HOW ENZYMES WORK

V. I. IVANOV

Why are enzymes that effective and specific? Because these natural catalysts are molecular machines. Analysis of enzymes in terms of molecular machine reveals how they work.

Почему природные катализаторы – ферменты – столь эффективны и специфичны? Потому, что они – молекулярные машины. Анализ ферментов с этой точки зрения позволяет понять, как они работают.

КАК РАБОТАЮТ ФЕРМЕНТЫ

В. И. ИВАНОВ

Московский физико-технический институт

ВВЕДЕНИЕ

Химические реакции в живых организмах осуществляются при помощи катализаторов – ферментов. Ферменты – это белки, а белки – полимеры, образующиеся из звеньев – аминокислот. Полимерная цепочка фермента из нескольких сотен звеньев сворачивается в компактную структуру – глобулу. Ферменты – глобулярные белки. В белках встречаются двадцать типов аминокислот, чередование которых в белковой цепи определяет специфику фермента, то есть его биологическую функцию. Сколько в клетке разных ферментов? Столько, сколько в ней протекает различных химических реакций, то есть процессов, сопровождающихся разрывом или образованием ковалентных связей. По современным оценкам их десятки тысяч. При таком изобилии естественно возникает вопрос: существует ли общий механизм работы разных ферментов? Я постараюсь ответить на этот вопрос.

Прежде всего, какие свойства присущи ферментам как катализаторам? Таких свойств три.

1. Чрезвычайно высокая эффективность. Это означает, что реакция, без фермента, как правило, вообще не идущая, “мчится” со скоростью несколько тысяч актов в секунду. У некоторых ферментов, например у каталазы, которая разлагает перекись водорода, это число увеличивается до миллиона. Правда, есть и довольно медленно работающие ферменты, например пепсин, расщепляющий в желудке белки со скоростью лишь десять актов в секунду.

2. Чрезвычайно высокая специфичность по типу реакции. Это означает, что данный фермент катализирует только ту реакцию, для которой он предназначен. Например, фермент декарбоксилаза, отщепляющий карбоксильную группу аминокислоты, не будет отщеплять аминогруппу той же аминокислоты. Для этого есть фермент трансаминаза.

3. Чрезвычайно высокая специфичность в отношении тех соединений, с которыми индивидуальный фермент должен работать. Даже если какая-то реакция может идти с разными соединениями, данный фермент будет работать только с одним (или немногими). Такие вещества называются субстратами, а свойство фермента работать только с ними – субстратной специфичностью.

Отметим, что упомянутые три свойства решительно отличают ферменты от искусственных катализаторов. Понять, как ферментам это удается – значит разгадать механизм ферментных реакций.

© Иванов В.И., 1996

Обсудим подробнее каждое из трех свойств ферментов. Когда говорят о высоких скоростях ферментных реакций, надо уточнить, в сравнении с чем они высокие. Например, химическая реакция $NaOH + HCl \longrightarrow NaCl + H_2O$ идет и без фермента со скоростью 10^{13} актов в секунду (при концентрации реагентов в несколько молей). Это больше скорости любой ферментной реакции! Поэтому важно представлять, какова вообще максимальная скорость химической реакции. Она определяется частотой колебаний длины валентной связи. Возьмем, например, молекулу O_2: O=O. Чтобы она распалась на атомарный кислород: $O=O \longrightarrow O + O$, двойная связь должна растянуться из-за тепловых колебаний. Если растяжение окажется недостаточным для диссоциации, то следующий подходящий момент может наступить только после сжатия на следующем периоде колебания. То есть максимальная скорость определяется частотой колебания длины валентной связи, которая лежит в инфракрасной области спектра и примерно равна 10^{13} актов/с. Это предельно высокая скорость. В большинстве случаев исходные соединения и продукты реакции разделены энергетическим барьером, и тогда скорость реакции описывается формулой, которая нам пригодится не один раз:

$$\upsilon = \frac{kT}{h}\exp\left(-\frac{E}{RT}\right), \qquad (1)$$

где k – постоянная Больцмана ($1{,}4 \cdot 10^{-16}$ эрг/град), T – абсолютная температура, h – постоянная Планка ($6{,}6 \cdot 10^{-27}$ эрг·с). Отсюда получаем, что комбинация kT/h по порядку величины составляет 10^{13} актов/с. E – это высота энергетического барьера, отделяющего исходные реагенты от продуктов реакции. RT – энергия теплового движения, примерно 0,6 ккал/моль. Мы видим, что даже при барьере нулевой высоты ($E = 0$) скорость реакции не может превосходить 10^{13} актов/с. Поэтому, говоря о высоких скоростях работы ферментов, мы должны задаться вопросом: высокие по сравнению с чем? Ответ очевиден: по сравнению с соответствующей реакцией, идущей без фермента. Вся сложность в том, что очень часто соответствующие реакции неизвестны. Как бы то ни было, будем называть модельной системой такую, в которой без фермента (хотя и в присутствии низкомолекулярных катализаторов) из исходных соединений получаются те же продукты, что и в ферментной реакции. Если сходство модельной системы столь велико, что процесс идет через те же промежуточные соединения, то говорят о конгруэнтной модельной системе. (Пояснение: сходство предполагает лишь одну и ту же химическую структуру, но не обязательно идентичность конформации или ионных форм.)

