

БИОХИМИЯ

Д. Л. ТАЛМУД, член-корреспондент Академии Наук СССР

СТРОЕНИЕ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ И ЕЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

1. Строение белковой молекулы—не обычная проблема химии. И это не только потому, что белки—самые сложные высокомолекулярные вещества, строение которых еще только начинает выясняться. Биохимическая роль белка делает вопрос о строении белковой молекулы одним из важнейших вопросов всего естествознания. Решение этого вопроса дает возможность приступить к исследованию обмена веществ в живых организмах, как к ряду элементарных химических процессов, обеспечивающих непрерывное воспроизведение и накопление определенного белка.

Выдвинутая недавно Ринч⁽¹⁾ гипотеза строения белковой молекулы, по видимому, открывает эту возможность. Но предложенная гипотеза является пока лишь результатом математического рассмотрения проблемы, поэтому она нуждается прежде всего в экспериментальной проверке. Опытное подтверждение сделает эту гипотезу теорией, на основе которой возможно будет затем по-новому оценить биохимическую роль белка. Описанные ниже эксперименты являются первой попыткой в этом направлении.

2. В настоящее время известны три состояния, в которых могут находиться белки: а) «волокнутое» состояние, характеризующееся правильным строением молекулярной цепи и кристаллическим характером («волокна»), б) аморфное состояние, характеризующееся хаотическим сплетением свернутых в «узлы» молекулярных цепей, и в) «глобулярное» состояние белковых молекул в растворе, кристаллизующихся с большим количеством воды из маточного раствора определенного состава. Очень вероятно, что «глобулярные» белки наиболее близки по строению к активному биохимическому состоянию; аморфное состояние связано с денатурацией «глобулярных» белков, а «волокнутое» состояние возникает при растяжении аморфного белка.

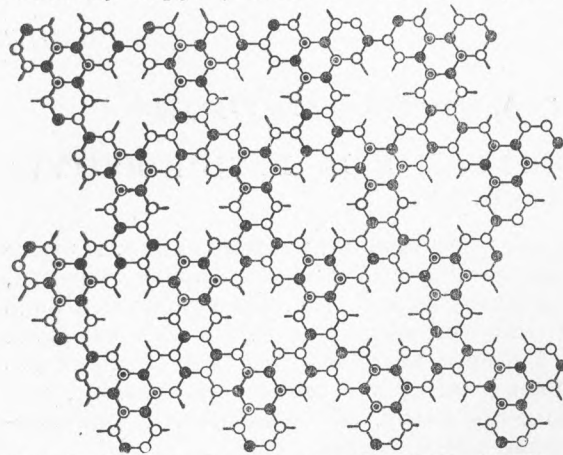
Естественно поэтому, что наибольший интерес представляет строение молекулы «глобулярного» белка, хотя последний наименее изучен. Однако, бесспорно установлено, что «глобулярные» белки представляют собой не смеси, а однородные вещества совершенно определенного молекулярного веса (около 35 000 или кратного этой величины)⁽²⁾. Для ряда белков с молекулярным весом около 35 000 Бергман и Ниман⁽³⁾ показали с большой убедительностью, что в состав молекулы входит 288 аминокислотных остатков.

Гипотеза Ринч заключается в основных чертах: 1) в предположении, что все аминокислотные остатки образуют «циклольную» структуру из определенного образом чередующихся ди- и триазиновых колец, и 2) в предпо-

ложении, что «циклольная» плоскость может замыкаться в замкнутые в пространстве многогранники, поверхности которых состоят лишь из определенного числа аминокислотных остатков. Для белка с молекулярным весом около 35 000 получается как раз 288 остатков.

Опытная проверка гипотезы Ринч была осуществлена нами следующим образом.

Как видно из фиг. 1, изображающей схему циклольной структуры, все «отверстия» в гранях «глобулярной» молекулы представляют собой пространство, окруженное 12 шестиугольниками. Однако, боковые группы α -аминокислот еще сужают «отверстие», делая его близким по величине к бензольному ядру. (Только в том случае, если хотя бы часть аминокислот



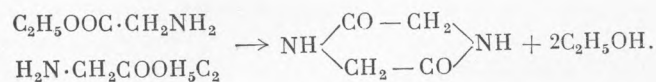
Фиг. 1.—Циклольная структура ●=N; ○=C(OH), пептидный гидроксил, вверх, ⊙=C(OH), пептидный гидроксил, вниз; ○—=CHR, начальное направление боковой цепи вверх, ○—=CHR, начальное направление боковой цепи вниз (по Ринч).

состоит из гликокола, «отверстие» будет иметь больший размер.)

Это соображение привело нас к мысли о том, что молекулы, сечение которых меньше диаметра бензольного ядра, должны диффундировать сквозь «отверстия» внутрь белковых молекул, заполненных, очевидно, растворителем. Если после этого вызвать «интраглобулярную» реакцию, сопровождающуюся увеличением размера молекул продукта реакции до размеров бензольного ядра или больше, то последние не смогут проникнуть в межглобулярное пространство. Эта реакция должна протекать при

температуре, не вызывающей свертывания белка.

