

совместной упаковки двух тРНК, связанных с соседними кодонами мРНК, в рибосоме [82]. Эта модель не имеет структурных подтверждений.

Естественный путь для выяснения структурно-функциональных свойств тРНК состоит в ее ферментативном расщеплении на фрагменты и в исследовании их свойств. Баев и сотрудники [83] показали, что половины молекулы, полученные из дрожжевой Вал-тРНК₁ расщеплением фосфодиэфирной связи в пределах антикодона и сами по себе неактивные, будучи смешаны, полностью восстанавливают акцепторную активность к аминокислоте. В то же время расщепление фосфодиэфирной связи в антикодоне необратимо уничтожает его способность взаимодействовать с кодоном [84]. В дальнейшем было установлено, что восстановлению активности предшествует самосборка фрагментов, причем агрегированная молекула тРНК может быть даже лишена части полинуклеотидной цепи [85, 86]. При самосборке 3'- и 5'-половины агрегируют в эквимольном соотношении, и самосборка проходит количественно менее чем за 2 мин. Самосборка специфична — 3'- 5'-половины Вал-тРНК в присутствии 5'-половины других тРНК образуют только гомологичный комплекс. В каждой тРНК существует своя нуклеотидная последовательность. Половины не обладают сродством к Вал-тРНК-синтетазе. Баев считает, что структурные участки Вал-тРНК, входящие в состав половин, непосредственно не участвуют в узнавании Вал-тРНК-синтазы, но спирализованные части антикодоновой и акцепторной ветвей необходимы для образования активной конформации тРНК.

Пространственное строение тРНК исследуется и косвенными методами. Акридиновые красители сорбируются на двуспиральных участках нуклеиновых кислот между соседними парами А—У (или А—Т в ДНК) попарно. Изучая тушение люминесценции красителей, вызванное миграцией энергии от одной сорбированной молекулы к другой, можно установить относительное расположение двойных пар (А—У)₂ (см. [73]).

Изоакцепторные тРНК различаются своей первичной структурой. По-видимому, это определяется не только вырождением генетического кода (см. § 9.6). В строении тРНК проявляются видовые различия. Установлено, что минорные основания имеют вторичное, а не генетическое происхождение — тРНК метилируется под действием фермента метилазы.

§ 9.5. РИБОСОМЫ

Рибосомы непосредственно наблюдаются с помощью электронной микроскопии как округлые гранулы диаметром 150—250 Å. Физические характеристики рибосом *E. coli* приведены в табл. 9.1 [87].

Физические свойства рибосом *E. coli*

Константа седиментации $S_{20, w}^0$ (сведберги)	69,1—70,5
Характеристическая вязкость $[\eta]$, $см^3/г$	6,1—6,8
Коэффициент поступательной диффузии $D_{20, w}^0 \cdot 10^7$	1,83
Парциальный удельный объем, $см^3/г$	0,64—0,60
Молекулярный вес	$\sim 3 \cdot 10^6$
Размеры в высушенном состоянии, Å	$200 \times 170 \times 170$
Объем, Å^3	$\sim 3 \cdot 10^6$
Размеры в водной среде, Å	$\sim 300 \times 300 \times 200$
Объем, Å^3	$\sim (7-10) \cdot 10^6$
Вероятное количество удерживаемой воды, $г/г$	0,9

Рибосомы эукариотов (организмов, клетки которых содержат ядра) характеризуются большим значением $S_{20, w}^0$ (80 S, а не 70 S), м.в. $(4,1-4,7) \cdot 10^6$ и несколько большими размерами

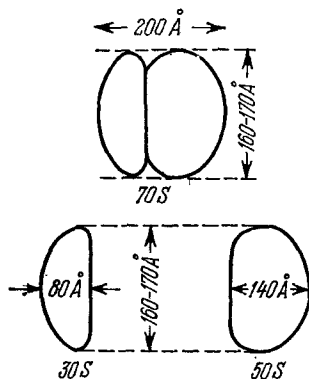


Рис. 9.11. Схема 70S-, 30S- и 50S-частиц.

