

Физика должна рассмотреть эту картину количественно, вы-явив попутно, в какой мере возможно разделение указанных эф-фектов.

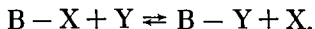
Приведем в заключение данные, характеризующие скорости ферментативных и аналогичных неферментативных процессов (табл. 6.1).

#### § 6.4. Конформационные свойства ферментов

Для понимания ферментативной активности необходимо рас-смотреть конформационное поведение макромолекулы белка. Конформационная лабильность белка обеспечивает возможность его специфического взаимодействия с субстратами и другими лигандами. В некоторых конформациях белок более эффективно связывает субстрат. Одновременно происходит отбор конформа-ций субстрата. В ФСК отбираются те конформации белка и суб-страта, которые находятся в *структурном соответствии* друг с другом, обеспечивающем оптимальное значение свободной энер-гии взаимодействия. При образовании ФСК происходит взаим-ная «подгонка» конформаций белка и субстрата, т. е. их специ-фический отбор. Посредством конформационных превращений реализуется структурное соответствие фермента и субстрата.

Конформационные эффекты определяют значительные изме-нения энтропии при образовании ФСК. Понижение энтропии при отборе определенной конформации может компенсироваться понижением энтальпии. Физический анализ событий такого ти-па требует учета явлений в окружающей водной среде.

В свое время Фишер предложил *модель «ключ — замок»* для рассмотрения фермент-субстратного взаимодействия. Фермент и субстрат обладают жесткими структурами, причем фермент «по-догнан» к субстрату как замок к ключу. Ряд фактов противоречит такой модели — взаимодействие фермента с субстратом имеет, по-видимому, не статический, а динамический характер. Кошланд предложил модельную теорию *индуцированного струк-турного соответствия* фермента и субстрата. Перечислим исход-ные положения этой теории, задачи которой состояли прежде всего в объяснении специфичности ферментов, катализирующих реакции переноса связи



1. Субстрат вызывает изменение геометрии фермента при своем проникновении 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.

Конечно, эта теория охватывает и те случаи, в которых из-меняется конформация субстрата, а не фермента, или изменя-ются конформации и того, и другого. Основная идея теории со-

стоит в определяющей роли конформационной лабильности взаимодействующих молекул для ферментативного катализа.

Ряд фактов действительно свидетельствует о конформационных превращениях ферментов при их взаимодействиях с субстратами. В присутствии субстратов некоторые ферменты становятся более жесткими, другие, напротив, более лабильными — легче денатурируются при нагревании. Субстраты индуцируют диссоциацию *глутаматдегидрогеназы* и *гексокиназы* на субъединицы. Под действием субстрата изменяется реакционная способность аминокислотных остатков фермента. Спектр поглощения *химоотрипсина* меняется при его взаимодействии с субстратом и эти изменения могут быть интерпретированы как вызванные изменением конформации. Изменения конформаций проявляются и в спектрах люминесценции как ароматических аминокислотных остатков, так и сорбированных на белке красителей. Методами спектрополяриметрии установлены изменения  $\alpha$ -спиральности, возникающие при взаимодействиях ферментов с субстратами, коферментами и другими лигандами. Сведения о конформационных изменениях в ФСК дают также спектры ЭПР ферментов, содержания парамагнитные метки, спектры ЯМР и т. д.

Рентгенография фермент-субстратных комплексов дает прямую информацию о конформационных превращениях. При вхождении субстрата в полость *лизоцима* (с. 185) полость сужается и более плотно «зажимает» субстрат. Смещения аминокислотных остатков белка невелики, но заметны — остаток Трп 62 смещается на 0,075 нм. Одновременно происходит изменение конформации аналога субстрата — небольшой поворот углеводных колец вокруг гликозидной связи.

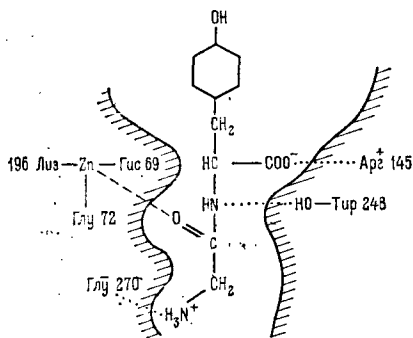


Рис. 6.8. Схема активного центра карбоксипептидазы

при исследовании *карбоксипептидазы*. В присутствии аналога субстрата глицилтирозина расположение остатков существенно меняется. Активный центр представляет собой глубокую полость, подобную «рту наука» со «щупальцами», готовыми направить субстрат к кофактору — к атому Zn. Одно «щупальце», содержащее Тир 248, направляется к NH-группе субстрата, Арг 145 другого взаимодействует с карбоксилем субстрата, Глу 270 третьего — с конечной аминогруппой (рис. 6.8).

Как уже указывалось (с. 134), рентгеноструктурный анализ позволил недавно определить относительную подвижность (конформационную и колебательную) различных аминокислотных остатков в белках. Исследования метиоглобина и лизоцима показали, что остатки, расположенные внутри глобулы, имеют значительно меньшую подвижность, чем расположенные на ее поверхности.

