



УДК 577.15.02

**ПОНИЖАЕТ ЛИ ФЕРМЕНТ ЭНЕРГИЮ АКТИВАЦИИ
ЭЛЕМЕНТАРНОГО АКТА ХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ?*****Карнейский М. Я., Яковлев Г. И.****Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва****Антонов В. К.****Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложена концепция, согласно которой эффективность ферментативного катализа обусловлена стабилизацией ферментом наиболее реакционноспособной формы субстрата. При этом активационный барьер превращения этой формы в продукты реакции не изменяется. Максимальный каталитический эффект пропорционален энергии стабилизации активной формы субстрата ферментом. Используется представление о ступенчатом образовании продуктивного фермент-субстратного комплекса. С рассматриваемых позиций объясняются различные проявления специфичности ферментов в наблюдаемых кинетических константах процесса.

Замечательная способность ферментов специфически связывать субстрат и превращать его в продукт реакции с исключительной эффективностью уже давно служит предметом пристального внимания. Еще около 50 лет назад Холден [1] предположил, что энергия фермент-субстратного взаимодействия может использоваться биокатализатором для понижения энергии активации химической реакции. Все последующие гипотезы, касающиеся причин высокой каталитической эффективности ферментов, имели своей целью объяснить механизм использования энергии фермент-субстратного взаимодействия для понижения активационного барьера реакции. Наибольшее распространение получили представления, согласно которым энергия взаимодействия субстрата с ферментом запасается системой в основном состоянии в виде напряжений субстрата и (или) фермента и освобождается в переходном состоянии реакции. Эти представления наиболее полно рассмотрены в обзорах [2, 3]. Концепция напряжений базируется на предположении, что атомы и группы атомов фермента в фермент-субстратном комплексе жестко фиксированы в пространстве, вследствие чего фермент комплементарен только одному состоянию субстрата — переходному.

Существуют ли убедительные экспериментальные доказательства правильности исходных положений о жесткости фермента, напряжениях в фермент-субстратных комплексах и комплементарности фермента переходному состоянию субстрата? Результаты проведенных к настоящему времени многочисленных исследований структуры ферментов и фермент-лигандных комплексов в кристалле [4–7] и в растворе [8–10], а также

данные теоретического конформационного анализа [11, 12] свидетельствуют об отсутствии геометрических напряжений в фермент-субстратных комплексах и определенной подвижности компонентов его составляющих. В качестве единственного экспериментального подтверждения комплементарности фермента переходному состоянию субстрата рассматриваются данные о высоком родстве к ферментам некоторых веществ — так называемых аналогов переходного состояния [13]. Внимательный анализ структуры этих веществ показывает, однако, что они являются скорее аналогами промежуточных соединений в ферментативной реакции.

Таким образом, современный уровень знаний о структуре и свойствах ферментов и фермент-субстратных комплексов заставляет поставить под сомнение положение о том, что фермент комплементарен исключительно переходному состоянию субстрата, а следовательно, и утверждение, что каталитическая эффективность ферментов обусловлена их способностью понижать активационный барьер элементарного акта химического превращения субстрата.

В настоящей работе, развивая представления, сформулированные одним из нас ранее [14], будет показано, что наблюдаемые скорости ферментативных реакций могут быть достигнуты без понижения активационного барьера стадии образования или расщепления ковалентной связи в субстрате.

Основные положения предлагаемой модели

Решающим для оценки каталитической эффективности фермента является правильный выбор модельной системы сравнения. По нашему мнению, экспериментально наблюдаемая скорость модельной реакции, как правило, не отражает истинную величину активационного барьера для элементарного акта химической реакции. Это обусловлено тем, что в растворе обычно существует равновесие между различными по реакционной способности формами субстрата. Так, хорошо известно, что скорости химического превращения разных ионных форм, таутомеров или конформеров одного и того же соединения могут различаться на много порядков [15]. Если сопоставить скорость химического превращения наиболее реакционноспособной формы субстрата в растворе (в «конгруэнтной» модельной системе) со скоростью аналогичной ферментативной реакции, то оказывается, что различие между ними часто весьма невелико [14, 16]. Однако следует иметь в виду, что, как правило, концентрация такой реакционноспособной формы в растворе чрезвычайно мала. Таким образом, представление о том, что фермент существенно понижает активационный барьер химической стадии реакции, в значительной степени базируется на сопоставлении скорости превращения «активной» формы субстрата (ферментативная реакция) со скоростью превращения «неактивной» формы этого же субстрата (модельная система). В рамках развиваемых представлений свободная энергия активации превращения субстрата в продукт складывается из свободной энергии элементарного акта с участием активной формы субстрата (S_a) и различия в свободной энергии активной и неактивной (S_n) форм субстрата в растворе (рис. 1).

