

9. *Leucyl-tRNA* and *arginyl-tRNA* synthetases of wheat germ. Inactivation and ribosome effect / J.-R. Carias, M. Mouricout, B. Quintard et al. // *Eur. J. Biochem.*—1978.—87, N 3.—P. 583—590.
10. *Потапов А. П., Овчаренко Г. В., Солдаткин К. А.* Получение и характеристика 40S- и 60S-субчастиц рибосом из печени кролика / *Методы молекуляр. биологии: Сб. науч. тр.*—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 100—105.
11. *Берестецкая Ю. В., Смирнов В. В., Сургучев А. П.* Двухмерный электрофорез рибосомных белков из штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, несущих рецессивную супрессорную мутацию // *Биол. науки.*—1981.—№ 3.—С. 20—21.
12. *Шеррер К.* Выделение РНК и изучение ее свойств с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы // *Методы вирусологии и молекуляр. биологии.*—М.: Мир, 1972.—С. 337—354.
13. *Изучение комплексов аминоксил-тРНК синтетаз печени кролика при экспериментальном инфаркте миокарда / Л. Л. Иванов, Л. Ю. Лукшявичюс, М. И. Коваленко и др. // Укр. биохим. журн.*—1983.—55, № 4.—С. 368—371.
14. *Распределение лейцил-тРНК синтетазной активности в безрибосомных экстрактах печени кролика и миокарда свиньи / Л. Л. Иванов, З. П. Мартинкус, Р. Р. Стапуленис и др. // Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 3.—С. 67—70.
15. *Chuang H. J. K., Bell F. E.* Use of a thermal inactivation technique to obtain binding constants for the *Escherichia coli* valyl-tRNA synthetase // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1972.—152, N 2.—P. 502—514.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев
Каунас. мед. академия

Получено 11.09.91

УДК 577.216.3

Б. К. Искаков, К. И. Мадин

ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА 45S РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ ЧАСТИЦ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

В субрибосомной фракции цитоплазматического экстракта зародышей пшеницы обнаружены относительно гомогенные (45S) рибонуклеопротеидные (РНП) частицы, содержащие значительное количество быстрометящейся РНК. Величина плавучей плотности 45S РНП-частиц в градиенте концентрации CsCl составляет 1,50 г/см³ и следовательно, они не являются свободными цитоплазматическими информосомами. В состав частиц входят: 17S рРНК, быстрометящаяся гетерогенная (6-16S) РНК, обладающая высокой матричной активностью, и ряд низкомолекулярных РНК, из которых наиболее представлена РНК (5,3S) длиной 135 нуклеотидов. Анализ белков 45S частиц двухмерным электрофорезом выявил две группы полипептидов. Первая группа представлена типичными структурными белками рибосом (M_r 10 000—50 000). Ко второй группе можно отнести высокомолекулярные полипептиды (40 000—120 000), среди которых, вероятно, присутствуют полипептиды факторов инициации трансляции. Предполагается, что 45S РНП-частицы представляют собой нативный преинициаторный трансляционный комплекс [мРНК·40S·eIF·Met-tRNA_i·GTP], который может накапливаться *in vivo* как интермедиат инициации трансляции.

Введение. В цитоплазме эукариотических клеток мРНК находится в составе как полирибосомных, так и внеполирибосомных рибонуклеопротеидных (мРНП) частиц. Эти частицы были названы «информосомами» как переносчики структурной информации [1]. Цитоплазматические внеполирибосомные (свободные) информосомы имеют универсальное распространение в эукариотических клетках и представляют собой класс частиц, отличающихся от рибосом и их субъединиц по коэффициентам седиментации и плавучей плотности в CsCl [2, 3]. Свободные информосомы обладают рядом характерных общих свойств, главным из которых является то, что их коэффициент седиментации зависит от такового образующей их мРНК и превышает его в 2—2,5 раза. При этом плавучая плотность информосом в CsCl составляет от 1,36 до 1,48 г/см³, причем плотность главного компонента всегда равна 1,40 г/см³ независимо от коэффициента седиментации [4].

Вместе с тем в цитоплазме ряда клеток животных обнаружены относительно гомогенные РНП-частицы с коэффициентом седиментации

40—50S, содержащие РНК, быстро метящуюся радиоактивными предшественниками [4—9]. Их обозначают как 45S РНП-частицы [4] или, иногда, как нативные 40S (рибосомные) субчастицы [10]. Как правило, в составе этих частиц обнаруживается существенное количество новосинтезированной быстрометящейся РНК, которую часто отождествляют с мРНК. Это обстоятельство послужило причиной многочисленных экспериментальных работ и дискуссий, посвященных установлению природы 45S РНП-частиц [4—12]. Однако, обобщая результаты этих исследований, нельзя сделать однозначного вывода о природе 45S РНП-частиц клеток животных и вопрос до сих пор остается открытым.

В настоящей работе представлены данные по изучению локализации новосинтезированной быстрометящейся РНК в клетках высших растений. Обнаруженные нами в цитоплазме зародышей пшеницы субрибосомные РНП-частицы по своим физико-химическим характеристикам и по составу аналогичны 45S частицам клеток животных. Обсуждается вопрос о природе 45S РНП-частиц зародышей пшеницы.

Материалы и методы. Зародыши пшеницы (сорт Казахстанская 4) отделяли от эндосперма по методике Джонстона и Стерна [13]. Проращивание зародышей, инкубацию с [³H]уридином и получение безмитохондриального цитоплазматического экстракта (S23) проводили, как описано ранее [14]. Время проращивания зародышей составляло 12 ч, время инкубации с радиоактивным предшественником — 30 мин.

