



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.15.02

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И СТАБИЛЬНОСТЬЮ
БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ ИЗ МЕЗОФИЛЬНЫХ
И ТЕРМОФИЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ*Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра химической энзимологии*

В обзоре рассмотрены основные структурные факторы, обеспечивающие образование и стабилизацию глобулярной структуры белковых макромолекул в растворе, локализация различных аминокислотных остатков в белках и вклад различных взаимодействий в стабилизацию нативной конформации макромолекул. Проанализированы предложенные в литературе корреляции между первичной структурой и термостабильностью белков, отмечен ограниченный характер подобных корреляций. Сравнение известных структур ферментов из мезо- и термофильных источников выявило основные структурные особенности ферментов из термофилов, обеспечивающие их высокую стабильность: уменьшенное содержание лизина, серина, аспарагина, цистеина, повышенное содержание аргинина и α -спиральобразующих остатков, большое значение алифатического индекса белка. Анализ литературы показывает, что стабилизация термофильных ферментов обусловлена образованием небольшого числа дополнительных солевых или водородных связей, а также гидрофобных взаимодействий, возникающих при замене отдельных аминокислотных остатков в мезофильном ферменте.

Стабилизация биологических макромолекул по отношению к различным денатурирующим воздействиям имеет важное практическое и теоретическое значение. Разработка научных основ стабилизации позволяет, с одной стороны, решить проблему более широкого использования биологических катализаторов в практических целях и, с другой — ведет к более глубокому пониманию взаимосвязи между структурой и стабильностью биологических макромолекул.

Стабильность белка, т. е. его способность сохранять биологические функции в данных условиях (рН, температура, состав микроокружения), является объективной физико-химической характеристикой макромолекулы и обусловлена как структурой белка, так и природой его взаимодействия с микроокружением. На протяжении десятилетий проводится большое число исследований по установлению взаимосвязи между структурой (первичной, вторичной и третичной) белков и их стабильностью. Знание таких закономерностей позволило бы целенаправленно разрабатывать методы модификации белков для получения их высокостабильных производных, столь нужных на практике. Именно так, в частности, «поступает Природа», создавая термофильные микроорганизмы, содержащие ферменты, термостабильность которых во много раз превышает термостабильность аналогичных ферментов из мезофильных источников. Значительно большая стабильность ферментов из термофильных микроорганизмов (термофильные ферменты) по сравнению с их мезофильными аналогами (мезофильные ферменты) достигается заменой (в результате мутации) очень малого количества аминокислотных остатков в мезофильном ферменте, являющихся «ключевыми» для стабилизации нативной конформации белка. Проводимое в данном обзоре сравнение структур термо- и мезофильных ферментов позволяет выявить некоторые из этих «ключевых» структурных элементов, ответственных за повышенную термостабильность термофильных ферментов.

Рассмотрению структурных особенностей термо- и мезофильных ферментов в данном обзоре предшествует анализ различных структурных

факторов, определяющих стабильность белковых макромолекул в растворе, и тех возможных корреляций между первичной структурой белков и их стабильностью в растворе, которые пытались выявить авторы ряда работ.

1. Структура биологических макромолекул и факторы, определяющие ее стабильность в растворе

Биологические макромолекулы состоят из одной или нескольких линейных полимерных цепей, мономерные звенья которых — остатки аминокислот — образуют специфические, генетически predetermined последовательности (первичная структура), от которых зависит характер нековалентных внутри- и межцепочечных взаимодействий и в конечном счете конформация макромолекулы (вторичная, третичная и четвертичная структуры) [1]. Число конформаций, возможных для молекулы белка, велико. Согласно теории двух состояний, их можно разбить на две группы [2]. В первую группу входит узкий набор нативных конформаций белка, в которых он проявляет биологическую активность. Вторую группу составляют все остальные возможные конформации белка, функционально неактивные, т. е. денатурированные.

Экспериментальные данные подтверждают гипотезу о том, что молекула белка в нативном состоянии имеет уникальную трехмерную структуру, которая определяется аминокислотной последовательностью и данным окружением [3]. Структура нативного белка обладает гибкостью и внутренней динамикой, играющими важную роль в его функциональной активности [4]. Для нативной конформации гиббсовская свободная энергия системы, состоящей из белка и растворителя, минимальна при данных физических условиях (температура, pH, ионная сила, присутствие различных добавок и т. д.).

Согласно модели трехмерной структуры белка, предложенной Фишером, в глобуле (сфера с радиусом R) различают «центры» двух различных классов [5]. В наружном слое толщиной r находятся поверхностные «центры», и любой аминокислотный остаток полипептидной цепи, расположенный в этом слое, считается сольватированным. Во внутренней сфере с радиусом $R-r$ содержатся аминокислотные остатки, лишенные контакта с растворителем и находящиеся в относительно неполярном окружении. В соответствии с местоположением в рассмотренной модели, по последним данным Шераги с сотр. [6], все аминокислотные остатки разделяются на три типа: 1) гидрофобные, предпочтительно локализующиеся внутри молекулы (Cys, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Phe); 2) гидрофильные, предпочтительно локализующиеся в поверхностном слое (Asp, Glu, Lys, Asn, Gln, Pro, Arg, Ser, Thr); 3) нейтральные и амбивалентные, безразличные в отношении локализации на поверхности или во внутреннем объеме молекулы (Ala, His, Gly, Tyr) [2, 6].

Рентгеноструктурный анализ большого количества белковых молекул показал, что в компактной структуре белка большинство неполярных остатков действительно находится внутри молекулы и не контактирует с растворителем, а полярные остатки располагаются главным образом на поверхности молекулы [7, 8].

На основании известной трехмерной структуры ряда белков рассчитаны коэффициенты распределения каждого из 20 аминокислотных остатков между внутренней областью и поверхностью глобулы белка [8, 9]. Оказалось, что эти величины не коррелируют со свободной энергией переноса остатков из органического растворителя в воду, измеренной ранее Ээнфордом, т. е. с их гидрофобностью [10]. Внутренняя часть 22 белков с известной структурой на 56% состоит из лейцина, изолейцина, валина, аланина, и глицина, на 22% из фенилаланина, серина, треонина, цистеина и 22% составляют остальные 11 аминокислот. Поверхность белка имеет более регулярное строение, чем внутренняя область: неполярные остатки почти отсутствуют, несмотря на то что аспарагин, аспарагиновая кислота, глутамин, глутаминовая кислота, лизин и аргинин составляют всего 40% всех доступных остатков [9]. Существуют исключения из общего правила на-

хождения полярных остатков снаружи, а неполярных — внутри белковой молекулы: неполярный остаток пролина предпочтительно находится на поверхности молекулы, нахождение серина и треонина безразлично, а обычно сильное предпочтение лизина (по сравнению с аргинином) находится на поверхности молекулы, вероятно, связано с энтропийным фактором [8].

Число аминокислотных остатков, совершенно недоступных растворителю в белках, как было показано, невелико (например, в панкреатическом ингибиторе трипсина из 58 остатков совершенно недоступны растворителю только четыре) и связано с общим числом остатков в молекуле соотношением

$$n^{1/3} - n_{\text{внутр}}^{1/3} = k, \quad (1)$$

где n — общее число остатков в молекуле белка, $n_{\text{внутр}}$ — число остатков, совершенно недоступных растворителю [9]. Величина k зависит только от площади поверхности глобулы ($S_{\text{пов}}$), рассчитываемой по методам, предложенным в работах [11, 12]. Для $S_{\text{пов}} = 10-20 \text{ \AA}^2$ среднее значение $k = 1,62 \pm 0,13$. Анализ трехмерных структур 19 глобулярных белков показал, что доля гидрофобных аминокислотных остатков во внутренней гидрофобной сфере тем больше, чем больше их среднее содержание во всем белке, и уменьшается при приближении к поверхности молекулы [6]. Для малых белков доля гидрофобных остатков во внутренней сфере больше, чем для больших. Распределение гидрофильных остатков аминокислот обратно распределению гидрофобных. Экспонированная область макромолекулы также неоднородна по составу: гидрофильность каждого внешнего слоя увеличивается с приближением к поверхности [6]. Возможно также нахождение гидрофобных остатков на поверхности молекулы, а части гидрофильных — внутри нее.

