

сти, вызванные изменением рН в исследованном интервале, не сопровождаются разворачиванием глобулы.

Сходные результаты получены для глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, но здесь нет такой четкой корреляции, как для первого фермента (дальнейшие подробности см. в [68, 87]). Ряд данных о влиянии рН среды на вторичную структуру белков приводит Жоли [102].

Описанные выше результаты подтверждают общие представления об определяющей роли конформационных явлений в ферментативной активности и в этом смысле согласуются с теорией Кошланда. Установленная для лактатдегидрогеназы корреляция степени спиральности и скорости реакции весьма показательна. Конечно, нет оснований считать подобную корреляцию обязательной во всех случаях.

Но пока не существует метода — теоретического или экспериментального — для учета относительной роли всех трех механизмов: механизма, рассмотренного в феноменологической теории Михаэлиса и Давидсона (см. стр. 394), механизма Кирквуда и Шомейкера и конформационного механизма. Следует отметить, что наряду с флуктуациями зарядов, исследованными Кирквудом, должны существовать пространственные флуктуации, определяемые подвижностью полипептидных цепей.

§ 6.7. ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Основная нерешенная задача физики и физической химии ферментов состоит в количественном объяснении их высокой каталитической активности.

Несомненно, что все рассмотренные выше эффекты дают свои вклады в ферментативную активность. Однако количественные оценки здесь недостаточно достоверны и не решают проблему.

В физическом аспекте должно поставить вопрос об едином механизме ферментативной активности, определяемом физическими свойствами глобулы как целостной системы. Мы не знаем пока, существует ли такой механизм или ферментативная активность полностью определяется уже рассмотренными химическими и физико-химическими факторами. Очевидно, что здесь интересен и положительный, и отрицательный ответ на вопрос о существовании единого физического механизма.

Следует подчеркнуть, что свойства глобулы как целого, за исключением наличия в ней полости с неполярными остатками, не учитываются ни в теории Кошланда, ни, тем более, в химических теориях взаимодействий в активных центрах ферментов.

Бряд ли осмысленно искать этот механизм в специальных полупроводниковых или иных электронных свойствах глобулы,

Выше уже были приведены аргументы, опровергающие представления об особых электронных свойствах белков (см. стр. 109). Эти аргументы безусловно справедливы применительно к подавляющему большинству известных ферментов. Следует, однако, согласиться с Перутцом, указывающим, что специальные механизмы могут быть существенны в ферментах, участвующих в переносе электронов или в превращении различных форм энергии (таких, например, как энергия фотонов) в химическую энергию [88].

Белковая глобула представляет собой не статистическую, а динамическую систему. Это своего рода машина, работа которой в конечном счете определяется конкретными деталями ее устройства. Как пишет Эйген: «...мы встречаемся здесь с видами молекул, которые кажутся проявляющими некоторую степень «разумности», в отличие от своих неорганических «коллег», которые просто говорят «да», когда они реагируют, или «нет», когда они не реагируют» [103]. Тем не менее не только законно, но и необходимо рассмотреть эту машину как целостную физическую систему.

Естественная физическая идея состоит в предположении о способности глобулы служить неким энергетическим резервуаром. Энергия теплового движения или энергия, приобретенная глобулой при сорбции субстрата, конвертируется в энергию ФСК, в результате чего происходит эффективное понижение энергии активации. Неполная упорядоченность глобулы и малые различия в свободных энергиях упорядоченного и неупорядоченного состояний (порядка 1 ккал/моль) означают наличие конформационных флуктуаций [104, 105]. Косвенные свидетельства в пользу таких флуктуаций состоят в заметном дейтеробмене с водородами пептидных связей —СО—NH— при температурах, значительно меньших температуры денатурации белка, при которой водородные связи рвутся [104]. О том же говорит повышенная жесткость ФСК по сравнению со свободным ферментом — ФСК труднее расщепляется трипсином [105—107]. По-видимому, связывание субстрата уменьшает конформационную подвижность глобулы. Наличие значительных флуктуаций следует также из общей феноменологической теории полимерной глобулы, развитой Лифшицем (см. стр. 143, 236).

Накопление энергии флуктуаций в ФСК и вызванное этим понижение энергии активации процесса, казалось бы, можно рассматривать на основе общей теории мономолекулярного распада. Представим себе химическую связь, включенную в сложную систему других связей. Система как целое испытывает тепловые колебания. Имеется конечная вероятность накопления в данной связи энергии, достаточной для ее разрыва. В изолированной связи такой возможности нет. Не может ли включение

субстрата в комплекс с ферментом создать возможность накопления энергии на связях субстрата?

