

MECHANISM OF AMINO ACID SELECTION IN THE PROCESS OF PROTEIN BIOSYNTHESIS

O. I. LAVRIK

The paper deals with the first stage of protein biosynthesis – aminoacylation of transfer RNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. These enzymes demonstrate the high specificity of aminoacyl-tRNA formation, despite the structural similarity of many natural aminoacids. The mechanisms providing tRNA aminoacylation specificity and their role in protein biosynthesis are discussed in this paper.

Статья посвящена первому этапу биосинтеза белка – реакции аминокислотирования транспортных РНК. Эта реакция катализируется ферментами – аминокислот-тРНК-синтетазами. Аминокислотирование тРНК определяет правильность включения нужной аминокислоты в белок. Обсуждаются механизмы, обеспечивающие высокую точность отбора аминокислот аминокислот-тРНК-синтетазами и их вклад в специфичность белкового синтеза.

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ОТБОРА АМИНОКИСЛОТ В БИОСИНТЕЗЕ БЕЛКА

О. И. ЛАВРИК

Новосибирский государственный университет

ВВЕДЕНИЕ

Биосинтез белков стал центральной проблемой молекулярной биологии с середины 50-х годов, со времени формулирования проблемы генетического кода, адапторной гипотезы белкового синтеза, открытия тРНК и аминокислот-тРНК-синтетаз. С начала 70-х годов проблема белкового синтеза разделилась на два крупных направления: рибосомное и вне ribосомное – аминокислотирование транспортных РНК (тРНК) аминокислот-тРНК-синтетазами. Наряду с рибосомным, второе направление продолжает привлекать к себе внимание, что вполне объяснимо. Взаимодействие тРНК с аминокислот-тРНК-синтетазами представляет собой интереснейшую систему для понимания белково-нуклеинового узнавания, то есть фундаментального вопроса всех этапов переноса генетической информации в клетке. Аминокислот-тРНК-синтетазы осуществляют отбор аминокислот и специфических тРНК, уникальная химическая вариабельность которых сочетается с однотипностью их строения. Вторичная структура тРНК описывается так называемым “клеверным листом”, а трехмерная – структурой L-образной формы, которая была установлена методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения.

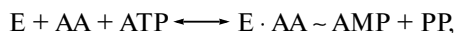
Аминокислот-тРНК-синтетазы образуют самую многочисленную группу ферментов, участвующих в реализации генетической информации. Например, ДНК- и РНК-полимеразы в каждом из биологических видов представлены всего несколькими разными белками, в то же время разных аминокислот-тРНК-синтетаз в каждой клетке не менее двадцати. При единстве функций (активация аминокислот и их перенос на транспортные РНК) синтетазы весьма отличаются по молекулярному весу (от 40 до примерно 300 тыс. дальтон) и могут состоять из одной либо из нескольких полипептидных цепей.

С функциональной точки зрения аминокислот-тРНК-синтетазы обладают исключительно высокой специфичностью в присоединении определенной аминокислоты к специфической тРНК. Это обеспечивается специальными механизмами и абсолютно необходимо для воспроизведения генетически заданной структуры белка. Данная статья посвящена механизмам специфического отбора

аминокислот и обеспечения “сверхспецифичности” аминоацил-тРНК-синтетаз.

Первый этап белкового синтеза в клетке – это отбор специфических аминокислот и их присоединение к транспортным РНК. Реакция катализируется аминоацил-тРНК-синтетазами и протекает в два этапа (рис. 1).

Первая стадия – активация аминокислоты – происходит с участием аденозин-5'-трифосфата (АТФ)

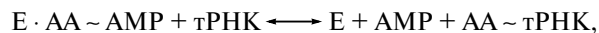


где E – аминоацил-тРНК-синтетаза, AA – аминокислота, АТФ – аденозин-5-трифосфат, PP – пирофосфат, E · AA ~ AMP – комплекс фермента с аминокислотой, AMP – аденозин-5-монофосфат.

Завершается эта стадия формированием связанного с ферментом аминокислоты (рис. 1б). При этом происходит активация аминокислоты в результате гидролиза макроэргической связи в АТФ и отщепления пирофосфата.