Выделение субклеточных фракций. Безмитохондриальный цитоплазматический экстракт (S23) обрабатывали тритоном X-100 (20 мин в конечной концентрации 0,5 %), наслаивали на 1 М сахарозу (4 мл экстракта на 1 мл сахарозы), которую готовили на буфере для гомогенизации (0,02 М триэтаноламин-HCl, pH 7,6, 0,25 М сахароза, 0,1 М KCl, 0,003 М MgCl₂, 0,005 М 2-меркаптоэтанол), и центрифугировали при 105 000 g в течение 60 мин в роторе SW-55. Первый осадок (P1) обозначен как полирибосомная фракция. Надосадочную жидкость наслаивали на 0,5 М сахарозу и центрифугировали в том же режиме в течение 3 ч. Второй осадок (P2) обозначен как рибосомная фракция. Надосадочную жидкость центрифугировали еще раз в прежнем режиме в течение 5 ч. Конечный осадок (P3) обозначен как субрибосомная фракция, а надосадочная жидкость (S100) — как безрибосомный цитоплазматический экстракт или цитозоль. Полученные осадки суспендировали в стандартном буфере (буфер для гомогенизации без сахарозы) и центрифугировали при 15 000 g для удаления агрегатов. Осветленную таким образом суспензию после измерения в ней УФ-поглощения при 260 нм и кислотоосаждаемой радиоактивности подвергали седиментационному и плотностному анализам.

Седиментационный анализ. В зависимости от размеров анализируемых молекул использовали различные (5—20 % и 10—50 %) градиенты концентрации сахарозы. Тип ротора и режимы центрифугирования указаны в подписях к рисункам.

Плотностный анализ проводили в преформированном градиенте плотности CsCl (1,3—1,7 г/см³), как описано ранее [14]. Во фракциях градиентов определяли УФ-поглощение при 260 нм, кислотоосаждаемую радиоактивность и количество белка.

Выделение и анализ РНК. РНК выделяли фенольным методом, как описано ранее [15], и анализировали в градиенте (10—30 %) концентрации сахарозы, а также электрофорезом в градиентном (2—15 %) полиакриламидном геле [ПААГ] с 7 М мочевиной [16].

Электрофорез белков в 12,5 %-ном ПААГ с 0,1 %-ным DS-Na осуществляли по методу Лэммли [17].

Двухмерный электрофорез белков в ПААГ с электрофокусированием в присутствии мочевины в первом направлении и электрофорезом в присутствии DS-Na — во втором проводили по методу О'Фаррелла [18] с небольшими модификациями [15].

Матричную активность РНК оценивали по ее способности стимулировать включение L-[³⁵S]метионина (удельная радиоак-

тивность 9 ПБк/моль, производство «Радиопрепарат» ИЯФ АН Узбекистана) в кислотоосаждаемые полипептиды при трансляции в бесклеточной системе зародышей пшеницы, как описано ранее [19].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены результаты седиментационного анализа новосинтезированной быстрометящейся РНК, содержащейся в полирибосомной (P1), рибосомной (P2) и субрибосомной (P3) фракциях клеток зародышей пшеницы. В полирибосомной фракции (рис. 1, а) содержится значительное количество 80S монори-

