

УДК 547.918

## БИОКАТАЛИЗ ГИДРОЛИЗА ГЛИКОЗИДНОЙ СВЯЗИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИЗОЦИМА

*B. I. Максимов*

В последние годы благодаря достижениям рентгено-структурного анализа ферментов впервые представилась возможность конкретного и вполне однозначного описания действующих факторов биокатализа. Эти факторы биокатализа доказаны с использованием биохимических, физико-химических и физических методов исследования. Лизоцим является первым ферментом, для которого такая работа была проведена в достаточно полном объеме. Статья посвящена обзору именно этих исследований. В итоге была решена задача не только конкретного описания механизма действия этого фермента, но также и в принципе были окончательно утверждены общие черты механизмов биокатализа. Вместо старых более или менее вероятных, гипотез благодаря этим исследованиям создалось вполне определенное представление о механизме биокатализа.

Библиография — 98 наименований.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	2073
II. Ранний период изучения механизма действия лизоцима . . . . .	2074
III. Молекулярный механизм гидролиза коротких олигосахаридов . . . . .	2075
IV. Кристаллографическая модель и молекулярный механизм . . . . .	2078
V. Электронный механизм . . . . .	2083
VI. Некоторые нерешенные вопросы . . . . .	2088

### I. ВВЕДЕНИЕ

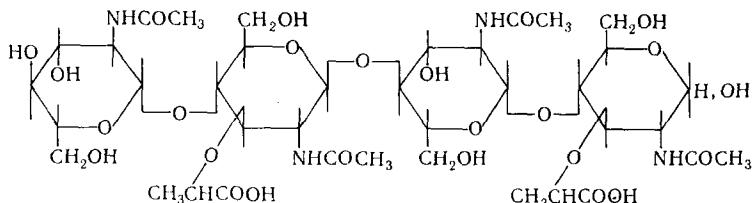
В 1967 г. были опубликованы полные материалы по рентгено-структурному анализу лизоцима и его фермент-субстратных комплексов с углеводами с разрешением 2 Å<sup>1</sup>. Тогда это была единственная изученная во всех подробностях структура фермент-субстратного комплекса. Впервые представилась возможность на конкретном примере получить однозначные результаты по структуре активного центра и высказать на основе этих прямых данных гипотезу о механизме действия фермента.

Химические и физико-химические исследования, которые особенно интенсивно проводились после публикации<sup>1</sup>, позволили сопоставить структурные данные с каталитическими свойствами фермента, и сейчас механизм действия лизоцима в основных чертах выяснен. Этот пример является поучительным во многих отношениях. Во-первых, он убеждает нас в том, что такая сложная задача, какой является однозначное описание конкретного механизма действия фермента, может быть решена только в итоге комплексного исследования проблемы разными методами: химическими, биохимическими, физико-химическими и физическими. Во-вторых, он подтверждает давно высказываемое мнение о том, что в механизме биокатализа заложены обычные принципы физической органической химии. В-третьих, он показывает, что эффективное протекание химического процесса (биокатализ) может быть обеспечено не только прямым действием фермента на разрываемые связи субстрата, но и за счет сложного пути реакции через промежуточные вещества, каждое из которых само по себе является субстратом лизоцима. Цель обзора со-

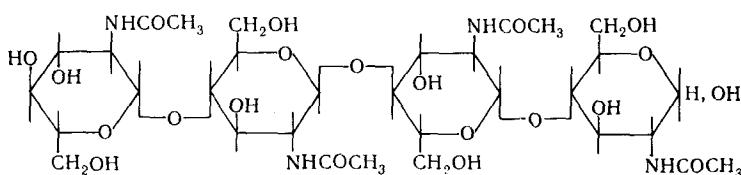
стоит в том, чтобы описать химический механизм действия лизоцима и показать, насколько сложно могут взаимодействовать отдельные факторы биокатализа и тем самым попытаться установить его основную сущность.

## II. РАННИЙ ПЕРИОД ИЗУЧЕНИЯ ЛИЗОЦИМА

Лизоцим стал широко известен благодаря публикации Флеминга, описавшего в 1922 г. бактериолитическое действие ряда биологических жидкостей и экстрактов<sup>2</sup>. О химической природе субстратов лизоцима долгое время ничего не было известно. В ряде работ установлено, что лизоцим может действовать на полисахаридные компоненты клеток с выделением *N*-ацетил-*D*-глюкозамина<sup>3-5</sup>. Впервые химическая природа субстрата лизоцима была определено установлено в работе Бергера и Вайсера<sup>6</sup>, показавших, что хитин может гидролизоваться лизоцимом с образованием *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. Тем самым было доказано, что лизис бактерий происходит за счет гидролиза полисахарида по  $\beta$ -(1—4)-гликозидной связи соединяющей остатки *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. Первые сообщения о низкомолекулярных субстратах появились в 1959—1960 гг<sup>7-10</sup>. Солтон и Гизен<sup>7, 8</sup> выделили тетрасахарид из продуктов гидролиза лизоцимом бактериальных оболочек и показали, что при действии лизоцима на этот субстрат образуется только один продукт реакции, *N*-ацетил-глюкозаминил- $\beta$ <sup>1-4</sup>-*N*-ацетилмураминовая кислота, дисахарид, строение которого окончательно было установлено позднее<sup>11, 12</sup>. Исходный тетрасахарид имеет следующую структуру:



Структура другого субстрата — тетрасахарида, фрагмента хитина такова:



Строение углеводной цепи в обоих случаях одинаково, хотя бактериальный тетрасахарид содержит остатки *D*-молочной кислоты. В работах<sup>7-10</sup>, а также в ряде более поздних работ<sup>13, 14</sup>, предполагали прямой гидролиз олигосахаридов.

При действии лизоцима на трисахарид аналогичной структуры было обнаружено только два продукта: моносахарид и дисахарид<sup>10, 14</sup>. По мнению Рапли, преимущественно расщепляется гликозидная связь с невостанавливающим концом<sup>15</sup>. Первые измерения скорости гидролиза олигосахаридов, фрагментов хитина показали, что дисахарид совсем не гидролизуется лизоцимом, трисахарид гидролизуется очень медленно, скорость гидролиза олигосахаридов нарастала по мере увеличения длины олигосахарида<sup>13</sup>.

### III. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА КОРОТКИХ ОЛИГОСАХАРИДОВ

Исследование механизма действия лизоцима имело два отправных момента. Во-первых, было установлено, что короткие олигосахариды гидролизуются не непосредственно, а через промежуточный синтез более длинных олигосахаридов (гидролиз через трансгликозилирование). Во-вторых, показано, что гидролиз идет практически полностью до ацетил-*D*-глюкозамина.

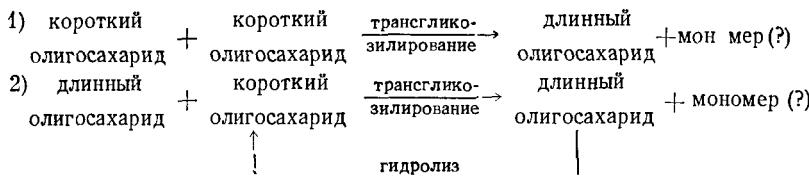
#### 1. Гидролиз через трансгликозилирование

В 1964 г. Кравченко и Максимов<sup>16</sup> опубликовали первое сообщение об образовании высокомолекулярных водонерастворимых продуктов при действии лизоцима на разные олигосахариды, фрагменты хитина. Подобное же явление наблюдали Шарон и Зейфтер, используя в качестве субстрата бактериальный тетрасахарид<sup>17</sup>. Позднее опубликован ряд сообщений, подтверждающих и расширяющих сведения о синтетической активности лизоцима и доказывающих, что образование более высокомолекулярных углеводов происходит по механизму трансгликозилирования (см. например<sup>18-21</sup>).

Можно было рассматривать реакцию трансгликозилирования как побочную реакцию, которая протекает при определенных условиях (например, при повышенных концентрациях субстрата и фермента). Однако биохимические, рентгеноструктурные и физико-химические исследования показали, что трансгликозилирование является основной промежуточной стадией в реакции гидролиза коротких олигосахаридов, катализируемой лизоцимом. И в зависимости от условий процесс останавливается либо на стадии тотального гидролиза субстрата до мономера, либо на каких-то промежуточных вариантах.

Впервые механизм гидролиза через трансгликозилирование был сформулирован в 1965 г. в работе Максимова, Каверзневой и Кравченко<sup>19</sup>. Экспериментальным основанием для такого вывода послужили следующие впервые описанные в той же статье факты: 1) индукционный период в реакции гидролиза коротких олигосахаридов; 2) действие затравки; 3) тотальный характер гидролиза три- и тетрасахарида (по всем гликозидным связям). Трисахарид расщепляется не до мономера и димера, как это считали некоторые авторы<sup>10, 14, 15</sup>, а только до мономера; 4) изменение направления реакции в сторону гидролиза или синтеза — в зависимости от концентрации фермента и субстрата. Кроме того учитывалось, что скорость гидролитической<sup>13</sup> и синтетической<sup>16</sup> реакций лизоцима заметно возрастала по мере удлинения олигосахарида-субстрата. С другой стороны, установлено, что трисахарид в принципе не может быть прогидролизован лизоцимом прямым путем.

