



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.152.321*6.02

© 1992 г. П. В. Безукладников, Л. А. Елякова,
А. К. МазурЯВЛЕНИЕ МНОГОКРАТНОЙ АТАКИ В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ
ЭНДОГЛЮКАНАЗ*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток*

Обзор посвящен явлению неоднократных каталитических актов, происходящих за время одного фермент-субстратного взаимодействия между некоторыми эндоглюканазами и водорастворимыми полисахаридами.

Содержание

1. Гидролиз гомополисахаридов
2. Гидролиз олигосахаридов и низкомолекулярных полисахаридов
3. Использование трансгликозилирующих свойств ферментов для изучения многократной атаки
4. Достоверна ли интерпретация экспериментальных данных по многократной атаке?
5. Представления о механизме многократной атаки на субмолекулярном уровне

Введение

В теоретической и прикладной энзимологии всегда был велик интерес к реакциям ферментативной деградации полимерных природных материалов: ДНК, белков, полисахаридов и т. д. Полимерные субстраты (в отличие от мономерных, в которых фермент обычно способен катализировать лишь одно превращение) могут расщепляться эндодеполимеразами (ферментами, катализирующими деградацию внутренних межмономерных связей) различным образом. Продукты, образующиеся в результате начальной атаки полимера, способны быть субстратами для последующего действия фермента, что порождает возможность существования различных механизмов деградации, значительно усложняет картину реакции и кинетическое описание процесса.

Пожалуй, наиболее интригующим среди возможных способов деградации является многократная (по-английски *multiple*) атака, когда фермент, осуществив катализ первоначального разрыва связи в субстрате, остается в комплексе с одним из образовавшихся фрагментов субстрата и, перемещаясь тем или иным образом вдоль полимерной цепи, катализирует расщепление еще нескольких связей в той же молекуле субстрата. В русско-

Сокращения: РРА - α -амилаза поджелудочной железы свиньи, ТАА - α -амилаза из *A. oryzae* (Така-амилаза А).

язычной литературе термин «multiple attack» часто переводили как «множественная атака», что, на наш взгляд, менее точно. В остальном в данной работе мы пользуемся терминологией, впервые введенной в известном обзоре Хорлина [1].

Молекулярный механизм многократной атаки вызывает значительный интерес также и в связи с возможным его сходством с процессами миграции матричных ферментов вдоль молекул нуклеиновых кислот [2], взаимодействия *lac*-репрессора с ДНК [3], поиска специфических мест на ДНК рестрикционными нуклеазами [4], действия маннуронозой С-5-эпи-меразы на альгинаты [5] и др.

Следует отметить существенное смысловое различие между понятием многократной (повторной) атаки (multiple или repetitive attack) ферментами водорастворимых полисахаридов [6, 7] и понятием «эндофермента упорядоченного действия», расщепляющего нерастворимые биополимеры [8]. При ферментативной деградации нерастворимых субстратов важную роль играют макрокинетические эффекты, в частности неспецифическая сорбция. Для некоторых целлюлаз, более или менее упорядоченно катализирующих деструкцию кристаллической целлюлозы, т. е. образующих значительные количества низкомолекулярных продуктов, показано наличие доменного строения, причем на одном из доменов находится активный центр, а другой домен способен сорбироваться на нерастворимой целлюлозе [9, 10]. Это, по-видимому, не позволяет ферменту и субстрату далеко разойтись в растворе и может приводить к последовательной атаке связей, расположенных недалеко друг от друга. В растворе же повторные атаки могут происходить только вследствие микроскопических эффектов, т. е. каких-то специфических взаимодействий в активных центрах ферментов, хотя, конечно, нельзя исключать возможности сочетания обоих механизмов при расщеплении нерастворимых субстратов.

До настоящего времени среди большинства исследователей ферментативного гидролиза углеводов отсутствует не только сколь-нибудь детальное представление о механизме многократной атаки растворимых субстратов на субмолекулярном уровне, но и согласие относительно распространенности этого явления среди эндоглюканаз [8, 11–14]. В настоящем обзоре мы попытались суммировать основные, на наш взгляд, экспериментальные наблюдения и теоретические представления в данной области, заметно расширенные в последние годы.

1. Гидролиз гомополисахаридов

В отличие от природных субстратов нуклеаз и протеиназ среди субстратов карбогидраз имеются полимеры, содержащие только один тип мономерных остатков, соединенных одинаковыми О-гликозидными связями. Это гомополисахариды.

Вкратце современные представления о ходе деградации линейных гомополисахаридов состоят в следующем. В большей части продуктивных фермент-субстратных комплексов из-за гораздо меньших размеров активного центра в сравнении с размерами субстрата весь активный центр фермента заполнен субстратом. Атака всех связей такого субстрата равновероятна, за исключением, быть может, нескольких связей, расположенных вблизи от концов цепей. В случае деполимеризации высокомолекулярных субстратов влияние концевых связей невелико, поэтому характер первоначального расщепления каждой цепи близок к случайному. В процессе деградации субстрата доля концевых связей возрастает. Как следствие, среди продуктивных фермент-субстратных комплексов возрастает количество таких, в которых часть активного центра фермента не занята

мономерными остатками субстрата. В результате индивидуальные особенности строения участка связывания на ферменте будут все больше сказываться на протекании реакции и некоторые связи при этом будут расщепляться преимущественно.

Данные представления отвечают механизму так называемой предпочтительной или преимущественной (preferred) атаки [15, 16].

Модель многократной атаки впервые появилась в литературе в связи с исследованиями β -амилаз — ферментов экзо-действия еще в 40-х годах [17, 18]; довольно быстро она нашла экспериментальное подтверждение и стала общепринятой для экзоферментов [16, 19]. Эта же идея была позднее перенесена Робитом и Френчем [6, 7, 20] на эндоферменты для объяснения большого выхода низкомолекулярных олигомеров (преимущественно димера — мальтозы) на начальных стадиях гидролиза некоторыми α -амилазами амилозы (α -1,4-глюкана) со средней степенью полимеризации DP 1000.

После первоначального разрыва одной из связей полимера, который может происходить по механизму предпочтительной атаки, агликоновый фрагмент субстрата отщепляется от фермент-субстратного комплекса, а оставшийся связанным с ферментом гликоновый фрагмент, содержащий карбоний-ион на конце, после атаки водой или другим акцептором гликозильного остатка способен, не переходя в раствор, каким-то образом переместиться в активном центре. Если в результате такой подвижки (скольжения — sliding) вновь образуется продуктивный фермент-субстратный комплекс, то может расщепиться еще одна связь и становится вероятным повторение процесса гидролиза. Поскольку при этом каждая следующая атакуемая связь располагается ближе к невозстанавливающему концу исходного субстрата, говорят о направлении многократной атаки к этому концу.

Одна из изученных амилаз — α -амилаза из поджелудочной железы свиньи (далее везде PPA — от англ. porcine pancreatic α -amylase) оказалась способной катализировать до четырех повторных атак на амилозу при pH < 7. При pH > 10 способность к многократной атаке у PPA исчезала [6], хотя частоты расщепления связей в октасахаридах у PPA одинаковы при pH 6,9 и 10,5 [7]. У других α -амилаз было обнаружено гораздо меньшее число повторных атак.

Направленность многократной атаки к невозстанавливающему концу субстрата экспериментально доказана для PPA [7]. Этот механизм с «задержкой» гликонового фрагмента субстрата в активном центре фермента согласуется с известной способностью эндогликаназ к трансгликозилированию (переносу гликонового фрагмента на гидроксильные группы акцептора, отличного от воды) [21–23].

Теоретический анализ, проведенный Тома [24], показал, что различить экспериментально предпочтительную атаку (в том числе вторичную атаку на диссоциировавшие продукты реакции), многократную (повторную) атаку, действие смеси изоформ фермента и другие гипотетические способы деградации очень сложно, так как прямых тестов на каждый механизм не существует. Например, механизм предпочтительной атаки на основе подцентровой модели активного центра фермента сам по себе может порождать смеси продуктов весьма разнообразного состава [8, 25]. Поэтому качественная задача — выявление многократной атаки — в действительности оборачивается задачей количественной; необходимо оценить кратность атаки, т. е. количество повторных разрывов связей в субстрате без диссоциации фермент-субстратного комплекса, приходящихся на один первоначальный разрыв, в условиях, когда вторичная атака на присутствующие в растворе продукты деградации дает малый вклад в распределение продуктов. Для решения этой задачи предложен ряд эксперименталь-

ных методов [6, 7, 26] и несколько способов интерпретации данных [11, 13, 14].

Робит и Френч [6] фракционировали ферментативный гидролизат амилозы спиртом. В осадок выпадали продукты со степенью полимеризации более 20, образуя таким образом высокомолекулярную фракцию продуктов. Если в качестве субстрата взять амилозу с исходной степенью полимеризации DP_0 1000, то на начальной стадии деградации первый разрыв в цепи будет приходиться в основном на внутренние связи субстрата, а образования низкомолекулярных олигосахаридов можно ожидать главным образом за счет повторных атак. Обозначая RV_i — увеличение общей восстанавливающей способности (сокращение от англ. reducing value), эквивалентное увеличению количества молекул во всей смеси, RV_p — возрастание восстанавливающей способности осадка, r — отношение этих величин, а θ — степень кратности атаки, можно записать

$$r = RV_i / RV_p = RV_p (1 + \theta) / RV_p = 1 + \theta. \quad (1)$$

В первом приближении можно считать [6], что молекулы в осадке примерно соответствуют полимерной фракции, а олигосахариды, присутствующие в супернатанте, образуются за счет многократной атаки, т. е. число молекул в надосадочной жидкости эквивалентно $RV_p \cdot \theta$. Очевидно, что в процессе деградации величина r будет возрастать, так как все большая часть продуктов начальных атак будет оставаться в супернатанте. Таким образом, измеряемая степень повторной атаки может быть завышена, причем точность определения θ сильно зависит как от состава исходного полисахарида, так и от достигнутой глубины реакции [14].