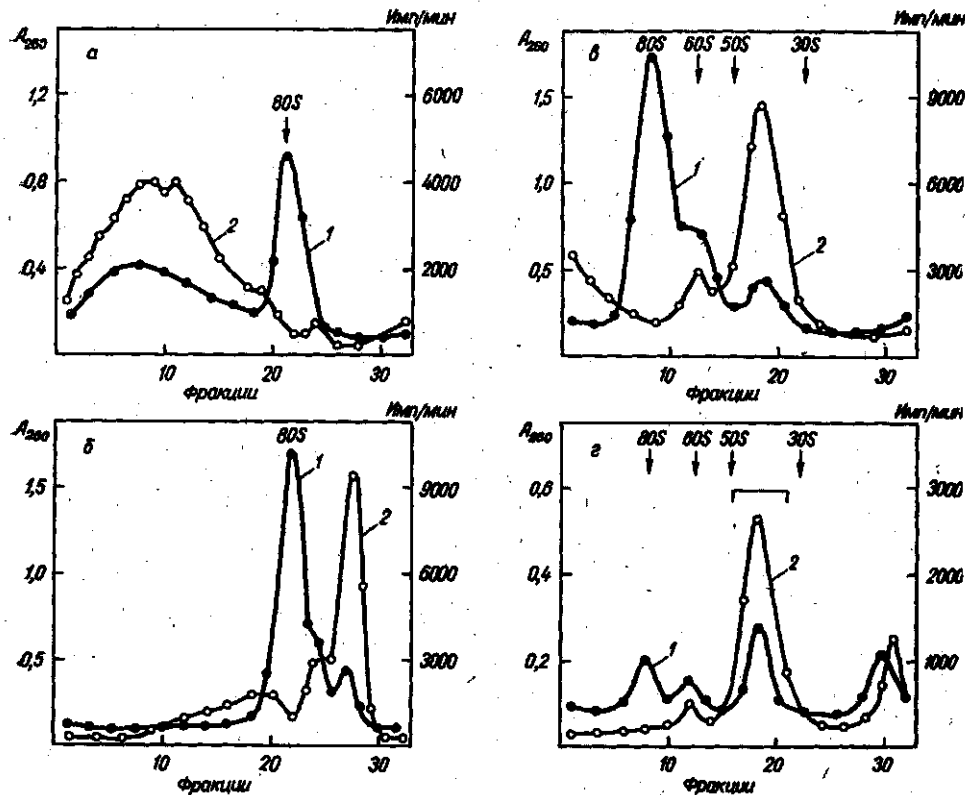


Рис. 1. Седиментационный анализ новосинтезированной быстрометящейся $[^3\text{H}]$ уридином РНК, содержащейся в полирибосомной (а), рибосомной (б, в) и субрибосомной (г) фракциях цитоплазмы зародышей пшеницы: 1 — A_{260} ; 2 — радиоактивность. Условия центрифугирования: ротор SW-41, 105 000 g, 3 °C, 2 ч, 10–50 %-ный сахарозный градиент — для а и б; 3 ч, 5–20 %-ный сахарозный градиент — для в и г

босом, однако практически вся радиоактивная РНК седиментирует быстрее 80S, по-видимому, в составе полирибосом.

При анализе рибосомной фракции (P2) в 10–50 %-ном градиенте концентрации сахарозы (рис. 1, б) по УФ-поглощению наблюдаются два компонента — главный (80S), соответствующий монорибосомам, и минорный (45S), соответствующий нативным 40S рибосомным субчастицам (40SC4). Небольшое плечо на правом склоне пика монорибосом соответствует 60S рибосомным субчастицам (60SC4). Часть быстрометящейся РНК распределяется гетерогенно в предрибосомной зоне градиента и, по-видимому, находится в составе легких полирибосом, не осевших в полирибосомную фракцию (P1). Большая часть новосинтезированной РНК распределяется в пострибосомной зоне сахарозного градиента в виде двух относительно гомогенных компонентов — главного (45S) и минорного (60S). Рибосомы и, следовательно, рибосомная РНК практически не содержат радиоактивной метки, в то время как структуры с коэффициентом седиментации около 45S имеют наибольшую удельную радиоактивность. Для того чтобы повысить разрешающую способность в пострибосомной зоне, материал рибосомной фрак-

ции (P2) анализировали в пологом (5–20 %) градиенте концентрации сахарозы (рис. 1, в). Из этого анализа отчетливо видно, что новосинтезированная РНК в пострибосомной зоне градиента седиментирует преимущественно в составе частиц с коэффициентом седиментации около 45S.

На рис. 1, г, представлен результат седиментационного анализа субрибосомной фракции (P3). Материал, поглощающий в УФ-области, отражает распределение рибосом, рибосомных субчастиц, растворимых

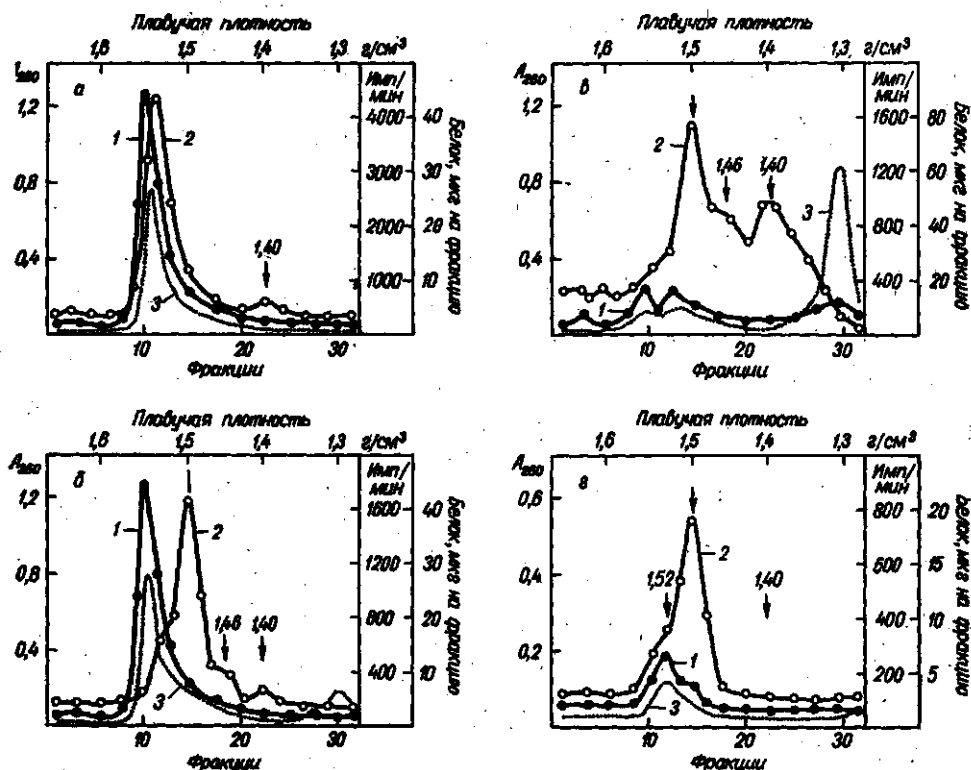


Рис. 2. Плотностный анализ в градиенте CsCl материала полирибосомной (а), рибосомной (б), субрибосомной (в) фракций и 45S фракции сахарозного градиента (г), собранной, как показано на рис. 1, г: 1 — A_{280} ; 2 — радиоактивность; 3 — распределение белка. Условия центрифугирования: ротор SW-65, 105 000 g, 3 °C в течение 20 ч

белков и транспортной РНК. Новосинтезированная высокомолекулярная РНК, так же как в случае рибосомной фракции, обнаруживается главным образом в составе 45S РНП-частиц. Лишь незначительная ее часть находится в составе 60SC4.