Центральным положением предлагаемой нами гипотезы о природе высокой каталитической эффективности ферментов является утверждение, что различие в свободных энергиях комплекса фермента с активной и неактивной формами субстрата минимально, т. е. фермент стабилизирует активную форму субстрата. Это означает, что скорость ферментативной реакции будет пропорциональна (в зависимости от лимитирующей скорости стадии) либо разнице свободных энергий активной и неактивной форм субстрата в растворе, либо величине активационного барьера превращения активной формы субстрата в продукт. Рассмотрим, какой максимальный каталитический эффект может быть получен на основе предла-

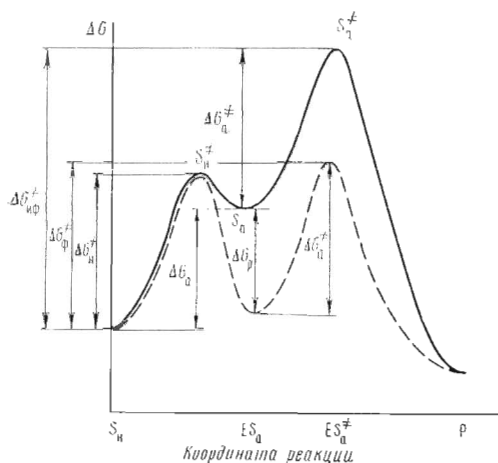


Рис. 1. Изменение свободной энергии по координате реакции в модельной системе (сплошная линия) и в присутствии фермента (пунктир). Для ферментативной реакции указано положение только продуктивного комплекса. Значения ΔG произвольные, обозначения — см. текст

гаемой модели, в предположении, что фермент не влияет на величину активационного барьера превращения активной формы субстрата в продукт.

Как видно из диаграммы, представленной на рис. 1, свободная энергия активации неферментативной реакции (измеряемая в эксперименте кажущаяся величина) определяется выражением

$$\Delta G_{\text{нф}}^{\ddagger} = \Delta G_a + \Delta G_a^{\ddagger},$$

где ΔG_a — изменение свободной энергии при переходе из формы S_n в форму S_a , а ΔG_a^{\ddagger} — истинная свободная энергия активации превращения формы S_a в продукт. Кажущаяся свободная энергия активации ферментатив-

ного превращения субстрата в продукт будет равна $\Delta G_{\text{ф}}^{\ddagger} = \Delta G_a + \Delta G_a^{\ddagger} - \Delta G_p$, где ΔG_p — различие в свободной энергии образования комплекса фермента с формой S_a и формой S_n , т. е. энергия стабилизации формы S_a на ферменте. Именно этой величиной и будет определяться наблюдаемый выигрыш в скорости ферментативного превращения субстрата в продукт по сравнению с модельной системой.

Согласно предлагаемой модели, образование продуктивного фермент-субстратного комплекса, в котором достигается стабилизация активной формы субстрата, является многостадийным процессом. Основная особенность этого процесса — протекание каждой стадии в оптимальных условиях, создающихся в результате завершения предыдущей стадии [14]. Следует подчеркнуть, что представление о стадийном образовании продуктивного фермент-субстратного комплекса в последнее время находит все больше экспериментальных подтверждений [17–25].