В работах [11, 13, 14] было показано, что величину θ следует определять экстраполяцией экспериментальных зависимостей r к нулевой степени расщепления. Однако конкретный вид формул, описывающих эти зависимости, настолько различался, что авторы работ [13] и [11] пришли к прямо противоположным выводам. Вначале Тома [13] резюмировал, что многократная атака в той или иной степени присуща большинству эндогликоказ и что ее отсутствие следует рассматривать как исключение. Напротив, Бэнкс и Гринвуд [11] пришли к выводу, что многократная атака среди протестированных к тому времени α -амилаз встречается только у панкреатических ферментов млекопитающих, а у амилаз из других источников она отсутствует. При этом в обеих работах использовались довольно сложные математические выкладки и были высказаны не всегда очевидные предположения.

При наиболее вероятном распределении отношение

$$R = DP_w / DP_n \approx 2,$$

где DP_w — средневесовая степень полимеризации, а DP_n — среднечисленная. Величина DP_w гораздо менее чувствительна к увеличению количества коротких цепей, чем DP_n , и можно ожидать, что, в то время как при ферментативном расщеплении, происходящем случайным образом, молекулярно-весовое распределение амилозы все время остается наиболее вероятным и отношение R не должно меняться с ростом глубины реакции, при наличии многократной атаки величина R будет возрастать.

В работе [26] DP_w определяли по изменению вязкости раствора, предварительно выяснив зависимость вязкости от DP_w с помощью метода светорассеяния. DP_n можно измерить, исходя из количества концевых (восстанавливающих) остатков в смеси. Эти эксперименты свидетельствовали о заметной степени повторной атаки у некоторых амилаз, особенно у РРА, однако интерпретация данных здесь сталкивается с теми же проблемами.

Образование олигомеров вследствие предпочтительной атаки связей вблизи от концов цепей, обусловленной особенностями энергетики связывания в активном центре, сказывается на величине отношения R так же, как многократная атака, причем разграничить эти влияния весьма затруднительно.

Качественный аналог этого метода — широко применяемая в изучении амилаз зависимость так называемого иодного окрашивания (blue value) от восстанавливающей активности реакционной смеси [6, 12, 26, 27]. Основой метода является специфическое свойство высокомолекулярной амилозы образовывать окрашенные комплексы с иодом, причем эта способность резко уменьшается при переходе к низкомолекулярным мальтодекстринам. α -Амилаза, действующая по механизму многократной атаки, при равном возрастании восстанавливающей способности гораздо меньше снижает иодное окрашивание, чем другие амилазы. Этот простой качественный тест наиболее широко описан [6, 12, 26, 27, 28], однако его пока не удалось интерпретировать количественно, поскольку неизвестна конкретная зависимость величины окрашивания от длины цепи.

Японскими авторами было предложено вместо иода использовать гидрофобный зонд — TNS (2-*на*-толуилнафталин-6-сульфонат), — который в отличие от иода дает зависящую от длины цепи флуоресценцию даже с мальтоолигосахаридами [29, 30]. Им удалось получить удовлетворительное совпадение экспериментальных данных с теоретической моделью многократной атаки [31, 32]. Эта модель, однако, включала компьютерное моделирование кинетических уравнений и несколько подгоночных параметров, что не позволяло считать полученное совпадение дискриминирующим тестом.

Разногласия между наиболее авторитетными учеными в данной области физико-химической энзимологии, возникшие при анализе совокупности результатов, полученных описанными методами, а также недостаточная ясность причин этих разногласий для широкой аудитории биохимиков из-за запутанности математической обработки данных внесли известную неопределенность в понимание самого предмета исследований. Это, по-видимому, и привело к резкому снижению числа работ по тестированию многократной атаки на полисахаридах [33, 34] и переносу центра тяжести в исследованиях на деградацию субстратов меньшего размера и изучение структуры ферментов.

Новый подход к интерпретации экспериментальных данных был развит лишь сравнительно недавно [14, 25, 35–37]. Было получено строгое теоретическое решение задачи о форме кривой молекулярно-вещного распределения продуктов, возникающих при ферментативной деполимеризации [38]. Оказалось, что распределение специфически зависит от энергетики связывания субстрата только для цепей, содержащих меньше мономерных остатков, чем может расположиться в активном центре фермента. Для более длинных цепей любая исходная кривая распределения стремится к экспоненциальной форме по мере деградации. Этот теоретический вывод был подтвержден экспериментально [39].

Именно с неточностью представлений о форме кривой молекулярно-вещного распределения продуктов были связаны разногласия в интерпретации экспериментальных данных по многократной атаке [11, 13]. Подробный анализ совокупности опубликованных результатов по действию α -амилаз на амилозу позволил получить теоретические зависимости при использовании всего двух параметров: кратности атак θ и средней степени полимеризации продуктов повторных атак n . Это дало возможность судить о справедливости теории по соответствию экспериментальных данных линейным анаморфозам теоретических кривых в подходящих координатах [14]. Оказалось, что во многих случаях совпадение теории с экспериментом

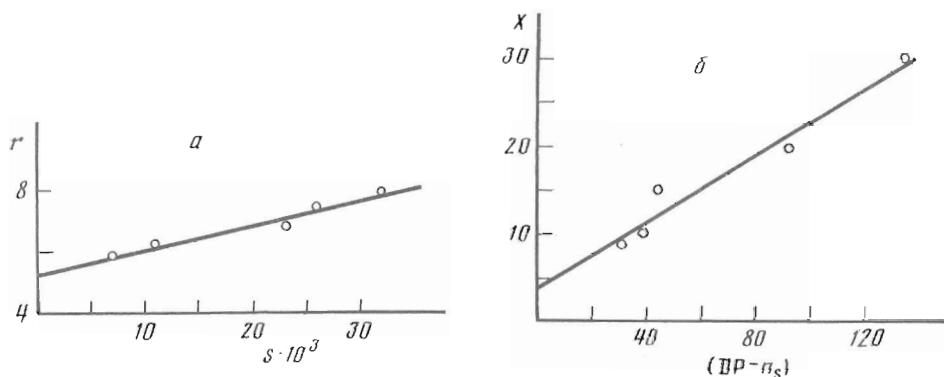


Рис. 1. Определение степени повторной атаки для PPA из экспериментальных данных по фракционированию продуктов расщепления высокомолекулярной амилозы [5] двумя различными способами [13]: а — используя отношение восстанавливающих активностей всего раствора и осадка (r) согласно уравнению (2); б — с помощью соотношения (3)

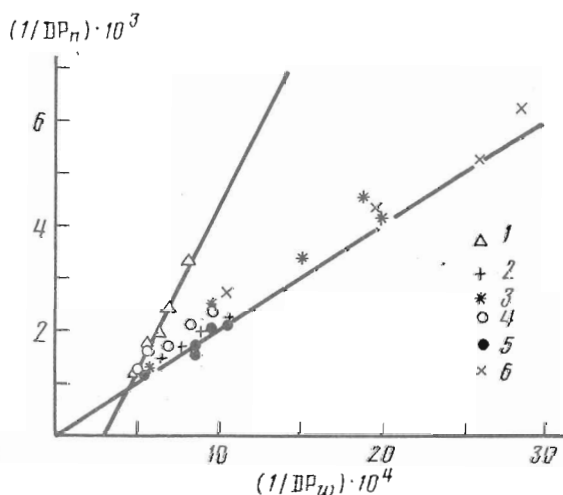


Рис. 2. Определение степени повторной атаки из экспериментальных данных по измерению DP_w и DP_n в ходе гидролиза амилозы α -амилазами PPA и *B. amyloliquefaciens* в воде (1, 2) и 40% глицерине (3, 4), а также α -амилазами из слюны человека (5) и молотой ржи (6) в 40% глицерине. Верхняя прямая проведена с помощью линейной регрессии по экспериментальным точкам для PPA. Нижняя прямая соответствует отсутствию повторных атак ($\theta=0$)

хорошее, причем описанные выше опыты с фракционированием продуктов и измерением отношения DP_w/DP_n дают сходные значения θ .

На рис. 1а, б приведены результаты обработки экспериментов Робита и Френча [6] для PPA двумя способами [14]. В первом случае для начальной стадии реакции, когда средняя степень полимеризации гидролизующей амилозы еще велика, теоретическая зависимость имеет вид

$$r \approx 1 + \theta + (n_s - l + 1)(1 + \theta)s, \quad (2)$$

где n_s — максимальная степень полимеризации продуктов, остающихся в растворе при фракционировании; $s = 1/(DP_p - n_s)$, где DP_p — средняя степень полимеризации осадка, измерявшаяся экспериментально [6]; l — величина, характеризующая длину области связывания белка, а параметры

r и θ определены выше в уравнении (1). Согласно уравнению (2), $r-1$ стремится к степени кратности атаки θ , когда s стремится к нулю, и наклон экстраполирующей прямой зависит от θ , что хорошо согласуется с экспериментальными данными [6, 14].