Таким образом, в цитоплазме клеток прорастающих зародышей пшеницы присутствуют относительно гомогенные 45S РНП-частицы, содержащие значительное количество (около 20 %) быстрометящейся новосинтезированной РНК. Естественно возникает вопрос о природе этих частиц.

Поскольку плотностный анализ РНП-частиц дает дополнительную информацию для суждения об их природе, материал полирибосомной (P1), рибосомной (P2) и субрибосомной (P3) фракций анализировали в градиенте плотности CsCl (рис. 2). Прежде всего следует напомнить, что у высших растений плавучая плотность в CsCl для 80S монорибосом составляет 1,54–1,55 g/cm^3 ; 60SC4 — 1,56–1,57 g/cm^3 ; 40SC4 — 1,52–1,53 g/cm^3 ; полирибосом — 1,51–1,53 g/cm^3 ; информсом — 1,40–1,44 g/cm^3 [20, 21].

Из рис. 2, а, видно, что практически вся новосинтезированная РНК полирибосомной фракции распределяется в зоне с плавучей плотностью 1,50–1,54 g/cm^3 , характерной для полирибосом, хотя присутствует и

минорный компонент с плотностью $1,40 \text{ г/см}^3$, характерной для информсом зародышей пшеницы. Распределение белка по градиенту полностью совпадает с распределением УФ-поглощающего материала, что свидетельствует о его локализации в составе РНП-частиц. Свободный белок (плавучая плотность $1,30\text{--}1,35 \text{ г/см}^3$) отсутствует.

В рибосомной фракции (рис. 2, б) УФ-поглощающий материал представлен главным образом рибосомами (плавучая плотность $1,54\text{--}1,55 \text{ г/см}^3$). Радиоактивный материал распределяется в градиенте CsCl достаточно гомогенно с максимумом в зоне с плавучей плотностью $1,50 \text{ г/см}^3$. Выявляются также два минорных компонента с плотностями $1,46$ и $1,40 \text{ г/см}^3$. Распределение белка по градиенту в основном совпадает с распределением УФ-поглощающего материала. Однако наличие белка в зоне с плотностью $1,3\text{--}1,32 \text{ г/см}^3$ свидетельствует о том, что в препарате рибосомной фракции содержится определенное (около 10 % от суммарного белка) количество свободных белков.

В субрибосомной фракции (рис. 2, в) УФ-поглощающий материал представлен двумя компонентами с плавучими плотностями $1,55$ и $1,52 \text{ г/см}^3$. Первый компонент соответствует, по-видимому, неразделившимся монорибосомам и 60SC4, второй — 40SC4. Радиоактивный материал распределяется в градиенте CsCl аналогично таковому в рибосомной фракции, т. е. имеются главный компонент с плотностью $1,50 \text{ г/см}^3$ и два минорных, но достаточно хорошо выраженных, с плотностями $1,46$ и $1,40 \text{ г/см}^3$. Компонент с плотностью $1,40 \text{ г/см}^3$ представлен, по-видимому, свободными цитоплазматическими информсомами. Два других компонента с плотностями $1,50$ и $1,46 \text{ г/см}^3$ ранее уже наблюдались в цитоплазматических экстрактах прорастающих зародышей пшеницы [22] и было предположено, что они соответствуют комплексам информсом с 40SC4 или монорибосомой, однако природа этих компонентов далее не выяснялась. Анализ содержания белка во фракциях градиента (см. рис. 2, в) свидетельствует о том, что препарат субрибосомной фракции содержит большое количество (около 90 % суммарного белка) свободных белков, распределяющихся в широкой зоне с плотностями $1,30\text{--}1,35 \text{ г/см}^3$.

Сопоставляя результаты седиментационного (см. рис. 1) и плотностного (см. рис. 2) анализов рибосомной и субрибосомной фракций, можно сделать заключение, что главный радиоактивный компонент с плотностью $1,50 \text{ г/см}^3$ на рис. 2 соответствует 45S частицам на рис. 1 или, иначе говоря, 45S частицы имеют плавучую плотность $1,50 \text{ г/см}^3$. Для того чтобы убедиться в этом, был проведен плотностный анализ 45S фракции, вычлененной из сахарозного градиента, как указано на рис. 1, г. На рис. 2, г, приведен результат этого анализа. По УФ-поглощению обнаруживается главный компонент с максимумом в зоне с плотностью $1,52 \text{ г/см}^3$, характерной для 40SC4. В этой зоне содержится около 20 % радиоактивного материала, который может представлять собой новосинтезированную 17S рРНК, находящуюся в составе новообразованных 40SC4. На правом склоне УФ-пика выявляется небольшое плечо с плотностью $1,50 \text{ г/см}^3$, на которое приходится около 70 % радиоактивного материала, взятого в анализ. По-видимому, в 45S фракции сахарозного градиента находятся по крайней мере два типа РНП-частиц: 1 — 40SC4 (включая новообразованные), которые присутствуют в большем количестве, но содержат меньше радиоактивной РНК; 2 — собственно 45S частицы, присутствующие в небольшом количестве, но содержащие РНК с наибольшей удельной радиоактивностью. Свободные информсомы ($1,40\text{--}1,44 \text{ г/см}^3$) в препарате не обнаруживаются.