На первой стадии обе формы субстрата (см. рис. 2) способны связываться с ферментом, давая неспецифический сорбционный комплекс (E_0S_n и E_0S_a), причем константы образования такого комплекса должны быть практически одинаковы для обеих форм субстрата. Этот комплекс образуется за счет столкновения молекулы субстрата с активным центром фермента, скорость его образования близка к скорости диффузии (10^9 с^{-1}). Условием образования сорбционного комплекса является наличие определенного топохимического соответствия между активным центром фермента и фрагментом молекулы субстрата. При образовании сорбционного комплекса система теряет трансляционные степени свободы, однако вращение

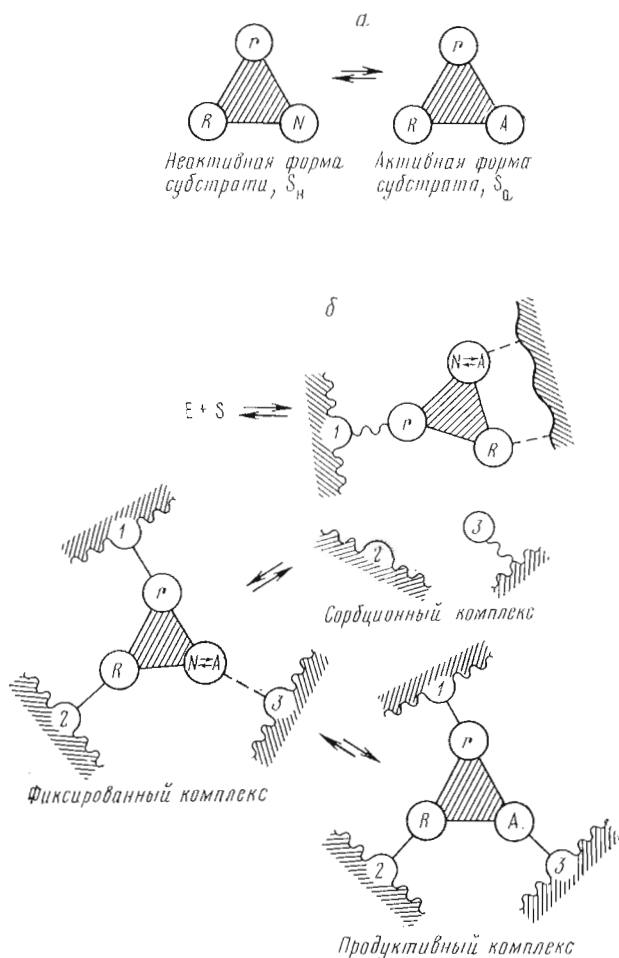


Рис. 2. Равновесие между активной и неактивной формами субстрата в модельной системе (а) и в фермент-субстратных комплексах (б). Обозначения: r – фрагмент молекулы субстрата, необходимый для первичного узнавания, R – для специфического узнавания; трансформируемый в реакции фрагмент молекулы субстрата в активной (A) и неактивной (N) форме; 1 – участок активного центра фермента, ответственный за первичное узнавание субстрата, 2 – за специфическое узнавание субстрата; 3 – участок активного центра фермента, стабилизирующий трансформируемый фрагмент молекулы субстрата в активной форме. Силосной прямой линией обозначены специфические взаимодействия в фермент-субстратном комплексе, фиксирующие фрагменты молекулы субстрата и группы активного центра фермента, волнистой – специфические взаимодействия, при которых сохраняется относительная подвижность компонентов фермент-субстратного комплекса; пунктирной – неспецифические взаимодействия

вокруг ординарных связей фрагментов молекулы субстрата и функциональных групп активного центра остается незаторможенным. Поэтому субстрат может быть ориентирован относительно белка различным образом. Основной вклад в свободную энергию сорбционного комплекса вносит изменение энтропии системы. Уменьшение энтропии вследствие образования комплекса, по-видимому, компенсируется вытеснением молекул воды, иммобилизованных в активном центре фермента. Таким образом, строение сорбционного комплекса отличается подвижностью его компонентов, т. е. в нем реализуются не все потенциально возможные контакты между субстратом и ферментом, а только те, энергия которых незначительно зависит от направления и (или) медленно падает с увеличением расстояния между взаимодействующими атомами или группами. При образовании сорбционного комплекса реализуется первый уровень специфичности фермента

(«первичная» специфичность), когда субстраты дискриминируются по размеру, геометрической форме и заряду связываемого участка молекулы. Образование сорбционного комплекса не приводит к стабилизации активной формы субстрата.

