

П. В. АФАНАСЬЕВ

## О ПРИРОДЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 VIII 1948)

Вопросы строения, структуры и физико-химических свойств глобулярных белков в последнее время получили существенное разъяснение. На основе общепринятых в химии макромолекул принципов С. Е. Бреслеру и Д. Л. Талмуду <sup>(1)</sup> удалось дать объяснение природы глобулярного состояния белков.

Согласно гипотезе, выдвинутой ими, белковая глобула, в некотором смысле, напоминает капельку эмульсии. Соотношение между числом гидрофобных и числом гидрофильных боковых цепей, а также своеобразии распределения боковых цепей вдоль полипептидной цепи приводят к появлению относительной монодисперсности в размерах молекул глобулярных белков.

Далее Д. Л. Талмуду с сотр. <sup>(2)</sup> удалось экспериментально осуществить глобулярное состояние у синтетических полиамидов, построенных, до некоторой степени, аналогично полипептидам. Таким образом было показано, что глобулярное состояние свойственно не только белковым веществам.

Эти работы касаются, в основном, выяснения природы так называемой минимальной глобулы, лежащей в основе различных классов глобулярных белков с большими молекулярными весами <sup>(3)</sup>. Глобулярные белки с молекулярными весами большими, чем у минимальной глобулы, рассматриваются как ассоциаты <sup>(4)</sup>.

Дальнейшими работами Д. Л. Талмуда и сотр. <sup>(5)</sup> показано, что для объяснения ряда существенных свойств глобулярных белков (различной степени асимметрии глобулярных белков <sup>(3)</sup>, обратимого растяжения белковых глобул в растворах мочевины, гуанидина, детергентов <sup>(6)</sup>, изменения химических и биохимических свойств <sup>(7)</sup>) необходимо учесть своеобразии строения глобулярных белков на границе с растворителем.

Фиксированность гидрофильных групп в полипептидной цепи и различие природы гидрофильных групп приводят к неравномерности поверхностных свойств пограничного с растворителем слоя глобулы. Так как форма глобулы обусловлена минимумом свободной энергии, то из-за неравномерности поверхностных свойств глобулы форма ее вообще отлична от шарообразной. Зависимость поверхностных свойств глобулы от свойств растворителя обуславливает изменение формы глобулы при изменении свойств растворителя. На основе этих представлений возможно понять относительно легкую обратимую изменчивость свойств глобулярных белков.

В случае обычной эмульсии всегда наблюдается процесс коалесценции, приводящий к слиянию частиц и к постепенному росту частиц эмульсии. Этот процесс термодинамически предопределен, так как слияние частиц эмульсии приводит к уменьшению поверхностной энергии. Частицы эмульсии всегда шарообразны, независимо от изме-

нения свойств растворителя, и процесс слияния частиц всегда энергетически выгоден. Если же мы имеем глобулярные молекулы, форма которых зависит от свойств растворителя, то процесс слияния частиц не всегда возможен, так как не всегда энергетически выгоден. Процесс слияния частиц может иметь место только при наличии определенных условий. В других случаях, наоборот, возможен процесс деления частиц.

Свободная энергия образования пептидной связи около  $-3,5$  ккал. (8), и, следовательно, пептидная связь является термодинамически неустойчивой и более или менее легко гидролизуется. Неустойчивым, по этим причинам, должен быть и полипептид. Однако, если полипептид находится в глобулярном состоянии, то, помимо свободной энергии образования пептидных связей, нужно учитывать поверхностную энергию на границе раздела глобула — растворитель. Нам представляется, что гидролиз белка в глобулярном состоянии в начальной стадии протекает не как процесс растворения, например, кристалла или как процесс коррозии, т. е. не топочимически, а происходит как процесс дробления глобулы при каждом гидролитическом расщеплении единичной пептидной связи. Таким образом, гидролиз глобулярного белка можно представить себе как процесс, обратный слиянию частиц. Если это так, то состояние равновесия или скорость распада должны определяться не только свободной энергией образования пептидной связи или энергией активации гидролиза пептидной связи, но и поверхностной энергией глобулы.

Поверхностная энергия, являясь величиной положительной, может в той или иной степени компенсировать свободную энергию образования пептидных связей. Эта компенсация может существенно изменить устойчивость глобулярной молекулы.

