

к ним соседних участков цепи и дальнейшая стабилизация структуры. На четвертой стадии образуется единая компактная структура глобулы путем роста одного центра кристаллизации или объединения нескольких центров. Наконец, путем локальной подстройки образуется нативная структура глобулы.

Количественная разработка этой привлекательной гипотезы позволила подойти к анализу путей самоорганизации белков, в частности миоглобина [182]. Теория предсказывает положение зародышей пяти длинных и двух коротких спиральных участков в цепи. Проведены грубые расчеты конформационных энергий системы на стадиях образования центров кристаллизации. Последовательный анализ позволил найти простанственную структуру миоглобина, хорошо согласующуюся с опытом.

Дальнейшее развитие теории требует уточнения количественных оценок и рассмотрения кинетики самоорганизации. Экспериментальный подход к проблеме состоит в изучении кинетики ренатурации белков при постоянных внешних условиях. Сведения о термодинамически устойчивых стадиях ренатурации при изменяющихся внешних условиях можно получить с помощью ядерного магнитного резонанса (см. § 5.10).

§ 4.10. ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Все рассказанное в этой главе относилось к глобулярным белкам со свойственным им многообразием структур и функций. Гораздо менее разнообразные фибриллярные белки характеризуются специфическими особенностями строения и выполняют специальные функции. Это — структурные и сократительные белки. Первые играют роль опорных и защитных компонент, входя в состав сухожилий, хрящей, костей, связок и т. д. (коллагены), а также эпидермиса, волос, шерсти, рогов и т. д. (кератины). Вторые входят в состав рабочих веществ механохимических систем, в частности мышц (миозин).

В отличие от большинства глобулярных белков, фибриллярные, волокнообразующие, белки функционируют не в растворе, т. е. не в цитоплазме клеток, но образуют надмолекулярные тканевые системы. Выполнение структурной функции требует особой точности построения, регулярности структуры на всех уровнях, начиная с первичной.

Кожа животного содержит коллаген (в дерме) и кератин (в эпидермисе). При экстрагировании соединительной ткани холодными растворами солей, разбавленными уксусной кислотой (рН 3,9), а также растворами щелочей часть коллагена переходит в раствор. Эти растворяющиеся молекулы при любом способе экстракции практически идентичны. Часть коллагена, растворимую в кислоте, принято называть проколлагеном.

Коллагеновые волокна (фибриллы) образуются при агрегации цепей проколлагена. В процессе роста костей, остеогенеза, эти фибриллы играют роль центров кристаллизации, на которых растут игольчатые кристаллы оксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Коллагеновые волокна нерастворимы в воде, но при длительном нагревании с водой коллаген превращается в растворимую желатину — в результате гидролиза части пептидных связей и, следовательно, деструкции длинных белковых цепей.

Основная проблема физики коллагена и других фибриллярных белков состоит в следующем: каким образом особенности первичной структуры определяют специфические свойства фибрилл?

Аминокислотный состав коллагена весьма своеобразен. 33% всех аминокислотных остатков составляет Гли, 12% Про и 10% неканонический остаток оксипролил (Опро). Этот остаток, а также оксизил (Олиз), содержащийся в количестве от 0,3 до 1,2%, встречаются главным образом в коллагене. Коллаген содержит также до 10% Ала и значительно меньшие количества других аминокислот, причем содержание Тир, Гис, Цис и Мет, Вал, Фен особенно мало — менее чем по 1%. Таким образом, до $\frac{2}{3}$ остатков составляют Гли, Про, Опро и Ала. Тем самым, запас информации в коллагене более беден, чем в глобулярных белках, молекулы коллагена, в сущности, не являются информационными.

Последовательность остатков в коллагене можно представить в виде (Гли— x — x) $_n$, где x — любой остаток. Чаще всего встречаются последовательности Гли—Про—Опро, Гли—Про—Ала, Гли—Ала—Опро [154].

Строение коллагена было выяснено в рентгенографических исследованиях Рамачандрана с сотрудниками [155, 156] и Рича и Крика [7, 8, 157]. Коллаген сходен с синтетическими полиглицином и полипролином. Структура полиглицина показана на стр. 183.

Молекула коллагена состоит из трех цепей типа полиглициновых, скрученных совместно в спираль (рис. 4.25). При этом остатки Гли располагаются вблизи центральной оси тройной спирали, а остальные $\frac{2}{3}$ остатков выступают наружу и способны присоединять соседние цепи. Молекулярный вес такой тройной



Рис. 4.25. Модель структуры коллагена.