(сухой объем $5 \cdot 10^6 \text{Å}^3$). Для рибосом митохондрий и хлоропластов эукариотов константа седиментации близка к 70 S, а не к 80 S. 70 S-рибосомы состоят из двух субъединиц — 30 S и 50 S, на которые они диссоциируют при уменьшении концентрации двухвалентных ионов (Mg^{++}) или при увеличении концентрации одновалентных ионов. Молекулярный вес 50 S-частиц вдвое больше, чем 30 S-частиц $1,8 \cdot 10^6$ и $(0,7-1,0) \cdot 10^6$ соответственно. Форма и размеры 70 S-, 30 S- и 50 S-частиц показаны на рис. 9.11. Аналогичным образом 80 S-рибосомы состоят из 60 S- и 40 S-частиц. Установлено, что присутствие ионов Mg^{++} необходимо

для поддержания целостности рибосом [88, 89]. Имеются два критических уровня содержания Mg^{++} — если оно меньше первого уровня, то рибосомы диссоциируют на субъединицы, если меньше второго, то сами субъединицы утрачивают компактную структуру. Первый уровень равен $0,5 \text{ мкмоль } Mg^{++}$ на 1 мкмоль фосфата для 70 S-частиц и $0,3-0,1$ для 80 S-частиц, т. е. $2500-3000$ ионов Mg на рибосому. Второй уровень — $0,3$ для 70 S- и $0,15$ для 80 S-частицы, т. е. менее 1000 ионов Mg на рибосому [88].

Рибосомальная РНК составляет около 65% сухого веса рибосом, белки — примерно 35%. рРНК разделяются на три класса,

а именно на высоко- (23—28 S, м.в. $\geq 1 \cdot 10^6$), средне- (16—18 S, м.в. $< 1 \cdot 10^6$) и низкомолекулярные (5 S, м.в. около 40 000). В нативном состоянии эти компоненты рРНК являются непрерывными цепями [90]. Нуклеотидный состав различных компонент рРНК неодинаков и не подчиняется правилам Чаргаффа. Исследования структурных превращений рибосом привели к следующим представлениям о структуре рРНК в растворе и о ее взаимодействиях с белками [87, 91]. По-видимому, вторичная структура рРНК характеризуется многочисленными короткими двуспиральными участками, соединенными промежуточными, одностежковыми участками в гибкую палочку. Молекулы белка взаимодействуют с неспиральными участками рРНК, не нарушая ее вторичной структуры, и образующийся таким образом рибонуклеопротеидный комплекс сворачивается в компактную структуру рибосомной субъединицы. В 70 S-рибосоме содержится около 65 полипептидных цепей со средним молекулярным весом каждой цепи 65 000, в 80 S-рибосоме число таких цепей вдвое больше. В 30 S-частицах имеется 19—20 сортов белков, в 50 S-частицах их более 50. Установлена частично глобулярная структура этих белков и наличие в них α -спиральных участков.

Рибосомы испытывают три вида структурных превращений: обратимую диссоциацию на две субъединицы, разворачивание субъединиц, разборку субъединиц. Как уже сказано, диссоциация может быть вызвана понижением концентрации ионов Mg^{++} . Электронная микроскопия показывает, что ассоциирующие субъединицы взаимодействуют определенными участками своих поверхностей. Роль ионов Mg^{++} (или Ca^{++}), вероятно, сводится к экранировке отрицательных зарядов фосфатных и карбоксильных групп. Взаимодействие субъединиц в рибосоме до сих пор детально не изучено. Имеются данные, указывающие на существование в клетке фонда свободных субъединиц, находящихся в равновесии с нефункционирующими рибосомами, в которых связь между субъединицами недостаточно стабильна. Эта связь стабилизируется при взаимодействии с компонентами белок-синтезирующей системы, в частности тРНК [92]. Спирин и Гаврилова подчеркивают значение лабильной ассоциации двух неравных субчастиц в рибосоме [87].

На рибосомах *E. coli* было открыто и изучено разворачивание субчастиц при удалении ионов Mg^{++} и увеличении концентрации одновалентных ионов [93—95]. Разворачивание происходит ступенчато, в несколько стадий, каждая из которых реализуется в узком интервале изменений ионного окружения. Эти скачкообразные переходы свидетельствуют о кооперативности соответствующих процессов. В конечном счете образуется рыхлый неупорядоченный рибонуклеопротеид.

