



УДК 577.152.314'.14

СПЕЦИФИЧНОСТЬ РНКазы *BACILLUS INTERMEDIUS* 7P В РЕАКЦИЯХ РАСЩЕПЛЕНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Яковлев Г. И., Ченурнова Н. К., Моисеев Г. П.,
Боцаров А. Л., Лопатиев С. В.*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Проведено изучение механизма действия бактериальной РНКазы *B. intermedius* 7P в реакциях расщепления полинуклеотидов. С этой целью измерены кинетические параметры реакций гидролиза этим ферментом poly(I), poly(A), poly(U) и poly(C) на стадии трансэтерификации. Показано, что пуриновые и пиримидиновые полинуклеотиды расщепляются в одном и том же активном центре РНКазы. Исследовано влияние природы нуклеозида на О5'-конце расщепляемой фосфодиэфирной связи на скорость ее расщепления данным ферментом. Проведено сопоставление скоростей расщепления гомополимеров нуклеотидов с учетом этого влияния. Показано, что при гидролизе полинуклеотидов РНКазы *B. intermedius* 7P проявляет пуриновую специфичность, в то время как при гидролизе низкомолекулярных субстратов, в соответствии с ранее выполненными исследованиями авторов, она проявляет гуаниловую специфичность. Рассмотрен механизм действия фермента, позволяющий объяснить уменьшение специфичности РНКазы при гидролизе высокомолекулярных субстратов.

Внеклеточная циклизирующая РНКаза (КФ 3.1.4.23), продуцируемая споровыми бактериями вида *Bacillus intermedius*, является гуанозинспецифичным ферментом по отношению к низкомолекулярным субстратам [1]. Так, в ряду нуклеозид-2',3'-циклофосфатов ферментативному гидролизу подвергаются только те нуклеотиды, основания которых представлены гуанином или его производными [1, 2]. Было показано, что РНКаза *B. intermedius* 7P способна катализировать гидролиз динуклеозидмонофосфатов, также проявляя заметную специфичность к гуанозину на О3'-конце фосфодиэфирной связи [1]. Вместе с тем в работе [3] отмечалось, что фермент наряду с poly(I) способен гидролизовать poly(A), poly(U) и poly(C).

В данной работе с целью изучения механизма действия и получения количественных представлений о специфичности РНКазы *B. intermedius* 7P в реакциях расщепления природных РНК проведены измерения кинетических параметров гидролиза этим ферментом различных гомополирибонуклеотидов и исследовано влияние природы нуклеозида на О5'-конце фосфодиэфирной связи на скорость ее расщепления (вторичная специфичность РНКазы).

Для определения вторичной специфичности РНКазы *B. intermedius* 7P были измерены кинетические параметры реакции расщепления ряда динуклеозидфосфатов на стадии трансэтерификации (табл. 1). Из табл. 1 видно, что скорость расщепления динуклеозидфосфатов типа GrN (где N=A, G, C, U) уменьшается в ряду A>G>C, U. Изменение скорости в

Таблица 1

Кинетические параметры реакций гидролиза гуанозинсодержащих динуклеозидфосфатов РНКазой *B. intermedius* 7P при pH 6,2, I = 0,215 и 25° С

Субстрат	$k_{кат}, с^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, M^{-1}$	$k_{кат}/K_m \cdot 10^{-4}, с^{-1}M^{-1}$
GrA	14,0	2,3	6,1
GrG	3,0	1,1	2,7
GrC	1,2	2,0	0,6
GrU	0,6	0,83	0,7

этом ряду составляет около одного порядка и обусловлено главным образом вариацией каталитической константы скорости $k_{\text{кат}}$. В соответствии с предложенным ранее механизмом, лежащим в основе вторичной специфичности РНКазы, скорость расщепления динуклеозидфосфатов определяется сродством основания нуклеозида на О5'-конце расщепляемой фосфодиэфирной связи к определенному участку активного центра фермента, при связывании в котором О5'-нуклеозида фосфодиэфирный фрагмент оказывается в высокореакционной конформации [4]. В соответствии с этим механизмом следует ожидать, что вторичная специфичность каждой РНКазы, определенная на основе динуклеозидфосфатов, сохраняется при переходе к полинуклеотидам. Это подтверждается результатами изучения вторичной специфичности пиридинспецифичной РНКазы А и гуанилспецифичной РНКазы Т₁.