Фундаментальное значение конгруэнтной системы заключается в том, что, имея ее, можно сравнивать скорости отдельных стадий реакции в ферментной системе с соответствующими стадиями в системе конгруэнтной. Тем самым можно вычленить вклад белка-фермента на каждой стадии реакции. Вообще говоря, могло бы оказаться, что конгруэнтных систем не существует, а фермент работает не на основе реакций органической химии. Но сейчас, когда конгруэнтные системы в ряде случаев найдены, такая ситуация представляется невероятной. Чтобы наше изложение не было столь абстрактным, вот конкретный пример.

РЕАКЦИЯ РАЦЕМИЗАЦИИ

Пример удобен тем, что начальное состояние (L-аминокислота) и конечное (D-аминокислота) имеют одинаковую энергию; известен фермент рацемаза, катализирующий это превращение; есть конгруэнтная модельная система, проводяшая ту же реакцию, но без фермента.

Рассмотрим сначала гипотетическую реакцию в вакууме безо всяких катализаторов (рис. 1). Путь реакции таков: ион водорода отрывается от атома углерода C_α. При этом образуется переходное состояние – карбанион, в котором центральный атом углерода находится в одной плоскости с тремя атомами, соседствующими с этим углеродом. Затем ион водорода вновь присоединяется к центральному углероду, но уже с другой стороны плоскости, как показано на рис. 1, *а*. Левый изомер аминокислоты превратился в правый. Плоский карбанион – на

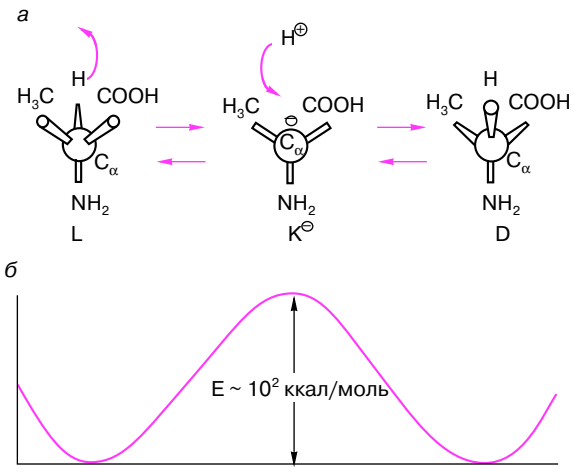


Рис. 1. Путь реакции рацемизации на примере аминокислоты аланина. *а*: На первой стадии L-аланин (слева) после отрыва иона водорода от центрального атома углерода C_α, находящегося в центре тетраэдра, превращается в "плоский" карбанион K^-. На второй стадии ион водорода H^+ вновь присоединяется к карбаниону K^-, но уже с другой стороны плоскости. Это ведет к превращению левого изомера L-аланина в правый – D-аланин. *б*: Изменение энергии системы по мере превращения L-аланина через переходное состояние K^- в D-аланин. L- и D-изомеры имеют одинаковую энергию, но разделены высоким барьером.

вершине энергетической горы (рис. 1, *б*). От подножья, изомеров L и D, высота порядка 10^2 ккал/моль. Она соответствует энергии разрыва ковалентной связи C–H. Подставив в формулу (1) эту величину, получим, что для аминокислоты такая реакция в среднем может случиться лишь один раз за 10^{50} лет, а так как возраст Вселенной 10^{10} лет, то практически никогда. Барьер слишком высок.

Поместим теперь нашу систему в воду. Из рис. 2 видно, что молекула воды, образуя так называемую водородную связь (правда, в данном случае связь очень слаба), оттягивает водород, помогая ему оторваться. При этом на вершине появляется ямка, а барьер немного понижается, вероятность реакции чуть-чуть, но возрастает. А можно ли столь сильно понизить барьер, чтобы реакция шла с заметной скоростью? Да. Нужно только добавить катализатор посильнее воды. Подсказку дает природа. В клетке эта реакция идет с участием витамина B_6 – пиридоксальфосфата (ПЛФ), связанного с ферментом рацемазой, но реакцию можно проводить и в лабораторной пробирке безо всякого фермента. В таком случае мы имеем конгруэнтную систему:

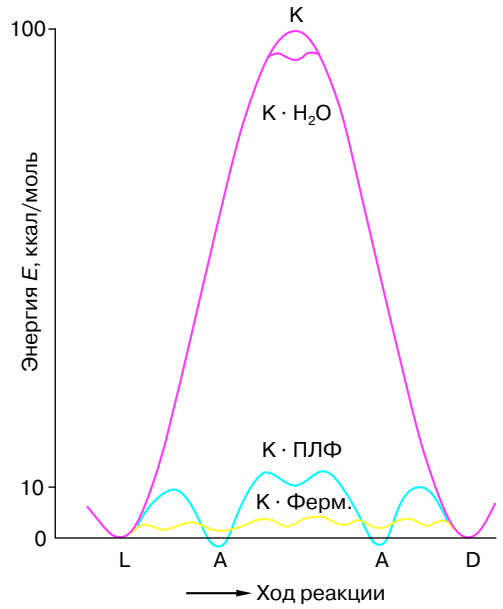
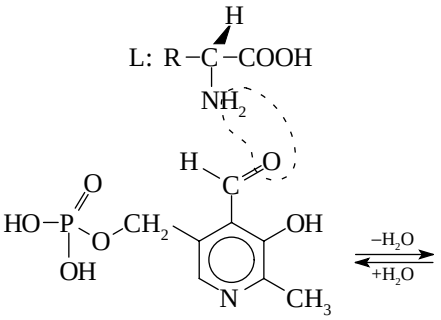
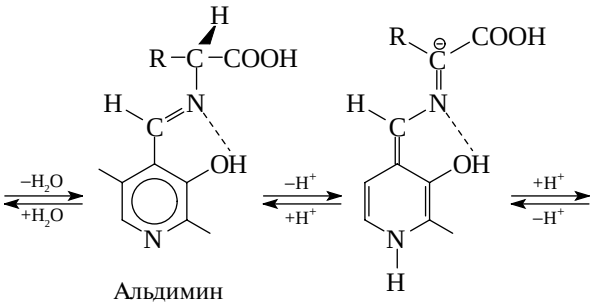


Рис. 2. Изменение энергии по ходу процесса: в некатализируемой реакции (K), в водной среде ($K \cdot H_2O$), в конгруэнтной системе с катализатором пиридоксальфосфатом ($K \cdot$ ПЛФ) и ферментом рацемазой ($K \cdot$ ферм.). L и D – зеркальные изомеры аланина; K – ключевой интермедиат карбанион, который стабилизирован водородной связью с водой ($K \cdot H_2O$), в ковалентном соединении с катализатором пиридоксальфосфатом ($K \cdot$ ПЛФ) и на ферменте ($K \cdot$ ферм.). A – альдимин, промежуточное соединение, появляющееся в конгруэнтной и ферментной системах. Обратите внимание, как меняется высота барьера *E*.

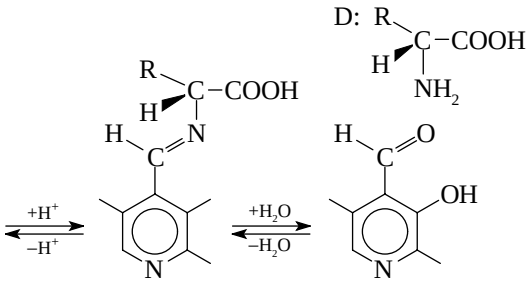


Пиридоксальфосфат
(ПЛФ)



Альдимин
L-аминокислоты

Карбанион



Альдимин
D-аминокислоты

Пиридоксальфосфат
(ПЛФ)

Это истинный катализ, так как в итоге ПЛФ выходит из процесса неизменным, в то время как L-аминокислота превращается в D-изомер и наоборот – ведь реакция обратима. Замечательно, что скорость превращения уже достаточно высока – около сотни минут, чему соответствует частота 10^{-4} актов/с. Подставим эту частоту в формулу (1). Получаем для высоты барьера ~10^1 ккал/моль, то есть катализатор ПЛФ понизил барьер в 10 раз. Правда, при этом путь реакции стал более сложным: вдобавок к карбаниону появились новые промежуточные соединения – альдимины.

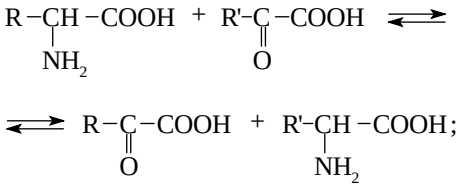
Можно ли утверждать, что мы имеем дело с искусственным “ферментом”? Нет, нельзя, потому что ни одно из трех отличительных свойств ферментов, сформулированных в начале статьи, здесь не проявляется: 1) скорость работы фермента в миллионы раз больше, чем в бесферментной конгруэнтной системе

с ПЛФ; с ферментом рацемазой она 10^4 актов/с; 2) специфичность по типу реакции отсутствует: кроме рацемизации, идут и другие процессы; 3) естественно, нет и субстратной специфичности: в то время как каждый тип рацемазы работает с одним типом аминокислоты, в модельной конгруэнтной системе "субстратом" может служить любая. Подытожим сказанное в таблице:

	Некатализируемая реакция	Конгруэтная модельная система	Фермент
Скорость	10^{-57} актов/с	10^{-4} актов/с	10^4 актов/с
Барьер	$E \sim 10^2$ ккал/моль	$E \sim 10^1$ ккал/моль	$E \sim 10^0$ ккал/моль

