

12. Alexander S. S., Jr., Colonna G., Edelhoeh H. The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 5.—P. 1501—1505.
13. Lai Ch.-S., Tooney N. M., Ankel E. G. Structure and flexibility of plasma fibronectin in solution: electron spin resonance spin-label, circular dichroism and sedimentation studies // *Biochemistry*.—1984.—23, N 26.—P. 6396—6397.
14. Circular dichroic analysis of immunoglobulins in phylogenetic perspective / G. W. Litman, D. Frommel, A. Rosenberg, R. A. Good // *Biochim. et biophys. acta.*—1971.—236, N 3.—P. 647—654.
15. A study of the structure of fibronectin / V. E. Koteliansky, M. A. Glukhova, M. V. Bejanian et al. // *Eur. J. Biochem.*—1981.—119, N 3.—P. 619—624.
16. Distribution of secondary structure along the fibronectin molecule / S. Yu. Venyaminov, M. L. Metsis, M. A. Chernousov, V. E. Koteliansky // *Ibid.*—1983.—135, N 3.—P. 485—489.
17. Chose A. C., Jirgensons B. Circular dichroism studies of the variable and constant halves of kappa-type Bence-Jones proteins // *Biochim. et biophys. acta.*—1971.—251, N 1.—P. 14—20.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.—743 с.
19. Keil-Douha V., Planchetaut T. Potential proteolytic activity of human plasma fibronectin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 15.—P. 5377—5381.
20. Beaven G. H., Holiday E. R. Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids // *Adv. Protein Chem.*—1952.—7.—P. 319—386.

Ин-т ревматологии АМН СССР, Москва
Крым. мед. ин-т, Симферополь

Получено 23.03.88

FIBRONECTIN CONFORMATION WITH DIFFERENT IONIC STRENGTH
OF THE SOLUTION AS DETERMINED BY CIRCULAR DICHROISM METHODS
AND THERMAL-PERTURBATION DIFFERENTIAL SPECTROSCOPY

Yu. K. Sykulev, S. Yu. Tetin, S. P. Atamas, [L. I. Matuiskaya],
A. F. Panasyuk, G. V. Troitsky

Institute of Rheumatology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow
Crimean Medical Institute, Simferopol

S u m m a r y

Conformation of plasma fibronectin was determined by circular dichroism and thermal perturbation differential spectroscopy with different ionic strength of the solution. It was found that conformational transition in fibronectin molecule, induced by an increase of the ionic solution strength was followed by no changes in secondary and tertiary structure of protein but was a result of changes in relative arrangement and domain-domain interaction in space.

УДК 547.963.32

А. И. Зинченко, И. Л. Попов, В. Н. Барай, И. А. Михайлопуло

**5'-ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ
И ИХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ
ИНТАКТНЫМИ КЛЕТКАМИ ERWINIA HERVICOLA:
СПЕЦИФИЧНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ДОНОРА
ФОСФАТНОЙ ГРУППЫ И АКЦЕПТОРА**

*Изучена нуклеозидфосфотрансферазная реакция, катализируемая интактными клетками *Erw. herbicola* 47/3. Показано, что среди исследованных доноров фосфатной группы при фосфорилировании аденозина до АМР наиболее эффективным оказался п-нитрофенилфосфат. Эффективность нуклеозидов рибо-ряда в качестве акцепторов фосфата убывает в ряду гуанозин > уридин > риботимидин > цитидин > аденозин > инозин > ксантозин. 2'-Дезоксинуклеозиды оказались менее эффективными акцепторами фосфатной группы в сравнении с соответствующими рибонуклеозидами.*

Введение. Нуклеозид-5'-монофосфаты представляют интерес для физико-химической биологии, медицины и пищевой промышленности. В настоящее время существуют следующие принципиальные возможности

получения этих соединений: 1) гидролиз ДНК или РНК нуклеазами; 2) ферментация штаммов, продуцирующих нуклеотиды; 3) химическое и ферментативное фосфорилирование соответствующих нуклеозидов. Для получения природных рибо- и дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов в основном используются два первых способа. В случае же синтеза модифицированных нуклеотидов применяются химические и ферментативные методы.