Отношение числа полярных аминокислотных остатков к числу неполярных (относительная полярность) определяет форму макромолекулы [13]. Чем больше относительная полярность, тем более вытянутую форму имеет молекула, приближаясь к структуре фибриллярного белка. При очень малой относительной полярности полярные остатки не полностью экранируют неполярные даже при сферической форме молекулы. Это приводит к увеличению свободной энергии системы, вследствие чего гидрофобные взаимодействия способствуют агрегации глобул, т. е. появлению четвертичной структуры белка.

Для глобулы белка характерно наличие структурных доменов, кластеров гидрофобных и гидрофильных аминокислот [14, 15], образующихся вследствие тенденции каждого аминокислотного остатка ассоциироваться в молекуле с определенными и специфическими остатками [16, 17]. Специфичность в окружении была найдена как среди полярных, так и среди неполярных остатков. Остатки, окружающие изолейцины, лейцины и валины, главным образом неполярные, а пролин — неполярный остаток — ассоциируется с полярными. Найдена высокая степень взаимной кооперативности между парами остатков глутаминовая кислота — лизин, метионин — аргинин, аспарагин — триптофан и глутамин — пролин [16].

Таким образом, нативная глобулярная структура белка в растворе определяется его аминокислотной последовательностью и образуется вследствие тенденции предпочтительного расположения аминокислотных остатков внутри или на поверхности глобулы, а также их специфического кооперирования друг с другом. Компактность формы, наличие плотно упакованного гидрофобного ядра и полярной оболочки — наиболее яркие, общие и непереносимые структурные особенности нативной структуры глобулярных белков.

Строго говоря, нативное состояние биополимера — это то, в котором он функционирует в живой биологической системе, естественных для себя условиях [18]. Однако сохранение им *in vitro* функциональной активности, качественно неотличимой от активности *in vivo*, служит убедительным критерием его нативности, а денатурация *in vitro* является истинной денатурацией [18]. Существует большое количество определений денатурации!

белков. Наиболее общее физико-химическое определение дал Жоли: «...денатурация — это любая модификация вторичной, третичной или четвертичной структуры белковой молекулы, за исключением разрыва ковалентных связей» [19]. С молекулярно-биологических позиций «денатурация — это конформационное изменение биологической макромолекулы, приводящее к необратимой или обратимой утрате ею способности к выполнению определенной биологической функции» [18].

Конформационный переход белка при денатурации протекает по кооперативному механизму. Кооперативность перехода проявляется в том, что вследствие взаимодействия между отдельными участками системы вероятности их перехода из одного состояния в другое зависят от состояния соседних участков. Этот процесс хорошо описывается модельным переходом «все или ничего» между нативным и денатурированным состояниями [2] *. Популяции этих двух состояний хорошо разделены в средней точке перехода, и гиббсовская свободная энергия состояний белка имеет два локальных минимума, соответствующих нативной и денатурированной структурам.

Если нативная конформация белка обладает свободной энергией $G_{\text{нат}}$, а денатурированная — $G_{\text{ден}}$, то величина и знак свободной энергии денатурации,

$$\Delta G_{\text{ден}} = G_{\text{ден}} - G_{\text{нат}}, \quad (2)$$

будут определять стабильность нативной конформации белка. В случае $\Delta G_{\text{ден}} > 0$ нативное состояние белка термодинамически более выгодно, чем денатурированное, и белок будет тем стабильнее, чем больше $\Delta G_{\text{ден}}$. Это случай термодинамической стабильности белка. Термодинамические аспекты стабильности нативной конформации глобулярных белков детально рассмотрены в работе Привалова [20].

Стабильность белка в растворе определяется рядом факторов, связанных со структурными характеристиками молекулы [2]: 1) увеличение конформационной энтропии (~2–6 энтропийных единиц на один аминокислотный остаток) при разворачивании белка дает существенный вклад в свободную энергию дестабилизации нативных белков; 2) водородные связи между пептидными группами в молекуле (энергия одной связи ~1,4 ккал/моль [18]) заметно стабилизируют нативную структуру белка; 3) дальнедействующие электростатические взаимодействия заряженных групп на поверхности белка в зависимости от pH могут стабилизировать (при pH, близких к изоэлектрической точке) или дестабилизировать (при крайних значениях pH) нативную конформацию макромолекулы (свободную энергию этих взаимодействий можно рассчитать и оценить эмпирически [21, 22]); 4) гидрофобное связывание неполярных аминокислотных остатков играет важную роль в стабилизации нативной конформации белков в водных растворах (свободная энергия системы при переносе алифатического радикала остатка аминокислоты из неполярного растворителя в воду увеличивается на ~2,8 ккал/моль [23]); 5) специфические сшивки полипептидной цепи (образование S—S-связей) увеличивают стабильность макромолекулы за счет уменьшения энтропии разворачивания глобулы [20]; 6) простетическая группа, образуя ковалентные, ионные или координационные связи с белком, оказывает стабилизирующее влияние на макромолекулу в целом [24, 25]; 7) внутримолекулярные связи ионного типа в глобулярных белках также стабилизируют их нативную конформацию [26–28].

Таким образом, полная свободная энергия денатурации белка состоит из энергий различных взаимодействий, указанных выше. $\Delta G_{\text{ден}}$ различных глобулярных белков при данной температуре различаются незначительно по величине (рис. 1) и при температурах, близких к физиологическим, относительно невелики: 12 ± 5 ккал/моль [20, 29].

* Для того чтобы переход был корректно проанализирован с позиции теории двух состояний и были получены истинные термодинамические параметры перехода, он должен удовлетворять ряду тестов, сформулированных в работе [2].

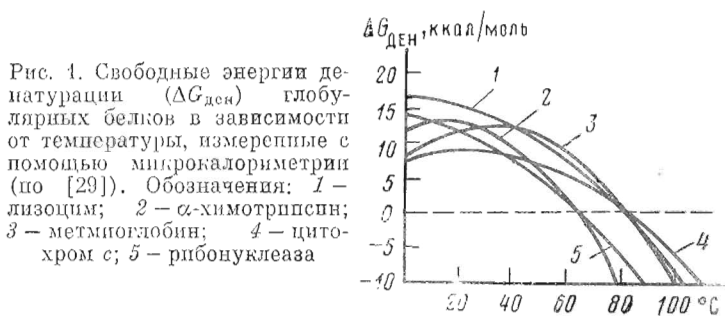


Рис. 1. Свободные энергии денатурации ($\Delta G_{\text{ден}}$) глобулярных белков в зависимости от температуры, измеренные с помощью микрокалориметрии (по [29]). Обозначения: 1 — лизоцим; 2 — α -химотрипсин; 3 — метмиоглобин; 4 — цитохром c; 5 — рибонуклеаза

В процессе развития белковой химии не раз вставал вопрос: какие из указанных выше взаимодействий являются главными и определяют стабильность нативной конформации белка? С момента открытия Полингом α -спирали водородным связям пептидных групп отводили главную роль в образовании и поддержании нативной структуры белка. После того как было показано, что другие связи в белке также важны для стабилизации белковой глобулы [10, 30], главную роль в стабилизации третичной структуры белка стали отводить гидрофобным взаимодействиям. Локальная гидрофобность стабилизирует также и вторичную структуру белков, поскольку способность каждой из 20 аминокислот к образованию α -спирали или β -складчатой структуры тем выше, чем выше локальная гидрофобность в молекуле, причем образование β -структуры в большей степени зависит от нее, чем образование α -спирали [31]. Кластеры гидрофобных аминокислотных остатков играют важную роль в архитектуре белковой молекулы, а их внутренняя мобильность обуславливает стабильность нативной конформации [32].