Гидролиз этого субстрата есть результат сложного процесса, схема которого предложена в 1965 г.<sup>19</sup>:



Эта схема описывает две фазы реакции: первую — очень медленную, соответствующую индукционному периоду, в течение которого подготав-

ливаются условия для второй фазы реакции. Во второй фазе происходит переваривание основного количества субстрата, причем процесс имеет циклический характер. В ряде последующих работ<sup>22-24</sup> эти факты были подтверждены на других примерах. Затравку рассматривали как кофактор в реакции, подобный коферменту<sup>22</sup>. Было показано, что субстрат и затравка конкурируют за место связывания с активным центром фермента<sup>24</sup>. Изучение действия лизоцима на ди-*N*-хлорацетил-хитобиозу позволило обнаружить, что в определенных условиях из 1 моля дисахарида образуется только 1 моль моносахарида<sup>23</sup>. Была предложена схема процесса<sup>23</sup>:

1. димер + димер → мономер + тример
2. димер + олигосахарид ( $x$  звеньев) мономер + олигосахарид ( $x+1$  звено)

Согласно этой схеме на первой стадии происходит образование затравки по механизму диспропорционирования, а на второй стадии — трансгликозилирование с образованием в основном мономера.

В 1967 г. Шарон опубликовал данные о том, что бактериальный тетрасахарид гидролизуется только после индукционного периода, величина которого была обратно пропорциональна концентрации фермента<sup>25</sup>, Шарон также объясняет наблюдаемый лаг-период сложностью процесса гидролиза и молекулярным механизмом гидролиза через трансгликозилирование.

В 1968 г. Шипман, Поллок и Шарон опубликовали более подробные сведения по молекулярному механизму гидролиза<sup>26</sup>. В этой работе продукты, образующиеся при действии лизоцима на олигосахариды из оболочек *Micrococcus lysodeikticus* исследованы методами электрофореза и хроматографии на бумаге, а также ионообменной хроматографией. Использование субстрата, меченного тритием, позволило просто решить ряд аспектов молекулярного механизма. Это исследование убедительно показало, что синтез осуществляется в основном по механизму трансгликозилирования. Механизм действия затравки рассматривался по аналогии с цепным процессом, причем роль «носителя цепи» играют гекса- и октасахариды. В обзоре Шипмана и Шарона<sup>27</sup> гидролиз через трансгликозилирование рассматривается как наиболее характерная особенность катализа лизоцимом. Изучение действия лизоцима на гликозиды хитиновых олигосахаридов также привело к этому молекулярному механизму. В 1968 г. к этой точке зрения присоединились Осава<sup>28</sup> при изучении гидролиза нитрофениловых гликозидов олигосахаридов, Тсай и сотр.<sup>29</sup> при исследовании действия лизоцима на гликозидные изологи хитинового дисахарида. К этому же выводу пришли Хорлин, Шашкова и Зурбян<sup>30</sup>. Кинетическое исследование молекулярного механизма проведено в работе<sup>31</sup>.

## 2. Другие механизмы

Молекулярный механизм гидролиза через трансгликозилирование доказан в настоящее время многими исследователями<sup>19, 22-31</sup>.

Однако ряд авторов не учитывали как в прежних, так и в более поздних работах, что гидролиз хитиновых субстратов осуществляется непрямым путем<sup>7-10, 13, 14</sup>. В последнее время, как правило, отмечают образование продуктов трансгликозилирования. Однако реакцию трансгликозилирования рассматривают как побочную; полагая, что гидролиз и трансгликозилирование протекают параллельно, Дэлквист и Рэфтери<sup>32</sup> в 1967 г. сообщили, что при действии лизоцима на три *N*-ацетил-хитотриозу образуются дисахарид и моносахарид в молярном отношении 2 : 1;

вместо 1:1 ожидаемого при прямом гидролизе. Они полагают, что часть образовавшегося *N*-ацетил-*D*-глюкозамина связывается с исходным три-сахаридом с образованием тетрасахарида, который они обнаружили среди продуктов реакции. Аналогичный механизм предложен и в статье Рэфтери и Ранд-Мейр<sup>33</sup>. Авторы, считают, что наблюдаемое ими образование  $\beta$ -метилгликозида *N*-ацетил-*D*-глюкозамина есть результат прямого переноса ацетилглюкозаминного остатка с ди-*N*-ацетил-хитобиозы (донар в реакции трансгликозилирования) на метанол (акцептор).

В работах Рапли и сотр. также не учитывается необходимость стадии трансгликозилирования в гидролизе коротких олигосахаридов<sup>13, 15, 34</sup>. Рапли и Гэйтс рассматривают молекулярный механизм согласно которому продуктивный комплекс лизоцима с три-*N*-ацетил-хитотриозой образуется с молярным отношением фермента к субстрату 1:2<sup>34</sup>. В этом случае, по мнению авторов, возможен прямой гидролиз одной из адсорбированных молекул трисахарида. Шарон и сотр.<sup>26</sup> считают такой механизм мало вероятным, хотя бы потому, что две молекулы трисахарида имеют на один атом кислорода больше, чем гексасахарид, размещающийся в активном центре лизоцима. Прямой гидролиз три-*N*-ацетил-хитотриозы допускается также и в последующих работах Рапли и сотр.<sup>35, 36</sup>. Рапли и Гэйтс<sup>44</sup> предприняли попытку определить место разрыва гликозидной связи в олигосахаридах при гидролизе и трансгликозилировании, считая их параллельно протекающими процессами. Реакцию проводили с 0,001—0,05 M олигосахарида и 0,1—0,8 M *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. В виду большого избытка *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (до 1000-кратного) реакция должна ограничиться в данном случае переносом на мономер. Некоторые результаты этой работы приведены в табл. 1.

ТАБЛИЦА 1

**Характеристика расщепления гликозидных связей в хитиновых олигосахаридах в реакции переноса на *N*-ацетил-*D*-глюкозамин**

Олигосахарид	Относительная скорость	Порядок реакции	Вид действия
Димер	0,003	1	$X_1 \downarrow X_2 \downarrow X_3$
Тример	1	1	$X_1 \downarrow X_2 \downarrow X_3$
Тетрамер	8	1	$X_1 \downarrow X_2 \downarrow X_3 \downarrow X_4$
Пентамер	4000	0	$X_1 — X_2 — X_3 \downarrow X_4 \downarrow X_5$
Гексамер	30000	0	$X_1 — X_2 — X_3 — X_4 \downarrow X_5 — X_6$

Из табл. 1 видно, что скорость трансгликозилирования нарастает настолько стремительно, что разница в скоростях для димера и гексамира составляет уже 7 порядков величины. Если еще учесть, что среди продуктов реакции дисахарида с моносахаридом в присутствии лизоцима авторы обнаружили к концу реакции значительное количество три- и тетрасахарида, то можно думать, что и в этой системе процесс должен быть самоускоряющимся за счет увеличения числа оборотов реакции с накапливающимися более длинными олигосахаридами. Поэтому, с нашей точки зрения, представленная в табл. 1 схема расщепления димера и тримера (по данным Шарона — и тетрамера) соответствуют индукционному периоду реакции.

В 1967 и 1969 гг. Кравченко и Кузнецов опубликовали статьи<sup>37, 38</sup>, в которых описали действие лизоцима на тетра-N-ацетил-хитотетраозу. Наряду со всеми возможными продуктами гидролиза, авторы наблюдали образование гексасахарида, количество которого не менялось, пока сохранялся субстрат, и который исчезал в конце реакции. Если исходить из данных по содержанию гексасахарида, приведенных на рисунках, и принять его равным 0,1 эквивалента при исходном количестве тетрасахарида 8 эквивалентов, то вычисление отношения скоростей трансгликозилирования (с использование данных Рапли и Гэтса в табл. 1) показывает, что трансгликозилирование гексасахарида, несмотря на его незначительное количество должно протекать в  $\approx 50$  раз интенсивнее, чем тетрасахарида (как донора в реакции). Авторы полагают, что гидролиз и трансгликозилирование идут параллельно, а о механизме гидролиза через трансгликозилирование в этих статьях вообще не упоминается.

Нужно отметить, однако, что в некоторых случаях все же, видимо, и короткие олигосахарины могут гидролизоваться прямым путем. Например, *p*-нитрофениловые гликозиды N-ацетил-D-глюкозаминил-D-глюкозы и N-ацетил-D-глюкозаминил-D-2-дезоксиглюкозы, по-видимому, могут гидролизоваться прямо до дисахаридов без промежуточного образования более длинных олигосахаридов, что доказано соответствующими методами<sup>39</sup>.

#### IV. КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ

Основные и подробные сведения по строению фермент-субстратных комплексов, полученные методом рентгено-структурного анализа, появились в 1967 г.<sup>4</sup>, хотя некоторые сведения публиковались и раньше<sup>40</sup>. В этих работах комплексы лизоцима с разнообразными углеводами называли фермент-ингибиторными. По-видимому, на названии этих комплексов отразились преобладающие в то время представления о том, что дисахарид не является субстратом лизоцима, а трисахарид при насыщающих концентрациях гидролизуется медленно (см. <sup>4</sup>, стр. 385). В то же время все эти углеводы способны были ингибировать лизис *Micrococcus lisodeikticus*. В последнее время термин «ингибиторы» в отношении хитиновых или бактериальных олигосахаридов применяется все реже и реже.

