

ENZYMES – BIOLOGICAL CATALYSTS: BASIC PRINCIPLES OF ACTION

N. L. KLYACHKO

Basic principles of catalysis and peculiarities of enzymes as catalysts are discussed. There are multi-point interactions between enzyme and substrate leading to the proper orientation and proximity of the reactive groups around the active center; transfer of the reaction to the intramolecular level; enhancement of the reactivity of the reaction transient state.

Обсуждены общие принципы катализа и особенности действия ферментов как катализаторов: многоточечное взаимодействие с субстратом, приводящее к сближению и правильной ориентации в активном центре реагирующих групп; перевод реакции во внутримолекулярный режим; повышение реакционной способности групп, участвующих в катализе; стабилизация переходного состояния реакции.

ФЕРМЕНТЫ – БИОЛОГИЧЕСКИЕ КАТАЛИЗАТОРЫ: ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ДЕЙСТВИЯ

Н. Л. КЛЯЧКО

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Ферменты – особые белки, которые действуют как катализаторы в биологических системах. К настоящему времени найдена лишь одна ферментативная реакция небелковой природы, когда молекула РНК катализирует свое собственное разрезание на части. В природном окружении многие ферменты функционируют в живых клетках, где одновременно протекает множество взаимосвязанных процессов. Они могут быть выделены из клеток и очищены. Именно это обстоятельство явилось важной вехой в понимании кинетических особенностей и механизмов действия многих ферментов. Ферменты – уникальные катализаторы, обладающие непревзойденной эффективностью действия (каталитической активностью) и высокой селективностью. Пример эффективности протекания реакции разложения перекиси водорода приведен в табл. 1.

Таблица 1. Энергия активации (E_a) и относительная скорость реакции: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ при отсутствии и в присутствии различных катализаторов

Катализатор	E_a , кДж/моль	Относительная скорость реакции при 300 К
Без катализатора	70	1
Pt (гетерогенный)	45	$2 \cdot 10^3$
Ионы железа (гомогенный)	42	$8 \cdot 10^3$
Каталаза (фермент)	7	$9 \cdot 10^{10}$

В настоящее время известно более 2000 ферментов, многие из которых катализируют одну реакцию, то есть превращение одного особого субстрата (субстраты – это реагенты в катализируемой ферментом реакции, претерпевающие превращение) в определенный продукт. Несмотря на колоссальное многообразие как катализируемых ферментами реакций, так и на непохожие по структуре сами ферменты, можно выделить общие их черты и принципы действия.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ. ЧТО ДЕЛАЕТ КАТАЛИЗАТОР?

Для того чтобы прошла химическая реакция, нужно, чтобы молекулы столкнулись. Из кинетической

энергии таких столкновений можно почерпнуть энергию, необходимую для того, чтобы разорвать или ослабить химические связи в молекулах реагентов. В результате теплового движения за 1 с происходит триллионы столкновений молекул, лишь редкие из которых приводят к химическому превращению. То есть реагируют только те молекулы, которые в момент столкновения обладают достаточной суммарной энергией. Эта энергия, называемая энергией активации (E_a), характеризует ту минимальную энергию, которой должна обладать молекула (или молекулы), чтобы вступить в химическую реакцию. Графически эта величина соответствует величине барьера (образованию переходного состояния), который необходимо преодолеть для осуществления химической реакции (соответствует разности уровней энергий Гиббса переходного и исходного состояний) (рис. 1). В результате многие даже термодинамически разрешенные (выгодные) реакции практически не идут из-за слишком высокой энергии активации.

