

тель равен 55, т. е. молярной концентрации воды; иными словами, молярная концентрация пар взаимодействующих молекул равна произведению молярных концентраций реагентов, деленному на 55 и умноженному на координационное число в водном растворе [60, 61] (см. также [62]).

Задача состоит в заполнении «разрыва», в количественном объяснении ферментативного катализа. Существует ли какой-либо основной фактор, ответственный за большую скорость ферментативных реакций, или необходимо «концертное» действие всех факторов? Пока нет ответа на эти вопросы, но можно наметить некоторые пути их исследования.

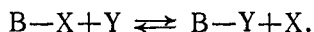
§ 6.5. КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Из конформационной лабильности макромолекулы белка следует специфическое взаимодействие фермента с субстратом и другими лигандами. Возможно, что в некоторых конформациях белок более эффективно связывает субстрат, чем в других. При связывании может происходить отбор конформаций субстрата. Каруш объяснил способность альбумина плазмы связывать различные вещества «конфигурационной адаптативностью» этого белка [63].

Можно думать, что в ФСК отбираются те конформации белка и субстрата, которые находятся в структурном соответствии друг с другом, обеспечивающем оптимальное значение свободной энергии взаимодействия [64, 65]. Структурное соответствие при образовании ФСК можно считать динамическим, индуцируемым. Таким образом, при образовании ФСК могут происходить изменения реальных конформаций белка и субстрата или одного из них. Васлов и Доэрти констатировали наличие конформационных эффектов при связывании химотрипсина молекул субстратов и конкурентных ингибиторов [66]. Структурное соответствие в ФСК до некоторой степени подобно соответствию в гетерогенном катализе (см. стр. 359). Исходя из своей мультиплетной теории, Баландин предложил качественную схему структурного соответствия фермента, кофермента и субстрата [67, 68].

Можно думать, что значительные изменения энтропии при образовании ФСК происходят именно в результате конформационных эффектов. Понижение энтропии при отборе определенной конформации может компенсироваться понижением энтальпии вследствие взаимодействия и повышением энтропии других участков глобулы. Как мы видели, физический анализ событий такого типа в белке требует учета явлений в окружающей водной среде (см. стр. 371).

Последовательное развитие теории индуцированного структурного соответствия в ферментативном катализе было проведено Кошландом [69]. Задача теории состояла прежде всего в объяснении специфичности ферментов, катализирующих реакции переноса связи типа



Старая идея о статической системе со структурным соответствием, идея «ключ—замок» (Фишер) объясняла специфичность фермента не гибкостью, а жесткостью его структуры, обуславливающей притяжение определенной молекулы субстрата, и стерическое отталкивание незначительно отличающегося аналога. Ряд фактов противоречит этой простой модели. Так, вода и другие малые молекулы, содержащие гидроксил, не участвуют в реакциях переноса гидроксила, катализируемых фосфорилазами и киназами. Напротив, гидроксилсодержащие молекулы большого размера являются в этих случаях субстратами. Зачастую у хорошо сорбируемых активным центром лигандов реакционная способность отсутствует, несмотря на то, что весьма сходные соединения обладают ею. Вместе с тем известны случаи, когда малые молекулы не сорбируются, а их аналоги большего размера хорошо сорбируются активным центром. Фосфотрансацетилаза действует на ацетат, пропионат, бутират, но не на формиат, а β -глюкозидаза действует на глюкозиды, но не на 2-дезоксиглюкозиды. Аналогичные данные приведены в [64, 69].

Кошланд сформулировал следующие положения [70]:

1. Субстрат вызывает изменения геометрии фермента, поскольку он проникает в активный центр.
2. Для ферментативного действия необходима надлежащая взаимная ориентация каталитических групп.
3. Субстрат индуцирует такую ориентацию изменениями, которые он вызывает в геометрии фермента.

