

С. Е. БРЕСЛЕР, П. А. ФИНОГЕНОВ и С. Я. ФРЕНКЕЛЬ

## О СТРОЕНИИ МАКРОМОЛЕКУЛЫ ПРОКОЛЛАГЕНА

(Представлено академиком А. Ф. Иоффе 22 III 1950)

В 1947 г. В. Н. Орехович и А. А. Тустановский<sup>(1)</sup> выделили из кожи животных новый кристаллический белок, названный ими проколлагеном, и подробно изучили его свойства<sup>(2-8)</sup>. Помимо ряда чисто биологических проблем, которые возникли в связи с этим открытием, новый белок представлял большой интерес с точки зрения физико-химической теории строения макромолекул. По всем внешним данным он был сходен с фибриллярными белками, например, давал растворы высокой вязкости. С другой стороны, ярко выраженная способность кристаллизоваться сближала его с глобулярными белками.

1. Нами был изучен проколлаген из кожи крыс\*. Измерялась константа седиментации белка  $S$  в ультрацентрифуге при ряде концентраций от 0,045 до 0,45%, константа диффузии  $D$  при нескольких концентрациях, удельный объем  $V$  и вязкость. Опыты в ультрацентрифуге ставились при 60 000 об/мин. и ускорении в 250 000g, контроль за ходом седиментации велся по шкальному методу Ламма. Диффузия измерялась на автоматически действующем аппарате в течение 2—3 суток.

Перед каждым опытом изготовлялся свежий раствор проколлагена в 0,025  $M$  цитратном буфере при pH 3 (данный pH соответствует максимальной устойчивости белка). Затем раствор фильтровался от выпадавших в небольшом количестве хлопьев через стеклянный фильтр № 4, после чего оказывался совершенно прозрачным. Концентрация проколлагена определялась по измерению общего азота.

2. Первое обнаруженное нами существенное обстоятельство заключалось в том, что проколлаген, если он предохранен от денатурации, является монодисперсным белком, т. е. действительно относится к группе глобулярных белков. На рис. 1 представлены диаграммы седиментации проколлагена в ультрацентрифуге (концентрация белка 0,21%). На рис. 2 изображен ход константы седиментации  $S$ , приве-

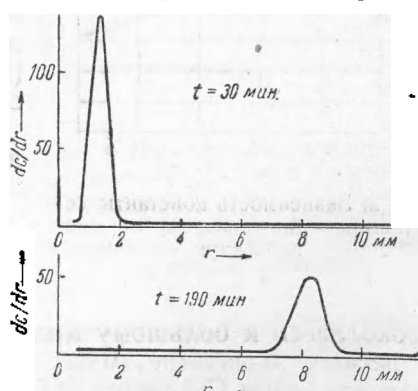


Рис. 1. Седиментация в ультрацентрифуге 0,21% раствора проколлагена

\* Образцы кристаллического белка были представлены нам В. Н. Ореховичем и А. А. Тустановским.

денной, как это принято, к 20° С и чистой воде, как функция концентрации белка. Увеличение константы седиментации при понижении концентрации объясняется тем, что длинные молекулы движутся в растворе не независимо друг от друга.

Измерения диффузии проколлагена представляют некоторые трудности, ибо белок, в результате долгого выдерживания при 25° С, начинает денатурироваться и коагулировать. Однако при достаточно высоких концентрациях (выше 0,3%) вызванные этим искажения невелики и позволяют измерить коэффициент диффузии с удовлетворительной точностью. В интервале концентраций от 0,3 до 0,5% коэффициент диффузии оказывался равным в среднем  $2,24 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/сек. ( $D$  также приведен к воде и 20° С). Можно полагать, что среднее значение  $D$  соответствует средней из бравшихся концентраций, т. е. 0,4%.