Для рис. 16 теоретическая прямая описывается формулой

$$X = \frac{G_0 \left(1 - \frac{s_0}{s}\right)}{RV_t} = \frac{1}{\theta + 1} DP_p + \frac{(l-1) + \theta \cdot n_r - n_s}{\theta + 1}, \quad (3)$$

где G_0 — общая концентрация остатков глюкозы в растворе, первоначально связанных в амилозе, $s_0 = 1/DP_0 = 10^{-3}$, а n_r — средняя степень полимеризации олигомерных продуктов повторных атак. Левая часть уравнения (3), для удобства обозначенная X , легко вычисляется из экспериментальных данных, а стоящая в правой части величина DP_p измерялась непосредственно [6]. В отличие от уравнения (2), соответствующего первоначальному способу оценки степени кратности атак Робитом и Френчем через отношение r и имеющего поэтому достаточно ясный смысл, уравнение (3) было выведено таким образом, чтобы получить линейное соотношение между экспериментально измеренными величинами без предположения о низкой степени гидролиза исходного субстрата [14]. Поэтому величина, стоящая в левой части, в данном случае не имеет очевидного физического смысла, зато линейность экспериментальных зависимостей, если она наблюдается, может служить дополнительным аргументом в пользу использованной теории [14] и, кроме того, позволяет оценить величину n_r из пересечений аппроксимирующих прямых с осями координат.

Как видно, линейность экспериментальных зависимостей на рис. 1а, б вполне удовлетворительна. В обоих случаях пересечение прямых с осями координат дает $\theta \approx 4$. Другие параметры, входящие в формулы (2) и (3) и определенные из этих графиков, имеют значения $l \approx 5,5$ и $n_r \approx 3,5$ [14], что находится в прекрасном соответствии с размером активного центра РРА, определенным картированием [40], и составом олигомеров, появляющихся на ранней стадии гидролиза амилозы [26].

На рис. 2 приведены результаты обработки экспериментальных данных по измерению DP_w и DP_n [26] в координатах, согласно теории дающих линейную зависимость [14]:

$$DP_n^{-1} = 2(\theta + 1) DP_w^{-1} - s_0 \theta.$$

Для РРА прямая, проведенная по методу наименьших квадратов, соответствует $\theta \approx 4$ [14]. Для других ферментов экспериментальные точки лежат вблизи прямой, соответствующей $\theta \approx 0$.

Таким образом, в настоящее время имеются достаточно широкие экспериментальные возможности для тестирования многократной атаки при ферментативном гидролизе высокомолекулярных растворимых гомополисахаридов. Следует иметь в виду, что, например, для β -1,4- и β -1,3-глюканаз (целлюлаз и ламинариаз) в природе не существует водорастворимых линейных субстратов со степенью полимеризации более 20–30. Для не очень высокомолекулярных субстратов трудно провести фракционирование так, чтобы величина n_s была постоянна в ходе реакции. С другой стороны, применение метода, связанного с оценкой отношения DP_w/DP_n , к субстратам с DP порядка нескольких десятков также затруднительно в связи с недостаточной чувствительностью обычных методов измерения вязкости и светорассеяния.

2. Гидролиз олигосахаридов и низкомолекулярных полисахаридов

В ряде работ [41—43] измерялась степень кратности атаки при гидролизе уникальных амилазных субстратов — циклодекстринов: циклогекса-, циклогепта- и циклооктаамилозы под действием панкреатических α -амилаз свиньи и человека и α -амилазы из *Aspergillus oryzae*. Основная трудность в этих работах — высокая вероятность вторичных атак на продукты начального каталитического акта, так как образующиеся линейные мальтоолигосахариды эффективнее расщепляются амилазами, чем исходные циклодекстрины. Во избежание появления ложного эффекта многократной атаки Френч с сотр. [42] добавляли в реакционную смесь примерно 60-кратный избыток (по каталитической активности в сравнении с α -амилазой) β -амилазы. Этот экзофермент не способен катализировать гидролиз циклодекстринов, а с невосстанавливающего конца линейных мальтоолигосахаридов отщепляет дисахарид — мальтозу.

При такой схеме опыта после начальной атаки γ -циклодекстрина α -амилазой образуется линейный октасахарид, который может далее гидролизываться либо, при наличии многократной атаки, самой α -амилазой (приводя к образованию глюкозы, мальтозы и мальтотриозы), либо, после диссоциации α -амилазы и линейного олигосахарид, добавленной в избытке β -амилазой (с образованием только мальтозы). Оказалось, что в продуктах гидролиза циклооктаамилозы под действием смеси цикло-либо панкреатической α -амилазы с β -амилазой помимо мальтозы содержатся также глюкоза и мальтотриоза [42]. На таком субстрате у РРА $\theta=2,8$, а у человеческой панкреатической α -амилазы $\theta=2,4$ при pH 6,9 [43]. Такая степень повторной атаки означает протекание реакции с данным субстратом практически по однопечечному механизму, когда за время одного фермент-субстратного взаимодействия происходит гидролиз всех доступных связей в олигосахариде. В то же время при гидролизе линейного октасахарид РРА повторно атакует лишь 27% молекул [7].

Столь значительная разница на идентичных по размеру субстратах может быть проиллюстрирована следующим образом (рис. 3). После начальной атаки циклодекстрина для повторной атаки доступен весь линейный октасахарид. Если же начальная атака осуществляется на линейный олигосахарид, то наблюдать значительную степень повторной атаки ($\theta > 1$) в принципе невозможно, поскольку значительная часть образующихся при начальной атаке гликоновых фрагментов субстрата вследствие недостаточных размеров не способна затем покрыть весь активный центр фермента, что необходимо для эффективной атаки. В результате диссоциация продуктов из активного центра более вероятна, чем катализ дополнительных разрывов связей в них.

Для определения вероятности повторной атаки у эндогликаназ широко применяется метод с использованием радиоактивно меченных субстратов, как правило, олигосахаридов [7, 44]. В основе метода лежит сравнение реального распределения продуктов ферментативной деградации и теоретического распределения, ожидаемого при диссоциации фермента и обоих продуктов реакции после первоначального каталитического акта. Это теоретическое распределение вычисляется из начальных мольных фракций продуктов, образующихся при ферментативной деградации олигосахаридов, меченных по восстанавливающему концу. При этом вероятность реакций трансгликозилирования и вторичных атак на продукты деградации, которые могут искажать распределение, должна быть малой.

Правомерность такого сравнения поставил под сомнение Клесов [8, с. 86]: «...каким образом при экспериментальном получении относительных частот расщепления связей при гидролизе мальтоолигосахаридов под действием α -амилазы удалось избежать множественной атаки (если

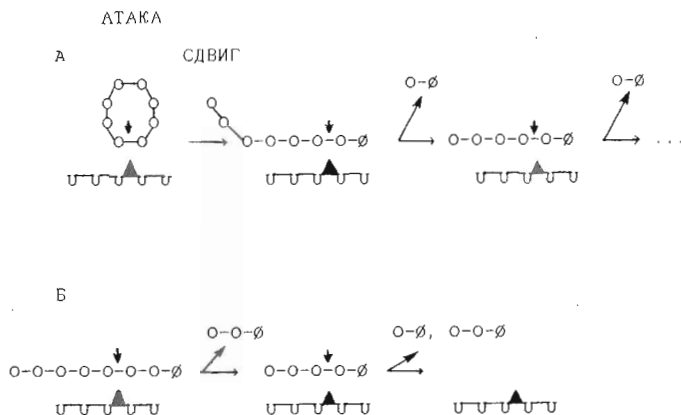


Рис. 3. Многократная атака РРА циклооктасахарида (А) и линейного октамера (Б). U — подцентры активного центра, ▲ — место расположения каталитических аминокислотных остатков (вертикальными стрелками указано место разрыва связи), O — глюкозные остатки, Ø — восстанавливающий остаток

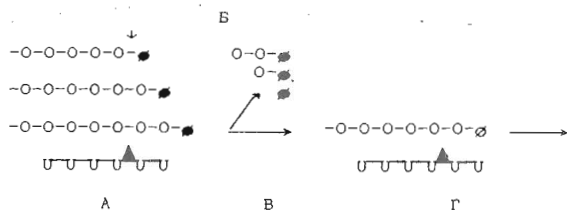


Рис. 4. Определение частот расщепления связей (начальных молярных фракций меченых продуктов) при направлении повторных атак к невосстанавливающему концу субстрата. Обозначения — как на рис. 3. ● — меченый восстанавливающий остаток. А — начальная атака различных позиционных изомеров; Б — диссоциация с отщеплением меченого агликонового фрагмента; В — сдвиг субстрата в активном центре фермента; Г — повторные атаки

она, как утверждают авторы *, имеет место), поскольку эти данные были впоследствии использованы для расчета степени множественной атаки...»

Ответ на этот вопрос иллюстрируется рис. 4. Если повторная атака направлена к невосстанавливающему концу субстрата, то она не влияет на частоты расщепления связей (равные начальным скоростям образования меченых продуктов), определяемые с использованием субстратов, меченных по восстанавливающему концу. Связано это с тем, что возникающий при первоначальном расщеплении агликоновый меченый фрагмент субстрата первым диссоциирует из активного центра и не подвергается многократной атаке. Сопоставляя эти частоты расщепления с частотами, полученными при гидролизе субстрата, либо меченого по невосстанавливающему концу [7], либо полностью меченого [44], можно оценить вероятность повторной атаки такого субстрата.

Органическим недостатком этого метода является принципиальная невозможность наблюдать большие степени повторной атаки. Высокая сравнительная точность метода обусловлена в основном осуществимостью полного хроматографического разделения всех продуктов гидролиза, что до-

* Имеются в виду авторы работы [44].