Методы химического 5'-фосфорилирования не обладают должной степенью специфичности, что вызывает в ряде случаев необходимость предварительной защиты функциональных групп нуклеозида и последующего их деблокирования. При этом выходы желаемых соединений нестабильны и колеблются в широком интервале значений в зависимости от структуры исходного нуклеозида [1].

Ферментативные способы свободны от указанных недостатков. Кроме того, исходные субстраты в значительно меньшей мере расходуются на образование побочных продуктов реакции. Последнее особенно важно при фосфорилировании труднодоступных модифицированных нуклеозидов. В качестве биокатализаторов при ферментативном фосфорилировании нуклеозидов наиболее часто применяют нуклеозидфосфотрансферазы [2—9].

Нуклеозидфосфотрансферазы (КФ 2.7.1.77) катализируют трансформацию нуклеозидов в 5'-, 2'- или 3'-моносфосфаты, используя в качестве доноров фосфатных групп некоторые низкоэнергетические моноэфиры фосфорной кислоты. Для синтеза 5'-моонуклеотидов, в том числе и модифицированных, пригодны препараты нуклеозидфосфотрансфераз, выделенные из моркови [3, 4], проростков пшеницы [6, 8] и различных бактерий [2, 7]. Последние, на наш взгляд, являются более перспективными из-за простоты получения, поскольку в качестве ферментного препарата можно использовать целые микробные клетки [2, 7, 9]. Кроме того, бактериальные препараты характеризуются значительно меньшим содержанием интерферирующих фосфатаз [2, 5, 10]. Немаловажен также и тот факт, что с помощью селекции можно сравнительно быстро улучшать бактериальные штаммы по требуемым параметрам.

Несмотря на широкое изучение различных свойств бактериальных нуклеозидфосфотрансфераз [2, 7, 10—12], вопрос о субстратной специфичности этих ферментов, особенно по отношению к модифицированным в углеводной части молекулы нуклеозидам, исследован недостаточно. В связи с этим задачей настоящего исследования явилось изучение возможности синтеза клетками *Erw. herbicola* 47/3, содержащими высокоактивную нуклеозидфосфаттрансферазу, различных 5'-моонуклеотидов, модифицированных в углеводной части молекулы, а также сравнение эффективности доноров фосфатной группы в реакции фосфорилирования аденозина (Ado). Данный штамм был отобран нами ранее как наиболее эффективный для синтеза аденозин-5'-монофосфата (AMP) из Ado и *n*-нитрофенилфосфата (p-NPP) [9].

Материалы и методы. В работе были использованы Ado, 2'-дезоксаденозин (2' dAdo), AMP, аденозин-5'-дифосфат (ADP), аденозин-5'-трифосфат (ATP), аденозин-3'-монофосфат (3'-AMP), аденозин-2'(3')-монофосфат (2'(3')-AMP), гуанозин (Guo), 2'-дезоксигуанозин (2' dGuo), гуанозин-5'-монофосфат (GMP), уридин (Urd), 2'-дезоксуридин (2' dUrd), уридин-5'-монофосфат (UMP), цитидин (Cyd), 2'-дезоксцитидин (2' dCyd), цитидин-5'-монофосфат (CMP), риботимидин (Thd), тимидин (2' dThd), инозин (Ino), ксантозин (Xao), p-NPP, рибозо-5-фосфат, 2-цианозтилфосфат и β-глицерофосфат фирмы «Fluka» (Швейцария), [8-³H]аденозин с удельной радиоактивностью 555 ГБк/ммоль ВО «Изотоп» (Моск. отд-ние). Синтез 9-(β-D-арабинофуранозил)аденина (ara-Ade), 9-(β-D-ксилофуранозил)аденина (xylo-Ade) и -гуанина (xylo-Gua), а также 1-(β-D-арабинофуранозил)цитозина (ara-Cyt) описан ранее в работах [13], [14] и [15] соответственно. Синтез 1-(β-D-арабинофуранозил)тимина (ara-Thy), 9-(β-D-арабинофуранозил)гуанина (ara-Gua), 3'-амино-2', 3'-дидезоксаденозина (3'NH₂; 2',3'ddAdo) и -тимидина (3'NH₂; 2',3'ddThd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксаденозина

(3'F; 2',3'ddAdo), его α -аномера (α -3'F; 2',3'ddAdo), -гуанозина (3'F; 2', 3'ddGuo) и -тимидина (3'F; 2', 3'ddTld), 3'-азидо-2', 3'-дидезокситимидина (3'N₃; 2', 3'ddTld) будут описаны отдельно. Для всех упомянутых выше соединений (любезно предоставленных Е. И. Квасюком, Г. В. Зайцевой и Н. Е. Пупейко, Ин-т биоорг. химии АН БССР) получены корректные спектральные (УФ, КД, ¹H-ЯМР, масс-спектрометрия) данные, а также данные элементного анализа. 2'-Амино-2'-дезоксисуридин (2'NH₂; 2'dUrd), 2'-азидо-2'-дезоксисуридин (2'N₃; 2'dUrd), 3'-амино-3'-дезоксисуридин (3'NH₂; 3'dUrd) и -цитидин (3'NH₂; 3'dCyd), а также 3'-азидо-3'-дезоксисуридин (3'N₃; 3'dUrd) любезно предоставлены проф. А. А. Каевским (Ин-т молекуляр. биологии АН СССР).

Получение биомассы клеток *Erw. herbicola* 47/3 описано в работе [9].

Стандартная реакционная смесь (0,25 мл) содержала 15 мМ нуклеозид, 90 мМ донор фосфата, 0,2 М Na-ацетатный буфер (рН 4,5) и интактные клетки (1 % в расчете на сухую массу). Смесь инкубировали при 50 °С, отбирая аликвоты (5 мкл), которые анализировали при помощи тонкослойной хроматографии, как описано в работе [9].

В экспериментах по изучению эффективности различных доноров фосфата в реакции синтеза АМР в смесь дополнительно вносили 9,3 кБк [8-³H]аденозина. После хроматографии аликвот реакционной смеси зоны хроматограмм, соответствующие появлению АМР и Ado, вырезали, вещества элюировали 1,5 мл воды, после чего радиоактивность элюатов измеряли в 10 мл сцинтиллятора Брэн [16] на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Mark-III» (США). Абсолютную радиоактивность проб находили методом отношения каналов внешнего стандарта.

Фосфорилирующую активность клеток определяли за время, при котором выход нуклеотидов не превышал 10 %. АМР дефосфорилировали, используя стандартную реакционную смесь, содержащую вместо нуклеозида и донора фосфата 15 мМ АМР.

Все цифровые данные, представленные в статье, являются усредненными величинами из 4—5 определений.

Результаты и обсуждение. Использование интактных клеток для осуществления различных реакций лимитируется в ряде случаев побочными, нежелательными биотрансформациями исходных субстратов, что приводит к снижению выходов желаемых соединений (см., например, работу [13]). По этой причине представлялось целесообразным установить наличие в клетках *Erw. herbicola* 47/3 interfering ферментативных активностей. В первую очередь это относится к фосфатазной, нуклеозидазной и нуклеозиддезаминазной активностям.

Как видно из рисунка, в экспериментальных условиях, оптимизированных нами ранее для получения АМР из Ado и p-NPP [9], фосфорилирование Ado и гидролиз эквимолярного количества АМР протекают с одинаковой скоростью (составляющей 12 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ клеток). Судя по литературным данным, такое отношение нуклеозидфосфотрансферазной и фосфатазной активностей характерно для клеток и других бактериальных штаммов, использованных в качестве биокатализаторов при фосфорилировании нуклеозидов [2, 5, 10], и значительно отличается от растительных ферментных препаратов, где фосфатазная активность превосходит нуклеозидфосфотрансферазную в 10—40 раз [3, 4, 6, 8]. Эти данные объясняют тот факт, что при синтезе 5'-мононуклеотидов растительными ферментами исследователи вынуждены вводить в реакцию донор фосфата по крайней мере в 15-кратном избытке по отношению к концентрации нуклеозида [3, 4, 6, 8].

