

С. Е. МАНОЙЛОВ

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ СОЕДИНЕНИЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АДЕНИНА С АМИНОКИСЛОТАМИ

(Представлено академиком А. Ф. Иоффе 7 V 1949)

Одной из существенных проблем химии нуклеопротеидов является вопрос о природе связи между нуклеиновой кислотой и белком.

В предыдущей работе (1) нами было высказано предположение о возможности образования пептидной связи непосредственно между аминогруппой аденина нуклеиновой кислоты и карбоксильной группой аминокислоты в белке. Основанием к этому явилось следующее наблюдение. При исследовании спектра поглощения нуклеиновой кислоты свободной и прочно связанной с белком («истинный нуклеопротеид», по А. Н. Белозерскому (2)) оказалось, что максимум поглощения в ультрафиолетовой области смещается с 2620 Å для свободной до 2550 Å для связанной нуклеиновой кислоты. Максимум 2620 Å обусловлен структурой аденина, и поэтому естественно было приписать это смещение спектра вовлечению аденина в соединение с белком.

С целью выяснения правильности этого предположения в настоящей работе были предприняты опыты ферментативного синтеза соединений нуклеиновой кислоты с некоторыми аминокислотами, а также аденина с аминокислотами, увенчавшиеся успехом.

Синтез нуклеиновой кислоты с аминокислотами нам удалось осуществить благодаря применению принципа энзиматического синтеза под давлением, предложенного С. Е. Бреслером (3). Этот метод, как известно, основан на обращении действия гидролитического фермента с помощью высокого давления. Поэтому сначала требовалось найти фермент, гидролизующий истинный нуклеопротеид. Так как связь между нуклеиновой кислотой и белком, по нашему предположению, должна осуществляться по типу кислотных амидов, казалось вероятным, что гидролизующим ферментом для истинного нуклеопротеида может являться ферментный препарат «панкреатин», содержащий различные полипептидазы. Действительно, опыт подтвердил это предположение: панкреатин при  $\text{pH} = 8,2$  и  $38^\circ$  в течение 3—4 час. расщеплял препарат истинного нуклеопротеида с образованием свободной нуклеиновой кислоты.

Вслед за этим были предприняты опыты синтеза под давлением. 0,005—0,01 М растворы нуклеиновой кислоты и аминокислоты в боратном буфере ( $\text{pH} = 9,3$ ) смешивались в равных количествах. Панкреатин добавлялся в количестве 1/20 к весу субстрата. Смесь помещалась в бомбу, в которой поддерживалось давление 6000 атм. и температура  $37^\circ$ . Одновременно ставились контрольные опыты, где смешивались: а) нуклеиновая кислота и аминокислота без добавления фермента;

б) нуклеиновая кислота и аминокислота с добавлением фермента, предварительно инактивированного нагреванием до 100°; в) одна нуклеиновая кислота с добавлением фермента и г) одна аминокислота с добавлением фермента.

В исходных растворах и в растворах, подвергавшихся давлению, измерялось содержание аминокислот по методу Ван-Слайка.

В случае присоединения карбоксильной группы аминокислоты к аминогруппе нуклеиновой кислоты (аденина) следовало ожидать умень-

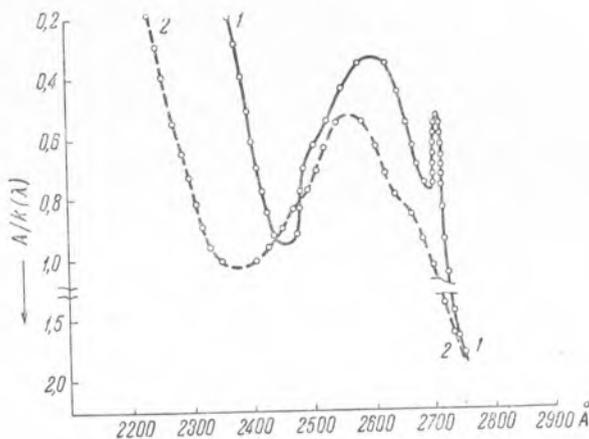


Рис. 1. 1—тимонуклеиновая кислота 0,0029 M + *l*-триптофан 0,0029 M до применения давления; 2 — то же после применения давления. *A* — константа прибора, *k* — коэффициент экстинкции

шения содержания аминного азота в растворе на 1/4 часть, если бы аминокислота нацело вступала в соединение. Эту величину убыли аминокислоты можно условно принять за 100% синтеза.