##### 1. Структурная, термодинамическая и функциональная характеристика участков связывания

Результаты исследования английских кристаллографов показали, что молекула лизоцима представляет собой плотно упакованную глобулу, по форме близкую к эллипсоиду вращения с размерами  $30 \times 30 \times 45$  Å. Поперек глобулы проходит глубокая расщелина, которая и представляет собой активный центр фермента. При образовании фермент-субстратного комплекса углевод размещается в щели; для каждого мономерного звена есть свой участок — всего их шесть. Следовательно, молекула гексасахарида способна полностью закрыть щель. Отдельные участки сорбции названы латинскими буквами *A*, *B*, *C*, *D*, *E* и *F*, начиная с участка, взаимодействующего с невосстановляющим концом гексасахарида. Комплексы с тетра-, пента- и гексасахаридами рентгеноструктурным методом наблюдать не удалось. Комплекс лизоцима с трисахаридом оказался очень стабильным и, кроме того, само присоединение трисахарида к лизоциму не отразилось на структуре фермента в целом. Поэтому, зная

структуре лизоцима без субстрата, можно было довольно легко рассчитать структуру его комплекса с трисахаридом. Оказалось, что трисахарид занимает участки *A*, *B* и *C* (*C* — восстанавливающий конец трисахарида). Кроме того сохранение известной жесткости структуры фермента при образовании его комплекса с короткими субстратами, позволило путем наложения молекулярных моделей гексасахарида на молекулярную модель лизоцима получить данные о строении и такого фермент-субстратного комплекса.

Сам факт экстраполяции структуры фермент-субстратного комплекса на участки *D*, *E* и *F* и подтверждение правильности этой экстраполяции всеми последующими химическими и физико-химическими данными, показывает достаточно четко то, что комплементарность в структуре фермента не формируется под влиянием субстрата, а существует независимо от субстрата. После присоединения субстрата в молекуле лизоцима происходят лишь незначительные изменения структуры. Было замечено, например, некоторое смещение остатка триптофана 62 на величину 0,75 Å.

Другие остатки также немного сдвигаются, сужая несколько щель и делая контакт фермента с субстратом более плотным. Однако здесь не может идти речь об индуцированном соответствии структуры фермента к субстрату. Эти изменения в структуре фермента было бы вернее назвать некоторым усовершенствованием существующей комплементарности во взаимодействии лизоцима с трисахаридом.

Субстрат, наоборот, претерпевает существенные изменения. Во-первых, он утрачивает свободу вращения вокруг С—О-связей, соединяющих мономерные остатки. Его структура становится столь же жесткой, что и структура самого фермента. Во-вторых, жесткое скрепление фермента с субстратом — гексасахаридом вынуждает последний на одном из шести участков (*D*) изменить конформацию пиранозного цикла «кресло» и принять менее устойчивую и более напряженную конформацию (полукресло). Эта деформация структуры углеводного звена на участке *D* имеет

ТАБЛИЦА 2

Термодинамическая характеристика образования фермент-субстратных комплексов, а также отдельных участков сорбции<sup>27\*</sup>

Участок сорбции							$\Delta F_a^0$ ккал/моль
<i>X</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	
NAG —			NAG				- 4,5(± 0,3)
		NAG — NAG					- 7,4
		NAM — NAG					- 7,9
	NAG —	NAG — NAG					- 9,2
	NAG —	NAM — NAG					- 9,8
	NAG —	NAM					>- 4,2
	NAG —	NAM — NAG — NAM					>- 6,9
	NAG —	NAM — NAG — NAM		-NAG			- 8,6
	NAG —	NAG — NAG			- NAM		- 9,2
$\Delta \Delta F_a^0$ , 0		- 1,8	- 2,9	< - 5,7	+ 2,9	- 1,7	
ккал/моль						( <i>E</i> + <i>F</i> )	

\* NAG—N-ацетилглюказамин, NAM—N-ацетилмураминовая кислота.

решающее значение в катализе, осуществляющем лизоцимом. Измерение констант ассоциации между лизоцимом и хитиновыми и бактериальными олигосахаридами, проведенное разнообразными методами, позволило определить изменение свободной энергии этого взаимодействия, как сум-

му свободных энергий взаимодействий на всех шести участках молекулы лизоцима.

Результаты этих измерений были суммированы в обзоре Шипмана и Шарона<sup>27</sup> в виде табл. 2. Внизу в табл. 2 приводится вклад  $\Delta\Delta F^\circ_a$ , вносимый на каждом участке отдельно.

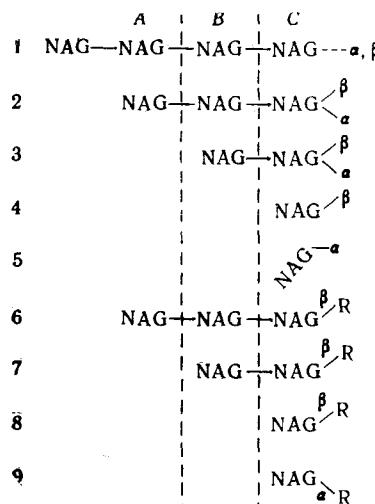
Из табл. 2 видно, что эти вклады различаются настолько существенно, что на них следует остановиться отдельно. Единственным участком, на котором происходит проигрыш в энергии, является участок D. Это легко объясняется изменением конформации углеводного остатка на этом участке. Соседний с ним участок, наоборот, отличается самой высокой величиной выигрыша свободной энергии, и следовательно, самым прочным связыванием субстрата. По данным кристаллографической модели сорбированный N-ацетил-D-глюкозамин оказывается как бы в гидрофобном «кармане»<sup>41</sup>. В статье Рапли и сотр.<sup>42</sup>, посвященной характеристике комплексов лизоцима с разными углеводами и родственными по структуре соединениями, сравнивали свободную энергию образования комплексов лизоцима с N-ацетил-D-глюкозамином, N-метил-, N-оксиэтил- и N-циклогексилацетамидом. Она оказалась равной соответственно: —4,7; —2,4; —2,8 и —3,1 ккал/моль. Эти и другие данные<sup>42</sup> показывают, что гидрофобное взаимодействие ацетамидной группировки субстрата вносит большой вклад в энергию образования комплекса. Таким образом, субстрат, имеющий N-ацетамидную группу, должен сорбироваться всегда таким образом, чтобы в первую очередь было занято место C.

Легко видеть, что короткие хитиновые олигосахариды (димер, тример и тетрамер) должны занимать места только слева от места C в табл. 2. Феноменологически это проявляется таким образом, что константа сродства увеличивается при переходе от мономера к димеру и тримеру, а при дальнейшем удлинении субстрата она уже мало изменяется. Первые количественные данные по этому вопросу опубликовали Дэлквист, Жао и Рэфтери<sup>43</sup>. Они получили для моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексасахаридов следующие величины: 4—6·10<sup>-2</sup>; 1,75·10<sup>-4</sup>; 6,58·10<sup>-6</sup>; 9,45·10<sup>-5</sup>; 9,35·10<sup>-6</sup> и 6,15·10<sup>-6</sup>. Последние две константы являются скорее ориентировочными, так как еще до установления равновесия субстраты оказывались частично прогидролизованными. Данные по константам ассоциации фермент-субстратных комплексов, полученных разными методами, приведены в обзоре<sup>27</sup>. Структуру комплексов лизоцима с хитиновыми олигосахаридами и их гликозидами изучали методом ЯМР, и в результате этой работы установлено точное положение всех остатков<sup>44</sup>.

Для установления положения отдельных мономерных звеньев субстрата в активном центре лизоцима измеряли химические сдвиги  $\text{CH}_3$ -протонов ацетамидных групп хитиновых олигосахаридов в свободном виде и в их комплексах с лизоцимом. При образовании фермент-субстратных комплексов наблюдали смещение сигналов ЯМР в сторону сильных полей и их уширение. Ацетамидные группы хитинового олигосахарида оказываются в неодинаковом магнитном окружении при образовании комплекса. Это позволяет характеризовать каждый моносахаридный остаток олигомера по соответствующему резонансу. Этим способом получено подтверждение правила размещения мономерных звеньев в активном центре лизоцима. Первым бывает занят участок C, остальные участки вступают в контакт с субстратом в следующем порядке: сначала B, потом A. Это правило размещения, как было видно выше, полностью согласуется с термодинамическими характеристиками. Интересно, что даже тетрасахарид подчиняется этому правилу преимущественного расположения звеньев.

ложения. Один из остатков его оказывается вне зоны активного центра, и такое расположение оказывается более выгодным, так как расположение на участках *A*, *B*, *C* и *D* должно привести к проигрышу в энергии на 2,9 ккал/моль.

С бактериальными олигосахаридами дело обстоит несколько сложнее. По данным рентгено-структурного анализа остаток N-ацетил-мураминовой кислоты (NAM) не может разместиться на участках *A* и *C* из-за пространственных препятствий<sup>4</sup>. По этой причине наиболее вероятное положение для дисахарида NAG—NAM — это участки *A* и *B*, а участок *C* остается свободным.