Методы рентгенодинамического анализа, мёсбауэровской спектроскопии, рэлеевского рассеяния мёсбауэровского излучения (§ 5.1, 5.3) и другие показывают, что конформационная

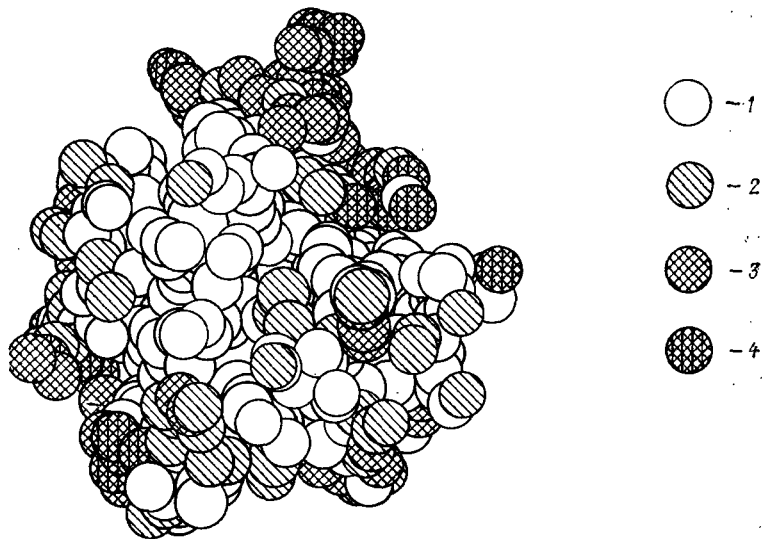


Рис. 6.9. Атомная модель молекулы рибонуклеазы  $C_2$  из *Aspergillus clavatus* по данным рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,55 Å. Различной штриховкой показаны атомы, имеющие различную подвижность — средние квадратичные смещения  $\langle u \rangle$ : 1 —  $\langle u \rangle < 0,5 \text{ Å}$ ; 2 —  $0,5 \text{ Å} < \langle u \rangle < 0,6 \text{ Å}$ ; 3 —  $0,6 \text{ Å} < \langle u \rangle < 0,7 \text{ Å}$ ; 4 —  $\langle u \rangle > 0,7 \text{ Å}$ . Значения  $\langle u \rangle$  для атомов, входящих в  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -формы, заметно ниже, чем для атомов в нерегулярных участках

подвижность сохраняется в белках и при низких температурах. Происходят ли эти движения вблизи положения равновесия или конформационная структура глобулы неравновесна, «застеклована»? По-видимому, возможны оба случая. В отличие от стеклообразных полимеров, высота и положение пика теплоемкости на кривой плавления белка большей частью не зависят от скорости нагревания, что свидетельствует в пользу равновесия. Известны, однако, и противоположные случаи.

На рис. 6.9 показана рентгенодинамическая картина, полученная Поляковым в Институте кристаллографии АН СССР для рибонуклеазы.

Итак, в ФСК достигается структурное соответствие, реализуемое в полости молекулы фермента. Как показывает сопоставление всех изученных рентгенографически структур, их общая особенность состоит в том, что внутренняя поверхность полости образована преимущественно неполярными остатками. Вследствие гидрофобных взаимодействий полярные остатки выведены наружу. неполярное «нутро» белковой молекулы имеет малую диэлектрическую проницаемость, что облегчает электрические взаимодействия. Фермент является не только специфическим реагентом, но и средой реакции. Перутц писал: «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. неполярные внутренние области ферментов обеспечивают живую клетку эквивалентами органических растворителей, применяемых химиками».

Все эти представления имеют модельный, качественный характер и сами по себе не означают построения физической теории ферментативного катализа. Пути, ведущие к такой, еще не созданной теории, описаны далее.

### § 6.5. Физика фермент-субстратного взаимодействия

Физическое своеобразие ферментативного катализа определяется прежде всего ролью глобулы, размеры которой на порядок больше размеров субстрата. Естественно возникает вопрос о причинах большой эффективности именно такой системы при осуществлении химического превращения в водной среде, при нормальном давлении и физиологической температуре.

При сорбции активным центром молекула субстрата переходит из водного окружения в окружение, созданное аминокислотными остатками. Субстрат оказывается в окружении с малой диэлектрической проницаемостью, в котором могут осуществиться сильные электрические взаимодействия между реагентами и полярными группами фермента. Развивая идею «фермент — растворитель», Перутц приходит к заключению о том, что электростатические взаимодействия дают главный вклад в энергетику ферментативного катализа, т. е. в понижение энергии активации, вызываемое ферментом. Отличие фермента от водного раствора состоит в том, что в активном центре фермента располагаются диполи с фиксированной ориентацией по отношению к заряженным группам субстрата, даже если поле этих зарядов мало. Вследствие такой ориентации ферменты могут стабилизировать пары ионов и другие распределения зарядов значительно больше, чем вода. В водных растворах электростатическое притяже-