этот показатель — то критическое содержание Mg^{++} , ниже которого данные рибосомы диссоциируют на субчастицы, — можно обозначить как *первый критический уровень содержания Mg^{++} в рибосомных частицах*.

Стабильность самих рибосомных субчастиц поддерживается при меньшем содержании в них Mg^{++} . Так, если диализовать дрожжевые 80 S рибосомы против буфера без Mg^{++} ,

то одновременно с диссоциацией на субчастицы они теряют эндогенный Mg^{++} до конечного его содержания около 0,15 микромоля на 1 микромоль фосфора (Lapsink, 1964). Этот оставшийся Mg^{++} уже весьма прочно удерживается самими субчастицами. Если все же уменьшить это содержание путем сработки комплексирующими агентами (ЭДТА), то нативная структура субчастиц начинает разрушаться.

То же самое, лишь при других значениях содержания Mg^{++} , происходит с 70 S рибосомами *E. coli*. Диссоциация рибосом сопровождается падением содержания Mg^{++} от 0,5 до 0,35—0,33 микромоля на 1 микромоль фосфора (Rodgers, 1964; Choi, Cagg, 1967). Оставшийся Mg^{++} гораздо более прочно удерживается субчастицами. Если же и его начать удалять, то с субчастицами происходят дальнейшие структурные превращения (разворачивание) (Rodgers, 1964; Gesteland, 1966; см. ниже, раздел IV, 2).

Минимальную концентрацию Mg^{++} в частицах, которая еще достаточна для поддержания исходной целостности (компактности) субчастиц, можно обозначить как *второй критический уровень содержания Mg^{++} в рибосомных частицах*. Второй критический уровень содержания Mg^{++} в рибосомных частицах, ниже которого они уже теряют исходную компактность, составляет, как правило, около 0,15 микромоля Mg^{++} на 1 микромоль фосфора для 80 S рибосом и около 0,3 микромоля на 1 микромоль фосфора для 70 S рибосом, или что-то около 1000 атомов Mg на полную рибосому, т. е. около 5—10 мг Mg^{++} на 1 г сухого веса рибосом (от 0,5 до 1%). Однако этот уровень не постоянен и сильно зависит также от содержания одновалентных катионов в среде и от присутствия полиаминов. Например, наличие ионов K^+ в среде несколько стабилизирует рибосомную частицу, и второй критический уровень содержания Mg^{++} в присутствии K^+ может быть заметно ниже. Удаление полиаминов (см. ниже) из рибосомы повышает необходимый критический уровень содержания Mg^{++} . Значительные вариации могут наблюдаться в зависимости от биологического источника рибосом.

В отношении характера и прочности связывания ионов Mg^{++} в рибосомных частицах важную информацию дают опыты по скорости обмениваемости связанного Mg^{++} с внешним Mg^{++} в окружающем растворе. Оказывается, что, как показано на рибосомах *E. coli* с помощью радиоактивного Mg^{++} (Rodgers, 1964), около 35% Mg^{++} в 70 S рибосоме очень быстро (менее, чем за 2 мин. при 0°) обменивается со свободным Mg^{++} среды. Это как раз тот лабильно связанный Mg^{++} , который обеспечивает первый критический уровень, необходи-

мый для поддержания ассоциации субчастиц в 70 S частице. Остальной Mg^{++} рибосомы, поддерживающий компактность и целостность самих субчастиц, практически за короткое время не обменивается с внешним Mg^{++} ; скорость его обмена не превышает 5—6% в час при 0°. О прочности связывания Mg^{++} в субчастицах свидетельствует и то, что для его удаления обычно не достаточно простого, даже длительного, диализа против безмагниевого буфера, а требуется применение либо комплексирующих агентов типа ЭДТА (Gesteland, 1966), либо больших (0,5 M и выше) конкурентных концентраций одновалентных катионов в среде (Спирин и др., 1963; Gavrilova et al., 1966).

Таким образом, можно принять, что эндогенный Mg^{++} рибосомных субчастиц, обеспечивающий их целостность и соответствующий второму критическому уровню содержания Mg^{++} в рибосомах, является *прочно связанным и медленно обменивающимся* со свободным Mg^{++} среды. То дополнительное количество Mg^{++} , которое необходимо для поддержания ассоциации субчастиц в рибосоме, т. е. благодаря добавлению которого достигается первый критический уровень содержания Mg^{++} в рибосоме, представлено *лабильно связанными и быстро обменивающимися* ионами Mg^{++} .

Следует еще раз подчеркнуть, однако, что сформулированное представление о критических уровнях содержания Mg^{++} в рибосомных частицах не может рассматриваться как абсолютное. В частности, в поддержании целостности субчастиц и их ассоциации в полную частицу заметную роль, частично заменяющую роль Mg^{++} , могут играть такие органические катионы, как ди- и полиамины. Поэтому в зависимости от их содержания в рибосомах критический уровень содержания Mg^{++} может быть, по-видимому, различен и несколько варьирует даже для рибосом из одного и того же вида организма.

Полиамины как составная часть рибосом особенно детально были изучены в препаратах рибосом из *E. coli*. Как качественный набор, так и их количественное содержание, по данным различных авторов, несколько варьирует. Вполне вероятно, что это может отражать реальные вариации в зависимости от условий выращивания, фазы роста, штамма и т. п., т. е. что данный компонент рибосомы не столь постоянен, не столь строго фиксирован в количестве и составе, как другие. Так, Циллиг с сотр. (Zillig et al., 1959) обнаружили в рибосомах *E. coli* диамины — *путресцин, кадаверин и 1,3-диаминопропан*; два первых содержались в преобладающем количестве, их соотношение составляло 2:1; спермидина обнаружено не было; общее содержание диаминов составляло 2,5% от сухого веса

рибосом. Коэн и Лихтенштейн (Cohen, Lichtenstein, 1960) нашли 1,5% полиаминов в рибосомах *E. coli*, и причем только путресцин и *спермидин* в соотношении 3:1—2:1. Спар (Spahr, 1962) определил содержание полиаминов в рибосомах *E. coli* равным всего 0,4% от сухого веса рибосом, обнаружив путресцин, спермидин и кадаверин в соотношении 3:2:1, а также следы *спермина*. В препаратах животных рибосом, как правило, обнаруживается спермин, а также был найден кадаверин и 1,3-диаминопропан (Zillig et al., 1959; Siekevitz, Palade, 1962). В рибосомах из дрожжей найдены спермидин, путресцин и немного спермина (Ohtaka, Uchida, 1963).

Все перечисленные поли- и диамины, добавленные в небольших концентрациях в раствор, как было показано, заметно стабилизируют рибосомы против энзиматической и температурной деградаци и предотвращают диссоциацию на субчастицы в буферах с малым содержанием Mg^{++} ; особенно в этом отношении эффективен спермидин. Имеются убедительные данные о том, что добавление полиаминов позволяет заметно снизить оптимальную концентрацию Mg^{++} в суспензии рибосом при работе с бесклеточными белок-синтезирующими системами, а также приводит к увеличению активности таких систем (Martin, Ames, 1962; Nathans, Lipmann, 1961; Lucas et al., 1963; Bretthauer et al., 1963; Hershko et al., 1961). Возможно, следовательно, полиамины представляют собой важный компонент рибосомы, по-видимому, не просто дополняющий стабилизирующую роль Mg^{++} , но также и играющий свою собственную регулирующую роль в создании рибосомной структуры, наиболее приспособленной для выполнения функций.

5. Резюме

Физически рибосома есть компактная частица, по форме приближающаяся к сфере или, точнее, к слегка сплюснутому эллипсоиду вращения, с линейными размерами около 200—300 Å. Различают два класса рибосом: так называемые 70 S рибосомы и 80 S рибосомы. Первые характеризуются молекулярным весом несколько менее 3×10^6 , размерами в высушенном состоянии около $200 \times 170 \times 170$ Å и коэффициентом седиментации ($S_{20, w}^0$) около 70 ед. Сведберга. Вторые несколько крупнее; они имеют молекулярный вес около $4-5 \times 10^6$, размеры в высушенном состоянии $250 \times 200 \times 200$ Å и коэффициент седиментации около 80 ед. Сведберга. Набухаемость рибосом, т. е. количество удерживаемой воды

на грамм сухого веса, по-видимому, порядка двух третей по объему. Рибосомы 70 S класса характерны для бактерий, актиномицетов и синезеленых водорослей, т. е. для так называемых Protokaryotes, а также для хлоропластов и митохондрий высших организмов. Рибосомы 80 S класса — компонент цитоплазмы всех организмов, кроме бактерий, актиномицетов и синезеленых водорослей, т. е. всех Eukaryotes.

Химически рибосома есть рибонуклеопротеид. В 70 S рибосомах белок составляет около 35—40% от сухого веса, а остальные 65—60% приходятся на рибосомальную РНК. В 80 S рибосомах относительное содержание белка больше; он составляет около половины сухого веса рибосомы, а остальные 50% приходятся на РНК. Обязательным низкомолекулярным компонентом рибосом являются двухвалентные катионы — прежде всего Mg^{++} и, по-видимому, Ca^{++} . Вероятно, в физиологических условиях рибосомальная РНК в составе рибосом находится преимущественно в виде Mg^{++} -соли. Кроме неорганических катионов, рибосомы могут содержать варьирующие количества диаминов и полиаминов — путресцина, кадаверина, спермидина и др.

Л и т е р а т у р а

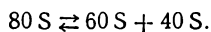
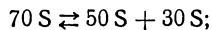
- Белицина Н. В., Розенблат В. А., Спирин А. С. 1971. Молекулярная биология, 5, 898.
- Одинцова М. С., Брусков В. И., Голубева Е. В. 1967. Биохимия, 32, 1047.
- Светаило Е. Н.; Филиппович И. И., Сисакян Н. М. 1966. Докл. АН СССР, 170, 206.
- Спирин А. С., Киселев Н. А., Шакулов Р. С., Богданов А. А. 1963. Биохимия, 28, 920.
- Abdul-Nour B., Webster G. C. 1960. Exp. Cell. Res., 20, 226.
- Boardman N. K., Francki R. J. B., Wildman S. G. 1965. Biochemistry, 4, 872.
- Boardman N. K., Francki R. J. B., Wildman S. G. 1966. J. Mol. Biol., 17, 470.
- Bretthauer R. K., Marcus L., Chaloupka J., Halvorson H. O., Bock R. M. 1963. Biochemistry, 2, 1079.
- Brown D. D., Caston J. D. 1962. Develop. Biol., 5, 412.
- Chao F.-C. 1957. Arch. Biochem. Biophys., 70, 426.
- Chao F.-C., Schachman H. K. 1956. Arch. Biochem. Biophys., 61, 220.
- Choi Y. S., Carr C. W. 1967. J. Mol. Biol., 25, 331.
- Clark M. F., Matthews R. E. F., Ralf R. K. 1964. Biochim. Biophys. Acta, 91, 289.
- Cohen S. S., Lichtenstein J. 1960. J. Biol. Chem., 235, 2112.
- Dibble W. E., Dintzis H. M. 1960. Biochim. Biophys. Acta, 37, 152.
- Dintzis H. M., Borsook H., Vinograd J. 1958. «Microsomal Particles and Protein Synthesis», p. 95. Pergamon Press, London — New York — Paris — Los Angeles.
- Edelman I. S., Ts'o P.O.P., Vinograd J. 1960. Biochim. Biophys. Acta, 43, 393.
- Elson D. 1959. Biochim. Biophys. Acta, 36, 362.

- Elson D. 1961. Biochim. Biophys. Acta, 53, 232.
- Gavrilova L. P., Ivanov D. A., Spirin A. S. 1966. J. Mol. Biol., 16, 473.
- Gesteland R. F. 1966. J. Mol. Biol., 18, 356.
- Goldberg A. 1966. J. Mol. Biol., 15, 663.
- Hall C. E., Slaughter H. S. 1959. J. Mol. Biol., 1, 329.
- Hamilton M. G., Cavaliere L. F., Petermann M. L. 1962. J. Biol. Chem., 237, 1155.
- Hamilton M. G., Petermann M. L. 1959. J. Biol. Chem., 234, 1441.
- Hart R. G. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 60, 629.
- Hershko A., Amoz S., Mager J. 1961. Biochem. Biophys. Res. Commun., 5, 46.
- Hess E. L., Lagg S. E. 1963. Biochemistry, 2, 726.
- Hill W. E., Rossetti G. P., VanHolde K. E. 1969. J. Mol. Biol., 44, 263.
- Huxley H. E., Zubay G. 1960. J. Mol. Biol., 2, 10.
- Keller P. J., Cohen E., Wade R. D. 1963. Biochemistry, 2, 315.
- Kuff E. L., Zeigel R. F. 1960. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7, 465.
- Kurland C. G. 1960. J. Mol. Biol., 2, 83.
- Küntzel H. 1969. J. Mol. Biol., 40, 315.
- Küntzel H., Noll H. 1967. Nature, 215, 1340.
- Lansink A. G. W. J. 1964. «Yeast Ribosomes and Magnesium Ions». Doctor Thesis. Nijmegen, Netherlands.
- Lucas J. M., Schüurs A. H. W. M., Simpson M. V. 1963. Fed. Proc., 22, 302.
- Lyttleton J. W. 1960. Biochem. J., 74, 82.
- Lyttleton J. W. 1962. Exp. Cell. Res., 26, 312.
- Madison J. T., Dickman S. R. 1963. Biochemistry, 2, 321.
- Martin R. G., Ames B. N. 1962. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 48, 2171.
- Nathans D., Lipmann F. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 497.
- Ohtaka Y., Uchida K. 1963. Biochim. Biophys. Acta, 76, 94.
- Petermann M. L. 1960. J. Biol. Chem., 235, 1998.
- Petermann M. L., Hamilton M. G. 1957. J. Biol. Chem., 224, 725.
- Petermann M. L., Pavlovic A. 1966. Biochim. Biophys. Acta, 114, 264.
- Pogo A. O., Pogo B. B., Littau V. C., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Hamilton M. G. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 55, 849.
- Rawson J. R., Stutz E. 1969. Biochim. Biophys. Acta, 190, 368.
- Rodgers A. 1964. Biochem. J., 90, 548.
- Sager R., Hamilton H. G. 1967. Science, 157, 709.
- Shelton E., Kuff E. L. 1966. J. Mol. Biol., 22, 23.
- Siekevitz P., Palade G. E. 1960. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7, 631.
- Siekevitz P., Palade G. E. 1962. J. Cell. Biol., 13, 217.
- Spahr P. F. 1962. J. Mol. Biol., 4, 395.
- Spencer D. 1965. Arch. Biochim. Biophys., 111, 381.
- Svetailo E. N., Philippovich I. I., Sissakian N. M. 1967. J. Mol. Biol., 24, 405.
- Tal M. 1969. Biochemistry, 8, 424.
- Tashiro Y., Siekevitz P. 1965. J. Mol. Biol., 11, 149.
- Tashiro Y., Yphantis D. A. 1965. J. Mol. Biol., 11, 174.
- Taylor M. M., Storck R. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 52, 958.
- Tissières A., Watson J. D. 1958. Nature, 182, 778.
- Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R. 1959. J. Mol. Biol., 1, 221.
- Ts'o P. O. P., Bonner J., Vinograd J. 1956. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 451.
- Ts'o P. O. P., Bonner J., Vinograd J. 1958. Biochim. Biophys. Acta, 30, 570.
- Ts'o P. O. P., Vinograd J. 1961. Biochim. Biophys. Acta, 49, 113.
- Vasiliev V. D. 1971. FEBS Letters, 14, 203.
- Zillig W., Krone W., Albers M. 1959. Z. physiol. Chemie, 317, 131.

II

Подразделение рибосомы на две неравные субчастицы

Самой яркой структурной особенностью рибосомы является то, что она всегда построена из двух неравных субчастиц. Это есть универсальный принцип структурной организации рибосом. Этот принцип был открыт Тиссьером и Уотсоном на 70 S рибосомах (Tissières, Watson, 1958) и Чао на 80 S рибосомах (Chao, 1957) в опытах, где рибосомы удалось диссоциировать на составляющие их субчастицы при понижении концентрации щелочно-земельных катионов (Mg^{++} , Ca^{++}) в растворе и вновь реассоциировать при восстановлении исходных условий:



Подразделение рибосомы на две неравные субчастицы можно отчетливо видеть на электронных микрофотографиях как 70 S, так и 80 S рибосом. По-видимому, впервые это наблюдали Хаксли и Зьюбей (Huxley, Zubay, 1960) при электронно-микроскопическом изучении 70 S рибосом *Escherichia coli*, используя методику негативного контрастирования. Подразделение 80 S рибосомы на две субчастицы наблюдали в электронный микроскоп Сабатини, Таширо и Паладе (Sabatini et al., 1966) и Шелтон и Куфф (Shelton, Kuff, 1966).

1. Большая субчастица

Большая субчастица 70 S рибосомы в свободном состоянии имеет коэффициент седиментации $S_{20, w}^0 = 50$ ед. Сведберга (Tissières et al., 1959) и потому обозначается как *50 S частица*. Ее молекулярный вес, рассчитанный из коэффициента седиментации и коэффициента диффузии, равен

$1,8 \times 10^6$ (Tissières et al., 1959). Существенно более низкую величину молекулярного веса 50 S субчастицы — $1,55 \times 10^6$ — получили Хилл и др. (Hill et al., 1969) из данных по седиментационному равновесию.

Форма 50 S субчастицы *E. coli* была довольно детально изучена путем электронной микроскопии (Hall, Slayter, 1959; Huxley, Zubay, 1960; Hart, 1962, 1965; Bruskov, Kisselev, 1968a; Lubin, 1968). Она может быть очень грубо аппроксимирована сферой с одной более или менее уплощенной стороной. Именно своей уплощенной стороной 50 S субчастица соединяется с 30 S субчастицей в полную 70 S рибосому; соответственно эта сторона 50 S субчастицы может быть обозначена как ее *контактирующая поверхность*.

Средний диаметр 50 S субчастицы в сухом состоянии — около 160 Å; отсюда «сухой» объем — около 2×10^6 Å³, что совпадает с «сухим» объемом, вычисленным из парциального удельного объема частицы и ее молекулярного веса. Однако, как и в случае полных рибосом, объем 50 S субчастицы в растворе должен быть больше «сухого» объема.

Действительно, при электронномикроскопическом изучении 50 S частиц, высушенных из замороженного состояния, их размеры оказались существенно больше, чем у воздушно высушенных 50 S частиц: они составили $230 \times 230 \times 160$ Å (объем $4,6 \times 10^6$ Å³) (Hart, 1962) или $210 \times 230 \times 160$ Å (объем $4,0 \times 10^6$ Å³) (Васильев, 1971, не опубликовано). Большой объем в данном случае был объяснен тем, что при обычном высушивании рибосом на воздухе они, теряя воду, сжимаются, а при высушивании из замороженного состояния их размеры могут быть ближе к исходным. Объем 50 S субчастицы в растворе, оцененный из характеристической вязкости и коэффициента диффузии, составляет около 6×10^6 Å³. Следовательно, и в 50 S субчастице, как и в полной 70 S рибосоме, вода составляет около двух третей ее эффективного объема в растворе.

На самом деле детальная форма 50 S частицы, однако, не может быть описана какой-либо простой геометрической фигурой; она сложна и специфична. Электронномикроскопические наблюдения с высоким разрешением показали, что в одной проекции частица выглядит как аркообразная или серповидная, тогда как в другой проекции очертания близки к прямоугольнику с округленными углами (Bruskov, Kisselev, 1968a; Lubin, 1968). Именно уплощенная сторона представляет собой основание «арки», т. е. по плоскости контактирующей поверхности 50 S частицы идет глубокая борозда, или канал, шириной около 40 Å (Bruskov, Kisselev, 1968a); по-видимому, вход в этот канал с периферии 50 S частицы иногда на электронных

микрофотографиях виден как «глазоподобный» участок (Hart, 1965).

Одной из характерных деталей морфологии, выявляемых на 50 S субчастицах и характеризующих скорее всего тонкий поверхностный «рельеф» частиц, является наблюдаемая параллельная исчерченность некоторых участков поверхности рибосомной частицы с периодичностью (расстояние между параллельными рядами) около 30—40 Å (Spirin, Kisselev, 1964; Hart, 1965; Vasiliev, 1971).

Большая субчастица 80 S рибосомы, имеющая коэффициент седиментации в свободном состоянии около 60 ед. Сведберга и обозначаемая как *60 S частица*, очень похожа по морфологии на 50 S частицу, но несколько крупнее (Bruskov, Kisselev, 1968b). Ее молекулярный вес был определен физическими методами (седиментационное равновесие или сочетание седиментации и диффузии) и оказался равным около 3×10^6 (Tashiro, Yphantis, 1965; Petermann, Pavlovec, 1966).

Как в 50 S субчастице 70 S рибосом, так, по-видимому, и в 60 S субчастице 80 S рибосом относительное содержание РНК больше, чем содержание белка. В *50 S частицах* РНК составляет около 63—65% (Tissières et al., 1959); этому соответствует плавучая плотность в CsCl около $\rho = 1,64 \text{ г/см}^3$ (Gavrilova et al., 1966). Как можно оценить из величин плавучей плотности *60 S частиц* в CsCl, равных $\rho = 1,57 - 1,61 \text{ г/см}^3$ (Perry, Kelley, 1966; Белицина и др., 1968; Infante, Nemer, 1968; Овчинников и др., 1969; Фаис и др., 1970), относительное содержание РНК в 60 S частицах составляет сравнительно близкую величину — около 58—60%.

2. Малая субчастица

Малая субчастица 70 S рибосомы имеет коэффициент седиментации $S_{20, w}^0 = 31-32$ ед. Сведберга (Tissières et al., 1959; Hill et al., 1969) и обозначается как *30 S частица*. Молекулярный вес этой субчастицы, рассчитанный из коэффициента седиментации и коэффициента диффузии, оказался равным $0,7 \times 10^6$ (Tissières et al., 1959), а по данным седиментационного равновесия — $0,9 \times 10^6$ (Hill et al., 1969).

В отличие от более или менее изометрической 50 S частицы, высушенная малая (30 S) рибосомная субчастица в сво-

бодном виде на электронных микрофотографиях выглядит сильно уплощенной в одном направлении, деформируемой структурой, часто с неправильными очертаниями (Hall, Slayter, 1959; Huxley, Zubay, 1960). Высота такой частицы, лежащей уплощенной стороной на подложке, составляет 70—95 Å, а видимый диаметр в среднем 150—180 Å. Если аппроксимировать эту частицу эллипсоидом с размерами $160 \times 160 \times 80$ Å (соотношение полуосей около 1:2), то получается «сухой» объем около 1×10^6 Å³, что совпадает с «сухим» объемом, оцененным из парциального удельного объема и молекулярного веса частицы. Размеры 30 S субчастицы, высушенной из замороженного состояния, составляют по электронномикроскопическим данным (Васильев, 1971, не опубликовано) $100 \times 240 \times 120$ Å (объем $1,5 \times 10^6$ Å³). Объем 30 S субчастицы в растворе, оцененный по характеристической вязкости, составляет около 4×10^6 Å³.

В составе полной 70 S рибосомы 30 S субчастица примыкает к своему партнеру, 50 S субчастице, одной из своих поверхностей, которая может быть обозначена как *контактирующая* поверхность 30 S субчастицы.

Как и в 50 S субчастице, весовое количество РНК в 30 S субчастице больше, чем весовое количество белка: на РНК приходится около 60—65% сухого веса субчастицы.

Малая субчастица 80 S рибосомы, обозначаемая как *40 S частица*, отличается от 30 S частицы своим большим размером. Это связано не только с большим размером заключенной в ней РНК (см. ниже, раздел III), но и с гораздо большим относительным и абсолютным содержанием белка. Относительное содержание белка в 40 S частице может быть оценено из величины плавучей плотности этой частицы в CsCl, которая равна $\rho = 1,49—1,53$ г/см³ (Perry, Kelley, 1966; Белицина и др., 1968; Infante, Nemer, 1968; Овчинников и др., 1969; Фаис и др., 1970); согласно такой оценке, белок составляет несколько более половины (53—55%) сухого веса 40 S субчастицы (Овчинников и др., 1969). Таким образом, 40 S субчастица существенно отличается от своего партнера, 60 S субчастицы, по соотношению РНК:белок, которое в 40 S субчастице меньше 1, а в 60 S субчастице — больше 1.

Молекулярный вес 40 S субчастицы может быть оценен равным около $1,5 \times 10^6$ (исходя из молекулярного веса ее РНК — см. раздел III — и соотношения РНК:белок).

Таким образом, как в 70 S, так и в 80 S рибосомах *малая субчастица по весу вдвое меньше большой субчастицы*. В обоих типах рибосом малая субчастица имеет гораздо более

асимметричную форму, чем большая субчастица. Но если в 70 S рибосомах обе субчастицы близки по соотношению РНК:белок, то в 80 S рибосомах субчастицы различаются и в этом отношении.

3. Ассоциация субчастиц

В составе полной 70 S рибосомы обе субчастицы прилегают друг к другу своими контактирующими поверхностями, образуя структуру, электронномикроскопическое изображение одной из проекций которой дано на рис. 11.

Ассоциация субчастиц в полной рибосоме может характеризоваться разной стабильностью в зависимости от типа рибосомы (70 S или 80 S) и от ее функционального состояния. Как правило, субчастицы в 80 S рибосомах ассоциированы гораздо более прочно, чем в 70 S рибосомах. В свою очередь, в пределах каждого из двух типов рибосом имеются большие различия в стабильности ассоциации субчастиц в рибосомах, взятых в разном функциональном состоянии. Мерой стабильности ассоциации двух субчастиц в препаратах рибосом может служить размер того воздействия, который оказывается достаточным, чтобы вызвать диссоциацию рибосом на субчастицы в растворе.

Во всех случаях ассоциация субчастиц в рибосоме поддерживается при участии ионов Mg^{++} и (или) Ca^{++} (Chao, 1957; Ts'o, 1958; Ts'o et al., 1958; Tissières, Watson, 1958; Tissières et al., 1959; Ts'o, Vinograd, 1961; Gordon, Lipmann, 1967). Поэтому удаление этих ионов из среды приводит к диссоциации рибосом на субчастицы, и, в частности, мерой стабильности ассоциации субчастиц может служить как раз та минимальная концентрация этих катионов в среде, которая еще не вызывает диссоциации.

Диссоциация бактериальных 70 S рибосом. Впервые Тиссьер и Уотсон (Tissières, Watson, 1958; Tissières et al., 1959) определенно показали, что для поддержания ассоциированного (70 S) состояния выделенных препаратов рибосом *E. coli* требуется концентрация Mg^{++} в растворе около 0,01 M; понижение концентрации Mg^{++} в растворе до 10^{-3} M — 10^{-4} M вызывает их диссоциацию на 50 S и 30 S субчастицы.

Было показано, что Ca^{++} в эквивалентной концентрации (0,01 M) так же хорошо, как Mg^{++} , поддерживает ассоциированное состояние 70 S рибосом *E. coli* (Gordon, Lipmann, 1967). Mn^{++} также может способствовать ассоциации суб-

частиц (Белицина и др., 1971). Другие двухвалентные металлы — Be^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} , по-видимому, не активны в поддержании специфической ассоциации субчастиц в 70 S рибосоме.

Кроме металлических катионов (Mg^{++} , Ca^{++} и Mn^{++}), в поддержании ассоциированного состояния 70 S рибосомы *E. coli* оказались очень эффективными ди- и полиамины, и особенно спермин и спермидин (Cohen, Lichtenstein 1960; Silman et al., 1965; Pestka, 1966; Norton et al., 1968; Белицина и др., 1971).

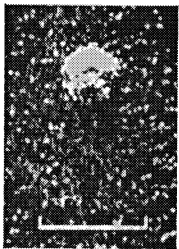
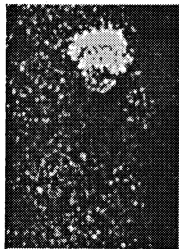
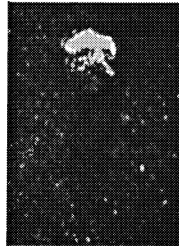
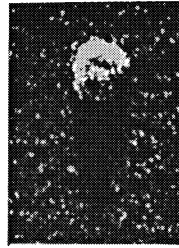
Аминогликозидные антибиотики — стрептомицин, неомицин, канамицин — также очень сильно стабилизируют ассоциированное состояние 70 S рибосом из чувствительных к ним штаммов бактерий (Leon, Brock, 1967; Suzuki et al., 1968; Лишневская и др., 1971).

Высокие концентрации одновалентных катионов (K^+ , NH_4^+) всегда способствуют диссоциации 70 S рибосом (Сабо, Спирин, 1970). Вообще, чем выше концентрация одновалентных катионов в среде, тем более высокие концентрации Mg^{++} требуются, чтобы поддержать ассоциированное состояние рибосом. Гораздо более сильной диссоциирующей активностью, чем K^+ , NH_4^+ , Cs^+ или Rb^+ , обладают в эквивалентных концентрациях ионы Na^+ и Li^+ (Белицина и др., 1971).

Понижение pH раствора ниже 7 несколько противодействует диссоциации 70 S рибосом на субчастицы; наоборот, увеличение pH выше 7 способствует диссоциации 70 S рибосом (Сабо, Спирин, 1970). При понижении pH до 5 рибосомы начинают агрегировать неспецифически и выпадать в осадок. При увеличении pH выше 9 рибосомы деградируют.

Повышение температуры раствора способствует диссоциации 70 S рибосом (Сабо, Спирин, 1970). В случае рибосом *E. coli* особенно сильно тенденция к диссоциации выражена при температурах выше 40° . При температурах вблизи 60° рибосомы *E. coli* полностью диссоциируют даже при $0,01\text{ M Mg}^{++}$, а выше 60° необратимо денатурируют.

Гидрофобные агенты — метанол, этанол, диметилсульфоксид, диоксан — взятые в концентрации около 1 M, сильно стабилизируют ассоциацию между рибосомными субчастицами (Spirin, Lishnevskaya, 1971). Негидрофобный агент — глицерин — оказывает при этом лишь слабое стабилизирующее (ассоциирующее) действие, а мочеви́на дестабилизирует (диссоциирует) ассоциат (Spirin, Lishnevskaya, 1971). Это, между прочим, свидетельствует против значительной роли гидрофобных взаимодействий в ассоциации рибосомных субчастиц и более всего указывает на возможное участие водородных связей.



Р и с. 11.

Электронные микрофотографии одиночных 70S рибосом *Escherichia coli*, высушенных из замороженного состояния (выполнены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР)

Оттенение вольфрамом. Увеличение 300 000 (длина масштабной метки соответствует 500Å)

Кроме специфической ассоциации 50 S и 30 S субчастиц в 70 S рибосому, высокие концентрации Mg^{++} (особенно 0,01M и выше) могут способствовать димеризации 70 S рибосом в 100 S частицы (Tissières et al., 1959), а также димеризации 50 S субчастиц (Huxley, Zubay, 1960) и димеризации 30 S субчастиц (Dahlberg, Haselkorn, 1967). При более высоких концентрациях Mg^{++} (0,1M и выше) может происходить дальнейшая агрегация частиц. Димеризация 70 S рибосом в 100 S частицы зависит от pH: она сильно нарастает при понижении pH от 7 до 5,5 (Сабо, Спирин, 1970). Понижение температуры раствора до $+4^\circ$ также способствует димеризации (Сабо, Спирин, 1970). Димеризация 70 S рибосом при высоких концентрациях Mg^{++} ингибируется одновалентными катионами (например, K^+ или NH_4^+ в концентрации 0,05M — 0,1M) (Watson, 1964; Dahlberg, Haselkorn, 1967; Сабо, Спирин, 1970), повышенными pH (около 8) и повышенными температурами (30° — 40°) (Сабо, Спирин, 1970).

Аналогичная димеризация 80 S рибосом в 110 S — 120 S частицы и 40 S субчастиц в 60 S частицы может наблюдаться и в случае рибосом высших организмов (Ts' o et al., 1958; Hamilton, Petermann, 1959; Petermann, 1960; Ts' o, Vinograd, 1961; Lederberg, Mitchison, 1962; Tashiro, Siekevitz, 1965).

Диссоциация 80 S рибосом. В отношении условий диссоциации на субчастицы, 80 S рибосомы высших организмов, и особенно рибосомы животных, могут сильно отличаться от бактериальных 70 S рибосом. Как уже указывалось, связь между субчастицами в 80 S рибосомах более стабильна. Обычно для того чтобы вызвать диссоциацию 80 S рибосомы на субчастицы, недостаточно простого понижения концентрации ионов Mg^{++} в среде на порядок или два, как в случае 70 S рибосом, а чаще всего необходимо рибосомы поместить в среду совсем без ионов Mg^{++} . Но даже в этом случае диссоциация обычно не идет; вторым условием должна быть или относительно высокая концентрация одновалентных катионов (например, K^+), или повышенный pH раствора (до 8,5), или наличие анионов типа фосфата или карбоната, имеющих сродство к двухвалентным катионам. Если не употреблять сильные комплексоны для удаления Mg^{++} (типа ЭДТА или пирофосфата), или крайних значений pH (9 — 9,5), или больших концентраций фосфата или карбоната (0,1M), или очень высоких концентраций одновалентных катионов (например, 0,5—0,7 M KCl), то в относительно мягких условиях 80 S рибосома может быть диссоциирована на большую и меньшую субчастицы с коэффициентами седиментации около 60 и 40 ед. Сведберга соответственно. Так, Чао (Chao, 1957) была описана полная

диссоциация дрожжевых рибосом по типу $80\text{ S} \rightarrow 60\text{ S} + 40\text{ S}$ в $0,01\text{M}$ фосфатном буфере pH 7,5. Рибосомы проростков гороха оказалось возможным диссоциировать по схеме $79\text{ S} \rightarrow 58(\pm 2)\text{ S} + 38(\pm 2)\text{ S}$ при повышении pH от 6,5 до 7,5 в фосфатном буфере с ионной силой 0,05, или при увеличении ионной силы фосфатного буфера pH 6,5 выше 0,05, или при действии $0,7\text{M}$ KCl в отсутствие фосфата, или, наконец, просто путем продолжительного диализа против фосфатного буфера без Mg^{++} (Ts' o et al., 1958). Животные рибосомы, как показывает пример с рибосомами крысиной гепатомы Новикова, не обработанными предварительно дезоксихолатом, также диссоциируют по схеме $81\text{ S} \rightarrow 64\text{ S} + 45\text{S}$, например, в $0,005\text{M}$ фосфатном буфере, содержащем $0,0005\text{M}$ MgCl_2 и $0,05\text{M}$ NaCl (Kuff, Zeigel, 1960). Точно так же рибосомы из ретикулоцитов кролика диссоциируют по схеме $78\text{ S} \rightarrow 58\text{ S} + 40\text{ S}$ при диализе против буфера с KCl, не содержащего Mg^{++} (Ts' o, Vinograd, 1961). Точные значения коэффициентов седиментации получаемых субчастиц у различных авторов для различных рибосом, как видно, несколько варьируют — от 58 до 64 ед. Сведберга для большой субчастицы и от 38 до 46 ед. Сведберга для малой субчастицы.

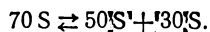
Во многих случаях предварительная обработка препаратов дезоксихолатом значительно изменяет стабильность рибосом по отношению к диссоциирующим воздействиям и, возможно, характер самих рибосом, в результате чего сильно меняется видимая картина диссоциации (см., например, Kuff, Zeigel, 1960). Не исключено, что дезоксихолат отщепляет от рибосом некоторую, наиболее лабильно связанную порцию белка. Поэтому те случаи, когда для получения 80 S рибосом применяется дезоксихолат (или какие-либо другие детергенты), требуют особого рассмотрения. Точно так же использование более жестких условий для удаления ионов Mg^{++} из рибосомы, включая применение комплексонов типа ЭДТА и пиродифосфата, вызывает структурные изменения рибосом, идущие за пределы простой диссоциации на субчастицы; диссоциация в этом случае сопровождается, по-видимому, частичным разворачиванием (разрыхлением) субчастиц и, может быть, даже отщеплением части белка.

Здесь мы лишь укажем, что при диссоциации 80 S рибосом с помощью комплексонов коэффициенты седиментации образующихся субчастиц значительно ниже, чем были только что приведены, и составляют для всех изученных случаев, независимо от объекта, 43—50 ед. Сведберга для большой субчастицы и 24—32 ед. Сведберга для малой субчастицы (Ts' o et al., 1958; Hamilton, Petermann, 1959; Kuff, Zeigel, 1960; Lamf-

rom, Glowacki, 1962; Tashiro, Siekevitz, 1965). Это значит, что в таких случаях диссоциация 80 S рибосомы на субчастицы сопровождается, скорее всего, структурными превращениями — частичным разворачиванием и, может быть, некоторой разборкой, а не представляет собой явление в чистом виде.

Стабильность ассоциации при разных функциональных состояниях рибосомы. В транслирующей рибосоме две составляющие субчастицы *прочно* ассоциированы друг с другом, специфически соединяясь своими контактирующими поверхностями. Однако показано, что прочная ассоциация субчастиц в транслирующей рибосоме обеспечивается далеко не только собственным сродством их друг к другу, но и участием аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК (Schlessinger et al., 1967; Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970), а также, возможно, других компонентов белок-синтезирующей системы (например, различных белковых факторов и ГТФ).

Ассоциация чистых — «ненагруженных» (т. е. лишенных аминоацил-тРНК, пептидил-тРНК, белковых факторов транслации) — 50 S и 30 S субчастиц в нетранслирующую 70 S рибосому является относительно *нестабильной*. Показано, что между таким 70 S ассоциатом и свободными 50 S и 30 S субчастицами имеется *динамическое равновесие* (Spirin, 1971):



Это значит, что нетранслирующие рибосомные частицы должны постоянно обмениваться партнерами. Равновесие можно сдвинуть влево повышением концентрации Mg^{++} в среде и вправо — понижением концентрации Mg^{++} . В равновесной смеси при «физиологических» концентрациях одновалентных катионов (от 0,05 M до 0,16 M K^+ или NH_4^+) частицы находятся преимущественно в форме 70 S ассоциатов при 0,01 M — 0,02 M Mg^{++} и преимущественно в форме 50 S и 30 S субчастиц уже при 0,005 M — 0,003 M Mg^{++} (Спирин и др., 1970; Сабо, Спирин, 1970; Belitsina, Spirin, 1970; Спирин, Коваленко, 1970, не опубликовано). Таким образом, *собственное специфическое сродство* двух комплементарных субчастиц, безусловно, имеется, но оно не может быть достаточным, чтобы поддерживать их стабильную ассоциацию в физиологических условиях — например, при 0,005 M Mg^{++} , 0,1 M K^+ , pH 7—8, $t^\circ = 37^\circ$ для рибосом *E. coli*. Выявить собственное сродство двух субчастиц друг к другу можно, например, повысив концентрацию Mg^{++} и снизив температуру; по мере увеличения концентрации Mg^{++} , уменьшения концентрации одновалентных катионов, уменьшения pH и уменьшения температуры 50 S и 30 S субчастицы бу-

дуг все лучше ассоциировать (Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970; Спирин и др., 1970; Сабо, Спирин, 1970), т. е. равновесие вышеприведенной реакции будет сдвигаться влево.

Введение аминоксил-тРНК в присутствии матричного полинуклеотида в рибосому вызывает сильную *стабилизацию* ассоциации между рибосомными субчастицами (Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970). В физиологической обстановке это же происходит, очевидно, при *инициации* трансляции (см. ниже, «Функционирование рибосомы», раздел III, 1): так, сначала свободная 30 S субчастица связывается с иницирующим районом мРНК и с инициаторной аминоксил-тРНК (формилметионил-тРНК), а затем, вследствие увеличившегося сродства к 50 S субчастице, происходит ассоциация субчастиц с образованием стабилизированного инициаторного 70 S комплекса (Nomura, Lowry, 1967; Nomura et al., 1967; Schlessinger et al., 1967; Kondo et al., 1968). Вероятно, что по аналогичной причине может происходить формирование стабилизированных 70 S частиц при лизисе или гомогенизации клеток в присутствии повышенных концентраций Mg^{++} (при наличии также K^+ или NH_4^+); свободные 30 S субчастицы или их лабильные ассоциаты с 50 S субчастицами будут связывать мРНК (или ее фрагменты) и аминоксил-тРНК, что повлечет за собой их более стабильную ассоциацию с 50 S субчастицами (Phillips, Franklin, 1969). Если диссоциация 70 S рибосом, образованных из чистых («ненагруженных») 30 S и 50 S субчастиц, достигается уже при 0,003—0,005M Mg^{++} , то для быстрой и полной диссоциации 70 S рибосом, стабилизированных присутствием аминоксил-тРНК, концентрацию Mg^{++} в среде необходимо понизить до 0,001M (Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970; Спирин и др., 1970).

Начало *трансляции* в рибосоме делает ассоциацию рибосомных субчастиц не только *еще более стабильной*, но и *необратимой* на весь процесс трансляции. Безусловно, субчастицы транслирующей рибосомы уже не находятся в равновесии со свободными субчастицами и не обмениваются.

Для того чтобы вызвать искусственную диссоциацию транслирующих бактериальных рибосом на субчастицы, недостаточно понизить концентрацию Mg^{++} в среде до 0,001M, а требуется более полное удаление Mg^{++} — по крайней мере до 0,0001M или даже ниже (Tissières et al., 1960; Gilbert, 1963; Schlessinger, Gros, 1963; Kohler et al., 1968; Kelley, Schaechter, 1969; Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970). Транслирующие 80 S рибосомы в ряде объектов могут быть, по-видимому, еще стабильнее и, как правило, требуют для своей диссоциации даже обработки ЭДТА (Warner et al., 1963; Wettstein et al., 1963).

Особенно большая стабильность транслирующих рибосом может быть объяснена, по-видимому, одновременным присутствием в них как *аминоацил-тРНК*, так и *пептидил-тРНК* (Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970). То, что присутствие пептидил-тРНК действительно вносит вклад в стабилизацию ассоциации рибосомных субчастиц, было показано прямыми экспериментами (Schlessinger et al., 1967; Spirin, 1969; Belitsina, Spirin, 1970). Необратимость стабильной ассоциации субчастиц в транслирующей рибосоме видна из того факта, что после ее искусственной диссоциации субчастицы, несущие субстраты трансляции — 50 S субчастица, несущая пептидил-тРНК, и 30 S субчастица, несущая мРНК и аминоацил-тРНК, — уже не способны реассоциировать и продолжить трансляцию (Belitsina, Spirin, 1970).

По-видимому, *терминация* трансляции (см. ниже, «Функционирование рибосомы», раздел III, 3), когда рибосома оказывается освобожденной от аминоацил-тРНК и от синтезируемого пептида, должна приводить к резкой *дестабилизации* ассоциации рибосомных субчастиц. Ассоциация субчастиц после терминации снова делается обратимой, терминировавшая рибосома в физиологических условиях проявляет тенденцию к диссоциации на субчастицы, между субчастицами происходит интенсивный обмен (Kaempfer et al., 1968; Kaempfer, Meselson, 1969). Скорее всего это обусловлено тем обстоятельством, что собственное сродство двух рибосомных субчастиц друг к другу, в отсутствие аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК, не достаточно, чтобы обеспечить их стабильную ассоциацию (см. выше). Кроме того, имеются указания, что в бактериальных клетках имеется специальный белковый фактор — «фактор диссоциации» DF (Subramanian et al., 1968, 1969) — ослабляющий ассоциацию между рибосомными субчастицами, т. е., очевидно, еще более сдвигающий равновесие реакции $70\text{ S} \rightleftharpoons 50\text{ S} + 30\text{ S}$ в сторону диссоциации. Вероятно, что этот фактор идентичен фактору инициации F 3 (см. ниже, «Функционирование рибосомы», раздел I, 6). Он, по-видимому, имеет сродство к 30 S субчастице и, связываясь с ней, понижает ее сродство к 50 S субчастице. Тогда терминация приводит к появлению свободных рибосомных субчастиц, и лишь после связывания мРНК и инициаторной аминоацил-тРНК малой рибосомной субчастицей снова возникает возможность для формирования стабилизированного 30 S — 50 S (или 40 S — 60 S) ассоциата. Таким образом, имеется цикл, в котором рибосомы каждый раз диссоциируют при терминации и прочно реассоциируют при инициации трансляции (Mangiarotti, Schlessinger, 1966, 1967; Kaempfer et al., 1968; Kaempfer, Meselson, 1969).

Литература

- Белицина Н. В., Овчинников Л. П., Спири́н А. С., Гендон Ю. З., Чернос В. И. 1968. Молекулярная биология, 2, 727.
- Белицина Н. В., Розенблат В. А., Спири́н А. С. 1971. Молекулярная биология, 5, 898.
- Лишневская Е. Б., Гельфанд В. И., Спири́н А. С. 1971. Докл. АН СССР, 199, 712.
- Овчинников Л. П., Быстрова Т. Ф., Спири́н А. С. 1959. Докл. АН СССР, 185, 210.
- Сабо Б., Спири́н А. С. 1970. Молекулярная биология, 4, 628.
- Спири́н А. С., Софронова М. Ю., Сабо Б. 1970. Молекулярная биология, 4, 618.
- Файс Д., Шакулов Р. С., Клячко Е. В. 1970. Молекулярная биология, 4, 232.
- Belitsina N. V., Spirin A. S. 1970. J. Mol. Biol., 52, 45.
- Bruskov V. I., Kisselev N. A. 1968a. J. Mol. Biol., 37, 367.
- Bruskov V. I., Kisselev N. A. 1968b. J. Mol. Biol., 38, 443.
- Chao F.—C. 1957. Arch. Biochem. Biophys., 70, 426.
- Cohen S. S., Lichtenstein J. 1960. J. Biol. Chem., 235, 2112.
- Dahlberg J. E., Haselkorn R. 1967. J. Mol. Biol., 24, 83.
- Gavrilova L. P., Ivanov D. A., Spirin A. S. 1966. J. Mol. Biol., 16, 473.
- Gilbert W. 1963. J. Mol. Biol., 6, 389.
- Gordon J., Lipmann F. 1967. J. Mol. Biol., 23, 23.
- Hall C. E., Slayter H. S. 1959. J. Mol. Biol., 1, 329.
- Hamilton M. G., Petermann M. L. 1959. J. Biol. Chem., 234, 1441.
- Hart R. G. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 60, 629.
- Hart R. G. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 53, 1415.
- Hill W. E., Rossetti G. P., VanHolde K. E. 1969. J. Mol. Biol., 44, 263.
- Huxley H. E., Zubay G. 1960. J. Mol. Biol., 2, 10.
- Infante A. A., Nemer M. 1968. J. Mol. Biol., 32, 543.
- Kaempfer R., Meselson M. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 209.
- Kaempfer R., Meselson M., Raskas H. J. 1968. J. Mol. Biol., 31, 277.
- Kelley W. S., Schaechter M. 1969. J. Mol. Biol., 42, 599.
- Kohler R. E., Ron E. Z., Davis B. D. 1968. J. Mol. Biol., 36, 71.
- Kondo M., Eggerston G., Eisenstadt J., Lengyel P. 1968. Nature, 220, 368.
- Kuff E. L., Zeigel R. F. 1960. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7, 465.
- Lamfrom H., Glowacki E. R. 1962. J. Mol. Biol., 5, 97.
- Lederberg S., Mitchison J. M. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 55, 104.
- Leon S. A., Brock T. D. 1967. J. Mol. Biol., 24, 391.
- Lubin M. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 61, 1454.
- Mangiarotti G., Schlessinger D. 1966. J. Mol. Biol., 20, 123.
- Mangiarotti G., Schlessinger D. 1967. J. Mol. Biol., 29, 335.
- Nomura M., Lowry C. V. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 946.
- Nomura M., Lowry C. V., Guthrie C. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 1487.
- Norton J. W., Erdmann V. A., Herbst E. J. 1968. Biochim. Biophys. Acta, 155, 293.
- Perry R. P., Kelley D. E. 1966. J. Mol. Biol., 16, 255.
- Pestka S. 1966. J. Biol. Chem., 241, 367.
- Petermann M. L. 1960. J. Biol. Chem., 235, 1998.
- Petermann M. L., Pavlovac A. 1966. Biochim. Biophys. Acta, 114, 264.
- Phillips L. A., Franklin R. M. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 243.

- Sabatini D. D., Tashiro Y., Palade G. E.* 1966. J. Mol. Biol., **19**, 503.
Schlessinger D., Gros F. 1963. J. Mol. Biol., **7**, 350.
Schlessinger D., Mangiarotti G., Apirion D. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **58**, 1782.
Shelton E., Kuff E. L. 1966. J. Mol. Biol., **22**, 23.
Silman N., Artman M., Engelberg H. 1965. Biochim. Biophys. Acta, **103**, 231.
Spirin A. S. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 197.
Spirin A. S. 1971. FEBS Letters, **14**, 349.
Spirin A. S., Kisselev N. A. 1964. Communication at the VI Intern. Congress of Biochem., New York (Abstracts I, Symp., **3**, p. 32).
Spirin A. S., Lishnevskaya E. B. 1971. FEBS Letters, **14**, 114.
Subramanian A. R., Ron E. Z., Davis B. D. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **61**, 761.
Subramanian A. R., Davis B. D., Beller R. J. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 223.
Suzuki J., Hori M., Umezawa H. 1968. J. Antibiotics (Japan), **21**, 571.
Tashiro Y., Stekevitz P. 1965. J. Mol. Biol., **11**, 149.
Tashiro Y., Yphantis D. A. 1965. J. Mol. Biol., **11**, 174.
Tissières A., Schlessinger D., Gros F. 1960. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **46**, 1450.
Tissières A., Watson J. D. 1958. Nature, **182**, 778.
Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R. 1959. J. Mol. Biol., **1**, 221.
Ts'o P. O. P. 1958. «Microsomal particles and protein synthesis», p. 156. Oxford: Pergamon Press.
Ts'o P. O. P., Bonner J., Vinograd J. 1958. Biochim. Biophys. Acta, **30**, 570.
Ts'o P. O. P., Vinograd J. 1961. Biochim. Biophys. Acta, **49**, 113.
Vasiliev V. D. 1971. FEBS Letters, **14**, 203.
Warner J. R., Knopf P. M., Rich A. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **49**, 122.
Watson J. D. 1964. Bull. soc. chim. biol., **46**, 1399.
Wettstein F. O., Staehelin T., Noll H. 1963. Nature, **197**, 430.

Рибосомальная РНК

1. Молекулярно-весовые характеристики

Рибосомальная РНК, как уже отмечалось, составляет не менее половины от сухого веса рибосомных частиц и является, таким образом, их важнейшим структурным компонентом. По седиментационным и молекулярно-весовым характеристикам рибосомальная РНК любой клетки подразделяется на *три дискретных класса* молекул: 1) высокомолекулярная 23 S—28 S РНК (молекулярный вес более 1×10^6), 2) высокомолекулярная 16 S—18 S РНК (молекулярный вес менее 1×10^6) и 3) сравнительно низкомолекулярная 5 S РНК (молекулярный вес около 40 000).

Высокомолекулярные рибосомальные РНК. Наличие двух дискретных классов молекул высокомолекулярной рибосомальной РНК связано с подразделением рибосомы на две неравные субчастицы. В каждую субчастицу входит *одна* молекула высокомолекулярной рибосомальной РНК. Следовательно, в большую (50 S или 60 S) субчастицу входит молекула 23 S—28 S РНК, а в меньшую (30 S или 40 S) — молекула 16 S—18 S РНК.

В случае *бактериальных рибосом* в 50 S субчастицу входит одна молекула рибосомальной РНК с молекулярным весом около $1,1 \times 10^6$; в 30 S субчастицу входит одна молекула РНК с молекулярным весом $0,56 \times 10^6$ (Kurland, 1960; Green, Hall, 1961; Stanley, Bock, 1965). Обычно, следуя Курланду, в литературе их коэффициенты седиментации принимают равными 23 и 16 ед. Сведберга соответственно; поэтому высокомолекулярные рибосомальные РНК бактерий принято всюду обозначать как 23 S и 16 S РНК. Однако не надо забывать, что это в некотором смысле условность. На самом деле, значения седиментационных коэффициентов РНК существенно зависят от ионных условий в растворе, а различные авторы отнюдь не пользуются каким-либо стандартным растворителем. Более того, значения седиментационных коэффициентов РНК

могут заметно варьировать в зависимости от примесей связанных ионов двух- и более валентных металлов в самом препарате РНК. По-видимому, одним из лучших стандартных растворителей, в значительной мере снимающих неконтролируемое влияние примесных катионов, является 0,1M NaCl с 0,01M ЭДТА. В результате седиментационного анализа в аналитической ультрацентрифуге рибосомальных РНК из ряда видов бактерий было найдено, что все они характеризуются практически одинаковыми величинами коэффициентов седиментации; в 0,1M NaCl с 0,01M ЭДТА, в присутствии 20 мкг/мл поливинилсульфата, pH 4,5, седиментационные коэффициенты ($S_{20,w}^0$) бактериальных РНК (включая *E. coli*) составляли около 20 ($20,4 \pm 0,6$) ед. Сведберга для большого и около 15 ($15,2 \pm 0,4$ ед. Сведберга для малого компонента¹, в 0,01 M $MgCl_2$ седиментационные коэффициенты повышались до 28 ед. Сведберга для большого компонента и 21 ед. Сведберга для малого компонента высокомолекулярной рибосомальной РНК (Taylor et al., 1967).

Рибосомы других протокариотических организмов — *актиномицетов* и *синезеленых водорослей* — характеризуются точно такими же молекулярными весами их высокомолекулярных рибосомальных РНК, что и бактериальные рибосомы: $1,1 \times 10^6$ и $0,56 \times 10^6$ для РНК 50 S и 30 S субчастиц соответственно (Loening, 1968).

Молекулярные веса РНК из 80 S рибосом низших эукариотических растений — *водорослей*, *грибов*, *папоротников* — несколько выше, чем у бактерий и других Protokaryotes. Они составляют $1,3 \times 10^6$ для их 25 S РНК и $0,7 \times 10^6$ для их 17 S РНК (Stutz, Noll, 1967; Loening, 1968). В соответствии с этим в 0,1M NaCl с 0,01M ЭДТА в присутствии 20 мкг/мл поливинилсульфата, pH 4,5, точные значения коэффициентов седиментации рибосомальных РНК различных видов грибов составляют около $23,4 \pm 0,5$ и $16,4 \pm 0,2$ ед. Сведберга, т. е. выше, чем у бактериальных рибосомальных РНК в тех же условиях (Taylor et al., 1967). В 0,01M $MgCl_2$ коэффициенты седиментации рибосомальных РНК грибов увеличиваются до 30 и 20 ед. Сведберга (Taylor et al., 1967).

Точно такие же величины молекулярных весов двух рибо-

¹ Эти значения получены путем измерения $S_{20,w}^0$ при малых концентрациях РНК с помощью ультрафиолетовой оптики. Экстраполяция значений $S_{20,w}^0$, полученных при больших концентрациях РНК с помощью шлирен-оптики, дает в аналогичном растворителе (фосфатный буфер с ионной силой 0,1, 0,01M ЭДТА) более высокие значения $S_{20,w}^0$ — до 23 и 17 ед. Сведберга (Спирин, 1961).

сомальных РНК — $1,3 \times 10^6$ и $0,7 \times 10^6$ — найдены в случае цитоплазматических 80 S рибосом и всех *высших растений* (Loening, Ingle, 1967; Loening, 1968). Для них отмечались коэффициенты седиментации около 25 и 16 ед. Сведберга (Pollard, 1964; Click, Hackett, 1966; Click, Tint, 1967; Stutz, Noll, 1967), хотя более поздние данные указывают, что коэффициент седиментации малого компонента рибосомальной РНК должен быть выше и приближаться к 18 ед. Сведберга (Loening 1968).

Что касается *животных*, то у их 80 S рибосом наблюдается небольшая, но отчетливая вариабельность молекулярного веса большого компонента рибосомальной РНК, т. е. РНК 60 S субчастицы: чем выше организм на эволюционной лестнице, тем больше молекулярный вес этой РНК. Молекулярный вес малого компонента рибосомальной РНК, т. е. РНК 40 S субчастицы, более или менее постоянен и всюду составляет около $0,7 \times 10^6$. Так, у *беспозвоочных животных* (насекомые, иглокожие) молекулярные веса двух рибосомальных РНК составляют $1,4 \times 10^6$ и $0,7 \times 10^6$, у *холоднокровных позвоночных* (например, земноводные) они составляют $1,5 \times 10^6$ и $0,7 \times 10^6$, у *птиц* — около $1,6 \times 10^6$ и $0,7 \times 10^6$ (Loening, 1968). Наконец, у *млекопитающих*, включая человека, молекулярные веса двух рибосомальных РНК составляют $1,70\text{—}1,75 \times 10^6$ и $0,7 \times 10^6$ (Gierer, 1958; Petermann, Pavlovec, 1966; Hamilton 1967; Loening, 1968). В соответствии с этим рядом, для беспозвоочных животных, в частности насекомых, было замечено, что коэффициенты седиментации их рибосомальной РНК несколько ниже, чем у позвоночных (Applebaum et al., 1966). Обычно для рибосом позвоночных животных наблюдаемые различными авторами коэффициенты седиментации составляют около 28—30 ед. Сведберга и около 17—18 ед. Сведберга (Gierer, 1958; Cheng, 1959; 1960; Hall, Doty, 1959; Ts'o, Squires, 1959; Littauer, 1961; Petermann, Pavlovec, 1963; 1966; Henshaw, 1964; De Bellis et al., 1964; Brown, Gurdon, 1964; Montagnier, Bellamy, 1964; Click, Tint, 1967); поэтому животные рибосомальные РНК чаще всего принято обозначать как 28 S и 18 S РНК.

Несколько особняком стоят рибосомальные РНК некоторых *простейших*, в частности *Амобы* и *Еуглены*: молекулярный вес малого компонента их рибосомальной РНК существенно выше, чем у других изученных организмов, и равен $0,85\text{—}0,9 \times 10^6$, а большой компонент, имеющий молекулярный вес $1,3\text{—}1,53 \times 10^6$, почему-то физически нестабилен (Loening, 1968). Рибосомальная РНК другого класса простейших — Ciliates — по молекулярному весу относится к чисто «растительному типу»: большой компонент — $1,3 \times 10^6$, малый компонент — $0,69 \times 10^6$ (Loening, 1968; Reisner et al., 1968).

Таблица 2
Молекулярные веса и коэффициенты седиментации
высокомолекулярных рибосомальных РНК

Источник РНК	Коэффициенты седиментации, $S_{20, w}^0$, ед. Сведберга (обычно принимаемые значения, ионная сила $\approx 0,1$)	Молекулярный вес*
Бактерии, а также актиномицеты и синезеленые водоросли [70 S рибосомы]	23 16	$1,1 \times 10^6$ $0,56 \times 10^6$
Хлоропласты и митохондрии [70 S рибосомы]	23 16	$1,1 \times 10^6$ $0,56 \times 10^6$
Грибы и водоросли [80 S рибосомы]	25 18	$1,3 \times 10^6$ $0,7 \times 10^6$
Высшие растения [80 S рибосомы]	25 18	$1,3 \times 10^6$ $0,7 \times 10^6$
Простейшие [80 S рибосомы]	25 — 26 18 — 20	$1,3 - 1,5 \times 10^6$ $0,7 - 0,9 \times 10^6$
Беспозвоночные животные [80 S рибосомы]	26 18	$1,4 \times 10^6$ $0,7 \times 10^6$
Позвоночные животные [80 S рибосомы]	27 — 28 18	$1,5 - 1,75 \times 10^6$ $0,7 \times 10^6$

* Рассчитано из обычно принимаемых значений $S_{20, w}^0$ по формуле $M = 1550 \times S_{20, w}^{2,1}$ (Спирин, 1961) и скорректировано в соответствии с экспериментальными данными (Loening, 1968).

Так как все эукариотические организмы, начиная от простейших, грибов и водорослей и кончая высшими растениями и животными, кроме 80 S рибосом, имеют в составе своих митохондрий и хлоропластов также еще и 70 S рибосомы, то вопрос о молекулярных весах рибосомальной РНК из этих органоидов представляет особый интерес. Оказалось, что рибосомальная РНК 70 S рибосом митохондрий (Küntzel, Noll, 1967; Rifkin et al., 1967; Dure et al., 1967; Rogers et al., 1967; Wintersberger, 1967; Dubin, Brown, 1967) и хлоропластов (Stutz, Noll, 1967; Loening, Ingle, 1967; Loening, 1968; Scott, Smillie, 1969; Rawson, Stutz, 1969) как высших, так и низших эукариотических организмов не отличима по молекулярным весам и коэффициентам седиментации от бактериальных рибосомальных РНК (23 S и 16 S).

Приведенные выше данные по коэффициентам седиментации и молекулярным весам высокомолекулярных рибосомальных РНК суммированы в табл. 2.

В целом можно видеть, что в живой природе вариации молекулярных весов высокомолекулярных рибосомальных РНК сравнительно невелики. По крайней мере, среди бактерий и среди всех растений заметных вариаций в молекулярных весах рибосомальных РНК вообще нет. Эта крайне малая изменчивость — почти универсальность — рибосомальных РНК проявляется и в других их характеристиках (см. ниже).

Низкомолекулярная рибосомальная РНК. Помимо структурной высокомолекулярной рибосомальной РНК, в составе рибосом как бактерий, так и высших организмов обнаружена также сравнительно низкомолекулярная РНК с коэффициентом седиментации около 5 ед. Сведберга (Rosset, Monier, 1963; Rosset et al., 1964; Comb, Katz, 1964; Comb et al., 1965; Zehavi-Willner, Comb, 1966; Comb, Zehavi-Willner, 1967; Comb, Sarkar, 1967). Так как по соотношению четырех главных оснований (Г, А, Ц, У — см. ниже) и по коэффициенту седиментации она похожа на «растворимую» (адапторную) РНК, или тРНК (4 S РНК), ее одно время в литературе называли «т-подобной РНК» («t-like RNA»). Однако, в отличие от тРНК, указанная 5 S РНК не содержит метилированных оснований и псевдоуридина, не имеет акцептирующего ЦЦА-конца и не способна энзиматически присоединять концевые Ц и А нуклеотиды, не участвует в активации и акцептировании аминокислот и вообще не имеет гомологии с цепями тРНК по нуклеотидной последовательности. Ее молекулярный вес заметно больше, чем молекулярный вес тРНК; например, 5 S РНК из рибосом *E. coli* имеет в своей цепи 120 нуклеотидов (мол. вес около 40 000) (Brownlee, Sanger, 1967; Brownlee et al., 1967) вместо 75—85 нуклеотидов в 4 S тРНК (мол. вес около 27 000). 5 S РНК в свободном виде в клетке не встречается, а всегда входит только в состав рибосом, являясь компонентом большей (50 S или 60 S) субчастицы. При диссоциации рибосомы на субчастицы 5 S РНК сохраняется в связи с большей субчастицей, но, по-видимому, легко удаляется из нее при структурных превращениях типа разворачивания и разборки (см. ниже — раздел V, 1, 2). На каждую рибосому приходится 1 молекула 5 S РНК. Весьма вероятно, что место ее локализации в большой рибосомной частице находится на контактирующей поверхности, т. е. на поверхности, взаимодействующей с малой субчастицей.

Таким образом, в настоящее время можно считать, что в рибосому, например, в рибосому *E. coli*, входит по одной мо-

лекуле 23 S РНК, 16 S РНК и 5 S РНК; соответственно их относительные весовые соотношения в рибосомах *E. coli* составляют 65%, 33% и 2% (т. е. на 5 S РНК падает всего немногим более 1% от сухого веса рибосомы).