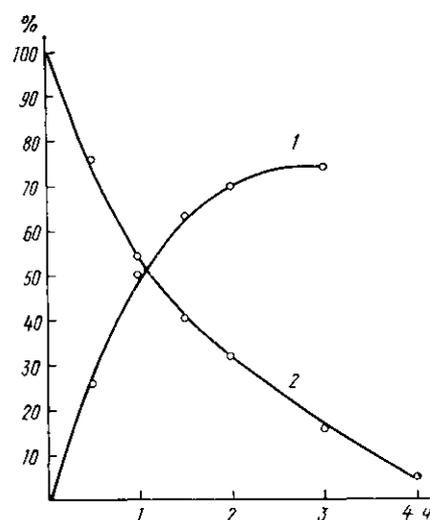
Остальные interfering активности — нуклеозидазная, аденозин-, цитидин- и гуанозиндезаминазная активности, как было установлено в отдельных экспериментах, в наших экспериментальных условиях практически не проявляются. Следовательно, эффективность синтеза нуклеозид-5'-монофосфатов является результатом одновременного действия нуклеозидфосфотрансферазы и фосфатазы. Таким образом, нуклеозидфосфотрансферазная активность целых клеток, измеряемая нами, может быть несколько заниженной по сравнению с истинной, которая проявилась бы в клетках без действия фосфатазы.

Известно, что на эффективность фосфорилирования нуклеозидов

изучаемым нами ферментом оказывают значительное влияние природа донора и акцептора фосфатных групп, а также их сочетание. Донорами фосфатной группы в реакциях фосфорилирования, катализируемых нуклеозидфосфотрансферазами, могут служить нуклеотиды, моноэфиры фосфорной кислоты и фенолов, такие как р-NPP, фенилфосфат, нафтилфосфат, а также рибозо-5-фосфат [2, 3, 10, 17]. Однако по эффективности они могут значительно отличаться друг от друга. Так, при фосфорилировании Urd ферментом, выделенным из моркови, 3'-AMP, AMP, р-NPP и фенилфосфат являются хорошими и практически эквивалентными донорами, а рибозо-5-фосфат проявляет слабую донорскую активность [17]. В то же время в реакции, катализируемой нуклеозидфосфотрансферазой *Erw. herbicola*, р-NPP демон-

Кинетика фосфорилирования Aдо (1) и дефосфорилирования AMP (2) клетками *Erw. herbicola* 47/3. По оси ординат — концентрация AMP

Kinetics of Aдо phosphorylation (1) and AMP dephosphorylation (2) by *Erw. herbicola* 47/3 cells. Concentration of AMP in % of max.



стрирует в 4 раза более слабые донорские свойства, чем 5'-мононуклеотиды [10], а рибозо-5-фосфат равен по эффективности р-NPP для фермента из *Pseudomonas trifolii* [2].

Полученные нами результаты экспериментов по изучению влияния доноров фосфатной группы на скорость фосфорилирования Aдо клетками *Erw. herbicola* 47/3 представлены в табл. 1. Можно видеть, что в отличие от фермента *Erw. herbicola* ATCC14537 [10] в нашем случае наилучшим донором является р-NPP. Этот факт, по-видимому, можно объяснить тем, что в свое время отбор штамма 47/3 проводился по максимальной эффективности синтеза AMP с использованием в качестве донора фосфатной группы именно р-NPP [9].

Несколько худшими донорскими свойствами обладают 5'-мононуклеотиды, причем эти свойства уменьшаются в ряду UMP > AMP > GMP > CMP, что свидетельствует о некотором влиянии гетероциклического основания на эффективность изучаемой реакции.

Следует отметить, что на донорские свойства нуклеотидов помимо природы гетероциклического основания оказывает некоторое влияние

Таблица 1

Влияние природы донора фосфатной группы на фосфорилирующую активность клеток *Erw. herbicola* 47/3 в реакции синтеза AMP

Effect of phosphate donors on phosphorylating activity of *Erw. herbicola* 47/3 cells in the reaction of AMP synthesis

Донор фосфатной группы	Относительная активность, %	Донор фосфатной группы	Относительная активность, %	Донор фосфатной группы	Относительная активность, %
р-NPP	100	3'-AMP	51	β-Глицерофосфат	0
Фенилфосфат	54	2'(3')-AMP	53	Глюкозо-1-фосфат	0
UMP	95	ADP	76	Глюкозо-6-фосфат	0
AMP	91	ATP	19	Полифосфат	7
GMP	89	Рибозо-5-фосфат	66	КН ₂ РO ₄	0
CMP	77	2-Цианэтилфосфат	14		

положение фосфатных групп в углеводной части молекулы и их количество. Так, на примере использования фосфорилированных производных Ado видно, что изменение положения фосфатной группы с 5'- на 2'- или 3'-положение, а также увеличение их числа при 5'-атоме углерода приводят к снижению донорских свойств нуклеотида.