Вспомним реакцию окисления аммиака, который способен гореть в чистом кислороде (с огромным трудом на воздухе) с образованием азота и паров воды. Реакция идет только при высокой температу-

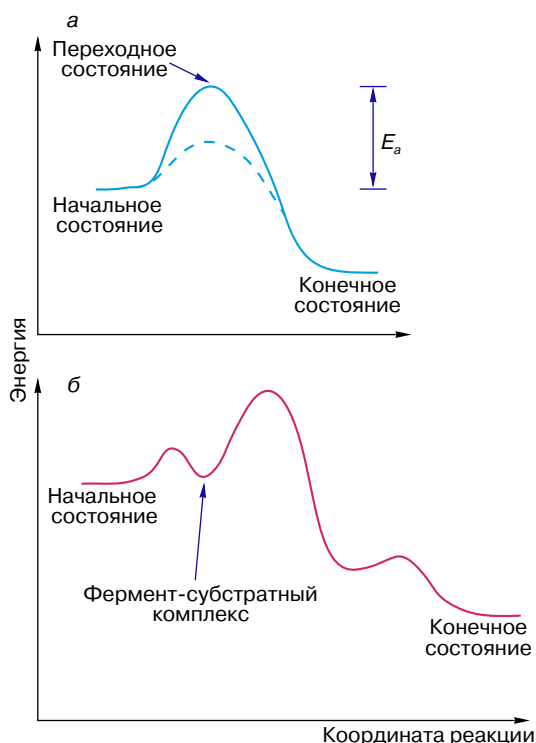


Рис. 1. Схематическое представление изменения свободной энергии в ходе химической реакции. Катализатор уменьшает энергию активации – понижает барьер свободной энергии: а – пунктирная линия; б – фермент разбивает высокий барьер на несколько более мелких

ре. Добавление же порошка оксида хрома (Cr_2O_3) приводит к “огненному дождю” из этих частиц. Идет реакция (экзотермическая, то есть с выделением теплоты), продукты которой содержат NO и воду. Оксид хрома, являющийся в реакции катализатором, не изменяется, но направляет реакцию по энергетически более выгодному пути с меньшей энергией активации (см. рис. 1), при более низкой температуре в данном случае.

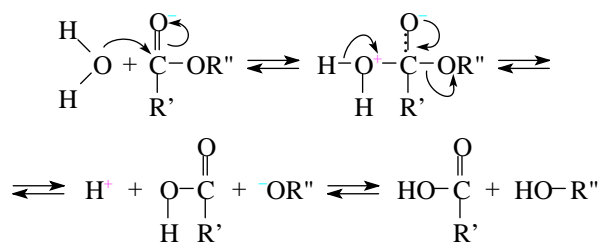
Важно отметить, что катализатор не расходуется и не изменяет разности свободных энергий начального и конечного состояний реакции, то есть не влияет на общие термодинамические характеристики реакции, в частности не смещает ее равновесие (изменяя лишь время выхода в равновесное состояние). Действие катализатора заключается в понижении энергии активации и означает, что большая доля сталкивающихся молекул будет обладать достаточной энергией для преодоления барьера свободной энергии переходного состояния и протекания реакции.

За счет чего катализатор может понижать барьер свободной энергии (или свободную энергию переходного состояния)? Он может взаимодействовать с реагентами, давая принципиально иное переходное состояние или просто более стабильное (и, следовательно, с более низкой свободной энергией), чем образуемое в некаталитической реакции.

Рассмотрим некоторые основные механизмы катализа. Все они могут быть обнаружены при изучении действия ферментов как катализаторов. Пример – реакция гидролиза сложного эфира:



Эта реакция включает нуклеофильную атаку свободной парой электронов кислорода воды по углеродному остатку карбонила (имеет частичный положительный заряд δ^+ в результате оттягивания электронной плотности на кислородный атом), образование переходного состояния и далее продуктов реакции. Основные стадии реакции при нейтральных pH выглядят следующим образом:

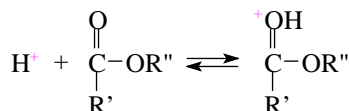


Как видно из представленной схемы, в образующемся переходном состоянии атакующая молекула воды приобретает положительный заряд, а кислород карбонильной группы – отрицательный. Такое переходное состояние крайне невыгодно, то есть его образование требует высокой энергии активации. Это, в свою очередь, означает, что скорость реакции будет очень мала.

