ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РИБОСОМЫ МЕТОДОМ РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ

И. Н. СЕРДЮК

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

THE STUDY OF A RIBOSOMAL STRUCTURE BY THE NEUTRON SCATTERING METHOD

I. N. SERDYUK

Some physical aspects of structural organization of the ribosome revealed by neutron scattering method are discussed.

Обсуждаются некоторые физические аспекты структурной организации рибосомы, выявленные с помощью метода рассеяния нейтронов.

С физической точки зрения рибосома является молекулярной машиной с размерами около 250 Å, синтезирующей белки из аминокислот по программе, закодированной в специальной матричной РНК. С химической точки зрения рибосома является нуклеопротеидом, состоящим из специальных рибосомных РНК и различных рибосомных белков. Комбинация нескольких десятков макромолекул разной химической структуры образует уникальную частицу, в которой все стадии процесса биосинтеза белка координированы в пространстве и времени [1].

Как объект структурных исследований рибосома привлекает внимание физиков, химиков и биологов с момента ее открытия (в 1956 году). В течение первого десятилетия наибольший прогресс в понимании общих черт, характеризующих рибосому, был достигнут в основном двумя физическими методами: ультрацентрифугированием и электронной микроскопией (рис. 1). Во-первых, было обнаружено, что целая рибосомная частица прокариотических клеток имеет константу седиментации 70S[1] и состоит из двух неравных субчастиц (большой и малой), слабо ассоциированных друг с другом и имеющих константы седиментации 50S и 30S соответственно. Во-вторых, было показано, что белковый компонент каждой рибосомной частицы состоит из многих разных белков (21 белок для 30S и 34 белка для 50S субчастицы). В-третьих, было открыто, что каждая компактная субчастица может быть развернута в единый рибонуклеопротеидный тяж без отщепления рибосомных белков и фрагментации рибосомных РНК. Это открытие привело к концепции рибонуклеопротеидного тяжа и инициировало следующие открытия, согласно которым каждая субъединица рибосом может быть реконструирована из соответствующих рибосомных РНК и белков. С помощью

[1] Константа седиментации частицы S (сведберг по имени шведского ученого – A. Swedberg) определяется скоростью ее оседания на единицу центробежного ускорения и связана с параметрами частицы следующей формулой $S = [M(1 - \bar{\upsilon}\rho_0)]/f_0$. В этой формуле M – масса частицы, $\bar{\upsilon}$ – ее парциальный удельный объем, ρ_0 – плотность растворителя, а f_0 – константа поступательного трения. Из формулы следует, что при сохранении формы частицы и ее парциального удельного объема, то есть плотности, константа седиментации является просто мерой ее молекулярной массы.

© Сердюк И.Н., 1999

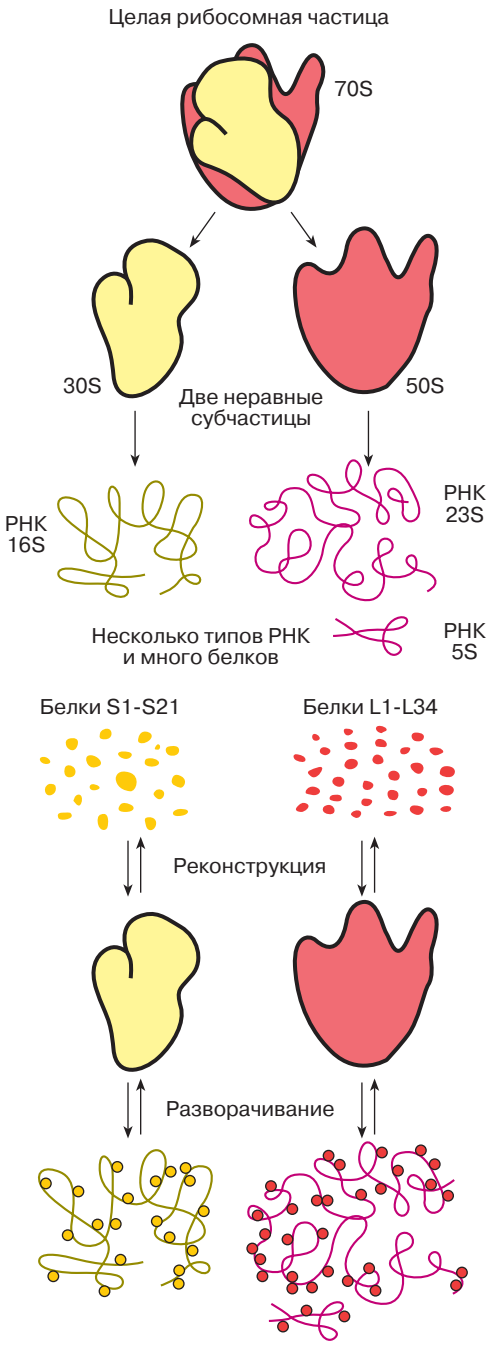

Рис. 1. Основные черты структурной организации рибосом, установленные с помощью ультрацентрифугирования и электронной микроскопии