Интерес представляет тот факт, что свойства рибозо-5-фосфата в качестве донора фосфатного остатка сопоставимы с таковыми нуклеозид-5'-монофосфатов. Напротив, по данным Чао, переход от 5'-мононуклеотидов к рибозо-5-фосфату сопровождался многократным уменьшением активности нуклеозидфосфотрансферазы *Erw. herbicola ATCC14537* [10]. Остальные фосфатсодержащие соединения, представленные в табл. 1, не проявили себя в качестве эффективных субстратов изучаемой нами реакции, что согласуется с результатами уже упоминавшихся выше работ.

Поскольку *p*-NPP оказался лучшим среди изученных нами доноров фосфата, именно его мы использовали в дальнейших экспериментах по изучению сравнительной эффективности фосфорилирования различных нуклеозидов клетками *Erw. herbicola 47/3*. Данные этих экспериментов представлены в табл. 2 и 3. Их анализ позволяет сделать следующие выводы.

Прежде всего заслуживает внимания тот факт, что эффективность нуклеозидов рибо-ряда в качестве акцепторов фосфатной группы зави-

Таблица 2

Фосфорилирование природных рибонуклеозидов до 5'-монофосфатов клетками *Erw. herbicola 47/3* с использованием *p*-NPP в качестве донора фосфатной группы
Phosphorylation of natural ribonucleosides to 5'-monophosphates by *Erw. herbicola 47/3* cells using *p*-NPP as phosphate group donor

Нуклеозид	Относительная активность, %	Максимальный выход нуклеотида, %	Нуклеозид	Относительная активность, %	Максимальный выход нуклеотида, %
Guo	100	80	Ado	35,0	73
Urd	72,9	78	Ino	26,8	80
Thd	58,3	79	Xao	15,2	55
Cyd	45,4	84			

Таблица 3

Эффективность фосфорилирования нуклеозидов до 5'-монофосфатов клетками *Erw. herbicola 47/3* с использованием *p*-NPP в качестве донора фосфатной группы
Phosphorylation of nucleosides to 5'-monophosphates by *Erw. herbicola 47/3* cells using *p*-NPP as phosphate group donor

Нуклеозид	Активность относительно немодифицированных рибонуклеозидов, %	Максимальный выход, %	Нуклеозид	Активность относительно немодифицированных рибонуклеозидов, %	Максимальный выход, %
Ado	100	73	2'NH ₂ ; 2'dUrd	132,2	78
2'dAdo	86,7	65	2'N ₃ ; 2'dUrd	95,2	56
Ara-Ade	35,8	40	3'NH ₂ ; 3'dUrd	77,6	65
Xylo-Ade	75,0	58	3'N ₃ ; 3'dUrd	97,6	63
3'NH ₂ ; 2',3'ddAdo	194,2	75	Cyd	100	84
3'F; 2',3'ddAdo	75,8	50	2'dCyd	75,3	78
α-3'F; 2',3'ddAdo	233,3	65	3'NH ₂ ; 3'dCyd	151,9	70
Guo	100	80	Ara-Cyt	33,0	40
2'dGuo	79,0	73	Thd	100	79
Ara-Gua	51,0	65	2'dThd	74,5	82
Xylo-Gua	67,9	70	Ara-Thy	67,0	46
3'F; 2',3'ddGuo	47,5	56	3'NH ₂ ; 2',3'ddThd	114,0	73
Urd	100	78	3'N ₃ ; 2',3'ddThd	75,2	75
2'dUrd	64,8	78	3'F; 2',3'ddThd	53,0	81
Ara-Ura	34,8	33			