Мы видим, что сильные ковалентные взаимодействия в конгруэнтной системе, то есть химические реакции, уменьшают энергетический барьер на порядок величины. В то же время различие между конгруэнтной системой и ферментом характеризуется относительно малым энергетическим интервалом, который может быть преодолен нековалентными взаимодействиями: электростатическими, гидрофобными и водородными связями. С точки зрения физики фермент – это малое возмущение в конгруэнтной системе. Вывод очень важный. Из него следует, что ферментный катализ – проблема не химическая, а физическая. Фермент не создает "новой химии", он лишь меняет уровни энергии промежуточных соединений конгруэнтной системы с помощью невалентных взаимодействий. При этом работа фермента состоит в том, чтобы эти энергетические уровни стали приблизительно (с точностью до нескольких ккал/моль) одинаковыми. Образно говоря, фермент, используя невалентные (физические) взаимодействия, шлифует профиль энергии вдоль пути реакции так, чтобы шероховатости не превышали нескольких ккал/моль (см. рис. 2). Как это делается, рассмотрим на примере хорошо изученного фермента трансаминазы.

Аспартат-глутамат трансаминаза, о которой пойдет речь, катализирует реакцию



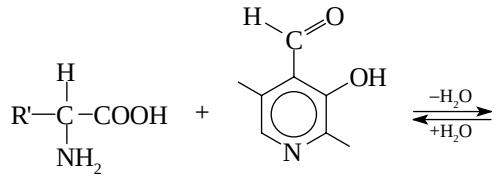
$R = HOOC-(CH_2)_2$ для глутаминовой и α-кетоглутаровой кислот,

$R' = HOOC-CH_2$ для аспарагиновой и щавелевоуксусной кислот, α-кетоглутаровая и щавелевоуксусная кислоты относятся к классу кетокислот.

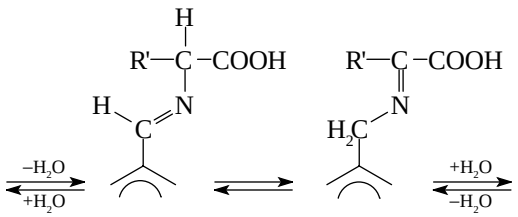
КАК РАБОТАЕТ ТРАНСАМИНАЗА?

Как и рацемазы, трансаминазы используют в качестве помощника пиридоксальфосфат. Такие низкомолекулярные помощники называются коферментами. Многие ферменты обходятся без коферментов, но все ферменты имеют так называемый активный центр – место, где протекает химическая реакция, катализируемая ферментом. Кофермент, если он есть у фермента, находится в активном центре.

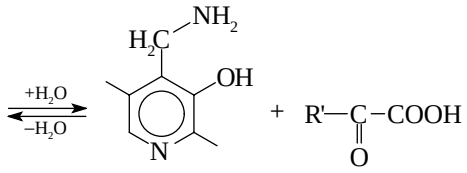
Химический механизм этой реакции с участием ПЛФ был предложен в нашей стране А.Е. Браунштейном и М.М. Шемякиным (1952 г.) и независимо Д. Метцлером, М. Икавой и Э. Снеллом в США (1954 г.):



Аминокислота Пиридоксальфосфат (ПЛФ)



Альдимин Кетимин



Пиридоксаминфосат (ПМФ) Кетокислота

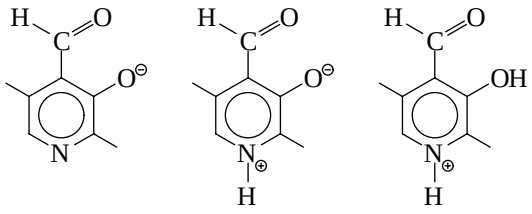
Возникающий таким образом пиридоксаминфосфат (ПМФ) потом реагирует с другой кетокислотой в обратной реакции, причем кетокислота превращается в соответствующую аминокислоту. ПЛФ при этом выступает промежуточным акцептором аминогруппы, а общая реакция переаминирования разбивается на две полуреакции:

$$RCHNH_2COOH + ПЛФ = RCOCOOH + ПМФ,$$

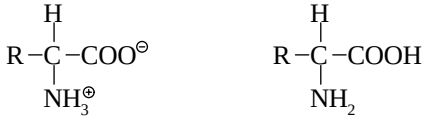
$$R'COCOOH + ПМФ = R'CHNH_2COOH + ПЛФ.$$

Сравним скорости соответствующих стадий ферментной и конгруэнтной систем. Рассмотрим первую стадию – образование альдимина. В конгруэнтной системе скорость его появления определить нетрудно: продукт имеет интенсивный желтый цвет. Трудность в другом. Оба исходных участника, и

ПЛФ, и аминокислота, в растворе представляют собой смесь различных ионных форм:



Анион Биполярный ион Катион



Биполярный ион Нейтральная форма

Реакционная способность ионных форм не одинакова, то есть скорость образования альдимина зависит от того, какие ионные формы в данном акте реагируют. Например, наиболее активной является нейтральная форма аминокислоты. Но ее содержание в водном растворе невелико: в нем больше всего биполярной формы.

