

ГОРИЗОНТЫ БИОХИМИИ

ГОРИЗОНТЫ  
БИОХИМИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО

«МИР»

# HORIZONS IN BIOCHEMISTRY

Albert Szent-Györgyi Dedicatory Volume  
Edited by  
MICHAEL KASHA AND BERNARD PULLMAN

ACADEMIC PRESS NEW YORK LONDON

1962

# ГОРИЗОНТЫ БИОХИМИИ

*Перевод с английского*

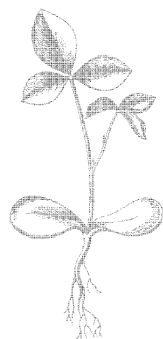
А. Ю. БОРИСОВА, Ю. В. МОРОЗОВА,  
Л. А. ОСТЕРМАНА, Н. А. РАЙСКОЙ

*Под редакцией и с предисловием*

*проф. Л. А. ТУМЕРМАНА*

Издательство «МИР»

Москва 1964



Scan AAW

Книга содержит ряд проблемных статей по различным вопросам молекулярной биологии (биохимическая эволюция, молекулярная генетика, биохимический катализ, квантовая биология). В написании книги приняли участие крупнейшие ученые мира: Дж. Бернал, М. Кальвин, Л. Полинг, Л. Кребс, А. Корнберг, А. Ленингер и др. Статьи представляют собой не обычные обзоры экспериментальных данных, а содержат яркую характеристику современного состояния и перспектив той или иной проблемы в свете общего развития всей молекулярной биологии.

Предназначена для биологов всех специальностей, в том числе для студентов старших курсов и аспирантов, а также для физиков, химиков и математиков.

## ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Предлагаемая вниманию советского читателя книга «Горизонты биохимии» представляет собой сборник статей, выпущенных в ознаменование 70-летнего юбилея Альберта Сцент-Дьёрдьи — выдающегося исследователя и одного из глубоких и интересных современных мыслителей в области биохимии, биофизики и биологии вообще. В сборник включены 28 статей, написанных крупнейшими специалистами в самых разнообразных областях физико-химической биологии. Этим объясняется чрезвычайное разнообразие тем, освещенных в отдельных статьях, — начиная с проблем биохимической эволюции и кончая основами квантовой биохимии. Среди них читатель найдет ряд статей, посвященных вопросам молекулярной генетики, механизму ферментативного катализа, физико-химическим свойствам биополимеров, механизмам преобразования энергии в живых системах, свойствам воды и ряду других вопросов.

Такое разнообразие тем соответствует широте и разнообразию круга научных интересов того, кому эта книга посвящена. В своей последней книге «Введение в субмолекулярную биологию», вышедшей недавно в русском переводе (издательство «Наука», 1964), Сцент-Дьёрдьи рассказывает о своем научном пути. «Я начал свои исследования в области гистологии. Не удовлетворившись той информацией о жизни, какой могла снабдить меня морфология клетки, я обратился к физиологии. Найдя физиологию слишком сложной, я занялся фармакологией, где по крайней мере один из партнеров — лекарственное средство — прост по своей природе. Убедившись, что рассматриваемая ситуация все еще слишком сложна, я обратился к бактериологии. Найдя и бактерии слишком сложными, я спустился на молекулярный уровень, занявшись химией и физической химией. Вооруженный приобретенным опытом, я принялся за изучение мышцы. После 20 лет работы я пришел к заключению, что для понимания мышцы необходимо спуститься на электронный уровень, законы которого регулируются волновой механикой». Поэтому неудивительно, что в обширном круге фундаментальных проблем биологии и биохимии вряд ли можно найти вопросы, которые не «резонировали» бы каким-то образом с научными интересами человека, прошедшего в науке столь сложный и извилистый путь и достигшего больших успехов на всех этапах этого пути.

При указанном выше разнообразии затронутых в книге тем поистине поразительно то внутреннее единство, которым эта книга пронизана. Читая ее, порой забываешь, что она написана 28 авторами — специалистами

в самых различных областях науки. Кажется, что читаешь книгу одного автора с необычайно широкой эрудицией и единой точкой зрения на суть разнообразных рассматриваемых в книге вопросов.

Это внутреннее единство книги, отсутствие в ней эклектичности, которой можно было бы ожидать от «сборника статей», объясняется, как мне кажется, тем, что вся книга по своему духу является глубоко «сцент-дъёрдвевской». Она свидетельствует о том, как глубоко проникли в сознание современных исследователей те общие идеи, провозвестником которых был Сцент-Дъёрдъ, и какое огромное стимулирующее влияние имели эти идеи.

Подобно Фаусту Сцент-Дъёрдъ стремился проникнуть в суть того загадочного процесса, который мы называем жизнью. Его целью всегда было понять «...Вселенной внутреннюю связь...».

Какова же та важнейшая общая идея, которую вынес Сцент-Дъёрдъ из своих странствий и которую он с таким блеском пропагандирует в своих книгах? Это мысль о том, что понимание биологической функции невозможно без перехода в новое «измерение» — мир субмолекулярных и супрамолекулярных явлений, управляемых не законами классической, а законами квантовой физики.

История развития биохимии, говорит Сцент-Дъёрдъ, проста и логична. Если мы хотим от описания структуры химических соединений и изменений этой структуры, происходящих при простых реакциях в гомогенной среде (растворе), перейти к пониманию функций живого организма, то неизбежно придется отказаться от наивного, «лукрецианского», как называет его Сцент-Дъёрдъ, представления об атомах, как о неделимых «кирпичиках» 92 различных видов, символически изображаемых буквами латинского алфавита, и о молекулах как об агрегатах таких кирпичиков, связи между которыми символизируются черточками, соединяющими эти буквы. Подобный подход был закономерен в конце прошлого века, когда создавалась современная биохимия, и до поры до времени он обеспечивал ее блестящие успехи и достижения, темп накопления которых еще и сейчас достаточно высок. Но уже видны рубежи, за которыми этот подход бессилён. Проблемы, остающиеся нерешенными, это проблемы функционирования сложных систем, которые нельзя выразить на языке букв и черточек. «Каким образом, — спрашивает Сцент-Дъёрдъ, — можно было бы выразить в этих терминах такую реакцию, как мышечное сокращение, основным продуктом которой является не вещество, а работа?»<sup>1</sup> Для понимания тонких биологических функций необходимо учитывать те специфические квантовомеханические явления, которые разыгрываются в новом, электронном мире субатомных и супраатомных явлений.

Свою «Биоэнергетику» (Физматгиз, 1961) Сцент-Дъёрдъ закончил утверждением: «Я не сомневаюсь в том, что наш век будет свидетелем глубокой

---

<sup>1</sup> А. Сцент-Дъёрдъ и, Введение в субмолекулярную биологию, изд. «Наука», М., 1964, стр. 23.

революции в развитии биологии, установления квантовомеханической биохимии, построенной над зданием лукрецианской биохимии». «Горизонты биохимии» являются свидетельством того, как быстро — быстрее, вероятно, чем предполагал сам Сцент-Дьёрдьи, — осуществляется это предсказание. Становление квантовой биологии — это или прямая тема многих разнородных по своему конкретному содержанию статей, вошедших в эту книгу, или «подтекст» статей, в которых проблемы квантовой биологии как будто явно не ставятся. По существу, эта книга — книга о становлении новой, субмолекулярной биологии. Следить за становлением этой новой науки захватывающе интересно, и даже по одному этому можно думать, что книга вызовет горячий интерес у всех биологов, биохимиков и биофизиков. Особенно полезна, как мне кажется, будет эта книга молодым научным работникам, чье мышление еще сохранило достаточную пластичность, дающую им возможность оторваться от «традиционных» путей и смело пойти по новым путям, ведущим к «горизонтам науки».

Этим молодым научным работникам, ищущим путей применения физических идей и методов к решению биологических проблем, книга будет очень полезна и в другом отношении. За очень небольшими исключениями, статьи этой книги не представляют собой обычных сводок или обзоров литературы по тому или иному вопросу. Они дают написанную широкими мазками общую картину положения дел в данной области, отражающую личную точку зрения автора, картину, устремленную именно к перспективам, «горизонтам» науки. Написанные крупнейшими специалистами, выдающимися учеными, пролагающими новые пути в исследовании данной проблемы, эти статьи не только вводят читателя в проблему, но и содержат множество указаний на возможные точки приложения новых методов и новых идей. Стимулирующее и вдохновляющее влияние этой книги на научное развитие молодых — да и не только молодых — ученых, работающих или стремящихся работать в области физико-химической биологии, представляется мне несомненным.

В рамках этого предисловия я не могу, конечно, останавливаться на содержании и характере всех или хотя бы даже некоторых статей этой книги. Да в этом, вероятно, и нет надобности. Мне хочется лишь привлечь внимание читателя к статье Б. Коммонера «Является ли ДНК самовоспроизводящейся молекулой?»

В современной молекулярной биологии положение о том, что молекула ДНК является самовоспроизводящейся, т. е. что в процессе репликации генетическая специфичность (последовательность нуклеотидов) во вновь сформированной молекуле определяется всецело *только* последовательностью нуклеотидов в исходной молекуле-матрице, принимается всеми как исходный и незыблемый факт. Экспериментальным фундаментом этой теории является установление Уотсоном и Криком двуспиральной структуры молекулы ДНК, которая служит *моделью* того, как *могло бы* происходить это самовоспроизведение. И хотя сам создатель этой теории Крик



называл положение о том, что белки не вносят никакой информации в синтез ДНК, «центральной догмой» теории, подчеркивая умозрительный характер этого положения, однако серьезных попыток проверить логический и экспериментальный базис теории было сделано очень мало.

Подвергнув эту концепцию логическому и экспериментальному анализу, Коммонер пришел к выводу, что нет никаких прямых экспериментальных доказательств того, что ДНК реплицируется путем самовоспроизведения, т. е. что последовательность нуклеотидов в продукте определяется только их последовательностью в родительской молекуле. «Однако», по его мнению, «новые данные о генетических функциях ДНК противоречат концепции эпигенеза»<sup>1</sup>. Он сближает далее процесс репликации ДНК с автокаталитическими механизмами, несущими в себе зачатки репликации и осуществляющими «синтез искусственных полимеров за счет линейного наращивания, а не путем матричного копирования, причем специфичность полимеров определяется частично свойствами реагирующей системы, а не только структурой исходной молекулы»<sup>2</sup>.

Я не беру на себя смелость судить о том, в какой мере прав в своих выводах Коммонер. Но независимо от того, в какой мере он прав и даже прав ли он вообще, предпринятая им попытка подвергнуть критическому анализу исходные положения современной молекулярной генетики представляется мне чрезвычайно важной и своевременной. Вокруг вопросов, поднятых Коммонером, несомненно, разыграется обширная дискуссия, в которой должны сказать свое слово и биологи, особенно биохимики, и физики. Плодотворность такой дискуссии представляется мне несомненной, и я надеюсь, что опубликование статьи Коммонера в книге, которая получит широкое распространение среди всех, интересующихся проблемами физико-химической биологии, привлечет к этим вопросам внимание ученых.

*Л. А. Гумерман*

---

<sup>1</sup> См. настоящий сборник, стр. 246.

<sup>2</sup> См. настоящий сборник, стр. 253.

# АЛЬБЕРТ СЦЕНТ-ДЬЁРДЬИ И СОВРЕМЕННАЯ БИОХИМИЯ

Р. ВЮРМСЕР

Как современнику Альберта Сцент-Дьёрдьи, мне довелось изо дня в день следить за его важными работами в области биохимии в период между двумя мировыми войнами, а затем и в период становления современной биохимии.

Сцент-Дьёрдьи начал свою исследовательскую работу, еще будучи студентом-медиком, в лаборатории своего дяди — гистолога М. Ленгосека. Однако это была лишь дань семейной традиции, и вскоре он «почувствовал себя неудовлетворенным тем, что могли ему сказать о жизни мертвые ткани». В течение ряда лет первая мировая война и последовавшие за ней события не позволяли ему работать на избранном им поприще в Венгрии. Только после странствований по университетам Польши, Германии и Голландии ему удалось наконец выполнить свои первые биохимические работы в лаборатории Гамбургера в Гронингене.

Это был период, когда Мейергоф после исследований Хилла начал свою работу по изучению химии мышцы, работу, которой было суждено впоследствии привести к глубокому пониманию процессов гликолиза и роли фосфатных связей. В те годы наиболее дискуссионными были вопросы о механизме окисления в тканях. Существовали две противоположные теории — теория Варбурга и теория Виланда. Определяется ли по существу каталитический процесс активацией водорода дегидрогеназами Тунберга или активацией кислорода «дыхательным ферментом» Варбурга? Сегодня такой вопрос кажется странным, ибо мы привыкли к мысли, что необходима активация обоих типов. Но именно Сцент-Дьёрдьи наиболее убедительно доказал это [2]. Вскоре после этого были выяснены основные черты процессов биологического окисления. В то время как Кейлин показал, что «дыхательный фермент» представляет собой катализатор, действующий на цитохромы, Сцент-Дьёрдьи обратил свое внимание на промежуточные переносчики водорода. Открыв снова и независимо козимазу Эйлера, он нашел вслед за этим «цитофлав» [3], строение которого позже было установлено Куном. В конечном счете исследования растительных тканей позволили Сцент-Дьёрдьи выделить и идентифицировать гексуроновую кислоту, которая впоследствии получила название аскорбиновой кислоты [4, 5] и оказалась не чем иным, как витамином С [6].

Последняя работа, за которую Сцент-Дьёрдьи был удостоен Нобелевской премии, была начата в маленьком здании в Гронингене, а затем продолжалась в Кембридже, куда Гопкинс пригласил его для работы в своей

лаборатории, бывшей в то время подлинной Меккой для биохимиков. Сцент-Дьёрдьи вернулся в Венгрию в 1930 г., и здесь, в Институте медицинской химии университета в Сегеде, заканчивая исследования аскорбиновой кислоты, он с группой талантливых молодых ученых открыл каталитическое действие фумаровой кислоты на тканевое дыхание [7, 8].

Дыхание гомогената грудной мышцы голубя, очень интенсивное вначале, с течением времени постепенно затухает, но его можно усилить до исходного уровня добавлением минимальных количеств сукцината или фумарата. Такой процесс, несомненно, является каталитическим, так как количество добавленной дикарбоновой кислоты не находится в стехиометрическом отношении к количеству потребленного после ее прибавления кислорода. В то время это была совершенно новая идея. Катализатором служил не фермент, а парафермент — метаболит. В предложенной схеме водород донора, например углевода, восстанавливает первую из дикарбоновых кислот — щавелевоуксусную кислоту; образующаяся при этом яблочная кислота восстанавливает фумаровую кислоту до янтарной; янтарная кислота в свою очередь отдает водород цитохромам. Эта основная концепция была модифицирована и дополнена после того, как Кребс выявил важную роль лимонной кислоты. Однако вместе с Болдуином [1] мы должны признать, что все наши современные знания об аэробном метаболизме основаны на этих работах Сцент-Дьёрдьи с гомогенатом грудной мышцы голубя.

Дыхание исключительно важно для организма. Тем не менее даже в жизни аэробных организмов огромное значение имеют процессы, происходящие в отсутствие свободного кислорода. Процессы синтеза представляют собой не что иное, как окислительно-восстановительные реакции, переплетающиеся с процессами конденсации и гидролиза. Отмечу мимоходом, что именно для того, чтобы понять эту связь, я посвятил так много лет определению окислительно-восстановительных потенциалов метаболических систем. Свободный кислород имеет значение только на последнем этапе пути водорода через систему последовательных переносчиков. На всех предыдущих этапах имеется свободная энергия для компенсации эндергонических процессов. Сцент-Дьёрдьи подчеркивал экономичность таких последовательных этапов окисления. Клетка не могла бы использовать без значительных потерь большие количества энергии, освобождающиеся при сжигании водорода, который содержится в питательных веществах, если бы этот процесс происходил сразу. Она «расплачивается мелкой монетой» и поэтому избегает потерь [9].

Прямое обнаружение быстрого обмена водорода между различными метаболитами интересно и с другой точки зрения. Такой перенос водорода, происходящий в результате случайного обмена между множеством доноров и акцепторов, обуславливает тот или иной окислительно-восстановительный уровень внутриклеточных процессов, который, как я полагаю, играет определенную роль в поддержании химической организации клетки.

В период между двумя мировыми войнами биохимия обогатилась очень важными сведениями о взаимозависимости разнообразных метаболических процессов, об участвующих в них ферментах и коферментах и структуре последних. В частности, была подробно изучена роль фосфорилированных соединений в энергетическом сопряжении отдельных реакций. Значительно яснее стал вопрос о биосинтезе на стадии комбинации малых молекул. Область, которая оставалась ранее практически совершенно не исследованной, заняла в современной биохимии привилегированное положение.

К 1938 г. Сцент-Дьёрдьи начал серию исследований в области, которую, как мне кажется, лучше всего назвать молекулярной физиологией.

Эти исследования вскоре привели его к тому, что он сам называет субмолекулярной биологией.

Мы воспользовались выражением «молекулярная физиология», так как цель этих исследований заключалась в том, чтобы найти в одной и той же молекуле (конкретно речь шла о мышечном белке) и физиологический эффект, и его причину. Иными словами, нужно было объяснить то или иное типичное проявление жизнедеятельности (например, мышечное сокращение), исходя из структуры определенной специфической молекулы. Отнюдь не ясно заранее, возможно ли это вообще. По словам самого Сцент-Дьёрдьи, «одним из основных принципов жизни является организация; мы понимаем под этим, что при объединении двух вещей рождается нечто новое, качества которого не аддитивны и не могут быть выражены через качества составляющих его компонент». Однако весьма вероятно, что если молекулы определенного типа обладают зачатками функции, превосходящими физиологический акт, то частичное объяснение поставленных выше вопросов все же коренится в структуре самих молекул. Это и показал Сцент-Дьёрдьи [11] своими исследованиями мышечных белков.

После работ Энгельгардта, Любимовой и Мейтиной стало известно, что нити того вещества, которое было названо миозином, могут сокращаться в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ). Сцент-Дьёрдьи и его группе удалось разделить миозин на два белка — собственно миозин и актин, объединение которых дает актомиозин. Именно этот комплекс и обладает контрактивными свойствами. В растворах он реагирует на добавление АТФ уменьшением вязкости. Если же актомиозин находится в форме непрерывного геля, то АТФ вызывает его сокращение. Это изменение конфигурации превосхищает, таким образом, сокращение живой мышцы.

Конечно, между этими двумя явлениями существуют различия. В процессе экстрагирования белки неизбежно изменяются в большей или меньшей степени. Во всяком случае, условия в актомиозиновой нити отличны от условий в мышечной фибрилле. Никким образом не разделяя утверждения сторонников обобщенного принципа дополнительности о том, что сложность биологических явлений исключает возможность их истолкования, мы надеемся, что когда-нибудь нам удастся объяснить их межмолекулярными силами. Этот день еще не наступил. Тем не менее мы можем уже сейчас заняться проблемой связи между отдельными свойствами молекулы и ее структурой. На этот путь и отважился вступить Сцент-Дьёрдьи.

Количественные данные показали, что действие, оказываемое распадом маленькой молекулы АТФ на всю большую молекулу миозина, в целом приводит к проблеме передачи действия: сфера влияния реакции слишком велика, чтобы ее можно было объяснить кулоновскими силами. Отсюда возникло представление о наличии в макромолекулах электронных полос проводимости. Сцент-Дьёрдьи распространил эту концепцию полупроводимости и на другие биологические проблемы. Она должна была объяснить такие ферментативные реакции, для которых был исключен простой механизм соударений и где казалась необходимой определенная пространственная организация [10].

Момент был подходящим. В науке для достижения чего-то осязаемого, выходящего за рамки спекуляции, творческое воображение должно найти необходимую поддержку в общем развитии идей и техники. Это и имело место в данном случае. Появилось довольно значительное число работ, основанных на гипотезе полупроводимости. Хотя полосы проводимости были до сих пор обнаружены только в некоторых особых системах, возбуждаемых квантами большой энергии, все же работы по биохимии на субмо-

лекулярном уровне получили мощный стимул. Сам Сцент-Дьёрдьи обратил внимание на электронный перенос другого типа. Когда две подходящие молекулы соприкасаются друг с другом, то их электронные орбиты могут перекрываться, что приводит к образованию комплекса с переносом заряда. Электрон переходит с высшей заполненной орбиты донора на низшую незаполненную орбиту акцептора. Донор, превратившийся в акцептор, и акцептор, ставший донором, могут образовать цепь для переноса электронов между удаленными молекулами. Во всяком случае, изучение таких комплексов с переносом заряда при ферментативном катализе является очень многообещающим, так как здесь имеется тесный контакт между ферментом и субстратом.

Сомнительно, можно ли полностью объяснить действие ферментов, не учитывая перегруппировки атомов. Мысль о том, что в каталитическом процессе участвует своего рода обратимая денатурация, подтверждается данными об изменении энтропии, соответствующем образованию комплексов фермент — субстрат и их активации. Однако эти структурные изменения в такой же мере зависят от электронных событий, в какой изменения реакционной способности зависят от переноса заряда. Во всяком случае, к числу наиболее важных следствий из последних работ школы Сцент-Дьёрдьи относится осознание необходимости трактовать проблему и теоретически и экспериментально на электронном уровне. Чем же может быть будущая биология, как не теоретической биологией, которая, основываясь на квантовой механике, осмыслит свойства жизни, исходя из свойств внутри- и межмолекулярных инфраструктур?

Обнаружение переноса заряда методами спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса и интерпретация этих данных, базирующаяся на расчетах Пюльманов, уже позволили объяснить целый ряд свойств биологических систем.

В сороковые годы, в тот период, когда Сцент-Дьёрдьи проводил свои исследования в области субмолекулярной физиологии, родилась наука, которую сегодня принято называть молекулярной биологией. Верно это или нет, но мы по традиции привыкли проводить различие между изучением функции организма, т. е. физиологией, и изучением формирования того же организма, которое относится к другим областям биологии. Успехи в изучении структуры белков и получение паракристаллов вирусов (последние, быть может, являются простейшими формами жизни) толкнули некоторых авторов на путь механистического объяснения формирования некоторых специфических компонентов организмов или даже самих организмов. Основная трудность, с которой мы сталкиваемся при построении любой схемы биосинтеза, заключается в том, что возникновение некоторой последовательности аминокислот крайне маловероятно, и не потому, что оно связано с уменьшением энтропии (это могло бы быть скомпенсировано в общем процессе метаболизма), а потому, что очень трудно представить себе механизм отбора данных аминокислот. Таким образом, здесь мы имеем дело с действием молекулярных сил притяжения. Начиная с 1940 г. Полинг пытается выяснить природу этих сил. Он пришел к заключению, что они действуют между комплексментарными поверхностями и обусловлены формой и зарядом последних.

Молекулярная биология широко использовала достижения в области генетики. С одной стороны, удалось объяснить влияние генов их способностью контролировать синтез определенных химических веществ, а с другой — доказать, что информация, необходимая для биосинтеза тех или иных специфических веществ, заключена в нуклеиновых кислотах.

Современная точка зрения состоит в том, что каждая аминокислота связывается с комплементарной последовательностью нуклеотидов в цепи нуклеиновых кислот.

Для комбинации антиген — антитело и фермент — субстрат оказалось возможным рассчитать величину межмолекулярных сил и проверить эти расчеты экспериментально. Аналогичный расчет, вероятно, окажется возможным и для системы аминокислота — нуклеотид. Для этого, очевидно, нужно знать распределение зарядов, поляризуемость и ионизационные потенциалы данных молекул.

Таким образом, два направления исследований — одно, исходящее из изучения мышечного сокращения и активации ферментов, и другое, связанное с биосинтезом специфических белков, — ведут к общим проблемам и методам, которые еще недавно считались областью чистой физики. Это начало истории, которая, как мы предвидим, будет очень длительной. Как говорит Сцент-Дьёрдьи в своей последней книге, «...чтобы найти подход к центральным проблемам биологии, мы должны расширить свои представления в двух направлениях: в субмолекулярном и в надмолекулярном» [12]. Некоторые начинают заглядывать в область физики твердого тела. Однако чрезвычайная простота трактуемых там систем находится в резком контрасте с загадочными конструкциями живого.

Сцент-Дьёрдьи подчеркивает эту пропасть, которую еще предстоит заполнить. Но его энтузиазм и вера в будущее позволяют ему сохранить оптимизм. Последняя книга Сцент-Дьёрдьи, столь типичная для этой точки зрения, будет иметь огромное влияние на молодых биохимиков, занимающихся проблемами, стоящими на стыке биологии и физики. Число таких ученых возрастает с каждым днем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Baldwin E., *Dynamic Aspects of Biochemistry*, Cambridge Univ. Press, London and New York, 1948.
2. Banga I., Szent-Györgyi A., *Biochem. Z.*, **157**, 50 (1925).
3. Gözsy B., Szent-Györgyi A., *Biochem. Z.*, **224**, 1 (1934).
4. Svirbely J. L., Szent-Györgyi A., *Biochem. J.*, **26**, 865 (1932).
5. Szent-Györgyi A., *Biochem. Z.*, **150**, 195 (1924).
6. Szent-Györgyi A., *Nature*, **129**, 782 (1927).
7. Szent-Györgyi A., *Biochem. J.*, **22**, 1387 (1928).
8. Szent-Györgyi A., *Studies on Biological Oxidations and Some of Its Catalysts*, J. A. Barth, Leipzig, 1937.
9. Szent-Györgyi A., *Über den Mechanismus der biologischen Verbrennungen*, Nobel Verlag, 1937.
10. Szent-Györgyi A., *Science*, **93**, 609 (1941).
11. Szent-Györgyi A., *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press, New York, 1947.
12. Szent-Györgyi A., *Introduction to a Submolecular Biology*, Academic Press, New York, 1960 (А. Сцент-Дьёрдьи, Введение в субмолекулярную биологию, изд. «Наука», М., 1964).

# БИОХИМИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ

ДЖ. БЕРНАЛ

В начале XIX века мир химии делился на две части: неорганическую химию (она включала в себя обычные лабораторные операции, изучение различных окислительных и восстановительных процессов) и химию продуктов животного и растительного происхождения. Предполагалось, что происхождение этих *органических* веществ связано с действием некоего *жизненного начала*, которое ответственно за образование сложных и нестабильных соединений, возникающих в результате всякого рода брожений и гниений.

После того как в 1828 г. Вёлер впервые осуществил синтез мочевины, такой взгляд на жизненное начало стал постепенно исчезать. Конечно, на этом пути встречались временные отступления. Самое значительное из них было связано с замечательным открытием Пастера, который установил асимметричную природу некоторых молекул; эти соединения, по его мнению, могли возникать только в результате процессов жизнедеятельности. Оптическая активность почти вплоть до настоящего времени считалась характерной особенностью биомолекул; хотя сам Пастер сумел разделить в лаборатории право- и левовращающие изомеры, он считал, что, поскольку он сам также является организмом, это разделение также можно приписать жизненным силам.

Тем не менее установившаяся общая точка зрения сводилась к тому, что органическая химия представляет собой не что иное, как более сложную область химии неорганической, и что, пользуясь методами неорганической химии, можно разрешать проблемы, выдвигаемые химией соединений углерода и азота.

В настоящее время, рассматривая актуальные проблемы биохимии, мы до некоторой степени возвращаемся к прежней точке зрения. Некоторые органические вещества имеют молекулы необычайной сложности. Теперь, когда мы умеем идентифицировать и очищать их, стало ясно, что в организмах они синтезируются совершенно регулярным и упорядоченным образом. Более того, эти синтезы осуществляются очень быстро, в ограниченном пространстве, при обычной температуре и без нагромождения всей той аппаратуры, без которой не может обойтись современный химик. Однако в наибольшей мере повлияли на наш подход к биологической химии открытия

последних пяти лет, в частности установление особой роли нуклеиновых кислот в синтезе белков, в особенности ферментов, и открытия, связанные с тонким гистологическим изучением внутренних структур клетки.

Мы теперь отдаем себе отчет в том, что на первых порах, когда Гопкинс вел свои работы по изучению наиболее важных метаболитов, биохимии, по сути дела, лишь коснулись проблемы. В самом деле, им еще предстояло распознать те простейшие молекулы, которые служат отдельными компонентами в сложнейших процессах биологического синтеза. Когда же мы сумели в какой-то мере обозреть процесс в его целостности, например обнаружить циклические процессы при брожении, окислении или фотосинтезе, нам стало ясно, что весь метаболизм представляет собой динамическую конструкцию, сложность которой намного выше всего того, что человек мог когда-нибудь вложить в свои химические операции. Еще более удивительным в некотором смысле оказалось то, что при рассмотрении биохимии в целом, включая процессы, протекающие у всех видов животных и растений, а также бактерий и вирусов, обнаружилось необычайное единство и экономичность. Все снова и снова мы встречаемся с одними и теми же химическими реакциями и структурами — вплоть до деталей атомной структуры. И даже там, где наблюдаются вариации, это вариации на одну и ту же тему. Так, например, порфирины используются в дыхательных ферментах, при фотосинтезе и при переносе кислорода у высших животных.

Все это привело нас к убеждению, что биохимия характеризуется некоторым внутренним *единством*, предполагающим существование *биохимической эволюции*, значительно более тонкой и значительно более ранней, чем та биологическая эволюция, которая дала все разнообразные формы, приспособления и особенности поведения современных растений и животных. Такова была ведущая идея Пятого международного биохимического конгресса в Москве.

Изучение происхождения жизни, которое началось четверть века назад как интересная спекуляция, необходимая для того, чтобы можно было связать развитие Земли с развитием живых форм на ней, признано теперь почти официально важным разделом самой биохимии, вводящим исторический и временной элемент в то, что до сих пор было лишь описанием наблюдаемых структур и реакций.

Ранние работы о происхождении жизни были сосредоточены на установлении самой возможности этого факта, т. е. на том, чтобы показать, что жизнь могла возникнуть на поверхности Земли из неорганических веществ. Теперь доказывать такую возможность больше нет нужды: мы можем принять ее. Более того, теперь мы знаем, что существует множество путей, по которым мог начаться этот процесс. Теперь нас интересует не сама возможность возникновения жизни, а точное выяснение того, как это произошло.

Здесь уже недостаточно общих рассуждений или даже разумного использования данных геохимии и астрофизики. Фактический ход биохимической эволюции может быть установлен только с позиций современной биохимии. Это возможно при условии, что мы сделаем одно допущение, для которого, впрочем, имеются очень веские основания. Мы должны принять, что те химические вещества и те химические реакции, которые наиболее широко распространены в современных живых организмах — растениях и животных, — повторяют, конечно, с некоторыми вариациями, те вещества и реакции, которые существовали при самом зарождении жизни или, строже говоря, до того как возникли какие-нибудь живые организмы как таковые.



Существенно, что при этом должен был протекать определенный процесс воспроизведения не организма и даже не клетки, а, скажем, молекулы глюкозы, что на первый взгляд кажется более простым. Нет сомнений в том, что это воспроизведение происходит и сейчас и что оно происходило на протяжении всех геологических эпох. Применяя современные аналитические методы (см., например, работы Абельсона), мы находим в горных породах те же молекулы, которые и сейчас составляют основу современной биохимии, в частности аминокислоты, пурины и порфирины. Но когда мы начинаем изучать биосинтез этих молекул в современных организмах, мы снова сталкиваемся с явным противоречием. Фактически образование в организмах таких сравнительно простых молекул, а возможно даже и самых простых молекул, вроде водорода или окиси углерода, требует сложных сопряженных циклов реакций. Более того, в их синтезах в организме принимают участие такие сложнейшие молекулы, как молекулы многочисленных ферментов, нуклеиновых кислот и другие.

Если бы мы не знали ничего больше, мы пришли бы к постулату о вечности жизни, не обязательно той жизни, какую мы знаем, но жизни, как ее представляет себе биохимик — со всеми ее ферментами, нуклеиновыми кислотами и переплетающимися циклами реакций. Однако логически это может быть верно только до определенного момента в истории Земли, и нам надлежит решить, когда был этот момент. Он мог отстоять от нашей эпохи на тысячу миллионов лет или даже на три тысячи миллионов лет. Начиная с этого момента (но не раньше — из-за отсутствия самого механизма) весь механизм — с некоторыми вариациями, как я сказал, — производил одни и те же сорта молекул. Если верно, что воспроизведение жизненных процессов всегда осуществлялось через механизмы синтеза нуклеиновых кислот и белков, на что указывают данные современной биохимии, то мы должны были бы допустить, что сами нуклеиновые кислоты и составляющие их нуклеотиды, построенные из сахара, фосфата и пуринов и пиримидинов, первоначально должны были быть созданы с помощью механизма, который протекал бы вне зависимости от того, существовали эти молекулы ранее или нет, т. е., строго говоря, не представлял бы собой процесса воспроизведения.

Биохимику, который рассматривает этот вопрос, вполне естественно принять за исходную точку момент возникновения механизма с участием белков и нуклеиновых кислот, считать этот механизм заданным и изучать те типы реакций и процессы развития, которые могли иметь место после возникновения этого фундаментального механизма. Но их ошибка, на мой взгляд, заключается в том, что они необоснованно провозглашают этот момент началом жизни. Быть может, это можно принять как *определение* жизни, но его нельзя рассматривать как ее биохимическое начало, так как соединения, необходимые для этого процесса, учитывая их сложность, сами требуют предшествующей эволюции.

Эта эволюция должна была быть по существу отличной от последующей биохимической эволюции. На ее протяжении не могло происходить воспроизведения молекул в сколько-нибудь строгом смысле этого слова. Не могла, например, всегда существовать та необычайная точность, с какой теперь воспроизводится структура такой молекулы, как молекула гемоглобина, в которой замена одной аминокислоты на другую проявляется как вполне определимая вариация. Такая точность должна была развиваться постепенно, без резкого перехода. Раньше чем возникло столь совершенное копирование, должно было существовать неудачное копирование; еще раньше вообще не должно было быть никакого копирования. По-видимому,

происходило случайное образование различных молекул, которые постепенно рассортировывались в известные нам сейчас структуры.

Таким образом, возникновение механизма воспроизведения может служить исходным моментом при изучении биохимической эволюции. Мы можем выделить здесь два периода: период до и период после возникновения нуклеиновых кислот. Если угодно, мы можем использовать этот водораздел для того, чтобы отметить первое появление жизни и определить *жизнь* как нечто такое, что требует участия нуклеиновых кислот и белков; то, что не содержит такого механизма, можно назвать *не-жизнью* или *пред-жизнью*. Однако я предпочел бы использовать второе из этих названий для характеристики своего рода переходного этапа между периодом «ограниченного органического» синтеза, происходящего под действием физических агентов в космосе или на Земле, и тем моментом, когда начал действовать механизм нуклеиновых кислот и белков. Пири назвал этот этап «эобионтической стадией». Эта стадия охватывает наименее достоверные и наименее доступные для исследования этапы процесса, приведшего к возникновению современных форм жизни. Хотя, может быть, еще преждевременно пытаться реконструировать эти этапы, однако все же, по-видимому, стоит высказать некоторые идеи относительно предполагаемого хода этой стадии эволюционного процесса хотя бы просто для того, чтобы наметить путь исследований. Одинаково ценным было бы как доказательство неверности моих предположений по этому вопросу, так и подтверждение их правильности.

С чисто биохимической точки зрения мы можем усмотреть нечто важное уже в самом этом разделении. Биохимия современных организмов, т. е. то, что мы называем биохимией как таковой, изучает многочисленные превращения, в первую очередь превращения простых химических соединений в сложные и обратное превращение сложных соединений в простые, т. е. анаболическую и катаболическую стороны метаболизма. Но биохимия также сталкивается и с изменениями этих обменных процессов, с их исторической эволюцией под влиянием изменений окружающей среды, причем часто процесс эволюции необыкновенно стремителен. Здесь биохимические процессы соприкасаются с биологической эволюцией, причем возникают очень тонкие механизмы, обеспечивающие эту связь, например механизмы иммунитета, которые дают организму возможность копировать или, точнее, создавать «обратную копию» антигена в течение очень короткого времени.

С точки зрения биохимика и специалиста по электронной микроскопии, наиболее удивительным является не самый факт вторичной биохимической эволюции, а исключительная стабильность элементов, связанных не только с химической, но и с физической стороной жизни. Такая структура, как, например, мышца, возникшая на очень ранних стадиях эволюции у кишечнополостных, сохраняется у всех животных и у человека. Целлюлоза, возникшая в бактериальных структурах, присутствует у всех представителей растительного царства, а также у представителей животного царства (не только у оболочников, но, как недавно было показано, и у всех высших позвоночных, включая человека). Этот структурный консерватизм присущ также клеточным компонентам.

Специфическая структура, характерная для базальных телец с их тройными кольцами, несущими девять двойных наружных и две внутренних протофибриллы, по-видимому, формируется у всех организмов, кроме бактерий. Если мы не встречаем ее у некоторых высших растений, то существует достаточно доказательств того, что здесь произошла утрата функции в процессе эволюции. Одно из поразительных открытий, сделанных

при помощи электронного микроскопа, — обнаружение у центриолей точно такой же структуры. Эта структура представляет собой нечто вроде «стандартной детали», самая сложность которой свидетельствует о том, что она имеет свою предысторию, хотя, насколько нам известно, ее предшественники пока не найдены. Недавно было показано [5], что в меньшем масштабе совершенно та же структура — девять плюс два — лежит в основе строения волоса млекопитающих.

Изучение механизма воспроизведения центриолей познакомило нас, далее, с таким элементом процесса воспроизведения, который раньше мы могли наблюдать разве только в развитии вирусов. Речь идет здесь о воспроизведении не путем расщепления, а путем роста в молекулярном масштабе: новая центриоль, по-видимому, создается за счет роста вбок, под прямым углом к прежней. Здесь мы имеем дело со своеобразным механизмом матричного воспроизведения, действующим на уровне, промежуточном между молекулярным уровнем и уровнем целого организма.

Когда-нибудь мы сумеем проанализировать и расчленить эти структуры и процессы и показать, каким образом развитие организма может быть сведено к тому, что можно назвать «операциональными правилами построения» для стандартизованных компонент. Очень хороший пример представляет собой бактериофаг T2; его полидрикеская головка и способный сокращаться отросток построены из ограниченного числа белковых молекул, которые, по-видимому, тождественны или очень сходны друг с другом. Таких молекул имеется по 15 на каждой грани головки, и 13 образуют отросток фага. Создается впечатление, что существует нечто вроде программы, подобной программе для вычислительной машины, или вроде набора правил, по которым должны складываться эти элементарные кирпичики.

Но сами эти кирпичики, очевидно, должны быть старше, чем те структуры, которые из них строятся; это означает, что появлению организмов предшествовала эволюция их компонентов, т. е. самих белковых молекул.

Как мы должны представлять себе такую молекулярную, или химическую, эволюцию? Здесь, в силу их общности и логичности, должны применяться те же принципы, что и при изучении эволюции самих организмов. Гений Дарвина уже дал нам ключ к решению этих проблем — это идея о *естественном отборе*. Как указал впервые Горовиц [6], еще до того, как началась конкуренция между организмами, должна была иметь место конкуренция между молекулами и различными сочетаниями реакций. Теперь мы уже можем сказать несколько больше о природе этой конкуренции, ибо самым удивительным на первый взгляд является то, что биомолекулы вплоть до мельчайших деталей скроены в соответствии с той работой, которую они должны выполнять. Эта согласованность структуры и функции, с одной стороны, носит чисто геометрический характер и проявляется в трехмерной форме этих молекул, и особенно в форме их поверхности, а с другой стороны — физический характер, выражающийся в согласованности энергетических уровней молекул. Этому вопросу дал новый толчок сам Сцент-Дьёрдьи [13].

Что касается первой стороны проблемы, то мы теперь только начинаем понимать, хотя фактически мы этого еще и не знаем, как молекула фермента действует в качестве определенной трехмерной единицы, в третичной структуре которой оказываются сближенными те отрезки белковой цепи, чье комбинированное действие необходимо для связывания молекулы, на которую фермент действует. Это свойство не может быть выведено ни из

первичной структуры белка, ни даже из его вторичной структуры. К сожалению, нам еще не известна полностью третичная структура ни одного ферментного белка и мы все еще не вышли в этой области из стадии догадок и предположений. Но мы по крайней мере начинаем понимать, почему для выполнения, казалось бы, очень простых химических реакций, вроде, например, разрушения молекулы перекиси водорода, необходима сложная конструкция в виде цепи, состоящей из нескольких сотен звеньев.

Электронные взаимодействия, характерные для этих биомолекул, конечно, имеют гораздо более тонкий характер. Некоторые указания на их роль мы можем найти в существовании молекулы хлорофилла, которая является одной из наиболее строго стандартизованных биомолекул. Сэр Уолтер Ралей сказал: «Почему кровь красная, а трава зеленая — это тайны, в которые никто не может проникнуть». Первым шагом на пути раскрытия этих тайн было установление того, что в крови содержится железо, а в растениях — магний. Однако вся глубина этого различия выявилась лишь тогда, когда были сопоставлены энергетические уровни триплетных состояний этих молекул и было показано, что замена железа магнием, являющаяся с химической точки зрения совершенно необычной, создает в течение достаточно длительного времени возможность использования энергии поглощенного света для расщепления молекулы воды с освобождением кислорода [12]<sup>1</sup>.

Отбирая или модифицируя молекулу так, чтобы ее энергетические уровни слегка изменились, можно осуществить много новых реакций. Нет ничего удивительного в том, что, коль скоро такая реакция установилась, она в дальнейшем уже не модифицируется, а лишь встраивается в более сложную схему, в которой ее специальная функция может быть полностью реализована.

Не случайно, что вещества, которые, по-видимому, ответственны за восприятие запаха, оказались весьма сходными с веществами сетчатки глаза, ответственными за восприятие светового раздражения. Те и другие представляют собой каротины, т. е. чрезвычайно чувствительные акцепторы электронов [2]. Можно сказать, что в первом случае мы «нюхаем молекулы», а во втором — «нюхаем свет», или, если угодно, в первом случае мы «видим молекулы», а во втором — «видим свет». То или иное специфическое словоупотребление теряет здесь смысл, так как в обоих случаях то, что мы обнаруживаем, — это очень небольшое изменение электронных уровней. За счет эволюции молекул, способных воспринимать такие изменения, создается первоначально возможность возникновения ощущений в примитивном организме. Движение, которое коррелирует с ощущением, также, по-видимому, зависит от молекулярной эволюции частей молекул белка или целых полимерных молекул, которые приобретают способность изменять свою форму под действием небольших электронных изменений. Связь этой способности с движением делает ощущения полезными для организма. Движение без ощущений и ощущения без движения были бы для организма бесполезными; обе эти способности должны были возникнуть примерно в одно и то же время, хотя и не обязательно в одной и той же части организма.

<sup>1</sup> Вопрос о роли триплетных возбужденных состояний в биологических и фотобиологических процессах, в частности в фотосинтезе, нельзя считать окончательно решенным. Напротив, в последнее время накоплен ряд данных, говорящих о том, что в фотосинтезе конверсия световой энергии в химическую осуществляется скорее на синглетном уровне молекул фотосинтетических пигментов, непосредственно возбуждаемом светом, чем на их триплетном уровне. — *Прим. ред.*

Что же мы можем сказать сейчас об эобионтических изменениях? Я указал уже, что мы не можем использовать существующие в настоящее время механизмы реализации жизненных функций для характеристики этих изменений; мы должны вернуться назад и, отбросив возможность точной репликации, сосредоточить внимание на таких молекулах, которые могли возникнуть спонтанно, и на тех химических изменениях или физико-химических условиях, которые при этом создаются. Теперь мы начинаем находить ключи к этой проблеме на основе опытов, уточняющих прежние работы Мюллера о синтезе органических соединений из неорганических предшественников. По-видимому, такие синтезы осуществляются легче, чем мы могли раньше предполагать. Однако тщательный анализ этих синтезов показал, что они закономерно приводят к появлению сравнительно ограниченного числа типов молекул, с которыми мы фактически встречаемся в биохимии.

Десять лет назад мы строили догадки о том, сохраняют ли молекулы, которые мы находим в биологических структурах, свой специфический характер в силу присущей им стабильности или же они впервые возникли в результате исторической случайности и с тех пор воспроизводятся вновь и вновь. Последняя точка зрения, справедлива она или не справедлива для молекул более позднего и более сложного периода биохимической эволюции, когда уже возникла естественная возможность точной репродукции, не может относиться к ранним этапам, когда такая репродукция была невозможна. На основе имеющихся экспериментальных данных мы можем утверждать, что те молекулы, которые мы фактически получаем, это либо молекулы, имеющие особенно низкую энергию и потому особенно стабильные, либо молекулы, которые образуются с наибольшей вероятностью, т. е. такие, образование которых связано с наибольшей энтропией.

Последние работы Оро [10], относящиеся к синтезу пуринов и пиримидинов из молекул аммиака и циана, очень ясно обрисовывают те пути, по которым могло идти образование этих веществ без какого бы то ни было участия жизненных процессов. У нас есть много оснований утверждать, что основные типы химических молекул, в том числе и столь сложные соединения, как кислоты растительного происхождения, сахара и липиды, а также аминокислоты, пурины и, возможно, даже порфирины, вначале образовывались случайно, за счет абиотических процессов. Вопрос о том, как они позже рассортировались, представляет собой очень интересную проблему, но нет необходимости предполагать, что речь идет о чем-то весьма маловероятном. Подобные синтезы, сегрегации и последовательности реакций протекают при сходных температурных условиях и в минералах поверхностных профилей земной коры.

Образование таких структур, как бокситы и латериты, равно как и другие преобразования глинистых минералов, происходит без всякого участия биологических процессов в результате процессов дегидратации, окисления — восстановления и прежде всего разделения (сегрегации).

Здесь могли самопроизвольно протекать процессы хроматографического разделения, которые мы теперь применяем в промышленности и наших лабораториях. Высказанное мной несколько лет назад предположение о том, что первоначальные химические процессы, связанные с жизнью, происходили между молекулами, адсорбированными на глинистых частицах в иле устьев рек, может иметь более широкое значение, чем я в свое время думал. Молекулы, из которых сформировалась жизнь, могли здесь не только сохранять-

ся, но и рассортировываться, образуя очень сложные и обширные слои, которые я назвал «превитальными областями»; здесь создается также возможность значительной дифференциации и сегрегации. Это является, очевидно, логической необходимостью для возникновения жизни, и при этом создается достаточная концентрация материалов, обеспечивающая возможность таких изменений. Если начало концентрации происходило на глине, то следствием ее, вероятно, была своего рода агрегация в полимеры или коацерваты (как предположил А. И. Опарин).

Если мы попытаемся углубиться еще дальше, то мы столкнемся с одной из наиболее волнующих проблем из числа тех, которые возникли при попытках разобраться в истории возникновения жизни на Земле. Это вопрос о том, откуда взялся исходный материал для построения жизни. Как я писал в другом месте [1], фактически мы должны выбирать между двумя гипотезами, в пользу каждой из которых имеются некоторые химические и другие аргументы, а именно между гипотезой Опарина — Холдена об эволюции углеродсодержащих соединений из газов первоначальной земной атмосферы и более старой идеей, что эти соединения были занесены на Землю из мирового пространства. Доказательства в пользу последней точки зрения основываются на недавних анализах углистых метеоритов, которые, несомненно, содержат достаточные количества соединений углерода и азота, а также свободной энергии, необходимой для их дальнейшего преобразования. Другим источником этих соединений, как указал Оро [11], могли быть кометы.

Более новая, хотя и предусмотренная Аррениусом, идея заключается в том, что сама жизнь прошла начальные стадии своей эволюции на какой-нибудь другой планете. Конкретные свидетельства в пользу этого содержатся в спектральных и хроматографических анализах Кальвина [4] и Бриггса [2], которые нашли в углистых метеоритах метаболиты, сходные с пуринами. Сюда же относятся и данные Мейншайна и Нады [3], которые с помощью масс-спектрографического анализа обнаружили в этих метеоритах наличие углеводов, сходных с теми, какие синтезируются наземными организмами.

В еще более поздней работе Надь и Клаус [7] утверждают, что в метеоритах, упавших в Оргейле и Ивуна, они обнаружили структуры, сходные с водорослями. Если эти результаты подтвердятся, то нам придется искать истоки жизни за пределами Земли, но сейчас эта задача уже не столь фантастична, как это казалось нам каких-нибудь пять лет назад.

Жизнь могла возникнуть где угодно. Однако отсюда вовсе не следует, что остатки этой жизни, перенесенные в какую-то отдаленную эпоху на нашу планету, даже если они остались невредимыми в этом путешествии, должны были сразу распространиться и стать, таким образом, непосредственным источником жизни на Земле. Гораздо разумнее предположить, что жизнь на Земле возникла из нескольких источников. Учитывая современные экспериментальные данные и тот несравненно более мощный поток информации, которого можно ждать от результатов первых межпланетных путешествий, сейчас было бы преждевременно высказывать об этих проблемах что-нибудь, кроме самых общих предположений.

Мы можем сказать, основываясь на полученных до сих пор данных, что жизнь на Земле существует очень давно. Однако мы не можем сейчас дать никаких сколько-нибудь серьезных оценок относительной продолжительности периодов органической и биохимической эволюции. Здесь нужно учитывать два существенных соображения. Прежде всего следует помнить, что та органическая эволюция, которую мы знаем, происходит

чрезвычайно медленно из-за высокого совершенства копирующего механизма, определяемого генетическим аппаратом. Теперь только изменения этого копирующего механизма (в результате мутаций или генетических скрещиваний) могут приводить к возникновению новых видов. При отсутствии копирующего механизма эволюция могла носить скорее непрерывный, чем дискретный характер [9]. Любая возникшая молекула могла бы стать частью комплекса и могла бы сравнительно быстро элиминировать те ранее образовавшиеся молекулы, которые были менее эффективны в биохимическом процессе. Однако против этого говорит другое соображение. Первые этапы биохимической эволюции, по-видимому, в значительной степени зависели от случайных удач и ошибок, причем, очевидно, число ошибок значительно превышало число удач. В силу этого задача отбора и стабилизации удачных молекул и реакций очень сложна и потому должна была решаться в ходе длительной эволюции. Кроме того, степень внутренней биохимической сложности значительно превышает степень внешней органической сложности, касающейся только формы и размеров, ощущений и движений. А между тем времени было очень мало. Весь процесс эволюции длился около четырех миллиардов лет, и, по данным геологии, мы можем утверждать, что из них примерно полтора или два миллиарда лет, несомненно, приходится на органическую эволюцию. Таким образом, для биохимической эволюции остается период длительностью не больше одного-двух миллиардов лет.

Итак, в настоящее время у нас имеются основания говорить о процессе, который можно назвать биохимической эволюцией. Этот процесс в значительной мере, хотя и не полностью, предшествовал органической эволюции. Он продолжался и на протяжении всей геологической истории, но был здесь подчинен органической эволюции, подобно тому как в наше время продолжающаяся органическая эволюция подчинена социальной эволюции человечества.

Поэтому эволюционная биохимия представляет интерес не только сама по себе и не только в силу неопределенного значения ее изучения для жизни и здоровья человека, но и как существенная, хотя все еще почти неисследованная, часть космической истории.

В заключение я хотел бы сопоставить идеи исторического развития, т. е. эволюции, биохимических структур, с одной стороны, и тех химических реакций, которые происходят в организмах, — с другой. Изучая органическую эволюцию, мы всегда различаем онтогенетический и филогенетический аспекты проблемы. Мы отличаем вопрос о том, каким образом осуществляется развитие отдельного животного по заданному плану, от вопроса о происхождении этого животного от предков, отличных от него. Мне кажется, что те же два аспекта мы должны различать и при изучении молекул, из которых построены организмы. Каждая молекула, которая является составной частью современных организмов, имеет свой определенный путь биосинтеза: это ее онтогенез. Но она имеет и своих молекулярных предков. Так, например, теперь, когда установлена последовательность аминокислот в белках, белковая молекула представляется нам текстом, который был скопирован с более старых текстов более простого типа, причем в часть текста были внесены при этом некоторые изменения. Я представляю себе, что подобным образом мы могли бы проследить историю всех биохимических молекул до все более и более простых их предшественников, пока мы не пришли бы к изолированным атомам в пространстве. Из них возникли не только планета, на которой мы живем, но и жизнь на этой планете и человечество, которое только начинает понимать процесс своего происхождения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bernal J. D., Nature, **190**, 129 (1961).
2. Briggs M. H., Duncan R. B., Nature, **191**, 1310 (1961).
3. Briggs M. H., Nature, **191**, 1137 (1961).
4. Calvin M., Vaughn S. K., Space Research, North Holland Publ., Amsterdam, 1960.
5. Frazer R. D. B., Масграе Т. Р., Rogers G. E., Nature, **193**, 1052 (1962).
6. Horowitz N. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **31**, 153 (1945).
7. Nagy B., Claus G., Nature, **192**, 594 (1961).
8. Nagy B., Meinschein W. G., Hennessy D. J., Ann. N. Y. Acad. Sci., **93**, 25 (1961).
9. Опарин А. И., Происхождение жизни на Земле, Изд. АН СССР, М., 1959.
10. Ogo J., Nature, **191**, 1193 (1961).
11. Ogo J., Nature, **190**, 389 (1961).
12. Rabinowitch E. I., Phytosynthesis, vol. 2, Part. II, p. 1793 ff, Interscience, New York, 1956. (Рабинович Е., Фотосинтез, ИЛ, М., 1959.)
13. Szent-Györgyi A., Introduction to Submolecular Biology, Academic Press, New York, 1960 (Сцент-Дьёрдьи, А., Введение в субмолекулярную биологию, изд. «Наука», М., 1964).



# ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ЭВОЛЮЦИИ ФОТОСИНТЕЗА И КОНВЕРСИИ КВАНТОВ

М. КАЛЬВИН

## I. ВВЕДЕНИЕ

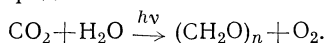
Подготовка настоящей статьи оказалась делом исключительно трудным, может быть, наиболее трудным из всех, за которые я когда-нибудь брался. Я утешаю себя тем, что причина этого лежит в самой природе эволюционного процесса. В науках физических (и особенно в науках математических) мы привыкли к последовательному чередованию событий. Здесь одна идея предшествует следующей и весь ход мыслей развертывается постепенно как единая последовательность, как построение целостное от начала до конца. Те из вас, кто знаком с путями эволюции биологических объектов, знают, что эволюционная история живых организмов не может быть описана подобным образом. Особенно трудно наметить этот путь в проблеме фотосинтеза, составляющей предмет настоящей статьи.