Идея эта заманчива, но ошибочна. Как показывает теория мономолекулярного распада [1, 108], накопление колебательной энергии не влияет на энергию активации, необходимую для разрыва связи, но сказывается лишь на предэкспоненциальном множителе b , имеющем смысл средней частоты колебательной системы (ср. (6,10)). Средняя частота в ФСК не может сильно отличаться от частоты колебаний субстрата [68].

Другое предположение состоит в том, что энергия, выделяемая при сорбции субстрата, трансформируется в энергию упругих колебаний глобулы, ведущей себя подобно капле жидкости. Частоты таких колебаний попадают в гиперзвуковую область (максимальная дебаевская частота порядка 10^{13} сек⁻¹). Стоячие волны в капле могут образовывать пучность в области активного центра, и энергия упругих колебаний может активировать молекулу субстрата [109]. Количественные оценки, основанные на этой идее, показали, что энергия упругих колебаний глобулы действительно может достигать 5—10 ккал/моль и обеспечивать значительное понижение эффективного активационного барьера [110]. Однако такая гипотеза ничем не доказана и, в частности, она не объясняет, почему энергия колебаний не диссипирует в окружающую среду.

Из ненадежности «капельной» гипотезы не следует, однако, невозможность понижения эффективной энергии активации за счет энергии сорбции субстрата. Структурное соответствие фермент — субстрат приводит и белок и малую молекулу в напряженное состояние. Можно сказать, что молекула субстрата «растянута на дыбе» [21].

Допустим, что длина нерастянутой молекулы субстрата равна l_0 , длина полости фермента, контактирующей с субстратом, l . Изменения длины молекул субстрата и фермента равны x и y соответственно. Тогда $x + y = l - l_0$ и условие равенства упругих сил имеет вид

$$k_s x = k_e y,$$

где k_s и k_e — коэффициенты упругости субстрата и фермента. Из двух написанных соотношений находим

$$x = \frac{l - l_0}{1 + k_s/k_e}, \quad y = \frac{k_s}{k_e} \frac{l - l_0}{1 + k_s/k_e}.$$

Упругая энергия субстрата, т. е. величина, на которую понижается энергия активации, равна

$$\Delta E = \frac{1}{2} k_s x^2 = \frac{1}{2} k_s \left(\frac{l - l_0}{1 + k_s/k_e} \right)^2. \quad (6,80)$$

Порядок величины k_e отвечает произведению линейных размеров глобулы на модуль упругости $L\epsilon$. Для белка $L \approx 50 \text{ \AA}$, $\epsilon \sim 10^{10} \text{ эрг} \cdot \text{см}^{-3}$. Следовательно, $k_e \sim 5 \cdot 10^8 \text{ дин} \cdot \text{см}^{-1}$. Наибольшая энергия упругой деформации сосредоточивается в наиболее слабом месте молекулы субстрата. Деформация валентных углов происходит значительно легче, чем валентных связей [111]. Вместе с тем энергия, запасенная на угловых степенях свободы молекулы, может перейти на валентные связи и уменьшить энергию активации, нужную для разрыва. Коэффициент упругости, отвечающий низкочастотным деформационным колебаниям ($\nu \sim 10^{13} \text{ сек}^{-1}$), примерно равен $1,5 \cdot 10^4 \text{ дин} \cdot \text{см}^{-1}$. Допустим, что $\Delta E = 7,5 \text{ ккал/моль}$ (при такой величине ΔE скорость реакции увеличивается в 10^5 раз). Тогда $x \approx 0,8 \text{ \AA}$, $y \approx 2,3 \text{ \AA}$, упругая энергия фермента $\frac{1}{2}k_e y^2 \approx 21 \text{ ккал/моль}$. Значит, суммарная энергия, расходуемая при сорбции на упругую деформацию, составляет приблизительно 30 ккал/моль. Эта величина не чрезмерна, если учесть, что сорбция происходит за счет многоточечного связывания, т. е. образования нескольких химических и нехимических связей между субстратом и ферментом. Наблюдаемая энергия сорбции равна разности истинной энергии сорбции и упругой энергии фермента и субстрата.

