

Ю. Н. ЧИРГАДЗЕ, А. М. ОВСЕПЯН

**СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ МИОГЛОБИНА
В ДАЛЕКОЙ ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ**

(Представлено академиком Г. М. Франком 12 II 1971)

В низкочастотной области от 500 до 10 см⁻¹ спектр нормальных колебаний сильно зависит от пространственной структуры молекул и их взаимного расположения. Теоретически распределение частот определяется как внутримолекулярными колебаниями атомов, так и колебаниями всей решетки твердого тела. Имеется несколько методов, позволяющих определять частоты переходов в этом диапазоне. Так, экспериментально наблюдаемое распределение медленных нейтронов по энергиям при неупругом рассеянии прямо соответствует частотному распределению. Для полиглицина, например, спектры рассеяния нейтронов в области 600—20 см⁻¹ для разных конформаций молекулы существенно отличаются (¹). Развитие лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния позволяет надеяться на получение спектров низких частот полипептидов и белков в водной среде, хотя, по-видимому, нижний предел в этом методе находится около 250 см⁻¹ (²). Начаты фундаментальные исследования спектров поглощения полипептидов в далекой инфракрасной области (³, ⁴), в результате которых был обнаружен ряд полос, характерных для спиральной и складчатой структур полипептидных цепей.

В настоящем сообщении представлены результаты первого исследования спектров поглощения в области 500—30 см⁻¹ глобулярных белков в нативном и денатурированном состояниях. В качестве объекта изучения был взят миоглобин кашалота в форме MbMet. Хроматографически чистый препарат был выделен по методу (⁵). Нативный белок получен диализом против дистиллированной воды с NaOH pH 6,9 и лиофильно высушен; денатурированный образец получен испарением воды при 90° из раствора с NaOH, pH 9,5; количество свободной щелочи, определенной титрованием, составляло менее 4% от веса сухого белка и практически не оказывало влияния на спектр.

В области 500—390 см⁻¹ спектры снимались на спектрофотометре IR-27G фирмы Шимадзу, Япония, характеристики прибора в этом диапазоне были улучшены за счет принудительной осушки атмосферного воздуха на всем пути оптического луча. Основная часть спектра в области 410—30 см⁻¹ получена с помощью длинноволнового инфракрасного спектрофотометра FIS-3 фирмы Хитачи, Япония, с разрешением не хуже 5 см⁻¹. Ввиду особого характера спектра белка требуется повышенная точность записи пропускания, поэтому были использованы шкалы с 4-кратным растяжением. Точность составляла $\pm 0,2\%$ в пропускании, и с учетом ошибки при регистрации линии нулевого поглощения ошибка в шкале оптических плотностей равнялась $\pm 0,004$ при 0,4 опт. ед. Образцы готовились в виде пасты с вазелином в отношении белок — вазелин 1:4 по весу. Паста наносилась на полиэтиленовую пластину толщиной 0,5 мм и помещалась в вакуумную среду кюветного отделения спектрофотометра. Количество воды в белковых препаратах контролировалось по и.к. спектру в средней области и не превышало 3—5% по весу.

Спектры нативного метмиоглобина и миоглобина, денатурированного щелочью при высокой температуре, представлены на рис. 1. В случае нативного белка в высокочастотной части спектра от 500 до 280 см⁻¹ обнаруживаются четыре достаточно четко выраженных максимума 470, 422,

376 и 324 см^{-1} , находящихся на склоне интенсивной и широкой пептидной полосы Амид V около 600 см^{-1} . Денатурация приводит к исчезновению первых трех полос, последняя полоса несколько меняется по форме контура и имеет частоту 328 см^{-1} . В остальной части спектра от 280 до 30 см^{-1} поглощение нативного миоглобина вначале сохраняется на одном уровне, вплоть до 140 см^{-1} , а затем довольно круто падает практически до нулевого значения. Спектр денатурированного Mb в области ниже 300 см^{-1} отличается от спектра нативного провалом поглощения в интервале 280—210 см^{-1} и двумя широкими полосами около 160 и 128 см^{-1} .

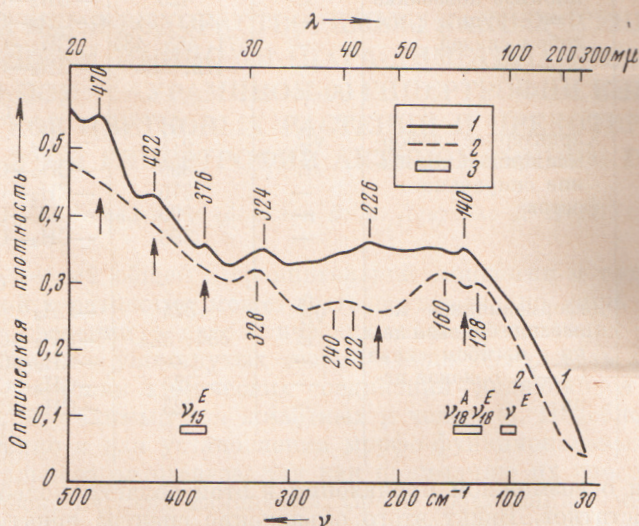


Рис. 1. Спектр поглощения миоглобина кашалота в нативном состоянии (1) и при щелочной денатурации (2). 3 — Интервалы ν для характерных спиральных колебаний по данным (4). Стрелки указывают места существенных изменений в спектре при денатурации. Эффективная толщина слоя в обоих случаях приблизительно одинакова, 2,6 мг/см^2 . Ошибка измерения указана на кривых при 280 см^{-1} . 1 — MbMet pH 6,9; 20°; 2 — MbMet pH 9,5; 90°