На второй стадии происходит фиксация сорбционного комплекса в конформации, обеспечивающей возможность взаимодействия реагирующего фрагмента молекулы субстрата с группами активного центра фермента, ответственными за стабилизацию активной формы субстрата (образование фиксированных комплексов E_pS_n и E_pS_a). На этой стадии реализуется максимально возможное число взаимодействий между нетрансформируемыми фрагментами молекулы субстрата и белком, обусловленное топохимическим соответствием реагентов. Следовательно, на этой стадии происходит «узнавание» ферментом субстратов и реализуется «вторичная» специфичность ферментов. Для простоты изложения мы принимаем, что вклад в свободную энергию фиксированного комплекса, обусловленный взаимодействием реагирующего фрагмента молекулы субстрата с белком, равен нулю. Следовательно, образование фиксированного комплекса не сопровождается стабилизацией активной формы субстрата. Очевидно, что максимальный выигрыш в наблюдаемой скорости реакции на этой стадии не может превышать величину, характеризующую переход от бимолекулярной реакции к мономолекулярной. При сравнении с модельной системой величина кажущегося активационного барьера превращения субстрата в продукт остается неизменной.

На завершающей стадии образования продуктивного комплекса ($E_pS_a^*$) благодаря взаимодействию реагирующего фрагмента активной формы субстрата с белком происходит стабилизация активной формы субстрата. Таким образом, продуктивный фермент-субстратный комплекс, согласно предлагаемой модели, представляет собой комплекс фермента с активной формой субстрата, в котором достигнуто максимально возможное структурное и энергетическое соответствие между реагентами. Для достижения максимального выигрыша в скорости необходимо, чтобы различие в свободной энергии продуктивного комплекса и комплекса фермента с неактивной формой субстрата было минимальным. Следует подчеркнуть, что продуктивный фермент-субстратный комплекс в рамках данной модели образуется из комплекса фермента с любой из форм субстрата, хотя механизм превращения будет существенно различным. Превращение комплекса фермента с неактивной формой субстрата в фермент-субстратный продуктивный комплекс происходит путем его изомеризации в комплекс фермента с активной формой субстрата (сорбционный или фиксированный). В проведенном рассмотрении такая изомеризация должна происходить на стадии фиксированного комплекса, поскольку мы приняли, что различие между активной и неактивной формами субстрата заключается исключительно в различном строении реагирующего фрагмента молекулы субстрата. Очевидно, что такая ситуация является в значительной мере идеализированной и в общем случае различие в строении и свойствах реагирующего фрагмента молекулы субстрата в его разных формах обусловлено различием в строении всей молекулы. В этом случае превращение сорбционного комплекса фермента с неактивной формой субстрата в продуктивный комплекс будет проходить исключительно через стадию изомеризации его в сорбционный комплекс фермента с активной формой субстрата, поскольку топохимическое соответствие между неактивной формой субстрата и ферментом достаточно только для образования сорбционного комплекса.

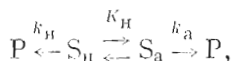
Таким образом, молекулярный механизм каталитического действия ферментов в соответствии с предлагаемой моделью состоит в том, что с помощью фермента происходит такое разделение кажущегося активационного барьера реакции, когда суммарный барьер становится равным его максимальному компоненту. Очевидно, что наибольший выигрыш в наблю-

даемой скорости реакции по сравнению с модельной системой будет получен в том случае, когда различие в свободной энергии активной и неактивной форм субстрата и энергия активации превращения активной формы субстрата в продукт примерно равны.

Кинетическое рассмотрение

Ниже мы проанализируем минимальную схему ферментативной реакции в соответствии с предложенной моделью, полагая, что сорбционный комплекс с неактивной формой субстрата непосредственно превращается в продуктивный фермент-субстратный комплекс. Анализ кинетической схемы с учетом всех промежуточных стадий не сказывается на конечных выводах, но является более сложным и менее наглядным.

Согласно модели, в растворе существует равновесие между активной и неактивной формами субстрата, смещенное в сторону последней:



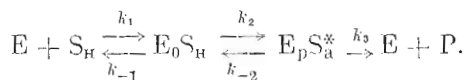
где

$$K_{н} = [S_{а}] / [S_{и}] \ll 1.$$

Пренебрегая скоростью прямого превращения $S_{и}$ в P ($k_{и}$), можно записать для наблюдаемой скорости неферментативного превращения всего субстрата в продукт ($v_{нф}$):

$$v_{нф} = k_{а} K_{н} [S]_0, \text{ т. е. } k_{нф} = k_{а} K_{н}.$$

Если в эту систему вносится фермент, то минимальная схема реакции может быть представлена следующим образом:



Как уже указывалось выше, превращение комплекса $E_0 S_{и}$ в $E_p S_{а}^*$, показанное здесь в одну стадию, может, согласно модели, происходить через ряд стадий. При этом значения k_2 и k_{-2} будут соответствовать лимитирующей скорости превращения стадий.

