

В. К. АНТОНОВ

КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ СУБСТРАТА α -ХИМОТРИПСИНА В РАСТВОРЕ И В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ФЕРМЕНТА

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 18 I 1972)

α -Химотрипсин рассматривают (^{1, 2}) в настоящее время как пример фермента, для которого справедлива концепция Э. Фишера о соответствии с субстратом по типу «ключ-замок». Этот вывод основывается, главным образом, на данных рентгеноструктурного анализа (²), свидетельствующих, что при образовании комплекса этого фермента с виртуальным субстратом N-формил-L-триптофаном (I) не происходит каких-либо конформационных изменений в молекуле белка. Эти данные говорят, однако, лишь о состоянии одного из партнеров фермент-субстратного взаимодействия α -химотрипсина. Что же касается субстрата, то сравнения его конформации в растворе и в активном центре фермента до сих пор не проводилось *. Настоящая статья имеет целью восполнить этот пробел.

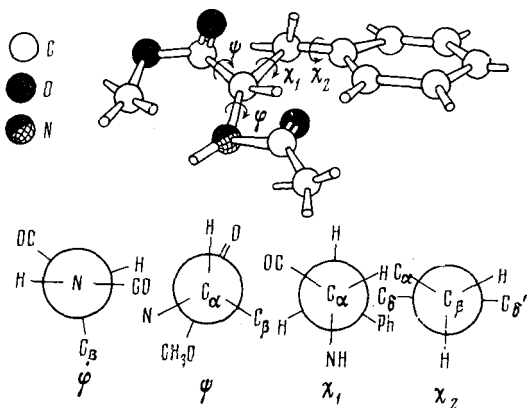


Рис. 1. Реакционная конформация метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина

Конформация типичного субстрата α -химотрипсина, например, метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (II) в активном центре фермента может быть выведена из совокупности рентгеноструктурных данных и результатов кинетического субстратного и ингибиторного анализа. Эта конформация представлена на рис. 1. Основанием для приписания субстрату именно такой конформации служат следующие данные.

1) Сравнение кинетических параметров химотрипсинового гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (II) и некоторых циклических его аналогов с ограниченной конформационной подвижностью, как например D-3-карбометокси-3,4-дигидроизокарбостирила (III) (см. (⁴) и цитированную там литературу), позволяет сделать вывод о частичном сходстве реакционных конформаций этих соединений. Взаимное расположение субстратов II и III в активном центре фермента может быть представлено рис. 2.

2) Как это следует из данных по ингибированию α -химотрипсина (^{5, 6}) и из рентгеноструктурных данных (⁷), связывающий участок ак-

* В работе (³) на основании сравнения характера спектров я.м.р. I в отсутствие и в присутствии фермента было высказано предположение, что связывание I мало изменяет его конформацию.

тивного центра фермента имеет ограниченные размеры и поэтому ароматические группы субстратов II и III должны связываться в одном и том же локусе фермента. Отсюда следует, что взаимное расположение этих соединений лучше описывается рис. 2А.

3) Циклические субстраты типа III имеют в растворе экваториальную конформацию, причем существует параллелизм между способностью таких субстратов принимать в растворе экваториальную конформацию и их субстратными свойствами ⁽⁸⁾. Экваториальная ориентация III и соответствующая ей ориентация сложноефирной группы в II подтверждается

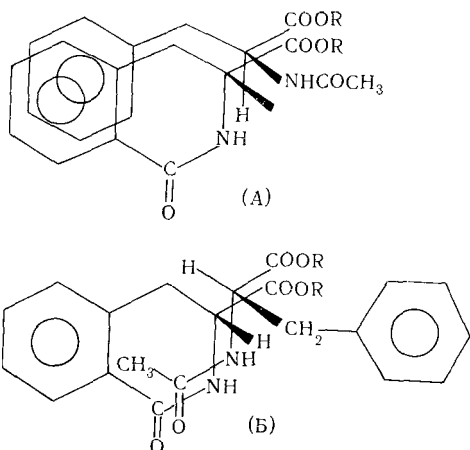


Рис. 2. Возможные взаимные ориентации метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина и D-3-карбометокси-3,4-дигидроизокарбостирила в активном центре α -химотрипсина

рентгеноструктурными данными ⁽²⁾, различием в специфичности химотрипсина по отношению к производным транс- и цис-коричных кислот ⁽⁹⁾ и рядом других данных ⁽¹⁰⁾.