Очевидно, что если бы все меченые 45S частицы являлись новообразованными 40SC4, то их плавучая плотность в CsCl должна была составлять $1,52 \text{ г/см}^3$. В случае, если бы частицы являлись комплексами свободной (не связанной с белком) мРНК и 40SC4, то плавучая плотность таких комплексов должна была быть больше таковой 40SC4 (т. е. больше, чем $1,52 \text{ г/см}^3$). Наконец, если эти частицы являются свободными информсомами, то величина их плавучей плотности дол-

жна быть $1,40 \text{ г/см}^3$. Величина плавучей плотности 45S частиц, равная $1,50 \text{ г/см}^3$, занимает промежуточное положение между плотностью 40SC4 ($1,52 \text{ г/см}^3$) и свободных информосом ($1,40 \text{ г/см}^3$). Можно предположить, что 45S РНП-частицы зародышей пшеницы представляют собой комплексы 40SC4 со свободными информосомами.

Дальнейшее изучение 45S частиц вели в направлении анализа РНК и белков, входящих в их состав.

Для выяснения природы 45S РНП-частиц важное значение имеет изучение природы новосинтезированной РНК. С этой целью анализу подвергли РНК, входящие в состав полирибосом и 45S частиц, поскольку

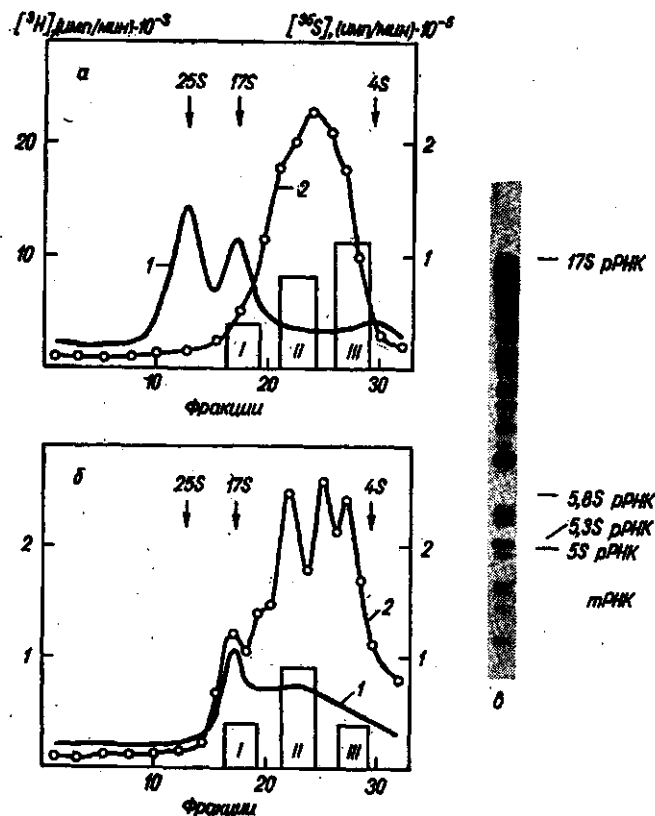


Рис. 3. Анализ РНК, выделенных из полирибосом (а) и из 45S фракции сахарозного градиента (б, в), собранной, как указано на рис. 1, г: 1 — A_{260} ; 2 — радиоактивность. Трансляционную активность РНК, содержащихся в различных зонах сахарозных градиентов: I — 15—18S; II — 10—15S; III — 6—10S, определяли, как описано в разделе «Материалы и методы». Условия центрифугирования: ротор SW-50.1, 105 000 г, 16 °С, 6 ч; 10—30 %-ный сахарозный градиент — для а и б; в — электрофорез РНК 45S фракции в 2—15 %-ном градиентном ПААГ с 7 М мочевиной

ку именно в этих структурах находится практически вся новосинтезированная РНК (см. рис. 1). На рис. 3, а, приведено седиментационное распределение РНК, выделенной из полирибосом, из которого видно, что рибосомные РНК не содержат радиоактивной метки, а вся новосинтезированная быстрометящаяся РНК распределена гетерогенно в интервале 6—16S с максимумом около 12S. Такое распределение характерно для мРНК.

Анализ РНК 45S частиц в градиенте сахарозы (рис. 3, б) показал, что в препарате не содержится 25S рРНК, а присутствуют 17S рРНК, гетерогенная по размеру РНК (6—16S) и небольшое количество низкомолекулярных РНК (4—6S). Около 20 % радиоактивности приходится на новосинтезированную 17S рРНК, однако большая часть быстрометящейся РНК распределяется гетерогенно в интервале 6—16S, что характерно для мРНК.

Другим критерием матричной природы РНК является ее способ-

ность направлять синтез белка *in vitro*. Для измерения матричной активности из сахарозных градиентов, в которых анализировали РНК полирибосом (см. рис. 3, а) и РНК 45S частиц (рис. 3, б), вычленили три зоны: I — 15—18S, II — 10—15S, III — 6—10S и содержащиеся в них РНК транслировали в бесклеточной системе зародышей пшеницы. Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что новосинтезированная РНК, содержащаяся в обоих типах РНП-структур, обладает высокой матричной активностью и в случае РНК 45S частиц максимум этой активности приходится на зону 10—15S. Очевидно, что отождествление новосинтезированной РНК с мРНК справедливо толь