Для РНКазы А было обнаружено, что каталитическая константа скорости расщепления межинуклеотидной связи в рядах СрN и УрN (где N = А, G, C, U) изменяется более чем в 100 раз, тогда как величина константы Михаэлиса остается практически постоянной [5, 6]. При гидролизе РНК под действием РНКазы А, как и в случае динуклеозидфосфатов, расщепление связей пиридин — пурин происходит быстрее, чем связей пиридин — пиридин [7].

В случае гуанилспецифичной РНКазы Т₁ скорость расщепления межинуклеотидной связи в ряду GrC, GrG, GrA, GrU изменяется в 8 раз при рН 7,5 и примерно в 5 раз при рН 5,0 [8]. Как и в случае РНКазы А, это изменение связано главным образом с уменьшением в ряду каталитической константы скорости. Характер влияния природы 5'-нуклеозида на скорость гидролиза динуклеозидфосфатов РНКазой Т₁ сохраняется при расщеплении связи после инозина и аденозина [9]. При ограниченном гидролизе природной РНК, в соответствии с вторичной специфичностью фермента, наблюдается расщепление только определенных межинуклеотидных связей после гуанозина [10].

Все это позволяет считать, что наблюдаемые для РНКазы *B. intermedius* 7Р степень и характер влияния природы О5'-концевого нуклеозида на скорость расщепления динуклеозидфосфатов существенно не изменяются при гидролизе межинуклеотидной связи в составе полирибонуклеотидов.

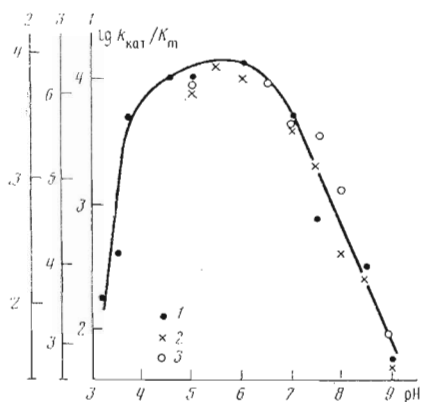
Известно, что пиридинспецифичная РНКазы А каталитически расщепляет poly(A) и poly(G), хотя и со значительно меньшей скоростью, чем poly(C) и poly(U) [11—13]. Гуанозинспецифичная РНКазы Т₁ также, кроме poly(G) и poly(I), способна, хотя и с заметно меньшей эффективностью, гидролизовать poly(A), poly(C) и poly(U) [14]. Воспроизводя эти результаты, мы нашли, что скорость расщепления РНКазой А poly(A) на пять порядков ниже, чем poly(U) (рН 7,5; 0,1 М NaCl, 25° С). На такую же примерно величину различается скорость расщепления РНКазой Т₁ poly(A) и poly(I) (рН 6,2; 0,2 М NaCl, 25° С). Таким образом, специфичность этих ферментов к определенному типу нуклеозида на О3'-конце фосфодиэфирной связи не является абсолютной. РНКазы *B. intermedius* 7Р тоже наряду с poly(I) катализирует гидролиз poly(A), poly(U) и poly(C) (табл. 2). Из табл. 2 видно, что пуриновые полинуклеотиды расщепляются в 10³—10⁴ раз быстрее, чем пиридиноновые. Если реакция расщепления пуриновых и пиридиноновых полинуклеотидов осуществляется под действием одних и тех же каталити-