Аминокислота активируется путем образования связанного с ферментом смешанного ангидрида с AMP точно таким же образом, как это делает хи-

мик-органик, когда активирует карбоксильную группу, превращая карбоновую кислоту в ацилхлорид или ангидрид. Активированный аминокислотный остаток легко атакует одну из гидроксильных групп рибозного кольца концевой аденозина тРНК. Это приводит к образованию аминоацил-тРНК (рис. 1в)



где AA ~ tRNA – аминоацил-тРНК

Аминоацильный остаток присоединяется к 2'- или 3'-гидроксиду аденозина, который расположен на 3'-конце молекулы тРНК. Это соединение, аминоацил-тРНК, содержит активированную сложноэфирную связь и энергии этой связи вполне достаточно для формирования пептидной связи в процессе биосинтеза белка. Аминоацил-тРНК является завершённым субстратом для биосинтеза белка на рибосомах и далее в процессе белкового синтеза идет узнавание только полимерной части этой молекулы, а именно тРНК (рис. 1г). Это обстоятельство было доказано классическими опытами Франсуа Шапвилля, проведенными в лаборатории Фрица Липпмана. тРНК, специфичная к

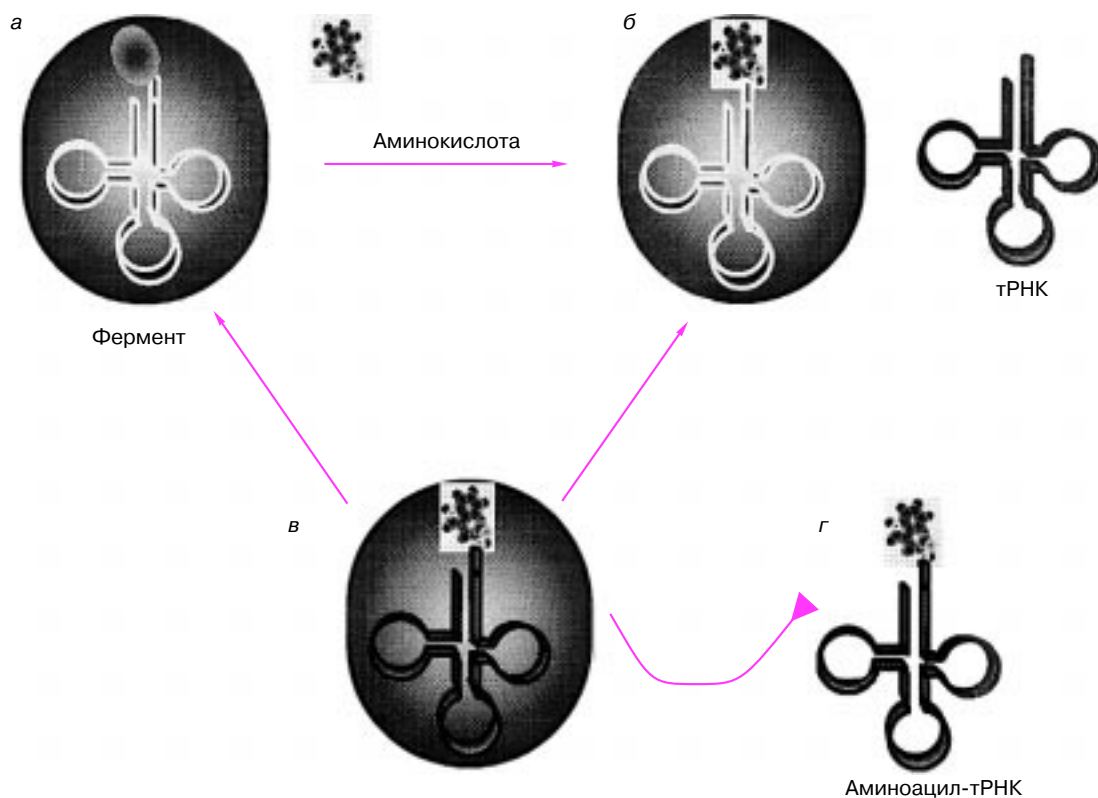


Рис. 1. Схема аминокислотирования тРНК аминокислотами.

а – Фермент – аминокислот-тРНК-синтетаза (для наглядности место связывания тРНК обозначено структурой в виде клеверного листа, место связывания аминокислоты в виде малого овала); б – первая стадия реакции аминокислотирования – активация аминокислоты (тРНК для наглядности представлена вторичной структурой в виде клеверного листа); в – вторая стадия реакции аминокислотирования – связывание тРНК, синтез аминокислот-тРНК; г – синтезированная аминокислот-тРНК – субстрат для биосинтеза белка на рибосомах.