Несколько не умаляя значения водородных связей и гидрофобных взаимодействий в стабилизации белковой молекулы, следует подчеркнуть важность внутримолекулярных взаимодействий ионного типа, которые в некоторых случаях могут оказывать основное стабилизирующее влияние на нативную структуру белка. Например, конформационный анализ для октапептида ангиотензина показал, что наиболее стабильная конформация — это квазициклическая структура молекулы, которая образуется за счет ионной связи между гуанидиновой группой Arg-2 и карбоксильной группой C-концевого остатка [33]. Рентгеноструктурный анализ пяти белков — цитохрома b_5 , лизоцима, стафилококковой нуклеазы, эритрохромина, карбоксипептидазы — выявил в них связи ионного типа: Lys—Glu, Arg—Glu, Lys—Asp, Arg—Asp [34]. Ионные взаимодействия реализуются либо в виде единичных электростатических «скрепок», либо в составе некоторого пространственно ограниченного кластера, образованного несколькими группами зарядов различного знака. В последнем случае одна ионогенная группа может принимать участие в двух, трех или четырех ионных взаимодействиях (как остаток Arg-35 в нуклеазе). Однако авторы делают вывод, что эти связи не являются основным фактором самоорганизации глобулы, как, например, дисульфидные связи [34]. В некоторых белках существенный вклад в стабилизацию белковой глобулы вносят гидратированные ионные группы [27]. Для панкреатического ингибитора трипсина показано, что только гидрофобного связывания и плотной упаковки недостаточно для объяснения сворачивания белка в нативную конформацию. Следует принимать во внимание и электростатические взаимодействия заряженных остатков [35].

Кристаллографические исследования показали, что небольшое увеличение числа солевых связей в макромолекуле значительно увеличивает термостабильность ферредоксина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [26]. Солевая связь между Lys-13 и Glu-90 в цитохроме с ответственна за формирование закрытой структуры гемовой щели [36]. По всей вероятности, солевые связи играют важную роль в связывании гема с белком и поддержании нативной структуры других гемсодержащих белков. В целом водородные и солевые связи, гидрофобное связывание, связи с кофактора-

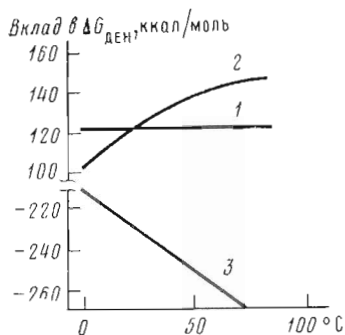


Рис. 2

Рис. 2. Влияние температуры на общие вклады в стабильность ($\Delta G_{ден}$) нативного хмотрипсиногена водородных связей (1), гидрофобного связывания (2) и конформационной энтропии (3) (по [28])

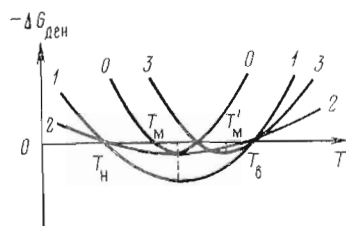


Рис. 3

Рис. 3. Гипотетические кривые зависимости свободной энергии денатурации ($-\Delta G_{ден}$) от температуры для глобулярных белков из термофилов (по [50]). Обозначения: 0 — мезофильный белок; 1 — термофильный белок с большей свободной энергией денатурации (углубление кривой 0); 2 — термофильный белок с большим температурным интервалом стабильности (выравнивание кривой 0); 3 — термофильный белок со сдвинутым максимумом стабильности (сдвиг кривой 0 от T_M до T'_M); T_H и T_B — температуры низко- и высокотемпературной денатурации, T_M — температура максимальной стабильности белка

ми или ионами металлов в совокупности определяют стабильность нативной конформации белка. Однако в конкретных случаях может доминировать тот или иной тип взаимодействия.

В случае $\Delta G_{ден} < 0$ нативная конформация белка, термодинамически невыгодная, может существовать длительное время вследствие высокого кинетического барьера трансформационного превращения. Это случай кинетической стабильности белка. Часто кинетическая стабильность свойственна денатурированным белкам по отношению к процессу ренатурации, что делает процессы денатурации практически необратимыми, хотя с точки зрения термодинамики процессы, не осложненные вторичными процессами, должны быть полностью обратимыми [37].

Существуют различные методы определения термодинамической и кинетической стабильности белков. Термодинамические параметры денатурации определяют, измеряя константы равновесия между нативной и денатурированной формами белка или теплоту денатурации. Стабильность характеризуют также средней температурой перехода в денатурированное состояние, средней концентрацией денатурирующего агента и другими параметрами. Кинетическая стабильность наиболее часто измеряется как константа скорости изменения какого-либо свойства белка во времени (КД- или УФ-спектры, флуоресценция, а для ферментов — их активность). В общем случае стабильность активности ферментов может быть неидентична стабильности всей белковой глобулы.

Одним из наиболее распространенных типов денатурации является термоденатурация. Температура оказывает следующее влияние на стабильность белка: 1) повышение температуры вызывает деструктурирование воды, и до $\sim 60^\circ\text{C}$ сила гидрофобных взаимодействий возрастает с увеличением температуры; 2) увеличение температуры делает доступными конформации белка с большей свободной энергией, увеличивая конформационную энтропию, и приводит к более развернутой форме макромолекулы; 3) с увеличением температуры ослабляются другие внутримолекулярные взаимодействия, стабилизирующие белок (солевые связи, связи с кофакторами и ионами металлов) (рис. 2) [38].

Для большинства глобулярных белков зависимость $\Delta G_{ден}$ от температуры описывается кривыми, представленными на рис. 1, и имеет максимум при температуре максимальной стабильности белка (T_M). Вместе с тем

$\Delta G_{\text{ден}}=0$ при температурах низко- и высокотемпературной денатурации (соответственно T_n и T_h , рис. 3), ниже и выше которых белок денатурирован. Для практических целей важно, что максимальная стабильность большинства глобулярных белков наблюдается в интервале температур 0–10°С, что позволяет долго хранить белки при этих температурах [39]. Кроме того, термостабильность белков резко возрастает после их лиофилизации [40].

Таким образом, общая свободная энергия стабилизации белков мала (не превышает 15–17 ккал/моль, рис. 1) и является следствием тонкого баланса между большими по энергии (см. рис. 2) внутримолекулярными стабилизирующими силами. Даже незначительное изменение этого баланса может приводить к сильному изменению стабильности белков, что будет видно при рассмотрении стабилизированных белков и ферментов.

II. Возможные корреляции между первичной структурой и стабильностью белков

В последние годы были сделаны попытки найти корреляции между стабильностью белков и их структурой. Выявление корреляции предполагает существование какого-либо одного, главного типа внутримолекулярных взаимодействий, ответственного за стабильность нативной конформации белков, что в общем случае неверно. Поэтому найденные корреляции оказались справедливыми лишь для ограниченного числа белков и ферментов сходного строения.

Вигелю предположил, что между гидрофобностью и термостабильностью белков существует корреляция [41], но это предположение не было подтверждено [42]. На примере 14 белков Боли и Бриз [43] выявили эмпирическую зависимость температуры плавления белка ($T_{\text{пл}}$)* от индекса гидрофобности белка (X_1) и среднего объема аминокислотных остатков белка (X_2):

$$T_{\text{пл}}=226,81-0,0127 X_1+3,8474 X_2. \quad (3)$$

Наибольший вклад в величину $T_{\text{пл}}$ вносит, как видно из соотношения (3), средний объем аминокислотных остатков (X_2). Из корреляционных коэффициентов была выявлена сильная тенденция остатков глутаминовой кислоты стабилизировать, а остатков серина — дестабилизировать белок по отношению к термоденатурации. Недостатком предложенной корреляции является то, что авторы не учитывали влияние гема и других внутримолекулярных взаимодействий на стабильность изученных ими гемовых белков [43].