Схематическое изображение размещения остатков N-ацетил-D-глюкозамина (NAG) в олигосахаридах на *A*, *B* и *C* участках лизоцима<sup>44</sup>

Последние два участка, *E* и *F*, как уже отмечалось, получены экстраполяцией рентгеноструктурных данных. Они изучены экспериментально значительно хуже. По мнению Шарона и сотр.<sup>27, 45</sup> на участках *A*, *B*, *C*, *D* располагаются долго живущие гликозильные производные, получаемые отщеплением «агликона», а на участках *E* и *F* после отщепления агликоновых остатков располагаются молекулы акцепторов. Прямым путем образование комплекса лизоцима с акцептором зарегистрировать не удается. Однако количественным изучением продуктов реакции трансгликозилирования это удалось сделать<sup>43</sup>. Используя в качестве акцепторов смеси одновременно двух веществ, авторы судили по соотношению образующихся продуктов трансгликозилирования об относительных скоростях их образования. Сравнение двух акцепторов: глюкозы и N-ацетил-D-глюкозамина — показало, что на участке *E* активную роль играют гидрофобные взаимодействия при образовании фермент-субстратного комплекса. Их вклад в  $\Delta F$  оценивается величиной —0,9 ккал/моль. Аналогичным образом найдено, что на участке *F* эти взаимодействия не проявляются. Таким методом удалось оценить суммарный вклад обоих участков *E* и *F* в  $\Delta F$ , равный —1,7 ккал/моль (табл. 2). Как видно, он сравнительно невелик, поэтому для направления процесса в сторону трансгликозилирования необходимо, чтобы концентрация акцептора была существенно выше концентрации донора. Акцепторный участок лизо-

цима, также как и донорный, видимо, не претерпевает глубоких изменений при образовании фермент-субстратного комплекса. Шарон и сотр.<sup>46</sup> испытали 40 различных моно- и дисахаридов в качестве акцепторов и показали, что акцепторами могут быть только те вещества, которые геометрически соответствуют поверхности на участке *E*, всего оказалось 29 акцепторов. Остальные 11 веществ не комплементарны участку *E* и не вступают в реакцию вообще. Самое интересное, что геометрическое соответствие может быть достигнуто разными способами размещения акцептора. По этой причине не только гексозы, но и пентозы и даже углеводы *L*-ряда способны быть акцепторами, а образующиеся гликозидные связи были не только  $\beta$ -(1→4) типа, но также и  $\beta$ -(1→2)- и  $\beta$ -(1→3)-типов. Реакционную способность акцепторов можно было предсказать из данных по структуре участка *E*. Например, *D*-ксилоза могла разместиться на участке *E* тремя способами, соответственно которым образовывались продукты с 1—2, 1—3 и 1—4 гликозидными связями<sup>49</sup>.

## 2. Продуктивные и непродуктивные фермент-субстратные комплексы

Термодинамические свойства участков сорбции в активном центре лизоцима объясняют существование так называемых непродуктивных комплексов. Само название «непродуктивные комплексы» означает, что образование таких фермент-субстратных комплексов, не приводит к разрыву или появлению ковалентных связей. Английские кристаллографы, создатели модели лизоцима, постулировали, что разрыв гликозидной связи в олигосахариде может происходить только между звеньями на участках *D* и *E*<sup>1</sup>. Дальнейшие экспериментальные работы подтвердили это предположение и сейчас это общепризнано<sup>27</sup>. Как было показано выше, сорбция ди-, три- и тетрасахаридов осуществляется преимущественно на участках *A*, *B*, *C*, т. е. вне зоны гликозидных связей. Следовательно, все эти комплексы, преимущественное образование которых наблюдается при насыщающих концентрациях субстрата, являются непродуктивными. По этой причине они были легко обнаружены методами рентгено-структурного анализа и разнообразными физико-химическими методами<sup>27</sup>.

Для образования продуктивного комплекса необходимо преодолеть энергетический барьер, связанный с сорбцией на участке *D*. Легко видеть, что для олигосахаридов, фрагментов хитина, этот барьер может быть преодолен только благодаря одновременному заполнению всех или почти всех участков сорбции в активном центре лизоцима. Продуктивный комплекс с такими олигосахаридами может быть легко получен только в случае гекса- или возможно, пентасахарида. Этот вывод доказывается, в частности, применением такого конкурентного ингибитора, каким является краситель Бибриха—Скарлетта<sup>36</sup>, способный специфически сорбироваться в области активного центра. С помощью этого ингибитора определены константы сродства для продуктивного и непродуктивного комплексов три-*N*-ацетил-хитотриозы с лизоцимом. Они равны соответственно  $1,0 \cdot 10^{-2}$  и  $1,5 \cdot 10^{-5} M$ . Непродуктивных комплексов образуется почти на три порядка больше, чем продуктивных. Константа сродства для продуктивного комплекса гексасахарида оценена в этой работе величиной  $5 \cdot 10^{-6} M$ , что очень близко к константе сродства для непродуктивного комплекса этого субстрата.

Описаны случаи, когда короткие олигосахариды могут образовывать преимущественно продуктивные комплексы.

Например, *p*-нитрофенил-4-O-(2-ацетамидо-2-дезокси- $\beta$ -*D*-глюкопиранозил)- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид, может медленно гидролизоваться

лизоцимом без осложнения реакцией трансгликозилирования<sup>39</sup>. Углеводные остатки этого дисахарида занимают участки *C* и *D*, а нитрофенилгликозидная связь оказывается в зоне расщепления, что обеспечивает возможность прямого гидролиза без трансгликозилирования. Аналогичный результат наблюдали с трисахаридами, у которых на восстановливающем конце были остатки *D*-глюкозы, *D*-ксилозы и *D*-галактозы, причем последний гидролизовался намного быстрее, чем все остальные<sup>47</sup>. Здесь также, по-видимому, образуется только продуктивный комплекс типа *CDE* (*C*—NAG; *D*—NAG; *E*—галактоза).

### 3. Интерпретация молекулярного механизма

Без принятия молекулярного механизма гидролиза через трансгликозилирование невозможно объединить данные по структурным и термодинамическим характеристикам участков сорбции лизоцима. Эти характеристики, а также вытекающие из них представления о продуктивных и непродуктивных комплексах лизоцима с субстратами показывают, что в ходе ферментативной реакции на поверхности активного центра непрерывно функционирует гексахарид или более длинный олигосахарид. Он то удлиняется за счет трансгликозилирования, то укорачивается за счет гидролиза, и итогом этого циклического процесса является гидролиз короткого олигосахарида, вовлекаемого в процесс на стадии трансгликозилирования в качестве акцептора. Присутствие длинного олигосахарида в небольшом количестве необходимо для эффективного гидролиза коротких олигосахаридов, причем длинный олигосахарид выступает в роли «затравки» в реакции.

Глубина гидролиза олигосахарида зависит от его строения. Хитиновые три- и тетрасахариды расщепляются почти полностью до мономера<sup>19</sup>, бактериальный трисахарид расщепляется только до димера<sup>26</sup>. Это различие объясняется тем, что остатки NAM в бактериальных олигосахариках не могут разместиться на участках *A*, *C* и *F*. Кроме того ингибирующее действие продукта реакции на фермент у дисахарида выражено сильнее, чем у моносахарида, так как дисахарид сорбируется прочнее, чем моносахарид.

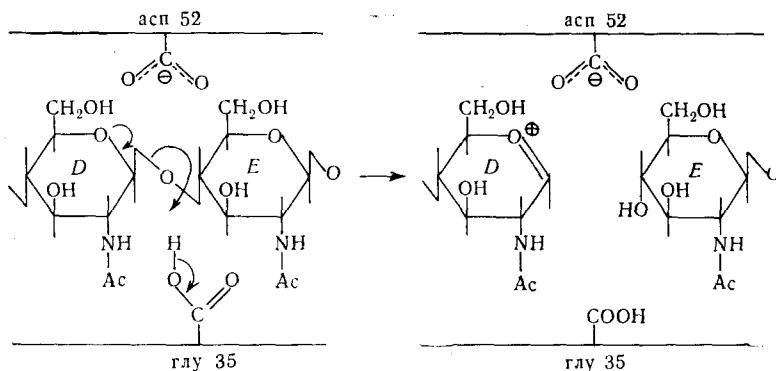
## V. ЭЛЕКТРОННЫЙ МЕХАНИЗМ

### 1. Данные рентгено-структурного анализа

Анализ структуры комплексов лизоцима с субстратами дает возможность также высказать гипотезу об электронно-конформационных принципах катализа в данном конкретном случае. Авторы исходили из допущения о том, что регистрируемый ими комплекс лизоцима с три-N-ацетилхитотриозой (на участках *A*, *B* и *C*) является нереактивным или непродуктивным. Реактивным должен быть комплекс, который этим методом зарегистрировать не удается. Наиболее вероятным местом разрыва гликозидных связей является участок между центрами *D* и *E*. Единственными ионогенными группами, расположенными внутри щели и способными участвовать в передаче протона, являются две карбоксильные группы ( $\beta$ -COOH-группа аспарагиновой кислоты 52 и  $\gamma$ -COOH-группа глутаминовой кислоты 35), которые оказываются размещенными по обе стороны от  $\beta$ -(1—4)-гликозидной связи субстрата. Остаток глу 35 лежит преимущественно в неполярной области около дна щели, что должно затруднить диссоциацию COOH-группы. Действительно,  $pK_a$  этих групп  $\approx 6$ , тогда как обычно эта величина имеет значение 4,5—4,6. Остаток

асп. 52 расположен в полярной области и связан водородными связями с амидными группами, имеющими протонно-акцепторный характер. Это облегчает диссоциацию COOH-групп остатка асп 52. Величина  $pK_a$  этих групп сдвинута в кислую область, по сравнению с нормальным значением ( $\sim 4$  и  $\sim 4,5$  соответственно). Таким образом, благодаря жесткой фиксации этих функциональных групп и образованию стабильного микроЭкружения около каждой из них, они ионизованы в различной степени.