2. Непрерывность полинуклеотидных цепей

В конце 50-х — начале 60-х годов в ряде лабораторий были получены экспериментальные данные о том, что каждая молекула рибосомальной РНК состоит не из одной непрерывной цепи, а из большего или меньшего количества более коротких цепей (субъединиц). Так, ряд авторов (Hall, Doty, 1958, 1959; Takamami, 1960; Osawa, 1960; Tashiro et al., 1960; Aronson, McCarthy, 1961; Helmkamp, Ts'o, 1961) наблюдали образование частиц более низкого молекулярного веса после прогревания растворов различных рибосомальных РНК. Этот факт объясняли наличием субъединиц в макромолекуле рибосомальной РНК, связанных друг с другом «слабыми» связями, разрушающимися при нагревании. Предполагали, что такими «слабыми» связями могут быть водородные связи или мостики из двухвалентных и многовалентных металлов. Действительно, Аронсон и МакКарти (Aronson, McCarthy, 1961) наблюдали распад молекулы рибосомальной РНК из *E. coli* до частиц с молекулярным весом около 30 000 в результате диализа раствора РНК против буфера, не содержащего магния. С другой стороны, Гельмкамп и Тсо (Helmkamp, Ts'o, 1961; Ts'o, Helmkamp, 1961) сообщили, что рибосомальная РНК из проростков гороха, характеризующаяся вначале двумя компонентами с седиментационными коэффициентами 27—28 и 17—18 ед. Сведберга, в результате разрыва водородных и гидрофобных связей при помощи формамида или диметилсульфоксида, так же как и в результате нагревания водного раствора, обнаруживает необратимую диссоциацию на субъединицы; после такой обработки и обратного перевода ее в водный раствор при комнатной температуре она седиментирует как гетерогенный пик со средним седиментационным коэффициентом 8—10 ед. Сведберга.

Противоположные результаты впервые были получены в 1960 г. на животной рибосомальной РНК (Спирин, Мильман, 1960; Spirin, 1960), а вслед за тем подтверждены на бактериальной рибосомальной РНК из *E. coli* и растительной РНК из проростков гороха (Спирин, 1961; Богданова и др. 1962). В этих опытах удалось получить высокомолекулярные рибо-

сомальные РНК, не диссоциирующие при нагревании и при удалении двухвалентных и многовалентных катионов металлов. Все изученные РНК обнаруживали многократный подъем удельной вязкости в результате термального разворачивания их полинуклеотидных цепей; присутствие значительных концентраций ЭДТА не влияло на этот подъем. Охлаждение после прогревания растворов рибосомальной РНК из *E. coli*, во время которого она характеризуется развернутым состоянием цепей (80°) как в присутствии, так и в отсутствие ЭДТА, приводило к полному восстановлению прежних размеров молекул, включая большой и малый компоненты рибосомальной РНК (23 S и 16 S). Наконец, длинные непрерывные нити рибосомальной РНК в развернутом состоянии обнаруживаются в электронном микроскопе; самые длинные нити на микрофотографиях рибосомальной РНК имели длину до 18 000 Å, что должно соответствовать, по-видимому, одной непрерывной вытянутой полинуклеотидной цепи большого компонента рибосомальной РНК с молекулярным весом около $1,1 \times 10^6$. Таким образом, согласно этим данным, каждая молекула рибосомальной РНК составлена, по-видимому, из одной непрерывной полинуклеотидной цепи, которая разворачивается при нагревании, не диссоциируя и давая сильное загущение раствора, и которая потом легко свертывается в прежнюю частицу после охлаждения.

Дело в том, что, очевидно, получить «диссоциацию» молекул рибосомальной РНК гораздо легче, чем не получить ее. Такая ложная картина «диссоциации» возможна ввиду очень легкой ранимости полинуклеотидной цепи РНК. Особенно надо отметить следующие возможности получения артефактов: а) тепловую деградацию полирибонуклеотидной цепи, особенно при длительном нагревании; б) ферментативную деградацию, главным образом за счет присутствия в препаратах РНК следов вездесущих рибонуклеаз; в) выявление предсуществующих немногочисленных разрывов полинуклеотидной цепи, полученных в ходе выделения рибосом или препарата РНК из рибосом и не обнаруживающихся при комнатной температуре вследствие поддержания целостности всей компактной частицы РНК за счет многочисленных внутримолекулярных «комплементарных» взаимодействий. В последнем случае при разрушении комплементарных взаимодействий действительно может иметь место диссоциация частицы на отдельные составляющие ее цепочки. Это было показано для ряда препаратов потерявшей инфекционность вирусной РНК (Гаврилова и др., 1959; Haselkorn, 1962). Возможность нарушения целостности (непрерывности) полинуклеотидной цепи РНК еще в составе рибосом

без видимого изменения физико-химических характеристик этих рибосом также была показана (Шакулов и др., 1962). Такое нарушение (скрытая деградация рибосомальной РНК внутри рибосом) может происходить в процессе получения препаратов рибосом, и его можно получить искусственно, действуя малыми концентрациями экзогенной рибонуклеазы на рибосомальные частицы; седиментационные характеристики частиц при этом сохраняются. Таким образом, если не пытаться с особой тщательностью получить именно непрерывные цепи, а исходить из противоположной точки зрения, то деградацию полинуклеотидной цепи или выявление уже предсуществующих нарушений этой цепи очень легко продемонстрировать в опыте и выдать за «диссоциацию» якобы естественно существующих субъединиц.

На основании сказанного можно думать, что в опытах ряда авторов так называемая диссоциация РНК и была на самом деле следствием либо нуклеазных загрязнений их препаратов, либо чересчур жесткой термальной обработки, приводившей к деградации цепи, либо плохого качества самих препаратов, состоящих, возможно, из РНК с разорванной цепью. На самом деле молекулы нативных рибосомальных РНК представляют собой непрерывные полинуклеотидные цепи, которые в зависимости от молекулярного веса РНК состоят из 3200—5500 нуклеотидов для 23 S — 28 S компонента и из 1600—2500 для 16 S — 18 S компонента (Spirin, 1960, 1962; Спирин, 1961; Богданова и др., 1962).

В результате прямой экспериментальной проверки работ, говорящих в пользу гипотезы о субъединицах рибосомальной РНК, было показано, что обнаружение «субъединиц» при нагревании растворов РНК или при удалении ионов двух- и более валентных металлов является артефактом, отражающим деградацию РНК во время опыта, и был подтвержден вывод о непрерывности полинуклеотидных цепей высокомолекулярных рибосомальных РНК (Möller, Boedtke, 1962; Boedtke et al., 1962). Этот вывод был подтвержден также в последующей работе, где рибосомальную РНК обрабатывали формамидом, диметилсульфоксидом, ЭДТА, низкой ионной силой, теплом, и при этом не обнаружили никакой диссоциации на субъединицы (Stanley, Bock, 1965). Наконец, подтверждение ковалентной непрерывности полинуклеотидных цепей высокомолекулярных рибосомальных РНК было получено также путем химического определения количества концевых групп (Lane et al., 1963; Midgley, 1965a; Hunt, 1970).

В некоторых более новых работах приводятся данные в пользу того, что хотя ковалентная цепь высокомолекулярной рибосомальной РНК непрерывна, но в ней имеются особые

«слабые» точки, отличающиеся по стабильности от обычных межнуклеотидных связей. Например, обращается внимание на то, что цепь 23 S рибосомальной РНК *E. coli* в слабощелочных условиях, рН 9—10 легко разрывается ровно в середине, давая два 16 S фрагмента (Midgley, 1965 b). Однако при проверке этих опытов в нашей лаборатории оказалось, что особо тщательно депротенизированные препараты РНК не дают указанного эффекта, и 23 S РНК может быть стабильна при рН 9,5 (0,1 M глициновый буфер) в течение 10 час. при 37° (Барулина, 1966, не опубликовано). Действительно, было показано, что молекулы 23 S РНК оказываются стабильными при рН 10 в присутствии 10^{-3} M иодацетата, являющегося эффективным ингибитором многих ферментов; кроме того, очистка препаратов РНК с помощью переосаждения из 1 M LiCl или использование безрибонуклеазных штаммов *E. coli* для получения препаратов тоже дает РНК, где 23 S компонент вполне стабилен при рН 10 (Михайлова, Богданов, 1969).

Далее, иногда отмечается, что к распаду животной 26 S — 28 S рибосомальной РНК пополам, на две 16 S — 18 S молекулы, может приводить кратковременное нагревание препарата РНК или действие агентов типа формамида или диметилсульфоксида (Petermann, Pavlovec, 1963, 1966; Brown, Littna, 1964; Applebaum et al., 1966). В последней работе (Applebaum et al., 1966) было выяснено, что процесс этот не есть разрыв ковалентной связи, а отражает реальную диссоциацию нековалентных связей при наличии *предсуществующего* разрыва в ковалентной цепи 26 S РНК. Монодисперсность продукта диссоциации указывает, что точка разрыва очень специфична и находится всегда в середине цепи; по мнению авторов, такая специфичность точки *предсуществующего* разрыва может быть обусловлена действием нуклеаз на РНК еще в составе рибосом, до их депротенизации.

Таким образом, очевидно, что изолированная, тщательно очищенная рибосомальная РНК не обнаруживает каких-либо специальных «слабых» точек в цепи, отличных по стабильности от обычных межнуклеотидных связей. В то же время у рибосомальной РНК в *составе рибосомальных частиц* имеются явные предпочтительные точки разрыва, обусловленные, по-видимому, структурой частиц. Так, в первую очередь при «спонтанной» деградации РНК в *составе рибосом* ковалентная цепь 23 S — 28 S РНК рвется пополам, и в итоге либо из 50 S субчастицы (в случае *E. coli*) изолируется два 16 S компонента вместо одного 23 S, либо 26—28 S РНК, изолированная из 60 S субчастицы (в случае животных рибосом), содержит *предсуществующий* разрыв и легко диссоциирует на два 16—18 S фрагмента.

3. Нуклеотидный состав

а. Соотношения четырех главных нуклеотидов

Хотя два класса высокомолекулярных рибосомальных РНК локализованы в рибосоме в двух разных субчастицах, имеют большую разницу в молекулярном весе, а также, как сейчас известно, образуются в клетке на разных участках ДНК (на разных генах) (Yankofsky, Spiegelman, 1963; Attardi et al., 1965a, b; Oishi, Sueoka, 1965), они имеют очень сходное соотношение четырех главных азотистых оснований (Г, А, Ц, У), т. е. сходный нуклеотидный состав.

Так, в *бактериальных* рибосомах либо вообще не удается заметить разницу в нуклеотидном составе 23 S и 16 S РНК, либо обнаруживаемое различие очень мало и обычно заключается в слегка большем содержании пуринов (Г, А) в 23 S РНК (Spahr, Tissières, 1959; Bolton et al., 1959; Woese, 1961; Midgley, 1962). Низкомолекулярная 5 S рибосомальная РНК бактерий, наоборот, может довольно существенно отличаться по нуклеотидному составу от высокомолекулярных 23 S и 16 S РНК (Rosset et al., 1964; Schleich, Goldstein, 1966). Нуклеотидный состав 23 S, 16 S и 5 S рибосомальных РНК *E. coli*, выведенный как среднее из ряда литературных данных (Spahr, Tissières, 1959; Bolton et al., 1959; Midgley, 1962; Rosset et al., 1964; Brownlee et al., 1967), представлен в табл. 3.

Нуклеотидный состав рибосомальных РНК самых различных видов бактерий разного таксономического положения и с самым разным составом ДНК очень мало варьирует, обнаруживая поразительное сходство (Спирин и др., 1957; Belozersky, Spirin, 1958, 1960; Woese, 1961; Midgley, 1962). Все бактериальные высокомолекулярные рибосомальные РНК характеризуются небольшим преобладанием суммы Г + Ц над суммой А + У [$(Г + Ц) : (А + У) \approx 1,2$], значительным преобладанием

Таблица 3
Нуклеотидный состав рибосомальных РНК *E. coli*

Компонент РНК	Содержание нуклеотидов, молярные %				$\frac{Г + Ц}{А + У}$	$\frac{Пу}{Пи}$	$\frac{Г + У}{А + Ц}$
	Г	А	Ц	У			
23 S	32,8	25,5	21,0	20,6	1,17	1,40	1,15
16 S	31,6	24,5	22,5	21,3	1,18	1,28	1,12
5 S	33,8	19,2	30,0	17,0	1,76	1,13	1,03

пуриновых нуклеотидов над пиримидиновыми (Пу : Пи \approx 1,4—1, 3) и приблизительным равенством сумм Г + У и А + Ц [(Г + У) : (А + Ц) \approx 1,0—1,1]. (В щелочных гидролизатах выделенных препаратов РНК последнее равенство часто отклоняется от 1 в большую сторону, по-видимому, вследствие некоторого дезаминирования Ц с превращением его в У; скорее всего, нативный состав рибосомальной РНК строго выдерживает указанное равенство).

Нуклеотидным составом, очень похожим на состав бактериальных рибосомальных РНК, обладают высокомолекулярные РНК цитоплазматических рибосом *высших растений*. Как и среди бактерий, состав РНК высших растений, по-видимому, мало варьирует от вида к виду (Урысон, Белозерский, 1959; Ванюшин, Белозерский, 1959). В пределах класса двудольных состав РНК практически одинаков (Ванюшин, Белозерский, 1959). Нуклеотидный состав большого 25 S компонента рибосомальной РНК высших растений (класс двудольных) практически идентичен составу бактериальных РНК; в меньшем — 16 S компоненте обнаруживается несколько большее содержание У и меньшее — Ц (Click, Hackett, 1966; Pollard, 1964).

В отличие от бактерий и высших растений, среди *низших растений*, относящихся к Eukaryotes, могут быть, по-видимому, более значительные вариации нуклеотидного состава рибосомальных РНК в зависимости от видовой принадлежности. У грибов, например, состав тотальной РНК, отражающий, очевидно, в основном состав рибосомальной РНК, бывает, как обычно, «ГЦ-типа» (с преобладанием Г и Ц над А и У), так и «АУ-типа» (с преобладанием А и У), но у большинства видов Г + Ц \approx А + У (Урысон, Белозерский, 1960; Ванюшин и др., 1960).

Нуклеотидный состав рибосомальных РНК *позвоночных животных* существенно отличается от состава бактериальных рибосомальных РНК и в то же время, по-видимому, очень схож в пределах группы позвоночных (Lerner et al., 1963; Zimmerman et al., 1963; Montagnier, Bellamy, 1964; De Bellis et al., 1964; Brown, Gurdon, 1964; Ellem, 1966; Hirsch, 1966; Газарян, Шуппе, 1966, 1967; Galibert et al., 1966). Здесь, как правило, отмечаются существенные различия в нуклеотидном составе двух классов высокомолекулярной рибосомальной РНК: в большинстве случаев анализ показывает заметно большее содержание А и У и меньшее Г и Ц в препаратах 18 S РНК по сравнению с 28 S РНК. Средние данные по нуклеотидному составу высокомолекулярных рибосомальных РНК млекопитающих (состав РНК из разных видов млекопитающих, по-видимому, совершенно не различим) (Montag-

nier, Bellamy, 1964; De Bellis et al., 1964; Ellem, 1966; Hirsch, 1966), а также данные по составу 5 S РНК клеток млекопитающих (Galibert et al., 1966; Forget, Weissman, 1967) приведены в табл. 4.

Таблица 4

Нуклеотидный состав препаратов рибосомальных РНК млекопитающих

Компонент РНК	Содержание нуклеотидов, молярные %				$\frac{\Gamma + Ц}{А + У}$	$\frac{Пу}{Пи}$	$\frac{\Gamma + У}{А + Ц}$
	Г	А	Ц	У			
28 S	36,1	15,8	31,0	17,2	2,03	1,08	1,14
18 S	30,6	20,3	27,6	21,4	1,40	1,04	1,09
5 S	32,5	18,3	27,5	21,7	1,50	1,03	1,18

Состав рибосомальных РНК птиц (Lerner et al., 1963) и земноводных (Brown, Gurdon, 1964), если и отличается от состава РНК млекопитающих, то не очень значительно. Возможно, однако, состав РНК рыб существенно отличается от вышеуказанного и варьирует от вида к виду (Медников и др., 1965).

Весьма вероятно, однако, что констатируемое всеми авторами большее содержание А и У в препаратах 18 S РНК по сравнению с 28 S РНК отражает не истинное их различие, а является следствием загрязнения препарата рибосомальной 18 S РНК фракцией информационной РНК, имеющей тот же коэффициент седиментации и характеризующейся преобладанием А и У над Г и Ц. Этот вопрос экспериментально был поставлен Газаряном и Шуппе (1966, 1967). Было показано, что если клетки (ретикулоциты голубя) предварительно обработаны NaF с целью диссоциации рибосом от мРНК, а затем РНК выделена из таких освобожденных от мРНК рибосом, то нуклеотидный состав 18 S РНК приближается к составу 28 S РНК (Газарян, Шуппе, 1967).

В целом высокомолекулярные рибосомальные РНК позвоночных животных, как видно, характеризуются значительным преобладанием Г и Ц над А и У ($\frac{\Gamma + Ц}{А + У} \simeq 2$), очень небольшим преобладанием пуриновых нуклеотидов над пиримидиновыми ($\frac{Пу}{Пи} \simeq 1,1$) и приблизительно равным сумм $\frac{\Gamma + У}{А + Ц}$ ($\frac{\Gamma + У}{А + Ц} \simeq 1-1,1$).

У беспозвоночных животных и простейших состав рибосомальной РНК может, по-видимому, значительно отличаться от состава РНК позвоночных и довольно сильно варьировать у представителей различных таксономических групп (Антонов,

Белозерский, 1962; Гумилевская, Сисакян, 1963; Медников, 1965; Prestayko, Fisher, 1966; Ritossa et al., 1966; Applebaum et al., 1966). Среди простейших и насекомых нередки случаи, когда в рибосомальной РНК преобладают А и У над Г и Ц (Гумилевская, Сисакян, 1963; Prestayko, Fisher, 1966; Ritossa et al., 1966).

В качестве итога следует подчеркнуть, что во всех изученных рибосомальных РНК оба высокомолекулярных компонента — 23—28 S и 16—18 S, по-видимому, очень близки между собой по нуклеотидному составу. В ряде случаев, правда, отмечаются существенные различия. Однако если даже эти различия действительно связаны с некоторыми отличиями в соотношении нуклеотидов у двух рибосомальных РНК, а не примесью мРНК в препаратах 16—18 S, то все же удивительно не столько то, что различие есть, сколько то, что сходство остается очень большим. Это может иметь прямое отношение к возможной принципиальной гомологичности структурной организации обеих рибосомных субчастиц, большой (50 S или 60 S) и малой (30 S или 40 S).

Основными *общими закономерностями* нуклеотидного состава всех высокомолекулярных рибосомальных РНК, по-видимому, являются: 1) большее или меньшее преобладание пуриновых нуклеотидов над пиримидиновыми — $G + A > C + U$; 2) приблизительное равенство количества 6-кетогрупп и количества 6-аминогрупп — $G + U \simeq A + C$ (правило Элсона — Чаргаффа для РНК; см. Elson, Chargaff, 1954, 1955; Chargaff, 1963). (Снова необходимо подчеркнуть, что часто наблюдаемые небольшие отклонения от последнего равенства в сторону некоторого преобладания суммы $G + U$ над суммой $A + C$ могут быть следствием легкого дезаминирования Ц с превращением его в У в ходе выделения препаратов РНК и особенно в ходе их щелочного гидролиза, так что, может быть, в нативной рибосомальной РНК это равенство выдерживается еще строже).

6. «Минорные» нуклеотиды

В дополнение к нуклеотидам четырех главных азотистых оснований (Г, А, Ц и У) цепи высокомолекулярных рибосомальных РНК в составе рибосом характеризуются также присутствием небольшого количества метилированных оснований (2-метиладенин, 6-метиладенин, 6-диметиладенин, 1-метилгуанин, 2-метилгуанин, 5-метилцитозин, тимин и др.), тиолированных оснований (4-тиоурацил и др.), а также псевдоуридина (ψ, 5-рибозилурацил) и 2'-О-метилрибозы. Это обстоятельство роднит их с адапторными РНК (тРНК) и отличает

от вирусных и информационных РНК (мРНК). Однако доля метилированных нуклеозидов и псевдоуридина от общего числа нуклеозидов в рибосомальных РНК значительно ниже, чем в адапторных РНК (тРНК). Так, в высокомолекулярных рибосомальных РНК *E. coli* одна метильная группа приходится приблизительно на 100—150 нуклеотидных остатков, тогда как в тРНК в среднем одна на 30—40 нуклеотидов (Dubin, Günalp, 1967; Hayashi et al., 1966). Точно так же в рибосомальных РНК *E. coli* один псевдоуридиловый остаток приходится на 300—800 нуклеотидов, а в тРНК — приблизительно на 50 нуклеотидов (Dubin, Günalp, 1967). Интересно, что общая доля метилированных нуклеозидов в 16 S компоненте РНК несколько выше, а псевдоуридина значительно ниже, чем в 23 S компоненте. Имеются и качественные отличия; например, 6-метиладенин, 2-метиладенин и 2'-О-метилрибоза являются характерными составными частями 23 S РНК *E. coli*, но они не обнаруживаются в 16 S РНК; наоборот, 6-диметиладенина сравнительно много в 16 S РНК и нет в 23 S РНК. В целом расчет показывает, что в цепи 23 S РНК *E. coli* содержится около 10 остатков псевдоуридина и около 25—28 метильных групп, включая 2 остатка 2-метиладенина, 4—5 остатков 6-метиладенина, 1 остаток 1-метилгуанина, 3—4 остатка 2-метилгуанина, 3-остатка 5-метилцитозина, 5 остатков тимина и до 2 метилированных рибоз. В цепи 16 S РНК *E. coli* имеется, по-видимому, 2 остатка псевдоуридина и около 20 метильных групп, включая 2—3 остатка 6-диметиладенина, около 5 остатков 2-метилгуанина, 3 остатка 5-метилцитозина, 1 остаток тимина (Dubin, Günalp, 1967; Fellner, Sanger, 1968). На всю РНК 70 S рибосомы *E. coli* приходится около 16 остатков тиоурацила (Cotter, Gratzel, 1970). Появление метилированных и тиолированных нуклеозидов и псевдоуридина на характерных местах в цепях рибосомальной РНК обусловлено, как и в случае тРНК, действием соответствующих метилирующих и модифицирующих ферментов на уже синтезированные полинуклеотидные цепи. Эта модификация рибосомальной РНК происходит до или в процессе сборки рибосомных частиц в клетке.

4. Нуклеотидная последовательность

Высокомолекулярные рибосомальные РНК. Полная нуклеотидная последовательность ни одной из высокомолекулярных рибосомальных РНК пока не известна. Однако какая-то небольшая информация о некоторых общих харак-

терных чертах последовательности высокомолекулярных рибосомальных РНК имеется.

Прежде всего данные по сравнению полных рибонуклеазных гидролизатов 23 S и 16 S компонентов рибосомальной РНК бактерий показывают, что они содержат разные относительные количества различных олигонуклеотидов и даже качественно различные олигонуклеотиды; следовательно, нуклеотидные последовательности двух высокомолекулярных рибосомальных РНК — 23 S и 16 S — определенно различны (Aronson, 1962, 1963; Sanger et al., 1965; Fellner, Sanger, 1968), несмотря на очень близкий, почти идентичный нуклеотидный состав. Тот же вывод можно сделать из анализа рибонуклеазных гидролизатов рибосомальных РНК животных клеток (Amaldi, Attardi, 1968). Прямыми определениями показано, что рибосомальные 23 S и 16 S РНК бактерий имеют разные 5'-концевые последовательности (Takanami, 1967; Sugiyama, Takanami, 1967). Вывод о различии нуклеотидной последовательности двух высокомолекулярных рибосомальных РНК можно сделать также из данных по отсутствию конкуренции между ними при гибридизации с ДНК, что указывает на отсутствие большой гомологии в их нуклеотидных последовательностях (Yankofsky, Spiegelman, 1963; Oishi, Sueoka, 1965; Brown, Weber, 1968). Однако, возможно, какая-то гомология имеется, так как в литературе опубликованы и противоположные данные об известной частичной конкуренции между 23 S и 16 S РНК *E. coli* или между 28 S и 18 S РНК животных клеток при гибридизации с ДНК (Attardi et al., 1965 a, b).

Очень интересно, что в пределах таксономических групп, объединяющих более или менее родственные виды, выявляется далеко идущая гомология в нуклеотидных последовательностях между рибосомальными РНК. Так, согласно данным по гибридизации рибосомальных РНК с ДНК, гомология наблюдается между рибосомальными РНК всех позвоночных животных (Attardi et al., 1965 b), между рибосомальными РНК различных видов рода *Bacillus* (Dubnau et al., 1965; Doi, Igarashi, 1965, 1966) и даже между рибосомальными РНК столь различных родов, как *Escherichia*, *Serratia* и *Azotobacter* (Attardi et al., 1965 b; Nomura et al., 1968). Более того, определенная ограниченная гомология в нуклеотидной последовательности наблюдается даже между рибосомальными РНК очень далеко отстоящих видов бактерий — например, *Escherichia*, *Bacillus* и *Micrococcus lysodeikticus* (Attardi et al., 1965 b; Nomura et al., 1968). Гомология в нуклеотидной последовательности может выявляться, несмотря на некоторые различия в нуклеотидном составе рибосомальных РНК. Отсю-

да делается вывод о значительной консервации по крайней мере определенных участков рибосомальных РНК в эволюции.

Косвенные данные свидетельствуют, что высокомолекулярные рибосомальные РНК характеризуются определенными специфическими чертами их нуклеотидной последовательности, отличающими их от всех прочих РНК — вирусных, информационных, адапторных.

Во-первых, рибосомальные РНК различного происхождения легко образуют комплексы с участками денатурированной ДНК, богатыми Ц; это комплексообразование идет за счет комплементарного взаимодействия богатых Ц участков ДНК с участками рибосомальной РНК, богатыми Г (Орага-Kubinska et al., 1964). В комплексообразовании такого типа участвует как 23 S компонент, так и 16 S компонент (последний несколько более эффективно). Таким образом, рибосомальные РНК, в отличие от прочих РНК, обнаруживают значительную долю (от 5 до 20%) Г-богатых участков в полинуклеотидной цепи. Из сопоставления с данными по анализу олигонуклеотидов рибонуклеазного гидролизата (Sanger et al., 1965) следует думать, однако, что эти участки ни в коем случае не являются непрерывными полиГ блоками, а включают в себя значительные количества А и У (и очень мало Ц). Но во всяком случае, в этих участках, комплементарно взаимодействующих с Ц-богатыми участками ДНК, пуриновые нуклеотиды сильно преобладают, составляя $\frac{2}{3}$ от всех нуклеотидов (Орага-Kubinska et al., 1964).

Во-вторых, в отличие от прочих РНК, различные рибосомальные РНК обнаруживают гистерезис при их спектрофотометрическом титровании в районе pH 3—7 в растворе, что не может не указывать на определенную специфику их нуклеотидной последовательности (Сох, 1966). Скорее всего, этот гистерезис означает перестройку вторичной структуры РНК при подкислении раствора — переход от классического комплементарного спаривания А — У и Г — Ц к образованию коротких спиралей с типом спаривания А — А (Сох, 1962, 1966). В таком случае эти данные свидетельствуют о наличии в полинуклеотидных цепях рибосомальных РНК известной доли особых участков, богатых А.

Наконец, в-третьих, следует вспомнить данные по нуклеотидному составу рибосомальных РНК: пурины всегда преобладают над пиримидинами — $G + A > C + U$ — и вместе с тем соблюдается правило Чаргаффа — $G + U \simeq A + C$. Структурный смысл правила Чаргаффа, к сожалению, однако, до сих пор не вскрыт, и в настоящее время про него почти забыли. Между тем правило характерно именно для рибосомальной

РНК, и, очевидно, оно и обуславливает то, что состав тотальной РНК всюду более или менее соответствует этому правилу. Правило Чаргаффа автоматически выводится, если допустить, что в рибосомальной РНК более или менее строго выполняется правило комплементарности — $G = C$ и $A = U$, но еще в дополнение имеется *некомплементарный избыток пуриновых нуклеотидов*. Может быть, в этом и состоит структурный смысл правила Чаргаффа для РНК. Тогда снова напрашивается предположение о существовании в рибосомальных РНК специфических участков цепи, богатых пуриновыми нуклеотидами.

Низкомолекулярная рибосомальная РНК. В отличие от высокомолекулярных РНК, для 5 S рибосомальной РНК *E. coli* известна ее полная нуклеотидная последовательность (Brownlee, Sanger, 1967; Brownlee et al., 1967). Цепь 5 S РНК *E. coli* построена, как уже отмечалось, из 120 нуклеотидных остатков. 5'-концевым остатком цепи является 5'-фосфорилированный уридилый остаток (фУ), а 3'-концевым — также уридилый остаток со свободным 3'-гидроксильной группой (U_{OH}); 3'-концевая тринуклеотидная последовательность в целом выглядит как ЦАУ $_{OH}$; таким образом, концы 5 S РНК очень специфичны и отличаются от концов тРНК (фГ и ЦЦА $_{OH}$). В средних участках нуклеотидной последовательности 5 S РНК также трудно найти какую-либо гомологию с нуклеотидными последовательностями тРНК.

Важно, что цепи 5 S РНК *E. coli* вовсе не обнаруживают большого разнообразия по нуклеотидной последовательности: в изученном штамме *E. coli* (MRE 600) существует, по-видимому, всего два основных вида цепей 5 S РНК, различающихся лишь по 13-му нуклеотидному остатку (у большинства цепей — Г, тогда как часть цепей имеет У в положении 13). В остальном цепи 5 S РНК у *E. coli* имеют идентичную нуклеотидную последовательность.

Полная нуклеотидная последовательность 5 S рибосомальной РНК *E. coli* представлена ниже:

фУГЦЦУГГЦГГЦЦ U УАГЦГЦГГУГГУЦЦАЦЦУГАЦЦЦАУГЦЦГА-
АЦУЦАГААГУГАААЦГЦГУАГЦГЦЦГАУГГУАГУУГГГУЦЦУ-
ЦЦАУГЦГАГАГУАГГГААЦУГЦЦАГГЦАУ $_{OH}$.

5 S РНК млекопитающих и человека (Forget, Weissman, 1967; Williamson, Brownlee, 1969) также состоит из 120 нуклеотидных остатков, но на 5'-конце имеет 5'-фосфорилированный гуаниловый остаток (фГ), а на 3'-конце — ЦУУ $_{OH}$.

Ее полная нуклеотидная последовательность следующая (Forget, Weissman, 1967):

фГУЦУАЦГГЦЦАУАЦЦАЦЦУГААЦГЦГЦЦГАУЦУ-
ЦГУЦУГАУЦУЦГААГЦУААГЦАГГГУЦГГГЦЦУГГУУАГУ-
АЦУУГГАУГГГАГАЦЦГЦЦУГГГАУАЦГГГУГЦУГААГЦУУ_{ОН}.

5. Вторичная структура в растворе

Известно, что изолированные рибосомальные РНК в растворах при невысоких температурах, не слишком малых ионных силах и при значениях pH, не очень отличающихся от нейтральных, обладают: а) значительным гипохромизмом в районе собственного поглощения в ультрафиолете (т. е. поглощение РНК в ультрафиолете ниже суммы поглощений составляющих ее нуклеотидов), б) оптической активностью, значительно превышающей оптическую активность составляющих их нуклеотидов, и в) большой компактностью молекулы, выявляемой гидродинамическими методами (седиментация, вязкость). При нагревании растворов, уменьшении ионной силы ниже критического уровня или при титровании в кислую или щелочную сторону гипохромизм, оптическая активность и гидродинамическая компактность скачкообразно падают, обнаруживая черты перехода типа «порядок — беспорядок». Переход полностью обратим и имеет чисто конформационную природу. Анализ всех перечисленных данных и их сопоставление со свойствами ДНК привели к выводу о наличии конформационной упорядоченности в молекулах РНК в растворе и о том, что конкретной формой этой упорядоченности, по крайней мере в значительной части, является вторичная структура в виде двойных спиралей, поддерживаемых комплементарными взаимодействиями между азотистыми основаниями (см. обзоры Spirin, 1960; Спирин, 1963).

В то же время экспериментально выявляемые свойства вторичной структуры РНК обнаруживают резкие отличия от таковых ДНК. Если ДНК представляет собой непрерывную совершенную двойную спираль, придающую жесткость молекуле по всей ее длине, то для РНК, как показывают ее гидродинамические свойства, исключена возможность существования в виде такой единой жесткой спирали. Далее, молекула РНК обнаруживается как одна непрерывная полинуклеотидная цепь, а это значит, что любая существующая в РНК вторичная структура должна возникать только за счет взаимодействия между звеньями одной и той же цепи (тогда как моле-

кула ДНК построена из двух цепей, расхождения которых можно добиться путем ее денатурации). Следовательно, спирализация цепи РНК, в отличие от ДНК, создается за счет внутрицепного взаимодействия оснований. Следующее отличие заключается в наблюдаемом факте полной и практически мгновенной обратимости процесса разрушения («плавления») спиралей в молекулах РНК, тогда как для ДНК этот процесс (денатурация) частично обратим лишь при специальных условиях медленного охлаждения (ренатурация). Наконец, важнейшее отличие, наблюдаемое во всех опытах по «плавлению» спиральных структур РНК,— это отсутствие резкого узкотемпературного перехода, являющегося характерной чертой структурного перехода молекул ДНК. Резкость перехода означает кооперативный процесс разрушения единой правильной (регулярной) структуры. В случае РНК переход происходит в несравненно более широком температурном интервале, чем это требуется для «плавления» единой спирали типа ДНК, и скорее отражает поочередное самостоятельное «плавление» отдельных многочисленных коротких спиралей.

Все эти экспериментальные данные привели к заключению, что спирализация в молекулах РНК носит не полный, как в ДНК, а частичный характер, и что вторичная структура РНК в растворе представляет собой, по всей вероятности, набор относительно коротких двойных спиралей, возникающих за счет попарного комплементарного взаимодействия между участками одной и той же цепи (Doty et al., 1959; Спирин и др., 1959; Fresco et al., 1960; Spirin, 1960; Спирин, 1961; Богданова и др., 1962).

Принципиально спаривание двух полинуклеотидных участков с образованием двойной спирали может достигаться при участии самых различных пар противоположащих оснований. Однако в свое время еще Доти с сотрудниками (Doty et al., 1959; Fresco et al., 1960) привели различные доказательства того, что реально в молекулах РНК единственным (или во всяком случае значительно преобладающим) типом спаривания оснований является взаимодействие аденина с урацилом и гуанина с цитозином (А — — У пары и Г — — Ц пары). Поскольку спиральные участки в молекулах РНК возникают за счет изгибания цепи и ее секций «на себя», то в каждом данном спиральном участке направления тяжей будут антипараллельны (Doty et al., 1959; Fresco et al., 1960). Следовательно, отдельные спиральные участки в РНК носят, по-видимому, ДНК-подобный характер с А — — У и Г — — Ц парами и антипараллельностью тяжей. Рентгеноструктурные исследования подтвердили наличие в рибосомальных РНК двутяжных ДНК-подобных

спиралей с преобладающим, если не единственным, типом спаривания А — У и Г — Ц (Zubay, Wilkins, 1960; Klug et al., 1961; Spencer et al., 1962; Spencer, Poole, 1965). В обстоятельном спектрофотометрическом исследовании рибосомальных РНК в процессе кислотно-основного и температурного «плавления» их вторичной структуры Кокс (Cox, 1966) получил еще более убедительные данные, что вторичная структура рибосомальной РНК при нейтральных рН обусловлена *главным образом, если не исключительно, А — У и Г — Ц парами*. Наконец, Томас (Thomas, 1969) показал, что инфракрасный спектр РНК в районе $1550\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ есть сумма вкладов лишь от А — У и Г — Ц пар и четырех неспаренных нуклеотидов.

Количественное определение размера спиральности в молекулах рибосомальной РНК в растворе (т. е. определение того, какая доля от всех нуклеотидов цепи РНК организована в спиральные участки), сделанное на основании спектрофотометрических данных, дает 70% при рН 7, ионной силе порядка 0,1 и температуре до 25°C (Cox, 1966). Наиболее надежное определение степени спиральности было сделано недавно путем изучения инфракрасных спектров рибосомальной РНК в растворе (Cotter, Gratzner, 1969 a; Thomas, 1969); опять-таки, при ионной силе около 0,1 в составе А — У и Г — Ц пар оказалось около 60—65% всех нуклеотидов при 30° и, соответственно, несколько выше при более низких температурах. Следовательно, около $\frac{2}{3}$ нуклеотидов организовано в спиральные участки, в то время как $\frac{1}{3}$ нуклеотидных остатков входит, очевидно, в однотяжные «аморфные» участки рибосомальной РНК.

Анализ изменений спектров ультрафиолетового поглощения высокомолекулярных рибосомальных РНК в процессе кислотно-щелочного титрования и в процессе теплового «плавления» спиралей показывает, что если спиральные участки характеризуются равными соотношениями пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (Пу = Пп, Г = Ц и А = У, как и следует ожидать исходя из Уотсон — Криковского спаривания), то в «аморфных» (неспирализованных) участках наблюдается значительная концентрация пуриновых нуклеотидов (Cox, 1966). Сильное преобладание пуриновых нуклеотидов над пиримидиновыми в «аморфных» (неспаренных) участках рибосомальной РНК *E. coli* было подтверждено в исследовании инфракрасных спектров РНК (Cotter, Gratzner, 1969 a). У бактериальной РНК преобладание пуринов над пиримидинами в «аморфных» участках заметно больше (Пу/Пп $\simeq 2\text{--}2,5$), чем у животной РНК (Пу/Пп $\simeq 1,6$). Все это, как видно, согласуется с представленной выше интерпре-

тацией правила Элсона — Чаргаффа и соответствующим предположением о наличии специальных, богатых пуринами последовательностей в рибосомальных РНК. Вероятно, что эти, специальные, богатые пуринами участки существуют вне спиралей, т. е. образуют, по-видимому, связующие однотяжные перемычки между спиральными участками при формировании вторичной структуры рибосомальной РНК в растворах (Сох, 1966).

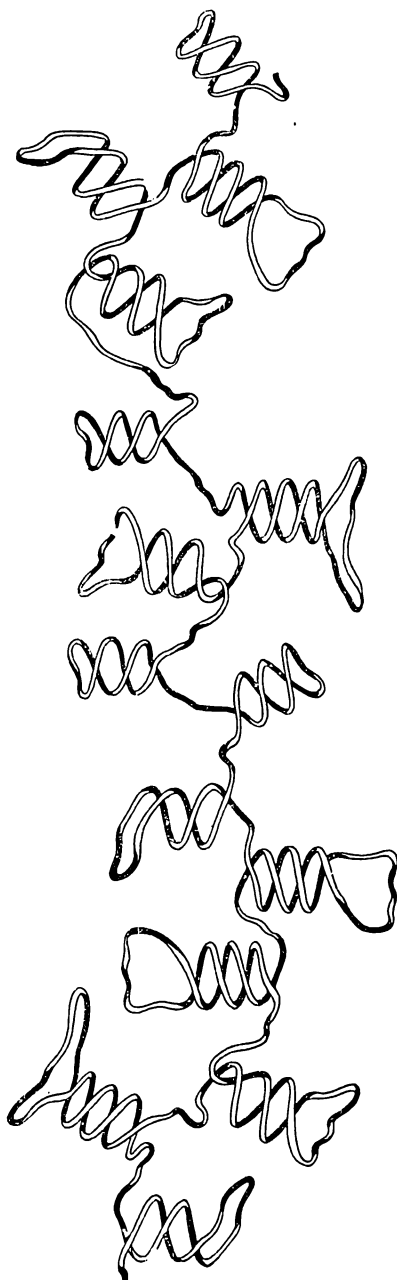
Что касается вопроса о размере (длине) самих спиральных участков, заключенных в РНК, то еще из работы Доти с сотрудниками (Doty et al., 1959) следовало, что спиральные участки во всяком случае не могут быть очень длинными. По этим данным, особенно по результатам оценки ширины температурного перехода и средней температуры плавления спиралей, вторичная структура РНК представляет собой, по-видимому, набор довольно разнообразных коротких спиральных районов, распределенных по всей частице РНК. Более подробный анализ этого вопроса был предпринят Фреско и др. (Fresco et al., 1960), которые показали, что минимальный размер спиралей, существующих в РНК, составляет, по-видимому, 4—6 пар нуклеотидов (около половины полного витка двойной спирали), но основная часть спиралей длиннее, и в среднем размер спиралей может составлять около одного полного витка (10 пар нуклеотидов). Этот вывод был подтвержден специально для рибосомальных РНК Коксом (Сох, 1966), показавшим, что число пар нуклеотидов, составляющих спиральный участок, невелико и лежит в основном между 4 и 17.

Итак, полинуклеотидная цепь высокомолекулярной рибосомальной РНК в растворе формирует многочисленные *короткие* двуспиральные участки за счет попарного взаимодействия секций данной цепи с *антипараллельным* направлением взаимодействующих секций. Ряд общих соображений и косвенных экспериментальных данных заставляет полагать, что короткие спиральные районы с антипараллельным направлением тяжей могут и должны возникать в РНК в основном за счет попарного взаимодействия *смежных* (соседних) секций полирибонуклеотидной цепи (Fresco et al., 1960; Spirin, 1960; Богданова и др., 1962). Схема фрагмента такой структуры дана на рис. 12.

Существование многочисленных коротких спиральных участков, образованных за счет *смежных* секций цепи, автоматически предполагает, что спиральные участки в целом представляют собой набор «шпилек», торчащих от *последовательно связывающего* их остова полинуклеотидной цепи (рис. 12). По-видимому, при невысоких ионных силах (0,1 —

0,01), когда еще может быть достаточно выражено электростатическое отталкивание между фосфатами, спиральные участки должны иметь тенденцию к взаимному отталкиванию, и тем самым вся молекула должна стремиться вытянуться в направлении, перпендикулярном осям спиралей; так может возникнуть тяжёлая или палочкообразная структура высокомолекулярной РНК в растворе. Таким образом, эта структура будет поддерживаться только силами электростатического отталкивания, растягивающими частицу в длину, при наличии ковалентного остова, последовательно связывающего друг с другом отдельные спиральные участки. Если признать также значительную роль за комплексно-металлическими мостиками и неспецифическими водородными связями в макромолекуле РНК, то возникает возможность некоторого связывания между самими параллельно расположенными соседними спиральными участками. (Не исключено, что при параллельной укладке спиральных участков в макромолекуле РНК могут возникать даже зоны их кристаллической упаковки).

Таким образом, суммируя приведенные соображения в от-



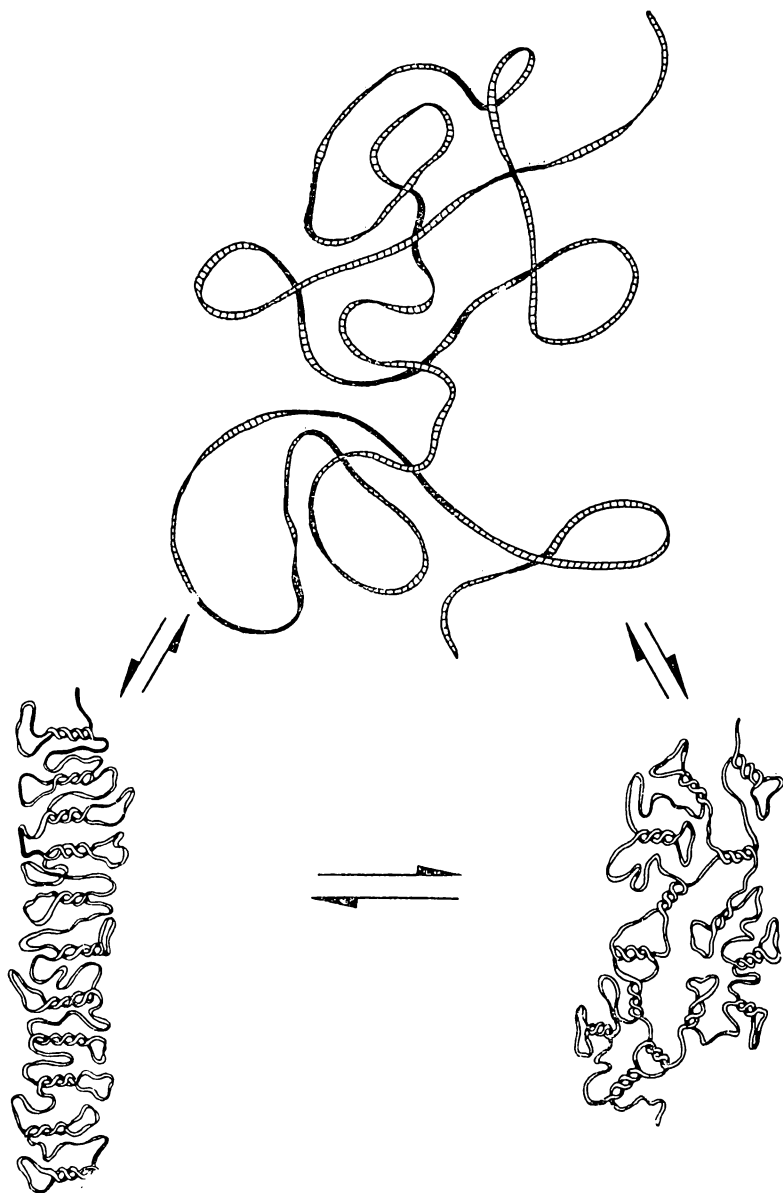
Р и с. 12.

Схема вторичной структуры изолированной рибосомальной РНК в растворе (фрагмент молекулы)

ношении принципов взаиморасположения спиралей в высокополимерных РНК в растворах при комнатной температуре и умеренных ионных силах, можно сказать, что короткие «шпилькообразные» двуспиральные участки в молекуле РНК должны иметь тенденцию располагаться преимущественно перпендикулярно длинной оси всей молекулы, чередуясь с неспирализованными однотяжными участками. «Стопкообразное» расположение этих спиральных и чередующихся с ними беспорядочных участков формирует палочкообразную или тяжеобразную частицу.

Независимые экспериментальные подтверждения *палочкообразной*, или *тяжеобразной*, формы молекул высокомолекулярных рибосомальных РНК в растворе при умеренных ионных силах получены методами светорассеяния (Timasheff et al., 1958; Kropman et al., 1960) и главным образом электронной микроскопии (Kisselev et al., 1961; Богданова и др., 1962). Диаметр палочек, или тяжей, был оценен равным около 30 Å, что хорошо соответствует средней *длине* спирального участка размером около одного витка. Наблюдаемые в электронный микроскоп общие размеры «палочек» согласуются с предложенной моделью палочкообразной структуры высокомолекулярной РНК в растворе.

В целом при рассмотрении вторичной (и третичной) структуры рибосомальной РНК в растворе следует помнить, что это не есть стабильная структура, предсуществующая в рибосоме и сохраняющаяся в ходе депротенинизации. Целый ряд приемов депротенинизации (например, «горячая» депротенинизация с фенолом) *заведомо* «плавают» всю или почти всю вторичную структуру в ходе обработки. И тем не менее в растворах с умеренной ионной силой высокомолекулярная рибосомальная РНК, полученная любым способом, обладает вторичной структурой, по-видимому, со всеми теми характерными для рибосомальной РНК чертами, которые были здесь описаны. Следовательно, при описании вторичной структуры РНК ее нельзя рассматривать как некую изначально данную, фиксированную, нативную структуру. Наоборот, эта структура является типично равновесной обратимой структурой. В конкретных условиях раствора цепь РНК спонтанно приобретает данную конформацию, которая в этих условиях является результатом равновесия различных молекулярных сил и соответствует минимуму свободной энергии. Можно думать, что РНК приобретает свою наиболее стабильную конформацию как результат латеральной подвижности, которая позволяет прозондировать и найти наиболее выгодные из конкурирующих конформаций. Полная и практически мгновенная обратимость



Р и с. 13.

Схема конформаций и конформационных переходов макромолекул высокополимерной РНК в растворе в зависимости от ионной силы, температуры и рН («клубок—палочка—развернутая нить») (Spirin, 1960; Спирин, 1963)

всех изменений вторичной структуры и общей конформации, включая восстановление всех прежних характеристик — степени спиральности, размеров и формы частиц, — после полного «плавления» спиралей и термального разворачивания цепи (Богданова и др., 1962) находится в полном согласии с этими представлениями. По-видимому, каждая молекула РНК в данных условиях раствора будет спонтанно принимать свой собственный конкретный «рисунок» вторичной структуры, уникальность которого будет продиктована специфической нуклеотидной последовательностью РНК.

При сильном отклонении условий раствора от описываемых (невысокая температура, нейтральные pH, умеренные ионные силы) конформация молекул рибосомальных РНК, как и всех прочих РНК в растворе, претерпевает обратимые конформационные превращения (см. обзоры Spirin, 1960; Спирин, 1963). В соответствии с этим в зависимости от условий ионной силы, температуры и других факторов макромолекулы РНК могут существовать в различных конформациях. При умеренной ионной силе и комнатной температуре они представляют собой *компактные палочки* или *тяжи*, составленные из коротких спиральных участков, чередующихся с беспорядочными. При повышении ионной силы они становятся менее асимметричными и переходят в состояние, более напоминающее *компактные клубки*. При повышении температуры растворов или при переводе в обессоленные растворы, а также при подкислении, подщелачивании или под действием формамида, диметилсульфоксида и т. п. макромолекулы переходят в состояние более или менее *распрявленных нитей* или *рыхлых беспорядочных клубков*. Все эти крайние конформации связаны друг с другом обратимыми переходами. Указанные представления схематически даны на рис. 13.

6. Вторичная структура в составе рибосомы

Важнейшим вопросом при изучении структуры РНК в выделенном свободном состоянии в растворе является вопрос о том, какое отношение обнаруживаемая структура имеет к биологическим функциям молекул и к той нативной структуре, которой эта РНК обладает в функционирующих живых системах. Для рибосомальной РНК вопрос особенно сложен, так как в клетке она вообще никогда не предоставлена самой себе, а всегда определенным образом организована с белком в специфические рибонуклеопротеидные частицы. Главный вопрос для рибосомальной РНК состоит в том, какую структу-

ру имеет высокополимерная РНК в самой рибосомной частице и в какой мере обсуждавшиеся принципы и черты молекулярной организации свободной РНК в растворе действительны для РНК в составе самих рибосом.

Имеющиеся в настоящее время данные указывают на то, что общий характер спиральных участков и степень спиральности рибосомальных РНК примерно одинаковы у свободной РНК и РНК в составе рибосом.

В первую очередь, это данные по изучению УФ гипохромизма рибосом, а точнее — РНК внутри рибосом. Первые опыты были проведены Холлом и Доти (Hall, Doty, 1959), которые показали, что РНК внутри рибосом гипохромична, т. е., возможно, содержит спиральные участки, поддерживаемые комплементарными взаимодействиями, и что при нагревании растворов рибосом эти спиральные участки «плавятся» подобным же образом, как и в свободных РНК. В 1960 г. целый ряд авторов (Zubay, Wilkins, 1960; Schlessinger, 1960; Bonhoeffer, Schachman, 1960) попытались количественно сопоставить гипохромизм РНК внутри рибосом и у изолированной РНК. Оказалось, что размер гипохромизма у РНК внутри рибосом тождествен с таковым у свободной РНК в растворе при высокой ионной силе. Эти опыты указывали на то, что количество спиральных участков и доля спирализованных нуклеотидов примерно совпадают у свободной РНК в скрученном состоянии и у РНК внутри рибосом. Можно сделать вывод, что данные по вторичной структуре РНК в растворе в той или иной мере действительны и для РНК внутри рибосом, и что в рибосомах размер спирализации и основные моменты вторичной структуры РНК, обнаруживаемой в свободном виде, не возмущены и не нарушены взаимодействием ее с рибосомальным белком.

Другая группа данных — это рентгеноструктурные исследования рибосом (Zubay, Wilkins, 1960; Klug et al., 1961). В этих исследованиях было показано, что дифракционная картина самих рибосом почти не отличается от картины, получаемой наложением рентгенограммы изолированной РНК на рентгенограмму свободного рибосомального белка. Анализ рентгенограмм рибосом показал, что РНК в рибосомах характеризуется, по-видимому, спиральными участками того же характера и строения, что и свободная РНК в растворе; эти участки имеют двутяжную (двуспиральную) природу, их цепи антипараллельны и основной тип спаривания оснований в них — А — У и Г — Ц пары.

Третья группа данных касается изучения дисперсии оптического вращения рибосом по сравнению с изолированной

рибосомальной РНК в растворе (Blake, Peacocke, 1965; McPhie, Gratzner, 1966; Sarkar et al., 1967). Известно, что РНК в области собственного поглощения в ультрафиолете обнаруживает очень характерный и *очень чувствительный к конформационным изменениям* (изменениям вторичной структуры) эффект Коттона с пиком в области 280 мкм и провалом в области 250 мкм. Оказалось, что рибосомы дают качественно и количественно точно такой же эффект Коттона в этой области, как и выделенная из них РНК. В целом профиль дисперсии оптического вращения рибосом во всем районе от 220 до 350 мкм идентичен, по-видимому, простой сумме профилей оптического вращения свободной рибосомальной РНК и рибосомального белка. Указанные наблюдения сделаны на бактериальных, дрожжевых и животных рибосомах. Следовательно, даже такой тонкий и чувствительный метод, как измерение дисперсии оптического вращения, ни в одном случае не выявляет каких-либо отличий вторичной структуры рибосомальной РНК в составе рибосом и в изолированном виде при умеренных ионных силах.

Наконец, убедительные данные были получены из изучения инфракрасных спектров рибосом (Cotter, Gratzner, 1969 b). А — — У и Г — — Ц пары в РНК могут быть выявлены по характерным пикам в районе 1550—1700 см⁻¹. Спектр рибосом выявляет именно этот тип спаривания как единственный, и доля спаренных нуклеотидов может быть оценена как 60% от всех нуклеотидов — практически то же, что в свободной РНК. Инфракрасный спектр рибосомы является простой суммой вкладов от белка и РНК с 60% спирализации.

Таким образом, различные методические подходы к изучению внутренней структуры рибосом приводят к одному выводу: вторичная структура РНК внутри РНП-частиц (рибосом) сходна с вторичной структурой, которую мы изучаем у свободной высокополимерной РНК в растворах с умеренной солевой концентрацией, и приведенные выше заключения о ее характере сохраняют, по-видимому, свою силу для описания структуры РНК в нативных функционирующих структурах¹.

¹ В литературе имеется указание и противоположного рода. Фурано, Бредли и Чайлдерс (Furano et al., 1966) изучали изменение спектра поглощения акридиноранжа при связывании его с рибосомами (с РНК рибосом) и с изолированной рибосомальной РНК. Они нашли, что около 90% фосфатов РНК в рибосомах свободно для быстрого связывания красителя. Изменение спектра поглощения акридиноранжа при его титровании рибосомами отличалось от изменения спектра при титровании красителя изолированной рибосомальной РНК; это различие укладывалось в представление об очень малом содержании двойных спиралей у РНК в соста-

7. Резюме

Итак, в каждую рибосомную субчастицу входит одна молекула высокомолекулярной рибосомальной РНК: в большую субчастицу (50 S или 60 S) входит молекула 23 S — 28 S РНК с молекулярным весом $1,1\text{—}1,7 \times 10^6$, а в малую субчастицу (30 S или 40 S) — молекула 16 S — 18 S РНК с молекулярным весом $0,55\text{—}0,7 \times 10^6$. Кроме того, в большую субчастицу входит одна молекула сравнительно низкомолекулярной 5 S РНК с молекулярным весом около 40 000 (120 нуклеотидов). Высокомолекулярная РНК каждой рибосомной субчастицы есть одна ковалентно-непрерывная полинуклеотидная цепь.

Характерными чертами первичной структуры обеих высокомолекулярных рибосомальных РНК являются следующие: 1) наличие некоторого количества метилированных нуклеотидов, а также псевдоуридина; 2) несоблюдение равенств $\Gamma = \text{Ц}$ и $\text{А} = \text{У}$; 3) приблизительное равенство количества 6-кетогрупп и количества 6-аминогрупп, т. е. $\Gamma + \text{У} \simeq \text{А} + \text{Ц}$ (правило Элсона — Чаргаффа); 4) большее или меньшее преобладание пуриновых нуклеотидов над пиримидиновыми в целом, т. е. $\Gamma + \text{А} > \text{Ц} + \text{У}$; 5) наличие особых участков (нуклеотидных последовательностей), богатых пуриновыми нуклеотидами. Две высокомолекулярные рибосомальные РНК имеют разную нуклеотидную последовательность.

Цепь высокомолекулярной рибосомальной РНК, будь она в составе рибосомной субчастицы или в изолированном виде в растворе при достаточной ионной силе, образует вторичную

ве рибосом — в противоположность изолированным РНК. Однако в рассматриваемой работе не было надлежащих контрольных опытов, которые бы показали, что сами рибосомы не деградируют и не изменяются при связывании красителя. В исследовании Пермогорова и Сладковой (Пермогоров, Сладкова, 1968) указанная работа была подвергнута всесторонней проверке. С этой целью было проведено параллельное изучение изменений спектров поглощения акридиноранжа, изменений дисперсии оптической активности в полосе поглощения акридиноранжа и изменений седиментационных свойств рибосом при титровании акридиноранжа рибосомами. Результаты проверки показали, что при малых отношениях рибосома/краситель (при избытке красителя) рибосомы разрушаются и количество фосфатов, доступных красителю, становится значительно больше, чем в интактных рибосомах, достигая 90%. В ненарушенных же рибосомах количество фосфатов, доступных красителю, составляет всего около 20% от числа доступных фосфатных групп в изолированной рибосомальной РНК. Очевидно, таким образом, что интерпретация данных спектрофотометрического титрования в работе Фурано и др. является ошибочной и не может служить каким-либо основанием для суждения о вторичной структуре РНК в рибосомах.

структуру. Основными чертами вторичной структуры высокомолекулярной РНК являются следующие. 1) Вторичная структура РНК представляет собой главным образом двойные спирали, образующиеся за счет комплементарного спаривания между участками одной и той же цепи. 2) В каждой рибосомальной РНК образуется не одна длинная совершенная двойная спираль, а большой набор многочисленных, относительно коротких двуспиральных участков; длина спиралей не превышает, по-видимому, двух полных витков (20 пар нуклеотидов, около 70 Å), а в среднем может составлять около одного полного витка (10 пар нуклеотидов, 30—40 Å). 3) Эти короткие двуспиральные участки образуются, скорее всего, преимущественно за счет спаривания *смежных* секций полинуклеотидной цепи; в результате спаренные секции имеют антипараллельное направление в спирали («шпилькообразная» структура). 4) Основным, если не исключительным, типом взаимодействий между противоположными секциями в спиралах является Уотсон—Криковское спаривание, т. е. Г—Ц и А—У пары. 5) Приблизительно $\frac{2}{3}$ нуклеотидов рибосомальных РНК участвуют в этом спаривании, а $\frac{1}{3}$ представляет «аморфные» (неспиральные) участки. 6) В «аморфных» (неспиральных) участках имеется преимущественная концентрация пуриновых нуклеотидов. Разными методами, чувствительными к вторичной структуре РНК, не было обнаружено различий между вторичной структурой РНК в составе рибосом и в изолированном состоянии в растворе при умеренной ионной силе.

Л и т е р а т у р а

- Антонов А. С., Белозерский А. Н. 1962. Докл. АН СССР, 142, 1184.
Богданова Е. С., Гаврилова Л. П., Дворкин Г. А., Киселев Н. А., Спирин А. С. 1962. Биохимия, 27, 387.
Ванюшин Б. Ф., Белозерский А. Н. 1959. Докл. АН СССР, 127, 455.
Ванюшин Б. Ф., Белозерский А. Н., Богданова Е. С. 1960. Докл. АН СССР, 134, 1222.
Гаврилова Л. П., Спирин А. С., Белозерский А. Н. 1959. Докл. АН СССР, 126, 1121.
Газарян К. Г., Шуппе Н. Г. 1966. Биохимия, 31, 687.
Газарян К. Г., Шуппе Н. Г. 1967. Докл. АН СССР, 176, 714.
Гумилевская Н. А., Сисакян Н. М. 1963. Докл. АН СССР, 149, 198.
Медников Б. М. 1965. Докл. АН СССР, 161, 721.
Медников Б. М., Антонов А. С., Белозерский А. Н. 1965. Докл. АН СССР, 165, 227.
Михайлова И. Ю., Богданов А. А. 1969. Докл. АН СССР, 184, 232.
Пермогоров В. И., Сладкова И. А. 1968. Молекулярная биология, 2, 276.
Спирин А. С. 1961. Биохимия, 26, 511.
Спирин А. С. 1963. Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот, М., Изд-во АН СССР.

- Спирин А. С., Белозерский А. Н., Шугаева Н. В., Ванюшин Б. Ф. 1957. Биохимия, 22, 744.
- Спирин А. С., Гаврилова Л. П., Бреслер С. Е., Мосевичкий М. И. 1959. Биохимия, 24, 938.
- Спирин А. С., Мильман Л. С. 1960. Докл. АН СССР, 134, 717.
- Урысон С. О., Белозерский А. Н. 1959. Докл. АН СССР, 125, 1144.
- Урысон С. О., Белозерский А. Н. 1960. Докл. АН СССР, 132, 708.
- Шакулов Р. С., Айтхожин М. А., Спирин А. С. 1962. Биохимия, 27, 744.
- Amaldi F., Attardi G. 1968. J. Mol. Biol., 33, 737.
- Applebaum S. W., Ebstein R. P., Wyatt G. R. 1966. J. Mol. Biol., 21, 29.
- Aronson A. I. 1962. J. Mol. Biol., 5, 453.
- Aronson A. I. 1963. Biochim. Biophys. Acta, 72, 176.
- Aronson A. I., McCarthy B. J. 1961. Biophys. J., 1, 215.
- Attardi G., Huang P. C., Kabat S. 1965a. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 53, 1490.
- Attardi G., Huang P. C., Kabat S. 1965b. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 54, 185.
- Belozersky A. N., Spirin A. S. 1958. Nature, 182, 111.
- Belozersky A. N., Spirin A. S. 1960. The Nucleic Acids, 3, 147. Acad. Press. New York.
- Blake A., Peacocke A. R. 1965. Nature, 208, 1319.
- Boedtker H., Möller W., Klemperer E. 1962. Nature, 194, 444.
- Bolton E. T., Britten R. J., Cowie D. B., McCarthy B. J., McQuillen K., Roberts R. B. 1959. Carnegie Inst. Wash. Year Book, 58, 259.
- Bonhoeffer F., Schachman H. K. 1960. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2, 366.
- Brown D. D., Gurdon J. B. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 51, 139.
- Brown D. D., Littna E. 1964. J. Mol. Biol., 8, 669.
- Brown D. D., Weber C. S. 1968. J. Mol. Biol., 34, 681.
- Brownlee G. G., Sanger F. 1967. J. Mol. Biol., 23, 337.
- Brownlee G. G., Sanger F., Barrell B. G. 1967. Nature, 215, 735.
- Chargaff E. 1963. Essays on Nucleic Acids. Elsevier Publ. Co., Amsterdam — London — New York.
- Cheng P. Y. 1959. Nature, 184, 190.
- Cheng P. Y. 1960. Biochim. Biophys. Acta, 37, 238.
- Click R. E., Hackett D. P. 1966. J. Mol. Biol., 17, 279.
- Click R. E., Tint B. L. 1967. J. Mol. Biol., 25, 111.
- Comb D. G., Katz S. 1964. J. Mol. Biol., 8, 790.
- Comb D. G., Sarkar N. 1967. J. Mol. Biol., 25, 317.
- Comb D. G., Sarkar N., DeVallet J., Pinzino C. J. 1965. J. Mol. Biol., 12, 509.
- Comb D. G., Zehavi-Willner T. 1967. J. Mol. Biol., 23, 441.
- Cotter R. I., Gratzer W. B. 1969a. Nature, 221, 154.
- Cotter R. I., Gratzer W. B. 1969b. European J. Biochem., 8, 352.
- Cotter R. I., Gratzer W. B. 1970. Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 766.
- Cox R. A. 1962. Colloque Internat. sur les Acides Ribonucléiques et Polyphosphates. Strasbourg, 6—12 juillet 1961, p. 135; CNRS, Paris.
- Cox R. A. 1966. Biochem. J., 98, 841.
- De Bellis R. H., Gluck N., Marks P. A. 1964. J. Clin. Invest., 43, 1329.
- Doi R. H., Igarashi R. T. 1965. J. Bacteriol., 90, 384.
- Doi R. H., Igarashi R. T. 1966. J. Bacteriol., 92, 88.
- Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M. 1959. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 45, 482.
- Dubin D. T., Brown R. E. 1967. Biochim. Biophys. Acta, 145, 538.
- Dubin D., Günalp A. 1967. Biochim. Biophys. Acta, 134, 106.
- Dubnau D., Smith I., Morell P., Marmur J. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 54, 491.