спирали (проколлаген) примерно равен 360 000, каждая из трех цепей содержит около 1000 аминокислотных остатков. Длина молекулы 290 нм, диаметр 1,5 нм.

Структура синтетического полипептида (Гли—Про—Опро)_n с молекулярным весом в несколько тысяч весьма сходна со

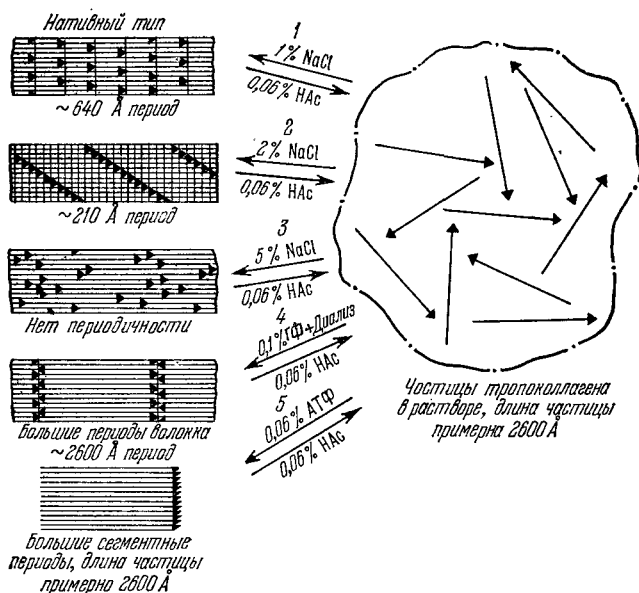


Рис. 4.26. Агрегация молекул проколлагена (по Шмитту).

1—агрегация 1%-ным NaCl, 2—то же 2%-ным NaCl, 3—то же 5%-ным NaCl, 4—0,1%-ным гуанидинфосфатом + диализ, 5—то же 0,06%-ным АТФ. Дезагрегация во всех случаях уксусной кислотой.

структурой коллагена. Это было установлено методами рентгенографии, инфракрасной спектроскопии и спектрополяриметрии [158, 159].

Схема агрегации молекул проколлагена в надмолекулярные фибриллы показана на рис. 4.26. На электронных микрофотографиях нативных коллагеновых волокон видна поперечная исчерченность, соответствующая этой схеме. Период исчерченности 640 Å.

Миллер и Рэй предложили другую модель коллагеновых фибрилл, согласно которой молекулы тропоколлагена группируются в жгуты, свитые из пяти нитей [160]. Эта модель также согласуется с рентгенографическими данными. Вопрос, тем самым, требует дальнейшего исследования.

Теоретический расчет структуры коллагена, исходящий из минимизации конформационной энергии, был проведен Туманяном [161]. В работе учтена стабилизирующая роль молекулы воды (см. [162]). При осторожном нагревании коллагена с водой при 62—63 °С волокна испытывают необратимое сокращение примерно в три раза. По-видимому, этот переход, являющийся конформационным превращением, обусловлен кооперативным разрушением водородных и гидрофобных связей. Проколлаген испытывает тепловой переход и в растворе. Привалов и Тиктопуло исследовали этот переход методом калориметрии [163].

В табл. 4.16 приведены параметры денатурации тропоколлагена при pH 3,5 в зависимости от содержания иминокислотных остатков (Про, Опро).

Таблица 4.16

Термодинамические характеристики денатурации тропоколлагена

Источник тропоколлагена	Число иминокислотных остатков на 1000	$T_{\text{пер}}$, °С	Теплота $Q_{\text{пер}}$, кал/г	ΔH , кал/моль	ΔS , э. е.
Крыса	226	40,8	16,8	1530	4,9
Шука	199	30,6	13,6	1240	4,1
Мерлан	—	21,5	9,7	880	3,0
Треска	155	20,0	8,2	750	2,6

Сильное возрастание Q , ΔH и ΔS с увеличением содержания иминокислотных остатков нельзя объяснить, предположив, что нативная структура тропоколлагена стабилизируется только внутримолекулярными водородными связями, так как иминокислотные остатки их не образуют. Предположение об определяющей роли гидрофобных взаимодействий тоже не спасает ситуацию — их исчезновение есть экзо-, а не эндотермический процесс. Электростатические взаимодействия не могут играть заметной роли, так как ΔH практически не зависит от pH. Авторы в соответствии с [162] предполагают, что тропоколлаген стабилизируется примыкающей к нему водной структурой. Действительно, известно, что удаление воды приводит к разрушению структуры коллагена, а ее добавление эту структуру восстанавливает [162]. Физические методы свидетельствуют о наличии упорядоченной водной структуры, связанной с коллагеном, что, в частности, было показано методом ядерного магнитного резонанса [164]. Структура коллагена, в которой добавочная водородная связь на каждый триплет образована молекулой воды, была недавно изучена [165].