серусодержащей аминокислоте цистеину, была аминокислота цистеинил-тРНК был восстановлен до аланина с помощью катализатора – никеля Рэнея. Результатом явилось получение “неправильно” аминокислотированной тРНК: тРНК, специфичная к цистеину (тРНКЦис), оказалась связанной с остатком аланина. Эта аланил-тРНКЦис вошла в рибосому, связанную с РНК, распознала кодом цистеина, как это и должна была сделать цистеиновая тРНК, но включенным в белок оказался не цистеин, а аланин. Эксперименты доказывали адапторную функцию тРНК и то обстоятельство, что ошибка на стадии аминокислотирования тРНК не исправляется на других этапах белкового синтеза. Следовательно, аминокислотирование тРНК должно происходить безошибочно.

Экспериментальные оценки частоты ошибок, происходящих при биосинтезе белков, приводят к величине $1 \cdot 10^{-4}$. Эта величина включает в себя ошибки, возникающие как на этапе трансляции, так и транскрипции, то есть предшествующей стадии переноса генетической информации.

Что означает этот уровень ошибок в смысле синтеза дефектных молекул белка? Это означает, что среднестатистически одно ошибочное включение аминокислоты произойдет на каждые 10000 остатков актов включения аминокислот в белки. Поскольку в среднем белки несут около 500 остатков, из 10000 аминокислот можно составить 20 белков, а они будут содержать единственную ошибочную аминокислоту в каком-либо положении цепи. Если около 10% всех ошибок серьезно сказываются на биологической функции белка, то из этого следует, что одна молекула белка из 200 синтезированных окажется бесполезной в клеточном метаболизме.

Первой стадией реакции аминокислотирования тРНК является активация аминокислоты с участием АТФ, следовательно, прежде всего фермент должен образовать комплекс с нужной аминокислотой. Способность аминокислот-тРНК-синтетаз различать природные аминокислоты изучена очень подробно. Дискриминация неспецифических аминокислот, способных разместиться в активном центре фермента, в принципе обусловлена тем, что аминокислот-тРНК-синтетаза воспринимает небольшие отличия, существующие между истинным субстратом и неспецифической аминокислотой.

Были проведены обширные исследования по изучению вклада различных участков молекул аминокислот во взаимодействие с аминокислот-тРНК-синтетазами. Речь идет об обычном отборе специфического субстрата на стадии его связывания с активным центром и дальнейшим каталитическим превращением. Аминокислоты построены из специфического радикала, α -аминогруппы и карбоксильной группы. На рис. 2 представлена структурная формула аминокислоты фенилаланина.

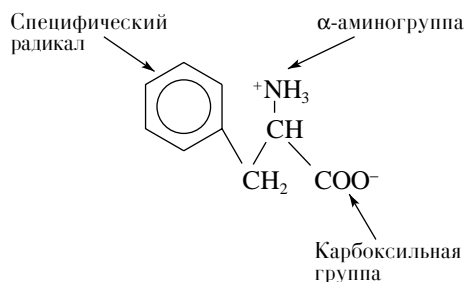


Рис. 2. Структурная формула фенилаланина.

Вклад различных фрагментов молекулы аминокислоты исследовали с помощью неприродных синтетических аналогов аминокислот, в которых были изменены специфический радикал, аминокислотная группа или карбоксильная группа. Например, были удалены либо замещены карбоксильные группы, введены заместители по α -аминогруппам и специфическим радикалам. Было показано для различных аминокислот-тРНК-синтетаз, что необходимым элементом узнавания всех аминокислот является α -аминогруппа. Модификация этой группы приводит к резкому падению сродства аминокислоты к ферменту, то есть неспецифическая группировка аминокислоты дает существенный вклад в энергию связывания и определяет последующее узнавание специфического радикала аминокислот. Как принято считать, карбоксильная группа играет меньшую роль на стадии первичного связывания аминокислоты, однако безусловно важна на последующих каталитических этапах реакции аминокислотирования.