- Dure L. S., Epler J. L., Barnett E. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **58**, 1883.
 Ellem K. A. O. 1966. J. Mol. Biol., **20**, 283.
 Elson D., Chargaff E. 1954. Nature, **173**, 1037.
 Elson D., Chargaff E. 1955. Biochim. Biophys. Acta, **17**, 367.
 Fellner P., Sanger F. 1968. Nature, **219**, 236.
 Forget B. G., Weissman S. M. 1967. Science, **158**, 1695.
 Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P. 1960. Nature, **188**, 98.
 Furano A. V., Bradley D. F., Childers L. G. 1966. Biochemistry, **5**, 3044.
 Galibert F., Larsen C. J., Lelong J. C., Boiron M. 1966. Bull. soc. chim. biol., **48**, 21.
 Gierer A. 1958. Z. Naturforsch., **13b**, 788.
 Green M., Hall B. 1961. Biophys. J., **1**, 517.
 Hall B. D., Doty P. 1958. In «Microsomal Particles and Protein Synthesis», Pergamon Press, Oxford, p. 27.
 Hall B. D., Doty P. 1959. J. Mol. Biol., **1**, 111.
 Hamilton M. 1967. Biochim. Biophys. Acta, **134**, 473.
 Haselkorn R. 1962. J. Mol. Biol., **4**, 357.
 Hayashi Y., Osawa S., Miura K. 1966. Biochim. Biophys. Acta, **129**, 519.
 Helmkamp G. K., Ts'o P.O.P. 1961. J. Amer. Chem. Soc., **83**, 138.
 Henshaw E. C. 1964. J. Mol. Biol., **9**, 610.
 Hirsch C. A. 1966. Biochim. Biophys. Acta, **123**, 246.
 Hunt J. A. 1970. Nature, **226**, 949.
 Kisselev N. A., Gavrilova L. P., Spirin A. S. 1961. J. Mol. Biol., **3**, 778.
 Klug A., Holmes K. C., Finch J. T. 1961. J. Mol. Biol., **3**, 87.
 Kronman M. J., Timasheff S. N., Colter J. S., Brown R. A. 1960. Biochim. Biophys. Acta, **40**, 410.
 Küntzel H., Noll H. 1967. Nature, **215**, 1340.
 Kurland C. G. 1960. J. Mol. Biol., **2**, 83.
 Lane B. G., Diemer J., Blashko C. A. 1963. Can. J. Biochem. Physiol., **41**, 1927.
 Lerner A. M., Bell E., Darnell J. E. 1963. Science, **141**, 1187.
 Littauer U. Z. 1961. In «Protein Biosynthesis», ed. R. J. C. Harris. New York, Acad. Press, 1961.
 Loening U. E. 1968. J. Mol. Biol., **38**, 355.
 Loening U. E., Ingle J. 1967. Nature, **215**, 363.
 McPhie P., Gratzner W. B. 1966. Biochemistry, **5**, 1310.
 Midgley J. E. M. 1962. Biochim. Biophys. Acta, **61**, 513.
 Midgley J. E. M. 1965a. Biochim. Biophys. Acta, **108**, 340.
 Midgley J. E. M. 1965b. Biochim. Biophys. Acta, **108**, 348.
 Möller W., Boedtker H. 1962. Colloque Internat. sur les Acides Ribonucléiques et Polyphosphates. Strasbourg, 6—12 juillet 1961, p. 99; CNRS, Paris.
 Montagnier L., Bellamy A. D. 1964. Biochim. Biophys. Acta, **80**, 157.
 Nomura M., Traub P., Bechmann H. 1968. Nature, **219**, 793.
 Oishi M., Sueoka N. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **54**, 483.
 Opara-Kubinska Z., Kubinski H., Szybalski W. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **52**, 923.
 Osawa S. 1960. Biochim. Biophys. Acta, **43**, 110.
 Petermann M. L., Pavlovic A. 1963. J. Biol. Chem., **238**, 3717.
 Petermann M. L., Pavlovic A. 1966. Biochim. Biophys. Acta, **114**, 264.
 Pollard C. J. 1964. Biochem. Biophys. Res. Commun., **17**, 171.
 Prestayko A. W., Fisher W. D. 1966. J. Cell. Biol., **31**, 88A.
 Rawson J. R., Stutz E. 1969. Biochim. Biophys. Acta, **190**, 368.
 Reisner A. H., Rowe J., Macindoe H. M. 1968. J. Mol. Biol., **32**, 587.
 Rifkin M. R., Wood D. D., Luck D. J. L. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **58**, 1025.

- Ritossa F. M., Atwood K. C., Spiegelman S. 1966. *Genetics*, 54, 663.
- Rogers P. J., Preston B. N., Titchener E. B., Linnane A. W. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 405.
- Rosset R., Monier R. 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, 68, 653.
- Rosset R., Monier R., Julien J. 1964. *Bull. soc. chim. biol.*, 46, 87.
- Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G. 1965. *J. Mol. Biol.*, 13, 373.
- Sarkar P. K., Yang J. T., Doty P. 1967. *Biopolymers*, 5, 1.
- Schleich T., Goldstein J. 1966. *J. Mol. Biol.*, 15, 136.
- Schlessinger D. 1960. *J. Mol. Biol.*, 2, 92.
- Scott N. S., Smillie R. M. 1969. *Currents Mod. Biol.*, 2, 339.
- Spahr P. F., Tissières A. 1959. *J. Mol. Biol.*, 1, 237.
- Spencer M., Fuller W., Wilkins M. H. F., Brown G. L. 1962. *Nature*, 194, 1014.
- Spencer M., Poole F. 1965. *J. Mol. Biol.*, 11, 314.
- Spirin A. S. 1960. *J. Mol. Biol.*, 2, 436.
- Spirin A. S. 1962. Colloque Internat. sur les Acides Ribonucléiques et les Polylphosphates. Strasbourg, 6—12 juillet 1961, p. 73; CNRS, Paris.
- Stanley W. M., Bock R. M. 1965. *Biochemistry*, 4, 1302.
- Stutz E., Noll H. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 774.
- Sugiura M., Takanami M. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 1595.
- Takanami M. 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 152.
- Takanami M. 1967. *J. Mol. Biol.*, 23, 135.
- Tashiro Y., Shimidzu H., Inouye A., Kakiuchi K. 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 43, 544.
- Taylor M. M., Glasgow J. E., Storck R. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 164.
- Thomas G. J. 1969. *Biopolymers*, 7, N 3, 325.
- Timasheff S. N., Brown R. A., Colter J. S., Davies M. 1958. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 662.
- Ts'o P. O. P., Helmkamp G. K. 1961. *Tetrahedron*, 13, 198.
- Ts'o P. O. P., Squires R. 1959. *Fed. Proc.*, 18, 341.
- Williamson R., Brownlee G. G. 1969. *FEBS Letters*, 3, 306.
- Wintersberger E. 1967. *Z. physiol. Chemie*, 348, 1701.
- Woese C. R. 1961. *Nature*, 189, 920.
- Yankofsky S. A., Spiegelman S. 1963. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 49, 538.
- Zehavi-Willner T., Comb D. G. 1966. *J. Mol. Biol.* 16, 250.
- Zimmerman E. F., Heeter M., Darnell J. E. 1963. *Virology*, 19, 400.
- Zubay G., Wilkins M. H. F. 1960. *J. Mol. Biol.*, 2, 105.

IV

Рибосомальные белки

1. Определение

Каждая рибосома в клетке или в выделенном состоянии содержит *много* белковых молекул. Однако степень связанности и сила удержания различных белков в рибосоме могут быть различны. Более того, некоторые рибосомальные белки даже, по-видимому, не связаны сколько-нибудь прочно и постоянно в рибосоме, но находятся в динамическом равновесии в экзогенном фонде свободных белков в растворе и, таким образом, легко обмениваются на аналогичные экзогенные белки и легко удаляются при промывке рибосом. С другой стороны, на рибосоме могут, по-видимому, сорбироваться белки, не имеющие прямого отношения к ее функционированию. Так как рибосомы приходится изучать в основном в изолированном состоянии, то очевидно, что применение различных методов выделения и, главное, очистки должно приводить к выделению препаратов с различным содержанием белка. Так это и есть на самом деле. Отсюда возникают большие трудности в определении, что считать истинно рибосомальными белками.

Мы будем считать истинно рибосомальными белками, или *структурными рибосомальными белками*, лишь те белки рибосом, которые не удаляются из частиц при тщательной очистке препаратов. Тщательная очистка означает промывку с помощью 0,5 — 1 М NH_4Cl или KCl в присутствии ионов Mg^{++} . Соответствующие препараты рибосом мы будем называть *тщательно очищенными рибосомами*. Термин «структурные белки» надо понимать при этом условно, в следующем смысле: каждый из этих белков, по-видимому, не имеет самостоятельного функционального значения, но в составе рибосом они участвуют в создании *структур*, обладающих как функциями специфического *связывания* других компонентов белок-синтезирующего аппарата, так и *каталитическими функциями*.

В состав *неочищенных рибосом*, выделенных обычными способами одно-двух-трехкратного осаждения в ультрацент-

рифуге в присутствии 0,005—0,02 М Mg^{++} , помимо указанных «структурных рибосомальных белков», могут входить лабильно связанные белки, также играющие определенную роль в структуре рибосомы, в ассоциации ее с другими компонентами белок-синтезирующей системы и в обеспечении некоторых каталитических функций (ГТФ-азных и пептидил-тРНК-эстеразных). В случае бактериальных рибосом сюда относятся факторы инициации F1, F2 и F3; трансферные факторы T и G (или TF-I и TF-II в случае животных рибосом), факторы терминации R₁ и R₂ и, возможно, некоторые другие белки (см. «Функционирование рибосомы», раздел I). Все они или по крайней мере их большая часть связаны с рибосомой не permanently, а лишь в момент выполнения функции, т. е. периодически образуют с рибосомой временные ассоциаты. Эти лабильно и временно связанные белки всегда есть в большем или меньшем количестве в клеточном соке в свободном виде. Поэтому, хотя тщательно очищенные рибосомы лишены их, и сами по себе, в присутствии мРНК и аминоацил-тРНК, не могут синтезировать белок, но при добавлении клеточного сока снова становятся полноценными биологически активными рибосомами. В клетке или в полноценной белок-синтезирующей бесклеточной системе указанные лабильно связанные белки в известном смысле находятся в динамическом равновесии с экзогенным фондом свободных белков. Эти белки можно обозначить как *условно рибосомальные белки*.

Кроме этих белков, препараты неочищенных рибосом могут содержать известные количества ферментов и других белковых компонентов, сорбированных рибосомами в процессе выделения и не имеющих прямого отношения ни к структуре, ни к функционированию рибосом. По-видимому, к таким *посторонним белкам* следует отнести, в частности, большинство ферментов, обнаруживаемых в связи с рибосомными частицами: дезоксирибонуклеазу, полинуклеотидфосфорилазу, АТФ-азу, фосфатазы, пептидазы, дегидрогеназы и т. п. (см. обзор Petermann, 1964).

Особого рассмотрения требует вопрос о рибонуклеазе. Рибонуклеазная активность характерна для большинства рибосомных препаратов и потому часто рибонуклеаза рассматривалась даже как обязательный, присущий рибосоме компонент (см. обзор Petermann, 1964). Эта рибонуклеаза в составе рибосом находится обычно в неактивном, латентном состоянии. Активация рибонуклеазы наступает при сравнительно высоких ионных силах (0,1 и выше), при удалении ионов Mg^{++} или при действии мочевины, а также под действием целого ряда других, повреждающих рибосому агентов. Такая актива-

ция быстро приводит к деградации рибосомальной РНК и разрушению частиц, т. е. к «самоперевариванию» препарата рибосом. На рибосомах *E. coli* было показано, что этот фермент — рибонуклеаза I — специфически локализован в 30 S субчастице (Elson, Tal, 1959; Waller, 1964). Однако оказывается, что фермент можно отмыть от рибосом *E. coli* с помощью 0,5—1 M NH_4Cl (Stanley, Bock, 1962, не опубликовано; Спирин и др., 1963; Salas et al., 1965) и при этом их функции в белок-синтезирующей системе *in vitro* не нарушаются. Далее, были найдены объекты, рибосомы которых вовсе лишены латентной рибонуклеазы — например, *Bacillus megatherium* (Waller, 1964), *Pseudomonas fluorescens* (Cammack, Wade, 1965) и др. Даже для *E. coli* были найдены в природе (Cammack, Wade, 1965) и получены искусственно (Gasteland, 1966) мутанты, лишенные рибонуклеазы I. Наконец, было показано (Neu, Herpel, 1964), что и в нормальных клетках *E. coli* основная часть фермента до разрушения клеток находится не в рибосомах, а между клеточной стенкой и клеточной мембраной; разрушение клетки приводит к освобождению рибонуклеазы I из поверхностного слоя в раствор, после чего она сорбируется на рибосомах, специфически ассоциируя с 30 S субчастицей, с переходом в неактивное (латентное) состояние. Таким образом, по-видимому, даже такой характерный для рибосом фермент, как рибонуклеаза, оказывается скорее всего посторонним для рибосомы белком. Однако все же способность фермента специфически ассоциировать с рибосомой (именно с 30 S субчастицей) и специфическая инактивация его на рибосоме требуют своего объяснения.

В последующем изложении, касающемся структуры рибосомальных белков, мы не будем рассматривать ни условно рибосомальные белки, ни, тем более, посторонние белки, сорбированные на рибосомах, и ограничимся рассмотрением лишь рибосомальных белков, остающихся в рибосомах после их тщательной очистки и промывки, т. е. только «структурных рибосомальных белков».

2. Количество белковых молекул на рибосому и их молекулярно-весовые характеристики

а. Бактериальные 70 S рибосомы

В очищенных бактериальных рибосомах белок составляет около одной трети от сухого веса рибосомы. Это значит, что общий «молекулярный вес», приходящийся на весь белок 70 S рибосомы, составляет около 10^6 . Весь этот белок одной 70 S рибосомы складывается приблизительно из 50 полипептидных цепей. Из них до 34 полипептидных цепей приходится на 50 S субчастицу и от 16 до 21 — на 30 S субчастицу (Hardy et al., 1969; Craven et al., 1969; Traut et al., 1969; Sypherd et al., 1969; Kaltschmidt, Wittmann, 1970). Средний молекулярный вес полипептидных цепей структурного рибосомального белка составляет, таким образом, около 20 000.

Рибосомальный белок не однороден, а *сильно гетерогенен по молекулярному весу* составляющих его полипептидных цепей (Kaltschmidt et al., 1967; Möller, Chrambach, 1967; Moog et al., 1968). Размах вариаций размеров полипептидных цепей рибосомального белка велик — от цепей с молекулярным весом около 7000—10 000 до цепей с молекулярным весом около 50 000 и даже более.

Большая (50 S) субчастица рибосомы *E. coli* содержит до 34 различных полипептидных цепей с молекулярными весами от 7500 до 50 000 (Traut et al., 1969). Хотя все эти цепи различны по первичной структуре (см. ниже), часть из них, по-видимому, может быть сгруппирована в классы цепей одинакового или близкого молекулярного веса. Так, по крайней мере 6 различных полипептидных цепей 50 S субчастицы имеют молекулярный вес около 20 000; 6 других полипептидов характеризуются молекулярным весом 15 000; для 7 полипептидных цепей найден молекулярный вес 12 000; эти три класса полипептидных цепей объемлют уже более половины всех полипептидных цепей 50 S субчастицы (Traut et al., 1969).

Молекулярные веса полипептидных цепей малой (30 S) субчастицы рибосомы *E. coli* столь же сильно варьируют — от 9000—10 000 до 30 000 в случае цепей, обязательных для каждой 30 S субчастицы (т. е. встречающихся в количестве одной цепи на одну рибосому) и до 60 000—70 000 для цепей «необязательного набора» (т. е. встречающихся в количестве, существенно меньшем, чем одна цепь на одну рибосому). Значения молекулярных весов полипептидных цепей рибосомального белка 30 S субчастицы *E. coli* даны в табл. 5.

Т а б л и ц а 5

Молекулярные веса полипептидных цепей рибосомального белка 30 S субчастиц *E. coli*

(порядковые номера белков даны согласно номенклатуре Виттманна — см. Kaltschmidt Wittmann, 1970; в скобках даны обозначения Номура — см. Nomura et al., 1969)

Класс белков	Порядковый номер белка	Данные Курланда (Kurland et al., 1969)	Данные Траута (Traut et al., 1969)
Белки, обязательно присутствующие в каждой 30 S частице (обязательный набор)	S3 (P3)	31 300—33 000	29 900
	S4 (P4a)	26 700	
	S5 (P4)	24 000	20 200
	S6 (P3a)	18 000	13 500
	S7 (P5)	21 500	19 600
	S8 (P4b)	17 600	29 800
	S9 (P8)	21 000	16 200
	S10 (P6)	16 000	10 500
	S12 (P10)	19 000	
	S16 (P9)	13 500	
Белки, присутствующие не во всех 30 S частицах (необязательный набор)	S17 (P9)	10 700	9 600
	S18 (P12)	14 600	
	S1 (P1)	65 000	68 000
	S2 (P2)	30 000	
	S11 (P7)	18 300	
	S13	?	
	S14 (P11)	15 600	
	S15 (P10a)	13 200	10 700
	S19 (P13)	15 000	11 400
	S20 (P14)	14 000	10 800
	S21 (P15)	13 000	

6. Животные 80 S рибосомы

80 S рибосомы животных имеют гораздо большее и относительное и абсолютное содержание белка, чем бактериальные рибосомы: в них белок составляет около половины сухого веса, и «молекулярный вес», приходящийся на тотальный белок 80 S частицы, составляет $2-2,5 \times 10^6$. Согласно наиболее раннему определению молекулярного веса тотального белка рибосом печени быка методом равновесного ультрацентрифугирования, средневесовой молекулярный вес полипептидных цепей составляет около 25 000 (Curry, Hersh, 1962). Величину

около 16 000—17 000 для среднечислового молекулярного веса белка рибосом печени крысы можно вывести как среднее из молекулярных весов фракций этого белка, анализированных методом равновесного центрифугирования (Hamilton, Ruth, 1967). На основании этих данных и по аналогии с рибосомальным белком бактерий, средний молекулярный вес полипептидных цепей рибосомального белка 80 S рибосом можно принять равным около 20 000. Если учесть относительное содержание белка в 80 S рибосомах и их субчастицах, то отсюда следует, что количество полипептидных цепей рибосомального белка, приходящихся на одну 80 S рибосому животного происхождения, составляет, по-видимому, что-то *около 100*, и из них около 50—75 приходится на 60 S субчастицу и около 35—50 — на 40 S субчастицу.

При изучении молекулярных весов отдельных фракций рибосомального белка 60 S субчастицы рибосом печени крысы были найдены величины средневесового молекулярного веса от 10 000 до 30 000 (Hamilton, Ruth, 1967). Одна из электрофоретических фракций, составляющая около 20% тотального белка 60 S субчастицы, давала средневесовой молекулярный вес около 29 000, другая электрофоретическая фракция, объемлющая несколько более 10% тотального белка, — около 15 000. Свыше 20% тотального белка 60 S субчастицы распределялось во фракции с молекулярным весом около 10 000—11 000. Следовательно, белок животных рибосом, как и белок бактериальных рибосом, *очень гетерогенен* по молекулярному весу.

3. Аминокислотный состав и последовательность

Как правило, аминокислотный состав тотального рибосомального белка (Ts'o et al., 1958; Crampton, Petermann, 1959; Spahr, 1962; Mathias Williamson, 1964) характеризуется сравнительно высоким содержанием основных аминокислот — аргинина, лизина и гистидина, что в целом придает ему основной характер. Белок содержит очень мало цистеина и, видимо, совсем не имеет дисульфидных мостиков. В остальном аминокислотный набор является полноценным: имеются все аминокислоты, свойственные обычным глобулярным белкам, в том числе триптофан. Содержание неполярных аминокислот находится на уровне, свойственном глобулярным белкам, богатым неполярными аминокислотами. В табл. 6 в качестве примера приведен состав тотального рибосомального белка *E. coli* по данным Спара (Spahr, 1962).

Т а б л и ц а 6

Аминокислотный состав тотального рибосомального белка *E. coli*
(по данным Spahr, 1962)

Аминокислотные остатки	Содержание	
	в молях на 100 молей аминокислот (молярные %)	в граммах на 100 г белка (весовые %)
<i>Неполярные</i>		
Глицин	8,2	4,2
Аланин	11,0	7,0
Валин	9,6	8,6
Лейцин	7,4	7,5
Изолейцин	5,5	5,6
Фенилаланин	3,0	4,0
Метионин	2,4	2,8
Пролин	3,7	3,2
Цистеин	0,5	0,5
Триптофан	0,7	1,2
Тирозин	1,8	2,6
<i>Полярные неионизованные</i>		
Серин	4,4	3,4
Треонин	5,2	4,7
Аспарагин+глутамин	7,1	7,8
<i>Кислые</i>		
Аспарагиновая кислота+глутаминовая кислота	11,3	12,5
<i>Основные</i>		
Аргинин	7,2	10,3
Лизин	9,0	10,4
Гистидин	1,9	2,4
<i>Избыток основных над кислыми</i>		
(арг + лиз + гис) — (асп + глю)	6,8	—

Отмечается очень большое сходство аминокислотного состава тотального белка двух рибосомных субчастиц. Так, по содержанию большинства аминокислот тотальные белки 50 S и 30 S субчастиц рибосом *E. coli* практически не различаются, и небольшие статистически достоверные отличия обнаруживаются лишь по 5 аминокислотам: белок 50 S субчастицы содержит слегка больше аланина и треонина и слегка меньше аргинина, гистидина и глутаминовой кислоты, чем белок 30 S

субчастицы (Spahr, 1962). Точно так же тотальные белки 50 S субчастицы и 30 S субчастицы очень сходны по N-концевым аминокислотам: в обеих около 46—49% концевых групп представлено метионином, около 36—40% — аланином, около 10—12% — серином, 1—3% — треонином и 1—2% — глутаминовой и аспарагиновой кислотами (Waller, Harris, 1961).

Наиболее важной характеристикой белкового компонента рибосомы является то, что он состоит из *большого разнообразия полипептидных цепей с разной первичной структурой*.

Разнообразие белков (полипептидных цепей) рибосомы было открыто и убедительно обосновано Валлером (Waller, Harris, 1961; Waller, 1963, 1964) при изучении бактериальных рибосом, хотя несколько ранее уже было получено указание на множественность белков в 80 S рибосомах растительного происхождения (Setterfield et al., 1960). Разнообразие белков рибосомы проявлялось в том, что при анализе препарат тотального белка разделялся на большое количество фракций, различающихся по электрофоретической подвижности в гелях (Setterfield et al., 1960; Waller, Harris, 1961; Waller, 1963, 1964; Leboy et al., 1964; Traut, 1966; Traub et al., 1966; Möller, Chrambach, 1967; Kaltschmidt et al., 1967; Stöffler, 1967; Low, Wool, 1967; Hamilton, Ruth, 1967) или по связыванию на катионообменных колонках (Waller, Harris, 1961; Waller, 1963, 1964; Spitnik-Elson, 1964; Möller, Widdowson, 1967). Было ясно, что указанное фракционирование в той или иной степени отражает большую гетерогенность тотального рибосомального белка по основности, т. е. по аминокислотному составу составляющих его полипептидных цепей.

Важно отметить, что, тем не менее, большая часть полипептидных цепей, составляющих белковый компонент рибосомы, имеет, как правило, выраженный основной характер.

Последующее выделение индивидуальных фракций тотального рибосомального белка и прямое сравнение их аминокислотного состава и пептидных карт триптических гидролизатов (Traut et al., 1967; Möller, Castleman, 1967; Kaltschmidt et al., 1967; Chersi et al., 1968; Fogel, Sypherd, 1968; Moore et al., 1968) окончательно доказало, что белковый компонент рибосомы складывается из большого и сложного набора полипептидных цепей с разным аминокислотным составом и разной аминокислотной последовательностью.

В настоящее время все входящие в рибосому полипептидные цепи могут быть выделены и охарактеризованы как индивидуальные белки (см., например, Traut et al., 1969). Оказалось, что набор цепей (белков) в двух субчастицах рибосомы совершенно различен, и не найдено ни одного белка, который

бы входил в обе из них. Более того, оказалось, что по крайней мере большинство из белков входит в каждую субчастицу не более чем в одном экземпляре, т. е. в количестве одной молекулы на рибосому, и не повторяется в рибосоме даже дважды.

Малая (30 S) субчастица рибосом *E. coli* была изучена в отношении белкового состава особенно тщательно (Craven et al., 1969; Kurland et al., 1969; Traut et al., 1969; Sypherd et al., 1969). Оказалось, что хотя в 30 S субчастицу *E. coli* входит до 21 различных полипептидных цепей, но из них некоторая часть присутствует не во всех 30 S субчастицах. Другими словами, имеется обязательный набор из 12—15 различных полипептидных цепей, присутствующих в каждой 30 S субчастице в количестве одного экземпляра на частицу; но, кроме того, имеется, по-видимому, варьирующий, больший или меньший, набор дополнительных белков (Kurland et al., 1969; Traut et al., 1969). По-видимому, белки варьирующего набора, обнаруживаемые не обязательно в каждой 30 S субчастице, относительно лабильно связаны с рибосомой и могут присутствовать или нет в зависимости от функционального состояния субчастицы и/или в зависимости от процедур выделения препаратов субчастиц.

Как показали исследования пептидных карт триптических гидролизатов индивидуальных белков 30 S субчастицы *E. coli*, все или почти все они действительно обладают различной первичной структурой. Более того, за одним или двумя исключениями, не было найдено достаточно выраженных общих или гомологичных аминокислотных последовательностей у различных полипептидных цепей, входящих в 30 S субчастицу (Moore et al., 1968; Craven et al., 1969). Вывод о том, что всех или почти все полипептидные цепи 30 S субчастицы различны, подтверждается также их перекрестным иммунологическим анализом: как оказалось, они не обнаруживают перекрестных реакций, т. е. значительных гомологий между этими белками не выявляется (Traut et al., 1969).

Таким образом, 30 S субчастица не имеет структур, построенных из одинаковых повторяющихся белковых субъединиц, а представляет собой внутренне асимметричную частицу, где весь набор из 16—21 белков (полипептидных цепей) уникален, и в составе частицы, как правило (может быть, лишь за одним-двумя исключениями), полипептидные цепи не повторяются даже дважды.

Большая (50 S) субчастица рибосом *E. coli* содержит, как уже указывалось, до 34 полипептидных цепей с молекулярными весами от 7500 до 50 000, которые также различны по

первичной структуре (Delius, Traut, 1969; Traut et al., 1969). В отличие от белкового компонента 30 S субчастицы, преобладающее большинство или почти все (по крайней мере, 31) полипептидные цепи 50 S субчастицы *E. coli* являются обязательными и входят в каждую 50 S субчастицу в количестве одного экземпляра на частицу (Traut et al., 1969).

Рибосомальные белки различных организмов различаются. Это верно как для рибосомальных белков различных видов бактерий (Waller, 1964; Otaka et al., 1968; Wittmann, 1969, 1970; Stöffler, Wittmann, 1969), так и для рибосомальных белков различных видов животных (Bielka, Welfle, 1968) и высших растений (Lyttleton, 1968; Wittmann, 1969, 1970; Stöffler et al., 1969). Однако близкие виды обнаруживают, соответственно, большее или меньшее сходство их рибосомальных белков.

Очень большое сходство наблюдается между рибосомальными белками разных родов и видов бактерий в пределах семейства *Enterobacteriaceae*. Согласно иммунологическим тестам, они практически не различимы по серологической специфичности (Wittmann, 1969, 1970; Stöffler, Wittmann, 1969). Сравнение электрофореграмм или хроматографических профилей рибосомального белка у *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* и *Serratia* показывает в основном идентичность, а различия имеют место лишь в нескольких белковых компонентах (Leboy et al., 1964; Otaka et al., 1968; Sypherd et al., 1969). Различие в единичных белковых компонентах рибосомального белка можно обнаружить также у различных штаммов *Escherichia coli* (Leboy et al., 1964; Otaka et al., 1968; Krembel, Apirion, 1968; Osawa et al., 1970; Dekio et al., 1970).

В противоположность ситуации у *Enterobacteriaceae*, рибосомальные белки различных видов рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* и др.) обнаруживают сравнительно мало сходства (Otaka et al., 1968; Wittmann, 1969, 1970; Stöffler, Wittmann, 1969).

Между рибосомальными белками представителей различных семейств бактерий всегда наблюдается очень малое, если и наблюдается какое-либо, сходство (Waller, 1964; Otaka et al., 1968; Wittmann, 1969, 1970; Stöffler, Wittmann, 1969). Исключение составляет *Azotobacter*, рибосомальные белки которого оказались серологически близкими к таковым *Enterobacteriaceae*; отмечается также существенный серологический перекрест между рибосомальными белками *Enterobacteriaceae*, с одной стороны, и *Hydrogenomonas* и *Rhodopseudomonas*, с другой (Wittmann, 1969, 1970; Stöffler, Wittmann, 1969).

При сравнительном исследовании белков 80 S рибосом различных далеко отстоящих (не родственных) видов позвоночных животных (крыса, корова, свинья, курица, лягушка, форель) было найдено, что имеется, по-видимому, много общих белковых компонентов, но много и специфических для каждого из перечисленных организмов (Bielka, Welfle, 1968). Однако близкие виды (крыса, мышь, кролик) почти не различимы по белковому набору 80 S рибосом (Low, Wool, 1967; Bielka, Welfle, 1968). Заметных отличий в белковом наборе не удалось найти также у 80 S рибосом различных тканей одного вида (Low, Wool, 1967; Bielka, Welfle, 1968).

Аналогичная ситуация найдена и при изучении 80 S рибосом высших растений: разные виды, если только они не близко родственны, имеют, наряду с общими, набор специфических полипептидных цепей, но разные органы одного и того же вида не различимы по белковому составу их рибосом (Lyttleton, 1968). Белковый состав 70 S рибосом хлоропластов очень сильно отличается от такового цитоплазматических 80 S рибосом одного и того же вида растения (Lyttleton, 1968). Исследование белков растительных рибосом как иммунологически, так и физическими методами позволяет прийти к следующим заключениям: 1) цитоплазматические 80 S рибосомы всех высших растений, несмотря на различия, серологически родственны друг другу и имеют по крайней мере один общий белковый компонент; 2) 80 S рибосомы двудольных растений более родственны между собой, чем таковые однодольных растений; 3) 70 S рибосомы хлоропластов, несмотря на большие отличия, родственны 80 S рибосомам того же растения; 4) в то же время 70 S рибосомы хлоропластов разных не родственных видов растений очень мало родственны между собой; 5) 70 S рибосомы высших растений вовсе не родственны 70 S рибосомам бактерий, а 80 S рибосомы высших растений не родственны 80 S рибосомам животных или дрожжей (Wittmann, 1969, 1970; Stöffler et al., 1969).

В заключение интересно отметить, что сильные отклонения в аминокислотном составе рибосомального белка главным образом в сторону значительного увеличения кислотности большинства полипептидных цепей наблюдаются при переходе к галофилизму, как показано на галофильной (живущей при высоких концентрациях солей) бактерии *Halobacterium cutirubrum* (Bayley, 1966),

4. Конформация

О конформации полипептидных цепей рибосомального белка известно мало. Значительной трудностью в ее изучении является то, что отделение белка от рибосомы, как правило, сопровождается его большей или меньшей денатурацией и агрегацией. Поэтому все электрофоретические, седиментационные и т. п. исследования изолированного рибосомального белка проводят, как правило, в присутствии мочевины или хлористого гуанидина, где белок представлен в виде дезагрегированных развернутых полипептидных цепочек. Соответственно изучение белка в таком растворителе или в агрегированном состоянии мало что может дать для выяснения его нативной конформации. По-видимому, рибосомальные белки обладают вполне стабильной нативной конформацией *лишь в составе рибосомы*, и любое отделение их от рибосомы либо значительно дестабилизирует их нативную конформацию, либо автоматически приводит к денатурации.

Попытки исследовать конформацию рибосомального белка в составе рибосомы были предприняты путем изучения дисперсии оптического вращения рибосом в области собственного ультрафиолетового поглощения пептидной связи — 200—230 мкм (McPhie, Gratzner, 1966; Sarkar et al., 1967). В этой области оптическое вращение белка очень чувствительно к наличию α -спиральных структур, которые обуславливают пик оптической активности при 198 мкм, минимум при 232—233 мкм и характерное плечо в районе 210 мкм. Найдено, что если из кривой дисперсии оптического вращения рибосом вычесть кривую дисперсии оптического вращения рибосомальной РНК, то получившаяся разностная кривая, соответствующая рибосомальному белку, указывает на наличие α -спиралей. Общее содержание α -спиральной структуры в белке рибосомы предположительно было оценено в 30%.

Можно предположить, что по крайней мере некоторая часть молекул рибосомального белка в рибосоме является молекулами глобулярного типа, содержащими α -спиральные участки.

5. Резюме

В состав рибосомы входит несколько десятков молекул (полипептидных цепей) структурного рибосомального белка. Бактериальная 70 S рибосома включает в себя приблизительно 50 полипептидных цепей со средним молекулярным весом око-

ло 20 000. Животная 80 S рибосома имеет, по-видимому, около 100 полипептидных цепей в своем составе.

Полипептидные цепи рибосомального белка гетерогенны по молекулярному весу; среди них имеются как цепи в 100 аминокислотных остатков, так и относительно длинные цепи в 300—500 аминокислотных остатков (размах вариаций молекулярных весов — от 7000—10 000 до 30 000—60 000 в пределах одной рибосомы).

Большая часть полипептидных цепей рибосомального белка имеет основной характер, обусловленный некоторым преобладанием основных аминокислот над кислыми. В целом рибосомальный белок сильно гетерогенен по аминокислотному составу и последовательности, представляя собой сложный набор разнообразных полипептидных цепей. Набор цепей в двух субчастицах рибосомы совершенно различен. Большинство из полипептидных цепей рибосомального белка входит в каждую субчастицу не более чем в одном экземпляре, т. е. в количестве одной молекулы на рибосому.

Предварительные данные указывают, что некоторые молекулы белка в составе рибосомы могут характеризоваться, по крайней мере частично, глобулярной конформацией и наличием α -спиральных участков.

Л и т е р а т у р а

- Спирин А. С., Киселев Н. А., Шакулов Р. С., Богданов А. А. 1963. Биохимия, 28, 920.
Bayley S. T. 1966. J. Mol. Biol., 15, 420.
Bielka H., Welfle H. 1968. Molec. Gen. Genetics, 102, 128.
Cammack K. A., Wade H. E. 1965. Biochem. J., 96, 671.
Chersi A., Dzionara M., Donner D., Wittmann H. G. 1968. Molec. Gen. Genetics, 101, 82.
Crampton C. F., Petermann M. L. 1959. J. Biol. Chem., 234, 2642.
Craven G. R., Voynow P., Hardy S. J. S., Kurland C. G. 1969. Biochemistry, 8, 2906.
Curry J. B., Hersh R. T. 1962. Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 415.
Dekio S., Takata R., Osawa S., Tanaka K., Tamaki M. 1970. Molec. Gen. Genetics, 107, 39.
Deliuss H., Traut R. 1969. VI FEBS Meeting, Madrid. (Report at Symp. 1).
Elson D., Tal M. 1959. Biochim. Biophys. Acta, 36, 281.
Fogel S., Sypherd P. S. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, 1329.
Gesteland R. F. 1966. J. Mol. Biol., 16, 67.
Hamilton M., Ruth M. 1967. Biochemistry, 6, 2585.
Hardy S. J. S., Kurland C. G., Voynow P., Mora G. 1969. Biochemistry, 8, 2897.
Kaltschmidt E., Wittmann H. G. 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 1276.
Kaltschmidt E., Dzionara M., Donner D., Wittmann H. G. 1967. Molec. Gen. Genetics, 100, 364.

- Krembel J., Apirion D. 1968. J. Mol. Biol., 33, 363.
- Kurland C. G., Voynow P., Hardy S. J. S., Randall L., Lutter L. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 17.
- Leboy P. S., Cox E. C., Flaks J. G. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 1367.
- Low R. B., Wool I. G. 1967. Science, 155, 330.
- Lyttleton J. W. 1968. Biochim. Biophys. Acta, 154, 145.
- Mathias A. P., Williamson R. 1964. J. Mol. Biol., 9, 498.
- McPhie P., Gratzner W. B. 1966. Biochemistry, 5, 1310.
- Möller W., Castleman H. 1967. Nature, 215, 1293.
- Möller W., Chrambach A. 1967. J. Mol. Biol., 23, 377.
- Möller W., Widdowson J. 1967. J. Mol. Biol., 24, 367.
- Moore P. B., Traut R. R., Noller H., Pearson P., Delius H. 1968. J. Mol. Biol., 31, 441.
- Neu H. C., Heppel L. A. 1964. J. Biol. Chem., 239, 2927.
- Nomura M., Mizushima S., Ozaki M., Traub P., Lowry C. V. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 49.
- Osawa S., Takata R., Dekio S. 1970. Molec. Gen. Genetics, 107, 32.
- Otake E., Itoh T., Osawa S. 1968. J. Mol. Biol., 33, 93.
- Petermann M. L. 1964. «The physical and chemical properties of ribosomes». Elsevier Publ. Co. Amsterdam — London — New York.
- Salas M., Smith M. A., Stanley W. M., Wahba A. J., Ochoa S. 1965. J. Biol. Chem., 240, 3988.
- Sarkar P. K., Yang J. T., Doty P. 1967. Biopolymers, 5, 1.
- Setterfield G., Neelin J. M., Neelin E. M., Bayley S. T. 1960. J. Mol. Biol., 2, 416.
- Spahr P. F. 1962. J. Mol. Biol., 4, 395.
- Spitnik-Elson P. 1964. Biochim. Biophys. Acta, 80, 594.
- Stöffler G. 1967. Molec. Gen. Genetics, 100, 374.
- Stöffler G., Janda H. G., Wittmann H. G. 1969. Personal communication.
- Stöffler G., Wittmann H. G. 1969. Personal communication.
- Sypherd P. S., O'Neil D. M., Taylor M. M. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 77.
- Traub P., Nomura M., Tu L. 1966. J. Mol. Biol., 19, 215.
- Traut R. 1966. J. Mol. Biol., 21, 571.
- Traut R. R., Delius H., Ahmad-Zadeh C., Bickle T. A., Pearson P., Tissières A. 1969. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 25.
- Traut R., Moore P., Delius H., Noller H., Tissières A. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1294.
- Ts'o P.O.P., Bonner J., Dintzis H. 1958. Arch. Biochim. Biophys., 76, 225.
- Waller J. P. 1963. J. Mol. Biol., 7, 483.
- Waller J. P. 1964. J. Mol. Biol., 10, 319.
- Waller J. P., Harris J. I. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 18.
- Wittmann H. G. 1969. VI FEBS Meeting, Madrid. (Report at Symp. 1).
- Wittmann H. G. 1970. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 20, 55.

Структурные превращения рибосомных частиц

Одним из решающих моментов в изучении рибосомы явилось открытие структурных превращений рибосомных субчастиц. Первый шаг в этом направлении был сделан в 1963 г., когда было открыто *разворачивание компактных рибосомных субчастиц в рибонуклеопротеидные тяжи* (Спирин и др., 1963; Spirin, 1963). Следующий шаг состоял в обнаружении возможности последовательной диссоциации групп белков от рибосомной частицы, т. е. *ступенчатого «раздевания», или разборки, рибосомных субчастиц* (Meselson et al., 1964; Spirin et al., 1965; Lerman et al., 1966). Эти два типа структурных превращений рибосомных частиц — разворачивание и разборка — послужили основой для понимания ряда принципов строения рибосомы и для экспериментального осуществления ее самосборки.

1. Разворачивание и принцип рибонуклеопротеидного тяжа

Разворачивание компактных рибосомных субчастиц в рибонуклеопротеидные тяжи достигается путем вытеснения или прямого удаления внутририбосомного Mg^{++} и других двухвалентных катионов. Разворачивание происходит в значительной мере, по-видимому, за счет увеличивающегося электростатического отталкивания внутри рибосомной частицы. Оно проявляется как резкое уменьшение седиментационных коэффициентов частиц при одновременном увеличении удельной вязкости. Эти изменения компактности рибосомных субчастиц могут происходить в таких ионных условиях, когда вторичная структура самой рибосомальной РНК видимым образом не «плавится», и весь эффект обусловлен лишь нарушением внутририбосомной компактной упаковки. Несмотря на полное нарушение внутририбосомной упаковки, белок не отделяется от

высокомолекулярной рибосомальной РНК. Поэтому *высокомолекулярная РНК каждой рибосомной субчастицы может рассматриваться как единый, ковалентно-непрерывный каркас или матрица, размещающая на себе многочисленные молекулы рибосомального белка и формирующая таким образом единый рибонуклеопротеидный тяж*. Отсюда *рибосомная субчастица может быть рассмотрена как компактно свернутый рибонуклеопротеидный тяж*.

а. Компактность исходной укладки

Как уже указывалось выше (раздел III, 6), при сравнении вторичной структуры рибосомальной РНК в изолированном состоянии (без белка) и в составе рибосомной частицы не обнаруживается видимых различий. В обоих случаях существование многочисленных коротких спиральных участков, образованных за счет взаимодействия смежных секций цепи, автоматически предполагает, что спиральные участки в целом представляют собой набор «шпилек», торчащих от последовательно связывающего их остова полинуклеотидной цепи (см. раздел III, 5). Однако далее, при переходе к рассмотрению третичной структуры РНК, начинаются существенные различия.

В изолированной РНК в растворе короткие шпилькообразные двуспиральные участки имеют, вероятно, тенденцию располагаться преимущественно перпендикулярно длинной оси всей молекулы, чередуясь с неспиральными однотяжными участками; стопкообразное расположение этих спиральных и чередующихся с ними «аморфных» участков формирует в целом *палочкообразную или тяжеобразную* частицу РНК с вторичной структурой (Spirin, 1960; Спирин, 1963; см. раздел III, 5; рис. 12). Сильно асимметричная, палочкообразная или тяжеобразная форма свободной рибосомальной РНК, с длиной тяжа 600—1200 Å и средней шириной около 30 Å, хорошо демонстрируется под электронным микроскопом (Kisselev et al., 1961).

Оказывается, что рибосомальная РНК *в составе рибосомной субчастицы*, обладающая, вероятно, той же вторичной структурой (см. раздел III, 6), в целом *гораздо более компактна и менее асимметрична*, чем изолированная РНК. Это также может быть продемонстрировано под электронным микроскопом, где рибосомные субчастицы (включающие, как известно, всю молекулу рибосомальной РНК) выглядят как очень компактные *округлые* образования с линейными размерами, не превышающими 200—250 Å (Hall, Slayter, 1959; Huxley, Zubay, 1960; Hart, 1962; Спирин и др., 1963). Различия в компактности и степени пространственной асимметрии между свободной РНК с вторичной структурой и РНК в составе

рибосомных субчастиц видны и из гидродинамических характеристик: так, характеристическая вязкость 50 S рибосомных субчастиц ($[\eta] = 5,4\text{--}5,6 \text{ см}^3/\text{г}$; Tissières et al., 1959; Hill et al., 1969) почти на порядок величины ниже характеристической вязкости свободной рибосомальной 23 S РНК с полной вторичной структурой ($[\eta] = 38 \text{ см}^3/\text{г}$; Stanley, Bock, 1965).

Таким образом, присутствие рибосомального белка в комплексе с РНК, с одной стороны, вероятно, не нарушает и не изменяет существенным образом вторичной структуры (набора двуспиральных «шпилек») рибосомальной РНК, а с другой стороны, как-то обеспечивает очень компактную упаковку упомянутого РНК-тяжа как целого, формируя его третичную структуру и в целом четвертичную структуру частицы.

б. Характеристика процесса разворачивания

Для обеспечения нативного компактного состояния рибосомной субчастицы необходимо, чтобы эффективное электростатическое отталкивание анионных групп (фосфаты и карбоксилы) внутри частицы не превышало какой-то определенной величины. Обычно это достигается путем экранировки внутририбосомных отрицательных зарядов связанными в рибосомах многочисленными ионами Mg^{++} , а также, по-видимому, в известной мере, и ионами полиаминов.

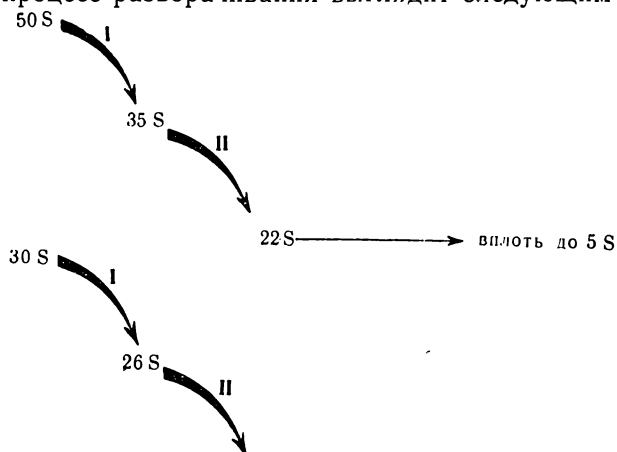
Высокие концентрации одновалентных катионов в среде могут приводить к конкурентному вытеснению части ионов Mg^{++} (и полиаминов) из рибосом. При определенных концентрациях солей одновалентных металлов (0,5—1M NH_4Cl или KCl) это частичное вытеснение внутририбосомных катионов компенсируется экранирующим действием большой концентрации свободных одновалентных катионов, и рибосомные частицы не теряют своей исходной компактности. Однако, если после такой обработки рибосомы перенести в условия более низкой ионной силы (менее 0,5—0,3) без ионов Mg^{++} в среде, то эти Mg^{++} -обедненные рибосомные частицы обнаружат скачкообразную трансформацию в менее компактную форму (Спирин и др., 1963; Gavrilova et al., 1966). Этот переход и обозначается как *разворачивание*.

Такое же разворачивание рибосомных частиц можно получить и путем прямого удаления ионов Mg^{++} из бактериальных рибосом, например, с помощью комплексонов (ЭДТА) (Gesteland, 1966; Weller et al., 1968; Miall, Walker, 1969; Tal, 1969) или с помощью инкубации в присутствии более мягких Mg^{++} -связывающих анионов, например, ортофосфата (Natori et al. 1968). Как можно видеть из анализа литературы, определенные этапы процесса разворачивания, сопровождаемого пони-

жением седиментационных коэффициентов рибосомных субчастиц при действии на них ЭДТА или безмагниевой среды, наблюдались на бактериальных рибосомах и несколько ранее, хотя трактовались эти явления по-разному (Weller, Horowitz, 1964; Rodgers, 1964; Cammack, Wade 1965). Возможно, с разрыхлением 50S частицы ($50S \rightarrow 40S$) имел дело и Элсон (Elson, 1961, 1964), хотя в его опытах могли быть и элементы разборки (см. ниже).

Разворачивание рибосомных субчастиц, открытое и изученное главным образом на рибосомах *E. coli* (Спирин и др., 1963; Гаврилова и др., 1966; Gavrilova et al., 1966; Gesteland, 1966; Weller et al., 1968; Miall, Walker, 1969), представляет собой процесс *многоступенчатый*. Так, сначала исходная компактная 50 S субчастица *скачкообразно* переходит в форму 35 S, характеризующуюся тем же молекулярным весом и соотношением РНК/белок, но менее компактным состоянием, чем 50 S. Затем, при дальнейшем удалении Mg^{++} или уменьшении ионной силы, 35 S переходит в еще менее компактную форму 22 S — тоже скачкообразно, без промежуточных состояний, по принципу «все или ничего». Несмотря на сохранение полного содержания рибосомального белка, 22 S форма ведет себя уже как типичный полиэлектролит типа свободной РНК в растворе и более или менее плавно уменьшает свой коэффициент седиментации, т. е. плавно разворачивается, при уменьшении ионной силы в отсутствие ионов Mg^{++} .

Аналогичным образом, через определенные дискретные стадии, происходит разворачивание и 30 S субчастицы. Схематически процесс разворачивания выглядит следующим образом:



Каждый скачкообразный этап разворачивания — I и II — происходит в довольно *узком интервале* изменения ионных условий. Например, если разворачивание осуществляется путем уменьшения ионной силы в среде, то этап I в основном проходит в интервале ионных сил (NH_4Cl или KCl) от 0,3 до 0,2 а этап II — от 0,1 до 0,01 (Gavrilova et al., 1966).

Разворачивание субчастиц может быть, по-видимому, по крайней мере частично, обратимо; обращение достигается добавлением ионов Mg^{++} .

Субчастицы 80 S рибосом также разворачиваются в безмагниевой среде, особенно в присутствии Mg^{++} -комплексирующих анионов, таких как ЭДТА, пирофосфат и др., и процесс также идет через ряд дискретных ступеней. Первый этап разворачивания есть превращение компактных 60 S и 40 S субчастиц в несколько более рыхлые 50 S и 30 S компоненты. Это разрыхление субчастиц часто сопровождается диссоциацией 80 S рибосом, если она проводится путем достаточно жесткого удаления Mg^{++} ; понижение седиментационных коэффициентов субчастиц до 50 S и 30 S или даже ниже при диссоциации 80 S рибосом в присутствии пирофосфата или ЭДТА наблюдали многие авторы еще до того, как природа явления была выяснена (Ts'o et al., 1958; Hamilton, Petermann, 1959; Kuff, Zeigel, 1960; Lamfrom, Glowacki, 1962; Henshaw, 1964; Tashiro, Siekevitz, 1965). Отдельно превращение дрожжевой 60 S субчастицы в 50 S компонент при удалении Mg^{++} наблюдал Морган (Morgan, 1962), но лишь недавно Гош (Ghosh, 1969) доказала, что это превращение есть чисто конформационное разрыхление, без какой бы то ни было потери белка или деградации РНК. Разворачивание животных рибосомных субчастиц, включая более глубокие стадии разворачивания, изучалось в ряде работ (Gould et al., 1966; Petermann, Pavlovic, 1966).

Разворачивание субчастиц, в том числе самая первая стадия разрыхления, сопровождается резким увеличением чувствительности их РНК к атаке рибонуклеазой (Natori et al., 1968; Weller et al., 1968; Cox, 1969b; Möller et al., 1969).

Характерным моментом разворачивания большой рибосомной субчастицы (50 S или 60 S) является то, что в процессе разворачивания уже на первых его этапах она легко теряет свою 5 S РНК (Galibert et al., 1966; Comb, Sarkar, 1967; Morell, Marmur, 1968; Siddiqui, Hosokawa, 1968, 1969; Sarkar, Comb, 1969). По-видимому, эта потеря является необратимой или трудно обратимой; во всяком случае, даже при видимой реассоциации 5 S РНК с обратно свернутой субчастицей не удавалось получить полного восстановления нативной конформации большой субчастицы,

В процессе разворачивания рибосомных субчастиц не было найдено отделения каких-либо фракций рибосомального белка от высокомолекулярной рибосомальной РНК (Спирин и др., 1963; Gavrilova et al., 1966; Gesteland, 1966; Weller et al., 1968; Morell, Marmur, 1968; Ghosh, 1969).

Разворачивание рибосомных субчастиц, проходя через одну-две дискретные промежуточные стадии разрыхления частицы, заканчивается таким конечным конформационным состоянием рибонуклеопротейда, которое по своим гидродинамическим характеристикам практически не отличается от свободной высокомолекулярной РНК в аналогичных условиях ионной силы и температуры. Так, даже в условиях умеренной ионной силы (0,1—0,02) коэффициент седиментации понижается приблизительно в два раза (Gavrilova et al., 1966; Gesteland, 1966), а характеристическая вязкость повышается на порядок величины (Weller et al., 1968; Tal, 1969), достигая значений, характерных для свободной РНК. В электронном микроскопе развернутые рибосомы могут быть выявлены как палочкообразные или тяжкообразные структуры (Спирин и др., 1963), мало отличимые от палочек или тяжей РНК.

С другой стороны, указанное конечное состояние разворачивания (например, $50\text{ S} \rightarrow 35\text{ S} \rightarrow 22\text{ S}$ для большой рибосомной субчастицы бактериальных рибосом) может быть получено в условиях, когда еще никакого «плавления» вторичной структуры РНК наверняка не должно происходить (например, ионная сила 0,1 при 20° — см. Gavrilova et al., 1966). Прямые определения степени гипохромизма и оптической активности развернутых рибосом действительно подтверждают, что разворачивание может не сопровождаться заметными изменениями вторичной структуры РНК частиц (Weller et al., 1968; Miall, Walker, 1969). Следовательно, разворачивание рибосомных субчастиц (если только ионная сила не слишком мала и температура раствора не высока) вовсе не обусловлено нарушением спиральных структур и комплементарных взаимодействий в рибосомальной РНК, а есть независимый процесс нарушения компактной упаковки РНК-тяжа, соединенного с белком, как *целого*. Следовательно, разворачивание есть переход компактной рибосомной субчастицы в *рибонуклеопротейдный тяж*, основу которого составляет тяж РНК со своей вторичной структурой (см. выше, раздел III, 5; рис. 12).

Рибонуклеопротейдный тяж, так же как и свободная РНК, ведет себя в растворе как полиэлектролит, *плавно* понижая седиментационный коэффициент при понижении ионной силы (Gavrilova et al., 1966). Более того, при достаточно низких ионных силах, а также при повышении температуры раствора на-

чинается разрушение двуспиральных участков РНК рибонуклеопротеидного тяжа, т. е. «плавление» вторичной структуры, что приводит к еще большему падению коэффициентов седиментации и многократному подъему удельной вязкости (Cavrilova et al., 1966; Tal, 1969; сравни с аналогичным поведением РНК, Spirin, 1963). Все это происходит по-прежнему без всякого отделения белка от РНК. Профили температурного плавления вторичной структуры рибонуклеопротеидного тяжа и свободной РНК в аналогичных ионных условиях практически полностью совпадают (Miall, Walker, 1969; см. также Cotter et al., 1967, где плавлению подвергались дрожжевые рибосомы, диализованные против 0,1М NaCl без Mg^{++} и находящиеся, вероятно, на грани разворачивания). В то же время исходные компактные рибосомные субчастицы, в отличие от развернутых рибонуклеопротеидных тяжей, начинают обнаруживать плавление вторичной структуры своей РНК лишь при сравнительно высоких температурах — выше 55° (Miall, Walker, 1969). Это значит, что до разворачивания, в исходной субчастице, рибосомальный белок сшивал и удерживал вместе разные части РНК-тяжа, а разворачивание есть нарушение каких-то белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий; после разворачивания белок остается просто висеть на тяже РНК, уже не возмущая его общей конформации.

Между прочим, из того наблюдения, что прикрепленный к РНК белок в развернутом рибонуклеопротеидном тяже не влияет на стабильность вторичной структуры РНК, можно сделать предположение о присоединении белка преимущественно к неспиральным («аморфным») участкам РНК.

Итак, в целом, в ходе процесса разворачивания всегда может быть выделено по крайней мере три последовательных *дискретных* состояния конформации рибонуклеопротеидной частицы (например, $50\text{ S} \rightarrow 35\text{ S} \rightarrow 22\text{ S}$ или $30\text{ S} \rightarrow 26\text{ S} \rightarrow 16\text{ S}$). Переход от одного состояния к другому является скачкообразным, кооперативным превращением, идущим по принципу «все или ничего», без плавных промежуточных состояний. Конечное — развернутое — состояние рибонуклеопротеидной частицы характеризуется полиэлектролитным поведением: значения седиментационных коэффициентов и удельной вязкости могут плавно изменяться в зависимости от ионной силы раствора. Гидродинамические и оптические характеристики частицы в этом состоянии очень похожи на таковые свободной РНК. Поэтому логично данное состояние рибонуклеопротеидной частицы рассматривать как *беспорядочное* состояние *рибонуклеопротеидного тяжа*, где основу образует тяж («палочка») РНК с прикрепленными к нему молекулами белка.

Исходное состояние рибосомной субчастицы в таком случае может рассматриваться как какая-то компактная укладка указанного рибонуклеопротеидного тяжа. Компактность этой укладки обеспечивается, очевидно, взаимодействием между частями рибонуклеопротеидного тяжа. Основную роль в поддержании стабильности этой укладки играют, вероятно, рибосомальные белки; возможно, что здесь очень важны белок-белковые взаимодействия.

В процессе разворачивания, в результате первого этапа превращения, нарушается, очевидно, некая кооперативная система белок-зависимых (может быть, белок-белковых) взаимодействий между участками рибонуклеопротеидного тяжа, и рибосомная частица переходит из компактного состояния в более рыхлое промежуточное состояние, сохраняя, однако, часть взаимодействий между участками тяжа. В результате последующего этапа (или этапов) превращения нарушаются остальные взаимодействия между участками тяжа, и рибонуклеопротеидная частица переходит в состояние развернутого беспорядочного рибонуклеопротеидного тяжа. Дальнейшее уменьшение компактности тяжа может происходить за счет разрушения вторичной структуры (двухспиральных шпилькообразных участков) его РНК.

в. Каркасная роль рибосомальной РНК (принцип рибонуклеопротеидного тяжа)

Самым важным выводом из явления разворачивания рибосомных субчастиц кажется то, что многочисленные молекулы рибосомального белка могут удерживаться на самой высокомолекулярной РНК независимо от четвертичной структуры рибосомной частицы как целого. Отсюда следует, что высокомолекулярная рибосомальная РНК может рассматриваться как единый ковалентно-непрерывный каркас, к которому присоединены молекулы или группы молекул рибосомального белка. Возможно, именно в этом и состоит ее биологическая роль.

На основании изучения главным образом явления разворачивания может быть предложена для рассмотрения следующая модель взаимной организации высокомолекулярной РНК и белка в рибосомной частице (Спирин и др., 1963; Spirin, 1963; Spirin, 1969): 1) цепь высокомолекулярной рибосомальной РНК формирует *вторичную структуру*, аналогичную таковой в растворе, с многочисленными короткими спиральными участками, последовательно связанными чередующимися с ними однотяжными неспиральными участками в *гибкую «палочку»* или *тяж*; 2) белковые молекулы взаимодействуют с РНК преимущественно по *неспиральным участкам* цепи, так что вто-

ричная структура РНК не возмущается, и в то же время образуется *рибонуклеопротеидный тяж*; 3) рибонуклеопротеидный тяж, структурным каркасом которого является «палочка» или тяж РНК, *сворачивается*, в свою очередь, определенным *компактным* образом, формируя рибосомную субчастицу (50 S или 30 S, в зависимости от РНК).

Имеется ряд косвенных указаний, что белок действительно прикреплен в основном к неспиральным участкам высокомолекулярной РНК. Так, спиральные участки можно разрушить в растворе с низкой ионной силой (что видно из понижения коэффициентов седиментации до 3—5 S; см. Gavrilova et al., 1966) или путем нагревания (Cotter et al., 1967; Miall, Walker, 1968; Tal, 1969), и это не вызывает диссоциацию белков от РНК. И наоборот, сохранение полного содержания белка в составе рибосомного рибонуклеопротеида не влияет на плавление спиралей его РНК (см. те же ссылки). Далее, если компактное состояние рибосомной субчастицы зафиксировать формальдегидом, то можно расплавить всю вторичную структуру РНК без всякого разворачивания, в пределах компактной частицы; в этом случае расплавленные (бывшие спиральные) участки оказываются свободно доступными для формальдегида (Сох, 1969а). В целом создается впечатление, что спиральные участки РНК ведут себя независимо от рибосомального белка.

Каркас РНК специфичен для белков, которые к нему присоединены, т. е. формирование рибонуклеопротеидного тяжа является результатом специфического РНК-белкового узнавания. Это заключение лучше всего следует из опытов по реконструкции рибосомных частиц из рибосомальной РНК и рибосомального белка (см. ниже, раздел V, 2). Так, в условиях реконструкции изолированные рибосомальные белки 30 S субчастицы *E. coli* специфически комбинируются только с 16 S РНК *E. coli*, но не с дрожжевой 16 S РНК и не с 16 S-фрагментами 23 S РНК *E. coli* (Traub, Nomura, 1968). Точно так же рибосомальная 23 S РНК *E. coli* комбинируется в гомогенные рибонуклеопротеидные частицы лишь с белком 50 S субчастицы *E. coli*, но не с белком 30 S субчастицы (Спирин и др., 1968).

По-видимому, только определенные небольшие участки высокомолекулярной рибосомальной РНК прямо участвуют в специфическом взаимодействии с рибосомальными белками (Nomura et al., 1968), и каждый рибосомальный белок или группа белков «персонально» узнает лишь *свой* участок РНК-каркаса. Именно за счет этого должна достигаться необходимая специфичность и уникальность пространственного размещения разнообразных белковых молекул или групп молекул

на каркасе РНК. Если «узнающие» участки каркаса РНК действительно являются по преимуществу неспиральными, то они должны быть обогащены пуриновыми нуклеотидами по сравнению с остальной частью РНК (см. раздел III, 4, 5). Имеются экспериментальные данные, что участки рибосомальной РНК, защищенные рибосомальным белком от нуклеаз, т. е., возможно, как раз белок-узнающие участки РНК, содержат значительный избыток гуаниловых нуклеотидов (Möller et al., 1969).

Формируемый в результате РНК-белкового узнавания рибонуклеопротеидный тяж *со специфической последовательностью различных белков вдоль него* свернут определенным уникальным образом в компактную рибосомную частицу; это сворачивание определяется главным образом белковым компонентом тяжа; можно думать, что уникальность компактной упаковки тяжа детерминирована как набором, так и последовательностью белков вдоль тяжа. Роль белкового компонента в обеспечении компактной укладки тяжа следует прежде всего из сравнения рибонуклеопротеидных частиц со свободной РНК в растворе: лишь присутствие рибосомальных белков на РНК-тяже обеспечивает компактную укладку (см. выше). Далее, опыты по реконструкции 30S субчастицы из РНК и белка (см. ниже, раздел V, 2) говорят о том, что для формирования компактной частицы нужно присутствие совершенно определенного набора белков на рибосомальной РНК (Nomura et al., 1969). То что компактная рибосомная субчастица довольно прочно «сцементирована» именно рибосомальными белками, следует также из данных по действию рибонуклеазы на рибосомы: оказалось, что рибонуклеаза может вызывать частичную деградацию рибосомальной РНК в рибосомах, но это не приводит к распаду частиц, потере компактности или другим видимым изменениям (Шакулов и др., 1962; Santer, 1963; Cox, 1969b). Как уже указывалось выше, разрыхленные рибосомы, наоборот, легко распадаются при действии рибонуклеазы.

В обеспечении компактной упаковки большую роль могут играть белок-белковые взаимодействия между участками тяжа. В пользу этого свидетельствует то, что формальдегид, известный как белок-сшивающий агент, способен прочно фиксировать компактное состояние рибосомы; компактность формальдегид-фиксированной рибосомы сохраняется даже после полного теплового плавления вторичной структуры ее РНК (Cox, 1969a). Однако, по-видимому, не менее важны и взаимодействия присоединенного к РНК белка с другими участками РНК, т. е. типа РНК-белок-РНК. Замечательным примером в этом отношении являются опыты Номура и др. (Nomu-

ga et al., 1968) по реконструкции 30 S субчастицы из 16 S РНК, обработанной HNO_2 , и нормального рибосомального белка: было найдено, что после определенного уровня обработки HNO_2 рибосомальная 16 S РНК еще сохраняла способность узнавать и присоединять весь набор белков 30 S субчастицы, но полученный рибонуклеопротеид не сворачивался в компактную 30 S форму.