Убыль аминокислоты в опытах с триптофаном, тирозином и фенилаланином (табл. 1) свидетельствует о вовлечении аминокислоты

Таблица 1

Системы	Аминокислота в мг/мл		% выхода реакции по отношению к теории	Максимум поглощения в Å		Колич. аминокислоты в растворе в мг/мл		% выхода продукта вычисл. по убыли аминокислоты
	до давления	после давления		до давления	после давления	до давления	после давления	
Рибонуклеиновая к-та + <i>l</i> -тирозин . . . . .	0,132	0,110	72	2620	2560	0,20	0,064	68
Тимонуклеиновая к-та + <i>l</i> -тирозин . . . . .	0,151	0,115	100	2620	2560	0,21	0,061	71
То же + <i>l</i> -тирозин . . . . .	0,155	0,100	—	2620	2570	—	—	—
» + <i>l</i> -триптофан . . . . .	0,216	0,162	100	2620	2570	0,19	0,059	69
» + <i>l</i> -триптофан . . . . .	0,115	0,083	100	2620	2570	—	—	—
» + <i>l</i> -лейцин . . . . .	0,1	0,1	0	2620	2620	—	—	—
» + <i>l</i> -фенилаланин . . . . .	0,195	0,173	45	2620	2570	—	—	—
» + <i>l</i> -глутаминовая к-та . . . . .	0,104	0,108	0	2620	2620	—	—	—
						Над лантановым осадком		
Аденин сульфат + <i>l</i> -тирозин . . . . .	0,141	0,108	46	2610	2570	0,18	0,0936	48
Гипоксантин + <i>l</i> -тирозин . . . . .	0,150	0,151	0	2540	2540	0,15	0,148	0
						Над медным купоросом		

кислоты в реакцию синтеза, ибо ни в одной из упомянутых выше контрольных проб не наблюдалось уменьшения содержания аминокислот. Кроме того, если субстратом служили аминокислоты лейцин и глютаминная кислота, также не было обнаружено признаков реакции синтеза.

Параллельно был применен второй способ анализа продукта реакции. К исходному раствору, а также к реакционной смеси добавлялся специфический осадитель нуклеиновой кислоты — ион лантана. Для этого на 1 мл нашего раствора, извлеченного из бомб, прибавлялось 2 мл 2% раствора  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  и 0,5 мл 96° спирта. Нуклеиновая кислота выпадала полностью в осадок. В прозрачном растворе над осадком производилось количественное определение тирозина по методу Томаса или триптофана по Фюрту.

Оказалось, что после синтеза большая часть аминокислоты осаждается совместно с нуклеиновой. Хотя этот метод анализа и дает несколько заниженные цифры для выхода соединения нуклеиновая кислота — аминокислота из-за небольшого увлечения свободной аминокислоты в осадок в исходном растворе, все же результаты оказываются отчетливыми и совпадение метода осаждения с методом Ван-Слайка достаточно удовлетворительным (табл. 1). Контрольные пробы, о которых говорилось выше, были проанализированы по методу осаждения и дали нулевые результаты.

Третьим методом контроля за процессом синтеза служило исследование спектра поглощения раствора в ультрафиолетовой области. Опыт показал, что во всех случаях, когда синтез был обнаружен химическими методами, имело место характерное смещение максимума поглощения с 2620 до 2560—2580 Å, подобное тому, которое наблюдалось нами ранее у истинного нуклеопротеида (рис. 1). Во всех случаях, когда синтез не имел места (например, для глютаминной кислоты, лейцина, в контрольных пробах), никаких изменений спектра в растворах, подвергнутых давлению, не наблюдалось.