Полученные величины  $S$  и  $D$  позволяют вычислить молекулярный вес проколлагена по формуле Сведберга

$$M = \frac{S}{D} \frac{RT}{1 - \bar{V}\rho} \quad (1)$$

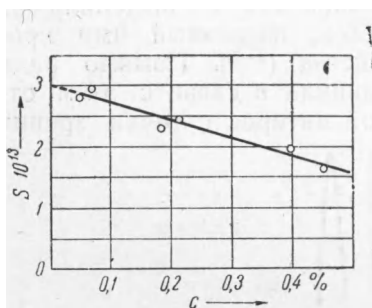


Рис. 2. Зависимость константы седиментации проколлагена от концентрации

Здесь  $S$  — константа седиментации, т. е. скорость движения макромолекул, деленная на ускорение;  $M$  — молекулярный вес;  $\bar{V}$  — удельный объем;  $\rho$  — плотность воды при 20° С (0,9982);  $D$  — константа диффузии;  $T$  — абсолютная температура (293° К);  $R$  — универсальная газовая постоянная ( $8,313 \cdot 10^7$  эрг/градус).

Удельный объем был измерен нами пикнометрически и оказался равным (при 20° С)  $\bar{V} = 0,720 \pm 0,005$ .

Находя из рис. 2 для концентрации 0,4%  $S = (1,8 \pm 0,05) \cdot 10^{-13}$ , получим молекулярный вес проколлагена  $M = 70\,000 \pm 3\,500$ . Это позволяет отнести

проколлаген к большому молекулярному классу глобулярных белков с весами, близкими 70 000, что соответствует четырем элементарным единицам Сведберга (17 500).

3. Теперь рассчитаем степень асимметрии белка. Для этого мы воспользуемся величиной  $S$ , экстраполированной к нулевой концентрации белка, т. е. положим  $S = 3 \cdot 10^{-13}$  (рис. 2). По формуле седиментации

$$S = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{f} \quad (2)$$

найдем константу трения  $f$ . Это трение относится к движению макромолекул в бесконечно разбавленном растворе, т. е. не зависит от их взаимодействия. Если бы белковые макромолекулы были шариками, то имел бы место закон Стокса  $f_0 = 6\pi\eta a$ , где  $a = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \frac{M\bar{V}}{N}}$  — радиус глобулы ( $N$  — число Авогадро).

Для нашего случая находим из экспериментальных данных отношение

$$\frac{f}{f_0} = 1,19 \cdot 10^{-15} \frac{M^{1/3} (1 - \bar{V}\rho)}{S \bar{V}^{1/3}} \quad (3)$$

Если это отношение (а оно как раз такого порядка, какое наблюдалось Сведбергом у самых асимметричных из глобулярных белков) целиком

объясняется асимметрией глобулы, то можно применить формулу для константы трения вытянутых эллипсоидов вращения

$$\frac{f}{f_0} = \frac{V\sqrt{1-\lambda^2}}{\lambda^{3/2} \ln \frac{1+\sqrt{1-\lambda^2}}{\lambda}} \quad (4)$$

Воспользовавшись нашими данными, получаем для отношения полюсов

$$\lambda = \frac{b}{a} = \frac{1}{23}.$$

Следовательно, молекула проколлагена представляет собой почти цилиндр с длиной, примерно в 20 раз превосходящей диаметр. Зная объем молекулы  $v = MV/N$ , находим, что диаметр ее равен  $d = 16,7 \text{ \AA}$ , а длина  $L = 380 \text{ \AA}$ .

Зная примерный аминокислотный состав макромолекулы (8), мы можем вычислить средний вес аминокислотного остатка  $m = 117$  и определить степень полимеризации проколлагена  $\nu = M/m \approx 600$ . А так как длина одной пептидной связи составляет примерно  $4 \text{ \AA}$ , то длина всей полипептидной цепочки проколлагена равна  $2400 \text{ \AA}$ , т. е. в 6,25 раз превышает длину  $L$  макромолекулы. Это с несомненностью указывает на то, что полипептидная цепь свернута в макромолекуле белка.

