

БИОХИМИЯ

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 (1) выделили из кожи животных новый кристаллический белок, названный ими проколлагеном, и подробно изучили его свойства (2-8). 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 фибрillлярными 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 изготавлялся свежий раствор проколлагена в 0,025 M цитратном буфере при pH 3 (данний 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-

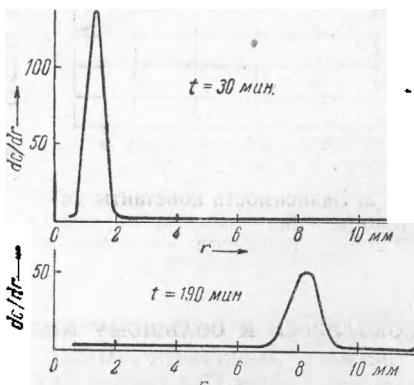


Рис. 1. Седиментация в ультрацентрифуге 0,21% раствора проколлагена

* 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 $2,24 \cdot 10^{-7}$ см²/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

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

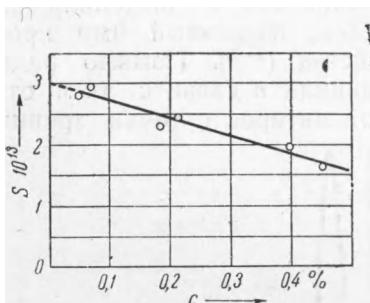


Рис. 2. Зависимость константы седиментации проколлагена от концентрации

Здесь S — константа седиментации, т. е. скорость движения макромолекул, деленная на ускорение; M — молекулярный вес; V — удельный объем; ρ — 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) $V = 0,720 \pm 0,005$.

Находя из рис. 2 для концентрации 0,4% $S = (1,8 \pm 0,05) \cdot 10^{-13}$, получим молекулярный вес проколлагена $M = 70000 \pm 3500$. 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

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

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 $a = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \frac{MV}{N}}$ — радиус глобулы (N — число Авогадро).

Для нашего случая находим из экспериментальных данных отношение

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

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

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

Воспользовавшись нашими данными, получаем для отношения полуосей

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

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 \AA , то длина всей полипептидной цепочки проколлагена равна 2400 \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 $0,32 M$ NaCl при $\text{pH } 3$.

Оказалось, что, помимо основного пика, соответствующим неизмененному проколлагену, появились два новых пика, седиментировавших несколько быстрей (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

$$\left(\frac{f}{f_0} \right)_1 = \text{const} \frac{M^{1/2}}{S_1}.$$

Для двойника имеем соответственно

$$\left(\frac{f}{f_0} \right)_2 = \text{const} \frac{(2M)^{1/2}}{S_2},$$

т. е.

$$\frac{S_2}{S_1} = 2^{1/2} \left(\frac{f}{f_0} \right)_1 / \left(\frac{f}{f_0} \right)_2. \quad (5)$$

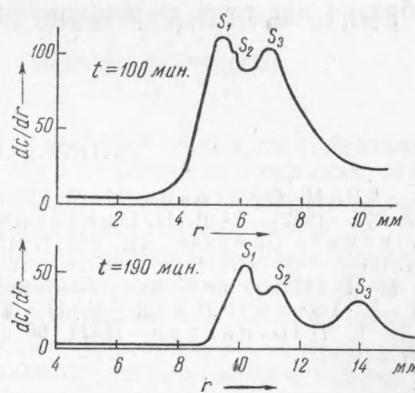


Рис. 3. Седиментация в ультрацентрифуге 0,21% раствора проколлагена в присутствии NaCl . S_1 , S_2 и S_3 — пики, относящиеся, соответственно, к единичной глобуле и двум конфигурациям двойников

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% (1,59).

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 pH 3 диссоциация кислотных групп в основном подавлена), молекулы проколлагена соединяются попарно, образуя два типа двойников — продольные и поперечные.

Поступило
20 III 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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