Рассматривая большее количество белков, чем предыдущие авторы, Стельваген с сотр. [44] не обнаружили корреляции между $T_{\text{пл}}$ и X_2 , но отметили взаимосвязь между $T_{\text{пл}}$ и частичной площадью поверхности белка, доступной растворителю, выражающей как $S_{\text{нат}}/S_{\text{ден}}$. В свою очередь эта величина зависит от молекулярного веса белка: $S_{\text{нат}}=11,116 \cdot (\text{молекулярный вес})^{0,75}$ — площадь поверхности белка, доступная растворителю в нативном состоянии, а $S_{\text{ден}}=1,44 \cdot (\text{молекулярный вес})$ — общая доступная площадь поверхности белка в денатурированном состоянии. Отношение $S_{\text{нат}}/S_{\text{ден}}$ связано следующим соотношением с $T_{\text{пл}}$ (рассчитано нами из опытных данных [44]):

$$S_{\text{нат}}/S_{\text{ден}}=0,0800+0,0030 T_{\text{пл}} \text{ для мономерных белков,}$$

$$S_{\text{нат}}/S_{\text{ден}}=-0,0280+0,0032 T_{\text{пл}} \text{ для субъединичных белков.}$$

Чем больше $S_{\text{нат}}/S_{\text{ден}}$ (чем меньше молекулярный вес), тем стабильнее белок. Значения $T_{\text{пл}}$ и $S_{\text{нат}}/S_{\text{ден}}$ для 20 изученных белков хорошо удовлетворяют прямолинейным зависимостям. При одном и том же значении

* $T_{\text{пл}}$ связана с кооперативной термоденатурацией нативной структуры белка и определяется по точке перелома на кривой изменения какого-либо свойства белка (в данном случае собственного рН белка) от температуры.

$S_{нат}/S_{ден}$ величина $T_{пл}$ больше для субъединичных белков, чем для мономерных. С ростом молекулярного веса отношение $S_{нат}/S_{ден}$ падает и соответственно уменьшается термостабильность белка.

Из полученной корреляции вытекают два пути увеличения термостабильности большой полипептидной цепи: 1) ассоциация глобулярных субъединиц в олигомер; 2) сворачивание большой полипептидной цепи во множество глобулярных доменов. В обоих случаях при неизменном молекулярном весе произойдет увеличение $S_{нат}/S_{ден}$ (и $T_{пл}$). Авторы отмечают, что отклонения этой зависимости от линейной для некоторых белков могут объясняться влиянием на их стабильность таких внутриглобулярных взаимодействий, как S—S-связи, связывание ионов металлов, кофакторов и некоторых других.

Следует различать «микро-» и «макростабильности» белков [45]. «Микростабильность» характеризуется энергией, необходимой для микроразворачивания белковой глобулы, и определяется, например, по скорости водородного обмена протонов внутренней части молекулы с водой. «Макростабильность» характеризуется энергией, необходимой для макроразворачивания глобулярной структуры, и определяется из экспериментов по денатурации белков. «Микростабильность» характеризует среднюю локальную стабильность той области макромолекулы, в которой может происходить разворачивание, т. е. жесткость ее структуры. «Макростабильность» описывает стабильность всей кооперативной структуры в целом и выражается величиной $\Delta G_{ден}$.

На примере девяти белков Привалов с сотр. [45] показали, что «микростабильность» или жесткость белковой глобулы (она никогда не характеризует макромолекулу в целом) зависит от степени насыщения молекулы белка неполярными контактами, т. е. от кластеров гидрофобных групп внутри белковой структуры, и увеличивается с ростом гидрофобного ядра макромолекулы. В то же время гидрофобность белковой глобулы не влияет на «макростабильность» белка ($\Delta G_{ден}$), которая может зависеть от подвижности гидрофобных кластеров друг относительно друга [32]. На $\Delta G_{ден}$ может влиять также такой фактор, как шивка полипептидной цепи, которая уменьшает энтропию разворачивания молекулы белка (аналогично может влиять связывание кофакторов или ионов металлов).

Все приведенные работы являются попытками «нащупать» корреляцию между двумя сложными характеристиками белков: структурой и стабильностью. «Макростабильность» белков связывается с параметрами первичной структуры молекулы белка, т. е. с качеством и количеством содержащихся в ней аминокислотных остатков [43, 44], а «микростабильность» — с гидрофобностью внутренней части молекулы белка [45].

В рассмотренных работах [43, 44] стабильность авторы характеризовали температурой плавления белка. По-видимому, более правильно стабильность белков характеризуется величиной свободной энергии денатурации — $\Delta G_{ден}$, которая зависит от температуры, как показано на рис. 1. Белки могут иметь одинаковую $T_{пл}$, но различную стабильность ($\Delta G_{ден}$) при всех других температурах (см. лизоцим и цитохром с на рис. 1). Поэтому величина $T_{пл}$ вряд ли может служить объективным критерием стабильности белков. Однако именно этого авторы работ [43, 44] не учитывали. Сравнение же температурных зависимостей $\Delta G_{ден}$ для различных белков показало, что между молекулярным весом и стабильностью белка корреляция не наблюдается [20].

Рассмотренные корреляции, естественно, справедливы лишь внутри определенной группы белков сходной структуры (в частности, для гомологичных белков) и не могут быть распространены на все белки, поскольку не учитывается множество других различных факторов, определяющих стабильность нативной конформации макромолекулы. Возможно, следует искать взаимосвязь между стабильностью и третичной или даже четвертичной структурой белков. Важность решения проблемы взаимосвязи структуры и стабильности белков не вызывает сомнений и привлекает внимание многих исследователей, поскольку позволит конструировать белки с заданной стабильностью.

III. Структурные особенности ферментов из термофильных источников как причины их высокой стабильности

Микроорганизмы способны регулировать термостабильность ферментов в зависимости от температуры выращивания. При низких температурах культивирования ($<50^{\circ}\text{C}$) синтезируются мезофильные, а при высоких ($>50^{\circ}\text{C}$) — термостабильные ферменты [46, 47]. Высокая термостабильность последних в большинстве случаев хорошо коррелирует с температурными условиями существования микроорганизма [48].

Ферменты из термофилов также устойчивы по отношению к денатурации мочевиной, солянокислым гуанидином, рН и органическими растворителями [49].

Повышенная термостабильность термофильного белка по сравнению с мезофильным может быть результатом: 1) увеличения энергии активации процесса денатурации; 2) увеличения свободной энергии денатурации $\Delta G_{\text{ден}}$ (рис. 3, 1); 3) выравнивания профиля свободной энергии денатурации (рис. 3, 2); 4) сдвига профиля $\Delta G_{\text{ден}}$ (рис. 3, 3) [50]. Для большинства термофильных ферментов увеличение стабильности связано с увеличением $\Delta G_{\text{ден}}$ (углубление кривой θ до кривой 1 на рис. 3). К такому изменению $\Delta G_{\text{ден}}$ приводят дополнительные гидрофобные взаимодействия, а также водородные, солевые и S=S-связи, образующиеся в термофильных ферментах, по сравнению с мезофильными аналогами. В то же время для термофильной фосфоглицераткиназы было найдено, что $\Delta G_{\text{ден}}$ не зависит от температуры в интервале от 0 до 60°C , т. е. фермент ведет себя в соответствии с кривой 2 на рис. 3 (стабильность при низких и высоких температурах увеличивается без изменения температуры максимальной стабильности T_m и величины $\Delta G_{\text{ден}}^{\text{макс}}$) [50].