Поэтому наблюдаемая скорость будет всего лишь усредненной величиной. И вот это, казалось бы, усложняющее обстоятельство, как мы сейчас увидим, позволяет сделать очень важные выводы о механизме работы фермента. Т. Брюс и его коллеги в США, проводя реакцию при различных pH, смогли рассчитать константы скоростей для каждого сочетания ионных форм аминокислоты и ПЛФ. Для реакции нейтральной формы аминокислоты (RNH_2) с каждой из трех ионных форм ПЛФ получились следующие значения (для простоты округляю цифры до порядка величины): k(анион) = 10^2/моль · мин, k(биполярный ион) = 10^4/моль · мин, k(катион) = = 10^6/моль · мин. Поскольку реакция бимолекулярная, в значения констант скорости входит концентрация.

А какова скорость этой же стадии реакции – образования альдимина – в реакции с ферментом трансаминазой? Ее определили итальянцы П. Фаселла и его коллеги: k(фермент) = 10^8 /моль · мин. Получается, что фермент всего лишь в сто раз эффективнее, чем реакция катиона ПЛФ с нейтральной формой аминокислоты.

Наблюдаемая же скорость в конгруэнтной системе намного ниже потому, что доля таких сочетаний весьма мала. Возникает догадка: не может ли фермент создавать в активном центре такое наиболее реакционноспособное сочетание ПЛФ и аминокислоты? Вы можете сказать: “Пусть так, но все же различие в сто раз еще остается.” Его-то как раз объяснить нетрудно. Чтобы прошла химическая реакция, молекулы (в нашем случае ПЛФ и аминокислота) должны не только столкнуться, но и быть правильно ориентированы вдоль, как говорят, координаты реакции; остальные столкновения будут малорезультативными. Расчет вероятности правильного столкновения и дает примерно 0,01.

Итак, мы приходим к очень важному выводу. Различие в скоростях первой стадии модельной реакции и той же стадии ферментной реакции можно полностью объяснить, если поставить два условия: 1) в активном центре фермента реагенты принимают наиболее реакционноспособные формы; 2) в активном центре фермента реагенты ориентируются вдоль координаты реакции. Каждое из этих действий требует энергии. Единственный способ получить ее – позаимствовать часть энергии связывания реагентов с белком. Добиться этого можно, связывая их с белком по боковым группировкам. Кроме того, такое “многоточечное” связывание позволяет сориентировать реагенты вдоль координаты реакции, то есть выполнить и второе требование.

Какой величины энергия может быть таким способом позаимствована? Зададим вопрос иначе: энергия какой величины нас бы устроила? Как мы уже показали, перепад энергий при переходе от конгруэнтной системы к ферментной составляет порядка 10^1 ккал/моль (рис. 2). Значит, именно такую величину нам должно дать многоточечное связывание реагентов в активном центре фермента. Это вполне обеспечивают нековалентные взаимодействия: ионные, гидрофобные (то есть взаимное притяжение химических группировок, отталкивающих от себя воду), водородные связи.

Большинство ферментных реакций, включая наши примеры рацемизации и переаминирования, проходят через много стадий. Поэтому фермент должен выполнять требования 1 и 2 на каждой стадии многостадийной реакции. Это очень непростое условие. Ведь разные стадии – это разные химические реакции. Но условия, оптимальные для одной реакции, не обязаны совпадать с оптимальными условиями для другой реакции. Каким образом фермент мог бы “переключать условия” от стадии к стадии? Возможный ответ подсказывает работа конвейера. Если на какой-то стадии при многостадийном процессе изготовления изделия надо вставить болт, то на предшествующей стадии должно быть сделано отверстие, то есть условия для реализации следующей стадии готовятся на предшествующей.

МОДЕЛЬ РАБОТЫ ФЕРМЕНТА АСПАРТАТ-ТРАНСАМИНАЗЫ

Исходя из рассмотренных выше общих принципов работы ферментов, М.Я. Карпейским и мной еще в 1966 году была предложена конкретная модель ферментативного переаминирования. Рассмотрим состояние перед началом реакции (рис. 3, состояние *I*). Химиками доказано, что кофермент в трансаминазе присутствует не в виде свободного альдегида, а в виде “внутреннего” альдимина с бо-

ковой аминогруппой лизина, входящего в состав белка. Другими точками прикрепления ПЛФ к белку являются фосфатная группа (ионная связь), азот кольца (водородная связь с белковой группой Z), CH_3-группа (гидрофобное взаимодействие с неполярными группировками белка) и, наконец, ионизованная $-O^-$-группа (ионная связь с положительно заряженной группой белка, X^+). Подчеркнем, что такое многоточечное связывание установлено в многочисленных экспериментах.