электронной микроскопии была установлена общая морфология рибосомы и ее субчастиц.

К концу 60-х годов нейтронная физика была развита настолько, что появилась возможность изучения структуры рибосомы с помощью нейтронного рассеяния [2]. Для таких исследований наиболее подходящими оказались так называемые тепловые нейтроны, то есть нейтроны, имеющие кинетическую энергию, сравнимую с кинетической энергией газа при комнатной температуре. Длина волны таких нейтронов около 1,5 Å. Максимальный поток нейтронов в реакторах, где в качестве замедлителя используется легкая или тяжелая вода при комнатной температуре, приходится именно на эту область длин волн. Этот диапазон длин волн оптимален для определения координат атомов, поскольку расстояние между атомами имеют тот же порядок величины. Холодный замедлитель (например, дейтерий при температуре около 20°K) сдвигает максимум потока нейтронов в сторону больших длин волн (4–6 Å). Такие длины волн оптимальны для большинства малоугловых нейтронных спектрометров, предназначенных для изучения структуры рибосомы с помощью рассеяния нейтронов [2].

Нейтроны рассеиваются на ядрах атомов. Размеры ядер имеют порядок 10^{-12} см, что на четыре порядка меньше длины волны тепловых нейтронов. Вследствие этого амплитуда рассеянной нейтронной волны является изотропной, действительной и практически не зависит от энергии нейтрона для всех основных атомов, входящих в состав биополимеров. Однако знак и величина амплитуды рассеяния нерегулярным образом зависят от заряда и массового числа ядра, а также от взаимной ориентации спинов нейтрона и ядра. Используя эту зависимость, физики развили несколько экспериментальных подходов в малоугловом рассеянии нейтронов. Каждый из этих подходов позволяет изменять контраст в широких пределах, высвечивая по отдельности РНК и белковый компоненты рибосомной частицы. Именно такая вариация контраста обеспечивает возможность получения с помощью рассеяния нейтронов структурной информации, практически недоступной таким физическим методам, как ультрацентрифугирование, электронная микроскопия и рассеяние рентгеновских лучей.

Существенное различие между рассеивающими свойствами атома водорода и атома дейтерия приводит к тому, что значение плотности амплитуд рассеяния легкой воды мало и отрицательно ($-0{,}56 \times \times 10^{-12}$ см), тогда как значение плотности амплитуд рассеяния тяжелой воды велико и положительно ($+6{,}35 \cdot 10^{-12}$ см) [3]. Плотности амплитуд рассеяния РНК и белкового компонентов рибосомы имеют промежуточные значения. Поэтому, помещая рибосомную частицу в разные H_2O–D_2O смеси, легко достичь ситуации, когда один из компонентов рибосомы становится невидимым. Теоретические расчеты и эксперимент показывают, что рассеяние от белкового компонента устраняется в ~40% D_2O, а рассеяние от РНК-компонента – ~70% D_2O в смесях H_2O–D_2O. Главное достоинство этого метода заключается в простоте и возможности менять не только рассеивающие свойства растворителя, но и

рассеивающие свойства частицы. Последнее достигается за счет выращивания биологической культуры на дейтерированной среде. В процессе такого выращивания атомы дейтерия встраиваются в биомакромолекулу, и в дальнейшем часть из них (около 3/4) неспособна к обмену на атомы водорода. Таким образом, контраст в этом методе может меняться либо за счет изменения рассеивающих свойств самой частицы (биосинтетическое дейтерирование), либо за счет изменения рассеивающих свойств растворителя (разные H_2O–D_2O смеси).

Рибосомные РНК располагаются преимущественно в центре рибосомных частицы [4]. Применение метода вариации контраста с использованием разных H_2O–D_2O смесей показало, что РНК и белок не распределены однородно в этой частице, а более плотный с нейтронной точки зрения компонент (рибосомная РНК) располагается преимущественно в ее центре. Более того, количественная интерпретация полученных значений радиусов инерции РНК и белкового компонентов привела к выводу, что рибосомная РНК в обеих субчастицах упакована в компактное ядро, так что связывающиеся с рибосомной РНК рибосомные белки локализуются в основном на периферии частицы (рис. 2).