Термофильные белки и ферменты должны обладать большей как термодинамической, так и кинетической стабильностью. Поскольку по абсолютной температурной шкале различие между 35°C (средняя $T_{\text{пл}}$ для мезофильных ферментов) и 80°C (средняя $T_{\text{пл}}$ для термофильных ферментов) относительно мало ($\sim 15\%$), то даже небольшие различия в энергии активации и в свободной энергии денатурации для термо- и мезофильных ферментов могут приводить к значительным различиям в их термостабильности при незначительном различии их структур [49]. Расчет показывает, что уменьшение константы скорости термонактивации в 10 раз при 70°C требует увеличения $\Delta G_{\text{ден}}$ всего на 1,56 ккал/моль. Для увеличения $T_{\text{пл}}$ от 35 до 45°C для полипептидной цепи с M 35 000 требуется увеличить число водородных связей лишь на 3%. Различия в $\Delta G_{\text{ден}}$ (и в $\Delta G_{\text{акт}}^{\ddagger}$) для белков до 10 ккал/моль могут быть получены при замене одного или двух аминокислотных остатков в молекуле [49]. Такие изменения энергии могут наблюдаться при образовании небольшого количества дополнительных солевых или водородных связей, гидрофобных взаимодействий в термофильных белках.

Следовательно, теоретическое рассмотрение показывает, что несколько дополнительных нековалентных взаимодействий, возникающих в термофильных ферментах, могут приводить к их значительной стабилизации по сравнению с мезофильными аналогами.

Возникает вопрос: каков же механизм стабилизации белков в природе, какие структурные элементы ответственны за повышенную стабильность термофильных ферментов? Эти «ключевые» структурные элементы были выявлены при сравнении первичных (а в некоторых случаях и третичных) структур ряда термо- и мезофильных ферментов (таблица). Сравнение молекулярных структур выявляет роль отдельных аминокислотных остатков в стабилизации белковой глобулы. Это может быть ключом к пониманию общих механизмов стабилизации ферментов и взаимосвязи между структурой и стабильностью белковых макромолекул. В последнее десятилетие структура и стабильность ферментов из термофильных микроорганизмов интенсивно изучаются (см. обзор [39]).

Первичные структуры термофильного и мезофильного ферредоксинов высокогомологичны. Аминокислотная последовательность термофильного

Причины повышенной стабильности ферментов из термофильных источников по сравнению с ферментами из мезофильных источников

Фермент	Источники	Сравнение стабильности т- и м-ферментов *	Причины большей стабильности т-ферментов по сравнению с м-ферментами		Литература
			«ключевые» различия в структуре	дополнительные стабилизирующие взаимодействия в т-ферменте	
Ферредоксин	<i>C. tartarivorum</i> (м)	т-фермент при 70° С в 2 раза стабильнее м-фермента	Gln-31, Gln-44	Внешние две солевые и водородные связи	[26, 51]
	<i>C. thermosaccharolyticus</i> (т)	т-фермент при 60° С в 30 раз стабильнее м-фермента	Glu-31, Glu-44 Leu-48, Ser-45	Солевые связи и гидрофобные взаимодействия между субъединицами	[51]
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	<i>B. stearothermophilus</i> (т)		Arg-48, Phe-45	Солевые связи между субъединицами	[26]
	Дрожжи (м)		Ser-281, Gln-201		
	<i>B. stearothermophilus</i> (т)	55° С (20 мин) 75° С (20 мин) 100° С (20 мин) 59° С (15 мин)	Arg-281, Glu-201	Меж- и внутрисубъединичные солевые связи и гидрофобные взаимодействия	[52, 54]
Нейтральная протемназа	<i>B. stearothermophilus</i> (т)	84° С (15 мин)	В т-ферментах больше Leu, Ala, Glu, Arg, меньше SH-группы	Солевые связи и гидрофобные взаимодействия; связь с двумя дополнительными ионами Ca ²⁺	[55-57]
	<i>T. aquaticus</i> (т)		В т-ферменте больше гидрофобных остатков Phe, Tyr, Trp, Ile, Leu, меньше гидрофильных остатков Asx, Glx, Lys, Arg, Ser, Thr и на два атома Ca ²⁺ больше		
Термоллизин	<i>B. thermoproteolyticus</i> (т)	40° С (24 ч) 2*			
α-Ампилаза	<i>B. subtilis</i> (м)	40° С (24 ч) 2*		Большое сродство к ионам Ca ²⁺ при высоких температурах	[59]
	<i>B. stearothermophilus</i> (т)	40° С (24 ч) 2*			

Фермент	Источники	Сравнение стабильности т- и м-ферментов *	Причины большей стабильности т-ферментов по сравнению с м-ферментами		Литература
			«экстремальное» различие в структуре	дополнительные стабилизирующие взаимодействия в т-ферменте	
Энолаза	Мышцы кролика, дрожжи, <i>E. coli</i> (м)	Относительное увеличение $T_{0.5}$ для т-ферментов на 30–40° С	В т-ферментах больше Glx, Val, больше α -спиралей, меньше β -структуры; м-ферменты — димеры, т-ферменты — октамеры	Большее число водородных связей; усиление межсубъединичного взаимодействия	[60, 61]
Железо-серный белок	<i>B. stearothermophilus</i> (т), <i>T. X-1</i> (т), <i>T. aquaticus</i> УТ-1 (т), <i>T. thermophilus</i> (т)	100% (67° С, 45 мин) **		Девять S-S-связей	[62]
Глутаминсингтаза	<i>B. subtilis</i> (м)	0% (65° С, 20 мин) **		Большее число солевых и S-S-связей	[63]
β -Глюкозидаза	<i>B. stearothermophilus</i> (т)	78% (65° С, 20 мин) **	В т-ферментах меньше средняя гидрофобность, больше Asx, Glx и других полярных остатков, больше S-S-связей		
	<i>B. caldolyticus</i> (т)	89% (80° С, 20 мин) **			
Дегидрогеназы	<i>Mucor miehei</i> УН-10 (м)	0% (80° С, 5 мин) **		В т-ферменте больше углеводных остатков	[64]
	<i>Mucor miehei</i> УН-10 (т)	56% (95° С, 5 мин) **			
Лактатдегидрогеназа	Мышцы свиные (м)	60° С (5 мин)			[66]
	<i>T. thermophilus</i> (т)	95° С (5 мин)		В т-ферменте больше Arg, Ala, Leu, меньше Asp, Lys	
	<i>B. caldotenax</i> (м)	53° С (30 мин)			
	<i>B. caldotenax</i> (т)	68° С (30 мин)		В т-ферментах на 10–11 Arg больше, на 8–10 Lys меньше	[67]
Роданаза	<i>B. stearothermophilus</i> (м)	45° С (30 мин)			
	<i>B. stearothermophilus</i> (т)	77° С (30 мин)			
	<i>Thiobacillus denitrificans</i> (м)	65° С (0,5 мин)			
	<i>B. subtilis</i> (м)	65° С (4,5 мин)		Увеличение α -спиральной структуры	[49]
	<i>B. stearothermophilus</i> (т)	65° С (36 мин)			

* м- и т- — мезо- и термофильные ферменты. Во всех случаях, где не указано особо, приведена температура ($T_{0.5}$), при которой за указанное в скобках время фермент инактивируется на 50%. ** Денатурирующий агент — солянокислый гуанидин с концентрацией 0,06 (длм м) и 0,069 М (длм т). ** Приведена остаточная активность фермента при инкубировании в указанных условиях.

фермента отличается от мезофильного ферредоксина только тем, что в ней остатки Gln-31 и Gln-44 замещены на остатки Glu [51]. В результате этого в термофильном ферредоксине образуются две дополнительные (по сравнению с мезофильным) солевые связи между His-2 и Lys-29, общими для обоих ферментов, и введенными COOH-группами Glu-31 и Glu-44. Образование двух солевых связей повышает термостабильность ферредоксина при 70° С в 2 раза. Сравнение трехмерных структур различных ферредоксина подтвердило, что единственным источником повышения термостабильности в этих ферментах являются дополнительные солевые связи [26].

Повышенная стабильность термофильной триозофосфатизомеразы (см. таблицу) также обусловлена дополнительными солевыми связями на поверхности молекулы без изменения ее третичной структуры [51].