стижимо лишь при деградации олигосахаридов. При этом средняя степень повторной атаки очень мала вследствие небольшого количества связей в гликоновых фрагментах, образующихся при первоначальной атаке. В результате высокая точность практически компенсируется необходимостью измерять весьма малые вероятности повторных атак [8, 44]. Например, в работе [44] при изучении действия α -амилазы из *A. oryzae* (в литературе обычно именуемой Така-амилазой А (ТАА)) на мальтоолигосахариды были получены следующие величины (количество молекул олигосахарида, подвергшихся повторной атаке, в процентах): 1 для гидролиза тримера и тетрамера, 3 для пентамера, 5 для гекса- и гептамера, 11 для окта- и 12 для декамера. Для сравнения РРА повторно атакует 27% молекул октасахарида [7].

Избежать трудностей в анализе результатов опытов, связанных, с одной стороны, с полидисперсностью и склонностью к образованию надмолекулярных структур (агрегация, ретроградация амилозы) у высокомолекулярных субстратов, а с другой — с низкими степенями повторной атаки при гидролизе олигосахаридов, позволяют методы, развитые для изучения гидролиза низкомолекулярных полисахаридов [29, 31, 32, 45]. Из-за распространенности таких субстратов некоторые подходы могут применяться для изучения практически любых эндогликаназ [45].

Впервые для эндо- β -гликаназ путем сравнительного изучения эндо- β -1,3-глюканаз J_0 и J_{IV} из морских моллюсков *Chlamys albidus* и *Spisula sachalinensis* соответственно было показано, что J_{IV} катализирует гидролиз ламинарина (β -1,3-глюкана с DP 25) в оптимуме pH 5,2 по механизму многократной атаки со степенью кратности $\theta \approx 3$ [45].

Как и в работе Аллена и Тома [44], θ для J_{IV} была рассчитана из сравнения теоретического [46, 47] (в предположении отсутствия многократной атаки) и экспериментального распределения продуктов гидролиза радиоактивно меченного по восстанавливающему концу субстрата. Ранее Алленом был предложен метод, который позволяет получить частоты разрывов связей в олигомерном субстрате независимо от вторичной атаки ферментом перешедших в раствор первичных продуктов гидролиза, величины фона радиоактивности и общей радиоактивности пробы [48]. Однако даже для сравнительно низкомолекулярного полимерного субстрата этот метод невозможно применить, так как он основан на измерении концентраций всех продуктов гидролиза. Тем не менее удалось показать, что в модифицированном виде метод Аллена может быть использован и при неполном хроматографическом разделении продуктов гидролиза [45].

Для оценки величины θ у J_{IV} было использовано допущение, что, как и у РРА, основными продуктами многократной атаки являются низкомолекулярные олигосахариды (в данном случае со степенью полимеризации не более трех). Общее распределение продуктов оценивалось с помощью жидкостной хроматографии. Точность определения степени кратности атаки при этом невелика в сравнении с определением ее на радиоактивных олигосахаридах [44]. Однако ясно, что θ стремится к своему максимальному значению при DP, стремящемся к бесконечности. Измеренная величина θ может быть гораздо выше при DP25, чем при DP<10, поэтому при сравнительном изучении близких по свойствам ферментов легче и эффективнее тестировать многократную атаку таким образом [45].

Следует указать, что само по себе сравнение распределения только низкомолекулярных продуктов гидролиза полисахаридов различными эндогликаназами не способно выявить фермент с выраженной многократной атакой. Как в случае с РРА и α -амилазой слюны человека [6], так и в случае с J_0 и J_{IV} [45] это распределение оказалось сходным, но анализ всех данных, полученных при комплексном изучении гидролиза, показал, что РРА и J_{IV} действуют по механизму многократной атаки.

3. Использование трансгликозилирующих свойств эндоглюканаз для изучения многократной атаки

Определение степени кратности атаки, как правило, включает в себя сравнение реального распределения продуктов ферментативного гидролиза субстрата либо с теоретическим распределением, ожидаемым в отсутствие многократной атаки, либо с распределением продуктов гидролиза того же субстрата другим ферментом, для которого ранее было установлено отсутствие способности к многократной атаке. Наиболее полные исследования включают в себя и тот и другой подходы. Особое внимание при моделировании теоретического распределения продуктов по имеющимся экспериментальным данным в методе, носящем название подцентрового (субсайтного) картирования активных центров ферментов [46, 47, 49—52], уделяется учету влияния трансгликозилирования и вторичных атак на вышедшие из фермент-субстратного комплекса продукты реакции. В соответствии с общепринятой методологией субсайтного картирования [47] считается необходимым настолько возможно уменьшить влияние этих реакций.

Эффект вторичных атак растет с увеличением концентраций продуктов в смеси, и им можно пренебречь на начальной стадии гидролиза [48]. Вероятность реакции трансгликозилирования обычно уменьшают, используя достаточно разбавленные растворы субстратов [48]. При этом влияние трансгликозилирования на многократную атаку практически не обсуждалось.

В нашей недавней работе [53] впервые был применен парадоксальный подход: предложено не уменьшать влияние трансгликозилирования на распределение продуктов при изучении многократной атаки, а использовать само распределение продуктов трансгликозилирования как тест на повторную атаку. Ранее было показано, что эндо- β -1,3-глюканазы из морских двусторчатых моллюсков обладают высокой трансгликозилирующей способностью [23, 54—58]. Свойство глюканазы L_{IV} эффективно катализировать перенос на [¹⁴C]глюкозу [23], а также глицерин, метилглюкозиды и метилцеллобиозид было использовано для изучения многократной атаки этого фермента на ламинарии [53].

На рис. 5 приведен график накопления радиоактивных олигосахаридов — продуктов трансгликозилирования, содержащих меченую глюкозу, в зависимости от степени реакции трансгликозилирования DR, где $DR = 1 - A_1/A_0$ (A_1 — радиоактивность глюкозы-акцептора, A_0 — общая радиоактивность пробы). До DR 0,12 (доля разрушенных связей в субстрате, определенная по накоплению восстанавливающих сахаров, составляет ~0,1) наблюдается практически линейная зависимость накопления продуктов от величины DR. При этом низкомолекулярные радиоактивные олигосахариды — продукты трансгликозилирования появляются уже в начальной фазе реакции при DR 0,0236 (доля разрушенных связей в субстрате порядка 0,01), а радиоактивные ламинариантаоза и -гексаоза обнаруживаются с некоторой задержкой. Если принять во внимание, что на невозстанавливающий конец такого субстрата, как ламинария, у L_{IV} приходится незначительная доля от общего числа первоначальных разрывов [59—60], то возможны два объяснения наблюдаемых результатов (рис. 6).

На рис. 6А показан так называемый смещенный фермент-субстратный комплекс. Он образуется тогда, когда добавленная в качестве акцептора глюкоза может связываться с активным центром фермента, при этом препятствуя связыванию мономерных остатков субстрата с подцентрами гликоновой части активного центра NN —2, —3, —4. Для того чтобы оценить связывание глюкозы с L_{IV}, была измерена константа диссоциации комп-

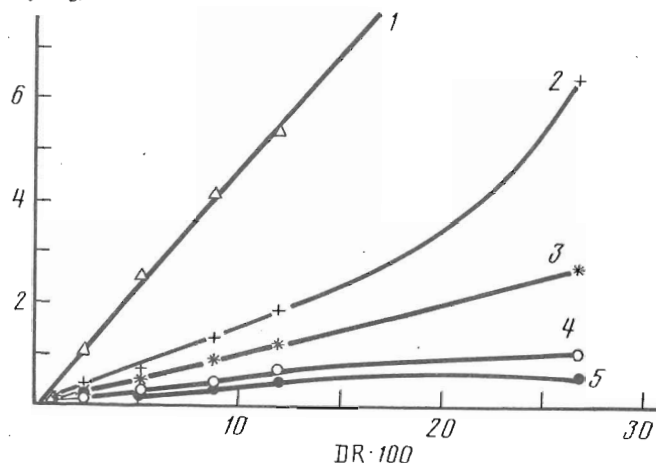
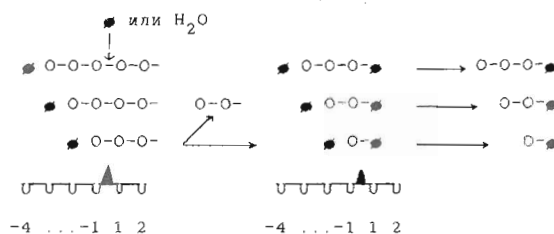
$(A_i/A_0) \cdot 100$


Рис. 5. Анализ накопления продуктов трансгликозилирования на $[^{14}\text{C}]$ -глюкозу: 1 – ламинарибиоза, 2 – ламинаритриоза, 3 – ламинаритетраоза; 4 – ламинарипентаоза; 5 – ламинаригексаоза. A_i – радиоактивность i -мера, $i=2-6$. $[\text{ЛIV}]=2 \cdot 10^{-7}$ М, $[\text{глюкоза}]=1,14 \cdot 10^{-3}$ М, $[\text{ламинарин}]=0,9 \cdot 10^{-3}$ М. Прямые проведены по методу наименьших квадратов. Точки при DR 0,0088 соответствуют фону реакционной смеси без фермента