Зависимость теплового эффекта денатурации от содержания иминокислотных остатков свидетельствует о линейной гетерогенности тропоколлагена, о том, что молекула содержит участки с различной степенью упорядоченности. Это следует и из анализа кривой плавления. В работе [163] показано также, что сложный ход поглощения тепла, наблюдаемый в солевом растворе тропоколлагена, связан с некоторым предденатурационным конформационным переходом в условиях, близких к физиологическим (см. также [166]).

Много данных, относящихся к структуре и свойствам коллагена, содержится в обзоре [167]. Методы рентгеноструктурного анализа фибриллярных систем описаны ниже (см. § 5.2).

Указанная проблема не может считаться решенной, — несмотря на очень большое число работ, посвященных коллагену, мы еще не располагаем достаточно полной теорией его строения и свойств. Создание такой теории весьма актуально по двум причинам. Во-первых, коллаген — один из важнейших белков в организмах животных. Во-вторых, относительная (по сравнению с глобулярными белками) простота его состава и строения делает коллаген очень ценной моделью для изучения структуры и свойств белков в целом.

Обратимся теперь к другому важному фибриллярному белку — к кератину.

Макроскопические свойства кератинсодержащих биологических структур — волос, шерсти, перьев, рогов, ногтей, копыт — указывают на его высокую стабильность и нерастворимость. Исследование кератина показывает, что эти особенности определяются прежде всего большим числом поперечных дисульфидных связей между пептидными цепями. Кератин волос человека и кератин шерсти содержит 11—12% цистина, т. е. 3% серы.

Длина волокон кератина существенно зависит от содержания в них воды (именно на этом основан волосяной гигрометр). Эти волокна эластичны и поддаются растяжению. Астбюри провел классические исследования структуры кератина шерсти методом рентгенографии [168]. Его структура сильно меняется при растяжении. Для кератина нерастянутого волокна шерсти характерна периодичность 5,1 Å (α -кератин), при растяжении возникает β -кератин, периодичность структуры уменьшается до 3,3 Å и появляются поперечные периоды, равные 4,65 и 9,7 Å. Астбюри считал, что для α -кератина характерны регулярные изгибы полипептидных цепей, которые выпрямляются при растяжении. Действительно, в дальнейшем было показано, что β -кератин имеет каноническую β -форму (см. [169]). α -кератин содержит много α -спирального вещества.

Кератин — сложный белок. При разрыве дисульфидных связей в результате его окисления или восстановления получается

растворимое вещество, из которого можно выделить две фракции — бедную и богатую серой. Фракция, бедная серой, состоит из фибриллярных молекул, способных образовывать волокна, а фракция, богатая серой, состоит из глобулярных молекул. Есть основания думать, что эти глобулярные молекулы служат сшивками в кератиновых волокнах, фибриллы которых построены из белка, содержащего мало серы.

В результате рентгеновских и электронно-микроскопических исследований установлено, что основная единица волокна есть цилиндрическая микрофибрилла диаметром примерно в 75 \AA , построенная из белков с малым содержанием серы. Регулярно уложенные участки этих белков являются α -спиралями, совместно скрученными попарно. На рис. 4.27 показана гипотетическая модель молекулярной организации α -кератина. Белок гетерогенен и состоит из двух главных компонент в отношении 2 : 1. Отдельные молекулы могут располагаться либо последовательно (рис. 4.27, б, в), либо параллельно друг другу (рис. 4.27, г). Спиральные участки молекул скручены либо попарно, либо в тройную сверхспираль. Опыт дает большие периоды вдоль волокна, равные 200 \AA , что согласуется с моделями 4,27, в и г, но не с 4.27, б.