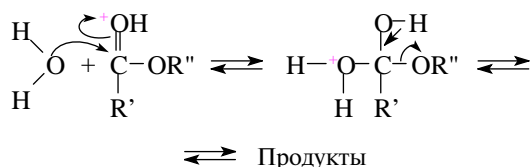
Использование катализатора в данном случае может существенно помочь процессу. Каким образом?

1. Кислотно-основный катализ (под действием H⁺ или OH⁻);

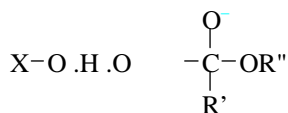
а) кислоты могут временно давать протон молекуле эфира:



Протонированная форма эфира (более реакционноспособная) затем атакуется молекулой воды аналогично схеме без катализатора с той лишь разницей, что переходное состояние двухзарядное (более стабильное, чем предыдущее), следовательно, для такой реакции требуется меньшая энергия активации:



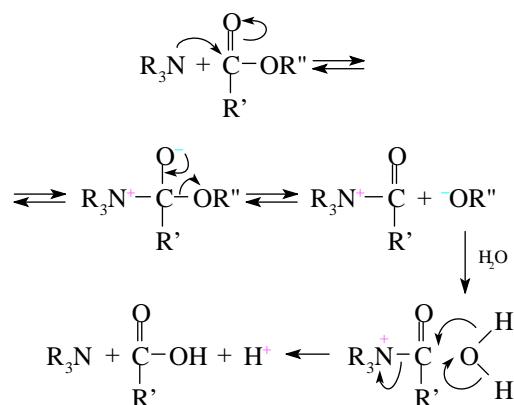
б) основания (XO⁻) могут временно акцептировать протон (H⁺), помогая стабилизировать двухзарядное переходное состояние, например таким образом:



2. Электростатический катализ. Переходное состояние можно стабилизировать электрическим полем иона, например положительно заряженный карбоний-ион (переходное состояние в случае катализа ферментом – лизоцимом) стабилизируется электрическим полем отрицательно заряженной карбоксильной группы остатка аспарагиновой кислоты. Конечно, энергия электростатического взаимодействия двух точечных зарядов зависит от свойств среды (диэлектрической постоянной), в которой это взаимодействие происходит. В водной среде это взаимодействие слабое, однако в органических растворителях, а также в активных центрах ферментов оно может вносить существенный вклад.

3. Ковалентный катализ (электрофильный или нуклеофильный). Роль ионов меди в предыдущем примере, помогающих оттянуть электроны из реакционного центра, можно обсуждать как форму электрофильного катализа.

Катализатор нуклеофильной природы, например третичный амин, имеющий неподеленную пару электронов на атоме азота, казалось бы, ничем не отличается от исходного реагента некаталитической реакции (1), в данном случае молекулы воды:

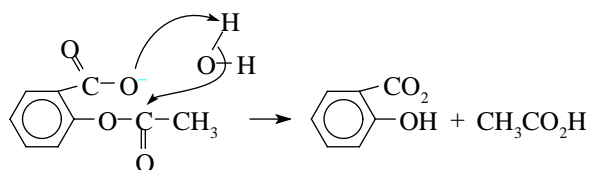


Более того, в этом случае мы видим и двухзарядное переходное состояние. Тем не менее реакция в присутствии катализатора идет, а при отсутствии его практически нет. Причина в том, что катализатор имеет более сильно выраженный нуклеофильный характер, чем атакуемая группа (а следовательно, действует быстрее), а промежуточное соединение более реакционноспособное, чем исходное. Эффект повышения нуклеофильной способности тех или иных групп весьма ярко проявляется в ферментативном катализе. Более того, фермент может одновременно использовать несколько различных механизмов катализа, повышая эффективность химической реакции.

Действие ферментов, как и других катализаторов, как уже сказано выше, заключается в понижении свободной энергии активации реакции. Однако картина протекания реакции в присутствии фермента (профиль изменения свободной энергии) выглядит сложнее, чем для обычных катализаторов (см. рис. 1, б).