Скорость ферментативной реакции $v_{ф}$ будет (полагая, что $k_1 \gg k_3$)

$$v_{ф} = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K'_m + [S]_0},$$

где

$$k_{кат} = \frac{k_3 K_p}{1 + K_p} \text{ и } K_p = \frac{k_2}{k_{-2} + k_3},$$

а

$$K'_m = \frac{K_s}{1 + K_p} \text{ и } K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}.$$

Максимально возможное значение константы скорости ферментативной реакции равно k_3 , что достигается при $K_p \gg 1$. В этом случае увеличение константы скорости ферментативной реакции по сравнению с неферментативной равно (так как $k_3 = k_a$):

$$\frac{k_{кат}}{k_{нф}} = \frac{1}{K_{н}}.$$

Каталитический эффект будет наблюдаться во всех случаях, когда $K_p > K_{н}$. По отношению к исходному состоянию неактивной формы субстрата наблюдаемое ускорение ферментом будет

$$\frac{k_{кат}}{K'_m k_{нф}} = \frac{K_p}{K_{н} K_s}.$$

Каким реально может быть порядок величин K_m ? Очевидно, что эта величина должна быть пропорциональна отношению констант диссоциации разных ионных форм, если активная и неактивная формы субстрата различаются состоянием ионизации реагирующей группы, или же пропорциональна константе конформационного равновесия, если различие связано с разной реакционной способностью конформеров, или, наконец, энергии резонансной стабилизации реагирующей группы, если фермент стабилизирует форму с более низкой резонансной стабилизацией. В последнем случае должна наблюдаться корреляция между свободными энергиями расщепления резонансно-стабилизированных групп и константами скоростей ферментативных реакций. Действительно, линейная зависимость $\Delta G_{\text{гидр}}$ и отношения $k_{\text{кат}}/K_m'$ была обнаружена [26] для серии «полуспецифических» субстратов α -химотрипсина.

С позиций, изложенных выше, представляет интерес рассмотреть различные случаи проявления субстратной специфичности ферментов в кинетических константах реакций. Значения наблюдаемых кинетических параметров в зависимости от величины K_p могут быть:

$$k_{\text{кат}}=k_3 \text{ и } K_m'=K_s/K_p \text{ (при } K_p \gg 1)$$

и

$$k_{\text{кат}}=k_3 K_p \text{ и } K_m'=K_s \text{ (при } K_p \ll 1).$$

Очевидно, что для однотипных субстратов константы диссоциации сорбционных комплексов (K_s) должны быть близки (сходная «первичная» специфичность), а константы равновесия между сорбционным комплексом и продуктивным (K_p) должны различаться за счет разной «вторичной» специфичности. Скорости же трансформации продуктивного комплекса (k_3) для субстратов, содержащих одинаковую превращаемую группу, должны быть одинаковыми. Рассмотрим эти случаи.

А. Специфичность проявляется в максимальной скорости катализа. Это тот случай, когда два субстрата имеют примерно одинаковые константы Михаэлиса, но превращаются ферментом с разной скоростью. Кинетически такой ситуации удовлетворяет условие, когда $K_p \ll 1$. При этом условии наблюдаемая константа Михаэлиса будет одинакова для субстратов, имеющих одинаковые по структуре участки, обуславливающие «первичную» специфичность, а каталитические константы будут различаться на величину, определяемую отношением величин K_p этих субстратов. Структурно это означает, что сорбционные комплексы близки по строению, а продуктивные — различаются. Известно много случаев, когда субстратная специфичность ферментов проявляется в максимальной скорости катализа. Наиболее яркий — это гидролиз пептидных связей, катализируемый пепсином, когда для серии субстратов, имеющих одинаковый аминокислотный остаток в участке «первичной» специфичности, различие в наблюдаемой каталитической константе достигает величины 10^5 [27, 28]. Другой пример — рибонуклеаза *A*, где при переходе от динуклеозидмонофосфата к метилому эфиру нуклеозид-3'-фосфата каталитическая константа уменьшается в $6 \cdot 10^3$ раз, тогда как величина K_m' практически не изменяется [29].