4) Как это следует из данных по ферментативному гидролизу D-3-карбометокси-3,4-дигидроизокумарина ⁽⁴⁾ и величин постантильных констант гидролиза соединения III ⁽¹¹⁾, лактамная группировка изокарбостирила (III) не участвует в образовании водородной связи с ферментом. Субстратные свойства аналогов III, содержащих и не содержащих лактамную группировку, коррелируют со скоростью их щелочного гидролиза ⁽⁴⁾, поэтому нет необходимости постулировать какие-либо невалентные взаимодействия соответствующего участка таких аналогов с ферментом, как это делается в работе ⁽¹²⁾. Лактамная группа III, очевидно, ориентирована в направлении, доступном для растворителя, тогда как N-ациламидная группа II, образующая водородную связь с карбонильной группой остатка серина-214 ⁽²⁾, ориентирована в направлении основной пептидной цепи, образующей гидрофобную полость в химотрипсине.

5. Ориентация атакующей карбонильной группы субстрата, связанного в активном центре фермента, может быть выведена из сравнения субстратных свойств II и L-3-бензил-2,5-дикетоморфолина ⁽¹³⁾, в котором вращение вокруг связи C _{α} -CO невозможно. Угол ψ в этом соединении, из-за неплоской конформации гетероциклической части молекулы составляет $\sim 140^\circ$. Анализ кристаллографических данных, полученных для комплекса химотрипсина с N-формил-L-триптофаном (I) ⁽²⁾, показывает, что при учете взаимодействия карбонильной группы I с N-атомами остатков серина-195 и глицина-193, а также взаимодействия NH-группы I с CO-группой серина-214, реализующегося в комплексе фермента с истинным субстратом, угол ψ в последнем должен составлять $130-150^\circ$.

Конформационные состояния производных N-ацетил-L-фенилаланина в растворе были исследованы как методом я.м.р. ⁽¹⁴⁾, так и методом теоретического конформационного анализа ⁽¹⁵⁾. Согласно этим данным, в водных растворах соединения типа II существуют в виде равновесной смеси ротамеров, из которых преобладающими ($\sim 70\%$) являются конформации с двугранным углом $\chi_1 = 300^\circ$. Из этих конформаций абсолютным энергетическим минимумом обладают конформации В и R, имеющие угол $\chi_2 = 90^\circ$ и отличающиеся углом ψ , равным 120 и 330° соответственно.

В табл. 1 сопоставлены конформационные параметры метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (II), связанного в активном центре α -химо-

трипсина с параметрами энергетически наиболее выгодной конформации (R) производных N-ацетил-*L*-фенилаланина * в растворе, а также с параметрами N-формил-*L*-триптофана, полученными из данных рентгеноструктурного анализа комплекса этого соединения с ферментом ⁽²⁾.

Можно видеть, во-первых, что конформация N-формил-*L*-триптофана заметно отличается от истинной конформации субстрата в активном центре фермента. Это, вероятно, связано с наличием заряда на карбоксилатной группе квазисубстрата (угол ψ) и с особенностями кристаллической упаковки химотрипсина, искажающей положение C_α —N-связи (угол φ) ⁽²⁾.

Т а б л и ц а 1

Сравнение кофмаций. Величины двугранных углов в градусах

Параметр	Конформация субстрата (II) в активном центре химотрипсина согласно рис. 1	Наиболее выгодная энергетическая конформация производных N-ацетил- <i>L</i> -фенилаланина в растворе ⁽¹⁵⁾	Конформация N-формил- <i>L</i> -триптофана в комплексе с химотрипсином по данным рентгеноструктурного анализа *
ψ ($C_\alpha - C'$)	~140	120	180
φ ($C_\alpha - N$)	40	43	118
χ_1 ($C_\alpha - C_\beta$)	300	300	308
χ_2 ($C_\beta - C_\gamma$)	150	85	170

* Рассчитано из координат атомов, приведенных в работе ⁽²⁾.