Сравнение третичных структур тетрамерных мезо- и термофильных глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ показало, что большая термостабильность термофильного фермента объясняется исключительно дополнительными солевыми связями между его четырьмя субъединицами [26]. Ser-281 и Gln-201 в мезофильном ферменте замещены на Arg и Glu в термофильном ферменте, которые образуют солевые связи в щели между симметрично расположенными субъединицами белка. Различие в скорости термоденатурации термо- и мезофильных ферментов предполагает дополнительную энергию стабилизации не больше 2 ккал/моль для ферредоксина и 5—10 ккал/моль для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Поскольку энергия одной солевой связи составляет ~1—3 ккал/моль, то нескольких таких связей достаточно для достижения повышенной термостабильности белков [26].

При сравнении свойств двух термофильных тетрамерных глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ из *Thermus aquaticus* и *Bacillus stearothermophilus* и мезофильной, имеющих на 60% гомологичные аминокислотные последовательности, обнаружена корреляция между термостабильностью и большим содержанием Ala, Leu, меньшим содержанием SH-групп и изоэлектрическими точками ферментов (4,3 и 4,8 для соответствующих термофильных и 7,0 для мезофильного) [52, 53]. Наиболее стабильный фермент из *T. aquaticus* в отличие от термофильного фермента из *B. stearothermophilus* и других мезофильных аналогов содержит только один остаток Cys, который является функционально важным [53]. Большая стабильность этих термофильных ферментов по сравнению с мезофильным обусловлена дополнительными солевыми связями как между субъединицами, так и на поверхности каждой из субъединиц, а также дополнительными гидрофобными взаимодействиями между субъединицами [54].

Нейтральная протеиназа из *Bacillus subtilis* и термоллизин из *Bacillus thermoproteolyticus* (два гомологичных фермента) сильно различаются по стабильности [55]. Для термоллизина температура, при которой фермент теряет 50% активности за 15 мин, равна 84° С, а для протеиназы — 59° С. Оба фермента сходны по специфичности, кинетическим параметрам, т. е. имеют сходную конформацию вблизи активного центра. Авторы считают, что третичные структуры этих ферментов также близки. Аминокислотный состав их сходен, хотя по содержанию лизина, аспарагина, треонина, глутамина, глицина, валина, изолейцина и лейцина они несколько различаются. Причем в С-концевой части и центре молекулы эти ферменты высокогомологичны, а основные различия найдены вблизи N-конца [56].

Следующие особенности в структуре термофильного фермента являются причиной, по мнению авторов, его высокой термостабильности: 1) термоллизин содержит на два атома Ca²⁺ больше, чем протеиназы (Ca²⁺, как известно, в большинстве случаев стабилизирует молекулы белков); 2) идентифицированы дополнительные солевые связи в трехмерной структуре термоллизина по сравнению с протеиназой; 3) в термоллизине больше гидрофобных остатков и меньше гидрофильных; 4) термоллизин содержит меньше α-спиралей. Тем не менее авторы считают пока невоз-

возможным точно определить число и природу взаимодействий, ответственных за исключительную стабильность термолизина [56]. Способность термолизина выдерживать экстремальные температуры по сравнению с мезофильным аналогом может быть связана не только с увеличением энергии активации процесса термоденатурации, но и с его способностью к более быстрой ренатурации и с большей структурной гибкостью [57]. В то же время термолизин обладает и большей термодинамической стабильностью по отношению к термоинактивации [58].

Различие в стабильности термо- и мезофильных α -амилаз из *B. steaurothermophilus*, содержащих связанные ионы Ca^{2+} , авторы объясняют как некоторыми различиями в их аминокислотном составе, так и различием в родстве ферментов к ионам Ca^{2+} при высоких температурах [59].

Разная термостабильность четырех энзимов обусловлена различиями в их аминокислотном составе и конформации молекул. Не отмечено корреляции между температурой полуинактивации этих ферментов и их гидрофобностью [60]. Сравнение трех мезофильных (димеры) и трех термофильных (октамеры) энзимов показало, что для этих ферментов температура полуинактивации увеличивается линейно с увеличением содержания в молекуле аргинина, глицина, числа водородных связей, в то время как зависимость этого параметра от общего содержания глутаминовой и аспарагиновой кислот проходит через максимум [61]. Предполагается, что более сильное межсубъединичное взаимодействие в термостабильных ферментах обеспечивает дополнительную их стабилизацию по сравнению с термолабильными.

Сверхстабильность железо-серного белка из *T. thermophilus* может быть объяснена наличием в молекуле девяти S—S-связей и двух железо-серных кластеров [62].

Термофильная и сверхтермофильная глутаминсинтетазы мало чем отличаются от мезофильной по субстратной специфичности, содержанию α - и β -структур, третичной и четвертичной структуре, но заметно различаются по термостабильности [63]. Термофильные ферменты содержат больше полярных аминокислотных остатков, большее число S—S-связей и имеют меньшую среднюю гидрофобность по сравнению с мезофильной глутаминсинтетазой.

Высокая стабильность целлюлаз из термофильных грибов *Hemicola insolens* УН-8 обусловлена, как показано, большим содержанием в ферменте углеводных остатков (26—39%), состоящих главным образом из N-ацетилглюкозамидов [64]. Различие в термостабильности двух β -глюкозидаз из термофильного гриба *Mucor miehei* УН-10 также объясняется только большим содержанием углеводных остатков в термофильном ферменте по сравнению с мезофильным при одинаковых аминокислотном составе, изоэлектрических точках и каталитических свойствах [65].

Термофильная и мезофильная дегидрогеназы имеют сходные каталитические свойства и реакционную способность по отношению к SH-реагентам [66]. Структуры их субъединиц также мало различаются. Это говорит о сходстве их активных центров, но о некотором различии в структуре белка, что делает термофильный фермент более стабильным. Температура полуинактивации пропорциональна содержанию Asp, Lys. В то же время не выявлено заметных различий в средней гидрофобности и числе аминокислот, участвующих в образовании водородных и солевых связей для термо- и мезофильных дегидрогеназ.

Термофильная и мезофильная лактатдегидрогеназы имеют сходный аминокислотный состав, однако термофильный фермент содержит на 10—11 остатков Arg больше и на 8—10 остатков Lys меньше, чем мезофильный [67].

Интересная корреляция между структурой и термостабильностью была обнаружена (см. таблицу) для роданазы, выделенной из различных источников [49].

В феррицитохроме с-552 из термофильных микроорганизмов связь железа гема с лигандным метионином очень устойчива к денатурации под действием рН, солянокислого гуанидина и нагреванию по сравнению

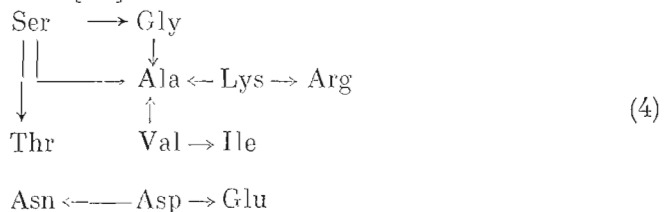
с той же связью в цитохроме с из сердца лошади [68]. Поскольку в обоих цитохромах железо гема координируется двумя сильными лигандами — гистидином и метионином, различие в стабильности гем-лигандной связи в обоих ферментах, вероятно, связано с различным вкладом других аминокислотных остатков в стабилизацию связи гем-белок.