Для проведения «интраглобулярной» реакции мы избрали этиловый эфир гликокола, обладающий по Фишеру⁽⁴⁾ замечательным свойством перехода при комнатной температуре в водном растворе в 2-5-диоксо-пиперазин:



Приводим один из типичных опытов: к охлажденному до 0° водному раствору дважды осажденного кристаллического яичного альбумина, нейтрализованного раствором аммиака, прибавляется водный раствор этилового эфира гликокола. Общий объем смеси составлял 50 см³ и содержал 3.328 г белка и 5.6375 г этилового эфира гликокола. Затем смесь в течение суток нагревалась до 35° и оставлялась 2 суток при комнатной температуре, оставаясь все время совершенно прозрачной. Но уже через несколько часов после начала опыта образовался небольшой крупнокристаллический осадок, оказавшийся диоксо-пиперазином (0.3374 г). После осаждения осадка диоксо-пиперазин из смеси больше не выделялся даже через 5 суток от начала опыта.

В отдельном опыте определялась кроме того растворимость диоксо-пиперазина в 50 см³ раствора белка той же концентрации и состава. При этом в раствор перешло 0.6522 г диоксо-пиперазина.

Таким образом мы установили, что из образовавшегося в «интраглобулярной» реакции диоксо-пиперазина $0.3374 \text{ г} + 0.6522 \text{ г} = 0.9896 \text{ г}$ оказалось между «глобулами» (на образование его пошло 1.7882 г этилового эфира гликокола). Следовательно, внутри «глобул» осталось $5.6375 - 1.7882 \text{ г} = 3.8493 \text{ г}$ этилового эфира гликокола, образовавшего 2.296 г диоксо-пиперазина.

Произведенное особо измерение кинетики образования диоксо-пиперазина из водного раствора этилового эфира гликокола убеждает в том, что весь эфир в течение опыта с белком превратился в диоксо-пиперазин (фиг. 2). Так как эта реакция второго порядка ($k_2 = 12.1 \cdot 10^{-3}$), то зависимость скорости ее от концентрации эфира очень велика, между тем измерение кинетики производилось при концентрации (3%, температура 35°), в три раза меньшей, чем в опыте с белком.

Отдельно была измерена адсорбция этилового эфира гликокола на денатурированном нагреванием яичном альбумине. Адсорбция производилась из 4% раствора при 0° , когда скоростью превращения эфира в диоксо-пиперазин можно пренебречь. Этот опыт показывает, что адсорбцией на белке удерживается в 6 раз меньше эфира, чем «интраглобулярной» реакцией.

Не менее убедительно в пользу «интраглобулярной» реакции и против адсорбции говорит сопоставление следующих данных:

Молекулярный вес яичного альбумина (²)	34.500
Удельный вес яичного альбумина	1.3
Взятое для опыта количество яичного альбумина	3.1382 г
Объем взятого для опыта белка	2.41 см ³
Число молекул белка во взятом для опыта количестве	$5.5 \cdot 10^{19}$
Поверхность одной «глобулы» яичного альбумина	5914.5 \AA^2
Объем одной «глобулы» яичного альбумина	43214 \AA^3

Если даже предположить, что каждый шестиугольник, входящий в «цикллол», может удержать 2 молекулы этилового эфира гликокола или что $\frac{1}{3}$ всей поверхности «глобул» покрыта молекулами эфира гликокола (сечение равно 20.4 \AA^2), то на каждую «глобулу» придется 70 молекул эфира гликокола, а на все взятое количество белка $5.3 \cdot 10^{21}$ молекул эфира гликокола. Из приведенных ниже данных легко подсчитать количество диоксо-пиперазина, оказавшегося внутри «глобул» белка после «интраглобулярной» реакции.

Удельный вес этилового эфира гликокола	1.0275
Объем 1 молекулы эфира гликокола	165.5 \AA^3
Число молекул эфира, могущих поместиться в 1 «глобуле» яичного альбумина	261
Удельный вес диоксо-пиперазина	1.083
Объем 1 молекулы диоксо-пиперазина	173.7 \AA^3
Число молекул диоксо-пиперазина, могущих поместиться в 1 «глобуле» яичного альбумина	248

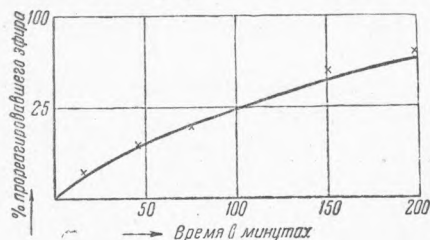
В результате опыта оказалось, что внутри 1 «глобулы» заключено 200 молекул диоксо-пиперазина, образовавшихся из 400 молекул эфира гликокола, а внутри всех «глобул» взятого белка заключено $22.4 \cdot 10^{21}$ молекул эфира гликокола, превратившегося в результате «интраглобулярной» реакции в диоксо-пиперазин. Это в 4.2 раза больше того количества эфира гликокола, которое могло бы адсорбироваться на поверхности всех «глобул».