Б. Специфичность проявляется в величине константы сродства субстрата к ферменту. Имеется в виду случай, когда наблюдаемые константы скорости превращения субстрата в продукт одинаковы для серии субстратов, а кажущиеся константы Михаэлиса существенно различны. Этому случаю соответствует положение, когда $K_p \gg 1$ и $k_{\text{кат}}=k_3$, а $K_m'=K_s/K_p$. Очевидно, что здесь скорость химического превращения исследуемых субстратов близка к максимальной. Именно такая ситуация наблюдается при гидролизе карбоксипептидазой *A* субстратов типа Z-X-Phe-OH, для которых изменение в структуре аминокислотного остатка X мало влияет на величину $k_{\text{кат}}$ и сильно сказывается на значении K_m' [30].

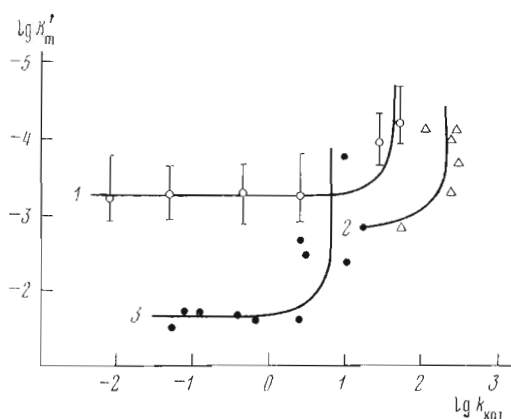


Рис. 3. Зависимость $\lg K_m'$ от $\lg k_{\text{кат}}$: 1 — для субстратов пепсина типа Z-A-B-C-Phe-Phe-D (приведены средние значения $\lg K_m'$ для среднего значения $\lg k_{\text{кат}}$ в каждом десятичном интервале $k_{\text{кат}}$, вычисленные с использованием экспериментальных данных для 65 субстратов [28, 34]; вертикальные линии — разброс значений $\lg K_m'$), 2 — для субстратов карбоксипептидазы типа Z-X-Phe-OH [30], 3 — для субстратов α -химотрипсина типа Ac-A-B-C-Phe-D' [35, 36]. A, B, C, X — аминокислотные остатки и D—NH₂-группа (амид) или C-концевые защитные группы. Сплошные линии — теоретически рассчитанные зависимости $\lg k_{\text{кат}}$ и $\lg K_m'$ (см. текст) при варьировании K_p в области $1 \ll K_p \ll 1$ и значениях k_3 и K_s соответственно: 46 с⁻¹ и $5,4 \cdot 10^{-4}$ М (1); 215 с⁻¹ и $1,5 \cdot 10^{-3}$ М (2); 6,8 с⁻¹ и $22 \cdot 10^{-3}$ М (3)

В. Специфичность проявляется как в $k_{\text{кат}}$, так и в K_m' , т. е. соблюдается принцип «лучшее связывание — лучший катализ». Это правило весьма четко прослеживается на примере гидролиза α -химотрипсином эфиров N-ациламинокислот [31]. Поскольку указанные соединения различаются по структуре фрагмента молекулы, определяющего «первичную» специфичность, константы диссоциации сорбционных комплексов должны различаться. Различие в величинах $k_{\text{кат}}$ может быть обусловлено или тем, что $K_p \ll 1$, или же тем, что лимитирующей скоростью стадией является стадия k_2 ($k_{\text{кат}} = k_2$). Интересно, что для субстратов этого фермента, не имеющих в молекуле N-ациламиногруппы (ср., например, эфиры дигидрокоричной кислоты и фенилаланина), специфичность проявляется только на уровне каталитических констант [32].

Таким образом, в рамках предлагаемой модели экспериментально измеряемые константы являются эффективными величинами, т. е. характеризуют либо стадию химического превращения, либо стадию образования продуктивного комплекса, а в большинстве случаев обе стадии вместе.