А



Б

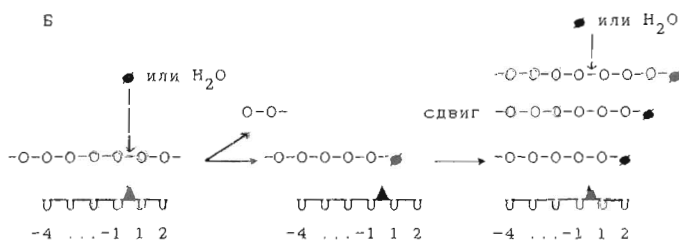


Рис. 6. Возможные пути деградации полимерного субстрата эндоглюканазой ЛIV в присутствии акцептора – глюкозы: А – трансгликозилирование на смещенном фермент-субстратном комплексе; Б – трансгликозилирование, сопровождаемое многократной атакой со сдвигом субстрата на 1, 2, 3 и более глюкозных остатков и соответственно с последующим образованием меченых димера, тримера, тетрамера и других олигосахаридов (обозначения – как на рис. 3). ● – глюкоза – акцептор; подцентры гликоновой части активного центра фермента обозначены отрицательными номерами, а агликоновой части – положительными

лекса ЛІV с [^{14}C]глюкозой методом равновесного диализа; найдено, что $K_d=2\cdot 10^{-4}$ М [61]. По данным работы [62], для ламинарина константа Михаэлиса $K_m=5\cdot 10^{-5}$ М, и таким образом можно высказать предположение о незначительном влиянии смещенного фермент-субстратного комплекса на выход продуктов реакции при взятых, примерно равных концентрациях глюкозы и субстрата.

На рис. 6Б изображен механизм трансгликозилирования с последующей многократной атакой по меченому продукту-субстрату. В этом случае меченые низкомолекулярные продукты также образуются без лаг-периода, а их относительный выход должен уменьшаться с ростом степени полимеризации [35], что и наблюдается в опыте.

В данном случае в качестве оценки степени многократной атаки может служить отношение суммы концентраций меченых димера, тримера и тетрамера, которые пропорциональны их радиоактивности $\left(\sum_{i=2}^4 A_i\right)$ к концентрации остальных продуктов переноса $\left(A_0 - \sum_{i=1}^4 A_i\right)$, экстраполированное к нулевой степени реакции:

$$\theta = \frac{\sum_{i=2}^4 A_i}{A_0 - \sum_{i=1}^4 A_i} = \frac{\sum_{i=2}^4 A_i/A_0}{DR - \sum_{i=2}^4 A_i/A_0}.$$

Экстраполяция к нулевой степени расщепления приводит к $\theta=3,6$ [53], что хорошо согласуется с ранее полученным значением $\theta=3$ [45]. Подтверждены данные работы [45] о наиболее вероятном сдвиге субстрата ламинарина при многократной атаке на одну глюкозную единицу. В отсутствие акцептора глюкозидных остатков, отличного от воды, такой сдвиг приводит к образованию глюкозы, а в присутствии акцептора основным продуктом многократной атаки является глюкозил-акцептор. Такой же вывод был сделан и при изучении переноса, катализируемого ЛІV, на глицерин, α - и β -метилглюкозиды и метилцеллобиозид.

Для изучения распределения продуктов переноса на метилцеллобиозид был применен метод масс-спектрометрии ЭРИАД [63]. Ранее [57, 58] было показано, что масс-спектрометрия ЭРИАД позволяет делать полуколичественные сравнительные оценки концентраций нейтральных углеводородов в растворе. Оказалось, что продукт переноса ламинаритетраозы на акцептор появляется в реакционной смеси, как и в случае переноса на [^{14}C]глюкозу, с небольшим лаг-периодом. Это означает, что доля продукта многократной атаки в общем выходе этого соединения не настолько велика, чтобы фиксироваться на начальной стадии реакции. Таким образом, видимо, приближение, использованное при оценке θ , в целом справедливо. Разница в отношении концентрации основных продуктов переноса на метилцеллобиозид и глюкозу ($\{\text{глюкозил-акцептор}\}/\{\text{биозил-акцептор}\}$) не очень велика, и, возможно, вероятность подвижки фермента и субстрата друг относительно друга на то или иное число мономерных единиц в субстрате не зависит решающим образом от природы (размеров) присоединенного акцептора.

4. Достоверна ли интерпретация экспериментальных данных по многократной атаке?

В двухтомном учебном пособии Клесова «Ферментативный катализ» [8] многократной атаке посвящена отдельная глава. В конце ее в результате анализа литературных экспериментальных данных делается вывод, что «и без того сложная картина кинетики и механизмов действия деполимераз дополнительно усложняется введением надуманных эффектов» (имеется в виду многократная атака). С одной стороны, нельзя не согласиться с тем, что анализ кинетических зависимостей всегда должен включать проверку альтернативных гипотез, за что ратует автор учебника. Среди публикаций, посвященных многократной атаке, как и в любой другой области, можно найти работы, заслуживающие критики. Тем не менее вывод автора, опровергающий сложившиеся в научной литературе на этот счет взгляды, основан, по нашему мнению, и на невнимательном анализе вполне корректных классических исследований, что внесло изрядную путаницу в данную проблему.

Центральной аргументом в критическом анализе Клесова служит очевидная трудность в интерпретации кинетики накопления продуктов деполимеризации, которая состоит в необходимости отличить повторную атаку без диссоциации от просто вторичного гидролиза продуктов, способных быть субстратами. Хотя в данном обзоре не рассматривается многократная атака ферментов *экзо*-типа действия, мы должны в этой связи коротко остановиться на наиболее ранних данных о механизме повторной атаки у β -амилаз, поскольку он был обнаружен относительно давно и считался доказанным в момент появления первых данных об этом явлении у α -амилаз [6].

Френч и соавт. [19] изучали состав продуктов гидролиза мальтоген-таозы (Glc_7) под действием β -амилазы. При 55% расходе субстрата в смеси обнаруживались мальтоза (Glc_2) и мальтотриоза (Glc_3) и отсутствовал пентамер (Glc_5). Отсутствие Glc_5 авторы объяснили двукратной атакой Glc_7 без диссоциации фермент-субстратного комплекса с отщеплением двух молекул Glc_5 . Как справедливо отмечает Клесов [8], скорость «нормального» гидролиза Glc_3 примерно равна таковой для Glc_7 и поэтому Glc_5 не может накапливаться. Это, по мнению автора [8], может служить более простой альтернативной интерпретацией результатов Френча и соавт. [19]. Однако при чуть более внимательном анализе становится ясно, что это не так.

Очевидно, что кинетическая картина расщепления Glc_7 в отсутствие повторной атаки ($\theta=0$) и при $\theta=1$ будет иметь качественный вид, показанный на рис. 7а и б соответственно. Точка перегиба на кривой накопления Glc_3 на рис. 7а обязательно совпадает с максимумом кинетической кривой Glc_5 . Если скорость расщепления Glc_7 равна таковой у Glc_5 , то в этой точке концентрации $[\text{Glc}_7]$ и $[\text{Glc}_5]$ должны быть равны. Для этой простой реакции нетрудно записать систему кинетических уравнений и показать, что максимум $[\text{Glc}_5]$ соответствует примерно 60% расхода Glc_7 . Вероятно, Френч и соавторы учитывали это обстоятельство, выбрав для анализа именно точку с 55% расходом Glc_7 [19]. При этом в отсутствие повторных атак концентрации Glc_5 и Glc_7 должны быть приблизительно равны, и не заметить мальтопентаозу в смеси было нельзя. Аналогично можно рассмотреть и другие эксперименты по действию β -амилаз на олигосахариды, α -амилаз на циклодекстрине и меченый октасахарид для которых Клесовым предложены альтернативные интерпретации, исключаяющие многократную атаку [8].

Убедительное свидетельство в пользу механизма повторной атаки — характерные кинетические кривые на рис. 7б, которые в упомянутых слу-

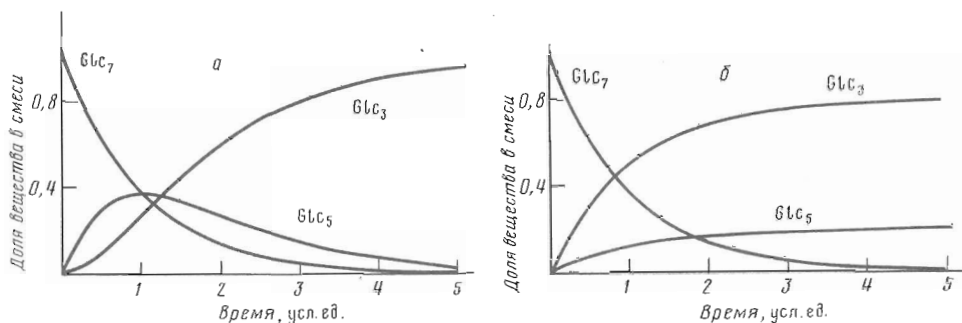


Рис. 7. Теоретический ход кривых накопления продуктов при расщеплении мальтотриосахарида Glc_7 β -амилазой без повторной атаки ($\theta=0$) (а) и с двукратной атакой ($\theta=1$) (б)

чаях всегда наблюдаются экспериментально. Отличительная особенность кинетических кривых при многократной атаке — появление без лаг-фазы, с ненулевой начальной скоростью вторичных продуктов, которые не могут образоваться из исходных субстратов в результате одного каталитического акта. Это относится к Glc_3 на рис. 7б, радиоактивно меченным олигосахаридам при трансгликозилировании (см. выше), коротким олигомерам при действии α -амилаз на амилозу и циклодекстрины. Рисунок 7б можно получить из рис. 7а только предположив, что скорость расщепления Glc_3 много больше таковой у Glc_7 или, в более общем случае, что скорость расщепления постепенного деградируемых цепей сильно растет с уменьшением их длины. Это, однако, полностью противоречит экспериментальным данным о кинетике гидролиза олиго- и полисахаридов гликаназами.