В структуре нативного миоглобина 77% аминокислотных остатков включены в спиральные участки полипептидной цепи. На этом основании, а также исходя из аминокислотного состава, можно попытаться объяснить спектр Mb в далекой инфракрасной области, сопоставив его со спектрами спиральных полипептидов. В табл. 1 приведены некоторые частоты Mb и нескольких полипептидов с алкильными боковыми радикалами: поли-L-аланина, поли-L, α -амино-*n*-масляной кислоты (в этом случае установлено одновременное существование двух структурных изомеров боковой цепи), поли-L-норвалина, поли-L-норлейцина и поли-L-лейцина. Характерными для спиральной структуры в спектрах этих полипептидов являются сильные полосы с частотами около 380, 150 и 100 см^{-1} , форму соответствующих колебаний можно оценить на основании расчетов, проведенных для первых двух из перечисленных полипептидов (4). Как видно из табл. 1, все пики в области 500—300 см^{-1} сопоставляются однозначно. Три пика и в том числе пик 376 см^{-1} , соответствующий характерному колебанию спиральной конформации, исчезают в спектре при денатурации щелочью и высокой температурой. Измерение ультрафиолетового кругового дихроизма Mb в этом состоянии показывает, что молекула белка большей частью находится в клубкообразной конформации и общее количество спиралей уменьшается до 15—20%.

В настоящее время еще нет никаких данных по низкочастотным и.к. спектрам полипептидов в клубкообразном состоянии, практически ничего

Отнесение некоторых полос в низкочастотном спектре миоглобина на основе сравнения со спектрами исследованных α -спиральных полипептидов

Нативный, см^{-1}	Денатурированный, см^{-1}	Отнесение колебаний	Тип колебаний	Полипептиды, $(^{\circ})$, см^{-1}	Боковой радикал полипептида
470 422	— —	Плоское деформационное колебание $\text{C}=\text{O}$ -группы с изгибом связей $\text{C}_{\alpha}-\text{C}_{\beta}-\text{C}_{\gamma}$	— E — — —	— 425 453, 434 471, 455, 434 472, 455	— CH_3 — CH_2-CH_3 — $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ — $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ — $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ CH_3
376	—	Характерное деформационное колебание спирального остова	ν_{E}^{15} E — — —	371 390 376 390 396	— CH_3 — CH_2-CH_3 — $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ — $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ — $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ CH_3
324	328	Деформационное колебание боковой цепи с изгибом связи $\text{C}_{\alpha}-\text{C}_{\beta}$ боковой цепи	ν_{E}^{16} E — — —	324 334, 324 — 323 323	— CH_3 — CH_2-CH_3 — $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ — $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ — $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ CH_3

неизвестно и о возможном проявлении в этой области колебаний аминокислотных остатков. Ввиду этого объяснение спектра денатурированного Мб затруднительно, особенно в области ниже 280 см^{-1} . Существенные изменения, происходящие с полосами около 470 , 422 и 324 см^{-1} , свидетельствуют не только об изменении вторичной структуры полипептидной цепи, но, что важнее отметить, кроме этого независимым образом отражают изменения в конформационном состоянии боковых цепей (табл. 1). Поглощение в диапазоне $280-120 \text{ см}^{-1}$, по-видимому, включает в себя полосы деформационных колебаний боковых цепей с ионизированными группами, а также неплоских колебаний колец гистидина $(^6)$. Сильное изменение спектра в этой области при щелочной денатурации возможно обусловлено деионизацией основных групп некоторых остатков.

Таким образом, проведенные измерения и анализ спектров миоглобина в нативном и денатурированном состояниях подтверждают большую конформационную чувствительность области скелетных колебаний и возможность получения соответствующей информации непосредственно для таких сложных молекул, как глобулярные белки. Следует отметить, что ценность низкочастотной области спектра заключается не в определении общего количества различных типов регулярных структур, хотя качественно это также можно сделать, а, по-видимому, в возможности изучения более тонких деталей структуры в целом и ее отдельных участков $(^7)$.

Авторы выражают благодарность Л. С. Решетниковой за предоставленные препараты миоглобина.

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
4 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. D. Gupta, S. Trevino, H. Boutin, J. Chem. Phys., 48, 3008 (1963).
- ² R. C. Lord, N. Yu, J. Mol. Biol., 50, 509 (1970); 51, 203 (1970).
- ³ T. Miyazawa, K. Fukushima et al., In: Conformation of Biopolymers, 2, London, 1967, p. 557.
- ⁴ K. Itoh, T. Shimanouchi, Biopolymers, 7, 649 (1969); 9, 383 (1970).
- ⁵ K. A. Harper, R. A. Bradshaw et al., J. Biol. Chem., 243, 683 (1968).
- ⁶ T. Shimanouchi, I. Harada, J. Chem. Phys., 41, 2651 (1964).
- ⁷ Ю. Н. Чиргадзе, Биофизика, 14, 792 (1969).