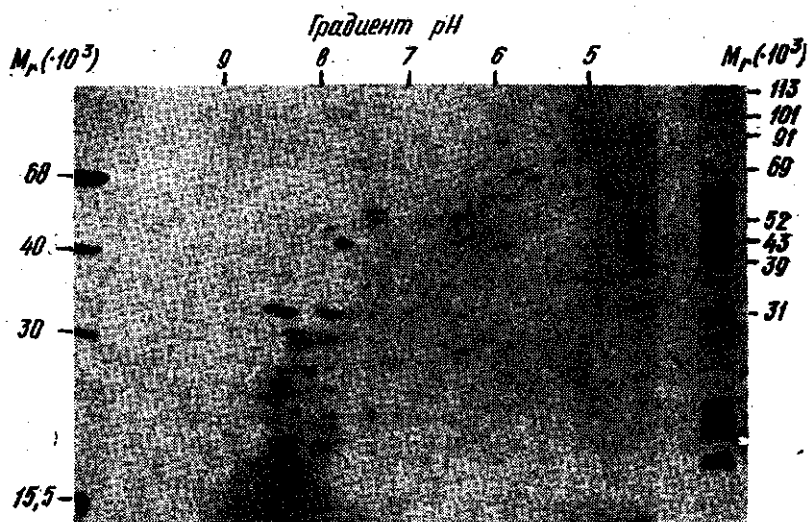


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ белков, содержащихся в 45S фракции, собранной, как указано на рис. 1, г

ко при коротких периодах инкубации зародышей пшеницы с радиоактивным предшественником (до 30 мин). При более длительной инкубации радиоактивная метка начинает активно включаться в рибосомные, транспортные и другие виды РНК.

Анализ РНК 45S частиц электрофорезом в 2—15 %-ном градиентном ПААГ (рис. 3, в) подтвердил результаты седиментационного анализа и выявил в низкомолекулярной зоне характерный набор РНК. Помимо высокомолекулярных в препарате содержится небольшое количество тРНК, а также ряд дискретных низкомолекулярных РНК, из которых наиболее представлена РНК (5,3S) длиной около 135 нуклеотидов.

Для анализа белков, входящих в состав 45S частиц, использовали материал 45S фракции, вычлененной из сахарозного градиента, как показано на рис. 1, г. В качестве контроля чистоты этого материала использовали данные его плотностного анализа в градиенте CsCl (см. рис. 2, г). Как видно, препарат не содержит свободных белков (плавучая плотность 1,30—1,32 г/см³) и представлен, по-видимому, смесью малых рибосомных субчастиц и 45S частиц. Поскольку нам не удалось далее разделить материал на эти составляющие, мы можем привести лишь суммарный полипептидный состав 45S фракции. Белки 45S фракции анализировали электрофорезом в ПААГ с DS-Na и двухмерным электрофорезом (рис. 4). Из приведенных данных следует, что большая часть полипептидов представлена типичными структурными белками рибосом с M_r от 10 000 до 50 000, распределенными в щелочной зоне градиента pH. Вместе с тем в препарате присутствуют и полипептиды, составляющие характерную группу, отличную от рибосомных белков. К этой группе можно отнести высокомолекулярные полипептиды (M_r 40 000—120 000), распределяющиеся в слабощелочной

зоне градиента рН и присутствующие в небольших количествах. Из многочисленных полипептидов этой группы обращает на себя внимание полипептид с M_r 52 000, имеющий изоэлектрическую точку около 6,5 и присутствующий в значительном количестве. Аналогичный пептид обнаруживается и в составе полирибосомных информосом зародышей пшеницы [14, 15], следовательно, можно предположить, что в составе 45S частиц этот полипептид также связан с мРНК. Вполне вероятно, что во вторую группу входят полипептиды информосомных белков и факторов инициации трансляции.

Таким образом, в субрибосомной фракции цитоплазматического экстракта зародышей пшеницы обнаружены относительно гомогенные 45S РНП-частицы, содержащие значительное количество новосинтезированной быстрометящейся РНК. Анализ в градиенте CsCl показал наличие в 45S фракции по крайней мере двух типов РНП-частиц с плавучими плотностями 1,50 и 1,52 г/см³ и отсутствие свободных информосом (плотность 1,40 г/см³). По-видимому, оба типа РНП-частиц содержат 40SC4, так как в их составе находится 17S рРНК, часть которой является радиоактивно меченной. Однако большая часть новосинтезированной быстрометящейся РНК имеет матричную природу и находится в составе РНП-частиц с плотностью 1,50 г/см³ (собственно 45S частицы). Кроме упомянутых высокомолекулярных РНК, в 45S фракции обнаружено небольшое количество тРНК, а также ряд низкомолекулярных РНК с размерами в интервале 120—200 нуклеотидов. Структура и функции наиболее представленной из них, обозначенной как 5,3S РНК (длина около 135 нуклеотидов), в настоящее время исследуются. Наконец, полипептиды, содержащиеся в 45S фракции, можно разделить на две группы: 1 — рибосомные (рИ 8—9; M_r 10 000—50 000); 2 — нерибосомные (рИ 4,5—7; M_r 40 000—120 000). Во вторую группу могут входить полипептиды информосомных белков, а также факторов инициации трансляции.

Обобщая экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, можно предположить, что 45S РНП-частицы зародышей пшеницы являются комплексами 40SC4 со свободными информосомами, которые функционально тождественны преинициаторным трансляционным комплексам, содержащим 40SC4, мРНП, белковые факторы инициации трансляции, GTP и инициаторную метионил-тРНК.