Итак, кофермент присутствует в трансаминазе в виде биполярного иона. Что касается второго участника – аминокислоты, то даже из школьного курса известно, что в водном растворе при pH7 она – биполярный ион. Вернемся к тому месту статьи, где говорилось, что химики доказали: реакционноспособным сочетанием является катион ПЛФ и нейтральная аминокислота. Получается конфуз – ни один из реагентов не готов к реакции. Но не будем спешить. Сначала аминокислота должна закрепиться в активном центре (рис. 3, *II*). В этом ей помогают две отрицательно заряженные группы $-COO^-$, так как субстрат – аспарагиновая кислота – несет их: $^-OOC-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$. Два ионизованных карбоксила связываются с положительным группами белка, одна из которых X^+ (рис. 3, *II*). Нейтрализация карбоксила группой X^+, уменьшая отрицательный электростатический потенциал, облегчает отсоединение протона от аминогруппы. Одновременно из-за нейтрализации X^+ возрастает способность группы кофермента $-O^-$ захватывать протон. В результате происходит перенос протона между ними и мы получаем требуемую для реакции катионную форму кофермента и одновременно нейтральную аминокислоту (рис. 3, *III*).

Следующая стадия – образование субстратного альдимина в реакции аминокислоты с внутренним альдимином (рис. 3, *IV*). Хотя оба реагента теперь уже присутствуют в должных ионных формах, возникает новое неожиданное препятствие для реакции. Как мы видели, кофермент прочно прикреплен к белку всеми своими боковыми группами (рис. 3, *I*). То же относится к субстрату: аспарагиновая кислота "заякорена" обоими карбоксилами. Кстати, именно этим определяется субстратная специфичность, другие аминокислоты не будут комплементарны активному центру. Кроме того, такая фиксация субстрата необходима для ориентации аминогруппы

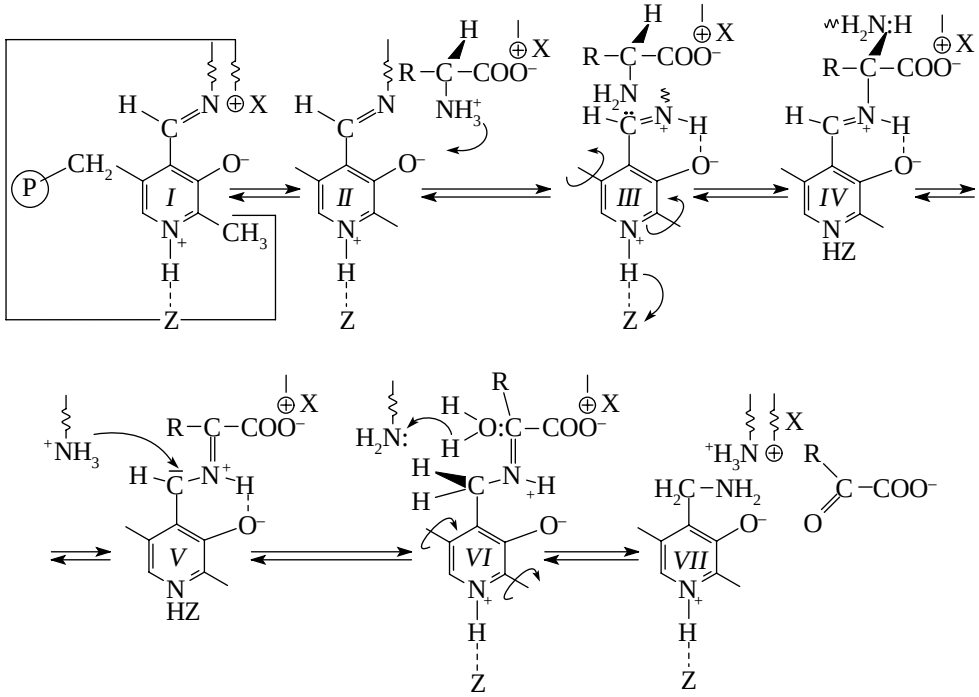


Рис. 3. Основные стадии ферментативного переаминирования в ходе превращения аминокислоты в кетокислоту. *I* – исходное положение в активном центре свободного фермента трансаминазы. ПЛФ присутствует в виде так называемого внутреннего альдимина с лизиновым звеном белка. Остальные изображенные точки прикрепления обсуждаются в тексте. *II* – состояние, когда субстратная аминокислота закрепилась в активном центре. *III* – произошел перенос протона с аминогруппы субстрата на кофермент. *IV* – образовался субстратный альдимин. Освободившаяся при этом аминогруппа лизина готова акцептировать протон центрального атома углерода. *V* – карбанион, получающийся при отрыве протона от углерода. *VI* – протон с аминогруппы лизина переходит на отрицательно заряженный атом углерода кофермента, образуя так называемый кетимин. *VII* – связь C=N кетимина гидролизуется с образованием кетокислоты и пиридоксаминфосфата (ПМФ).

вдоль координаты реакции (рис. 4). Между центрами аминогруппы субстрата и углерода иминогруппы кофермента расстояние не может быть меньше 3,5 Å, при котором реагенты касаются друг друга. Но при образовании субстратного альдимина это расстояние обязано сократиться более чем вдвое, так как возникает ковалентная связь C=N субстратного альдимина. Для реакции в конгруэнтной системе проблемы нет: и субстрат, и кофермент, свободно диффундируя, могут подвинуться на требуемое расстояние. Но так не может быть на ферменте, где они прочно закреплены. Казалось бы, опять тупик. Но посмотрите на рис. 3, *III*. Ионная связь гидроксила кофермента с группой X^+, которой завладел субстрат, исчезла. Протонизация гидроксила кофермента вызывает разрыв или заметное ослабление водородной связи атома азота кольца с группой белка Z. Связь C=N должна разорваться при переходе к состоянию 4 (рис. 3, *IV*). Нерушимыми остаются лишь две точки прикрепления кофермента к белку – по фосфату и группе CH_3.

