

С. Е. БРЕСЛЕР и Е. И. НИДЗЯН

## О ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ФОСФАТА С АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ НА РИБОНУКЛЕИНОВУЮ КИСЛОТУ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 IX 1950)

Многочисленные прямые и косвенные данные указывают на то, что синтез белка в живой клетке сопряжен с неизвестными пока превращениями рибонуклеиновой кислоты. Во всех клетках и тканях, где наблюдается интенсивный синтез белка (эмбриональная ткань, размножающиеся бактерии или дрожжи, ткани, находящиеся в состоянии регенерации, секретирующая железа), присутствует в значительной концентрации рибонуклеиновая кислота<sup>(1)</sup>. Хевеши показал<sup>(2)</sup>, что в быстро растущих тканях имеет место энергичный обмен радиоактивного фосфора между рибонуклеиновой кислотой и минеральным фосфатом. Шпигельман и Камен<sup>(3)</sup> обнаружили на дрожжах, что обмен фосфора происходит сопряженно с синтезом белка, приостановка синтеза белка с помощью ядов или в результате недостатка азотистых веществ полностью прекращает переход фосфора из нуклеопротеида в минеральный. Наконец, Фридкин и Ленингер<sup>(4)</sup> проводили аэробное окисление яблочной кислоты под действием гомогената печени (крысы) и обнаружили, что сопряженно с окислением идет связывание неорганического фосфата рибонуклеиновой кислотой, входящей в состав митохондрии и других форменных элементов клеток.

Как же представить себе эту связь между синтезом белка и превращениями рибонуклеиновой кислоты? Возможно, что рибонуклеиновая кислота осуществляет перенос энергии, необходимой для синтеза пептидной связи. В таком случае можно было бы допустить, что она способна к дополнительному фосфорилированию в каждом звене полимерной цепи за счет оставшихся свободными гидроксильных фосфорной кислоты. Можно ожидать, что образующиеся таким образом дополнительные пирофосфатные группы будут обладать макроэнергическими свойствами, т. е. смогут играть роль резервуара и переносчика энергии в последующих процессах синтеза белка. Данные Браше с сотр.<sup>(1)</sup> подтверждают подобную гипотезу. Эти авторы утверждают, что им удавалось выделять полинуклеотиды с избытком фосфора по сравнению с общепринятой формулой.

В настоящей работе было показано в возможно простых условиях, что существуют ферментативные процессы переброски фосфата с АТФ на рибонуклеиновую кислоту и что этот дополнительный фосфат в рибонуклеиновой кислоте связан в форме сложного эфира.

Методика опытов. Опыт заключался в том, что готовилась АТФ, меченная радиоактивным фосфором  $P^{32}$  (для этого производилась внутривенная инъекция раствора радиоактивного  $Na_2HPO_4$  кролику, после чего из скелетных мышц обычным путем добывалась АТФ). К раствору

радиоактивной АТФ добавлялась полимерная рибонуклеиновая кислота (приготавливалась из пивных дрожжей обычным методом, не подвергалась освобождению от протеинов) и очень малое количество ферментного препарата (гомогената печени крысы). После получасовой инкубации в термостате при  $37^{\circ}$  реакционная смесь фракционировалась и измерялось содержание радиоактивного фосфора в рибонуклеиновой кислоте, очищенной от АТФ. Оказалось, что происходит весьма отчетливый переход фосфата с АТФ на рибонуклеиновую кислоту.

Реакционная смесь составлялась следующим образом: бралось 30—40 мг рибонуклеиновой кислоты, предварительно тщательно отдиализованной против воды, 10 мг меченой АТФ; ее активность составляла 5000 импульсов на мг в минуту, т. е. активность, взятая на опыт, была  $\sim 50000$  1/мин. (здесь, как и в дальнейшем, даются полные активности препаратов; при измерении на счетчике Гейгера в расчет входит коэффициент, зависящий от телесного угла установки). Субстраты растворялись в 0,2 мл глицил-глицинового буфера pH 7,3 (0,01 М глицил-глицин и NaOH). В реакционную среду добавлялись еще электролиты — ионы Mg и K (0,0005 М  $MgSO_4$  и 0,005 М  $K_2SO_4$ ) и NaF концентрации 0,05 М. Ионы K и Mg добавлялись по аналогии с опытами Фридкина и Ленингера как возможные активаторы трансфосфорилирующего фермента, присутствие фторида было необходимо, чтобы отравить действие фосфатаз, минерализующих органически связанный фосфат. Опыт показал, что присутствие фторида необходимо для наблюдения переброски фосфата. Перед самым опытом добавлялось 0,04 мл свежего гомогената печени крысы (количество добавленного белка 0,6 мг). Вся реакционная смесь доводилась до 1,0 мл.

После инкубации при  $37^{\circ}$  в течение 0,5 часа реакционная смесь подвергалась фракционированию. В этой операции заключалась основная экспериментальная трудность настоящей работы. Мы преодолели ее, применив хроматографию на бумаге. Реакционная смесь наносилась в виде пятна на плотную фильтровальную бумагу, элюция проводилась 50% этиловым спиртом. Опыт показал, что 50% этанол полностью элюирует мононуклеотиды (АТФ) и минеральный фосфат, но для этого бумага должна быть предварительно очищена от следов металлов (Ca, Ba и др.). Поэтому фильтровальная бумага предварительно промывалась 2 М HCl, а затем водой до нейтральной реакции и высушивалась. За ходом элюции АТФ можно было следить чрезвычайно удобно с помощью ультрахемискапа Е. М. Брумберга<sup>(5)</sup>. Освещая бумагу, увлажненную спиртом, ультрафиолетовым светом и рассматривая ее на просвет через флуоресцирующий экран, покрытый фосфорами, можно было отчетливо видеть пятно рибонуклеиновой кислоты, пятно АТФ и следить за движением пятен. Выбранная нами концентрация спирта почти не сдвигала с места рибонуклеиновую кислоту. АТФ уносилась в течение 20—24 час. на значительное расстояние (10—15 см) вдоль бумажной ленты, но отставала от движения фронта жидкости ( $R_f = 0,7$ ). Если в рибонуклеиновой кислоте присутствовал мононуклеотид, то он двигался вместе с АТФ. Естественно, что это понижало изучаемый нами эффект, поэтому мы по возможности освобождали рибонуклеиновую кислоту от мононуклеотида предварительным диализом.