Что касается 45S РНП-частиц клеток животных, то первоначально имелись две точки зрения на их природу. Согласно первой, вся меченая РНК этих частиц представлена 18S рибосомной РНК и, следовательно, сами 45S частицы являются новосинтезированными предшественниками 40SC4, которые появляются в цитоплазме быстрее, чем 60SC4 [5], и почему-то содержат гораздо больше белка по сравнению со зрелыми 40SC4 [9, 11]. Согласно второй точке зрения, меченая РНК в составе 45S частиц представляет собой РНК матричного типа, а 45S частицы являются комплексами мРНК [6—8] или мРНП [12] с 40SC4 и рассматриваются как промежуточная стадия перехода мРНК в полирибосомы. Позднее было выдвинуто третье предположение, заключающееся в том, что 45S РНП-частицы могут быть специфическими для быстроделющихся клеток информосомами, содержащими, очевидно, гомогенную по молекулярной массе мРНК, либо мРНК в зоне 45S может оказаться примесью за счет наложения гетерогенно седиментирующих информосом [4, 9].

Свойства 45S частиц животных клеток можно суммировать следующим образом. Частицы имеют достаточно гомогенное распределение в градиенте концентрации сахарозы в области 40—50S, несмотря на то, что в их составе обнаруживается некоторое количество гетерогенной РНК, подобной мРНК. У ретикулоцитов кролика в составе 45S частиц была обнаружена гомогенная по размеру (9S) глобиновая мРНК [10, 23]. В градиенте плотности CsCl частицы распределяются в виде нескольких (от двух до семи) дискретных компонентов с плавучими плотностями в интервале от 1,38 до 1,53 г/см³, причем преобладают по

массе компоненты с плотностями 1,46—1,51 г/см³ [9, 24, 25]. Рибонуклеиновый компонент 45S частиц представлен 18S рРНК, мРНК и низкомолекулярной РНК (4—6S). Наличие 18S рРНК показано во всех работах, посвященных изучению 45S частиц. Присутствие мРНК в составе частиц также показано многочисленными исследованиями, причем мРНК была идентифицирована по седиментационному распределению в градиенте концентрации сахарозы [6], электрофоретическому распределению в агарозном геле [26], по эффективности гибридизации с гомологичной ДНК [7], по способности направлять синтез полипептидов в бесклеточной системе трансляции [6, 23]. Присутствие в составе 45S частиц низкомолекулярных РНК было доказано на ретикулоцитах кролика [23], однако природа их не была установлена. Вместе с тем имеются данные о том, что в состав 45S частиц входит инициаторная Met-тРНК [24, 27]. Анализ белкового компонента свидетельствует в пользу того, что в состав 45S частиц входят структурные белки 40SC4 [23, 26]. Кроме этих белков, обнаруживаются дополнительные высокомолекулярные полипептиды, многие из которых соответствуют полипептидам инициаторных трансляционных факторов eIF-2 и eIF-3 [23]. Остальные из нерибосомных полипептидов не идентифицированы, но, вполне вероятно, могут соответствовать другим инициаторным факторам и (или) белкам мРНК [23, 28].

Сравнивая свойства и компонентный состав 45S РНП-частиц клеток животных и растений, можно заключить, что они весьма сходны между собой.

Авторы выражают благодарность Л. П. Овчинникову и сотрудникам лаборатории регуляции биосинтеза белка Института белка АН СССР за обсуждение и критические замечания по работе.

Резюме. В субрибосомной фракции цитоплазматического экстракта зародков пшеницы выявлено относительно гомогенные (45S) рибонуклеопротеидные (РНП) частицы, которые содержат значительное количество РНК, которая быстро митируется радиоактивными поперечниками. Величина плавучей плотности 45S РНП-частиц в градиенте концентрации CsCl составляет 1,50 г/см³, и, как следствие, они не являются свободными цитоплазматическими информосомами. В состав частиц входят: 17S рРНК, гетерогенная (6-16S) РНК, которая быстро митируется и имеет высокую матричную активность, и ряд низкомолекулярных РНК, из которых наиболее представлена РНК (5,3S) длиной 135 нуклеотидов. Анализ белков 45S частиц методом электрофореза выявил две группы полипептидов. К первой относятся типовые структурные белки рибосом (с молекулярной массой (10—50) · 10³), ко второй — высокомолекулярные полипептиды ((40—120) · 10³), среди которых, вероятно, присутствуют полипептиды факторов инициации трансляции. Препаруется, что 45S РНП-частицы — это нативный преинициаторный трансляционный комплекс [мРНК · 40S · eIF · Met-tRNA_i · GTP], который может накапливаться *in vivo* как интермедиат инициации трансляции.

Summary. Relatively homogeneous 45S ribonucleoprotein particles, containing considerable amount of a newly synthesized rapidly labeled RNA, have been detected in subribosomal fraction of cytoplasmic extract from germinating wheat embryos. These particles have the buoyant density of about 1.50 g/cm³ and apparently are not represented by free cytoplasmic informosomes. The isolated particles contain 17S rRNA, rapidly labeled heterogeneous (6—16S) RNA with strong messenger activity and several low molecular weight RNAs among which the 5.3S RNA (of about 135 nt) is the most abundant. According to 2D-PAGE two groups of polypeptides can be revealed in the particles. Polypeptides of the first group (10—50 kDa) correspond to structural ribosomal proteins. The second group consists of higher molecular weight polypeptides (40—120 kDa) and may include polypeptides of translation initiation factors. The 45S particles may represent a native [mRNP · 40S · eIFs · Met-tRNA_i · GTP] complex which may occur *in vivo* as a translatable intermediate in the initiation sequence.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spirin A. S. Non-ribosomal ribonucleoprotein particles (informosomes) of animal cells / The mechanisms of protein synthesis and its regulation. — New York, 1972. — Vol. 27. — P. 515—536.