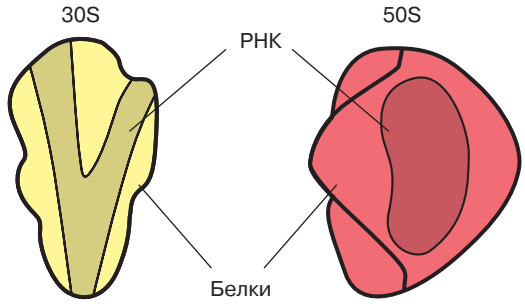

Рис. 2. Схематическая демонстрация центрального расположения РНК в рибосомных частицах. РНК окрашена более темным цветом

Рибосомные белки в растворе имеют глобулярную конформацию [5]. В начале 70-х годов появились две точки зрения на конформацию рибосомных белков. Согласно первой, основанной на данных иммуноэлектронной микроскопии, малоуглового рентгеновского рассеяния и гидродинамики, рибосомные белки не являются обычными глобулярными белками, а представляют собой сильно вытянутые частицы. Согласно другой точке зрения, развитой моими коллегами в Институте белка РАН и основанной на данных сканирующей микрокалориметрии, измерений оптических и ЯМР-спектров, рибосомные белки являются белками с большим количеством вторичной структуры, хорошо развитой и кооперативно плавящейся третичной структурой.

Решающие эксперименты по доказательству глобулярности рибосомных белков были получены с помощью измерения радиусов инерции рибосомных белков в D_2O, где отношение сигнал/фон максимально и надежные измерения могут быть проведены в концентрации 1 мг/мл, при которой рибосомные белки не агрегируют [5]. Эти измерения показали, что нейтронные радиусы инерции рибосомных белков в растворе относительно малы и характерны для компактных, а не вытянутых или развернутых молекул. Они соответствовали радиусам инерции обычных глобулярных белков (таких, как лизоцим, миоглобин, гемоглобин) равного молекулярного веса (рис. 3).

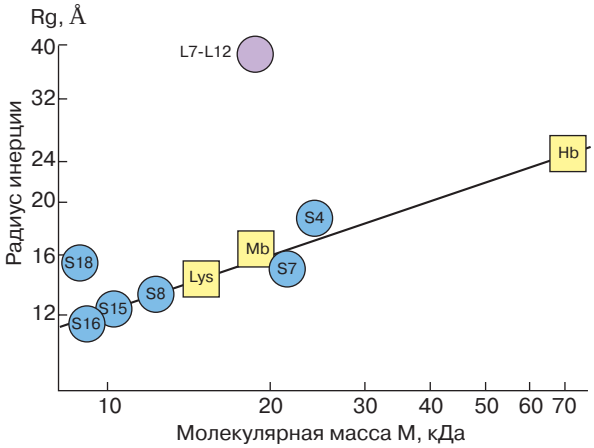

Рис. 3. Доказательство компактной (глобулярной) структуры ряда рибосомных белков в растворе. Зависимость нейтронных размеров (радиусов инерции) (в Å) для некоторых рибосомных белков (обведены кружочками) от их молекулярной массы (в кДа) в двойном логарифмическом масштабе аналогична таковым для обычных глобулярных белков (лизоцим, миоглобин, гемоглобин) (обведены квадратами). Исключением является рибосомный белок большой субчастицы L7-L12, образующий в растворе палочкообразный димер. Высокая асимметрия этого белка приводит к тому, что значение его радиуса инерции располагается существенно выше прямой, имеющей наклон 1/3. Для однородной частицы радиус инерции R_g зависит от ее размеров и формы

Недавние успехи в кристаллизации рибосомных белков, анализ их структуры рентгеновской дифракцией в кристалле и анализ структуры рибосомных белков в растворе с помощью ЯМР полностью подтвердили нейтронные данные, полученные почти 20 лет назад о структуре рибосомных белков [6].