Этот элементарный расчет проведен в предположении об однородных упругих свойствах белковой глобулы. Если область присоединения субстрата в ФСК имеет повышенную жесткость, то энергия упругой деформации фермента уменьшится и может оказаться даже меньше энергии молекулы субстрата.

Рассмотренная модель имеет статический характер. В действительности механизм «дыбы» следует считать динамическим, что может существенно изменить приведенные оценки. Так, при резонансе колебаний молекул субстрата и фермента для ускорения реакции в 10^5 раз нужны средние упругие энергии, в четыре раза меньшие, чем в статическом случае, так как биения периодически удваивают амплитуду колебаний.

Механизм «дыбы» должен следовать из теории глобулы Лифшица (см. стр. 236), согласно которой даже гомогенная глобула представляет собой систему с дискретными уровнями свободной энергии. Флуктуации ее оболочки могут обеспечить индуцированное структурное соответствие, предполагаемое Кошландом, а изменение уровня свободной энергии глобулы при сорбции субстрата эквивалентно накоплению энергии упругой деформации. Возможно, что эти представления окажутся полезными для понимания работы ферментов.

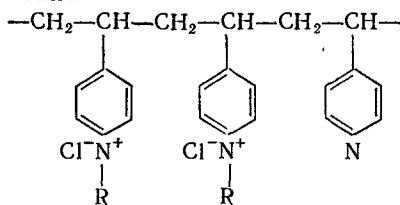
Все приведенные выше соображения не учитывают, однако, еще одного весьма важного фактора. Как уже сказано (см. стр. 376), молекула субстрата внедряется в гидрофобную, неполярную, полость в молекуле фермента. Тем самым, молекула

субстрата переходит из водного в гидрофобное окружение. Фермент является не только специфическим реагентом, но и специфической средой реакции [88, 112]. Как писал Перутц [112], «Мы можем спросить себя, почему химические реакции, нормально требующие мощных органических растворителей или сильных кислот и оснований, могут протекать в водном растворе вблизи нейтрального рН в присутствии ферментных катализаторов. Органические растворители имеют преимущества по сравнению с водой, обеспечивая среду с низкой диэлектрической проницаемостью, в которой могут иметь место сильные электрические взаимодействия между реагентами. Неполарные внутренние области ферментов обеспечивают живую клетку эквивалентами органических растворителей, применяемых химиками. Субстрат может быть введен в среду с низкой диэлектрической проницаемостью, в которой могут осуществиться сильные электрические взаимодействия между ними и полярными группами фермента».

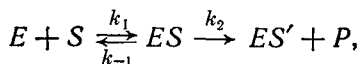
Исследование поведения фермента как среды реакции требует, с одной стороны, экспериментального моделирования, с другой — построения теории скоростей реакций в растворах.

Имеются пока немногочисленные работы, в которых ферменты частично моделируются синтетическими полиэлектролитами. Остановимся на исследованиях, опубликованных в работах [113—116].

Поли-4-винилпиридины (ПВП), частично алкилированные 2-(2'-хлорэтил)-пиридином или бензилхлоридом, проявляют высокую каталитическую активность при гидролизе сложноэфирной связи, на 2—4 порядка превосходящую каталитическую активность низкомолекулярных аналогов. Был изучен ряд алкилированных ПВП типа



Гидролизу подвергались следующие субстраты: *n*-нитрофенил-ацетат (НФА), *n*-нитрофенилтриметилацетат (НФТМА), *n*-нитрофенилбензоат (НФБ), *n*-нитрофенилциннамат (НФЦ). Часть полимеров вела себя не как истинные катализаторы, но в соответствии со схемой



т. е. «катализатор» изменялся в ходе реакции, образуя соединение ES' . Таким образом, здесь происходит «субстратное