Подробный анализ или даже просто перечисление всех работ, незаслуженно подвергнутых критике автором [8], значительно и необоснованно увеличили бы объем данного обзора. Заметим лишь, что в исследованиях многократной атаки α -амилаз большую роль сыграли эксперименты со специфически мечеными олигосахаридами [7, 44], некорректность критики которых Клесовым уже отмечалась выше. Удивительно, что основополагающее исследование Робита и Френча [7], в котором получены наиболее очевидные свидетельства многократной атаки для РРА, было практически проигнорировано [8]. Из него выхвачен лишь один эксперимент, раскритикованный аналогично и столь же неубедительно, как приведенный выше пример с β -амилазой.

С другой стороны, нельзя, например, не согласиться с критикой Клесовым работ Хутны и Угорского [33, 34] и некоторых других исследований.

К интерпретируемым неоднозначно можно также отнести результаты по ингибированию многократной атаки 40% глицерином, 0,3 М эритроном, 0,3 М метил- α -D-глюкопиранозидом [27], а также 0,004–0,2 М мальтотриозолом [64], которые могут объясняться просто реакцией трансгликозилирования на полигидроксильные акцепторы [53, 57]. Однако даже в сомнительных случаях интерпретация экспериментальных данных авторами, исходя из предположения о механизме многократной атаки, часто кажется достаточно обоснованной, поскольку такой подход позволяет свести в единую картину результаты разнородных косвенных экспериментов, для каждого из которых в принципе возможны и другие объяснения.

5. Представления о механизме многократной атаки на субмолекулярном уровне

Прежде чем перейти к более детальному рассмотрению многократной атаки, остановимся на некоторых других гипотетических механизмах деполимеризации, объясняющих большой выход олигомеров на начальной стадии деградации полимерного субстрата.

После того как выяснилось, что РРА не содержит примеси экзофермента, было высказано предположение, что на одной белковой глобуле находятся два функционально различных каталитически активных центра [26, 27]. В другой работе [33] предложен механизм, в соответствии с которым в оптимуме рН РРА представляет собой димер с тандемно расположенными активными центрами, так что в продуктивном фермент-субстратном комплексе сразу расщепляются две связи в полимере, а оставшийся между каталитическими участками фрагмент как бы попадает в ловушку и подвергается последующему расщеплению, что и приводит к образованию небольших олигомеров. Все эти модели, вероятно, представляют лишь исторический интерес в свете современных сведений о размерах активных центров и данных рентгеноструктурного анализа ТАА [65] и РРА [66].

До сих пор наиболее полное описание гипотетических механизмов многократной атаки на качественном уровне дано Робитом и Френчем [7]. Как отмечали сами авторы, эти механизмы в конечном итоге могут быть сведены к двум: клеточный эффект растворителя и скольжение субстрата в активном центре фермента.

Многократная атака, обусловленная так называемым клеточным эффектом растворителя, включает в себя временную диссоциацию фермент-субстратного комплекса, после которой фермент, находясь в окрестности только что расщепленной цепи, повторно атакует ее с большей вероятностью, чем другие [7, 14, 67]. Именно этот механизм предполагался первоначально [19]. Клеточный эффект имеет общее значение для связывания молекул в растворе, и вопрос состоит лишь в том, насколько он велик. Некоторые количественные оценки возможной степени повторной атаки по такому механизму были сделаны не так давно [67].

Атака олигосахаридов с $DP < 12$ была теоретически изучена с использованием классической модели пространственных случайных блужданий. Показано, что вероятность повторной атаки по данному механизму сильно зависит от вероятности расщепления связи в продуктивном фермент-субстратном комплексе, образующемся после начальной атаки. Так как вероятность расщепления, видимо, не одинакова у разных ферментов, так называемый клеточный эффект растворителя по-разному будет отражаться даже на ферментах с близкими размерами и формой. Максимальная вероятность повторной атаки по такому механизму (π) немногим превышает 0,3 на олигосахариде с DP 12. Если же учесть, что РРА почти не способна расщеплять концевую связь в субстрате [6, 40], то для нее π не может превысить 0,22 даже на полимерном субстрате. Таким образом, за счет пространственного случайного блуждания нельзя объяснить эффект многократной атаки для РРА, так как ее степень повторной атаки $\theta \approx 4$ соответствует $\pi \approx 0,8$. Столь большую вероятность нельзя получить, не предположив, что взаимодействие фермента с субстратом сохраняется во время блуждания [67].

Хотя определенная экспериментально вероятность повторных атак олигосахаридов ТАА [44] укладывается в теоретически оцененный диапазон [67], для описания наблюдаемого распределения продуктов требуется, чтобы реассоциация при повторной атаке практически всегда заканчивалась гидролизом. Последнее явно неверно для обычного связывания

олигосахарида из раствора, поэтому мы должны допустить, что состояние фермента и субстрата между повторными атаками отлично от свободного, т. е. вновь предположить существование взаимодействия между ними. Ясно, что такая модель уже неотличима от модели скольжения.

Таким образом, клеточный эффект не может быть единственным механизмом повторных атак и скорее всего играет ничтожную роль [67]. Другие работы, в которых бы изучалось влияние клеточного эффекта растворителя на кинетику действия карбогидраз, нам неизвестны.

Несколько подробнее рассматривался механизм скольжения, «проскальзывания» субстрата в активном центре. В работах японских авторов [31, 32] введение в математическую модель предположения о проскальзывании субстрата в активном центре РРА на две глюкозные единицы существенно улучшало согласование между теорией и экспериментальными данными. Равновероятное проскальзывание на любое число глюкозных единиц приводило к гораздо худшему соответствию.

Хутны и Угорский [34] получили выражения для параметров K_m и V_m , используя модель скольжения для многократной атаки. Было показано, что K_m^{-1} и V_m должны расти со степенью полимеризации субстрата вследствие того, что увеличивается возможная длина «пробега» по цепи, а следовательно, и время жизни фермент-субстратного комплекса (предполагалась постоянная скорость скольжения). Не касаясь конкретного механизма повторной атаки, рассмотренного авторами [34], следует отметить, что, поскольку для карбогидраз обычно скорость диссоциации комплекса Михаэлиса значительно больше скорости гидролиза, вклад процессов, включающих в себя расщепление связей, в среднее время жизни может быть мал вследствие их малой общей вероятности. С другой стороны, и K_m^{-1} , и V_m должны расти с длиной цепи субстрата просто вследствие увеличения скорости ассоциации при возрастании числа доступных участков связывания на субстрате. Этот эффект авторами работы [34] не учитывался, и поэтому трудно судить, действительно ли измеренные экспериментально зависимости вызваны многократной атакой, хотя в принципе ее наличие для РРА хорошо известно.

О том, каким образом происходит процесс проскальзывания, в настоящее время ничего неизвестно. Наиболее детальные теоретические представления об одном из способов скольжения приведены в работе Маура [35].

Если фермент-субстратные взаимодействия, препятствующие диссоциации, имеют энергию G_d , а взаимодействия, препятствующие переходу между рядом расположенными состояниями фермента на цепи, — энергию смещения $G_{см}$, и $G_d > G_{см}$, то за время жизни фермент-субстратного комплекса может произойти один или несколько переходов между соседними состояниями. После каждого расщепления гомополимера и отщепления одного из образовавшихся фрагментов (агликонового) остается комплекс фермента с оставшимся гликоновым фрагментом субстрата. Этот комплекс непродуктивен, однако в дальнейшем после нескольких последовательных единичных переходов олигосахаридного фрагмента, описываемых как случайное блуждание (дрейф субстрата), может возникнуть состояние, в котором активный центр фермента полностью занят субстратом, и возможен гидролиз гликозидной связи. Дрейф субстрата в противоположную сторону приводит к диссоциации фермент-субстратного комплекса. Прекращение блужданий вследствие диссоциации фермент-субстратного комплекса возможно и в других состояниях, в том числе отвечающих продуктивным комплексам, где процесс дрейфа может также прерваться расщеплением цепи. В результате всех описанных событий от гомополимеров отщепляются различные олигомеры.

Теория, представленная в работе [35], позволяет на основе механизма одномерных случайных блужданий описать распределение продуктов гидролиза амилозы РРА [26] на небольших глубинах реакции при pH 4,8. Распределение вероятностей повторной атаки по внутренним связям полимерной цепи D_n при этом выглядит так:

$$D_n = a \cdot \exp(-bn).$$

где n — степень полимеризации отщепляемого олигомера, a и b — константы. Следует отметить довольно хорошее согласие экспериментально наблюдаемого изменения формы кривой молекулярно-весового распределения продуктов в ходе гидролиза амилозы РРА [26] с теоретическими предсказаниями [35].

Что касается вероятностей атак концевых связей, то о них трудно что-либо сказать. В случае пятиподцентрового активного центра РРА описание данных облегчается тем, что РРА практически не отщепляет глюкозу [26, 40], а уже отщепление димера происходит вследствие разрыва связи, подпадающей под определение «внутренней». Очевидно, что главный эффект рассмотренного механизма дрейфа и вытекающего из него экспоненциального распределения продуктов повторной атаки — максимальный выход наиболее низкомолекулярного продукта (в данном случае мальтозы) [35].