Эти положения иллюстрируются рис. 6.18. Рис. 6.18, *в* и *г* показывают, почему молекулы, сходные с субстратом, но отличные от него по размерам, нереакционноспособны. Согласно модели Кошланда специфичность и каталитическая эффективность фермента связаны друг с другом, но их механизмы различны, и реакция осуществляется только при надлежащем взаимном расположении сорбирующих и каталитического центров относительно молекулы субстрата. Кошланд иллюстрирует это примером β -амилазы [71]. Этот фермент действует на конечные группы амилозы, но не на другие глюкозидные связи полисахарида. Циклоамилозы являются конкурентными ингибиторами фермента. Сказанное поясняется схемой на рис. 6.19. Реакция происходит лишь при определенном пространственном расположе-

нии сорбирующих и каталитических групп фермента А, В, X (см. также [72, 73]).

Наглядная модель действия модификатора по Кошланду показана на рис. 6.20 [72]. Ингибитор конкурентен, если группа В

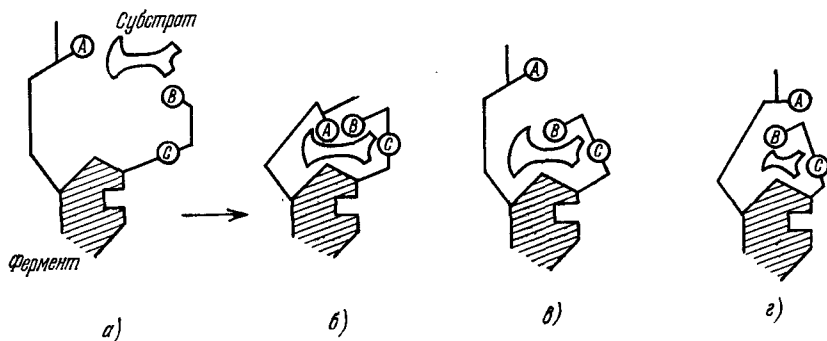


Рис. 6.18. Схема образования комплекса фермент — субстрат посредством индуцированного структурного соответствия.

а) Фермент; б) ФСК; в) и г) комплексы с аналогами субстрата.

существенна для присоединения субстрата, и неконкурентен в случае ее каталитической активности.

Столь же наглядная схема отбора конформации белка субстратом показана на рис. 6.21 [59], где Н в кружке — гидрофоб-

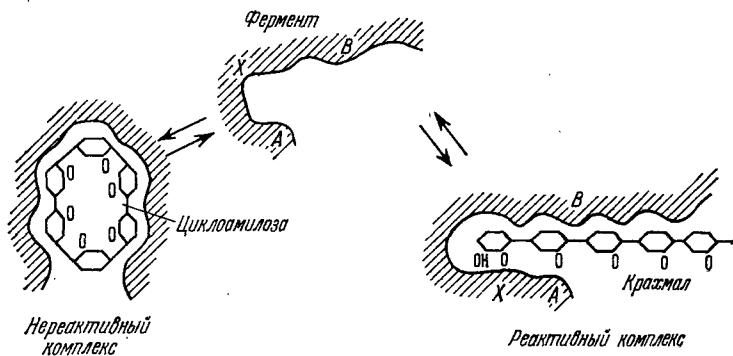


Рис. 6.19. Схема, иллюстрирующая действие β -амилазы.

ная группа, а знаки плюс и минус в кружках — заряженные группы.

Наглядное моделирование было применено и для рассмотрения эффекта ориентации в ФСК. При элементарных расчетах

этого эффекта исходили из предположения об очень резкой зависимости энергии системы от углов ориентации [62]. В дальнейшем было показано, что такой резкой зависимости не может быть [74]. Для увеличения скорости реакции в 10^5 раз необходимо снижение активационного барьера на 7 ккал/моль. Такое изменение энергии возможно при поворотах вокруг двойных связей на $10-15^\circ$ или при изменениях валентных углов на $5-10^\circ$. Между тем оценки в [62] предполагают изменения углов всего лишь на $0,1^\circ$.

Для подтверждения качественных положений теории Кошланда нужно доказать, что при взаимодействии белка с лигандами действительно происходят конформационные изменения и что они служат причиной наблюдаемого возрастания скорости.