2. *Preobrazhensky A. A., Spirin A. S.* Informosomes and their protein components: The present state of knowledge // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*—1978.—21.—P. 1—37.
3. *Spirin A. S., Ajtkhozhin M. A.* Informosomes and polyribosome associated proteins in eukaryotes // *Trends biochem. sci.*—1985.—10, N 4.—P. 162—165.
4. *Ovchinnikov L. P., Spirin A. S.* Ribonucleoprotein particles in cytoplasmic extracts of animal cells // *Naturwissenschaften.*—1970.—57, N 11.—P. 514—521.
5. *Entrance of newly formed messenger RNA and ribosomes into HeLa cell cytoplasm / M. Girard, H. Latham, S. Penman, J. E. Darnell // J. Mol. Biol.*—1985.—11, N 2.—P. 187—201.
6. *Henshaw E. C., Revel M., Hiatt H. H.* A cytoplasmic particle bearing messenger ribonucleic acid in rat liver // *Ibid.*—14, N 1.—P. 241—256.
7. *McConkey E. H., Hopkins J. W.* Subribosomal particles and the transport of messenger RNA in HeLa cells // *Ibid.*—P. 257—270.
8. *Joklik W. K., Becker Y.* Studies on the genesis of polyribosomes. II. The association of nascent messenger RNA with the 40S subribosomal particle // *Ibid.*—13, N 2.—P. 511—520.
9. *Пострибосомные РНК-содержащие частицы цитоплазмы животных клеток по данным анализа в градиенте CsCl / Л. П. Овчинников, Н. В. Белицина, А. Ц. Аванесов, А. С. Спирин // Докл. АН СССР.*—1969.—186, № 5.—С. 1202—1205.
10. *Zehavi-Willner T., Danon D.* Complexes of messenger RNA and 40-S subunit in rabbit reticulocytes // *Eur. J. Biochem.*—1973.—33, N 2.—P. 258—264.
11. *Perry R. P., Kelley D. E.* Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes // *J. Mol. Biol.*—1968.—35, N 1.—P. 37—59.
12. *Huang A. S., Baltimore D.* Initiation of polyribosome formation in poliovirus-infected HeLa cells // *Ibid.*—1970.—47, N 3.—P. 275—291.
13. *Johnston F. B., Stern H.* Mass isolation of viable wheat embryo // *Nature.*—1957.—179.—P. 160—161.
14. *Искаков Б. К., Айтхожин М. А.* Белки информосом, связанных с полирибосомами, из прорастающих зародышей пшеницы // *Молекуляр. биология.*—1979.—13, № 5.—С. 1124—1129.
15. *Искаков Б. К., Айтхожин М. А.* Выделение белков информосом и анализ их с помощью двумерного электрофореза // *Методы молекуляр. биологии, биохимии и биотехнологии растений.*—Алма-Ата: Наука, 1988.—168 с.
16. *Электроэлюция нуклеиновых кислот из полиакриламидных гелей и определение нуклеотидной последовательности РНК / К. И. Мадин, Н. Ж. Каримов, Б. К. Искаков, Н. О. Накисбеков // Там же.—С. 158.*
17. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
18. *O'Farrell P. H.* High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.*—1975.—250, N 10.—P. 4007—4021.
19. *The synthesis of high-molecular-weight proteins in the wheat germ translation system / M. D. Morch, G. Drugeon, W. Zagorski, A. L. Haenni // Meth. Enzymol.*—1986.—118.—P. 154—164.
20. *Ajtkhozhin M. A., Beklemishev A. B., Nazarova L. M.* Dissociation and density characteristics of ribosomes of plant cells // *FEBS Lett.*—1972.—21, N 1.—P. 42—44.
21. *Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U., Doschanov Kh. I.* Informosomes of germinating wheat embryos // *Ibid.*—1973.—31, N 1.—P. 104—106.
22. *Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U.* Release of mRNP particles of informosome type from polyribosomes of higher plant embryos // *Ibid.*—1974.—41, N 2.—P. 275—279.
23. *Buhl W.-Ju., Sarre T. F., Hilse K.* Characterization of a native mRNA containing preinitiation complex from rabbit reticulocytes: RNA and protein constituents // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1980.—93, N 3.—P. 979—987.
24. *On the heterogeneity of native ribosomal subunits in Ehrlich-ascites-tumor cells cultured in vitro / W. J. van Venrooy, A. P. M. Janssen, J. H. Hoeymakers, B. M. de Man // Eur. J. Biochem.*—1976.—64, N 2.—P. 429—435.
25. *Vangdal E., Elkhom Th. S.* Analysis of the population of the native 40S ribosomal subunits in mouse plasmacytoma cells grown in suspension culture // *Ibid.*—1980.—107, N 1.—P. 15—23.
26. *Nikolaev N., Welfle H., Hadjiolov A. A.* Characterization of a free cytoplasmic ribonucleoprotein particle carrying messenger-like ribonucleic acid // *FEBS Lett.*—1972.—27, N 21.—P. 235—239.
27. *Smith K. E., Richards A. C., Arnstein H. R. V.* The binding of Met-tRNA_i to isolated 40-S ribosomal subunits and the formation of Met-tRNA_i-80-S ribosome initiation complexes // *Eur. J. Biochem.*—1976.—62, N 2.—P. 243—245.
28. *Sundkvist J. C., Staehelin Th.* Structure and function of free 40-S ribosome subunits: characterization of initiation factors // *J. Mol. Biol.*—1975.—99, N 3.—P. 401—418.

Ин-т молекуляр. биологии и биохимии
им. М. А. Айтхожина АН КазССР, Алма-Ата

Получено 22.07.91