В связи с недостаточным числом изученных ферментов с ясно выраженной многократной атакой трудно сказать, действительно ли все предположения, высказанные выше, выполняются. Среди них лишь предположение о большой вероятности расщепления связи в продуктивном комплексе, образующемся после начальной атаки, несколько контрастирует с современными представлениями. Обычно полагают, что акты ассоциации-диссоциации между ферментом и субстратом происходят многократно, прежде чем осуществляется каталитический акт. Указанное противоречие можно попытаться снять, если обратиться к работам Шераги и сотр. [68, 69], в которых рассматривается связывание хитоолигосахаридов с лизоцимом.

Авторами работ [68, 69] было показано, что в активном центре лизоцима возможны два вида связывания субстрата: «левостороннее» и «правостороннее» (имеется в виду преимущественное связывание на противоположных стенках щели активного центра). При «левостороннем» связывании потенциально расщепляемая связь находится на некотором удалении от каталитических аминокислотных остатков. Менее энергетически выгодный «правосторонний» способ связывания более соответствует продуктивному комплексу с высокой вероятностью расщепления связи, так как эта связь ближе к каталитическим группам. Можно поэтому представить следующую схему реакции:



где ES — «левосторонний» комплекс, видимо, соответствующий комплексу Михаэлиса (которому отвечают предположения о многократном соударении фермента и субстрата перед связыванием), а ES' — «правосторонний» комплекс. После начального расщепления комплекс фермента с гликоновым фрагментом субстрата EP_1 , вероятно, находится в конформации, соответствующей ES' . Если в этом, условно говоря по аналогии с лизоцимом, «правостороннем» комплексе происходит проскальзывание, то вероятность расщепления связи при повторных атаках может быть значительно выше, чем вероятность диссоциации.

Заключение

В результате почти четвертьвековых исследований стало ясно, что действие эндогликаназ по механизму многократной атаки наиболее характерно для α -амилазы из поджелудочной железы свиньи (РРА) и других млекопитающих, а также β -1,3-гликаназы из морского моллюска *S. sachalinensis* (ЛІV). Эти ферменты катализируют расщепление соответствующих субстратов — гомополисахаридов со степенью кратности атаки θ около четырех. Из предложенных до настоящего времени немногочисленных моделей многократной атаки, видимо, наилучшей является модель одномерных случайных блужданий (диффузионного дрейфа) субстрата в активном центре деполимеразы.

Высказано предположение о физиологическом значении многократной атаки для организма хозяина [35]. Например, РРА выводится в просвет кишечника и «работает» как бы в проточном реакторе. В данном случае «классическая» смесь эндофермента и экзофермента может оказаться неэффективной вследствие выноса из активной зоны продуктов гидролиза крахмала эндоферментом и, в результате, их недоступности для действия экзофермента и плохой усвояемости организмом. Что касается упомянутого морского моллюска, то у него вообще не обнаружены экзо- β -1,3-гликаназы [70], и фермент, с высокой эффективностью катализирующий образование глюкозы из ламинарина, этому беспозвоночному просто необходим.

Еще одна α -амилаза из *A. oryzae* (ТАА) предположительно катализирует гидролиз линейных субстратов с меньшей кратностью атаки. Вполне возможно, что степень повторной атаки, характерную для ТАА, могут иметь и другие α -амилазы, поскольку действие иных α -амилаз, кроме РРА и ТАА, на специфические меченые субстраты не изучалось, а по распределению продуктов гидролиза амилозы ТАА существенно не отличалась от других α -амилаз.

Для всех трех эндогликаназ предполагаются высокие вероятности расщепления связи в фермент-субстратном комплексе, образующемся после первоначального расщепления связи. Так как степень многократной атаки на высокомолекулярном полисахариде θ может быть (в предположении, что каждая следующая атака происходит с одинаковой вероятностью λ) выражена как

$$\lim_{DP \rightarrow \infty} \theta \approx \lambda / (1 - \lambda),$$

то для РРА и ЛІV величина λ составляет около 0,8 на полимерном субстрате.

В настоящее время остаются плохо изученными многие вопросы в этой области. Например, неясно, существуют ли аналогии в механизме многократной атаки для эндогликаназ и экзогликаназ [16, 71, 72], а также для других ферментов, катализирующих подобные процессы [2—5]. Непонятно, как связана повторная атака с особенностями подцентрового строения активного центра фермента и иными его свойствами, в том числе способности к трансгликозилированию. При изучении разных аспектов трансферазной активности α -амилаз [26, 73] РРА никак не выделялась среди шести ферментных препаратов из различных источников. Однако упомянутые исследования ни в коем случае не исчерпали потребности в углубленном изучении трансгликозилирующих свойств этих ферментов. Не исключено, что при этом могли бы появиться новые данные, проливающие свет на взаимосвязь различных свойств гликаназ.

В последнее десятилетие предприняты значительные усилия в исследовании других энзиматических свойств РРА: изучалась специфичность РРА после различных химических модификаций [74, 75], ее действие

на различным образом модифицированные субстраты [76—80], гидролиз различных субстратов в зависимости от pH [81].

С помощью рентгеноструктурного анализа определены пространственные структуры ТАА [65] и РРА [66], а также кислой α -амилазы из *A. niger* [82]. Молекула ТАА состоит из 478 аминокислотных остатков, свернутых в два больших домена. Первые 380 остатков с N-конца составляют домен А, остальные — домен В. Домены образуют глобулу размером $80 \times 45 \times 45$ (А). Большая щель расположена у С-конца домена А. Фермент гликозилирован по Asn-197 и недалеко от щели содержит связанный ион кальция, видимо стабилизирующий архитектуру щели. Показано, что мальтотриоза, являющаяся «плохим» субстратом для данного фермента, связывается внутри упомянутой щели. Выведенная путем подгонки модель субстратного связывания включает в состав активного центра семь подцентров для связывания глюкозных остатков, что практически совпадает с данными, полученными из кинетических экспериментов [52, 83, 84]. Вероятные каталитические остатки активного центра, Glu-230 и Asp-297, расположены на расстоянии примерно 3 Å от гликозидного кислорода между четвертым и пятым подцентрами. Часть аминокислотных остатков, составляющих место связывания субстрата, идентична в РРА и ТАА [85], причем четвертый, пятый и шестой подцентры, считая от невосстанавливающего конца субстрата, в основном состоят из консервативных для двух амилаз остатков.

Фактически эти результаты явились первым прямым подтверждением используемого много лет предположения об общем сходстве строения активных центров гликаназ с детально изученной структурой активного центра лизоцима.

Белковая глобула РРА из 496 аминокислотных остатков имеет на поверхности щель длиной ~ 30 Å, в которой могут поместиться пять глюкозных остатков, что также согласуется с данными кинетических экспериментов [40, 86].

Исследования методом молекулярной графики приводят к выводу, что при возможном общем сходстве с лизоцимом по механизму действия амилазы ТАА и РРА значительно отличаются от него структурой в области активного центра. Если у лизоцима активный центр представляет собой своеобразную долину на поверхности глобулы [87, 88], то у амилаз это выпадина, в которой конформация субстрата, вероятно, имеет U-образный вид, так что невосстанавливающий и восстанавливающий концы олигосахарида оказываются сближенными [65, 89]. Такое строение активного центра согласуется с хорошо известной способностью α -амилаз гидролизовать циклодекстрины.

Исследования структуры LIV только развиваются. В настоящее время известна последовательность более 40 аминокислотных остатков с N-конца и устанавливается полная первичная структура по структуре кДНК [90]. Недавно в нашей лаборатории получены микрокристаллы этого белка (В. В. Сова, Т. Г. Светашева, М. Б. Филитова, Л. А. Елякова; данные не опубликованы).