Второй особенностью конформационно-электронного механизма действия лизоцима является деформация глюкопиранозного кольца на участке D. Стереохимические особенности участка D таковы, что углеводный остаток принимает конформацию полукресла. Это связано с расходом энергии (см. выше), и этот расход компенсируется за счет энергии связывания на других участках сорбции. Однако такая деформация способствует гетеролизу гликозидной связи, так как она соответствует стабильной конформации карбониевого иона. Роль карбоксильных групп в этом процессе заключается в том, что одна из них (глу 35) инициирует гетеролиз гликозидной связи, а другая группа (асп. 52) стабилизирует промежуточный катион. Механизм этого процесса может быть представлен в следующем виде:



Свободные углеводные остатки с участков E и F десорбируются, и дальнейшая реакция завершается либо присоединением воды (гидролиз), либо сорбцией на участках E и F других олигосахаридов и образованием новой гликозидной связи (трансгликозилирование). Таким образом в механизме действия лизоцима реализуется общий кислотный катализ.

## 2. Химические и физико-химические исследования

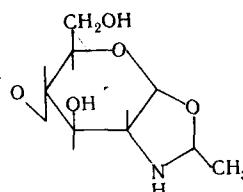
Химические и физико-химические исследования должны были доказать справедливость механизма реакции, выдвигаемого на основе структурных данных. Методами химической модификации лизоцима установлено, что единственными группами, принимающими непосредственное участие в катализе, являются карбоксильные группы<sup>48, 49</sup>,  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-группы лизиновых остатков, концевая NH<sub>2</sub>-группа лизоцима<sup>50-53</sup>, единственный остаток гистидина<sup>50, 52, 54</sup>, таанидиновые группы аргинина<sup>53</sup>, фенольно-гидроксильные группы тирозина<sup>50</sup> могут быть полностью химически заблокированы без потери ферментом всей активности. В некоторых случаях такая модификация приводила к частичному снижению активности, в других — к увеличению<sup>51, 52, 54</sup>. Активность определяли, как правило, турбидиметрическим методом по растворяющему действию ферmenta на

сусpenзию бактерий *Micrococcus lysodeikticus*. Естественно, что на растворение бактериальной сусpenзии (лизис) оказывает влияние слишком много факторов, чтобы прямо связывать количественные изменения активности с какими-либо структурными факторами. Однако, когда удавалось модифицировать лизоцим по карбоксильным группам, то в ряде случаев получали полностью неактивное производное. Молекула лизоцима содержит всего 11 карбоксильных групп (2 остатка глутаминовой кислоты, 8 остатков аспарагиновой кислоты и C-конец). С использованием карбодиимидного метода удалось присоединить по карбоксильным группам такие аминопроизводные, как  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOCH}_3$  и  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2$ . Одну из COOH-групп активного центра (глу 35) не удается амидировать, другая группа (асп 52) может быть заблокирована, причем субстрат (трисахарид) препятствует реакции<sup>55, 56</sup>. Полная инактивация фермента при блокировании асп 52 и влияние субстрата на реакцию доказывает, что эта группа является критической для активности. Такие же результаты получены и при алкилировании лизоцима с использованием в качестве алкилирующего средства тетрафторбората триэтилоксония<sup>50, 57</sup>. При этом получена смесь продуктов, которая была разделена ионообменной хроматографией. В чистом виде выделено два моноалкилированных производных лизоцима, одно из которых неактивно, но способно реагировать самопроизвольно при pH 2,0<sup>50</sup>. Доказано, что это производное лизоцима имеет алкилированную COOH-группу остатка асп. 52<sup>57</sup>. Прямое каталитическое действие карбоксильных групп глу 35 и асп 52 подтверждается также тем фактом, что блокирование всех остальных карбоксильных групп не приводит к полной потере активности лизоцима<sup>55, 56</sup>.

Обе группы обладают необычными химическими свойствами. Остапок глу 35 оказывается химически инертным, хотя, как утверждают Лин и Кошленд<sup>56</sup> эта группа пространственно доступна для реакции. Необычными химическими свойствами обладает также этил-лизоцим (этилирован по асп. 52). Сложно-эфирная связь в этом соединении не способна к реакциям нуклеофильного замещения, она устойчива к щелочному омылению, к действию гидразина, гидроксиамина, она не восстанавливается  $\text{LiAlH}_4$ <sup>57</sup>.

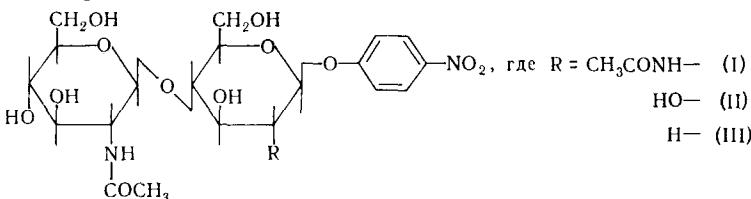
Механизм химического (неферментативного) гидролиза гликозидов приведен в обзоре<sup>58</sup>. Поэтому естественным оказалось предположение о том, что карбоксильная группа глу 35 проявляет каталитическое действие по механизму общего кислотного катализа. Она протонирует гликозидный кислород, что приводит к разрыву гликозидной связи и образованию иона карбония. Как это изображено на стр. 2084, сам факт разрыва гликозидного мостика по связи C<sub>1</sub>—O доказан при использовании воды с изотопом <sup>18</sup>O.

Рэфтери и Ранд-Меир рассмотрели 5 вероятных электронных механизмов расщепления гликозидных связей<sup>33</sup>, из них два приводили к образованию  $\alpha$ -гликозидных связей. Эти два механизма были отброшены, так как авторы показали, что среди продуктов реакции ди-N-ацетилхитобиозы с метанолом удается обнаружить только  $\beta$ -метиловый гликозид N-ацетил-D-глюкозамина. Если  $\alpha$ -гликозид и образуется, то его количество не может превышать 0,3% по отношению к общему содержанию метилгликозидов<sup>59</sup>. Следовательно, реакция идет с сохранением конфигурации при C<sub>1</sub>-атоме. Такая реакция могла бы протекать по механизму двойного нуклеофильного замещения по Кошленду<sup>60</sup>. Кроме того, возможен был механизм, учитывающий участие ацетамидной группы (анхирмерное содействие), через стадию образования оксазолинового производного<sup>61</sup>.



В опытах с модельными химическими реакциями показано, что участие ацетамидной группы может ускорить гидролиз гликозидной связи в 10<sup>3</sup> раз<sup>62</sup>. Наконец, возможен механизм расщепления гликозидной связи через стадию образования иона карбония, но с сохранением конфигурации при C<sub>1</sub>-атоме благодаря ориентированному присоединению к иону карбония соответствующего нуклеофилла (воды в гидролизе или другого акцептора в переносе).

Для окончательного решения этого вопроса кинетическим методом важно было правильно выбрать субстрат, так как изучаемая реакция должна протекать по одному единственному пути. Для этого были синтезированы три вещества типа



и было показано, что при действии лизоцима на вещество (I) образуется смесь разнообразных углеводов, а из веществ (II) и (III) хроматографическим путем удавалось получать только соответствующие дисахариды<sup>39</sup>. Методом ЯМР была определена константа ассоциации для комплекса лизоцима с II ( $K_s = 1,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-2} M$ ) и найдено, что она хорошо согласуется с константой Михаэлиса ( $K_m = 2,3 \pm 0,8 \cdot 10^{-2} M$ ). Учитывая, что остаток NAG в III оченьочно сорбируется на участке C, следует заключить, что III образует с лизоцимом только продуктивный комплекс. Этот субстрат оказался наиболее подходящим для кинетических исследований.

ТАБЛИЦА 3

Условия гидролиза	$k_H/k_D$
2 N HCl, 50°	1,13
3 N NaOCH <sub>3</sub> , 70°	1,03
β-глюказидаза	1,015
Лизоцим	—
pH 5,5	1,41
pH 3,1	1,11
pH 8,3	1,11

Для решения этого вопроса был применен метод вторичного кинетического изотопного эффекта ( $\alpha$ -дейтерия)<sup>63</sup>. В табл. 3 приведена характеристика вторичных изотопных эффектов для гидролиза соединения (III) в разных условиях. Типичные  $S_{N}2$  реакции имеют отношение констант скорости  $k_H/k_D$  около единицы (гидролиз метилатом натрия), а  $S_{N}1$  реакции — около 1,14 (гидролиз соляной кислотой). Лизоцим в широкой области pH показывает изотопный эффект, в значительной степени соответствующий  $S_{N}1$

механизму реакции. Для сравнения авторы исследовали механизм гидролиза III, катализируемого β-глюказидазой миндаля, и нашли, что механизм действия этого фермента принципиально иной.