Специфическое распознавание аминокислот аминокислот-тРНК-синтетазами осуществляется за счет взаимодействий со специфическими радикалами аминокислот. Было установлено, что аминокислот-тРНК-синтетазы, специфичные к резко различным по структуре аминокислотам, легко осуществляют отбор нужной аминокислоты на стадии связывания и последующей активации аминокислоты с образованием аминокислот-аденилата. Например, цистеинил-тРНК-синтетаза из кишечной палочки (*E. coli*) и дрожжевая тирозил-тРНК-синтетаза отбирают специфический субстрат только за счет предпочтительной активации с такой высокой точностью, что отпадает необходимость в дополнительных механизмах коррекции. В то же время похожие по структуре аминокислоты могут быть узнаны “не своими” аминокислот-тРНК-синтетазами и даже может происходить их активация с образованием аминокислот-аденилата. Весьма похожими, например, являются следующие аминокислоты: валин, изолейцин, треонин (рис. 3).

Разберем подробнее два примера ошибочной активации этих похожих аминокислот, которые привлекали особенное внимание ввиду их значения для

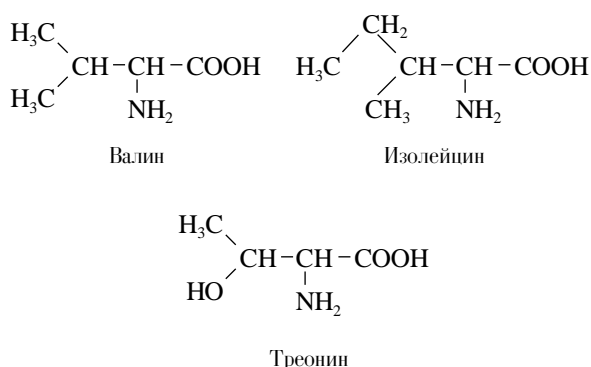
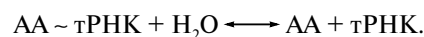


Рис. 3. Структурные формулы валина, изолейцина, треонина.

клетки, и для них были детально изучены механизмы коррекции ошибок. Изолейцил-тРНК-синтетаза способна активировать валин, и валил-тРНК-синтетаза способна активировать изостерическую валину аминокислоту — треонин. Наличие разницы в энергии связывания не до конца обеспечивает в этих случаях точность работы системы аминокислотирования, тем более что концентрация валина в некоторых организмах в 5 раз и более превышает концентрацию изолейцина. Если учитывать реальные соотношения в энергии связывания и скоростях превращения этих аминокислот, а также концентрацию аминокислот в клетке, уровень ошибок должен быть достаточно высок. В частности, в связи с более высокой концентрацией валина реальная ошибка должна была возникать примерно 1 на 20 — 40 актов включения аминокислоты в белок. Но с другой стороны, по реальным оценкам суммарная ошибка для валина, занявшего ошибочно в белке место изолейцина, составляет только 1 на 3000. Таким образом, стало очевидным, что некоторые аминокислот-тРНК-синтетазы обладают дополнительными механизмами коррекции ошибок, которые позволяют дискриминировать неспецифические аминокислоты, структурно схожие с аминокислотой — субстратом.

Еще в ранних опытах, проведенных в лаборатории американского ученого Поля Берга, было замечено, что ошибочно сформированный изолейциновым ферментом валиладенилат гидролизует до валина и АМР при добавлении транспортной РНК, специфичной к изолейцину. То есть специфическая тРНК стимулирует гидролиз “неправильного” промежуточного продукта и не происходит ошибочного присоединения валина к тРНК, специфичной к изолейцину. Поскольку не происходит образования ошибочной аминокислот-тРНК, следовательно, синтетаза функционирует как фермент, непосредственно гидролизующий АТР для разрушения ошибочного продукта.

Впоследствии была обнаружена еще одна гидролитическая функция аминокислот-тРНК-синтетаз: эти ферменты гидролизуют аминокислот-тРНК не по пути обратной реакции с участием АМР, а просто деацилируют свой продукт, то есть



Было высказано предположение, что такой гидролиз может вносить свой вклад в корректирование. Однако для системы изолейцин–валин образования неправильной аминокислот-тРНК выявлено не было, и, следовательно, в этом случае такой механизм не работает.

