



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.412.088.3

ВЫДЕЛЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ  
ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ *THERMUS*  
*THERMOPHILUS* HB8

Решетникова Л. С., Черная М. М., Анкилова В. И.\*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

\*Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Фенилаланил-тРНК-синтетаза (*L*-фенилаланин:тРНК-лигаза (АМР), КФ 6.1.1.20) является одним из ключевых ферментов биосинтеза белка. Интерес к аминоксил-тРНК-синтетазам связан с их высокой специфичностью, обеспечивающей правильность трансляции, и с проблемой белково-нуклеинового узнавания. Фенилаланил-тРНК-синтетаза имеет сложную четвертичную структуру и помимо аминокислотирования осуществляет дополнительные каталитические функции [1, 2]. Структурная основа всех функций фенилаланил-тРНК-синтетазы может быть установлена после определения пространственной организации фермента методом рентгеноструктурного анализа. Первым важнейшим шагом на пути этих исследований является получение кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного эксперимента. В данном сообщении описан метод, позволивший впервые выделить высокоочищенный препарат фенилаланил-тРНК-синтетазы из *Thermus thermophilus* и закристаллизовать его. Кроме того, дается краткая характеристика фермента.

Штамм *T. thermophilus* HB8 был получен из Японии от проф. Т. Осима. Бактериальная масса выращена во ВНИИ прикладной биохимии (Олайне, ЛатвССР). Первую стадию выделения, включающую получение пострибосомального супернатанта и хроматографию на DEAE-сефарозе, проводили как описано ранее [3]. Фракцию с DEAE-сефарозы, обладающую фенилаланил-тРНК-синтетазной активностью, высаливали сульфатом аммония (45% насыщения) и хроматографировали на колонке (2,5×70 см) с поливиниловым сорбентом Toyopearl (Toyo Soda, Япония) в 20 мМ трис-НСI-буфере, рН 7,8, содержащем 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,1 мМ NaN<sub>3</sub> (буфер А) в градиенте концентрации сульфата аммония от 30 до 10% насыщения (объем градиента 2 л). Рехроматографию проводили в этих же условиях. Активную фракцию высаливали, осадок суспендировали в буфере А и суспензию наносили на две последовательно соединенные колонки (1,5×100 и 2,5×100 см) с ультрагелем AcA-34 (LKB, Швеция), уравновешенным этим же буфером. Активный белок хроматографировали на колонке (0,9×15 см) с фенилаланиламиногексил-сефарозой, синтезированной нами согласно методу [4]. Элюцию проводили в буфере А в градиенте концентрации KCl от 0 до 1 М (объем градиента 1,6 л). Активную фракцию высаливали, осадок растворяли в буфере А и диализовали против этого же буфера. Фермент хроматографировали на колонке (0,9×15 см) с гепарин-сефарозой (Pharmacia, Швеция), уравновешенной буфером А, в градиенте концентрации KCl от 0 до 0,3 М (объем градиента

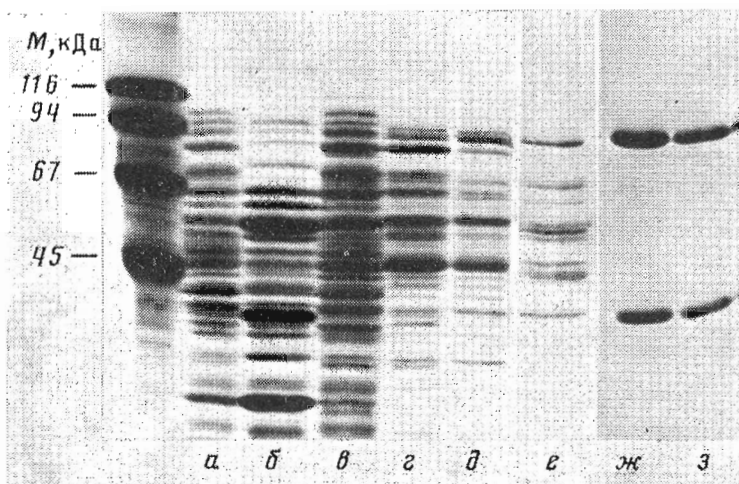


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препаратов фенилаланил-тРНК-синтетазы в ходе очистки. *а* – активная фракция с DEAE-сефарозы; *б*, *в* – супернатант и осадок после высаливания этой фракции сульфатом аммония 45% насыщения соответственно; *г*, *д* – активные фракции с Тоурреарг после двух последовательных хроматографий; *е* – препарат фермента после фенилаланиламиногексил-сефарозы; *ж* – фермент после гепарин-сефарозы; *з* – фермент из кристаллов. 0 – смесь стандартных белков (слева указаны молекулярные массы)

0,4 л). Очищенный препарат фенилаланил-тРНК-синтетазы использовали для дальнейших исследований. Выделение и кристаллизацию проводили при 4° С.