Многократная атака приводит к нетривиальным кинетическим последствиям: с ростом степени кратности атаки нивелируется связь распределения продуктов гидролиза с подцентральной картой фермента [37], и при этом, как ни парадоксально, чем больше степень полимеризации субстрата, тем больше относительный выход низкомолекулярных олигосахаридов [24]. Этот факт — еще одно подтверждение возможности возникновения нового качества из «простой» суммы водородных связей, электростатических, гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, возникающих при контактах полисахарида с белком. Многие аспекты этого явления, как и его значение с эволюционной стороны, еще предстоит выяснить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хорлин А. Я. // Структура и функции активных центров ферментов/Ред. Ю. М. Торчинский. М.: Наука, 1974. С. 39-69.
2. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 2. С. 402.
3. Berg O. G., Blomberg C. // Biophys. Chem. 1977. V. 7. P. 33-39.
4. Langowski J., Alves J., Pingoud A., Maas G. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 501-513.
5. Larsen B., Skjak-Braek G., Painter T. // Carbohydr. Res. 1986. V. 146. P. 342-345.
6. Robyt J. F., French D. // Arch. Biochem. and Biophys. 1967. V. 122. P. 8-16.
7. Robyt J. F., French D. // Arch. Biochem. and Biophys. 1970. V. 138. P. 662-670.
8. Класов А. А. Ферментативный катализ, часть вторая: ферментативная деструкция полимеров (полимерные субстраты). М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. 216 С.
9. van Tilbeurgh H., Tomme P., Clayssens M., Bhikhabhai R., Pettersson G. // FEBS Lett. 1986. V. 204. P. 223-227.
10. Tomme P., van Tilbeurgh H., Pettersson G., Vandekerckhove J., Knowles J., Teeri T., Clayssens M. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 170. P. 575-581.
11. Banks W., Greenwood C. T. // Carbohydr. Res. 1977. V. 57. P. 301-315.
12. Banks W., Mazumder N. K., Spooner R. L. // Int. J. Biochem. 1976. V. 7. P. 107-110.
13. Thoma J. A. // Biopolymers. 1976. V. 15. P. 729-746.
14. Mazur A. K. // Biopolymers. 1984. V. 23. P. 1735-1756.
15. Bird R., Hopkins R. H. // Biochem. J. 1954. V. 56. P. 86-87.
16. Bailey J. M., French D. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 1-14.
17. Swanson M. A. // J. Biol. Chem. 1948. V. 172. P. 805-814.
18. Kerr R. W. // Nature. 1949. V. 164. P. 757-759.
19. French D., Levine M. L., Pazur J. H., Norberg E. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. V. 72. P. 1746-1748.
20. Robyt J. F. // Denpun Kagaku. 1989. V. 36. P. 287-301.
21. Кравченко И. А., Максимов В. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1964. № 3. С. 584.
22. Greenwood C. T., Milne E. A., Ross G. R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1968. V. 126. P. 244-248.
23. Bezukladnikov P. W., Elyakova L. A. // Carbohydr. Res. 1988. V. 184. P. 268-270.
24. Thoma J. A. // Carbohydr. Res. 1976. V. 48. P. 85-103.
25. Елякова Л. А., Мазур А. К. // Молекулярн. биология. 1982. Т. 16. № 3. С. 499-510.
26. Banks W., Greenwood C. T., Khan K. M. // Carbohydr. Res. 1970. V. 12. P. 79-87.
27. Banks W., Greenwood C. T., Khan K. M. // Carbohydr. Res. 1971. V. 19. P. 252-254.
28. Banks W., Mazumder N. K., Spooner R. L. // Comparat. Biochem. and Physiol. 1971. V. 408. P. 983-991.
29. Kondo H., Nakatani H., Hiromi K. // Agric. Biol. Chem. 1977. V. 41. P. 631-634.
30. Nakatani H., Shibata K., Kondo H., Hiromi K. // Biopolymers. 1977. V. 16. P. 2363-2370.
31. Kondo H., Nakatani H., Hiromi K., Matsuno R. // J. Biochem. 1978. V. 84. P. 403-417.
32. Kondo H., Nakatani H., Matsuno R., Hiromi K. // J. Biochem. 1980. V. 87. P. 1053-1070.
33. Hutny J. // Acta biochim. pol. 1981. V. 28. P. 123-134.
34. Hutny J., Ugorski M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1981. V. 206. P. 29-42.
35. Мазур А. К. // Молекулярн. биология. 1985. Т. 19. Вып. 5. С. 1400-1408.
36. Мазур А. К., Елякова Л. А. // Молекулярн. биология. 1983. Т. 17. Вып. 1. С. 101-111.
37. Мелехин А. В., Мазур А. К. Препринт. Владивосток: ИАПУ ДВО АН СССР, 1988.
38. Mazur A. K. // Biopolymers. 1984. V. 23. P. 859-876.
39. Mazur A. K., Nazarova N. I., Elyakova L. A. // FEBS Lett. 1985. V. 192. P. 43-46.
40. Robyt J. F., French D. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. P. 3917-3927.
41. Suetsugu N., Koyama S., Takeo K., Kuge T. // J. Biochem. 1974. V. 76. P. 57-63.
42. Abdullah M., French D., Robyt J. F. // Arch. Biochem. and Biophys. 1966. V. 144. P. 595-598.
43. Kondo H., Nakatani H., Hiromi K. // Carbohydr. Res. 1990. V. 204. P. 207-213.
44. Allen J. D., Thoma J. A. // Carbohydr. Res. 1978. V. 61. P. 377-385.
45. Bezukladnikov P. W., Elyakova L. A. // Carbohydr. Res. 1986. V. 152. P. 261-273.
46. Thoma J. A., Brothers Ch., Spradlin J. // Biochemistry. 1970. V. 9. P. 1768-1775.
47. Allen J. D. // Meth. Enzymol. 1980. V. 84. P. 248-271.
48. Walker G. J., Dewar M. D. // Carbohydr. Res. 1975. V. 39. P. 303-315.
49. Chipman D. M., Sharon N. // Science. 1969. V. 165. P. 464-465.
50. Thoma J. A., Rao G. V. K., Brothers Ch., Spradlin J. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 5621-5635.
51. Allen J. D., Thoma J. A. // Biochem. J. 1976. V. 159. P. 105-120.
52. Allen J. D., Thoma J. A. // Biochem. J. 1976. V. 159. P. 121-132.
53. Bezukladnikov P. W., Elyakova L. A. // Carbohydr. Res. 1990. V. 203. P. 119-127.
54. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189-1196.

55. Звягинцева Т. Н., Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1342–1346.
56. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1215–1223.
57. Безукладников П. В., Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Миргородская О. А. // Химия природн. соедин. 1989. № 1. С. 54–59.
58. Безукладников П. В., Елякова Л. А., Миргородская О. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1318–1325.
59. Назарова Н. И., Мазур А. К., Елякова Л. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1478–1483.
60. Артюков А. А., Сундукова Е. В., Безукладников П. В., Елякова Л. А. // Жидкостная хроматография. Тез. докл. II Всесоюз. симп. Черноголовка, 1982. С. 35.
61. Лакизова И. Ю., Безукладников П. В., Елякова Л. А., Емельяненко В. И., Пермяков Е. А., Буриштейн Э. А. Химия физиологически активных веществ. Тез. докл. V Всесоюз. конф. «Проблемы и перспективы ферментативного катализа». Нальчик, 1988. С. 56–57.
62. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Привалова Н. М. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1553–1559.
63. Александров М. Л., Безукладников П. В., Грачев М. А., Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Кондратьев В. М., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Фридлян-ский Г. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1689–1692.
64. Kondo H., Nakatani H., Hiromi K. // Carbohydr. Res. 1990. V. 206. P. 161–166.
65. Matsuura Y., Kusanoki M., Harada W., Kakudo M. // J. Biochem. 1984. V. 95. P. 408–411.
66. Buisson C., Duee E., Hoser R., Payan F. // Acta Crystallogr. 1984. A4002. P. 1–41.
67. Мазур А. К., Петухов М. Г., Елякова Л. А. // Биофизика. 1988. Т. XXXIII. Вып. 3. С. 417–421.
68. Pincus M. R., Zimmerman S. S., Sheraga H. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 4261–4265.
69. Smith-Gill S. J., Rapley J. A., Pincus M. R., Carty R. P., Sheraga H. A. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 993–997.
70. Etyakova L. A., Shilova T. G. // Comparat. Biochem. and Physiol. 1979. V. 64. P. 245–248.
71. Bochkov A. F., Sova V. V., Kirkwood S. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 258. P. 531–540.
72. Nelson T. F. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 377. P. 139–145.
73. Okada G., Genghof D. S., Hehre E. J. // Carbohydr. Res. 1979. V. 71. P. 287–298.
74. Sakano Y., Ishizuka Y., Takahashi S., Kobayashi T. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. P. 3013–3018.
75. Ishizuka Y., Sakano Y., Kobayashi T. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. P. 3019–3023.
76. Kainuma K., French D. // Carbohydr. Res. 1982. V. 106. P. 143–153.
77. Takeda Y., Hizukuri S., Ozono Y., Suetake M. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 749. P. 302–311.
78. Chan Y., Braun P. J., French D., Robyt J. F. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 5795–5800.
79. Braun P. J., French D., Robyt J. F. // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. P. 265–271.
80. Braun P. J., French D., Robyt J. F. // Carbohydr. Res. 1985. V. 143. P. 107–116.
81. Ishikawa K., Matsui I., Honda K., Nakatani H. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 7119–7123.
82. Boel E., Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z., Dodson G. G., Jensen V. I., Petersen S. B., Swift H., Thim L., Woldike R. F. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 6244–6249.
83. Nitta Y., Mizushima M., Hiromi K., Ono S. // J. Biochem. 1971. V. 69. P. 567–576.
84. Suganuma T., Matsuno R., Ohnishi M., Hiromi K. // J. Biochem. 1978. V. 84. P. 293–316.
85. Toda H., Kondo K., Narita K. // Proc. Jap. Acad. 1982. V. 58B. P. 208–212.
86. Prodanov E., Seigner C., Marchis-Mouren G. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 122. P. 75–81.
87. Blake C. C. F., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. // Nature. 1965. V. 206. P. 757–761.
88. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., Phillips D. C., Sarma V. R. // Proc. Roy. Soc. (London). 1967. V. B167. P. 378–388.
89. Петухов М. Г., Дорофеев В. Э., Мазур А. К. // Химия белков. Тез. докл. Всесоюз. симп. Тбилиси, 1990. С. 106.
90. Кожемяко В. Б., Конечный А. А., Пяловская И. Н., Сова В. В., Елякова Л. А. // Химия белков. Тез. докл. Всесоюз. симп. Тбилиси, 1990. С. 15.

Поступила в редакцию
29.V.1991

После доработки
11.III.1992

P. W. BEZUKLADNIKOV, L. A. ELYAKOVA, A. K. MAZUR

MULTIPLE ATTACK IN THE MECHANISM OF ACTION OF
ENDO-GLUCANASES

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch, Russian Academy of
Sciences, Vladivostok*

The review deals with the phenomenon of repetitive catalytic acts occurring in one enzyme-substrate encounter of certain endo-glucanases with water soluble polysaccharides. Here are discussed experimental results and theoretical models applied in analysis of data.