Огромную роль в катализе ферментами играет то, что, собственно, происходит до начала химической реакции, а именно образование так называемого фермент-субстратного комплекса (первый локальный минимум на рис. 1, б). Почему? Дело в том, что в этом случае реагирующие частицы оказываются сближенными и сориентированными до начала собственно химической реакции. Высокий барьер свободной энергии разбивается на несколько меньших, первый из которых, показанный на рис. 1, б, характеризует неизбежные энергетические потери при сближении и ориентации молекул, связанные с затормаживанием их поступательного и вращательного движений. То есть в ферментативном катализе осуществляется перевод реакции во внутримолекулярный режим. Что дает такой перевод, отражает приведенный в качестве примера гидролиз аспирина.

4. Внутримолекулярный катализ. Гидролиз эфирной связи в случае аспирина ускоряется за счет внутримолекулярного общесосновного катализа:



Оказывается, что простой перевод реакции гидролиза эфирной связи во внутримолекулярный режим приводит к увеличению ее скорости в 100 раз. Как и за счет чего осуществляется такой перевод в ферментах?

Ферменты, как и все белки, строятся из аминокислот, в пространстве они организованы (свернуты) особым образом (третичная и четвертичная структуры белка) (см. статью Н.К. Наградовой “Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белков”: Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 7). Высокая каталитическая активность ферментов обеспечивается функционированием специального участка – сложноорганизованного активного центра, в состав которого входят аминокислотные остатки, часто весьма удаленные друг от друга в первичной полипептидной последовательности. Так, в

состав активного центра одного из представителей сериновых протеаз (ферменты, участвующие в гидролизе белков, расщепляющие пептидную связь, и других соединений, играющие важную роль в переваривании пищи) – химотрипсина наряду с собственно катализатором – серином-195 (Ser-195)¹ входят остатки гистидина-57 (His-57) и аспарагиновой кислоты-102 (Asp-102). Более того, в состав активных центров многих ферментов входят и непосредственно участвуют в катализе ионы металлов, как, например, ион цинка в молекуле карбоангидразы (фермент, катализирующий реакцию гидратации двуокиси углерода и дегидратации бикарбоната) или ион железа в уже упоминавшейся каталазе. Причем в последнем случае ион железа находится в составе сложного органического соединения – гема, прочно связанного с белком. Схематическое изображение некоторых групп, входящих в состав активных центров ферментов, приведено на рис. 2, 3.

¹ Номера, стоящие после обозначения аминокислоты, указывают положение этой аминокислоты в полипептидной цепи.