Гомогенность активных фракций на каждой стадии очистки контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли [5]. Активность фенилаланил-тРНК-синтетазы определяли согласно методу [6] по количеству [<sup>14</sup>С]фенилаланил-тРНК, образующейся в реакции аминокислотирования, которую проводили в 50 мкл смеси следующего состава: 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 8,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ, 10<sup>-2</sup> мМ [<sup>14</sup>С]фенилаланин, 40 мкМ суммарная тРНК *E. coli* и от 0,1 до 10 мкг белка (в зависимости от степени очистки фермента). Препарат суммарной тРНК из *E. coli* выделяли согласно методу [7]. Содержание тРНК<sup>Phe</sup> в этом препарате составляло 1,7%. Ферментативную реакцию проводили при 55° С в течение 1 мин. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее аминокислотирование 1 нмоль тРНК<sup>Phe</sup> в 1 мин при 55° С. Концентрацию белка определяли по разности поглощения при 228,5 и 234 нм [8]. Молекулярную массу нативного фермента оценивали с помощью гель-фильтрации на колонке (0,9×50 см) с сефакирилом S-300 (Pharmacia, Швеция), а молекулярную массу субъединиц – с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Кристаллизацию белка проводили с помощью метода диффузии паров в висящей капле [9]. В качестве осадителя использовали раствор сульфата аммония 30% насыщения в 20 мМ имидазол-НСI-буфере, рН 7,8.

Из 1 кг бактериальной массы было получено 10 мг высокоочищенного препарата фенилаланил-тРНК-синтетазы. Данные, характеризующие степень очистки белка на каждой стадии выделения, представлены в таблице. Анализ активных фракций фермента с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показан на рис. 1. После осаждения фермента сульфатом аммония из фракции с DEAE-сефарозы (стадия 2) большая часть примесных белков оставалась в растворе (рис. 1*а–в*). При гидрофобной хроматографии на сорбенте Тоурреарг (стадия 3) в один прием проводилась очистка всего белка, полученного на предыдущей стадии (3,7 г). Активная фракция была элюирована при 17–19% насыщения сульфата аммония. Рехроматография на

Основные стадии очистки	Общий белок, мг	Удельная активность, ед. акт./мг	Общая активность, ед. акт.	Степень очистки	Выход, %	
					активность	белок
1. Хроматография на DEAE-сефарозе	5800	0,8	4650	1	100	100
2. Высаливание сульфатом аммония, 45% насыщения	3700	1,2	4440	1,5	95	64
3. Гидрофобная хроматография на Тоурорепл	420	9,0	3780	11,2	81	7,2
4. Гель-фильтрация на ультрагеле	300	12,0	3600	15,0	77	5,1
5. Хроматография на фенилаланиламиногексил-сефарозе	70	30,0	2100	37,5	45	1,2
6. Хроматография на гепарин-сефарозе	10	90,0	900	112,0	19	0,6

этой же колонке позволяла вдвое увеличить удельную активность фермента. С помощью гель-фильтрации (стадия 4) белок освобождался от солей и низкомолекулярных полипептидов. При хроматографии на фенилаланиламиногексил-сефарозе (стадия 5) активная фракция элюировалась 0,5 М KCl. Несмотря на значительную очистку, на этой стадии препарат фермента содержал большую долю примесных белков (рис. 1е). Вероятно, фенилаланиламиногексил-сефароза обладает наряду с аффинными еще и ионообменными свойствами. Окончательная очистка фенилаланил-тРНК-синтетазы была осуществлена на гепарин-сефарозе (стадия 6, рис. 1ж), где белок элюировался 0,15 М KCl. Таким образом, был получен препарат фермента с уд. акт. 90 ед./мг, определенной при 55° С.