Таблица 2

Кинетические параметры реакций гидролиза гомополинуклеотидов РНКазой *B. intermedius* 7Р при рН 6,2 и 25° С

Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^4, \text{М}^{-1}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{с}^{-1}\text{М}^{-1}$
poly(I)	55	0,22	$3,5 \cdot 10^6$
poly(A)	180	1,1	$1,6 \cdot 10^6$
poly(U)	2,2	2,5	$8,8 \cdot 10^3$
poly(C)	0,025	1,7	$1,5 \cdot 10^2$

ческих групп фермента, т. е. протекает в одном и том же активном центре, то следует ожидать сохранения установленного выше характера влияния природы О5'-концевого нуклеозида на скорость расщепления. Тем не менее более высокая скорость расщепления poly(A) и poly(U) по сравнению с poly(U) и poly(C) не может быть объяснена только различием



Зависимость $k_{кат}/K_m$ от pH для реакции гидролиза GpC (1) [1], poly(U) (2) и poly(A) (3) РНКазой *B. intermedius* 7P

B. intermedius 7P, мы изучили зависимость отношения кинетических параметров $k_{кат}$ и K_m от pH для реакций расщепления poly(A) и poly(U) (рисунок). Известно, что зависимость $k_{кат}/K_m$ от pH определяется ионизацией групп фермента или свободного субстрата, которые принимают участие в образовании фермент-субстратного комплекса и/или в каталитическом акте [15, 16]. Из рисунка видно, что зависимости $lg(k_{кат}/K_m)$ от pH в области pH 5,5–9 для реакций гидролиза GpC, poly(A) и poly(U) практически одинаковы. Ранее было показано, что для GpC зависимость $lg(k_{кат}/K_m)$ от pH в этой области значений определяется единственной группой, величина pK которой равна 6,5 [4]. Эта группа была отнесена к имидазольному кольцу единственного в составе РНКазы *B. intermedius* 7P остатка гистидина [17], принадлежащего активному центру фермента [1, 18]. Совпадение щелочных ветвей зависимостей $lg(k_{кат}/K_m)$ от pH для GpC, poly(A) и poly(U) позволяет считать, что в реакции расщепления фосфодиэфирных связей этих субстратов принимает участие один и тот же (из-за его единственности в составе фермента) остаток гистидина. На основании этого можно заключить, что реакция расщепления всех указанных субстратов протекает в одном и том же активном центре РНКазы. Установив этот факт, можно суммировать выводы о специфичности расщепления межнуклеотидных связей в полирибонуклеотидах РНКазой *B. intermedius* 7P следующим заключением: скорость расщепления межнуклеотидных связей должна убывать в порядке пури-пури > пури-пиримидин >> пиримидин-пури > пиримидин-пиримидин.

Значительное различие в скоростях гидролиза poly(I) и poly(A) по сравнению с poly(U) и poly(C), которое только в небольшой степени связано с природой нуклеозида на О5'-конце расщепляемой фосфодиэфирной связи, приводит к заключению, что оно обусловлено различием в связывании пуринов и пиримидинов в активном центре фермента, фиксирующем О3'-нуклеозид. Возникает вопрос: почему РНКазы *B. intermedius* 7P, проявляющая гуаниловую специфичность при гидролизе низкомолекулярных субстратов, оказывается пуриносpezifичной при гидролизе полинуклеотидов?

Для протекания реакции расщепления межнуклеотидной связи с образованием соответствующего 2',3'-циклофосфата необходимо, чтобы 2'-ОН-группа рибозы нуклеозида на 3'-конце расщепляемой связи была соответствующим образом ориентирована относительно фосфатной группы и

типа нуклеозида на О5'-конце расщепляемой связи, так как, согласно вышеприведенным данным, разница в скоростях гидролиза из-за вторичной специфичности РНКазы *B. intermedius* не превышает 10 раз. Следовательно, если гидролиз пуриновых и пиримидиновых полинуклеотидов происходит в одном и том же активном центре фермента, то можно заключить, что при гидролизе полинуклеотидов РНКазы *B. intermedius* 7P проявляет специфичность к пуриновым нуклеозидам на О3'-конце гидролизуемой связи.