Как мы покажем дальше в ходе нашего изложения, при эволюции фотосинтеза происходило слияние в определенный момент времени ряда совершенно независимых друг от друга эволюционных путей и дальнейшее их развитие, приведшее к тому современному аппарату фотосинтеза, который мы знаем. Пытаясь описать эту последовательность событий, я почувствовал возросшее уважение к авторам исторических романов. Они также имеют дело с множеством кажущихся независимыми последовательностей событий, приводящих к определенному частному происшествию в конце или, быть может, в начале романа, и требуется большое искусство для того, чтобы проследить все нити, переходя от одной к другой и сводя их таким образом, чтобы они соединились в нужном месте и в нужный момент. Я не сумел двигаться достаточно плавно среди всех этих нитей эволюционного развития, которые в конечном счете слились, чтобы дать начало очень сложному процессу фотосинтеза. Поэтому история фотосинтеза может показаться более запутанной, чем это было на самом деле, так как я был вынужден перескакивать от одного пути эволюции к другому и обратно, чтобы попытаться указать точки их слияния.

## II. ПРОЦЕСС ФОТОСИНТЕЗА В ЕГО СОВРЕМЕННОЙ ФОРМЕ

После этих извинений начнем наше изучение эволюционной истории фотосинтеза с описания того, что мы считаем известным о том современном процессе, к которому мы должны в конечном счете прийти. Фотосинтез — это тот процесс, при помощи которого организмы в состоянии преобразовывать электромагнитную энергию в химическую, используя реакцию между

двуокисью углерода и водой; при этом выделяется молекулярный кислород и восстанавливается углерод:



Такова суммарная реакция фотосинтеза, который давно уже был охарактеризован как процесс превращения электромагнитной энергии, представляемой здесь квантом, в химический потенциал, представляемый молекулярным кислородом, а также углеродом и водородом, преимущественно на уровне окисленности углеводов [6, 8, 9, 10].

Если бы этим исчерпывалось все, что мы знаем о фотосинтезе, то вряд ли мы были бы в состоянии попытаться раскрыть ту эволюционную историю, которая могла привести к его возникновению. К счастью, однако, за последние 1—2 десятилетия мы узнали о фотосинтезе, вероятно, больше, чем за предшествующее столетие. Приведенная выше реакция выражает то, что было доступно нам примерно сто лет назад. До периода, предшествовавшего второй мировой войне, накопление наших химических знаний о фотосинтезе прогрессировало очень медленно, но начиная с середины тридцатых годов и особенно в послевоенное время прогресс в этой области шел значительно быстрее.

Что же мы знаем теперь о процессе фотосинтеза? Вместо того чтобы попытаться дать исторический обзор развития наших знаний, я постараюсь, во-первых, сопоставить некоторые твердо установленные факты, известные нам относительно фотосинтеза, представляемого его реакцией в общем виде; во-вторых, охарактеризовать те типы организмов, в которых осуществляется этот процесс; в-третьих, установить (насколько это возможно), каков биологический аппарат фотосинтеза у некоторых из этих организмов, и, наконец, в-четвертых, проанализировать процесс на молекулярном уровне. При рассмотрении эволюции такого рода процесса мы сталкиваемся с проблемой того, на каком уровне рассматривать процесс фотосинтеза. Будем ли мы трактовать его на уровне целого организма, на уровне клетки, на уровне субклеточных образований, на уровне макромолекул или на уровне небольших молекул субстратов, принимающих участие в этом процессе? Фактически мы должны были бы, если бы это было возможно, включить в рассмотрение все эти уровни, но это сделало бы такое обсуждение исключительно трудным.

Я выделю два аспекта: сам механизм процесса на уровне субстратов (или, возможно, на субмолекулярном уровне) и аппарат фотосинтеза на субклеточном (или макромолекулярном) уровне.

### Природа фотосинтезирующих организмов

Вряд ли есть необходимость давать здесь обзор всех типов организмов, способных осуществлять процесс фотосинтеза. Совершенно очевидно, что высшие растения, например в поле или в лесу, осуществляют его в больших масштабах. Однако, помимо высших зеленых растений, существует ряд других организмов, способных осуществлять этот процесс или часть его. Эти организмы составляют важную часть той биологической схемы, которую нам нужно будет рассмотреть. Сюда относятся морские водоросли — красные и зеленые; те и другие играют очень важную роль в кругообороте углерода на земной поверхности, так как водоросли представляют собой наиболее обширное семейство растений, участвующих в этом кругообороте. Далее существует другая группа — сине-зеленые водоросли, которые, по-видимому, являются наиболее примитивными в струк-

турном отношении организмами, способными осуществлять весь процесс фотосинтеза, т. е. восстановление углерода и выделение кислорода. И, наконец, мы переходим к зеленым и пурпурным фотосинтезирующим бактериям, которые способны осуществлять только часть процесса конверсии световой энергии. Бактерии способны преобразовывать электромагнитную энергию в химическую, но без выделения кислорода. Для восстановления углерода они используют отличные от воды конечные восстанавливающие агенты и потому дают отличные от кислорода окислители. Однако фотосинтезирующие бактерии могут поглощать электромагнитную энергию солнечного излучения и преобразовывать ее в химический потенциал.

Таким образом, организмы самой различной степени сложности могут осуществлять полностью или частично этот процесс конверсии (превращения энергии); во всяком случае, все они в состоянии осуществлять критическую стадию этого процесса — поглощение квантов излучения и их конверсию.

### III. МЕХАНИЗМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

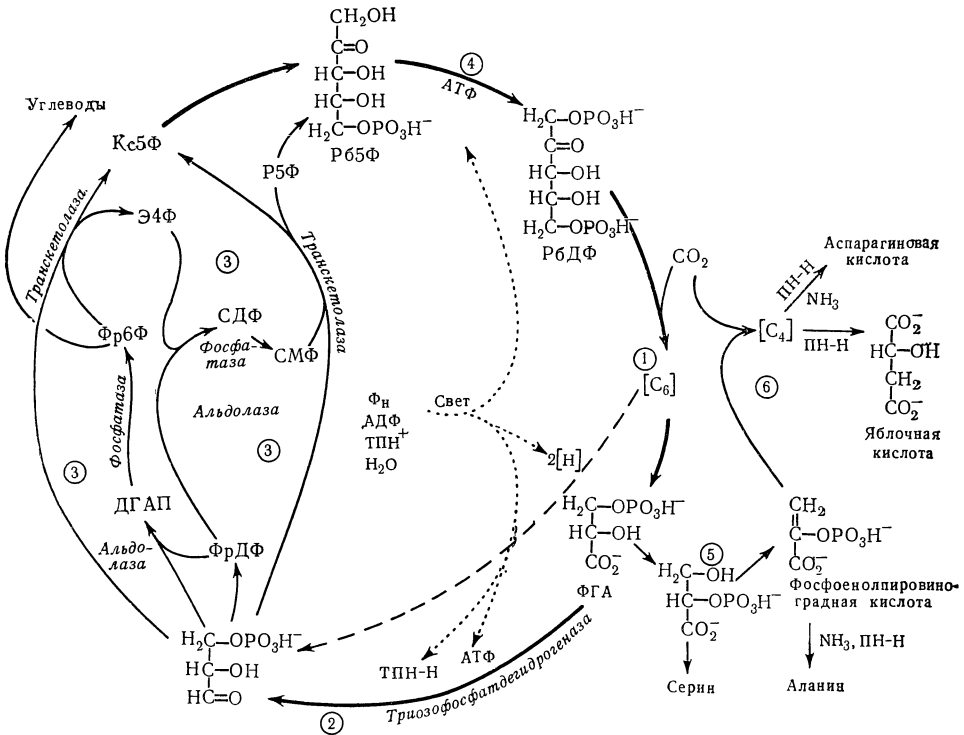
#### Путь углерода при фотосинтезе

Посмотрим, что нам сейчас известно о механизме самого процесса фотосинтеза. Частично наши знания являются результатом начатых еще до войны работ с применением меченых атомов, о которых мы уже упоминали выше [6, 8, 9, 10]. Эту работу начал мой коллега С. Рубен, пользовавшийся радиоактивным изотопом  $C^{11}$ , но сейчас же после войны, в 1945 г., мы возобновили ее, применив углекислый газ, меченный  $C^{14}$ , для изучения последовательности реакций и промежуточных соединений в процессе превращения  $CO_2$  в углеводы. В настоящее время мы можем составить весьма полную схему восстановления  $CO_2$  (упрощенный вариант цикла восстановления углерода показан на фиг. 1). Первый этап в фотосинтетическом цикле углерода — карбоксилирование сахара, рибулозодифосфата, с образованием фосфоглицириновой кислоты, которая в свою очередь может быть восстановлена до триозофосфата с использованием некоторого *восстановительного агента* и некоторого *пирофосфатсодержащего соединения*. Триозофосфат проходит затем через ряд преобразований и дает снова рибулозодифосфат, после чего цикл превращения углерода может возобновиться.

Для образования двух названных выше соединений — восстановительного агента, который мы обозначим через [Н], и особого фосфорного (пирофосфатсодержащего) соединения — необходим свет. По-видимому, этим специфическим фосфорным соединением является аденозинтрифосфат (АТФ), содержащий пирофосфатную связь. Это обстоятельство имеет очень важное значение и будет обсуждаться подробнее в дальнейшем.

Основной факт, который я хотел бы особенно подчеркнуть на этом этапе нашего исследования, заключается в том, что восстановление  $CO_2$  в цикле превращений углерода и вся последовательность ферментативных реакций, принимающих участие в этом восстановлении, представляют собой темновые реакции. Если только налицо имеются продукты *световой* реакции, а именно восстановительный агент и какой-то тип *макроэргических* фосфатов, весь цикл может работать и углерод из  $CO_2$  может включаться в разнообразнейшие соединения, в том числе и в сахара. Молекула сахара может быть удалена из цикла. Каждый раз, например, как цикл совершит шесть оборотов, образуется одна молекула сахара — гексозы. Это и происходит в действительности.

Мы знаем также, что все 11 ферментов (катализаторов), принимающих участие в реакциях цикла восстановления углерода, очень широко распространены в живой природе и могут быть найдены почти всюду — не только в организмах, преобразующих солнечную энергию, но и в организмах,



Фиг. 1. Цикл восстановления углерода (упрощенная схема).

1 — рибулозодифосфат взаимодействует с  $\text{CO}_2$ , давая нестабильное соединение с 6 атомами углерода; далее происходит его распад с образованием двух трехуглеродных соединений; это 3-фосфоглицериновая кислота и либо трифосфоглицериновый альдегид (3-ФГА), который образуется в изолированных ферментных системах, либо какое-нибудь другое трехуглеродное соединение, например триозофосфат (пунктирная стрелка). 2 — ФГА восстанавливается до триозофосфата с помощью  $\text{ATP}$  и  $\text{ТПН-Н}$ , полученных при световой реакции с участием молекул воды. 3 — в результате ряда различных реакций конденсации и перегруппировки триозофосфат превращается в пентозофосфат. 4 — пентозофосфат при участии  $\text{ATP}$  фосфорилируется и дает рибулозодифосфат. Дальнейшее превращение углерода происходит через превращение ФГА в фосфоенолпироват (5) и через карбоксилирование (6) с образованием четырехуглеродных соединений (вероятно, щавелевоуксусной кислоты). В схеме показаны также реакции, ведущие к образованию некоторых вторичных промежуточных соединений, являющихся продуктами цикла превращений углерода. Сокращения: ФрДФ — фруктозодифосфат; ДГАП — дигидроаминопимелиновая кислота; ФрбФ — фруктозо-6-фосфат; СМФ — седогептулозомонофосфат; СДФ — седогептулозодифосфат; Э4Ф — эритрозо-4-фосфат; Кс5Ф — ксилулозо-5-фосфат; Р65Ф — рибулозо-5-фосфат; Р5Ф — рибозо-5-фосфат; РбДФ — рибулозодифосфат.

не имеющих никакого отношения к процессу фотосинтеза. Отсюда становится довольно ясным, что по крайней мере эта последовательность реакций, т. е. цикл восстановления углерода, несомненно, развилась в отдельной цепи эволюционных событий, которая на ранних стадиях не имела никакого или почти никакого отношения к процессу конверсии электромагнитной энергии [16, 22]. Сам по себе процесс конверсии энергии, по-видимому, сразу же или почти сразу создает два вещества — восстановительный агент и соединение с пирофосфатной связью, которые могут затем войти в цикл восстановления углерода.

Итак, мы можем уже различить два совершенно независимых эволюционных направления, которые в процессе эволюции объединились сравнительно недавно и привели к образованию современного зеленого растения [13, 14, 21]. Одно из них — это система восстановления углерода.

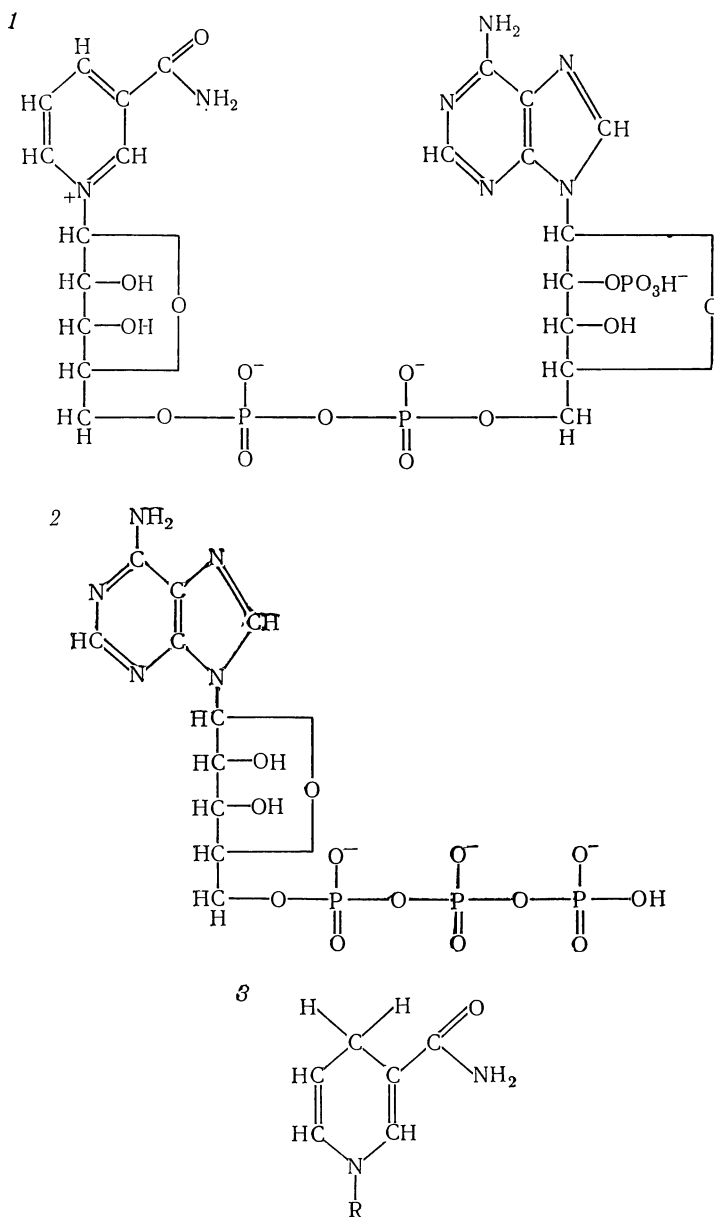
### Конверсия квантов в фотосинтезе

Вернемся теперь к самому фотохимическому процессу. Выделив систему восстановления углерода как самостоятельное направление эволюции, я оставляю ее, так как в ней нет ничего специфического для фотосинтезирующих организмов, кроме комбинации продуктов световой реакции с определенным набором ферментов, каждый из которых в отдельности или в различных сочетаниях может быть найден и у организмов, неспособных к фотосинтезу [39, 52]. Следовательно, до сравнительно недавнего времени цикл восстановления углерода имел свою самостоятельную эволюционную историю.

Попытаемся выяснить, что нам еще известно о процессе конверсии квантов. Оказывается, что здесь наши сведения отличаются весьма малой детализацией по сравнению с тем, что нам известно о процессе восстановления углерода. Прежде чем мы начнем обсуждение этого процесса, быть может, будет полезно рассмотреть структурные формулы тех двух молекул, которые, по нашему мнению, играют существенную роль в протекании цикла реакций фотосинтетического восстановления углерода (несомненно, существуют и другие, пока еще нам не известные молекулы, принимающие участие в реакциях, приводящих к выделению кислорода). Для осуществления углеродного цикла необходим прежде всего восстановительный агент, а именно пиридиннуклеотид в его восстановленной форме. Адениновая и пиридиновая группы, связанные друг с другом через две молекулы сахара (рибозы) пиродифосфатной связью, образуют молекулу вещества, которое известно под названием *дифосфопиридиннуклеотида*. Фактически, по-видимому, в фотосинтезе участвует молекула, очень сходная с этой, но включающая в себя еще одну фосфатную группу, соединенную с одной из молекул рибозы. Поэтому в качестве структурной формулы для восстановительного агента, необходимого в цикле восстановления углерода, я буду пользоваться формулой трифосфопиридиннуклеотида в его восстановленной форме (ТПН-Н).

Возможно, что существует и другой, еще более специфичный, восстановительный агент, используемый фотосинтезирующими организмами для восстановительного расщепления первоначального продукта карбоксилирования (см. фиг. 1, 1) [11]. Если это верно, то этот агент, несомненно, является по крайней мере столь же эффективным соединением, как ТПН-Н. Связан он структурно и кинетически с последним или нет, но если этот специфический восстановительный агент функционирует в зеленых растениях, то он, по всей вероятности, возник как более поздний и более эффективный продукт эволюционного развития, поскольку цикл может осуществляться и через посредство ТПН-Н. Другой молекулой, которая имеет важнейшее значение для функционирования цикла и которая должна каким-то образом образовываться в результате *фотохимических* реакций, является молекула аденозинтрифосфата (АТФ). Здесь присутствуют две пиродифосфатные связи, но для нас наиболее важна конечная фосфатная связь (фиг. 2).

Что нам известно о том, каким образом фотохимические превращения приводят к образованию этих двух веществ? Хотя в этом вопросе наша информация не отличается полнотой, однако многое нам известно, причем



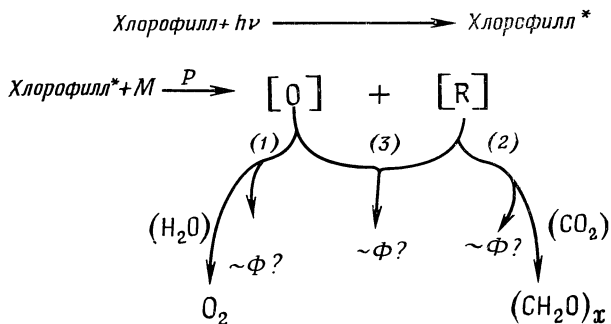
Фиг. 2. Структурные формулы трифосфопиридиннуклеотида [окисленная (1) и восстановленная (3) форма] и аденозинтрифосфата (2); эти вещества необходимы для протекания фотосинтетического цикла восстановления углерода.

1 — трифосфопиридиннуклеотид (окисленная форма ТПН<sup>+</sup>); 2 — аденозинтрифосфат (АТФ); в АТФ конечная фосфорная кислота замещена на ОН-группу; 3 — никотиамидная часть ТПН-Н (восстановленный ТПН<sup>+</sup>).

наши знания имеют существенное значение, определяя ход рассуждений об эволюционных соотношениях между фотосинтетическим аппаратом и другими биосинтетическими аппаратами живых организмов.

### 1. Фотоиндуцированная окислительно-восстановительная система

В настоящее время известно, что главная фотохимическая реакция — это поглощение света хлорофиллом, приводящее к образованию либо возбужденных молекул хлорофилла, либо возбужденных агрегатов таких молекул (я не имею здесь в виду, что это должны быть отдельные молекулы хлорофилла в растворе; речь идет о хлорофилле в том виде, в каком он входит в фотосинтезирующий аппарат организмов.) Эта возбужденная молекула должна затем претерпеть некоторое превращение; она может, например, взаимодействовать с какой-нибудь другой молекулой, так что происходит разделение *окислителя* и *восстановителя* [19, 20]. Я пользуюсь



Фиг. 3. Упрощенная схема фотосинтеза.

Квант света поглощается молекулой хлорофилла; после этого с возбужденной молекулой происходит какой-то процесс (этот первичный акт обозначен буквой *P*), в результате которого образуются два химических вещества (например, [O] и [R]); одно из этих веществ [O] в конце концов превращается в кислород (1), а другое [R] служит для восстановления CO<sub>2</sub> до уровня углеводов (2). На этих путях биосинтеза могут также образовываться различные богатые энергией химические соединения (АТФ, или ~Φ). Последние могут образовываться либо на одном из этих путей, либо на обоих. Возможна и обратная реакция (3) между окислителями и восстановителями, в процессе которой также могут возникать макроэргические соединения. Конечно, и здесь наиболее вероятно образование пирофосфатных связей в АТФ.

этими терминами прежде всего потому, что в последнее время в их истолковании возникла некоторая путаница. В обычном процессе фотосинтеза окислителем может стать молекулярный кислород, а восстановителем — восстановленное соединение, пиридиннуклеотид. Пиридиннуклеотид совместно с АТФ, механизма образования которого мы пока не касались, будет давать возможность осуществляться реакциям углеродного цикла.

Терминами *окислитель* и *восстановитель* химики пользуются для того, чтобы охарактеризовать события, происходящие после того, как возбужденный хлорофилл передаст свою энергию некоторой другой молекуле или совокупности молекул, если в этом прямо участвует некоторая окислительно-восстановительная система. Биологи привыкли использовать эти термины в другом смысле. Вслед за Ван-Ниелем [69], Станьером [65] и Арноном [2, 3] биологи обычно подразумевают под *M* (фиг. 3) воду и считают, что в качестве окислителя ([O] на фиг. 3) действует гидроксил [OH]. Однако нужно отметить, что они всегда весьма предусмотрительно помещают символ гидроксила в квадратные скобки. (Те из вас, кто знает смысл таких скобок, поймут их значение в этом случае: когда биохимик заключает что-нибудь в квадратные скобки, то фактически он признается, что не знает, о чем идет речь; это лишь общее представление, а не химическая формула.) Восстановителем ([R] на фиг. 3) биологи называют водород [H]; это заставляет многих предположить, что первичным результатом конверсии кванта является расщепление молекулы воды. Теория Ван-Ния вво-

дит лишь образование некоторого восстановителя, природа которого нам неизвестна, и окислителя, о природе которого мы тоже ничего не знаем. Эти два вещества в конечном счете должны происходить из воды, на что прежде всего указывает стехиометрия первичной реакции фотосинтеза.

В последние годы в дискуссиях стала встречаться и другая, совершенно новая терминология, имеющая совершенно отличные источники, но описывающая те же явления. Физики называют восстановитель «электроном» и говорят, что после удаления электрона из молекулы остается дырка [1, 15, 19, 20]. Не следует смущаться этой разногласием в терминологии, потому что все понятия: окислитель — восстановитель, гидроксил — водород, электрон — дырка — это лишь различные наименования для одних и тех же по существу вещей. Сейчас мы попытаемся установить, какой путь поможет наилучшим образом описать изучаемые процессы в деталях.

Я ввожу терминологию физиков, потому что в последние годы мы познакомились с рядом реакций возбужденного хлорофилла, причем одной из них является реакция переноса электрона, которую можно наблюдать спектроскопически. Электрон отнимается от двухвалентного железа, переводя его в трехвалентное состояние [1, 11, 30, 31, 49, 50, 51, 64]. Установление того, что такой перенос происходит, и притом происходит чрезвычайно быстро после поглощения света хлорофиллом, имеет очень важное значение<sup>1</sup>. Возбужденный хлорофилл может тем или иным путем извлекать электрон из соединения, содержащего ферро-ионы (в современных организмах таким соединением, связанным с хлорофиллом, является цитохром), причем образуются феррицитохром и электрон, переходящий к какой-то, пока еще не установленной, молекуле [48, 49]. По-видимому, между молекулой, специфичной для фотосинтезирующих растений (т. е. хлорофиллом), и определенными типами молекул, встречающимися также у других организмов (а именно цитохромами, в состав геминовой группы которых входит железо), существует какая-то связь. Железосодержащие геммы имеют универсальное распространение, и это важный факт, который следует отметить для дальнейшего изложения.

Мы знаем также, что в конечном счете электроны должны найти путь к пиридиннуклеотиду. Соединения типа окисленного железа могут забирать электроны у воды, давая ферро-ион, молекулярный кислород и протоны.

Все эти процессы сопровождаются образованием АТФ. Место образования АТФ нам неизвестно, однако мы вынуждены допустить, что АТФ образуется либо на пути от промежуточного окислителя к кислороду (реакция 1 на фиг. 3), либо на пути от промежуточного восстановителя (возможно, сульфгидрильной группы) к пиридиннуклеотиду (реакция 2 на фиг. 3), либо в результате реакции рекомбинации (водорода с гидроксидом), в которой электрон попадает обратно в дырку (реакция 3 на фиг. 3).

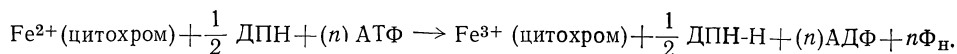
## 2. Фотоиндуцированное дегидрирование

Недавно обнаруженная [29] обратимость по крайней мере некоторых этапов окислительного фосфорилирования создает основу для очень глубо-

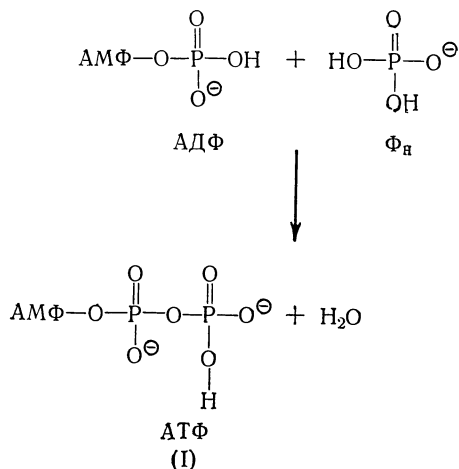
<sup>1</sup> В недавней модификации обобщения Ван-Нилья [65] в качестве первичного донора электронов для возбужденного хлорофилла рассматривается не вода, а молекула ферроцитохрома. При этом не уточняется первичная судьба возбужденного электрона, который должен быть удален из молекулы хлорофилла. Предполагается, что окисленный цитохром может окислять воду до кислорода с сопутствующим образованием АТФ. Такое предположение сходно с гипотезой Бассама [7] и соответствует реакции 1 на фиг. 3.



ких изменений наших основных представлений об окислительно-восстановительных фотопроцессах. Так, существуют указания на то, что в митохондриях может протекать реакция

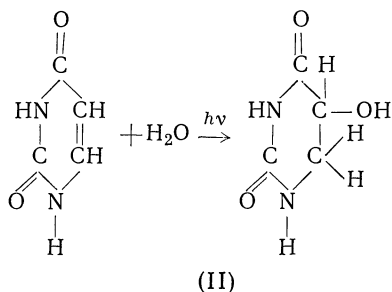


Если бы существовал независимый, не окислительно-восстановительный путь дегидрирования с образованием АТФ по реакции, изображенной ниже,



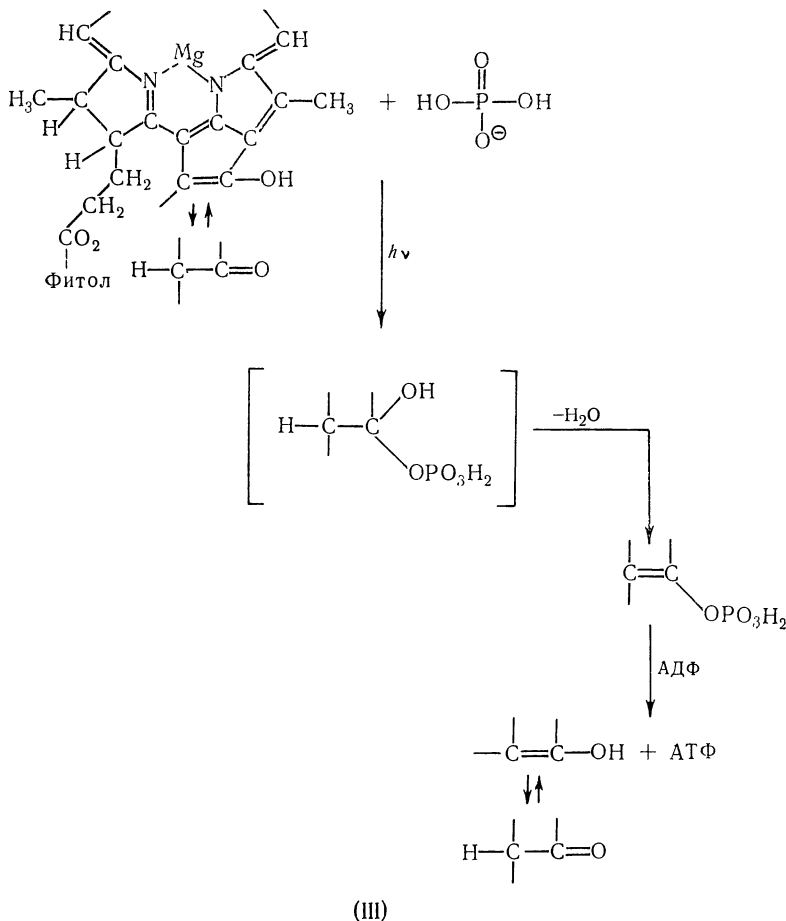
то *оба* соединения — АТФ и ТПН-Н — могли бы образовываться в световых реакциях без фотоиндуцированных реакций прямого переноса электронов.

У нас есть уже некоторые основания для создания идеи о том, что возбужденная светом система  $\pi$ -электронов может иметь повышенное сродство к воде, приводящее к гидратации в результате процесса, который в обратном направлении идет с очень низкой скоростью [61]. Этим путем может быть поглощена энергия кванта.



Если бы, например, 9,10-енольная группа в хлорофилле могла (в возбужденном состоянии) присоединять к себе ортофосфат, то образовывался бы енолфосфат, который, по всей вероятности, мог бы осуществлять фосфорилирование аденозиндифосфата (АДФ) и давать требующийся АТФ [70]. Часть последнего могла бы использоваться для обращения восстановления системы ДПН-Н-цитохром и для разделения окислителя и восстановителя (расщепления воды), которое в конечном счете необходимо для выделения  $\text{O}_2$  и восстановления  $\text{CO}_2$ .

Весьма значительная трудность, создаваемая такой схемой, состоит в том, что здесь на каждый поглощенный квант должно происходить образование *не одной, а значительно большего числа молекул*. Даже если бы мы



нашли, как обойти эту трудность, все же совершенно ясно, что такой путь превращений мог возникнуть лишь сравнительно недавно, в процессе эволюционного усложнения высокоразвитой биосинтетической системы преобразования энергии.

#### IV. ПИРОФОСФАТНЫЕ СВЯЗИ В ПРОЦЕССАХ, НЕ СВЯЗАННЫХ С ФОТОСИНТЕЗОМ

Общеизвестно, что пирофосфатные связи встречаются в очень разнообразных организмах. Практически во всех организмах существуют механизмы для создания АТФ, не имеющие ничего общего с фотосинтетическими механизмами. Один из таких механизмов — обращение реакции, в которой АТФ используется в фотосинтетическом цикле (триозофосфатдегидрогеназа). Заставляя реакцию 2 (фиг. 1) идти в обратном направлении, можно получить АТФ. Более важным источником АТФ является реакция, в которой, по-видимому, участвуют железо и цитохромы и которая включает в себя

также окисление и восстановление пиридиннуклеотида. Эти две реакции у нефотосинтезирующих организмов участвуют в образовании АТФ. Процесс окисления пиридиннуклеотида, который протекает за счет перехода электронов обратно к кислороду через железосодержащие цитохромы с сопутствующим образованием АТФ, известен под названием окислительного фосфорилирования. Он приводит к образованию большего количества АТФ, чем процесс окисления субстратов. Возвращение возбужденных светом электронов к хлорофиллу через всю эту цепь или часть ее могло бы создавать необходимый запас АТФ (см. реакцию 3 на фиг. 3).

Таким образом, как восстановленный пиридиннуклеотид, так и АТФ образуются не только при фотосинтезе [14]. У нас имеются некоторые сведения о том, как образуется пиридиннуклеотид; однако о синтезе АТФ в процессе окислительного фосфорилирования, который осуществляется с переносом электронов от восстановленных пиридиннуклеотидов обратно к кислороду через железо цитохромов, нам известно очень немного. А между тем это одна из важнейших проблем в изучении процессов преобразования энергии во всех организмах.

Итак, мы выделили в фотосинтезе две линии эволюционного развития: линию, приводящую к образованию пирофосфатов (АТФ), и линию, дающую начало пиридиннуклеотидам. Ни один из этих процессов не требует непосредственного участия фотопроцесса. Это может означать, что возникновение световой реакции или ее участие в образовании АТФ и (или) восстановлении пиридиннуклеотидов было очень поздним событием в органической эволюции живого мира [16, 22]. Вы видите теперь, что, обсуждая вопрос о происхождении фотосинтеза, мы вынуждены коснуться вопроса о происхождении жизни. От этого вывода уклониться нельзя, и теперь мы можем рассматривать этот вопрос на гораздо более глубоком уровне, чем это было возможно еще сравнительно недавно. Этот вопрос обсуждался подробнее в другом месте [25], так что здесь мы не будем вдаваться в детали.

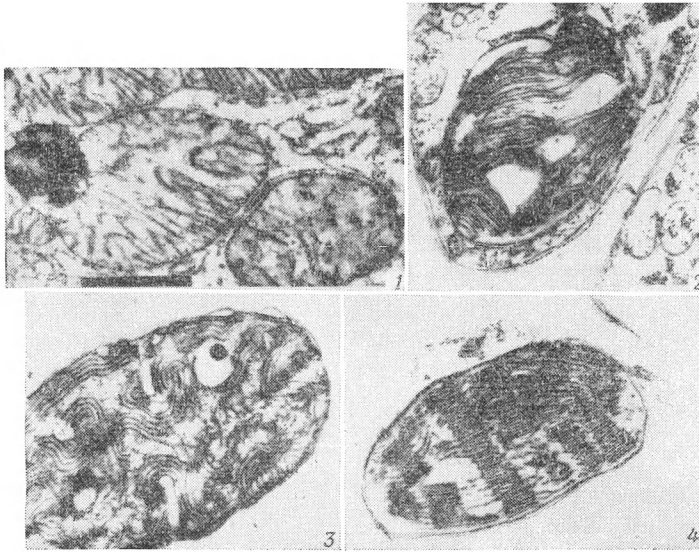
Я лишь бегло коснусь некоторых этапов для того, чтобы сосредоточить ваше внимание на эволюции отдельных механизмов синтеза АТФ, синтеза молекул, участвующих в синтезе АТФ в современных организмах, и синтеза пиридиннуклеотидов. В самом конце я остановлюсь на вопросе о том, как могла возникнуть поглощающая свет молекула хлорофилла и как она связана с другими процессами преобразования энергии.

## V. ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ

На фиг. 4 показаны хлоропласты, из которых состоит аппарат фотосинтеза у зеленых растений. Я не ставил себе задачу морфологического описания аппарата фотосинтеза, но, быть может, необходимо сказать несколько слов об особенностях фотосинтетического материала на субклеточном уровне, когда он все еще доступен для непосредственного наблюдения. Далее я продолжу рассмотрение уже на уровне макромолекул и, наконец, перейду к уровню субстратов, т. е. в область обычной органической химии.

На фиг. 4 показаны хлоропласты трех различных организмов: одноклеточной зеленой водоросли, сине-зеленой водоросли, которая хотя и лишена хлоропластов, как таковых, но имеет слоистые структуры, заполняющие всю клетку, и высшего растения (табак); во всех трех случаях наблюдается высокоорганизованная ламеллярная структура. Сами ламеллы построены из макромолекулярных субъединиц, которые уже можно разли-

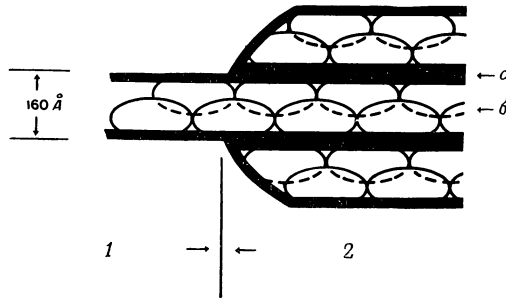
чить визуально [59]. На фиг. 5 изображена модель ламеллярной структуры хлоропласта, а на фиг. 6 приведена электронная микрофотография



Фиг. 4. Хлоропласты одноклеточной зеленой водоросли, сине-зеленой водоросли, табака и митохондрии из поджелудочной железы морской свинки.

1 — митохондрии из поджелудочной железы морской свинки; 2 — хлоропласты с несколькими митохондриями из водоросли *Chlamydomonas* (Сэджер); 3 — целая клетка сине-зеленой водоросли *Anabaena*, видны ламеллы (Фаттер); 4 — хлоропласты из листа табака. До фиксации перманганатом листья выдерживались в темноте в течение 24—36 час (Вайер).

препарата лисфилизированных хлоропластов шпината из надосадочной жидкости; на этой микрофотографии видна субструктура ламелл.

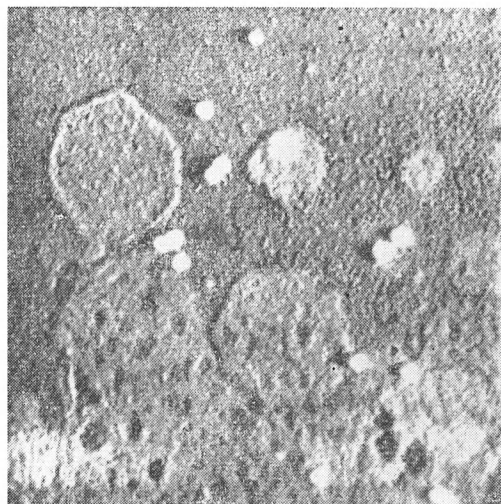


Фиг. 5. Модель ламеллярной структуры хлоропластов из листа шпината, по Парку и Пону [59].

*a* — окрашивающийся оснмем слой ламеллярной структуры. Толщина 30 Å в области, лежащей между гранами (1), и 60 Å — в области гран (2); *b* — частицы, формирующие гранулярную внутреннюю поверхность двух слоев, образующих ламеллярную структуру. Упаковка сплюснутых сфер значительно сложнее, чем это показано на фигуре, так как на самом деле центральные оси обоих слоев могут находиться в разных вертикальных плоскостях.

Фиг. 4 показывает, что высокая степень упорядоченности характерна не только для хлоропластов, но и для других органелл клетки, например для митохондрий, осуществляющих иные функции (образование АТФ путем окислительного фосфорилирования пиридиннуклеотидов [18]). На этой

фигуре видно сходство структуры фотосинтетического аппарата и материала, который не несет функций фотосинтеза: во всех этих случаях наблюдается высокоупорядоченная слоистая структура. Такая структура должна

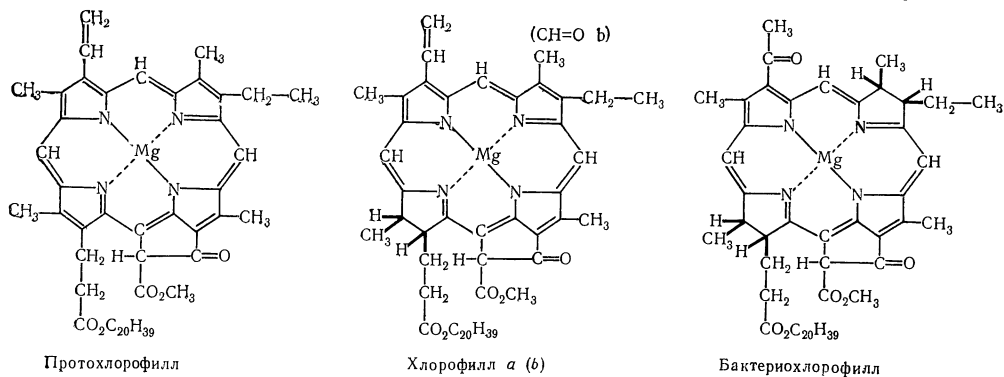


Фиг. 6. Лиофилизированные обломки хлоропластов, полученные действием ультразвука; для сравнения на снимке приведены шарики полистирола диаметром 880 Å.

была каким-то образом возникнуть из молекул, которые сами имеют тенденцию к упорядоченному расположению в силу особенностей атомов, из которых они построены.

### Структура хлорофилла

Детальная структура молекулы хлорофилла, безусловно связанная с поглощением света и преобразованием его энергии, представлена на фиг. 7.



Фиг. 7. Структура протохлорофилла, хлорофилла и бактериохлорофилла.

Здесь изображена структура трех известных нам типов хлорофилла. Во-первых, это *протохлорофилл*, образующийся в этилированных растениях, выращенных в темноте. Если перенести такие растения на свет, то происходит превращение протохлорофилла в *хлорофилл* [63]. Основное различие

между протохлорофиллом и хлорофиллом заключается в присоединении двух атомов водорода по месту двойной связи в кольце D. *Бактериохлорофилл*, который ответствен за поглощение и конверсию света в фотосинтезирующих пурпурных и зеленых бактериях, отличается от хлорофилла зеленых растений по второму (дигидропиррольному) кольцу.

Мы должны, с одной стороны, проанализировать, как образовались упорядоченные структуры, показанные на фиг. 4, 5 и 6, с другой — попытаться проследить эволюцию специфической молекулы, молекулы хлорофилла, принадлежащей к классу тетрапиррольных соединений, известных под названием порфиринов. Эти две стороны вопроса — возникновение упорядоченных структур в клетке и эволюция самого хлорофилла — являются основными аспектами нашей эволюционной схемы процесса фотосинтеза.

Структурный аспект — возникновение упорядоченности и структуры — является общим для эволюции всех живых организмов. Это часть общего вопроса о том, каким образом из неживого материала могли развиваться упорядоченные структуры, т. е., в сущности, часть общей проблемы химической эволюции и происхождения жизни.

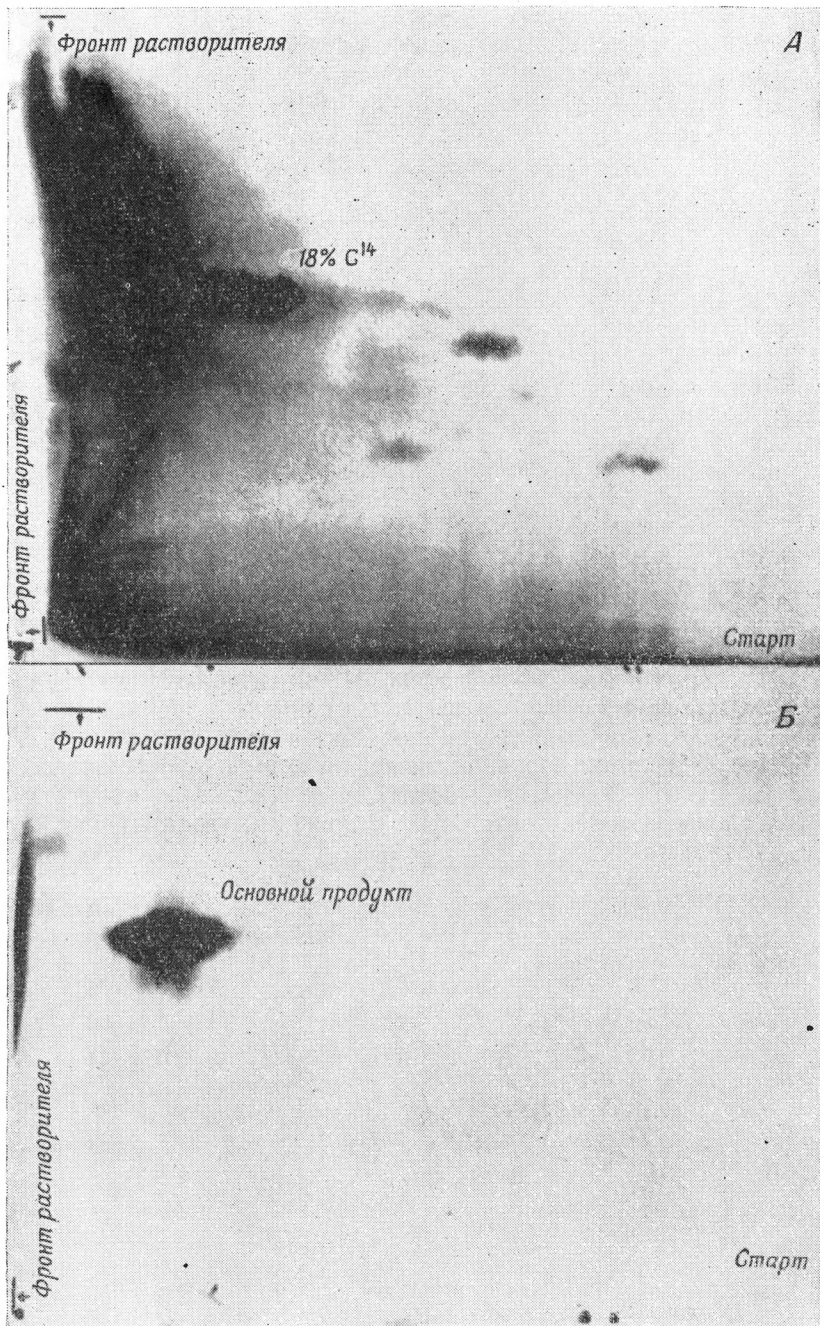
## VI. ХИМИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ

Я начну с краткого обсуждения исходных процессов химической эволюции, начиная с молекул первичной атмосферы, которые, как мы уже упоминали, должны были подвергаться примитивным фотосинтетическим превращениям под воздействием далекого ультрафиолета или радиоактивного излучения земной коры. Считают, что наиболее древними молекулами на поверхности Земли были метан, аммиак, вода и др. (фиг. 8). Атомы, возникшие при действии излучения, энергия которого достаточна для разрыва связей C—C, C—H, H—H, N—H и H—O, могут образовывать более сложные молекулы (см. фиг. 8, нижняя строка). Такие процессы

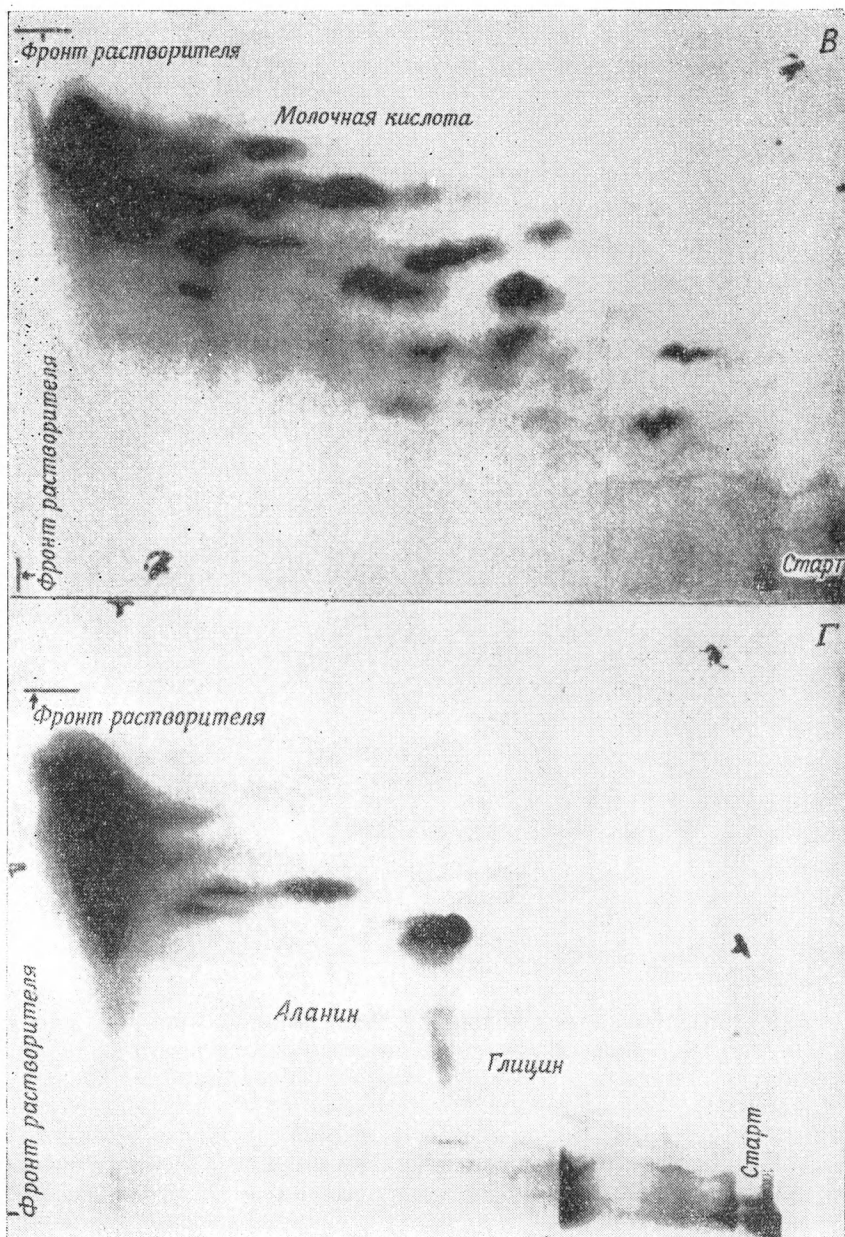


Фиг. 8. Первобытные и примитивные органические молекулы.

могли происходить либо под действием ионизирующего излучения [40], например под действием  $\beta$ -частиц, испускаемых  $\text{K}^{40}$ , которым очень богата земная кора [66], либо под действием ультрафиолетовых лучей с длиной волны менее 2200 Å [47]. Легко видеть, что образующиеся таким образом молекулы представляют собой субстраты (муравьиная, уксусная и янтарная кислоты и глицин), перерабатываемые всеми современными живыми организмами. Глицин представляет собой простейшую из аминокислот,



Фиг. 9. Радиоавто  
 Соединения, образующиеся после воздействия электронами с энергией 5 мэв на смесь мече  
 Система растворителей для хроматографии в вертикальном направлении: бутанол — пропано  
 системы: фенол — вода (А, В, Г); изомасляная кислота — NH<sub>4</sub>OH (Б); А — осадок; Б — ос  
 элюат с дауэкс 50 (минимум 35 соединений); Г — М16;



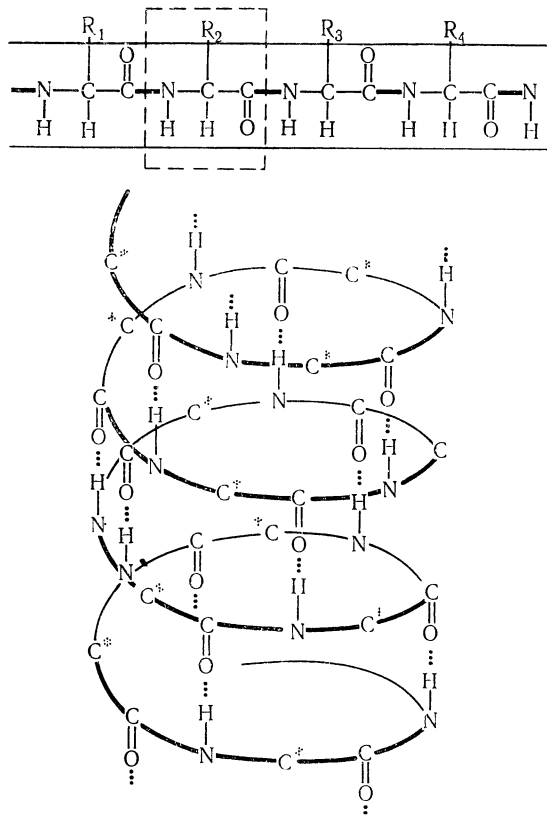
графы хроматограмм.

ного метана ( $C^{14}H_4$ ), аммиака и воды. Для хроматографирования использовали ватман № 1. новая кислота — вода; для хроматографирования в горизонтальном направлении использовали новая фракция I, дауэкс 50 (минимум 25 соединений); В — кислая и нейтральная фракции, основная фракция II, дауэкс 50 (минимум 20 соединений).



входящих в состав белков. Замена одного из атомов водорода на какие-нибудь другие группы атомов приводит к образованию остальных аминокислот (около 20).

В первых своих экспериментах, выполненных в 1950 г., мы пользовались пучком ионизирующих частиц из циклотрона [40]. Мы исходили из смеси углекислого газа, водорода и воды; в результате беспорядочных химических преобразований образовывались восстановленные соединения: муравьиная, уксусная и янтарная кислоты. В последующих экспериментах



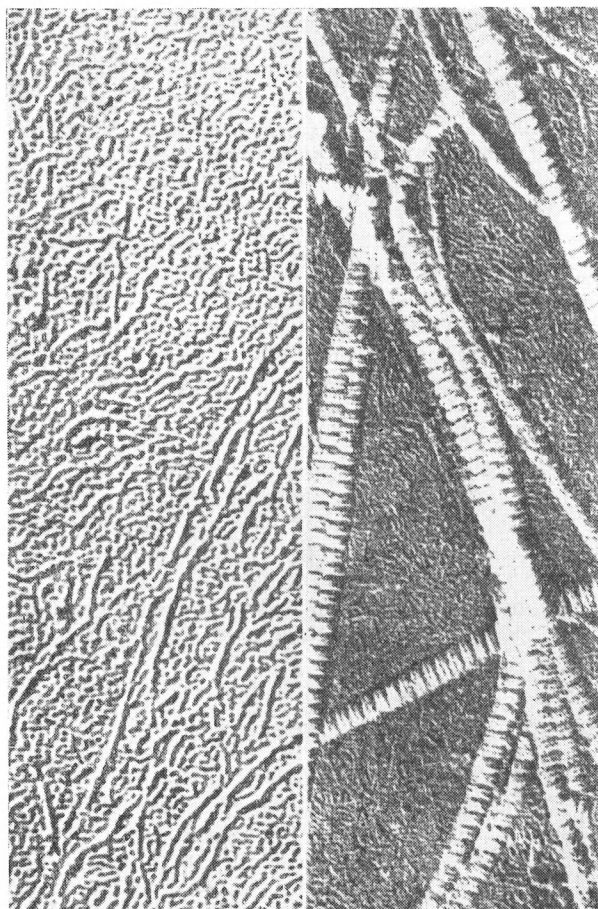
Фиг. 10. Структура белка.

