

С. Е. БРЕСЛЕР, М. В. ГЛИКИНА и С. Я. ФРЕНКЕЛЬ

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА И ПРОБЛЕМА РЕАКТИВНОГО
ЦЕНТРА ФЕРМЕНТОВ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 III 1954)

В настоящее время существует общепринятый взгляд на то, что в процессе ферментативного катализа действующим началом является целая макромолекула белка — апофермента в ее нативном состоянии. Во многих ферментах обнаружена низкомолекулярная компонента — простетическая группа, также участвующая в химической активации субстрата; однако последняя действует только в комплексе с белком.

Именно белковая часть фермента обуславливает не только активирование субстрата, но и направление его конечного превращения. С другой стороны, биохимия собрала немало фактов, свидетельствующих о том, что процесс ферментативного катализа разыгрывается на небольшом участке белковой макромолекулы — реактивном центре, состоящем из нескольких соседних аминокислотных остатков. При этом боковые радикалы соответствующих аминокислот образуют ту пространственную конфигурацию центров притяжения по отношению к субстрату или, по терминологии введенной А. А. Баландиным ⁽¹⁾, тот мультиплет, который способен адсорбировать молекулы субстрата и, ослабив в них одни химические связи, создать условия, благоприятствующие образованию новых измененных ковалентных связей. Примеры подобных фактов многочисленны — тут и различные химические изменения макромолекул белка, не влекущие за собой изменения специфической ферментативной функции (например, блокирование amino- и карбоксильных групп трипсина ⁽²⁾, присоединение к химотрипсину по свободным аминогруппам длинных полиглициновых цепей ⁽³⁾ и т. п.), и открытие у одного и того же фермента множества различных функций (у протеаз — кроме протеолитической — амидазная, эстеразная, фосфоамидазная, транспептидазная функции). Причем эти различные виды активности часто имеют различные оптимумы pH, свои специфические яды и активаторы, что с несомненностью указывает на одновременное существование в белке различных реактивных центров с различной структурой и функцией. Все эти и многие подобные известные факты, а также общие физико-химические соображения о том, что химическое превращение должно разыгрываться на расстоянии немногих ангстрем и, следовательно, каталитическая активность белка не может требовать одновременного участия пространственно отдаленных участков макромолекулы, заставило нас искать ферментативную активность у низкомолекулярных фрагментов белковой молекулы.

Опыты были поставлены с двумя ферментами: трипсином и миогеном. Кристаллический трипсин в 0,8—1,0% растворе подвергался автолизу в боратном буфере при pH 9,15 и температуре 37° в течение 3 час. 30 мин. Ход автолиза контролировался по нарастанию аминогрупп (по Ван-Слайку). После достижения некоторой глубины автолиза раствор автолизованного фермента помещался в специально изготовленную препаративную кювету ультрацентрифуги. В этой кювете, построен-

ной по принципам, описанным Сведбергом и Педерсеном ⁽⁴⁾, имеется тонкая решетчатая диафрагма, отделяющая верхнюю половину пространства от нижней. Эта диафрагма не позволяет осуществиться конвективному перемешиванию раствора после конца центрифугирования в процессе остановки машины. Подкисленный до pH 3 автолизированный 1% раствор трипсина центрифугировался в течение 6—8 часов при 65000 об/мин. (ускорение 300 000 g). После остановки машины из верхнего отсека кюветы извлекался с помощью шприца раствор в количестве 0,10—0,15 мл и подвергался исследованию. Оптическое наблюдение за ходом седиментации показывало, что за время центрифугирования все макромолекулы белка успевали осесть на дно кюветы. В верхнем отсеке кюветы могли оставаться лишь достаточно низкомолекулярные пептиды, с молекулярными весами не превышающими 2000—3000. Раствор, извлеченный из верхнего отсека кюветы, исследовался на протеазную активность, а также на содержание общего азота. Метод измерения протеазной активности заключался в осаждении стандартного раствора субстрата (кристаллического сычужочного альбумина) после протеолиза трихлоруксусной кислотой ⁽⁵⁾ и в измерении мутности полученных растворов с помощью спектрофотометра. Метод измерения общего азота заключался в полном кислотном гидролизе очень малой порции раствора в запаянной стеклянной ампуле и в последующем определении аминокрупп количественным нингидриным методом в варианте Тролла и Кеннана ⁽⁶⁾.