Разборка рибосомных частиц состоит в отделении белка от рРНК при повышении концентрации одновалентных ионов. Эти процессы также имеют многостадийный и кооперативный характер. Весьма интересна возможность обратной самосборки рибосомных частиц при надлежащем изменении среды. Реконструированные частицы биологически функциональны [96, 97]. Согласно Спирину, эти явления определяются особой ролью рРНК, которая служит «каркасом или матрицей для специфического размещения на ней молекул рибосомального белка» [87]. В основе самосборки лежит узнавание участка РНК молекулой определенного белка.

Полная разборка рибосом и их реконструкция из полученных белков и рРНК была осуществлена Номурой и сотрудниками [98—100]. Роль рРНК оказалась специфичной, но не абсолютно — функциональные 30 S-частицы получаются из 16 S рРНК одного вида бактерий и рибосомных 30 S-белков другого вида. Было выделено 19 белков. Установлено, что чувствительность 30 S-частиц к стрептомицину (препятствующему правильному чтению текста мРНК) определяется одним лишь белком, обозначаемым P 10. Оказалось, что частицы, лишенные белка P 10, точнее читают текст в присутствии веществ, этому препятствующих, — не только антибиотиков, но и C_2H_5OH и ионов Mg^{++} при их высокой концентрации. Отсутствие любого из 19 белков влияет на ряд функций 30S-частиц. Несколько различных функций этих частиц изменяется при отсутствии любого из 19 белков. Таким образом, все белки действуют согласованно, что необходимо и для самосборки.

Кинетика самосборки отвечает реакции первого порядка, что означает наличие медленной, лимитирующей процесс перестройки некоторой промежуточной компоненты. Сильная зависимость скорости от температуры показывает, что на эту перестройку требуется около 40 ккал/моль рибосом. Самосборка рибосом из всех компонент *in vitro* происходит примерно за 5 мин.

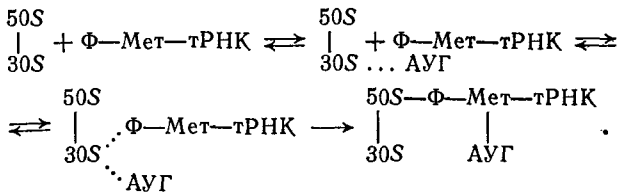
Генетический анализ мутантов *E. coli*, характеризующихся различными дефектами самосборки рибосом, свидетельствует в пользу того, что самосборка *in vivo* и *in vitro* происходит сходным образом. Молекулярные механизмы этих интересных и важных явлений еще не изучены.

Исследование функционирования рибосом — актуальная задача. Для работы рибосом необходимо присутствие в них специальных белков — *трансферных факторов* (см. [87]). Известны три фракции трансферных факторов: G-фактор, зависимый от ГТФ, T_c — стабильный фактор и T_n — нестабильный фактор [101]. В присутствии G-фактора появляется ГТФ-азная активность. Трансферные факторы объединяются с рибосомой в присутствии двухвалентных катионов. Структура и роль трансфер-

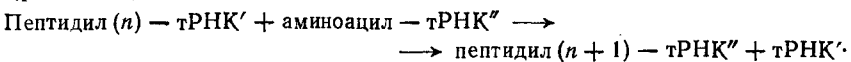
ных факторов недостаточно изучены. Установлено наличие также белковых факторов инициации и терминации синтеза полипептидной цепи (см. [87]).

Для комплексообразования рибосом с мРНК или с искусственными полинуклеотидами требуется присутствие Mg^{++} в концентрации, не меньше 0,005 М. Каждая рибосома соединяется лишь с одной полинуклеотидной цепью. Связывание происходит в 30 S-субъединице. В тройном комплексе рибосома — мРНК — аминоксил — тРНК последняя связывается строго избирательно: антикодон тРНК с кодоном мРНК. Образование прочной пары кодон — антикодон также происходит в 30 S-субъединице. В отсутствие матрицы деацилированная тРНК или аминоксил — тРНК связываются 50 S-субъединицей, неким пептидил — тРНК-связывающим участком.