Рибосомные РНК способны к самоорганизации [7]. Как было указано ранее, рибосомные компоненты способны реконструироваться *in vitro* в функционально активную частицу. Такая реконструкция означает, что должно существовать узнавание каждой молекулой своего места на рибосоме. В этой связи

возникает вопрос о том, способны ли изолированные рибосомные РНК без рибосомных белков образовывать трехмерный каркас, сравнимый по своим размерам и форме с таковым в составе рибосомных субчастиц, или для этого требуется определенный набор рибосомных белков. Для решения этой проблемы нейтронные кривые рассеяния для 30S и 50S рибосомных частиц в растворителе, где вклад в рассеяние вносят только рибосомные РНК (~40% D_2O в смеси H_2O–D_2O), были выбраны как стандартные кривые, описывающие трехмерный каркас рибосомных РНК. Эти кривые рассеяния сравнивали последовательно с кривыми рассеяния от соответствующих рибосомных РНК (16S и 23S РНК) в изолированном состоянии и в комплексе с рибосомными белками. Очевидно, что если при определенном наборе рибосомных белков в комплексе кривая рассеяния от РНК в составе субчастицы совпадает с кривой рассеяния от РНК в составе комплекса, то это будет означать, что набор белков в комплексе достаточен для образования такого трехмерного каркаса. Не исключалась и возможность того, что сами рибосомные РНК и вовсе без рибосомных белков способны приобретать и сохранять в растворе структуру, неотличимую по компактности от ее структуры в составе рибосомных субчастиц. Главный итог такого нейтронного исследования (рис. 4) состоял в том, что общее специфическое сворачивание рибосомных РНК в условиях реконструкции определяется ее собственными внутримолекулярными взаимодействиями, однако дополнительное сворачивание (около 1/4 ее линейных размеров) обеспечивается рибосомными белками. Было установлено, что определенный набор рибосомных белков (6 для 16S РНК и 9 для 23S РНК) необходим и достаточен для того, чтобы рибосомные РНК принимали конформацию, по компактности неотличимую от таковой в составе рибосомных частиц.

В процессе биосинтеза белка рибосома осциллирует между двумя конформациями, отличающимися геометрическими размерами [8]. Одним из ключевых вопросов структурной рибосомологии является вопрос о том, как изменяется сама рибосомная частица в процессе биосинтеза белка. Ответ на этот вопрос получить очень трудно, так как функционирующая рибосома слишком сложна для прямого изучения физическими методами и в настоящее время нет физических подходов для изучения рибосомного цикла в масштабе реального времени.

В качестве первого шага такого исследования простая вариация контраста в нейтронном рассеянии была применена для изучения различия в компактности рибосомы в двух функциональных состояниях. Обнаружено, что величины нейтронных радиусов инерции рибосомы в двух состояниях различны. Отсюда сделан вывод о том, что транслокация делает рибосому менее компактной. Сразу же возник вопрос о том, является ли такое изменение компактности рибосомы следствием смещения