ингибирование». Другие алкилпроизводные ПВП вели себя как истинные катализаторы — комплекс ES' расщеплялся. Кинетика гидролиза в обоих случаях отвечала уравнению Михаэлиса — Ментен (см. стр. 363). Величина k_2/K_M для полимеров варьировала от 4,5 до 64,0 л·моль·сек⁻¹ (в зависимости от природы алкилов и их содержания), тогда как для низкомолекулярного аналога 4-этилпиридина $k_2/K_M = 1,6 \cdot 10^{-2}$ л·моль·сек⁻¹. Повышенная каталитическая активность полимера объясняется возникновением в макромолекулярном клубке активных полостей, образованных гидрофобными заместителями. Это подтверждается интересными фактами. Каталитическая активность имеет резко выраженный максимум при определенном содержании α неалкилированных пиридиновых колец. Значение α , отвечающее максимуму, в свою очередь возрастает с увеличением степени полимеризации. В то же время приведенная вязкость полимера имеет острый минимум при том же значении α . Очевидно, что при этом полимер приобретает форму организованной глобулы с гидрофобной полостью внутри нее. Полимерный катализатор характеризуется высокой специфичностью; так, ПВ-бензилпиридин гидролизует НФА в 25 раз быстрее, чем НФТМА, и неизмеримо быстрее, чем НФБ и НФЦ. Активными центрами служат незамещенные пиридиновые кольца, окруженные N-алкилированными кольцами. В полости находятся, таким образом, нуклеофильные группы (пиридиновые кольца), окруженные гидрофобными заместителями. Кинетическое поведение полимерных катализаторов имитирует поведение α -химотрипсина. Для них изучено влияние среды на глобуляризацию и гидролиз и определены термодинамические характеристики элементарных стадий гидролиза.

В изложенных выше исследованиях моделированы свойства фермента как среды реакции, что позволяет количественно оценить соответствующий вклад в ферментативную активность. Как можно найти этот вклад теоретически?

Имеется ряд попыток построить теорию ионных и ион-дипольных реакций в растворах, основанную на теории абсолютных скоростей реакций Эйринга [2, 117, 119]. Сама эта теория является, по существу, «газовой», и в указанных работах вакуум заменяется непрерывной средой, характеризуемой макроскопическим значением статической диэлектрической проницаемости ϵ , и все изменения в константах скоростей выражаются через ϵ . Между тем среда поляризуется, перестраивается при изменении электронной структуры реагентов, причем первый процесс происходит значительно медленнее второго. Расчеты скоростей окислительно-восстановительных реакций в растворах, учитывающие динамическую роль среды, были впервые выполнены Маркусом [120]. В дальнейшем скорость электронного

обмена была рассчитана более строго в рамках квантовой механической теории химических реакций, протекающих в полярных средах [121—124]. Основное положение теории состоит в том, что все движения частиц, участвующих в реакции, включая частицы растворителя, могут трактоваться либо классически, либо квантово. Классическими являются движения с частотами $\omega \ll kT/\hbar$, квантовыми — с частотами $\omega \gg kT/\hbar$. Энергия активации процесса определяется высотой потенциального барьера, преодолеваемого классической подсистемой, а трансмиссионный коэффициент κ (см. стр. 357) — способностью квантовой подсистемы к туннельному прохождению под барьером.

Состояние полимерного «растворителя» можно описать набором гармонических осцилляторов с координатами q_x и частотами ω_x . Зависимость кинетических параметров реакции от свойств растворителя можно определить, если известна комплексная диэлектрическая проницаемость среды $\varepsilon(\mathbf{k}, \omega)$, где зависимость ε от волнового вектора \mathbf{k} описывает изменение ε , вызванное изменением состояния среды. Энергию ее реорганизации можно записать в виде

$$E_s = \frac{1}{2} \sum_{x \text{ (класс)}} \hbar \omega_x (q_{x0}^f - q_{x0}^i) = \frac{1}{8\pi} \sum_{\mathbf{k}} (\mathbf{D}_i(\mathbf{k}) - \mathbf{D}_f(\mathbf{k})) \frac{1}{\pi} \int_{\text{(класс)}} \frac{\text{Im } \varepsilon(\mathbf{k}, \omega)}{\omega |\varepsilon(\mathbf{k}, \omega)|} d\omega, \quad (6,81)$$

где q_{x0}^i, q_{x0}^f — равновесные значения нормальных координат до и после электронного перехода; $\mathbf{D}_i(\mathbf{k})$ и $\mathbf{D}_f(\mathbf{k})$ — фурье-амплитуды вектора электрической индукции реагентов и продуктов реакции

$$\mathbf{D}_{i, f} = \int \mathbf{D}_{i, f}(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{k}\mathbf{r}) d\mathbf{r}. \quad (6,82)$$

В формуле (6,81) суммирование и интегрирование проводятся по частотам, соответствующим классическим степеням свободы.