2. Ступенчатая разборка и самосборка

Химическое разнообразие белков (полипептидных цепей) в каждой рибосомной субчастице (см. раздел IV, 3) оказалось непосредственно сопряжено с физической гетерогенностью в белковом компоненте рибосомной частицы. Это выражается прежде всего в том, что имеются разные группы белков (полипептидных цепей), удерживаемые в рибосоме по-разному. Так, действуя высокими концентрациями одновалентных солей, можно получить последовательную диссоциацию групп белков от рибосомной частицы, т. е. ступенчатое, по порциям, в несколько дискретных стадий «раздевание» рибосомной частицы, вплоть до почти «голой» рибосомной РНК. Большинство стадий «раздевания», или разборки, оказались легко обратимыми, что позволило перейти к экспериментальному осуществлению самосборки биологически активных рибосомных субчастиц *in vitro*.

а. Ступенчатая диссоциация рибосомального белка

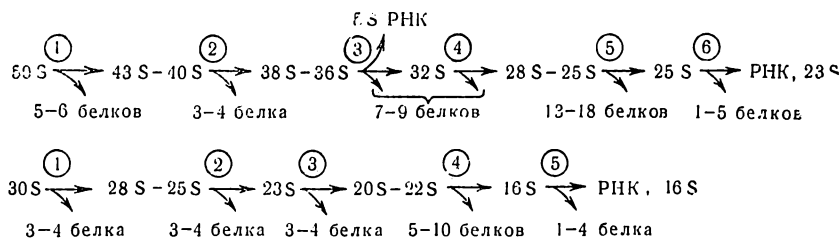
Как уже отмечалось, высокие концентрации одновалентных солей имеют двоякое воздействие на внутририбосомные электростатические силы: а) ослабление всех электростатических взаимодействий, включая как электростатическое отталкивание (в основном между фосфатами РНК), так и электростатическое притяжение (возможно, между фосфатами РНК, с одной стороны, и основными группами белка, с другой); б) конкурентное вытеснение одновалентными катионами связанных ионов Mg^{++} из рибосомы. По-видимому, как ослабление электростатического взаимодействия между белком и РНК, так и вытеснение ионов Mg^{++} приводит к тому, что при действии высоких концентраций одновалентных солей рибосомальный белок становится менее прочно удерживаемым в составе рибосомной частицы. Обычно, если концентрация Mg^{++} в растворе не превышает 0,01 М, то уже при концентрации соли 1–2М и выше может начаться диссоциация белка от рибосомной ча-

стицы. Добавление ионов Mg^{++} в среду противодействует диссоциации молекул белка от рибосомной частицы. Это и указывает на то, что удержание белка в составе рибосомы обеспечивается далеко не только простым электростатическим взаимодействием его основных групп с фосфатами РНК, а в значительной мере, если не в основном, за счет какой-то организации с участием ионов Mg^{++} (см. ниже).

Указание на возможность отделения определенной, сравнительно небольшой порции белка от рибосомных частиц впервые было получено на рибосомах *E. coli*, обработанных высокой концентрацией $CsCl$ (Meselson et al., 1964). Впоследствии было показано, что с помощью высоких концентраций $CsCl$ можно получить дальнейшее последовательное ступенчатое «разделение» рибосомных частиц *E. coli* (Spirin et al., 1965; Спири́н и др., 1966; Lerman et al., 1966; Гаврилова и др., 1966); этот многостадийный процесс и обозначается как *разборка* рибосомных частиц.

Аналогичную ступенчатую разборку, вплоть до почти «голой» РНК, можно осуществить, применяя также высокие концентрации (2—6 М) $LiCl$ (Itoh et al., 1968), а также других солей одновалентных катионов — $NaCl$, KCl , частично NH_4Cl . Процедуру разборки, разработанную для бактериальных рибосом, можно с успехом, как оказалось, применить и для животных рибосомных частиц (Лерман, 1968).

Схематически процесс разборки рибосомных частиц *E. coli* может быть представлен следующим образом:



В целом, по силе и способу удержания в рибосомной частице все белковые молекулы (полипептидные цепи) обеих субчастиц бактериальной рибосомы, 50S и 30S, грубо распадаются на два больших класса: 1) белки, диссоциирующие от рибосомной частицы в условиях высокой концентрации соли (например, 3—6М $CsCl$ или $LiCl$) при наличии некоторого количества Mg^{++} в частицах или в среде; 2) белки, более прочно удерживаемые, не диссоциирующие в этих условиях, а отделя-

емые от РНК лишь при совместном действии соли и ЭДТА (частично) или соли и мочевины (полностью) (Spirin et al., 1965; Lerman et al., 1966; Marcot-Queiroz, Monier, 1966; Atsmon et al., 1967; Гарбер, Барулина, 1968; Itoh et al., 1968). Каждый класс включает в себя приблизительно половину белков (полипептидных цепей) рибосомной субчастицы. В результате диссоциации всех белков первого класса, т. е. под действием высокой концентрации соли (без ЭДТА или мочевины) на рибосомные частицы, образуются «раздетые» 28 S — 25 S (производные от 50 S) и 20—22 S (производные от 30 S) рибонуклеопротеидные частицы (см. схему разборки). Белок, формирующий эти 28 S—25 S и 20—22 S частицы, может быть обозначен как *базальный структурный белок* рибосом. Соответственно, диссоциирующий белок, т. е. белок, составляющий первый из двух упомянутых классов, может быть обозначен как *дополнительный рибосомообразующий белок*. Экспериментально было показано, что каждый класс белков содержит полипептидные цепи разнообразной основности, и различная сила удержания этих двух классов рибосомального белка в составе рибосомной частицы вовсе не определяется основностью их полипептидных цепей (Гарбер, Барулина, 1968).

Наиболее важной и характерной чертой процесса диссоциации белков первого класса, т. е. дополнительного рибосомообразующего белка, является то, что отщепление белка от рибосомной частицы в условиях высокой ионной силы происходит не как постепенная диссоциация многочисленных независимых белковых молекул, а небольшими дискретными, *кооперативными группами* (Spirin et al., 1965; Lerman et al., 1966). Соответственно, превращение рибосомных частиц в базальные РНП-частицы идет через ряд *дискретных* стадий (см. схему разборки: 50 S → 43 S → 36 S → 32 S → 28 S - 25 S и 30 S → 28 S → 23 S → 20 - 22 S). Это означает, что в процессе инкубации в растворе с высокой ионной силой от рибосомной частицы отщепляется не последовательно по одному белку, а на каждой стадии отщепляется сразу группа белков. Вероятно, эти кооперативные группы в большинстве случаев очень небольшие и включают в себя всего по 3—4 белка (полипептидных цепи).

Следует отметить, что в процессе описанного «раздевания» большая рибосомная субчастица теряет не только белки, но и свою низкомолекулярную (5 S) РНК. Отщепление 5 S РНК происходит вместе с отщеплением определенной группы белков; установлено, что 43 S — 40 S частицы (а, возможно, и 38 S — 36 S частицы) еще содержат связанную с ними 5 S РНК, тогда как «базальные» 28 S — 25 S частицы уже полностью ли-

шены ее (Marcot-Queiroz, Monier, 1967; Morell, Mármur, 1968; Staehelin et al., 1969).

Кооперативность отщепления каждой небольшой группы дополнительного рибосомообразующего белка может указывать на то, что в составе рибосомы различные полипептидные цепи, входящие в группу, вместе формируют единый белковый комплекс с четвертичной структурой. Формирование таких белковых четвертичных структур внутри рибосомы может быть связано с формированием соответствующих внутририбосомных функциональных центров.

Необходимо отметить, что сами указанные небольшие группы в свою очередь, по-видимому, взаимозависимы, и отщепление одной группы белков от рибосомной частицы индуцирует более легкое отщепление следующей группы. Таким образом, рибосомная субчастица является частично кооперативной системой в целом. Эта кооперативность, однако, не предполагает обязательных контактных взаимодействий между группами белков, а может обуславливаться конформационными изменениями частицы, индуцируемыми отщеплением той или иной группы белков.

В отношении базального структурного белка рибосомных субчастиц следует сказать, что в его удержании в составе рибонуклеопротеида особенно большую роль играет непосредственное специфическое взаимодействие с определенными участками рибосомальной РНК. Так, в 30 S субчастице базальными белками являются по крайней мере 7—8 белков (S4, S7, S8, S15, S17, S19, S20, согласно номенклатуре Виттмана — см. табл. 5). Из них 4 белка — S4, S7, S8 и S20 — обнаруживают большую или меньшую способность непосредственно удерживаться рибосомальной 16 S РНК, даже в отсутствие других белков; S4 и S20 удерживаются очень специфично и прочно на 16 S РНК, независимо от других белков; удержание S8 и S7 стимулируется наличием S4 и S20 (Schaup et al., 1971). Остальные базальные белки 30 S субчастицы требуют для прочного удержания наличия на РНК S4, S7, S8 и S20 и в значительной степени стимулируют удержание друг друга, т. е. также формируют частично кооперативную систему (Mizushima, Nomura, 1970).

Разделение тотального рибосомального белка на два класса — базальный структурный белок и дополнительный рибосомальный белок — нашло в последнее время подтверждение в том, что при обработке 30 S рибосомных субчастиц экзогенными агентами — протеазами или химическими модификаторами — белки (полипептидные цепи) первого класса оказались недоступными (экранированными, «внутренними»),

а белки второго класса — доступными для этих агентов, т. е. открытыми с поверхности («наружными») (Chang, Flaks, 1970; Craven, Gupta, 1970).

б. Свойства промежуточных рибонуклеопротеидных частиц

Итак, в процессе ступенчатой разборки рибосомных частиц образуется целый спектр последовательных, дефицитных по белку производных (см. схему разборки). Каждое из этих производных может быть в известных условиях получено в более или менее чистом виде и проанализировано (Lerman et al., 1966; Itoh et al., 1968). Все они являются рибонуклеопротеидами, содержащими целую интактную рибосомальную РНК, 23 S или 16 S. Первая группа производных — 43 S — 32 S и 28 S — 23 S частицы — это рибонуклеопротеиды, являющиеся промежуточными, хотя и дискретными, состояниями при инкубации рибосом в высокой концентрации соли; они могут быть обозначены как «интерсомы». Вторая группа производных — 28 S — 25 S и 20 — 22 S — представляют собой, как уже указывалось, конечное состояние при «раздевании» рибосомных субчастиц в условиях высокой концентрации соли без ЭДТА и мочевины и потому могут быть названы «минисомами», или базальными рибонуклеопротеидными частицами. Некоторые свойства всех этих частиц даны в табл. 7.

Таблица 7

Терминология и свойства рибосомных частиц *E. coli* и их естественных предшественников или искусственных, дефицитных по белку, последовательных производных

Свойства	Рибосомные субчастицы	«Неосомы» (?)				«Эсосомы» (?)	
		«Интерсомы» (промежуточные РНП-частицы)			«Минисомы» (базальные РНП-частицы)	?	РНК
		I	II	III			
Коэффициент седиментации, ед. Сведберга	50	43—40	38—36	~52	23—25	~25	23
	30	28—25		23	22—20	~16	16
Содержание белка, %	38—35	30	27—25	24—22	20—15	≤5	0
Плавучая плотность в CsCl, г/см ³	1,02—1,04	1,66—1,67	1,68—1,69	1,70—1,72	1,73—1,76	?	≥1,9

Свойства промежуточных 43 S — 32 S и 28 S — 23 S частиц («интерсом»). Дефицитные по белку производные 50 S и 30 S рибосомных субчастиц могут быть получены путем длительного (равновесного, около 36 часов) *центрифугирования* рибосом *E. coli* в градиенте плотности CsCl в присутствии относительно высокой концентрации Mg^{++} — 0,02 — 0,04 M (Meselson et al., 1964; Hosokawa et al., 1966; Staehelin, Meselson, 1966). Полученные таким путем производные в 0,01 M фосфатном буфере с 0,001 M Mg^{++} или в 0,01 M *трис*-буфере с 10^{-4} — 5×10^{-4} M Mg^{++} характеризовались коэффициентами седиментации 40—42 и 23 ед. Сведберга. По косвенным данным, основанным на расчете количества радиоактивной серы в предварительно меченном тотальном белке и отщепленном белке, они имели 60—80% исходного белкового содержания. Плавающая плотность в CsCl при 0,02 — 0,04 M Mg^{++} составляла около 1,66 г/см³, тогда как исходные рибосомные частицы в тех же условиях давали плавающую плотность около 1,62 г/см³.

Аналогичные частицы могут быть получены путем длительной (15—72 часа) *инкубации* рибосом *E. coli* в 5 M CsCl, но при относительно низкой концентрации Mg^{++} — около 0,002 M (Lergman et al., 1966). В 0,01 M фосфатном буфере с 0,001 M Mg^{++} полученные частицы характеризовались коэффициентами седиментации $S_{20,w}^0$ либо 42—43 и 28 ед. Сведберга, либо в результате более длительной инкубации в CsCl — 36 и 23 ед. Сведберга. Прямые определения количества белка показали, что эти частицы содержали около 30% белка, т. е. около 80% исходного белкового содержания. Средняя плавающая плотность в CsCl при 0,003 M Mg^{++} составляла 1,68 — 1,69 г/см³; исходные рибосомы в тех же условиях имели плавающую плотность 1,62 — 1,64 г/см³.

Указанные частицы, названные здесь «интерсомами», различными авторами обозначаются по-разному: А-компонент, или «А-частицы», «сердцевинные» (core) частицы, «субрибосомные частицы», «ободранные частицы» и т. п.

Из схемы разборки и из табл. 7 видно, что «интерсомы» могут быть подразделены по крайней мере на две-три подгруппы, различающиеся разным содержанием белка: среди производных 50 S субчастиц можно выделить подгруппу 40 — 43 S частиц (около 85% исходного количества белка 50 S субчастицы), подгруппу 36 — 38 S частиц (около 75% исходного количества белка) и подгруппу 32 S частиц (около 60 — 70% исходного количества белка, отсутствие 5 S РНК); среди промежуточных производных 30 S субчастиц можно выявить подгруппу 25—28 S частиц (80—85% исходного количества

белка 30 S субчастицы) и подгруппу 23 S частиц (60 — 70% исходного количества белка). Коэффициенты седиментации «интерсом», по-видимому, сравнительно мало зависят от концентрации ионов Mg^{++} в растворе, во всяком случае в пределах от 10^{-4} до $10^{-3}M$.

«Интерсомы», в отличие от исходных рибосомных субчастиц, функционально не активны: они не способны связывать мРНК и тРНК (Raskas, Staehelin, 1967; Nomura, Traub, 1966), так же как и в целом осуществлять синтез полипептида *in vitro* (Hosokawa et al., 1966; Staehelin, Meselson, 1966; Nomura, Traub, 1966).

Свойства «минимальных» рибонуклеопротеидных 28 S и 20 S частиц («минисом»). Еще более дефицитные по белку производные могут быть получены из рибосомных частиц или из «интерсом» путем центрифугирования через концентрированные (2 — 3M) растворы CsCl или LiCl с небольшим содержанием Mg^{++} (2×10^{-3} — $5 \times 10^{-3}M$) (Spin et al., 1965; Спирин и др., 1966; Lerman et al., 1966; Marcot-Queiroz, Monier, 1966). Получаемые частицы содержат всего около 50% исходного содержания белка в рибосомах. Соответственно, их плавучая плотность в CsCl при $2 \times 10^{-3}M$ Mg^{++} составляет 1,73—1,76 г/см³. Коэффициенты седиментации их сильно зависят от концентрации частиц и от концентрации ионов Mg^{++} . Величины $S_{20,w}^0$ при $10^{-3}M$ Mg^{++} составляют около 28 (± 2) и 20 (± 2) ед. Сведберга; при $10^{-4}M$ Mg^{++} они существенно ниже — около 25 и 18 ед. Сведберга. Увеличение ионной силы за счет одновалентных ионов также приводит к увеличению коэффициентов седиментации. Очевидно, это отражает обратимые конформационные изменения частиц в зависимости от ионов Mg^{++} и ионной силы. Показано, что эти изменения состоят в разворачивании (разрыхлении) частиц при уменьшении концентрации Mg^{++} и ионной силы (Иванов, 1967, не опубликовано).

По всем изученным свойствам получаемые частицы очень похожи на частицы типа предшественников рибосом, особенно в большом количестве накапливающиеся *in vivo* при ингибировании белкового синтеза в бактериальных клетках с помощью хлорамфеникола («СМ-частицы»), пуромидина («РМ-частицы»), при недостатке требуемой аминокислоты («РС-частицы») и т. д. Поэтому рассматриваемые здесь искусственно «ободренные» производные рибосом, названные «минисомами», иногда обозначаются также как «ХМ-подобные» («СМ-like») частицы.

в. Самосборка

Процесс разборки рибосомных частиц в ряде случаев оказался обратимым. Другими словами, в определенных условиях продукты разборки (по крайней мере, неполной разборки) способны снова специфически воссоединяться в рибосомные частицы, обладающие функциональной (белок-синтезирующей) активностью. Такая реконструкция биологически активных рибосомных частиц происходит спонтанно и представляет собой пример *самосборки* сложной биологической структуры.

Проблема экспериментального осуществления сборки рибосомных частиц из высокомолекулярного каркаса и отдельных рибосомальных белков в условиях *in vitro* была впервые поставлена в 1963 году, когда удалось показать, что дефицитные по белку предшественники рибосом, накапливающиеся в клетках *E. coli*, ингибированных хлорамфениколом (так называемые «СМ-частицы»)¹, способны *in vitro* присоединять дополнительный белок и превращаться в компактные частицы, не отличимые от нормальных рибосомных частиц по физическим и химическим критериям (Шакулов и др., 1963; Spirin, 1963).

Именно вышеуказанные опыты послужили стимулом для попыток искусственно получить «ХМ-подобные» («СМ-like») минисомы путем «раздевания» рибосомных частиц, а затем обратить этот процесс и реконструировать рибосомы (Lerman et al., 1966; Спирин и др., 1966). Действительно, процесс раз-

¹ Вера в то, что содержащие рибосомальную РНК рибонуклеопротеидные частицы, выделяемые из ингибированных хлорамфениколом клеток *E. coli* (так называемые «хлоромитетиновые», или «СМ-частицы»; см. Nomura, Watson, 1959; Kurland et al., 1962; Hosokawa, Nomura, 1965; Nomura, Hosokawa, 1965), являются дефицитными по белку предшественниками рибосом, была поколеблена сообщением Йошида и Осава (Yoshida, Osawa, 1968). Они показали, что белок «СМ-частиц» не является рибосомальным и что образование «СМ-частиц» есть, по-видимому, результат взаимодействия белка клеточного экстракта с рибосомальной РНК при гомогенизации клеток *E. coli*. Однако в других сообщениях были представлены доказательства рибосомальной природы белков «СМ-частиц» (Fenske et al., 1968; Lefkovits, DiGirolamo, 1969). Возможно, что эти расхождения объясняются различиями в дозах, длительности и условиях применения хлорамфеникола для ингибирования белкового синтеза; от этого может зависеть, накапливаются ли преимущественно голые рибосомальные 23S и 16S РНК или же «полуодетые» белком 25S и 18S предшественники рибосом. Во всяком случае, опыты по образованию *in vitro* рибосомоподобных частиц из «СМ-частиц» и фракции лишь «дополнительного» рибосомального белка (Лерман и др., 1967) подтверждают, что могут существовать «СМ-частицы», содержащие рибосомальный («базальный») белок и являющиеся, по-видимому, предшественниками рибосом.

Сборки рибосомных частиц до минисомных («ХМ-подобных») частиц, имеющих 50% исходного белкового содержания, оказался сравнительно легко обратимым. Если к суспензии минисом, полученных в результате отщепления от рибосомных частиц половины их структурного белка, добавить этот отщепленный белок («дополнительный рибосомообразующий белок»), то в буфере в присутствии ионов Mg^{++} 28 S и 20 S минисомы специфически воссоединяются с белком, давая 50 S и 30 S рибосомоподобные частицы (Lerman et al., 1966), способные функционировать (синтезировать полипептид) в белок-синтезирующей системе (Spirin, Belitsina, 1966; Спирин и др. 1966).

Независимо было показано, что реконструкция биологически активных рибосомных частиц может быть проведена также из менее «раздетых» промежуточных частиц — из 43 S и 28 S — 23 S интерсом, имеющих, по-видимому, 70—80% исходного белкового содержания (Hosokawa et al., 1966; Staehelin, Meselson, 1966).

В последнее время были предприняты попытки добиться обращения всех стадий разборки, т. е. реконструировать рибосомы из полностью «раздетой» РНК и соответствующих фракций рибосомального белка.

При попытках реконструировать 50 S субчастицу *E. coli* из рибосомальной 23 S РНК и рибосомального белка была применена процедура двухстадийной сборки: сначала 23 S РНК объединялась с белками «базальной» фракции (см. выше, раздел V, 2, а), а затем полученные рибонуклеопротеидные 28 S частицы объединялись с фракцией «дополнительного» рибосомального белка (Спирин и др., 1968). Присоединение белка к 23 S РНК было специфическим в том смысле, что гомогенные рибонуклеопротеидные частицы образовывались лишь с рибосомальным белком 50 S субчастиц. В результате были получены частицы, подобные рибосомным 50 S субчастицам по седиментационным свойствам и содержанию белка. Набор белков, согласно электрофоретическим данным, был неотличим от набора белков в нормальных 50 S субчастицах (Гарбер, 1968, не опубликовано). Однако реконструированные частицы были биологически не активны, и ни добавление избытка 5 S РНК, ни нагревание в присутствии ионов Mg^{++} не активировало их (Белицина, Позднякова, 1968, не опубликовано).

В противоположность этому, объединение рибосомальной 16 S РНК с рибосомальным белком 30 S субчастицы *E. coli* дало в результате 100%-ную реконституцию биологически активных 30 S субчастиц (Traub, Nomura, 1968). Эта полная

самосборка биологически активной 30 S субчастицы происходила с равно высокой эффективностью как при проведении реакции в две последовательные стадии, когда белки присоединялись к 16 S РНК двумя порциями, так и из смеси 16 S РНК сразу с полным набором белков 30 S субчастицы, т. е. в одну стадию. Оптимальными условиями самосборки 30 S субчастицы оказалось сочетание высокой ионной силы (0,3 M KCl), относительно высокой концентрации Mg^{++} (0,02 M $MgCl_2$) и повышенной (физиологической) температуры (37°). Взаимодействие белка с РНК идет не как присоединение независимых молекул к каркасу, а наблюдается отчетливо выраженная, хотя лишь частичная, кооперативность (Traub, Nomura, 1969). Было найдено, что указанная самосборка идет через функционально неактивный промежуточный рибонуклеопроteid, содержащий почти полный набор белков, но не имеющий надлежащей компактной конформации. Эти неактивные частицы имеют седиментационный коэффициент 22 S. Лишь инкубация при повышенной температуре обеспечивает пространственную реорганизацию неактивной 22 S частицы в активную частицу. Указанная реорганизация сопровождается присоединением нескольких дополнительных белков. Пространственная реорганизация частицы при нагревании представляет собой, вероятно, переукладку рибонуклеопроteidного тяжа, и лишь после этой переукладки разрешается присоединение оставшихся нескольких белков (Traub, Nomura, 1969).

Таким образом, самосборка рибосомной частицы не может рассматриваться столь упрощенно, как независимое узнавание белками своих мест на РНК с формированием рибонуклеопроteidного тяжа, и уж затем сворачивание тяжа в компактную частицу. Очевидно, что процессы формирования рибонуклеопроteidного тяжа и его сворачивание могут быть взаимозависимы, и последняя стадия присоединения белка требует не просто наличия РНК или рибонуклеопроteidного тяжа, а тяжа в совершенно определенной, специфической конформации.

Недавно в условиях, аналогичных условиям для самосборки биологически активных 30 S субчастиц *E. coli*, Номура и Эрдманн (Nomura, Erdmann, 1970) осуществили сборку функционально активных 50 S субчастиц из 23 S РНК и рибосомальных белков термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*; по-видимому, термофильная природа исходного организма обеспечила большую стабильность нативной конформации каких-то рибосомальных белков, по сравнению с рибосомальными белками *E. coli*. Однако авторы отмечают, что процесс самосборки 50 S субчастиц *in vitro* проходил зна-

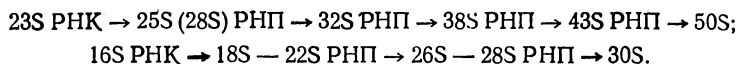
чительно медленнее, чем сборка этих частиц *in vivo* или чем самосборка 30 S субчастиц, откуда делается вывод о возможной роли каких-то внешних факторов в естественной сборке 50 S субчастиц, в отличие от 30 S субчастиц (Nomura, Erdmann, 1970).

По-видимому, формирование рибосомных частиц *in vivo* представляет собой процесс сборки, аналогичный сборке *in vitro*, но идет всегда в несколько последовательных дискретных стадий, через ряд дефицитных по белку рибонуклеопротеидных частиц-предшественников — «неосом» (Britten et al., 1962). Каждая стадия означает более или менее кооперативное присоединение нескольких белков к высокомолекулярному каркасу (РНК или РНП). Согласно последним данным Осава с сотрудниками (Osawa et al., 1969), формирование рибосомной 50 S субчастицы *E. coli in vivo* идет следующим образом: сначала 23 S РНК комбинируется с первой группой белков, что приводит к образованию ~ 30 S РНП-частицы; затем присоединение второй группы белков дает в результате ~ 40 S РНП-частицу; окончательная сборка в 50 S субчастицу состоит в присоединении 5 S РНК и третьей группы белков. Рибосомная 30 S субчастица, согласно Осава (Osawa, 1968), формируется *in vivo* за счет аналогичного последовательного ступенчатого присоединения белков через стадии 16 S РНК, 22 S РНП и 26 S РНП.

Существование промежуточных стадий 32 S РНП и 43 S РНП в формировании 50 S субчастицы и 21 S РНП в формировании 30 S субчастицы подтверждается недавними данными по накоплению этих промежуточных продуктов у мутантов, дефектных по признаку сборки рибосом (subunit assembly defective mutants, см. Guthrie et al., 1969 a, b). Ранее 25 S РНП и 32 S РНП, содержащие рибосомальную 23 S РНК, и 18 S РНП и 28 S РНП, содержащие рибосомальную 16 S РНК, были выделены из клеток *E. coli*, где формирование рибосом было ингибировано хлорамфениколом (25 S и 18 S РНП) или фторурацилом (32 S и 28 S РНП); предполагалось, что накопление этих частиц в присутствии ингибиторов отражает накопление предшественников рибосом на одной из стадий сборки *in vivo* (Копо, Osawa, 1964; Iwabuchi et al., 1965). Методом прослеживания пульсовой метки в рибосомальной РНК удавалось в нормальных клетках *E. coli* обнаружить 32 S РНП, 38 S РНП и 43 S РНП, содержащие 23 S РНК, и 26 S РНП, содержащий 16 S РНК (Iwabuchi et al., 1965; Mangiarotti et al., 1968).

Таким образом, в целом можно дать следующую предположительную схему последовательных стадий сборки рибосом-

ных субчастиц *in vivo* (у *E. coli*):



Нельзя не видеть практически полного совпадения этой независимо сформулированной схемы биогенеза рибосом *in vivo* с вышеприведенной схемой разборки рибосом (см. стр. 121), если рассматривать ее в обратном направлении, справа налево. В настоящее время можно, по-видимому, принять, что рибосомы в клетке собираются из рибосомальной РНК и многочисленных полипептидных цепей рибосомального белка через несколько дискретных состояний по схеме, демонстрирующей ступенчатую разборку рибосом, но с противоположным направлением всего процесса. Сборка 30 S субчастицы представляет собой, по-видимому, истинную спонтанную *самосборку*. В сборке 50 S субчастицы пока нельзя исключать возможности участия также некоторого внешнего фактора, направляющего, регулирующего или катализирующего по крайней мере одну из стадий процесса; в частности, таким фактором может быть 30 S субчастица или ее предшественник (Nashimoto, Nomura, 1970).

Возможность правильной спонтанной сборки многочисленных и разнообразных белковых молекул (полипептидных цепей) в рибосомную частицу означает, что имеется очень специфическое и точное узнавание каждой молекулой своего места в рибосоме. В связи с этим весьма вероятно, что сборку направляет некий специфический организующий каркас, роль которого могла бы играть цепь рибосомальной РНК. Таким образом, можно сформулировать следующую гипотезу о *функциональной роли рибосомальной РНК* в клетке: цепь рибосомальной РНК служит в первую очередь своего рода *каркасом или матрицей для специфического размещения на ней молекул рибосомального белка*; при этом каждый участок РНК со специфической нуклеотидной последовательностью узнается совершенно определенным белком; тем самым нуклеотидная последовательность рибосомальной РНК детерминирует набор и порядок расположения рибосомальных белков. Разумеется, присоединение первой порции белков в процессе сборки может детерминироваться *непосредственно* нуклеотидной последовательностью РНК, тогда как присоединение следующих порций белков скорее всего должно определяться совместно структурой РНК и *уже присоединенными белковыми молекулами*, т. е. в последнем случае каркасом или матрицей будет служить рибонуклеопротеид в своей специфической конформации.

Каркасная роль рибосомальной РНК может, разумеется, выступать не только в процессе самосборки, но в сохранении целостности и в функционировании уже готовых рибосомальных частиц. Конечно, гипотеза о каркасной роли рибосомальной РНК не исключает возможности непосредственного функционирования ее участков в связывании компонентов белок-синтезирующей системы.

3. Некоторые общие выводы о четвертичной структуре рибосомных субчастиц

а) Четвертичная структура каждой рибосомной субчастицы представляет собой довольно *компактную упаковку молекул белка и участков РНК*.

Компактность структуры обеспечивается наличием тесных внутририбосомных взаимодействий. Это не только взаимодействия РНК с белком, но и, по-видимому, тесные белок-белковые взаимодействия.

Большую роль во внутририбосомных взаимодействиях, обеспечивающих компактность частиц, играют связанные в рибосоме ионы Mg^{++} . Эта роль ионов Mg^{++} состоит, во-первых, в том, что они, нейтрализуя фосфаты и карбоксилы, подавляют внутририбосомное электростатическое отталкивание и тем самым разрешают белок-белковые и иные взаимодействия; во-вторых, в том, что они могут образовывать и, по-видимому, образуют прямые Mg^{++} -мостики внутри рибосомы, создавая систему внутририбосомных сшивок.

б) В организации внутририбосомных взаимодействий существует определенная *кооперативность*. Даже взаимодействие белка с РНК в рибосоме нельзя рассматривать как простое электростатическое взаимодействие независимых молекул белка с фосфатными группами РНК, а лишь как кооперативную систему из взаимодействующих друг с другом белковых молекул (полипептидных цепей) и участков РНК.

Изучение процессов конформационных превращений рибосом типа разворачивания и разборки *in vitro* с определенностью указывает на то, что благодаря кооперативности каждая рибосомная частица представляет собой довольно устойчивую систему. Для того чтобы вызвать ее превращение типа разворачивания или разборки, необходимо выйти, по-видимому, далеко за пределы тех воздействий, которые возможны в физиологических условиях. Обнаруживаемая кооперативность в организации рибосомных субчастиц является важной

характеристикой, гарантирующей рибосому от возможных изменений и искажений не только в меняющихся условиях *in vivo*, но и при довольно грубых процедурах выделения.

в) При наличии кооперативности четвертичная структура каждой рибосомной субчастицы вместе с тем иррегулярна и *несимметрична*. Это следует прежде всего из того, что она строится из большого количества неповторяющихся — разных — белковых субъединиц.

г) Роль высокомолекулярной рибосомальной РНК каждой субчастицы можно видеть в том, что она является единым *ковалентно-непрерывным каркасом* для размещения разнообразных рибосомальных белков.

С одной стороны, при создании столь сложной и несимметричной четвертичной структуры, включающей 20 или более разных белковых субъединиц, и при необходимости очень строгого, уникального пространственного размещения всех этих разных субъединиц чрезвычайно сильно должны возрастать трудности сборки такой четвертичной структуры в процессе естественного биогенеза. Вряд ли можно было бы рассчитывать на надежную безошибочную сборку столь сложной структуры только за счет парных белок-белковых узнаваний, характерных для обычных белковых четвертичных структур. Поэтому соблазнительно видеть биологическую роль высокомолекулярной рибосомальной РНК как раз в том, что она, будучи единым ковалентно-непрерывным каркасом для размещения рибосомальных белков, обеспечивает надлежащую сборку многочисленных разнообразных белковых субъединиц в уникальную четвертичную структуру.

С другой стороны, каркасная роль рибосомальной РНК, вероятно, не заканчивается после завершения сборки, а продолжает быть важным фактором поддержания нативной четвертичной структуры функционирующих рибосомных субчастиц.

д) Из однотипности структурных превращений рибосомных субчастиц следует также, что все основные принципы четвертичной структуры обеих рибосомных субчастиц, большой (50 S или 60 S) и малой (30 S или 40 S), несмотря на различие размеров и формы, по-видимому, одинаковы.

Л и т е р а т у р а

- Гаврилова Л. П., Лерман М. И., Спирин А. С. 1966. Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 826.
Гарбер М. Б., Барулина Н. А. 1968. Молекулярная биология, 2, 448.
Лерман М. И. 1968. Молекулярная биология, 2, 209.

- Лерман М. И., Зиммерман Р. А., Гаврилова Л. П., Спири́н А. С. 1967. Молекулярная биология, 1, 12.
- Спири́н А. С. 1963. Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот. М., Изд-во АН СССР.
- Спири́н А. С., Белицина Н. В., Гал Э., Позднякова Т. М. 1968. Молекулярная биология, 2, 95.
- Спири́н А. С., Киселев Н. А., Шакулов Р. С., Богданов А. А. 1963. Биохимия, 28, 920.
- Спири́н А. С., Лерман М. И., Гаврилова Л. П., Белицина Н. В. 1966. Биохимия, 31, 424.
- Шакулов Р. С., Айтхожин М. А., Спири́н А. С. 1962. Биохимия, 27, 744.
- Шакулов Р. С., Богданов А. А., Спири́н А. С. 1963. Докл. АН СССР, 153, 224.
- Atsmon A., Spitnik-Elson P., Elson D. 1967. J. Mol. Biol., 25, 161.
- Britten R. J., McCarthy B. J., Roberts R. B. 1962. Biophys. J., 2, 83.
- Cammack K. A., Wade H. E. 1965. Biochem. J., 96, 671.
- Chang F. N., Flaks J. G. 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 1321.
- Comb D. G., Sarkar N. 1967. J. Mol. Biol., 25, 317.
- Cotter R. I., McPhie P., Gratzner W. B. 1967. Nature, 216, 864.
- Cox R. A. 1969a. Biochem. J., 114, 743.
- Cox R. A. 1969b. Biochem. J., 114, 753.
- Craven G. R., Gupta V. 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 1329.
- Elson D. 1961. Biochim. Biophys. Acta, 53, 232.
- Elson D. 1964. Biochim. Biophys. Acta, 80, 379.
- Fenske H., Venker P., Lindigkeit R. 1968. Acta biol. med. germ., 20, K5.
- Galibert F., Larsen Ch. J., Lelong J. C., Boiron M. 1966. Bull. soc. chim. biol., 48, 21.
- Gavrilova L. P., Ivanov D. A., Spirin A. S. 1966. J. Mol. Biol., 16, 473.
- Gesteland R. F. 1966. J. Mol. Biol., 18, 356.
- Ghosh N. 1969. Biochem. J., 115, 1005.
- Gould H. J., Arnstein H.R.V., Cox R. A. 1966. J. Mol. Biol., 15, 600.
- Guthrie C., Nashimoto H., Nomura M. 1969a. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63, 384.
- Guthrie C., Nashimoto H., Nomura M. 1969b. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 69.
- Hall C. E., Slayter H. S. 1959. J. Mol. Biol., 1, 329.
- Hamilton M. G., Petermann M. L. 1959. J. Biol. Chem., 234, 1441.
- Hart R. G. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 60, 629.
- Henshaw E. C. 1964. J. Mol. Biol., 9, 610.
- Hill W. E., Rossetti G. P., Van Holde K. E. 1969. J. Mol. Biol., 44, 263.
- Hosokawa K., Nomura M. 1965. J. Mol. Biol., 12, 225.
- Hosokawa K., Fujimura R. K., Nomura M. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 198.
- Huxley H. E., Zubay G. 1960. J. Mol. Biol., 2, 10.
- Itoh T., Otaka E., Osawa S. 1968. J. Mol. Biol., 33, 109.
- Iwabuchi M., Kono M., Oumi T., Osawa S. 1965. Biochim. Biophys. Acta, 108, 211.
- Kisselev N. A., Gavrilova L. P., Spirin A. S. 1961. J. Mol. Biol., 3, 778.
- Kono M., Osawa S. 1964. Biochim. Biophys. Acta, 87, 326.
- Kuff E. L., Zeigel R. F. 1960. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7, 465.
- Kurland C. G., Nomura M., Watson J. D. 1962. J. Mol. Biol., 4, 388.
- Lamfrom H., Glowacki E. R. 1962. J. Mol. Biol., 5, 97.
- Lefkowitz I., DiGirolamo M. 1969. Biochim. Biophys. Acta, 174, 561.
- Lerman M. I., Spirin A. S., Gavrilova L. P., Golov V. F. 1966. J. Mol. Biol., 15, 268.
- Mangiurrotti G., Apirion D., Schlessinger D., Silengo L. 1968. Biochemistry, 7, 456.

- Marcot-Queiroz J., Monier R. 1966. *Bull. soc. chim. biol.*, **48**, 446.
Marcot-Queiroz J., Monier R. 1967. *Bull. soc. chim. biol.*, **49**, 477.
Meselson M., Nomura M., Brenner S., Davern C., Schlessinger D. 1964. *J. Mol. Biol.*, **9**, 696.
Miall S. H., Walker I. O. 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, **174**, 551.
Mizushima S., Nomura M. 1970. *Nature*, **226**, 1214.
Möller W., Amons R., Groene J. C. L., Garrett R. A., Terhorst C. P. 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 381.
Morell P., Marmur J. 1968. *Biochemistry*, **7**, 1141.
Morgan R. S. 1962. *J. Mol. Biol.*, **4**, 115.
Nashimoto H., Nomura M. 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1440.
Natori S., Maruta H., Mizuno D. 1968. *J. Mol. Biol.*, **38**, 109.
Nomura M., Erdmann V. A. 1970. *Nature*, **228**, 744.
Nomura M., Hosokawa K. 1965. *J. Mol. Biol.*, **12**, 242.
Nomura M., Mizushima S., Ozaki M., Traub P., Lowry C. V. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 49.
Nomura M., Traub P. 1966. *Organizational Biosynthesis*. Acad. Press, New York.
Nomura M., Traub P., Bechmann H. 1968. *Nature*, **219**, 753.
Nomura M., Watson J. D. 1959. *J. Mol. Biol.*, **1**, 204.
Osawa S. 1968. *Annual Review Biochem.*, **37**, 109.
Osawa S., Otaka E., Itoh T., Fukui T. 1969. *J. Mol. Biol.*, **40**, 321.
Petermann M. L., Pavlovic A. 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 264.
Raskas H. J., Staehelin T. 1967. *J. Mol. Biol.*, **23**, 89.
Rodgers A. 1964. *Biochem. J.*, **90**, 548.
Santer M. 1963. *Science*, **141**, 1049.
Sarkar N., Comb D. G. 1969. *J. Mol. Biol.*, **39**, 31.
Schaup H. W., Green M., Kurland C. G. 1971. *Molec. Gen. Genetics*, **109**, 193.
Siddiqui M. A. Q., Hosokawa K. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 1.
Siddiqui M. A. Q., Hosokawa K. 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 711.
Spirin A. S. 1960. *J. Mol. Biol.*, **2**, 436.
Spirin A. S. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 267.
Spirin A. S. 1969. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **19**, 133. Pergamon Press, Oxford — London — Edinburgh — New York — Toronto — Sydney — Paris — Braunschweig.
Spirin A. S., Belitsina N. V. 1966. *J. Mol. Biol.*, **15**, 282.
Spirin A. S., Belitsina N. V., Lerman M. I. 1965. *J. Mol. Biol.*, **14**, 611.
Staehelin T., Maglott D., Monro R. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 39.
Staehelin T., Meselson M. 1966. *J. Mol. Biol.*, **16**, 245.
Stanley W. M., Bock R. M. 1965. *Biochemistry*, **4**, 1302.
Tal M. 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 76.
Tashiro Y., Stekevitz P. 1965. *J. Mol. Biol.*, **11**, 149.
Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R. 1959. *J. Mol. Biol.*, **1**, 221.
Traub P., Nomura M. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 777.
Traub P., Nomura M. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 63.
Ts'o P. O. P., Bonner J., Vinograd J. 1958. *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 570.
Weller D. L., Horowitz J. 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 361.
Weller D. L., Shechter Y., Musgrave D., Rougvie M., Horowitz J. 1968. *Biochemistry*, **7**, 3668.
Yoshida K., Osawa S. 1968. *J. Mol. Biol.*, **33**, 559.

VI

Заключение: общие принципы строения рибосомы

Предыдущие разделы свидетельствуют о том, что в отношении строения рибосом накоплено много фактического материала. Накапливаются новые факты. И поэтому становится необходимым не только систематизировать все эти данные — попытка систематизации сделана в предшествующих разделах, — но и специально выделить особо важные из них, составляющие *костяк* наших современных представлений о строении рибосомы.

Как всегда, фактов принципиального значения, раскрывающих существо устройства рибосомы, оказывается немного. За пятнадцатилетнюю историю изучения рибосом, после первого их обнаружения, выделения и анализа, можно выделить три главных открытия, заложивших основы сегодняшних знаний о строении рибосомы.

Прежде всего, в 1957—1958 гг. было открыто, что рибосома построена из двух неравных субчастиц (Chao, 1957; Tissières, Watson, 1958). Построение рибосомы из двух неравных субчастиц оказалось универсальным принципом и получало неизменные подтверждения в самых разных исследованиях рибосом. Очевидно, что *принцип двух неравных субчастиц* может быть сформулирован как одна из фундаментальных, наиболее очевидных и в то же время наиболее характерных черт в строении рибосомы.

Далее, в 1961 году был обнаружен другой первостепенной важности факт — то, что рибосома имеет большое разнообразие белков (полипептидных цепей) в своем составе (Waller, Haggis, 1961). Все последующее развитие знаний о рибосомальном белке полностью подтвердило вывод, что тотальный белок каждой рибосомной субчастицы представляет собой сложный набор разнообразных полипептидных цепей. Отсюда можно сформулировать *принцип множественности рибосомальных белков* как вторую характерную фундаментальную черту рибосомной структуры.

Наконец, в 1963 году было осуществлено разворачивание рибосомных субчастиц в рибонуклеопротеидные тяжи (Спирин и др., 1963). Отсюда следовало, что каждая рибосомная субчастица может быть рассмотрена как компактно свернутый рибонуклеопротеидный тяж с основой в виде ковалентно-непрерывной цепи рибосомальной РНК. Каркасная роль рибосомальной РНК в размещении рибосомальных белков вслед за тем была подтверждена также опытами по самосборке рибосомных частиц (см. выше, раздел V, 2). В настоящее время *принцип рибонуклеопротеидного тяжа* может быть положен в основу наших знаний о строении рибосомы как ее третья фундаментальная и отличительная черта.

Почему из всей совокупности фактического материала именно перечисленные сейчас черты структуры выделены в качестве *принципов* строения рибосомы?

Прежде всего, любой формулируемый принцип строения должен отвечать главнейшему требованию: выражать ту специфику, то особенное, то наиболее характерное, что свойственно данному типу структуры и отличает его от других. Три сформулированных здесь принципа — принцип двух неравных субчастиц, принцип множественности белковых субъединиц и принцип рибонуклеопротеидного тяжа — полностью соответствуют этому требованию, так как действительно отражают главные особенности рибосомной структуры по сравнению с другими известными макромолекулярными частицами и системами.

Далее, если принципы выбраны правильно, то весь многочисленный бессистемный или формально систематизированный материал по структуре рибосом должен вполне естественно распределяться в *логическую систему* частных проявлений или следствий этих немногочисленных принципов. Сформулированные принципы строения рибосомы удовлетворяют и этому требованию: большая часть данных о рибосоме, изложенных в монографии, отражает те или иные проявления этих принципов и поэтому может быть разложена на соответствующие три раздела.

Однако не весь материал укладывается в три сформулированных принципа, и прежде всего из них оказывается невозможным вывести форму рибосомных субчастиц, степень их компактности, распределения РНК и белка. Очевидно, поэтому, что в наших знаниях нехватает еще одного принципа — пожалуй, некоего *принципа укладки* рибонуклеопротеидного тяжа в компактную частицу, — чтобы вместе с сформулированными выше тремя принципами создать целостное представление о строении рибосомы.

Наконец, правильность формулирования вышеуказанных черт рибосомы как ее главных структурных принципов проверяется тем обстоятельством, что каждый из этих структурных принципов может быть рассмотрен как результат совершенно определенной фундаментальной функциональной задачи. Имеется три последовательные задачи: 1) собрать рибосомные субчастицы как целое; 2) обеспечить формирование разнообразных функциональных центров на субчастицах; 3) обеспечить динамическую работу рибосомы в процессе трансляции.

Принцип рибонуклеопротеидного тяжа гласит, что рибосомная субчастица строится на базе единого ковалентно-непрерывного каркаса высокомолекулярной рибосомальной РНК. Можно думать, что закладка этого принципа в структурную организацию рибосомы определялась прежде всего требованиями сборки очень сложной и асимметричной четвертичной структуры.

Принцип множественности белков констатирует большое разнообразие белковых субъединиц в рибосомной частице. Принцип коррелирует с разнообразием и сложностью функциональных центров рибосомы, включая как связывающие, так и каталитические центры. Поэтому разумно верить в то, что множественность белков рибосомы диктуется необходимостью создать надлежащее разнообразие сложных, многоцентровых функциональных участков.

Наконец, принцип двух неравных субчастиц описывает наиболее очевидную макрочерту рибосомной организации: каждая транслирующая рибосома обязательно складывается из двух компактных рибонуклеопротеидных частиц, имеющих разные размеры и разный набор функциональных центров. Основные функции связывания и катализа присущи уже отдельным рибосомным субчастицам, и лишь функции динамического перемещения (транслокации) требуют полной рибосомы из двух субчастиц. Отсюда логично предположить, что построение рибосомы из двух неравных, лабильно ассоциированных субчастиц призвано обеспечивать функции транслокации и динамику в работе рибосомы в целом. Можно думать, что элементарным приводным актом в динамической работе рибосомы является некоторое обратимое пространственное смещение двух субчастиц друг относительно друга (см. ниже).

Л и т е р а т у р а

- Спирин А. С., Киселев Н. А., Шакулов Р. С., Богданов А. А. 1963. Биохимия, 28, 920.
Chao F.-C. 1957. Arch. Biochem. Biophys., 70, 426.
Tissières A., Watson J. D. 1958. Nature, 182, 778.
Waller J.-P., Harris J. I. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 18

Часть вторая

Функционирование рибосомы

Компоненты белок-синтезирующей системы

Рибосома есть аппарат белкового синтеза. Для осуществления белкового синтеза этот аппарат должен быть снабжен: 1) *матричным полинуклеотидом*, в качестве которого в клетках выступают естественные информационные РНК (мРНК), а в бесклеточных системах их роль могут выполнять также различные синтетические полирибонуклеотиды; 2) *аминоацилированными адапторными, или трансферными РНК (аминоацил-тРНК)*; 3) *набором белковых трансферных факторов*, а также *белковых факторов инициации и факторов терминации*; 4) *ГТФ*; 5) *надлежащими неорганическими катионами* — двухвалентными Mg^{++} или Ca^{++} и одновалентными K^{+} или NH_4^{+} — в определенной концентрации. Все это представляет собой *компоненты белок-синтезирующей системы*. Условия, предъявляемые системой к состоянию каждого из компонентов, описываются ниже.

1. Рибосома

Известно, что полная работающая рибосома состоит из двух лабильно связанных между собой субчастиц — большой (50 S или 60 S) и малой (30 S или 40 S). Только *полная* рибосома (70 S или 80 S), состоящая из *обеих* субчастиц, может осуществлять весь процесс трансляции в белок-синтезирующей системе. Ни одна из рибосомных субчастиц в отдельности не может заменить полную рибосому в кодируемой матрицей синтезе полипептидной цепи белка (Gilbert, 1963; Pestka, Nirenberg, 1966).

2. Матричный полинуклеотид

Для того чтобы взаимодействовать с рибосомой и выполнять свою матричную роль в белок-синтезирующей системе, матричный полинуклеотид должен, по-видимому, удовлетворять единственному обязательному условию: он не должен обладать совершенной вторичной структурой или большой долей особенно стабильных кооперативных спиральных участков. Так, ни обычные нативные ДНК, ни двуспиральные вирусные РНК, ни спиральные комплексы синтетических полирибонуклеотидов типа комплекса полиА — полиУ, а также синтетические полинуклеотиды с особенно большим содержанием Г, не обладают матричной активностью и вообще неспособны соединяться с рибосомами (Takanami, Okamoto, 1963a, b; Nirenberg, Matthaei, 1961; Singer et al., 1963; Nirenberg et al., 1963).

В то же время хорошо известно, что естественные мРНК и однотяжные вирусные РНК, являющиеся идеальными матрицами, обладают довольно выраженной вторичной структурой (см. обзор Спирин, 1963; а также Bautz, 1963; Haselkorn et al., 1963). Эта вторичная структура представляет собой набор относительно коротких и относительно нестабильных спиральных участков, образуемых за счет попарного взаимодействия смежных секций цепи друг с другом (см. рис. 12). Общий размер такой спирализации высок (около 60 — 70% всех нуклеотидов). Тем не менее это не мешает им служить в качестве матрицы в белковом синтезе. По-видимому, чтобы вступить во взаимодействие с рибосомой, полинуклеотид прежде всего должен обязательно иметь однотяжные неспиральные участки. Тогда, очевидно, относительно короткие спиральные участки полинуклеотида не представляют серьезных затруднений для работы рибосомы и использования всей нуклеотидной последовательности полинуклеотида в трансляции: работающая рибосома в процессе трансляции может расплетать короткие спиральные участки полинуклеотида.

На первичную структуру матричного полинуклеотида не накладывается, по-видимому, никаких принципиальных ограничений. Известно, что матрицей могут служить не только естественные мРНК, но и разнообразные искусственные полирибонуклеотиды, в состав которых входят азотистые основания, обычно встречающиеся в природных нуклеиновых кислотах (Nirenberg et al., 1963; Speyer et al., 1963). Нуклеотидный состав полирибонуклеотидов может быть самым разнообразным — от гомополимеров типа полиУ, полиА и полиЦ до беспорядочных гетерополимеров с самым разным соотношением А, Г, У и Ц. Лишь гомополимер полиГ и некоторые другие синте-

тические полинуклеотиды с преобладанием Г являются очень плохими матрицами, но, по-видимому, в основном из-за образования очень стабильных спиралей, т. е. вторичной структуры (Singer et al., 1963). Матрицей может служить даже полириботимидиловая кислота (Szer, Ochoa, 1964).

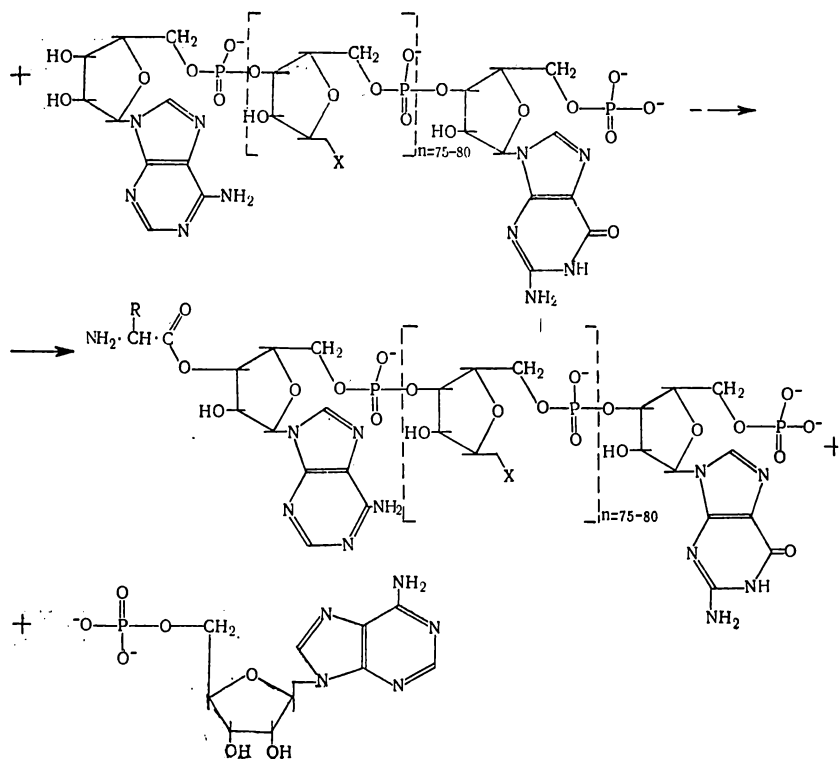
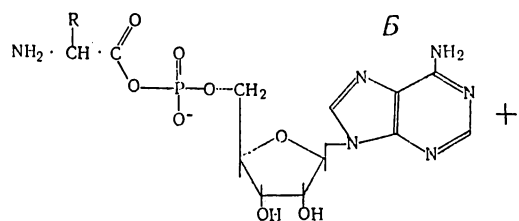
Более того, оказывается, что при особых условиях — например, в присутствии аминоклюкозидных антибиотиков — матрицей для работы рибосомы могут служить не только полирибонуклеотиды, но и однотажные полидезоксирибонуклеотиды (McCarthy, Holland, 1965; Morgan et al., 1967). Это значит, что даже различие в сахарных компонентах двух нуклеиновых кислот не является абсолютно критическим для способности взаимодействовать с рибосомой и участвовать в синтезе белка. Тем не менее в природе (в клетке) мы встречаемся, по-видимому, исключительно с полирибонуклеотидами (мРНК) в качестве матричных полинуклеотидов.

Таким образом, чтобы полинуклеотид мог служить матрицей в белок-синтезирующей системе, он должен не обладать совершенной вторичной структурой и обязательно иметь неспирализованные участки. Первичная же структура может быть самой разнообразной, и матричный полинуклеотид может иметь практически любой нуклеотидный состав, если его азотистыми компонентами служат пуриновые и пиримидиновые основания, обычно встречающиеся в природных нуклеиновых кислотах.

3. Аминоацил-тРНК

Аминоацил-тРНК являются непосредственно той формой, в которой активированные аминокислотные остатки переносятся в строящуюся полипептидную цепь в рибосоме. Другими словами, аминоацил-тРНК, как и матричный полинуклеотид, — это компоненты, непосредственно взаимодействующие с рибосомой в ходе белкового синтеза.

Образование аминоацил-тРНК из свободных аминокислот и тРНК происходит вне рибосомы, совершенно независимо от нее, в «растворимой» фазе внутриклеточной среды или бесклеточной системы (см. обзор Hoagland, 1960). Процесс катализируется ферментом *аминоацил-тРНК-синтетазой* (или рН 5-фермент) и проходит в *две стадии*. Первая стадия обозначается как реакция *первичной активации карбоксила*: свободная аминокислота реагирует с АТФ, в результате чего получается аминоациладенилат и пирогосфат (рис. 14, А). Продукт реакции — аминоациладенилат — остается связанным с ферментом

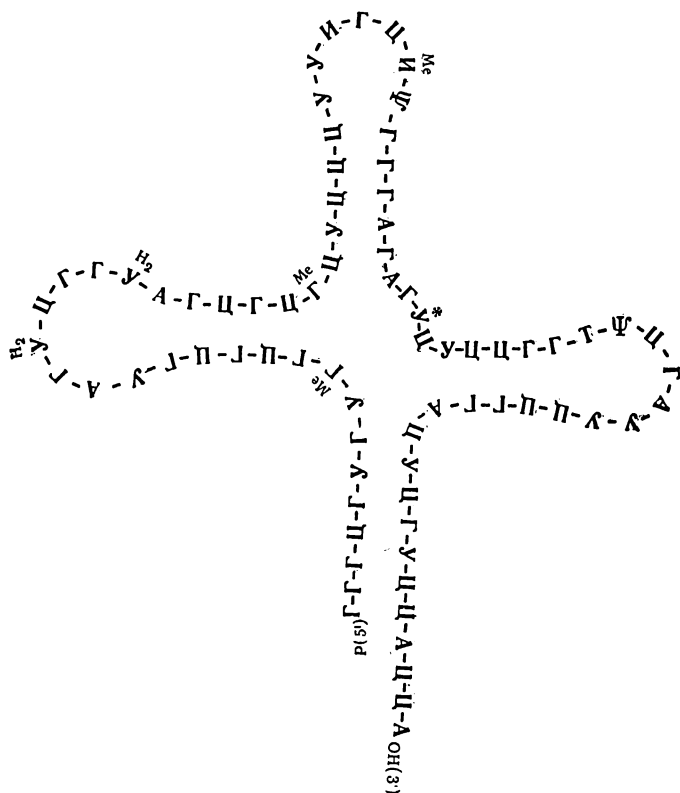


в виде нековалентного комплекса. Этот аминокациладенилат-ферментный комплекс далее вступает во взаимодействие со свободной тРНК и происходит вторая стадия, обозначаемая как реакция *акцептирования* активированного аминокислотного остатка: карбоксил аминокислотного остатка аминокациладенилата переносится на 3'-ОН-группу рибозы концевого аденозина тРНК. В результате освобождается АМФ и образуется конечный продукт — аминокацил-тРНК (рис.14, Б). Важно то, что для каждой аминокислоты существует своя специфическая аминокацил-тРНК-синтетаза, которая активирует только данную аминокислоту и затем перебрасывает ее на тРНК. В свою очередь для каждой аминокацил-тРНК-синтетазы существует своя специфическая (или свои специфические) тРНК, и только она может взаимодействовать с ферментом в реакции акцептирования. Таким образом, благодаря строгой специфичности фермента по отношению к аминокислоте, с одной стороны, и к тРНК, с другой, происходит специфическое акцептирование аминокислот совершенно определенными тРНК. В соответствии с этим различают аланиновые тРНК, сериновые тРНК, тирозиновые тРНК, валиновые тРНК, фенилаланиновые тРНК и т. д. — по числу различных аминокислот. В дальнейшем они будут обозначаться как тРНК^{ала}, тРНК^{сер}, тРНК^{тир}, тРНК^{вал}, тРНК^{фен} и т. п. Нуклеотидная последовательность тРНК^{ала} дрожжей (Holley et al., 1965) дана на рис. 15. Подробное рассмотрение первичных структур различных тРНК можно найти в монографии Т. В. Венкстерж (1970).

Естественно, что в процессе трансляции, осуществляемом рибосомой, участвуют лишь аминокацилированные тРНК: аланил-тРНК^{ала}, серил-тРНК^{сер}, тирозил-тРНК^{тир}, валил-тРНК^{вал}, фенилаланил-тРНК^{фен} и т. д. При синтезе белка с участием естественных матриц — мРНК — в белок-синтезирующей системе должен присутствовать *весь набор различных аминокацил-тРНК*. При исключении любой из них синтез белка быстро прекращается ввиду неизбежного обрыва трансляции на недостающем аминокислотном остатке. (Как и следует ожидать, при синтезе полипептидов в бесклеточных системах с участием синтетических матричных полинуклеотидов, имеющих неполный набор азотистых оснований, присутствие всех аминокацил-тРНК не обязательно.)

Р и с. 14.

Активация аминокислоты (А) и акцептирование аминокислотного остатка адапторной РНК (Б)



Р и с. 15.

Аланиновая тРНК дрожжей: полная нуклеотидная последовательность и предполагаемое взаиморасположение участков цепи (типа «клеверного листа»)

4. ГТФ

Для функционирования рибосомы и осуществления процесса трансляции в белок-синтезирующей системе обязательно должен присутствовать гуанозин-5'-трифосфат — ГТФ (Keller, Zamecnik, 1956; Nathans et al., 1962; Conway, Lipmann, 1964). Он не может быть заменен ни одним из других известных трифосфатов нуклеозидов — АТФ, УТФ, ЦТФ и т. п. Гуанозин-5'-дифосфат — ГДФ, наоборот, является ингибитором трансляции. Таким образом, потребность системы в ГТФ очень специфична. В ходе трансляции ГТФ расщепляется на ГДФ и неорганический фосфат, и требуется постоянная регенерация ГДФ в ГТФ.

5. Белковые трансферные факторы

Для того чтобы обеспечить функционирование рибосомы в белок-синтезирующей системе, необходимо присутствие в системе специальных белков, называемых трансферными факторами. Эти растворимые белки непосредственно взаимодействуют с рибосомой и участвуют в осуществлении необходимых звеньев процесса трансляции. Впервые необходимость специальных белковых факторов клеточного сока для функционирования рибосом была показана на животных системах (Nathans, Lipmann, 1960; von Ehrenstein, Lipmann, 1961; Bishop, Schweet, 1961; Fessenden, Moldave, 1961), а затем, более детально, трансферные факторы были изучены у бактерий, и прежде всего *E. coli* (Nathans, Lipmann, 1961; Nathans et al., 1962; Nakamoto et al., 1963; Allende et al., 1964).

В настоящее время в бактериальной белок-синтезирующей системе известно три растворимых белка, которые принимают участие в синтезе полипептидной цепи на рибосоме в качестве трансферных факторов (Lucas-Lenard, Lipmann, 1966). Указанные белки не могут заменить друг друга, а должны присутствовать все вместе, т. е. дополняют друг друга. Липманн с сотрудниками обозначают их как T_u -фактор (нестабильный трансферный фактор), T_s -фактор (стабильный трансферный фактор) и G-фактор (ГТФ-зависимый фактор).

Т-факторы. Два бактериальных Т-фактора — T_u и T_s — представляют собой белки, присутствующие в свободном виде в клеточном соке. T_u -фактор — крупный и очень лабильный белок; T_s -фактор — небольшой, относительно стабильный белок (Lucas-Lenard, Lipmann, 1966). Т-факторы чувствительны к окислению их SH-групп и потому для своей активности требуют присутствия SH-соединений в растворе. Оба белка легко ассоциируют друг с другом, давая T_u — T_s -комплекс (Parmeggiani, 1968; Parmeggiani, Gottschalk, 1969; Weissbach et al., 1969; Lucas-Lenard et al., 1969).

Этот объединенный Т-фактор (T_u — T_s) в присутствии ионов Mg^{++} и K^+ или NH_4^+ способен вступать в реакцию с молекулой ГТФ и с молекулой аминоацил-тРНК, образуя стабильный комплекс aa -тРНК — T_u — ГТФ (Ravel et al., 1967, 1968, 1969; Gordon, 1967, 1968; Weissbach et al., 1969; Lucas-Lenard et al., 1969; Skoultchi et al., 1969). Последний является той формой, в которой аминоацил-тРНК поступает в рибосому (Ravel, 1967; Ravel et al., 1967, 1969; Ertel et al., 1968; Haenni, Lucas-Lenard, 1968; Lucas-Lenard et al., 1969; Skoultchi et al., 1969). Сначала весь этот комплекс ассоциирует с рибосомой, затем в нем происходит расщепление ГТФ до ГДФ

и ортофосфата, в результате чего аминоксил-тРНК остается в рибосоме, а комплекс T_u — ГДФ и ортофосфат освобождаются (см. ниже, раздел II, 2, а и раздел III, 2, б). Комплекс T_u — ГДФ реагирует в растворе с T_s -белком, в результате чего ГДФ вытесняется, и снова образуется объединенный T_u — T_s комплекс. Основная функция Т-факторов как раз и состоит, видимо, в том, что они вместе с ГТФ принимают участие в специфическом связывании аминоксил-тРНК с рибосомой (см. ниже, раздел II, 2).