Для выяснения вопроса о том, гидролизуются ли пуриновые и пиримидиновые полинуклеотиды в одном и том же активном центре РНКазы

каталитических групп фермента. В случае динуклеозидмонофосфатов, содержащих гуанозин на ОЗ'-конце фосфодиэфирной связи, продуктивный фермент-субстратный комплекс образуется за счет специфической фиксации белком гуанилового основания и фосфатной группы. При гидролизе полинуклеотидов вместе со специфичной фиксацией фосфата расщепляемой связи может происходить связывание ближайших к ОЗ'-нуклеозиду фосфатных групп (изоточка РНКазы *B. intermedius* 7P равна 9,5 [1]). При определенном расположении зарядов на поверхности белка, возможно реализующемся для РНКазы *B. intermedius* 7P, в результате такого связывания ОЗ'-нуклеозид, не являющийся производным гуанозина, может оказываться в положении, близком к локусу белка, в котором связываются производные гуанозина. При этом за счет ограничения конформационной подвижности ОЗ'-нуклеозид может большую или меньшую часть времени находиться в том локусе фермента, где специфически связывается гуанозин. В этом случае его продуктивная ориентация относительно фосфата и каталитических групп фермента достигается благодаря неспецифичным взаимодействиям с белком.

Ранее на основании изучения разностных УФ-спектров комплексов РНКазы *B. intermedius* 7P с производными гуанозина были получены результаты, позволяющие полагать, что основание ОЗ'-концевого нуклеозиды в продуктивном фермент-субстратном комплексе фиксируется около кольца боковой цепи остатка фенилаланина [1]. Возможно, что именно взаимодействие между ароматическим кольцом указанного фенилаланинового остатка и основанием ОЗ'-нуклеозиды типа стэкинг определяет при гидролизе полинуклеотидов продуктивную ориентацию рибозы ОЗ'-нуклеозиды относительно фосфатной группы и каталитических групп белка. В этом случае более высокие значения $k_{кат}$ для пуриновых полинуклеотидов по сравнению с пиримидиновыми отражают более сильное взаимодействие пуриновых оснований и фенилаланинового кольца.

Рассмотренный механизм расщепления полинуклеотидов РНКазой *B. intermedius* 7P согласуется с наблюдаемой разницей величин каталитических констант скоростей гидролиза $poU(U)$ и $poU(C)$ (табл. 2). Отношение этих величин с поправкой на различие скоростей из-за влияния 5'-нуклеозиды (табл. 1) равно 44. Образование продуктивного фермент-субстратного комплекса по вышеприведенному механизму требует перехода ОЗ'-нуклеозиды из состояния с ориентацией в растворитель в состояние с гидрофобным окружением. Соответственно величина $k_{кат}$ определяется отношением концентраций продуктивных и непродуктивных комплексов фермента с полинуклеотидом. Поэтому следует ожидать сравнительно меньших значений $k_{кат}$ для тех нуклеозидов, основание которых имеет большое сродство к воде. В работе [19] путем измерения концентрационного распределения оснований нуклеиновых кислот между фазами в системе хлороформ — вода показано, что сродство цитозина к воде в 60 раз выше, чем урацила. Это значение близко к величине отношения $k_{кат}$ для реакций гидролиза $poU(U)$ и $poU(C)$ с поправкой на вторичную специфичность РНКазы. Обсуждать на подобной основе различие скоростей $poU(I)$ и $poU(A)$ не представляется возможным, так как трудно вычленить вклад специфичных взаимодействий гипоксантина с белком при образовании продуктивного комплекса РНКазы с $poU(I)$.