Для вычисления энергии активации простейших процессов электронного переноса нужно найти седловую точку на поверхности пересечения термов начального U_i и конечного U_f состояний:

$$\left. \begin{aligned} U_i &= J_i + \frac{1}{2} \sum_{x \text{ (класс)}} \hbar \omega_x (q_x - q_{x0}^i)^2, \\ U_f &= J_f + \frac{1}{2} \sum_{x \text{ (класс)}} \hbar \omega_x (q_x - q_{x0}^f)^2. \end{aligned} \right\} \quad (6,83)$$

Координаты седловой точки q_x^* даются формулой

$$q_x^* = 1/2 (q_{x0}^f - q_{x0}^i) + \frac{\Delta J}{2E_s} (q_{x0}^f - q_{x0}^i), \quad (6,84)$$

где $\Delta J = J_f - J_i$ — тепловой эффект реакции. Энергия активации равна

$$E^* = 1/2 \sum_{x \text{ (класс)}} \hbar \omega_x (q_x^* - q_{x0}^i)^2 = \frac{(\Delta J + E_s)^2}{4E_s}. \quad (6,85)$$

Для энтропии активации (см. [124]) имеем

$$S^* = k \ln \frac{\hbar \omega_{\text{эфф}}}{kT}, \quad (6,86)$$

где

$$\omega_{\text{эфф}}^2 = \frac{\sum_x \omega_x^3 (q_{x0}^i - q_{x0}^f)^2}{\sum_x \omega_x (q_{x0}^i - q_{x0}^f)^2}; \quad (6,87)$$

здесь суммы берутся также по классическим степеням свободы. Трансмиссионный коэффициент равен

$$\kappa = \left\{ \begin{array}{l} 1, \text{ если } |\mathcal{L}|^2 \gg \hbar \omega_{\text{эфф}} \omega (kTE_s)^{1/2}, \\ |\mathcal{L}|^2 \left(\frac{4\pi^3}{\hbar^2 \omega_{\text{эфф}}^2 kTE_s} \right)^{1/2}, \text{ если } |\mathcal{L}|^2 \ll \hbar \omega_{\text{эфф}} \omega (kTE_s)^{1/2}, \end{array} \right\} \quad (6,88)$$

где \mathcal{L} — электронный обменный интеграл.

Изложенное относится к полярной среде. В ФСК реагенты (субстраты) находятся в полностью или частично неполярной среде. Однако физическая природа влияния среды на реакцию должна оставаться такой же. В отсутствие среды относительное расположение электронных уровней реагентов не меняется во времени. Электронный переход совершается практически мгновенно, и поэтому в силу закона сохранения энергии изменение энергии электрона должно компенсироваться изменением кинетических энергий реагентов. Но из-за большой массы ядер резкое изменение их скоростей маловероятно. Поэтому электронный переход может совершаться лишь при практическом совпадении начального и конечного уровней, отвечающих переносу электрона, т. е. переходу из восстановленного состояния $E_{\text{восст}}^0$ в окисленное $E_{\text{окис}}^0$. Положение этих уровней зависит от динамического состояния среды. Переходному состоянию будет отвечать такая конфигурация диполей среды и (или) такая деформированная конфигурация ФСК (фермента), при которой совпадают уровни $E_{\text{восст}}^0$ и $E_{\text{окис}}^0$. Эти энергии оказываются функциями некоторых обобщенных координат q , характеризую-

ших состояние среды. В гармоническом приближении гамильтониан среды имеет вид

$$\mathcal{H} = -1/2 \sum_x \hbar \omega_x \frac{\partial^2}{\partial q_x^2} + 1/2 \sum_x \hbar \omega_x (q_x - q_{x0})^2 + J, \quad (6,89)$$

где ω_x и q_x — частоты и координаты нормальных колебаний среды, q_{x0} — равновесные координаты, J — минимальная потенциальная (или свободная) энергия системы. В общем случае

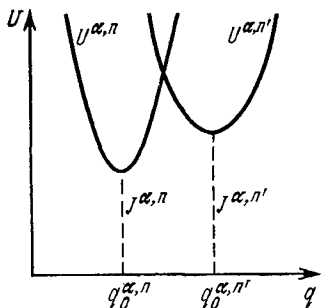


Рис. 6.25. Электронный переход без изменения α .

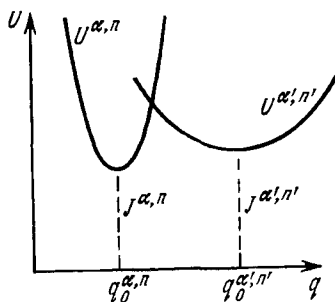


Рис. 6.26. Электронный переход с изменением α .