1. Устойчивость глобулярных белков и поверхностная энергия белковых молекул. Оценить влияние поверхностной энергии можно следующим образом: положим

$$v \cong \frac{4}{3} \pi a^2 b; \quad s \cong 4\pi ab, \quad (1)$$

где  $v$  — объем глобулярной молекулы,  $s$  — поверхность глобулярной молекулы,  $a$  и  $b$  — оси эллипсоида вращения. Обозначим  $b/a = \gamma$  и будем называть  $\gamma$  степенью асимметрии глобулярных молекул.

Положим, что  $v = Pw$ , где  $P$  — степень полимеризации глобулярной молекулы и  $w$  — средний объем аминокислотного остатка. Подставляя эти величины в уравнение (1), получим поверхность глобулярной молекулы

$$s = 4,83 P^{2/3} w^{1/3} \gamma^{1/3}. \quad (2)$$

Поверхность грамм-молекулы будет равна:

$$S = 2,93 \cdot 10^{24} P^{2/3} w^{1/3} \gamma^{1/3}. \quad (3)$$

Увеличение поверхности при распаде глобулы на  $n$  равных частей

$$nS_{1/n} - S = 2,93 \cdot 10^{24} P^{2/3} w^{1/3} \gamma^{1/3} (n^{1/3} - 1) = \Delta S. \quad (4)$$

При  $n = 2$

$$\Delta S = 7,61 \cdot 10^{23} P^{2/3} w^{1/3} \gamma^{1/3}. \quad (5)$$

В случае минимальной глобулы, при шарообразной форме молекул, должна иметь место компенсация свободной энергии образования пептидной связи. Эта компенсация происходит за счет увеличения поверхностной энергии, появляющейся при делении глобулы на две

части. При таком условии минимальная глобула будет устойчивой. Полагая молекулярный вес минимальной глобулы 17 600 и средний молекулярный вес аминокислотного остатка 115, получим степень полимеризации  $P = 153$ . Средний удельный объем аминокислотного остатка  $\sim 0,75$ . Следовательно, средний молекулярный объем аминокислотного остатка  $1,42 \cdot 10^{-22} = w$ , откуда  $w^{1/3} = 2,72 \cdot 10^{-15}$ .

Для условия компенсации можно написать:

$$F_0 = \sigma \Delta S = 5,91 \cdot 10^{10} \sigma,$$

где  $F_0$  — свободная энергия образования пептидной связи, равная  $-3,5$  ккал. или  $-1,46 \cdot 10^{11}$  эрг.

Следовательно, можно написать:  $1,46 \cdot 10^{11} = 5,91 \cdot 10^{10} \sigma$ , где  $\sigma$  есть среднее значение поверхностного натяжения на границе глобула — растворитель, откуда  $\sigma = 2,47$  дин/см.

Требуемое значение поверхностного натяжения близко к значениям поверхностного натяжения на границах: изоамиловый спирт — вода 5,4 дин/см, бутиловый спирт — вода 1,58 дин/см, т. е. получается вполне реальное значение.

При отклонении формы глобулы от шарообразной устойчивость ее будет нарушаться. Увеличение степени асимметрии глобулы будет уменьшать ее устойчивость, и в некоторый определенный момент станет выгодно деление глобулы.

В действительности гидролитический распад белка защищен активационным барьером в 20—30 ккал. Кроме того, увеличение степени асимметрии глобул происходит при заметном снижении поверхностного натяжения на границе глобула — раствор.

Вычислим, какую асимметрию должна иметь минимальная глобула, чтобы она могла разделиться на две шарообразные половинки при энергии активации гидролитического расщепления в 20 ккал. и поверхностном натяжении  $\sigma = 1$  дин/см:

$$8,36 \cdot 10^{11} = 2,93 \cdot 10^{24} \cdot 28,6 \cdot 2,72 \cdot 10^{-15} (\gamma^{1/3} - 1); \quad \gamma = 100.$$

Таким образом, минимальная глобула самопроизвольно не может распадаться и в действительности не распадается, так как требуемая для этого асимметрия так велика, что она практически не достижима.

Степени асимметрии, необходимые для самопроизвольного распада глобул с различными степенями полимеризации при энергии активации в 20 ккал. приведены в табл. 1

Из табл. 1 можно видеть, что для устойчивости глобул с большими молекулярными весами энергия образования пептидной связи уже не играет существенной роли, и процессы деления и слияния этих глобул, в основном, определяются энергетикой поверхностных изменений.

## II. Зависимость протеолитической атакуемости

глобулярных белков от степени асимметрии глобул.