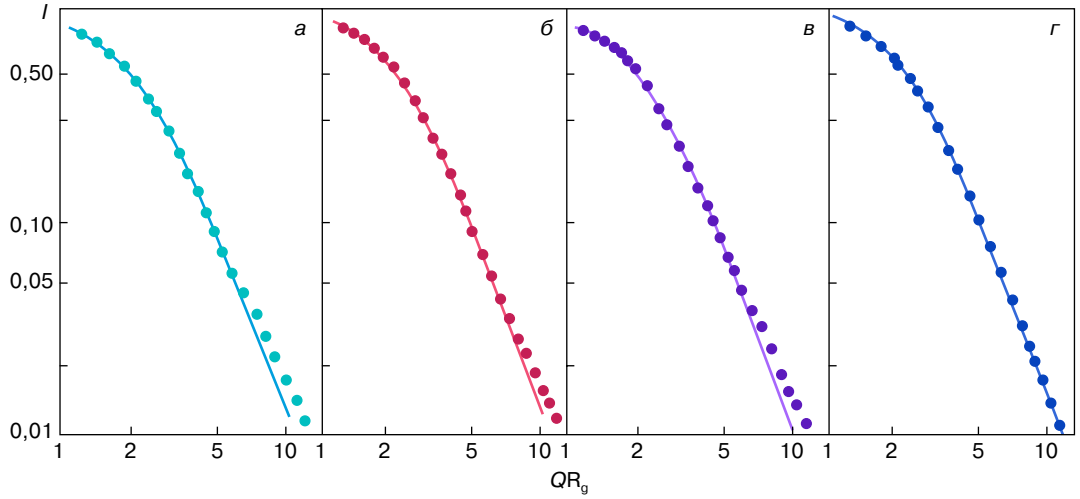

Рис. 4. Нейтронные эксперименты, доказывающие, что общее специфическое сворачивание рибосомной 16S РНК в условиях реконструкции определяется ее собственными внутримолекулярными взаимодействиями, а дополнительное сворачивание (около 1/4 ее линейных размеров) обеспечивается рибосомными белками. Зависимость интенсивности рассеяния нейтронов от произведения радиуса инерции R_g на модуль вектора рассеяния Q ($Q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, где λ – длина волны нейтрона, а θ – половина угла рассеяния) в двойном логарифмическом масштабе наглядно показывает, что по мере добавления рибосомных белков к рибосомной 16S РНК кривые рассеяния от комплексов 16S РНК с белками (точки) приближаются к кривой рассеяния для 30S субчастицы в 40% D_2O (сплошная линия), то есть к кривой рассеяния для 16S РНК в составе 30S субчастицы: *а* – изолированная 16S РНК в буфере для реконструкции, *б* – комплекс 16S РНК с одним белком (S4), *в* – комплекс 16S РНК с четырьмя белками (S4, S7, S8 и S15), *г* – комплекс 16S РНК с шестью белками (S4, S7, S8, S15, S16 и S17)

одной субъединицы относительно другой, или это изменение затрагивает только одну из субъединиц, и если да, то какую. Получить ответ на этот вопрос, исследуя нативную (протонированную) 70S рибосомную частицу в разных H_2O–D_2O смесях, невозможно, поскольку 30S и 50S субчастицы при таком подходе неотличимы друг от друга с нейтронной точки зрения. Для решения этого вопроса *E. coli* была выращена одновременно на протонированной и дейтерированной среде, и четыре типа 70S гибридных изотопных частиц были получены комбинацией из протонированных и дейтерированных рибосомных компонентов (рис. 5). Исследование таких частиц в двух функциональных состояниях позволило прийти к двум выводам. Во-первых, компактность малой, а не большой субчастицы изменяется при транслокации. Во-вторых, расстояние между субъединицами также меняется. На основании этих нейтронных данных была постулирована следующая модель рибосомы как динамической машины.

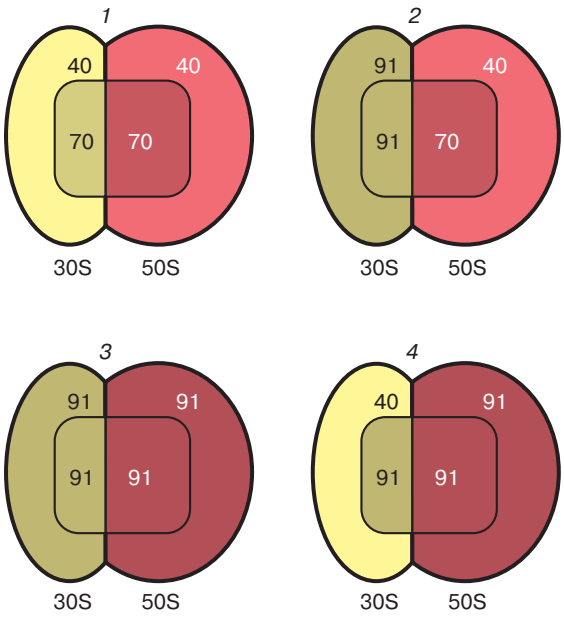

Рис. 5. Четыре типа рибосомных 70S гибридных изотопных частиц, исследованных в двух функциональных состояниях. Клетки *E. coli* выращены параллельно на обычной (протонированной) и дейтерированных средах. Разные типы 70S рибосомных частиц получены комбинацией из протонированных и дейтерированных рибосомных компонентов. В первом типе частиц вклад в рассеяние вносят РНК и белковый компоненты обеих субчастиц, во втором – РНК и белковый компоненты большой субчастицы, в третьем – белковый компонент малой субчастицы. В четвертом типе частиц вклады в рассеяние РНК и белкового компонентов в обеих субчастицах одинаковы (однородная частица). Цифры внутри каждой компоненты означают ее рассеивающую амплитуду, выраженную в относительных величинах (в % D_2O)

Рибосома осциллирует между двумя конформерами, отличающимися по геометрическим размерам. Активной (пульсирующей) частью рибосомы является 30S субчастица. Было предположено, что движение ее головки относительно пассивной 50S субчастицы и есть главный механический акт транслокации [8].