Во-вторых, из приведенных данных видно, что конформация субстрата в комплексе с ферментом довольно близка одной из наиболее выгодных конформаций в растворе. Различия заключаются в величине угла χ_2 , т. е. в ориентации плоскости бензольного кольца относительно Н— C_β —Н-фрагмента, а также в небольшом отклонении угла ψ , не превышающем 20°. Что же касается параметра φ , а также взаимной ориентации связей C_α — C' и C_β — C_γ , определяемой двугранным углом χ_1 , то они оказываются одинаковыми в обоих случаях. Энергетическое различие конформации субстрата в комплексе с ферментом и наиболее выгодной его конформации в растворе, связанные с изменением угла χ_2 , не превышают 1 ккал/моль, однако конформация с углом $\chi_2 \sim 150^\circ$ весьма чувствительна к изменениям угла ψ ⁽¹⁵⁾. Изменение этого угла на 20° связано с изменением энтальпии примерно на 2 ккал/моль.

Таким образом, α -химотрипсин фиксирует в активном центре конформацию субстрата, близкую к оптимальной конформации его в растворе и отличающуюся от таковой по энтальпии примерно на 3 ккал/моль. Эта величина заметно ниже, чем изменение энтальпии системы при образовании комплекса Михаэлиса (для этилового эфира N-ацетил-*L*-триптофана $\Delta H^\circ = -9.9$ ккал/моль ⁽¹⁷⁾). Очевидно, что при полном превращении субстрата в продукты фермент затрачивает часть энергии, выделяемой при образовании фермент-субстратного комплекса на конформационное изменение субстрата. В этом смысле концепция «ключ — замок» применима к взаимодействию α -химотрипсина с субстратом с тем лишь уточнением, что из многих «ключей» (ротамеров) только один (и не самый простой) подходит к «замку».

* В работах ^(14, 15) последовались метиламид (1-метоксикарбонил-4-этил)-амид N-ацетил-*L*-фенилаланина. Однако как это следует из данных работы ⁽¹⁶⁾, замена эфирной группы на амидную существенно не влияет на конформацию основной и боковой цепи производных N-ацетил-*L*-фенилаланина.

Автор выражает благодарность Е. М. Попову и Г. М. Липкину за полезное обсуждение этой работы.

Институт природных соединений им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. W. Ingles, J. R. Knowles, *Biochem. J.*, **104**, 369 (1967). ² T. A. Steitz, R. Henderson, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.*, **46**, 337 (1969). ³ J. T. Gerig, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2681 (1968). ⁴ V. K. Antonov, L. D. Rumsh, *FEBS Letters*, **9**, 67 (1970). ⁵ J. R. Knowles, *J. Theoret. Biol.*, **9**, 213 (1965). ⁶ V. K. Antonov, T. V. Ivanina et al., *FEBS Letters*, **7**, 23 (1970). ⁷ P. B. Sigler, O. M. Blow et al., *J. Mol. Biol.*, **35**, 143 (1968). ⁸ N. Q. Abdullaev, V. F. Bystrov et al., *Tetrahedron Letters*, № 60, 5287 (1969). ⁹ И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, *ДАН*, **193**, 932 (1970). ¹⁰ S. G. Cohen, Z. Neuwirth, S. Y. Weinstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5306 (1966). ¹¹ В. К. Антонов, Л. Д. Румш, *ДАН*, **185**, 821 (1969). ¹² S. G. Cohen, A. Milovanović et al., *J. Biol. Chem.*, **244**, 2664 (1969). ¹³ L. D. Rumsh, L. I. Volkova, V. K. Antonov, *FEBS Letters*, **9**, 64 (1970). ¹⁴ V. F. Bystrov, S. L. Portnova et al., *Tetrahedron Letters*, № 60, 5283 (1969). ¹⁵ Г. М. Липкин, С. Ф. Архипова, Е. М. Попов, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1970**, 345. ¹⁶ Е. М. Попов, Г. М. Липкин и др., *Хим. природн. соед.*, № 2, 184 (1971). ¹⁷ S. Rajender, M. Han, R. Lumry, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1378 (1970).