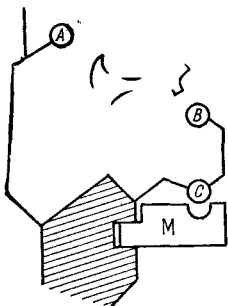


Рис. 6.20. Схема действия модификатора М.

Ряд фактов свидетельствует о конформационных превращениях ферментов (см. [68, 71]). В присутствии субстратов некоторые ферменты становятся более жесткими, другие, напротив, более лабильными — легче денатурируются при нагревании [75]. Субстраты индуцируют диссоциацию глутаматдегидрогеназы [76] и гексокиназы [77]. Под действием субстрата изменяется реакционная способность аминокислотных остатков фермента; так, иодирование пенициллиназы усиливается субстратом [78]. Эти явления можно объяснить моделью Кошланда [79] (см. также обзоры [80, 81]).

Спектр поглощения химотрипсина меняется при его взаимодействии с субстратом, и эти изменения могут быть интерпретированы как вызванные изменениями конформации [82]. Сходные явления наблюдались и в ряде других случаев (см., например, [83]). Изменения конформаций проявляются и в спектрах люминесценции как ароматических аминокислотных остатков, так и сорбированных на белке красителей (см. [84]). Конформационные изменения фосфоглюкомутазы при ее взаимодействии с субстратом глюкозо-6-фосфатом находят свое выражение в спектрах поглощения и в спектрах люминесценции [68, 85].

Спектрополяриметрия позволяет выявить структурные изменения, происходящие в активном центре и в глобуле в целом. Выше уже было сказано об исследовании аспаратаминотрансферазы (см. стр. 379, а также [68, 86]). В ряде ферментов наблюдалось изменение степени α -спиральности, возникающее при взаимодействии фермента с субстратом, коферментом и другими лигандами (см. [68]). Подробное изучение ДОВ лактатдегидрогеназы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы показало, что

присоединение кофермента (НАД, см. стр. 95) значительно изменяет степень α -спиральности этих белков [68, 87].

Сведения о конформационных изменениях дают также спектры ЭПР ферментов, содержащих метку (парамагнитный радикал), спектры ЯМР и люминесценции (см. гл. 5).

Таким образом, основное предположение теории Кошланда в ряде случаев доказано. Эти результаты, однако, еще не свидетельствуют о том, что изменения конформации белка приводят

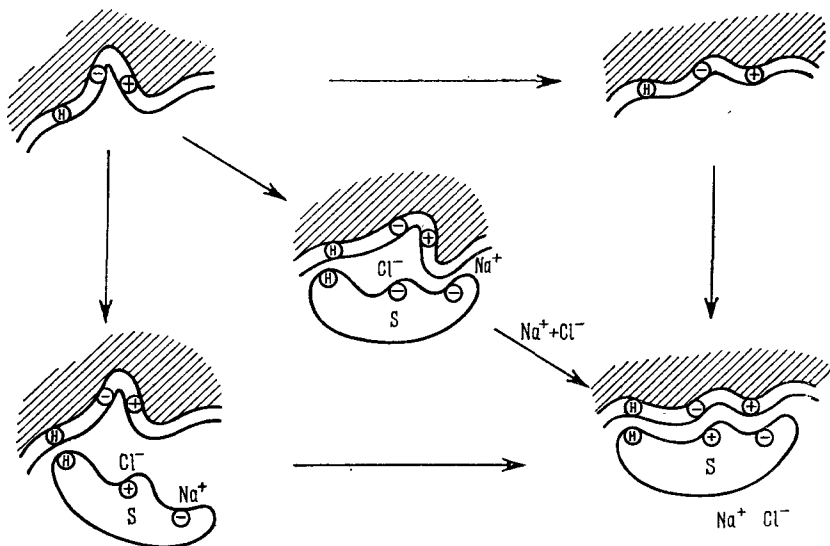


Рис. 6.21. Схема отбора конформации белка субстратом.

к достижению структурного соответствия. Для доказательства такого соответствия оптические методы сами по себе недостаточны, их должно сочетать с химическими и с глубоким теоретическим анализом (см. сказанное об ААТ, стр. 378—383). Непосредственную информацию об изменении структуры фермента и субстрата при образовании их комплекса дает рентгеноструктурный анализ [88].