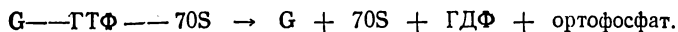
Г-ф а к т о р. Бактериальный Г-фактор — белок с молекулярным весом около 70 000 — 90 000; он состоит из четырех субъединиц с молекулярным весом около 20 000 каждая (Leder et al., 1969; Parmeggiani, Gottschalk, 1969). Этого белка очень много в клеточном экстракте *E. coli* — до 2—3% от всех растворимых белков. Но белок не очень стабилен и сравнительно легко инактивируется при нагревании. Белок очень чувствителен к окислению и для поддержания активности требует постоянного присутствия SH-соединений (Lucas-Lenard, Lipmann, 1966; Kaziro et al., 1969).

При добавлении Г-фактора к полным транслирующим рибосомам появляется ГТФ-азная активность и начинается расщепление ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата. Отдельно ни Г-фактор, ни рибосома не способны расщеплять ГТФ. Повидимому, между рибосомами и Г-факторами возникает стехиометрический комплекс, и ГТФ-азная активность является характерным свойством лишь этого комплекса (Nishizuka, Lipmann, 1966; см. также Conway, Lipmann, 1964; Chan, McCorquadale, 1965; Gordon, Lipmann, 1967). Для объединения Г-фактора с рибосомой или для ГТФ-азной активности системы рибосома — Г-фактор требуются ионы Mg^{++} или заменяющие его катионы — Ca^{++} или Mn^{++} (Gordon, Lipmann, 1967). Само объединение Г-фактора с рибосомой происходит обязательно с участием ГТФ (Parmeggiani, Gottschalk, 1969; Kaziro et al., 1969):

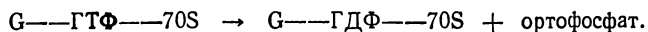


(в присутствии ГДФ также образуется комплекс $G-ГДФ-70S$). Существенно, что для образования комплекса требуются обе рибосомные субчастицы, и отдельно ни 50 S субчастица, ни 30 S субчастица не образуют комплекса с Г-фактором (Nishizuka, Lipmann, 1966; Parmeggiani, Gottschalk, 1969). Появление ГТФ-азной активности является прямым следствием соединения Г-фактора с ГТФ и с транслирующей рибосомой. ГТФ в образовавшемся комплексе гидролизует, после

чего комплекс распадается:



В отсутствие белкового синтеза, т. е. при образовании комплекса с нетранслирующей рибосомой, может наблюдаться и несопряженная ГТФ-азная активность с сохранением комплекса:



Система рибосома + G-фактор исключительно специфична по отношению к «субстрату»: она гидролизует только ГТФ и ни один из других известных трифосфатов нуклеозидов (АТФ, УТФ, ЦТФ и т. д.). ГДФ является сильным конкурентным ингибитором ГТФ-азной активности и, по-видимому, ГТФ-азный центр имеет большое сродство к ГДФ (Nishizuka, Lipmann, 1966).

Так как G-фактор при соединении с рибосомой участвует в расщеплении макроэргической связи ГТФ, то уже давно высказывалось соображение, что он может играть роль в энергетическом обеспечении транслокации, т. е. «механического передвижения» рибосомы относительно цепи мРНК, и в одновременной переброске остатка тРНК из одного участка на рибосоме в другой в процессе трансляции (Conway, Lipmann, 1964; Nishizuka, Lipmann, 1966). Это предположение нашло подтверждение в ряде последующих работ, где было показано, что G-фактор и индуцируемое им расщепление ГТФ действительно необходимы непосредственно для акта транслокации в рибосоме (Brot et al., 1968; Erbe, Leder, 1968; Pestka, 1968; Haenni, Lucas-Lenard, 1968; Lucas-Lenard, Haenni, 1969). Соответственно, вместо обозначения «G-фактор» для этого белка в литературе часто можно встретить название «транслоказа».

Трансферные факторы животных клеток. Из животных клеток также выделены трансферные факторы, один из которых, обозначаемый как TF-I, функционально аналогичен бактериальному T-фактору, а другой, обозначаемый TF-II, аналогичен G-фактору бактерий (Arlinghaus et al., 1964; Gasior, Moldave, 1965; Klink et al., 1967; Skogerson, Moldave, 1967; Schneir, Moldave, 1968; Felicetti, Lipmann, 1968; McKeehan et al., 1969). Животный фактор TF-I — очень крупный белок с молекулярным весом 186 000; в присутствии мочевины или гуанидин-хлорида он диссоциирует на большие субъединицы с молекулярным весом 62 000 (McKeehan et al., 1969; McKeehan, Hardesty, 1969). Животный фактор TF-II —

белок с молекулярным весом около 70 000 (McKeehan et al., 1969; Moldave et al., 1969). Оба белка для поддержания их активности требуют присутствия SH-соединений, но TF-II особенно чувствителен к окислению (Hardesty et al., 1969).

6. Белковые факторы инициации

Было замечено, что в бактериальных бесклеточных белок-синтезирующих системах с тщательно очищенными рибосомами затруднено считывание природных мРНК. В неочищенных системах такого затруднения нет. Эти наблюдения указывали на то, что для считывания природных мРНК, помимо известных компонентов белок-синтезирующей системы, требуются, по-видимому, еще какие-то дополнительные факторы, довольно лабильно связанные с рибосомами и отмываемые от них при тщательной очистке. Эти факторы оказались необходимы лишь для *начала* процесса трансляции. Для самого хода трансляции эти факторы, по-видимому, необязательны. Указанные «факторы инициации» оказались веществами белковой природы. Они были обнаружены и идентифицированы в 1966 г. одновременно в трех лабораториях (Revel, Gros, 1966; Brawerman, Eisenstadt, 1966; Stanley et al., 1966).

В настоящее время в бактериальных системах известно три белковых фактора инициации, обозначаемых как F1 (или A), F2 (или C) и F3 (или B) (Salas et al., 1967a, b; Eisenstadt, Brawerman, 1967; Iwasaki et al., 1968; Revel et al., 1968). Фактор F1 — небольшой белок (полипептид) основного характера с молекулярным весом 8000—9000; F2 — крупный лабильный белок кислого характера с молекулярным весом 70 000—90 000, имеющий важную для активности SH-группу; F3 — белок с молекулярным весом около 30 000 (Chae et al., 1969; Mazumder et al., 1969; Kolakofsky et al., 1969; Wahba et al., 1969; Thach et al., 1969). Все три фактора необходимы, чтобы обеспечить эффективную инициацию трансляции природных мРНК. Для этого указанные белки должны связаться с бактериальной рибосомой, а более конкретно — с ее 30S субчастицей. Их роль в инициации трансляции достаточно сложна и включает участие: а) в специфическом узнавании иницирующего кодона (АУГ или ГУГ) рибосомой и в связывании рибосомы с мРНК; б) в специфическом узнавании и связывании инициаторной тРНК (формилметионил-тРНК) и ГТФ с рибосомой, ассоциированной с иницирующим кодоном; в) в расщеплении ГТФ до ГДФ и ортофосфата и в сопряженной

транслокации инициаторной тРНК из участка первичного связывания в другой участок рибосомы (см. ниже, раздел III, 1).

Для животных систем (например, система синтеза гемоглобина из ретикулоцитов кролика) в последнее время также показано наличие белковых факторов инициации (M_1 , M_2 и M_3), аналогичных бактериальным факторам (Prichard et al., 1970).

7. Факторы терминации

Кроме белков, необходимых для инициации трансляции и для ее продолжения, полная белок-синтезирующая система должна содержать, как оказалось, также специальные макромолекулярные компоненты, ответственные за освобождение законченной полипептидной цепи белка из рибосомы после терминации трансляции (Ganoza, 1966). Растворимый «освобождающий фактор» R белковой природы был выделен из *E. coli* (Saracchi, 1967). Было показано, что для своего действия «освобождающий фактор» должен вступить во взаимодействие с комплексом рибосома—терминирующий кодон мРНК—пептидил-тРНК. Дальнейшее изучение показало, что у *E. coli* имеется не один, а два белка, функционирующих как факторы терминации: белок R_1 , осуществляющий освобождение пептида при терминации кодонами УАГ или УАА, и белок R_2 , освобождающий пептид при наличии терминирующих кодонов УГА или УАА (Scolnick et al., 1968). Молекулярный вес белка R_1 равен 44 000, а белка R_2 — 46 000; оба белка мономерны, т. е. не обнаруживают субъединичного строения (Saracchi, Klein, 1969). Кроме R-факторов, недавно обнаружен еще один белковый фактор, обозначенный как S, который вызывает ускорение определенных стадий процесса терминации (Milman et al., 1969; Caskey et al., 1969; Goldstein et al., 1970).

Функция R-фактора в терминации трансляции сводится прежде всего к узнаванию терминирующего кодона, когда он оказывается в связи с рибосомой, а затем уже к индукции гидролиза сложноэфирной связи между тРНК и пептидилем в рибосоме (Caskey et al., 1969).

8. Неорганические катионы

Для работы белок-синтезирующей системы прежде всего необходима определенная концентрация двухвалентных катионов, как правило, в виде ионов Mg^{++} . Обычно в бесклеточной системе оптимальная концентрация ионов Mg^{++} составляет от 0,005 *M* до 0,015—0,02 *M*. При наличии заметных концентраций одновалентных катионов (K^+ , NH_4^+ , *трис*⁺) в среде требуются несколько большие концентрации Mg^{++} , чем при малом содержании одновалентных катионов. При работе с синтетическими матричными полинуклеотидами, как правило, требуются повышенные концентрации Mg^{++} для начала трансляции — 0,014—0,016 *M* и выше; после того как трансляция начата, концентрация Mg^{++} может быть снижена, например, до 0,008—0,005 *M*. С естественными мРНК инициация трансляции успешно проходит при той же концентрации Mg^{++} , которая оптимальна для всего процесса трансляции, например, 0,008—0,005 *M* (но зато, как отмечалось выше, с естественными мРНК требуется присутствие специальных белков для инициации трансляции).

Хотя Mg^{++} обычно выступает в роли преобладающего и обязательного двухвалентного катиона в белок-синтезирующей системе *in vivo*, в системах *in vitro* он может быть с большим или меньшим успехом заменен на Ca^{++} , а также на Mn^{++} в соответствующих же концентрациях (порядка 0,01 *M*) в среде (Moore, 1966; Gordon, Lipmann, 1967; Maden, Monro, 1968).

В качестве другого необходимого катиона для белок-синтезирующей системы требуется либо K^+ , либо NH_4^+ (Lubin, 1963, 1964; Lubin, Ennis, 1963, 1964; Conway, 1964; Spyrides, 1964). Эти два катиона, по-видимому, взаимозаменяемы. Их оптимальная концентрация в среде составляет порядка 0,1 *M*. Na^+ и Li^+ не только не могут заменить K^+ или NH_4^+ , но являются их антагонистами, ингибируя работу белок-синтезирующей системы.

По-видимому, Mg^{++} и K^+ или NH_4^+ как специфические для рибосомы катионы необходимы для поддержания самых различных ее функций — как функций комплексообразования и связывания компонентов белок-синтезирующей системы (см. ниже), так и каталитической функции синтеза пептидной связи (Traut, Monro, 1964; Smith et al., 1965; Rychlik, 1966; Rychlik et al., 1967; Maden, Monro, 1968).

Л и т е р а т у р а

- Венкстери Т. В. 1970. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. М., «Наука».
- Спириг А. С. 1963. Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот. М., Изд-во АН СССР.
- Allende J. E., Monro R., Lipmann F. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1211.
- Arlinghaus R., Shaeffer J., Schweet R. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1291.
- Bautz E. K. F. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 205.
- Bishop J. O., Schweet R. S. 1961. Biochim. Biophys. Acta, 54, 617.
- Brawerman G., Eisenstadt J. 1966. Biochemistry, 5, 2784.
- Brot N., Ertel R., Weissbach H. 1968. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 563.
- Capecchi M. R. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1144.
- Capecchi M. R., Klein H. A. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 469.
- Caskey C. T., Scolnick E., Tomkins R., Goldstein J., Milman G. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 479.
- Chae Y.-B., Mazumder R., Ochoa S. 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 62, 1181.
- Chan M., McCorquodale D. J. 1965. J. Biol. Chem., 240, 3116.
- Conway T. W. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1216.
- Conway T. W., Lipmann F. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 1462.
- von Ehrenstein G., Lipmann F. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 941.
- Eisenstadt J. M., Brawerman G. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1560.
- Erbe R. W., Leder P. 1968. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 798.
- Ertel R., Brot N., Redfield B., Allende J. E., Weissbach H. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, 861.
- Felicitelli L., Lipmann F. 1968. Arch. Biochem. Biophys., 125, 548.
- Fessenden J. M., Moldave K. 1961. Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 232.
- Ganoza M. C. 1966. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 273.
- Gasior E., Moldave K. 1965. J. Biol. Chem., 240, 3346.
- Gilbert W. 1963. J. Mol. Biol., 6, 374.
- Goldstein J., Milman G., Scolnick E., Caskey T. 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 65, 430.
- Gordon J. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1574.
- Gordon J. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, 179.
- Gordon J., Lipmann F. 1967. J. Mol. Biol., 23, 23.
- Haenni A. L., Lucas-Lenard J. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 61, 1363.
- Hardesty B., Culp W., McKeehan W. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 331.
- Haselkorn R., Fried V. A., Dahlberg J. E. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 49, 511.
- Hoagland M. 1960. The Nucleic Acids, 3, 349. Acad. Press, New York. Русский перевод: «Нуклеиновые кислоты», М., ИЛ, 1962.
- Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Merrill S. H., Penswick J. R., Zamir A. 1965. Science, 147, 1462.
- Iwasaki K., Sabol S., Wahba A. J., Ochoa S. 1968. Arch. Biochem. Biophys., 125, 542.
- Kaziro Y., Inoue N., Kuriki Y., Mizumato K., Tanaka M., Kawakita M. 1965. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 385.
- Keller E. B., Zamecnik P. C. 1956. J. Biol. Chem., 221, 45.

- Klink F., Kramer G., Nour A., Petersen K. 1967. *Biochim. Biophys. Acta*, **134**, 360.
- Kolakofsky D., Dewey K., Thach R. E. 1969. *Nature*, **223**, 694.
- Leder P., Skogerson L. E., Nau M. M. 1969. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 454.
- Lubin M. 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 345.
- Lubin M. 1964. *Fed. Proc.*, **23**, 994.
- Lubin M., Ennis H. L. 1963. *Fed. Proc.*, **22**, 302.
- Lubin M., Ennis H. L. 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 614.
- Lucas-Lenard J., Haenni A.-L. 1969. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 93.
- Lucas-Lenard J., Lipmann F. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 1562.
- Lucas-Lenard J., Tao P., Haenni A.-L. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 455.
- Maden B. E. H., Monro R. E. 1968. *European J. Biochem.*, **6**, 309.
- Mazumder R., Chae Y.-B., Ochoa S. 1969. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 98.
- McCarthy B. J., Holland J. J. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 880.
- McKeehan W. L., Hardesty B. 1969. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4330.
- McKeehan W., Sepulveda P., Lin S. Y., Hardesty B. 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 668.
- Milman G., Goldstein J., Scolnick E., Caskey T. 1969. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 183.
- Moldave K., Galasinski W., Rao P., Siler J. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 347.
- Moore P. B. 1966. *J. Mol. Biol.*, **18**, 8.
- Morgan R., Wells R. D., Khorana H. G. 1967. *J. Mol. Biol.*, **26**, 477.
- Nakamoto T., Conway T. W., Allende J. E., Spyrides G. J., Lipmann F. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 227.
- Nathans D., von Ehrenstein G., Monro R., Lipmann F. 1962. *Fed. Proc.*, **21**, 127.
- Nathans D., Lipmann F. 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 126.
- Nathans D., Lipmann F. 1961. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 497.
- Nirenberg M. W., Jones O. W., Leder P., Clark B. F. C., Sly W. S., Pestka S. 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 549.
- Nirenberg M. W., Matthaei J. H. 1961. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1588.
- Nishizuka Y., Lipmann F. 1966. *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 344.
- Parmeggiani A. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 613.
- Parmeggiani A., Gottschalk E. M. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 377.
- Pestka S. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 726.
- Pestka S., Nirenberg M. 1966. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 641.
- Prichard P. M., Gilbert J. M., Shafritz D. A., Anderson W. F. 1970. *Nature*, **226**, 511.
- Ravel J. M. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1811.
- Ravel J. M., Shorey R. L., Garner C. W., Dawkins R. C., Shive W. 1969. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 321.
- Ravel J. M., Shorey R. L., Shive W. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 68.
- Ravel J. M., Shorey R. L., Shive W. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 9.
- Revel M., Gros F. 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 124.
- Revel M., Herzberg M., Becarevic A., Gros F. 1968. *J. Mol. Biol.*, **33**, 231.
- Rychlik I. 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 425.
- Rychlik I., Chládek S., Zemlička J. 1967. *Biochim. Biophys. Acta*, **138**, 640.

- Salas M., Hille M. B., Last J. A., Wahba A. J., Ochoa S. 1967a. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 387.
- Salas M., Miller M. J., Wahba A. J., Ochoa S. 1967b. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1865.
- Schneir M., Moldave K. 1968. Biochim. Biophys. Acta, 166, 58.
- Scolnick E., Tomkins R., Caskey T., Nirenberg M. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 61, 768.
- Singer M. F., Jones O. W., Nirenberg M. W. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 49, 392.
- Skogerson L., Moldave K. 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 568.
- Skoultchi A., Ono Y., Waterson J., Lengyel P. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 437.
- Smith J. D., Traut R. R., Blackburn G. M., Monro R. E. 1965. J. Mol. Biol., 13, 617.
- Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C., Wahba A. J., Gardner R. S., Ochoa S. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 559.
- Spyrides G. J. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1220.
- Stanley W. M., Salas M., Wahba A. J., Ochoa S. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 290.
- Szer W., Ochoa S. 1964. J. Mol. Biol., 8, 823.
- Takanami M., Okamoto T. 1963a. J. Mol. Biol., 7, 323.
- Takanami M., Okamoto T. 1963b. Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 297.
- Thach R. E., Hershey J. W. B., Kolakofsky D., Dewey K. F., Remold-O'Donnell E. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 277.
- Traut R. R., Monro R. E. 1964. J. Mol. Biol., 10, 63.
- Wahba A. J., Chae Y. B., Iwasaki K., Mazumder R., Miller M. J., Sabol S., Sillero M. A. G. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 285.
- Weissbach H., Brot N., Miller D., Rosman M., Ertel R. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 419.

II

Функциональные центры рибосомы

Можно различать три группы функциональных активностей полной рибосомы в процессе трансляции: 1) функции связывания и удержания компонентов белок-синтезирующей системы (связывание и удержание мРНК, аминоацил-тРНК, пептидил-тРНК, ГТФ и т. д.); 2) каталитические функции (в первую очередь, образование пептидной связи — пептидил-трансферазная функция, а также ГТФ-азная функция); 3) функции механического перемещения, или транслокаций (транслокация мРНК и остатков тРНК).

Для выполнения функций, относящихся к первым двум группам, рибосома имеет локальные функциональные центры или участки, распределенные по двум субчастицам. Каждая из двух субчастиц в отдельности проявляет, соответственно, либо одни, либо другие функциональные активности из этих групп, и, как правило, вовсе не требует для этого ассоциации со своим партнером в полную рибосому. Наоборот, ни одна из субчастиц в отдельности не обладает функцией транслокации; последняя есть свойство только полной рибосомы, состоящей из двух субчастиц. Отсюда можно предположительно заключить, что главный смысл построения рибосомы из двух субчастиц состоит в каком-то обеспечении механизма пространственных перемещений (транслокаций) в процессе трансляции.

Если рассмотреть *малую рибосомную субчастицу*, то прежде всего можно отметить, что она, по-видимому, не несет никаких каталитических функций, но зато в полной мере ответственна за целый ряд функций связывания. Так, именно на ней локализован мРНК-связывающий участок (Takanami, Okamoto, 1963a; Okamoto, Takanami, 1963) и участок специфического связывания аминоацил-тРНК (Matthaei et al., 1964; Suzuka et al., 1965; Pestka, Nirenberg, 1966a, b).

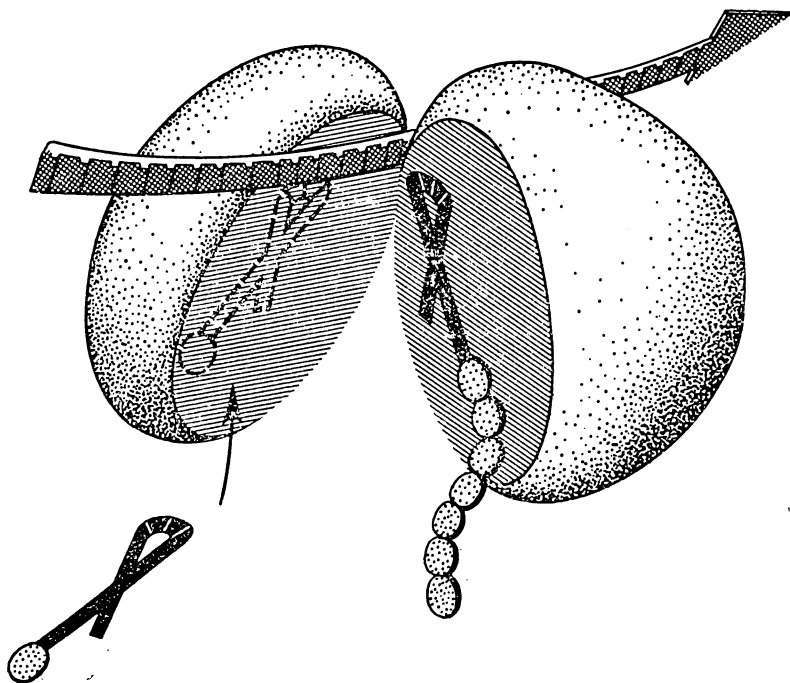
Большая рибосомная субчастица характеризуется, в первую очередь, наличием каталитического пептидил-трансферазного

участка, ответственного за образование пептидной связи в процессе трансляции (Traut, Монго, 1964; Монго, 1967). Кроме того, большая рибосомная субчастица удерживает на себе пептидил-тРНК в процессе трансляции. Одним из факторов удержания молекулы пептидил-тРНК является наличие на большой субчастице специального тРНК-удерживающего участка, иногда обозначаемого как участок неспецифического (т. е. не зависящего от наличия мРНК) связывания тРНК (Саппоп et al., 1963; Саппоп, 1967; Монго et al., 1968).

Имеется целый ряд экспериментальных и логических оснований, позволяющих предполагать, что перечисленные функциональные участки локализованы в основном на контактирующих поверхностях рибосомных субчастиц (рис. 16) (Спирин, 1968, 1970; Spirin, 1968, 1969).

Р и с. 16.

Схематическое изображение рибосомы (составляющие ее субчастицы несколько раздвинуты, чтобы показать контактирующие поверхности), ассоциированной с мРНК (на 30S субчастице) и с пептидил-тРНК (на 50S субчастице); аминоацил-тРНК поступает на 30S субчастицу



Таким образом, между двумя субчастицами рибосомы намечается четкое разделение труда: большая субчастица выступает в роли носителя, на котором *удерживается* и *наращивается* полипептид (в виде пептидил-тРНК), а малая субчастица ответственна за специфический (детерминируемый матрицей) *выбор* соответствующих аминоксил-тРНК из среды.

1. Ассоциация рибосомы с матричным полинуклеотидом (мРНК-связывающий участок)

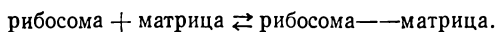
Связывание и удержание матричного полинуклеотида (мРНК) на рибосоме зависит от очень многих условий: ионного состава среды, структуры удерживаемого участка полинуклеотида, присутствия других компонентов белок-синтезирующей системы (аминоацил- и пептидил-тРНК, некоторых белковых факторов и т. п.) в связи с рибосомой, стадии трансляции (инициация, элонгация или терминация — см. ниже, раздел III) и т. д. Однако принципиальное выявление мРНК-связывающей активности и мРНК-связывающего участка рибосомы можно осуществить и не прибегая к изучению всех этих условий, а ограничившись сравнительно простой системой: очищенные рибосомы + матричный полинуклеотид + ионы магния в определенной концентрации. В экспериментах *in vitro* можно показать, что очищенные бактериальные рибосомы могут ассоциировать в этих условиях с некоторыми полинуклеотидами, при отсутствии всех других высокомолекулярных компонентов белок-синтезирующей системы. Именно эта система и разбирается ниже как основа для выявления мРНК-связывающей функции рибосомы.

а. Условия комплексообразования и стабильность комплекса

Для образования более или менее стабильного комплекса рибосомы с матричным полинуклеотидом может быть достаточно присутствия в среде лишь определенной концентрации ионов Mg^{++} , как правило, не ниже 0,005 М. В таких условиях, т. е. в отсутствие каких-либо других высокомолекулярных компонентов белок-синтезирующей системы, при 0,005—0,02 М Mg^{++} отмечали комплексообразование рибосом *E. coli* с полиУ (Spyrides, Lipmann, 1962; Takanami, Okamoto, 1963a; Moore, 1966a, Castles, 1969), полиЦ (Haselkorn, Fried, 1964; Moore, 1966a), РНК из вируса желтой мозаики турнепса (Haselkorn

et al., 1963; Voorma et al., 1964), РНК из полиовируса (Warner et al., 1963), РНК из вируса f2 (Takanami et al., 1965), а также с полириботимидиловой кислотой (Szer, Nowak, 1967), одно-тяжной и денатурированной ДНК (Takanami, Okamoto, 1963b) и даже с лишенными матричной активности производными полиУ — поли-N-метилуридилиловой кислотой и поли-5,6-дигидроуридилиловой кислотой (Szer, Nowak, 1967).

В любом случае такая ассоциация является, по-видимому, *обратимой* в том смысле, что существует динамическое равновесие между комплексом, с одной стороны, и свободными рибосомами и свободными матрицами, с другой:



Связанная матрица комплекса поэтому может сравнительно легко обмениваться на экзогенную свободную матрицу. Вместе с тем в присутствии 0,005—0,02 М Mg^{++} для перечисленных выше матричных полинуклеотидов константы их ассоциации с рибосомами достаточно велики, а скорость диссоциации сравнительно мала, так что соответствующие комплексы можно регистрировать даже после отмывки от избытка свободных матриц.

Среди вышеперечисленных матриц наблюдаются серьезные различия в константах их связывания с рибосомами. Так, комплексы рибосом с полиУ заметно прочнее, чем с вирусными РНК и тем более с полиЦ (Haselkorn, Fried, 1964; Moore, 1966a; Dahlberg, Haselkorn, 1967). Поэтому полиУ может вытеснять полиЦ и РНК из комплекса с рибосомами. Длинные цепи полиУ прочнее связываются с рибосомами, чем короткие (Castles, 1969). Достаточно прочные комплексы рибосом с полиА в указанных условиях вообще не образуются (Takanami, Okamoto, 1963a; McLaughlin et al., 1966).

При понижении концентрации ионов Mg^{++} до 10^{-3} — 10^{-4} М стабильность комплекса между рибосомой и матричным полинуклеотидом сильно снижается, скорость диссоциации становится высокой, и поэтому уже образовавшиеся комплексы рибосома—мРНК или рибосома—полиУ быстро и полностью диссоциируют на составляющие компоненты — рибосому и полинуклеотид — при отмывке от свободных компонентов. Однако в равновесной смеси комплекс рибосома—матрица обнаруживается даже при 10^{-4} М Mg^{++} (Dahlberg, Haselkorn, 1967).

Имеется указание, что для стабильной ассоциации рибосомы с матричным полинуклеотидом (полиУ) ионы Mg^{++} в среде могут быть успешно заменены на Ca^{++} или Mn^{++} в той же концентрации — около 10^{-2} М, а также на 10^{-3} М сперми-

дин (Moore, 1966a). Это значит, что Mg^{++} не очень специфичен в осуществлении ассоциации рибосомы с матричным полинуклеотидом. Ионы K^{+} несколько дестабилизируют комплекс, образуемый с участием двухвалентных катионов (Dahlberg, Haselkorn, 1967).

Температурные условия, во всяком случае в пределах от 0 до $40^{\circ}C$, не являются, по-видимому, критическими для образования комплексов рибосом с полиУ, полиЦ и вирусными РНК. Комплекс может образовываться как при $0-4^{\circ}C$, так и при 37° (Spyrides, Lipmann, 1962; Takanami, Okamoto, 1963a; Haselkorn et al., 1963; Haselkorn, Fried, 1964; Warner et al., 1963; Takanami et al., 1965).

Показано, однако, что при повышении температуры прочность комплекса (константа связывания) заметно понижается (Dahlberg, Haselkorn, 1967). В то же время в некоторых случаях было замечено, что рибосомы могут лучше ассоциировать с матрицей при повышенной температуре (в пределах допустимого температурного диапазона). Например, препарат РНК полиовируса больше присоединяет рибосом при 37° , чем при $4^{\circ}C$ (Warner et al., 1963). Эта особенность может быть связана не с прямым действием температуры на связь между рибосомой и мРНК, а с тем, что вторичная структура мРНК препятствует ее ассоциации с рибосомой, а при повышенной температуре вторичная структура частично разрушается или лабилизуется.

б. Участок полинуклеотида, взаимодействующий с рибосомой

Как правило, цепь матричного полинуклеотида по своей длине значительно превосходит линейные размеры рибосомной частицы. Поэтому рибосома может удерживать лишь какой-то ограниченный участок полинуклеотида. Размер этого участка не известен. Для случая ассоциации рибосомы с полиУ была сделана попытка оценить его размер путем определения длины того отрезка полинуклеотида, который оказывается защищенным от действия экзогенной рибонуклеазы, как полагают, в результате связывания с рибосомой. Для этого полиУ ассоциировали с рибосомами, а затем подвергали действию рибонуклеазы. После депротенинизации гидролизата находили полинуклеотидные (полиУ) фрагменты длиной около 25 нуклеотидных остатков (Takanami, Zubay, 1964). Отсюда был сделан вывод, что с рибосомой связан участок полиУ длиной около 25 нуклеотидных остатков.

Позже аналогичные опыты были проведены с природными матричными полинуклеотидами — РНК из бактериофагов $\phi 2$, R17 и Q β ; участки мРНК, защищаемые связанными с ней рибо-

сомами от действия рибонуклеаз, имели длину от 40 до 60 нуклеотидов (Steitz, 1969a, b; Gupta et al., 1969, 1970; Hindley, Staples, 1969).

По-видимому, участок, к которому может присоединяться рибосома, ни в коем случае не может быть двуспиральным (Takanami, Okamoto, 1963a, b). Следует думать, что рибосома ассоциирует лишь с *однотяжным неспирализованным участком* матричного полинуклеотида. (Конечно, как уже указывалось, транслирующая рибосома может расплетать спиральные участки мРНК и тем самым быть в ассоциации с любым отрезком полинуклеотидной цепи; но отсюда же следует, что тот отрезок мРНК, который будет во временной ассоциации с рибосомой, в этот момент будет опять-таки лишен его собственной вторичной структуры.)

в. Участок рибосомы, взаимодействующий с матричным полинуклеотидом

Любое рассмотрение вопроса об участке на рибосоме, который взаимодействует с матричным полинуклеотидом, базируется на следующем важнейшем наблюдении: каждая рибосома способна присоединить всего лишь одну цепь матричного полинуклеотида (Moog, 1966a). Следовательно, по-видимому, на рибосоме должен быть всего *один* функциональный участок, взаимодействующий с матричным полинуклеотидом. (Это не значит, что на рибосоме обязательно имеется всего одна точка взаимодействия или один центр такого взаимодействия. Полинуклеотид может удерживаться на рибосоме несколькими связывающими центрами, но поскольку они все равно не могут выступать в роли независимых связывающих участков, то следует рассматривать именно их совокупность как один связывающий кооператив.)

Заранее нельзя сказать, локализуется ли мРНК-связывающий участок исключительно на одной из двух субчастиц рибосомы (50 S или 30 S), или он формируется лишь совместно большой и малой субчастицами. Экспериментально этот вопрос решается таким образом: рибосому диссоциируют на большую и малую субчастицы, их разделяют и к каждой из них в отдельности добавляют матричный полинуклеотид и Mg^{++} до концентрации 10^{-2} M. Оказывается, что в этих условиях 30 S субчастица связывает матрицу, а 50 S субчастица нет (Takanami, Okamoto, 1963a; Okamoto, Takanami, 1963; Dahlberg, Haselkorn, 1967). На основании этого в настоящее время принимается, что мРНК-связывающий участок рибосомы локализован на *меньшей (30 S) субчастице рибосомы* (рис. 16).

Имеются определенные экспериментальные указания в пользу предположения, что мРНК-связывающий участок рибосомы формируется, по крайней мере частично, *белковым компонентом* 30 S субчастицы. Так, после очень мягкой обработки 70 S рибосомы или ее 30 S субчастицы трипсином их способность связывать матричный полинуклеотид уменьшается или утрачивается, несмотря на сохранение внешней целостности частиц (Zak et al., 1966; Kaji et al., 1966a). Получены и более прямые указания: найдено, что отделение определенной порции рибосомального белка от 30 S субчастицы лишает ее способности присоединять матричный полинуклеотид (полиУ), а добавление ее к «ободанным» 30 S субчастицам восстанавливает их способность связывать полиУ (Traub, Nomuga, 1968; Traub et al., 1967). Эта фракция включает в себя около 7 белковых молекул на 30S субчастицу, и из них 5 белков основного характера оказались наиболее существенными для этой функции. Одного какого-либо белка, который бы целиком отвечал за эту функцию, не найдено: без любого из 5 вышеуказанных белков функция сохраняется, хотя и несколько снижается (Traub et al., 1967). Отсюда можно думать, что мРНК-связывающая способность рибосомы обеспечивается *группой* рибосомальных белков. Аминогруппы рибосомального белка в связывании матричного полинуклеотида, по-видимому, не участвуют (Moore, 1966b).

Не исключено, что в дополнение к связыванию матрицы белковыми центрами рибосомы может существовать и возможность взаимодействий между участками матричного полинуклеотида и рибосомальной РНК. В пользу такой возможности также имеются некоторые косвенные экспериментальные указания (Moore, Asano, 1966; Millar et al., 1965; Moore, 1966b).

Общие соображения заставляют предполагать, что ассоциация матричного полинуклеотида с рибосомой допускает сравнительно легкое скольжение цепи полинуклеотида вдоль мРНК-связывающего участка. Во всяком случае, этого требуют условия последовательного «прочитывания» цепи мРНК при трансляции.

Очень вероятно, что местом расположения мРНК-связывающего участка является *контактирующая, т. е. обращенная к большой субчастице, поверхность* малой (30S или 40S) субчастицы. Так, известно, что диссоциация полной рибосомы на субчастицы путем понижения концентрации Mg^{++} сопровождается освобождением связанной мРНК; однако оказалось, что если диссоциацию субчастиц предотвратить путем фиксации рибосом формальдегидом, то матричный полинуклеотид не

может освободиться из рибосомы, несмотря на понижение концентрации Mg^{++} (Moore, 1966b). Вместе с тем, в контрольном эксперименте матричный полинуклеотид легко освобождался при понижении концентрации Mg^{++} из комплекса 30 S субчастица—матрица, обработанного формальдегидом (Moore, 1966b). Можно думать, таким образом, что в полной рибосоме матричный полинуклеотид как бы зажат между двумя субчастицами, будучи связан на контактирующей поверхности малой субчастицы и имея возможность свободно скользить вдоль нее (рис. 16).

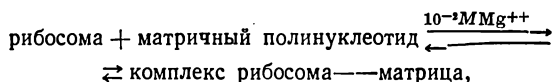
г. Резюме

Для комплексообразования очищенных рибосом с матричными полинуклеотидами в отсутствие всех других высокомолекулярных компонентов белок-синтезирующей системы требуется присутствие двухвалентных катионов — Mg^{++} или замещающих его Ca^{++} и Mn^{++} . При концентрации Mg^{++} в среде не ниже 0,005 M (от 0,005 до 0,02 M) рибосомы образуют стабильный комплекс с полиУ, менее стабильный с некоторыми природными мРНК, еще менее стабильный с полиЦ, и совсем нестабильный с полиА. Рибосома связывается лишь с однотяжными неспиральными участками полинуклеотидов. Каждая рибосома может связать лишь один полинуклеотид. Ответственной за связывание с матричным полинуклеотидом является 30 S субчастица рибосомы. На 30 S субчастице имеется специальный мРНК-связывающий участок. Он, вероятно, формируется, по крайней мере частично, рибосомальным белком. Не исключено, что рибосомальная РНК также может участвовать во взаимодействии с матричным полинуклеотидом. Имеются основания предполагать, что мРНК-связывающий участок расположен на контактирующей (обращенной к большой субчастице) поверхности малой субчастицы и что цепь матричного полинуклеотида может более или менее свободно скользить вдоль мРНК-связывающего участка между двумя субчастицами.

2. Связывание аминоксил-тРНК с рибосомой в присутствии матричного полинуклеотида (участок связывания акцепторной тРНК)

а. Условия образования тройственного комплекса и его стабильность

Если имеется рассмотренная выше равновесная система



то введение аминоксил-тРНК в эту систему приводит к формированию относительно стабильного комплекса рибосома—матрица—аминоксил-тРНК (Kaji, Kaji, 1963, 1964; Nakamoto et al., 1963; Spyrides, 1964; Nirenberg, Leder, 1964; Leder, Nirenberg, 1964a, b). При этом в комплекс вступает лишь та аминоксил-тРНК, которая *соответствует кодам матричного полинуклеотида*, т. е. происходит *строгий специфический выбор аминоксил-тРНК* из среды.

Достаточно стабильный тройственный комплекс рибосома—матрица—аминоксил-тРНК образуется в равной мере при использовании матричных полинуклеотидов, характеризующихся большой константой связывания с рибосомой (например, полиУ) или малой константой связывания (полиА, олигонуклеотиды) (Nirenberg, Leder, 1964; Kaji, Kaji, 1964), т. е. положение равновесия вышеприведенной реакции не имеет, по-видимому, существенного значения для результата образования тройственного комплекса. При введении аминоксил-тРНК в состав комплекса указывавшаяся выше значительная разница в прочности связи между рибосомой и полинуклеотидами разного состава исчезает; например, введение лизил-тРНК в систему рибосома + полиА делает связь рибосомы с полиА даже несколько более прочной, чем связь рибосомы с полиУ, в присутствии или в отсутствие фенилаланил-тРНК (McLaughlin et al., 1966). Таким образом, введение аминоксил-тРНК фактически обеспечивает образование стабильного комплекса независимо от собственного средства рибосомы к матричному полинуклеотиду.

Очевидно, вследствие этих же обстоятельств рибосома в присутствии соответствующих аминоксил-тРНК может образовывать достаточно стабильные комплексы с совсем короткими олигонуклеотидами, например, тринуклеотидами (Nirenberg, Leder, 1964), которые сами по себе с рибосомой почти не связываются (Hatfield, 1965, 1966).

Важно отметить, что участие всех трех компонентов — рибосомы, матрицы и аминоксил-тРНК — в формировании стабильного комплекса является кооперативным. Например, отдельно ни фенилаланил-тРНК, ни тринуклеотид УУУ или УУЦ с рибосомой почти не связываются, но добавление УУУ или УУЦ стимулирует связывание фенилаланил-тРНК, добавление фенилаланил-тРНК стимулирует связывание УУУ или УУЦ, и увеличение связывания тринуклеотида при этом приблизительно равно увеличению связывания аминоксил-тРНК (Hatfield, 1965, 1966). Такие же выводы можно сделать при анализе связывания полиА и лизил-тРНК с рибосомой (McLaughlin et al., 1966).

Образование тройственных комплексов требует приблизительно тех же концентраций ионов Mg^{++} , что и связывание рибосомы с полиУ, полиЦ или вирусной РНК в отсутствие аминоксил-тРНК — около 0,01 М. Для получения стабильных комплексов с участием тринуклеотидов используют более высокие концентрации ионов Mg^{++} — 0,02—0,03 М (Nirenberg, Leder, 1964). Из ряда работ следует, что образование тройственного комплекса стимулируется катионами K^+ или NH_4^+ (в концентрации до 0,05—0,1 М) (Spyrides, 1964; Pestka, Nirenberg, 1966a).

Образованный тройственный комплекс сохраняет стабильность в довольно широком интервале температур — от 0° и, по крайней мере, до 45—50° С при 0,03 М Mg^{++} , независимо от состава матричного полинуклеотида (McLaughlin et al., 1966). При дальнейшем повышении температуры комплекс диссоциирует. Диссоциация вполне обратима, так что при охлаждении комплекс образуется вновь. Температура диссоциации тройственных комплексов с участием разных матричных полинуклеотидов при 0,03 М Mg^{++} в среде лежит в пределах от 50 до 60°.

Компоненты тройственного комплекса на холоду при 0,02—0,03 М Mg^{++} , по-видимому, почти не обмениваются с экзогенными компонентами — во всяком случае в течение 10—20 мин. видимого обмена аминоксил-тРНК не удается заметить (Nirenberg, Leder, 1964; McLaughlin et al., 1966). Очевидно, в этих условиях комплекс весьма стабилен, константа ассоциации очень велика, скорость диссоциации мала. При более высоких температурах, например, 24° С, обмен аминоксил-тРНК, связанной в комплекс рибосома—триплет—аминоксил-тРНК, на экзогенную аминоксил-тРНК той же специфичности также очень медленный (Hatfield, 1966). Однако матричный триплет этого комплекса быстро обменивается на такой же экзогенный триплет (Hatfield, 1966).

При концентрации Mg^{++} 0,01 М и выше никаких других компонентов белок-синтезирующей системы для образования тройственного комплекса рибосома—матрица—аминоацил-тРНК, по-видимому, не требуется (Spyrides, Lipmann, 1962; Conway, 1964; Kaji, Kaji, 1964; Spyrides, 1964; Nirenberg, Leder, 1964; Nishizuka, Lipmann, 1966; Kurland, 1966).

Однако было найдено, что при более «физиологических» концентрациях Mg^{++} — около 0,005 М — специфическое связывание аминоксил-тРНК с рибосомой само по себе почти не происходит или происходит очень медленно; в этих условиях для быстрого и полного связывания аминоксил-тРНК с рибосомой, помимо матрицы, требуются также трансферные Т-факторы и ГТФ (Arlinghaus et al., 1964; Ravel et al., 1966; Ravel, 1967; Lucas-Lenard, Haenni, 1968; Ertel et al., 1968; Erbe, Leder, 1968; Ibuki, Moldave, 1968; Skoultchi et al., 1968). В отличие от «неэнзиматического» (т. е. идущего в отсутствие белковых факторов) связывания аминоксил-тРНК при высоких концентрациях Mg^{++} (0,01 М и выше), связывание, «катализируемое» Т-факторами и ГТФ, часто в литературе обозначают как «энзиматическое».

«Энзиматическое», т. е. Т-ГТФ-зависимое, связывание аминоксил-тРНК в тройственный комплекс рибосома—матрица—аминоацил-тРНК в бактериальных системах идет через следующие промежуточные этапы (см. Ravel et al., 1969; Lucas-Lenard et al., 1969; Weissbach et al., 1969; Skoultchi et al., 1969):

- 1) $TU—Ts + ГТФ + aa-тРНК \rightarrow aa-тРНК—TU—ГТФ + Ts$;
- 2) $aa-тРНК—TU—ГТФ + 70S \text{ рибосома—мРНК} \rightarrow 70S \text{ рибосома—мРНК—}aa-тРНК—TU—ГТФ$;
- 3) $70S \text{ рибосома—мРНК—}aa-тРНК—TU—ГТФ \rightarrow 70S \text{ рибосома—мРНК—}aa-тРНК + TU—ГДФ + \text{ортофосфат}$;
- 4) $TU—ГДФ + Ts \rightarrow TU—Ts + ГДФ$.

Аналогично, с участием фактора TF-I и ГТФ, происходит связывание аминоксил-тРНК с животной 80S рибосомой (см. Hardesty et al., 1969; Moldave et al., 1969). В результате образуется тройственный комплекс, трансферный фактор освобождается в среду, а ГТФ расщепляется до ГДФ и ортофосфата.

«Энзиматическое» связывание аминоксил-тРНК может протекать и без расщепления ГТФ. Так, если ГТФ заменить на его нерасщепляемый аналог — 5'-гуанилил-метил-дифосфо-

нат, то аминоацил-тРНК тоже оказывается связанной с комплексом рибосома—мРНК (Ertel et al., 1968; Haenni, Lucas-Lenard, 1968; Skogerson, Moldave, 1968), но процесс не идет далее реакции (2), т. е. Т-фактор и аналог ГТФ не освобождаются; вместо тройственного комплекса образуется пятикомпонентный комплекс рибосома—мРНК—*aa*-тРНК—Т-фактор—аналог ГТФ, который в последующих реакциях трансляции участвовать не может (Lucas-Lenard et al., 1969; Skoultchi et al., 1969).

Есть все основания полагать, что именно «энзиматическое», т. е. Т-ГТФ-зависимое, связывание аминоацил-тРНК является механизмом поступления аминоацил-тРНК в транслирующую рибосому *in vivo* и в бесклеточных системах *in vitro* (см. ниже, раздел III, 2, 6).

б. Участок матричного полинуклеотида, ассоциирующий с рибосомой и тРНК

То, что говорилось об участке матричного полинуклеотида, ассоциирующем с рибосомой с образованием двустороннего комплекса рибосома—матрица, сохраняет, по-видимому, силу и для случая тройственного комплекса рибосома—матрица—аминоацил-тРНК: этот участок должен быть одно-тяжным, а не двуспиральным. В данном случае это особенно существенно, так как ассоциирующий участок матричного полинуклеотида содержит *кодон*, азотистые основания которого должны быть открыты для комплементарного взаимодействия с антикодоном аминоацил-тРНК.

Опыты Ниренберга и Ледера (Nirenberg, Leder, 1964) показали, что уже тринуклеотид вступает в ассоциацию с рибосомой и соответствующей ему аминоацил-тРНК, давая тройственный комплекс. Свойства такого комплекса принципиально не отличаются от свойств комплекса с участием любого длинного полинуклеотида. Более того, определение термальной стабильности тройственных комплексов с участием полиА и олигоА разной длины (рибосома—полиА—лизил-тРНК) дало следующий результат: стабильность комплекса с участием тринуклеотида (A_3) почти не отличается от стабильности комплекса, в который входят полиА длиной свыше 100 нуклеотидов; такую же стабильность дают олигоА длиной в 6 и 8 нуклеотидов (McLaughlin et al., 1966). Это позволяет думать, что уже тринуклеотидного участка полинуклеотида достаточно для связывания с рибосомой и тРНК в тройном комплексе. В таком случае именно *короткая двуспиральная пара кодон-антикодон* должна быть, по-видимому, *основной точкой удержания* матричного полинуклеотида (так же как и

тРНК, см. ниже) на рибосоме в тройственном комплексе рибосома—матрица—аминоацил-тРНК.

Однако термальная стабильность комплекса с участием полиУ (рибосома—полиУ—фенилаланил-тРНК) зависит от длины полинуклеотида: полиУ длиной свыше 100 нуклеотидов дает заметно более высокую стабильность, чем олигоУ длиной 8 нуклеотидов, и еще более высокую, чем олигоУ длиной 4 нуклеотида (McLaughlin et al., 1966). Это может быть связано с уже отмечавшимся выше обстоятельством, что полипиримидиновые полинуклеотиды могут взаимодействовать другими участками цепи с рибосомальной РНК, обеспечивая тем самым дополнительный вклад в стабильность комплекса.

Когда изучали образование тройственных комплексов с участием олигонуклеотидов (U_3 , U_4 , A_3 и т. п.) в качестве матрицы, было отмечено, что с олигонуклеотидами без 5'-концевого фосфата комплексобразование идет хуже, чем в случае олигонуклеотидов с фосфорилированным 5'-концом, а наличие фосфата на 3'-конце, наоборот, ингибирует комплексобразование (Nirenberg, Leder, 1964). Очевидно, фосфатный остаток на 5'-конце матричного полинуклеотида как-то способствует ассоциации рибосомы с полинуклеотидом и тРНК, хотя и далеко не обязателен.

в. Участки аминоксил-тРНК, взаимодействующие с матричным полинуклеотидом и рибосомой

Как уже говорилось, в состав тройственного комплекса рибосома—матрица — аминоксил-тРНК входит строго избирательно лишь та аминоксил-тРНК, которая несет аминокислоту, кодируемую матрицей. В то же время, согласно адапторной гипотезе (Crick, 1958; Chapeville et al., 1962), специфичность самого аминоксильного остатка не должна играть роли в обеспечении избирательности связывания аминоксил-тРНК в комплекс. Более того, экспериментальные данные показывают, что аминоксильный остаток вообще не обязателен для специфического связывания тРНК в тройственный комплекс: в процессе «неэнзиматического» связывания неацилированная тРНК, специфичная для аминокислоты, кодируемой матрицей, тоже связывается с рибосомой в присутствии матрицы (Kaji, Kaji, 1964; Kurland, 1966; Levin, 1966; Seeds, Conway, 1966; Levin, Nirenberg, 1968; Philipps, 1970).

Ясно, что если аминоксильный остаток не обязателен для избирательного связывания аминоксил-тРНК, то с кодоном матричного полинуклеотида, определяющим избирательность связывания, должна взаимодействовать лишь сама полинуклеотидная цепь тРНК. Взаимодействие это должно быть строго

специфично, т. е., очевидно, это должно быть *комплементарное* взаимодействие кодона с определенным участком цепи тРНК. Следовательно, каждая молекула тРНК должна иметь специальный участок, комплементарный к тому кодону, который кодирует аминокислоту, акцептируемую данной тРНК. Этот участок, состоящий, как и кодон, из трех нуклеотидных остатков, получил название *антикодона*. Антикодон в цепи тРНК занимает приблизительно серединное положение (с 34—36-го по 36—38-й нуклеотиды). Вся избирательность связывания именно данной специфической аминокислоты-тРНК при наличии в рибосоме соответствующего кодона определяется нуклеотидным составом и последовательностью антикодонного участка тРНК.

Почти несомненно, что комплементарное связывание антикодона тРНК с кодоном матричного полинуклеотида и в количественном отношении должно вносить существенный вклад в удержание аминокислот-тРНК в комплексе. Правда, в условиях водного раствора комплементарное взаимодействие всего по трем нуклеотидам обычно очень слабо и безусловно не могло бы обеспечить достаточно сильного удержания большой молекулы аминокислот-тРНК на матричном полинуклеотиде (Lipsett et al., 1961; Lipsett, 1964; Michelson, 1965; McLaughlin et al., 1966). Однако в соответствующем окружении на рибосоме стабильность кодон-антикодонного взаимодействия может быть значительно выше, чем в растворе.

Хотя ясно, что антикодону принадлежит важнейшая роль в обеспечении связывания аминокислот-тРНК в тройственном комплексе, трудно обойтись без допущения о возможной роли и других участков тРНК в удержании ее на рибосоме. Во-первых, дополнительное, пусть даже слабое, связывание тРНК по каким-то другим участкам цепи, если бы оно существовало, помогло бы объяснить относительно прочное удержание ее в комплексе. Во-вторых, необходимость более или менее жесткой ориентации аминокислот-тРНК на рибосоме также требует допустить дополнительное связывание тРНК по участку, отличному от антикодона. В-третьих, в экспериментах можно обнаружить некоторое сродство тРНК к самой рибосоме — например, при рН около 5—6 наблюдается заметное присоединение аминокислот-тРНК к 30 S субчастице рибосомы в отсутствие матрицы (Pestka, Nirenberg, 1966a).

Удобной рабочей гипотезой является предположение о *двухцентровом* связывании остатка тРНК рибосомой: одной точкой связывания является кодон-антикодонная пара, а другой — какой-то неспецифический, универсальный для всех тРНК, район молекулы. Согласно этой гипотезе, прочная по-

сатка молекулы тРНК на рибосому будет достигаться лишь при наличии сразу обеих точек связывания, а вклад каждой из них в отдельности не достаточен для удержания тРНК.

Универсальным нуклеотидным сочетанием всех тРНК является гексануклеотидная последовательность ГТΨЦГА (в некоторых случаях может быть ГТΨЦАА; последний А может быть метилирован) в районе 50—60-го нуклеотида (Венкстерн, 1970) (см. рис. 15). Этому универсальному блоку в молекуле тРНК и было бы логично приписать функцию дополнительного связывания с рибосомой. Имеющиеся экспериментальные данные подтверждают эту гипотезу: показано, что свободный тетра-нуклеотид ТΨЦГ сильно ингибирует специфическое связывание аминоацил-тРНК с рибосомами; другие тетрануклеотиды не обладают таким ингибирующим действием (Ofengand, Henes, 1969; Shimizu et al., 1970).

Относительно роли универсальной 3'-концевой последовательности ЦЦА и связанного с ней аминоацильного остатка можно сказать следующее: они во всяком случае не обязательны для специфического связывания тРНК с рассматриваемым тРНК-связывающим участком рибосомы; более того, на 30 S субчастице рибосомы, где расположен этот участок (см. ниже, раздел «г»), центров, взаимодействующих с аминоацильным остатком и примыкающей к нему 3'-концевой последовательностью ЦА, по-видимому, вообще нет (Pestka, 1970).

Следует отметить, что при «энзиматическом» (т. е. Т-ГТФ-зависимом) связывании аминоацил-тРНК в тройственный комплекс аминоацильный остаток оказывается строго необходимым: связывание деацилированной тРНК, а также тРНК с ацетилированным или дезаминированным аминоацильным остатком, вовсе не стимулируется Т-факторами и ГТФ (Revel et al., 1967, 1969; Lucas-Lenard, Haenni, 1968; Jerez et al., 1969; Siler, Moldave, 1969). Аминоацильный остаток здесь, однако, оказывается нужен для связывания аминоацил-тРНК с комплексом Т-фактор—ГТФ, а не для взаимодействия с рибосомой.

Вместе с тем связывание аминоацильного остатка и примыкающей к нему 3'-концевой последовательности тРНК (...-ЦА-аминоацил) с рибосомой все же в конце концов происходит как в результате «неэнзиматического», так и в результате Т-ГТФ-зависимого связывания аминоацил-тРНК. Однако этот ...-ЦА-аминоацильный конец молекулы связывается, по-видимому, уже не в пределах разбираемого здесь тРНК-связывающего участка, а с совсем другим функциональным центром

рибосомы — с акцептор-связывающим центром пептидил-трансферазного участка (см. ниже, раздел 4). Тем не менее, как и надо ожидать, эта еще одна точка удержания молекулы аминоацил-тРНК в рибосоме обеспечивает дополнительное закрепление и, тем самым, большую стабильность связывания аминоацил-тРНК по сравнению с деацилированной тРНК или с тРНК без 3'-концевых нуклеотидов на целой (70S) рибосоме.

г. Участок рибосомы, взаимодействующий с кодон-антикодоновой парой и тРНК

Как уже отмечалось, рибосома имеет всего один функциональный участок, связывающий матричный полинуклеотид, и указанный участок локализован на 30S субчастице. В полном соответствии с этим оказалось, что изолированные 30S субчастицы, как и целые 70S рибосомы, могут «неэнзиматически» формировать тройственный комплекс с матричным полинуклеотидом и аминоацил-тРНК (Matthaei et al., 1964; Suzuka et al., 1965; Kaji et al., 1966b; Pestka, Nirenberg, 1966a, b). Комплекс 30S — матрица — аминоацил-тРНК наиболее полно образуется при концентрации ионов Mg^{++} около 0,02 M, хотя и при 0,01 M Mg^{++} комплексообразование довольно существенно. Связывание аминоацил-тРНК в комплекс с 30S субчастицей и матричным полинуклеотидом строго специфично: выбор данной аминоацил-тРНК целиком определяется матричным полинуклеотидом или олигонуклеотидом в точном соответствии с кодом. В комплекс одинаково связывается как аминоацил-тРНК, так и соответствующая свободная деацилированная тРНК. Ионы K^+ и $[NH_4]^+$ в концентрации 0,1 M стимулируют связывание аминоацил-тРНК в системе 30S субчастица + матрица. Без матричного полинуклеотида 30S субчастица практически лишена способности связывать аминоацил-тРНК или тРНК при обычных условиях (0,01—0,02 M Mg^{++} , pH 7—9). Трансферные Т-факторы и ГТФ ни при каких условиях не стимулируют связывание аминоацил-тРНК с изолированной 30S субчастицей, т. е. «энзиматического» связывания с ней не наблюдается (Lucas-Lenard, Haenni, 1968).

Таким образом, во всех существенных чертах условия образования комплекса 30S — матрица — аминоацил-тРНК идентичны условиям «неэнзиматического» образования обычного тройственного комплекса рибосома — матрица — аминоацил-тРНК (см. выше, раздел 2, а). Это не может не указывать на то, что именно 30S субчастица несет основную ответственность за специфическое связывание аминоацил-тРНК на

рибосоме в присутствии матрицы. Следовательно, именно на 30 S субчастице должен быть локализован участок, связывающий кодон-антикодоновую пару, и, вероятно, другие части молекулы тРНК. Другими словами, на малой субчастице рибосомы расположен участок *специфического (избирательного) связывания тРНК*.

Этот тРНК-связывающий участок ответствен за выбор из среды и связывание с рибосомой аминоацил-тРНК, соответствующей кодону матричного полинуклеотида. Из рассмотрения механизма трансляции (см. ниже, раздел III, 2) будет видно, что в каждом акте образования пептидной связи в рибосоме аминоацильный остаток специфически связываемой молекулы аминоацил-тРНК является *акцептором* пептидила: пептидный остаток переносится от своего остатка тРНК на аминогруппу аминоацильного остатка связанной молекулы аминоацил-тРНК. Поэтому специфически связываемая в тройственный комплекс тРНК может быть обозначена как *акцепторная тРНК*, а связывающий ее участок, расположенный на малой (30 S или 40 S) рибосомной субчастице, — как участок связывания акцепторной тРНК, или *акцепторный тРНК-связывающий участок*. Сокращенно этот участок малой субчастицы называют также *А-участком* (A site).

Уже говорилось, что удобной рабочей гипотезой является предположение о наличии по крайней мере двух связывающих центров в А-участке малой рибосомной субчастицы: центра удержания кодон-антикодовой пары и центра удержания какого-то более универсального района тРНК (возможно, ее ГТΨЦГА участок). Такое двухцентровое связывание остатка акцепторной тРНК в А-участке должно обеспечивать надлежащую прочность связывания, правильную жесткую установку и ориентацию молекулы в рибосоме и в то же время легкость смещения со своего места при нарушении хотя бы одного центра связывания.

Пока нельзя сказать с определенностью, какой из двух химических компонентов 30 S субчастицы — рибосомальная РНК или рибосомальный белок — принимает главное участие в связывании кодон-антикодовой пары и другой части молекулы тРНК, т. е. в формировании центров акцепторного тРНК-связывающего участка. Из общих соображений скорее можно отдать предпочтение *белковому компоненту* в качестве ответственного за связывание тРНК. Действительно, было получено экспериментальное указание на роль аминогруппы рибосомального белка в связывании тРНК (Моогс, 1966b). Обработка рибосом трипсином приводит к быстрой инактивации функции специфического связывания аминоацил-тРНК (Takeda et

al., 1968). Более прямые данные об участии рибосомальных белков в формировании тРНК-связывающих центров 30 S субчастицы были получены в лаборатории Номура (Tгауб, Номура, 1968; Tгауб et al., 1967): путем обработки 30 S субчастицы высокой концентрацией CsCl в присутствии 0,02—0,04 М $MgCl_2$ от нее отщепляется 7 белковых молекул, в результате чего полностью исчезает способность связывать аминоксил-тРНК в присутствии матричного полинуклеотида. Из отщепляемых 7 белков 2 белка основного характера оказались особенно важными и абсолютно необходимыми для тРНК-связывающей активности, т. е. для формирования акцепторного тРНК-связывающего участка (Tгауб et al., 1967).

д. Резюме

При наличии матричного полинуклеотида и аминоксил-тРНК в системе рибосома образует стабилизированный тройственный комплекс рибосома—матрица—аминоксил-тРНК. В комплекс строго избирательно связывается лишь аминоксил-тРНК, специфичность которой соответствует кодам матричного полинуклеотида (так называемое «специфическое связывание» аминоксил-тРНК). Присутствие или отсутствие самого аминоксильного остатка, однако, не имеет решающего значения. В ассоциации участвует однотяжный участок матричного полинуклеотида. Для образования тройственного комплекса необходима концентрация Mg^{++} в среде около 0,01—0,02 М. Ионы K^+ и NH_4^+ стимулируют ассоциацию. При более низких концентрациях Mg^{++} (около 0,005 М) для процесса связывания аминоксил-тРНК с рибосомой необходимы белковые трансферные факторы (Т) и ГТФ.

Основой тройственной ассоциации является, по-видимому, комплементарное взаимодействие кодона матричного полинуклеотида с антикодоном тРНК и удержание этой кодон-антикодоновой пары на рибосоме. Указанное удержание кодон-антикодоновой пары и образование тройственного комплекса обеспечивается в основном 30 S субчастицей рибосомы. Вероятно, что на 30 S субчастице имеются дополнительные центры связывания тРНК, в совокупности с кодон-антикодон-связывающим центром образующие участок специфического связывания тРНК, или акцепторный тРНК-связывающий участок (А-участок). Можно думать, что основную ответственность за формирование этого связывающего участка на 30 S субчастице несут рибосомальные белки.

3. Удержание тРНК на рибосоме в отсутствие матрицы (участок связывания донорной тРНК)

Показано, что рибосомы *E. coli* могут связывать тРНК или аминоацил-тРНК и в отсутствие матричного полинуклеотида (Cannon et al., 1963; Cannon, 1967; Takeda et al., 1968). В отличие от избирательного связывания специфической тРНК в присутствии матрицы это связывание иногда обозначают как «неспецифическое связывание» тРНК рибосомой.

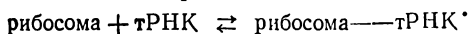
Пептидил-тРНК, добавленные к рибосомам в отсутствие матричного полинуклеотида, обнаруживают гораздо более активное «неспецифическое» связывание, чем свободные тРНК или аминоацил-тРНК (Rychlik, 1966b; Pestka, Nirenberg, 1966b).

Транслирующая рибосома всегда содержит пептидил-тРНК (см. ниже, раздел III, 2, а). Оказывается, что в определенные фазы рабочего цикла транслирующей рибосомы пептидил-тРНК удерживается в ней настолько прочно, что не диссоциирует даже при диссоциации рибосомы на субчастицы и полном удалении матрицы в низкой концентрации Mg^{++} (Gilbert, 1963). Это независимое от мРНК прочное удержание молекулы пептидил-тРНК частично определяется тем же участком рибосомы, который обеспечивает «неспецифическое связывание» тРНК (Cannon, 1967).

а. Условия связывания и стабильность комплекса

Для связывания тРНК или аминоацил-тРНК очищенными рибосомами без матрицы требуется лишь концентрация Mg^{++} около 0,01 М или выше. Различные тРНК и аминоацил-тРНК связываются, по-видимому, в равной мере, т. е. рибосома не предпочитает ни одну из них. При 10^{-4} М Mg^{++} комплекс рибосома—тРНК полностью диссоциирует. Характерная особенность рассматриваемого комплекса состоит в том, что его образование подавляется ионами K^{+} даже при сохранении высокой концентрации ионов Mg^{++} . Комплекс хорошо образуется на холоду (0—4° С). Ни источников энергии, ни белковых факторов не требуется.

Связанная тРНК или аминоацил-тРНК легко обменивается с экзогенными тРНК. При этом избыток тРНК легко вытесняет аминоацил-тРНК из рибосомы, и наоборот. Следовательно, существует динамическое равновесие:



Очень лабильная связь и легкая обмениваемость связанной тРНК является, по-видимому, существенной отличительной чертой этого комплекса по сравнению с так называемым «специфическим» связыванием тРНК в присутствии матрицы (см. выше, раздел 2).

Связывание пептидил-тРНК с рибосомой является, по-видимому, гораздо более сильным (Rychlik, 1966b). Оно требует также концентрации Mg^{++} около 0,01 М, но одновалентные катионы K^+ и NH_4^+ в концентрации 0,1 М при этом не подавляют образование комплекса. Связывание частично подавляется ионами Na^+ и Li^+ . Комплекс хорошо образуется при 0°, и повышение температуры до 25° лишь немного ускоряет комплексообразование. Ни источников энергии, ни белковых факторов здесь также не требуется. Можно думать, что неспецифическое связывание пептидил-тРНК с рибосомой во всем принципиально аналогично неспецифическому связыванию свободных тРНК и аминоацил-тРНК, за исключением значительной разницы в силе связывания.