В то же время при использовании быстрой кинетики английским ученым Аланом Ферштом было показано образование неправильного продукта — соединения треонина с тРНК, специфичной к валину, в присутствии валил-тРНК-синтетазы. Этот продукт был выделен, и было показано, что скорость гидролиза “неправильной” аминокислот-тРНК, содержащей остаток треонина вместо остатка валина, выше в 2000 раз по сравнению с “правильной” валил-тРНК. Для этого фермента было предположено существование специального центра, обеспечивающего гидролиз неправильной аминокислот-тРНК. Как попадает аминокислотный остаток в предполагаемый гидролитический центр? Одна из гипотез состояла в том, что важную роль в этом процессе играет перенос аминокислотного остатка с одного гидроксильного атома концевой аденозин-тРНК на другой. Известно, что аминокислотирование тРНК различными специфическими осуществляется либо по 2'-, либо по 3'-гидроксильному атому концевой аденозин-тРНК. В районе соседнего неакцептирующего гидроксильного атома расположен гидролитический центр. Следует полагать, что неспецифический аминокислотный остаток обладает меньшим сродством к центру активации аминокислоты и легко может подвергнуться 2' → 3' аминокислотному переносу. После попадания в “гидролитический центр” синтетазы происходит быстрое отщепление неправильного аминокислотного остатка от аминокислот-тРНК с участием молекулы воды. Возможно, что гидролитический центр фермента в случае валил-тРНК-синтетазы образует водородную связь с гидроксильной группой треонина. Таким образом, валин связывается с гидролитическим центром гораздо слабее по сравнению с треонином, а это в конечном итоге приводит к менее эффективному гидролизу. Итак, природой создан специфический механизм структурного распознавания аминокислот, который реализуется в двух случаях: один раз для узнавания нужного субстрата на стадии биосинтеза, а другой раз — для узнавания неправильного субстрата на стадии гидролиза.

Механизм функционирования валил-тРНК-синтетазы был наглядно представлен Аланом Ферштом как механизм “двойного сита” (рис. 4). Предполагается, что на первом этапе природные аминокислоты,

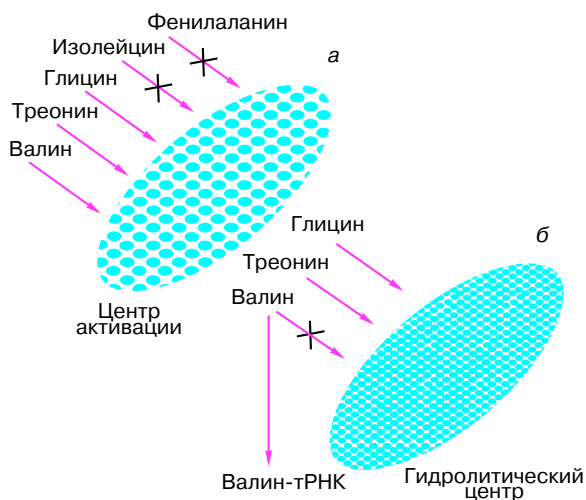


Рис. 4. Механизм “двойного сита”, моделирующий функционирование валил-тРНК-синтетазы. *а* – Большие по размеру аминокислоты не проходят сквозь первое “сито”; *б* – меньшие (или изоэстерические) аминокислоты проходят сквозь второе “сито”.

большие, чем специфический субстрат, “отсеиваются” с достаточной эффективностью за счет простого стерического исключения, тогда как меньшие, или изоэстерические, аминокислоты попадают в аминокисляющую центр и активируются в соответствии с величинами их кинетических характеристик взаимодействия и превращения данной аминокисля-тРНК-синтетазой. Отбраковка неправильных аминокислот осуществляется за счет их отщепления в гидролитическом центре. Последний процесс идет более эффективно для неспецифического аминокисляющего остатка.

Похожий механизм коррекции через гидролиз неправильного продукта реализуется также при биосинтезе ДНК. Многие ДНК-полимеразы имеют гидролизующую 3'-5'-экзонуклеазную активность. Молекула ДНК синтезируется в направлении 5' → 3',

то есть нуклеотиды присоединяются к 3-гидроксильной группе полинуклеотида, а гидролизующая активность работает в обратном направлении. Принцип вырезания “неправильного” основания также основан на уменьшении эффективности связывания основания со специфическим центром, так как специфичность центра определяется основанием матрицы, которое комплементарно правильному и некомплементарно ошибочно включенному нуклеотиду. В целом условие функционирования корректирующего механизма в ферментативном катализе состоит в том, что в ходе реакции должны образовываться легко гидролизующиеся промежуточные соединения или конечный продукт реакции. Коррекция обеспечивается гидролизом “неправильных” продуктов.