Миллер [54, 55] добавлял к исходной смеси аммиак и получал сверх того и глицин. В течение последнего полугодия мы повторили эти эксперименты, но вместо того чтобы выделять случайно образующиеся соединения обычными аналитическими методами, мы вводили в исходную газовую смесь метан, меченный  $C^{14}$ , вводя таким образом радиоактивные атомы, за судьбой которых весьма нетрудно следить. Поток частиц из линейного ускорителя (5 мэв) проходил через смесь метана, аммиака и воды; водный раствор, содержащий продукты такой обработки, систематически анализировали при помощи хроматографии на бумаге [57].

На фиг. 9 показаны результаты одного из таких опытов. Это фотография экспонированной рентгеновской пленки, полученная при наложении на нее бумажной хроматограммы, содержащей радиоактивные продукты. Каждое темное пятно на пленке соответствует локализации определенного

соединения. Локализация того или иного соединения на пленке позволяет установить его природу. Нам удалось выделить около дюжины нелетучих радиоактивных соединений.

Мы могли таким образом идентифицировать ряд соединений, в том числе глицин, аланин и различные другие аминокислоты, а также сахара,



Фиг. 11. Электронная микрофотография нитей коллагена.

некоторые жирные кислоты и некоторые оксикислоты. Все это вещества, из которых построена современная живая материя<sup>1</sup>. Мочевина составляет около 60% общего количества образовавшихся продуктов. В нейтральной и кислой фракции мы нашли большое число соединений, в том числе молочную кислоту и сахара [57]. Легко видеть также, что незначительную часть продуктов реакции составляют аланин и глицин (аминокислоты). По-видимому, в этой облученной смеси присутствует также некоторое количество еще не идентифицированных оснований, в том числе гетероциклические соединения. Итак, такого рода беспорядочные процессы могут служить

<sup>1</sup> Наличие в водном растворе HCN было установлено другим методом [57].

источником простых соединений, необходимых современным живым организмам [25, 26, 27].

Получив таким образом эти простые соединения, в особенности аминокислоты, мы можем различными путями строить из них белки. Оставляя в стороне более сложные и специфические методы, требующие введения в молекулу специальных защитных или активирующих групп, можно указать, что недавно в лабораторных условиях удалось успешно провести этот процесс с помощью по крайней мере двух простых способов, которые, по-видимому, могли бы осуществляться и в примитивных условиях. Первый метод заключается в нагревании смеси аминокислот в расплавленной глутаминовой кислоте с добавлением некоторых полифосфорных кислот. При этом получается смешанный полипептид, сходный с белком [35, 36, 37]. Второй путь заключается в нагревании аминокислот в водном растворе аммиака. При этом получают полипептиды меньшего размера [56].

Белки сами могут принимать специфическую конфигурацию (фиг. 10). Спиральная структура спонтанно возникает в линейной совокупности аминокислот в силу особенностей расположения атомов углерода, водорода, азота и кислорода в такой цепи. На фиг. 11 показана уже визуально различимая упорядоченность спиральной структуры. Слева представлена электронная микрофотография белка, являющегося компонентом коллагена. Когда происходит агрегация белковых цепей (правая фотография), то в силу специфического расположения аминокислот в белке возникает специфическая упорядоченная структура. Здесь можно видеть начало возникновения той *видимой* упорядоченности, которая необходима для образования митохондрий, хлоропластов и других субклеточных структур. Такая упорядоченность, конечно, присуща всем живым организмам, и ее возникновение вовсе не специфично для фотосинтеза. Итак мы можем проследить за возникновением упорядоченности, начиная с простейших молекул древней атмосферы земли (см. фиг. 8), через белки (см. фиг. 10 и 11) до субклеточного материала (см. фиг. 8).

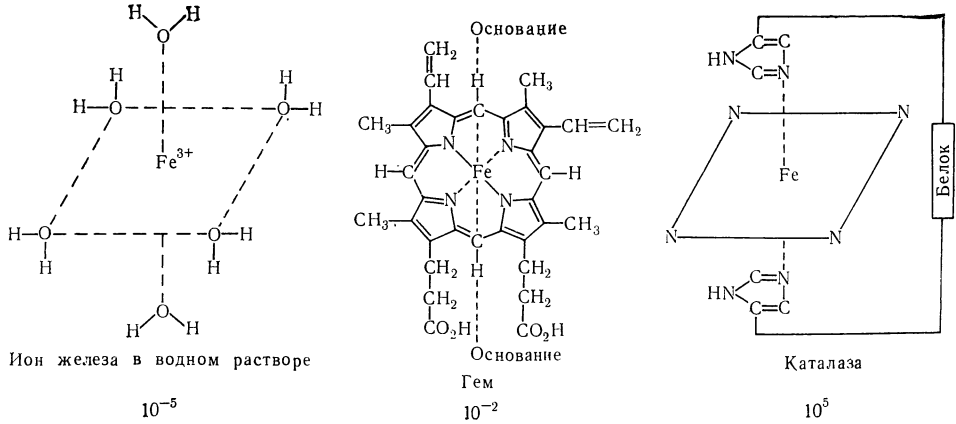
## VII. ЭВОЛЮЦИЯ РУДИМЕНТАРНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

Обратимся теперь к вопросу о происхождении порфиринов, которые, по-видимому, играют центральную роль не только в поглощении света (например, в случае хлорофилла), но и в возникновении АТФ у современных, а, возможно, также и у первых живых организмов.

На фиг. 12 показано, что примитивная способность железа играть роль катализатора при разложении перекиси водорода, которая могла образовываться в морях под действием ультрафиолета или радиоактивного излучения (возникающего при распаде атомов  $K^{40}$ ), возрастает в 1000 раз, если атом железа становится частью молекулы порфирина. Если произвести дальнейшее преобразование, включив гем в свернутую белковую молекулу и создав таким образом молекулу фермента каталазы, то каталитическая его способность в реакции разложения перекиси возрастет еще в 10 млн. раз [26].

Этот факт имеет очень важное значение, так как, по моему мнению, перекись водорода образовывалась в первичных морях в очень ранние периоды ее истории под действием как ультрафиолета из верхних слоев атмосферы, так и излучения, возникающего при распаде атомов  $K^{40}$  в земной коре. Наличие  $H_2O_2$  могло играть роль необходимого для эволюции давления отбора [41], который обусловил совершенствование каталитической функции железа по описанному пути.

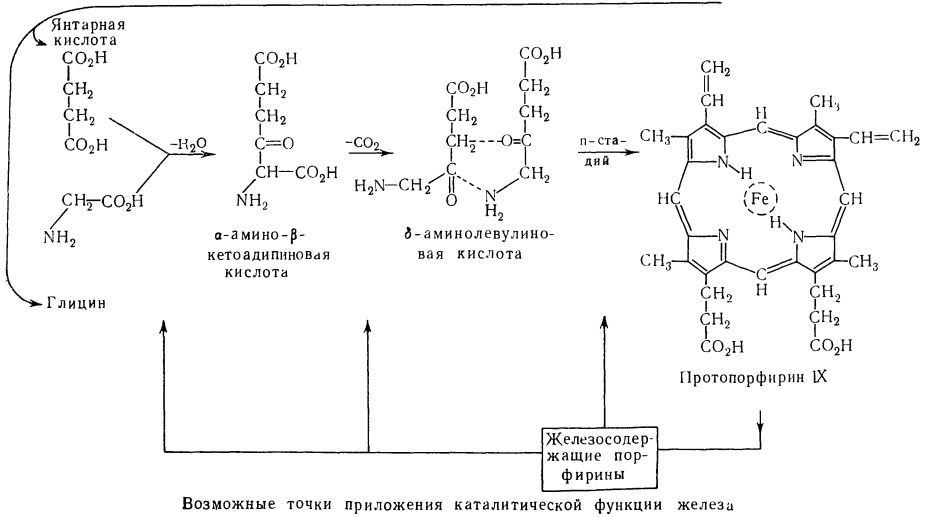
Мы можем составить себе некоторое представление о том, как это могло происходить, рассмотрев пути синтеза гемов современными организмами



Фиг. 12. Эволюция катализатора реакции разложения перекиси водорода ( $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ ).

Цифры выражают каталитическую активность в 1 мл за 1 сек при 0°.

(фиг. 13). Мы исходим из янтарной кислоты и глицина, которые возникали в примитивной атмосфере Земли в результате беспорядочных синтетических процессов. При соединении этих молекул получается  $\alpha$ -амино- $\beta$ -кетoadипиновая кислота, которая после декарбоксилирования превращается



Фиг. 13. Биосинтез порфиринов и эволюция каталитических функций железа.

в  $\delta$ -аминолевулиновую кислоту. Две молекулы последней могут реагировать друг с другом, давая пиррольное кольцо. За этим следует ряд процессов окисления и конденсации, приводящих к образованию тетрапиррольного кольца [60]; некоторые из них наверняка катализируются железом. Окисление может осуществляться либо кислородом, либо перекисью в присутствии

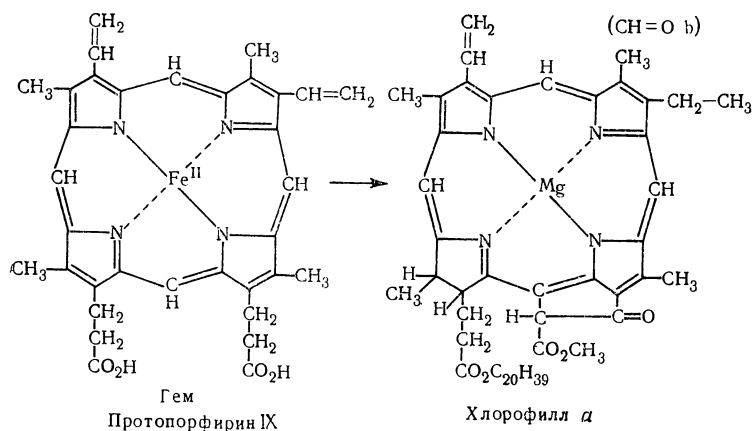


у животных и растений; эти же системы, по-видимому, используются и в процессах фосфорилирования при фотосинтезе.

Мы можем теперь сделать предположение о той направляющей силе, которая обусловила образование порфириновых молекул. По-видимому, именно наличие в океане перекисей и целесообразность преобразования в водной среде ортофосфатов в пирофосфаты, которые в дальнейшем использовались в процессах соединения аминокислот и формирования белков, послужило такой силой. Таковы были этапы эволюционного процесса, который привел сначала к образованию порфиринов, а затем к выработке механизма синтеза пирофосфатов.

### VIII. СОПРЯЖЕНИЕ

До сих пор мы обходились без участия какого-нибудь специального механизма, обуславливающего использование света для реализации рассмотренных процессов. При рассмотрении более поздних этапов возникла



Фиг. 14. Связь структуры гема и хлорофилла.

необходимость проследить, каким образом потеря электрона железом могла осуществляться при участии света. Это было необходимо для того, чтобы связать фотохимическую реакцию с тем, что, как мы сейчас знаем, не является фотохимическим процессом.

Я думаю, что это событие произошло на довольно позднем этапе эволюции. Об этом свидетельствует то, что в настоящее время синтез молекулы хлорофилла осуществляется последовательностью реакций, почти тождественной с последовательностью реакций, ведущей к образованию гема [12, 44—66]. Отличие состоит лишь в том, что перед включением железа в гем (протопорфирин IX) происходит включение магния и образование молекулы хлорофилла (фиг. 14). Я полагаю, что необходимость такой реакции обусловлена прежде всего тем, что способность гема к поглощению света очень невелика. Гем красного цвета, но по своей способности к поглощению света он даже отдаленно не приближается к хлорофиллу. Одной из основных причин того, что в процессе эволюции предпочтение было отдано хлорофиллу, содержащему в своей молекуле магний (магний-хлорин), является то, что магний-хлорин поглощает свет в несколько тысяч раз интенсивнее, чем содержащий железо порфирин. Кроме того, по-видимому,

какие-то специфические особенности электронной структуры магния и упаковки молекул хлорофилла в кристаллическую решетку, облегчающие потерю электрона хлорофиллом, лучше реализуются в структуре хлорина, чем в структуре порфирина. Если бы оказалось, что при этом играет роль и активация дегидратации фосфата за счет 9,10-енольной группы хлорофилла, то это был бы третий мощный фактор отбора, благоприятствовавший возникновению структуры хлорофилла.

Нужно также учитывать исследуемую сейчас возможность того, что *два различных* акта конверсии квантов могут совместно участвовать в процессе фотосинтеза с большей эффективностью, чем каждый из них порознь [32, 33, 38, 42, 43, 44]. Одним из таких процессов является перенос электронов *от* восстановленного цитохрома [23 24]. Предполагается, что другой процесс — это перенос электрона *к* окисленному цитохрому [32]. Альтернативной парой переносов мог бы быть перенос *на* хлорсфилл (от цитохрома) и *от* хлорсфилла (к хинону или дисульфиду) [28]. Вопрос о том, достаточен ли сам по себе *какой-нибудь один* из этих различных актов конверсии кванта для реализации, хотя бы и с невысокой эффективностью, всего процесса фотосинтеза, еще не получил до сих пор однозначного ответа в эксперименте. Во всяком случае, совместное существование этих процессов, несомненно, признак, приобретенный в процессе эволюции сравнительно недавно.

Нам еще предстоит точно установить причины физического и химического преимущества хлорсфилла по сравнению с порфирином. Интересно было бы исследовать палеонтологический материал и посмотреть, нельзя ли подтвердить представление о том, что гем (а стало быть, и его окислительная функция) возник раньше, чем в атмосфере Земли появились большие количества кислорода, образование которых можно связать только с одним геохимическим процессом — фотосинтезом, приводящим к выделению кислорода. Если это подтвердится, то очень важно далее установить время появления хлорсфиллов. Уже давно известно [67], что в нефти и в других органических минералах присутствуют как «ископаемые» молекулы гема, так и молекулы хлорсфилла. Надежда на то, что удастся различить их происхождение, основывается главным образом на возможности присутствия углеродных заместителей у  $\delta$ -атомов углерода этих веществ, ведущих свое происхождение от хлорсфилла с его изоциклическим кольцом. Относительная стабильность других возможных отличительных признаков и даже структура некоторых бактериальных хлорсфиллов (у *Chlorobium*) нам пока еще не известны. Вероятно, фотосинтез у бактерий, который протекает только с образованием АТФ (без выделения кислорода), является более примитивным процессом, и поэтому можно считать, что фотосинтетические пигменты бактерий возникли на более ранних этапах эволюции, чем хлорсфилл высших растений. До сих пор порфирины не обнаружены с достоверностью в докембрийских формациях, хотя наличие ископаемых форм, морфологически разительно сходных с сине-зелеными водорослями, и описано Бэргхорном [4, 68].

Еще в 1937 г. Г. Фишер писал: «С точки зрения исторического развития мы считаем гемин более древним пигментом». Оснований для этого заключения он не привел. Несомненно, он основывался на структурно-химических соотношениях. В свете того, что мы теперь знаем о взаимосвязи современных биосинтетических процессов, утверждение Фишера приобретает достоверность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Arnold W., Clayton R. K., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **46**, 796 (1960).
2. Arnon D. I., Nature, **184**, 10 (1959).
3. Arnon D. I., In «Light and Life» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), pp.489—565, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961.
4. Barghoorn E. S., Private communication at Woodring Conference on Major Biologic Innovations and the Geologic Record, Shenandoah National Park, Virginia, 1961.
5. Barltrop J. A. (1961) (личное сообщение).
6. Bassham J. A., J. Chem. Educ., **36**, 548 (1959).
7. Bassham J. A., Radiation Research, Suppl., **2**, 497 (1960).
8. Bassham J. A., J. Chem. Educ., **38**, 151 (1961).
9. Bassham J. A., Calvin M., The Path of Carbon in Photosynthesis, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1957.
10. Bassham J. A., Calvin M., The Photosynthesis of Carbon Compounds, W. A. Benjamin, New York, 1962.
11. Bassham J. A., Kirk M. R., Biochim. et Biophys. Acta, **43**, 447 (1960).
12. Bogorad L., In «Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems» (M. B. Allen, ed.), pp. 227—256, Academic Press, New York, 1960.
13. Calvin M., Idea and Expt., **2**, № 4 (1953).
14. Calvin M., Am. Scientist, **44**, 248 (1956).
15. Calvin M., J. Chem. Soc., p. 1895 (1956).
16. Calvin M., U. S. Atomic Energy Comm. UCRL — 3915, August 1957.
17. Calvin M., In «Radiation Biology and Medicine» (W. D. Claus, ed.), pp. 826—848, Addison-Wesley, Reading, Massachusetts, 1958.
18. Calvin M., U. S. Atomic Energy Comm. BNL 512 (C-28), 160 (1958).
19. Calvin M., Revs. Modern Phys., **31**, 147 (1959).
20. Calvin M., Revs. Modern Phys., **31**, 157 (1959).
21. Calvin M., Evolution, **13**, 362 (1959).
22. Calvin M., Science, **130**, 1170 (1959).
23. Calvin M. In «Light and Life» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), pp. 317—355, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961.
24. Calvin M., J. Theoret. Biol., **1**, 258 (1961).
25. Calvin M., Ann. Internal Med., **54**, 954 (1961).
26. Calvin M., Chem. Eng. News. **39**, 96 (1961).
27. Calvin M. Condon Lectures, «Chemical Evolution», Oregon State Board of Higher Education, Eugene, Oregon, 1961.
28. Calvin M., Advances in Catalysis, **14** (in press).
29. Chance B., Nature, **189**, 719 (1961).
30. Chance B., Nishimura M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **46**, 19 (1960).
31. Chance B., Smith L., Nature, **175**, 803 (1959).
32. Duysens L. N. M., Ames J., Kamp B. M., Nature, **190**, 510 (1961).
33. Emerson R., Chalmers R., Cederstand C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **43**, 135 (1957).
34. Fischer H., Chem. Revs. **20**, 41 (1937).
35. Fox S. W., Science, **132**, 200 (1960).
36. Fox S. W., Harada K., Science, **133**, 1923 (1961).
37. Fox S. W., Harada K., Vegotsky A., Experientia, **15**, 81 (1959).
38. French C. S., V Международный Биохимический конгресс, т. I, II, Москва (1961).
39. Fuller R. C., Gibbs M., Plant Physiol. **31**, Suppl. xxi (1956).



40. Garrison W. M., Morrison D. C., Hamilton J. G., Bensen A. A., Calvin M., *Science*, **114**, 416 (1951).
41. Gerschman R., *Proc. 21st Intern. Physiol. Pharmacol. Congr.*, Buenos Aires, 1957, p. 222 (1959).
42. Govindjee and Rabinowitch E. I., *Biophys. J.*, **1**, 73 (1960).
43. Govindjee, Rabinowitch E., Thomas J. B., *Biophys. J.*, **1**, 91 (1960).
44. Granick S., *J. Biol. Chem.*, **172**, 717 (1948).
45. Granick S., *Harvey Lectures*, Ser. **44**, 220 (1950).
46. Granick S., In «Porphyrin Biosynthesis and Metabolism», *Ciba Foundation Symposium*, Churchill, London, 1955.
47. Groth W. E., von Weysenhoff H., *Planet. Space Sci.*, **2**, 79 (1960).
48. Kamen M. D., In «Enzymes: Units of Biological Structure and Function» (O. H. Gaebler, ed.), p. 483, *Academic Press*, New York, 1956.
49. Kamen M. D., In «Light and Life» (W. D. McElroy and B. Glass, eds. pp. 483—488, *Johns Hopkins Press*, Baltimore, Maryland, 1961).
50. Lundegardh H., *Physiol. Plantarum*, **7**, 375 (1954).
51. Lundegardh H., *Biochim. et Biophys. Acta*, **35**, 340 (1959).
52. Milhaud G., Aubert J. P., Miller J., *Compt. rend. acad. sci.*, **243**, 102 (1956).
53. Miller S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2351 (1955).
54. Miller S. L., In «Aspects of the Origin of Life» (M. M. Florkein, ed.), pp. 85—97, *Pergamon Press*, New York, 1960.
55. Miller S. L., Urey H. C., *Science*, **130**, 245 (1959).
56. Oró J., Kimball A. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 166 (1961).
57. Palm C., Calvin M., «Primordial Organic Chemistry. I» (in press).
58. Palm C., Calvin M., *University of California Radiation Laboratory Report UCRL-9519*, 30—39, Januar 1961.
59. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.*, **3**, 1 (1961).
60. Shemin D., *Harvey Lectures*, Ser. **50**, 248 (1954—1955).
61. Shugar D., Wierchowski K. L., *Biochim. et Biophys. Acta*, **23**, 657 (1957).
62. Shugar D., Wierchowski K. L., *Postepy Biochem.*, **4**, 243 (1958).
63. Smith J. H. C., In «Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems» (M. B. Allen, ed.), pp. 257—278, *Academic Press*, New York, 1960.
64. Smith L., In «Light and Life» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), pp. 436—443, *Johns Hopkins Press*, Baltimore, Maryland, 1961.
65. Stanier R. Y., *Bacteriol. Revs.*, **25**, 1 (1961).
66. Swallow A. J. «Radiation Chemistry of Organic Compounds», pp. 244, *Pergamon Press*, New York, 1960.
67. Treibs A., *Angew. Chem.*, **49**, 682 (1936).
68. Tyler A. S., Barghoorn E. S., Barrett L. P., *Bull. Geol. Soc. Am.*, **68**, 1293 (1957).
69. van Niel C. B., In «The Microbe's Contribution to Biology», pp. 155—182 *Harvard Univ. Press*, Cambridge, Massachusetts, 1956 (К. Ван-Ниль, Вклад микробов в биологию, ИЛ, М., 1959).
70. Wasserman H. H., Cohen D., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4435 (1960).

# ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭТАПЫ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ

Г. ГАФФРОН

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОПОЭЗЕ

Обнаружив и собрав бесчисленные факты, касающиеся жизни на Земле, биологи XIX века начали искать общую идею, которая могла бы охватить и объяснить всю их совокупность. В конечном счете это удалось сделать Дарвину. Впоследствии биологи убедились в том, что его концепция эволюции в состоянии объяснить и возникновение жизни, и теперь они ищут факты, которые могли бы подтвердить это убедительное объяснение.

Открытия последнего времени, установившие единообразие и тождественность тех основных, важнейших реакций обмена, которые протекают во всех организмах, были не просто увлекательны сами по себе, но давали надежду найти рациональный научный подход и к проблеме происхождения жизни. Ведь эти открытия указывали на возникновение какого-то исходного примитивного организма — клетки, которая была прародительницей всех клеточных организмов, возникших после нее. Некоторые аргументы в пользу такого уникального исторического события сначала казались довольно убедительными. Теперь мы в такой же мере убеждены в том, что эти аргументы бьют мимо цели. Наша задача состоит теперь не в том, чтобы описать первоначальное возникновение какого-то частного и единственно способного выжить организма, а в том, чтобы понять и изучить условия, которые привели, что было более или менее неизбежно, к возникновению целого класса жизнеспособных явлений. Сформулированная таким образом задача при всей своей грандиозности не кажется неосуществимой (подробнее см. [29]). Такая перестройка нашей рабочей гипотезы обусловлена главным образом новыми открытиями в астрономии. Согласно Хойлу [38], Шепли [65] и Довилье [15], представляется совершенно невероятным, что возникновение и развитие жизни возможно только на нашей планете. По-видимому, в космосе существует бесчисленное множество сходных с Землей планет, а следовательно, существует естественная органическая эволюция, которая повсеместно приводит к возникновению жизни, сознания и мышления. Органическая эволюция, рассматриваемая с таких позиций, может показаться сходной с шахматной партией, которая разыгрывается вначале с дюжиной элементарных частиц и сотней элементов, а затем с двумя десятками аминокислот и четырьмя нуклеотидами. Продолжая эту аналогию, можно сказать, что каждая такая партия в своем развитии неизбежно вскоре теряет сходство с другой партией [61]. Однако наибольший интерес для нас представляют основные правила самой «эволюционной игры», и хотя в миттельшпиле и эндшпиле (например,

дарвиновская эволюция в течение последних двух миллиардов лет) эта «игра», несомненно, чрезвычайно сложна и всегда очень разнообразна, тем не менее «дебюты», по-видимому, настолько однообразны и просты, что у нас возникает надежда на успех попыток серьезно в них разобраться.

Это направление впервые возникло из остроумных попыток Холдэна и Опарина в тридцатых годах XX века и с тех пор дало плодотворные результаты. В табл. 1 дан обзор тех гипотез о ходе органической эволюции, которые представляются в настоящее время наиболее достоверными и общепринятыми. Этот обзор основывается главным образом на некоторых главах книги Опарина «Происхождение жизни на Земле» [56] и на некоторых других книгах, которые я прочитал. В нем нет ничего нового. Цель его только в том, чтобы облегчить ссылки на определенные фазы гипотетической истории эволюции жизни.

Очевидно, существует практически два подхода к нашей проблеме. Мы можем начать с самого начала, с эры I. При этом мы берем за основу более или менее твердо установленные факты, добытые геохимиками и астрономами, и начинаем экспериментировать, все более усложняя те модельные реакции, которые, по нашему мнению, могли бы быть движущими факторами эволюции на протяжении определенного геологического периода. Можно также начать с нашего времени, с аэробной эры V, и попытаться углубиться в прошлое таких реакций метаболизма, эволюционную историю которых можно было бы проследить. Желая изучить историю фотохимического синтеза на Земле, мы можем сразу же подойти к пограничной черте, отделяющей нашу эру от последней анаэробной, так как эра IV кончается образованием в атмосфере кислорода за счет фотосинтетической активности растений. На долю эры V приходится большая часть дарвиновской эволюции.

По причинам, к которым мы вернемся позже, мы считаем, что дарвиновская эволюция клеточных организмов, в ходе которой определяющая роль принадлежит наследственности и мутациям, должна была начаться раньше этой даты, т. е. где-то в глубине эры IV. Это означает, что жизнь должна была возникнуть еще значительно раньше. Возникновению фотосинтеза, проходящего с освобождением кислорода, должна была предшествовать огромная работа. Таким образом, конечный этап процесса возникновения жизни, если под этим разуметь момент возникновения первой «современной» клетки, должен был предшествовать возникновению развитого фотосинтеза. Это утверждение дает непосредственную возможность поставить вопрос о том, какие из хорошо известных нам реакций метаболизма были уже полностью развиты к этому времени. Дыхание? Конечно, нет. Брожение? Да, но, вероятно, не в той форме, которую мы обычно имеем в виду в связи с гликолизом углеводов. Фотосинтез? Да, но без выделения кислорода из воды, т. е. в той анаэробной форме, которую мы называем фотовосстановлением. Что же дает нам основания высказывать подобные догадки? Дело в том, что при изучении современных одноклеточных организмов были обнаружены несколько более простых, менее комплексных и несколько менее эффективных метаболических путей по сравнению с теми, которые мы находим у большинства аэробных организмов. При этом у нас нет никаких оснований полагать, что эти реакции возникли в результате вторичного упрощения. У некоторых водорослей, например, более простые метаболические пути существуют совместно с такими путями, которые возникли в процессе более позднего развития.

Обычно водоросли и бактерии рассматривают как примитивные организмы, так как они находятся на нижней ступени эволюционной лестницы.

Таблица 1

## Краткий обзор современных представлений о последовательных этапах эволюции

Эра	Определяющие условия среды	Главные источники энергии	Результат
I	Анаэробные, сильно восстановительные	Ультрафиолет, тепло, электрические разряды	Простые радикалы. Накопление органических молекул в океане. Ацетат, глицин, урацил, аденин и т. п. («органический суп», по Опарину—Холдэну)
Исчезновение водороды			
II	Анаэробные; следы кислорода	Ультрафиолет, тепло  Видимый свет	Сложные органические соединения, каротины, нуклеотиды, пептиды, полифосфаты, пигменты, <i>порфирины</i> . Катализ металл-органическими соединениями. Примитивный катализ на поверхностях. Межмолекулярные окислительно-восстановительные реакции
Появление слоя озона (защита от ультрафиолета)			
III	Преимущественно анаэробные; некоторое количество двуокиси углерода; следы кислорода	Видимый свет	Эволюция «синтетических циклов». Многократная репликация. Специфический катализ и <i>фотохимические процессы</i> на поверхности больших органических молекул. Примитивные ферменты. Гены
Первые организмы			
IV	Те же условия, что для эры III	Видимый свет (фотовосстановление)  Брожение	Репликация метаболических единиц за счет «пищи». <i>Фотофосфорилирование</i> . <i>Фотоконверсия ацетата</i> . Уменьшение запаса первоначальной органической «пищи». <i>Фотовосстановление</i> двуокиси углерода за счет органических и неорганических доноров водорода

Появление больших количеств кислорода

Продолжение табл. 1

Эра	Определяющие условия среды	Главные источники энергии	Результат
V	Преимущественно аэробные с отдельными анаэробными областями (двуокись углерода сначала в большем, затем в меньшем количестве)	Видимый свет (фотосинтез)  Дыхание	Автотрофные растения. Новый источник пищи. Появление дышащих организмов. Автоокисление, фотоокисление. Дифференцировка многоклеточных организмов. Растения и животные становятся полностью зависимыми от <i>фотосинтеза</i> , для которого необходима свободная двуокись углерода. Установление современных равновесных условий. Непрерывный кругоборот приблизительно постоянного объема органического материала

Но сама эта эволюционная лестница относится только к дифференцировке многоклеточных организмов. С биохимической точки зрения вряд ли одноклеточные организмы менее сложны, чем какие-либо другие. У одноклеточных организмов уже полностью развиты такие основные, важнейшие реакции, как брожение, дыхание и фотосинтез. По истечении двух миллиардов лет эры V на Земле уже не осталось подлинно примитивных организмов. Существует, однако, одно важное различие между низшими и высшими организмами. Последние уже утратили большую часть тех черт, которые имели живые существа в начале нашей аэробной эры V и которые они унаследовали от предшествующей анаэробной эры IV. Анаэробные фотосинтезирующие бактерии и одноклеточные водоросли обладают такими особенностями метаболизма, которые ясно выдают их происхождение из анаэробной эры IV, хотя с той поры прошло несколько миллиардов лет. Существует два обширных класса организмов, как бы застывших на этой пограничной черте: это такие организмы, которые способны развиваться только в отсутствие кислорода, хотя и не гибнут в мягких аэробных условиях, и такие, которые уже стали аэробными организмами, но не боятся переноса в анаэробные условия и продолжают активно осуществлять свой метаболизм в отсутствие кислорода. Среди этих организмов мы и будем искать указаний на миновавшие дни эволюции.

Недавние исследования ряда видов зеленых и сине-зеленых водорослей вскрыли поразительное разнообразие переходов и сочетаний различных типов аэробного и анаэробного метаболизма. Ниже я опишу новый пример того, как удалось установить экспериментально, что наиболее важная из фундаментальных реакций — фотосинтез — развилась путем последовательного приобретения уже ранее высокоспециализированных ферментных систем.

С другой стороны, пигментные комплексы, главным компонентом которых является хлорофилл, по всей вероятности, эффективно функционировали (т. е. преобразовывали световую энергию в химический потенциал) задолго до того, как возникла первая клетка или даже первый настоящий фермент. Иными словами — как я пытался показать в табл. 1, — мы счи-

таем, что фотохимические превращения с участием порфиринов не только сопровождали, но и оказывали решающее влияние на ход эволюционного процесса с самых давних времен; они стали важным фактором в течение эры *II*. Можем ли мы доказать это? Здесь нас ждет разочарование. Насколько я знаю, не была еще осуществлена такая модельная реакция, которая показала бы возможность легкого спонтанного синтеза порфирина в тех условиях, какие имели место в течение эры *I* или *II*. Между тем знаменитый опыт Миллера-Юри был проведен уже девять лет назад. Находясь, как и все мы, под впечатлением, с одной стороны, той легкости, с какой при электрических разрядах в атмосфере метана и аммиака образуются алифатические кислоты и аминокислоты [54, 57], а с другой — простоты тех путей, по которым клетка строит порфирины из этих самых продуктов реакций Миллера [66], я высказал в 1955 г. на конференции по использованию солнечной энергии в Тусконе предположение, что порфирины, являющиеся в лабораторных экспериментах прекрасными фотосенсибилизаторами, должны были играть решающую роль на ранних стадиях эволюции — практически ту же роль, какую они играют в настоящее время [27, 28].

Переход от эры *I* к эре *II* был обусловлен полной потерей избытка свободного водорода. После этого прямое разложение паров воды под действием ультрафиолета привело к выделению кислорода и озона в количестве, достаточном для защиты поверхности Земли от дальнейшего влияния этого первоначального важного источника энергии. По-видимому, значительно позже, лишь после того как возник современный фотосинтез, свет мог снова начать играть в эволюционном процессе ту роль, которая первоначально принадлежала ультрафиолету. Но на этот раз процесс шел в области более низких частот, т. е. при меньшем запасе энергии в каждом поглощаемом кванте. Однако если порфирины могут спонтанно образовываться из компонентов «миллеровского варева», то, очевидно, эти флуоресцирующие пигменты должны были в значительной мере ускорять эволюцию, в особенности потому, что видимого света в атмосфере значительно больше, чем ультрафиолета. В то же время действие видимого света значительно мягче, оно менее деструктивно, носит менее «стерилизующий» характер, и вместе с тем энергии видимого света достаточно, чтобы вызвать любое число актов переноса электронов (водорода), окислительно-восстановительных реакций и процессов прямого окисления малых и больших органических молекул. Я по-прежнему убежден в том, что эта гипотеза не только правдоподобна, но и необходима для объяснения скорости эволюции.

За истекшее время значительное число биологически активных веществ было синтезировано в эксперименте при таких условиях, которые явно сравнимы с условиями внешней среды эры *I*. Допустим, что за достаточно длительное время могли спонтанно возникнуть все малые молекулы, служащие строительными материалами и катализаторами в основном метаболизме живых клеток. В чем же заключается значение этих новых экспериментов по сравнению, скажем, с синтезом щавелевой кислоты или мочевины, выполненным Вёлером сто тридцать лет назад? Только в том, что сейчас эти эксперименты сознательно моделировались так, чтобы условия, в которых они проводились, соответствовали условиям, существовавшим, по нашему мнению, на протяжении эры *I* или эры *II*. Что касается путей возникновения жизни, то они дают нам об этом не больше указаний, чем дает находка кучи камней или кирпичей для понимания чертежей, правил конструирования и законов механики, позволяющих построить из этих камней мост или храм.

Тот факт, что эти простые химические вещества могли иметься в больших количествах, конечно, очень утешителен. Он позволяет нам с большей уверенностью искать подходы к решению подлинной проблемы. Отрицательный результат всех попыток получить надлежащие органические соединения в условиях, соответствующих геохимическим, был бы тяжелым ударом. Но нужно помнить, что вещества, накапливавшиеся в течение эры I, были такими же мертвыми, как и сегодня, когда мы умеем синтезировать их (как и многие другие, более сложные вещества) в любом желаемом количестве.

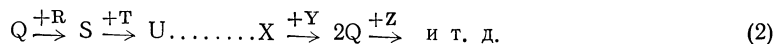
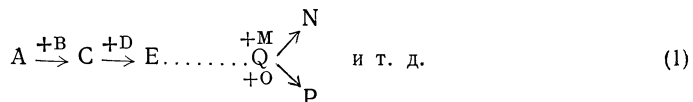
### ОРГАНИЧЕСКИЙ КАТАЛИЗ И РЕПРОДУКЦИЯ

Когда мы говорим, что события, относящиеся к первой и последней эрам, в принципе поняты нами, то, конечно, это не означает, что больше не осталось важных нерешенных научных проблем, касающихся этих периодов. Это означает лишь, что эти проблемы уже можно сформулировать рациональным образом, тогда как, занимаясь загадками, таящимися за событиями эры II и частично эры III, мы стоим еще перед задачей найти правильную формулировку самой проблемы.

Наиболее загадочным является возникновение белков и нуклеиновых кислот в самовоспроизводящихся системах. Высокополимерные соединения типа белков или нуклеиновых кислот могут быть получены относительно простыми методами. Но такие катализаторы, как известные нам ферменты, столь специфичные в своем действии благодаря в высочайшей степени детализированной внутренней структуре и конфигурации, не могли возникнуть спонтанно под влиянием сил, действовавших в эре I. Такова общепринятая сейчас точка зрения [2].

Однако если одновременно формируется и совершенствуется благодаря отбору ряд специфических ферментов, то синтез *de novo* какого-либо определенного фермента из его элементарных компонентов не обязательно должен требовать участия целой клетки (см., в частности, [64]). Участия целой клетки требует только процесс репродукции во всей его целостности, ибо здесь синтез одного катализатора зависит от синтеза других катализаторов, которые зависят в свою очередь... и т. д. По-видимому, необходимо предположить, как это делает Анкер, что вначале катализаторы, так же как и цикл репродукции, были более простыми и, несомненно, менее специфичными и менее эффективными. Кальвин [12, 13] показал, как колоссально может быть биологическое ускорение действия некоторых металлов-катализаторов при наличии в среде соответствующих белков. Все это еще не дает нам возможности раскрыть завесу, скрывающую тайну образования белков. Поэтому, естественно, привлекают к себе большое внимание всякого рода комбинации искусственно приготовленных реагентов, образующих комплексные соединения с металлами, например хинолинов, со столь же искусственными молекулярными поверхностями, создаваемыми при действии детергентов. Как показали Лове и Филлипс [51], в таких условиях катализируется образование металлосодержащих порфиринов. Полное исчезновение к настоящему времени ранних стадий процесса делает задачу, с которой мы здесь сталкиваемся, особенно трудной. Когда мы пытаемся их реконструировать, мы не можем считать, что результат наших трудов будет соответствовать «естественным», т. е. исторически существовавшим, стадиям процесса. Всякое вещество Q, возникшее в результате ряда этапов, которые могли осуществляться в предполагаемых условиях эры I или эры II, и способное инициировать другую последователь-

ность реакций, приводящую снова к образованию этого вещества, и участвовать в ней, является, очевидно, самовоспроизводящимся [1, 2, 74]:



В цепи реакций (2) все вещества Q, S, U, ... X «воспроизводятся» за счет пищи с помощью промежуточных метаболитов, символически обозначенных буквами R, T...Y. Полимеризация предсуществовавших сходных или тождественных компонентов не является самовоспроизведением. Равным образом и ускорение реакций типа (1) в результате каталитического действия продукта Q не является автокатализом. Вопрос о специфическом источнике энергии, направляющей определенный класс реакций синтеза, также является вторичным по отношению к общей проблеме.

Биохимики обычно интересуются природой отдельных соединений в последовательности реакций



и их химическими взаимодействиями. Задачей эволюционной биохимии является реконструкция таких последовательностей реакций типа (1), которые могли бы приводить ко всевозможным веществам Q, способным инициировать реакции типа (2). Последующие этапы эволюции усложнили эту проблему, так как в клетке сотни циклов самовоспроизведения сплетаются подобно отдельным словам кроссворда. Например, вещество Q<sub>1</sub> не может возникнуть до тех пор, пока не возникло вещество Q<sub>2</sub>, и т. д. Такое свехупрощение основной, центральной проблемы, о которой мы знаем столько подробностей и в то же время не имеем никаких твердо установленных общих правил, имеет целью только подчеркнуть, что на ранних этапах эволюции могли функционировать простые циклы репродукции. Положение в нашей проблеме сходно с тем, какое существовало в начале XIX в. в вопросе о происхождении видов.

Оба эти типа реакций — прямой синтез и циклическая репликация — могли бы возникнуть одновременно, если бы уже существовали условия для реакций типа (2) и еще сохранились условия для реакций типа (1). Затем реакции типа (2), будучи более эффективными (а в наших умозаключениях относительно эволюции мы всегда предполагаем, что именно так и обстоит дело), могли бы взять верх и вытеснить реакции типа (1). Возможно также, что оба эти типа реакций возникли в периоды, разделенные многими миллионами лет и соответствующие разным эрам. Быть может, например, образование соединений, которые могли позже играть роль соединений типа Q, происходило под действием коротковолнового ультрафиолетового света, действовавшего на поверхность Земли и в эру II, тогда как возникновение циклических процессов стало возможным лишь при условиях, возникших в эре III. Это автоматически закрыло бы книгу на начальной эволюции веществ типа Q, и перед современным наблюдателем вся проблема предстала бы в более простом издании, с которым мы имеем дело сегодня. Как только возникли «циклы веществ Q», они размножились за счет свободной пищи, одновременно развиваясь во все более и более сложные системы. Когда первоначальные запасы органической материи были почти исчерпаны, источником энергии и соединений углерода мог стать только



новый тип фотохимических процессов. Так, в процессе эволюции был отобран специальный тип фотохимических процессов органических веществ, который затем сам стал определяющим фактором эволюции.

#### ИЗМЕНЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА ПРОТЯЖЕНИИ ЭВОЛЮЦИИ

При изучении эволюции метаболических реакций мы пытаемся в основном выяснить, что определяло возрастание эффективности, скорости и специфичности этих реакций, хотя они и протекают при относительно низкой температуре по сравнению со сходными реакциями *in vitro*. Попытка понять эволюцию фотосинтеза добавляет к проблеме ферментативного катализа другую задачу совершенно противоположного характера: каким образом сохранить потенциально высокую скорость и эффективность фотохимической реакции? Квантовый выход одного акта поглощения света, приводящего к возникновению возбужденного электронного состояния поглотившей свет молекулы, принят равным единице.

Вероятность того, что после поглощения кванта возбужденная молекула органического пигмента будет инициировать некоторую химическую реакцию, может иметь любое значение между нулем и (практически) единицей. Возбужденная светом молекула хлорофилла при наличии соответствующих реагентов может *in vitro* давать химическую реакцию в 95 случаях из 100. (Оставляя в стороне возможные цепные реакции, мы будем говорить, что в этом случае квантовый выход реакции почти равен единице.) Это относится и к некоторым порфиринам, которые, как мы считаем, образовались в эре II. [25]. Современный фотосинтез в живых клетках настолько сложен, что для эффективного освобождения одной молекулы кислорода из воды требуется 8 квантов, т. е. 8 отдельных первичных актов в 8 отдельных молекулах хлорофилла (последние обзоры известных расхождений в оценке квантовых выходов фотосинтеза см. [30, 44]). Мы можем сформулировать это по-иному, сказав, что для получения одного эквивалента радикала водорода плюс один эквивалент радикала гидроксила в состоянии, приблизительно эквивалентном половине молекулы перекиси водорода, необходимы два световых кванта. Два — это, по-видимому, минимальное число квантов видимого света, которое содержит достаточное количество энергии, потому что одного кванта недостаточно. Можно создать условия, при которых работает каждая молекула хлорофилла в функционирующем хлоропласте. Хотя в клетке часто присутствуют и другие вспомогательные пигменты, однако лишь один тип молекул, именно хлорофилл (магнийсодержащий порфирин), является фотоактивным и только его фотохимические реакции служат источником всей пищи, которой мы располагаем. Это может означать только одно: преимущества, которые хлорофилл сохранил или приобрел на протяжении эволюции, должны быть очень велики, по крайней мере столь же велики, как преимущества железосодержащих порфиринов в процессах окислительно-восстановительного катализа. «Господствующее положение» хлорофилла должно было утвердиться до эры V, так как именно фотосинтез с участием хлорофилла и обусловил переход от эры IV к эре V. Оставляя в стороне многочисленные эксперименты с неорганическими фотокатализаторами и связанные с ними спекуляции, мы можем указать по крайней мере три причины, в силу которых хлорофилл вышел победителем в конкуренции с другими органическими пигментами. Во-первых, только структура хлорофилла обеспечивает возможность 100-процентной внутренней конверсии поглощенной световой энер-

гии в энергию электронного возбуждения, которая может быть использована в химических реакциях (квантовый выход около 1). Во-вторых, только хлорофилл способен выполнять функцию окислительно-восстановительного катализатора с минимальными внутренними потерями на тепло или излучение, что делает сопряжение его с другими ферментными системами чрезвычайно эффективным. В-третьих, порфирины возникли раньше всего и в больших количествах; будучи не хуже других пигментов, но стабильнее их, они с самого начала заняли господствующее положение в фотохимии жизни.

Первое соображение не очень убедительно. Пигменты с совершенно иной химической структурой также могут в лабораторных опытах сенсibilизировать химические реакции с квантовым выходом, близким к единице. Второе соображение также не слишком сильно, ибо столь отличные от хлорофилла флавины составляют основу природных окислительно-восстановительных пигментов с ясно выраженной фотохимической активностью. Мы покажем на модели, которая будет приведена ниже, что эти пигменты прекрасно приспособлены к функционированию на белковых поверхностях.

Третье соображение является нашим основным объяснением. Оно очень просто, но опирается на тот факт, что наука не обнаружила ни одного класса живых существ, у которых отсутствуют порфирины. Кроме того, по сравнению с другими пигментами, способными приходить в возбужденное состояние под действием света, хлорофилл имел то преимущество, что в присутствии следов кислорода он способен окислять другие пигменты, раньше чем он сам подвергнется фотоокислению. Нетрудно придумать и другие причины, объясняющие господство хлорофилла в органическом мире, например необходимость перекрывания полос поглощения нескольких близкородственных пигментов одного комплекса для эффективного переноса заряда, но, несомненно, все это — позднейшие усложнения, возникшие в ходе эволюции. Пока нам достаточно самой общей гипотезы.

Таким образом, наш общий вывод заключается в том, что способность сенсibilизировать химическую реакцию с квантовым выходом, близким к единице, должна была использоваться на всем протяжении органической химической эволюции, начиная с эры *II* и до эры *IV*, когда фотосинтез стал тем, что он представляет собой сейчас. В этой эволюции фотохимии жизни должны были быть одержаны две наиболее крупные победы. Одной из них было исключение бесполезных обратных реакций между непосредственными продуктами первичного светового этапа процесса. Около одной трети поглощенной энергии фиксируется растением в синтезируемых углеводах и расходуется на образование кислорода. Чтобы добиться такого результата, все промежуточные соединения на пути к углеводам или свободному кислороду должны быть защищены от вовлечения в побочные реакции или рекомбинации с соответствующими партнерами без совершения полезной работы. Другая победа заключалась в объединении эффектов двух квантов света для осуществления фотолиза, или фотоокисления воды, т. е. процесса, для которого энергии одного кванта недостаточно.

Осуществляемые в лабораториях реакции с квантовым выходом, близким к единице, всегда являются экзергоническими; первичные продукты реакции при этом разделяются. Это напоминает то, что произошло бы, если бы кого-нибудь столкнули в пропасть. При этом вероятность немедленного возвращения обратно, конечно, весьма невелика. Напротив, когда суммарная фотохимическая реакция является эндергонической, то квантовые выходы очень низки: первичные продукты реакции сейчас же «скатываются», подобно сизифову камню, со своих высоких энергетических

уровней и рекомбинируют, поскольку специфические молекулярные структуры для их захвата отсутствуют. В живой клетке эти проблемы решаются тем, что молекулы пигмента располагаются на поверхности макромолекулярной структуры, а наиболее трудная задача — освобождение кислорода — осуществляется в два этапа [23, 30, 44, 60]. На каком же этапе эволюции были сделаны эти два фундаментальных приобретения? Эволюция фотосинтеза должна была претерпеть решающий поворот в тот момент, когда появились белковоподобные вещества. Здесь наша проблема сливается с общей проблемой эволюции белков. Поэтому я опишу ниже особую модельную фотохимическую реакцию, способную внести вклад в проблему возникновения взаимодействия между фотохимическими и ферментативными реакциями.

Эволюция фотосинтетического аппарата была завершена, т. е. этот аппарат принял свои современные черты тогда, когда он приобрел способность образовывать свободный кислород. Чтобы прийти к этому конечному результату, необходимо было последовательное объединение в одной цепи целого ряда реакций. Какая же из них была последним приобретением, положившим конец анаэробной эре? Каждый знает, что в зеленых растениях кислород освобождается из воды. Отсюда даже человек, далекий от этих проблем, может сделать очевидный вывод, что этим последним этапом эволюции было использование воды в качестве донора водорода, тогда как до этого донорами водорода служили такие вещества, как  $H_2$ ,  $H_2S$  и масляная или молочная кислоты.

Такой ответ был бы совершенно приемлем тридцать лет назад, когда Ван-Ниль [69] впервые направил изучение фотосинтеза по правильному пути. Однако в настоящее время у нас имеется достаточно дополнительных данных, показывающих, что такой ответ слишком поверхностен и не дает объяснения многим достоверно установленным фактам. Тем не менее в настоящее время этот ответ вновь предлагается все в той же привлекательной своей простотой форме в качестве новой идеи [50].

Поэтому последний раздел этой статьи посвящен рассмотрению экспериментальных доказательств существования длительной эволюционной истории механизма разложения воды, восходящей, быть может, к эре, предшествовавшей возникновению живых клеток.

#### ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗНАЯ СИСТЕМА, СОДЕРЖАЩАЯ ФЛАВИН, МАРГАНЕЦ И ГЕМИНОВУЮ ГРУППУ

То, что будет сказано ниже, основано на результатах изучения взаимодействия некоторых агентов, используемых обычно для усиления реакций хлоропластов.

1. *Аскорбиновая кислота*. В методиках многих экспериментов с хлоропластами аскорбиновая кислота фигурирует как фактор, обеспечивающий известный баланс между уровнями окисления других компонентов цепи переноса электронов [49].

2. *Флавин (ФМН)* — соединение, принимающее участие в одном из типов циклического фотофосфорилирования [5].

3. *Каталаза*. В опытах, проведенных в нашей лаборатории Мелером [53], смесь каталазы с этиловым спиртом по Кейлину — Хартри [40] использовали для удаления перекиси, образующейся на свету при восстановлении свободного кислорода хлоропластами.

4. *Ион марганца*. Герретсен [31] показал, что наличие ионов марганца изменяет величину потенциалов, возникающих под действием света в экс-

трактах из зеленых растений. Кесслер [42] нашел, что в процессе фотосинтеза недостаток ионов марганца сильнее всего сказывается на реакциях, связанных с выделением кислорода (см. также [52]).

5. Препараты *хлоропластов*, выделенные из листьев подсолнечника (*Helianthus annuus*).

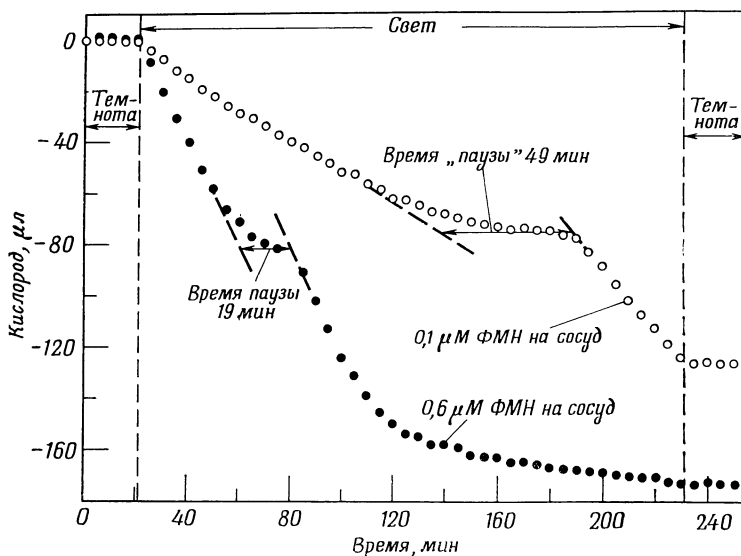
Известно, что флавины чувствительны к свету и разлагаются под действием света как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Хорошо известно также, что флуоресцирующие красители способны осуществлять фотоокисление аскорбиновой кислоты. Один из таких примеров — фотоокисление флавином, однако здесь реакция более сложна из-за светочувствительности самого сенсibilизатора. Каталаза в этиловом спирте предотвращает накопление перекиси водорода, если она образуется в ходе такого фотоокисления. Таким образом, при освещении на воздухе смеси, состоящей из соединений 1, 2 и 3, аскорбиновая кислота быстро окисляется, превращаясь в дегидроаскорбиновую кислоту. Такие опыты настолько хорошо известны, что их можно считать тривиальными.

При добавлении к смеси иона марганца характер реакции поразительно изменяется, и теперь ее никак нельзя считать тривиальной. Фотоокисление аскорбиновой кислоты уже не останавливается, как обычно, на уровне дегидроаскорбиновой кислоты, а продолжается дальше. Поглощается второй эквивалент кислорода, и происходит разложение самой дегидроаскорбиновой кислоты. Эти два этапа окисления не идут одновременно или непосредственно друг за другом. Они четко разделены третьей промежуточной реакцией, протекающей без потребления кислорода и требующей известного времени для своего завершения. Такой трехступенчатый процесс наблюдается только тогда, когда в системе присутствуют все четыре компонента [34, 35]. Более детальный анализ, слишком сложный, чтобы его стоило излагать здесь, приводит к следующему объяснению этих фактов (фиг. 1). Исходный субстрат, аскорбиновая кислота, подвергается фотоокислению на поверхности комплекса флавинов — марганец — каталаза до тех пор, пока почти весь запас этого субстрата не будет исчерпан. За это время накапливается продукт окисления, который, однако, *не является* стабильной дегидроаскорбиновой кислотой. Второй этап начинается только тогда, когда концентрация исходной аскорбиновой кислоты становится очень низкой. На этом втором этапе, не требующем участия кислорода, происходит фотореакция преобразования первого окисленного промежуточного вещества в собственно дегидроаскорбиновую кислоту. Дегидроаскорбиновая кислота в свою очередь может также на протяжении этого процесса накапливаться до тех пор, пока в основном не исчезнет предшествующая форма. Только после этого начинается третий этап — второе фотоокисление. По-видимому, когда интенсивность света достаточно мала и является фактором, лимитирующим скорость этого второго фотоокисления, окисление дегидроаскорбиновой кислоты идет даже с несколько большей скоростью, чем первое фотоокисление. Именно это второе фотоокисление и требует присутствия в смеси, кроме флавина, также каталазы и ионов марганца, в отсутствие которых оно не идет. Аскорбиновая кислота, как упоминалось выше, может подвергаться, хотя и с меньшим квантовым выходом, фотоокислению и в чистом растворе; образование в этом процессе предшественника дегидроаскорбиновой кислоты также отмечалось раньше [41, 55].