В ряде работ Лоуз и сотр.<sup>61, 64, 65</sup> доказывали, что реакция гидролиза олигосахаридов, катализируемая лизоцимом, проходит через окса-

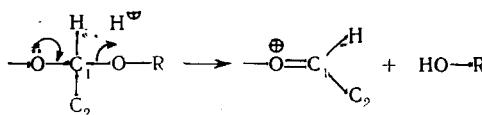
золиновое производное углевода. Авторы нашли, что кинетика гидролиза *o*- и *p*-нитрофениловых гликозидов ди-*N*-ацетилхитобиозы подчиняется уравнению Михаэлиса и Ментен. Однако, несмотря на большой объем проделанной ими работы, их выводы об участии ацетамидной группы в катализе нельзя считать достоверными, так как подчинение кинетики уравнению Михаэлиса и Ментен оказалось в данном случае чисто формальным и лишено обычно вкладываемого в нее физического смысла. В цитированной выше работе<sup>63</sup> показано, что при действии лизоцима на вещество (I) образуется смесь продуктов и что такой субстрат не пригоден для кинетических исследований электронного механизма; поэтому выводы Лоузэ и других лишены основания. Переваривание таких субстратов происходит по механизму гидролиза через трансгликозилирование, что для нитрофениловых гликозидов показал Осава<sup>28</sup>. Критика механизма через оксазолиновое производное приводится также в обзоре Шипмана и Шарона<sup>27</sup>.

### 3. Теория химического сопряжения как одна из предпосылок электронного механизма действия лизоцима

Характерной особенностью лизоцимного катализа, рассмотренной выше, является принудительное воздействие фермента на структуру глюкопиранозного цикла на участке *D*. Обычно это рассматривается как подтверждение высказываемых ранее гипотез о деформации и напряжении разрываемых связей, происходящих на поверхности активного центра фермента<sup>1, 27, 58</sup>. Однако важно акцентировать внимание также на вопросе о роли сопряжения химических связей в биокатализе. Тем самым можно установить связь между классическими представлениями органической химии и представлениями о механизме биокатализа.

Теория сопряжения связей и влияние сопряжения на реакционную способность разрабатывались в органической химии давно. Одним из основных положений в сопряжении простых связей, которые были разработаны Несмейновым<sup>66</sup>, является выполнение определенных стереохимических требований. Обширный класс органических реакций, протекающий благодаря сопряжению простых связей, получил название «реакций фрагментации», теоретические и экспериментальные разработки которых широко проводят Гроб и сотр.<sup>68</sup> Мы уже отмечали ранее<sup>67</sup>, что теория Гроба о фрагментации органических веществ в основных своих положениях соответствует теории сопряжения простых связей Несмейнова<sup>66</sup>. Различия между этими теориями касаются, в основном, терминологии. Гроб употребляет такие термины, как «стереоэлектронный фактор» и «франгомерное ускорение»<sup>68, 69</sup>, отражающие в сущности влияние конформации молекулы на скорость реакции. Высказывалась также гипотеза о том, что упомянутое выше франгомерное ускорение может быть одним из факторов биокатализа (Коссовер<sup>70</sup>).

В наших исследованиях по фрагментации  $\alpha$ -аминокислот с третичным атомом азота мы пришли к выводу о том, что в силу пространственных затруднений молекула  $\alpha$ -аминокислоты может принимать фиксированную конформацию — наиболее благоприятную для сопряжения простых связей<sup>71, 72</sup>. В данном случае затруднения вращения в молекуле аминокислоты вокруг *N*—*C*-связи и фиксация конформации возникают вследствие пространственных затруднений, создаваемых объемистым заместителем на азоте. Фиксация конформации молекулы субстрата происходит также при образовании фермент-субстратного комплекса. Нельзя исключить, что фиксированная конформация благоприятна для *p*, *o*-сопряжения следующего вида:



Благодаря этому сопряжению переходное состояние существует частично в оксониевой форме с двойной связью. Этот возможный фактор биокатализа мы называли «включением сопряжения» или пространственно-ориентационным фактором<sup>73</sup>.

Молекулярный и электронный механизмы действия лизоцима взаимно связаны. Чтобы энергия превращения «кресло — полукресло» была компенсирована энергией образования фермент-субстратного комплекса, необходимо участие шести (или пяти) центров сорбции.

## VI. НЕКОТОРЫЕ НЕРЕШЕННЫЕ ВОПРОСЫ

Исследование механизма действия лизоцима является примером комплексного исследования крупной естественно-научной проблемы. Лизоцим по ряду причин оказался удобным объектом для рентгено-структурного исследования. Однако ко времени завершения этой работы было очень мало химических и физико-химических данных по механизму действия на субстрат. Субстраты с конкретными химическими характеристиками стали известны лишь к 1960 г. Опубликование данных рентгено-структурного анализа (1965—1967 гг.) по структуре лизоцима и его комплексов с субстратами стимулировало химические и физико-химические работы. Примерно за 5—6 лет (1964—1969 гг.) в ряде лабораторий СССР, США, Англии, Японии, Франции и других были выяснены почти все детали, касающиеся механизма действия лизоцима. Полное согласование данных химических и физико-химических исследований с данными рентгено-структурного анализа позволяет утверждать, что в основном механизм действия лизоцима установлен достоверно и полно.

Однако есть еще некоторые вопросы, которые требуют доработки. Эти вопросы связаны, в частности, с природой структурных изменений лизоцима в области pH 6—7, отражающихся на его активности. В этой области pH лежат константы диссоциации как имидазольной группы единственного остатка гистидина, не принимающего непосредственного участия в катализе, так и аномальной карбоксильной группы «глу 35», играющей ключевую роль в катализе. Диссоциация карбоксильной группы, которая наступает при увеличении pH до 6—7 и выше, видимо, сопровождается какими-то тонкими изменениями в структуре фермента, что повышает склонность к агрегации нативного<sup>74, 75</sup> и облученного<sup>76, 77</sup> белка в этом интервале pH. Методом ЯМР показано, что димеризация нативного лизоцима в растворе осуществляется за счет поверхности фермента, примыкающей к области активного центра<sup>78</sup>. Неясна также природа взаимодействия лизоцима с хитином.

Детальное исследование показало, во-первых, что это взаимодействие осуществляется за счет специфического фермент-субстратного сродства. Во-вторых, было установлено, что существуют два комплекса между лизоцимом и хитином, различающиеся по ряду свойств, в частности, тем, что один образуется преимущественно при pH ниже 6—7, другой — в более основной области<sup>79—82</sup>. Так как никакие другие методы (дифференциальная УФ-спектроскопия, флуоресценция, ЯМР-спектроскопия и др.) не указывали на существование двух разных комплексов.

сов лизоцима с водорастворимыми субстратами, то данные о взаимодействии лизоцима с нерастворимым в воде хитином можно истолковать как особенность самого хитина, поскольку, в отличие от низкомолекулярных и водорастворимых субстратов, хитин сорбирует молекулы лизоцима не только за счет фермент-субстратного взаимодействия, но и за счет сил, действующих на поверхности раздела твердой (хитин) и жидкой (раствор) фаз.

Далеко не закончено также исследование каталитической активности при высоких значениях рН. При действии лизоцима на бактерии *Micrococcus lysodeikticus* было обнаружено, что зависимость активности от рН имеет второй максимум при рН 9,2<sup>83-85</sup>. Так как трудно ожидать, что в этой области рН карбоксильная группа глутаминовой кислоты имеет второй максимум при рН 9,2<sup>83-85</sup>, то было предположено, что в этих условиях функция общего кислотно-катализирующего центра осуществляется не остатком глутаминовой кислоты, а ε-аминогруппой остатка лизина 97, расположенного у выхода из щели<sup>84</sup>. Позднее<sup>85</sup> был сделан вывод, что сорбированный субстрат (бактериальная клетка) влияет на диссоциацию глутаминовой кислоты таким образом, что за счет электростатического взаимодействия она остается в недиссоциированной форме даже при рН 9,2. Незаряженный субстрат, тетра-N-ацетил-хитотетраоза, по их данным, не гидролизуется лизоцимом при рН больше 8<sup>85</sup>.

Обнаружено также<sup>86</sup>, что оптимумы рН гидролазного и трансферазного действия лизоцима не совпадают: гидролиз преимущественно протекает при более низких значениях рН, а синтетическая активность проявляется в большей степени при повышенных значениях рН (особенно при рН 8—9). Изменение характера каталитического действия лизоцима при изменении рН можно было связать с диссоциацией карбоксильной группы глутаминовой кислоты и соответственно агрегатного состояния фермента. Мы предположили<sup>86</sup>, что гидролиз осуществляется мономерной молекулой лизоцима, а трансгликозилирование — димерная. Следует подчеркнуть, что из всей области активного центра наименее доказательно изучены участки E и F, которым приписывается, как было видно выше, роль акцепторных участков.

Однако взаимоотношения между сорбией субстрата, катализом и агрегацией фермента оказались более сложными, чем это можно было ожидать. Ряд данных показывает, что агрегация нативного<sup>87-90</sup> и облученного<sup>91, 92</sup> лизоцима подавляется в присутствии субстрата. Больше того, создается впечатление, что тормозящее действие субстрата на димеризацию лизоцима проявляется даже после полного удаления субстрата. Если это так, то субстрат вызывает в лизоциме изменения структуры, которые сохраняются в ней продолжительное время<sup>93</sup>. В данном случае речь может идти о так называемых тонких структурных изменениях (subtle conformational changes). По-видимому, к ним следует отнести изменения, вызываемые субстратом на противоположном конце молекулы фермента, наблюдаемые методом парамагнитного зонда<sup>95</sup>.