После того как хроматографическая разгонка была осуществлена и пятна обнаружены с помощью ультрафиолетового света, производилось измерение радиоактивности вдоль бумажной ленты по участкам шириной в 3 см. Это и давало нам картину конечного распределения меченого фосфата.

Результаты. На рис. 1 изображен результат типичного опыта. По оси ординат нанесена активность участков бумажной ленты, по оси абсцисс — координата (номер) участка. Внизу изображены пятна

рибонуклеиновой кислоты (РК) и АТФ так, как они выглядят в ультрафиолетовом свете. Мы убеждаемся, что от 6 до 9,5% радиоактивности АТФ, взятой в опыт, осталось в пятне рибонуклеиновой кислоты. В различных опытах это количество колебалось, но если относить перенесенный с АТФ меченый фосфат к весовой единице рибонуклеиновой кислоты, то эффект всегда сохранялся близким к 0,22  $\mu$ моля фосфата на 1 мг рибонуклеиновой кислоты.

Когда мы брали недиализированный препарат рибонуклеиновой кислоты, который содержал, по данным диализа, до 60% мононуклеотида и низкомолекулярных осколков, то и измеряемый нами эффект оказывался примерно в 3 раза ниже. Это происходило потому, что, как говорилось выше, мононуклеотид отгонялся 50% спиртом вместе с АТФ.

Чтобы убедиться, что оставшийся в пятне рибонуклеиновой кислоты радиоактивный фосфат связан эфирной связью, был поставлен следующий опыт. После разгонки и измерения на счетчике на пятно рибонуклеиновой кислоты наносилась капля глицил-глицинового буфера, в которой содержалось 2,5 мг препарата картофельной апиразы, полученной по методу Калькара. Как известно, апираза является ферментом, катализирующим гидролитическое расщепление эстерифицированных фосфатов, минерализацию их. После действия апиразы снова проводилась отгонка 50% спиртом. При этом радиоактивность пятна рибонуклеиновой кислоты падала в 2—2,5 раза.

Контрольные опыты. Первые контроли показали, что если смешивать в соответствующих количествах рибонуклеиновую кислоту с радиоактивной АТФ или радиоактивным минеральным фосфатом без добавления фермента, то после разгонки в пятне рибонуклеиновой кислоты не остается никакой измеримой радиоактивности. Это свидетельствовало об эффективности методики фракционирования. Далее были проделаны многочисленные контрольные опыты без фермента, с ферментом, инактивированным кипячением, с активным ферментом, но без флуорида, с ферментом, но без субстрата — рибонуклеиновой кислоты, и, наконец, со всеми ингредиентами, но без инкубации при 37°. Все контрольные опыты дали чистые нули, кроме опытов, в которых инкубация производилась без добавок гомогената печени. В этих опытах эффект был мал, но отличен от нуля. Повидимому, в самом препарате рибонуклеиновой кислоты содержатся следы фермента, катализирующего реакцию переброски фосфата.

### Выводы

Изложенные выше опыты показывают, что в гомогенате печени имеются ферменты, производящие переброску макроэргической фосфатной группы с АТФ на рибонуклеиновую кислоту.

Если полагать, что переброске подвергается только концевая фосфатная группа АТФ, то, учитывая, что меченая молекула АТФ

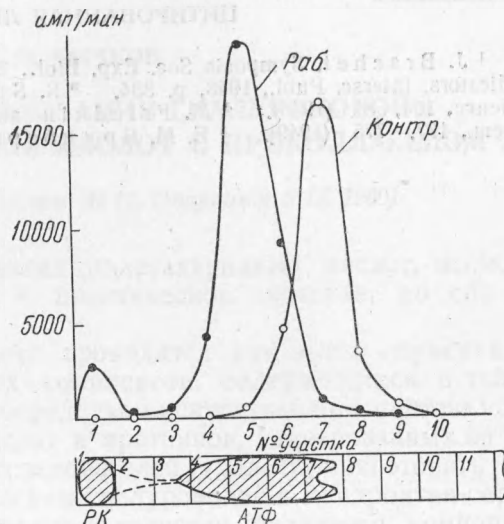


Рис. 1

содержит два меченых атома Р, следует считать, что 12—18% молекул АТФ отдали свою фосфатную группу рибонуклеиновой кислоте.

Тот факт, что перенесенный на рибонуклеиновую кислоту меченый фосфат отщепляется фосфатазой (апиразой), позволяет нам утверждать, что наблюдаемое явление есть трансфосфорилирование с АТФ на полинуклеиновую кислоту.

Ленинградский  
физико-технический институт  
Академии наук СССР

Поступило  
22 VI 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> J. Brachet, Symposia Soc. Exp. Biol., 216 (1947). <sup>2</sup> G. Hevesy, Radioactive Indicators, Intersc. Publ., 1948, p. 334. <sup>3</sup> S. Spiegelmann and M. D. Kamen, Science, **104**, 581 (1946). <sup>4</sup> M. Friedkin and A. L. Lehninger, Journ. Biol. Chem., **177**, 775 (1949). <sup>5</sup> Е. М. Брумберг, ДАН, **74**, № 4 (1950).