сит от гетероциклического основания и убывает в ряду Guo>Urd>>rThd>Cyd>Ado>Ino>Xao (табл. 2). 2'-Дезоксинуклеозиды в целом являются менее эффективными акцепторами фосфатной группы в сравнении с соответствующими рибонуклеозидами и по своей эффективности образуют ряд, аналогичный приведенному выше для рибонуклеозидов. Эти результаты несколько отличают изучаемую нами фосфорилирующую систему от описанных в литературе. Так, для нуклеозидфосфотрансферазы моркови акцепторная активность рибонуклеозидов уменьшается в ряду Cyd>Urd>rThd>Guo>Ado. Пиримидиновые рибонуклеозиды являются более эффективными акцепторами фосфата, чем соответствующие 2'-дезоксинуклеозиды, однако в случае пуриновых нуклеозидов наблюдается обратная зависимость [17]. В реакциях, катализируемых ферментом из ячменя [18], 2'-дезоксинуклеозиды являются более эффективными акцепторами фосфата, чем рибонуклеозиды, независимо от структуры гетероциклического основания. Нуклеозидфосфотрансфераза *Erw. herbicola ATCC14537* более эффективно фосфорилирует 2'dAdo, чем Ado или Thd [10].

Изменение конфигурации гидроксильных групп при С-2'- и С-3'-атомах углерода углеводного фрагмента рибонуклеозидов или замещение их на различные атомы и атомные группы приводит к существенному изменению акцепторных свойств образующихся аналогов. Так, при переходе от Ado и Guo к соответствующим ксило-аналогам, ху1о-Ade и ху1о-Gua (изменение конфигурации при С-3'), субстратная активность уменьшается на 25—30%. Более существенное уменьшение субстратной активности наблюдается при переходе от природных рибонуклеозидов к ара-аналогам. Другие типы модификаций при С-2' и С-3' приводят к уменьшению субстратной активности в различной степени за исключением аминодезоксинуклеозидов, являющихся более эффективными субстратами в сравнении с рибонуклеозидами.

Интересно отметить, что изучаемый нами фермент, так же как нуклеозидфосфотрансфераза растений [3, 19], оказался способным фосфорилировать нуклеозид в α -конфигурации, причем с большей эффективностью, чем тот же нуклеозид в β -конфигурации (см. 3'F; 2', 3'ddAdo и α -3'F; 2', 3'ddAdo).

Следует подчеркнуть, что фосфорилирование нуклеозидов изучалось нами в системе, оптимизированной для получения АМР, т. е. в условиях, возможно, недостаточно оптимальных для каждого конкретного нуклеозида, тем не менее в большинстве случаев были достигнуты высокие выходы 5'-моонуклеотидов, исходя из модифицированных нуклеозидов.

Таким образом, продемонстрированная в данной работе широкая специфичность изучаемого фермента по отношению как к донорам, так и акцепторам фосфата позволяет, на наш взгляд, рассматривать интактные клетки *Erw. herbicola 47/3* в качестве перспективного биокатализатора для препаративного получения различных нуклеозид-5'-монофосфатов с модифицированной углеводной частью молекулы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheit K. H. Nucleotide analogs // Synthesis and biological function.— New York: Wiley-Interscience, 1980.—288 p.
2. Bacterial synthesis of nucleotides. Pt II. Phosphoryl transfer between mononucleotides and nucleosides via a phosphotransferase reaction / K. Mitsugi, A. Kamimura, M. Kimura, S. Okumura // Agr. Biol. Chem.—1965.—29, N 12.— P. 1109—1118.
3. Harvey C. L., Clericuzio E. M., Nussbaum A. L. Small-scale preparation of 5'-nucleotides and analogs by carrot phosphotransferase // Anal. Biochem.—1970.—36, N 2.— P. 413—421.
4. Marutzky R., Peterssen H., Flossdorf J. Large scale enzymatic synthesis of nucleoside-5'-monophosphates using a phosphotransferase from carrots // Biotechnol. and Bioeng. Symp.—1974.—16, N 11.— P. 1449—1458.
5. Казаринова Л. А., Матвейчук Н. В., Лукин Н. С. Исследование трансформации инозина в 5'-инозиновую кислоту культурой *Pseudomonas trifolii* // Прикл. биохимия и микробиология.—1975.—11, № 2.— С. 195—202.