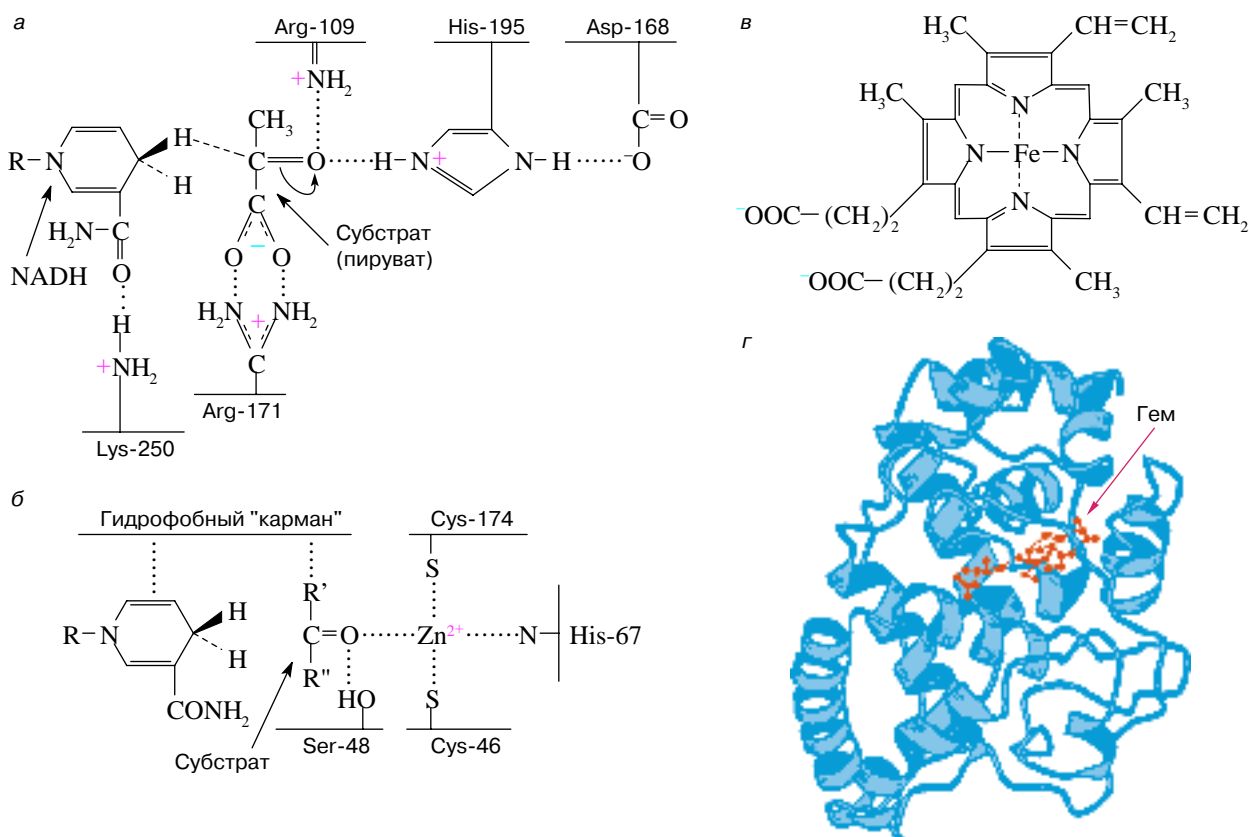


Рис. 2. Активный центр фермента может организовываться из аминокислотных остатков полипептидной цепи – лактатдегидрогеназа (а) или содержать ионы металлов – алкогольдегидрогеназа (б) или ионы металлов в составе сложных органических молекул – гем (в). Гем в состоянии белковой молекулы (г)