Сложность и специфичность обычного фотоокисления, возникающие при добавлении металлсодержащего белка, могут еще возрасти, если связать его с таким большим гетерогенным молекулярным комплексом, как хлоропласты или их обломки. Препараты хлоропластов готовили из листьев

подсолнечника (*Helianthus annuus*), и, насколько мы знаем, они были совершенно неактивны в общеизвестных сейчас фотометаболических реакциях.

Добавление хлоропластов не изменяет характера описанной тройной последовательности реакций. Оно главным образом смещает область эффективного поглощения света в красную область спектра. Хотя «нативный» хлорофилл полностью лишает флаavin его роли сенсibilизатора, тем не менее он не заменяет флаavin в его химических функциях. ФМН нельзя



Фиг. 1. Три последовательных этапа фотоокисления аскорбиновой кислоты при действии флавина (ФМН), каталазы и ионов  $Mn^{++}$  [35].

исключить из реакционной смеси. Выяснение природы и кинетики переноса энергии между этими двумя пигментами — дело дальнейших исследований, равно как и выяснение многих других сторон явления.

Здесь, в свете проблем фотохимической эволюции, нас интересует главным образом тот факт, что введение только одного белкового вещества может столь значительным образом изменять взаимодействие пяти более простых веществ: железосодержащего порфирина, ионов марганца, флавина, кислорода и аскорбиновой кислоты. Белок вносит соподчинение, упорядоченность и специфичность. Необходимо наличие пигмента, поглощающего видимый свет; вместе с тем система не должна подвергаться действию ультрафиолетовых лучей, которые способны легко разрушать некоторые из этих молекул. В нашей хронологической таблице эра II и представляет собой тот период, когда, во-первых, уже возникло много типов органических веществ и, во-вторых, видимый свет начал замещать ультрафиолет в качестве основного источника энергии.

С точки зрения эволюционной биохимии недостаток нашей модели состоит в том, что она не обладает «синтетическими» качествами. В целом в ней представлен только процесс фотоокисления. Было бы очень желательно дополнить ее строго экзергонический характер представлением о фотоиндуцированном образовании перекисей или об окислительно-восстановительных реакциях, протекающих с обнаружимым выигрышем свободной энергии,  $\Delta F$  [45, 46]. Другую задачу представляет замена природного

гемопротейна искусственным высокомолекулярным соединением [19, 20, 51]. Это значительно увеличило бы ценность нашей псевдометаболической световой реакции как средства более глубокого проникновения в те процессы, которые могли происходить на протяжении эры II, этого раннего средневековья в истории жизни.

#### СПОСОБНОСТЬ К ВЫДЕЛЕНИЮ КИСЛОРОДА КАК РЕЗУЛЬТАТ МУТАЦИИ В ФОТОВОССТАНАВЛИВАЮЩЕМ ОРГАНИЗМЕ

За последние два десятилетия опубликованы буквально сотни работ, посвященных биохимии фотосинтеза [30, 58, 60]. В этих работах окончательно разрешен один вопрос, решение которого намечалось еще до 1940 г. Было показано, что ассимиляция и восстановление двуокиси углерода в растениях происходят в результате совместного действия нескольких ферментных систем. Они близко напоминают те реакции метаболизма, которые у нефотосинтезирующих организмов участвуют в дыхании, брожении и других процессах химического синтеза. Эти ферментные системы сосредоточены в одной совершенно специфичной для них части фотосинтетического аппарата — в поглощающем свет хлорофилльном комплексе. Наши знания об этом последнем комплексе очень мало продвинулись по сравнению с тем, что предполагалось, обсуждалось и теоретически постулировалось много лет назад.

Знаменитая работа Кальвина и Бенсона [7], выяснившая в мельчайших деталях путь преобразований двуокиси углерода в сахар через целый ряд различных этапов, дает только случайную и отдаленную информацию о продуктах первичного процесса поглощения света. Причина этого в том, что между ферментативными реакциями, из которых складывается процесс фотосинтеза, и собственно фотохимическими превращениями существует лишь весьма слабая связь. Имеется множество способов, при помощи которых мы можем разделить комплексный процесс фотосинтеза на отдельные частные реакции, не затронув той специфической последовательности реакций, которая ставит фотосинтезирующие организмы на совершенно особое место в живом мире, а именно поглощение световых квантов и необычайно эффективную конверсию их электромагнитной энергии в потенциальную химическую энергию. Легче всего вычленил цикл Кальвина — Бенсона — синтез углеводов. В этом случае хлорофилльный комплекс полностью сохраняет свою способность катализировать выделение кислорода, т. е. разлагать (или окислять) на свету воду, если только для этого имеются подходящие (физиологические или нефизиологические) восстановители. Можно также блокировать различными специфическими путями выделение кислорода и показать, что фотохимическое восстановление двуокиси углерода продолжается при этом без помех, если только обеспечен иной путь оттока продуктов дегидрогенизации воды. Когда исключены обе эти формы активности (с одной стороны, восстановление, а с другой — окисление с выделением кислорода), то накопление световой энергии все еще продолжается. Особенность фотохимической системы в организмах заключается в том, что все обратные реакции, обусловленные начинающимся накоплением промежуточных продуктов, не используемых для внешних окислительно-восстановительных реакций, направляются по путям, ведущим к образованию макроэргических фосфатов (например, АТФ), если только имеются налицо необходимые ферменты и акцепторы фосфата [4]. Когда блокируется и этот последний путь, спектроскопические данные все еще указывают на существование в пигментном комплексе начальных окис-

лительно-восстановительных реакций [14, 72, 73]. Нельзя требовать лучших доказательств в пользу гипотезы о том, что тот полный механизм, какой мы находим в современных зеленых растениях, возник в результате последовательного приобретения одной синтетической способности за другой [47].

Таким образом, мы встречаемся с фундаментальным процессом метаболизма, который может дать нам ключ к пониманию событий, происходивших задолго до начала дарвиновской эволюции. После того как Ван-Ниль в своих классических работах по сравнительной биохимии фотосинтезирующих организмов привлек наше внимание к чертам сходства между выделяющими кислород растениями и анаэробными, но фотосинтезирующими (фотовосстанавливающими) бактериями, ученые предполагали, что такие бактерии представляют собой более раннюю, несколько более примитивную форму жизни. Общепринятым было мнение, что реакция, приводящая к выделению свободного кислорода, возникла как конечный этап в эволюции фотосинтеза. В дальнейшем мы должны иметь в виду, что у бактерий и у растений основные фотохимические катализаторы, такие, как хлорофиллы, цитохромы и каротины, одинаковы. Двуокись углерода ассимилируется у тех и у других через фосфоглицериновую кислоту; циклическое фотофосфорилирование протекает у обоих этих типов организмов. Среди различий между ними нужно отметить, что у бактерий преобладает ацетатно-жировой метаболизм, тогда как метаболизм в растениях ориентирован преимущественно на углеводы в качестве промежуточных продуктов. Различие, заключающееся в том, что организмы одного класса по преимуществу аэробны, а другого — анаэробны, весьма относительно. Известно, что некоторые пурпурные бактерии (хотя таких и меньшинство) могут переносить аэробные условия и даже расти за счет дыхательных процессов, тогда как некоторые зеленые водоросли переносят кислород, но не способны к гетеротрофному росту в темноте, так как они не обладают надлежащей дыхательной системой. Другим водорослям необходимы для роста свет и ацетат [59]. Словом, все известные нам одноклеточные организмы, использующие световую энергию, имеют так много общих черт, а свойства, определяющие различия между отдельными видами или штаммами их, перекрываются настолько сильно, что подобным биохимическим отклонениям трудно приписать какое-либо подлинно решающее значение. Поэтому выбор тех характерных черт, которые позволили бы нам понять, почему у одних из этих организмов происходит, а у других не происходит выделение кислорода, очень ограничен.

Попытка серьезного, т. е. экспериментального, исследования истории фотохимии живых клеток должна начаться с изучения доступных нам явлений и с выработки точных формулировок проблем, стоящих перед нами. Какая особая частная реакция была заключительным звеном в цепи возникновения механизма освобождения кислорода? От правильного ответа на этот вопрос зависит интерпретация процесса, обычно называемого фотолизом воды. Это слово означает, что свет играет существенную роль в освобождении кислорода из воды. Мы не знаем ни одного метаболического процесса, который мог бы привести к непрерывному выделению кислорода из воды в темноте. Стало быть, здесь мы имеем действительно ключевой исходный пункт. В зависимости от того, на какой предполагаемый механизм этой реакции хочет намекнуть тот или иной автор, эту реакцию называют дегидрогенизацией воды или ее фотоокислением. К сожалению, однако, такие чисто семантические предпочтения часто представляются авторами таким образом, как если бы они действительно вносили что-нибудь новое в обсуждаемый вопрос [8].

В отличие от других частных реакций фотосинтеза механизм выделения кислорода не был до сих пор отделен от фотохимических процессов как самостоятельная система реакций. Мы не знаем, с чего начинается выделение кислорода и каковы те промежуточные продукты, которые разлагаются марганецсодержащим ферментом. Этот механизм так тесно связан с хлорофилльным комплексом, что препараты хлоропластов сохраняют способность выделять кислород даже после промывки, когда теряется способность фиксировать двуокись углерода, или восстанавливать трифосфопиридиннуклеотид (ТФН), или накапливать макроэргические фосфатные связи. Эта активность хлоропластов сохраняется и после лиофилизации, а также после экстрагирования липидными растворителями и реактивации. Однако способность освобождать кислород (наряду со всеми другими синтетическими способностями) исчезает, если хлоропласты механически разрушить на частицы, которые содержат менее 400 молекул хлорофилла.

Таким образом, реакция с водой более тесно связана с активностью всего пигментного комплекса, чем какая-либо другая реакция фотосинтеза. Именно поэтому мы считаем, что дегидрогенизация воды была первым шагом на пути возникновения примитивного процесса фотосинтеза [68]. О специфическом механизме этого процесса мы не знаем ничего достоверного. Кинетические, химические, а также спектроскопические данные указывают на присутствие наряду с поглощающими свет пигментами нескольких цитохромов, каротинов, пластохинона и ионов марганца. Эти же соединения, за исключением марганца, имеются и в активных частицах, извлеченных из пурпурных бактерий.

Почему же в таком случае пурпурные и зеленые бактерии неспособны освобождать из воды кислород? Этот вопрос возник сразу же, когда тридцать лет назад был установлен сам этот факт. Тогда же возник и очевидный ответ на него: по-видимому, у этих организмов донором водорода служит не вода, а какие-то другие вещества и при таких условиях выделение кислорода может не происходить. Однако это тавтология, а не объяснение. Важно то, что произошло какое-то изменение в анаэробном механизме, было привнесено нечто новое, послужившее основой для отклонения в одном критическом пункте от того, что организмы уже были способны делать раньше.

Было проделано множество экспериментов, однако ни разу не удалось заставить какие-нибудь фотовосстанавливающие бактерии (*Thiorhodaceae* и *Athiorhodaceae*) или зеленые бактерии (*Chlorobium*) выделять хотя бы следы кислорода, как выделяют его растения. Восстановление двуокиси углерода прекращается у них в тот момент, когда исчерпывается запас соответствующих доноров водорода.

С другой стороны, многие водоросли прекращают выделять кислород на свету при фотосинтезе, как только появляется какой-либо источник водорода, который может использоваться для восстановления двуокиси углерода. Таким образом, по крайней мере у этих водорослей — а мы знаем много форм, содержащих необходимую гидрогеназу, — выделение кислорода представляет собой процесс, который может происходить или не происходить, может быть отделен от основного фотохимического процесса, причем каких-либо существенных изменений в последнем не происходит. Эти факты допускают двоякую интерпретацию. Мы можем считать, что всякий раз, когда водоросль возвращается к формам метаболизма своего анаэробного предшественника, она прекращает выделение кислорода и переходит к восстановлению ТФН (или фосфоглицериновой кислоты) путем более прямого фотокаталитического переноса водорода (или электронов). Другая точка зрения заключается в том, что наблюдаемое нами изменение — это главным обра-

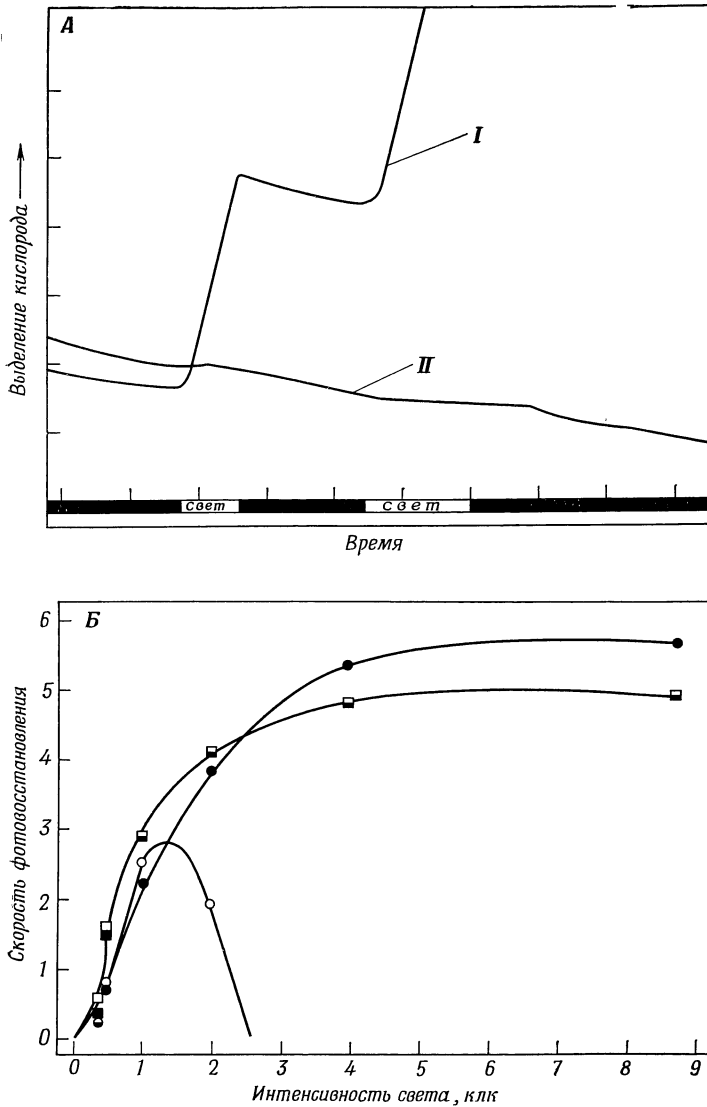


зом результат преждевременного восстановления промежуточных предшественников кислорода («перекисей» или, иначе, «окисленных цитохромов» и т. п.). Я стоял на последней точке зрения с момента, когда эти явления были открыты. Она неизбежно включает в себя гипотезу о том, что вода окисляется не в результате отдаленной от первичного акта и устранимой темновой реакции, но как непосредственный результат фотохимического акта. Оказалось возможным рассмотреть более детально те условия, в результате которых последовательность реакций, связанная с выделением кислорода, отделяется от остальных фотохимических окислительно-восстановительных реакций.

Первое, наименее сильное воздействие может заключаться попросту в повышении активности гидрогеназы в анаэробных условиях. Механизм выделения кислорода сохраняет свою полную активность. Величины удельной активности гидрогеназы, парциального давления водорода и интенсивности света (равная концентрации окислительных фотопродуктов) совместно определяют, какая доля кислорода, образовавшегося при фотосинтезе, останется в связанном состоянии. При малой интенсивности света выделяется лишь очень незначительное количество кислорода, при большой интенсивности — почти все ожидаемое его количество. Если весь кислород удаляется в струе водорода, то эта ситуация остается полностью обратимой и стабильной. Очевидное объяснение этих явлений в том, что здесь происходит конкуренция за какой-то общий промежуточный продукт [30, 37].

Следующая ступень достигается при блокировании одного из конкурирующих путей. Нормально путь через гидрогеназу закрыт, так как последняя неактивна на воздухе. После адаптации к водороду в анаэробных условиях второй путь, путь к кислороду, легко полностью блокировать с помощью соответствующих ядов. При таких условиях выделение кислорода полностью прекращается и скорость фотовосстановления может возрасть, пока не достигнет предельного значения, характерного для условий работы гидрогеназной системы, свойственных данному виду водорослей. Очень сходные результаты получаются, если не добавлять ингибитор, а удалять фактор, необходимый для выделения кислорода, а именно ионы марганца. При недостатке марганца фотосинтез у водорослей идет с низкой скоростью, тогда как фотовосстановление, напротив, идет очень интенсивно [43]. Действие ядов, а также эффект отсутствия марганца полностью обратимы. Растения ведут себя как бактерии только до тех пор, пока что-нибудь мешает им реализовать свою способность выделять кислород.

Третья ступень отделения фотосинтеза от процесса выделения кислорода является окончательной, необратимой. Здесь такое отделение определено генетически. Бишоп [9, 10] искал и нашел мутант водоросли *Scenedesmus*, полученный действием рентгеновского облучения, который был нормальным во всех отношениях, за исключением одного — способности выделять кислород. При этом у мутанта имелся нормальный набор пигментов. Он дышал, рос и восстанавливал двуокись углерода точно так же, как все другие водоросли, но его рост в аэробных условиях (и в темноте, и на свету) поддерживался за счет гетеротрофного питания, а восстановление двуокиси углерода фотохимическим путем происходило только в условиях адаптации к водороду. На фиг. 2 приводятся результаты сравнения активности нормальных водорослей *Scenedesmus* и этого мутанта. Скорость фотовосстановления у мутанта достигает наиболее высоких значений, какие когда-либо наблюдались у *Scenedesmus*, тогда как выделение кислорода на свету у него полностью отсутствует.



Фиг. 2. Генетически определенное разделение системы выделения кислорода от системы фотохимических реакций и восстановления двуокиси углерода у мутанта зеленой водоросли *Scenedesmus D<sub>3</sub>* [10].

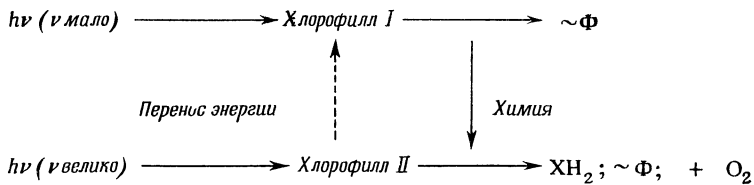
А. Полярнографическая регистрация потребления и выделения кислорода выращенными в темноте нормальными водорослями *Scenedesmus* и мутантом 11. Выращивание в темноте длилось 5 дней; газовая фаза: 4% CO<sub>2</sub>, 96% N<sub>2</sub>, температура 20°; объем, занимаемый клетками, 15 мкл; рН 6,5; концентрация фосфатного буфера 0,05 М; конечный объем 2 мл; интенсивность света 4 клк. I — контроль (нормальная водоросль); II — опыт (мутант PS — XCI4—11). По шкале ординат одно деление соответствует 0,47 мкл O<sub>2</sub>; по шкале абсцисс одно деление соответствует 50 сек.

Б. Зависимость скорости фотовосстановления (выражена числом мкл CO<sub>2</sub>, поглощенного в 1 час на 1 мкл клеток) у выращенных в темноте нормальных водорослей *Scenedesmus* и мутанта 11 от интенсивности света в присутствии и в отсутствие 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (ДХММ) в концентрации 2 · 10<sup>-6</sup> М. Температура 25°. Объем, занимаемый клетками, 30 мкл в сосуде. ○—○ контроль; ●—● контроль + ДХММ; □—□ мутант 11; ■—■ мутант 11 + ДХММ.

Те, кто экспериментировал с мутантами, знают, что требуется длительное время для обнаружения обратной мутации, т. е. для спонтанного восстановления способности выделять свободный кислород. Однако было бы интересно попытаться все же обнаружить такую обратную мутацию.

Какое отношение имеют эти мутации к нашей эволюционной проблеме? Я думаю, дело в том, что, когда все уже было готово и налажено, одно мутационное событие положило конец анаэробной эре. *Mutatis mutandis* это событие было обратным тому действию рентгеновских лучей, которое лишило штамм Бишопа способности выделять кислород.

Достаточно одного взгляда на пурпурную бактерию и на водоросль, чтобы увидеть, что на протяжении одного или двух миллиардов лет оба эти организма весьма значительно дивергировали. Однако нельзя отрицать, что



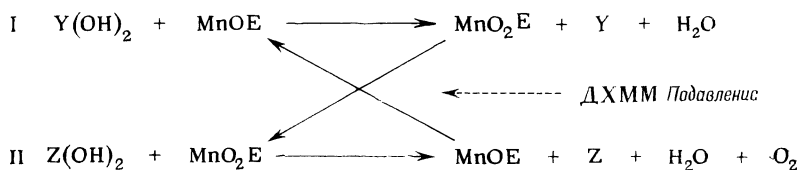
Фиг. 3. Эффект Эмерсона.

Две фотохимические реакции, инициируемые двумя различным образом связанными молекулами хлорофилла *a*, взаимодействуют в процессе выделения кислорода. Эффективный уровень возбуждения хлорофилла I соответствует поглощению света с длиной волны *больше* 700 *м* $\mu$ . Эффективный уровень возбуждения хлорофилла II соответствует поглощению света с длиной волны *меньше* 700 *м* $\mu$ . Возбуждение хлорофилла II приводит за счет миграции энергии также и к возбуждению хлорофилла I. Фотосинтез идет, если свет поглощается только хлорофиллом II. Напротив, если свет поглощается только хлорофиллом I, фотосинтез невозможен.

в отношении фотохимического механизма это расхождение является наименьшим. Тем не менее и здесь мы наблюдаем ряд наводящих на размышления различий, каждое из которых может иметь важное или решающее значение для способности организма окислять воду и освобождать кислород. Пигменты водорослей в отличие от пигментов бактерий поглощают видимые красные лучи, а не инфракрасные. Это может давать им решающее преимущество в 10 *ккал* в эффективном уровне возбуждения соответствующих пигментов. Однако это преимущество само по себе недостаточно, так как зеленые серные бактерии, пигменты которых поглощают в красной области спектра, также не выделяют кислорода. Набор цитохромов у обоих этих типов организмов неодинаков [36, 39], но и это различие, вероятно, не имеет решающего значения, хотя оно, возможно, играет существенную роль на каком-то промежуточном уровне. По-видимому, исключительной особенностью водорослей являются две характерные черты: это так называемый эффект Эмерсона и потребность в относительно высоком содержании ионов марганца. Потребность в ионах марганца у пурпурных бактерий по крайней мере в 100 раз меньше, чем у аэробных водорослей, причем у последних при переходе к фотовосстановлению без выделения кислорода такая потребность в марганце исчезает. Далее, открытое Эмерсоном у водорослей поразительное взаимодействие двух уровней в различных комплексах хлорофилла *a*, по имеющимся данным, у бактерий не существует [16, 17]. Фиг. 3 и 4 иллюстрируют эффект Эмерсона и интерпретацию функции марганецсодержащего фермента. Эмерсон [17, 18] обнаружил, что у зеленых растений свет с длиной волны, большей чем 700 *м* $\mu$ , неактивен, хотя он и поглощается пигментами. Сама по себе эта энергия не используется в фотосинтезе, но если одновременно дается свет с длинами волн, меньшими чем 680 *м* $\mu$ , то длинноволновое излучение ( $\lambda \geq 700 \text{ м}\mu$ ) становится полностью эффективным.

Возможное объяснение этих явлений заключается в том, что необходимо возбудить две различные формы одного и того же хлорофилла *a* до различных, но взаимодействующих уровней, чтобы получить два различных продукта окисления, из которых по крайней мере один имеет время жизни, измеряемое секундами. Оба эти продукта необходимы для выделения из воды кислорода. Марганецсодержащий фермент катализирует дисмутацию, которая не идет в его отсутствие. При этом «перекиси» исчезают в результате боковых или обратных реакций [24].

Франк (личное сообщение) предпочитает другую интерпретацию. По его мнению, эффект Эмерсона обусловлен не различной ролью двух форм хлорофилла, поглощающего в области 690—710 *mμ*, как это показано на фиг. 4,



Фиг. 4. Значение марганецсодержащего фермента.

В отсутствие марганецсодержащего фермента [42] фотосинтез идет без выделения кислорода. Восстановление двуокиси углерода осуществляется только при анаэробном фотовосстановлении. Здесь предполагается, что функцией фермента  $MnOE$  является катализ дисмутации «фото-перекисей», образующихся в результате фотохимических процессов, связанных с хлорофиллом I и II.

а более или менее случайным окислением в аэробных условиях хлорофилла, находящегося в возбужденном *n*,  $\pi$ -состоянии, т. е. побочной реакцией. Наши последние эксперименты с длинноволновым красным светом и с фотовосстанавливающим мутантом Бишопа дали в анаэробных условиях больший выход, чем в воздухе. Сейчас нельзя еще сказать, можно ли рассматривать это как подтверждение точки зрения Франка или эти результаты совместимы с нашей схемой при условии ее более тщательного анализа. Анализы на марганец также показали, что содержание марганца в нормальных и фотовосстанавливающих клетках *Scenedesmus* приблизительно одинаково. Однако мы знаем, что без марганецсодержащего фермента не происходит выделения кислорода и что этот фермент, по-видимому, отсутствует у бактерий.

Ясно, что каждое из обнаруживаемых различий между фотовосстанавливающими бактериями и фотовосстанавливающими водорослями возникло в результате по крайней мере одной мутации, подготовившей путь для образования таких окисленных промежуточных продуктов, которые при контакте с марганецсодержащим ферментом могут освобождать кислород. Но до тех пор пока этот последний шаг — добавление фермента — не был сделан, ни повышение энергетического уровня возбуждения хлорофилла, ни добавление или замена одного или нескольких цитохромов, ни включение каким-либо образом воды в механизм окислительно-восстановительных реакций не могли сами по себе обеспечить конечный переход от фотовосстановления к фотосинтезу с выделением кислорода. Добавление к предсуществовавшей системе «зеленого» хлорофилла марганецсодержащего фермента или какого-то близкого еще не известного катализатора — вот та мутация, которая положила конец анаэробной эре.

Какое отношение имеет все это к вопросу об участии воды в фотосинтезе? Арнон и др. [6] хотели бы заставить нас поверить, что предшественники свободного кислорода начали получаться из воды не раньше, чем разделились пути, связанные с явлениями адаптации, т. е. попросту в результате

замены  $H_2A$  (доноров водорода, могущих участвовать в различных процессах фотовосстановления) на  $H_2O$ .

Они пишут: «Различия между бактериальным фотосинтезом и фотосинтезом в зеленых растениях, по-видимому, связаны главным образом с природой доноров электронов, потребляемых при восстановлении пиридиннуклеотидов. С одними донорами электронов, например с газообразным водородом, восстановление пиридиннуклеотидов фотосинтезирующими бактериями есть темновая реакция... Выделение кислорода является характерной особенностью зеленых растений, так как оно представляет собой результат вспомогательной фотохимической реакции окисления воды ( $OH^-$ ), которое имеет место только в зеленых растениях. Таким образом, вода как донор электронов не участвует в двух главных событиях нециклического фотофосфорилирования в растениях и бактериях: в фотовосстановлении пиридиннуклеотидов и в сопряженном с ним образовании аденозинтрифосфата».

Представляется невероятным, чтобы окисление воды как темновая ферментативная реакция могло так успешно конкурировать с окислением водорода через гидрогеназу, как это было бы необходимо, чтобы вызвать обратимое выделение кислорода у адаптированных водорослей.

Не стоит продолжать доказывать невероятность этого объяснения, ибо в настоящее время мы располагаем важнейшими экспериментальными фактами, игнорировать которые было бы неразумно. Речь идет о постоянстве числа световых квантов, необходимых для ассимиляции одной молекулы двуокиси углерода, независимо от того, происходит ли это в анаэробных серных пурпурных бактериях или в аэробных или адаптированных растениях, хотя выигрыш свободной энергии в этих реакциях варьирует от 4 до 120 ккал. Очевидно, последовательность событий, стехиометрия внутреннего механизма у всех фотосинтетических организмов требует минимум 8 квантов на одну молекулу  $CO_2$ , или 2 кванта на каждый восстанавливающий атом водорода. Единственное объяснение этих наблюдений, которое до сих пор сохранило свое значение, — это то, которое неоднократно предлагалось Ван-Нилем [70], Франком [21, 22] и мной [26], а именно что участие воды в фотохимическом механизме есть реакция отдельная и независимая от конечного выделения кислорода. Я рекомендую, в частности, перечитать статью Ван-Нилея, написанную им в 1949 г. [71].

Очевидно, у анаэробных бактерий уже существует этот основной механизм. Этот этап эволюции должен был быть закончен раньше, чем могли стать эффективными дальнейшие упомянутые изменения, приведшие к фотосинтезу зеленых растений. Отсюда следует, что создание механизма с участием воды в фотохимическом процессе должно было предшествовать окончательному развитию бактериального типа фотосинтеза и что это давало известные преимущества при отборе по сравнению с более простыми одноквантовыми процессами переноса водорода — такими, какие мы способны воспроизводить искусственно в лаборатории. Гипотетическая история реакций хлорофилла представляется нам такой:

1. Сенсibilизированные реакции изомеризации; переносы водорода в гомогенных растворах. Квантовый выход был близок к единице лишь в редких случаях.

2. Сопряженные процессы гидрогенизации и дегидрогенизации на поверхностях. Начало отделения эффективных реакций от неэффективных.

3. Расширение области эффективных реакций путем создания новых реагентов под влиянием первых специфических белков (гемопротеидов).

4. *Образование комплексов с цитохромами. Вода как промежуточный участник в окислительно-восстановительных реакциях. Механизм с уча-*

ствием двух квантов. Сопряжение с независимо развивавшимися ферментативными окислительно-восстановительными системами.

5. Эволюция обратных реакций в фосфорилирующих системах. Сопряжение с метаболическими реакциями, требующими АТФ. Ассимиляция ацетата. Фиксация и восстановление двуокиси углерода. Полное фотовосстановление у первых фотосинтезирующих организмов.

6. Выигрыш 10 ккал на каждый поглощенный квант благодаря смещению полосы поглощения и увеличению числа форм хлорофилла. Эффект Эмерсона. Вспомогательные пигменты. Другие цитохромы (f). Другие хиноны. *Марганецсодержащий фермент. Освобождение кислорода.* Выживание организмов, защищенных каротинами.

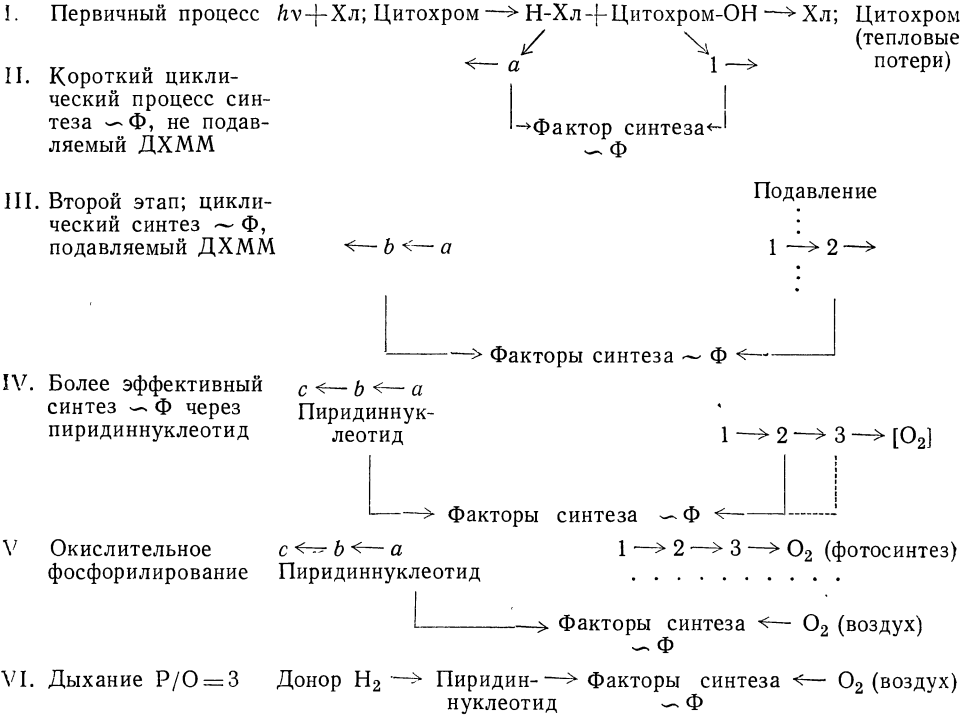
7. Эволюция дыхания. Цепь окислений, идущая от кислорода через цитохромы, флавин, пиридиннуклеотиды к органическим субстратам, могла развиваться из механизма фосфорилирования в фотосинтетическом аппарате, а цикл дикарбоновых кислот — из того механизма, с помощью которого эти кислоты разлагаются на свету на двуокись углерода и свободный водород.

В этой последовательности появление фотолитических процессов, которые используют воду для создания с помощью цитохромов [39] не только сильных восстановителей, но и сильных окислителей, отодвинуто далеко в глубь анаэробной эры и, быть может, отделено многими миллионами лет эволюции от времени возникновения первых зеленых водорослей. Аргументы, которые неоднократно приводил Арнон [3], чтобы лишить унифицированную концепцию фотосинтеза Ван-Ниля ее господствующего положения и утвердить вместо нее в качестве обобщающего принципа концепцию фосфорилирования, представляются мне научным регрессом, так как они не в состоянии объяснить и половины тех фактов, какими мы в настоящее время располагаем. Они требуют наличия ряда ступеней для окисления четырех молекул воды таким образом, чтобы в конечном счете выделилась одна молекула кислорода. Факты говорят против того, что все необходимые этапы эволюции были пройдены за время перехода от бактериального типа фотосинтеза к растительному типу. С другой стороны, если процессы, протекающие с поглощением двух квантов и с участием воды, возникли в середине или в начале анаэробной эры, то в них было заключено замечательное преимущество: они позволяли осуществляться таким окислительным реакциям, которые без света, хлорофилла и воды могли протекать только в аэробных условиях [62]. Вот что пишут по этому поводу Шер и Проктор [63]: «Современные опыты с бензоатом и другими ароматическими соединениями указывают на то, что бактериальный фотосинтез идет с образованием окислителя, эквивалентного молекулярному кислороду, образуемому при фотохимической реакции». В сентенции «свет эквивалентен АТФ» весьма мало пользы, ибо то же самое можно сказать о большом числе ферментативных этапов промежуточного метаболизма. Но когда мы говорим: «При анаэробных условиях видимый свет и вода являются эквивалентом кислорода», то мы имеем в виду нечто совершенно определенное [33].

Все мы убеждены в том, что дыхание развилось после того, как фотосинтез принял свою современную форму. Однако в этом, по-видимому, можно усмотреть нечто большее, чем простую последовательность событий во времени. Можно думать, что дыхательные механизмы развились из частей ранее существовавшего сложного фотосинтетического аппарата. Цепь переноса электронов могла отделиться от комплекса с пигментами, в котором она первоначально участвовала в фосфорилировании. В схеме на фиг. 5 в качестве предположительного промежуточного этапа указан открытый Кругманом и Веннесландом [48] процесс фотофосфорилирования, требующий участия

кислорода. Принадлежащее Гесту [32] открытие, что анаэробные пурпурные бактерии способны на свету полностью разлагать некоторые дикарбоновые кислоты до двуокиси углерода и водорода, также указывает на возможность развития дыхательного цикла дикарбоновых кислот из анаэробного механизма.

После возникновения кислородсодержащей атмосферы возникла также необходимость в защитной адаптации по отношению к опасности фотоокисления. Нет сомнений в том, что присутствие в пигментном комплексе



Фиг. 5. Возникновение дыхания из системы реакций, обратных реакциям в фотохимической системе, реагирующей с водой.

каротина, хотя оно и не имеет существенного значения для самого фотосинтеза, обеспечивает такого рода защиту [67]. Каротиноиды имеются в избытке у всех фотовосстанавливающих бактерий. Возникнув первоначально для других целей, они обеспечили выживание тех организмов, которые их имели. Мы знаем, что *in vitro* каротины предотвращают фотоокисление путем гашения триплетного состояния хлорофилла. Если бы мы попытались использовать это как модель для объяснения защитного действия каротинов *in vivo*, то мы столкнулись бы с новой трудностью. Если они обезвреживают триплетное состояние хлорофилла, прежде чем кислород получит возможность прореагировать с ним, то они должны быть тесно связаны с хлорофилльным комплексом. Защита обусловлена немедленным гашением триплетного состояния — каким же образом в таком случае вообще возможен фотосинтез в присутствии каротина? Вспомним, однако, о свойствах фотосинтетической единицы. Известно, что только одна из нескольких сотен молекул хлорофилла участвует в химическом процессе; роль остальных молекул сводится

к тому, что они поглощают свет и передают энергию своего первого возбужденного синглетного состояния «работающим» молекулам хлорофилла. Каждая из этих сотен поглощающих свет молекул таит в себе потенциальную опасность деструкции в присутствии кислорода. Однако «соскальзывание» в триплетное состояние неопасно, если такие триплетные состояния избирательно гасятся каротином. Как объяснить существование каротинов уже в самом начале аэробной эры? Здесь, по-видимому, мы снова встречаемся с таким случаем, когда вещество, ранее выполнявшее какую-то одну функцию, принимает на себя другую функцию, быть может, более важную для обеспечения поставленного на карту выживания клетки. Нам не известно, какую еще роль, помимо гашения триплетного состояния хлорофилла, мог бы играть каротин в хлорофилльном комплексе. Бишоп [11] выделил из листьев шпината двулучепреломляющее соединение белка с  $\beta$ -каротином, функция которого не установлена. Остается выяснить, является ли это соединение позднейшим приобретением зеленых растений или такое же или сходное соединение может быть найдено и у пурпурных бактерий. Это отодвинуло бы его возникновение в последнюю из додарвиновских анаэробных эр.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Allen G., *Am. Naturalist*, **91**, 65 (1957).
2. Anker H. S., *Perspectives in Biol. and Med.*, **5**, 86 (1961).
3. Arnon D. I., *Sci. American*, **203**, 2 (1960).
4. Arnon D. I., *Bull. Torrey Botan. Club*, **88**, 215 (1961).
5. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **32**, 47 (1959).
6. Arnon D. I., Losada M., Nozaki M., Takawa K., *Nature*, **190**, 601 (1961).
7. Bassham J. A., Calvin M., In «*Handbuch der Pflanzenphysiologie*» (A. Pirson, ed.), vol. **5**, p. 884, Springer, Berlin, 1960.
8. Baur E., *Helv. Chim. Acta*, **12**, 788 (1930).
9. Bishop N. I., *J. Gen. Phys.*, **45**, 592A (1962).
10. Bishop N. I., *Nature* (1962) (in press).
11. Bishop N. I., *Abstracts, Biophysical Society* (1962).
12. Calvin M., *Am. Scientist*, **44**, 248 (1956).
13. Calvin M., *Naturwissenschaften*, **43**, 387 (1956).
14. Chance B., Nishimura M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 19 (1960).
15. Dauvillier A., *L'Origine Photochimique de la Vie*, Masson, Paris, 1958.
16. Duysens L. N. M., Ames J., Kamp B. M., *Nature*, **190**, 510 (1961).
17. Emerson R., Chalmers R. V., Cederstrand C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **43**, 133 (1957).
18. Emerson R., Rabinowitch E., *Plant Physiol.*, **35**, 477 (1960).
19. Fox S. W., *Science*, **132**, 200 (1960).
20. Fox S. W., Harada K., *Science*, **133**, 1923 (1961).
21. Franck J., In «*Research in Photosynthesis*» (H. Gaffron, ed.), p. 142, Interscience, New York, 1957.
22. Franck J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 941 (1958).
23. Franck J., In «*Handbuch der Pflanzenphysiologie*» (A. Pirson, ed.), Vol. **5**, p. 689, Springer, Berlin, 1960.
24. French C. S., Fork D. C., V Международный биохимический конгресс, т. I, II, ИЛ, М., 1961



25. Gaffron H., Ber. deut. chem. Ges., **60**, 755 (1927).
26. Gaffron H., Am. J. Botany, **27**, 282 (1940).
27. Gaffron H., In «Rhythmic and Synthetic Processes in Growth» (D. Rudnick, ed.), p. 127, Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, 1957.
28. Gaffron H., In «Transactions of the Conference on the Use of Solar Energy, Tucson, Arizona, 1955», vol. 4, p. 145, Univ. of Arizona Press, 1958.
29. Gaffron H., Perspectives in Biol. and Med., **3**, 163; in «Evolution after Darwin» (Sol Tax, ed.), p. 39, University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1960.
30. Gaffron H., In «Plant Physiology» (F. C. Steward, ed.), Vol. **1B**, p. 3, Academic Press, New York, 1960.
31. Gerretsen F. C., J. Biol. Chem., **176**, 299 (1948).
32. Gest H., Ormerod J. G., Ormerod K. S., Arch. Biochem. Biophys. (1962) (in press).
33. Goldfine H., Bloch K., Oxygen and Biosynthetic Reactions (1962) (in press).
34. Habermann H., Gaffron H., In «Progress in Photobiology» (B. Chr. Christensen and B. Buchmann, eds.), Proceedings of the 3rd International Congress on Photobiology, 1960, p. 586, Elsevier, Amsterdam, 1961.
35. Habermann H., Gaffron H., Photochem. and Photobiol., **1** (1962) (in press).
36. Hill R., Scarisbrick R., New Phytologist, **50**, 98 (1951).
37. Horwitz L., Allen F. L., Arch. Biochem. Biophys., **66**, 23 (1957).
38. Hoyle F., Nature of the Universe, Harper, New York, 1960.
39. Kamen M. D., In «Enzymes: Units of Biological Structure and Function» (O. H. Gaebler, ed.), p. 483, Academic Press, New York, 1956.
40. Keilin D., Hartree E. F., Biochem. J., **39**, 293 (1945).
41. Kern M., Racker E., Arch. Biochem. Biophys., **48**, 235 (1954).
42. Kessler E., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 527 (1955).
43. Kessler E., Planta, **49**, 435 (1957).
44. Кок В., In «Handbuch der Pflanzenphysiologie» (A. Pirson, ed.), Vol. **5**, p. 566, Springer, Berlin, 1960.
45. Красновский А. А., ДАН УССР, **60**, 421, 1948.\*
46. Красновский А. А., Ann. Rev. Plant. Physiol., **11**, 363, 1960.
47. Krebs H. A., Kornberg H. L., Energy Transformations in Living Matter (A Survey), p. 275, Springer, Berlin, 1957 (Г. Кребс, Г. Корнберг, Превращения энергии в живых системах, ИЛ, М., 1959).
48. Krogman D. W., Vennesland B., J. Biol. Chem., **234**, 2205 (1959).
49. Losada M., Trebst A. V., Arnon D. I., J. Biol. Chem., **235**, 832 (1960).
50. Losada M., Whatley F. R., Arnon D. I., Nature, **190**, 601 (1961).
51. Lowe M. B., Phillips J. N., Nature, **190**, 262 (1961).
52. Lowenstein J. M., Biochim. et Biophys. Acta, **28**, 206 (1958).
53. Mehler A. H., Arch. Biochem. Biophys., **33**, 65 (1951).
54. Miller S. L., J. Am. Chem. Soc., **77**, 2351 (1955).
55. Nason A., Wosilait W. D., Terrell A. J., Arch. Biochem. Biophys. **48**, 233 (1954).
56. Опарин А. И., Происхождение жизни на земле, Материалы I Международного симпозиума, М., 1959.
57. Павловская Т. Е., Пасынский А. Г., Происхождение жизни на земле, Материалы I Международного симпозиума, М., 1959.
58. Pirson A., ed., Handbuch der Pflanzenphysiologie, Vol. **5**, Springer, Berlin 1960.
59. Pringsheim E. G., Weissner W., Arch. Mikrobiol., **40**, 231 (1961)
60. Rabinowitch E. I., Photosynthesis and Related Processes, Vol. **2**, Part. 2, Interscience, New York, 1956.

61. Reid C., In «The Origin of Life on Earth» (Материалы I Международного симпозиума, М., 1959).
62. Schenck G. O., Z. Elektrochem., 64, 997 (1960).
63. Scher S., Proctor M. H., In «Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems» (M. B. Allen, ed.), p. 387, Academic Press, New York, 1960.
64. Schramm G., Grötsch H., Pollmann W., Angew. Chem., 74, 53 (1962).
65. Shapley H., Perspectives in Biol. and Med., 3, 222; in «Evolution after Darwin» (Sol Tax, ed.), p. 23, University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1960.
66. Shemin D., In «Currents in Biochemical Research» (D. E. Green, ed.), p. 518, Interscience, New York, 1956.
67. Stanier R., Bacteriol. Revs., 25, 1 (1961).
68. Stoll A., Naturwissenschaften, 20, 955 (1932).
69. van Niel C. B., Arch. Mikrobiol., 3, 1 (1931).
70. van Niel C. B., Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., 3, 138 (1935).
71. van Niel C. B., In «Phytosynthesis in Plants» (J. Franck and M. E. Loomis, eds.), p. 437, Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1949.
72. Witt H. T., Moraw R., Müller A., Rumberg B., Gieger G., Z. physik. Chem. (Frankfurt), 23, 133 (1960).
73. Witt H. T., Müller A., Rumberg B., Nature, 192, 967 (1961).
74. Ycas M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 41, 714 (1955).

# ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

У. Д. МАК-ЭЛРОЙ И Г. Г. ЗЕЛИГЕР

## ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция, т. е. свечение, не является свойством, характерным лишь для какой-нибудь одной группы животных или растений. Это широко распространенное явление [1]. Наличие испускающих свет форм среди различных бактерий, грибов, многих беспозвоночных и даже рыб указывает на то, что это свойство представляет собой результат определенной химической реакции, общей для всех организмов. Широкое распространение люминесцирующих организмов может дать нам важный ключ к пониманию происхождения и эволюции этого явления.

Биолюминесценция представляет собой химическую реакцию, в процессе которой восстановленный субстрат (люциферин) окисляется кислородом воздуха, образуя при этом возбужденную молекулу, испускающую свет при возвращении в основное состояние [2]. Высокая эффективность этой окислительной люминесцентной реакции обусловлена наличием особого катализатора — люциферазы. Люциферины разных организмов сильно раз-

Таблица 1

Избранные примеры светящихся организмов

Организмы	Реакция, обуславливающая свечение	Максимум излучения, <i>мк</i>	
Светящиеся бактерии	$\text{FMN-H}_2 + \text{RC} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{array} + \text{O}_2 + \text{E}$	495	
Светляки	$\text{LH}_2 + \text{ATP} + \text{Mg} + \text{O}_2 + \text{E}$	562	
<i>Cypridina</i> (ракообразные)	$\text{LH}_2 + \text{O}_2 + \text{E}$	460	
<i>Odontosyllis</i> (многощетинковые черви)	$\text{LH}_2 + \text{O}_2 + \text{E}$	510	
<i>Pholas dactylus</i> (пластинчатожаберные моллюски)	$\text{ДПН-H} + \text{FMN} + \text{O}_2 + \text{E}$	480	
<i>Omphali flavida</i> (грибы)	$\text{ДПН-H} + \text{X} + \text{O}_2 + \text{E}$	530	
<i>Renilla reniformis</i> (морские черви)	$\text{LH}_2 + \text{AMF} + \text{O}_2 + \text{E}$	Синяя область спектра	
<i>Gonyaulax polyhedra</i> (простейшие)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{O}_2$		470
<i>Arogon</i> (рыбы)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{O}_2$		460

личаются между собой, хотя все они обладают одной общей чертой: способностью давать интенсивную флуоресценцию. Несколько примеров люминесцирующих организмов приведено в табл. 1.

$\text{LH}_2$  означает окисляемое вещество — люциферин, а  $E$  — фермент люциферазу. Как люциферин, так и люцифераза у различных форм различны. Недавно Джонсон и Ганеда показали, что светящиеся рыбы (*Arogon*), по-видимому, имеют такую же излучающую свет систему, что и ракообразные *Cypridina*. Структура люциферина светляков известна, и синтез этого вещества был недавно осуществлен [2], причем было показано, что этот люциферин отличается от люциферинов, выделенных из организма ракообразных и бактерий.

В этой статье мы попытаемся обосновать гипотезу, согласно которой сопровождающиеся свечением реакции в организмах в сущности представляли собой процессы, направленные на удаление кислорода и предотвращение окисления им важных субстратов. Это было необходимо для выживания ранних анаэробных форм жизни при появлении в атмосфере кислорода. По-видимому, использование органических восстановителей для удаления кислорода путем его прямого восстановления приводило к образованию возбужденных молекул, которые могли испускать свет. Мы предполагаем, что эти реакции лежали в основе возникновения и эволюции способности организмов к люминесценции.

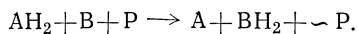
#### ЭВОЛЮЦИЯ ПРОЦЕССА ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Большинство исследователей считает, что в то время, когда на Земле возникали примитивные формы жизни, в окружающей среде не было кислорода<sup>1</sup>. Хотя следы кислорода и могли возникнуть в атмосфере под действием коротковолнового ультрафиолетового излучения, однако сомнительно, чтобы этот кислород сохранялся в свободном виде в течение сколько-нибудь длительного времени. Сильно восстановительная среда и большой избыток таких соединений, как, например, соединения  $\text{Fe}^{++}$ , должны были бы обеспечить немедленное восстановление свободного кислорода.

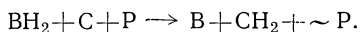
Хотя у современных аэробных организмов ступенчатые окислительные реакции представляют собой главные реакции, служащие для снабжения организма достаточным количеством энергии, однако очень маловероятно, чтобы кислород являлся конечным акцептором электронов и у первичных форм жизни. Свободный кислород должен был появиться в значительных количествах на более поздней стадии эволюции, когда окружающая среда постепенно из восстановительной превращалась в окислительную. В процессе эволюционного развития эти изменения сопровождалось развитием сложной системы ферментов, связывающих первичные фотохимические реакции с водой, игравшей роль донора водорода. Фотосинтез в зеленых растениях есть результат этих эволюционных явлений. Поэтому представляется несомненным, что первичные организмы были истинными анаэробами. Первоначальные процессы накопления и связывания энергии должны были, однако, включать в себя реакции дегидрогенизации и конденсации, которые катализировались сначала первичными катализаторами и лишь много позже стали катализироваться ферментами. Важным пунктом здесь является то, что жизнь возникла и начала развиваться только тогда, когда такие первич-

<sup>1</sup> По вопросу о природе земной атмосферы и идеях различных авторов, касающихся происхождения жизни и связанных с этим процессом, см. «Возникновение жизни на земле», к итогам Первого международного симпозиума «О происхождении жизни на Земле», 1957, Москва, Изд. АН СССР, 1959. — *Прим. ред.*

ные организмы оказались способными связывать энергию, освобождающуюся в реакциях дегидрогенизации, и использовать ее для синтеза всех необходимых для их репликации соединений. Когда мы рассматриваем процессы связывания энергии в современных организмах, то представляется наиболее правдоподобным, как это предположил Липман, что в процессе захвата и накопления энергии важную роль играли неорганические фосфаты в форме пирофосфатных связей. Первые организмы должны были использовать богатую органическими восстановителями среду для сопряжения реакции дегидрогенизации с освобождением и использованием энергии. Таким образом первые реакции захвата энергии должны были быть реакциями типа



Организм, конечно, мог использовать для своего роста и репродукции энергии окисления соединения  $\text{AH}_2$  лишь до тех пор, пока это соединение имело в окружающей среде в достаточном количестве. Существует ряд путей, по которым окисленное соединение А могло быть в дальнейшем снова восстановлено, но мы отложим обсуждение этого вопроса. Нет надобности подчеркивать, что, когда запас  $\text{AH}_2$  оказывался исчерпанным, организм был вынужден прибегать к другим реакциям дегидрогенизации. Выжить могли те организмы, которые приобрели способность использовать в реакциях сопряженного окисления — восстановления менее восстановленные соединения. Мы обозначим эту последующую реакцию дегидрогенизации и связывания энергии так:



Очевидно, что на протяжении такого эволюционного процесса анаэробы, используя соединения с высокой степенью восстановления, должны были прежде всего создавать постепенно среду более окислительную. На каждом последовательном этапе использовался акцептор электронов, потенциал которого все более приближался к потенциалу самого кислорода. Мы приходим, таким образом, к последовательности реакций дегидрогенизации, в которых освобождение энергии тесно связано с биосинтезом через пирофосфатные связи. Если внутри клетки тем или иным способом должно было преобразовываться небольшое количество соединений типа  $\text{AH}_2$ , то ясно, что такой избирательный эволюционный процесс должен был привести к созданию ряда систем переноса электронов, в которых могло происходить освобождение энергии. На каком-то этапе этого эволюционного процесса должен был возникнуть и процесс преобразования первичных восстановленных веществ, для которого источником энергии являлся солнечный свет. Жизнь могла возникнуть и развиваться до своего современного высокого уровня только благодаря наличию сложных органических молекул со сравнительно долгоживущими возбужденными состояниями. Возникновение возбужденных состояний молекул в результате поглощения ими квантов света было первым примитивным фотохимическим процессом, который в результате своей дальнейшей эволюции оказался в состоянии поддерживать высоковосстановительную среду. Совершенно ясно, что современный высокоэффективный фотосинтетический аппарат слишком сложен для того, чтобы он мог быть полностью развит у этих первичных организмов. Наиболее вероятной системой, из которой мог развиваться такой восстановительный механизм, являлись менее сложные неорганические комплексы металлов, а затем и металлоорганические соединения. Именно сопряжение использования энергии возбуждения с процессом переноса электронов и создало эффективный и неисчерпаемый источник энергии восстановления. Некоторые органические соединения могли функционировать таким же образом

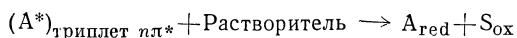
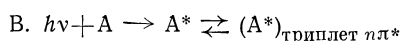
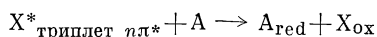
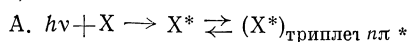
и в анаэробных условиях. Так, например, ФМН восстанавливается до ФМН-Н<sub>2</sub> и в отсутствие кислорода.