Но обратите внимание: они расположены по концам оси, образованной ординарными химическими связями C–C, вокруг которых возможно вращение. Не может ли кофермент в ходе образования внешнего альдимина повернуться навстречу субстрату? На рис. 4 показано, что это вполне возможно, причем, чтобы достичь требуемого сближения, кольцо кофермента должно повернуться на 30 – 40°.

Далее следуют оставшиеся стадии, которые можно обсуждать столь же подробно. Не станем это делать, так как наша цель – продемонстрировать механику работы фермента. Замечательно, что, стартуя от начального положения, мы почти не имеем свободы выбора. Требования должного электронного состояния реагентов, наряду с пространственными требованиями, как бы ведут нас за собой. Например, стадия *IV* – *V* (рис. 3), в ходе которой отрывается протон C_α–H-связи с образованием карбаниона (рис. 3, *V*). Что же его отрывает? Посмотрите: на предшествующих стадиях *III* – *IV* освобождается незаряженная аминогруппа остатка лизина, удачно расположенная как раз для акцептирования данного протона.

МОДЕЛЬ СРАВНИВАЕМ С ПРЯМЫМ ЭКСПЕРИМЕНТОМ

Надо сказать, что когда мы предложили детальную динамическую модель для реакции трансаминазы (1969 г.), ничего не было известно о пространственной структуре этого фермента. Модель в значительной степени послужила “катализатором” для рентгеноструктурных исследований. Через 15 лет были определены пространственные структуры трансаминаз с достаточно высоким разрешением в лабораториях Б.К. Вайнштейна (Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва), Д. Метцлера и А. Арнона (США) и И. Янсониуса (Швейцария). Стало возможным сравнить их результаты с предсказаниями нашей модели.

Как же, по данным рентгеноструктурного анализа, устроен активный центр рассматриваемого

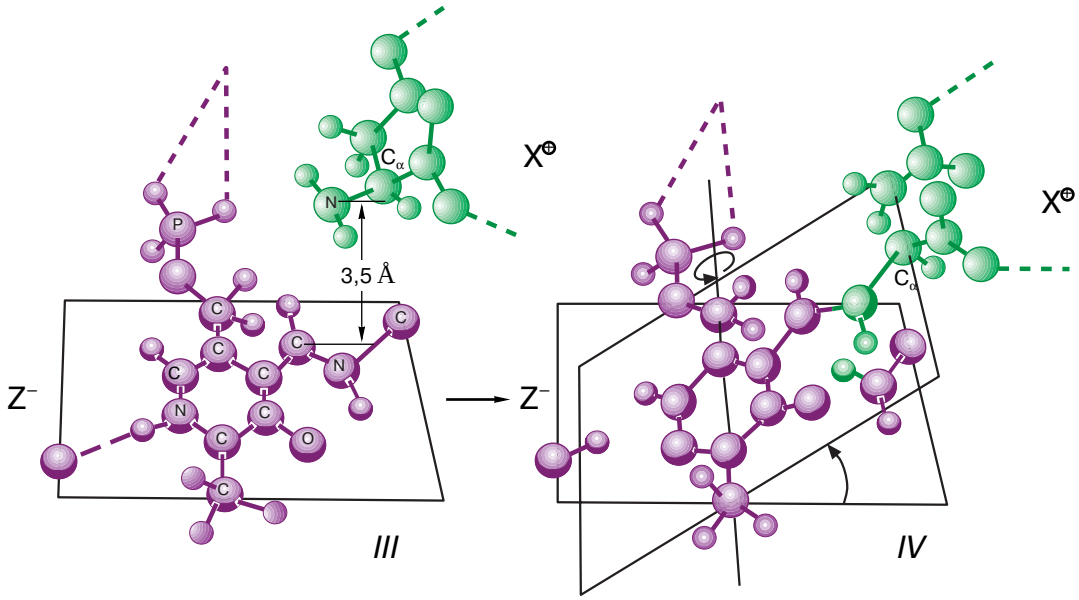


Рис. 4. Структурные изменения на стадии *III* ⟶ *IV* рис. 3. *III* – положение перед химической атакой аминогруппы аминокислоты на атом азота внутреннего альдимина трансаминазы. Расстояние между данными группировками не меньше, чем сумма радиусов двух атомов азота, – 3,5 Å. *IV* – образование субстратного альдимина; оно требует поворота кольца кофермента.