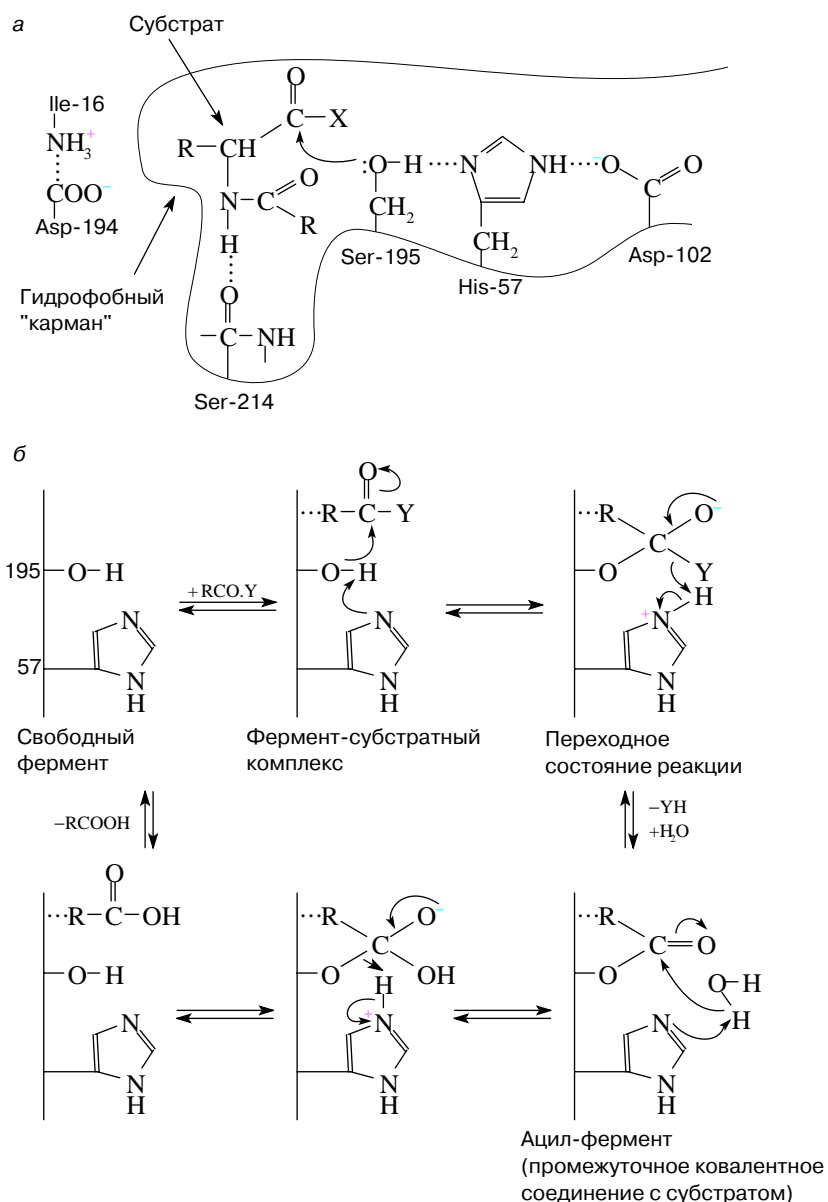


Рис. 3. Схема строения активного центра химотрипсина (а) и механизм катализируемой им реакции (б)

Выше мы выяснили, что для успешного нуклеофильного катализа необходимо, чтобы катализатор был сильным нуклеофилом, по крайней мере более сильным, чем исходный реагент. В то же время химические группы, формирующие активный центр фермента, сами по себе, как правило, являются слабыми катализаторами соответствующих реакций. Например, в уже упоминавшихся сериновых протеазах эффективная атака амидной связи происходит под действием слабонуклеофильной алифатической гидроксильной группы. Другой пример – карбоксильная группа, находящаяся в активном центре лизоцима (фермент, катализирующий гидролиз

мукополисахаридов, являющихся основным компонентом клеточной стенки некоторых бактерий) и участвующая в расщеплении простой эфирной связи углеводов. И тем не менее ферментативный катализ по своей эффективности превосходит все известные катализаторы. Почему? Пример того, как это, по-видимому, происходит в молекуле химотрипсина, приведен на рис. 3. Остатки Ser-195, His-57 и Asp-102, оказавшиеся рядом в активном центре фермента, принимают в этом участие. Субстрат связывается с соответствующими группами активного центра так, что соответствующий углеродный атом оказывается в положении, удобном для атаки катализатора

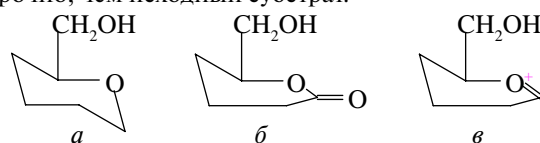
(Ser-195). Повышение нуклеофильности серина происходит при помощи гистидина (основной катализатор), оттягивающего на себя протон. Образующийся на имидазоле гистидина положительный заряд стабилизируется отрицательным зарядом карбоксильной группы аспарагиновой кислоты, действующей как электростатический катализатор. Отрицательный заряд тетраэдрического промежуточного комплекса стабилизируется водородными связями с Gly-193 и Ser-195. His-57 действует затем уже как кислотный катализатор, облегчая выделение первого продукта и т.д. Таким образом, действие фермента представляет собой хорошо отлаженную в пространстве и времени систему.