Некоторые перспективы. Из изложенного ясно, что, несмотря на все успехи малоуглового рассеяния нейтронов в изучении рибосомы, определение ее структуры с достаточно высоким пространственным разрешением далеко от решения. Это связано с тем, что метод малоуглового рассеяния, будь то нейтронов или рентгеновских лучей, по своей физической природе относится к методам низкого разрешения: потеря фазы при усреднении по всем ориентациям приводит к драматической потере информации.

Успехи в кристаллизации как рибосомы, так и отдельных субчастиц породили у исследователей надежду на быструю расшифровку ее структуры стандартными методами белковой кристаллографии. Однако эти методы (например, изоморфное замещение с помощью тяжелых атомов) фактически неприменимы к рибосоме минимум по двум причинам. Во-первых, рибосомные частицы имеют очень большую молекулярную массу и, во-вторых, их химический состав очень сложен. Поэтому использование стандартного подхода к описанию кривизны рибосомных частиц для обнаружения функции молекулярной упаковки и фазирования малоугловых рефлексов ведет к большим погрешностям из-за того, что рибосома является типичной двухфазной системой с существенно разными электронными плотностями РНК и белкового компонентов. Отсюда следует, что одним из необходимых условий решения фазовой проблемы является наличие надежных

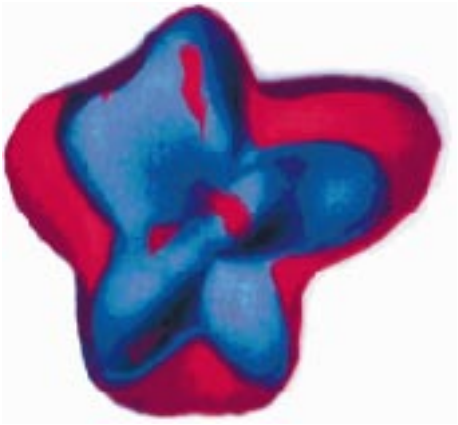

Рис. 6. Общая форма 50S рибосомной частицы (красный цвет) и ее РНК (синий), полученная методом сферических гармоник. Пространственное разрешение около 40 Å

двухфазных моделей рибосомы соответствующего пространственного разрешения.

В настоящее время разработан общий подход к построению таких моделей, основанный на методе сферических гармоник. Один из примеров такого построения для 50S субчастицы рибосом с пространственным разрешением 35 Å показан на рис. 6 [9]. Дальнейшее увеличение пространственного разрешения возможно только путем совместного использования рентгеновской дифракции в кристалле и малоуглового рассеяния в растворе. Возможность получения двухфазной модели рибосомных частиц позволяет использовать их для получения функции упаковки в кристалле и фазирования рентгеновских дифракционных данных. Для построения такой модели для 70S рибосомной частицы *Th. thermophilus* с пространственным разрешением ~20 Å объединили свои усилия ученые Института белка РАН (Пущино), Института кристаллографии РАН (Москва), Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ (Дубна) и Европейской лаборатории по молекулярной биологии (Гамбург).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Спирин А.С.* Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986.

2. *Аксенов В.Л.* // Природа. 1996. № 2. С. 3–17.

3. *Останевич Ю.М.*, *Сердюк И.Н.* // Успехи физ. наук. 1982. Т. 137. С. 85–114.

4. *Serdyuk I.N.*, *Grenader A.K.*, *Zaccai G.* // J. Mol. Biol. 1979. Vol. 135. P. 691–699.

5. *Serdyuk I.N.*, *Zaccai G.*, *Spirin A.S.* // Ibid. 1978. Vol. 94. P. 349–353.

6. *Liljas A.*, *Garber M.B.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. Vol. 5. P. 721–726.

7. *Vasiliev V.D.*, *Serdyuk I.N.*, *Gudkov A.T.*, *Spirin A.S.* // Structure, Function and Genetics of Ribosomes. N.Y.: Springer-Verlag, 1986. P. 128–142.

8. *Serdyuk I.N.*, *Baranov V.I.*, *Tsalkova T.N. et al.* // Biochimie. 1992. Vol. 74. P. 299–305.

9. *Svergun D.I.*, *Koch M.H.J.*, *Pedersen J.S.*, *Serdyuk I.N.* // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 240. P. 78–86.

* * *

Игорь Николаевич Сердюк, доктор физико-математических наук, профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ, зав. лабораторией Института белка РАН (Пущино), зав. группой лаборатории нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований (Дубна), лауреат Государственной премии СССР по науке и технике. Область научных интересов – структурная молекулярная биология. Автор около 100 научных работ.