фермента и как в нем расположен кофермент? Данные подтвердили и конкретизировали вывод о "многоточечном" характере связывания пиридоксальфосфата (см. рис. 5): по альдегидной группе (с аминогруппой остатка лизина № 258); по фосфатной группе (здесь присутствует сразу несколько контактов с образованием ионной и водородных связей); по атому азота кольца кофермента с образованием водородной связи с остатком аспарагиновой кислоты № 222, по CH_3-группе кофермента, которая, как и предполагалось в нашей модели, находится в гидрофобном окружении; по OH-группе, образующей водородную связь с тирозином № 225 и ионную с аргинином № 386 трансаминазы.

Но самые поразительные результаты кристаллографы получили, изучая не свободную трансаминазу, а ее комплексы с субстратами (точнее, с субстратоподобными ингибиторами). На рис. 5 мы видим, как аналог субстрата α-метиласпарагиновая кислота взаимодействует с активным центром на стадии образования субстратного альдимина. Как и предполагалось в нашей с М.Я. Карпейским модели, α-карбоксил субстрата взаимодействует с катионной группой вблизи гидроксила кофермента. Кристаллографы уточнили: такой группой служит аргинин № 386; дистальная карбоксильная группа тоже связывается с аргинином № 292, принадлежащим второй субъединице трансаминазы. (Давно установлено, что трансаминаза состоит из двух одинаковых глобул-субъединиц.) Но наша модель предсказывала и более интересные события, происходящие в активном центре трансаминазы при взаимодействии с субстратом. Прежде всего это поворот кофермента на стадии образования субстратного альдимина. На рис. 5 показано изменение в активном центре при переходе от внутреннего альдимина к субстратному по данным рентгеноструктурного анализа. Видно, что кофермент действительно поворачивается (примерно на 30°; сравните с рис. 4).

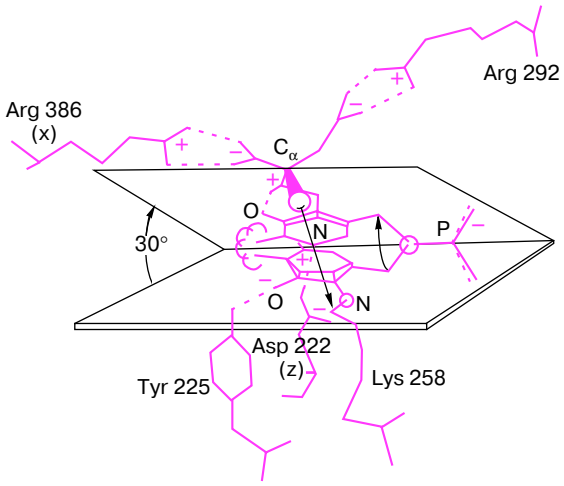


Рис. 5. Структурные изменения на стадии образования внешнего альдимина (*III* ⟶ *IV*) по данным кристаллографического эксперимента. Цифры при аминокислотных остатках – порядковые номера этих аминокислот в белковой цепи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сейчас определены пространственные структуры уже сотен ферментов и те принципы, которые лежат в основе ферментного катализа, могут быть проиллюстрированы на каждом из них. Тем не менее я считаю, что трансаминаза уникальна, поскольку стадии реакции отлично изучены как в конгруэнтной системе, так и в ферментной. Надеюсь, что рассмотрение конкретного примера дает представление об общих принципах ферментного катализа.

Фермент является столь эффективным и специфичным катализатором потому, что он: 1) стабилизирует на данной стадии реакции наиболее реакционноспособные состояния реагентов. Это достигается за счет заимствования части энергии взаимодействия при многоточечном связывании; 2) располагает реагирующие группы вдоль координаты реакции данной стадии; 3) реализует требования 1 и 2 на каждой стадии многостадийного процесса. Это достигается тем, что оптимальные условия протекания каждой стадии создаются за счет структурных и электронных изменений на предшествующих стадиях (принцип конвейера).

Из сказанного следует неоспоримый вывод, что ферменты – это машины. Тут надо добавить прилагательное "молекулярные", и это не формальное уточнение. В отличие от макроскопических машин, нас окружающих, в машинах молекулярных целенаправленные движения идут на фоне тепловых флуктуаций структуры. При этом амплитуды таких флуктуаций не намного меньше целенаправленных движений. Концепция молекулярной машины развивается многими исследователями, в том числе в России Л.А. Блюменфельдом, Д.С. Чернавским и С.И. Шнолем. Создание физической теории работы молекулярных машин – актуальнейшая задача современной биофизики.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Браунштейн А.Е.*, *Шемякин М.М.* //Биохимия. 1953. Т. 18. С. 393.

2. *Карпейский М.Я.*, *Иванов В.И.* // Nature. 1966. V. 210. P. 493.

3. *Иванов В.И.* // Химия и жизнь. 1977. № 11. С. 62.

4. *Блюменфельд Л.А.* Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1977.

* * *

Валерий Иванович Иванов, доктор физико–математических наук, профессор Московского физико-технического института, главный научный сотрудник Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, академик РАЕН. Автор открытия и более 100 научных работ в областях фотосинтеза, вирусологии, энзимологии, структуры и функций нуклеиновых кислот.