Следует подчеркнуть, что, как следует из значений $k_{\text{кат}}$ и K_m' (с. 650), существует определенная зависимость между величинами наблюдаемых кинетических констант, обусловленная величиной K_p . При одинаковых в данной серии субстратов значениях K_s связь между $k_{\text{кат}}$ и K_m' иллюстрируется графиками типа представленного на рис. 3. Выбранная серия субстратов может располагаться на этом графике в участке, где значение K_m' постоянно, в участке, где обе величины изменяются, и, наконец, там, где изменяется только $k_{\text{кат}}$. Имеющиеся экспериментальные данные (см. рис. 3) подтверждают существование такой зависимости (см. также [33]).

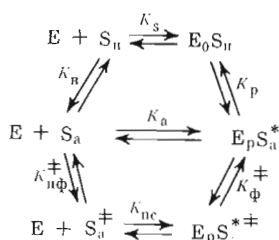
О возможности создания количественной теории ферментативного катализа

Поскольку в основе предлагаемой модели лежит идея о стабилизации ферментом активной формы субстрата в основном состоянии, целесообразно рассмотреть, стабилизируется ли при этом переходное состояние субстрата. В существующих теориях ферментативного катализа стабилизация переходного состояния и каталитическая эффективность фермента связа-

ны причинно-следственными отношениями [13]. Количественно каталитическую эффективность фермента определяют отношением константы равновесия между основным и переходным состоянием для ферментативной реакции (K_{Φ}^{\ddagger}) к аналогичной константе для неферментативной реакции ($K_{\text{нф}}^{\ddagger}$). Очевидно, что это отношение должно быть равным отношению константы связывания переходного состояния субстрата с ферментом ($K_{\text{пс}}$ — величина фиктивная) к константе ассоциации основного состояния субстрата с ферментом (\bar{K}_s):

$$\frac{K_{\text{пс}}}{\bar{K}_s} = \frac{K_{\Phi}^{\ddagger}}{K_{\text{нф}}^{\ddagger}}.$$

Поскольку ферментативная реакция протекает со скоростью, на много порядков превышающей аналогичную неферментативную реакцию, делается вывод, что в переходном состоянии субстрат связывается с ферментом существенно прочнее, чем в основном. Для ответа на вопрос, стабилизируется ли переходное состояние субстрата, рассмотрим схему превращений субстрата в предлагаемой нами модели:



При анализе наружного цикла равновесий легко убедиться, что

$$\frac{K_{\text{пс}}}{K} = \frac{K_{\Phi}^{\ddagger}}{K_{\text{нф}}^{\ddagger} K_{\text{н}}}, \quad \text{где } K = \frac{K_{\text{р}}}{K_s} = \frac{[E_{\text{р}} S_{\text{а}}^*]}{[E][S_{\text{н}}]},$$

или, так как по условию $K_{\text{нф}}^{\ddagger} = K_{\Phi}^{\ddagger}$, то $K_{\text{пс}}/K = 1/K_{\text{н}}$.

Следовательно, переходное состояние неферментативной реакции превращения неактивной формы субстрата в продукт (в рамках нашей модели понятие условное, так как неактивная форма субстрата в продукт непосредственно не превращается) стабилизируется относительно неактивной формы субстрата в основном состоянии. Однако следует помнить, что этот вывод является следствием формального кинетического рассмотрения и не отражает истинного механизма ускорения реакции ферментом, так как различие в свободной энергии основного и переходного состояний для активной формы субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе не изменяется при переходе от модельной системы к ферментной. В правильности сделанного вывода легко убедиться, проанализировав нижний цикл равновесий, для которого $K_{\text{пс}}/K_{\text{а}} = 1$. Таким образом, согласно предлагаемой модели, фермент стабилизирует основное состояние активной формы субстрата и «переходное состояние» неактивной формы.

Важным следствием предлагаемой модели является принципиальная возможность количественной оценки каталитической эффективности фермента в конкретной химической реакции с участием определенного субстрата, поскольку каталитическая эффективность пропорциональна величине константы равновесия между активной и неактивной формами субстрата. Эта константа в ряде случаев может быть измерена экспериментально или рассчитана на основе имеющихся экспериментальных данных.