\* \* \*

Лизоцим оказался первым ферментом, для которого выяснены все наиболее существенные детали механизма действия. Стало также ясным, что этот механизм не распространяется на все родственные ферменты (гликозидазы). Поэтому важно суметь правильно выделить самые общие принципы биокатализа, заложенные в основу механизмов действия ферментов вообще. Чтобы быть ближе к лизоциму, возьмем в качестве примера гидролиз гликозидной связи. Для того, чтобы этот гидролиз прошел по реакционному пути через ион карбония, необходимо: 1) про-

тонирование гликозидного кислорода; 2) соответствующее изменение конформации глюкопиранозного цикла; 3) ориентация отрицательно заряженного иона вблизи от иона карбония. Каждое из трех перечисленных условий осуществляется с некоторой долей вероятности. Вероятность одновременного совпадения всех трех условий выражается в виде произведения названных трех вероятностей. Мы перечислили лишь наиболее существенные условия, обеспечивающие каталитическое действие лизоцима. В общем виде число условий может быть и больше. Вероятность  $f$  протекания химического процесса равна произведению вероятностей  $f_i$  реализации каждого условия:

$$f = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \dots f_n, \text{ где } f_i < 1$$

Чем больше условий заложено в механизме процесса, тем меньше общая его вероятность. Путем изменения внешних параметров среды можно достигнуть резкого увеличения отдельных составляющих вероятностей  $f_i$ . Например, гидролиз гликозидов кислотами означает резкое увеличение вероятности протонирования гликозидного кислорода ( $f_1$ ) за счет столкновения с протонами (ионами гидроксония). Повышение температуры увеличит вероятность возникновения конформации переходного состояния ( $f_2$ ). Однако одновременное увеличение вероятностей протонирования ( $f_1$ ) и ориентации отрицательного иона ( $f_3$ ) в химических системах почти недостижимо. Только в отдельных случаях, известных как механизм согласованного действия, такая ситуация реализуется в неферментативных реакциях. Примером может служить широко известное каталитическое действие 2-оксипиридина на реакцию мутаротации глюкозы. Именно эта реакция рассматривается обычно как одна из моделей ферментативного процесса. Ориентирующее действие фермента, которое по Кошлэнду<sup>96</sup> обеспечивает сближение и надлежащую ориентацию реагирующих участков в молекулах субстратов, по существу сводится к повышению вероятности реализации условий переходного состояния.

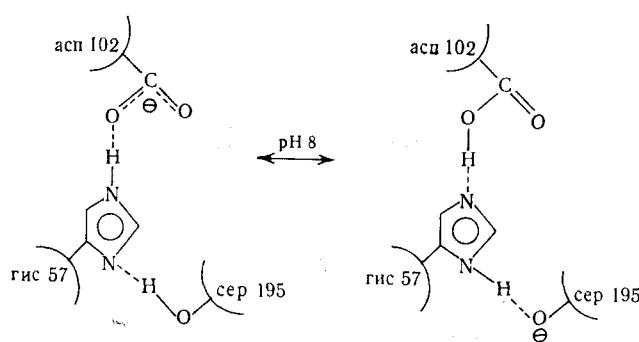
В лизоцимном катализе вероятность каждого из трех условий очень высока благодаря относительно жесткой фиксации «работающих» функциональных групп и их строгому стереохимическому соответству субстрату. Такая слабая кислота как глу 35 с  $pK_a$  6–7 протонирует гликозидный кислород со столь же высокой вероятностью, что, и, например, соляная или серная кислоты. Конформация переходного состояния диктуется стереохимическими особенностями участка  $D$  и ее вероятность, видимо, очень близка к единице. Столь же высока вероятность надлежащей ориентации отрицательного иона (асп. 52). То, что в химическом процессе является следствием случайно возникающего благоприятного совпадения нескольких условий для прохождения реакции, в ферментативном процессе запрограммировано в структуре белковой молекулы. Это и обеспечивает высокую эффективность ферментативного катализа.

Функция фермента состоит в том, что он организует химический процесс, направляя его по определенному реакционному пути и обеспечивая высокую вероятность реализации необходимых для реакции условий. Это направляющее действие фермента возможно только при условии, если сам фермент обладает достаточно жесткой фиксированной структурой. В низкомолекулярных соединениях жесткость структуры может быть достигнута главным образом за счет ковалентных связей, как например, в полициклических системах стероидов. В высокомолекулярных соединениях жесткость структуры обеспечивается уже за счет ком-

пактной упаковки полипептидных цепей в глобулы и нековалентного взаимодействия. Рентгено-структурный анализ показывает, что разнообразные белки имеют плотную глобулярную упаковку с жестко фиксированным положением полипептидных цепей<sup>97</sup>. Поэтому, если говорить об индуцированном соответствии фермента субстрату, широко известном как гипотеза Кошлэнда, эту индукцию следует ограничить очень небольшими смещениями атомов в молекуле фермента. В случае лизоцима эти смещения не превышают расстояния 1 Å. Столь незначительные структурные изменения в белке вряд ли могут быть достаточным основанием для утверждения о конформационной гибкости, тем более что речь заходит чаще уже не о конформационных изменениях, а о деформациях валентных углов и расстояний.

Высокий молекулярный вес фермента, его компактная и жесткая глобулярная структура обеспечивают фиксацию отдельных функциональных групп, что приводит к возникновению новых, не известных в органической химии свойств и явлений. Благодаря фиксированному положению эти группы оказываются в почти неизменном микроокружении и их свойства резко зависят от каждого конкретного микроокружения. В органической химии функциональная группа любой молекулы подвергается влиянию постоянно изменяющегося микроокружения и наблюдаемые в опытах свойства являются, как правило, макросвойствами, усредненными по свойствам многочисленных микроокружений данной группы. Кроме того, благодаря фиксации функциональных групп в жесткой глобуле фермента могут образовываться также структуры, которые необычны для органической химии. Высказанные положения могут быть проиллюстрированы рядом примеров.

Остаток аспарагиновой кислоты 52 в молекуле лизоцима фиксирован в зоне повышенной нуклеофильности. Он может быть легко этерифицирован действием тетрафторбората триэтилоксония, но образовавшийся сложный эфир не вступает в реакции нуклеофильного замещения (см. выше). Особыми химическими свойствами обладает сериновый гидроксил, входящий в активный центр химотрипсина. В данном случае фермент показывает такой тип сопряжений химических связей, который неизвестен в органической химии. Видимо, правильно его было бы назвать трансаннулярным сопряжением, так как оно больше всего напоминает трансаннулярное взаимодействие в макроциклических соединениях. Благодаря жесткой фиксации функциональных групп в химотрипсине геометрическое расположение аспарагиновой кислоты 102, гистидина 57 и серина 195 обеспечивает химическое сопряжение их функциональных групп, как это представлено ниже:



Остатки гистидина 57 и аспарагиновой кислоты 102 погружены в глобулу и не контактируют с раствором. Остаток серина 195 выступает на поверхность. Благодаря такому сопряжению обычная алифатическая гидроксильная группа способна при pH 8 диссоциировать, т. е. этим свойством она напоминает гидроксильную группу нитрофенола. Здесь так же, как и в процессе катализа, вероятность трансантанулярного сопряжения в смеси трех названных аминокислот ничтожно мала, а в белке благодаря пространственному сближению она осуществляется с вероятностью равной единице.

Химия белка дает кроме того примеры необычных структурных образований. Например, в кристалле лизоцима один из контактов между соседними молекулами фермента имеет структуру, напоминающую сэндвичевые структуры в химии металлоорганических соединений. Эта структура образуется с участием бензольного кольца фенилаланина одной молекулы лизоцима и фенольного кольца остатка тирозина от другой молекулы. Между параллельно расположеннымми кольцами размещается гуанидиновая группа аргинина в виде катиона, связанного с Cl-ионом. Такая структура стабилизируется дополнительными водородными связями.