Ценная информация о роли отдельных аминокислотных остатков в стабилизации белковых макромолекул была получена при изучении влияния точечной мутации (замены одного-двух аминокислотных остатков) на структуру и стабильность белков. Элвелл с сотр. [69] сравнили термостабильность (температурные зависимости $\Delta G_{ден}$ и $T_{пл}$) для лизоцима фага T4 (полипептид без S—S-связей) и лизоцима из двух его мутантов, где один или три остатка Trp в исходном ферменте заменены на Tyr. Хотя конформация молекулы почти не изменяется, замена одного Trp-138 уменьшает температуру плавления и изменяет температурную зависимость $\Delta G_{ден}$ так, что стабильность белка уменьшается во всем интервале температур от 0 до 60°С (при 20°С в 2 раза). Последующая замена еще двух остатков Trp на Tyr уже незначительно влияет на зависимость $\Delta G_{ден}$ от температуры (уменьшает $\Delta G_{ден}$), хотя $T_{пл}$ уменьшается. Этот факт еще раз указывает на то, что температура плавления не может служить объективной характеристикой стабильности белков. Аналогично эти мутации влияют на стабильность лизоцима в солинокислом гуанидине [70]. Следовательно, ключевым для стабилизации нативной структуры лизоцима является остаток Trp-138. При замене Glu-128 на Lys, Arg-96 на His и Ala-146 на Thr происходит уменьшение температуры плавления лизоцима [71, 72]. Наибольший дестабилизирующий эффект ($T_{пл}$ уменьшается на 14°С) оказывает замена Arg-96 на His. По мнению авторов, это объясняется ослаблением гидрофобных взаимодействий в молекуле и возможным разрушением α -спирали между остатками 82—90 [71].

Замещение Glu-49 на Met в α -субъединице триптофансинтетазы из *E. coli* дает более стабильный мутант по отношению к термоденатурации (в 2 раза при 58°С) и к денатурации мочевиной [73]. Структура фермента при этом не изменяется. По мнению авторов, усиление гидрофобных взаимодействий в мутанте при замене гидрофильного остатка Glu, находящегося в гидрофобном ядре, на Met обеспечивает наблюдаемый эффект стабилизации. При замене в глутаминсинтетазе Gly-211 на Arg или Glu термостабильность ($\Delta G_{ден}$) незначительно увеличивается (на 0,1 и 0,6 ккал/моль соответственно при 59°С) [74]. Предполагают, что Gly-211 находится на поверхности молекулы и в его окружении нет заряженных остатков, поэтому замещение вызывает незначительные изменения структуры и стабильности фермента.

Работы по точечным мутациям показывают, что даже замена одного аминокислотного остатка вызывает заметное изменение стабильности белка. К сожалению, при мутации выбор заменяющихся остатков довольно случаен, поэтому сравнение ферментов-мутантов с исходными не дает возможности выявить истинно «ключевые» остатки, способные к образованию дополнительных внутримолекулярных связей, стабилизирующих белок, как это происходит при синтезе термофильных ферментов в природе.

При сравнении аминокислотного состава ферредоксинов, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ и лактатдегидрогеназ из термофилов с их мезофильными аналогами были выявлены следующие направления преимущественного обмена аминокислотных остатков при переходе от мезо- к термофильным ферментам [75]:



Указанные замены увеличивают гидрофобность, спиральобразующую способность остатков и их тенденцию к образованию β -структуры. При этом несколько увеличивается объем внутренних остатков и достигается лучшая упаковка структуры белковой глобулы.

Анализ аминокислотного состава 14 термофильных и 207 мезофильных ферментов показал, что термофильные ферменты содержат больше Arg, Glx, Gly, но меньше Asx и Ser [76]. Термофильные ферменты характеризуются также большим содержанием α -спиралей, но меньшим — β -структуры, чем мезофильные аналоги. Увеличенное содержание Glu в термофильных ферментах улучшает их способность связывать ионы металлов. Возможно, что это одна из главных причин повышенной стабильности термофильных ферментов [76].

На примере 34 термо- и 208 мезофильных ферментов установлена положительная корреляция между алифатическим индексом белка и его термостабильностью [77]. Алифатический индекс определяли по формуле

$$A = X_{Ala} + aX_{Val} + b(X_{Ile} + X_{Leu}), \quad (5)$$

где $a = 2,9 \pm 0,1$; $b = 3,9 \pm 0,1$, а X — содержание соответствующих остатков в белке (в молярных процентах). Поскольку содержание этих остатков в термофильных ферментах значительно больше, чем в мезофильных, каждый термофильный фермент имеет большой алифатический индекс, чем его мезофильный аналог.

Приведенные данные показывают разнообразие причин, приводящих к более стабильному производному данного фермента, в отличие, например, от термофильных нуклеиновых кислот, характеризующихся главным образом повышенным содержанием G·C-пар или термофильных липидов, состоящих из более насыщенных жирных кислот с более удлинённой и разветвленной углеводородной цепочкой [48].

Анализ работ по выявлению структурных особенностей термофильных ферментов, ответственных за их высокую стабильность по отношению к денатурации теплом, pH, мочевиной, позволяет сформулировать некоторые общие выводы.

1. Термофильные ферменты и их мезофильные аналоги имеют сходные третичные структуры, молекулярный вес и каталитические свойства. Их аминокислотные последовательности гомологичны и различаются лишь строением нескольких аминокислотных остатков, которые ответственны за различия в стабильности.

2. Наиболее часто встречающиеся различия в аминокислотном составе термофильных белков и ферментов: уменьшенное содержание лизина, серина и аспарагиновой кислоты, повышенное содержание аргинина и групп, образующих α -спираль: аланина, лейцина, глутаминовой кислоты, а также аспарагина. Для термофильных ферментов характерно уменьшение числа SH-групп, поскольку они быстро окисляются и могут образовывать непродуктивные S—S-связи. Как правило, ферменты с большим содержанием SH-групп весьма лабильны.

3. Для термофильных ферментов характерно меньшее содержание β -структуры и большее значение алифатического индекса (повышенная доля алифатических остатков), хотя и не обнаруживается положительной корреляции между термостабильностью и гидрофобностью макромолекулы.

4. Главный вклад в стабилизацию термофильных ферментов вносят дополнительные (по сравнению с мезофильными ферментами) солевые, водородные, S—S-связи и гидрофобные взаимодействия, как внутримолекулярные, так и межсубъединичные, хотя в конкретных случаях относительное влияние каждого из стабилизирующих факторов может быть различным.