Удержание пептидил-тРНК транслирующей рибосомой (в пост-транслоцированном состоянии — см. ниже, раздел III, 2, а, г) характеризуется еще большей силой связывания: эта пептидил-тРНК не диссоциирует даже при 10^{-4} М Mg^{++} (Gilbert, 1963).

б. Возможные участки тРНК, взаимодействующие с рибосомой

При рассмотрении участков тРНК, могущих обеспечить ее «неспецифическое связывание» с рибосомой, прежде всего следует, естественно, обратить внимание на универсальные, общие для всех тРНК нуклеотидные сочетания. Уже отмечалось, что универсальный гексануклеотидный блок имеется в районе 50—60-го нуклеотидов: ГТΨЦГА (см. рис. 15). На основании экспериментальных данных, показывающих, что свободный тетра-нуклеотид ТΨЦГ сильно ингибирует связывание тРНК не только по акцепторному тРНК-связывающему участку (см. выше, раздел 3, в), но и по другому тРНК-связывающему участку рибосомы (Ofengand, Henes, 1969), можно думать о важной роли указанного универсального блока нуклеотидов в обеспечении неспецифического связывания тРНК с рибосомой.

Определенное сходство у разных тРНК имеется также в районе около 20-го нуклеотида цепи, где сосредоточена большая часть дигидроуридиловых остатков (см. рис. 15). Было бы интересно выяснить, не несет ли и «дигидроуридиловый» участок тРНК какой-либо функции в «неспецифическом» связыва-

нии тРНК с рибосомой. Опыты Пестка (Pestka, 1970) по периодатному окислению тРНК дают некоторое косвенное указание на участие «дигидроуридилового» блока молекулы в ее «неспецифическом связывании» с рибосомой.

С рибосомой, как уже указывалось, могут связываться как свободные (деацилированные), так и аминокацилированные тРНК, т. е. присутствие аминокацильного остатка на 3'-конце цепи не меняет коренным образом сродство молекулы к рибосоме. Однако, если на 3'-конце цепи тРНК присутствует не аминокацил, а пептидил, даже очень короткий, всего из двух-трех аминокислотных остатков, то сродство всей молекулы к рибосоме резко возрастает (Cannon, 1967). Комплекс рибосома—пептидил-тРНК оказывается стабильным не только при 10^{-2} М Mg^{++} , но даже при 10^{-4} М Mg^{++} как в отсутствие, так и в присутствии ионов K^{+} ; замещения пептидил-тРНК на экзогенные тРНК, даваемые в большом избытке, не наблюдается, т. е. константа связывания, очевидно, очень велика. В этом случае именно *N-блокированный* аминокацильный остаток со *сложноэфирной группой*, соединяющей его с тРНК, представляет собой точку сильного дополнительного связывания молекулы пептидил-тРНК с рибосомой; строго говоря, эта точка связывания имеет место уже за пределами разбираемого участка «неспецифического связывания» тРНК, будучи расположена в пептидил-трансферазном участке (см. ниже, раздел 4).

в. Участок рибосомы, взаимодействующий с тРНК

Имеющиеся экспериментальные данные (Cannon et al., 1963; Cannon, 1967) показывают, что на рибосоме имеется, по-видимому, только *один участок* для разбираемого «неспецифического» обратимого связывания тРНК или аминокацил-тРНК. Этот же участок частично ответствен за прочное удержание пептидил-тРНК (Cannon, 1967).

В опытах с изолированными субчастицами доказывалось, что только 50S субчастица, но не 30S субчастица, связывает тРНК или аминокацил-тРНК в отсутствие матричного полинуклеотида. Точно так же, если рибосома содержит пептидил-тРНК, то после диссоциации она остается в связи с 50S субчастицей. Следовательно, участок, связывающий тРНК в отсутствие матрицы, локализован на *50S субчастице* рибосомы, по всей вероятности, на ее поверхности, примыкающей к 30S субчастице (см. рис. 16).

Разбираемый тРНК-связывающий участок большой рибосомной субчастицы в транслирующей рибосоме удерживает остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК (см. ниже, раздел III, 2, а). Так как в акте образования пептидной связи пептидный

остаток переносится от этой тРНК на новопоступившую, специфически связавшуюся по А-участку молекулу аминоксил-тРНК, то данная тРНК может рассматриваться как *донор* пептидила. Поэтому участок «неспецифического связывания» тРНК, расположенный на 50S субчастице, можно обозначить как участок удержания донорной тРНК, или *донорный тРНК-связывающий участок*. Иногда в литературе его обозначают также как пептидил-тРНК-связывающий участок, хотя это название менее точно, если иметь в виду лишь участок связывания остатка тРНК. Принятое сокращенное обозначение этого тРНК-связывающего участка — *D-участок* или *P-участок* (D site или P site).

Показано, что связывание тРНК на 50S субчастице зависит от определенной небольшой фракции структурного рибосомального белка этой субчастицы (Traub, Nomura, 1968; Rasakas, Staehelin, 1967). При удалении этой фракции в процессе разборки субчастицы способность связывать тРНК утрачивается; если же данные белки воссоединить с субчастицей, то способность связывать тРНК восстанавливается даже при отсутствии ряда других структурных белков. Строго необходимыми для этой функции оказались всего 1—2 белка основного характера (Traub, Nomura, 1968). Таким образом, можно думать, что белковый компонент несет главную ответственность за формирование тРНК-связывающего участка на 50S субчастице.

г. Специфическая стимуляция присоединения пептидил-тРНК к рибосоме в присутствии матрицы

Показано, что хотя пептидил-тРНК (в частности, полилизил-тРНК) довольно существенно связывается с рибосомой в отсутствие матрицы, но добавление соответствующего ей матричного полинуклеотида (полиА) заметно стимулирует связывание пептидил-тРНК с донорным тРНК-связывающим участком (Rychlik, 1966b; Pestka, Nirenberg, 1966b). Можно думать, что попадание пептидил-тРНК на донорный тРНК-связывающий участок 50S субчастицы значительно облегчается, если оно проходит *через предварительное специфическое связывание с матричным полинуклеотидом и акцепторным тРНК-связывающим участком на 30S субчастице*. Во всяком случае это выглядит как одно из разумных объяснений приведенным выше данным по стимуляции. Возможность специфического связывания пептидил-тРНК с 30S субчастицей в присутствии соответствующей матрицы показана экспериментально (Pestka, Nirenberg, 1966b). Кроме того, найдено, что матричный полинуклеотид, не соответствующий по своей кодовой специфич-

ности изучаемой пептидил-тРНК, практически полностью подавляет ее неспецифическое связывание с полной (70 S) рибосомой, хотя не влияет на ее связывание с изолированной 50 S субчастицей (Pestka, Nirenberg, 1966b).

Последнее указывает на то, что присутствие матрицы в полной рибосоме должно полностью подавлять *неспецифическое* связывание и аминоацил-тРНК с донорным тРНК-связывающим участком 50 S субчастицы. Если аминоацил-тРНК в присутствии матрицы попадает на донорный тРНК-связывающий участок полной (70 S) рибосомы, то лишь через предварительное специфическое связывание с матрицей на акцепторном тРНК-связывающем участке 30 S субчастицы. Это означает, что любое связывание по обоим тРНК-связывающим участкам рибосомы *в присутствии матрицы может быть лишь специфичным*. Имеются экспериментальные доказательства такого специфического связывания двух молекул аминоацил-тРНК на рибосому: одной молекулы — по донорному тРНК-связывающему участку (по Р-участку), а другой молекулы — по акцепторному тРНК-связывающему участку (по А-участку) (Seeds et al., 1967; Igarashi, Kaji, 1967, 1970; Suzuka et al., 1970).

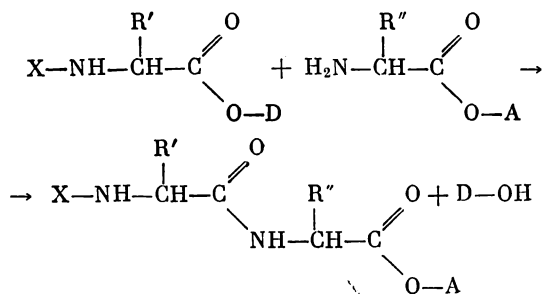
д. Резюме

Очищенные рибосомы могут связывать деацилированную тРНК или аминоацил-тРНК в отсутствие всех других высокомолекулярных компонентов белок-синтезирующей системы, в том числе в отсутствие матричных полинуклеотидов. Для этого связывания необходима лишь определенная концентрация двухвалентных катионов — Mg^{++} в среде: около 0,01 М. Ионы K^{+} подавляют такое связывание. Специфичность тРНК и присутствие или отсутствие аминоацильного остатка не имеют решающего значения для связывания. Связанная тРНК или аминоацил-тРНК находится в динамическом равновесии с экзогенными тРНК и легко обменивается с ними. Пептидил-тРНК гораздо более прочно удерживается в связи с рибосомой в отсутствие матрицы.

На рибосоме имеется всего один участок, связывающий тРНК в отсутствие матрицы. Этот участок расположен на 50S субчастице и может быть обозначен как *донорный тРНК-связывающий участок* (D-участок). Он формируется вероятнее всего определенной небольшой группой рибосомальных белков. По-видимому, именно в этом участке располагается остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК, прочно удерживаемой работающей рибосомой.

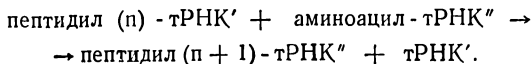
4. Катализ образования пептидной связи (пептидил-трансферазный участок)

Реакция образования пептидной связи в рибосоме есть реакция *транспептидации*: пептидный остаток, связанный сложн-ноэфирной связью с 3'-концом тРНК, переносится на амино-группу аминоацильного остатка молекулы аминоацил-тРНК с образованием пептидной связи. В самом общем виде реакция может быть написана следующим образом:



(где X — любой ацил, включая пептидил, аминоацил, ацетил или формил; D и A — остатки тРНК; R' и R'' — боковые радикалы участвующих в реакции аминоацильных остатков). В этой реакции аминоацильный остаток со свободной амино-группой (прикрепленной к 3'-концу тРНК «A») является *акцептором*, а 3'-концевая группировка тРНК «D» — *донором* пептидила (или любого другого N-ацилированного аминоацила, прикрепленного к 3'-концу тРНК «D»).

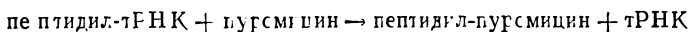
Таким образом, в транслирующей рибосоме исходными субстратами реакции являются пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК; в ходе реакции в молекуле пептидил-тРНК происходит замещение ее остатка тРНК на аминоацил-тРНК; в итоге продуктами реакции являются свободная (деацилированная) тРНК и пептидил-тРНК с удлиненным на одно аминоацильное звено пептидным остатком:



а. Условия реакции

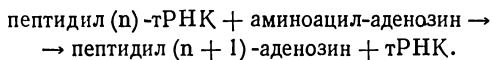
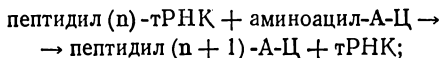
Реакция транспептидации протекает в рибосоме при наличии связанных с ней обоих субстратов — пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК — и не требует никаких других компонентов белок-синтезирующей системы, в том числе белковых факторов и ГТФ (Gottesman, 1967).

Оказалось, что для реакции транспептидации в рибосоме можно обойтись и без связанной аминоксил-тРНК, а дать вместо нее более простой акцептор пептидила, например, пурамицин (см. ниже, раздел IV, 1). Пурамицин представляет собой аналог аминокислированного 3'-концевого аденозина тРНК, и рибосома, удерживающая пептидил-тРНК, способна переносить пептидный остаток на аминокислильную группу аминокислильного остатка пурамицина так же, как она переносит его на аминоксил-тРНК:

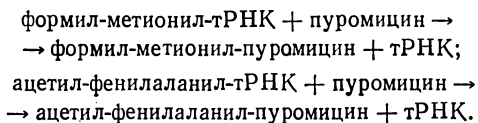


Эта реакция транспептидации с пурамицином вместо аминоксил-тРНК также не требует ни белковых факторов, ни ГТФ, а лишь наличия рибосомы и связанной с ней пептидил-тРНК (Traut, Monro, 1964; Rychlik, 1966a; Maden et al., 1968).

Вместо пурамицина в качестве низкомолекулярного акцептора пептидного остатка в рибосомной реакции транспептидации можно использовать аминокислированные 3'-концевые фрагменты тРНК (Takanami, 1964; Waller et al., 1966; Rychlik et al., 1967, 1969; Gottikh et al., 1970); минимальными акцепторными фрагментами для осуществления реакции транспептидации на рибосоме являются фрагменты типа Ц-А-аминоксил [цитидилил-(3' → 5')-0-аминоксил-аденозины], а в случае некоторых аминокислилов (лейцил, фенилаланил, тирозил) — даже типа А-аминоксил (3'-0-аминоксил-аденозины):

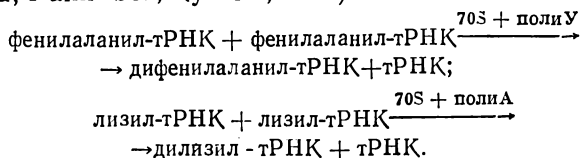


Нормальная реакция транспептидации идет и в том случае, если в рибосоме в качестве донора присутствует не истинная пептидил-тРНК, а любая N-ацилированная аминоксил-тРНК, например, формил-метионил-тРНК или ацетил-фенилаланил-тРНК (Bretscher, Marcker, 1966; Zamir et al., 1966; Lucas-Le-nard, Lipmann, 1967):

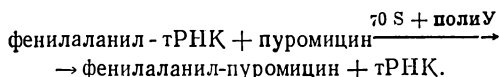


В условиях «неэнзиматического» связывания обычная аминоксил-тРНК может попадать не только в акцепторный, но и в донорный участок рибосомы, и тогда в рибосоме с каким-то

(обычно не очень большим) выходом может идти трансферазная реакция даже между двумя аминоксил-тРНК (Pestka, 1967, 1968a; Pulkrábek, Rychlik, 1968):

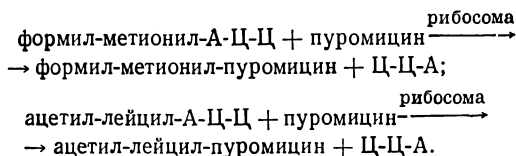


По этой же причине, если обычная аминоксил-тРНК, связываемая «неэнзиматически», затем попадает в донорный участок рибосомы, то она может медленно реагировать с пурамином (Sarkar, Thach, 1968):



Во всех этих случаях также никаких белковых факторов и ГТФ не требуется; в то же время ассоциация донорного субстрата реакции с рибосомой является обязательной.

Реакцию транспептидации в рибосоме оказалось возможным упростить еще более: было показано, что в качестве донорного субстрата реакции тоже можно брать не полную пептидил-тРНК или N-блокированную аминоксил-тРНК, а ее фрагмент. Впервые это было сделано с 3'-концевым гексануклеотидным фрагментом формил-метионил-тРНК — Ц-А-А-Ц-Ц-А-метионил-формил (Монго, Marcker, 1967), а затем с еще более короткими фрагментами типа Ц-Ц-А-метионил-формил, Ц-Ц-А-лейцил-ацетил и т. п. (Монго et al., 1968):



Необходимым условием реакции является то, чтобы донорный фрагмент имел возможность ассоциировать с рибосомой, и, по-видимому, именно для этого реакцию в данном случае приходится проводить в присутствии этанола или метанола. Минимальным олигонуклеотидным остатком, еще обеспечивающим ассоциацию донорного фрагмента с рибосомой в этих условиях, является тринуклеотид Ц-Ц-А. (Следует напомнить, что эта тринуклеотидная последовательность Ц-Ц-А является

универсальной 3'-концевой группировкой всех без исключения тРНК.)

Во всех случаях реакция транспептидации на рибосоме обязательно требует присутствия ионов Mg^{++} и K^+ (Traut, Monro, 1964; Monro, Marcker, 1967; Maden, Monro, 1968; Pestka, 1968a). В большинстве случаев (кроме реакции с донорным фрагментом в этаноле или метаноле) Mg^{++} с успехом может быть заменен на Ca^{++} , а K^+ — на NH_4^+ ; Mn^{++} вместо Mg^{++} , а Rb^+ и Cs^+ вместо K^+ также могут быть активны в большей или меньшей степени (Maden, Monro, 1968). Sr^{++} , Ba^{++} , спермидин, Na^+ , Li^+ полностью инертны, т. е. не могут заменить Mg^{++} или K^+ , не активируют реакции, но и не ингибируют ее. Be^{++} , Zn^{++} и Hg^{++} являются сильными ингибиторами. Реакция ингибируется при низких pH и стимулируется по мере повышения pH до 8,5 — 9 (Maden, Monro, 1968).

Интересно, что реакция транспептидации в рибосоме не ингибируется сульфгидрильными ядами (*парахлормеркурибензоат*, *параоксимеркурибензоат*, *иодозобензоат* и др.) (Traut, Monro, 1964; Monro, 1967; Pestka, 1968a).

Итак, для проведения реакции транспептидации оказывается необходимым и достаточным наличие: 1) рибосомы; 2) связанного или связывающегося с рибосомой донорного субстрата — N-блокированного аминоацильного остатка, соединенного сложноэфирной связью с аденозином тринуклеотидного сочетания Ц-Ц-А; 3) акцепторного субстрата — аминоацильного остатка, соединенного сложноэфирной связью с аденозином динуклеотидного сочетания Ц-А; 4) ионов Mg^{++} (или Ca^{++}) и K^+ (или NH_4^+).

6. Участок рибосомы, ответственный за транспептидацию

Так как для проведения реакции транспептидации рибосома не требует никаких растворимых белковых факторов, то очевидно, что она сама осуществляет катализ транспептидации. Другими словами, ферментативная — пептидил-трансферазная — активность есть функция самой рибосомной частицы (Traut, Monro, 1964; Rychlik, 1966a; Zamir et al., 1966; Gottesman, 1967; Monro, Marcker, 1967; Pestka, 1968a; Maden et al., 1968). Отсюда автоматически принимается существование специального «энзиматического» *пептидил-трансферазного участка* на рибосоме.

Оказалось, что реакцию транспептидации может с равным успехом катализировать не только полная (70S) рибосома, но и ее большая (50S) субчастица (Traut, Monro, 1964; Monro, 1967; Maden et al., 1968). Именно большая субчастица рибосомы удерживает на себе донорный субстрат реакции (пепти-

дил-тРНК, N-ацил-аминоацил-тРНК или фрагмент N-ацил-аминоацил-тРНК). Добавление акцепторного субстрата (пу-ромицина) в среду приводит к реакции образования пептидной связи. Все условия, необходимые для реакции транспептидации с участием большой субчастицы рибосомы, не отличаются от условий в случае полной рибосомы. Малая (30S) субчастица рибосомы никакой пептидил-трансферазной активностью не обладает и никакой принципиальной воздействия на активность большой субчастицы, по-видимому, не оказывает. Следовательно, пептидил-трансферазный участок рибосомы целиком локализован на *большой рибосомной субчастице*.

Почти несомненно, что пептидил-трансферазный участок большой рибосомной субчастицы формируется ее *белковым компонентом*. Известно, что при обработке 50 S субчастиц *E. coli* высокой концентрацией CsCl в присутствии 0,02—0,04 M MgCl₂ от субчастицы отщепляется порция из 5—6 белковых молекул, и оставшаяся 43 S частица оказывается лишенной своей тРНК-связывающей активности (Traub, Nomura, 1968). Однако это не нарушает пептидил-трансферазной активности частицы, т. е. пептидил-трансферазный участок, очевидно, сохраняется (Staehelin et al., 1969). Белки, формирующие этот участок, отщепляются на следующей стадии, т. е. при переходе 43 S частицы в 38 S — 36 S частицу (эта стадия проходит, когда при инкубации в 5 M CsCl концентрация Mg⁺⁺ не превышает 0,01 M): отщепление группы из 3—4 белков на этой стадии приводит к исчезновению пептидил-трансферазной функции. Отщепляемые белки являются основными. Сами по себе, вне рибосомы, они никакой ферментативной активностью не обладают. Таким образом, вероятно, что именно группа белков, отщепляемая при переходе 43 S частицы в 38 S — 36 S частицу (3—4 белка), формирует или участвует в формировании пептидил-трансферазного участка, встроенного в 50 S субчастицу (Staehelin et al., 1969).

Для того чтобы в пептидил-трансферажном участке могла произойти реакция транспептидации, реагирующие группировки субстратов реакции (донорного и акцепторного) должны быть, очевидно, строго определенным образом связаны и ориентированы там. Реагирующей группировкой донорного субстрата является сложнотифриная группировка N-блокированного аминокислотного остатка (в случае пептидила — С-концевого аминокислотного остатка). Очевидно, что она должна связываться со специальным центром пептидил-трансферазного участка; он может быть условно назван *пептидил-связывающим центром*, или *p-центром* (имея в виду связывание С-конца пептидила). Этот центр, входя в состав пептидил-трансферазного участка, в

то же время должен вплотную примыкать к ЦЦА-связывающему центру донорного тРНК-связывающего участка (см. выше, раздел 3), и два этих центра способны тем самым кооперативно удерживать всю группировку «ЦЦА-аминоацил-» молекулы пептидил-тРНК на 50 S субчастице.

Реагирующей группировкой акцепторного субстрата является аминогруппа аминоацильного остатка молекулы аминоксил-тРНК. Она должна связываться другим центром пептидил-трансферазного участка 50 S субчастицы; этот центр может быть условно обозначен как *аминоацил-связывающий (акцептор-связывающий) центр*, или *а-центр*. О его существовании и его избирательном сродстве к аминоксил-аденозиновой группировке свидетельствуют опыты с пуромицином (аналог аминоксил-аденозина) и с различными аминоксил-аденозинами (см. выше, раздел 4, а); цитидиловый остаток, примыкающий к адениловому (Ц-А-аминоацил), еще больше повышает сродство этого центра к акцепторной группировке (Rychlik et al., 1969). Связывание фенилаланил-олигонуклеотидных фрагментов молекулы фенилаланил-тРНК с акцептор-связывающим центром пептидил-трансферазного участка продемонстрировал недавно Пестка (Pestka, 1969a, b). Известно, однако, что в норме молекула акцепторной аминоксил-тРНК связана с малой (30 S) субчастицей рибосомы — с ее тРНК-связывающим участком. Следовательно, сам аминокислотный остаток с примыкающей к нему динуклеотидной группировкой ЦА должен всегда свисать с 30 S субчастицы и при наличии 50 S субчастицы взаимодействовать с ней. Это подтверждается опытами, где было показано, что добавление 50 S субчастиц к 30 S субчастицам, ассоциированным с аминоксил-тРНК, защищает аминокислотный конец последних как от нуклеазной, так и от щелочной деградации (Pestka, 1967, 1968b).

Таким образом, пептидил-трансферазный участок большой рибосомной субчастицы подразделяется на пептидил-связывающий центр, который удерживает С-концевой аминоксил и сложноэфирную группу молекулы пептидил-тРНК, и на аминоксил-связывающий центр, который связывает свисающий с малой субчастицы аминокислотный остаток и примыкающую к нему цитидилил-аденозиновую группировку. За счет этих центров соответствующие группировки донорного и акцепторного субстратов сближаются и строго ориентируются друг относительно друга в пептидил-трансферазном участке. Неизвестно, существует ли в этом участке также и специальный каталитический центр, или реакция транспептидации обеспечивается в данном случае лишь за счет строгой ориентации и сближения реагирующих групп, без специального механизма собственно энзиматического катализа.

5. Общая схема локализации функциональных центров рибосомы

На основе данного изложения можно дать общую, пока предварительную и условную, схему расположения различных функциональных участков на рибосоме. При описании схемы мы будем исходить из предположения, что все перечисленные выше функциональные участки локализованы на контактирующих (обращенных друг к другу) поверхностях субчастиц. Схема-модель в виде двух контактирующих поверхностей дана на рис. 17.

Согласно схеме (рис. 17, а), в рибосоме на контактирующей поверхности малой субчастицы находится мРНК-связывающий

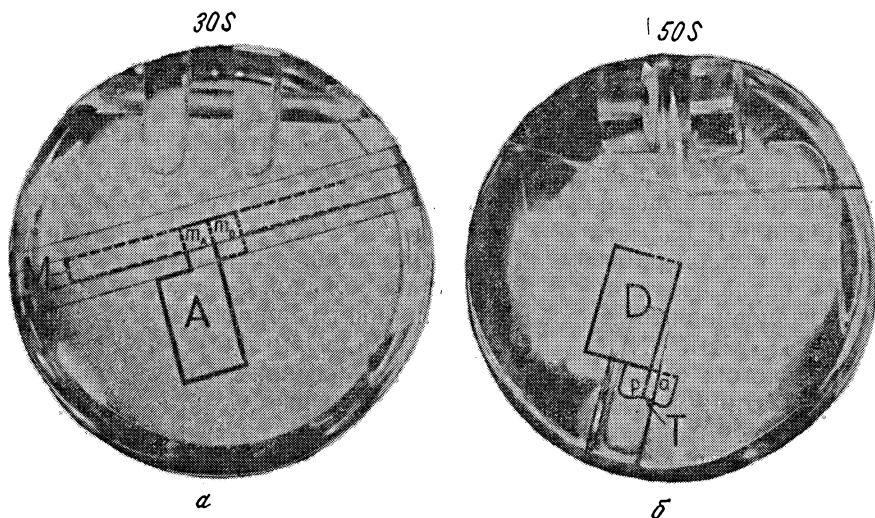


Рис. 17.

Схематическое изображение функциональных участков на контактирующих (обращенных друг к другу) поверхностях рибосомных субчастиц

а — контактирующая поверхность малой (30S) субчастицы: М — мРНК-связывающий участок, включающий в себя центр m_A , удерживающий кодон-антикодоновую пару с участием акцепторной тРНК; А — акцепторный тРНК-связывающий участок; б — контактирующая поверхность большой (50S) субчастицы: D — донорный РНК-удерживающий участок; Т — пептидил-трансферазный участок, включающий в себя пептидил-связывающий центр р и аминоацил-связывающий (акцептор-связывающий) центр а.

участок (М), и цепь мРНК может скользить вдоль нее, между двумя субчастицами. На той же контактирующей поверхности малой субчастицы находится участок специфического (т. е. детерминируемого матрицей) связывания тРНК, обозначаемый как акцепторный тРНК-связывающий участок (А). А-участок, естественно, частично перекрывается с М-участком; район перекрывания может быть обозначен как m_A -центр (центр, удерживающий антикодон аминокислот-тРНК и соответствующий кодон мРНК). Непосредственно примыкая к m_A -центру, на контактирующей поверхности малой субчастицы локализуется также центр связывания антикодонавого района другой молекулы тРНК (донорной тРНК); он также перекрывается с М-участком и может быть обозначен как m_D -центр.

Согласно той же схеме (рис. 17, б), на контактирующей поверхности большой субчастицы располагается участок неспецифического связывания тРНК, обозначаемый как донорный тРНК-удерживающий участок (D). К D-участку на контактирующей поверхности большой субчастицы примыкает пептидил-трансферазный участок (Т), который состоит, в свою очередь, из пептидил-связывающего центра (p), имеющего сродство к сложноэфирной группировке пептидил-тРНК, и из аминокислот-связывающего (или акцептор-связывающего) центра (a), имеющего сродство к аминокислотной группировке аминокислот-тРНК.

В полной рибосоме (в ее транслацированном состоянии) молекула пептидил-тРНК сидит на большой субчастице, прочно зацепившись своей сложноэфирной группировкой (\dots -Ц-А-СО · СНR · NH— \dots) за p -центр и своим остатком тРНК за D-участок; ее антикодонавый район свешивается с большой субчастицы и ассоциирован с мРНК в m_D -центре малой субчастицы. Аминокислот-тРНК садится на малую субчастицу так, что занимает А-участок, своим антикодом связываясь с мРНК в m_A -центре. Концевая группировка \dots -Ц-А-СО · СНR · NH₂ этой молекулы аминокислот-тРНК в силу своего сродства взаимодействует с a -центром Т-участка большой субчастицы.

В заключение необходимо сказать, что, помимо указанных центров самой рибосомы, она, очевидно, непосредственно участвует также в формировании ГТФ-азных центров; в формировании одного из них участвуют обе рибосомные субчастицы и трансферный Т-фактор (Т-зависимый ГТФ-азный центр); в формировании другого участвуют опять-таки обе рибосомные субчастицы и G-фактор (G-зависимый ГТФ-азный центр). Есть соображения, позволяющие думать, что оба центра формируются вблизи пептидил-трансферазного участка.

Литература

- Венкстери Т. В. 1970. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот. Изд-во «Наука», М.
- Спири А. С. 1968. Докл. АН СССР, 179, 1467.
- Спири А. С. 1970. Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 169.
- Arlinghaus R., Shaeffer J., Schweet R. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1291.
- Bretscher M. S., Marcker K. A. 1966. Nature, 211, 380.
- Cannon M. 1967. Biochem. J., 104, 934.
- Cannon M., Krug R., Gilbert W. 1963. J. Mol. Biol., 7, 360.
- Castles J. J. 1969. Arch. Biochem. Biophys., 134, 53.
- Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weissblum B., Ray W. J., Benzer S. 1962. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 48, 1086.
- Conway T. W. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 1216.
- Crick F. H. C. 1958. Symp. Soc. Exptl. Biol., 12, 138. Русский перевод: «Биологическое воспроизведение макромолекул», М., ИЛ, 1960, стр. 209.
- Dahlberg J. E., Haselkorn R. 1967. J. Mol. Biol., 24, 83.
- Erbe R. W., Leder P. 1968. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 798.
- Ertel R., Brot N., Redfield B., Allende J. E., Weissbach H. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, 861.
- Gilbert W. 1963. J. Mol. Biol., 6, 389.
- Gottesman M. E. 1967. J. Biol. Chem., 242, 5564.
- Gottikh B. P., Nikolaeva L. V., Kraevsky A. A., Kisselev L. L. 1970. FEBS Letters, 7, 112.
- Gupta S. L., Chen J., Schaefer L., Weissman S. M., Lengyel P. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 630.
- Gupta S. L., Chen J., Schaefer L., Lengyel P., Weissman S. M. 1970. Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 883.
- Haenni A.-L., Lucas-Lenard J. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 61, 1365.
- Hardesty B., Culp W., McKeenhan W. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 331.
- Haselkorn R., Fried V. A. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 51, 1001.
- Haselkorn R., Fried V. A., Dahlberg J. E. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 49, 511.
- Hatfield D. 1965. Fed. Proc., 24, 409.
- Hatfield D. 1966. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 619.
- Hindley J., Staples D. H. 1969. Nature, 224, 964.
- Ibuki F., Moldave K. 1968. J. Biol. Chem., 243, 791.
- Igarashi K., Kaji A. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 1971.
- Igarashi K., Kaji A. 1970. Europ. J. Biochem., 14, 41.
- Jerez C., Sandoval A., Allende J., Henes C., Ofengand J. 1969. Biochemistry, 8, 3006.
- Kaji A., Kaji H. 1963. Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 186.
- Kaji H., Kaji A. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 1541.
- Kaji H., Suzuka I., Kaji A. 1966a. J. Mol. Biol., 18, 219.
- Kaji H., Suzuka I., Kaji A. 1966b. J. Biol. Chem., 241, 1251.
- Kurland C. G. 1966. J. Mol. Biol., 18, 90.
- Leder P., Nirenberg M. W. 1964a. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 420.
- Leder P., Nirenberg M. W. 1964b. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 1521.
- Levin J. G. 1966. Fed. Proc., 25, 778.
- Levin J. G., Nirenberg M. W., 1968. J. Mol. Biol., 34, 467.
- Lipsett M. N. 1964. J. Biol. Chem., 239, 1256.
- Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F. 1961. J. Biol. Chem., 236, 857.
- Lucas-Lenard J., Haenni A.-L. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 59, 554.

- Lucas-Lepard J., Lipmann F.* 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 57, 1050.
- Lucas-Lepard J., Tao P., Haenni A.-L.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 455.
- Maden B. E. H., Monro R. E.* 1968. European J. Biochem., 6, 309.
- Maden B. E. H., Traut R. R., Monro R. E.* 1968. J. Mol. Biol., 35, 333.
- Matthaei H., Amelunxen F., Eckert K., Heller G.* 1964. Ber. Bunsengesellschaft phys. Chemie, 68, 735.
- McLaughlin C., Dondon J., Grunberg-Manago M., Michelson A., Saunders G.* 1966. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 601.
- Michelson A. M.* 1965. Bull. soc. chim. biol., 47, 1553.
- Millar D. B. S., Cukier R., Nirenberg M. W.* 1965. Biochemistry, 4, 976.
- Moldave K., Galasinski W., Rao P., Siler J.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 347.
- Monro R. E.* 1967. J. Mol. Biol., 26, 147.
- Monro R. E., Cerná J., Marcker K. A.* 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 61, 1042.
- Monro R. E., Marcker K. A.* 1967. J. Mol. Biol., 25, 347.
- Moore P. B.* 1966a. J. Mol. Biol., 18, 8.
- Moore P. B.* 1966b. J. Mol. Biol., 22, 145.
- Moore P. B., Asano K.* 1966. J. Mol. Biol., 18, 21.
- Nakamoto T., Conway T. W., Allende J. E., Spyrides G. J., Lipmann F.* 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 227.
- Nirenberg M. W., Leder P.* 1964. Science, 145, 1399.
- Nishizuka Y., Lipmann F.* 1966. Arch. Biochem. Biophys., 116, 344.
- Ofengand J., Henes C.* 1969. J. Biol. Chem., 244, 6241.
- Okamoto T., Takanami M.* 1963. Biochim. Biophys. Acta, 68, 325.
- Pestka S.* 1967. J. Biol. Chem., 242, 4939.
- Pestka S.* 1968a. J. Biol. Chem., 243, 2810.
- Pestka S.* 1968b. J. Biol. Chem., 243, 4038.
- Pestka S.* 1969a. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 589.
- Pestka S.* 1969b. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 395.
- Pestka S.* 1970. J. Biol. Chem., 245, 1497.
- Pestka S., Nirenberg M. W.* 1966a. J. Mol. Biol., 21, 145.
- Pestka S., Nirenberg M.* 1966b. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 641.
- Philipps G. R.* 1970. J. Biol. Chem., 245, 859.
- Pulkrábek P., Rychlík I.* 1968. Biochim. Biophys. Acta, 155, 219.
- Raskas H. J., Staehelin I.* 1967. J. Mol. Biol., 23, 89.
- Ravel J. M.* 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1811.
- Ravel J. M., Mosteller R. D., Hardesty B.* 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 701.
- Ravel J. M., Shorey R. L., Garner C. W., Dawkins R. C., Shive W.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 321.
- Ravel J. W., Shorey R. L., Shive W.* 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 68.
- Rychlík I.* 1966a. Biochim. Biophys. Acta, 114, 425.
- Rychlík I.* 1966b. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 31, 2583.
- Rychlík I., Cerná J., Chládek S., Zemlička J., Haladová Z.* 1969. J. Mol. Biol., 43, 13.
- Rychlík I., Chládek S., Zemlička J.* 1967. Biochim. Biophys. Acta, 138, 640.
- Sarkar S., Thach R. E.* 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 60, 1479.
- Seeds N. W., Conway T. W.* 1966. Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 111.
- Seeds N. W., Retsema J. A., Conway T. W.* 1967. J. Mol. Biol., 27, 421.
- Shimizu N., Hayashi H., Miura K.* 1970. J. Biochem. (Japan), 67, 373.
- Siler J., Moldave K.* 1969. Biochim. Biophys. Acta, 195, 130.

- Skogerson L., Moldave K.* 1968. Arch. Biochem. Biophys., **125**, 497.
- Skoultchi A., Ono Y., Moon H. M., Lengyel P.* 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **60**, 675.
- Skoultchi A., Ono Y., Waterson J., Lengyel P.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 437.
- Spirin A. S.* 1968. Currents in Modern Biology, **2**, 115.
- Spirin A. S.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 197.
- Spyrides G. J.* 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **51**, 1220.
- Spyrides G. J., Lipmann F.* 1962. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **48**, 1977.
- Staehelin T., Maglott D., Monro R.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 39.
- Steitz J. A.* 1969a. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 621.
- Steitz J. A.* 1969b. Nature, **224**, 957.
- Suzuka I., Kaji H., Kaji A.* 1965. Biochem. Biophys. Res. Commun., **21**, 187.
- Suzuka I., Schikawa K., Tanaka S.* 1970. Arch. Biochem. Biophys., **136**, 430.
- Szer W., Nowak L.* 1967. J. Mol. Biol., **24**, 333.
- Takanami M.* 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **52**, 1271.
- Takanami M., Okamoto T.* 1963a. J. Mol. Biol., **7**, 323.
- Takanami M., Okamoto T.* 1963b. Biochem. Biophys. Res. Commun., **13**, 297.
- Takanami M., Zubay G.* 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **51**, 834.
- Takanami M., Yan Y., Jukes T. H.* 1965. J. Mol. Biol., **12**, 761.
- Takeda Y., Suzuka I., Kaji A.* 1968. J. Biol. Chem., **243**, 1075.
- Traub P., Hosokawa K., Craven G. R., Nomura M.* 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **58**, 2430.
- Traub P., Nomura M.* 1968. J. Mol. Biol., **34**, 575.
- Traub R. R., Monro R. E.* 1964. J. Mol. Biol., **10**, 63.
- Voorma H. O., Gout P. W., Van Duin J., Hoogendam B. W., Bosch L.* 1964. Biochim. Biophys. Acta, **87**, 693.
- Waller J.-P., Erdős T., Lemoine F., Guttmann S., Sandrin E.* 1966. Biochim. Biophys. Acta, **119**, 566.
- Warner J., Madden M. J., Darnell J. E.* 1963. Virology, **19**, 393.
- Weissbach H., Brot N., Miller D., Rosman M., Ertel R.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 419.
- Zak R., Nair K., Rabinowitz M.* 1966. Nature, **210**, 169.
- Zamir A., Leder P., Elson D.* 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **56**, 1794.

III

Этапы трансляции

В полной белок-синтезирующей системе, т. е. при наличии всех необходимых компонентов, перечисленных выше (раздел I), рибосома осуществляет свою функцию *трансляции*: происходит синтез полипептидной цепи белка, и при этом аминокислотная последовательность синтезируемой цепи однозначно детерминирована нуклеотидной последовательностью мРНК.

В ходе трансляции, согласно современным представлениям, рибосома не размещает на себе весь матричный полинуклеотид, а последовательно протягивает его от одного конца к другому, в каждый данный момент будучи связана лишь с определенным, очень ограниченным участком матрицы (Watson, 1963; Gilbert, 1963a; Warner et al., 1963; Rich et al., 1963; Gierer, 1963; Noll et al., 1963; Спирин, 1964). Одновременно с протягиванием полинуклеотида на рибосоме синтезируется полипептидная цепь. Таким образом, рибосома прочитывает информацию, записанную в виде линейной последовательности нуклеотидов цепи мРНК, все время *передвигаясь относительно этой цепи*.

Известно, что полинуклеотид является полярным полимером: каждая межнуклеотидная связь образована так, что фосфатный остаток соединяет 3'-положение одного нуклеозида с 5'-положением соседнего нуклеозида, и эта направленность межнуклеотидной связи одинакова вдоль всей цепи полинуклеотида (см. рис. 4). Последовательность нуклеотидов в цепи принято читать в направлении связи $C_3'—P—C_5'$. Тогда у первого нуклеотидного остатка цепи будет не занято в межнуклеотидной связи его 5'-положение, а у последнего нуклеотидного остатка цепи окажется свободным 3'-положение. Соответственно первый нуклеотидный остаток цепи принято обозначать как 5'-конец полинуклеотида, а последний — как 3'-конец. Показано, что в процессе трансляции *матричный*

полинуклеотид читается рибосомой всегда в направлении межнуклеотидной связи $C_3'-P-C_5'$, т. е. от 5'-конца к 3'-концу (Thach et al., 1965; Salas et al., 1965; Terzaghi et al., 1965, 1966; Smith et al., 1966; Lamfrom et al., 1966).

Указанные два положения — динамическое передвижение цепи матричного полинуклеотида относительно рибосомы и полярность этого передвижения от 5'-конца к 3'-концу — являются основополагающими при рассмотрении всех этапов трансляции.

Вся совокупность процессов, осуществляемых рибосомой и приводящих в конечном итоге к формированию завершенной полипептидной цепи белка, может быть разбита на три последовательных этапа: 1) *начальная ассоциация* рибосомы с матрицей и аминоацил-тРНК и *инициация* трансляции; 2) собственно трансляция, или *полимеризация аминокислотных остатков в полипептидную цепь* (так называемая «элонгация»); 3) прекращение полимеризации аминокислот и освобождение полипептидной цепи белка из рибосомы — *терминация* трансляции.

1. Инициация трансляции

Инициация трансляции в физиологических условиях означает специфическое узнавание начальной точки трансляции в мРНК, ассоциацию рибосомы с этой начальной точкой и последующее образование первой пептидной связи. Необходимость строго фиксированной «точки отсчета» (начальной точки) при трансляции определяет то, что трансляция всегда начинается со специального иницирующего сочетания нуклеотидов — иницирующего кодона — в мРНК. Роль иницирующих кодонов играют триплеты АУГ и ГУГ, являясь, таким образом, началом любого транслируемого участка («цистрона») цепи мРНК. Этот иницирующий кодон специфически узнается на рибосоме специальной инициаторной аминоацил-тРНК; инициаторная тРНК имеет структурные особенности, отличающие ее от всех других тРНК. Аминоацильным остатком инициаторной тРНК является остаток метионина. В бактериальных системах NH_2 -группа метионина формилирована, т. е. инициаторная аминоацил-тРНК представляет собой N-блокированную метионил-тРНК — формилметионил-тРНК. У эукариотических организмов (животные, дрожжи) инициаторной аминоацил-тРНК является особая метионил-тРНК со свободной $[NH_2]$ -группой. В результате процесса инициации инициаторная аминоацил-тРНК оказывается в конце концов в до-

нормом тРНК-связывающем участке рибосомы, а акцепторный тРНК-связывающий участок принимает вторую аминокислоту-тРНК. Это и определяет одновременное нахождение в рибосоме двух аминокислот-тРНК, между которыми происходит первая реакция транспептидации — образуется первая пептидная связь.

а. Инициаторная аминокислот-тРНК

Инициаторная N-формилметионил-тРНК была открыта в *E. coli* в 1964 году Маркером и Сэнгером (Marcker, Sanger, 1964).

Показано, что в образовании формилметионил-тРНК принимает участие лишь строго специфическая тРНК^{Ф-мет}. Она сначала обычным путем акцептирует метионин с образованием метионил-тРНК^{Ф-мет}, а уж затем специальная ферментная система *E. coli* формилирует NH₂-группу метионинового остатка этой метионил-тРНК^{Ф-мет} (Marcker, 1965). Свободный метионин или метиониладенилат не формилируется. Более того, если получить искусственно N-формилметионин, то он не акцептируется тРНК^{Ф-мет}.

Помимо тРНК^{Ф-мет}, на которой происходит формилирование метионина после его акцептирования, в *E. coli* существует обычная тРНК^{мет}, тоже акцептирующая метионин, но без последующего его формилирования (Clark, Marcker, 1966; Kellogg et al., 1966). Следовательно, формилирующая ферментная система специфически узнает не просто метиониновый остаток, а соответствующую структуру тРНК^{Ф-мет}, с которой он связан.

Роль формилметионил-тРНК как инициаторной тРНК впервые была обоснована в опытах, где было показано, что в белок-синтезирующей системе *E. coli* ее формилметиониновый остаток неизменно оказывается в N-концевом положении синтезируемых полипептидных цепей (Adams, Caracchi, 1966; Caracchi, 1966a, b; Webster et al., 1966). Так как известно, что полипептидная цепь белка в процессе трансляции растет от N-конца к С-концу, то N-концевая аминокислота цепи должна быть первой, с которой начинается рост цепи в рибосоме. Следовательно, первой аминокислот-тРНК, которая определяет включение N-концевого остатка и тем самым начинает процесс трансляции, является N-формилметионил-тРНК.

Очевидно, поскольку NH₂-группа в формилметионил-тРНК защищена, эта аминокислот-тРНК и не может служить иначе, как для установки аминокислоты в самое N-концевое положение полипептидной цепи, т. е. для инициации трансляции. Для переноса метионинового остатка в любое другое, кроме N-кон-

цевого, положение полипептидной цепи используется другая метиониновая тРНК — обычная метионил-тРНК^{мет}. Таким образом, защита NH₂-группы в формилметионил-тРНК уже сама по себе выделяет ее из других аминоацил-тРНК, исключая для нее возможность переносить аминоксил в уже растущие пептидные цепи и оставляя лишь возможность начинать цепи.

Однако инициаторная функция формилметионил-тРНК обеспечивается, очевидно, главным образом ее особой структурой, определяющей средство к ней белковых факторов инициации, а не просто N-блокированным состоянием аминокислотного остатка. Подтверждением этого служит ситуация у эукариотических организмов, где инициаторную функцию выполняет неформилированная метионил-тРНК^{ф-мет} (Smith, Marcker, 1970; Brown, Smith, 1970; Gupta et al., 1970; Housman et al., 1970).

Интересно, что инициаторная метионил-тРНК из эукариотических организмов легко формилируется бактериальным ферментом, после чего может служить в качестве инициаторной аминокислот-тРНК в бактериальных системах (Takeishi et al., 1968; Raj Bhandary, Ghosh, 1969). Это значит, что инициаторные тРНК из эукариотических клеток и из бактерий имеют одинаковые особенности структуры, позволяющие специфической бактериальной трансформилазе и бактериальным факторам инициации избирательно узнавать их.

6. Иницирующие кодоны

Для того чтобы могло происходить эффективное связывание инициаторной формилметионил-тРНК или метионил-тРНК в начальный комплекс, матричный полинуклеотид комплекса должен иметь специальное сочетание нуклеотидов. В бактериальных системах сочетаниями нуклеотидов, кодирующими формилметионил-тРНК, т. е. обеспечивающими ее связывание в начальный комплекс, являются триплеты АУГ и ГУГ (Clark, Marcker, 1966; Kellogg et al., 1966; Sundararajan, Thach, 1966; Ghosh et al., 1967). Кодоны АУГ и, возможно, ГУГ являются иницирующими, т. е. обеспечивающими связывание инициаторной метионил-тРНК, также и в случае белок-синтезирующей системы эукариотических организмов (Brown, Smith, 1970).

Триплеты АУГ и ГУГ кодируют формилметионин (или начальный метионин) только будучи *начальными* триплетными при считывании матричного полинуклеотида. Если же эти триплеты нуклеотидов встречаются в цепи уже считываемого матричного полинуклеотида, когда они являются обычными «внутренними» триплетными, каждый из них кодирует свою аминокислоту: АУГ — метионин, ГУГ — валин (см. рис. 5).

Соответственно, начальный триплет АУГ полинуклеотидной цепи, ассоциированный с рибосомой, приводит к избирательному связыванию формилметионил-тРНК^{Ф-мет} (или метионил-тРНК^{Ф-мет}), а «внутренний» триплет АУГ в ходе трансляции реагирует лишь с метионил-тРНК^{мет}. Поэтому, например, если в бактериальную бесклеточную белок-синтезирующую систему дать в качестве матричного полинуклеотида регулярный синтетический полимер поли (АУГ)_n, то образуется полипептид N-формилмет-мет-мет-мет... (Ghosh et al., 1967). С регулярным полимером поли (УГ)_n в качестве матрицы образуется полипептид N-формилмет-цис-вал-цис-вал-... (первый ГУГ кодирует формилмет, УГУ кодирует цис, а «внутренние» ГУГ кодируют вал — см. рис. 5) (Ghosh et al., 1967).

Для образования начального комплекса сочетание АУГ (или ГУГ) совсем не обязательно должно находиться на самом 5'-конце матричного полинуклеотида. Например, если в качестве матрицы в белок-синтезирующей системе *in vitro* взять полимер ААУГ (У)₂₅ или АААУГ (У)₂₅, то точно так же, как с полимером АУГ (У)₂₅ будут синтезироваться полифенилаланиновые полипептиды (УУУ кодирует фенилаланин — см. рис. 5) с N-формилметионином на N-конце (Thach et al., 1966). Это означает, что иницирующий кодон АУГ может находиться и отступая от 5'-конца; тогда при ассоциации рибосома связывается в начальный комплекс все равно сочетанием АУГ. Тем самым считывание матричного полинуклеотида осуществляется не просто с 5'-конца, а так, что первым читается иницирующий триплет независимо от того, находится он на 5'-конце или отступая; тогда последующая нуклеотидная последовательность всегда читается по триплетам, находящимся в фазе от иницирующего триплета.

Было показано, однако, что при использовании природных полицистроновых (т. е. кодирующих более чем один белок) мРНК рибосомы могут иницировать трансляцию одновременно в разных точках мРНК, соответствующих началам разных цистронов (Lodish, 1969, 1970; Lodish, Robertson, 1969). Следовательно, иницирующим кодоном является не просто первый от 5'-конца АУГ или ГУГ триплет, но и «внутренние» АУГ или ГУГ триплеты тоже могут быть иницирующими. Далее, изучение нуклеотидной последовательности таких природных матриц, как РНК бактериальных вирусов, показало, что даже первый иницирующий триплет (начало первого цистрона) находится очень далеко отступая от 5'-конца РНК (Adams et al., 1969; Billeter et al., 1969). Более того, в 5'-концевой последовательности РНК до начала первого цистрона встречаются триплеты АУГ, но они не являются иницирующими. Отсюда

основной вопрос, который встает при рассмотрении природных матриц,— что детерминирует выбор лишь строго определенных АУГ и ГУГ триплетов в цепи мРНК в качестве иницирующих триплетов? Другими словами — почему лишь некоторые из АУГ и ГУГ триплетов кодируют формилметионин, а остальные — обычные метионин и валин? Полученные к настоящему времени данные по структуре иницирующих участков мРНК (Steitz, 1969) и по зависимости инициации от конформации цепи мРНК (Lodish, Robertson, 1969; Lodish, 1970) позволяют думать, что главным фактором, делающим триплет АУГ (или ГУГ) иницирующим кодоном, является пространственная структура данного участка цепи мРНК, и, в частности, его вторичная структура. Из данных Стейтца (Steitz, 1969) следует, что по крайней мере в некоторых случаях иницирующий кодон может представлять собой неспирализованный АУГ триплет, нуклеотидные последовательности справа и слева от которого взаимно комплементарны и образуют двуспиральную «шпильку»; возможно, что именно такие спиральные «шпильки», с АУГ (или ГУГ) кодоном в вершине, могут узнаваться рибосомами как начала цистронов на мРНК.

в. Белковые факторы инициации

В физиологических условиях для узнавания иницирующих кодонов природных мРНК рибосомами и для последующего специфического связывания инициаторной формилметионил-тРНК или метионил-тРНК рибосомой необходимы белковые факторы инициации.

В бактериальных системах обнаружены белковые факторы инициации F1, F2 и F3 (см. выше, раздел I, 6). Только рибосомные частицы, ассоциированные с этими белками, способны избирательно связываться с иницирующим триплетом, образовывать специфический начальный комплекс с формилметионил-тРНК и иницировать трансляцию. Все три белковых фактора ассоциируют с 30 S субчастицей рибосомы.

Фактор F3 (он же фактор В) строго требуется для инициации трансляции лишь с природными мРНК, но не с синтетическими матрицами, даже если последние имеют кодоны АУГ; не требуется он и для образования инициаторного комплекса с участием изолированного тринуклеотида АУГ (Iwasaki et al., 1968; Wahba et al., 1969; Brawerman, 1969; Revel et al., 1969). В то же время получены данные, что фактор F3 сам по себе, в свободном виде, имеет сродство к природным мРНК и может связываться с ними даже в отсутствие рибосом (Wahba et al., 1969). На основании всего этого фактору F3 приписывается непосредственное участие в узнавании природного иницирующего

щего района на мРНК: вероятно, будучи ассоциирован с 30 S субчастицей, он помогает ей дискриминировать между иницирующим кодоном АУГ (или ГУГ) и любым другим «внутренним» кодоном АУГ (или ГУГ) цепи мРНК.

Кроме того, имеются указания, что фактор F3 способствует диссоциации 70 S рибосом, свободных от новосинтезированного полипептида (Wahba et al., 1969; Subramanian et al., 1969). Возможно, что, ассоциируя с 30 S субчастицей, он как бы вытесняет собой 50 S субчастицу. Таким образом, он должен способствовать переводу закончивших трансляцию (терминировавших) 70 S рибосом в состояние диссоциированных субчастиц. Инициация всегда начинается, по-видимому, с диссоциированных субчастиц, а более конкретно — с 30 S субчастицы (см. ниже), присоединившей белок F3 и, вероятно, F2.

Белок F2 (он же C) — наиболее важный из белковых факторов инициации. Ассоциируя с 30 S субчастицей, он, по-видимому, способствует закреплению ее на мРНК (Herzberg et al., 1969; Revel et al., 1968b, 1969). Но самое главное, что он оказывается строго обязательным для последующего АУГ-зависимого связывания инициаторной формилметионил-тРНК с 30 S субчастицей (Wahba et al., 1969; Thach et al., 1969; Revel et al., 1968a, 1969; Brawerman, 1969). Для этой его функции необходим ГТФ (Ohta et al., 1967; Hershey, Thach, 1967; Leder, Nau, 1967; Anderson et al., 1967), к которому фактор F2 имеет сродство даже будучи вне рибосомы, в свободном виде ($F2 + \text{ГТФ} \rightarrow F2 - \text{ГТФ}$) (Mazumder et al., 1969; Wahba et al., 1969). Сам по себе или будучи в ассоциации с 30 S субчастицей, фактор F2 никакой ГТФ-азной активностью не обладает, но при последующем присоединении 50 S субчастицы он обеспечивает появление ГТФ-азной активности в полном начальном 70 S комплексе (Kolakofsky et al., 1968b; Thach et al., 1969). Таким образом, фактор F2 по своей функции аналогичен трансферному фактору T: так же как последний с участием ГТФ обеспечивает «энзиматическое» связывание обычных аминоксил-тРНК с рибосомой, фактор F2, тоже с участием ГТФ, обеспечивает «энзиматическое» связывание инициаторной формилметионил-тРНК. Разница состоит в том, что связывание обычной аминоксил-тРНК происходит с 30 S субчастицей в составе полной 70 S рибосомы, а связывание формилметионил-тРНК — со свободной 30 S субчастицей.

Фактор F1 (он же A) лучше всего связывается с 30 S субчастицей, когда на ней уже присутствуют иницирующий кодон АУГ, инициаторная формилметионил-тРНК, фактор F2 и ГТФ (Thach et al., 1969). Весь этот комплекс стабилизируется фактором F1 (Chae et al., 1969; Wahba et al., 1969). Но кроме

стабилизации комплекса, фактор F1, по-видимому, выполняет и следующую функцию: он вместе с формилметионил-тРНК способствует присоединению 50 S субчастицы к образованному комплексу (Brawerman, 1969). После присоединения 50 S субчастицы к комплексу 30 S—(F3)—АУГ—формилметионил-тРНК—ГТФ—F2—F1 фактор F1 освобождается из рибосомы в раствор, покидая комплекс (Thach et al., 1969).

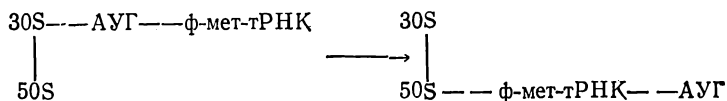
Следует указать, что столь специфическая инициация трансляции с участием трех белковых факторов инициации и ГТФ может быть воспроизведена только при определенных ионных условиях среды. В частности, для работы белковых факторов инициации требуется поддержание концентрации Mg^{++} в среде в довольно узких пределах — около 0,005 M и не выше 0,008—0,009 M (Nakamoto, Kolakofsky, 1966; Kolakofsky, Nakamoto, 1966; Sundararajan, Thach, 1966). По-видимому, при более высоких концентрациях Mg^{++} ассоциация рибосомы с матрицей и обычными аминоксил-тРНК становится достаточно сильной и происходит уже «неэнзиматически»; поэтому при концентрации Mg^{++} 0,01—0,02 M рибосома образует комплекс не только с иницирующими кодонами, но и с другими участками мРНК, и связывает не только формилметионил-тРНК, но равно и любые другие аминоксил-тРНК, а связывание, «катализируемое» факторами инициации и ГТФ, уже не может конкурировать с этим «неэнзиматическим» связыванием.

г. Образование начального комплекса

Образование начального — инициаторного — комплекса — это формирование такого ассоциата рибосомы с иницирующим кодоном мРНК и инициаторной аминоксил-тРНК, который готов воспринять следующую аминоксил-тРНК и образовывать с ней первую пептидную связь. Это означает, что в результате образования инициаторного комплекса формилметионил-тРНК или метионил-тРНК^{Ф-мет} должна оказаться в донорном тРНК-связывающем участке рибосомы, а акцепторный тРНК-связывающий участок быть готов воспринять аминоксил-тРНК.

Уже отмечалось, что в бактериальной белок-синтезирующей системе инициаторная формилметионил-тРНК, в отличие от всех обычных аминоксил-тРНК, действительно имеет повышенную способность занимать донорный тРНК-связывающий участок на рибосоме (Nakamoto, Kolakofsky, 1966; Bretscher, Marcker, 1966; Sundararajan, Thach, 1966). Однако показано также, что для ее эффективного попадания туда требуется прежде всего наличие иницирующего кодона в связи с рибосомой (Bretscher, Marcker, 1966; Zamir et al., 1966). Эта стиму-

лания связывания формилметионил-тРНК с донорным тРНК-связывающим участком в присутствии иницирующего кодона может быть объяснена лишь тем, что для попадания в донорный тРНК-связывающий участок она проходит через предварительное специфическое (АУГ-зависимое) связывание по акцепторному тРНК-связывающему участку на 30 S субчастице:

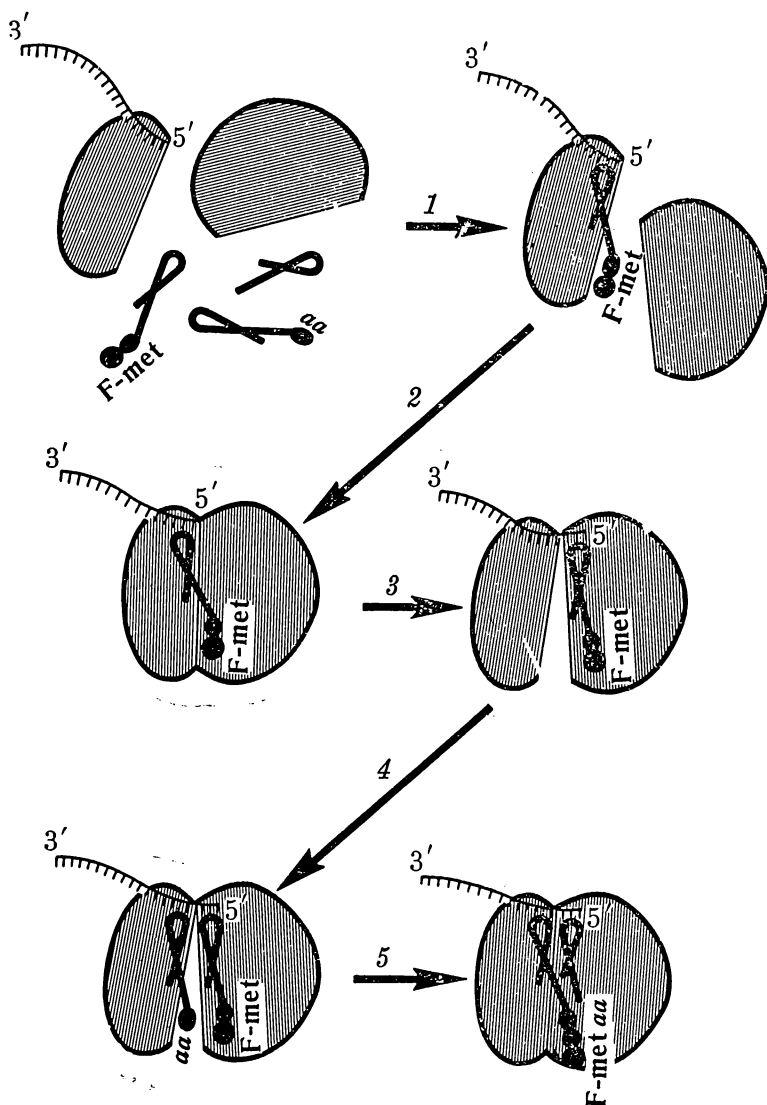


Аналогичный механизм был предложен выше (раздел II, 3, г) для объяснения стимуляции связывания пептидил-тРНК с рибосомой в присутствии матричного полинуклеотида.

Действительно, всеми последующими исследованиями было показано, что прежде чем попасть в донорный тРНК-связывающий участок на 50 S субчастице рибосомы, формилметионил-тРНК специфически связывается с *акцепторным тРНК-связывающим участком 30 S субчастицы*; именно для этого первичного связывания необходим иницирующий кодон, белковые факторы инициации и ГТФ (Nomura, Lowry, 1967; Hille et al., 1967; Sarkar, Thach, 1968; Mukundan et al., 1968; Ohta, Thach, 1968; Dube et al., 1969).

Более того, оказалось, что первичная ассоциация формилметионил-тРНК в присутствии иницирующего кодона и белковых факторов инициации в физиологических условиях происходит лишь со свободными 30 S субчастицами, но не с 30 S субчастицами в составе полных 70 S рибосом (Nomura, Lowry, 1967; Hille et al., 1967; Mukundan et al., 1968). Лишь после этого первичного связывания формилметионил-тРНК со свободной 30 S субчастицей образующийся тройственный комплекс 30 S субчастица — матрица — формилметионил-тРНК (—F1, F2, F3, ГТФ) ассоциирует со свободной 50 S субчастицей в полную 70 S рибосому (Nomura et al., 1967; Schlessinger et al., 1967; Kolakofsky et al., 1968a).

После образования полной 70 S рибосомы в ней происходит акт, который обозначается как транслокация формилметионил-тРНК: молекула формилметионил-тРНК оказывается перемещенной из акцепторного тРНК-связывающего участка 30 S субчастицы в *донорный тРНК-связывающий участок*, где она прочно удерживается в качестве донора и компетентна для реакции транспептидации с любым акцептором (Bretscher, Marcker, 1966; Zamir et al., 1966; Ohta et al., 1967; Hille et al., 1967). Это и есть конечная фаза образования начального — инициаторного — комплекса.



Р и с. 18.

Инициация трансляции в бактериальной белок-синтезирующей системе (схема)

1 — связывание формилметионил-тРНК с инициаторным кодоном матричного полинуклеотида на 30S субчастице; 2 — ассоциация субчастиц в полную рибосому; 3 — транслокация формилметионил-тРНК на донорный тРНК-связывающий участок 50S субчастицы; 4 — связывание второй аминоксил-тРНК с акцепторным тРНК-связывающим участком 30S субчастицы; 5 — образование первой пептидной связи — перенос формилметионилового остатка с тРНК-ф-мет на аминокгруппу аминоксил-тРНК

В целом можно дать следующую схему последовательности событий при образовании начального комплекса в бактериальной белок-синтезирующей системе (рис. 18).

Шаг 1. свободная 30 S субчастица лабильно ассоциирует с иницирующим кодоном мРНК. Этой ассоциации способствует белковый фактор инициации F3 (и, возможно, в какой-то степени фактор F2), предварительно связывающийся с 30 S субчастицей.