6. Gizievicz J., Shugar D. Preparative enzymic synthesis of nucleoside-5'-phosphates // Acta biochim. pol.—1975.—22, N 1.—P. 87—98.
7. Юодка Б. А. Ферментативное фосфорилирование 5'-гидроксильной группы нуклеотидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов // Биоорг. химия.—1975.—1, № 10.—С. 1434—1440.
8. Humble R. W., Mackenzie G., Shaw G. Phosphorylation of some 5-aminoimidazole nucleosides to the 5'-phosphates using a phosphotransferase from wheat // Nucleosides, Nucleotides.—1984.—N 3(4).—P. 363—367.
9. Трансформация аденозина в аденозин-5'-монофосфат интактными клетками *Erwinia herbicola* / И. А. Попов, В. Н. Барай, А. И. Зинченко и др. // Антибиотики и медицинская биотехнология.—1985.—30, № 8.—С. 588—591.
10. Chao H. M. Nucleoside phosphotransferase from *Erwinia herbicola*, a new membrane-bound enzyme // J. Biol. Chem.—1976.—251, N 8.—P. 2330—2333.
11. Mitsugi K. Bacterial synthesis of nucleotides. Pt 4. Effects of inhibitors and metallic ions on the nucleoside phosphotransferase // Agr. Biol. Chem.—1964.—28, N 10.—P. 669—677.
12. Bacterial synthesis of nucleotides. Pt 11. Distribution of nucleoside phosphotransferases in bacteria / K. Mitsugi, K. Komagata, M. Takahashi et al. // Ibid.—N 9.—P. 586—600.
13. Препаративный синтез противовирусного нуклеозида 9-β-D-арабинофуранозиладенина с помощью бактериальных клеток / Л. А. Ерошевская, В. Н. Барай, А. И. Зинченко и др. // Антибиотики и медицинская биотехнология.—1986.—31, № 3.—С. 174—178.
14. Stereospecific synthesis of β-D-xylofuranosides of adenine and guanine / N. E. Пороеико, Е. I. Квасюк, I. A. Mikhailopulo, M. J. Lidaks // Synthesis.—1985.—N 5/6.—P. 605—609.
15. Синтез O², 2'-циклоцитидина и его 5'-монофосфата / А. А. Ахрем, Е. Н. Калинин, Е. И. Квасюк, И. А. Михайлопуло // Биоорг. химия.—1977.—3, № 6.—С. 845—847.
16. Bray G. A. Simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in liquid scintillator counter // Anal. Biochem.—1960.—1, N 1.—P. 279—285.
17. Brunngraber E. F. Nucleoside phosphotransferase from carrot // Meth. Enzymol.—1978.—51.—P. 387—394.
18. Nucleoside phosphotransferase from barley / D. C. Prasher, M. C. Carr, D. M. Ives et al. // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 9.—P. 4931—4939.
19. Tunis M., Chargaff E. Studies on the nucleoside phosphotransferase of carrot // Biochim. et biophys. acta.—1960.—40, N 2.—P. 206—210.

Ин-т микробиологии АН БССР, Минск
Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск

Получено 20.04.88

5'-PHOSPHORYLATION OF NATURAL NUCLEOSIDES AND THEIR MODIFIED ANALOGS BY INTACT *ERWINIA HERBICOLA* CELLS: SPECIFICITY WITH RESPECT TO DONORS AND ACCEPTORS OF PHOSPHATE GROUP

A. I. Zinchenko, I. L. Popov, V. N. Barai, I. A. Mikhailopulo

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk
Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

S u m m a r y

Nucleoside-phosphotransferase reaction catalyzed by intact cells of *Erwinia herbicola* 47/3 has been studied. p-Nitrophenyl phosphate is found to manifest the highest activity among phosphate donors tested. All the natural ribonucleotides and ribose-5-phosphate proved to be highly efficient as well. The activity of ribonucleosides as acceptors of phosphate group decreases in the following order: guanosine > uridine > ribothymidine > cytidine > adenosine > inosine > xanthosine. 2'-Deoxynucleosides proved to be less efficient phosphate acceptors as compared to the corresponding ribonucleosides.

The findings obtained suggest that intact cells of *Erw. herbicola* 47/3 may be used to produce modified nucleoside-5'-monophosphates in preparative amounts.