Таблица 1

Активность осколков в автолизате кристаллического трипсина. Контроль активности—по перевариванию 1 мл раствора серумальбумина (0,5—1% по белку) при pH 9,15. Не переваренный белок определяется путем осаждения трихлоруксусной кислотой

Исследованный объект	Взятый объем р-ра фер- мента (мл)	Вес. колич. фермента (мг)	Колич. переваренного за 40 мин. белка (мг)	Активность фермента	
				мг перевар. белка: (1 мл центриф. р-ра)	мг перевар. белка: (мг фермента)
Кристаллический трипсин, диализованный при pH 3,5 с примесью 0,05 M Ca ⁺⁺		20	4,2		210
Автолизат (время автолиза 3,5 час., глубина автолиза 13,4%) центрифугирован при 65000 об/мин. 8 час.	0,1	72	0,9	9	12,5
Контроль. Исходный трипсин центрифугирован то же время. Проба взята из верхнего отсека кюветы	0,15	36	0,2	1,3	5,5

В табл. 1 представлены результаты типичного опыта. Даны активности автолизата после центрифугирования, рассчитанные на единицу объема раствора и на весовую единицу вещества в гидролизате, считая, что азот составляет 16% от веса пептидных фрагментов.

В качестве контроля были поставлены подобные же опыты с исходным неавтолизированным трипсином, причем для испытания активности брались такие же и большие объемы раствора, чем в автолизате. Как видно из табл. 1, в случае автолиза в верхнем отсеке кюветы раствор сохраняет заметную активность. Активность, рассчитанная на 1 мг, оказывается всего лишь в 10—20 раз меньше, чем в нативном белке. В контрольных опытах при центрифугировании исходного белка в верхнем отсеке остается весьма низкая, но все же не равная нулю активность.

Факт существования подобного не нулевого фона в контроле заставил нас искать какие-либо более простые примеры. Имея в виду, что по данным Нортропа и др. трипсин при рН 7 всегда самопереваривается, можно было думать, что практически невозможно освободить кристаллический фермент от осколков, непрерывно возникающих благодаря автолизу. Поэтому мы поставили следующую серию опытов с ферментом миоеном (кристаллизованным по Барановскому), для которого известна альдолазная функция (7). Миоен (1% раствор) подвергался гидролизу совместным действием кристаллических трипсина (1/200%) и химотрипсина (1/100%). По достижении средней глубины гидролиза в 5—6% гидролизованный ферментный раствор центрифугировался так же, как описано выше. После остановки машины раствор извлекался из верхнего отсека кюветы и определялась альдолазная активность по методике Херберта, Гордона, Грина и др. (8).

Типичные результаты подобного опыта собраны в табл. 2, одновременно с данными контрольного опыта. В случае миогена в контроле получался отрицательный результат, несмотря на значительный объем взятой пробы.

Таблица 2

Активность осколков в гидролизате миогена. Контроль активности по образованию триозофосфатов из фруктозодифосфата (образование гидролизуемого фосфата) в течение 3 мин. при 37° и рН 7,3

Исследованный объект	Взятый на определение объем центрифугир. раствора (мл)	Вес. колич. добавлен. фермента (мг)	Активность	
			мг Р мг ферм.	мг Р мл. центриф. р-ра
Кристаллический миоен	—	0,2	0,205	—
Миоен гидролизованный 2 часа смесью 1/200% трипсина и 1/100% химотрипсина, центрифугирован 4 часа при 65 000 об/мин.	0,12	0,4	0,046	0,15
Контроль. Исходный миоен, центрифугирован то же время. Проба взята из верхнего отсека кюветы	0,2	—	0	0

В гидролизате сохранялась значительная активность — до 20% первоначальной в расчете на единицу веса полипептидов.

Таким образом, на примере двух белков было показано, что присущая им специфическая каталитическая активность сохраняется в низкомолекулярных фрагментах, средний вес которых, оцененный по этим же данным (по соотношению количества вещества, оставшегося в верхнем отсеке кюветы ко всему взятому на разделение), составил 2000—3000. Эти факты полностью подтверждают теоретические представления об осуществлении акта ферментативного катализа на небольшом, но структурно определенном участке макромолекулы — реактивном центре. Отсюда следует, что белковая макромолекула может являться не одним отдельно взятым ферментом, а целой пространственно организованной системой реактивных центров, осуществляющих в определенных условиях различные ферментативные функции.

Поступило
30 III 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Баландин, ЖРФХО, 6, 909 (1929); ЖФХ, 5, 679 (1934); Усп. хим., 4, 1004 (1935).
- ² Н. L. Fraenkel-Conrat, J. Biol. Chem., 177, 385 (1949).
- ³ M. A. Stahmann, R. R. Becker, J. Am. Chem. Soc., 74, № 10, 2695 (1952).
- ⁴ T. Svedberg, K. Pedersen, The Ultracentrifuge, Oxf., 1940, 152.
- ⁵ S. Schwimmer, A. K. Balis, J. Biol. Chem., 179, 1063 (1949).
- ⁶ W. Troll, R. Cannan, ibid., 200, 803 (1953).
- ⁷ В. А. Энгельгардт, Jale J. Biol. and Med., 15, 21 (1942—1943).
- ⁸ D. Herbert, H. Gordon, V. Subrahmanyam, D. E. Green, Biochem. J., 34, 1108 (1940).