равновесная конфигурация среды будет характеризоваться различными конформационными состояниями α и различными электронными состояниями активного центра n . Учет ЭКВ (электронно-конформационных взаимодействий) требует записи гамильтониана \mathcal{H} в виде

$$\mathcal{H} = -1/2 \sum_x \hbar \omega_x^{\alpha, n} \frac{\partial^2}{\partial q_x^2} + 1/2 \sum_x \hbar \omega_x^{\alpha, n} (q_x - q_{x0}^{\alpha, n})^2 + J^{\alpha, n}, \quad (6,90)$$

и вероятность элементарного акта реакции равна

$$W = \sum_{\substack{\alpha, \alpha' \\ n, n'}} \Phi_{\alpha, n} W_{n, n'}^{\alpha, \alpha'}, \quad (6,91)$$

где $\Phi_{\alpha, n}$ — вероятность того, что до реакции среда характеризовалась конформационным состоянием α и электронным состоянием n , а $W_{n, n'}^{\alpha, \alpha'}$ — вероятность перехода системы в состояние α', n' . Электронные термы (поверхности потенциальной энергии), соответствующие различным конформационным и электронным состояниям, схематически изображены на рис. 6.25 (электронный переход без изменения α) и 6.26 (с изменением α).

Отличие неполярной среды от полярной состоит в том, что при переносе электрона или при сдвиге электронной плотности

энтропия реакции может быть значительной. Это определяется тем, что частоты, характеризующие флуктуацию поляризации в ходе реакции, не меняются, а деформационные акустические частоты при конформационных переходах могут существенно изменяться. Соответственно для неполярных сред скорость реакции может в значительной мере определяться энтропией активации. Из-за низких значений акустических частот, соответствующих ядерным осцилляторам, в неполярной среде электронная подсистема всегда будет адиабатически следовать за деформационными колебаниями и трансмиссионный коэффициент κ должен равняться 1.

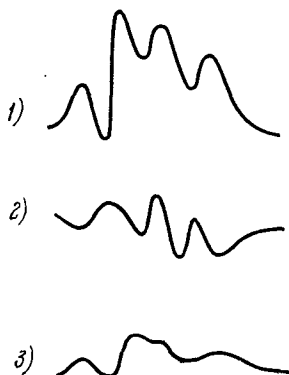


Рис. 6.27. Эффект дополнителности.

1—профиль химической свободной энергии, 2—профиль конформационной свободной энергии, 3—суммарный профиль.

Таким образом, актуальной задачей является построение физической теории ферментативного катализа, основанной на рассмотрении ЭКВ (см. [125, 126]). Приведенные соображения дают физическую трактовку роли акустических колебаний (см. стр. 401), «дыбы» (см. стр. 401), а также так называемому *эффекту дополнителности*. Ламри и Билтонен [127] полагают, что профиль конформационной свободной энергии вдоль реакционной координаты дополнителен к профилю химической (электронной) свободной энергии (рис. 6.27). В результате в суммарном профиле активационные барьеры снижены.

Ясные сведения об ЭКВ дают исследования влияния конформации на скорость медленного изотопного обмена водорода в полинуклеотидах, проведенные Варшавским и сотрудниками [128]. Скорость обмена водорода на третий у атома C_8 пуринового кольца в полиадениловой кислоте зависит от распределения электронной плотности в пурине. Это распределение изменяется при конформационных движениях, вызванных сдвигом рН и комплексообразованием с полиуридиловой кислотой. Скорость изотопного обмена весьма чувствительна к таким изменениям электронной плотности.

Общий результат ЭКВ состоит в том, что электронная перестройка в ходе ферментативной реакции влечет за собой изменение конформации макромолекулы. Эту ситуацию можно описать на языке физики твердого тела. Перемещение электрона или электронной плотности в макромолекуле вызывает деформацию «решетки», т. е. конформационную перестройку. Ее можно трактовать как возбуждение длинноволновых фононов, и си-

стема электрон плюс деформация макромолекулы оказывается подобной полярону. Назовем такую систему *конформоном* [129]. Энергия конформона меньше энергии свободного электрона. Понижен и барьер для реакции.