Как уже отмечалось, перевод реакции во внутримолекулярный режим приводит к ее ускорению. Почему образование нековалентного фермент-субстратного комплекса столь эффективно? Дело в том, что различные участки молекулы субстрата оказываются связанными с группами активного центра фермента пусть слабыми, но многочисленными взаимодействиями. Это и водородные связи, и гидрофобные, и ионные взаимодействия, и очень слабые ван-дер-ваальсовы силы. Рис. 2 и 3 демонстрируют примеры расположения субстратов в активных центрах различных ферментов. Это, например, гидрофобное взаимодействие бокового радикала R (Phe, Tug или Trp) в молекуле субстрата химотрипсина, который попадает в специальный гидрофобный “карман” молекулы фермента, уходя таким образом от невыгодного контакта с водой, приводящего к понижению энтропии за счет структурирования молекул воды вокруг гидрофобного радикала, а также образование водородной связи между остатком Ser-214 и N-ацильной частью субстрата. В результате такого многоточечного взаимодействия фермента с субстратом и происходят правильная ориентация и сближение реагирующих групп в активном центре и перевод реакции во внутримолекулярный режим до начала протекания химической реакции и образования переходного состояния. А следовательно, не будет энтропийных потерь, связанных с “наведением порядка” в переходном состоянии для некаталитической реакции (фиксация реагирующих групп).

Следует отметить также, что фермент, и в частности его активный центр, — это не некое застывшее образование. В ходе взаимодействия с субстратом и химической реакции в молекуле фермента могут происходить структурные (конформационные) изменения, которые удаётся в некоторых случаях зафиксировать и которые свидетельствуют о некоем “настраивании” активного центра. Так, например, ион железа гема в молекуле “отдыхающей” каталазы находится под плоскостью порфиринового кольца. Взаимодействие с перекисью водорода приводит к перемещению железа в плоскость гема на расстояние 0,7 Å. Другим примером является молекула лактатдегидрогеназы (фермент, катализирующий реакцию окисления лактата в пируват или реакцию

восстановления пирувата в лактат), для которой зафиксировано перемещение в пространстве куска аминокислотной последовательности белка, состоящего из значительного числа остатков (наблюдающееся при связывании субстрата и приводящее к появлению взаимодействий групп активного центра фермента, удаленных в свободном ферменте).

Аналогичные изменения могут происходить и в молекуле субстрата, направленные на то, чтобы способствовать образованию переходного состояния. Стабилизация же переходного состояния — это движущая сила реакции. Таким образом, взаимодействие между ферментом и переходным состоянием должно быть сильнее, чем взаимодействие между ферментом и субстратом. Весьма сложно измерить и сравнить эти величины. Однако в случае лизоцима удалось синтезировать вещество, являющееся стабильным аналогом предполагаемого переходного состояния в реакции гидролиза гликозидной связи. Так, ключевая часть молекулы субстрата представляет собой пиранозное кольцо в конформации кресла (а). Предполагается, что в переходном состоянии образуется карбоний-ион, изменяющий конформацию пиранозного кольца на полукресло или софу (в). Был синтезирован лактон (б) — аналог переходного состояния, который, как оказалось, способен связываться с ферментом в 100 раз более прочно, чем исходный субстрат.



Таким образом, общие принципы катализа применимы и к действию ферментов. Однако различные факторы, способствующие протеканию реакции, в ферментативном катализе действуют согласованно, а во многих случаях являются суммарным результатом ряда причин. Важнейшие из них: 1) многоточечное взаимодействие с субстратом, приводящее к сближению и правильной ориентации реагирующих групп; 2) перевод реакции во внутримолекулярный режим; 3) стабилизация переходного состояния реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1–3.
2. Ферит Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. 432 с.

* * *

Наталья Львовна Клячко, доктор химических наук, профессор химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов — энзимология. Занимается вопросами регуляции структуры и функции ферментов в системах, моделирующих природное окружение биокатализаторов. Автор более 100 научных работ и учебного пособия.