Необходимо подчеркнуть, что теория Кошланда не обязательно предполагает значительные изменения конформации белка. Эти изменения могут быть и малыми, если структура глобулы такова, что ее соответствие с субстратом уже predetermined. Вместе с тем структурное соответствие может обеспечиваться и изменением конформации субстрата.

Именно такой оказывается ситуация у лизоцима. Как показывает рентгенография [36, 88], субстрат входит в уже

имеющуюся полость молекулы фермента (см. стр. 377). При этом полость сужается для того, чтобы плотнее «зажать» субстрат. Смещения аминокислотных остатков белка невелики, но заметны — остаток Три 62 смещается на 0,75 Å. Одновременно происходит изменение конформации субстрата — небольшой поворот углеводных колец вокруг гликозидной связи.

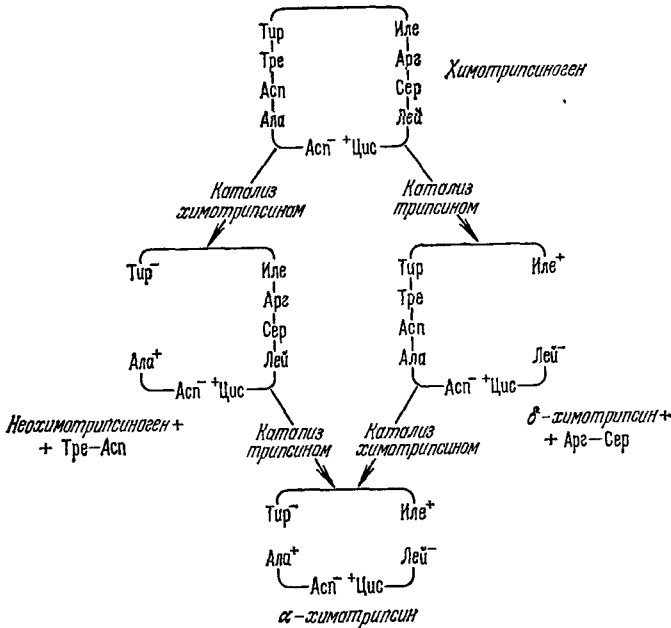


Рис. 6.22. Схема активации химотрипсиногена.

Наличие предуготовленной для субстрата полости обнаружено рентгенографически и у других ферментов. Активный центр рибонуклеазы, расположенный в этой полости, содержит основные остатки Лиз и Арг, взаимодействующие с фосфатными группами РНК (рибонуклеаза катализирует гидролитическое расщепление РНК). Каталитический участок в той же полости образован двумя остатками Гис, осуществляющими основной катализ [89, 90]. Аналогичная полость обнаружена в папаине, активными остатками которого являются Цис 25 и Гис 159 [91].

Рентгеноструктурный анализ раскрывает события, происходящие при образовании химотрипсина в результате активации химотрипсиногена. Такая активация состоит в расщеплении пептидной связи Арг 15 — Иле 16 (см., например, [13, 64]).

Установлено, что при этом аминокетильная группа Иле соединяется с γ -СООН-группой остатка Асп 194 и образуется глубокая полость. Локальное окружение этих групп имеет малую диэлектрическую проницаемость и ионная связь $\text{COO}^- - \text{H}_3\text{N}^+$ очень сильна. Активный центр химотрипсина содержит Сер 195, Гис 57 вблизи поверхности полости, глубже расположен Асп 102, его карбоксильная группа образует водородную связь с имидазолом Гис 57, который становится сильно поляризованным и притягивает протон гидроксила Сер 195. Участок, определяющий специфичность химотрипсина по отношению к ароматическим боковым цепям, расположен в глубокой полости вслед за активным центром. На рис. 6.22 дана схема превращения химотрипсиногена в химотрипсин (см. [88, 92, 93]).