Шаг 2: молекула формилметионил-тРНК ассоциирует с 30 S субчастицей, связываясь с установленным там иницирующим кодоном (рис. 18, 1). Это специфическое связывание формилметионил-тРНК идет при участии белкового фактора инициации F2 и ГТФ, без расщепления последнего. Формилметионил-тРНК оказывается в акцепторном тРНК-связывающем участке. Другой белковый фактор — F1 — стабилизирует ассоциацию формилметионил-тРНК с 30 S субчастицей.

Шаг 3: свободная 50 S субчастица ассоциирует с 30 S субчастицей, удерживающей формилметионил-тРНК (рис. 18, 2). Фактор F1, по-видимому, стимулирует ассоциацию, но при этом сам освобождается из связи с рибосомой.

Шаг 4: в образовавшейся 70 S рибосоме, удерживающей формилметионил-тРНК, происходит гидролитическое расщепление ГТФ до ГДФ и ортофосфата, в результате чего из рибосомы освобождаются фактор F2 (и, по-видимому, F3), и остаток тРНК молекулы формилметионил-тРНК транслоцируется в донорный тРНК-связывающий участок 50 S субчастицы (рис. 18, 3). Вместе с остатком тРНК молекулы формилметионил-тРНК перемещается удерживаемый ею иницирующий кодон, как что в акцепторном тРНК-связывающем участке оказывается смежный с ним нуклеотидный триплет (транслокация мРНК на один триплет). В гидролизе ГТФ принимает участие фактор F2 и обе рибосомные субчастицы. ГДФ и ортофосфат также освобождаются из рибосомы.

Теперь 70 S рибосома имеет вакантный акцепторный тРНК-связывающий участок и готова к обычному «энзиматическому» Т-ГТФ-зависимому связыванию аминоксил-тРНК в соответствии с установленным там очередным кодоном мРНК.

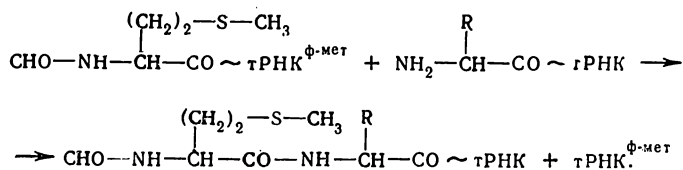
д. Поступление аминоксил-тРНК и образование первой пептидной связи

После того как инициаторная формилметионил-тРНК оказалась в донорном тРНК-связывающем участке, следуют дальнейшие события, уже типичные для обычного рабочего цикла трансляции.

Шаг 5: акцепторный тРНК-связывающий участок 30 S суб-

частицы с установленным там триплетом, смежным с иницирующим кодоном, избирательно связывает аминоксил-тРНК, соответствующую этому триплету (рис. 18, 4). Аминоксил-тРНК поступает в виде комплекса с белковым трансферным Т-фактором и ГТФ. После этого ГТФ при участии Т-фактора и обеих субчастиц распадается до ГДФ и ортофосфата, продукты распада и сам Т-фактор ($T \rightarrow ГДФ + \text{ортофосфат}$) освобождаются из рибосомы, а две аминоксил-тРНК — одна из них инициаторная формилметионил-тРНК — оказываются расположенными в рибосоме бок о бок, в непосредственной близости, будучи связаны с двумя смежными триплетами мРНК и с двумя смежными центрами пептидил-трансферазного участка.

Шаг 6: между формилметионил-тРНК и аминоксил-тРНК происходит реакция переноса формилметионинового остатка на аминогруппу молекулы аминоксил-тРНК с образованием первой пептидной связи (рис. 18, 5). Эта реакция происходит в пептидил-трансферазном участке 50 S субчастицы, без участия каких-либо дополнительных белковых факторов и источников энергии (см. раздел II,4). Надлежащее сближение свободной группы аминоксила молекулы аминоксил-тРНК с этерифицированным карбоксилем метионина молекулы формил-метионил-тРНК обеспечивается их фиксацией, соответственно, на аминоксил-связывающем и пептидил-связывающем центрах пептидил-трансферазного участка 50 S субчастицы (см. раздел II, 4). Формилметионил-тРНК играет роль донора, а аминоксил-тРНК — роль акцептора в этой реакции. Существование реакции состоит в том, что остаток тРНК^{Ф-мет} вытесняется аминоксилом молекулы аминоксил-тРНК из сложноэфирной связи с карбоксилем формилметионинового остатка, и образуется формил-дипептидил-тРНК и свободная тРНК^{Ф-мет}:



В результате реакции в донорном тРНК-связывающем участке остается молекула свободной тРНК^{Ф-мет}, а акцепторный тРНК-связывающий участок удерживает остаток тРНК новообразованной молекулы формил-дипептидил-тРНК (рис. 18).

Следующим шагом будет транслокация, требующая G-фактора и ГТФ и заключающаяся в перемещении остатка тРНК

молекулы пептидил-тРНК в донорный тРНК-связывающий участок, с вытеснением оттуда свободной тРНК^{Ф-мет}. Фаза инициации закончена — идет уже собственно трансляция («элонгация»).

е. Инициация в системах с синтетическими матрицами без иницирующих кодонов

Если матричный полинуклеотид не содержит иницирующего кодона, то инициация трансляции в физиологических условиях оказывается невозможной или сильно затрудненной.

Вместе с тем хорошо известно, что в бесклеточных белок-синтезирующих системах для синтеза полипептидов можно использовать самый разнообразный набор синтетических матричных полинуклеотидов, не содержащих никаких иницирующих кодонов. Следовательно, так или иначе, инициацию трансляции при работе с синтетическими полинуклеотидами можно получить, т. е. обойтись и без иницирующего кодона. Классическим примером синтеза полипептида в бесклеточной системе при участии матрицы без иницирующего кодона является синтез полифенилаланина в системе с полиУ (Nirenberg, Matthaei, 1961).

Как и следует ожидать, инициация синтеза полипептида в таких системах (например, с полиУ) имеет свои особенности и требует некоторых специальных условий, отклоняющихся от физиологических. Прежде всего, если синтез полипептида с участием полинуклеотидов, содержащих иницирующий кодон АУГ или ГУГ, начинается немедленно при введении в систему всех необходимых факторов, то, например, в системе с полиУ, как правило, имеется более или менее продолжительный *лаг-период* («индукционный период») (Nakamoto et al., 1963; Allende et al., 1964; Nishizuka, Lipmann, 1966a). Лишь после прошествия некоторого времени (от 30 сек. до нескольких минут) в системе с полиУ начинается синтез полипептида, который затем быстро нарастает и достигает нормальной скорости. Это означает, что в системе с полиУ затруднена именно инициация, т. е. узким местом всей трансляции является реакция образования первой пептидной связи. Но, как видно, хотя и с очень медленной скоростью, но все же эта реакция в системе осуществляется, несмотря на отсутствие иницирующего кодона.

Вышесказанное можно объяснить следующим образом. В результате ассоциации рибосомы с полиУ к ней разрешается присоединение фенилаланил-тРНК, и только фенилаланил-тРНК. Нормальное специфическое связывание последней проходит по акцепторному тРНК-связывающему участку. Попада-

ние же фенилаланил-тРНК в донорный тРНК-связывающий участок является более редким и случайным событием. Но все же поскольку некоторая вероятность одновременного нахождения двух надлежащим образом ориентированных фенилаланил-тРНК в рибосоме — одной в акцепторном тРНК-связывающем участке и другой в донорном тРНК-связывающем участке — имеется, то с известной, сравнительно небольшой, скоростью в рибосомах могут образовываться первые пептидные связи. Как только в рибосоме образовалась дифенилаланил-тРНК, дальнейшее течение трансляции не встречает затруднений и идет полным ходом. Так, постепенно, в течение лаг-периода, рибосома за рибосомой преодолевают указанный барьер инициации, и синтез полипептида в системе разворачивается до нормальной скорости.

Важным специальным условием для осуществления синтеза полипептида в системе с матрицами, не содержащими иницирующих кодонов, или в отсутствие формилметионил-тРНК является относительно высокая концентрация ионов Mg^{++} — примерно в два раза более высокая, чем с природными мРНК или с синтетическими матрицами, содержащими начальные АУГ или ГУГ триплеты, в присутствии формилметионил-тРНК. Оказалось, что эта повышенная концентрация — 0,015—0,020 М Mg^{++} — необходима лишь для начала синтеза полипептида, для успешного и быстрого прохождения лаг-периода, а когда трансляция в системе уже идет полным ходом, концентрацию Mg^{++} можно снизить до 0,007—0,010 М, что является более оптимальным для всего процесса (Revel, Hiatt, 1965; Nakamoto, Kolakofsky, 1966). Из того известного факта, что повышенные концентрации ионов Mg^{++} в среде способствуют как более прочной ассоциации рибосомы с матрицей, так и более прочному удержанию тРНК на рибосоме, напрашивается простое объяснение указанной «иницирующей роли» Mg^{++} : при его повышенной концентрации тройственный комплекс рибосома—матрица—аминоацил-тРНК становится достаточно стабильным и без инициаторной тРНК; отсюда вероятность надлежащего соседнего расположения двух аминоацил-тРНК в рибосоме возрастает, что приводит к соответствующему сравнительно быстрому образованию первых пептидных связей в рибосомах системы.

В бесклеточных системах с использованием матричных полинуклеотидов без иницирующих кодонов можно, однако, получить инициацию трансляции, не прибегая к повышению концентрации Mg^{++} и не преодолевая лаг-периода. Это, как оказалось, можно сделать, добавляя в систему экзогенную пептидил-тРНК, где специфичность тРНК соответствует кодо-

нам матричного полинуклеотида. В таком случае пептидил-тРНК оказывается эффективным инициатором трансляции. Например, если к системе с полиУ добавить дифенилаланил-тРНК^{Фен}, то лаг-периода не наблюдается, трансляция начинается немедленно, и для начала не требуется повышенной концентрации Mg^{++} (Nakamoto, Kolakofsky, 1966). Очевидно, экзогенная пептидил-тРНК может легко занимать донорный тРНК-связывающий участок рибосомы в силу сродства своего С-концевого аминокислотного остатка к пептидил-связывающему центру пептидил-трансферазного участка (см. выше — раздел II, 3, 4; Rychlik, 1966a, b). В результате пептидил-тРНК и специфически связываемая аминокислот-тРНК оказываются вместе, бок о бок в рибосоме, что разрешает немедленное образование пептидной связи — в данном случае между пептидил-ом и аминокислот-тРНК. Так пептидил-тРНК может заменить нормальную инициаторную (формилметионил) тРНК в инициации трансляции.

2. Собственно трансляция («полимеризация аминокислотных остатков»)

После того как образовалась первая пептидная связь и в рибосоме возникла дипептидил-тРНК (рис. 18, 5), можно говорить о переходе к центральному этапу функционирования рибосомы в белок-синтезирующей системе — к этапу последовательной полимеризации аминокислотных остатков в полипептидную цепь, или этапу собственно трансляции («элонгации»).

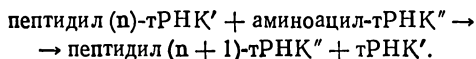
Хотя основные моменты процесса трансляции уже рассматривались в той или иной форме, здесь целесообразно кратко напомнить и суммировать те общие правила, которые лежат в основе этого процесса.

1. В процессе полимеризации аминокислотных остатков в полипептидную цепь участвуют не свободные аминокислоты, а аминокислот-тРНК. Соответственно матричный полинуклеотид, строго говоря, не есть матрица для полимеризации аминокислот, а лишь линейная последовательность нуклеотидов, задающая определенный порядок следования различных аминокислот-тРНК друг за другом при синтезе полипептидной цепи.

2. Процесс синтеза полипептидной цепи не есть одномоментная полимеризация аминокислотных остатков в результате выстраивания многочисленных аминокислот-тРНК на матрице, а представляет собой ступенчатое, строго последовательное на-

ращивание полипептидной цепи по одному аминокислотному остатку. Следовательно, матричный полинуклеотид задает не пространственный порядок взаиморасположения различных аминоацил-тРНК, а временной порядок присоединения их аминоацильных остатков к растущему полипептиду.

3. На протяжении всего процесса полимеризации растущий полипептид удерживается рибосомой. Пристраивание каждого следующего аминоацильного остатка происходит к С-концу полипептида, т. е. именно С-конец является растущим (Bishop et al., 1960; Dintzis, 1961; Rychlik, Šorm, 1962). тРНК, принеся последний пристроившийся аминоацильный остаток, остается связанной с ним, т. е. всегда на протяжении процесса трансляции С-конец растущего полипептида не свободен, а связан сложноэфирной связью с тРНК (Nathans, Lipmann, 1961; Takanami, 1962; Gilbert, 1963 b; Bretscher, 1963, 1965; Rychlik, 1965). Пристраивание очередного аминоацильного остатка заключается в замещении тРНК на аминоацил-тРНК. Таким образом, каждый акт образования пептидной связи есть реакция между пептидил-тРНК' и аминоацил-тРНК'', в результате чего образуется пептидил-тРНК'' с увеличенным на одно звено пептидным остатком, и свободная тРНК':



4. Каждый такой акт образования пептидной связи есть цикл, состоящий из нескольких последовательных стадий: 1) поступление аминоацил-тРНК'' в рибосому и надлежащая ее ориентация рядом с пептидил-тРНК'; 2) перенос С-конца пептидного остатка с тРНК' на свободную NH_2 -группу аминоацильного остатка аминоацил-тРНК''; 3) перемещение образовавшейся пептидил (n + 1)-тРНК'' на то место, где находилась пептидил(n)-тРНК' в начале цикла. По-видимому, одновременно со стадией 3 осуществляется передвижение цепи матричного полинуклеотида относительно рибосомы на один триплет в направлении от 5'-конца к 3'-концу.

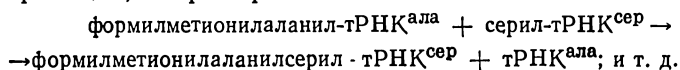
5. Весь процесс синтеза полипептидной цепи складывается из многократного (по числу аминокислотных остатков в полипептиде) повторения таких циклов. Следовательно, рибосома в процессе трансляции представляет собой циклически работающую машину; в каждом цикле осуществляется образование одной пептидной связи и протягивание матричного полинуклеотида на один триплет.

Так как собственно трансляция, или полимеризация, в целом сводится к многократному *повторению* одного и того

же цикла, то более детальное рассмотрение последнего является необходимым и достаточным для описания и характеристики всего процесса. Для рассмотрения цикла сначала будут описаны отдельные его участники, а затем дана общая картина их взаимодействия при функционировании рибосомы.

а. Пептидил-тРНК и ее удержание в транслирующей рибосоме

В процессе инициации трансляции формилметионил-тРНК^{ф-мет} (или, в животных системах, метионил-тРНК^{ф-мет}) реагирует со второй аминоацил-тРНК, например, с аланил-тРНК^{ала} так, что образуется формилметионилаланил-тРНК^{ала} (или метионилаланил-тРНК^{ала}) и свободная тРНК^{ф-мет}. Это означает появление в рибосоме пептидил-тРНК — в данном случае дипептидил-тРНК. В дальнейшем происходит удлинение пептидного остатка за счет аналогичных последовательных реакций, например:



Таким образом, на растущем конце пептида всегда присутствует ковалентно связанная с ним тРНК. Другими словами, если трансляция началась, то на протяжении всего ее хода в рибосоме перманентно будет присутствовать пептидил-тРНК; пептидный остаток при этом последовательно удлиняется, а остатки тРНК соответственно каждый раз сменяются.

Начало трансляции — образование пептидил-тРНК — необратимо закрепляет связь рибосомы с матрицей. В физиологических условиях транслирующая рибосома, пока в ней имеется пептидил-тРНК, не может, по-видимому, диссоциировать от матричного полинуклеотида. Следовательно, по всей вероятности, именно пептидил-тРНК ответственна за закрепление рибосомы на матричном полинуклеотиде. Скорее всего, это как-то связано с тем, что пептидил-тРНК сама очень прочно удерживается рибосомой. Она безусловно не обменивается с экзогенными производными любых тРНК. Связь настолько прочная, что можно понизить концентрацию Mg^{++} до 10^{-4} М и диссоциировать рибосому на субчастицы, а пептидил-тРНК не освободится, оставшись в комплексе с 50 S субчастицей (Gilbert, 1963b). По-видимому, лишь путем деструкции 50 S субчастицы (Gilbert, 1963b) или путем инкубации ее в безмагниевой среде (Bresler et al., 1966), что должно приводить к нарушению ее компактности, можно освободить пептидил-тРНК.

Возможность столь прочного удержания пептидил-тРНК в работающей рибосоме обусловлена, по-видимому, коопера-

тивным эффектом связывания как самого остатка тРНК, так и ее пептидного остатка. При отделении пептида от тРНК оба они уже не могут столь прочно удерживаться в рибосоме или в связи с ее 50 S субчастицей и легко освобождаются в раствор (Gilbert, 1963b; Traut, Monro, 1964; Cappon, 1967). В то же время для указанного выше прочного удержания достаточно уже, по-видимому, дипептидил-тРНК (Cappon, 1967).

Из того факта, что после диссоциации рибосомы на субчастицы пептидил-тРНК сохраняется в прочной связи с 50 S субчастицей, можно сделать вывод о локализации участка связывания пептидил-тРНК именно на 50 S субчастице рибосомы. Уже отмечалось (раздел II, 3, в), что здесь имеется тРНК-связывающий участок, но свободные тРНК и аминоксил-тРНК обнаруживают лишь сравнительно небольшое сродство к нему: связывание, если есть, очень лабильное, и связанные тРНК или аминоксил-тРНК находятся в динамическом равновесии с экзогенными тРНК, легко и быстро обмениваясь с ними (Cappon, 1967). Указывалось также (раздел III, 1), что инициаторная формилметионил-тРНК имеет заметно большее, в сравнении с обычными тРНК, сродство к 50 S субчастице. Наконец, отмечалось, что, по всей вероятности, именно этот участок частично ответствен за удержание пептидил-тРНК в рибосоме. В обоих последних случаях сродство резко возрастает по сравнению с аминоксил-тРНК вследствие, по-видимому, появления дополнительной точки связывания по примыкающему к тРНК N-блокированному аминоксилу. Этот центр связывания растущего конца пептида расположен, вероятно, в пределах пептидил-трансферазного участка и может быть обозначен как пептидил-связывающий центр, участок же, удерживающий сам остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК, обозначается как участок связывания донорной тРНК («донорный тРНК-связывающий участок», D — см. раздел II, 3).

Таким образом, первым обязательным участником или компонентом любого цикла в ходе трансляции является пептидил-тРНК. Она может прочно удерживаться на 50 S субчастице рибосомы, занимая ее тРНК-связывающий участок (донорный тРНК-связывающий участок рибосомы) и пептидил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка.

6. Поступление в рибосому аминоксил-тРНК

Последовательное наращивание полипептидной цепи в ходе трансляции предполагает последовательное поступление молекул аминоксил-тРНК в рибосому. Для обеспечения строгой детерминации аминокислотной последовательности полипепти-

да специфичность поступающей аминоацил-тРНК должна однозначно соответствовать находящемуся в данный момент в рибосоме кодону матричного полинуклеотида. Таким образом, к поступлению аминоацил-тРНК в транслирующую рибосому предъявляется жесткое требование: никакая другая аминоацил-тРНК, кроме аминоацил-тРНК, имеющей антикодон, комплементарный кодону матрицы, в норме не может поступить в работающую рибосому. Следовательно, при участии матричного полинуклеотида работающая рибосома прежде всего производит строгий *выбор* определенной специфической аминоацил-тРНК из среды.

Уже указывалось, что функция выбора аминоацил-тРНК сохраняется у изолированной 30 S субчастицы, ассоциированной с матричным полинуклеотидом или олигонуклеотидом (раздел II, 2, г). Скорее всего, именно 30 S субчастица, связанная в каждый данный момент с определенным кодоном, и ответственна целиком за функцию выбора у работающей рибосомы. Было определено, что на 30 S субчастице локализуется специальный тРНК-связывающий участок — акцепторный тРНК-связывающий участок — который сам по себе, возможно, обнаруживает какое-то сродство к тРНК, но недостаточное, чтобы удерживать ее; однако если к этому сродству добавляется комплементарное взаимодействие между антикодоном тРНК и кодоном матричного полинуклеотида или олигонуклеотида, ассоциированного с рибосомой, то соответствующая тРНК или аминоацил-тРНК удерживается этим тРНК-связывающим участком. Это и может быть основным механизмом выбора специфической аминоацил-тРНК.

Условия специфического связывания аминоацил-тРНК с акцепторным тРНК-связывающим участком на 30 S субчастице рибосомы подробно разбирались выше (раздел II, 2, а).

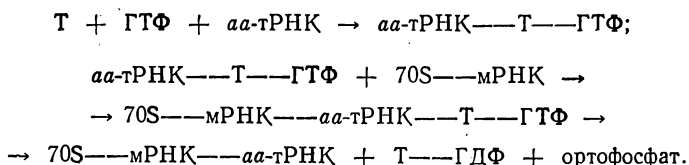
Для того чтобы произошло присоединение аминоацильного остатка к пептидной цепи, самого по себе специфического выбора аминоацил-тРНК из среды и ее поступления в рибосому, очевидно, не достаточно. В рибосоме должна произойти также совершенно определенная, жесткая ориентация молекулы аминоацил-тРНК относительно пептидил-тРНК, прочно закрепленной в пептидил-тРНК-связывающем участке. Эта ориентация должна обеспечить надлежащее сближение аминогруппы аминоацильного остатка аминоацил-тРНК с группой сложноэфирной связи, которой связан пептидил с тРНК в молекуле пептидил-тРНК.

При необходимости комплементарного взаимодействия со смежными кодонами матричного полинуклеотида молекула

аминоацил-тРНК, как очевидно, должна располагаться по отношению к молекуле пептидил-тРНК буквально вплотную, бок о бок, на значительной протяженности их длины. Тогда акцепторный тРНК-связывающий участок 30 S субчастицы должен непосредственно, вплотную, примыкать к донорному тРНК-связывающему участку 50 S субчастицы. Следовательно, оба тРНК-связывающих участка должны локализоваться у самой границы раздела между субчастицами рибосомы, скорее всего на самих контактирующих поверхностях субчастиц.

Более того, по всей вероятности, аминоацильный конец молекулы аминоацил-тРНК не крепится на акцепторном тРНК-связывающем участке 30 S субчастицы, а «сцепивается» с него. В то же время на 50 S субчастице, в ее пептидил-трансферазном участке, имеется специальный центр, обладающий сродством к аминоацильному концу молекулы аминоацил-тРНК (см. раздел II, 4). Можно думать, что этот аминоацил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка и обладает той необходимой ориентирующей функцией, связывая аминоацильный конец молекулы аминоацил-тРНК рядом с сложноэфирной группой молекулы пептидил-тРНК.

В физиологических условиях поступление аминоацил-тРНК в рибосому и ее соответствующая правильная ориентация там, с установкой аминогруппы рядом со сложноэфирной группой молекулы пептидил-тРНК, «катализируется» трансферными факторами $T_u + T_s$ (или TF-1 в животных системах) и является ГТФ-зависимым, потребляющим энергию процессом (Arlinghaus et al., 1964; Ravel et al., 1966, 1969; Ravel, 1967; Lucas-Lenard, Haenni, 1968; Lucas-Lenard et al., 1969; Ertel et al., 1968; Weissbach et al., 1969; Erbe, Leder, 1968; Ibuki, Moldave, 1968; Moldave et al., 1969; Skoultchi et al., 1968, 1969; Hardesty et al., 1969). Последовательность реакций, слагающих этот процесс, выглядит следующим образом:



Следовательно, в физиологических условиях аминоацил-тРНК поступает в рибосому в виде комплекса с Т-фактором и ГТФ, и на присоединение (специфическое связывание) каждой мо-

лекулы аминоксил-тРНК к рибосоме затрачивается энергия одной макроэргической связи ($\text{ГТФ} \rightarrow \text{ГДФ} + \text{ортофосфат}$).

Существенно, что собственно к *выбору* определенной специфической аминоксил-тРНК из среды Т-фактор и ГТФ отношения не имеют: с одной стороны, они комплексируют с любой аминоксил-тРНК, независимо от ее специфичности, лишь бы имела свободная аминогруппа; с другой стороны, поступление или непоступление комплекса аминоксил-тРНК — Т — ГТФ в рибосому однозначно определяется лишь соответствием или несоответствием антикодона тРНК кодону матрицы. Очевидно, что Т-фактор и ГТФ участвуют не в акте кодон-антикодового узнавания и даже не в посадке остатка тРНК на акцепторный тРНК-связывающий участок 30 S субчастицы (ведь при связывании аминоксил-тРНК со свободной 30 S субчастицей Т-фактор и ГТФ никак не помогают — см. Lucas-Lenard, Haenni, 1968). Скорее всего Т-фактор в сочетании с ГТФ участвует в *присоединении, закреплении и ориентации аминокислотного конца* молекулы аминоксил-тРНК на пептидил-трансферазном участке 50 S субчастицы. Получается точка дополнительного связывания аминоксил-тРНК с рибосомой, и потому «энзиматическое» связывание аминоксил-тРНК успешно идет при таких концентрациях Mg^{++} , которые явно не достаточны для удержания тРНК на акцепторном тРНК-связывающем участке 30 S субчастицы в отсутствие Т-фактора и ГТФ.

Для поступления аминоксил-тРНК в рибосому ГТФ с успехом может быть заменен на его нерасщепляемый аналог — 5'-гуанилил-метилден-дифосфонат (ГМФ-МДФ): образуется комплекс аминоксил-тРНК — Т-фактор — ГМФ-МДФ, который нормальным образом связывается с рибосомой при тех же низких концентрациях Mg^{++} , которые достаточны для «энзиматического» связывания (Ertel et al., 1968; Skogerson, Moldave, 1968; Haenni, Lucas-Lenard, 1968). Следовательно, не только для специфического выбора аминоксил-тРНК и связывания остатка тРНК с акцепторным тРНК-связывающим участком, но и для присоединения аминокислотного конца к пептидил-трансферазному участку гидролиза ГТФ не требуется.

Однако аминоксил-тРНК, «энзиматически» связанная с участием ГМФ-МДФ вместо ГТФ, оказывается не компетентной для последующей реакции образования пептидной связи (Skogerson, Moldave, 1968; Haenni, Lucas-Lenard, 1968). Это коррелирует с удержанием Т-фактора в рибосоме. По-видимому, Т-фактор освобождается из рибосомы лишь в результате гидролиза ГТФ. Тогда можно думать, что Т-фактор, связав-

ший аминоацильный конец молекулы аминоацил-тРНК и установивший его в пептидил-трансферазном участке рибосомы, сам экранирует аминогруппу и мешает ее реакции с пептидил-тРНК; лишь расщепление ГТФ индуцирует его освобождение, в результате чего аминогруппа оказывается открытой и может атаковать сложноэфирную группу пептидил-тРНК.

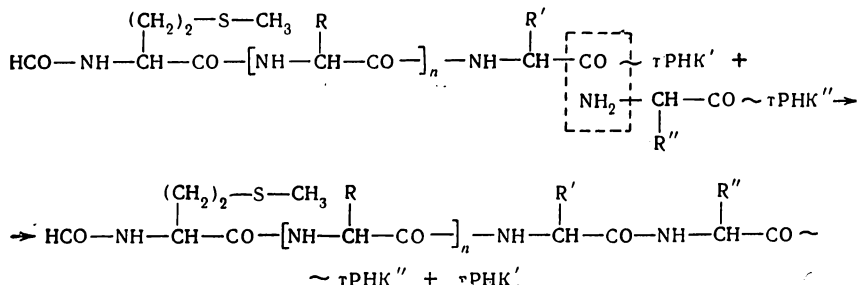
В целом, процесс поступления аминоацил-тРНК в транслирующую рибосому можно представить себе следующим образом. Предварительно, в растворе, вне рибосомы, Т-фактор, взаимодействуя с ГТФ как аллостерическим эффектором, приобретает сродство к аминоацильному концу молекулы и образует с ней комплекс (аминоацил-тРНК — Т-фактор — ГТФ). При встрече этого комплекса с рибосомой, несущей соответствующий кодон в акцепторном тРНК-связывающем участке, тРНК комплекса занимает этот участок на 30 S субчастице, а аминоацильный конец с присоединенным Т-фактором — ГТФ соединяется с пептидил-трансферазным участком 50 S субчастицы. Соединение рибосомы с Т-фактором наводит образование ГТФ-азного центра, ГТФ гидролизуются, в результате чего Т-фактор теряет сродство к аминоацильному концу молекулы аминоацил-тРНК и освобождается из рибосомы. Аминоацил-тРНК остается в рибосоме, будучи связанной своим остатком тРНК с акцепторным тРНК-связывающим участком 30 S субчастицы, а своим аминоацильным остатком — с пептидил-трансферазным участком 50 S субчастицы.

Таким образом, в результате связывания и ориентации молекулы аминоацил-тРНК в рибосоме она в основном располагается на 30 S субчастице, но аминоацильный конец оказывается переброшенным на 50 S субчастицу; наоборот, пептидил-тРНК связана с 50 S субчастицей, но ее антикодон взаимодействует с мРНК, закрепленной на 30 S субчастице.

в. Образование пептидной связи (транспептидация)

Именно удержание и надлежащая ориентация молекулы аминоацил-тРНК рядом с пептидил-тРНК создают в рибосоме возможность возникновения пептидной связи. Для этого прежде всего, как указывалось выше, свободная аминогруппа аминоацильного остатка аминоацил-тРНК должна оказаться рядом с этерифицированным карбоксилем пептидного остатка пептидил-тРНК. Благодаря наличию пептидил-трансферазного участка на 50 S субчастице рибосомы (см. раздел II, 4; Traut, Монго, 1964; Монго, 1967) между аминогруппой и карбоксилем замыкается ковалентная связь, в результате чего тРНК, находившаяся в сложноэфирной связи с карбоксилем пептида, оказывается вытесненной из этой связи. Таким обра-

зом, реакция представляет собой замещение остатка тРНК на остаток аминоксил-тРНК; сложноэфирная связь замещается на амидную (пептидную)



В реакции пептидил-тРНК выступает в качестве донора пептидила, а аминоксил-тРНК — в качестве его акцептора. Смысл реакции состоит в том, что пептид удлиняется на один аминокислотный остаток. Растет, как видно, С-конец пептида.

г. Транслокация

В результате реакции транспептидации в рибосоме создается следующая ситуация: тРНК', лишенная пептидила, продолжает удерживаться в донорном тРНК-связывающем участке (хотя, естественно, она уже не так прочно закреплена в рибосоме, как пептидил-тРНК'), а тРНК'', оказавшаяся связанной с пептидилом, по-прежнему, сидит в акцепторном тРНК-связывающем участке. Это состояние рибосомы и пептидил-тРНК называется *пре-транслоцированным состоянием*.

Чтобы рибосома могла перейти к следующему циклу, т. е. связать новую аминоксил-тРНК''' и образовать следующую пептидную связь, в ней сначала должна произойти *транслокация*. Транслокация включает в себя по крайней мере четыре взаимосвязанных и синхронизованных акта пространственных перемещений компонентов в рибосоме: 1) С-концевой аминокислотной молекулы пептидил-тРНК'' перемещается на пептидил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка и закрепляется там (транслокация пептидила); 2) остаток тРНК'' той же молекулы пептидил-тРНК'' перемещается из занимаемого им акцепторного тРНК-связывающего участка на донорный тРНК-связывающий участок (транслокация тРНК); 3) деацилированная тРНК', занимавшая донорный тРНК-связывающий участок, вытесняется из него и освобождается в среду; 4) цепь мРНК перемещается на один триплет в направлении от 5'- к 3'-концу, так что в акцепторном тРНК-связывающем

участке устанавливается новый очередной кодон (транслокация мРНК).

Пока не ясно, как сопряжены эти четыре акта пространственных перемещений друг с другом, и что здесь является ведущим, а что — ведомым. Очевидно лишь, что транслокация остатка тРНК'', освобождение деацилированной тРНК' и протягивание матрицы на один триплет должны совершаться одновременно и строго синхронно. Выяснено также, что процесс транслокации в целом требует присутствия белкового G-фактора и ГТФ и идет с потреблением энергии — в процессе транслокации ГТФ расщепляется до ГДФ и ортофосфата (Traut, Monge, 1964; Conway, Lipmann, 1964; Nishizuka, Lipmann, 1966b; Haenni, Lucas-Lenard, 1968; Lucas-Lenard, Haenni, 1968, 1969; Erbe, Leder, 1968; Erbe et al., 1969; Brot et al., 1968; Pestka, 1968).

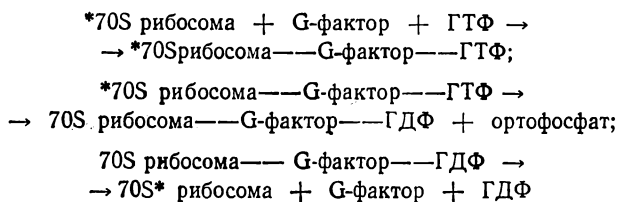
Можно представить себе два принципиально возможных способа протягивания (перемещения) матричного полинуклеотида относительно рибосомы.

1) Протягивание матрицы является активным — *ведущим* — процессом по отношению к процессу перехода остатка тРНК молекулы пептидил-тРНК из одного участка в другой. Это значит, что замыкание пептидной связи каким-то непонятным образом индуцирует такую локальную конформационную перестройку рибосомы (возможно, мРНК-связывающего и примыкающих к нему участков), которая перемещает матрицу на три нуклеотидных остатка (около 10 Å). В результате перемещения матрицы остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК окажется увлеченным своим кодоном в донорный тРНК-связывающий участок, а бывшая там свободная тРНК легко вытесняется. Для указанной перестройки (трансконформации) рибосомы с целью перемещения матрицы должна требоваться энергия, которая может поступать за счет расщепления молекулы ГТФ, т. е. перестройка должна быть ГТФ-зависимым процессом. Впрочем, перестройка может быть и спонтанной в ответ на замыкание пептидной связи, а ГТФ-зависимой тогда должна быть релаксация.

2) Протягивание матрицы является пассивным — *ведомым* — процессом по отношению к процессу перехода остатка тРНК молекулы пептидил-тРНК из одного тРНК-связывающего участка в другой. Это значит, что остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК спонтанно или за счет энергии расщепления ГТФ перескакивает в участок на 50 S субчастице и увлекает за собой связанный с ней кодон, приводя тем самым к перемещению матрицы на один триплет. Этот переход остатка тРНК из акцепторного тРНК-связывающего участка в донорный

тРНК-связывающий участок может быть непосредственным следствием образования пептидной связи, так как данный остаток тРНК после этого становится частью молекулы пептидил-тРНК, а С-конец пептидила имеет особое сродство к пептидил-связывающему центру пептидил-трансферазного участка, и переходит на него, увлекая остаток тРНК. Такое представление о протягивании матрицы как ведомом процессе дает более простое и потому очень привлекательное объяснение механизму процесса транслокации, строгому сопряжению процесса с образованием пептидной связи и всегда безошибочному перемещению матрицы именно на триплет — не больше и не меньше.

Конкретная роль G-фактора, ГТФ и расщепления ГТФ до ГДФ и ортофосфата в осуществлении транслокации не известна. По-видимому, G-фактор и ГТФ ассоциируют лишь с пре-транслоцированной рибосомой, после чего ГТФ распадается до ГДФ и ортофосфата:



(пре-транслоцированная 70 S рибосома обозначена со звездочкой слева, пост-транслоцированная рибосома — со звездочкой справа). Пока нельзя сказать, происходит ли транслокация сопряженно с распадом ГТФ в составе комплекса (реакция 2) или сопряженно с освобождением G-фактора и ГДФ из рибосомы (реакция 3). Однако данные о том, что транслокацию можно ингибировать (например, фусидовой кислотой или циклогексимидом — см. раздел IV) с сохранением ГТФ-азной активности рибосомного комплекса (Bodley et al., 1969; McKeehan, Hardesty, 1969), причем комплекс 70 S рибосома — G-фактор — ГДФ в этом случае, по-видимому, не распадается, наводят на мысль о сопряжении транслокации не с гидролизом ГТФ (реакция 2), а скорее именно с распадом комплекса (с освобождением G-фактора — реакция 3).

Можно представить следующую гипотетическую картину участия G-фактора и ГТФ в транслокации. G-фактор и ГТФ (в качестве аллостерического эффектора G-фактора) узнают нетранслоцированный (т. е. сидящий вне пептидил-связывающего центра пептидил-трансферазного участка) С-концевой аминокислотный остаток молекулы пептидил-тРНК, ассоциируют с ним и с рибосомой и сажают его на пептидил-трансферазный центр, т. е.

производят транслокацию пептидила. Но комплексообразование G-фактора с рибосомой наводит образование ГТФ-азного центра, который гидролизует ГТФ до ГДФ и ортофосфата. Это приводит к потере сродства G-фактора к рибосоме, и G-фактор и ГДФ освобождаются из нее, что индуцирует какое-то изменение в рибосоме, приводящее к вытягиванию остатка тРНК из акцепторного тРНК-связывающего участка закрепленным в пептидил-связывающем центре пептидиллом. Вытягивание остатка тРНК запускает все дальнейшие события: связанный с ней триплет мРНК смещается со своего места, толкает предшествующий триплет, а последний толкает связанную с ней деацилированную тРНК, в результате чего она освобождает донорный тРНК-связывающий участок; остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК садится на донорный тРНК-связывающий участок, увлекая свой триплет мРНК и тем самым устанавливая новый вакантный триплет в акцепторном тРНК-связывающем участке.

Так или иначе, в результате транслокации акцепторный тРНК-связывающий участок оказывается свободным, и в нем находится новый вакантный кодон мРНК; донорный тРНК-связывающий участок занят теперь остатком тРНК молекулы пептидил-тРНК; пептидил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка удерживает С-концевой аминокислотный остаток молекулы пептидил-тРНК, а аминокислотный-связывающий центр этого участка свободен. Пост-транслоцированная рибосома готова к восприятию следующей аминокислоты-тРНК и повторению всего цикла.

д. Общая схема рабочего цикла трансляции

Уже само обнаружение возможности одновременного нахождения пептидил-тРНК и аминокислоты-тРНК в работающей рибосоме привело в свое время к постулированию схем функционирования рибосомы, в которых утверждается наличие по крайней мере двух отдельных фиксированных тРНК-связывающих участков — аминокислоты-тРНК-связывающего и пептидил-тРНК-связывающего (Watson, 1964, 1965; Warner, Rich, 1964; Wettstein, Noll, 1965). В дальнейшем были получены и более прямые экспериментальные доказательства того, что действительно полная рибосома несет два тРНК-связывающих участка с различными свойствами (см. выше, раздел II, а также III, 2, а, б). Далее, в предложенных схемах, а также в более ранних схемах некоторых других авторов (Lipmann, 1963; Gilbert, 1963b; Traut, Monro, 1964) было постулировано, что образование пептидной связи в рибосоме происходит как перенос карбоксила пептидного остатка от тРНК на амино-

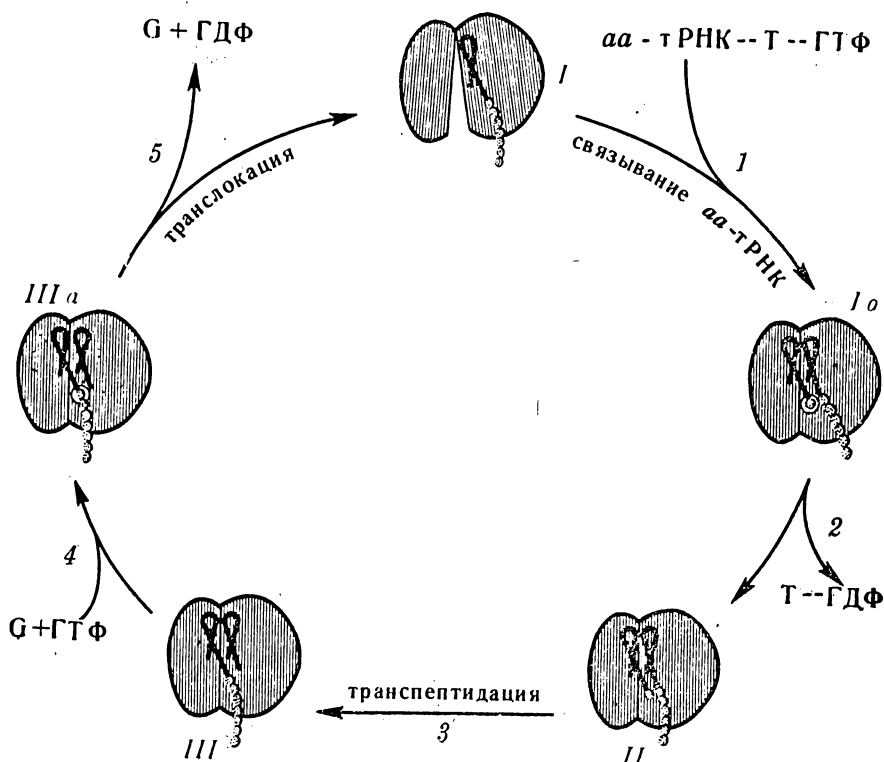
группу аминоксил-тРНК. Наконец, третьим важнейшим постулатом предложенных схем было утверждение того, что сразу после образования пептидной связи остаток тРНК новообразованной пептидил-тРНК перемещается из одного тРНК-связывающего участка в другой. В схеме Дж. Уотсона (Watson, 1964, 1965) все эти представления были впервые суммированы и сформулированы в наиболее четкой и полной форме.

Основываясь на указанных главных положениях схемы Дж. Уотсона и всей совокупности приведенных выше (раздел III, а—г) экспериментальных данных, мы можем дать следующее схематическое описание последовательности событий в единичном рабочем цикле транслирующей рибосомы (рис. 19). Начнем с пост-транслоцированного состояния, когда пептидил-тРНК занимает донорный тРНК-связывающий участок

Р и с. 19.

Вероятная схема рабочего цикла рибосомы

Объяснения в тексте



и пептидил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка на большой субчастице рибосомы, а акцепторный тРНК-связывающий участок на малой субчастице свободен (рис. 19, I).

Шаг 1: аминоацил-тРНК в комплексе с Т-фактором и ГТФ поступает в рибосому. Ее антикодон комплементарно связывается с кодоном мРНК и остаток тРНК в целом входит в акцепторный тРНК-связывающий участок малой рибосомной субчастицы. Аминоацильный остаток с примыкающим к нему 3'-концом тРНК и связанный с ним Т-фактор взаимодействуют с пептидил-трансферазным участком большой субчастицы.

Шаг 2: в рибосоме происходит гидролитический распад ГТФ, в результате которого комплекс Т-фактор — ГДФ и ортофосфат освобождаются из рибосомы, а аминоацильный конец молекулы аминоацил-тРНК (группировка «Ц-А-аминоацил») надлежащим образом устанавливается в аминоацил-связывающем центре пептидил-трансферазного участка. Теперь пептидил-трансферазный участок большой субчастицы удерживает в непосредственной близости друг к другу С-концевой аминоацил пептидного остатка молекулы пептидил-тРНК и аминоацил со свободной NH_2 -группой молекулы аминоацил-тРНК (рис. 19, II).

Шаг 3: С-концевой карбоксил пептидного остатка переносится от гидроксила рибозы своей тРНК на аминогруппу аминоацила молекулы аминоацил-тРНК, т. е. образуется пептидная связь между С-концом пептидила и аминогруппой аминоацил-тРНК. В результате в донорном тРНК-связывающем участке остается деацилированная тРНК, акцепторный тРНК-связывающий участок занят остатком тРНК, являющимся теперь частью новообразованной пептидил-тРНК, а новый С-концевой аминоацил пептидила оказывается вне пептидил-связывающего центра пептидил-трансферазного участка (пре-транслоцированное состояние; рис. 19, III).

Шаг 4: рибосома связывает трансферный G-фактор (TF-II в случае животных систем) и ГТФ (в результате этого, возможно, происходит установка С-концевого аминоацила пептидного остатка на пептидил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка).

Шаг 5: в рибосоме происходит гидролитическое расщепление ГТФ, ортофосфат, G-фактор (TF-II) и ГДФ покидают рибосому, и сопряженно с этим происходит транслокация: остаток тРНК молекулы новообразованной пептидил-тРНК перемещается из занимаемого им акцепторного тРНК-связывающего участка на 30 S субчастице в донорный тРНК-связывающий участок на 50 S субчастице, увлекая за собой связанный

с ним кодон мРНК и вытесняя деацилированную тРНК из донорного тРНК-связывающего участка. Теперь рибосома возвращена в исходное пост-транслоцированное состояние с вакантным акцепторным тРНК-связывающим участком (рис. 19, I). Цикл завершился. Таким образом, в результате полного единичного цикла: а) синтезируется одна пептидная связь — полипептид удлиняется на одну аминокислоту; б) матричный полинуклеотид перемещается относительно рибосомы на один триплет — прочитывается один кодон. Повторение этих циклов и создает процесс трансляции, в результате которого прочитывается матричный полинуклеотид и синхронно синтезируется полипептидная цепь. При этом можно напомнить, что матричный полинуклеотид перемещается (прочитывается) в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Полипептидная цепь, как видно из описанного цикла, растет своим С-концом, т. е. синтезируется от N-конца к С-концу.

Следует, однако, отдавать себе полный отчет в том, что хотя в настоящее время можно в виде приведенной выше схемы *описать* вероятную последовательность событий при функционировании рибосомы (см. предыдущий раздел, III, 2, д), но до сих пор не известен тот конкретный молекулярный механизм, который бы *объяснил* эту последовательность событий и объединил бы эти события в вытекающие друг из друга акты. Более того, до сих пор все рассмотрение функционирования рибосомы носило в известной мере абстрактный характер и не было органически увязано со структурой рибосомы, и, в частности, с ее наиболее характерной структурной особенностью — построением из двух неравных субчастиц.

С целью попытаться представить себе механизм участия рибосомы в осуществлении трансляции была предложена гипотеза (Спирин, 1968, 1970; Spirin, 1968, 1969), в основу которой положена идея о строгом разделении труда между двумя рибосомными субчастицами: для большой рибосомной субчастицы была постулирована роль «полимерного носителя», удерживающего последовательно наращиваемый полипептид в процессе синтеза, а малая субчастица рассматривается как подвижный «подносчик» новых аминоацил-тРНК. Однако синтез полипептида в рибосоме является строго детерминированным матрицей; это означает, что, с одной стороны, весь полипептид должен быть синтезирован при участии одной матрицы, а с другой стороны, в выборе подносимой аминоацил-тРНК должна участвовать та же матрица. Отсюда «носитель» полипептида и «подносчик» аминоацил-тРНК должны быть перманентно связаны с одной и той же матри-

цей и, следовательно, друг с другом. Предложенная гипотетическая модель состоит в том, что «носитель» (50 S) и «подносчик» (30 S) сочленены друг с другом с помощью подвижного «шарнира», так что «подносчик» (30 S) может отодвигаться от «носителя», вращаясь на «шарнире», и вылавливать из среды аминоацил-тРНК, соответствующую кодону матрицы, после чего он снова смыкается с «носителем» (50 S), приводя выбранную аминоацил-тРНК в контакт с растущим пептидом. Этот механизм простым образом объясняет и связывает в систему известные акты рабочего цикла рибосомы — поступление аминоацил-тРНК, выход деацилированной тРНК, образование пептидной связи, транслокацию. Основное положение гипотезы состоит в том, что периодическое размыкание и смыкание субчастиц рибосомы есть приводной механизм, обеспечивающий все пространственные перемещения тРНК и мРНК в процессе трансляции. Была построена основанная на этой гипотезе механическая модель функционирующей рибосомы и подробно описана кинематическая схема транслокации (Спирин, 1970; Spirin, 1969).

3. Терминация трансляции

Итак, в соответствии с механизмом трансляции, растущая полипептидная цепь в рибосоме всегда несет на своем С-конце остаток тРНК. Благодаря наличию тРНК растущая полипептидная цепь прочно удерживается в рибосоме. Завершение синтеза полипептидной цепи белка должно означать, следовательно, освобождение ее из связи с последней тРНК и с рибосомой.

Само по себе прочтение матричного полинуклеотида до 3'-конца, как оказалось, не обеспечивает освобождения пептида от тРНК и из связи с рибосомой. Так, полимеризация аминокислот при участии многих синтетических матричных полинуклеотидов в бесклеточных системах вовсе не завершается образованием свободных полипептидов, а дает в результате лишь соответствующие пептидил-тРНК, ассоциированные с рибосомами (Gilbert, 1963b; Takanami, Yan, 1965; Thach et al., 1965; Bretscher et al., 1965; Ganoza, Nakamoto, 1966).

С другой стороны, при использовании естественных полицистроновых мРНК синтезируемые полипептидные цепи белков освобождаются после прочтения каждого цистрона, т. е. при прохождении каких-то внутренних участков матричного

полинуклеотида, независимо от его 3'-конца (Ohtaka, Spiegelman, 1963; Saracchi, 1966b).

Перечисленные факторы не могли не привести к предположению, что освобождение полипептида из связи с тРНК и с рибосомой каким-то образом индуцируется специальным сочетанием нуклеотидов в цепи матричного полинуклеотида. Такие сочетания должны находиться в конце каждого цистрона природных мРНК. Эти нуклеотидные сочетания получили название терминирующих кодонов.

а. Терминирующий кодон

В опытах с использованием синтетических матричных полинуклеотидов в бесклеточных системах *E. coli* было замечено, что, в отличие от большинства синтетических полинуклеотидов, беспорядочный сополимер поли (У, А) приводит к образованию значительной доли свободных пептидов (Takamami, Yan, 1965; Bretscher et al., 1965; Ganoza, Nakamoto, 1966). Доля освобожденных пептидов зависела от соотношения А и У в полинуклеотиде: она была больше при преобладании А в составе полимера. Это позволило предположить, что триплет, состоящий из двух А и одного У, может являться терминирующим кодоном. Свободные пептиды образовывались со значительной эффективностью и при использовании беспорядочного матричного полинуклеотида поли (А, У, И) (Takamami, Yan, 1965). Так как И выступает в матрице как эквивалент Г, то можно было заключить, что сочетание из А, У и Г в матричном полинуклеотиде также может выполнять терминирующую функцию.

При испытании самых различных синтетических тринуклеотидов на связывание аминоксил-тРНК в бесклеточной системе (Nirenberg, Leder, 1964) было найдено, что всего несколько триплетов не связывают ни одну из обычных аминоксил-тРНК, в том числе триплеты УАА, УАГ и УГА (Nirenberg et al., 1965; Brimacombe et al., 1965). В дальнейшем на системах с синтетическими матрицами было окончательно доказано, что только эти три триплета из всех 64 — УАА, УАГ и УГА — действительно являются «бессмысленными» триплетами, т. е. триплетами, не кодирующими ни одну из аминокислот (см. Khorana et al., 1966; Morgan et al., 1966). Им, очевидно, и могла быть приписана терминирующая функция.

Вслед за этим терминирующая функция триплета УАА была прямо показана в экспериментах *in vitro*, где в качестве матрицы в бесклеточной белок-синтезирующей системе использовали синтетические полинуклеотиды АУГУА_n, АУГУ₂А_n,

АУГУ₃А_n и АУГУ₄А_n (Last et al., 1967); в первом случае никаких пептидов не синтезировалось, во втором случае синтезировался полипептид формилметионил-лейцил-полилизин, в третьем случае — формилметионил-фенилаланил-полилизин, а в четвертом — (АУГУУУУАА...) образовался лишь дипептид формилметионил-фенилаланин, и на этом трансляция обрывалась.

Несколько ранее всех приведенных биохимических экспериментов по выявлению терминирующих и «бессмысленных» нуклеотидных сочетаний на синтетических полинуклеотидах заключение о том, что терминирующей функцией в мРНК у *E. coli* могут обладать триплеты УАА и УАГ, было сделано на основании генетического анализа бессмысленных «янтарных» (amber) и «охровых» (ochre) мутаций (Brenner et al., 1965).

В случае «янтарной» мутации по определенному гену, как и в случае большинства обычных точечных мутаций, в клетках не образуется данный функциональный белок. Однако обычные точечные мутации, как известно, приводят к синтезу неактивного аналога этого белка, т. е. его полной полипептидной цепи с одной замененной аминокислотой. Вместо этого, «янтарные» мутации приводят к накоплению незаконченных N-концевых фрагментов полипептидной цепи данного белка (Sarabhai et al., 1964; Stretton, Brenner, 1965). Следовательно, «янтарная» мутация состоит не в замене аминокислотного остатка, как большинство обычных точечных мутаций, а в *обрыве* полипептидной цепи в точке, соответствующей измененному кодону данного гена.

Следовательно, измененный (мутировавший) кодон у «янтарных» мутантов детерминирует не какую-либо аминокислоту, а является «бессмысленным» и детерминирует прерывание, или терминацию процесса трансляции. Отсюда можно думать, что «янтарная» мутация означает, таким образом, изменение некоего смыслового кодона в терминирующий кодон.

У одних из исследованных «янтарных» мутантов полипептидная цепь прерывается по месту, где в норме должен стоять остаток глутамина (Stretton, Brenner, 1965; Notani et al., 1965; Weigert, Garen, 1965a), у других — по месту, где в нормальном белке стоит триптофан (Weigert, Garen, 1965a; Brenner et al., 1965). Следовательно, «янтарная» мутация состоит в изменении либо кодона глутамина, либо кодона триптофана в терминирующий кодон. Очевидно, что единственно возможным кодоном, который может образоваться в результате одной точечной мутации как из глутаминового кодона (ЦАА, ЦАГ), так и из триптофанового кодона (УГГ), может быть лишь триплет УАГ (ЦАГ → УАГ или УГГ → УАГ).

Следовательно, «янтарным» кодоном является именно УАГ, и этот кодон может нести терминирующую функцию в мРНК (Brenner et al., 1965; Weigert, Garen, 1965b).

Известна другая группа «бессмысленных» мутаций — так называемые «охровые» мутации, — принципиально аналогичных «янтарным», но отличающихся тем, что в штаммах бактерий, супрессирующих «янтарные» мутации, «охровые» мутации не супрессируются (Brenner, Beckwith, 1965). Это обстоятельство означает, что в данном случае обрыв роста полипептидной цепи детерминируется каким-то другим кодоном. Был сделан вывод, что «охровая» мутация состоит в изменении кодона глутамина ЦАА в триплет УАА (Brenner et al., 1965).

Наконец, были выделены мутанты, аналогичные «янтарным» и «охровым», но обрыв роста полипептидной цепи в них индуцировался кодоном УГА (Brenner et al., 1967; Sambrook et al., 1967).

Таким образом, найдено три кодона, которые детерминируют прерывание, или терминацию, трансляции — УАГ («янтарь»), УАА («охра») и УГА.

Неизвестно, однако, все ли три указанных триплета реально используются в нормальной клетке как кодоны, означающие конец цистрона, или природа использует по преимуществу или исключительно лишь один из них. Известно, что среди мутантов, супрессирующих «охровые» мутации, жизнеспособными оказываются лишь те, которые имеют сравнительно очень малую эффективность супрессии, тогда как у мутантов, супрессирующих «янтарные» мутации и мутации с появлением кодона УГА, эффективность супрессии может быть очень высокой. Это как будто бы представляет собой косвенное свидетельство в пользу того, что биологическое значение при нормальной терминации трансляции в конце каждого цистрона в клетке имеет преимущественно кодон УАА, а не УАГ и УГА (Brenner et al., 1965; Sambrook et al., 1967).

При анализе РНК бактериофагов f2 и R17, являющихся природными полицистроновыми матрицами для синтеза фаговых белков, в качестве терминирующего кодона был найден именно кодон УАА (Nichols, 1970; Beaudet, Caskey, 1970; Caracchi, Klein, 1970).

6. Механизм терминации

Итак, по-видимому, определенное сочетание нуклеотидов в цепи матричного полинуклеотида служит сигналом к прекращению трансляции и освобождению образовавшейся полипептидной цепи из связи с тРНК и рибосомой.

Само прекращение трансляции при вхождении в рибосому бессмысленного триплета нуклеотидов кажется вполне понятным и не требует какого-либо специального гипотетического механизма для своего объяснения. Действительно, если данный триплет не кодирует ни одну из аминокислот, то С-конец полипептида не вступит в очередную пептидную связь, и рабочий цикл рибосомы на этом прервется.

Однако вся сложность состоит во второй стороне этапа терминации: сразу вслед за остановкой трансляции или одновременно и синхронно с ней должно произойти освобождение полипептида из связи с тРНК и из рибосомы. Уже указывалось, что остановка трансляции сама по себе не вызывает автоматического освобождения ни полипептида, ни пептидил-тРНК. (Например, остановка трансляции происходит, очевидно, при окончании считывания цепи синтетической матрицы, у ее 3'-конца, но автоматического освобождения пептидов или пептидил-тРНК при этом не происходит.) Отсюда довольно очевидно, что терминирующий кодон должен не просто останавливать трансляцию, но и каким-то специальным образом индуцировать освобождение полипептида.

Возможны два принципиальных пути «освобождающего» действия терминирующего кодона: 1) он индуцирует освобождение пептидил-тРНК из рибосомы, а затем уже вне рибосомы специальный фермент может гидролизовать сложноэфирную связь между пептидом и тРНК; 2) он как-то индуцирует именно гидролиз сложноэфирной связи между пептидом и тРНК, что автоматически приводит к освобождению пептида из рибосомы. Оказалось, что в природе реализуется второй путь: гидролитическое освобождение пептида из связи с тРНК *происходит на рибосоме* и является первичным, а его освобождение из рибосомы — следствием этого, т. е. вторичным актом.

Установлено, что терминирующий кодон индуцирует гидролиз сложноэфирной связи между пептидилом и остатком тРНК в рибосоме через посредство специального растворимого белка, называемого *фактором терминации*, или *R-фактором* (см. раздел I, 7; Саресчи, 1967). R-фактор непосредственно узнает вакантный терминирующий кодон на рибосоме и, вероятно, связывается с такой рибосомой (Scolnick, Caskey, 1969). Найдено два различных R-фактора: R₁, узнающий кодоны УАГ и УАА, и R₂, узнающий кодоны УГА и УАА (Scolnick et al., 1968). Сам R-фактор эстеразной активностью не обладает, и лишь его кодон-зависимое связывание с рибосомой приводит к появлению эстеразной активности, гидролизующей пептидил-тРНК. По-видимому, эстеразная активность обеспечива-

ется пептидил-трансферазным центром рибосомы (Vogel et al., 1969; Tomkins et al., 1970; Fahnestock et al., 1970).

В терминеции трансляции принимают участие обе рибосомные субчастицы. При этом рибосома должна быть обязательно в пост-транслоцированном состоянии, когда остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК находится в донорном тРНК-связывающем участке, а терминирующий кодон — в акцепторном тРНК-связывающем участке (Caskey et al., 1969). Процесс терминеции можно разбить на две стадии, каждая из которых зависит от разных субчастиц: 1) собственно *узнавание терминирующего кодона*, где участвует 30 S субчастица, связанный с ней терминирующий кодон, белковый R-фактор и дополнительный, ускоряющий реакцию, белковый фактор S; 2) гидролитическое *освобождение пептида*, где участвует 50 S субчастица, удерживающая пептидный остаток, и R-фактор (Caskey et al., 1969).

Таким образом, терминеция начинается, когда в акцепторном тРНК-связывающем участке (его мРНК-связывающем центре) 30 S субчастицы появляется терминирующий кодон (например, UAA). Тогда вместо тРНК на акцепторный тРНК-связывающий участок садится белок, специфически взаимодействующий с терминирующим кодоном и с рибосомой — R-фактор. Другой белок — S-фактор — стимулирует связывание R-фактора с акцепторным тРНК-связывающим участком (Goldstein, Caskey, 1970). Далее, при наличии R-фактора, сидящего на тРНК-связывающем участке 30 S субчастицы и, по-видимому, какой-то частью взаимодействующего и с 50 S субчастицей, сложноэфирная связь молекулы пептидил-тРНК, сидящей на 50 S субчастице, гидролизует; очень вероятно, что этот гидролиз катализируется пептидил-трансферазным центром 50 S субчастицы. В результате гидролиза пептид освобождается из рибосомы. S-фактор взаимодействует с ГТФ (без расщепления последней) и индуцирует эффективное освобождение R-фактора из связи с рибосомой (Goldstein, Caskey, 1970).

Все вышеизложенное касалось терминеции в бактериальных системах. Имеются указания, что в животных системах процесс терминеции аналогичен: основным терминирующим кодоном является, по-видимому, UAA, и процесс зависит от белкового фактора терминеции (Goldstein et al., 1970).

После того как произошло освобождение пептида, оставшаяся деацилированная тРНК оказывается слабо удерживаемой в рибосоме и тоже легко освобождается, а ассоциация субчастиц друг с другом и с мРНК становится лабильной. Теперь рибосома может легко покинуть мРНК и диссоцииро-

вать на субчастицы. Свободные субчастицы снова могут взаимодействовать с белковыми факторами инициации и иницирующим кодоном мРНК, чтобы начать новый цикл трансляции.

в. Деформилирование и деметионилирование N-конца полипептида

По-видимому, освобождению полипептида из рибосомы сопутствуют некоторые модифицирующие реакции, завершающие образование законченной белковой молекулы из синтезированного полипептида, хотя непосредственно в терминеции трансляции не участвующие.

Как уже подробно разбиралось в разделе об инициации трансляции, первым N-концевым аминокислотным остатком при синтезе полипептидных цепей белков в бактериальных системах (*E. coli*) является N-формилметиониновый остаток (Adams, Саресчи, 1966; Webster et al., 1966; Саресчи, 1966a). В то же время завершенные белки, синтезированные в бактериях (*E. coli*), имеют, как правило, свободный неформилированный N-конец (Waller, 1963). Более того, N-концевой аминокислотой в завершенных белках *E. coli* хотя и часто является метионин, но далеко не всегда. Следовательно, для обеспечения образования полностью завершенных цепей белков в бактериальных системах должна осуществиться некоторая дополнительная модификация N-конца новосинтезированного полипептида; модификация заключается прежде всего в отщеплении концевой формильной группы (Саресчи, 1966a).

На каком этапе синтеза белка происходит эта модификация, т. е. отщепляется формил от N-конца полипептидной цепи? Исследование кинетики отщепления меченого формила указывает на то, что это отщепление происходит не в ходе трансляции, а скорее всего после завершения синтеза полной полипептидной цепи (Саресчи, 1966a). Найдено, что отщепление формильного остатка от N-конца новосинтезированной полипептидной цепи белка осуществляется с помощью специального фермента — пептид-деформилазы (Fry, Lamborg, 1967; Adams, 1968). Фермент очень нестабилен и, в частности, инактивируется SH-соединениями. Поэтому фермент отсутствует в более или менее очищенных бесклеточных системах и во всяком случае, по-видимому, не ассоциирован с рибосомой.

Важно указать на то, что при синтезе ряда белков *E. coli* отщепляется, по-видимому, лишь формильный остаток, и тогда N-концевой аминокислотой оказывается метионин. Однако образование других белков в тех же клетках идет с отщеплением

и формильной группы, и метионина, в результате чего на N-конце оказываются другие аминокислоты — аланин, серин, треонин и др. В целом наблюдается следующее соотношение N-концевых аминокислот в полностью завершеном тотальном белке *E.coli*: метионин — 45%; аланин — 30%; серин — 15%; треонин, глутаминовая кислота и прочие аминокислоты — 10% (Waller, 1963). Значительная доля N-концевых аланина и серина указывает, очевидно, что в синтезируемых полипептидных цепях в *E.coli* очень часто встречаются последовательности N-формилметионил-аланил-... и N-формилметионил-серил-... Но интересно, что значительная доля N-концевого метионина происходит лишь из самого формилметионина, а не из N-концевых последовательностей типа N-формилметионил-метионил-..., которые в синтезируемых полипептидных цепях практически не обнаруживаются (Carpeschi, 1966a). Что определяет отщепление в одних случаях только формильного остатка, а в других также и метионинового остатка от новообразованной полипептидной цепи белка, пока неизвестно. Предполагается, что отщепление метионина осуществляет специальная аминопептидаза. Можно предполагать, что решающим фактором, контролирующим аминопептидазную реакцию, является трехмерная конформация белка (Carpeschi, 1966a; Adams, 1968).