Биокатализ является лишь частным проявлением особенностей химии белка, возникающих благодаря организованной и почти не меняющейся во времени структуре молекул белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, Proc. Roy. Soc. B167, 348 (1967).
2. A. Fleming, Там же, B93, 306 (1922).
3. K. Meyer, J. W. Palmer, R. Thomson, D. Khorazo, J. Biol. Chem., 113, 303 (1936).
4. K. Meyer, E. Hahnel, A. Steinberg, Там же, 163, 733 (1946).
5. L. A. Epstein, E. B. Chain, Brit. J. Exp. Path., 21, 339 (1940).
6. L. R. Berger, R. S. Weiser, Biochim. biophys. acta, 26, 517 (1957).
7. M. R. Salton, J. M. Ghysen, Там же, 36, 552 (1959).
8. M. R. J. Salton, J. M. Ghysen, Там же, 45, 355 (1960).
9. H. P. Lenk, M. Wenzel, E. Schütte, Naturwiss., 47, 516 (1960).
10. M. Wenzel, H. P. Lenk, E. Schütte, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 327, 13 (1961).
11. R. W. Jeanloz, N. Sharon, H. M. Flowers, Biochem. biophys. res. Commun., 13, 20 (1963).
12. N. Sharon, T. Osawa, H. M. Flowers, R. W. Jeanloz, J. Biol. Chem., 241, 223 (1966).
13. J. A. Rupley, Biochim. biophys. acta, 83, 245 (1964).
14. R. F. Powning, H. Irgyiewicz, Там же, 124, 218 (1966).
15. J. A. Rupley, Proc. Roy. Soc., B 167, 416 (1967).
16. Н. А. Кравченко, В. И. Максимов, Изв. АН СССР, сер. хим. 1964, 584.
17. N. Sharon, S. Seifter, J. Biol. Chem., 239, PC 2398 (1964).
18. J. A. Rupley, Science, 150, 382 (1965).
19. В. И. Максимов, Е. Д. Каверзнева, Н. А. Кравченко, Биохимия, 30, 1007 (1965).
20. P. Jolles, D. Charlemagne, J. F. Petit, A. C. Maire, J. Jollés, Bull. soc. chim. biol., 47, 2241 (1965).
21. N. Sharon, J. Jollés, P. Jollés, Там же, 48, 731 (1966).
22. В. И. Максимов, О. М. Телепина, Биохимия, 31, 918 (1966).
23. В. И. Максимов, ДАН, 172, 210 (1967).
24. В. И. Максимов, Б. И. Осипов, Е. Д. Каверзнева, Биохимия, 32, 1169 (1967).
25. N. Sharon, Proc. Roy. Soc., B 167, 402 (1967).
26. D. M. Chipman, J. J. Pollock, N. Sharon, J. Biol. Chem., 243, 487 (1968).
27. D. M. Chipman, N. Sharon, Science, 165, 454 (1969).
28. T. Osawa, Carbohydrate Res., 7, 217 (1968).
29. C. S. Tsai, C. Reyez-Zamora, R. Otson, Biochim. biophys. acta, 250, 172 (1971).

30. A. Ya. Khorlin, E. A. Shashkova, S. E. Zurabyan, Carbohydrate Res., **21**, 269 (1972).
31. D. M. Chipman, Biochemistry, **10**, 1714 (1971).
32. E. W. Dahlquist, M. Raftery, Nature, **213**, 625 (1967).
33. M. A. Raftery, T. Rand-Mair, Biochemistry, **7**, 3281 (1968).
34. J. A. Rupley, V. Gates, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **57**, 496 (1967).
35. J. A. Rupley, V. Gates, R. Bilbrey, J. Am. Chem. Soc., **90**, 5633 (1968).
36. G. Rossi, E. Holler, S. Kumar, J. A. Rupley, Biochem. Biophys. Res. Commun., **37**, 757 (1969).
37. Н. А. Кравченко, Ю. Д. Кузнецов, Молек. биология, **1**, 498 (1967).
38. Н. А. Кравченко, Ю. Д. Кузнецов, в сб. Химия и биохимия углеводов «Наука», 1969, стр. 187.
39. T. Rand-Mair, E. W. Dahlquist, M. A. Raftery, Biochemistry, **8**, 4206 (1969).
40. C. C. Blake, D. F. Koenig, C. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, Nature, **206**, 757 (1965).
41. A. K. T. North, Sci. J., **2**, N. 11, 55 (1966).
42. J. A. Rupley, L. Butler, M. Gerring, F. J. Hartdegen, R. Pecoraro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **57**, 1088 (1967).
43. F. W. Dahlquist, L. Jao, M. Raftery, Там же, **56**, 26 (1966).
44. F. W. Dahlquist, M. A. Raftery, Biochemistry, **8**, 713 (1969).
45. J. J. Pollock, D. M. Chipman, N. Sharon, Biochem. Biophys. Res. Commun., **28**, 779 (1969).
46. J. J. Pollock, N. Sharon, Biochemistry, **9**, 3913 (1970).
47. J. J. Pollock, N. Sharon, Biochem. Biophys. Res. Commun., **34**, 673 (1969).
48. H. Frankel-Conrat, Arch. Biochem. Biophys., **27**, 109 (1956).
49. S. M. Parsons, L. Jao, F. W. Dahlquist, C. L. Borders, T. Groff, J. Racks, M. A. Raftery, Biochemistry, **8**, 700 (1969).
50. Н. А. Кравченко, Г. В. Клеопина, Е. Д. Каверзнева, Биохимия, **30**, 195, 534, 713 (1965).
51. Г. В. Клеопина, Н. А. Кравченко, Е. Д. Каверзнева, Изв. АН СССР сер. хим., **1965**, 830.
52. Н. А. Кравченко, Г. В. Клеопина, Е. Д. Каверзнева, Biochim. biophys. acta, **92**, 412 (1964).
53. R. C. Davis, A. Neuberg, Там же, **178**, 306 (1969).
54. Н. А. Кравченко, Г. В. Клеопина, Е. Д. Каверзнева, ДАН, **144**, 118 (1962).
55. D. G. Hoage, D. E. Koshland, J. Biol. Chem., **242**, 2447 (1967).
56. T. Lin, D. E. Koshland, Там же, **244**, 505 (1969).
57. S. M. Parsons, M. A. Raftery, Biochemistry, **8**, 4199 (1969).
58. C. A. Vernon, Proc. Roy. Soc., B **167**, 389 (1967).
59. F. W. Dahlquist, C. L. Borders, G. Jacobson, M. A. Raftery, Biochemistry, **8**, 694 (1969).
60. D. E. Koshland, Biol. Rev., **28**, 639 (1953).
61. G. Lowe, Proc. Roy. Soc., B **167**, 431 (1967).
62. D. Piszkiewicz, T. C. Bruice, J. Am. Chem. Soc., **89**, 6237 (1967).
63. F. W. Dahlquist, T. Rand-Mair, M. A. Raftery, Biochemistry, **8**, 4214 (1969).
64. G. Lowe, G. Sheppard, M. L. Sinnott, A. Williams, Biochem. J., **104**, 893 (1967).
65. G. Lowe, G. Sheppard, Chem. Commun., **1968**, 529.
66. А. Н. Несмеянов, Ученые записки МГУ, **132**, 5 (1950).
67. V. I. Maksimov, Tetrahedron, **21**, 687 (1965).
68. К. А. Гроб в сб. Теоретическая органическая химия, ИЛ, 1963, стр. 146.
69. Н. Р. Fischer, C. A. Гроб, Helv. chim. acta, **46**, 936 (1963).
70. Э. Коссовер, Молекулярная биохимия «Мир», 1964, стр. 319.
71. В. И. Максимов, ДАН, **145**, 567 (1962).
72. В. И. Максимов, Изв. АН СССР ОХН, **1963**, 1074.
73. В. И. Максимов, ЖОХ, **34**, 1512 (1966).
74. A. I. Sophianopoulos, R. E. Van Holde, J. Biol. Chem., **239**, 2516 (1964).
75. M. R. Bruzzesi, E. Chiancone, E. Antonini, Biochemistry, **4**, 1796 (1964).
76. В. И. Максимов, В. И. Осипов, Биохимия, **32**, 98 (1967).
77. В. И. Максимов, Там же, **32**, 835 (1967).
78. H. Sternlicht, D. Wilson, Biochemistry, **6**, 2881 (1967).
79. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, Е. Д. Каверзнева, ДАН, **170**, 213 (1966).
80. И. А. Черкасов, Н. А. Кравченко, Мол. биология, **1**, 381 (1967).
81. I. A. Cherkasov, N. A. Krawchenko, Biochim. biophys. acta, **206**, 289 (1970).
82. K. Hayashi, N. Fujimoto, M. Kugimiya, J. Biochem., **65**, 401 (1969).

83. A. Neuberger, B. M. Wilson, *Nature*, **215**, 524 (1967).
84. A. Neuberger, B. M. Wilson, *Biochim. biophys. acta* **147**, 473 (1967).
85. R. C. Davies, A. Neuberger, B. M. Wilson, Там же, **178**, 294 (1969).
86. В. И. Максимов, В. И. Осипов, Е. Д. Каверзнева, *Изв. АН СССР, сер. хим.* **1967**, 1165.
87. D. H. Meadows, J. L. Markley, J. S. Cohen, O. Jarde茨ky, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 307 (1967).
88. J. S. Cohen, O. Jarde茨ky, Там же, **60**, 92 (1968).
89. U. Zehavi, *Biochim. biophys. acta*, **194**, 526 (1969).
90. A. J. Sophiaanopoulos, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3188 (1969).
91. В. И. Максимов, *Радиобиология*, **10**, 632 (1970).
92. В. И. Максимов, В. И. Осипов, Е. Д. Каверзнева, Там же, **12**, 26 (1972).
93. U. Zehavi, A. Lustig, *Biochim. biophys. acta*, **236**, 127 (1971).
94. R. Lumgy, R. Biltonen, *Structure and stability of biological Macromolecules*, N. Y., стр. 65.
95. Г. И. Лихтенштейн, Ю. Д. Ахмедов, *Мол. биология*, **4**, 551 (1970).
96. Д. Кошланд, в сб. *Горизонты биохимии*, «Мир», М., 1964, стр. 203.
97. О. Б. Птицын, *Усп. совр. биологии*, **65**, 26 (1970).
98. D. M. Blow, J. J. Wigktoft, B. S. Hartley, *Nature*, **221**, 337 (1969).

Всесоюзный научно-исследовательский институт  
биосинтеза белковых веществ, ферментное отделение, Москва

---