При отсутствии кислорода в первоначальной атмосфере Земли спектр лучистой энергии, достигающей поверхности океанов, выходил далеко за пределы теперешней его границы (2900 Å), так что даже пиридиннуклеотиды могли в большом количестве переходить в возбужденное состояние. Очень существенное значение здесь имеет тот факт, что фотохимическое образование лейко-форм красителей облегчается при отсутствии в среде кислорода. Тушение кислородом флуоресценции многих органических красителей обычно интерпретируется как результат взаимодействия между основным триплетным состоянием молекулы кислорода и триплетным состоянием возбужденной молекулы органического соединения. Такое взаимодействие должно было переводить последнюю в состояние с высокой колебательной энергией, переходящее в основное состояние в результате взаимодействия с окружающей средой. Замораживание раствора или адсорбция субстрата на жесткой структуре, как это имеет место в митохондриях, приводит к двум последствиям: уменьшению числа колебательных степеней свободы, что обуславливает сужение полосы, и ослаблению вибрационного взаимодействия возбужденной молекулы с растворенным кислородом. По этой причине даже те органические молекулы, которые не флуоресцируют в растворах при комнатной температуре, дают фосфоресценцию при низкой температуре или при растворении их в «стекле» при комнатной температуре.

Азотистые гетероциклические соединения, примером которых может служить молекула аденина, характеризуются наличием несвязывающих электронов, которые создают энергетические уровни возбуждения, расположенные ниже, чем  $\pi \rightarrow \pi^*$ -уровни. Предполагается, что с синглетных  $\pi \rightarrow \pi^*$ -уровней молекула может переходить на триплетные  $n \rightarrow \pi^*$ -уровни, на которых и происходит тушение под влиянием кислорода или тушение в результате взаимодействия со средой.

Для того чтобы молекула могла эффективно использовать имеющуюся световую энергию, она должна обладать системой относительно слабо связанных  $\pi$ -электронов, способной переходить в возбужденные состояния. Эти возбужденные состояния должны быть достаточно отделены от вибрационных уровней основного состояния для того, чтобы энергия не рассеивалась немедленно в окружающую среду и чтобы новая молекула, обладающая высокой реакционной активностью, могла взаимодействовать с подходящим донором или акцептором. При этом в процессе переноса электронов участвуют не циклические углеродные соединения, а гетероциклические азотистые соединения с их триплетными  $n \rightarrow \pi^*$ -уровнями.

Портер показал, что при полном отсутствии кислорода триплет — триплетный перенос энергии очень эффективен, и это позволяет предполагать, что первоначально световое возбуждение было связано с соответствующими восстанавливающими соединениями именно этим путем (по одной из следующих схем):



Преимуществами этих механизмов по сравнению с соответствующими синглет — синглетными переносами энергии в обычных структурированных

системах являются уменьшение потерь энергии на флуоресценцию и более длительное время жизни триплетных состояний.

В настоящее время в хорошо упорядоченном митохондриальном аппарате переноса электронов восстановление ФАД через ДПН-Н и последующее восстановление цитохромных пигментов восстановленным ФАД, вероятно, не требуют участия возбужденных состояний этих молекул. Однако весьма показательно, что разности энергетических уровней между флуоресцирующими пиридиннуклеотидами (синяя область спектра), флавинами (желто-зеленая область спектра) и порфиринами (красная область спектра) являются величинами порядка 10 ккал/моль; этой энергии достаточно для образования фосфатных связей с высокой энергией. Природа синглетных и триплетных возбужденных состояний этих кофакторов могла играть важную роль на ранних стадиях их отбора для процессов переноса электронов. Возникновение белково-липидной митохондриальной матрицы для ступенчатого окисления, последний этап которого осуществляется за счет молекулы кислорода, почти несомненно произошло на более поздней стадии биологической эволюции. Это было связано с тем, что использование световой энергии стало осуществляться более эффективными аэробными системами хлорофилла.

#### АНАЭРОБНЫЕ УСЛОВИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КИСЛОРОДА

Представляется весьма вероятным, что в результате использования анаэробами высоковосстановленных соединений и сенсibilизированного фотохимического разложения воды при действии света на различные пигменты процессы постепенного увеличения содержания кислорода в среде и исчерпание запасов органических материалов, пригодных для анаэробного метаболизма, шли параллельно. Некоторые авторы считают, что на протяжении этого периода развились такие хемоавтотрофы, которые были способны для удовлетворения своих потребностей в энергии непосредственно окислять аммиак, сероводород или ферро-ион. Однако если прежние организмы были строгими анаэробами, то, очевидно, их рост должен был подавляться присутствием кислорода. К сожалению, мы не знаем, почему рост анаэробов прекращается в присутствии кислорода. Существуют некоторые организмы, которые могут расти при наличии в среде небольших количеств кислорода, но существуют и такие организмы, рост которых в этих условиях вообще невозможен. Очевидно, до тех пор пока в среде есть кислород, рост этих организмов тем или иным способом нарушается. Однако кислород оказывает скорее подавляющее, чем летальное, действие, так как после удаления кислорода рост возобновляется. Имеющиеся в настоящее время факты указывают на то, что подавление кислородом роста облигатных анаэробов может осуществляться различными путями. Одним из важнейших факторов считается образование гидроперекисей. Среди облигатных анаэробов есть некоторые организмы, которые могут потреблять кислород и образовывать перекиси водорода. Несмотря на такое потребление кислорода и накопление перекиси водорода, эти анаэробы возобновляют свой рост при перенесении в бескислородную среду. Другими словами, эти организмы не могут расти в присутствии кислорода, но после удаления его из среды рост их возобновляется. Существуют и другие анаэробы, потребление кислорода которыми не доказано и в которых не обнаружено перекиси водорода. Эти организмы также не способны расти в присутствии кислорода. Мы вынуждены, таким образом, прийти к заключению, что кислород, по крайней мере при не слишком дли-

тельном воздействии, оказывает на организмы подавляющее, но не летальное действие.

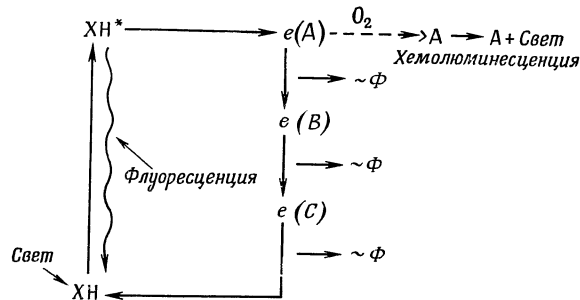
В то время, когда во внешней среде начали накапливаться небольшие количества кислорода, борьба за выживание происходила в изменяющейся обстановке, и мы полагаем, что верх в этой борьбе взяли те организмы, которые оказались способными быстро и непосредственно восстанавливать молекулярный кислород. Вначале этот процесс представлял собой обычную химическую реакцию, которая в некоторых случаях могла протекать довольно медленно. Однако наиболее приспособленными к новым условиям оказались те организмы, у которых выработался катализатор, ускоряющий процесс восстановления. Таким новым ферментом должна была быть оксидаза, катализирующая окисление восстановленного органического соединения молекулярным кислородом. Эта оксидаза должна была иметь те свойства, которые мы теперь приписываем люциферазе. Прямая реакция восстановленного субстрата с молекулярным кислородом обычно протекает с большим выделением тепла. Мы предполагаем поэтому, что в результате окислительной реакции продукты или промежуточные вещества оказываются в возбужденном состоянии. Если специфическая молекула способна флуоресцировать, то окисление приводит к тому, что мы называем биолуминесценцией. Таким образом, борьба за сохранение анаэробных условий приводила к отбору организмов, имеющих специфические оксидазы (люциферазы), катализирующие быстрое удаление кислорода. Мы предполагаем поэтому, что все организмы, сумевшие выжить в условиях низкого давления кислорода, были потенциально люминесцирующими в силу самого характера реакции удаления кислорода. Весьма показательно, что все люциферазные системы, которые были к настоящему времени тщательно исследованы, оказались способными катализировать использование восстановленного субстрата (люциферина) при очень низких давлениях кислорода. Системы светлячков, бактерий и усоногих раков по крайней мере в 100 или в 1000 раз более чувствительны к кислороду, чем гемоглобин.

Восстановление кислорода в большинстве случаев приводит к образованию перекиси водорода или некоторых органических пероксидных радикалов. Хотя большинство организмов может выдержать наличие небольших количеств перекиси водорода, ясно, что наиболее приспособленными должны были оказаться организмы, способные удалять перекиси с помощью восстанавливающих агентов с образованием воды. Это и должно было создать то давление отбора, которое привело к адаптации катализатора для использования добавочного восстановительного материала и перекиси водорода с образованием воды и окисленного продукта. Мы снова предполагаем, что выжившими в этих условиях оказались организмы, способные катализировать реакции пероксидазного типа. В сочетании с люциферазной реакцией это приводило к удалению кислорода с образованием воды, окисленного продукта и света. Несомненно, что на протяжении этого периода эволюционного процесса происходило развитие катализаторов для перекисей типа железосодержащих порфиринов. Отметим, например, что железо в форме  $Fe^{2+}$  является очень эффективным катализатором разложения перекиси водорода. Однако, когда железо включается в особые структуры типа четырехчленного пиррольного кольца, его каталитическая активность возрастает в несколько сот раз. Кальвин привел превосходные аргументы, объясняющие, каким образом перекись водорода могла благоприятствовать образованию соединений типа железосодержащих пирролов.

По мере постепенного перехода восстановительной среды в окислительную ферменты типа каталаз оказывались более благоприятными, чем перо-



ксидазные системы, разлагающие перекись водорода на воду и кислород. Это должно было привести к отбору таких систем, которые были способны восстанавливать кислород путем ступенчатого процесса, без образования свободной перекиси водорода в качестве промежуточного продукта. Нам кажется, что на протяжении этого периода возникли ферментные системы типа железосодержащих порфиринов, обладающие способностью активизировать кислород для прямого присоединения электронов. Кислород при этом уже мог функционировать как электронный акцептор без промежуточного образования перекиси водорода. Это приспособление и привело к развитию той системы окислительного фосфорилирования, которая существует у современных организмов. Таким образом, использование кислорода этими примитивными аэробными формами было последним важнейшим этапом в эволюции процесса переноса электронов. При использовании кислорода в качестве конечного акцептора электронов вся окружающая восстановительная



Фиг. 1. Связь энергии возбуждения с процессом переноса электронов.  
Объяснения см. в тексте.

среда стала доступной для окисления. Это должно было привести к быстрому развитию гетеротрофных организмов, которые возникли на этом этапе эволюции.

Фотохимические процессы, использующие энергию возбуждения, вероятно, были очень выгодны в среде, где донорами электронов служили сначала неорганические ( $\text{Fe}^{++}$ ) или органические вещества, а после того, как их запас был исчерпан, — вода. Следовательно, мы представляем себе фотосинтез у современных зеленых растений как процесс, в котором вода становится конечным донором электронов, по-видимому приводящим к образованию  $\text{OH}^-$ , способного приводить к образованию молекулярного кислорода. Возникновение организмов, способных использовать простые соединения углерода (типа  $\text{CO}_2$ ), воду и свет в качестве источника энергии, было тем первичным этапом эволюции, который привел к возникновению на Земле богатой органическими соединениями среды (фиг. 1).

После того как выработались такие системы и возникли истинные аэробы, очевидно, прямое восстановление кислорода и сопровождающая его люминесценция уже не давали организму никаких преимуществ при отборе. Поэтому с возникновением аэробов биолуминесценция должна была исчезать. Тем не менее, поскольку освобождение света было первоначально связано с существенным для освобождения энергии процессом переноса электронов, вполне возможно, что некоторые светящиеся виды могли сохраниться. Таков наш аргумент в пользу того, что биолуминесценция в эволюционном процессе есть рудиментарное свойство и что в настоящее время она не дает никаких преимуществ при отборе, если иметь в виду только первичные процессы возбуждения. Это не исключает, конечно, того, что на протяжении эво-

люции различных видов люминесцентная система могла быть приспособлена для некоторых вторичных целей, дающих этим видам те или иные преимущества при отборе. Прекрасным примером этого служит опознавание самки самцом у светляков. У бактерий трудно предполагать такую роль люминесценции, связанную с половым размножением. В тех случаях, где способность люминесцировать каким-то образом используется, она может иметь значение для объяснения более частных преимуществ при отборе. Первичный же процесс взаимодействия кислорода с восстановительными веществами, при котором возникают возбужденные молекулы, не может быть понят иначе, как в связи с некой основной системой метаболизма, общей для всех организмов.

Тот факт, что во всех тщательно исследованных люминесцирующих системах спектры излучения оказались совершенно различными, служит доводом в пользу идеи о том, что первоначально организмы пользовались разнообразными органическими молекулами для восстановления кислорода с образованием возбужденных молекул. Представляется весьма правдоподобным, что первоначальными восстановительными системами с уровнем потенциальной энергии, близким к потенциальной энергии пиридиннуклеотидов, были те системы, которые раньше использовались для освобождения энергии при дегидрогенизации. Выработка таких систем, вероятно, послужила основой для эволюции других этапов процесса переноса электронов. Этим можно объяснить, почему в процессе фотосинтеза мы прежде всего наблюдаем восстановление пиридиннуклеотидов под действием хлорофилла, хотя термодинамически другие пути могли быть выгоднее. Поддерживаемый фотохимическими процессами перенос электронов, по-видимому, всегда осуществляется с участием соединений с высокой степенью восстановления. Если у первоначальных анаэробов удаление кислорода происходило с использованием восстановителей с таким уровнем потенциала, то можно было бы ожидать, что чаще всего будет наблюдаться высокоэнергетическая люминесценция в синей области. По мере снижения восстановительной мощности среды в процесс должны были вовлекаться другие, менее восстановленные хромофорные группы. Поэтому для нашей аргументации имеет существенное значение тот факт, что большинство люминесцирующих форм — это одноклеточные (а многие из них и фотосинтезирующие) организмы и что их свечение лежит в синей части спектра. Может иметь значение и тот факт, что большая часть люминесцирующих организмов встречается в океанах. Меньше распространены формы, испускающие свет в желто-зеленой области спектра, и все эти формы, насколько нам известно, являются многоклеточными или сложными многоядерными структурами. Испускание красного света — явление очень редкое. Оно обнаружено до сих пор только у одного вида — у личинок пестрокрылки яблонной (*Rhagoletis pomonella*).

#### РЕЗЮМЕ

Способность люминесцировать распределена в животном, растительном и бактериальном мире случайно. Химические реакции, в которых образуются возбужденные молекулы, у всех форм являются окислительными, и в них в качестве конечного акцептора электронов используется молекулярный кислород. За исключением двух видов, каждое из окисляемых веществ (люциферин) в этих разнообразных организмах реагирует только со своим собственным ферментом (люциферазой). Это указывает на то, что люминесценция не связана обязательно с одним определенным органическим соединением. Однако предполагается, что, несмотря на свое видимое разнообразие,

все люциферины являются участниками общей химической реакции, лежащей в основе жизнедеятельности всех организмов.

Мы считаем, что эволюция организмов от анаэробных форм к аэробным первоначально была борьбой за анаэробные условия существования. Токсичность кислорода для анаэробов указывает на то, что первоначально выжидали те организмы, которые оказались способными прямо и быстро восстанавливать молекулярный кислород. Эта борьба за анаэробные условия приводила к отбору организмов, имеющих специфичные оксидазы (люциферазы), которые катализировали быстрое удаление кислорода; таким образом, все примитивные формы были потенциально люминесцирующими. Постепенный отбор и эволюция таких процессов переноса электронов, в которых восстановление кислорода до воды представляло собой ступенчатый процесс, в конечном счете привели к возникновению аэробных форм. С появлением последних окислительные люминесцентные реакции уже не давали преимуществ при отборе. Таким образом, мы считаем, что биолюминесценция является рудиментарным признаком, но что в результате вторичных эволюционных процессов люминесцентные системы могли сохраниться у различных не родственных друг другу организмов в силу того, что эти системы приобрели у них иные функции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Harvey E. N., Bioluminescence, Academic Press, New York, 1952.
2. McElroy W. D., Seliger H. H., In «Symposium on Light and Life» (W. D. McElroy and H. B. Glass, eds.), p. 219, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961.

# ПЕРЕДАЧА БИОХИМИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ И ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИИ

А. РИЧ

## ВВЕДЕНИЕ

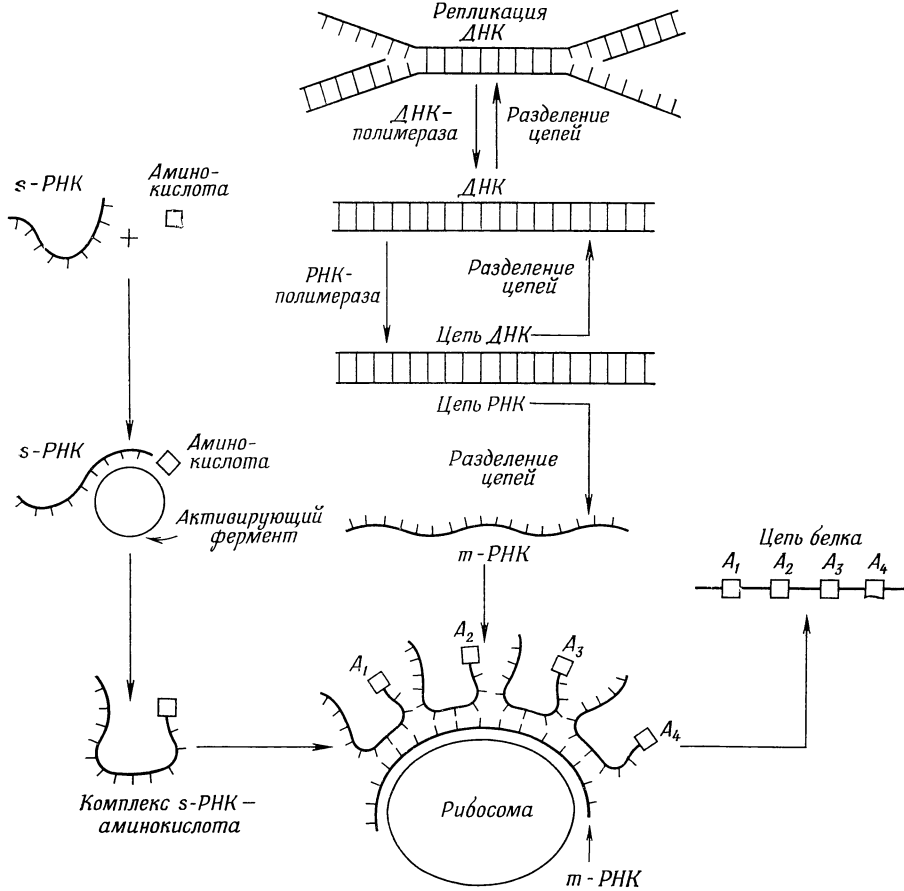
Выяснение центральной роли нуклеиновых кислот в передаче молекулярной информации явилось, быть может, наиболее поразительным достижением биохимии за последнее десятилетие. К началу 50-х годов было накоплено большое количество сведений о характере промежуточных этапов метаболизма, однако реакции, управляющие общим ходом всего процесса, были изучены сравнительно мало. В настоящее же время мы уже можем дать достаточно обоснованное объяснение процессу репликации и передачи генетической информации, а также тем процессам, с помощью которых эта информация используется для окончательного регулирования метаболизма. Центральное место в системе метаболических процессов принадлежит нуклеиновым кислотам: дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) и рибонуклеиновой кислоте (РНК). Нуклеиновые кислоты играют в современной биохимии необычайно важную роль, и трудно себе представить, что их свойства и функции были почти совсем неизвестны всего лишь 10 лет назад.

Естественно, что по мере углубления наших знаний о роли нуклеиновых кислот возникало множество вопросов, относящихся к тому, каким образом эти молекулы смогли занять такое командное положение в биохимических системах. Короче говоря, какова была их эволюционная история? К сожалению, в настоящее время у нас слишком мало экспериментальных данных, необходимых для того, чтобы дать ответ на эти вопросы. Тем не менее изучение общего характера процессов генетической репликации и реализации генетической информации позволяет поставить некоторые конкретные вопросы и наметить возможные пути эволюции, которые могли привести к современным живым системам. В этой статье высказывается ряд гипотез и предположений об эволюции нуклеиновых кислот. Некоторые из этих предположений могут оказаться полезными и стимулировать дальнейшую разработку этого вопроса или помочь в отыскании путей экспериментального подхода к проблеме.

## ОБЗОР ФУНКЦИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Функции нуклеиновых кислот в общих чертах схематически представлены на фиг. 1. Главным носителем генетической информации служит молекула ДНК. Термин «информация» по отношению к нуклеиновым кислотам часто представляет собой синоним слова «последовательность». Молекулы

нуклеиновых кислот — это линейные полимерные цепи, построенные из четырех основных нуклеотидных компонентов, и мы полагаем, что информация заключена в последовательности расположения этих четырех компонентов в цепи, аналогично тому, как информация, содержащаяся в предложении, определяется порядком расположения составляющих его букв. Таким образом, можно сказать, что молекулярный язык нуклеиновых кислот строится на основе четырехбуквенного алфавита.



Фиг. 1. Схема функций нуклеиновых кислот.

Похожие на лестницы фигуры изображают двухцепочечные нуклеиновые кислоты; основания изображены короткими поперечными линиями.

Вообще говоря, молекула ДНК выполняет две функции: во-первых, она обеспечивает воспроизведение самой себя в процессе деления клетки и таким образом содержащаяся в ней информация передается дочерним клеткам; во-вторых, она реализует эту информацию, воздействуя на метаболическую деятельность клетки. Согласно современной точке зрения, управление метаболизмом осуществляется в основном путем регулирования поступления белковых молекул, играющих роль катализаторов. В присутствии этих белков (ферментов) химические реакции протекают быстро, в отсутствие же их идут очень медленно или вовсе не идут. Механизм, лежащий в основе этих двух функций ДНК, был выяснен лишь в последние годы. В работе Корнберга с сотр. [1] было показано, что процесс репликации ДНК

управляется специальным ферментом — ДНК-полимеразой. В присутствии ДНК-затравки этот фермент обладает способностью разъединять скрученные цепи двухцепочечной молекулы и строить комплементарные последовательности нуклеозидтрифосфатов вдоль каждой из цепей таким образом, что в результате следующего за этим процесса объединения последовательностей в полимерные цепи образуются две идентичные молекулы ДНК. Меселсон и Шталь [7] продемонстрировали разделение двух нитей родительской молекулы ДНК в опытах *in vivo*. Основным условием функционирования такого механизма репликации служит возможность считывания, т. е. распознавания дезоксирибонуклеозидтрифосфатами комплементарных оснований на одной из разделившихся цепей ДНК. Так, остаток аденина должен связываться водородными связями только с тиминном, а остаток гуанина — только с цитозином.

Недавно Вейсс [14], Хервиц и др. [6], а также ряд других исследователей показали, что другой фермент, РНК-полимераза, обладает способностью строить комплементарные цепи РНК *in vitro*, используя в качестве матрицы молекулу ДНК. Если в опыте роль матрицы играют двухцепочечные молекулы ДНК, то обе цепи оказываются активными в отношении построения комплементарных молекул РНК. Однако было показано, что в этой системе могут использоваться и одиночные цепи ДНК. В этом случае, так же как и в предыдущем, важным элементом взаимодействия является считывание полинуклеотидной цепи ДНК отдельными нуклеозидтрифосфатами, из которых строится молекула РНК. В основе этого взаимодействия лежит образование специфических водородных связей между аденином и урацилом, гуанином и цитозином. Предполагается, что вслед за образованием полимерных цепей РНК *in vivo* эти цепи отделяются от матричных молекул ДНК и переходят в цитоплазму клетки. Такая РНК получила название *информационной РНК (m-РНК)*.

В обеих описанных выше реакциях полимеризации действует большое число еще неизвестных факторов. Так, например, мы очень мало знаем о механизме, регулирующем и направляющем эти реакции. Кроме того, хотя, по-видимому, ясно, что в процессе образования комплементарных цепей ДНК под действием ДНК-полимеразы активное участие принимают обе цепи исходной молекулы ДНК, мы до сих пор не знаем, обе ли цепи ДНК активны в отношении синтеза комплементарных к ним цепей РНК. Можно показать, что в изолированной ферментной системе обе цепи ДНК могут служить матрицами для построения комплементарных цепей РНК, однако надо еще выяснить, каким образом этот процесс протекает *in vivo*. Важность вопроса о синтезе одной или двух цепочек РНК становится очевидной при рассмотрении функций освобождающихся при этом продуктов.

За последнее время наше понимание механизма синтеза белков стало гораздо полнее. Наиболее замечательная особенность этого процесса состоит в том, что нуклеиновые кислоты играют центральную роль в организации совокупности аминокислот в цепи белковых молекул. Это также схематически изображено на фиг. 1. Было показано, что сравнительно короткие молекулы РНК, содержащие до 90 нуклеотидов каждая, — так называемая *транспортная РНК (s-РНК)* — могут вступать в реакцию с аминокислотами, образуя комплексы типа РНК — аминокислота. Эта реакция идет на поверхности активирующего фермента. В настоящее время имеются данные о том, что каждой аминокислоте соответствуют своя специфическая s-РНК и свой активирующий фермент. Специфичность активирующего фермента заключается в том, что он взаимодействует только с одной определенной аминокислотой (точнее, с аминоациладенилатом) и одной определенной

молекулой *s*-РНК, по-видимому, благодаря своей способности узнавать или считывать определенный участок полинуклеотидной цепи.

Вновь синтезированная *m*-РНК, отделившаяся от молекулы ДНК, содержит последовательность оснований, комплементарную к соответствующей последовательности оснований молекулы ДНК, служившей матрицей для ее синтеза. Эта РНК быстро метаболизируется, и обнаружить ее удалось лишь недавно с помощью метода импульсной радиоактивной метки [2, 5]. Можно проследить путь *m*-РНК от ДНК к рибосомным частицам — месту синтеза белков. Рибосомные частицы имеют приблизительно сферическую форму; их молекулярный вес достигает  $4 \cdot 10^6$ . Эти частицы способны присоединять к себе *m*-РНК и комплекс аминокислоты с *s*-РНК. Готовые полипептидные цепи отделяются от рибосомных частиц и свертываются затем в специфические молекулы белка.

Наше понимание процесса белкового синтеза еще очень ограничено. Тем не менее недавняя работа Ниренберга [9] явилась значительным шагом вперед на пути выяснения механизма этого процесса. Ниренберг показал, что, используя искусственно синтезированные полинуклеотиды в качестве синтетических *m*-РНК, можно получать полипептиды. Так, например, полиуридиловая кислота направляет синтез полифенилаланина; другие же полимеры или сополимеры рибонуклеотидной природы стимулируют присоединение других аминокислот. Весьма вероятно, что подобного рода реакции протекают в рибосомных частицах путем такого взаимодействия, в ходе которого пуриновые и пиримидиновые основания *s*-РНК находят соответствующие места на *m*-РНК, и таким образом осуществляется процесс считывания, в результате которого обеспечивается правильное взаимное расположение активированных аминокислот. Молекулы *s*-РНК для фенилаланина, по-видимому, имеют несколько прилегающих друг к другу адениновых остатков, комплементарно взаимодействующих с остатками урацила полиуридиловой кислоты. После того как аминокислоты расположатся в определенной последовательности, происходит их полимеризация с образованием белковой цепи, причем процесс полимеризации начинается с аминного конца.

Много усилий было направлено на выяснение природы процесса считывания. Существенной величиной, характеризующей этот процесс, является так называемое «кодовое число». Под кодовым числом подразумевают число нуклеотидов молекулы *m*-РНК, взаимодействующее с нуклеотидами одной молекулы *s*-РНК и таким образом определяющее специфичность данного участка молекулы. Если принять, что все четыре нуклеотида одинаково активны, то легко видеть, что при попарном сочетании различных нуклеотидов могло бы быть закодировано только 16 аминокислот. Но число основных аминокислот равно 20, следовательно, есть основание полагать, что кодирование одной аминокислоты осуществляется сочетанием по крайней мере трех нуклеотидов. Проведенные недавно генетические исследования Крика с сотр. [3] убедительно говорят в пользу того, что кодовое число равно именно трем. Весьма вероятно, что эта величина в ближайшем будущем будет определена точно в результате исследования систем синтетических *m*-РНК, подобных описанной выше. В связи с этим необходимо отметить, что, хотя, согласно общепринятой точке зрения, кодовое число должно быть одинаковым для всех аминокислот, в действительности это совершенно не обязательно. Не исключено, например, что природные аминокислоты объединены в разные классы и что для кодирования аминокислот каждого класса необходимо различное число нуклеотидов. Впрочем, в свете цитированных выше генетических опытов [3] такое предположение представляется маловероятным.

Мы уже отмечали, что *m*-РНК *in vivo* может строиться как комплементарная копия одной или обеих цепей ДНК. Если обе цепи ДНК активны в этом отношении, то на матрице молекулы ДНК должны синтезироваться две цепи РНК, комплементарные друг другу. Возможно, что в синтезе белка участвует только одна из них, в то время как вторая служит элементом контрольной или регуляторной системы. Если же обе цепи РНК кодируются для участия в белковом синтезе, то возникает возможность того, что молекулы белков синтезируются попарно таким образом, что члены каждой пары представляют собой белковые цепи, родственные в том отношении, что их синтез, точнее последовательность входящих в их состав аминокислот, определяется двумя комплементарными цепями *m*-РНК. Другая возможность заключается в том, что обе комплементарные цепи РНК ведут синтез одного и того же белка; в этом случае код уже должен быть вырожденным. Данная аминокислота при этом может быть закодирована более чем одним сочетанием трех нуклеотидов, но эти триплеты должны быть обязательно комплементарными. Так, например, для кодирования лейцина должны быть одинаково пригодны две комбинации нуклеотидов: *s*-РНК — АУГ и ЦАУ (А, У, Г, Ц — начальные буквы соответствующих нуклеотидов). При таких специфических условиях комплементарные цепи *m*-РНК будут вести синтез идентичных белков. Весьма вероятно, что, проводя опыты с синтетическими *m*-РНК, мы скоро сможем ответить на целый ряд подобных вопросов, связанных с проблемой кодирования.

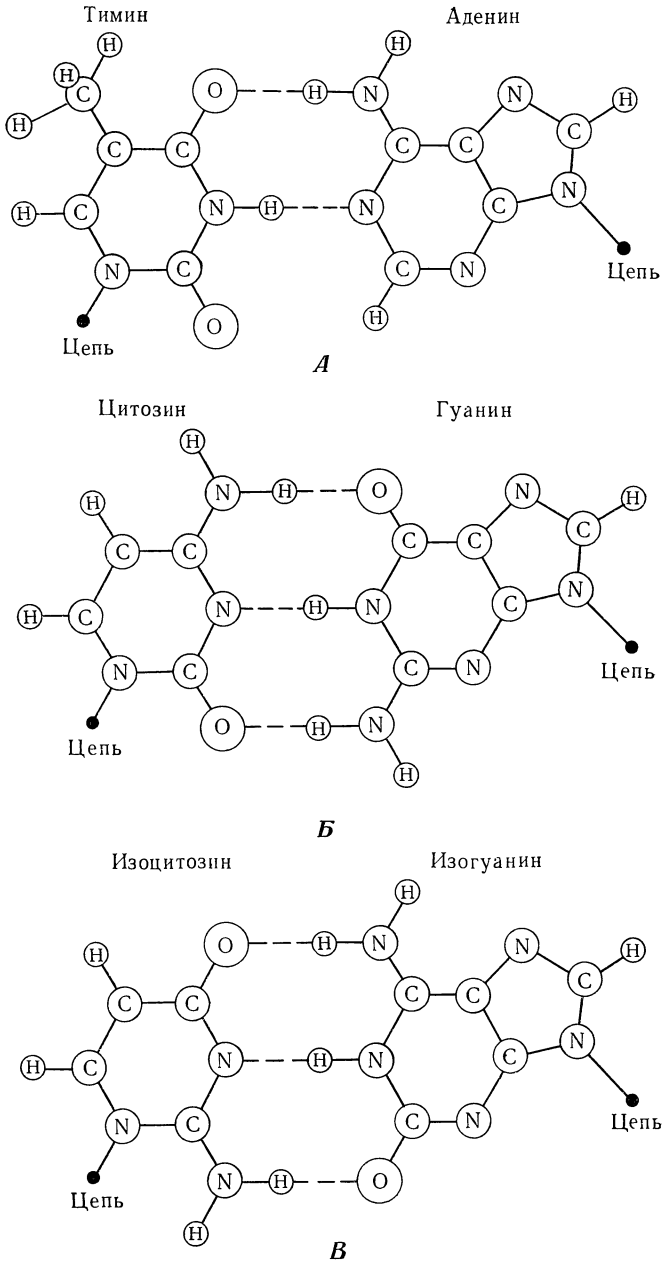
Воспользовавшись этим кратким обзором, обратим внимание на некоторые общие проблемы, относящиеся к функциям нуклеиновых кислот. Прежде всего отметим, что наиболее важная операция в процессе передачи информации заключается в считывании одной нуклеиновой кислоты другой. Считывание основывается на специфичности пуринов — пиримидинового взаимодействия. Хотя между пуринами и пиримидинами могут существовать водородные связи различных типов [10], наиболее важными среди этих связей являются те, которые обуславливают спаривание нуклеотидов в ДНК.

Действительно, образование пар АТ (или АУ) и ГЦ (фиг. 2, А, Б) обеспечивает специфичность взаимодействия в таких процессах, как репликация ДНК, синтез РНК и, по-видимому, выстраивание активированных аминокислот на молекуле *m*-РНК в ходе белкового синтеза. Взаимодействие такого типа представляет собой наиболее характерную особенность нуклеиновых кислот, и пространственная структура их молекул приспособлена для этого наилучшим образом. Для плоских, ненасыщенных пуриновых и пиримидиновых колец, располагающихся в виде стопки (причем плоскости направлены друг к другу), характерна значительная стабилизация структуры за счет действия ван-дер-ваальсовых сил. Пентозофосфатная цепь имеет предпочтительную конфигурацию такого рода, что молекулы могут образовывать спиральные структуры, закрученные вокруг расположенной по центру стопки пуринов и пиримидинов. Наконец, определенная система двух или трех водородных связей между пуринами и пиримидинами обладает достаточной специфичностью для того, чтобы определить выбор комплементарных оснований.

Можно сказать, что молекулы, содержащие информацию, это полимеры, последовательность мономерных звеньев в которых не является ни случайной, ни регулярной, но скорее носит специфический и часто сложный характер. Таким образом построены почти все белки, а также многие, хотя, вероятно, не все, нуклеиновые кислоты. Например, рибонуклеотидные полимеры, которые могут образовываться в бактериальных клетках при действии полинуклеотидфосфорилазы, по-видимому, отличаются случайным характе-



ром последовательности оснований, так как они не синтезируются на матрице. Вероятно, можно предполагать, что вообще все несущие информацию



Фиг. 2. Водородные связи между аденином и тиминном (А), гуанином и цитозинном (Б) и изогуанином и изоцитозинном (В).

биологически активные полимеры создаются *in vivo* путем передачи им информации о последовательности отдельных элементов от нуклеиновых кислот. По-видимому, это справедливо в отношении белков, но вполне воз-

можно, что такая гипотеза окажется плодотворной и для понимания ряда аспектов синтеза полисахаридов. В состав полисахаридов входит несколько различных типов молекул сахаров, и не исключено, что некоторые из этих полимеров могут нести в себе информацию о том, является ли их строение беспорядочным или совершенно регулярным. Это может быть справедливо для некоторых полисахаридов, входящих в состав клеточных стенок, или для специфических полисахаридов крови. Возможно, что в ходе дальнейших исследований будет обнаружен некий зависящий от РНК механизм полимеризации сахаров, не слишком сильно отличающийся от того, который известен для синтеза белка.

Мы можем назвать «реакциями переноса информации» все те молекулярные взаимодействия, которые необходимы для определения последовательности в содержащих информацию полимерах. В связи со сказанным выше можно заключить, что все обнаруженные до сих пор реакции переноса информации представляют собой взаимодействия нуклеиновых кислот с нуклеиновыми кислотами или их компонентами. Известно только одно существенное исключение из этого правила, а именно взаимодействие s-РНК со специфической аминокислотой на поверхности активирующего фермента. Эта реакция не обязательно предполагает взаимодействие нуклеиновых кислот между собой; она играет решающую роль в определении правильной последовательности аминокислот в молекуле белка.

#### ХИМИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ

При обсуждении проблемы происхождения жизни возможны два подхода. Первый заключается в изучении явлений природы, приведших к появлению определенных типов молекул в ранние периоды эволюции нашей планеты. Некоторые экспериментальные попытки приблизиться к решению этой проблемы были сделаны недавно [8]. В общих чертах эти опыты сводятся к изучению путей образования биологически важных соединений, например аминокислот, в первичной восстановительной атмосфере, которая, как полагают, существовала на Земле на ранних стадиях эволюции. Такая атмосфера была создана экспериментально, и в ней под влиянием электрического разряда был получен целый ряд аминокислот. Опыты такого рода способствуют выяснению направления или механизма реакций, сделавших возможным накопление и постепенное увеличение концентрации разнообразных органических молекул в первичном океане.

В течение этого периода, получившего название «химической эволюции», вероятно, происходило непрерывное увеличение числа сложных молекул, так как накопление более простых соединений, таких, как некоторые стабильные аминокислоты, приводило к тому, что они вступали между собой в химическое взаимодействие, ведущее к образованию новых органических веществ. До сих пор еще мало изучены пути, по которым с помощью такого рода реакций мог идти синтез нуклеотидов. Недавно было показано, что в первоначально существовавшей на Земле атмосфере могли образовываться аденин и урацил [4]. Ввиду этого есть основания полагать, что и столь сложные молекулы, как нуклеотиды, могли создаваться с помощью процессов неферментативного характера, использовавших либо энергию солнечного излучения, либо электрические разряды в первичной атмосфере. Весьма возможно, что эти процессы будут выяснены в ходе дальнейших экспериментов. Предположим для удобства рассуждений, что в первичном океане около трех миллиардов лет назад имелись молекулы такой же степени сложности, находившиеся на стадии, непосредственно пред-

шествовавшей той молекулярной организации, которую в соответствии с нашими современными представлениями мы уже можем назвать жизнью.

Второй подход к проблеме происхождения жизни — это изучение появления и эволюции содержащих информацию полимерных молекул и, следовательно, истории возникновения репликации. Понятие «живая система», естественно, до некоторой степени произвольно, однако можно сказать, что наиболее примитивной «живой» системой была, по-видимому, такая система, в которой могла происходить автокаталитическая репликация содержащего информацию полимера, использующего мономеры из окружающей среды для включения их в собственные реплики. Однажды возникнув, такая система должна была стать объектом всех модифицирующих ее воздействий среды, и мы можем назвать это состояние началом жизни.

В живых системах было обнаружено два характерных класса макромолекул — белки и нуклеиновые кислоты, — каждый из которых может быть взят за основу при построении теории происхождения жизни. В обоих случаях надо считать, что энергия солнца, используемая непосредственно в виде излучения или в виде электрических разрядов, прямо или косвенно участвовала в создании условий, приводивших к полимеризации аминокислот или нуклеотидов с образованием полимерных молекул. Процессы, которые могли следовать за образованием первичных белков или первоначальных нуклеиновых кислот, существенно различаются между собой, и мы можем рассматривать их отдельно.

#### НАЧАЛАСЬ ЛИ ЖИЗНЬ С МОЛЕКУЛ БЕЛКА?

В излагаемой нами теории подчеркивается важность каталитической роли первоначальных белков при создании среды, необходимой для их собственной репликации. Предполагается, что полипептиды создавались путем случайной полимеризации аминокислот и что среди этих полипептидов оказалось несколько молекул, обладавших каталитической активностью; именно эти молекулы и вступили в качестве ферментов в процесс объединения нуклеотидов, уже имевшихся, согласно нашему предположению, в первичном океане. В то же время, также в результате случайного соединения аминокислот, возникает другой фермент — катализатор, облегчающий репликацию первичных полинуклеотидных цепей. Он действует как первичная полимераз нуклеиновых кислот, организуя расположение комплементарных мононуклеотидов вдоль цепи и образование двухцепочечной молекулы. За этим может следовать разделение двух индивидуальных цепей, так что весь процесс может продолжаться. Однако в такой системе синтез белковых ферментов и запас информации, заложенный в молекуле нуклеиновой кислоты, еще не связаны между собой, и эта связь не может возникнуть в результате случайной полимеризации аминокислот. В этом и состоит основная слабость теории такого типа, так как она не может предложить трактовку наиболее важного этапа — возникновения контролируемого нуклеиновой кислотой белкового синтеза. Можно, однако, предложить для объяснения происхождения жизни теорию другого типа, в которой нуклеиновым кислотам отводится более важная роль.

#### ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ КАК ИСТОЧНИК ЖИВЫХ СИСТЕМ

Серьезные биохимические теории происхождения жизни на Земле появились лет 20—30 назад. В то время уже было совершенно ясно, что наиболее характерными молекулами, входящими в состав живых систем, являются

ся белки и что особые каталитические свойства белков играют важную роль в функционировании этих систем. В соответствии с этим внимание исследователей было сосредоточено на выяснении путей возникновения первичных белковых молекул из неживой материи. Однако бурное развитие наших представлений о роли нуклеиновых кислот за последнее десятилетие настоятельно потребовало такого пересмотра теории происхождения жизни, который позволил бы отвести в них подобающее место нуклеиновым кислотам. Как было уже сказано выше, последовательность аминокислот в белках можно рассматривать в определенном смысле как производную от информации, закодированной в последовательности чередования нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот определенного типа. Именно поэтому имеет полный смысл построить такую теорию происхождения жизни, в которой место первичных агентов заняли бы нуклеиновые кислоты.

Вначале представим себе большое количество нуклеотидных мономеров, свободно плавающих наряду с другими молекулами в первичном океане, где они возникли в результате химических реакций, стимулированных действием ультрафиолетового излучения или электрическими разрядами. Мы постулируем, что эти нуклеотидные единицы могли собраться в беспорядочно построенные цепи и образовать первичные одноцепочечные полинуклеотиды без участия каких-либо катализаторов белковой природы. Такое предположение вполне обоснованно, так как мы можем уже в настоящее время достичь того же результата чисто химическим путем, хотя и в определенных специальных условиях. Методы синтеза полинуклеотидных цепей были разработаны недавно Корана с сотр. [13], а также Шраммом с сотр. [11]. Оба опубликованных метода полимеризации основываются на использовании сильных дегидрирующих агентов в неводной среде. В присутствии таких агентов нуклеотиды отщепляют воду и полимеризуются, образуя полинуклеотиды. Корана получил полимеры такого рода с молекулярным весом более 5000, а Шрамму недавно удалось разработать методику, по которой были синтезированы макромолекулы с молекулярным весом, превышающим 50 000. Дальнейшие опыты в этом направлении позволят полнее изучить условия, в которых может происходить такого рода полимеризация. Однако в настоящее время уже известно, что молекулы полинуклеотидов могут образовываться и в отсутствие каталитически активных белков.

Следующий этап эволюции — возникновение реплицирующихся нуклеиновых кислот. Мы постулируем, что первичные полинуклеотидные цепи могли выступать в роли матриц или своего рода мягких катализаторов, способствовавших полимеризации комплементарных нуклеотидных остатков, в результате чего могли образоваться первые двухцепочечные молекулы. В сущности это та же самая система, что и в том случае, когда одна цепь ДНК ведет синтез новых цепей РНК или ДНК путем последовательного присоединения комплементарных нуклеотидов и их полимеризации. Однако мы постулируем, что этот процесс мог происходить в первоначально существовавшей среде и в отсутствие белкового катализа. Существуют ли в настоящее время какие-либо данные, говорящие о том, что реакция такого типа возможна? Крайне интересно было бы показать экспериментально, что индивидуальные полинуклеотидные цепи имеют тенденцию связывать комплементарные к ним основания или нуклеотиды или выступать в качестве мест их конденсации. Эксперименты такого рода в настоящее время уже могут быть поставлены. Очень интересный эффект обнаружил недавно Шрамм с сотр. [11] в процессе синтеза полиуридиловой кислоты. Оказалось, что скорость образования полимера уридиловой кислоты увеличивается более чем в десять раз при добавлении полиадениловой кислоты. Это позволяет

предположить, что полиадениловая кислота служит местом конденсации для комплементарных остатков уридиловой кислоты, которые в результате такой конденсации полимеризуются быстрее. Разумеется, необходимы дальнейшие опыты по изучению неферментативного полинуклеотидного катализа такого рода с целью установления границы его специфичности.

Мы отмечали здесь, что нуклеиновые кислоты существенным образом отличаются от белков. Имеются веские соображения стереохимического характера в пользу того, что полинуклеотиды могут выступать как катализаторы процесса своей собственной репликации. В то же время нет никаких оснований полагать, что такое самовоспроизведение возможно у полиаминокислот.

Итак, на данном этапе мы представили себе систему, содержащую мономеры нуклеотидов наряду с такими полимерами, которые в определенных условиях способны строить двухцепочечные варианты своей собственной структуры, используя для этого комплементарную систему водородных связей. Очевидно, такая неферментативная репликация должна была протекать очень медленно и сама система была бы малоэффективной. Возможно, что двухцепочечная форма нуклеиновой кислоты денатурировалась под действием солнечного тепла, распадаясь при этом снова на одиночные цепи; затем комплементарный синтез возобновлялся, и в результате число полимерных цепей снова начинало увеличиваться. Концентрация таких полимеров нуклеиновых кислот могла стать значительной, так как скорость разрушения цепей могла быть столь же мала, как и скорость их образования.

Теперь мы должны рассмотреть возможности модификации этого первичного процесса репликации нуклеотидных цепей. Представим себе, что к мононуклеотидным единицам, уже готовым включиться в состав полинуклеотидной цепи, случайно присоединяются другие малые молекулы. Так, например, если приходящий к месту полимеризации нуклеотид содержит в своем составе рибозу, то 3'- и 5'-гидроксильные группы используются в процессе полимеризации, однако одна гидроксильная группа, находящаяся в положении 2', еще остается свободной. К ней может присоединиться молекула другого типа, которая и в дальнейшем останется прикрепленной к растущей полинуклеотидной цепи. В частности, такой присоединившейся молекулой может оказаться органическая кислота, образующая с гидроксильной группой нуклеотида эфирную связь. Путем образования такой связи может присоединиться также и аминокислота. Можно предположить, что именно на этой стадии начинает создаваться система, в которой полимеризация молекулы нуклеиновой кислоты оказывается связанной со «сборкой» определенной последовательности аминокислот. После того как благодаря присоединению к соседним нуклеотидам аминокислоты оказались собранными в линейную последовательность, может произойти их полимеризация. По существу, именно на этом этапе и возникает наибольшее затруднение при разработке любой теории происхождения жизни, так как для того, чтобы подойти к развитию биохимических систем передачи информации, необходимо связать последовательность нуклеотидов с последовательностью аминокислот в белке. Однако для этого необходимо предположить, что последовательность аминокислот имеет определенную специфичность, которая и обеспечивает выполнение каталитических функций, необходимых для работы описанной системы. Короче говоря, мы должны попытаться найти пути возникновения активирующих ферментов.

Рассмотрим эту проблему более подробно. Мы могли бы представить себе, что какая-либо случайная полинуклеотидная цепь, выступая в роли конденсирующего агента и таким образом способствуя беспорядочной поли-

меризации аминокислот, вызовет образование молекулы, которая будет обладать способностью присоединять глутаминовую кислоту к вполне определенному нуклеотиду, например к аденину (или к триплету нуклеотидов, или к еще более крупной их комбинации). Появление такой молекулы, обладающей каталитическими свойствами, повлечет за собой возникновение большого числа аденил-глутаминовых единиц, однако это вовсе не будет способствовать воссозданию первоначального активирующего фермента, поскольку этот последний был образован в результате случайного взаимодействия аминокислот с нуклеотидами. Отсюда вытекает, что такой механизм не мог привести к синтезу специфических белковых молекул, управляемому молекулой с определенной последовательностью нуклеотидов, и, следовательно, мы вынуждены искать другие пути возникновения активирующих ферментов.

Рассмотрим один из таких возможных путей. Предположим, что в первоначальном процессе синтеза нуклеиновых кислот, сопровождающегося присоединением аминокислот, к каждому индивидуальному нуклеотиду присоединяется одна определенная аминокислота. Кодовое число в такой первичной системе было бы равно единице. Пусть, например, адениннуклеотид оказался бы способным присоединять к себе преимущественно глутаминовую кислоту, а каждый из остальных трех нуклеотидов обладал бы таким же сродством по отношению к трем различным аминокислотам соответственно. Это могло привести к возникновению первичных полипептидных цепей, состоявших в основном из четырех различных аминокислот, а именно тех, которые отличались наибольшим сродством к четырем различным нуклеотидам. В этой гипотезе избирательность должна быть связана с определенными стереохимическими особенностями реагирующих молекул или со сравнительной легкостью протекания реакции данной аминокислоты с данным нуклеотидом в отсутствие белковых катализаторов. Однако пока о специфичности такого рода еще ничего определенного сказать нельзя. Было бы интересно выяснить, существует ли какое-нибудь сродство между различными нуклеотидами и различными аминокислотами. Например, имеет ли место предпочтительное образование тех или иных аминоксилнуклеатов в процессе химического синтеза? Этот вопрос можно исследовать экспериментально уже в настоящее время. Вместе с тем не следует упускать из виду и возможность того, что другие компоненты первоначально существовавшей среды; такие, как поверхности минералов или глин, могли выступать в роли избирательных катализаторов.

Первым важным шагом на пути построения автокаталитической системы должно быть создание прототипа полипептидного катализатора, выступающего в роли активирующего фермента и усиливающего первоначально возникшую грубую избирательность, например для рассмотренного выше случая взаимодействия адениловой кислоты с глутаминовой. После появления таких первичных активирующих ферментов специфичность становится постоянной характеристикой системы и между последовательностью нуклеотидов и последовательностью аминокислот устанавливается взаимная зависимость.

Трудно переоценить роль активирующих ферментов в любой эволюционной теории. Это молекулы, осуществляющие связь между полинуклеотидами и полиаминокислотами, и весь механизм специфического синтеза зависит от их эволюционного развития. При создании биохимической системы активирующие ферменты должны возникать в первую очередь; до их появления могут существовать только полимеры аминокислот, имеющие беспорядочное строение.

Для того чтобы завершить образование полностью связанной системы из нуклеиновых кислот и белка, мы представим себе, что небольшое число беспорядочно построенных полинуклеотидных цепей начинает образовывать полипептидные цепочки, выполняющие функции активирующих ферментов, так что нуклеиновые кислоты оказываются определенным образом считанными. Если первичное кодовое число было равно 1 и в состав первичной нуклеиновой кислоты входило 4 нуклеотида, то и число необходимых для этой цели ферментов будет равно четырем. Если же в состав первичной нуклеиновой кислоты входило лишь 2 нуклеотида (что будет рассмотрено ниже), то необходимо наличие только двух активирующих ферментов. Это число является минимальным, так как для обеспечения специфичности необходимо присутствие более чем одного фермента.

Можно считать, что жизнь возникла в тот момент, когда в такой системе начался процесс синтеза специфических последовательностей аминокислот, связанного с последовательностью нуклеотидов в нуклеиновых кислотах. Некоторые из этих первичных нуклеиновых кислот могли иметь последовательность нуклеотидов, обуславливающую возможность появления полимерызы; тогда преимущественно стимулировался бы синтез именно таких нуклеиновых кислот, т. е. начался бы естественный отбор на молекулярном уровне. Можно видеть, что если первичное кодовое число было равно 1, то значительные преимущества оказывались на стороне такого мутанта, у которого в реакциях активации участвовали пары (или тройки) нуклеотидов, так как это могло бы повлечь за собой включение других аминокислот и привести к синтезу полипептидных цепей, отличающихся большей химической гибкостью.

Основная идея такой трактовки процессов развития состоит в том, что жизнь начинается с момента, когда полимеризация нуклеиновых кислот и полимеризация аминокислот оказываются связанными между собой. Важный шаг вперед на пути выяснения вопроса о том, когда именно в системе, ведущей синтез белка, возникает специфичность, был сделан после открытия активирующих ферментов. Однако прототип этой реакции мог иметь совсем иную форму, чем та, которая существует в настоящее время.

#### ТЕНДЕНЦИЯ К УВЕЛИЧЕНИЮ СЛОЖНОСТИ

Изучение эволюции на молекулярном уровне началось совсем недавно. Только в последние годы были разработаны методы определения последовательности аминокислотных остатков в белках. Это дает нам возможность приступить к изучению молекулярной эволюции белков, и весьма вероятно, что работа в этом направлении займет многие годы. В настоящее время мы еще не располагаем достаточными данными для того, чтобы предложить общую концепцию молекулярной эволюции, которая дала бы возможность понять и объяснить экспериментальные результаты.

В нашем распоряжении имеется обширная информация, касающаяся макроскопической эволюции, т. е. изменения организмов во времени и появления новых видов. Изучая имеющиеся в этой области данные, мы видим, что эволюция идет через медленные усовершенствования организмов с целью приспособления к окружающей среде, увеличивая таким образом способность к воспроизведению. Время от времени непрерывность развития нарушается и благоприятные возможности используются для приспособления к новой среде или к выполнению измененных физиологических функций. Как правило, макроскопическая эволюция организмов имеет тенденцию к увеличению сложности. Мы можем проследить развитие все более тонких

физиологических функций и все более тонкой регуляции, ведущих к прогрессивному росту способности организмов использовать окружающую среду и к увеличению способности к воспроизведению.

Естественно, возникает вопрос о том, справедливы ли аналогичные принципы в отношении эволюции на молекулярном уровне, а также происходило ли в ходе эволюции увеличение сложности молекулярной организации и функций. Можно думать, что это действительно имело место, и тогда следует изучать возможные пути этого процесса, особенно в связи с той ролью, которую играла в нем система передачи биологической информации.

В предыдущем разделе мы описали первичную самореплицирующуюся систему нуклеиновых кислот в тот момент, когда начал создаваться механизм обратной связи, в соответствии с которым изменение способности нуклеиновых кислот к репликации связано с образованием полипептидной цепи, которая затем отделяется, образуя молекулу первичного каталитически активного фермента. Как только эта система становится способной образовывать активирующие ферменты, она приобретает тенденцию развиваться в определенном направлении. Некоторые классы нуклеиновых кислот, которые случайно образовали последовательность нуклеотидов, кодирующую целый ряд функциональных белков, будут становиться более многочисленными, чем другие. Первоначально это может быть вызвано просто различием в концентрациях. Если данная нуклеиновая кислота начинает вырабатывать в дополнение к активирующим ферментам еще и полимеразу, то это должно приводить к образованию все больших количеств нуклеиновой кислоты того же типа благодаря сравнительно более высокой концентрации указанного фермента вблизи этих молекул.