В заключение следует отметить, что ферментативный гидролиз пуриновых полинуклеотидов РНКазой А и полинуклеотидов, не содержащих производных гуанозина, РНКазой Т₁, по-видимому, происходит по аналогичному механизму. Можно полагать, что для этих РНКаз после образования комплекса, включающего связывание фосфатной группы и нуклеозиды на ее О5'-конце, продуктивный комплекс возникает за счет стохастически достигаемой каталитической ориентации рибозы на ОЗ'-конце расщепляемой фосфодиэфирной связи.

РНКазу *B. intermedius* 7P получали по методике работы [3] из препарата отечественного производства. Динуклеозидфосфаты GpC и GpG были продуктами фирмы Serva, а GpA и GpU были получены нами согласно работе [20]. Полипуклеотиды poly(I), poly(A), poly(U) и poly(C) фирмы Reanal фракционировали на колонке с сефадексом G-50 (fine) размером 3,8×56 см. На колонку наносили 100 мг полинуклеотида, растворенного в 5–7 мл раствора 0,1 М LiCl и 0,05 М трис-HCl при pH 8,2. Элюция проводилась этим же раствором. Высокополимерный материал появлялся во фракциях элюата, составляющих 0,25–0,27 объема колонки. Отбор высокомолекулярной фракции завершали на фракции элюата, составляющей 0,38 объема колонки.

Полинуклеотиды из отобранной фракции осаждали на холоду тремя объемами этанола. Осадок растворяли в воде и лиофилизировали. Концентрации фермента и субстратов определяли спектрофотометрически. Использовали следующие молярные коэффициенты поглощения ($M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$): РНКазы *B. intermedius* 7P — $\epsilon_{280} = 22\,500$ при pH 7 [3], GpC — $\epsilon_{280} = 12\,600$ при pH 7 [21], GpU — $\epsilon_{280} = 10\,600$ при pH 7 [21], GpA — $\epsilon_{280} = 9760$ при pH 7 [7], GpG — $\epsilon_{280} = 14\,100$ при pH 7 [7], poly(A) — $\epsilon_{257} = 10\,000$ при pH 7,5 [22], poly(U) — $\epsilon_{264} = 9430$ при pH 7,5 [22], poly(I) — $\epsilon_{248} = 10\,000$ при pH 7,8 [19], poly(C) — $\epsilon_{268} = 6200$ при 7,8 [23].