4. В заключение приведем наши данные по морфологическим реакциям в растворах проколлагена под действием солей. Известно было, что присутствие солей существенно влияет на растворы проколлагена, изменяя, в частности, их вязкость. Мы исследовали в ультрацентрифуге раствор проколлагена в  $0,32 \text{ M NaCl}$  при pH 3.

Оказалось, что, наряду с основным пиком, соответствующим неизмененному проколлагену, появились два новых пика, седиментировавших несколько быстрее (рис. 3). Это указывало на образование „двойников“ в результате ассоциации глобул. Очевидно, эта ассоциация может происходить различными путями. Простейший вариант соответствует удлинению глобулы вдвое (ассоциация по длине). Пользуясь формулами (2) и (3), легко определить, что в этом случае произойдет.

Формулу (3) можно записать в виде

$$\left(\frac{f}{f_0}\right)_1 = \text{const} \frac{M^{3/2}}{S_1}.$$

Для двойника имеем соответственно

$$\left(\frac{f}{f_0}\right)_2 = \text{const} \frac{(2M)^{3/2}}{S_2},$$

т. е.

$$\frac{S_2}{S_1} = 2^{3/2} \left(\frac{f}{f_0}\right)_1 / \left(\frac{f}{f_0}\right)_2. \quad (5)$$

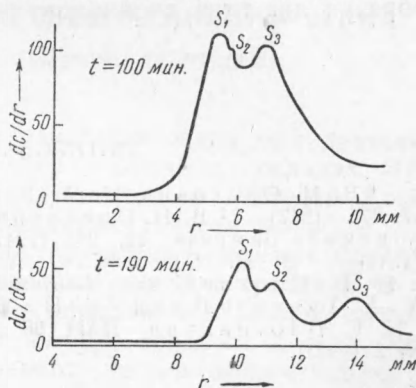


Рис. 3. Седиментация в ультрацентрифуге 0,21% раствора проколлагена в присутствии NaCl.  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  — пики, относящиеся, соответственно, к единичной глобуле и двум конфигурациям двойников

В нашем случае линейной ассоциации  $(f/f_0)_2 = 2,78$  (длина „цилиндра“ удвоилась, а радиус не изменился). Это дает теоретически  $S_2/S_1 = 1,21$ . На деле получено  $S_2 = 3,083 \cdot 10^{-13}$ ,  $S_1 = 2,558 \cdot 10^{-13}$ , т. е.  $S_2/S_1 = 1,20$ , что является идеальным совпадением.

Значительно интенсивнее второй пик, седиментирующий со значением  $S_3 = 3,91 \cdot 10^{-13}$ ,  $S_3/S_1 = 1,53$ , т. е. почти равно  $2^{1/2}$  (1,59).

Это соответствует такой ассоциации двух макромолекул проколлагена, когда они складываются вдоль образующей цилиндра. При этом как длина макромолекулы, так и малая ось эллипсоида остаются неизменными, поэтому и отношение  $f/f_0$  у двойников примерно такое же, как у одинарных молекул. Этот опыт показывает, что под действием солей, уменьшающих, как известно, ионные силы между основными группами белка (при рН 3 диссоциация кислотных групп в основном подавлена), молекулы проколлагена соединяются попарно, образуя два типа двойников — продольные и поперечные.

Поступило

20 III 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Н. Орехович, А. А. Тустановский и К. Д. Орехович, ДАН, 57, 475 (1947). <sup>2</sup> В. Н. Орехович, Усп. хим., 26, 690 (1947). <sup>3</sup> А. А. Тустановский, Биохимия, 12, 285 (1947). <sup>4</sup> Н. Е. Плотникова, ДАН, 58, 1715 (1947). <sup>5</sup> В. Н. Орехович, А. А. Тустановский, К. Д. Орехович и Н. Е. Плотникова, Биохимия, 13, 55 (1948). <sup>6</sup> В. Н. Орехович, А. А. Тустановский и Н. Е. Плотникова, ДАН, 60, 837 (1948). <sup>7</sup> Н. Е. Плотникова, ДАН, 66, 114 (1949). <sup>8</sup> М. П. Черников, ДАН, 67, № 2 (1949).