В животных системах, где синтез полипептидных цепей начинается не с формилметионина, а с метионина (Smith, Marcker, 1970; Brown, Smith, 1970; Gupta et al., 1970; Wilson, Dintzis, 1970; Housman et al., 1970), имеется, очевидно, аналогичная специфическая аминопептидаза; например, при синтезе α - и β -цепей гемоглобина фермент отщепляет этот N-концевой метионин, оставляя в качестве N-концевого остатка следующую аминокислоту — валин (Wilson, Dintzis, 1970; Housman et al., 1970).

Литература

- Спирин А. С. 1964. Рибонуклеиновые кислоты — состав, строение и биологическая роль. XIX Баховское чтение, 17 марта 1963 г. М., «Наука».
- Спирин А. С. 1968. Докл. АН СССР, 179, 1467.
- Спирин А. С. 1970. Известия АН СССР, сер. биол., № 2, 169.
- Adams J. M., 1968. J. Mol. Biol., 33, 571.
- Adams J. M., Carpeschi M. R. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 55, 147.
- Adams J. M., Jeppesen P., Sanger F., Barrell B. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 611.
- Allende J. E., Monro R., Lipmann F. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 51, 1211.
- Anderson J. S., Bretscher M. S., Clark B. F. C., Marcker K. A. 1967. Nature, 215, 490.
- Arlinghaus R., Shaeffer J., Schweet R. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 51, 1291.

- Beaudet A. L., Caskey C. T. 1970. *Nature*, 227, 38.
- Billeter M. A., Dahlberg J. E., Goodman H. M., Hindley J., Weissman C. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 635.
- Bishop J. O., Leahy J., Schweet R. S. 1960. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 46, 1030.
- Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 437.
- Brownerman G. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 307.
- Brenner S., Barnett L., Katz E. R., Crick F. H. C. 1967. *Nature*, 213, 449.
- Brenner S., Beckwith J. R. 1965. *J. Mol. Biol.*, 13, 629.
- Brenner S., Stretton A. O. W., Kaplan S. 1965. *Nature*, 206, 994.
- Bresler S., Grajewskaja R., Kirilov S., Saminski E., Shutov F. 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, 123, 534.
- Bretscher M. S. 1963. *J. Mol. Biol.*, 7, 446.
- Bretscher M. S. 1965. *J. Mol. Biol.*, 12, 913.
- Bretscher M. S., Goodman H. M., Menninger J. R., Smith J. D. 1965. *J. Mol. Biol.*, 14, 634.
- Bretscher M. S., Marcker K. A. 1966. *Nature*, 211, 380.
- Brimacombe R., Trupin J., Nirenberg M., Leder P., Bernfield M., Jaouni T. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 54, 954.
- Brot N., Ertel R., Weissbach H. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 563.
- Brown J. C., Smith A. E. 1970. *Nature*, 226, 610.
- Cannon M. 1967. *Biochem. J.*, 104, 934.
- Capecci M. R. 1966a. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 55, 1517.
- Capecci M. R. 1966b. *J. Mol. Biol.*, 21, 173.
- Capecci M. R. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 58, 1144.
- Capecci M. R., Klein H. A. 1970. *Nature*, 226, 1029.
- Caskey C. T., Scolnick E., Tomkins R., Goldstein J., Milman G. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 479.
- Ghae Y.-B., Mazumder R., Ochoa S. 1969. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 63, 828.
- Clark B. F. C., Marcker K. A. 1966. *J. Mol. Biol.*, 17, 394.
- Conway T. W., Lipmann F. 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 52, 1462.
- Dintzis H. 1961. *Science*, 47, 247.
- Dube S., Rudland P. S., Clark B. F. C., Marcker K. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 161.
- Erbe R. W., Leder P. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 798.
- Erbe R. W., Nau M. M., Leder P. 1969. *J. Mol. Biol.*, 39, 441.
- Ertel R., Brot N., Redfield B., Allende J. E., Weissbach H. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 59, 861.
- Fahnestock S., Neumann H., Sharbona V., Rich A. 1970. *Biochemistry*, 9, 2477.
- Fry K. T., Lamborg M. R. 1967. *J. Mol. Biol.*, 28, 423.
- Ganoza M. C., Nakamoto T., 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 55, 162.
- Ghosh H. P., Söll D., Khorana H. G. 1967. *J. Mol. Biol.*, 25, 275.
- Gierer A. 1963. *J. Mol. Biol.*, 6, 148.
- Gilbert W. 1963a. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 287.
- Gilbert W. 1963b. *J. Mol. Biol.*, 6, 389.
- Goldstein J. L., Beaudet A. L., Caskey C. T. 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 67, 99.
- Goldstein J. L., Caskey C. T. 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 67, 537.
- Gupta N. K., Chatterjee N. K., Bose K. K., Bhaduri S., Chung A. 1970. *J. Mol. Biol.*, 54, 145.
- Haenni A.-L., Lucas-Lenard J. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 61, 1363.
- Hardesty B., Culp W., McKeehan W. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 331.

- Hershey J. W., Thach R. E. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 57, 759.
- Herzberg M., Lelong J. C., Revel M. 1969. J. Mol. Biol., 44, 297.
- Hille M. B., Miller M. J., Iwasaki K., Wahba A. J. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 1652.
- Housman D., Jacobs-Lorena M., Raj Bhandary U. L., Lodish H. F. 1970. Nature, 227, 913.
- Ibuki F., Moldave K. 1968. J. Biol. Chem., 243, 791.
- Iwasaki K., Sabol S., Wahba A. J., Ochoa S. 1968. Arch. Biochem. Biophys., 125, 542.
- Kellogg D. A., Doctor B. P., Loebel J. E., Nirenberg M. W. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 55, 912.
- Khorana H. G., Buchi H., Ghosh H., Gupta N., Jacob T. M., Kossel H., Morgan R., Narang S. A., Ohtsuka E., Wells R. D. 1966. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 39.
- Kolakofsky D., Nakamoto T. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 56, 1786.
- Kolakofsky D., Ohta T., Thach R. E. 1968a. Nature, 220, 244.
- Kolakofsky D., Dewey K. F., Hershey J. W. B., Thach R. E. 1968b. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 61, 1066.
- Lamfrom H., McLaughlin C. S., Sarabhai A. 1966. J. Mol. Biol., 22, 355.
- Last J. A., Stanley W. M., Salas M., Hille M. B., Wahba A. J., Ochoa S. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 57, 1062.
- Leder P., Nau M. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 774.
- Lipmann F. 1963. Progress in Nucleic Acid Research, 1, 135. Acad. Press, New York.
- Lodish H. F. 1969. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 127.
- Lodish H. F. 1970. J. Mol. Biol., 50, 689.
- Lodish H. F., Robertson H. D. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 655.
- Lucas-Lenard J., Haenni A.-L. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 59, 554.
- Lucas-Lenard J., Haenni A.-L. 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 63, 93.
- Lucas-Lenard J., Tao P., Haenni A.-L. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 455.
- Marcker K. A. 1965. J. Mol. Biol., 14, 63.
- Marcker K. A., Sanger F. 1964. J. Mol. Biol., 8, 835.
- Mazumder R., Chae Y.-B., Ochoa S. 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 63, 98.
- McKeehan W., Hardesty B. 1969. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 625.
- Moldave K., Galasinski W., Rao P., Siler J. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 347.
- Monro R. E. 1967. J. Mol. Biol., 26, 147.
- Morgan A. R., Wells R. D., Khorana H. G. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 56, 1899.
- Mukundan M. A., Hershey J. W. B., Dewey K. F., Thach R. E. 1968. Nature, 217, 1013.
- Nakamoto T., Conway T. W., Allende J. E., Spyrides G. J., Lipmann F. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 227.
- Nakamoto T., Kolakofsky D. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 55, 606.
- Nathans D., Lipmann F. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 497.
- Nichols J. L. 1970. Nature, 225, 147.
- Nirenberg M., Leder P. 1964. Science, 145, 1399.
- Nirenberg M., Leder P., Bernfield M., Brimacombe R., Trupin J., Rottman F., O'Neal C. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 53, 1161.
- Nirenberg M. W., Matthaei J. H. 1961. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 47, 1588.
- Nishizuka Y., Lipmann F. 1966a. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 55, 212.
- Nishizuka Y., Lipmann F. 1966b. Arch. Biochem. Biophys., 116, 344.
- Noll H., Staehelin T., Wettstein F. O. 1963. Nature, 198, 632.

- Nomura M., Lowry C. V.* 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 546.
Nomura M., Lowry C. V., Guthrie C. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 1487.
Notani G. W., Engelhardt D. L., Konigsberg W., Zinder N. 1965. J. Mol. Biol., 12, 439.
Ohta T., Sarkar S., Thach R. E. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 1638.
Ohta T., Thach R. E. 1968. Nature, 219, 238.
Ohtaka Y., Spiegelman S. 1963. Science, 142, 493.
Pestka S. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 61, 726.
Raj Bhandary U. L., Ghosh H. P. 1969. J. Biol. Chem., 244, 1104.
Ravel J. M. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 57, 1811.
Ravel J. M., Mosteller R. D., Hardesty B. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 56, 701.
Ravel J. M., Shorey R. L., Garner C. W., Dawkins R. C., Shive W. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 321.
Revel M., Brawerman G., Lelong J., Gros F. 1968a. Nature, 219, 1016.
Revel M., Herzberg M., Becarevic A., Gros F. 1968b. J. Mol. Biol., 33, 231.
Revel M., Herzberg M., Greenspan H. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 261.
Revel M., Hiatt H. H. 1965. J. Mol. Biol., 11, 467.
Rich A., Warner J. R., Goodman H. M. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 269.
Rychlik I. 1965. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 30, 2259.
Rychlik I. 1966a. Biochim. Biophys. Acta, 114, 425.
Rychlik I. 1966b. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 31, 2583.
Rychlik I., Sorm F. 1962. Collection Czechoslov. Chem. Commun., 27, 2433.
Salas M., Smith M. A., Stanley W. M., Wahba A. J., Ochoa S. 1965. J. Biol. Chem., 240, 3988.
Sambrook J. F., Fan O. P., Brenner S. 1967. Nature, 214, 452.
Sarabhai A., Stretton A. O. W., Brenner S., Bolle A. 1964. Nature, 201, 13.
Sarkar S., Thach R. E. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 60, 1479.
Schlessinger D., Mangiarotti G., Apirion D. 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58, 1782.
Scolnick E. M., Caskey C. T. 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 64, 1235.
Scolnick E. M., Tomkins R., Caskey T., Nirenberg M. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 61, 768.
Skogerson L., Moldave K. 1968. Arch. Biochem. Biophys., 125, 497.
Skoultchi A., Ono Y., Moon H. M., Lengyel P. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 60, 675.
Skoultchi A., Ono Y., Waterson J., Lengyel P. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 437.
Smith A. E., Marcker K. A. 1970. Nature, 226, 607.
Smith M. A., Salas M., Stanley W. M., Wahba A. J., Ochoa S. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 55, 141.
Spirin A. S. 1968. Currents in Modern Biology, 2, 115.
Spirin A. S. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 197.
Steitz J. A. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 621.
Stretton A. O. W., Brenner S. 1965. J. Mol. Biol., 12, 456.
Subramanian A. R., Davis B. D., Beller R. J. 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 223.
Sundararajan T., Thach R. 1966. J. Mol. Biol., 19, 74.
Takanami M. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 61, 432.
Takanami M., Yan Y. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 54, 1450.
Takeishi K., Ukita T., Nishimura S. 1968. J. Biol. Chem., 243, 5751.
Terzaghi E., Okada Y., Streisinger G., Emrich J., Inouye M., Tsugita A. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 56, 500.

- Terzaghi E., Okada Y., Streisinger G., Tsugita A., Inouye M., Emrich J.* 1965. *Science*, **150**, 387.
- Thach R. E., Cecere M. A., Sundararajan T. A., Doty P.* 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 1167.
- Thach R. E., Dewey K. F., Brown J. C., Doty P.* 1966. *Science*, **153**, 416.
- Thach R. E., Hershey J. W. B., Kolakofsky D., Dewey K. F., Remold-O' Donnell E.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 277.
- Tomkins R. K., Scolnick E. M., Caskey C. T.* 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **65**, 702.
- Traut R. R., Monro R. E.* 1964. *J. Mol. Biol.*, **10**, 63.
- Vogel Z., Zamir A., Elson D.* 1969. *Biochemistry*, **8**, 5161.
- Wahba A. J., Chae J. B., Iwasaki K., Mazumder R., Miller M. J., Sabol S., Sillero M. A. G.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 285.
- Waller J. P.* 1963. *J. Mol. Biol.*, **7**, 483.
- Warner J., Madden M. J., Darnell J. E.* 1963. *Virology*, **19**, 393.
- Warner J. R., Rich A.* 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 1134.
- Watson J. D.* 1963. *Science*, **140**, 17.
- Watson J. D.* 1964. *Bull. soc. chim. biol.*, **46**, 1399.
- Watson J. D.* 1965. «Molecular Biology of the Gene», Benjamin. New York.
- Webster R. E., Engelhardt D. L., Zinder N. D.* 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 155.
- Weigert M., Garen A.* 1965a. *J. Mol. Biol.*, **12**, 448.
- Weigert M., Garen A.* 1965b. *Nature*, **206**, 992.
- Weissbach H., Brot N., Miller D., Rosman M., Ertel R.* 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 419.
- Wettstein F. O., Noll H.* 1965. *J. Mol. Biol.*, **11**, 35.
- Wilson D., Dintzis H.* 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **66**, 1282.
- Zamir A., Leder P., Elson D.* 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **56**, 1794.

IV

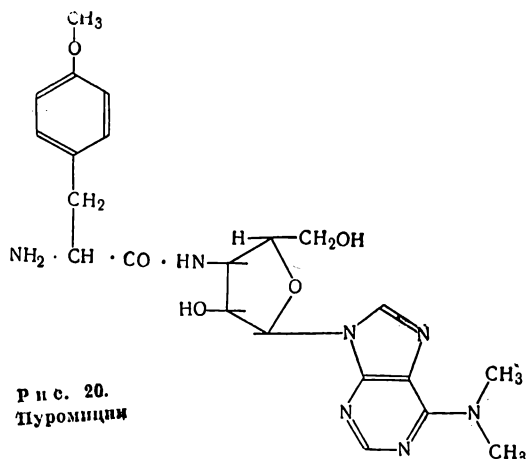
Дополнение. О механизме действия некоторых антибиотиков

Бактерицидное и бактериостатическое действие целого ряда известных антибиотиков — стрептомицина, хлорамфеникола, эритромицина, линкомицина, тетрациклинов, пуромицина и некоторых других — оказалось прямо обусловленным тем, что они действуют на бактериальные рибосомы и нарушают их нормальное функционирование. Некоторые антибиотики действуют на рибосомы эукариотических организмов.

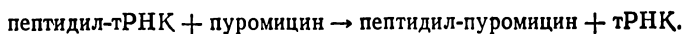
1. Пуромицин

Механизм действия этого антибиотика изучен наилучшим образом. По своей химической природе он представляет собой нуклеозидное производное — 6-диметиламино-9 (3'-пара-метокси-L-фенилаланил-амино-3'-дезоксиг-β-D-рибофуранозил)-пурин (рис. 20).

Уже рассмотрение химической формулы показывает, что пуромицин является структурным аналогом 3'-концевой аминокислотированной группировки тРНК (Yarmolinsky, Naba, 1959). Отсюда ингибирующее действие пуромицина на белковый синтез может быть объяснено конкурентным замещением очередной аминокислот-тРНК в процессе трансляции. Прямые экспериментальные данные показывают, что это так и есть и что результатом его добавления к транслирующей рибосоме является образование пептидной связи между ним и растущим пептидом с освобождением пептидил-пуромицина из рибосомы (Morris, Sweet, 1961; Allen, Zamecnik, 1962; Gilbert, 1963; Nathans, 1964; Traut, Monro, 1964; Smith et al., 1965). Пуромицин одинаково хорошо действует как на протокариотические (бактериальные) рибосомы, так и на эукариотические (в том числе животные) рибосомы.



Таким образом, пуромицин участвует в акте образования пептидной связи в рибосоме, подменяя при этом очередную аминоацил-тРНК: переброска С-конца растущего пептида от пептидил-тРНК происходит не на очередную аминоацил-тРНК, а на заменяющий ее пуромицин — на свободную аминогруппу его аминоацильного остатка:



При этом пуромицин вовсе не конкурирует с аминоацил-тРНК за связывание с акцепторным тРНК-связывающим участком на 30 S субчастице. Он взаимодействует лишь с аминоацил-связывающим центром пептидил-трансферазного участка 50 S субчастицы, не вступая, однако, и с ним в сколько-нибудь прочную ассоциацию. Имеющегося сродства и кратковременного, непрочного связывания пуромицина с пептидил-трансферазным участком оказывается достаточно, чтобы между ним и пептидил-тРНК произошла указанная реакция транспептидации. Образовавшийся пептидил-пуромицин не может удерживаться рибосомой и освобождается из нее в среду. Рибосома остается «пустой» — без растущего пептида. Это и означает обрыв трансляции.

Знание того, что пуромицин не ингибирует, в собственном смысле слова, ни одну из отдельно взятых стадий белкового синтеза, а сам участвует в акте образования пептидной связи в

рибосоме, позволяет применять его для изучения некоторых моментов функционирования рибосомы.

Так показано, что для реакции с пуромицином не требуется ни ГТФ, ни трансферных белковых факторов (Traut, Monro, 1964; Rychlik, 1966a; Bretscher, Marcker, 1966; Zamir et al, 1966; Monro, Marcker, 1967; Monro, 1967). Следовательно, акт образования пептидной связи в рибосоме происходит без участия ГТФ и без какого-либо из трансферных факторов, а *катализируется, очевидно, самой рибосомой*.

В то же время целостность всей рибосомы не обязательна для реакции с пуромицином: пептидная связь между пептидом и пуромицином образуется и в том случае, если в системе присутствуют изолированные 50 S субчастицы, удерживающие пептидил-тРНК (Traut, Monro, 1964). Следовательно, *пептидил-трансферазный каталитический центр рибосомы локализован на 50 S субчастице*.

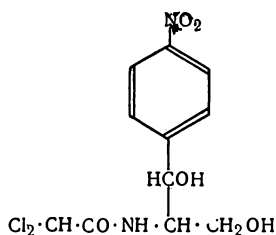
Замечено, что при действии пуромицина на работающие рибосомы в полной системе белкового синтеза освобождается до 100% пептидов. Однако если трансляция остановлена, например, путем удаления источников энергии и трансферных факторов, то пуромицин, при обработке рибосом, освобождает только часть (около половины) пептидов (Traut, Monro, 1964; Cannon, 1967). Это можно объяснить, исходя из рабочего цикла рибосомы (см. раздел III, 2, д). Если работа рибосомы прекращена в тот момент, когда пептидил-тРНК находится в транслоцированном состоянии на 50 S субчастице (см. рис. 19, I), то реакция с пуромицином — перенос на него С-конца пептида — разрешена. Если же рибосома остановлена в момент, когда С-конец пептидилового остатка еще только переброшен на аминоацил-тРНК в акцепторном тРНК-связывающем участке, а транслокация еще не произошла (см. рис. 19, II), то реакция с пуромицином, по-видимому, невозможна. Так или иначе, тот факт, что только часть неработающих рибосом освобождает пептид при действии пуромицина, сразу позволил сделать вывод о возможности двух различных состояний рибосомы в процессе ее функционирования (Traut, Monro, 1964).

Итак, пуромицин действует как конкурентный аналог аминоацил-тРНК, заменяя последнюю в реакции с пептидил-тРНК. Реакция пуромицина с пептидил-тРНК приводит к освобождению пептидила в виде пептидил-пуромицина из рибосомы, т.е. к прекращению синтеза белка. Пуромицин реагирует с пептидил-тРНК только в рибосоме. Для осуществления реакции образования пептидной связи между пуромицином и связанным пептидным остатком не требуется ни ГТФ, ни каких-либо тран-

сферных факторов: реакция катализируется самой рибосомой. Наличие одной лишь 50 S субчастицы, удерживающей пептидил-тРНК, достаточно для осуществления реакции с пурамицином. Однако при обработке пурамицином рибосом, в которых трансляция остановлена путем удаления трансферных факторов или источников энергии, только часть пептидил-тРНК реагирует с пурамицином, тогда как другая часть — нет; это может указывать на то, что в такой остановленной системе рибосомы находятся в двух различных состояниях.

2. Хлорамфеникол (хлоромецетин)

Показано, что этот антибиотик также блокирует белковый синтез на уровне рибосом (Nathans, Lipmann, 1961; Nathans et al., 1962; Rendi, Ochoa, 1962). Его структурная формула дана на рис. 21. В отличие от пурамицина, одинаково действующего как на бактериальные, так и животные системы, хлорамфеникол более специфичен и, как правило, оказывает сильное ингибирующее действие преимущественно на бактериальные



Р и с. 21.

Хлорамфеникол (хлоромецетин)

рибосомы. Были получены данные, что он может очень лабильно связываться с бактериальной рибосомой (Vazquez, 1963, 1964, 1966a; Wolfe, Hahn, 1965; Das et al., 1966). Участок этого лабильного связывания локализуется на 50 S субчастице. Показано, что хлорамфеникол не влияет ни на способность рибосомы связывать матричный полинуклеотид, ни на специфическое связывание аминоацил-тРНК и образование тройственного комплекса рибосома — матрица — аминоацил-тРНК, ни на образование начального комплекса (Speyer et al., 1963; Kučan, Lipmann, 1964; Nakamoto et al., 1963; Wolfe, Hahn, 1965; Das et al., 1966; Weber, DeMoss, 1966). Не ингибирует он и связывание пептидил-тРНК с пептидил-тРНК-связывающим участком на 50 S субчастице рибосомы (Rychlik, 1966a, b). Вместе с тем он полностью ингибирует реакцию пу-

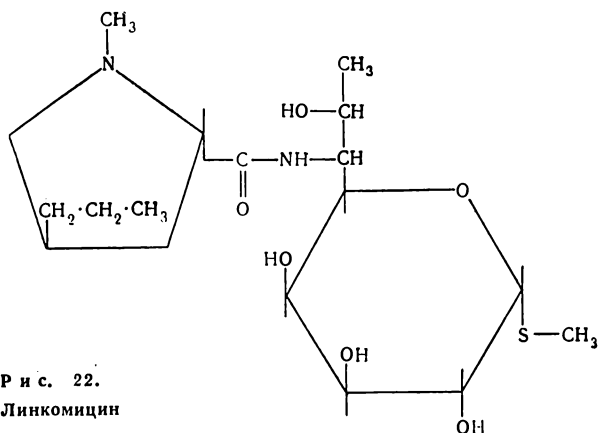
ромицина с пептидил-тРНК, связанной на рибосоме (Nathans et al., 1962; Nathans, 1964; Traut, Monro, 1964; Rychlik, 1966a). При действии на клетки и бесклеточные белок-синтезирующие системы хлорамфеникол останавливает рост пептида в рибосоме; пептид при этом не освобождается, а остается связанным (Julian, 1965; Das et al., 1966; Weber, DeMoss, 1966). Из всего сказанного уже можно было предполагать, что хлорамфеникол действует именно на образование пептидной связи в рибосоме. В последнее время более прямыми экспериментами доказано, что точкой приложения ингибитора является пептидил-трансферазный участок на 50 S субчастице (Monro, 1967; Monro, Vazquez, 1967).

Было высказано соображение, что хлорамфеникол можно рассматривать как аналог аминоацильного конца молекул аминоацил-тРНК при условии, что дихлорацетамидная группировка соответствует аминоацилу (Coutsogeorgopoulos, 1967a, b). Если это так, то хлорамфеникол должен взаимодействовать именно с аминоацил-связывающим центром пептидил-трансферазного участка. Действительно, ингибируя пуромициновую реакцию, хлорамфеникол выступает в роли *конкурентного* ингибитора пуромидина (Pestka, 1970). Недавно Пестка (Pestka, 1969a, b) прямо показал, что хлорамфеникол препятствует связыванию аминоацил-олигонуклеотидного фрагмента аминоацил-тРНК с 50 S субчастицей. Таким образом, можно по-видимому, считать, что местом приложения хлорамфеникола является аминоацил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка 50 S субчастицы: хлорамфеникол конкурирует с аминоацильным концом молекулы аминоацил тРНК за связывание с пептидил-трансферазным участком рибосомы и тем самым ингибирует синтез белка.

3. Линкомицин

Линкомицин — антибиотик рибосомного действия (рис. 22). Как и хлорамфеникол, он ингибирует белковый синтез на бактериальных рибосомах и не влияет на работу рибосом дрожжей, животных и растений (Josten, Allen, 1964; Chang et al., 1966; Vazquez, 1966a).

Местом действия линкомицина является 50 S рибосомная субчастица (Chang et al., 1966; Chang, Weisblum, 1966; Ennis, 1966; Vazquez, 1966c, 1967). Линкомицин обратимо связывается с 50 S субчастицей (Vazquez, 1967). Он конкурирует с хлорамфениколом за место связывания (Vazquez, 1966a; Vazquez,



Р и с. 22.
Линкомицин

Monro, 1967; Chang, 1968). Как и хлорамфеникол, этот антибиотик действует на пептидил-трансферазный участок рибосомы, блокируя пептидил-трансферазную реакцию и, в частности, реакцию пурамицина с пептидил-тРНК или формилметионил-тРНК (Monro, Vazquez, 1967; Igarashi et al., 1969). И линкомицин, и хлорамфеникол ингибируют связывание 3'-концевого фрагмента аминоксил-тРНК (аминоксил-олигонуклеотида) с рибосомой (Pestka, 1969b). Можно предполагать, что линкомицин связывается с аминоксил-связывающим центром пептидил-трансферазного участка рибосомы и тем самым мешает связыванию аминоксильного конца аминоксил-тРНК с этим участком

4. Спарсомицин

Антибиотик спарсомицин ингибирует белковый синтез как на 70 S, так и на 80 S рибосомах (Goldberg, Mitsugi, 1966). Его суммарная эмпирическая формула — $C_{31}H_{21}N_3O_6S_2$. Антибиотик не влияет на активность белковых трансферных факторов (McKeehan, Hardesty, 1969). Местом действия спарсомицина является большая (50 S или 60 S) рибосомная субчастица, а более конкретно — ее пептидил-трансферазный участок (Monro, Vazquez, 1967; Vazquez, Monro, 1967). Таким образом, спарсомицин, как и хлорамфеникол и линкомицин, блокирует пептидил-трансферазную функцию рибосомы (образование пептидной связи).

Спарсомицин, ингибируя реакцию пептидил-тРНК с пурамицином, ведет себя как конкурент по отношению к последне-

му (Goldberg, Mitsugi, 1967b; Pestka, 1970). Он является также ингибитором связывания аминоксил-олигонуклеотидного фрагмента аминоксил-тРНК с пептидил-трансферазным участком рибосомы (Pestka, 1969b). Следовательно, можно думать, что спарсомидин, как и хлорамфеникол и линкомицин, взаимодействует с аминоксил-связывающим центром пептидил-трансферазного участка большой субчастицы.

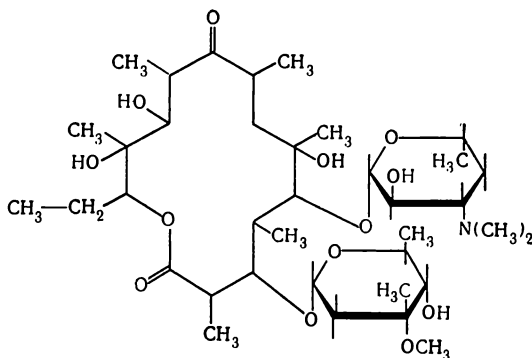
Однако были получены данные, что спарсомидин не препятствует связыванию хлорамфеникола на 50 S субчастице (Vazquez, Monro, 1967; Goldberg, Mitsugi, 1967a). Отсюда следует, что либо точки приложения спарсомидина и хлорамфеникола в пределах аминоксил-связывающего центра пептидил-трансферазного участка не совпадают, либо связывание спарсомидина значительно слабее, чем связывание хлорамфеникола.

Присутствие спарсомидина приводит к тому, что закрепление N-блокированного аминоксильного остатка молекулы N-ацил-аминоксил-тРНК или ее фрагмента (N-ацил-аминоксил-олигонуклеотида) в пептидил-связывающем центре пептидил-трансферазного участка становится более прочным (Hepper et al., 1969; Monro et al., 1969). По-видимому, большая молекула спарсомидина, связываемая аминоксил-связывающим центром, простирается вплотную к пептидил-связывающему центру и к самому донорному субстрату пептидил-трансферазной реакции, дополнительно закрепляя этот субстрат в своем центре. Такой стабилизированный комплекс 50 S субчастица — донорный субстрат — спарсомидин не способен к пептидил-трансферазной реакции с акцепторным субстратом, например, с пурамином (Monro et al., 1969). Интересно, что хлорамфеникол и линкомицин разрушают этот комплекс 50 S субчастица — донорный субстрат — спарсомидин (Monro et al., 1969), — возможно, за счет вытеснения или смещения молекулы спарсомидина.

5. Эритромицин

Эритромицин — антибиотик макролид (рис. 23). Его молекула представляет собой макроциклическое лактонное кольцо, связанное с двумя углеводными остатками.

Эритромицин блокирует белковый синтез, происходящий на 70 S рибосомах (Brock, Brock, 1959; Vazquez, 1963, 1966a, b; Wolfe, Hahn, 1964, 1965; Taubman et al., 1963, 1966; Tanaka, Teraoka, 1966; Rychlik, 1966a; Mao, Wiegand, 1968) и не активен с 80 S рибосомами (Vazquez, 1966c).



Р и с. 23.
Эритромицин

Местом действия эритромицина является 50 S рибосомная субчастица. Установлено, что эритромицин специфически присоединяется к 50 S (но не к 30 S) субчастице в отношении одна молекула антибиотика на одну рибосому (Taubman et al., 1966; Mao, 1967; Wilhelm, Corcoran, 1967; Oleinick, Corcoran, 1967; Mao, Putterman, 1969). Образование комплекса эритромицин—рибосома требует ионов NH_4^+ или K^+ . Ни Na^+ , ни Li^+ не могут заменить ионы K^+ или NH_4^+ , но они и не выступают как конкуренты в реакции образования комплекса рибосома—эритромицин в присутствии ионов NH_4^+ или K^+ (Mao, Putterman, 1969). Стабильный комплекс эритромицин—рибосома образуется лишь с ненарушенной 50 S субчастицей. Если с помощью CsCl отщепить часть рибосомального белка и получить производные 42 S частицы, то такие «раздетые» субчастицы не связывают эритромицин (Mao, Putterman, 1969).

В отличие от рассмотренных выше антибиотиков (хлорамфеникол, линкомицин, спарсомин), тоже действующих на 50 S субчастицу рибосомы, эритромицин, однако, вовсе не блокирует ее пептидил-трансферазную функцию (Cundliffe, McQuillen, 1967; Монго, Vazquez, 1967; Igarashi et al., 1969). Соответственно, он не мешает пурамицину взаимодействовать с аминоксил-связывающим центром пептидил-трансферазного участка и вступать в пептидную связь с донорным субстратом (например, с формилметионином; Монго, Vazquez, 1967). Точно так же эритромицин не ингибирует связывание 3'-концевого аминоксил-олигонуклеотидного фрагмента аминоксил-тРНК с пептидил-трансферазным участком рибосомы (в отличие от хлорамфеникола, линкомицина и спарсомина) (Pestka,

1969b). Следовательно, эритромицин связывается с 50 S субчастицей вовсе не по аминоксил-связывающему центру пептидил-трансферазного участка.

Вместе с тем можно показать, что место действия эритромицина находится в пределах пептидил-трансферазного участка. Так, эритромицин конкурирует и с хлорамфениколом (Vazquez, Monge, 1967), и с линкомицином (Chang, 1968) за связывание с 50 S субчастицей. Это может означать, что участки, занимаемые молекулами хлорамфеникола или линкомицина на 50 S субчастице, перекрываются с участком, занимаемым молекулой эритромицина.

Действие эритромицина на рибосому функционально проявляется в том, что эритромицин блокирует стадию транслокации рибосомного цикла (Cundliffe, McQuillen, 1967; Igarashi et al., 1969).

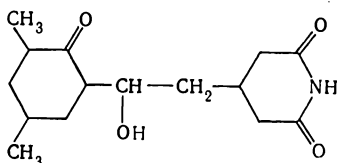
6. Циклогексими́д (актидион)

Циклогексими́д — антибиотик, являющийся производным циклогексилэтилглутаримида (рис. 24). Циклогексими́д активен против некоторых видов дрожжей, патогенных грибов и некоторых видов простейших; он очень токсичен для животных и растений и не действует на бактерии (Шемякин и др., 1961).

Было установлено, что циклогексими́д блокирует рибосомальный синтез белка на стадии транслокации (Lin et al.,

Р и с. 24.

Циклогексими́д (актидион)



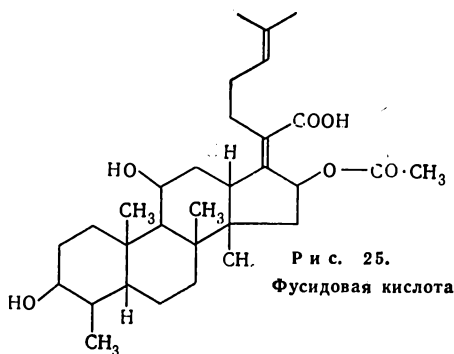
1966; McKeehan, Hardesty, 1969). При этом он не влияет на пептидил-трансферазную функцию рибосомы (McKeehan, Hardesty, 1969).

В противоположность фусидовой кислоте (см. ниже, раздел 7) циклогексими́д не влияет на рибосомозависимую ГТФ-азную активность трансферного фактора TF-II (McKeehan, Hardesty, 1969). По-видимому, его можно рассматривать как антибиотик собственно рибосомного действия. Местом действия циклогексими́да является сама 60 S рибосомная субчастица (Rao, Grollman, 1967). Можно предполагать, что

чувствительным к циклогексимиду является либо донорный тРНК-связывающий участок 60 S субчастицы, либо пептидил-связывающий центр пептидил-трансферазного участка; в таком случае антибиотик будет блокировать перемещение пептидил-тРНК в процессе транслокации (McKeehan, Hardesty, 1969).

7. Фусидовая кислота

Фусидовая кислота — антибиотик стероидной природы (рис. 25) — очень интересен тем, что ингибирует рибосомальный синтез белка путем блокирования стадии транслокации (Tanaka et al., 1968; Pestka, 1968; Наеппи, Lucas-Lenard, 1968). Изучение механизма действия антибиотика показало, что местом его приложения является, однако, не столько сама рибосома, сколько белковый G-фактор, необходимый для осуществления ГТФ-зависимой транслокации (Kinoshta et al., 1968; Tanaka et al., 1969). При наличии фусидовой кислоты в полной белок-синтезирующей системе G-фактор и ГТФ нормальным образом взаимодействуют с пре-транслоцированной

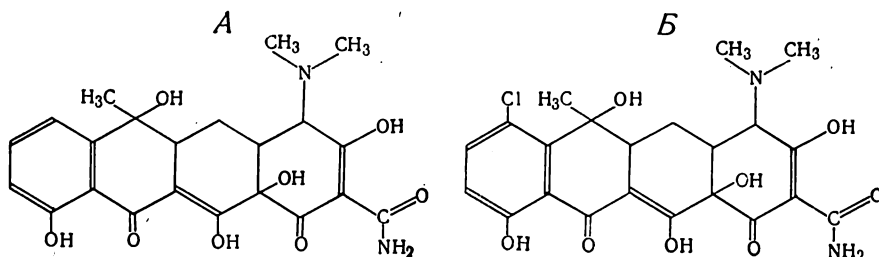


рибосомой, в результате чего от ГТФ отщепляется ортофосфат и образуется нормальный промежуточный комплекс рибосома — G-фактор — ГДФ; по-видимому, действие антибиотика состоит в том, что он блокирует последующую реакцию диссоциации комплекса и сопряженной транслокации (Bodley et al., 1969).

Фусидовая кислота, как оказалось, действует не только на бактериальный G-фактор, но и на его животный аналог — фактор TF-II, тем самым ингибируя ГТФ-зависимую транслокацию и в животных системах (Malkin, Lipmann, 1969).

8. Тетрациклины

Тетрациклиновые антибиотики — еще одна группа веществ, которые специфически подавляют синтез белка на рибосомном уровне (Rendi, Ochoa, 1962; Franklin, 1963). Структурные формулы наиболее часто используемых антибиотиков этой группы — тетрациклина и хлортетрациклина — даны на рис. 26. Имеется указание, что тетрациклины избирательно свя-



Р и с. 26.

Тетрациклин (А) и хлортетрациклин (Б)

зываются с 30 S субчастицей рибосомы (Connamacher, Mandel, 1965). Показано, что тетрациклины в концентрациях, подавляющих синтез белка (10^{-5} — 10^{-4} М), ингибируют именно специфическое связывание аминоацил-тРНК с рибосомой в присутствии матрицы (Suarez, Nathans, 1965; Hierowski, 1965; Vazquez, Monro, 1967). Точно так же под действием тетрациклина подавляется специфическое связывание аминоацил-тРНК с изолированной 30 S субчастицей в присутствии матричного полинуклеотида (Suzuka et al., 1966; Vazquez, Monro, 1967). При этом способность рибосомы к ассоциации с самим матричным полинуклеотидом сохраняется. Тетрациклины в концентрации 10^{-4} М не ингибируют присоединения пептидил-тРНК к рибосоме (Rychlik, 1966 b). Следовательно, можно думать, что тетрациклины избирательно действуют лишь на акцепторный тРНК-связывающий участок 30 S субчастицы — скорее всего непосредственно присоединяются к нему. Однако если аминоацил-тРНК уже связана с рибосомой или с 30 S субчастицей, то тетрациклин не вытесняет ее из комплекса (Hierowski, 1965; Suzuka et al., 1966).

Вместе с тем показано, что в присутствии больших концентраций тетрациклина (10^{-3} М), когда трансляция полностью подавлена, пуромидин освобождает лишь около поло-

вины пептидов из связи с тРНК и рибосомами (Traut, Monro, 1964). Возможно, что это является неспецифическим эффектом большой концентрации тетрациклина на пептидил-трансферный участок рибосомы (Monro, Vazquez, 1967).

Было найдено, что антибиотик *эдеин*, как и тетрациклин, ингибирует специфическое связывание аминоксил-тРНК с бактериальной рибосомой, но, в отличие от тетрациклинов, молекула эдеина присоединяется, по-видимому, одновременно к обоим субчастицам — 50 S и 30 S — и даже при низкой концентрации Mg^{++} вызывает ассоциацию 30 S и 50 S субчастиц в 70 S рибосому (Hierowski, Kurylo-Borowska, 1965; Kurylo-Borowska, Hierowski, 1965; Vazquez, Monro, 1967; Vazquez, 1967).

9. Стрептомицин и другие аминоглюкозидные антибиотики

Стрептомицин — вещество углеводной природы с сильно основными свойствами (рис. 27) — является одним из самых широко употребляемых антибактериальных антибиотиков. Показано, что антибиотик действует на белок-синтезирующий аппарат чувствительных к нему штаммов бактерий и что это действие обусловлено чувствительностью их рибосомного аппарата к антибиотику (Erdös, Ullmann, 1959, 1960; Hancock, 1961; Spotts, Stanier, 1961). Соответственно, он ингибирует бесклеточную белок-синтезирующую систему с участием рибосом из стрептомицин-чувствительных штаммов и не ингибирует, если рибосомы получены из стрептомицин-устойчивых клеток (Flaks et al., 1962a, b; Speyer et al., 1962; Mager et al., 1962). Помимо ингибирования антибиотик вызывает ошибки в трансляции матричного полинуклеотида — нарушается строгое соответствие между кодонами и включаемыми в полипептид аминокислотами, — и опять-таки это наблюдается лишь с рибосомами из стрептомицин-чувствительных бактерий и не наблюдается с рибосомами из стрептомицин-устойчивых штаммов (Davies et al., 1964). Местом приложения действия стрептомицина на рибосому является ее 30 S субчастица (Cox et al., 1964; Davies, 1964). Стрептомицин специфически взаимодействует с определенным структурным белком 30 S субчастиц рибосом, чувствительных к стрептомицину (Traut, Nomura, 1968; Ozaki et al., 1969); мутация, связанная с приобретением стрептомициновой устойчивости, заключается в изменении этого белка, приводящем к потере сродства к стрептомицину.

ляция связывания аминоксил-тРНК, не соответствующих кодонам матричного полинуклеотида. Например, рибосомы с полиУ, в норме связывающие фенилаланил-тРНК (УУУ кодирует фенилаланин — см. рис. 5) и лишь очень слабо — изолейцил-тРНК, в присутствии стрептомицина начинают значительно сильнее связывать изолейцил-тРНК (изолейцин кодируется, в частности, триплетом АУУ — см. рис. 5); стимулируется также связывание лейцил-тРНК (кодируется, в частности, триплетами УУА, УУГ, ЦУУ) и серил-тРНК (кодируется триплетами УЦУ, УЦЦ, УЦА и УЦГ) (Kaji, Kaji, 1965; Pestka et al., 1965). По-видимому, этот эффект в основном и ответствен за наблюдаемое в бесклеточных белок-синтезирующих системах ошибочное кодирование в присутствии стрептомицина; в частности, здесь также было найдено, что в системе с полиУ в синтезируемые полипептиды, кроме фенилаланина, включаются изолейцин, лейцин и серин (Davies et al., 1964, 1965). Эффект также очень специфичен и не наблюдается с рибосомами из стрептомицин-устойчивых штаммов. Эффект ошибочного связывания аминоксил-тРНК в присутствии стрептомицина проявляется *только на полных рибосомах*; на системах с изолированными 30 S субчастицами + матрица он отсутствует (Pestka, Nirenberg, 1966; Kaji, 1967). Ошибочное связывание аминоксил-тРНК, вызываемое стрептомицином в системах 70 S рибосомы + матрица, может быть значительно снижено или даже практически сведено на нет, если используемые в системе рибосомы были предварительно диссоциированы на субчастицы и вновь реассоциированы (Pestka, 1966; Kaji, 1967). (При этом известно, что связь между субчастицами в реассоциированных 70 S рибосомах слабее, чем в недиссоциированных 70 S рибосомах). Можно думать, следовательно, что эффект ошибочного связывания аминоксил-тРНК обусловлен не столько самой 30 S субчастицей, сколько взаимодействием между 30 S и 50 S субчастицами или наличием какого-то компонента, лабильно удерживаемого между субчастицами в рибосоме.

Хотя имеющиеся данные довольно сложны и запутаны, на основании их все же можно сделать предварительные заключения о действии стрептомицина на чувствительные к нему рибосомы. 1) Стрептомицин избирательно взаимодействует с 30 S субчастицей рибосомы. 2) Это взаимодействие происходит не по мРНК-связывающему центру и не по акцепторному тРНК-связывающему участку 30 S субчастицы. 3) Взаимодействие стрептомицина с 30 S субчастицей приводит к двум последствиям: а) к некоторому уменьшению сродства акцепторного тРНК-связывающего участка 30 S субчастицы к амино-

ацил-тРНК; следствием этого является частичный ингибирующий эффект на специфическое связывание аминоацил-тРНК; б) к изменениям на границе между субчастицами — возможно, к вовлечению каких-то групп 50 S субчастицы или компонента, пограничного между субчастицами, в процесс связывания аминоацил-тРНК (кодон-антикодового взаимодействия); следствием этого является эффект ошибочного связывания аминоацил-тРНК. Ослабление контакта между субчастицами или полная диссоциация снимают эффект ошибочного связывания, оставляя нетронутым ингибирующий эффект. 4) Оба действия стрептомицина являются непрямыми в том смысле, что сами функциональные группы стрептомицина непосредственно не участвуют ни в удержании «ошибочной» аминоацил-тРНК на рибосомной частице, ни в отталкивании «правильной» аминоацил-тРНК. Скорее всего, оба действия являются следствием искажающего влияния стрептомицина на конформацию и распределение зарядов в 30 S субчастице в целом. 5) Общим результатом действия стрептомицина на процесс трансляции является, таким образом, его вмешательство в процесс специфического поступления аминоацил-тРНК в рибосому; при этом происходит не столько ингибирование трансляции, сколько ошибочное считывание матрицы.

Все изложенные выше сведения, однако, получены из опытов *in vitro* с искусственными матрицами. Изучение влияния стрептомицина на синтез белка *in vitro* с естественными матрицами показало, что стрептомицин, как правило, полностью ингибирует трансляцию (Brock, 1966; Anderson et al., 1967; Luzzatto et al., 1969). В отличие от этого, в присутствии синтетической матрицы (например, полиУ) стрептомицин, как правило, блокирует синтез полипептида лишь частично (Flaks et al., 1962a; Speyer et al., 1962; Davies, 1964), а иногда и совсем не влияет на считывание, как в случае с полиА (Davies et al., 1966). Слабее, чем в случаях с экзогенной естественной мРНК, стрептомицин ингибирует белковый синтез *in vitro* на эндогенных мРНК (Brock, 1966; Modolell, Davis, 1968; Luzzatto et al., 1969). Полное ингибирование синтеза пептида с экзогенными естественными матрицами в белок-синтезирующей системе *in vitro* в присутствии стрептомицина может указывать на блокирование стадии инициации белкового синтеза. В пользу этого говорят также опыты, в которых стрептомицин сильно ингибировал связывание формилметионил-тРНК и идущей вслед за ней аланил-тРНК с рибосомой в присутствии РНК из бактериофага R-17 в качестве матрицы (Luzzatto et al., 1968). Однако есть и данные, что стрептомицин мгновенно блокирует наращивание уже начавшей синтезироваться цепи белка на

экзогенной мРНК, т. е. ингибирует и стадию элонгации (Modell, Davis, 1968).

In vivo, в клетке, стрептомицин вызывает уменьшение количества полирибосом и накопление 70 S монорибосом и рибосомных 30 S и 50 S субчастиц (Luzzatto et al., 1968). Накапливающиеся 70 S монорибосомы содержат мРНК. Предполагается, что стрептомицин вызывает образование каких-то «неправильных» (нефункциональных) иницирующих комплексов 70 S — мРНК, что и приводит к гибели клетки (Luzatto et al., 1968).

В настоящее время известны другие антибиотики аминокликозидной природы, в частности, *канамицин*, *неомицин* и *спектиномицин*. Как и стрептомицин, все они действуют на 30 S рибосомную субчастицу. Ответственными за чувствительность к этим антибиотикам и за их связывание на рибосоме являются, однако, *разные* рибосомальные белки 30 S рибосомальной частицы. Так, в составе 30 S субчастицы обнаружен белок, ответственный за чувствительность к спектиномицину (Traub et al., 1967; Bollen et al., 1969; Dekio, Takata, 1969); он отличен от белка, связывающего стрептомицин. Чувствительность к неомицину и канамицину связана с еще одним белком 30 S рибосомной субчастицы, имеющим сродство к обоим этим антибиотикам (Apirion, Schlessinger, 1968a, b). Канамицин и неомицин, как и стрептомицин, в опытах *in vitro* с синтетическими матрицами вызывают ошибочное включение большого набора аминокислот (Davies et al., 1964, 1965, 1966). Спектиномицин не вызывает заметного ошибочного считывания матрицы (Anderson et al., 1967). Изучение действия этих антибиотиков на белок-синтезирующий аппарат клетки *in vivo* показало, что, как и стрептомицин, все они вызывают уменьшение количества полирибосом в клетке и стимулируют накопление монорибосом (70 S рибосом) и рибосомных субчастиц (Gurgo et al., 1969).

Л и т е р а т у р а

- Шемякин М. М., Хохлов А. С., Колосов М. Н., Бергельсон Л. Д., Антонов В. К. 1961 Химия антибиотиков. М., Изд-во АН СССР, т. 1, стр. 142—147.
- Allen D. W., Zamecnik P. C. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 55, 865.
- Anderson R., Davies J., Davis B. D. 1967. J. Mol. Biol., 29, 203.
- Apirion D., Schlessinger D. 1968a. J. Bacteriol., 96, 768.
- Apirion D., Schlessinger D. 1968b. J. Bacteriol., 96, 1431.
- Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. 1969. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 437.
- Bollen A., Davies J., Ozaki M., Mizushima S. 1969. Science, 165, 85.

- Bretscher M. S., Marcker K. A. 1966. *Nature*, **211**, 380.
- Brock T. D. 1966. In 16th Symp. Soc. Gen. Microbiol. XVI. Cambridge University Press, Cambridge (Цит по Luzzatto et al., 1969. *J. Bacteriol.*, **99**, 206).
- Brock T. D., Brock M. L. 1959. *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 274.
- Cannon M. 1967. *Biochem. J.*, **104**, 934.
- Chang F. N. 1968. Ph. D. Thesis Univ. of Wisconsin, Madison (Цит. по Weisblum B., Davies J. 1968. *Bacteriol. Reviews*, **32**, 493).
- Chang F., Sih C., Weisblum B. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 431.
- Chang F. N., Weisblum B. 1966. *Biochemistry*, **6**, 836.
- Connamacher R. H., Mandel H. G. 1965. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 98.
- Coutsogeorgopoulos C. 1967a. *Biochemistry*, **6**, 1704.
- Coutsogeorgopoulos C. 1967b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 46.
- Cox E. C., White J. R., Flaks J. G. 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 703.
- Cundliffe E., McQuillen K. 1967. *J. Mol. Biol.*, **30**, 137.
- Das H., Goldstein A., Kanner L. 1966. *J. Mol. Pharmacol.*, **2**, 158.
- Davies J. E. 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 659.
- Davies J., Gilbert W., Gorini L. 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 883.
- Davies J., Gorini L., Davis B. D. 1965. *J. Mol. Pharmacol.*, **1**, 93.
- Davies J., Jones D. S., Khorana H. G. 1966. *J. Mol. Biol.*, **18**, 48.
- Dekio S., Takata R. 1969. *Molec. Gen. Genetics*, **105**, 219.
- Ennis H. L. 1966. *Mol. Pharmacol.*, **2**, 444.
- Erdős T., Ullmann A. 1959. *Nature*, **183**, 618.
- Erdős T., Ullmann A. 1960. *Nature*, **185**, 100.
- Flaks J. G., Cox E. C., White J. R. 1962a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 385.
- Flaks J. G., Cox E. C., Witting M. L., White J. R. 1962b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 390.
- Franklin T. J. 1963. *Biochem. J.*, **87**, 449.
- Gilbert W. 1963. *J. Mol. Biol.*, **6**, 389.
- Goldberg I. H., Mitsugi K. 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 1453.
- Goldberg I. H., Mitsugi K. 1967a. *Biochemistry*, **6**, 372.
- Goldberg I. H., Mitsugi K. 1967b. *Biochemistry*, **6**, 382.
- Gurgo C., Apirion D., Schlessinger D. 1969. *J. Mol. Biol.*, **45**, 205.
- Haenni A.-L., Lucas-Lenard J. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **61**, 1363.
- Hancock R. 1961. *Biochem. J.*, **78**, 7P.
- Herner A. E., Goldberg I. H., Cohen L. B. 1969. *Biochemistry*, **8**, 1335.
- Hierowski M. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 594.
- Hierowski M., Kurylo-Borowska Z. 1965. *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 578.
- Igarashi K., Ishitsuka H., Kaji A. 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 499.
- Josten J. J., Allen P. M. 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 241.
- Julian G. R. 1965. *J. Mol. Biol.*, **12**, 9.
- Kaji H. 1967. *Biochim. Biophys. Acta*, **134**, 134.
- Kaji H., Kaji A. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 213.
- Kaji H., Suzuka I., Kaji A. 1966. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1251.
- Kinoshita T., Kawano G., Tanaka N. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 769.
- Kučan Z., Lipmann F. 1964. *J. Biol. Chem.*, **239**, 516.
- Kurylo-Borowska Z., Hierowski M. 1965. *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 590.
- Lin S. Y., Mosteller R., Hardesty B. 1966. *J. Mol. Biol.*, **21**, 51.
- Luzzatto L., Apirion D., Schlessinger D. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **60**, 873.
- Luzzatto L., Apirion D., Schlessinger D. 1969. *J. Bacteriol.*, **99**, 206.

- Mager I., Benedict M., Artman M. 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 202.
- Malkin M., Lipmann F. 1969. *Science*, **164**, 71.
- Mao J. C. H. 1967. *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 2441.
- Mao J. C. H., Putterman M. 1969. *J. Mol. Biol.*, **44**, 347.
- Mao J. C. H., Wiegand R. G. 1968. *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 404.
- McKeehan W., Hardesty B. 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 625.
- Modolell S., Davis B. D., 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **61**, 1279.
- Monro R. E. 1967. *J. Mol. Biol.*, **26**, 147.
- Monro R. E., Celma M. L., Vazquez D. 1969. *Nature*, **222**, 356.
- Monro R. E., Marcker K. A. 1967. *J. Mol. Biol.*, **25**, 347.
- Monro R. E., Vazquez D. 1967. *J. Mol. Biol.*, **28**, 161.
- Morris A., Schweet R. 1961. *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 415.
- Nakamoto T., Conway T. W., Allende J. E., Spyrides G. J., Lipmann F. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 227.
- Nathans D. 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **51**, 585.
- Nathans D., Lipmann F. 1961. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 497.
- Nathans D., von Ehrenstein G., Monro R., Lipmann F. 1962. *Fed. Proc.*, **21**, 127.
- Oleinick N. L., Corcoran J. W. 1967. *Fed. Proc.* **27**, 285.
- Ozaki M., Mitzushima S., Nomura M. 1969. *Nature*, **222**, 333.
- Pestka S. 1966. *J. Biol., Chem.*, **241**, 367.
- Pestka S. 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **61**, 726.
- Pestka S. 1969a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 589.
- Pestka S. 1969b. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **64**, 709.
- Pestka S. 1970. *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 80.
- Pestka S., Marshall R., Nirenberg M. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 639.
- Pestka S., Nirenberg M. W. 1966. *J. Mol. Biol.*, **21**, 145.
- Rao S. S., Grollman A. P. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 696.
- Rendi R., Ochoa S. 1962. *J. Biol., Chem.*, **237**, 3711.
- Rychlik I. 1966a. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 425.
- Rychlik I. 1966b. Collection Czechoslov. Chem. Commun., **31**, 2583.
- Smith J. D., Traut R. R., Blackburn G. M., Monro R. E. 1965. *J. Mol. Biol.*, **13**, 617.
- Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C. 1962. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **48**, 684.
- Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C., Wahba A. J., Gardner R. S., Ochoa S. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 559.
- Spotts C. R., Stanier R. Y. 1961. *Nature*, **192**, 633.
- Suarez G., Nathans D. 1965. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 743.
- Suzuka I., Kaji H., Kaji A. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 1483.
- Tanaka K., Teraoka H. 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 204.
- Tanaka N., Kinoshita T., Masukawa H. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 278.
- Tanaka N., Kinoshita T., Masukawa H. 1969. *J. Biochem. (Japan)*, **65**, 459.
- Taubman S., Jones N., Young F., Corcoran J. 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 438.
- Taubman S., Young F. E., Corcoran J. W. 1963. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **50**, 955.
- Traub P., Hosokawa K., Craven G. R., Nomura M. 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**, 2430.
- Traub P., Nomura M., 1968. *Science*, **160**, 198.
- Traut R. R., Monro R. E. 1964. *J. Mol. Biol.*, **10**, 63.
- Vazquez D. 1963. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 409.
- Vazquez D. 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 464.
- Vazquez D. 1966a. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 277.

- Vazquez D. 1966b. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 289.
Vazquez D. 1966c. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **16**, 169.
Vazquez D. 1967. *Life Science*, **6**, 381.
Vazquez D., Monro R. E. 1967. *Biochim. Biophys. Acta*, **142**, 155.
Weber M., DeMoss J. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 1224.
Wilhelm J. M., Corcoran J. W. 1967. *Biochemistry*, **6**, 2578.
Wolfe A. D., Hahn F. E. 1964. *Science*, **143**, 1445.
Wolfe A. D., Hahn F. E. 1965. *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 146.
Yarmolinsky M. B., Haba G. L. 1959. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **45**, 1721.
Zamir A., Leder P., Elson D. 1966. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **56**, 1794.

Содержание

Предисловие к первому изданию	5
Предисловие ко второму изданию	7

Популярное введение

1. Общая схема биосинтеза белков	9
2. Кодирование информации (генетический код)	13
3. Хранение и воспроизведение закодированной информации	19
4. Передача информации (транскрипция)	23
5. Вовлечение аминокислот в биосинтез белков	24
6. Синтез белка в рибосоме (трансляция)	27
Литература	30

Часть первая

Структура рибосомы

1. Физические свойства и химический состав рибосомы	35
1. Форма и размеры	35
а. 70 S рибосомы Protokaryotes (бактерий и синезеленых водорослей)	36
б. 80 S рибосомы Eukaryotes	38
в. 70 S рибосомы хлоропластов и митохондрий	39
2. Компактность	40
3. Химический состав: содержание РНК и белка	41
а. 70 S рибосомы	41
б. 80 S рибосомы	42
4. Связанные низкомолекулярные катионы	43
5. Резюме	48
Литература	49

II. Подразделение рибосомы на две неравные субчастицы	51
1. Большая субчастица	51
2. Малая субчастица	53
3. Ассоциация субчастиц	55
Литература	62
III. Рибосомальная РНК	64
1. Молекулярно-весовые характеристики	64
2. Непрерывность полинуклеотидных цепей	69
3. Нуклеотидный состав	73
а. Соотношения четырех главных нуклеотидов	73
б. «Минорные» нуклеотиды	76
4. Нуклеотидная последовательность	77
5. Вторичная структура в растворе	81
6. Вторичная структура в составе рибосомы	88
7. Резюме	91
Литература	92
IV. Рибосомальные белки	96
1. Определение	96
2. Количество белковых молекул на рибосому и их молекулярно-весовые характеристики	99
а. Бактериальные 70 S рибосомы	99
б. Животные 80 S рибосомы	100
3. Аминокислотный состав и последовательность	101
4. Конформация	107
5. Резюме	107
Литература	108
V. Структурные превращения рибосомных частиц	110
1. Разворачивание и принцип рибонуклеопротеидного тая	110
а. Компактность исходной укладки	111
б. Характеристика процесса разворачивания	112
в. Каркасная роль рибосомальной РНК (принцип рибонуклеопротеидного тая)	117
2. Ступенчатая разборка и самосборка	120
а. Ступенчатая диссоциация рибосомального белка	120
б. Свойства промежуточных рибонуклеопротеидных частиц	124
в. Самосборка	124

3. Некоторые общие выводы о четвертичной структуре рибосомных субчастиц	132
Литература	133
VI. Заключение: общие принципы строения рибосомы	136
Литература	138

Часть вторая

Функционирование рибосомы

I. Компоненты белок-синтезирующей системы	141
1. Рибосома	141
2. Матричный полинуклеотид	142
3. Аминоацил-тРНК	143
4. ГТФ	146
5. Белковые трансферные факторы	147
6. Белковые факторы инициации	150
7. Факторы терминации	151
8. Неорганические катионы	152
Литература	153
II. Функциональные центры рибосомы	156
1. Ассоциация рибосомы с матричным полинуклеотидом (мРНК-связывающий участок)	158
а. Условия комплексообразования и стабильность комплекса	158
б. Участок полинуклеотида, взаимодействующий с рибосомой	160
в. Участок рибосомы, взаимодействующий с матричным полинуклеотидом	161
г. Резюме	163
2. Связывание аминоксил-тРНК с рибосомой в присутствии матричного полинуклеотида (участок связывания акцепторной тРНК)	164
а. Условия образования тройственного комплекса и его стабильность	164
б. Участок матричного полинуклеотида, ассоциирующий с рибосомой и тРНК	167
в. Участки аминоксил-тРНК, взаимодействующие с матричным полинуклеотидом и рибосомой	168
г. Участок рибосомы, взаимодействующий с кодон-антикодоновой парой и тРНК	171
д. Резюме	173

3. Удержание тРНК на рибосоме в отсутствие матрицы (участок связывания донорной тРНК)	174
а. Условия связывания и стабильность комплекса	174
б. Возможные участки тРНК, взаимодействующие с рибосомой	175
в. Участок рибосомы, взаимодействующий с тРНК	176
г. Специфическая стимуляция присоединения пептидил-тРНК к рибосоме в присутствии матрицы	177
д. Резюме	178
4. Катализ образования пептидной связи (пептидил-трансферазный участок)	179
а. Условия реакции	179
б. Участок рибосомы, ответственный за транспептидацию	182
5. Общая схема локализации функциональных центров рибосомы	185
Литература	187
III. Этапы трансляции	190
1. Инициация трансляции	191
а. Инициаторная аминоксил-тРНК	192
б. Иницирующие кодоны	193
в. Белковые факторы инициации	195
г. Образование начального комплекса	197
д. Поступление аминоксил-тРНК и образование первой пептидной связи	200
е. Инициация в системах с синтетическими матрицами без иницирующих кодонов	202
2. Собственно трансляция («полимеризация аминокислотных остатков»)	204
а. Пептидил-тРНК и ее удержание в транслирующей рибосоме	206
б. Поступление в рибосому аминоксил-тРНК	207
в. Образование пептидной связи (транспептидация)	211
г. Транслокация	212
д. Общая схема рабочего цикла трансляции	215
3. Терминация трансляции	219
а. Терминирующий кодон	220
б. Механизм терминации	222
в. Деформирование и деметионирование N-конца полипептида	225
Литература	226

IV. Дополнение. О механизме действия некоторых антибиотиков	231
1. Пуромидин	231
2. Хлорамфеникол (хлоромидин)	234
3. Линкомицин	235
4. Спарсомидин	236
5. Эритромицин	237
6. Циклогексимид (актидон)	239
7. Фузидовая кислота	240
8. Тетрациклины	241
9. Стрептомицин и другие аминоглюкозидные антибиотики	242
Литература	246

**Александр Сергеевич Спири́н,
Лидия Павловна Гаврилова**

РИБОСОМА

Издание второе,
переработанное и дополненное

Утверждено к печати
Ордена Ленина
Институтом биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Редактор Л. Н. Кузьмина
Художник Т. П. Поленова
Технический редактор Р. М. Денисова

Сдано в набор 22/VI 1971 г.
Подписано к печати 18/XI 1971 г.
Формат 60×90^{1/8}. Бумага № 1.
Усл. печ. л. 16,125. Уч.-изд. л. 15,0.
Тираж 5700. Т-19505. Тип. зак. 2523.
Цена 1 р. 19 к.

Издательство «Наука».
Москва К-62, Подсосенский пер., 21

2-я типография издательства «Наука»
Москва Г-99, Шубинский пер., 10.

О П Е Ч А Т К И

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
28	8 стр.	A — У	A — — У
38	6 св.	$S_{20}^0 W$	S_{20}^0, W
65	15 св.	0,4 ед. Сведберга для малого компонента ¹ , в 0,01 М MgCl ₂	0,4) ед. Сведберга для малого компонента ¹ ; в 0,01 М MgCl ₂
228	20 стр.	<i>MsKeehan W., Hardesty B.</i>	<i>McKeehan W., Hardesty B.</i>
232	Подпись к рис. 20	—	Рис. 20. Путомицин

А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова. Рибосома

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Рибосома

Рибосома

А.С. Спирин, Л.П. Гаврилова

А.С. Спирин, Л.П. Гаврилова

Рибосома занимает центральное место в биосинтезе белков. Именно в рибосомы стекается вся генетическая информация, идущая от генов (ДНК). С другой стороны, рибосомы являются конечным пунктом, куда доставляются активированные формы аминокислот (аминоацил-тРНК), служащие строительным материалом для белков. Сама рибосома представляет собой молекулярную машину, построенную из нескольких десятков макромолекул (рибосомальной РНК и белков), потребляющую энергию (ГТФ) для своей работы и на выходе производящую генетически детерминированные белки.

Рассмотрению структуры и функций этого центрального белоксинтезирующего аппарата, универсального во всей живой природе, и посвящена предлагаемая книга.

Издательство „Наука“ Москва