В отличие от полярона, конформон не является истинной квазичастицей, способной перемещаться на большие расстояния. Его энергия быстро диссипирует из-за неоднородности и аперидичности структуры глобулы. Однако для реализации ферментативного процесса достаточно конформационного превращения, т. е. возбуждения длинноволновых фононов в пределах нескольких пептидных связей. Дальнейшая конформационная перестройка глобулы может происходить уже не в результате ЭКВ, но вследствие кооперативности макромолекулы.

Представляется естественным применить концепцию конформона к рассмотрению неоднократно упоминаемых в литературе полупроводниковых свойств биополимеров [130]. Очевидно, что конформационные изменения должны сопровождать перемещение электрона в биополимерной системе и, тем самым, сказываться как на значении предэкспоненциального фактора σ_0 , так и на эффективной ширине энергетической щели E в выражении для электропроводности

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-E/2RT).$$

Однако существование у биополимеров полупроводниковых свойств и биологическая значимость последних отнюдь не доказаны. Наблюдаемые эффекты плохо воспроизводимы, они могут объясняться ионными примесями и другими факторами. Как уже сказано, все то, что мы знаем о структуре и свойствах биополимеров, не дает оснований считать их полупроводниками (см. стр. 110).

Напротив, ионную проводимость мембран вероятно следует рассматривать на основе концепции конформона.

В наиболее непосредственной форме представления об ЭКВ, о конформоне применимы к окислительно-восстановительным ферментам — к цитохромам. Уже сформулированы гипотезы, объясняющие окислительное фосфорилирование на основе представлений об ЭКВ [131—134]. Проведены модельные квантовомеханические расчеты электронного обмена у цитохрома *c*.

Экспериментальную информацию об ЭКВ может дать систематическое исследование изменений химических (электронных) свойств биополимера, вызванных изменением лиганда или кофактора, и наблюдение возникающих при этом изменений конформационных свойств макромолекулы как целого. Такое исследование было проведено на системах аспаратаминотрансферазы (ААТ) — лиганд (кофактор) [135, 147, 148]. Изучалась денатурация в растворе мочевины апофермента, нормального холофер-

мента и ряда комплексов апофермента с модифицированными коферментами. Равновесные изотермы денатурации распадаются для изученных систем на два типа кривых — со значениями концентрации мочевины c_m^* , отвечающими средней точке денатурации и равными приблизительно 5 и 7 М. Весьма близкие по электронному строению системы, содержащие соответственно $S-O-CH_3$ - и $S-N$ -группы, дают разные кривые. Известно, что наличие $-O-CH_3$ препятствует образованию альдиминной связи с ААТ (см. стр. 380). Напротив, кривые для аминформы и холофермента, восстановленного $NaBH_4$, практически совпадают, несмотря на то, что в первом случае альдиминная связь отсутствует, а во втором она очень прочна. Эти результаты непосредственно показывают, что электронные изменения в активном центре сильно сказываются на конформационной стабильности белка. О том же свидетельствуют данные, полученные для миоглобина (см. гл. 7).

Сопоставление ферментативного процесса, катализируемого ААТ, с реакцией в конгруэнтной модельной системе (см. стр. 381) показывает, что в ферментной системе происходит выравнивание энергетических уровней различных промежуточных форм и, тем самым, согласно правилу Бренстеда, понижение активационных барьеров. В этом проявляется комплементарность профилей химической (электронной) и конформационной энергий (см. стр. 408). Можно предположить, что изменение конформационной стабильности белка как целого коррелирует с конформационной свободной энергией многостадийного процесса. Промежуточные формы, возникающие в реакции с ААТ, моделируются комплексами холофермента с ингибиторами, останавливающими реакцию на различных стадиях. Была изучена денатурация таких комплексов. Из значений c_m^* , согласно Тенфорду (стр. 245), можно найти абсолютные значения свободной энергии денатурации ΔF , определяющие конформационную стабильность. Установлено, что конформационная стабильность на разных стадиях процесса различна. Формы, обладающие наименьшей химической энергией, в конгруэнтной системе имеют наибольшую конформационную энергию. Эти результаты согласуются с представлением о комплементарности, реализуемой в результате ЭКВ [147, 148].

§ 6.6. МЕТАЛЛОФЕРМЕНТЫ

ЭКВ отчетливо проявляются в свойствах *металлоферментов*.^{*} Металлы служат кофакторами многих ферментов — в большинстве классов ферментов имеются металлотетракоординатные. Ион металла непосредственно воздействует на конформационные свойства фермента и является удобной для исследования меткой в