Увеличение сложности может происходить в различных частях этой молекулярной системы. Мы постараемся их перечислить и рассмотреть те изменения, которые могли произойти в системе за всю историю ее существования. Такое перечисление может помочь в интерпретации данных, относящихся к биохимической эволюции, по мере того как такие данные будут появляться. Кроме того, мы стоим на пороге исследования космического пространства и, быть может, получим возможность изучать примитивные формы жизни экспериментально.

#### ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Естественно, возникает вопрос о том, почему нуклеиновые кислоты в настоящее время содержат только четыре нуклеотида (для простоты рассуждений мы не будем учитывать различий между урацилом и тиминном, а также не будем обращать внимания на различие углеводных остатков, входящих в состав молекул нуклеиновых кислот). Для того чтобы «записать» информацию, очевидно, достаточно двух оснований, например аденина и тимина. Первичный организм мог бы создать биохимическую систему передачи информации, аналогичную описанной выше, и в том случае, если его нуклеиновая кислота содержала бы лишь два комплементарных основания. Последовательность остатков аденина и тимина может нести информацию во многом аналогично тому, как это имеет место для системы точек и тире азбуки Морзе. В такого рода гипотетическом организме для кодирования двадцати аминокислот, т. е. для образования двадцати различных комбинаций оснований, потребовалось бы использовать по пяти оснований (двух типов) для образования каждой такой комбинации, кодирующей одну аминокислоту. Тем не менее в принципе такая система могла бы функционировать.



Возможно ли, чтобы на ранних ступенях развития жизни существовала система, использовавшая нуклеиновые кислоты только с двумя основаниями? Корнберг и его сотрудники показали, например, что фермент ДНК-полимераза в отсутствие заправки и при наличии в среде нуклеозидтрифосфатов может вести синтез АТ-сополимера. Это ДНК-подобная молекула с регулярно чередующейся последовательностью аденина и тимина. Возникает соблазн рассматривать ее как атавистическую форму ДНК. Уместно заметить также, что ДНК, выделенная из клеток краба, почти полностью состоит из АТ-сополимера [12]. В связи с этим было бы весьма интересно изучить зависимость состава нуклеиновых кислот от филогенетической эволюции и выяснить, имеет ли здесь место какая-либо определенная тенденция. Первые шаги в этом направлении уже предпринимаются [12].

Естественно также поставить вопрос, почему природа для построения нуклеиновых кислот ограничилась использованием четырех нуклеотидов, а не шести, например. Или в более общем виде: возможно ли для построения нуклеиновых кислот использовать еще и дополнительные, комплементарные пурин-пиримидиновые пары, при условии что геометрия молекулы и специфичность водородных связей останутся такими же, какие существуют сейчас в ДНК? Ответ на этот вопрос не вполне ясен ввиду того, что многое зависит от таутомерии оснований. Однако если мы будем рассматривать лишь аминокислоты и кетогруппы вместо иминокислот и енольных групп соответственно, то другая возможная комбинация оснований может быть представлена комплементарной парой в составе изогуанина и изоцитозина (фиг. 2, В). Если указанная таутомерная форма этих молекул устойчива, то они также могут быть включены в состав нуклеиновой кислоты и будут обладать необходимой специфичностью, т. е. будут образовывать водородные связи только друг с другом и ни с одним из остальных четырех оснований. Важно заметить, что для этого необходимо, чтобы атом водорода в изогуанине находился у первого (а не у третьего) атома азота кольца. Пока неясно, выполняется ли это условие для изогуанина. Во всяком случае, достаточно заметить, что, помимо обычных двух пар, существует лишь *очень небольшое число* комплементарных пар оснований, которые могли бы войти в состав структуры ДНК и обладали бы необходимой специфичностью. Тем не менее не вызывает сомнений, что нуклеиновая кислота, построенная по тому же принципу комплементарности из шести оснований, могла бы прекрасно функционировать в биологической системе. Для того чтобы кодировать те же двадцать аминокислот, в этом случае для сохранения информации о соответствующей аминокислоте можно было бы ограничиться двумя основаниями вместо трех.

#### УВЕЛИЧИЛОСЬ ЛИ В ХОДЕ ЭВОЛЮЦИИ ЧИСЛО АМИНОКИСЛОТ?

Благодаря недавнему открытию Ниренберга [9] мы можем использовать синтетические полирибонуклеотиды в качестве искусственных форм *m*-РНК для управления синтезом полипептидов и, по-видимому, в скором времени сумеем полностью расшифровать аминокислотный код. Из недавнего исследования Крика и сотр. [3], проведенного над серией мутантов, полученных действием акридинового оранжевого, следует, что код, вероятно, является триплетным и, вполне возможно, вырожденным. Таким образом, каждая аминокислота может определяться более чем одной тройкой нуклеотидов.

Обычно говорят, что в состав всех белков входит двадцать аминокислот, однако при этом упускают из виду, что в природе встречается еще несколько дополнительных, хотя и сравнительно малораспространенных, аминокислот.

Примером могут служить оксипролин или оксилизин, входящие в состав коллагена и родственных ему белков. Должно быть, сравнительно легко определить, соответствуют ли этим аминокислотам отдельные кодовые буквы, т. е. фиксированные группы нуклеотидов. Так, например, если обнаружится, что оксипролину соответствует своя, особая молекула *s*-РНК, с которой он связывается при помощи специального активирующего фермента, то весьма вероятно, что имеется и специальная буква кода, относящаяся только к оксипролину. Аналогичным образом можно исследовать и другие аминокислоты, присутствующие в белках в небольших количествах. Исследования такого рода могут показать, что только двадцать аминокислот включаются в белки при участии активирующих ферментов. Но более вероятно, что число двадцать не окажется уникальным и что существуют и другие буквы кода, определяющие некоторые другие аминокислоты, содержащиеся в белках в следовых количествах. Возможно, что эти факты и служат указанием на один из путей, которым могло идти увеличение сложности биохимических систем. Таким образом, число аминокислот, используемых биологической системой для построения белков, может оказаться функцией времени. В первоначальной, очень примитивной биохимической системе использовалось лишь небольшое число аминокислот, но постепенно, по мере эволюционного развития живых систем развивались все более тонкие механизмы функциональной регуляции за счет использования других аминокислот, с несколько отличными по химической структуре боковыми цепями. Эта гипотеза может быть проверена экспериментально.

Следует заметить, что система вырожденного кода для аминокислот хорошо приспособлена к такому типу эволюционных изменений. Предположим, например, что лейцин был представлен четырьмя видами нуклеотидных триплетов. В результате ошибки мутационного характера один из этих триплетов может оказаться связанным с новой аминокислотой, например оксипролином, но лейцин будет по-прежнему использоваться организмом. Таким образом, система должна иметь тенденцию движения к состоянию меньшей вырожденности и более широкого спектра используемых аминокислот. Совершенно ясно, что развитие кодовой системы, допускающей постепенное увеличение числа используемых аминокислот, несет с собой значительные преимущества в смысле естественного отбора.

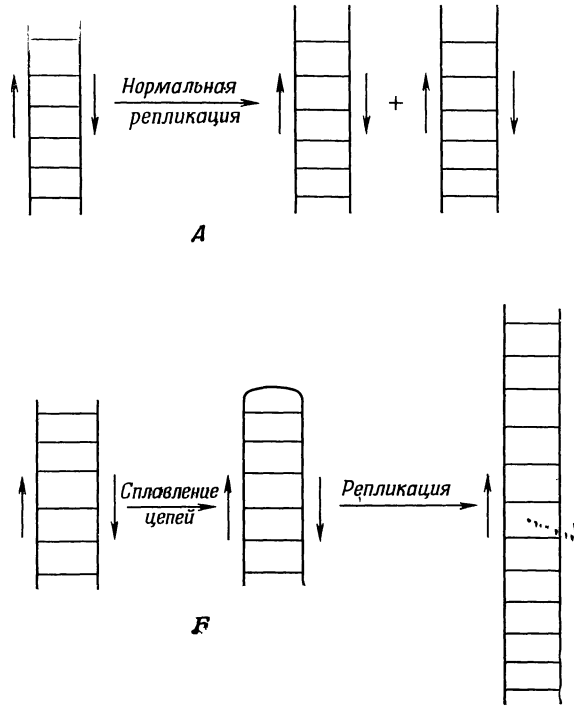
Важно иметь в виду, что расшифровка соотношения между *m*-РНК и синтезируемой с ее помощью полипептидной цепочкой должна пролить свет на все рассмотренные выше возможности.

#### УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ПРОЦЕССЕ ЭВОЛЮЦИИ

Если мы сравним содержание ДНК у разных организмов, то заметим, что количество ДНК увеличивается одновременно с возрастанием сложности организмов. Аналогично этому можно полагать, что количество генетической информации, содержащееся в отдельных первичных клетках, должно было увеличиваться и на самых ранних стадиях биохимической эволюции. Допустим, например, что в какой-то момент времени существовал примитивный организм, содержащий нуклеиновую кислоту в количестве, достаточном для того, чтобы кодировать пять или десять различных белков. Это было бы возможно в такой среде, где необходимая концентрация многих потребляемых организмом молекул была бы обеспечена природными процессами, как это описано ранее. В такой системе репликация нуклеиновой кислоты происходила бы примерно таким же образом, как мы представляем

себе этот процесс в настоящее время, т. е. путем разделения двух первоначальных нитей родительской молекулы нуклеиновой кислоты и построения комплементарных к ним цепей.

Мы можем спросить себя, что могло бы произойти в такой системе, если под действием космических лучей или иной радиации концы двухцепочечной молекулы ДНК соединились бы между собой обычной ковалентной связью. В результате длина исходной молекулы удвоилась бы, как это показано на фиг. 3. Тогда во время следующего цикла репликации длина молекулы ДНК была бы вдвое больше первоначальной. Количество информации, содержащейся в такой молекуле, оставалось бы прежним, но молекула



Фиг. 3.

А — репликация молекулы нуклеиновой кислоты, приводящая к образованию двух идентичных дочерних молекул; Б — действие соединения концов родительской молекулы на ее репликацию.

содержала бы две копии этой информации. Такое явление на первый взгляд не дает никаких эволюционных преимуществ. Однако в процессе мутации могут произойти изменения в составе оснований одной из копий, в то время как вторая копия, кодирующая тот же самый белок, останется незатронутой. Это означает, что мутация, которая могла бы быть летальной для организма, окажется нелетальной благодаря такому дублированию информации. Точно так же подобного рода аномалия могла бы привести к появлению ряда новых белковых молекул, которые в некоторых случаях окажутся более приспособленными к использованию условий окружающей среды, чем исходный организм с его единственной копией генетической информации. Таким образом, присутствие излишней, чрезмерной информации обеспечивает избирательное преимущество в эволюционном развитии. Если подобный процесс повторяется неоднократно, то организм в конце концов оказывается наделенным многими генетическими копиями исходного прототипа белковой

молекулы. Эти копии могут эволюционировать далее несколькими различными путями и дать начало классам молекул, хотя и сходных, но фактически различающихся между собой во многих отношениях. Возможно, что именно так возникли некоторые классы родственных белков, таких, как миоглобин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина, у которых есть много общего как в последовательности аминокислот, так и во вторичной структуре.

В настоящее время возможность процесса, показанного на фиг. 3, Б, уже можно выяснить экспериментально. Так, облучая гомогенные растворы ДНК, можно попытаться обнаружить небольшие количества более длинных молекул после обработки этих растворов ДНК-полимеразой.

### ПОЧЕМУ СУЩЕСТВУЮТ ДВЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ?

Весьма примечательно, что в современных биохимических системах имеется два вида нуклеиновых кислот, ДНК и РНК, различающиеся между собой только наличием или отсутствием гидроксильной группы во всех звеньях полимерной цепи и метильной группы — в некоторых звеньях. Несмотря на большое химическое сходство, молекулы двух нуклеиновых кислот выполняют в клетке совершенно разные функции. ДНК выступает в качестве основного носителя генетической информации, в то время как молекулы РНК используются для превращения этой информации в реальные молекулы белка. Ввиду столь явного химического сходства, естественно, встает вопрос о том, могли ли два ныне существующих различных класса нуклеиновых кислот произойти от одного корня, одной молекулы нуклеиновой кислоты, которая затем специализировалась в ходе эволюции. Для дальнейшего обсуждения сразу же отметим, что молекула РНК также может нести генетическую информацию, что имеет место, например, в случае РНК-содержащих вирусов. Поэтому, быть может, есть основания предполагать, что гипотетическая общая прародительская полинуклеотидная молекула представляла собой РНК-подобный полимер, способный осуществлять как передачу и хранение генетической информации, так и организацию аминокислот в специфические последовательности белков. Это означает, что полинуклеотидная цепь РНК обладала способностью к репликации и созданию комплементарных структур, в какой-то степени аналогично тому, как это имеет место в настоящее время для ДНК. С этой точки зрения ДНК можно рассматривать как производную молекулу, сохранившую в ходе эволюции способность выполнять лишь часть функций первоначальной молекулы нуклеиновой кислоты. Она как бы специализировалась на цикле молекулярной репликации, являющемся частью более общего механизма передачи генетической информации. ДНК метаболически менее активна, чем РНК; это обстоятельство, по-видимому, можно связать с отсутствием гидроксильной группы у второго атома углерода. Быть может, именно в результате потери этой гидроксильной группы ДНК утратила способность присоединять к себе аминокислоты, идущие на синтез белка. Однако появление двух различных классов нуклеиновых кислот, один из которых менее активен метаболически и специализирован на самовоспроизведении, несет с собой значительные преимущества в смысле естественного отбора. В определенном смысле это создает тенденцию к сохранению первоначальной генетической информации. Было бы весьма интересно изучить доступные нашему вниманию простые формы жизни и выяснить, нет ли среди них таких, которые используют только одну нуклеиновую кислоту вместо двух. Вполне вероятно, что РНК-содержащие вирусы можно рассматривать как результат регрессивной эволюции таких примитивных форм жизни.

Следует отметить, что изменения, которые обсуждались во многих случаях выше, могли происходить только на очень ранних ступенях эволюции. Живые системы, существующие в настоящее время, являются уже конечным результатом сложной конкуренции между многими различными типами систем.

### ЖИЗНЬ ВНЕ ЗЕМЛИ

Мы можем сделать несколько общих выводов из нашего описания молекулярных основ жизни в том виде, как она существует на нашей планете. Наиболее характерной особенностью живой системы является ее чрезвычайная сложность с молекулярной точки зрения. В ней идет множество химических реакций, включая синтез многих специфических белковых катализаторов, выступающих в качестве регуляторов, облегчающих течение самих этих реакций. Однако информация, необходимая для создания этих огромных молекул-катализаторов, хранится в полимерных цепях в значительно более компактной форме, чем масса самих молекул-катализаторов. В сущности, можно сказать, что характерным отличием жизни является хранение информации в полимерных молекулах и ее последующее выражение путем создания других полимерных молекул, обладающих специфическими функциями, такими, как построение катализаторов, клеточных стенок и прочих специализированных структур.

Мы находимся сейчас на пороге исследования космического пространства с целью выяснения вопроса о существовании жизни на других планетах и даже в других солнечных системах. Если жизнь вообще существует вне Земли, она может иметь формы, совершенно непохожие на те, которые существуют на нашей планете. Так, например, можно себе представить, что живая система, развившаяся в несколько отличной среде, могла отобрать другие классы молекул для создания полимеров, предназначенных как для хранения генетической информации, так и для проведения большого числа химических реакций, необходимых для осуществления жизненных процессов. Молекулярная основа других форм жизни может быть совершенно иной, чем на Земле. Однако весьма вероятно, что и эти другие формы жизни будут обладать одной главной чертой, общей с той формой, которая существует на Земле: они тоже будут использовать полимерные молекулы для хранения большого запаса информации, необходимой для адекватного определения сложной совокупности событий, происходящих в системе, которую мы называем «живой». Но, разумеется, полимеры могут быть совсем иными, и молекулярный состав других живых систем может не иметь никаких других общих черт с живыми системами Земли. В частности, нуклеиновые кислоты, играющие центральную роль в процессах передачи информации у тех форм жизни, которые существуют на нашей планете, могут отсутствовать вовсе у других форм жизни, где их должны заменять полимеры иного типа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом очерке кратко обрисованы наиболее существенные черты механизма биохимической передачи информации и обсуждаются различные проблемы, возникающие при попытке понять эволюционный путь создания этого механизма. Ввиду почти полного отсутствия фактического материала, относящегося к этой проблеме, рассмотрение, подобное приведенному здесь, неизбежно должно носить спекулятивный характер. Тем не менее некоторые

из предложенных размышлений могут стимулировать дальнейшие поиски экспериментальных подходов, которые позволили бы нам создать более прочный фундамент теории биохимической эволюции жизни.

*ЛИТЕРАТУРА*

1. Bessman M. J., Lehman I. R., Simms E. S., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, **233**, 171 (1958).
2. Brenner S., Jacob F., Meselson M., *Nature*, **190**, 576 (1961).
3. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., *Nature*, **192**, 1227 (1961).
4. Fox S. W., Harada K., *Science*, **133**, 1923 (1961).
5. Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Rissebro-ugh R. W., Watson J. D., *Nature*, **190**, 581 (1961).
6. Hurwitz J., Bresler A., Dringer R., *Biochem. Biophys. Research Communs.*, **3**, 15 (1960).
7. Meselson M., Stahl F. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 671 (1958).
8. Miller S. L., Urey H. C., *Science*, **130**, 245 (1959).
9. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1588 (1961).
10. Rich A., *Rev. Modern Phys.*, **31**, 191 (1959).
11. Schram G., Grötsch H., Pollmann W., *Angew. Chem.*, **73**, 619 (1961).
12. Sueoka N., *J. Mol. Biol.*, **3**, 31 (1961).
13. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6223 (1958).
14. Weiss S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 1020 (1960).

# ПОЧЕМУ ЖИВОЕ ВЕЩЕСТВО БАЗИРУЕТСЯ НА ЭЛЕМЕНТАХ ВТОРОГО И ТРЕТЬЕГО ПЕРИОДОВ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ? ПОЧЕМУ ФОСФОР И СЕРА СПОСОБНЫ К ОБРАЗОВАНИЮ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ?

Дж. УОЛД

Задавать вопросы и отвечать на них — это совершенно различные вещи, но поставить вопрос часто значительно труднее, т. е. такой вопрос, который ведет к новым вопросам и поставлен таким образом, чтобы был возможен однозначный ответ. Сцент-Дьёрды вел такой диалог с Природой всю свою жизнь; этот диалог велся изнутри, а не извне, потому что сам он, как все люди, — часть Природы. Трудно решить, кто здесь играл роль Сократа и кто — роль афинян, кто назойливый овод и кто его жертва; но когда имеешь дело с оводом, то почти наверное будешь ужален им.

Несколько времени назад, беседуя с Сцент-Дьёрды, я был несколько ошеломлен, услышав его вопрос: почему фосфор играет ту особую роль, какая принадлежит ему в организме? Я тоже задавал себе раньше этот вопрос, вернее, это была часть более общего вопроса: почему каждый из атомов, входящих в состав организма, играет в нем вполне определенную роль?

Это, очевидно, законный вопрос, ибо в выборе атомов нет ничего случайного. Основную массу органических молекул составляют в организме атомы С, Н, N и О, а также S и P; далее мы встречаем основные одноатомные ионы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Cl}^-$ ) и, наконец, микроэлементы, главным образом переходные элементы, которые именно поэтому подходят для той роли, в которой мы их встречаем, т. е. для роли ядер и лигандов в металлоорганических комплексах и окислительно-восстановительных ферментах; это Fe, Mn, Co, Cu, Zn. Все эти 16 элементов имеют относительно низкий молекулярный вес (они входят в число первых 30 элементов периодической системы). Из остающихся 62 природных элементов лишь I и Mo встречаются в микроколичествах у некоторых организмов. В общем и целом наиболее легкие элементы являются наиболее широко распространенными; однако ясно, что, хотя широкое распространение в океане упомянутых выше одноатомных ионов и сыграло свою роль, отбор элементов, из которых построены организмы, определялся какими-то иными критериями, чем их доступность.

Это «нечто» есть их *пригодность*, особое сочетание свойств, делающее эти элементы наиболее подходящими для той роли, которую они призваны выполнять в организме. Развивая эти рассуждения, нужно, я полагаю, учитывать, что для организмов возможности выбора были очень ограничены, так что в большинстве случаев они вынуждены были сделать именно тот выбор, который они сделали. По этой причине я полагаю, что не только

химические элементы, но и химическая конституция организмов одинакова во всей Вселенной.

Таким образом, вопрос, который мы поставили, имеет смысл, и в этом более широком контексте я поставил перед собой тот вопрос, который мне задал Сцент-Дьёрдьи: почему фосфор? Помимо этого, как мы увидим, я предпочел поставить сразу вопрос: почему фосфор и сера? Ибо вопрос о сере входит в ту же проблему. А почему *не* кремний? — это тоже часть того же вопроса. В конечном счете все дело, по-видимому, в том, чтобы элемент находился во втором, а не в третьем периоде периодической системы<sup>1</sup>.

Около 99% живых тканей живого организма построено из четырех элементов: Н, О, N и С. Некоторое время назад я спросил себя: почему именно из них? И после некоторого размышления я пришел к следующему ответу. *Это те элементы периодической системы, которые имеют атомы наименьшего размера и приобретают стабильные электронные конфигурации после присоединения соответственно 1, 2, 3 и 4 электронов.* Элементы С, N и О следуют во втором периоде непосредственно друг за другом. Дальше идет фтор (F); но фтор, хотя он также приобретает стабильную электронную конфигурацию после присоединения одного электрона, не принимает никакого участия в построении организмов, потому что по всем тем свойствам, которые имеют здесь значение, он уступает водороду, имеющему атомы меньшего размера. Присоединить к себе электрон — это только часть дела, в остальном имеет значение малый размер атома. Единственное, что в нашем случае больше подходит для дела, чем находиться во втором периоде, это быть в первом<sup>2</sup>.

Значение присоединения электронов известно. Химические связи, а стало быть молекулы, образуются при присоединении электрона, который становится общим для двух атомов. Но какое отношение имеют к этому размеры атома? Здесь важны два обстоятельства: во-первых, атомы наименьшего размера обычно образуют наиболее устойчивые связи и, во-вторых, только эти атомы, как правило, образуют кратные связи. Много лет назад Льюис [13] констатировал, что «способность образовывать кратные связи присуща почти исключительно только первым восьми элементам, и особенно углероду, азоту и кислороду». Он считал поэтому, что, если бы не эти элементы, понятие о кратных связях вообще не было бы создано. В тех редких случаях, когда мы случайно встречаем кратные связи, помимо этой тройки элементов, они чаще всего образуются серой и фосфором.

Все это приходит в голову при сравнении углерода с кремнием. Во всех тех частях Земли, которые хоть в какой-то мере доступны для живых организмов, кремния имеется примерно в 135 раз больше, чем углерода. В поверхностных слоях Земли, включая атмосферу и гидросферу, на долю кремния приходится 16,08% всех атомов, а на долю углерода — только 0,119%. Кремний расположен непосредственно под углеродом в периодической системе, т. е. также имеет тенденцию к присоединению четырех электронов и образованию четырех ковалентных связей. Почему же жизнь на Земле

<sup>1</sup> В нумерации периодов периодической системы существует некоторая неоднозначность. Мы здесь примем, что первый период составляют Н и He, второй период охватывает элементы от Li до Ne, а третий — от Na до Ar. В этой нумерации, следовательно, элементы С, N и О находятся во втором периоде, а элементы Si, P и S — в третьем.

<sup>2</sup> Нужно отметить, что тенденция к присоединению электронов в предельном случае приводит к образованию анионов, а не молекул. Вот одна из причин, почему фтор — наиболее электроотрицательный из элементов — не играет никакой роли в биохимии, а хлор имеет значение главным образом как ион. Именно поэтому я уделю хлору столь мало внимания при обсуждении вопроса о кратных связях.



базируется на относительно редком элементе — углероде, а не на кремнии, которого имеется гораздо больше?

Прежде всего это объясняется различиями в силе и, стало быть, в стабильности связей. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что в C—C-связи расстояние между атомами (длина связи) значительно меньше, чем в Si—Si-связи, и соответственно энергия первой связи почти вдвое больше энергии второй.

Таблица 1

Связь	Межатомное расстояние, Å	Энергия связи, ккал/моль
C—C	1,54	80—83
Si—Si	2,34	42,2

Ясно, что, поскольку построение организмов предполагает наличие способности образовывать устойчивые связи, а в конечном счете — длинные стабильные цепи атомов, углерод имеет большие преимущества перед кремнием.

Насколько важна для организмов способность образовывать кратные связи, можно проиллюстрировать путем сравнения свойств  $\text{CO}_2$  и  $\text{SiO}_2$ . В  $\text{CO}_2$  углерод связан с каждым из атомов кислорода двойными связями, каждая из которых образована двумя парами общих электронов. Благодаря этому электронная оболочка каждого из атомов, входящих в  $\text{CO}_2$ , приобретает законченную структуру октета. Таким образом, все возможности к образованию связей у этой молекулы исчерпаны. Углекислый газ легко растворяется в воде и реагирует с ней и в такой форме используется живыми организмами.

Совершенно иначе обстоит дело с  $\text{SiO}_2$ . Кремний соединен с атомами кислорода простыми связями, которые оставляют два неспаренных электрона у кремния и по одному у каждого из атомов кислорода. Лишенные возможности образовывать кратные связи, эти электроны спариваются с неспаренными электронами соседних молекул двуокиси кремния. Этот процесс приводит к образованию гигантского полимера, в некотором смысле слова — гигантской супермолекулы двуокиси кремния. Это и есть основная структура кварца — исключительно плотного, твердого, инертного материала, который можно разломать, только разрушив ковалентные связи.

По сравнению с углеродом кремний имеет и третий недостаток. Подобно атомам углерода, атомы кремния способны соединяться друг с другом с образованием цепей. Казалось бы, соединения кремния по своему разнообразию и сложности должны были бы соперничать с соединениями углерода. Однако с точки зрения жизни соединения кремния обладают решающим недостатком: связи Si—Si неустойчивы в присутствии воды, аммиака или кислорода.

Рассмотрим причины этого явления. У такого элемента второго периода, как углерод, внешняя оболочка имеет одну  $2s$ -орбиту и три  $2p$ -орбиты, на каждой из которых может находиться пара электронов с противоположными спинами, так что формируется октет. (При образовании четырех тетраэдрических ковалентных связей четыре орбиты второй оболочки гибридизируются, образуя четыре тождественных гибридных  $sp$ -орбиты.) Образованием четырех ковалентных связей — при каком угодно соотношении простых и кратных связей — в некотором смысле завершается образование октета, заполняются все орбиты второй оболочки, и на этом все кончается.

Напротив, у кремния внешней является третья оболочка. Когда в результате химических взаимодействий заполняются одна  $3s$ -орбита и три  $3p$ -орбиты, атом приобретает некоторую стабильность, поскольку его электронная конфигурация, хотя и несколько нарушенная тем, что атомные орбиты становятся орбитами молекулы, приближается к конфигурации инертного газа аргона. Однако образование октета электронов еще не насыщает третью оболочку. Последняя обладает пятью дополнительными  $3d$ -орбитами, на которые могут быть помещены еще 5 пар электронов. Это означает, что хотя для третьей оболочки, когда она является внешней, стабильное число электронов равно 8, как и в аргоне, однако при появлении четвертой оболочки число электронов в третьей оболочке увеличивается до 18, подобно тому как это имеет место в четвертом периоде для элементов от цинка до криптона. После того как атом кремния, образовав четыре ковалентные связи, фактически укомплектовал свой октет, его внешняя оболочка способна еще принимать дополнительные электроны на незаполненные  $3d$ -орбиты.

Цепи кремния особенно чувствительны к молекулам малого размера, имеющим неподеленные пары электронов. Относительно большие межатомные расстояния в цепях кремния (см. выше), по-видимому, дают таким молекулам возможность подходить достаточно близко для того, чтобы их неподеленные пары электронов занимали свободные орбиты, разрывая цепи. Сходный характер носит действие таких молекул на связи между кремнием и атомами, отличными от него. В то время, например, как метан ( $\text{CH}_4$ ) устойчив к воде и гидроксиду натрия, силан ( $\text{SiH}_4$ ) вступает с ними в реакцию, образуя силикат натрия и газообразный водород ( $\text{SiH}_4 + 2\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Na}_2\text{SiO}_3 + 4\text{H}_2$ )<sup>1</sup>.

Таким образом, мы можем указать три серьезные причины, по которым кремний непригоден в качестве основы для формирования организмов. Во-первых, он образует как с самим собой, так и с другими атомами связи значительно более слабые, чем  $\text{C}-\text{C}$ -связи. Во-вторых, его неспособность к образованию кратных связей приводит к возникновению гигантских инертных полимеров с ковалентными связями, что почти полностью выключает его из кругооборота веществ в природе. В-третьих, нестойкость цепей кремния и его соединений в присутствии кислорода, аммиака и воды уже сама по себе достаточна, чтобы определить непригодность кремния в качестве материала для построения живых систем. Я не могу представить себе вообще жизнь без воды и сколько-нибудь высокое развитие ее без кислорода; но это а priori исключает возможность того, чтобы химический состав живых организмов базировался на кремнии.

В этом отношении фосфор и сера, напротив, обладают особыми преимуществами. Я имею здесь в виду те их свойства, которые дают им возможность выполнять в организмах их наиболее ясно выраженную функцию агентов переноса групп и энергии. Конечно, они несут в организмах и другие функции, но никакие другие функции не предъявляют таких специфических требований, которым только эти элементы удовлетворяют в наибольшей степени.

Два свойства особенно должны благоприятствовать функциям такого рода: это, во-первых, способность к образованию самых разнообразных типов связей с малым и большим энергетическим потенциалом, т. е. с надлежащей дозировкой энергии; во-вторых, внутренняя нестабильность связей, облегчающая обмен. Первое свойство относится к области термодинамики.

<sup>1</sup> Это — пример так называемой нуклеофильной атаки, и ион гидроксила служит здесь типичным нуклеофильным реагентом. Я избегаю в настоящей статье этой специальной терминологии, чтобы сконцентрировать внимание на самих явлениях.

Что касается второго, то термодинамика устанавливает здесь только пределы; вопрос же о том, что происходит фактически, относится к другой области — к области механизмов и кинетики реакций. Обсуждая специальные преимущества фосфора и серы, мы будем иметь в виду главным образом эту последнюю сторону проблемы.

Термодинамический аспект процессов переноса энергии и групп — вопрос о «низкоэнергетических» и «высокоэнергетических» (макроэргических) связях, как их обычно называют биохимики, — тщательно изучался в последние двадцать лет, после того как Липман [14] впервые сформулировал эту проблему [7, 9—12, 16, 21]. Сейчас уже всем ясно, что эти термины не отражают сути, потому что мы имеем здесь дело не с энергией связи в строгом смысле слова, а с изменением свободной энергии, сопровождающим реакцию переноса, т. е. с разностью между величиной свободной энергии реагентов и свободной энергии продуктов реакции. При любых заданных условиях это изменение свободной энергии представляет собой сумму изменений резонансной стабилизации, ионизации, электростатических сил — словом, всех следствий реакции, протекающей в данных специальных условиях. В этом смысле «низкоэнергетические» и «высокоэнергетические» соединения характеризуются изменениями стандартной свободной энергии, сопровождающими гидролиз той или иной частной связи. Значения  $\Delta F^\circ$  от  $-1$  до  $-3$  ккал/моль характеризуют «низкоэнергетическую» связь, а значения  $\Delta F^\circ$  от  $-5$  до  $-10$  ккал/моль — связь «высокоэнергетическую».

Все разнообразные реакции переноса энергии и групп осуществляются в биологических системах органическими фосфатами. Сера образует три типа «высокоэнергетических» комплексов: один из них составляют ациловые эфиры тиолов (например, ацетил-КоА), другой — смешанные ангидриды фосфорной и серной кислот (например, аденозинфосфорилсульфат в реакциях сульфирования [15]) и третий — соединения сульфония (например, S-аденозилметионин в реакциях метилирования [1, 2]). Этот короткий список почти полностью исчерпывает все известные категории «высокоэнергетических» соединений. К ним нужно прибавить очень небольшой пока класс ацилимидазолов, в которых ацильная группа связана с атомом азота [23, 24], и чрезвычайно важный класс активированных аминокислот, в которых карбоксильная группа аминокислоты связана эфирной связью с 2'- или 3'-ОН-группой рибозы концевой адениловой кислоты транспортной РНК [20, 25, 80]. Насколько мне известно, только в этих двух случаях перенос групп осуществляется без участия соединений фосфора или серы.

Что же определяет специфическую роль серы и фосфора в организме? Или, иначе (вводя вопрос в общие рамки наших рассуждений), каковы особые свойства серы и фосфора (которых лишены их предшественники в периодической системе — кислород и азот), позволяющие им осуществлять их функции?

Я думаю, что ответ на этот вопрос может быть намечен в трех взаимосвязанных между собой направлениях: во-первых, S и P образуют, вообще говоря, более слабые связи, чем O и N. Во-вторых, благодаря наличию 3d-орбит S и P могут образовывать больше четырех ковалентных связей. В-третьих, среди элементов третьего периода только S и P сохраняют способность образовывать кратные связи.

Рассмотрим первое из упомянутых свойств фосфора и серы. Межатомные расстояния в случае ковалентных связей, образуемых S и P, больше, чем в случае связей, образуемых O и N. Мы имеем право делать такие сопоставления только на сравнимых молекулах, так как длина каждой отдельной связи несколько варьирует в зависимости от структуры всей

молекулы. Это можно видеть из сопоставления радиусов ковалентных связей (табл. 2), как это делает Полинг [19]. Межатомные расстояния связанных атомов, полученные сложением соответствующих радиусов связи, будут достоверными для таких молекул, в которых для данного атома число ковалентных связей соответствует его положению в периодической системе (т. е. четыре для С, два для О, три для Р и т. д.). При этом связи не должны иметь слишком сильно выраженного ионного характера и порядок их не должен сильно отличаться от целого числа.

Таблица 2

## Радиусы ковалентных связей

Элемент	Радиус связи, Å		Элемент	Радиус связи, Å	
	простая связь	двойная связь		простая связь	двойная связь
С	0,772	0,667	Si	1,17	1,07
N	0,74	0,62	P	1,10	1,00
O	0,74	0,62	S	1,04	0,94

Вообще говоря, бóльшим радиусам связей, характерным для элементов третьего периода, соответствует образование более слабых связей (т. е. связей с более низкой энергией) по сравнению с элементами второго периода. Мы видели уже это прежде при сравнении связей Si — Si и С — С. В табл. 3 приведены в качестве примера значения энергии связей, образуемых этими атомами с водородом [19, стр. 85].

Таблица 3

## Энергии связей

Связь	Энергия связи, ккал/моль	Связь	Энергия связи, ккал/моль
С—Н	98,8	Si—Н	70,4
N—Н	93,4	P—Н	76,4
O—Н	110,6	S—Н	81,1

Таким образом, первый пункт нашей аргументации сводится к тому, что при переходе от второго периода к третьему мы переходим, вообще говоря, к более слабым связям, которые по своей природе более доступны атаке и легче участвуют в реакциях расщепления и обмена.

Переходим ко второму пункту. Говоря о кремнии, мы уже отметили, что элементы третьего периода, помимо *s*- и *p*-орбит, обладают еще и *d*-орбитами и, таким образом, имеют места для размещения электронов сверх нормального октета внешней оболочки. Это свойство в наибольшей мере отличает элементы S и P от их предшественников во втором периоде. На пяти *3d*-орбитах в атомах S и P могут быть размещены 5 пар электронов. Однако возможности образования стабильных связей у этих элементов, по-видимому, более ограничены. Обычно фосфор образует не более пяти ковалентных связей (например, в  $\text{PCl}_5$ ), а сера — не больше шести (например, в  $\text{SF}_6$ ). При некоторых способах формального описания предпочитают изображать эти молекулы иначе. Однако существенно то, что, как бы мы ни изображали

эти молекулы, они свидетельствуют о наличии у S и P свойств, отсутствующих у атомов N и O, которым не свойственно приобретать такие значения валентности в каких-либо молекулах.

Можно ожидать, стало быть, что, так же как в соединениях кремния, наличие у атомов S и P незанятых  $3d$ -орбит облегчает атаку их молекулами, имеющими неподделенные пары электронов; эти неподделенные пары в промежуточном состоянии занимают  $3d$ -орбиты; в результате протекает реакция обмена.

Наконец, среди элементов третьего периода только сера и фосфор сохраняют тенденцию к образованию кратных связей, столь характерную для углерода, азота и кислорода. Поскольку раньше мы указали, что кремний не обладает в заметной степени этой способностью, представляется интересным выяснить, почему она столь характерна для серы и фосфора.

Тенденция элементов к образованию кратных связей представляется мне связанной каким-то образом с их малой величиной. Я не мог найти в литературе ясной формулировки этой точки зрения и не могу сам сформулировать ее. Коулсон [4, стр. 178] объясняет «тот экспериментальный факт, что кратные связи образуют практически лишь элементы двух первых рядов периодической системы», тем, что по мере увеличения размеров атомов значительно возрастают силы отталкивания между неспаренными электронами. Если считать, что связь образуется за счет пары электронов, принадлежащих обоим атомам, то для образования связи необходимо достаточно тесное сближение атомов. При таких обстоятельствах электроны, не участвующие в создании связи, сильно отталкиваются друг от друга, и чем больше число таких электронов, тем сильнее будет их взаимное отталкивание. Этим объясняют относительную непрочность связей между более тяжелыми элементами<sup>1</sup>. Кратная связь вызывает еще более сильное отталкивание, так как она требует еще большего сближения атомов, чем в случае простой связи. По этой причине образование кратных связей наблюдается только для атомов с малым ядром и с относительно малым числом электронов.

Этим, однако, дело, по-видимому, не ограничивается. Из сказанного следовало бы, что в ряду Si, P, S как сила связей, так и тенденция к образованию кратных связей должны последовательно уменьшаться, поскольку в этом ряду число электронов, не принимающих участия в образовании связей, а стало быть, и силы отталкивания последовательно возрастают; между тем фактически имеют место обратные соотношения. Оказалось, что значения энергии простых связей равны для связи Si — Si — 42,2, для P — P — 51,3, для S — S — 50,9 и для Cl — Cl — 58,0. Кроме того, тенденция к образованию кратных связей выражена у атомов S и P сильнее, а не слабее, чем у Si.

Все это может означать, что тенденция к образованию кратных связей может обуславливаться только малой величиной атомного радиуса. Если это верно, то тогда возникает ряд интересных соображений. Радиусы атомов с возрастанием порядкового номера элемента не возрастают. Напротив,

<sup>1</sup> Считают также, что сильное отталкивание между электронами, не образующими связи, служит причиной аномально низких значений энергии связей N — N (38,4 ккал/моль), O — O (33,2) и F — F (36,6). Атомы N, O и F могут образовывать прочные связи с другими элементами частично и потому, что они обладают ярко выраженной электроотрицательностью и их связи в большой мере имеют тенденцию приобретать ионный характер. Энергия связей P — P (51,3 ккал/моль), S — S (50,9) и Cl — Cl (58,0) относительно велика, потому что наличие у этих элементов  $3d$ -орбит компенсирует межатомные силы отталкивания, которые могли бы быть очень значительными благодаря наличию большого числа электронов, не принимающих участия в образовании связей (ср. [19, стр. 114]).

внутри каждого периода они уменьшаются, а при переходе к следующему периоду возрастают, приобретая новый порядок величины. Это объясняется тем, что радиус атома определяется в основном числом электронных оболочек, которое, конечно, остается постоянным для данного периода. Однако на протяжении периода возрастающий положительный заряд ядра все теснее стягивает к себе электроны, и потому в пределах каждого периода атомные радиусы уменьшаются по мере возрастания порядкового номера элемента.

Теперь, зная, что радиусы атомов серы и фосфора *меньше*, чем радиус атомов кремния, мы видим закономерность в том, что эти элементы легче образуют двойные связи, чем кремний. В табл. 4 приведены значения радиусов ковалентных связей для элементов второго и третьего периодов периодической системы [19, стр. 224, 228].

Таблица 4

Сопоставление радиусов ковалентных связей с порядковым номером элемента

Элемент	F	O	N	C	Cl	S	P	Si
Простые связи . .	0,64	0,74	0,74	0,772	0,99	1,04	1,10	1,17
Двойные связи . .	0,60	0,62	0,62	0,667	0,89	0,94	1,00	1,07
Порядковый номер	9	8	7	6	17	16	15	14

Из таблицы следует, что радиусы простых и двойных связей для селена и кремния одинаковы; для брома они несколько меньше. Для всех остальных элементов радиусы связей больше. Такого рода сопоставления позволяют заключить, что фосфор — это элемент, имеющий самые большие (но не самые тяжелые!) атомы, способные с легкостью образовывать кратные связи; последующие же элементы, начиная с кремния, сохраняют лишь в самой незначительной степени тенденции к образованию таких связей.

Ряд авторов придерживается той точки зрения, что в соединении  $\text{H}_3\text{PO}_4$  правильнее предполагать наличие трех простых ковалентных связей P — O и одной донорной связи, чем наличие трех простых и одной двойной связи<sup>1</sup>. Однако такое требование совершенно лишено смысла и очень мало обосновано с теоретической и экспериментальной точек зрения. Я думаю, что отчасти оно возникло вследствие предполагаемой аналогии с азотом, который, образовав три ковалентные связи, как в триметилаmine  $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ , может затем образовывать четвертую донорную связь, как в окиси триметиламина  $(\text{CH}_3)_3\text{N} \rightarrow \text{O}$ .

Однако такая аналогия несостоятельна: в отличие от азота фосфор может образовывать пятую ковалентную связь, принимая пару электронов на одну из своих  $3d$ -орбит. Очевидно, что образование одной двойной связи

<sup>1</sup> См., например, сноску на стр. 114 [10]: «Двойную связь P — O (т. е. связь в фосфорной кислоте) правильнее изображать как «семиполярную» двойную связь:  $\text{P} \rightarrow \text{O}$ ». Ср. это с рассуждениями Полинга [19 (см. стр. 320)], который приходит к заключению, что «данные, которыми мы в настоящее время располагаем, указывают на то, что старые формулы валентных связей... изображающие двойные связи резонирующими между атомами кислорода, что делает их эквивалентными — причем связи носят частично ионный характер, — дают несколько более удовлетворительное представление об ионах (кислородсодержащих кислот)».

в дополнение к трем простым связям вполне возможно в таких условиях. Измерения длины связей показывают, что это лучшая *простая* формула для фосфорной кислоты. Равным образом и для формулы серной кислоты можно представить себе существование двух простых и двух двойных S—O-связей, что соответствует шести валентностям (ср. [19], стр. 240).

Фактически, конечно, ни одна *простая* формула не изображает эти молекулы адекватно. Они представляют собой резонансные гибриды, в которых длина всех связей P—O и S—O значительно уменьшена по сравнению с простыми ковалентными связями. Крукшенк [5] определил величину этого уменьшения для тетраэдрических окси-анионов, элементов третьего периода (табл. 5).

Таблица 5

Длины связей тетраэдрических окси-анионов \*

Ионы	$\text{SiO}_4^{4-}$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{ClO}_4^-$
Простые связи				
Расчет . . . . .	1,76	1,71	1,69	1,68
Опыт . . . . .	1,63	1,54	1,49	1,46
Уменьшение длины связи . . . . .	0,13	0,17	0,20	0,22

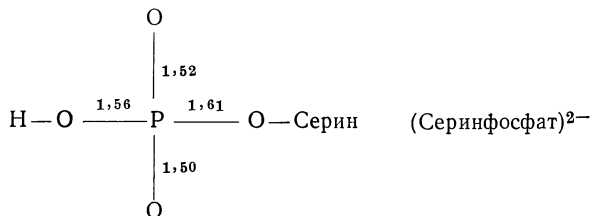
\* По Крукшенку [5]. Длины связей выражены в Å.

Длины простых связей были вычислены здесь по формуле Шомакера — Стивенсона [22], в которую был введен поправочный член, учитывающий частично ионный характер связей, обусловленный различиями в электроотрицательности отдельных атомов. Обнаруживаемое дальнейшее уменьшение длин связей рассматривается как доказательство двойственного характера двойных связей, которые во всех случаях требуют участия *3d*-орбит центрального атома.

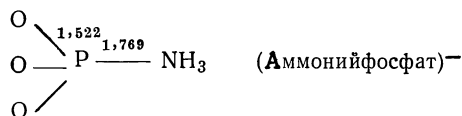
Крукшенк [5] установил также перераспределение длин связей, которое связано с присоединением других атомов или групп к одному или нескольким атомам кислорода в окси-анионах. Он устанавливает в качестве «простого эмпирического правила», что *средняя* длина связи X—O в тетраэдрических ионах  $\text{XO}_4$  остается равной экспериментальным значениям длины, приведенным в табл. 5. Присоединение к O какого-либо атома или группы атомов может увеличивать длину этой X—O-связи на величину до 0,15 Å, но одновременно другие X—O-связи сокращаются так, что средняя длина связей остается постоянной.

Так, например, в тетраэдрическом ионе  $\text{PO}_4^{3-}$  каждая P—O-связь имеет длину 1,54 Å, тогда как в  $\text{H}_3\text{PO}_4$  длина связи P—OH равна 1,57 Å, а длина связей P—O уменьшается до 1,52 Å. Если вместо H к кислороду присоединяется органический радикал, то асимметрия становится значительно большей. Для серинфосфата, например, длины P—O-связей приведены

ниже.



Для сульфатов имеют место такие же соотношения. В ионе  $\text{SO}_4^{2-}$  длины  $\text{S}-\text{O}$ -связей равны  $1,47 \text{ \AA}$ . Связь  $\text{S}-\text{OH}$  длиннее, она равна  $1,56 \text{ \AA}$ , например в  $\text{KHSO}_4$ . Однако в ионе этилсульфата  $(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{O}-\text{SO}_3^-$  длина связи  $\text{S}-\text{O} (\text{C}_2\text{H}_5)$  составляет  $1,603 \text{ \AA}$ , тогда как три связи  $\text{S}-\text{O}$  имеют длину  $1,464 \text{ \AA}$ . Такие же соотношения существуют и в молекулах, в которых атомы  $\text{P}$  фосфатов связаны непосредственно с атомами  $\text{N}$ , как, например, в креатинфосфате и аргининфосфате. В качестве примера приводим распределение длин связей для иона аммонийфосфата.



Таким образом, в замещенных фосфатах и сульфатах связи, длина которых увеличилась вследствие присоединения к кислороду органического или иного радикалов, становятся «открытыми местами»; незанятые  $3d$ -орбиты атомов  $\text{P}$  и  $\text{S}$  представляют собой как бы приманку. Любая молекула, которая может отдавать неподеленную пару электронов, должна находить легкий доступ к ядрам  $\text{S}$  и  $\text{P}$  и легко присоединяться к ним. Такие соединения легко реагируют с водой, с соединениями типа  $\text{KOH}$  или  $\text{RNH}_2$  и тому подобными молекулами; до некоторой степени такой же «уязвимостью» должны обладать все органические соединения серы и фосфора.

Из этих рассуждений следует, что вообще все реакции обмена, в которых участвуют органические соединения  $\text{S}$  и  $\text{P}$ , начинаются — независимо от того, какие дальнейшие перегруппировки следуют за этим, — с присоединения к ядру атомов  $\text{S}$  и  $\text{P}$  неподеленной пары электронов, занимающей свободные  $3d$ -орбиты. Гидролиз  $\text{S}$ - или  $\text{P}$ -связи должен, например, начинаться с присоединения к атому  $\text{S}$  или  $\text{P}$  неподеленной пары электронов кислорода. Учитывая последующие перегруппировки, мы должны ожидать, что в продуктах такого гидролиза гидроксильная группа воды всегда будет оставаться связанной с атомами  $\text{S}$  или  $\text{P}$ .

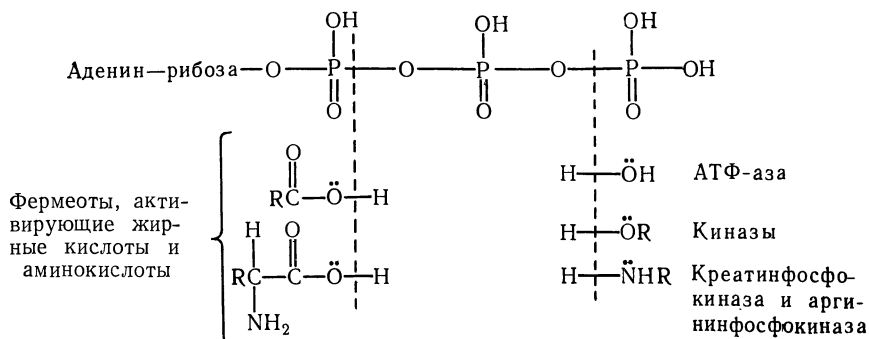
По-видимому, любой ферментативный гидролиз органических фосфатов оканчивается именно таким образом, как это было показано для таких реакций, проведенных с участием  $\text{H}_2\text{O}^{18}$ . Все известные киназные реакции, в которых молекулы со спиртовыми  $\text{OH}$ -группами действуют аналогично воде, также дают этот результат. Во всех подобных реакциях существующие  $\text{P}-\text{N}$ - или  $\text{P}-\text{O}$ -связи разрываются и  $\text{OH}$ -группа или  $\text{OR}$ -группа атакующей молекулы оказывается связанной с атомом  $\text{P}$  (ср. [3]).

Механизм реакций с АТФ, по-видимому, таков же. Здесь ферментативный гидролиз (АТФ-азная реакция) и обменная (киназная) реакция с  $\text{ROH}$  или  $\text{RNH}_2$  разрывают концевую фосфатную связь, причем  $\text{HO}$ -,  $\text{RO}$ - или  $\text{RN}$ -группы остаются связанными с остатком фосфорной кислоты. В другом



важном классе реакций, приводящих к активированию жирных кислот и аминокислот, происходит расщепление АТФ с выделением неорганического пирофосфата; при этом в качестве второго продукта обмена образуются аденилаты жирных кислот или аминокислот.

Во всех этих случаях реакция, вероятно, инициируется присоединением к атому Р неподеленной пары электронов от атомов О или N. Почему эта



атака направлена в одних случаях на первую фосфатную группу, а в других — на конечную, пока еще не ясно. (Случаев переноса пирофосфатных групп до сих пор еще не наблюдали.) Не следует забывать, что все эти реакции являются ферментативными и что ферменты, вероятно, в большой мере определяют место атаки.

По сути дела в этой статье мы лишь начали рассмотрение проблемы. Как бы ни инициировались обменные реакции, описанные выше, они не всегда так просты, как это было описано. В качестве наиболее яркого примера можно указать, что в ацил-S-КоА перенос ацильной группы происходит таким образом, что у атома S остается не неподеленная пара электронов донора, а водород; в качестве конечного продукта образуется HS-КоА. В таких процессах нет ничего загадочного, хотя все они порождают новые проблемы. Механизмы многих ферментативных реакций, проходящих с расщеплением органических фосфатов, были изучены Коном, Кошландом и др. [3]. Неферментативные реакции переноса с участием ацилфосфатов недавно были изучены Ди Сабато и Дженксом [6]. Ясно, конечно, что для понимания реакций переноса ацилимидазолов и образования связи между аминокислотой и рибозой транспортной РНК нужно рассмотреть механизмы, совершенно отличные от тех, которые обсуждались в настоящей статье.

Подведем итоги нашим рассуждениям. Я попытался выяснить, почему именно сера и фосфор были отобраны для участия в переносе групп и энергии в биологических системах. По нашему мнению, это объясняется, во-первых, тем, что атомы этих элементов образуют более «открытые» и обычно более слабые связи, чем их предшественники в периодической системе — атомы кислорода и азота; во-вторых, они имеют  $3d$ -орбиты, дающие им возможность образовывать более четырех валентных связей; в-третьих, они сохраняют характерную для атомов углерода, азота и кислорода способность к образованию кратных связей.

Способность к образованию кратных связей имеет значение главным образом в термодинамике процессов переноса энергии. В частности, в сочетании со способностью образовывать 5 или 6 ковалентных связей это свойство атомов S и P создает разнообразные возможности резонанса среди исходных и конечных продуктов обменных реакций, что значительно увеличивает число и разнообразие энергетических изменений, которые могут при

этом встречаться. Пользуясь прежним выражением, можно сказать, что эти свойства обуславливают адекватную дозировку энергии.

Относительно большая длина и малая прочность связей, образуемых атомами S и P, наряду с их тенденцией к присоединению неподеленных пар электронов на незанятые  $3d$ -орбиты обуславливают присущую этим связям нестабильность и уязвимость для атаки другими молекулами, что и ведет к реакциям обмена.

Я думаю, что выбор серы и фосфора для выполнения специфических функций определяется, как и в случае всех остальных элементов, из которых построены живые системы, их «пригодностью». Из всех элементов периодической системы они, по-видимому, в наибольшей степени обладают свойствами, необходимыми для осуществления процессов переноса групп и энергии. Именно в поисках этих свойств организмы и должны были обратиться от элементов второго к элементам третьего периода периодической системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cantoni G. L., J. Biol. Chem., **204**, 403 (1953).
2. Cantoni G. L., In «Comparative Biochemistry» (M. Florkin and H. S. Mason, eds.), Vol. I, p. 181. Academic Press, New York, 1960.
3. Cohn M., In Symposium on Enzyme Reaction Mechanisms, J. Cellular Comp. Physiol., **54**, Suppl. 1, 17 (1959).
4. Coulson C. A., «Valence», Oxford Univ. Press, London and New York, 1953.
5. Cruickshank D. W. J., J. Chem. Soc., p. 5486 (1961).
6. DiSabato G., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4393 (1961).
7. George P., Rutman R. J., Progr. in Biophys. and Biophys. Chem., **10**, 2 (1960).
8. Hecht L. I., Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **45**, 505 (1959).
9. Hill T. L., Morales M. F., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1656 (1951).
10. Huennekens F. M., Whiteley H. R., In «Comparative Biochemistry» (M. Florkin and H. S. Mason, eds.), Vol. I, p. 107. Academic Press, New York, 1960.
11. Kalckar H. M., In «Currents in Biochemical Research» (D. E. Green, ed.), p. 229. Interscience, New York, 1946.
12. Kalckar H. M., Nature, **160**, 143 (1947).
13. Lewis G. N., «Valence», Chemical Catalog Co., New York, 1923.
14. Lipmann F., Advances in Enzymol., **1**, 99 (1941).
15. Lipmann F., Science, **128**, 575 (1958).
16. Oesper P., Arch. Biochem., **27**, 255 (1950).
17. Oesper P., In «Phosphorus Metabolism» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), Vol. I, p. 523. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1951.
18. Pauling L., «General Chemistry», 2nd ed. W. H. Freeman, San Francisco, 1959.
19. Pauling L., The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 1960.
20. Preiss J., Berg P., Ofengand E. J., Bergmann F. H., Diekmann M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **45**, 319 (1959).
21. Rutman R. J., George P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **47**, 1094 (1961).
22. Schomaker V., Stevenson D. P., J. Am. Chem. Soc., **63**, 37 (1941).
23. Stadtman E. R., In «Mechanisms of Enzyme Action» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 581. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1954.
24. Stadtman E. R., White F. H., J. Am. Chem. Soc., **75**, 2022 (1953).
25. Zachau H. G., Acs G., Lipmann F., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **44**, 885 (1958).

# БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ

В. М. ИНГРЭМ

В результате открытия Полингом, Итано, Синджером и Уэллсом [23] аномального поведения гемоглобина серповидных клеток при электрофорезе и выяснения схемы наследования этой аномалии [3, 22] было получено химическое доказательство влияния генных мутаций на биохимическую структуру. Мысль о существовании такой причинной взаимосвязи, разумеется, не нова, однако это исследование послужило первым конкретным примером. Когда же в итоге было показано [15, 17], что аномальные физические свойства гемоглобина при серповидноклеточной анемии и других мутантных гемоглобинов можно сопоставить со специфическим замещением аминокислот, то природа этих мутаций была охарактеризована еще более детально (табл. 1). В настоящее время влияние генных мутаций на первичную структуру белков исследуется на ряде систем как у млекопитающих (бычий  $\beta$ -лактоглобулин), так и особенно на бактериальных системах, например на щелочной фосфатазе [20] и триптофансинтетазе у *Escherichia coli* [10, 27]. В этой статье мы попытаемся сделать некоторые выводы из имеющихся довольно скудных экспериментальных данных.

Таблица 1

Сводка известных аминокислотных замещений в аномальных гемоглобинах человека

Гемоглобин	$\alpha$ -Цепь								Источник данных
	1	2	16	30	57	58	68	141	
Нб А	Вал.	Лей...	Лиз... <sup>+</sup>	Глу... <sup>-</sup>	Гли.	Гис... <sup>+</sup>	АспNH <sub>2</sub> .....	Арг <sup>+</sup>	
Нб I			Асп. <sup>-</sup>						[21]
Нб G <sub>Гонолулу</sub>			ГлуNH <sub>2</sub>						[28]
Нб Норфолк					Асп.				[1]
Нб МБостон					Тир.				[7]
Нб G <sub>Филадельфия</sub>							Лиз. <sup>+</sup>		[12]

Продолжение

Гемоглобин	α-Цепь										Источник данных	
	1	2	3	6	7	26	63	67	121	146		
Нб А	+	Вал.	Гис.	Лей...	-	-	-	+	-	+		
Нб S				Глу.	Глу.	Глу...	Гис...	Вал.....	Глу.....	Гис		[15]
Нб С			+	Лиз.								[12, 13]
Нб G <sub>Сан-Хосе</sub>					Гли.							[11]
Нб Е						+	Лиз.					[14]
Нб M <sub>Саскатун</sub>							Тир.					[7]
Нб M <sub>Милуоки</sub>								Глу.				[7]
Нб D <sub>β</sub> Пенджаб (=D <sub>γ</sub> )										ГлуNH <sub>2</sub>		[29]

В наше время серповидноклеточная анемия остается единственной наследственной болезнью человека, при которой все (или большую часть) клинических проявлений удается с достаточной определенностью связать с влиянием генной мутации на структуру белка. Фактически причиной этой болезни является специфическое аминокислотное замещение, а именно замена в белковой молекуле гемоглобина глутаминовой кислоты валином. Эта поистине «молекулярная болезнь» (термин Полинга) представляет собой явление, которое подробно рассматривается в другой статье этого сборника. Несомненно, в будущем могут обнаружиться и другие четкие случаи «молекулярных болезней», но пока еще не ясно, какая часть наследственных заболеваний может быть объяснена таким простым способом. В настоящее время считают, что в основе большинства наследственных заболеваний лежит изменение в первичной структуре белка, однако это изменение может не проявиться непосредственно, а выявиться лишь в результате нарушений последовательности биохимических реакций. Вероятно также, что многие наследственные болезни окажутся обусловленными тем, что белок, имеющий нормальную структуру, либо полностью отсутствует, либо вырабатывается в недостаточном количестве.

В связи с этим интересно отметить работу Смитиза [26], который считает, что ему удалось доказать существование делеции, захватывающей два цистрона, которая приводит к выпадению нескольких аминокислот с последующим соединением оставшихся частей обеих пептидных цепей. Это исследование было проведено на гаптоглобулинах из сыворотки крови человека.

Проявление мутаций гена в виде определенных химических изменений белков имеет еще и другое очень важное эволюционное значение. Эти мутации поставляют материал для «микрорэволюции», снабжая организм измененными белками или ферментами, которые могут быть неблагоприятны или благоприятны в зависимости от направления естественного отбора. Хотя все обнаруженные до сих пор изменения (см. табл. 1) являются мельчайшими мыслимыми изменениями первичной структуры белка, возможны и весьма вероятны и другие типы изменений.

Все эти доводы основаны на допущении, что последовательность аминокислот белка, т. е. его первичная структура, определяет характер свертыва-

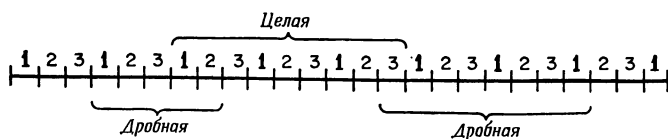
ния пептидной цепи и тем самым химическую природу поверхности белка, с которой связаны его наиболее важные биохимические свойства. Вероятно, это допущение справедливо для белков с небольшим молекулярным весом, скажем, до 20 000, независимо от того, стабилизируется ли его окончательная структура дисульфидными мостиками. Хабер и Анфинсен [9] показали, что тирозин — тирозиновое взаимодействие влияет на процесс свертывания и реактивации восстановленной рибонуклеазы поджелудочной железы. Такой простой механизм становится все менее вероятным по мере возрастания молекулярного веса и степени сложности белка, так как большая молекула, конечно, имеет целый ряд энергетически эквивалентных третичных структур, которые, однако, отнюдь не эквивалентны по своей биологической специфичности. Чем же определяется преимущество тех или иных возможных конфигураций? Вполне вероятно, что оно зависит от взаимодействия свертывающейся определенной цепью с каким-то другим белком, который сам генетически детерминирован, или с каким-нибудь простым субстратом, синтезируемым генетически детерминированными ферментами.

Кроме того, первичное изменение в мутировавшем белке может сказаться не только на самом этом белке, но и на других, с которыми он взаимодействует. В генетике хорошо известны случаи, когда отдельная мутация дает одновременно целый спектр эффектов. Такое явление называется *плейотропией*. Молекулярный механизм плейотропии может заключаться во взаимодействиях отдельного мутировавшего белка с рядом различных биохимических систем.

Таким образом, возможны весьма тонкие и далеко простирающиеся генные эффекты. В этой области молекулярной генетики сейчас стремятся сосредоточить усилия на исследовании очень простых бесклеточных систем, на которых можно ясно проиллюстрировать некоторые общие принципы. Однако если бы мы задалась целью понять в деталях молекулярную основу процесса эволюции или патогенеза молекулярных болезней — явлений принципиально сходных, то нам пришлось бы отказаться от этой простоты. Достаточно указать на недавнюю работу по комплементарности [6] или на продолжающееся обсуждение различных форм талассемии [18, 19, 24].

До сих пор мы говорили только о биохимических проявлениях «точечных мутаций», т. е. таких мутаций, которые вызывают лишь замещение одной аминокислоты на другую. Возможны и другие, более обширные изменения, однако, за исключением случая, описанного Смитизом [26], они еще не наблюдались. Сравнение последовательностей аминокислот в  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепях гемоглобина человека позволило Брауницеру и др. [4] заметить значительное сходство обеих последовательностей. Это навело на мысль о том, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина развились из общего предшественника и что различие между ними возникло в результате мутаций вышеупомянутого типа [4, 8, 17]. Но одного этого предположения оказалось недостаточно. Чтобы получить максимальное соответствие между последовательностями обеих цепей, Брауницеру пришлось допустить, что несколько аминокислот в каждой цепи не имеют партнеров в другой цепи, т. е. существуют «бреши». Разумеется, никаких реальных «брешей» не существует, так как полипептидные цепи представляют собой непрерывные структуры с ковалентными связями. Возможно, что «бреши» указывают на места, где аминокислоты, присутствовавшие в первоначальной цепи, были утрачены в ходе эволюции. Такая утрата могла произойти из-за потери некоторого количества генетического материала. Сходное явление, приводящее к потере функции, хорошо известно генетикам под названием делеции. В случае гемоглобина делеция имеет меньшую протяженность и функция утрачивается только частично.

Исходя из того, что дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) генетического материала содержит в себе код для специфической последовательности аминокислот в гемоглобинах, мы приходим к выводу о существовании делеций двух типов: *целых делеций* в ДНК (фиг. 1), которые простираются точно от начала одной кодовой единицы до конца той же самой или одной из следующих за ней кодовых единиц и поэтому не создают «бессмыслицы», и *дробных делеций*, которые либо начинаются, либо оканчиваются *внутри* кодовой единицы. Эти последние могут либо оставить «бессмыслицу» на одном из двух концов, что проявится в разрыве пептидной цепи или в прекращении белкового синтеза, либо приведут к особой форме мутагенеза, происходящего по механизму, сходному с механизмом, предложенным Криком



Фиг. 1. Диаграмма, представляющая «триплетный код» ДНК.

Скобки указывают «целые» и «дробные» делеции в генетическом материале.

и др. [5]; в таком случае код после делеции может читаться совершенно иначе, поскольку изменяется исходная точка, от которой начинается считывание. С этого места синтезируемая часть пептидной цепи будет очень странной, не имеющей никакого сходства с цепью гемоглобина. В обоих случаях дробные делеции вредны и поэтому элиминируются в ходе эволюции. «Бреши», найденные в настоящее время в цепях гемоглобина, вероятно, возникли в результате целых делеций, так как и перед «брешами» и после них существует много гомологичных последовательностей аминокислот.

Что можно сказать о добавлениях к генетическому материалу, приводящих (в отличие от делеций) к увеличению длины пептидных цепей? Мы не можем найти ни одного биохимического примера, иллюстрирующего это явление, ни среди гемоглобинов человека, ни где-либо еще, но мы могли бы с таким же успехом объяснить «бреши» в гемоглобиновых цепях Браунциера и как добавление аминокислот в гомологичную цепь.  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина человека не равны по длине (141 и 146 остатков), но их аминокислотные последовательности на обоих концах одинаковы. Такое положение могло бы возникнуть как в результате последовательных делеций, так и в результате появления дополнительного генетического материала в гене. Если бы первое объяснение «брешей» оказалось правильным, то можно было бы заключить, что действие эволюции состоит в изменении и сокращении цепей и что все первоначальные цепи были длиннее их современных потомков. Это маловероятно. Скорее можно предположить, что происходили также и добавления, причем добавлялись *целые* кодовые единицы.

Мы рассмотрели некоторые пути, по которым генные мутации могут изменять, прямо или косвенно, структуру белков, составляя тем самым основу эволюционных изменений. Биохимические исследования систем, иллюстрирующих эти процессы, только что начались, и в этой области еще многое остается сделать.

Возможно, одну из наиболее увлекательных проблем молекулярной биологии представляет собой выяснение механизма, по которому осуществляется активация гена или сохранение его в бездействующем состоянии. Хотя эти явления, без сомнения, имеют общее фундаментальное значение для проблемы клеточной дифференцировки, их можно просто пояснить на примере системы гемоглобинов. По-видимому, все клетки позвоночных

животных снабжены *генетическим* аппаратом, необходимым для создания гемоглобина, однако синтез гемоглобина происходит только в незрелых красных кровяных клетках. Вместе с тем эти клетки синтезируют почти исключительно гемоглобин и лишь небольшие количества других веществ. Механизм выглядит еще более примечательным, если учесть, что плод человека синтезирует зародышевый гемоглобин, отличный от гемоглобина взрослого человека и требующий для своего образования участия других генов.

Зародышевый гемоглобин:  $(F) = \alpha_2^A \gamma_2^F$ ,

Гемоглобин взрослого человека:  $(A) = \alpha_2^A \beta_2^A$ ,

где  $\alpha^A$ ,  $\beta^A$ ,  $\gamma^F$  — химические символы, обозначающие нормальные цепи  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  этих гемоглобинов (см. работу Шредера [25]). Необходимо отметить, что  $\alpha$ -цепи являются общими для обоих белков. Они детерминируются одним и тем же геном. Предполагают, что первичная структура каждой из этих цепей регулируется соответствующим структурным геном.

Генотип

$$\frac{\alpha^A \beta^A \gamma^F}{\alpha^A \beta^A \gamma^F}$$

потенциально содержит всю информацию, необходимую для синтеза как гемоглобина А, так и гемоглобина F. Тем не менее на ранней стадии зародыш производит только  $\alpha_2^A \gamma_2^F$ , а нормальный взрослый индивидуум — исключительно  $\alpha_2^A \beta_2^A$ . Переключение от синтеза зародышевого белка к синтезу белка взрослого индивидуума — явление, отнюдь не ограничивающееся гемоглобинами, — очевидно, затрагивает лишь структурные гены  $\gamma$  и  $\beta$ . Механизм, с помощью которого осуществляется такое переключение, интенсивно исследуется экспериментально, так как решение этой загадки поможет нам глубоко заглянуть в механизм клеточной дифференцировки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Baglioni C., Federation Proc., 20, Pt. I, p. 254 (1961).
2. Baglioni C., Ingram V. M., Nature, 189, 465 (1961).
3. Beet E. A., Ann. Eugenics, 14, 274 (1949).
4. Braunitzer G., Hilschmann N., Rudloff V., Hilse K., Liebold B., Müller R., Nature, 190, 480 (1961).
5. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., Nature, 192, 1227 (1961).
6. Fincham J. R. S., Advances in Enzymol., 22, 1 (1960).
7. Gerald P. S., Efron M. L., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 47, 1758 (1961).
8. Gratzer W. B., Allison A. C., Biol. Revs., 35, 459 (1960).
9. Haber E., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem. (1962) (в печати).
10. Helinski D., Yanofsky C., Federation Proc., 20, Pt. 1, 255 (1961).
11. Hill R. L., Schwartz H. C., Nature, 184, 641 (1959).
12. Hunt J. A., Ingram V. M., Nature, 182, 1062 (1958).
13. Hunt J. A., Ingram V. M., Nature, 184, 640 (1959).
14. Hunt J. A., Ingram V. M., Nature, 184, 870 (1959).
15. Ingram V. M., Nature, 180, 326 (1957).
16. Ingram V. M., In «Genetics» (H. E. Sutton, ed.), pp. 65—176. Josiah Macy Jr. Foundation, New York, 1960.
17. Ingram V. M., Nature, 189, 704 (1961).

18. Ingram V. M., Stretton A. O. W., Nature, **184**, 1903 (1959).
19. Itano H. A., Pauling L., Nature, **191**, 398 (1961).
20. Levinthal C., In «Genetics» (H. E. Sutton, ed.), p. 100. Josiah Macy Jr. Foundation, New York, 1960.
21. Murayama M., Federation Proc., **17**, Pt. I, p. 78 (1960).
22. Neel J. V., Science, **110**, 64 (1949).
23. Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Wells I. C., Science, **110**, 543 (1949).
24. Rucknagel D. L., Neel J. V., Progress in Medical Genetics, p. 178 (A. G. Steinberg, ed.), Vol. 1, Grune and Stratton, New York, 1961.
25. Schroeder W. A., Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, **17**, 322 (1959).
26. Smithies O., Second Intern. Conf. Human Genetics, Rome (1961).
27. Yanofsky C., Crawford J. P., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., **45**, 1016 (1959).
28. Hill (неопубликованные данные).
29. Baglioni (неопубликованные данные).



# ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

С. О Ч О А

## І. ВВЕДЕНИЕ

Бидл и Татум в работе, ставшей классической, впервые показали, что гены определяют синтез специфических ферментов в отношении 1 : 1. Вслед за этим Касперссон и Браше привели убедительные свидетельства в пользу того, что рибонуклеиновая кислота (РНК) служит посредником в передаче генетической информации от дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) к белку. Исследования Эвери, Маклеода и Маккарти, с одной стороны, и Хочкиса — с другой, показали, что трансформация у бактерий вызывается ДНК, и тем самым окончательно доказали, что ДНК представляет собой генетический материал. Эта точка зрения получила дальнейшее подтверждение в работе Херши и др., показавших, что заражение бактерии бактериофагами, ведущее к размножению фага внутри клетки, осуществляется путем впрыскивания фаговой ДНК в тело бактериальной клетки.

Для РНК-содержащих вирусов, таких, например, как вирус табачной мозаики (ВТМ) и другие вирусы растений, а также вирусов полиомиелита и гриппа генетическим материалом служит РНК. Это было показано Шраммом и его коллегами, а также Френкель-Конратом с сотрудниками. Их опыты доказали, что РНК вируса табачной мозаики обладает инфекционными свойствами и вызывает образование вирусных частиц в клетках растения. За этой работой последовали изящные исследования Гирера и Шрамма, Френкель-Конрата и др., в которых было показано возникновение мутантов ВТМ в результате обработки РНК этого вируса азотистой кислотой. Эта обработка приводит к дезаминированию пуриновых и пиримидиновых оснований, несущих  $\text{NH}_2$ -группы; так, например, цитозин при этом превращается в урацил.

После того как в лабораториях в Тюбингене и Беркли была определена последовательность аминокислот в молекуле белка, образующего оболочку частицы ВТМ, оказалось возможным получить такие индуцированные азотистой кислотой мутанты ВТМ, белок которых отличается от белка вируса дикого типа заменой одной из аминокислот на другую, например пролина на лейцин и треонина на серин. Таким образом, дезаминирование одного основания РНК вызывает замещение одной аминокислоты другой. Эти опыты еще раз подтвердили идею о том, что генетический код заключается в специфической последовательности нуклеотидов и что последовательность трех или более нуклеотидов кодирует включение в белок специфической аминокислоты. В настоящее время большой интерес представляет выяснение того, каким образом код ДНК определяет продуцирование специфического

белка. Для более детального исследования этой проблемы будет полезен краткий обзор современных данных о механизмах репликации генетического материала и о синтезе белка.

## II. РЕПЛИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Работа Уотсона и Крика [35], в которой они на основе данных рентгеноструктурного анализа установили молекулярную структуру ДНК, имела первостепенное значение для понимания способа репликации генетического материала. Уотсон и Крик пришли к выводу, что ДНК состоит из двух спирализованных нитей, переплетенных между собой и удерживаемых вместе водородными связями, действующими между спаренными комплементарными основаниями (аденин — тимин и гуанин — цитозин). Это согласовалось с результатами Чаргаффа, который показал, что в ДНК, выделенной из любого источника, количество аденина равно количеству тимина, количество гуанина — количеству цитозина, а число пуринов равно числу пиримидинов [7]. Предположение Уотсона и Крика получило экспериментальное подтверждение несколькими годами позднее, когда было обнаружено [34], что синтетические гомополинуклеотиды, полученные с помощью полинуклеотидфосфорилазы [25], например полиадениловая и полиуридиловая кислоты, взаимодействуют в растворе, образуя двухцепочечные спиральные структуры, удерживаемые водородными связями между комплементарными парами оснований: аденином и урацилом.

Уотсон и Крик постулировали, что удвоение генетического материала, т. е. ДНК, происходит в результате разделения ее нитей и последующего образования двух новых нитей вокруг каждой исходной цепи. Это предположение получило поразительное подтверждение в работе Меселсона и Шталя [22]. Эти авторы выращивали *Escherichia coli* в среде, обогащенной  $N^{15}$ , в результате чего синтезировалась «тяжелая», меченная  $N^{15}$  ДНК. Эта имеющая большую плотность ДНК могла быть отделена от «легкой» ДНК, содержащей  $N^{14}$ , и от ДНК промежуточной плотности путем равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия. Когда полностью меченые клетки помещали затем в среду, содержащую  $N^{14}$ , и исследовали лизаты через последовательные промежутки времени, то оказывалось, что в течение менее чем одной генерации накапливались молекулы ДНК, меченные только наполовину, количество же полностью меченных молекул ДНК уменьшалось. По прошествии одной генерации вся бактериальная ДНК состояла из меченных наполовину гибридных молекул. После двух генераций меченные наполовину и немеченные молекулы присутствовали в равных количествах. Это указывало на то, что после одной генерации каждая молекула ДНК состояла из одной тяжелой и одной обычной нити, в то время как после двух генераций две из четырех молекул содержали по одной тяжелой и одной обычной нити, а две другие содержали только обычные нити ДНК. Открытие полимеразы ДНК дало возможность объяснить эти результаты с точки зрения процессов, протекающих на уровне ферментов. Корнберг [16] и его сотрудники показали, что этот фермент синтезирует ДНК из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов с освобождением неорганического пирофосфата. Одного лишь присутствия всех четырех трифосфатов недостаточно. Фермент требует ДНК в качестве затравки. Затравка реплицируется, производя (посредством механизма образования пар) ДНК с тем же самым составом оснований и последовательностью. ДНК функционирует, следовательно, как матрица для своей собственной реплика-

ции. При этом каждая нить создает комплементарную, в результате чего после одного цикла синтеза образуются две двухцепочечные молекулы.

### III. СИНТЕЗ БЕЛКА

В лаборатории Замечника [38] было установлено, что рибонуклеопротеидные частицы, или рибосомы, связанные с эндоплазматической сетью, являются местом синтеза белков. Последующие опыты с бесклеточными системами показали, что для синтеза белка необходимы рибосомы, надосадочная фракция, аденозинтрифосфат (АТФ) или АТФ-генерирующая система, а также  $Mg^{++}$ . Потребность в АТФ говорила о том, что перед тем, как образовать пептидные связи, аминокислоты должны быть активированы. Действительно, вскоре Хогленд обнаружил, что в надосадочной жидкости, получающейся при центрифугировании, содержатся ферменты, активирующие аминокислоты. В присутствии АТФ,  $Mg^{++}$ , аминокислот и гидроксил-амин эти ферменты образуют гидроксаматы аминокислот. Этому процессу сопутствует расщепление АТФ до аденозин-5'-фосфата (АМФ) и неорганического пирофосфата. В отсутствие гидроксил-амин реакция приводит к образованию комплексов аминоксил-аденилат — фермент с освобождением пирофосфата. Вследствие обратимости этой реакции происходит включение меченного  $P^{32}$  пирофосфата в АТФ; этот обмен служит чувствительным тестом на активацию аминокислот. Истинная природа реакции была установлена Холли, который показал, что в присутствии фракции РНК, выделенной из надосадочной жидкости, полученной при центрифугировании, происходил обмен фосфора не только между пирофосфатом, но и между АМФ и АТФ. Дальнейшее исследование этого вопроса Бергом [3], Липманом и др. привело к открытию, что надосадочная жидкость содержит РНК с небольшим молекулярным весом (около 30 000), которая служит акцептором аминокислотных остатков в реакции активирования. Эта РНК, названная сначала растворимой РНК (*s*-РНК), теперь широко известна как акцептор аминокислот, или транспортная РНК. Установлено, что для каждой аминокислоты существует свой специфический активирующий фермент и специфическая РНК-акцептор, а несколько активирующих ферментов уже выделены в высокоочищенном виде. Были также разработаны методы выделения обогащенной специфической транспортной РНК. Молекулы транспортной РНК имеют на конце цепи остаток адениловой кислоты, содержащий два неэтерифицированных гидроксила при 2' и 3' атомах углерода рибозы, а перед адениловым остатком расположены два остатка цитидиловой кислоты. Начинаются цепи во всех случаях с гуаниловой кислоты. Известно также, что последовательность нуклеотидов, расположенных непосредственно перед тремя концевыми нуклеотидами, у различных типов *s*-РНК различна. При активировании аминокислоты остаток аминоксил-ада образует эфирную связь с одним из гидроксильных концевых аденозина *s*-РНК. Это активная форма аминокислоты, которая затем при участии одного или нескольких растворимых ферментов и гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ) переносится к рибосомам, где и происходит ее включение в полипептидную цепь.

Природа реакции переноса в настоящее время недостаточно ясна. Было проведено большое число исследований, посвященных составу и структуре рибосом, выделенных из животных, бактериальных и растительных клеток. Выяснилось, что рибосомы состоят из приблизительно равных частей белка и РНК. РНК рибосом имеет весьма высокий молекулярный вес (порядка  $1-2 \cdot 10^6$ ). Она отличается от *s*-РНК не только своим большим молекулярным весом, но также и тем, что в ее состав входят только четыре обычных

нуклеотида: адениловая, гуаниловая, уридилловая и цитидилловая кислоты, в то время как s-РНК содержит относительно большую долю остатков псевдоуридилловой кислоты, а также меньшие количества риботимидилловой кислоты и других нуклеотидов с метилированными основаниями. В зависимости от концентрации  $Mg^{++}$  в суспензии рибосомы могут существовать в несколько различных агрегированных состояниях. Так, были найдены рибосомы с константами седиментации 50S, 70S и 100S. По-видимому, именно 100S-рибосомы имеют отношение к синтезу белка.

До недавнего времени считали, что фактически матрицей в белковом синтезе служит рибосомная РНК. Первые указания на возможность ошибочности этого представления последовали из опытов Волкина и др. [33], которые обнаружили, что вскоре после заражения *E. coli* Т-четными фагами в присутствии ортофосфата, меченного  $P^{32}$ , образуется короткоживущая РНК, состав оснований которой был подобен составу оснований фаговой ДНК. Эти данные, а также наблюдения Спигелмана с сотр. [12, 24] привели к убеждению, что фактической матрицей служит не рибосомная РНК, а некая РНК, синтезируемая под генетическим контролем, т. е. под управлением ДНК, непосредственно перед синтезом белка. Действительно, было трудно связать матричную функцию рибосомной РНК с наблюдениями Чаргафа, Белозерского [2] и других, нашедших, что состав рибосомной РНК, количество которой доходит примерно до 80% общего количества РНК клетки, был исключительно постоянен у многих видов бактерий и отличался от состава оснований соответствующей ДНК, сильно различающегося у разных видов. Обнаружение короткоживущей матричной РНК, создаваемой под генетическим контролем, как это и требуется для синтеза специфических белков, дало возможность объяснить явления индукции и репрессии при синтезе ферментов. Жакоб и Моно [15] постулировали существование такой РНК, назвав ее *информационной РНК*. Эту концепцию подтвердили изящные опыты Бреннера и др. [4] и Гро и др. [10]. Первая группа авторов показала, что после заражения культуры клеток *E. coli* фагом Т2 не происходит синтеза новых рибосом и что вскоре после заражения образуется нестабильная РНК с тем же самым составом оснований, что и вирусная ДНК; эта РНК связывается со старыми рибосомами, которые и служат местом синтеза нового (фагового) белка.

Концепция информационной РНК была недавно подтверждена работами Ниренберга и Маттеи [23], Ленгуэла и др. [18], Вуда и Берга [37], показавших, что некоторые виды природной РНК (например, РНК из ВТМ), а также синтетические полирибонуклеотиды, полученные с использованием полинуклеотидфосфорилазы, заметно стимулируют включение аминокислот в кислотонерастворимые продукты в присутствии надосадочной фракции, полученной при центрифугировании гомогената клеток *E. coli*, и выделенных из них рибосом. Этот эффект зависит от присутствия s-РНК. Так, при использовании вместо информационной РНК полиуридилловой кислоты эта система синтезирует полифенилаланин, причем фенилаланин является единственной аминокислотой, чье включение в кислотонерастворимые продукты стимулируется этим полимером. Существуют указания на то, что в присутствии РНК из ВТМ синтезируется белок с иммунологическими свойствами белка ВТМ. Разнообразные сополимеры, полученные с помощью полинуклеотидфосфорилазы и содержащие уридилловую кислоту совместно с другими нуклеотидными остатками, стимулируют включение наряду с фенилаланином большого числа других аминокислот. Таким способом был определен нуклеотидный состав триплетов, кодирующих включение девятнадцати аминокислот [18, 31]. Тот факт, что для синтеза полифенилаланина

в присутствии полиуридилевой кислоты рибосомы печени крысы могут заменить рибосомы из *E. coli*, ярко показывает, что природа получающегося белка определяется информационной РНК, а не рибосомами [17].

В заключение можно сказать, что аппарат клетки, создающий белок, состоит из двадцати типов транспортной РНК, каждый из которых специфичен для определенной аминокислоты, и такого же количества активирующих ферментов, каждый из которых специфичен по отношению к определенной аминокислоте и соответствующей ей *s*-РНК. Все эти компоненты содержатся в надосадочной жидкости, получающейся при центрифугировании гомогената клеток, в которой одновременно находится один или несколько растворимых ферментов, участвующих в передаче активированных аминокислотных остатков к рибосомам и в образовании на рибосомах молекулы белка. Регулирующим агентом, который устанавливает последовательность аминокислот вдоль полипептидной цепи, является информационная РНК. Ее молекула синтезируется под генетическим контролем и представляет собой копию гена, т. е. цепи ДНК, кодирующей данный белок. Таким образом ДНК определяет нуклеотидную последовательность информационной РНК. Появляется все больше доказательств в пользу триплетного кода, т. е. такого кода, согласно которому каждые три нуклеотида в информационной РНК определяют одну аминокислоту; предполагают, что аминокислоты располагаются на матрице в той же последовательности, что и при построении полипептидной цепи. Это осуществляется с помощью механизма спаривания оснований, состоящего в одновременном использовании определенного триплета информационной РНК и комплементарного ему триплета транспортной РНК.

#### IV. СИНТЕЗ · ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК

Ничего не известно о механизме синтеза транспортной РНК. Ее «адапторный» триплет и другие специфические устройства, служащие для взаимодействия с данным активирующим ферментом, очевидно, predeterminedены и зафиксированы. С помощью соответствующего набора активирующих ферментов, транспортных РНК и информационных РНК, различающихся последовательностями триплетов вдоль цепей, могут быть синтезированы разнообразные белки. Поэтому перевод кода ДНК в соответствующий код информационной РНК становится центральным пунктом в передаче генетической информации. Это вызывает необходимость существования определенного механизма синтеза молекул РНК, представляющих собой реплики молекул ДНК. Открытие РНК-полимеразы доказало наличие такого механизма [8, 32, 36].

Подобно ДНК-полимеразе, полимеразы РНК были обнаружены как в бактериальных, так и в животных клетках. Она катализирует зависящий от ДНК синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов, и, так же как в случае ДНК-полимеразы, при этом требуется присутствие всех четырех трифосфатов. В результате синтеза освобождается неорганический пирофосфат. РНК-полимераза совершенно неактивна в отсутствие ДНК; затравочная ДНК может быть взята из целого ряда источников, и ее молекула может быть как одноцепочечной, так и двухцепочечной. Однако, очевидно, степень эффективности нативной (двухцепочечной) и денатурированной (одноцепочечной) ДНК в зависимости от источника фермента может быть различной. Так, в присутствии фермента, выделенного из *Azotobacter vinelandii*, нативная ДНК более активна [5]. Встречающаяся в природе одноцепочечная ДНК, например ДНК фага  $\phi$ X-174, является хорошей затравкой при синтезе РНК под действием РНК-полимеразы. С этой РНК в качестве за-

травки в присутствии фермента образуются комплементарные цепи РНК [6]. Это служит ясным указанием на то, что, подобно ДНК-полимеразе, РНК-полимераза действует по механизму комплементарного спаривания оснований. В согласии с исследованиями Волкина, изучавшего фаговую РНК, состав оснований РНК, синтезированной с помощью двухцепочечной ДНК-затравки, совпадает с составом этой ДНК, если тимин заменить на урацил. Это говорит о том, что реплицируются обе цепи ДНК, поскольку, как показано в табл. 1, при репликации только одной цепи не может получиться РНК с тем же составом оснований, что и у ДНК-затравки. Исследования показали, что последовательность рибонуклеотидов в РНК, синтезированной с помощью РНК-полимеразы, та же, что и в ДНК-затравке. Это заключение подтверждается тем фактом, что при медленном охлаждении предварительно нагретой смеси, содержащей как синтетическую РНК, так и ДНК-затравку, образуются молекулы, представляющие собой гибриды ДНК—РНК [9]. Таким образом, каждая цепь ДНК должна создавать комплементарную цепь РНК.

Таблица 1

Состав оснований РНК, синтезированной с помощью РНК-полимеразы, и ДНК, играющей роль матрицы

ДНК		Состав оснований ДНК, %			
цепь 1	цепь 2	основание	цепь 1	цепь 2	всего
А	Т	А	33,3	11,1	22,2
Г	Ц				
Ц	Г				
Т	А	Г	33,3	22,2	22,7
А	Т				
А	Т				
Ц	Г	Т	11,1	33,3	22,2
Г	Ц				
Г	Ц				
Г	Ц	Ц	22,2	33,3	27,7
РНК		Состав оснований РНК, %			
цепь 1а	цепь 2а	основание	цепь 1а	цепь 2а	всего
У	А	А	11,1	33,3	22,2
Ц	Г				
Г	Ц				
А	У	Г	22,2	33,3	27,7
У	А				
У	А				
Г	Ц	У	33,3	11,1	22,2
Ц	Г				
Ц	Г				
Ц	Г	Ц	33,3	22,2	27,7

#### V. РНК-«ШАБЛОН»

Механизм реакции, протекающей с участием РНК-полимеразы, еще не выяснен. Может быть, первым шагом в репликации является образование

гибридных двухцепочечных молекул (по одной цепочке от ДНК и от РНК) с помощью комплементарного спаривания оснований, но до сих пор еще нет доказательств, что это именно так. На возможность образования гибридов между цепями РНК и ДНК впервые указал Рич [29], который получал гибриды полиадениловой кислоты с короткоцепочечной политимидиловой кислотой, приготовленной синтетически Корана. Позднее Шильдкраут и др. [30] получили гибриды полирибоцитидиловой и полидезоксигуаниловой кислот. Наконец, совсем недавно Хайаши и Спигелман [13] сообщили, что в клетках *E. coli*, инфицированных фагом T2, содержится молекулярные гибриды ДНК — РНК, а Уорнер (неопубликованные данные) получил указания о существовании подобных гибридов у *Azotobacter*.

Как уже упоминалось, образования гибридов при синтезе РНК с помощью РНК-полимеразы еще не было обнаружено, однако предполагают, что при этом синтезе использовалась лишь малая часть ДНК-затравки и возникшие гибридные молекулы могли остаться незамеченными. Образование молекулярных гибридов ДНК—РНК представляется все же наиболее вероятным шагом в этой реакции. А если это так, то возникает вопрос, каким образом цепи ДНК и РНК, соединенные в гибридной молекуле, отделяются друг от друга с освобождением молекулы РНК. Возможно, что гибриды используются ДНК-полимеразой как матрица для образования одной двухцепочечной молекулы ДНК с освобождением одноцепочечной РНК (это предположение легко может быть проверено экспериментальным путем). В этом случае синтез реплик РНК по матрице ДНК с помощью РНК-полимеразы был бы связан с удвоением ДНК и происходил бы одновременно с клеточным делением. При этом возникла бы необходимость особого механизма синтеза информационной РНК в промежутках между клеточными делениями, в особенности для клеток животных и растений. Такой механизм мог бы осуществляться при участии определенного фермента, способного реплицировать РНК, синтезированную под действием РНК-полимеразы. С этой точки зрения РНК-полимераза должна была бы производить РНК-«шаблон», которая бы использовалась клеткой в промежутке между делениями для получения «копии», т. е. для создания информационной РНК. Недавно открытый в листьях шпината фермент, который, по-видимому, катализирует зависящий от РНК синтез РНК, может оказаться таким недостающим звеном.

## VI. РНК-СИНТЕТАЗА

В поисках ферментов, которые могут участвовать в синтезе РНК ВТМ, Редди в нашей лаборатории выделил из листьев шпината фермент, катализирующий включение нуклеотидов из рибонуклеозидтрифосфатов в кислотонерастворимые продукты. Хотя фермент был очищен лишь частично, он, подобно ДНК-полимеразе и РНК-полимеразе, проявлял оптимальную активность в присутствии всех четырех нуклеозидтрифосфатов. Были получены препараты этого фермента, содержащие небольшие количества РНК, совсем лишенные активности или малоактивные в отсутствие добавок РНК (при прочих оптимальных условиях). Как показано в табл. 2, активность восстанавливается при добавлении РНК. ДНК совершенно неактивна, независимо от того, нативная она или денатурированная. Предварительные результаты, полученные при использовании АТФ с  $\alpha$ -фосфатом, меченым  $P^{32}$ , и немеченого гуанозинтрифосфата (ГТФ), уридинтрифосфата (УТФ) и цитидинтрифосфата (ЦТФ), указывают на то, что распределение метки  $P^{32}$  среди 2'- и 3'-нуклеозидмонофосфатов (полученных при щелочном гидролизе РНК, выделенной в конце инкубации) различно в зависимости от того, из какого

источника была получена РНК, используемая в качестве затравки,— из дрожжей или из ВТМ.

Т а б л и ц а 2

Влияние РНК на активность РНК-синтетазы  
(по неопубликованным данным К. Редди)

Добавленная нуклеиновая кислота	Количество добавленной нуклеиновой кислоты, $\mu\text{г}$ на 1 $\text{mg}$ белка	Включение АМФ, $\mu\text{моль}$ на 1 $\text{mg}$ белка
Без нуклеиновой кислоты		0,2
РНК из дрожжей	100	3,6
ДНК из <i>Azotobacter</i>	100	0,3
РНК из ВТМ	40	2,3
РНК из ВТМ	80	2,9
РНК из ВТМ	120	3,8
РНК из ВТМ	160	7,1

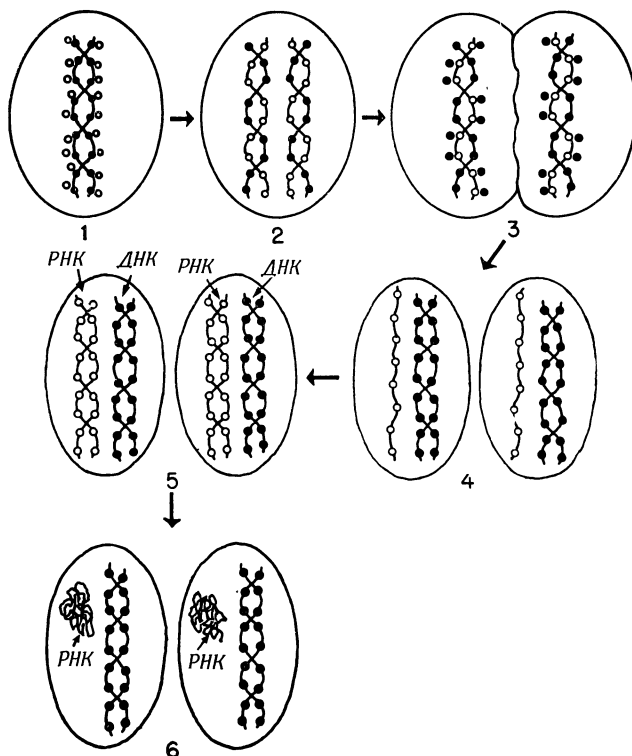
Возможно, что функция такого фермента состоит в копировании РНК-«шаблона», синтезированной с помощью РНК-полимеразы. Хотя РНК-синтетаза присутствует в надосадочной жидкости, полученной при центрифугировании гомогената листьев шпината, нельзя исключить и возможность того, что этот фермент попал туда из ядер при дроблении клеток. Целый ряд исследований обновления РНК посредством введения радиоактивных предшественников (меченных  $\text{P}^{32}$  пуриновых и пиримидиновых оснований) *in vivo*, а также опыты с интактными клетками и с клетками, из которых удаляли ядра, указывают на то, что синтез РНК в основном, а может быть и целиком, происходит в ядрах с последующим выходом РНК в цитоплазму.

Так как почти вся ядерная РНК находится в ядрышке и ядерная РНК имеет наивысшую скорость обновления по сравнению со всей РНК клетки, то можно предположить, что в ядрышке происходит копирование РНК-«шаблона». Эта мысль нашла подтверждение в опытах Аmano и Леблona [1], которые вводили мышам меченный тритием цитидин и прослеживали картину распределения метки в различные моменты времени с помощью радиоавтографии клеток печени и поджелудочной железы. В начальные моменты хроматин накапливал метку более интенсивно, чем ядрышко. При этом кривые удельной радиоактивности располагаются таким образом, что только кривая для ядрышка пересекает кривую для цитоплазмы. Исходя из этих данных, авторы пришли к выводу, что реакции, приводящие к синтезу РНК в хроматине и ядрышке, независимы друг от друга и что только ядрышковая РНК мигрирует в цитоплазму. Избирательно разрушая ядрышко клеток *HeLa* с помощью ультрафиолетового микропучка, Пери [26] нашел, что выход меченного тритием цитидина упал на 30% в ядрах и на 65% в цитоплазме по сравнению с контролями, в которых облучались окружающие ядрышко части ядра. Ро и Боннер [28] исследовали включение метки в ядра, выделенные из семян гороха. Инкубируя эти ядра с АТФ, ГТФ, УТФ и цитидином, меченным тритием, а затем разрушая их и разделяя ядерные фракции с помощью дифференциального центрифугирования, они обнаружили, что метка включается сначала в хроматин, а затем в ядрышко. Эти наблюдения подтверждают мнение о том, что синтез РНК сначала происходит в хроматине ядра и катализируется РНК-полимеразой (при этом в качестве матрицы



используется ДНК) и что последующее появление РНК в ядрышке может быть результатом синтеза, катализируемого ферментом типа РНК-синтетазы, а матрицей в этом синтезе служит ранее синтезированная РНК, т. е. РНК-«шаблон». Когда же клетка делится, весь синтез РНК должен проходить под генетическим контролем и РНК-«шаблон» должна исчезнуть. Это согласуется с исчезновением ядрышка во время клеточного деления [21].

Схематическая иллюстрация гипотезы, предлагаемой в этом обзоре, приведена на фиг. 1. Здесь изображены все стадии процесса, протекающего



Фиг. 1. Схематическое изображение гипотетического синтеза РНК-«шаблона» и процессы, протекающие при этом в ядре.

Объяснение см. в тексте.

при этом в ядре. На стадиях 1 и 2 происходит образование с помощью РНК-полимеразы двух гибридных молекул ДНК—РНК. За этим следуют стадии 3 и 4, на которых происходит удвоение ДНК; предполагается, что этот процесс катализируется ДНК-полимеразой, причем в качестве матриц используются гибридные двухцепочечные молекулы. В результате освобождается одноцепочечная РНК-«шаблон» и происходит деление клетки, причем, так как цепи молекул РНК каждой дочерней клетки являются копиями только одной из цепей ДНК материнской клетки, каждая цепь РНК подвергается самоудвоению (стадия 5) под действием РНК-синтетазы; образующаяся РНК-«шаблон» каждой дочерней клетки содержит всю информацию, имевшуюся в ДНК материнской клетки. На рисунке, изображающем стадию 6, показана предполагаемая локализация РНК в ядрышках дочерних клеток.

На основе данных, имеющихся в настоящее время, невозможно сказать, являются ли обе цепи ДНК «осмысленными» или лишь одна из них содержит истинный белковый код. Мармур и Лейн [20] получали гибридные молекулы, состоящие из двух цепей: трансформирующей ДНК с определенным маркером и нетрансформирующей ДНК того же вида бактерии; уменьшения трансформирующей активности при этом не было обнаружено. Этот результат показывает, что генетическая информация переносится независимо каждой цепью ДНК. Большая потеря трансформирующей активности ДНК вызвана слабым проникновением одноцепочечной ДНК в клетку. Это доказывается тем, что при нагревании меченной  $P^{32}$  трансформирующей ДНК количество  $P^{32}$  в клетках и трансформирующая активность падают с одинаковой скоростью [19]. Около 5% остаточной трансформирующей активности нагретой ДНК приходится на отдельные ее цепи [11]. Однако нет прямых доказательств того, что каждая из цепей молекулы ДНК может нести различную генетическую информацию. Единственным исключением являются опыты Эррио [14] по созданию гетерозиготной ДНК путем получения молекулярных гибридов, состоящих из цепей ДНК с различными трансформирующими маркерами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аmano M., Leblond C. P., *Exptl. Cell Research*, **20**, 250 (1960).
2. Белозерский А. Н., Спирин А. С., *Nature*, **182**, 111 (1958).
3. Berg P., *Ann. Rev. Biochem.*, **30**, 293 (1961).
4. Brenner S., Jacob F., Meselson M., *Nature*, **190**, 576 (1961).
5. Burma D. P., Kröger H., Ochoa S., Warner R. C., Weill J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **57**, 749 (1961).
6. Chamberlin M., Berg P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 81 (1962).
7. Chargaff E., In «The Nucleic Acids» (E. Chargaff and J. N. Davidson, eds.), Vol. 1, p. 307, Academic Press, New York, 1955.
8. Furth J. J., Hurwitz J., Goldman M., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **4**, 362, 431 (1961).
9. Geiduschek E. P., Nakamoto T., Weiss S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1405 (1961).
10. Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Risebrough R. W., Watson J. D., *Nature*, **190**, 581 (1961).
11. Guild W. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1560 (1961).
12. Hall B. D., Spiegelman S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 137 (1961).
13. Hayashi M., Spiegelman S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1564 (1961).
14. Herriot R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 146 (1961).
15. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 318 (1961).
16. Kornberg A., *Science*, **131**, 1503 (1960).
17. Lengyel P., Speyer J. F., Ochoa S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1936 (1961).
18. Lengyel P., Speyer J. F., Basilio C., Ochoa S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 282 (1962).
19. Lerman L. S., Tolmach L. J., *Biochim. et Biophys. Acta*, **33**, 371 (1959).
20. Marmur J., Lane D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 453 (1960).
21. Maziа D., In «The Cell» (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.), Vol. 3, p. 77. Academic Press, New York, 1961. (Д. Мэзия, Митоз и физиология клеточного деления, ИЛ, М., 1963.)
22. Meselson M., Stahl F. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 671 (1958).

23. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 1588 (1961).
24. Nomura M., Hall B. D., Spiegelman S., J. Mol. Biol., 2, 306 (1960).
25. Ochoa S., Angew. Chem., 72, 225 (1960).
26. Perry R. P., Exptl. Cell Research, 20, 216 (1960).
27. Reddi K. K., Science, 133, 1367 (1961).
28. Rho J. H., Bonner J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 1611 (1961).
29. Rich A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 1044 (1960).
30. Schildkraut C. L., Marmur J., Fresco J. R., Doty P., J. Biol. Chem., 236, PC 2 (1961).
31. Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C., Ochoa S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 63, 441 (1962).
32. Stevens A., J. Biol. Chem., 236, PC 43 (1961).
33. Volkin E., Astrachan L., Countryman J. L., Virology, 6, 545 (1958).
34. Warner R. C., J. Biol. Chem., 229, 711 (1957).
35. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, 171, 964 (1953).
36. Weiss S. B., Nakamoto T., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 1400 (1961).
37. Wood W., Berg P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 94 (1962).
38. Zamecnik P. C., Harvey Lectures, Ser., 54, 256 (1960).

# «КЛЕТКА-КНИГА» — МОДЕЛЬ ХРАНЕНИЯ И ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Дж. ПЛАТТ

## КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ СТАТЬИ

Выражение генетической информации в клетке и целом организме подобно прочтению сложной инструкции, причем эта аналогия простирается гораздо дальше, чем обычно думают. Генетическая информация линейно упорядочена в «слова», которые «считываются» последовательно во времени. Существует два копирующих механизма для нужд клеточной химии, один из них (ДНК-полимераза) служит для «перепечатки» всей «книги», а другой (РНК-полимераза) — для выборочного «считывания» «инструкций». Считывание осуществляется по «параграфам» (генам) и «страницам» (оперонам), которые могут «закрываться» (репрессия) или «открываться» (индукция), согласно условным «инструкциям» (комплексы репрессор — корепрессор), получаемым благодаря «ссылкам» (гены-регуляторы) на предыдущие страницы или на «книги» соседних тканей.

Один из наиболее важных выводов состоит в том, что «ссылки» на «страницы» осуществляются через «номер страницы», или «индекс страницы» (индукторы генов-операторов); эти «номера», или «индексы», должны быть широко распространенными «малоинформационными» кодами, очень отличными как по своему характеру, так и химически от остального видоспецифичного «высокоинформационного» «текста» (структурные гены) соответствующей «страницы». В промежутках между «чтением» «книги» могут быть «заперты» в компактных «хранилищах» (головки фагов, хромосомы).

Такого рода анализ вызывает несколько вопросов относительно «чтения» каждой из нитей двойной спирали, относительно многочисленных функций, присущих молекулам-«переводчикам» с «языка» нуклеиновых кислот на «язык» белка, и разницы в механической конфигурации цепей, когда они «открыты», «закрыты» или «сложены в хранилища».

## I. ВВЕДЕНИЕ

Известные в настоящее время факты, касающиеся переноса генетической информации, рассмотрены Жакобом и Моно [9] и суммированы Ричем [19]. Прежде всего нам хотелось бы напомнить основные данные так, как они описываются на современном генетико-биохимическом языке.

«ДНК создает РНК, которая в свою очередь создает белок». Другими словами, с отдельных коротких фрагментов данных цепей дезоксирибонуклеиновой кислоты (или иногда рибонуклеиновой кислоты), несущих генетическую информацию, заключенную в специфических последовательностях

оснований, снимаются копии в виде коротких фрагментов цепей информационной РНК, которые в свою очередь копируются или, лучше сказать, «переводятся» в аминокислотные последовательности ферментных белков.

Каким образом осуществляется регуляция синтеза ферментов?

Жакоб и Моно показали, что *ген-регулятор*, возможно расположенный в локусе, отличном от *структурного* локуса фермента, синтезирует специфическое вещество — *репрессор*. Это вещество, соединяясь с определенными химическими компонентами клетки — *коррепрессорами* или *индукторами*, — теряет способность взаимодействовать с соответствующим *геном-оператором*, расположенным на цепи ДНК. В первом случае наступает *репрессия*, во втором — *дерепрессия*, или, иными словами, *индукция* синтеза информационной РНК соседними *структурными генами*, в том числе и тем геном, который определяет структуру данного фермента.

Один и тот же ген-регулятор может контролировать синтез сразу нескольких ферментов — часто это совокупность ферментов, участвующих в последовательных этапах синтеза какого-либо одного соединения (например, гистидина, аргинина или ортофосфата). У бактерий структурные гены этих ферментов часто сгруппированы последовательно на генетической карте и находятся под контролем одного гена-оператора. Ген-оператор и соответствующие структурные гены вместе образуют отдельную информационную единицу, называемую *опероном*.

Коррепрессором — его действие заключается в подавлении синтеза фермента — часто служит конечный продукт (например, гистидин) той последовательности реакций, один из этапов которой катализирует этот фермент. С другой стороны, индуктором (его действие заключается в «разрешении» синтеза фермента) часто является субстрат (например, глюкоза) катаболического процесса, в котором участвует данный фермент.

Таким образом, система имеет обратную связь, регулирующую синтез ферментов, во всех случаях, когда регулирующий механизм не поврежден в результате мутации. Так как большинство ферментов требуется лишь в особых случаях или в особых непредвиденных обстоятельствах, то соответствующие опероны большую часть времени находятся в *состоянии репрессии*.

Настоящая статья содержит ряд соображений по поводу этих любопытных и увлекательных взаимоотношений. На эти соображения нас натолкнула мысль, что здесь существует простая и ясная аналогия с любой информационной последовательностью, которая выражается звено за звеном по принципу «все или ничего». Примером такой информации из повседневной жизни является книга или, более строго, весьма сложная «инструкция-руководство», которая может быть открыта только на одной странице или на нескольких страницах одновременно.

Конечно, на протяжении многих лет все те, кто писал или говорил о генетике, использовали при этом лингвистические и книжные метафоры, употребляя термины «код», «запятыя» и «слова», которые могут быть «прочитаны». Идея, развиваемая здесь, состоит в том, что подобная, казалось бы случайная, аналогия теперь, по-видимому, должна быть распространена глубже, охватывая детали, касающиеся хранения и чтения генетической информации. Поэтому интересно обсудить более тщательно вопрос о том, насколько точна эта аналогия и с какого момента она перестает соответствовать сути дела. Если она справедлива для достаточного числа деталей, то серьезное сравнение цепи генетической информации с книгой инструкций может стать удобным средством при объяснении и обучении генетике и эм-

бриологии. Эта аналогия может дать нам более общее и связанное представление о генетических процессах, а также стимулировать научные исследования, касающиеся тех структурных и биохимических аналогий, которые иначе могли бы остаться незамеченными.

Мы сможем лучше представить все возможности, последовательно рассмотрев различные аналогии. Начнем с наиболее известной параллели.

## II. ЛИНЕЙНЫЙ ХАРАКТЕР ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Информация в книге размещена в линейном порядке (за исключением иллюстраций). Это характерно и для генетической информации. Гипотетическая «генетическая карта», предложенная Морганом, считалась линейной; это давало возможность наглядно представить наблюдаемое в эксперименте соотношение вероятностей рекомбинации отдельных генов. Теперь Бензер [3] окончательно доказал линейность генетической карты для одного участка гена (область *rII* фага T4) вплоть до уровня точковых мутаций (замена отдельного основания). Электронные микрофотографии цепей ДНК, осажденных на подложке, также показали, что на протяжении тысяч и десятков тысяч ангстремов они не разветвлены [1].

Правда, генетическая карта фагов T2 и T4 представляется кольцевой; однако здесь, по-видимому, сказывается чисто формальный эффект какого-то непрерывного процесса репликации, а вовсе не происходит образования петли молекулой ДНК [22]. Образование боковых ответвлений спирали или двойной спирали на определенных этапах жизненного цикла, конечно, вполне возможно [15], но это не меняет представлений о линейности генетической информации. Следовательно, хотя в нашем представлении генетическая цепь больше напоминает скоропись свитка с ее слитным написанием букв, чем печатную книгу, в которой имеются пропуски между буквами и словами, однако и в книге, и в рукописи информация зашифрована в линейном порядке.