Дальнейший прогресс наших знаний о структуре и свойствах термо- и мезофильных ферментов и особенно получение и анализ трехмерных структур белков позволит более определенно интерпретировать различия в стабильности этих ферментов на молекулярном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хинпель И., Шлейх Т. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 320—480.
2. Брандс Дж. Ф. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 174—254.
3. Nemethy G., Scheraga H. A. Quart. Rev. Biophys., 1977, v. 10, № 3, p. 240—352.
4. Karplus M., McCammon J. A. CTC Crit. Rev. Biochem., 1981, v. 9, № 4, p. 293—349.
5. Fisher H. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, v. 51, № 6, p. 1285—1291.
6. Meirovitch H., Scheraga H. A. Macromolecules, 1980, v. 13, № 6, p. 1406—1414.
7. Kuntz I. D. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 11, p. 4009—4012.
8. Wertz D. H., Scheraga H. A. Macromolecules, 1978, v. 11, № 1, p. 9—15.
9. Janin J. Nature, 1979, v. 277, № 5696, p. 491—492.
10. Tanford Ch. J. Amer. Chem. Soc., 1962, v. 84, № 22, p. 4240—4247.
11. Richards F. M. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, v. 6, p. 151—176.
12. Wodak Sh. J., Janin J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 4, p. 1736—1740.
13. Волькенштейн М. В. Физика ферментов. М.: Наука, 1967, с. 24—36.
14. Meirovitch H., Scheraga H. A. Macromolecules, 1981, v. 14, № 2, p. 340—345.
15. Wodak Sh. J., Janin J. Biochemistry, 1981, v. 20, № 23, p. 6544—6552.
16. Manavalan P., Ponnuswamy P. K. Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 184, № 2, p. 476—487.
17. Ponnuswamy P. K., Prabhakaran M., Manvalan P. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 623, № 2, p. 301—316.
18. Кушнер В. П. Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров. Л.: Наука, 1977, с. 6—13.
19. Жолт М. Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968, с. 11—12.
20. Privalov P. L. Adv. Protein Chem., 1979, v. 33, p. 167—241.
21. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. М.: Химия, 1966, с. 518—595.
22. Ламри Р., Бултонен Р. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 7—173.
23. Джейкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 303—331.
24. Fisher W. R., Taniuchi H., Anfinsen Ch. B. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 9, p. 3188—3195.
25. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. Выхимия, 1975, т. 40, № 2, с. 297—301.
26. Perutz M. F. Science, 1978, v. 201, № 4362, p. 1187—1191.
27. Лихтенштейн Г. И. В кн.: Состояние и роль воды в биологических объектах. М.: Наука, 1967, с. 101—112.
28. Vincent J.-P., Chicheportiche R., Lazdunski M. Eur. J. Biochem., 1971, v. 23, № 3, p. 401—411.
29. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. J. Mol. Biol., 1974, v. 86, № 3, p. 665—684.
30. Kauzman W. Adv. Protein Chem., 1959, v. 14, p. 1—63.
31. Kanehisa M. I., Tsong T. Y. Biopolymers, 1980, v. 19, № 9, p. 1617—1628.
32. Wüthrich K., Wagner G., Richarz R., Braun W. Biophys. J., 1980, v. 32, № 1, p. 549—560.
33. Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Галактионов С. Г. В кн.: Межмолекулярное взаимодействие и конформации молекул. Тез. докл. III Всес. симп. Пущино, 1976, с. 19—20.
34. Ахрем А. А., Родионов М. А., Галактионов С. Г. Вестн. АН БССР. Сер. хим., 1977, № 6, с. 122—123.
35. Levitt M., Warshel A. Nature, 1975, v. 253, № 5494, p. 694—698.
36. Osheroff N., Borden D., Koppenol W. H., Margoliash E. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 4, p. 1689—1697.
37. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, v. 47, № 9, p. 1309—1314.
38. Brandis J. F. In: Thermobiology. London -- New York etc.: Acad. Press, 1967, p. 25—72.
39. Schmid R. D. Adv. Biochem. Eng., 1979, v. 12, p. 41—118.
40. Fujita Y., Noda Y. Int. J. Peptide Protein Res., 1981, v. 18, № 1, p. 12—17.
41. Bigelow Ch. C. J. Theor. Biol., 1967, v. 16, № 2, p. 187—211.
42. Goldsack D. E. Biopolymers, 1970, v. 9, № 2, p. 247—252.
43. Bull H. B., Breese K. Arch. Biochem. and Biophys., 1973, v. 158, № 2, p. 681—686.
44. Stellwagen E., Wilgus H. Nature, 1978, v. 275, № 5678, p. 342—343.
45. Privalov P. L., Tsalkova T. N. Nature, 1979, v. 280, № 5724, p. 693—696.
46. Habertich H.-U., Zuber H. Arch. Microbiol., 1974, v. 98, № 2, p. 275—287.
47. Küttner G. A. S., Bekheit abd et Samei M., Sauer G. Acta biol. Med. Germ., 1979, B. 38, № 10, S. K19—K24.
48. Билай Т. И. Термостабильные ферменты грибов. Киев: Наукова думка, 1979, с. 245.
49. Atkinson A. J. Appl. Chem. Biotechnol., 1976, v. 26, № 10, p. 577—578.
50. Nojima H., Iwai A., Oshima T., Noda H. J. Mol. Biol., 1977, v. 116, № 3, p. 429—442.
51. Perutz M. F., Raidt H. Nature, 1975, v. 255, № 5505, p. 256—259.
52. Hocking J. D., Harris J. I. In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel. Stuttgart etc.; Birkhäuser Verlag, 1976, p. 121—133.
53. Hocking J. D., Harris J. I. Eur. J. Biochem., 1980, v. 108, № 2, p. 567—580.
54. Walker J. E., Wonacott A. J., Harris J. I. Eur. J. Biochem., 1980, v. 108, № 2, p. 581—586.
55. Pangburn M. K., Levy P. L., Walsh K. A., Neurath H. In: Enzymes and proteins from

- thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 19–30.
56. *Grandi C., Vita C., Dalzoppo D., Fontana A.* Int. J. Peptide Protein Res., 1980, v. 16, № 4, p. 327–338.
 57. *Barach J. T., Adams D. M.* Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 485, № 2, p. 417–423.
 58. *Weaver L. H., Kester W. R., Ten Eyck L. F., Tatthews B. W.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 31–39.
 59. *Yutani K.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 91–103.
 60. *Stellwagen E., Barnes L. D.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 223–227.
 61. *Boccu E., Veronese F. M., Fontana A.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 229–236.
 62. *Ohnishi T., Blum H., Sato S., Nakazawa K., Hon-nami K., Oshima T.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 2, p. 345–348.
 63. *Welder F. C., Hoffman F. M., Kenney R., Carfi J.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 187–197.
 64. *Hayashida Sh., Yoshioka H.* Agric. and Biol. Chem., 1980, v. 44, № 3, p. 481–487.
 65. *Yoshioka H., Hayashida Sh.* Agric. and Biol. Chem., 1981, v. 45, № 3, p. 571–577.
 66. *Oshima T., Sakaki Y., Wakayama N., Watanabe K., Ohashi Z., Nishimura S.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 273–289.
 67. *Frank G., Habertich H.-U., Schaer H. P., Tratschin J. D., Zuber H.* In: Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Basel, Stuttgart etc.: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 375–389.
 68. *Hon-nami K., Oshima T.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 25, p. 5693–5697.
 69. *Elwell M. L., Schellman J. A.* Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 494, № 2, p. 367–383.
 70. *Elwell M. L., Schellman J. A.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 580, № 2, p. 327–338.
 71. *Grütter M. G., Hawkes R. B., Matthews B. W.* Nature, 1979, v. 277, № 5698, p. 667–669.
 72. *Schellman J. A., Lindorfer M., Hawkes R., Grütter M.* Biopolymers, 1981, v. 20, № 9, p. 1989–1999.
 73. *Yutani K., Ogasahara K., Sugino Y., Matsushiro A.* Nature, 1977, v. 267, № 5608, p. 274–275.
 74. *Matthews C. R., Crisanti M. M., Gepner G. L., Velecelebi G., Sturtevant J. M.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 7, p. 1290–1293.
 75. *Argos P., Rossman M. G., Grau U. M., Zuber H., Frank G., Tratschin J. D.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 25, p. 5698–5703.
 76. *Singleton R., Middaugh Ch. R., MacElroy R. D.* Int. J. Peptide Protein Res., 1977, v. 10, № 1, p. 39–50.
 77. *Ikai A.* J. Biochem., 1980, v. 88, № 6, p. 1895–1898.

Поступила в редакцию
28.IV.1982

STRUCTURE — STABILITY RELATIONSHIP FOR PROTEINS AND ENZYMES¹ FROM MESOPHILIC AND THERMOPHILIC SOURCES

KUTUZOVA G. D., UGAROVA N. N., BERESIN I. V.

*Chair of Chemical Enzymology, Chemistry Department,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The review considers major structural factors ensuring formation and stabilization of the globular structure of protein macromolecules in solution, location of various amino acid residues in proteins and contributions of different interactions into stabilization of native conformations of macromolecules. The primary structure — thermostability correlations reported in literature for proteins were analyzed and found to have inherent limitations. Comparison of the known structures for enzymes from meso- and thermophilic sources has revealed the major structural features of enzymes from thermophiles that are responsible for their high stability. There are: lowered content of lysine, serine, asparagine, cysteine; increased content of arginine and α -helix-promoting residues and a great role of aliphatic index of a protein. Analysis of literature indicates that the thermophilic enzyme stabilization owes to formation of a small number of additional salt or hydrogen bonds, and to hydrophobic interactions arising upon substitution of some amino acid residues in mesophilic enzymes.