В то же время количество оказавшихся внутри «глобул» молекул диоксо-пиперазина очень близко к максимальному количеству молекул, которое могло бы поместиться внутри «глобул».

Число молекул диоксо-пиперазина во всех «глобулах» (опыт)	$11.2 \cdot 10^{21}$
Максимальное число молекул диоксо-пиперазина, вмещающихся во всех «глобулах»	$13.6 \cdot 10^{21}$

3. Адсорбция несомненно предшествует «интраглобулярной» реакции. Только ею можно объяснить каталитическое течение «интраглобулярной» реакции. В межглобулярной среде скорость реакции значительно меньше. Катализатором является самая «глобулярная» молекула белка. Действительно, если бы скорость реакции образования диоксо-пиперазина внутри «глобул» и между ними была одинакова, то внутри «глобул» могла бы оказаться только та доля общего количества диоксо-пиперазина, которая равна занимаемой белком доле общего объема раствора. В нашем опыте объем, занимаемый молекулами белка (2.41 см^3), равен лишь 0.05 общего объема раствора (50 см^3). Поэтому в отсутствие каталитического действия белковой «глобулы» только 0.05 всего образовавшегося диоксо-пиперазина могло бы образоваться внутри «глобул». На самом деле внутри «глобул» оказалось около 0.68 всего диоксо-пиперазина.

Каталитический характер «интраглобулярной» реакции можно объяснить следующим образом. Диффундирующие внутрь «глобул» молекулы этилового эфира гликокола адсорбируются на внутренней поверхности «глобулы» (вероятнее всего, связываясь с энольными ОН-группами). При этом «циклольная» структура поверхности «глобулы» играет роль «штампа» по отношению к адсорбированным молекулам этилового эфира гликокола, расположение которых на поверхности «штампа» в точности повторяет геометрическую структуру последнего. Это выгодное предварительное расположение реагирующих молекул несомненно благоприятствует стериически ускорению реакции.



Фиг. 2.

В отличие от молекул эфира гликокола «отштампованные» молекулы диоксо-пиперазина не обладают адсорбируемыми группами и поэтому немедленно десорбируются, освобождая место на поверхности «штампа» для новых молекул эфира гликокола.

4. Изложенные выше эксперименты, подтверждая на опыте предложенную Ринч гипотезу строения белковой молекулы, показывают одновременно существование «интраглобулярных» реакций и каталитическую роль структуры белка в этих реакциях. Вместе с тем они открывают возможность для создания гипотезы (пусть еще мало обоснованной) о биокаталитическом действии белка в процессе накопления и воспроизведения определенного вида белка. Молекула «глобулярного» белка должна быть уподоблена элементарной клетке совершенно так же, как цепочечная молекула целлюлозы, кератина и т. п. может быть названа элементарным волокном. В такой элементарной клетке легко осуществить синтетические «внутриклеточные» процессы даже тогда, когда вне их протекает процесс диссимилиации. Известно, что производные диоксо-пиперазина расщепляются некоторыми протеолитическими ферментами. Это расщепление, однако, не сможет иметь места внутри элементарной клетки, так как молекула фермента из-за своих огромных размеров не сможет туда проникнуть. Каталитическое же действие самой структуры белковой молекулы будет способствовать внутри «глобул» синтезу «циклов» или их фрагментов из отдельных аминокислот, образующихся в процессе «экстрацеллюлярной» диссимилиации. Может быть «интраглобулярные» синтетические процессы стимулируются протетической группой, входящей в «циклольную» структуру белка или связанной иным путем с ее внутренней поверхностью. Так или иначе внутри элементарной клетки синтезируется новая белковая молекула, постепенно дегидратирующая старую молекулярную оболочку.

Когда эта дегидратация вызовет денатурацию, старая оболочка дециклизируется и освобождает новую белковую молекулу. Конечно, мыслимо, что внутри больших «глобул», молекулярный вес которых очень велик, может образоваться несколько молекул с меньшим молекулярным весом и т. д. С известным правом эту гипотезу можно назвать гипотезой об эволюции белковых молекул.

В ы в о д ы

1. Подвергнута опытной проверке выдвинутая Ринч гипотеза строения «глобулярных» белков.
2. Показано существование «интраглобулярных» реакций.
3. Показан каталитический характер «интраглобулярных» реакций и предложен молекулярный механизм каталитического действия белковой структуры.
4. Предложена гипотеза биокаталитической эволюции белковых молекул.

Институт физических и химических
исследований.
Ленинград.

Поступило
13 V 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ D. M. Wrinch, Proc. Roy. Soc. A, **161**, 505 (1937); Trans. Farad. Soc., **33**, 4368 (1937). ² Th. Svedberg, Chem. Rev., **14**, 1 (1935); **20**, 81 (1937). ³ M. Bergmann a. C. Niemann, Journ. Biol. Chem., **118**, 301 (1937). ⁴ E. Fischer, Ber., **34**, 433, 2868 (1901).