В заключение следует подчеркнуть, что предложенная модель не противоречит существующим теориям ферментативного катализа, которые

применимы в тех случаях, когда константа скорости превращения активной формы субстрата в продукт в ферментативной реакции превышает таковую для неферментативной реакции или когда вклад различия свободной энергии двух форм субстрата в кажущуюся энергию активации реакции невелик.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haldane J. B. S. (1930) *Enzymes*, p. 182, Longman, Green and Co.
2. Jencks W. P. (1975) *Adv. Enzymol.*, **43**, 219-410.
3. Fersht A. (1977) *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman and Co.
4. Blow D. (1976) *Acc. Chem. Res.*, **9**, 145-153.
5. Blake C. C. F. (1975) *J. Mol. Biol.*, **97**, 643-655.
6. Artymiuk P. J., Blake C. C. F., Grace D. E. P., Oatley S. J., Phillips D. C., Sternberg M. J. E. (1979) *Nature*, **280**, 563-568.
7. Liljas A., Rossmann M. G. (1974) *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 475-507.
8. Gein B., Karplus M. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2002-2006.
9. Hull W. E., Sykes B. D. (1975) *J. Mol. Biol.*, **98**, 121-153.
10. Eftink M. K., Ghiron C. A. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3290-3294.
11. Попов Е. М. (1977) *Молекулярн. биология*, **11**, 5-41.
12. Липкинд Г. М., Карпейский М. Я. (1978) *Молекулярн. биология*, **12**, 282-289.
13. Wolfenden R. (1976) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5**, 271-306.
14. Ivanov V. I., Karpeisky M. Y. (1969) *Adv. Enzymol.*, **32**, 22-53.
15. French F. C., Auld D. C., Bruice T. C. (1965) *Biochemistry*, **4**, 77-82.
16. Westheimer F. H. (1972) *Proceed. of Conference on Chem. Res. XV. Bio-Organic. Chemistry and Mechanisms*, Houston, Texas, pp. 7-30.
17. Hammes G. G. (1968) *Adv. Protein Chem.*, **23**, 1-57.
18. Sinnott M. L., Souchard I. J. L. (1973) *Biochem. J.*, **133**, 89-98.
19. Rosenberg T. L. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3834-3838.
20. Yon J. M. (1976) *Biochimie*, **58**, 61-69.
21. Carey R. R., Schneider H. (1976) *J. Mol. Biol.*, **102**, 679-693.
22. Harrison L. W., Vallee B. L. (1978) *Biochemistry*, **17**, 4359-4365.
23. Schneider W. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2288-2289.
24. Mattis J. A., Fruton J. S. (1976) *Biochemistry*, **15**, 2191-2197.
25. Angelides K. L., Fink A. L. (1979) *Biochemistry*, **18**, 2355-2369.
26. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 105-110.
27. Medzihradzky K., Voynick I. M., Medzihradzky-Schweiger H., Fruton J. S. (1970) *Biochemistry*, **9**, 1154-1162.
28. Зинченко А. А., Румш Л. Ш., Антонов В. К. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1663-1670.
29. Witzel H. (1963) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Davidson T. N., Cohe W. E., eds), vol. 2, pp. 224-238, Acad. Press, New York - London.
30. Клесов А. А., Вядли А. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 806-815.
31. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) *Int. J. Chem. Kinetics*, **6**, 801-811.
32. Березин И. В., Мартинек К. (1977) в кн.: *Основы физической химии ферментативного катализа*, с. 134, «Высшая школа», М.
33. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. (1979) в кн.: *Биокинетика*, с. 72, «Наука», М.
34. Clement G. E. (1973) *Progr. Bioorg. Mech.*, **2**, 177-201.
35. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Datler H. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **39**, 381-391.
36. Bauer C. A., Thompson R. C., Blout E. R. (1976) *Biochemistry*, **15**, 1296-1299.

Поступила в редакцию
10.XII.1979

DOES AN ENZYME DECREASE THE ACTIVATION ENERGY OF THE ELEMENTARY STEP OF CHEMICAL REACTION?

KARPEISKY M. Ya., YAKOVLEV G. I., ANTONOV V. K.

*Institute of Molecular Biology and M. M. Shemyakin Institute
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The concept is presented that the effectiveness of enzymic catalysis is due to the enzyme stabilization of the most reactive form of the substrate. According to this concept, an enzyme does not change the activation energy of the transformation of this substrate form into the reaction products. The maximal catalytic effect is proportional to the energy of enzyme stabilization of the substrate reactive form. Formation of the productive enzyme-substrate complex is postulated to proceed stepwise. In the light of these ideas a rationale is given to various manifestations of enzyme specificity in the observed kinetic constants.