Прямое подтверждение теории Кошланда получено при исследовании карбоксипептидазы [39, 94, 95] (см. стр. 376). В присутствии глицилтирозина расположение аминокислотных остатков фермента существенно изменяется. Активный центр представляет собой глубокую полость, подобную «рту паука» [88], со «щупальцами», готовыми направить субстрат к атому Zn. Одно «щупальце», содержащее Тир 248, направляется к NH-группе субстрата, Арг 145 другого взаимодействует с карбоксилем субстрата, Глю 270 третьего — с конечной аминокетильной группой (рис. 6.23).

Очевидно, что не следует понимать теорию Кошланда как теорию гибкой структуры фермента. Фермент скорее можно сравнить с механизмом, функциональные части которого могут испытывать дискретные перемещения, транслокации, необходимые для структурных соответствий с лигандами. Конструкция такого механизма характеризуется не пластичностью, но, скорее, упругостью. Модель белковой глобулы, построенная из шарнирно сочлененных упругих стержней (см. стр. 252), согласуется с фактами, полученными при изучении ферментов.

Структурное соответствие в ФСК, по-видимому, действительно достигается. Оно реализуется в полости молекулы фермента. Как показывает сопоставление всех изученных

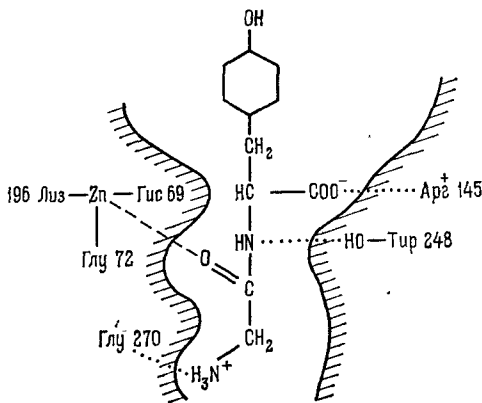


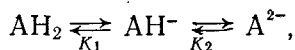
Рис. 6.23. Схема активного центра карбоксипептидазы.

рентгенографических структур, их единственная общая особенность состоит в том, что внутренняя поверхность полости образована преимущественно неполярными остатками. Вследствие гидрофобных взаимодействий полярные остатки выведены наружу (см. стр. 223). неполярное «внутри» белковой молекулы имеет малую диэлектрическую проницаемость, что облегчает электрические взаимодействия [88]. Значение этого рассмотрено далее (см. стр. 403).

§ 6.6. ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ФЕРМЕНТ

Очевидно, что ферментативная активность должна существенно зависеть от pH среды. Макромолекулы белка содержат ионизируемые группы. То же относится к большинству субстратов, модификаторов и коферментов. Подробная классификация возможных влияний pH на ферменты дана Уэббом [16] (см. также [68]). Изменение pH может изменить состояние ионизируемых групп в активном центре или соседствующих с ним; оно может также влиять на состояние неферментных компонент системы и на структуру глобулы локально или в целом.

Фермент может существовать в различных состояниях ионизации, находящийся в равновесии друг с другом. Рассмотрим простейшую модель системы с двумя состояниями ионизации [96]. Такова любая двухосновная кислота. Имеем



где K_1 и K_2 — первая и вторая константы ионизации. Обозначим сумму концентраций всех трех форм через A_t

$$A_t = [\text{AH}_2] + [\text{AH}^-] + [\text{A}^{2-}]. \quad (6,59)$$

Константы K_1 и K_2 равны

$$K_1 = \frac{[\text{AH}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}_2]}, \quad K_2 = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{AH}^-]} = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}^+]^2}{[\text{AH}_2]K_1}. \quad (6,60)$$

Следовательно,

$$A_t = [\text{AH}_2]f = [\text{AH}^-]f^- = [\text{A}^{2-}]f^{2-}, \quad (6,61)$$

где f , f^- , f^{2-} — так называемые pH-функции Михаэлиса:

$$f = 1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1K_2}{[\text{H}^+]^2}, \quad f^- = 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]}, \quad (6,62)$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_1K_2}.$$

Применим эту грубую модель к ферменту, приняв, что активный центр может существовать в трех указанных формах, но