Наряду с этим для аминокисля-тРНК-синтетаз был предложен специфический химический механизм, который не предусматривает наличия у этих ферментов специального гидролитического центра. Механизм коррекции весьма прост. В его основе лежит предположение о том, что нежелательные промежуточные соединения диффундируют в раствор, где подвергаются гидролизу, поскольку они нестабильны. Для аминокисля-тРНК-синтетаз промежуточным продуктом являются аминокисляденилаты (ангидриды аминокислот и аденозинмоно-фосфорной кислоты), которые очень нестабильны в водных растворах и гидролизуются с высокими скоростями. Принцип действия такого механизма можно проиллюстрировать схемой аминокисляирования тРНК (рис. 5).

После связывания с аминокисля-тРНК-синтетазой аминокислоты и АТФ образуются промежуточное соединение – комплекс фермент · аминокисляденилат, которое может либо реагировать с тРНК с образованием продуктов, либо диффундирует в раствор и гидролизуются. Если имеет место кинетическое корректирование, ошибочное промежуточное соединение (например, валиладенилат в системе изолейцил-тРНК-синтетазы) диффундирует в раствор и гидролизуются быстрее, чем успевает

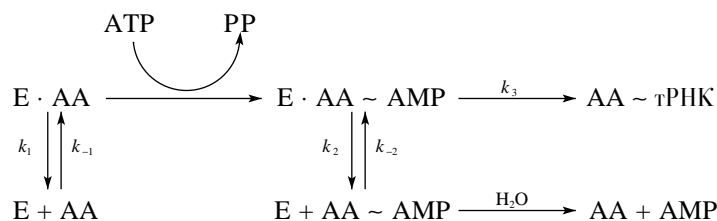


Рис. 5. Механизм исправления ошибок при аминокисляировании тРНК, основанный на нестабильности промежуточного продукта реакции.

E – аминокисля-тРНК-синтетаза, *AA* – аминокислота, *АТФ* – аденозин-5'-трифосфат, *AA ~ AMP* – аминокисляденилат (нестабильный промежуточный продукт), k_1, k_{-1} – константы диссоциации и ассоциации аминокислоты, k_2, k_{-2} – константы диссоциации и ассоциации аминокисляденилата, k_3 – константа скорости образования аминокисля-тРНК.

прореагировать с образованием продуктов, то есть $k_3 \ll k_{-2}$. Для правильного промежуточного соединения $k_3 > k_{-2}$ и имеет место образование продуктов. Следовательно, более эффективное связывание специфического субстрата используется дважды: первый раз при связывании субстрата с ферментом (рис. 5, стадия I) и второй — при связывании специфического промежуточного соединения (рис. 5, стадия II).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аминоацил-тРНК-синтетазы в сравнении, например, с такими ферментами аминокислотного обмена, как протеазы, обладают столь высокой специфичностью, что для обозначения этого феномена был введен термин — сверхспецифичность. Это свойство синтетаз с точки зрения молекулярной энзимологии выглядит тем более уникальным, что задачу специфичности эти ферменты решают дважды. Во-первых, на стадии активации аминокислоты в процессе их специфического отбора и, во-вторых, на стадии взаимодействия с полимерным субстратом — транспортной РНК. Вторая задача не менее сложна, так как транспортных РНК больше двадцати и во многих чертах они имеют сходную структуру. Для акцептирования одной и той же аминокислоты существует зачастую несколько изоакцепторных тРНК, что коррелирует с проблемой вырожденности генетического кода. Но всегда только один фер-

мент искусно осуществляет этот двойной выбор (аминокислоты и тРНК и их воссоединение).

В понимании механизма отбора тРНК в последнее время достигнуты значительные успехи, недаром аминоацил-тРНК-синтетазы вот уже много лет привлекают к себе пристальное внимание как уникальный объект энзимологии и как интереснейшая модель для изучения разнообразных аспектов белково-нуклеинового узнавания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев Л.Л., Фаворова О.О., Лаврик О.И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК. М.: Наука, 1984. 407 с.
2. Ферит Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. 432 с.
3. Лаврик О.И., Моор Н.А. Взаимодействие аминоацил-тРНК-синтетаз с аминокислотами // Молекулярная биология, 1984. Т. 18. С. 1208 — 1232.

* * *

Ольга Ивановна Лаврик, профессор кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета, доктор химических наук, зав. лабораторией биологической химии ферментов Новосибирского института биоорганической химии Сибирского отделения РАН, лауреат Государственной премии СССР, член-корреспондент РАЕН, автор более 170 статей и монографий по энзимологии белкового синтеза и репликации ДНК.