Состояние равновесия для микромолекул определяется термодинамическим уравнением

$$F_0 = RT \ln K,$$

где  $F_0$  — свободная энергия образования связи и  $K$  — константа равновесия. Для простейшего дипептида  $F_0 = -3,5$  ккал. В случае глобулярных белков равновесие может существенно смещаться в зави-

Таблица 1  
Значения  $\gamma$

$P$	$\sigma = 1$	$\sigma = 2,5$	$\sigma = 5$
153	100	15	5,2
306	36	7	3,1
612	15	4	2,1
1224	7	2,5	1,7

симости от свойств растворителя благодаря изменению поверхностной энергии. Следовательно, в таких случаях вместо  $F_0$  должно подразумевать разность между свободной энергией образования пептидной связи и изменением поверхностной энергии при делении глобулы.

В свете этих представлений делается понятной неатакуемость нативных белков протеолитическими ферментами, а также белков в присутствии некоторых солей или таких веществ, как каприловая кислота, так как во всех этих случаях повышается симметрия глобул. Понятной делается атакуемость глобулярных белков в присутствии денатурирующих веществ, т. е. веществ, увеличивающих асимметрию глобул. Эти соображения приложимы также к неферментативному, т. е. кислотному и щелочному гидролизу (9).

III. О природе ферментативной активности. Известно, что каталитическая активность ферментов существенно зависит от белковой компоненты. Ферменты, являясь явно глобулярными веществами, в общем случае состоят из простетической группы и белкового компонента (носителя). Простетическая группа, в основном, обуславливает специфичность фермента. Белковая компонента обуславливает, главным образом, каталитическую способность фермента, т. е. величину понижения энергии активации катализируемой реакции.

Во многих случаях мы имеем довольно точные и подробные сведения о химической природе и свойствах простетической группы. Природа и свойства белковой компоненты остаются пока совершенно неясными и непонятен механизм влияния этой части фермента на его каталитические свойства.

В свете развитых нами представлений можно представить механизм активирующего действия белкового носителя. Поверхностная энергия глобулярных макромолекул и их асимметрия определяют возможность протекания процессов слияния или деления глобул. Если молекулы субстрата бифункциональны, то, присоединяясь к молекулам фермента, они дают комплексы (фермент)<sub>2</sub>—субстрат, т. е. вызовут процесс слияния глобул фермента. При условиях, невыгодных для слияния, такие комплексы будут неустойчивы и должны стремиться к распаду. Таким образом, появляется конкуренция двух сил: сил слияния, обязанных субстрату, и сил деления, обязанных белковому носителю фермента. В результате, при соответствующих условиях, появляется усилие, стремящееся разделить комплекс, что и облегчает распад субстрата. Таким образом роль белковой компоненты фермента представляется довольно простой, но весьма существенной в определении величины активационного барьера процесса.

В дальнейшем мы покажем, как на основе этих представлений можно получить математические зависимости, охватывающие экспериментальные кинетические данные, и ряд новых следствий кинетического характера.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР

Поступило  
27 VIII 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. Е. Бреслер и Д. Л. Талмуд, ДАН, **43**, 326 (1944). <sup>2</sup> Д. Л. Талмуд, Коллоидн. журн., **8**, 252 (1946); А. Г. Пасынский, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, Коллоидн. журн., **9**, 297 (1947); А. Г. Пасынский, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, **56**, 279 (1947). <sup>3</sup> T. Svedberg and K. Pedersen, *The Ultracentrifuge*, 1940. <sup>4</sup> Д. Л. Талмуд, Коллоидн. журн., **8**, 247 (1946). <sup>5</sup> П. В. Афанасьев, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, **55**, 615 (1947); ДАН, **55**, 725 (1947). <sup>6</sup> H. Neurath, J. P. Greenstein, F. W. Putnam and J. O. Erickson, *Chem. Rev.*, **34**, 157 (1944). <sup>7</sup> R. C. Rice, G. A. Ballou, P. D. Boyer, J. M. Luck and F. G. Lum, *J. Biol. Chem.*, **158**, 609 (1945); К. И. Страичцкий и М. П. Черников, *Биохимия*, **12**, 277 (1947); К. И. Страичцкий, ДАН, **58**, 1423 (1947). <sup>8</sup> H. M. Huffman, *J. Phys. Chem.*, **46**, 885 (1942). <sup>9</sup> В. Г. Яковлев, ДАН, **60**, 89 (1948).