Нами изучена температурная зависимость скорости реакции аминокислотирования и обнаружено, что температурный оптимум находится вблизи 70° С. Значение удельной активности при этой температуре в 4 раза больше, чем при 55° С, и составляет 360 ед./мг. Вероятно, при использовании в качестве субстрата реакции аминокислотирования гомологичной тРНК из *T. thermophilus* эта величина была бы еще выше. Значения констант Михаэлиса для фенилаланина, АТФ и тРНК равны  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6,5 \cdot 10^{-5}$  и  $2 \cdot 10^{-6}$  М соответственно. Молекулярная масса фенилаланил-тРНК-синтетазы по результатам гель-фильтрации составляет 250 кДа. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия обнаружено наличие двух полипептидных цепей с молекулярными массами 36 и 92 кДа. Исходя из полученных величин молекулярных масс для целого белка и его субъединиц сделан вывод о том, что фенилаланил-

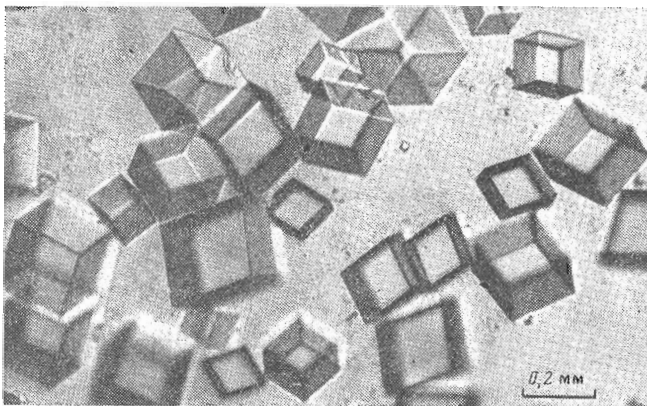


Рис. 2. Микрофотография кристаллов фенилаланил-тРНК-синтетазы из *T. thermophilus* HB8

тРНК-синтетаза из *T. thermophilus* является тетрамером типа  $\alpha_2\beta_2$ . Коэффициент поглощения фермента,  $E_{1\text{см}}^{1\%}$ , равен 8,8 при 280 нм.

Из полученного нами гомогенного препарата фенилаланил-тРНК-синтетазы выращены кристаллы, имеющие форму параллелепипедов с размерами 0,2×0,2×0,15 мм (рис. 2). Анализ полипептидного состава кристаллического материала показал полную идентичность с исходным препаратом (рис. 1ж, з). Фермент после растворения кристаллов сохраняет высокую активность. Кристаллы хорошо рассеивают рентгеновские лучи, и в настоящее время проводятся их рентгенографические исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Baltzinger M., Holler E. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 10. P. 2460–2476.
2. Goerlich O., Foeckler R., Holler E. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. № 1. P. 135–142.
3. Гарбер М. Б., Решетникова Л. С. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 11. С. 1572–1575.
4. Forrester P. I., Hancock R. L. // Can. J. Biochem. 1973. V. 51. № 1. P. 231–234.
5. Laemmly U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
6. Stulberg M. P. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 5. P. 1060–1064.
7. Сандашчиев Л. С., Староскина В. К., Стефанович Л. Е., Чучаев В. Н. // Молекулярн. биология. 1967. Т. 1. № 4. С. 463–466.
8. Ehreshmann B., Imbaut P., Weil J. M. // Analyt. Biochem. 1973. V. 54. № 2. P. 454–463.
9. Wlodawer A., Hodgson K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 1. P. 398–399.

Поступило в редакцию  
10.X.1986

#### ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE FROM THE *THERMUS THERMOPHILUS* HB8

RESHETNIKOVA L. S., CHERNAYA M. M., ANKILOVA V. N.\*

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*  
*\*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences, Novosibirsk*

Method of isolation of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* HB8 is described, including chromatography on DEAE-sepharose, ammonium sulfate fractionation, hydrophobic chromatography on Toyopearl, gel filtration on ultrogel AcA-34, chromatography on phenylalanylaminohexyl-sepharose and heparine-sepharose. Yield of the purified enzyme was 10 mg from 1 kg of *T. thermophilus* cells. The enzyme is found to consist of two types of subunits with molecular masses 92 and 36 kDa and is likely to be a tetramer protein with molecular mass 250 kDa. Crystals of phenylalanyl-tRNA synthetase suitable for X-ray structural studies have been obtained.