Для определения начальных скоростей расщепления субстратов при протекании реакции трансэтерификации использовались следующие изменения молярных коэффициентов поглощения при pH 6,2 и 25° С ($M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$): GpC — $\Delta\epsilon_{280} = 2050$, GpU — $\Delta\epsilon_{280} = 850$ [21], GpA — $\Delta\epsilon_{280} = 930$, GpG — $\Delta\epsilon_{280} = 1500$ [7], poly(U) — $\Delta\epsilon_{286} = 587$, poly(C) — $\Delta\epsilon_{250} = 2380$, poly(A) — $\Delta\epsilon_{260} = 5000$, poly(I) — $\Delta\epsilon_{248} = 1330$. Значения $\Delta\epsilon$ для poly(C) и poly(U) взяты равными значениям разности ϵ 3'-фосфата и 2',3'-циклофосфата уридина и цитидина соответственно. Значения $\Delta\epsilon$ для poly(A) и poly(I) были найдены путем исчерпывающего гидролиза полинуклеотидов. Кинетические измерения проводили в буферных растворах, содержащих 0,05 М трис, 0,05 М ацетат натрия и 0,1 М NaCl. Необходимое значение pH устанавливали добавлением уксусной кислоты. Величину pH измеряли комбинированным электродом GK 2401C (Radiometer, Дания) на pH-метре pH-340 (СССР). Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Cary-148 (Varian, США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпейский М. Я., Ханданян А. Ж., Чепурнова Н. К., Платонов А. Л., Яковлев Г. И. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1669–1679.
2. Yakovlev G. I., Vocharov A. L., Moiseyev G. P. FEBS Lett., 1984, v. 175, № 2, p. 356–358.
3. Голубенко И. А., Балабан Н. Н., Лещинская И. Б., Волкова Г. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. Биохимия, 1979, т. 44, вып. 4, с. 640–648.
4. Яковлев Г. И., Бочаров А. Л., Мусеев Г. П., Михайлов С. Н. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 2, с. 205–210.
5. Witzel H., Barnard E. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, v. 7, № 4, p. 295–299.
6. Folman H., Wiker H. J., Witzel H. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 2, p. 243–250.
7. McLennan B. D., Lane B. G. Can. J. Biochem., 1968, v. 46, № 1, p. 93–107.
8. Irie M. J. Biochem. (Tokyo), 1968, v. 63, № 5, p. 649–653.
9. Walz F. G., Osterman H. L., Liberlin C. Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 195, № 1, p. 95–102.
10. Glitz D. G., Eichler D. C., Angel L. Analyt. Biochem., 1974, v. 62, № 3, p. 552–567.
11. Umura H., Irie M., Ukita T. J. Biochem. (Tokyo), 1965, v. 58, № 3, p. 264–272.
12. Ward D. C., Fuller W., Reich E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 62, № 2, p. 581–588.
13. Cazzone P. J., Jardetzky O. FEBS Lett., 1977, v. 73, № 1, p. 77–79.
14. Irie M. J. Biochem. (Tokyo), 1965, v. 58, № 2, p. 599–603.
15. Peller L., Alberty R. A. J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 12, p. 5907–5914.
16. Alberty R. A. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, № 5, p. 2804–2810.
17. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. В., Голубенко И. А., Северин Е. С. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 187–202.

18. Голубенко И. А., Лещинская И. Б., Карнейский М. Я., Яковлев Г. И. Биорган. химии, 1982, т. 8, № 8, с. 1108-1118.
19. Gullis P. M., Wolfenden R. Biochemistry, 1981, v. 20, № 11, p. 3024-3028.
20. Хабарова М. И., Женодарова С. М. Молекуляр. биология, 1972, т. 6, № 5, с. 682-688.
21. Zabinski M., Walz F. G. Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 175, № 2, p. 558-564.
22. Blake R. D., Fresko J. R. J. Mol. Biol., 1966, v. 19, № 1, p. 145-160.
23. Chamberlin M. J., Patterson D. L. J. Mol. Biol., 1969, v. 42, № 2, p. 410-428.

Поступила в редакцию
4.III.1986

SPECIFICITY OF THE *BAVILLUS INTERMEDIUS* 7P RNAase IN REACTIONS OF POLYNUCLEOTIDE CLEAVAGE

YAKOVLEV G. I., CHEPURNOVA N. K., MOISEEV G. P., BOCHAROV A. I.,
LOPATNEV S. V.*

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
**Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga*

Mechanism of action of the *Bacillus intermedius* 7P RNAase in the cleavage of polynucleotides has been studied. Kinetic parameters of hydrolysis poly(I), poly(A), poly(U), and poly(C) by this enzyme are determined at the transesterification step. Purine and pyrimidine polynucleotides were shown to be cleaved at the same active centre of RNAase. The effect of the nucleoside at 5'-end of the phosphodiester bond to be split upon the rate of its enzymatic cleavage was studied. Rates of cleavage of homopolynucleotides were compared considering the above effect. The *B. intermedius* 7P RNAase exerted the purine specificity in the hydrolysis of polynucleotides and the guanyl specificity in the hydrolysis of low molecular weight substrates, as was found by the authors in earlier studies. The mechanism of action of the enzyme is discussed to account for the decreased specificity of RNAase in the hydrolysis of high molecular weight substrates.