Процесс трансляции начинается с инициации, т. е. с синтеза первой пептидной связи. В инициацию должны вовлекаться одновременно два комплекса аминоксил — тРНК. Один из них оказывается N-блокированным, инициаторным. Установлено, что это всегда N-формилметионил — тРНК, обладающий повышенным сродством к пептидил — тРНК-связывающему участку рибосомы на 50 S-частице [101]. Иницирующим кодоном мРНК служит АУГ или ГУГ, расположенный у 5'-конца полинуклеотида. По-видимому, этот кодон предварительно связывается аминоксил — тРНК-связывающим участком 30 S-субъединицы. Общая схема процесса инициации (см. [87]) записывается в виде (Ф — формил)



Далее происходит последовательная поликонденсация аминокислот. На протяжении всей трансляции растущий полипептид удерживается на рибосоме. Пристраивание каждого следующего аминоксила идет на С-конце полипептида. тРНК, принесшая пристроившийся аминоксил, остается с ним связанной. Очередной аминоксил пристраивается путем замещения тРНК на комплекс аминоксил — тРНК. Общая схема трансляции (рис. 9.12)



Цикл повторяется многократно. Суммарное его описание дано Уотсоном [2, 102]. Допустим, что в некоторый произвольный

момент на 50S-частице, в ее пептидил — тРНК-связывающем участке, находится пептидил — тРНК, а в аминокил — тРНК-связывающем участке 30S-частицы — аминокил — тРНК (рис. 9.12, б). На 50S-частице находятся также пептидилтрансферазный центр, обеспечивающий перенос пептидила. На рис. 9.12, в аминокильный конец комплекса аминокил — тРНК располагается вплотную к этерифицированному карбоксилу пептидила; далее этот карбоксил переносится на аминогруппу ами-

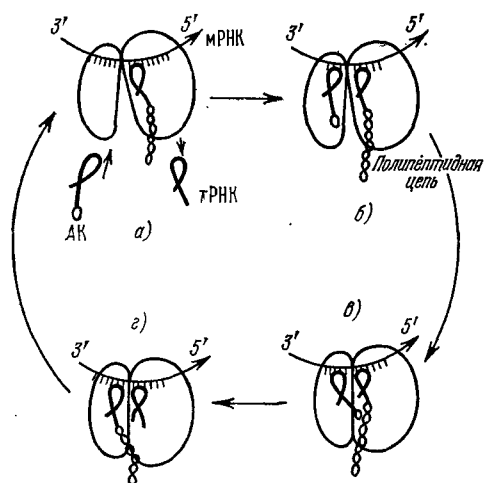


Рис. 9.12. Вероятная схема рабочего цикла рибосомы по Спирину.

Его результатом является синтез одной пептидной связи и перемещение мРНК относительно рибосомы на один кодон. Трансляция, надо думать, происходит в результате конформационного изменения рибосомы; энергия для этого черпается из ГТФ. Реализуется механохимический процесс — работа перемещения мРНК производится за счет химической энергии.

Как уже говорилось, одна молекула мРНК сочетается с несколькими рибосомами, образуя полисом. Размеры полисом зависят от длины цепей мРНК. При максимальном ее использовании на каждые 80 нуклеотидов приходится одна рибосома. При синтезе белков, содержащих примерно 150 аминокислот, в полисоме имеются 4—6 рибосом, при синтезе более длинных белковых цепей — 12—20 рибосом и больше. Наличие полисом объясняет сравнительно низкое содержание мРНК в клетке (1—2% общего количества РНК) — одна цепь мРНК обеспечивает синтез большого числа полипептидных цепей (дальнейшее описание трансляции см. в § 9.8).

ноацила комплекса аминокил — тРНК и на 50S-частице остается деацилированная тРНК (рис. 9.12, г). Затем происходит транслокация — остаток тРНК молекулы новообразованного пептидил — тРНК переходит с 30S- на 50S-частицу, увлекая за собой связанный с ним кодон мРНК и вытесняя деацилированную тРНК из пептидил — тРНК-связывающего участка (рис. 9.12, а). Затем на расположенный в 30S-частице новый кодон поступает новый комплекс аминокил — тРНК и цикл начинается сначала.