Четвертым доказательством того, что обнаруженное нами явление есть ферментативный синтез в условиях, когда химическое равновесие смещено давлением, служат опыты по вторичному ферментативному гидролизу наших продуктов. После извлечения реакционной смеси из бомбы часть вещества помещалась в термостат при 37° на 4 часа без добавления каких бы то ни было веществ. При атмосферном давлении фермент, содержащийся в продукте синтеза, за 4 часа снова расщеплял соединение нуклеиновой кислоты с аминокислотой, и продукты этой реакции ничем не отличались от исходного раствора, не подвергавшегося давлению. Для доказательства были использованы: измерение аминокислоты, осаждение лантаном и колориметрическое определение аминокислоты, а также исследование спектра поглощения.

Сопоставление однозначных результатов, полученных различными экспериментальными методами, показывает, что в результате ферментативного синтеза под давлением были получены соединения нуклеиновых кислот с аминокислотами, подобные пептидам. Эти вещества можно было бы назвать: тирозин-тимонуклеид, триптофан-тимонуклеид, фенилаланин-тимонуклеид.

Наконец, для того, чтобы непосредственно убедиться в соединении нуклеиновой кислоты с аминокислотой через аминогруппу аденина, был поставлен опыт по ферментативному синтезу соединения аденина с тирозином и гипоксантина с тирозином.

Реакционная смесь содержала 0,01 M раствор сульфата аденина или гипоксантина и 0,01 M раствор тирозина в боратном буфере (pH = 9,3). Препарат «панкреатин» прибавлялся в количестве 0,2 мг/мл. В остальном опыт ставился так же, как с нуклеиновыми кислотами. Контроль за процессом производился по уровню аминокислоты, по осаждаемости

аденина медью (подобно методу Графа и Маколлы) и по последующему колориметрическому определению тирозина в растворе (табл. 1). Кроме этих химических методов, исследовался спектр поглощения как в целом растворе, так и после осаждения аденина из раствора медью. Для этой реакции были проделаны все контроли, а также показан вторичный распад продукта синтеза под действием фермента при атмосферном давлении.

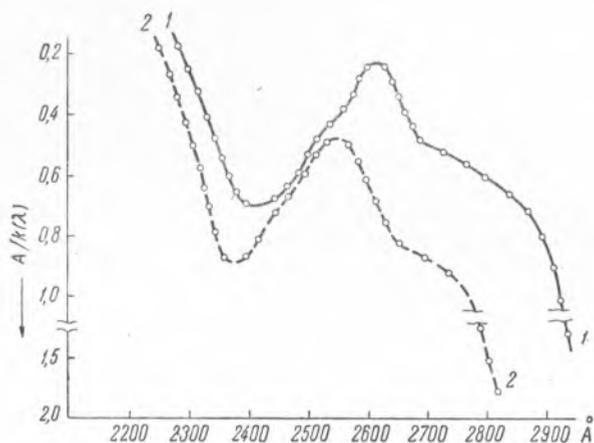


Рис. 2. 1 — тимонуклеиновая кислота 0,005 M + L-тирозин 0,005 M до применения давления; 2 — то же после применения давления

нии. Ферментативный синтез соединения аденил-тирозина, в котором нет иных возможностей для связи, кроме пептидной связи, между аминогруппой аденина и карбоксильной группой тирозина, и отсутствие синтеза в системе гипоксантин — тирозин являются, как нам кажется, достаточным доказательством высказанного нами ранее предположения о связи в истинном нуклеопротеиде между нуклеиновой кислотой и белком через аминогруппу аденина.

Исследование этого вопроса оказалось возможным благодаря применению метода энзиматического синтеза под давлением.

Центральный рентгенологический,  
радиологический и раковый институт  
Ленинград

Поступило  
21 III 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов и О. Н. Сеткина, Биохимия, 13, 337 (1948). <sup>2</sup> А. Н. Белозерский, Диссертация, МГУ, 1944. <sup>3</sup> С. Е. Бреслер и М. В. Гликина, Биохимия, 12, № 5, 389 (1947); С. Е. Бреслер, Изв. АН СССР, сер. физ., 12, № 6, 695 (1948).