Микрофибрилла в целом состоит из 11 таких протофибрилл — двойных или тройных спиралей, причем две из них расположены в центре микрофибриллы, а девять — на ее периферии (рис. 4.27, д). Это отношение 9 : 2 очень характерно для ряда биологических надмолекулярных структур, построенных из фибриллярных биополимеров. Микрофибрилла имеет однородное строение. Длины спиральных участков, образующих протофибриллы, не меняются заметно от вида к виду, но состав

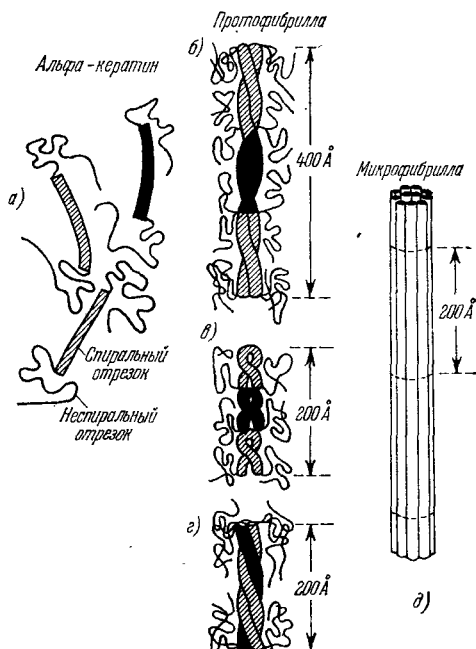


Рис. 4.27. Гипотетическая схема молекулярной организации α -кератина.

а) Отдельные молекулы двух основных компонент (они зачернены и заштрихованы; последние — белки с низким содержанием серы); б), в), г) протофибриллы; д) микрофибрилла.

неспиральных участков сильно варьирует. Принципиальные различия в кератинах млекопитающих определяются способом упаковки микрофибрилл и количеством и составом богатой серой глобулярной компоненты, т. е. матрикса, скрепляющего микрофибриллы друг с другом. При набухании в воде свойства этого матрикса заметно изменяются.

β -кератин изучен значительно хуже. Его не удается разделить на две указанные фракции. Примерно половина β -кератина имеет β -структуру, вторая половина не упорядочена. Микрофибриллы диаметром около 35 Å построены из двух переплетенных молекулярных нитей. Каждая нить содержит по четыре молекулы на период длиной в 95 Å. Дальнейшие подробности о структуре кератинов см. в [16, 170, 171].

Кератины представляют специальный интерес для биофизики, так как они являются хорошей моделью сложной надмолекулярной ориентированной структуры. Проблема связи этой структуры и ее свойств с первичной структурой соответствующих белков еще далека от своего решения.

Следует упомянуть еще об одном фибриллярном белке — о фиброине шелка. Фиброин имеет сравнительно простой аминокислотный состав и в этом отношении сходен скорее с коллагеном, чем с кератином. Он содержит 42,8% Гли, 33,5% Ала, 16,3% Сер и 11,9% Тир. Остальные аминокислоты присутствуют в малых количествах или отсутствуют (Цис, Мет). Рентгенограммы фиброина сходны с рентгенограммами β -кератина, основная конформация фиброина — β -форма.

Структура фиброина сходна со структурой полипептида (Гли — Ала)_n (шелк *Bombyx mori*) и полиаланина (шелк *Lysax*). Характерные для фиброина шелка последовательности Гли — Ала — Сер — Тир, большие участки состоят из сочлененный Гли — Ала.

Таким образом, специализированные структурные функции фибриллярных белков определяются их специфическим ориентированным строением. Биологическая роль таких белков не только защитная, как в случае кератина и фиброина. Выше уже указывалось, что коллаген необходим для остеогенеза, а миозин обладает ферментативной активностью — он катализирует гидролиз АТФ.

Литература

1. И. М. Лифшиц, ЖЭТФ 55, 2408 (1968).
2. П. Флори, Статистическая механика цепных молекул, «Мир», 1971.
3. V. Sasisekharan, in «Collagen», ed. N. Ramanathan, Intersci. Publ., 1962.
4. H. Scheraga, Adv. Phys. Org. Chem. 6, 103 (1968).
5. L. Pauling, R. Corey, H. Branson, Proc. Nat. Acad. Sci. US 37, 205 (1951).
6. L. Pauling, R. Corey, Proc. Nat. Acad. Sci. US 37, 241, 729 (1951).