## III. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ СЧИТЫВАНИЕ

В настоящее время показано, что до того, как аминокислоты соединяются в полипептидную цепь, они садятся на матрицу информационной РНК не случайным образом, а последовательно, начиная с одного и кончая другим концом молекулы РНК [4, 7]. Было также показано, что добавление (дупликация) или выпадение (делеция) одного основания в цепи ДНК сдвигает считывание вперед или назад на одно основание на протяжении десятков и сотен оснований «вправо» по генетической карте, что указывает на последовательность считывания длинных отрезков внутри гена на уровне ДНК [6] (хотя, конечно, не исключено, что одни отрезки могут считываться «слева направо», а другие — в обратном направлении).

Как отмечали многие авторы, такой процесс подобен чтению особого рода текста, буквы которого (4 различных типа оснований в цепи ДНК или РНК) сгруппированы в слова, состоящие, по-видимому, из трех букв (каждое слово соответствует одной из 20 или около этого различных аминокислот). А так как слова не отделены друг от друга ни промежутками, ни запятыми, то смещение на одну букву назад или вперед приводит к тому, что все слова, расположенные за тем местом, в котором произошел сдвиг, считываются неверно.

Чтобы физически приблизить аналогию с книгой к такой схеме, мы не будем проводить различий между буквами, промежутками и знаками пунктуации. Буквы должны быть напечатаны в один непрерывный от начала до

конца ряд, заворачивающий назад или вперед поперек (страницы (если это необходимо для компактности), как это иногда бывает в детских книжках-загадках. По сути дела и обычная книга имеет точно такую же информационную структуру (линейная упорядоченность), если речь идет о ее содержании, а не о форме записи.

#### IV. СЧИТЫВАЕТСЯ ЛИШЬ ОДНА (НО НЕ ДВЕ) ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

В модели ДНК, предложенной Уотсоном и Криком, каждая из обеих комплементарных цепей несет некую информационную последовательность, которая может быть скопирована в виде одной из двух комплементарных последовательностей информационной РНК. Образуются ли обе эти молекулы информационной РНК в действительности? А если так, то ответственны ли они за синтез белков с молекулами одинаковой длины, но имеющих совершенно различные свойства [18, 20]? Последнее предположение всегда казалось в высшей степени маловероятным для тех, кто задавался таким вопросом, и сейчас имеются прямые химические данные, отвергающие эту возможность.

Например, Спейер и др. [21] и Маттеи и др. [11] впервые сообщили о «словах», состоящих из триплетов оснований синтетической РНК, которые «делают» различные аминокислоты, причем оказалось, что все «осмысленные» триплеты, за какими-нибудь двумя-тремя исключениями, некомплементарны друг другу. Все они содержат один или более У; комплементарные им триплеты, следовательно, будут бедны У.

Эти результаты приводят к ряду важных заключений [17, 18]. Одно из них состоит в том, что большинство или все комплементарные триплеты РНК (бедные У) не кодируют аминокислот. Если это так, то на любом отрезке двойной спирали ДНК считываться будет только одна из ее цепей. Осмысленной цепью ДНК будет служить цепь, бедная У; на ней синтезируется богатая У цепь информационной РНК (кстати, если допустить, что считывается одна цепь ДНК, можно ограничиться рассмотрением лишь 32 из 64 возможных триплетов<sup>1</sup>).

Та цепь ДНК, которая не считывается (или при ее считывании создается информационная РНК, которая не участвует в синтезе белка), вообще говоря, не может считаться полностью «бессмысленной». Скорее всего, она имеет «комплементарный смысл», так как содержит, хотя и в комплементарной форме, информационную последовательность, требующую дополнительной репликации (в данной генерации), прежде чем она может быть использована для синтеза белка. С другой стороны, ее присутствие упраздняет один этап репликации в промежутке между генерациями, прежде чем может быть создан дочерний белок; кроме того, эта цепь, несомненно, предотвращает разрушение или химическое изменение комплементарной цепи (подобно этому иногда в книги, чтобы защитить дорогостоящие иллюстрации, кладут тонкие прозрачные прокладки). Существование фага  $\phi$ X-174, содержащего одноцепочечную ДНК, и РНК-содержащих вирусов показывает, что вторая цепь не является необходимой для передачи генетической информации.

Если «осмысленная» цепь ДНК содержит в основном триплеты, бедные У, то комплементарные цепи должны были бы легко разделяться при электрофорезе или центрифугировании [17]; этого, однако, не происходит. Тем не

<sup>1</sup> В настоящее время, когда обнаружены и безурацильные «осмысленные» триплеты, эти рассуждения уже не кажутся столь убедительными.— *Прим. перев.*

менее, если предположить, что каждая из цепей содержит перемежающиеся «осмысленные» и «комплементарные» отрезки, то можно будет объяснить полученные экспериментальные данные, так как в этом случае обеспечивается равновесие отношения пуринов к пиримидинам. Подобное предположение ранее было сделано на совсем других основаниях [15]. В ходе эволюции такое соединение «осмысленного» отрезка с «комплементарным» могло произойти во время одной из репликаций вследствие того, что по какой-либо причине вторая цепь не могла отделиться от конца первой [19].

Синтез цепей информационной РНК, по-видимому, естественным образом заканчивается на конце «осмысленного» отрезка, который, таким образом, мог бы служить для обозначения естественной границы гена или белка. Если, согласно модели Уотсона — Крика, каждая цепь ДНК имеет «одно определенное направление» в каждом нуклеотиде на всем своем протяжении, причем эти направления для комплементарных цепей противоположны, то «осмысленные» отрезки одной цепи должны будут считываться «слева направо», а «осмысленные» отрезки другой цепи — «справа налево». Однако в обоих случаях считывание может производиться с помощью одного и того же фермента — РНК-полимеразы.

В любом случае, независимо от того, считывается ли каждый отрезок всегда в одном и том же направлении или нет, мы видим, что генетические цепи очень близки к модели-книге тем, что они образуют только одну линейную «осмысленную» последовательность и в каждой точке должна считываться только одна цепь, а не две. Постоянна ли приблизительно скорость считывания для разных организмов, как это имеет место для разных книг? Это вполне возможно. По крайней мере промежутки времени, которые требуются фагу, бактерии или человеку для реализации всей их генетической информации, пропорциональны по порядку величины суммарным длинам цепей их ДНК (У. Лиддель, личное сообщение, 1961).

## V. КОПИРОВАНИЕ БЕЗ СЧИТЫВАНИЯ И НАОБОРОТ

Мы можем скопировать книгу, например фотографически, не читая ее. Монахи и писцы в свое время переписали множество рукописей, буква за буквой, совершенно не фиксируя внимания на их содержании. В случае генетической информации мы тоже видим, что процесс копирования не связан с «чтением». При копировании фермент ДНК-полимераза может продвигаться вдоль реплицирующейся цепи наподобие «застежки-молнии», создавая двойную спираль ДНК [9]. Ни информационная РНК, ни белок при этом не синтезируются. Этот фермент имеет дело со всей цепью ДНК, хотя она может быть в доступном для фермента состоянии в течение лишь части жизненного цикла, возможно, после того, как ее доступность для «чтения» была каким-то образом в течение определенного времени блокирована (копирование и чтение книги тоже чередуются друг с другом).

И наоборот, мы можем читать книгу или отдельные ее части, не снимая с них долговечной копии. «Чтение» цепей ДНК с целью «извлечь смысл» требует другого фермента — РНК-полимеразы, который, двигаясь вдоль цепи ДНК, строит комплементарную цепь информационной РНК. Этот фермент, как и мы, «прочитывает» не все подряд, а только те доступные, или дерепрессированные, отрезки, которые были для него «открыты». При этом не происходит образования какой-либо долговечной копии, так как информационная РНК — это короткоживущий продукт, который, по-видимому, распадается после того, как синтезирует свой белок (белок, конечно, не есть



«копия» информации в принятом смысле слова; он, например, не может производить копии самого себя. Он скорее напоминает «рабочее оборудование», которое собрано и запущено согласно инструкции-руководству).

## VI. СТРАНИЦЫ ОТКРЫТЫЕ И ЗАКРЫТЫЕ

Генетическая «книга» — это не свиток, который может быть развернут в различной степени в зависимости от того, какой кусок текста требуется прочитать. Данные по «индукции» и «репрессии» четко разграниченных участков информации заставляют нас думать о генетической «книге» как об обычной современной книге со «страницами» или, точнее, «двойными страницами», которые в каждый данный момент времени либо целиком открыты, либо полностью закрыты [12].

Таким образом, «двойная страница» соответствует «единице переноса информации» — оперону, который «открывается» и «закрывается» при действии индуктора или репрессора на данный ген-оператор. Оперон может состоять как из одного гена, несущего одновременно регуляторную функцию и функцию определения структуры белка, так и из гена-оператора в сочетании с двумя или несколькими отличными друг от друга структурными генами, контролирующими синтез двух или большего числа различных белков [12].

Мы можем рассматривать каждый из этих структурных генов как «параграф». Параграф в свою очередь состоит из «предложений», или «абзацев»: это *цистроны*, синтезирующие белковые фрагменты, совокупность которых (на основе комплементарного взаимодействия между ними) обладает каталитическим действием. Например, страница, озаглавленная «Синтез гистидина», в «книге *Salmonella*», по-видимому, содержит около восьми параграфов такого рода, несущих структурные инструкции, касающиеся структуры семи различных белков, катализирующих последовательные ступени в биосинтезе гистидина [12] (восьмой «параграф» — это «заголовок», или ген-оператор). При избытке гистидина «страница» «закрывается» и всякое считывание структурных генов с нее прекращается. «Закрывать» эту страницу лишь частично нельзя. Процесс, по-видимому, всегда идет по принципу «все или ничего». Двойная страница либо «открыта», либо «закрыта». Этим объясняется, почему, к примеру, клетка какого-нибудь позвоночного может, как мы все знаем, осуществлять специфические биохимические реакции, свойственные, скажем, почке или хрящевой ткани, но она не способна создавать какую-либо промежуточную по характеру ткань.

*Размеры страниц и книг.* Субъединицы известных ферментных белков, по-видимому, содержат от 100 до 500 аминокислот, что соответствует такому же числу триплетов в соответствующих им цепях ДНК. «Страница», содержащая 1—10 «параграфов» информации, может в таком случае содержать от 300 до 3000 «слов» (возьмем округленно 2000). Эта величина сравнима с размером страницы большой книги, например энциклопедии.

Бактериофаг или вирус с цепью ДНК длиной, скажем, в 200 000 оснований содержит тогда около 60 000 «слов», или примерно 30 «страниц», в своей генетической «книге инструкций». Такая «книга» для бактерии уже в 10—100 раз больше. А у человека его генетическая информация, заключенная в 46 хромосомах каждой соматической клетки, — это уже не просто книга, а большая энциклопедия, состоящая из 46 «томов»,  $2 \cdot 10^9$  «слов» (около  $6 \cdot 10^9$  пар оснований) и 1 000 000 «страниц», в среднем по 20 000 «страниц» в каждом «томе». Причина деления книг большого размера на отдельные тома в литературе и в биологии заключается в том, что это значительно

упрощает и ускоряет перепечатку и использование этой информации. Кроме того, при необходимости открыть несколько страниц одновременно это технически легче выполнить при наличии нескольких томов.

## VII. ТОЛЬКО НЕСКОЛЬКО СТРАНИЦ ОТКРЫТО

Клетка похожа на книгу не только потому, что ее «страницы» могут быть открыты или закрыты, но также и потому, что в каждый данный момент времени существует необходимость открыть лишь несколько «страниц». Например, клетке, способной использовать различные сахара в различных условиях окружающей среды, требуются различные ферменты. Генетическая информация для этих ферментов появилась как эволюционное приспособление, полезное в прошлом, хотя для выживания на отдельном конкретном субстрате необходимы лишь некоторые из них. Кроме того, многие ферменты бывают нужны для синтеза определенных продуктов лишь на какой-то одной стадии жизненного цикла и не нужны на другой.

Жакоб и Моно в своих работах подчеркивают необходимость регуляции путем репрессии для большинства генов, ответственных за синтез ферментов. Они указывают, что у «конститутивных мутантов», т. е. таких мутантов, у которых нарушена регуляция синтеза данного фермента, этот фермент (не продукт фермента, а сам фермент!) может составлять более 6% их общего белка. Очевидно, что «клетки не могут выжить при нарушении более чем двух или трех регулирующих систем». Иными словами, клетка не может «держаться открытыми и считывать непрерывно» более чем две или три из сотен ее «страниц».

У многоклеточных животных особенно ярко выражено существование ограничений, накладываемых на выражение информации в данный момент времени. Ясно, что яйцо перед первым дроблением не может реализовать всю заложенную в нем информацию, и обычно принято считать, что большая часть его генов не функционирует. Подобным образом у зрелого животного каждая из его клеток реализует лишь часть информации, свойственной определенному типу ткани. Клетки (по крайней мере соматические клетки высших животных) содержат также информацию, касающуюся всех других типов тканей, но эта информация репрессирована. Это доказывается классическими эмбриологическими опытами по индукции образования тканей клетками, не предназначенными для создания данной ткани. (Клетки кожи превращаются в глазную ткань, мышечная ткань может превращаться в хрящевую.)

Недавно на самом деле обнаружили, что явление, состоящее в реализации только части генетической информации в данный момент времени, можно наблюдать в микроскоп. «Кольца Бальбиани» и вздутия, наблюдаемые в определенных дисках гигантских хромосом насекомых, в настоящее время известны как места синтетической активности [2]. Оказалось, что вздутия и соответствующая активность наблюдаются в различных местах хромосомы в зависимости от типа ткани или от стадии развития.

Соматические клетки человека содержат в несколько сот раз больше ДНК, чем крупная бактериальная клетка. Для осуществления за один и тот же отрезок времени одинакового с бактериальной клеткой количества химических синтезов они используют в сотни и тысячи раз меньшую часть своей полной генетической информации (может быть, не случайно то, что общее число типов дифференцированных клеток, обнаруженных к настоящему времени у человека, равно примерно ста). С энергетической и химической точек зрения для тканевой клетки, по-видимому, невозможно использовать

все различные виды информации, которые реализует целое животное, иначе сама тканевая клетка должна будет достигнуть такой же величины и такой же степени структурной дифференцировки, как целое животное.

Итак, «книги» в каждой клетке могут быть «открыты» только на сравнительно небольшом числе «страниц» сразу.

### VIII. ИНДЕКСАЦИЯ «СТРАНИЦ»

Теперь мы перейдем к одной особенности аналогии с книгой, которой не придавали большого генетического или биохимического значения. Каждая «страница» «книги», за исключением «страниц» очень коротких «книг», всегда содержит два различных рода информации:

1) длинную последовательность «слов», высокоспецифичную для данной «книги» и содержащую большое количество информации, т. е. «текст»;

2) короткую последовательность, одинаковую для многих «книг» и содержащую небольшое количество информации, т. е. номер «страницы» или «индекс страницы».

Мы видели, что специфический текст и его параграфы соответствуют структурным генам. «Номер» или «индекс» — это хорошие метафоры для обозначения гена-оператора. Действие определенным образом расположенного гена-регулятора ссылается своим репрессором (если подобран надлежащий индуктор) на ген-оператор, чтобы «открыть страницу» оперона; оно, по-видимому, представляет собой близкую аналогию с инструкцией условной передачи при ссылке с одной страницы сложной книги инструкций на другую.

Конкретный пример поможет нам лучше уяснить себе эту аналогию. Читая определенную «страницу» нашей «книги инструкций», мы можем встретить «инструкцию условной передачи» (т. е. ген-регулятор), что дает в результате следующую последовательность приказов.

«Смотри, присутствует ли гистидин» (т. е. пусть РНК-полимераза или какой-нибудь другой считывающий репрессор фермент синтезирует репрессорное вещество для гистидина).

«Затем, если гистидин отсутствует (т. е. если теперь не может образоваться комплекс между репрессорным веществом и свободным гистидином), перейди к странице 137 — «синтез гистидина» (т. е. пусть свободный репрессор найдет свободный ген-оператор, которому он соответствует) и начинай делать гистидин по находящимся тут инструкциям» (т. е. пусть РНК-полимераза проходит через этот «дерепрессированный», или «открытый», ген-оператор и начинает воспроизводить 7 видов информационной РНК для ферментов синтеза гистидина в соответствии с семью «параграфами инструкции»<sup>1</sup>).

В этой аналогии, по-видимому, не так уж важно, рассматриваем ли мы ген-оператор как «номер страницы» или как «индекс» (по терминологии программирования — это «адрес»). «Числовое» обозначение более подходит всякий раз, когда «чтение» осуществляется последовательно от «страницы» к «странице» по цепи, например в том случае, когда происходит считывание

<sup>1</sup> Читатель может быть озадачен и удивлен выбором глагольных форм для написания этих «приказов». Однако это поможет понять, что в отличие от книги, читаемой человеком, в клетке нет какого-то «маленького человечка», который читает и переводит информацию, заключенную в ДНК. Клетка «читает себя», здесь глагол «читать» стал непереходным глаголом и означает, что чтение заключается в переворачивании страниц и в «реализации прочитанных инструкций». В английском языке для такого «автоматического» «чтения-действия», при котором книга не требует читателя и читает себя, а не читается, нет подходящих глагольных форм.

первых отрезков информации после митоза или оплодотворения (впрочем, цепь, которая считывается строго последовательно и вовсе не содержит ссылок на предыдущий или последующий текст, не будет нуждаться даже в номерах для страниц).

С другой стороны, при осуществлении большей части химических превращений у большинства клеток, и особенно в случае многоклеточных организмов, «страницы» будут «открываться» не последовательно, а по мере надобности, и ген-оператор должен тогда играть роль, близкую к роли «минимизированных индексов». Именно кратких (минимизированных), потому что код генов-операторов, подобно ссылке, должен быть записан на «языке», общем для многих организмов, на «языке» общих индукторов и ко-репрессоров, или же клетка «переводит» этот код на такой «язык» с помощью репрессора. Это означает, что «узнающая часть» репрессора, так же как и «узнающая» этот репрессор часть гена-оператора, должна быть всего лишь коротким, «малоинформационным заголовком», который соответствует «гистидину», или «глюкозе», или какому-нибудь другому из относительно небольшого числа широко распространенных веществ.

Таким образом, книга (или бактерия), содержащая 900 «страниц», может точно определять, какие страницы должны быть «открыты», используя трехзначные десятичные или десятизначные двоичные числа («адреса»), хотя каждая «страница» содержит от 1000 до 5000 битов информации. Каждая из этих трехзначных цифр, или минимизированных индексов, стоящих с ними в одной строке, является общей для многих «книг».

Эта особенность — малый запас информации — характерна и для более сложных биологических индукторов, с помощью которых одна ткань воздействует на другую, а также для репрессоров, которые «узнают» эти индукторы (хотя мы и не знаем многих деталей о действии каждого из них). Гормоны, например, представляют собой один из классов индукторов. Гормоны — это низкомолекулярные, легко диффундирующие молекулы; они могут быть одинаковыми для многих видов и вызывают настолько сходные реакции в развитии тканей, что им приходится приписать очень незначительную специфичность и предположить, что они несут очень мало информации по сравнению со структурными белками. То же самое справедливо и для менее изученных тканевых индукторов. Такие видоспецифичные структуры, как элементы глаза или перья, могут быть индуцированы в неподходящем участке кожи хозяина путем трансплантации эмбриональных тканей-индукторов, полученных от животных совершенно других видов или даже классов. Индуцированные структурные гены специфичны для данного хозяина; химический же индуктор специфичен только для типа ткани-индуктора. Поэтому индукторы, какова бы ни была их химическая природа, должны быть одинаковыми у многих видов или классов организмов.

Объяснение более тонких взаимодействий на основе подобных органо-специфичных малоинформационных процессов, по-видимому, необходимо для объяснения опытов Москоны [13, 14] и Вейсса по агрегации разделенных (обработкой трипсином) клеток ткани. Оказалось, что клетки почки цыпленка и клетки почки мыши «распознают» друг друга как «почечные клетки» (по крайней мере в начальных стадиях, до возникновения реакции иммунитета). Случайно встречаясь, эти клетки образуют связи друг с другом и таким образом создают организованную ткань, приобретая новую форму и перестраиваясь, так что образуется гибридная псевдопочка с почечными канальцами и другими характерными деталями строения почки.

Напротив, если разделенные клетки почки смешать с хрящевыми клетками, взятыми либо от того же вида, либо от представителей других видов

или классов, то эти клетки как бы «отвергают» друг друга и образуют отдельно почечную и отдельно хрящевую ткань. Это подтверждает предположение, что некоторые способные к диффузии, широко распространенные, но органоспецифичные (например, специфичные для почки) молекулы могут проникнуть в клетки, у которых когда-то уже были открыты «страницы», содержащие информацию относительно образования и функционирования почки, и открыть там «страницу» синтеза с заголовком: «Почка. Образование ткани». Однако молекулы другого типа, специфичные для хрящевой ткани, проникая в клетки, неспособны открыть страницы синтеза с таким заголовком (возможно, эти молекулы даже неспособны проникать в такие клетки; но тогда это просто частный случай, касающийся образования «узнающих пермеаз» и представляющий собой усложнение, которое нам нет необходимости рассматривать здесь, так как, по всей вероятности, его генетические аспекты не содержат какого-либо нового принципа).

*Химия «индекса страницы» и молекул репрессора.* Очевидно, что репрессор должен «узнавать», т. е. обладать способностью специфически связываться с двумя типами молекул: с молекулами гена-оператора и с молекулами корепрессора или индуктора. Поэтому сам репрессор, видимо, должен содержать две функциональные группы, причем одна из них, вероятно, имеет белковую природу, поскольку известно, что репрессор стереоспецифичен по отношению к индуктору или корепрессору. Правда, репрессор, по крайней мере во время его синтеза, дает отрицательный тест на белок, однако трудно объяснить факт стереоспецифичности каким-нибудь иным способом. Поэтому Жакоб и Моно пришли к заключению, что, видимо, репрессор сам синтезирует этот «специфичный для индуктора белок» и с этого момента остается связанным с ним.

Учитывая роль функциональной группы репрессора, «узнающей» ген-оператор, можно предположить, что эта группа представляет собой цепь нуклеиновой кислоты, подобной информационной РНК, которая, однако, является долгоживущей. По-видимому, ее последовательность оснований комплементарна последовательности оснований того гена-регулятора, который ее синтезирует. Она также может служить матрицей для синтеза гипотетического белка, который остается соединенным с ней после своего синтеза. Эта функциональная группа может быть комплементарной и по отношению к гену-оператору, с которым она способна соединиться. Наконец, есть основания предположить, что она удовлетворяет всем этим требованиям, хотя, вероятно, такой взгляд и слишком оптимистичен (впрочем, идентичность последовательности оснований у гена-регулятора и у гена-оператора просто соответствовала бы совпадению номера страницы в ссылке и действительного номера страницы).

Но каковы бы ни были детали механизма, если репрессор (или «переводчик индекса страницы») представляет собой комплекс белка и нуклеиновой кислоты, то это сразу же подсказывает некоторые важные биохимические обобщения, для подтверждения которых может быть привлечен ряд других данных.

Не составляет большого труда понять, что если существует два типа различных кодов, связанных друг с другом в биохимических клеточных процессах, — код последовательности оснований нуклеиновой кислоты и код последовательности аминокислот белка, — то на каждом участке их взаимодействия должны также существовать особые «молекулы-переводчики», содержащие *оба* кода и способные «разговаривать» на обоих языках. Вещество, вырабатываемое геном-регулятором, представляет собой молекулы именно такого рода — молекулы, которые осуществляют «перевод» с «языка»

индуктора (независимо от того, являются ли все индукторы белками или нет) на «язык» ДНК гена-оператора (если мы предположим, что они взаимодействуют не с ДНК гена-оператора, а с каким-то неизвестным «белком гена-оператора», то при этом проблема «перевода» лишь вернется обратно на этот белок; фактически мы видим, что когда репрессор соединен с геном-оператором, то его белок и есть белок гена-оператора).

Из общего требования процесса перевода следует, что должны существовать и другие системы молекул-переводчиков, связывающих белок и нуклеиновую кислоту. Две такие системы генетического перевода сразу приходят в голову. Это, во-первых, система молекул транспортной (или растворимой) РНК, состоящая из цепи РНК, соединенной со специфической аминокислотой. Молекулы транспортной РНК переносят информацию с матрицы информационной РНК на белковую цепь [19]. Во-вторых, это система, состоящая из постулированных ферментов-переносчиков, которые способны «прочитать» некоторую последовательность оснований молекул этой транспортной РНК, для того чтобы присоединить к ним надлежащие аминокислоты.

Представляется поучительным потратить теперь немного времени для исследования возможности существования здесь «бесконечной иерархии переводчиков». Не следует ли постулировать существование еще одной системы — системы ферментов-переносчиков второго порядка (или «преподавателей языка»), которые «читают» последовательности оснований, кодирующие ферменты первой системы, и присоединяют к этим последовательностям соответствующие аминокислоты. Таким же образом можно ввести систему третьего порядка, читающую код для системы второго порядка и т. д. Сформулировав проблему, мы сразу пришли к абсурду — и это позволяет нам сделать важный химический вывод. Ясно, что на какой-то определенной стадии должна существовать либо цепь оснований, которые не нуждаются в ферменте-переносчике (активирующем ферменте), а комплексироваться спонтанно со специфическими аминокислотами, либо цепь аминокислот, которые также взаимодействуют со специфическими основаниями. На какой же стадии процесса переноса информации это происходит? Перевод «языка» триплетов оснований РНК на «язык» аминокислот, по-видимому, уже универсален. Во всяком случае, как показали Ниренберг и Маттеи [25], а также Спейер и др. [21], он одинаков у нескольких организмов. Поэтому сами транспортные РНК или по крайней мере их ферменты-переносчики могут быть универсальными. Это может означать только одно: взаимодействие между основаниями и аминокислотами происходит аналогично существующий для нуклеиновых кислот взаимосвязи, основанной на комплементарности за счет структурного и химического соответствия, а не за счет некоего посредника, зависящего от случайностей, определяющих биологическое выживание. Это в свою очередь заставляет сделать еще одно предположение, которое может показаться странным, но заслуживает особого рассмотрения. Молекула транспортной РНК содержит около 80 оснований, но только 3 из них необходимы для осуществления комплементарного взаимодействия с соответствующим триплетом оснований информационной РНК. Быть может, столь большая длина молекулы необходима, чтобы сделать ее своего рода «антителом», имеющим специфическое сродство к ее собственной аминокислоте и к другим группам, с которыми она должна комплексироваться? В этом случае отпала бы необходимость в дополнительном ферменте-переносчике.

Кроме уже упомянутых систем, может существовать еще одна важная система «молекул-переводчиков» для «языков» нуклеиновых кислот и белков, а именно система молекул, определяющих эмбриональную индукцию.

Сейчас, по-видимому, существует общее согласие относительно того, что *индукторы*, диффундирующие из одной клетки в другую, представляют собой, по всей вероятности, соединение РНК с белком. Лэш [10] и Хомз и др. [8] анализировали индуктор спинного мозга эмбриона цыпленка, вызывающий образование хряща в сомитах. Оказалось, что этот индуктор содержит гуанозин- и цитозинмонофосфаты, а также гексозу, гексозамин и около 15 аминокислот.

Эмбриональный индуктор действует во многом подобно «приказу», заставляющему клетку «открыть определенную страницу». Эта черта действия индуктора наряду с присутствием в нем нуклеиновой кислоты дает основание предположить, что индуктор нельзя уподобить низкомолекулярному индуктору-субстрату, способному образовывать комплекс с репрессором. По-видимому, индуктор сам может быть конкурентом репрессора. Если бы такое предположение оказалось правильным, то исчезла бы необходимость в эндогенном «переводе» экзогенного индуктора. Безусловно, такая «служба перевода» между клетками у некоторых видов часто могла каким-то образом выпадать. В подобном случае ясно, что межвидовая общность, обнаруженная для тканевых РНК-индукторов, должна указывать на межвидовую общность кодов с участием генов-операторов.

Какова бы ни была природа и распространение этих разнообразных «молекул-переводчиков», из логических требований генетического «перевода», по-видимому, следует, что гены-регуляторы, гены-операторы и структурные гены должны обладать определенными физическими и химическими различиями. Например, для того чтобы создать репрессоры, состоящие из нуклеиновой кислоты и белка, требуется особого рода чтение регуляторных генов. Может ли это быть осуществлено только за счет специфической последовательности оснований или же для этого необходимы различные считывающие полимеразы? Возможно, что такое считывание происходит на ранних стадиях жизни клетки и поэтому эти «репрессоры-индексы» (заголовки) могут оказаться присоединенными к генам-операторам еще до того, как начинает осуществляться какое-либо считывание структурных генов. Означает ли это, что гены-регуляторы и гены-операторы наиболее активны в это время? Если бы многие гены-регуляторы должны были быть прочитаны, «до того как клетка начнет испытывать в них нужду», то синтез репрессоров составлял бы основную часть ранней синтетической активности генетического материала. Генам-операторам, несомненно, присущи иные химические свойства; насколько нам известно, именно эти гены должны сообщать: «открыто» или «закрыто» молекулам РНК-полимеразы, синтезирующим информационную РНК; при этом сами они не служат матрицей для информационной РНК.

В свете этих соображений не будет удивительным, если окажется, что гены-регуляторы и гены-операторы отделены от остальной информации, заключенной в генетической книге, своего рода химическими запятыми, представляющими собой участки ДНК с измененной конфигурацией. Возможно, что «изгибы» в цепях ДНК, складывающихся с образованием компактной формы, могут легче всего образовываться в тех местах, где расположены гены, обозначающие «номер страницы», что еще более увеличивает сходство с книгой. Для обеспечения химической недоступности «закрытых» «страниц» могла бы существовать какая-нибудь физическая «задвижка». Однако очевидно, что во время считывания по крайней мере сами «номера страниц» или «индексы» для «ссылок» должны оставаться химически доступными. Что могло бы удовлетворить этим требованиям лучше, чем физическое складывание, при котором «индексы страниц» окажутся именно снаружи — на местах сгибов? Части цепи, служащие «индексами страниц», на любой

стадии, когда они действительно сцеплены с белком репрессора, должны значительно отличаться по химическому составу от частей цепи ДНК, занятых структурными генами. В этом может состоять простое объяснение существования перемежающихся темных (нуклеиновая кислота) и светлых (белок) полос последовательности «генов», видимых в гигантских хромосомах из клеток слюнных желез дрозофилы (см. [5, 23] о возможной роли гистонов на ДНК как «индексов страниц»). Мы видим, что аналогия с книгой, включающая в себя идею «чтения страничных заголовков», весьма плодотворна, так как позволяет находить связи между многочисленными явлениями и по-иному осветить различные современные направления научных исследований.

#### IX. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ССЫЛКИ

Итак, картина индивидуального клеточного развития выглядит, согласно нашей модели, как чтение сложной книги инструкций со ссылками на предыдущий и последующий текст и с приложениями. Можно предполагать, что у простейшего после митоза или у яйца после оплодотворения генетическая «книга» либо открывается автоматически, либо уже открыта на «странице 1» (в диплоидных клетках существуют две «книги», которые должны открываться и считываться одновременно, причем текст обеих «книг» не всегда совпадает; однако это дополнительное усложнение здесь можно опустить). Вся генетическая информация этого первого оперона — «страницы 1» — начинает копироваться в виде информационной РНК, соответствующей структурным генам этого оперона, с помощью РНК-полимеразы, возможно уже имеющейся к тому времени в клетке. Вскоре с этой страницы или с последующих страниц начинается (с помощью этого же или другого фермента) считываться информация, заключенная в гене-регуляторе; при этом образуются репрессоры, представляющие собой «индексы страниц» («карточки для ссылок»?). Эти репрессоры могут проникать в те места на следующих «страницах», где находятся их гены-операторы. Некоторые ферменты и репрессоры, изготовленные согласно инструкциям, содержащимся на данной странице, могут синтезироваться только однажды; другие же, напротив, могут производиться снова и снова в течение всего времени, пока «страница» открыта; вероятно, это зависит от присутствия на концах цепей информационной РНК инструкций о «повторении» или о «прекращении» синтеза.

Когда «страница 1» «прочитана» или же когда накопилось достаточное количество продуктов деятельности ферментов — индукторов, требующих дальнейшей химической обработки, — может быть открыта «страница 2». После этого «страница 1» «закрывается» либо теми же самыми индукторами, действующими на нее как корепрессоры, либо она закрывается позднее другими индукторами. В какой-то момент «условные» репрессоры<sup>1</sup> могут стать специфичными по отношению к питательным веществам или ядам окружающей среды и определенные индукторы смогут открыть, например, «страницу 3», «страницу 12» и «страницу 64» в той последовательности, которая определяется информацией, содержащейся в функциональных «заголовках-индексах». Этот процесс будет продолжаться, «чтение текста» будет сопровождаться «ссылками» на предыдущие и последующие «страницы» или на специальные «приложения» вплоть до того момента, когда накопится «достаточное» количество продуктов, связанных с ростом. Тогда «страницы» закроются,

<sup>1</sup> Вещества, приобретающие репрессорные свойства в зависимости от тех условий, в которых находится ген. — *Прим. перев.*



т. е. РНК-полимераза «выключится», а ДНК-полимераза начнет процесс «копирования», подготавливая митоз.

У многоклеточных организмов конец первого клеточного деления не означает конца всей «книги»; это лишь конец ее «первой главы». Когда после митоза «книга открывается» опять, определенные части этой «главы» могут «перечитываться» снова; пропускаются лишь небольшие куски, относящиеся к «реакции на оплодотворение», но повторяются многие инструкции, касающиеся роста и клеточного деления. Однако цитоплазма уже не та, что была прежде. Индукторы и продукты, накопившиеся уже в дочерних клетках, могут начать открывать новые страницы — страницы «главы 2» и так далее — до конца этой главы и далее, причем с каждым клеточным делением начинается новая глава. С точки зрения этой модели читающейся книги закону «онтогенез повторяет филогенез» должно соответствовать предположение, что многие начальные главы генетической книги остаются почти неизменными на протяжении миллионов лет.

#### Х. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА: ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РАЗНЫЕ КНИГИ

Когда в результате деления каждая клетка приобретает соседей, возникают химические градиенты, создающие различие в концентрациях индукторов и корепрессоров в различных клетках; поэтому у разных дочерних клеток данного поколения в один и тот же момент времени окажутся открытыми не одинаковые, а различные главы. Можно предположить, что у мозаичных эмбрионов, а также в ряде других подобных случаев, когда дочерние клетки, по-видимому, необратимо утратили некоторые потенции сразу после первого деления, каждая клетка получила копию лишь части всей генетической книги. Но необходимость в таком допущении отпадает, если наборы индукторов в соседних клетках различаются настолько, что считывание в этих клетках начинается с различных «страниц»; это создает различную последовательность ступеней развития в результате несовпадающих последовательностей «ссылок» на «страницы» у разных клеток. Это может осуществиться при условии, что обмен индукторами между клетками незначителен.

Дифференцировка тотипотентных клеток, у которых реакция каждой клетки действительно зависит от индукторов соседних клеток и при этом одна из таких клеток отдает определенный набор индукторов и корепрессоров второй клетке и получает от нее другой набор, имеет еще один аспект аналогии с книгой.

Получается так, как если бы несколько студентов-медиков читали несколько лежащих рядом одинаковых учебников по анатомии, поделив между собой разделы учебника. Один говорит: «Я просмотрю все сведения о костях, если ты просмотришь все о крови, а он — о хряще». Каждый дает карточки со ссылками остальным, так что все студенты (или клетки) обмениваются информацией и просматривают страницы друг для друга. При этом все экземпляры книги открыты на разных страницах и главах.

Если диффузия индукторов между клетками протекает без затруднений, можно физически наблюдать тот момент, когда должна начаться специализация. До того как дробящееся яйцо достигло стадии 8—16 бластомеров (при этом некоторые клетки уже оказываются в окружении других клеток и возникшие градиенты могли бы привести к появлению химических различий между клетками, расположенными на периферии и в центре), не существует причин, которые обусловили бы «чтение» разных «глав» или каких-то.

«глав», отличных от тех, которые «читались» бы изолированной клеткой. Однако, начиная с этого момента, пути развития различных клеток будут различны, причем судьба каждой клетки с ее индивидуальной последовательностью «ссылок» на страницы обусловлена ее историей и соседями. Такой подход, основанный на представлении о «центральных» и «периферических» клетках, позволяет объяснить, чем определяется возможное число идентичных близнецов; число таких близнецов (нормально сформированных) зависит от числа клеток, которые успели отделиться до того, как утратили тотипотентность, которая была им свойственна изначально.

Нет никаких биологических оснований для того, чтобы какая-нибудь соматическая «страница» всегда содержала следующий приказ репрессора: «Закрой открытые страницы и возвращайся к стадии одной клетки». Движение информации от «страницы» к «странице» осуществляется только в одном направлении. Информация может содержать инструкции для программирования некоторых циклических последовательностей, но не может содержать инструкций для выполнения того же цикла в обратном направлении. По-видимому, «страницам» в клетках дифференцированной ткани всегда присуща *самоиндукция* в отношении многих химических превращений. «Открытые» опероны этих «страниц» посылают этим же «страницам» *индукторное* сообщение: «Оставайся открытой на этих страницах».

Такие самостабилизирующиеся ферментные механизмы, остающиеся включенными, коль скоро они однажды включились, работают по принципу триггера. Они обеспечивают стационарное состояние, определяющее особого рода *биологическую память* [24]. *Дедифференцировка* представляет собой обычное явление в культурах тканей. Но для того чтобы можно было пройти весь путь обратно к ранней стадии оплодотворенного яйца, мы должны научиться «выключать» этот триггер. Это, быть может, потребует обработки корепрессорами и индукторами, характерными для «ранних глав». По-видимому, когда-нибудь это удастся сделать довольно просто; для этого тканевую клетку придется изолировать от ее соседей, а затем окружить ее растущими клетками, находящимися на все более ранних стадиях развития.

## XI. НЕАКТИВНЫЕ КОНФИГУРАЦИИ

Последняя аналогия между генетической информацией и книгой состоит в том, что как первая, так и вторая могут находиться часть времени в свернутом виде в компактных «неактивных» конфигурациях и храниться в таком виде в «книжных шкафах». Такой конфигурацией, недоступной ни для считывания, ни для копирования, обладает ДНК, упакованная в головке фага; это справедливо и для клеточных хромосом, наблюдаемых во время митоза в виде коротких толстых образований. В каждом из этих случаев происходит сокращение длины в сотни и тысячи раз, и смысл таких форм состоит в том, чтобы уменьшить возможность повреждений во время их переноса из одной «читальни» в другую.

Мы почти ничего не знаем об этих компактных формах; нам ясно лишь, что ни в процессе образования, ни в процессе растягивания до полной длины цепи не запутываются и не разрываются. Возможно, для этого просто требуется скольжение отрезков цепи в одном и том же направлении «вдоль собственной длины»; при таком движении цепь не может запутаться и образование узелков при этом также невозможно (вспомните, как змея расправляет свои кольца).

Существует несколько возможных конфигураций для таких компактных форм. Одна из них — это «спираль, скрученная спиралью», или «спираль, дважды скрученная спиралью», наподобие вольфрамовой нити электрической лампочки. Другая форма предусматривает появление ряда скрученных участков, образованных одноцепочечными или двухцепочечными спиральями, вытянутыми в многочисленные боковые рукава («ламповые щетки») [15]. Обе эти формы возникают за счет небольших изменений двойной спирали, однако при этом существует возможность чрезмерного скручивания концов, если отсутствуют особые условия или не осуществляется компенсирующее это скручивание обратное скручивание.

Длинные цепи могут быть упакованы аналогично виткам «часовой пружины», лежащим друг на друге. Однако легче всего жесткую спираль согнуть в ломаную, а не в плавную кривую (в этом легко убедиться, манипулируя с растянутой стальной пружиной: пружина легче всего гнется там, где сгиб уже имелся). Вследствие этого возможно, что и ДНК просто будет стремиться сложиться именно таким образом. Существуют также многочисленные другие более сложные конфигурации, включающие возможность раскручивания двойной спирали при ее упаковке. При этом отдельные цепи стабилизируются в компактной форме совершенно другими химическими взаимодействиями — взаимодействиями, само существование которых доказывается наличием такой формы. Рич [20] указал на особое значение возможности зигзагообразного складывания и на его аналогию со складыванием многих синтетических полимеров, представляющих собой длинные цепи, сложенные таким образом, что получается ломаная линия, отрезки которой имеют длину 100 Å.

Связанные с этим вопросы о механохимических силах, заставляющих цепи принимать определенную конфигурацию, очень интересны сами по себе. Распространяется ли этот процесс волнообразно вдоль цепи или же он осуществляется одновременно во всех точках? Является ли процесс таким же простым, как высаливание ионами [20], которое идет самопроизвольно *in vitro* с очищенной ДНК? Или же в нем участвуют сцепленные друг с другом белковые цепи и процесс напоминает наблюдаемое при митозе сокращение белковых нитей веретена?

Для ответа на все эти вопросы необходимы дальнейшие рентгеноструктурные и химические исследования, а также опыты по моделированию. Мы уже начали понимать кое-что в переходах спираль — клубок и знаем кое-что о поведении цепей молекул полиэлектролитов. Изучение же процессов, при которых происходят тысячекратные изменения в длине может открыть нам совершенно новые аспекты механохимии [16].

Таким образом, мы видим, что генетические книги можно хранить в «книжных шкафах» в перерывах между их чтением.

## ХII. КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Подводя итоги, можно сказать, что модель «клетка-книга» создает новый подход к ряду вопросов, поставленных современными исследованиями. Сюда относятся вопросы о «смысле» и «комплементарном смысле» цепей, а также вопросы о направлении считывания двойной спирали. Далее, это вопросы биохимической генетики об «адресах», «страничных индексах» и генах-операторах и о химических различиях между этими и другими частями генетической цепи; о «молекулах-переводчиках», состоящих из белка и нуклеиновой кислоты, и о кодировании и месте действия молекул эмбриональных индукторов. Наконец, это проблемы разнообразных физи-

ческих конфигураций генетических цепей ДНК или РНК (когда различные «страницы» «открыты» или «закрыты» или же упакованы в виде «неактивных» компактных форм) — конфигураций, которые могут сильно отличаться как макро-, так и, возможно, микроструктурой от тех длинных неразветвленных инертных спиралей, которые обычно имеют в виду, говоря о нуклеиновой кислоте.

В общем аналогия между передачей генетической информации и сложной инструкцией, созданной человеком, по-видимому, дает нам последовательную и довольно точную картину, объединяющую разнообразие типы явлений. Как с точки зрения преподавания, так и с точки зрения научных исследований эта аналогия помогает лучше уяснить многие биофизические и биохимические детали, касающиеся активности генов в процессах клеточного развития и дифференцировки тканей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. В е е р М., J. Mol. Biol., 3, 263 (1961).
2. В е е р м а н W., «16th Growing Symposium», p. 83, Ronald Press, New York (1959).
3. В е н з е р S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 45, 1607 (1959).
4. В и ш о п J., Л е а х у J., Schweet R., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 1030 (1960).
5. В л о ч Д. П., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 324 (1962).
6. С р и с к F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts — Tobin R. J., Nature, 192, 1227 (1961).
7. Д и н т з и с H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 247 (1961).
8. Н о м м е с F. A., van Leeuwen G., Zilliken F., Biochim. Biophys. Acta, 56, 320 (1962).
9. Я с о б F., М о н о д J., J. Mol. Biol., 3, 318 (1961).
10. Л а ш J., Н о м м е с F. A., Zilliken F., Biochim. Biophys. Acta, 56, 313 (1962).
11. М а т т х а е и J. H., Jones O. W., Martin R. G., Nirenberg M. W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 666 (1962).
12. М о н о д J., Я с о б F., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 26, 389 (1961).
13. М о с с о н а A., Exptl. Cell Research, 22, 455 (1961).
14. М о с с о н а A., Sci. American, 205, 142 (1961).
15. П л а т т J. R., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 41, 181 (1955).
16. П л а т т J. R., J. Theoret. Biol., 1, 342 (1961).
17. Р и ч А., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 1044 (1960).
18. Р и ч А., «19th Growth Symposium», p. 3. Ronald Press, New York (1961).
19. Р и ч А., This volume, p. 103 (1962).
20. Р и ч А., Proc. Pontifical Acad. Vatican, p. 137 (1962).
21. С п е й е р J. F., Lengyel P., Basilio C., Ochoa S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 441 (1962).
22. С т а х л F. M. (в печати).
23. С т е д м а н E., Stedman E., Nature, 166, 780 (1950).
24. С з и л а р д L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 277 (1960).
25. Н и р е н б е р г M., Matthaei J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 10, 1588 (1961). (Молекулярная генетика, ИЛ, М., 1963.)

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БОЛЕЗНИ, ЭВОЛЮЦИЯ И ГЕННАЯ РАЗНОРОДНОСТЬ

Э. ЦУКЕРКАНДЛЬ, Л. ПОЛИНГ

## ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

### Понятие молекулярной болезни

Жизнь — это не свойство какой-либо одной молекулы, а скорее результат взаимодействия между молекулами. То же можно сказать и о болезнях, подвергающих жизнь опасности. Хотя и существуют молекулярные болезни, однако не существует «больных молекул». На молекулярном уровне мы встречаемся лишь с изменениями структуры и физико-химических свойств. Равным образом мы не можем надеяться обнаружить на этом уровне какой-нибудь критерий, позволяющий установить место данной молекулы на эволюционной лестнице. Хотя гемоглобин человека и отличается до некоторой степени от гемоглобина лошади [9], он, по-видимому, вовсе не является более совершенным. Молекулярные болезни и эволюция появляются на более высоком уровне — на уровне биологической интеграции. На этом уровне эти явления оказываются тесно связанными, и между ними нельзя провести резкой границы. Механизм молекулярной болезни представляет собой один из элементов механизма эволюции.

Эволюционировать — означало субъективно подвергаться страданиям от болезней. И эти болезни, разумеется, были молекулярными.

Взаимосвязи между молекулами, определяющие здоровое состояние или болезнь, могут изменяться под влиянием факторов среды, факторов старения или внутренних наследственных факторов. Два последних типа воздействий частично совпадают, так как старение само определяется генетическими факторами. Два первых типа факторов также частично совпадают, так как старение связано с кумулятивным эффектом внешних воздействий. Термин «молекулярная болезнь» в его единственно полезном ограниченном смысле по существу относится к третьему типу факторов, т. е. к изменениям взаимосвязей между молекулами, сводимыми к изменениям генов.

В той мере, в какой мы можем считать, что наследственность связана с нуклеиновыми кислотами и что первичными продуктами нуклеиновых кислот, кроме других молекул нуклеиновых кислот, являются только белки, можно считать, что понятие молекулярной болезни относится исключительно к наследованию измененных молекул белков и нуклеиновых кислот. Например, образование аномальных гликогенов [17] обусловливается действием аномальных ферментов — белков, ответственных за их синтез.

Аномальная нуклеиновая кислота и аномальный белок, синтезированный под ее контролем, представляют собой две стороны одной медали. Число известных в настоящее время видов белков гораздо больше числа

известных нуклеиновых кислот, и в этом состоит одна из причин того, что сейчас значительно легче начать изучение молекулярных болезней с изучения белков.

Аномальный белок, вызывающий молекулярную болезнь, имеет аномальные ферментативные или другие физико-химические свойства. Изменения таких свойств обязательно связаны с изменениями структуры. По-видимому, в настоящее время не имеет смысла резко разграничивать два типа структурных изменений, ответственных за возникновение молекулярных болезней, т. е. изменения в характере свертывания полипептидных цепей и изменения в последовательности аминокислот, из которых построены белковые цепи. Представляется все более вероятным, что изменения пространственной конфигурации (конформации) являются прямым следствием изменений в последовательности фрагментов полимерных молекул [9, 63]. Поэтому молекулярную болезнь, по-видимому, можно исчерпывающе охарактеризовать на молекулярном уровне с помощью определения изменений аминокислотной последовательности в белке (или последовательности нуклеотидов в соответствующей нуклеиновой кислоте). Это утверждение, конечно, справедливо лишь для данных условий внутриклеточной и внеклеточной среды. Если изменяется сама среда, то пространственная конфигурация белка может изменяться без какого-либо нарушения последовательности аминокислот, что также может привести к патологическому состоянию. Такое изменение среды возникает либо под влиянием внешних факторов, которых мы здесь не касаемся, либо из-за изменений последовательностей аминокислот в других белках, которые и будут ответственны за данную молекулярную болезнь.

### Молекулярные болезни, эволюция и среда

Изучение молекулярных болезней заставляет нас вернуться к изучению мутаций. Известно, что вредные мутации встречаются значительно чаще, чем полезные. Все дефектные мутации в широком смысле слова, заключающиеся или в полной утрате белка, или в утрате белковой функции из-за структурных изменений белка, представляют собой молекулярные болезни. Вместе с тем дефектные мутации часто служат фактором, обуславливающим приспособление организма к окружающей среде, т. е. фактором эволюции. Утрата функции, не приводящая в условиях данной среды к гибели организма, может создать такие условия, при которых энергия и генетический материал клетки способны приобрести новые функции. Более высокоразвитые организмы утратили способность к ряду процессов синтеза, которыми обладали более примитивные организмы [54]. Таким образом, вероятно, без молекулярных болезней не было бы эволюции. Поддержание «молекулярного здоровья», хотя оно и осуществляется в интересах индивидуума, противопоставлено эволюции вида. Однако лишь очень небольшая доля возникающих молекулярных болезней способствует эволюционному развитию.

Бактерия, которая в результате мутации утратила способность к синтезу определенного фермента, «страдает молекулярной болезнью». Первые гетеротрофные организмы возникли в результате подобных молекулярных болезней, от которых они «излечивались», поедая своих ближних. В конечном счете сама жизнь — это молекулярная болезнь, которая все время преодолевается путем приспособления к окружающей среде. Так, например, наша потребность в витаминах возникла как результат молекулярной болезни наших предков, «заболевших» сотни миллионов лет назад. Такие

молекулярные болезни не проявляются в нормальных условиях, поскольку среда служит источником паллиативных «лекарственных» веществ. В то же время если фенилаланин содержится в обычной диете лишь в небольших количествах, то мутация, ведущая к фенилкетонурии (эта мутация приводит к утрате способности превращать избыточные количества фенилаланина в тирозин), также не проявится в качестве молекулярной болезни, хотя эта мутация является таковой при нормальных условиях. Мы могли бы сказать, что эволюция частично основывается на молекулярных болезнях, симптомы которых устраняются под воздействием среды. Так как наши отдаленные предки должны были быть автотрофами, мы можем рассматривать самих себя как выродившиеся автотрофные организмы. Получается, что для достижения превосходства необходимо (хотя и недостаточно) быть дегенератом!

Таким образом, во многих случаях понятие молекулярной болезни оказывается тесно связанным со свойствами среды. Однако в некоторых случаях дело обстоит иначе. Примером может служить структурное изменение молекулы гемоглобина, приводящее к утрате способности обратимо связывать кислород. Эти два типа случаев сходны в том, что в них химические вещества среды либо не могут быть использованы (кислород или предшественники витаминов), либо не могут быть удалены (фенилаланин). Различие между этими двумя типами молекулярных болезней заключается фактически только в том, что в одном случае, например при авитаминозе или фенилкетонурии, среда может возместить утрату соответствующей биохимической реакции, либо снабжая организм продуктом этой реакции (витамином), либо прекращая поставлять субстрат (фенилаланин). В другом случае это невозможно из-за того, что для организма важен не продукт биохимического процесса (необходимый или, напротив, вредный), а сам процесс. Так, когда кислород не может эффективно передаваться тканям, последние утрачивают способность осуществлять процессы окисления. Окисление же должно проводиться самим организмом главным образом из-за того, что живая материя не может функционировать без химической энергии.

Таким образом, проявление молекулярных болезней всецело определяется средой в том случае, когда эта болезнь касается потребности в каких-либо веществах или неспецифических формах энергии, как, например, тепло. Если же молекулярная болезнь затрагивает какой-либо из тех основных, важнейших для существования живой материи процессов, которые характеризуются высокой специфичностью в освобождении энергии во времени и пространстве, то такая болезнь не зависит от среды. Жизнь может получать из среды все, за исключением упорядоченности и специфичности, которые присущи ей самой.

Рассматривая молекулярные болезни и среду в связи с эволюцией, мы сталкиваемся с двусторонней взаимосвязью. Эволюция, вероятно, зависит не только от наследуемых изменений в организме, вредность которых могла компенсироваться средой, но также и от изменений среды, в результате которых вредные молекулярные изменения в организме могли перестать проявляться. В ходе эволюции возникали и закреплялись такие молекулярные болезни, которые могли защищать организм от болезней, вызываемых внешними агентами. Так, например, было показано, что частота заболеваний малярией положительно коррелирует с серповидноклеточной анемией, характеризующейся присутствием в крови аномального гемоглобина HbS, с талассемией, болезнью, связанной с другим генетическим изменением гемоглобина, а также с глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназной недостаточностью и, наконец, с дальтонизмом [4, 91]. По-видимому, наличие в среде возбуди-

теля весьма опасной болезни, *Plasmodium falciparum*, благоприятствует сохранению и распространению среди людей таких молекулярных болезней, которые посредством неизвестных нам еще механизмов усиливают сопротивляемость этой инфекции. Такие молекулярные болезни, по крайней мере в гетерозиготном состоянии, менее летальны, чем инфекционное заболевание. Изучение этих фактов способствует выяснению общей картины взаимодействия между средой и молекулярными болезнями.

Молекулярная болезнь может сохраняться у данного вида как из-за того, что определенные агенты делают ее безвредной, так и, напротив, из-за того, что она делает относительно безвредными определенные агенты, присутствующие в среде. Именно по этой второй причине и представляется вероятным, что вызывающие болезнь внешние агенты, главным образом инфекционные, сыграли определенную роль в возникновении таких эволюционных изменений некомпенсированного дегенеративного характера, которые привели, например, к паразитизму. Ген серповидноклеточной анемии в гетерозиготном состоянии увеличивает вероятность выживания индивидуума, в то время как в гомозиготном состоянии он уменьшает эту вероятность, по крайней мере в той же степени, что и малярия. Когда два носителя гена серповидноклеточной анемии вступают в брак, то в среднем половина их потомства будет снова гетерозиготной. Вероятность выживания другой половины будет понижена либо вследствие заболевания серповидноклеточной анемией (гомозиготы по гену серповидноклеточности), либо из-за малярии (гомозиготы по гену «дикого типа»). Таким образом, в странах, где распространена малярия, гены серповидноклеточной анемии будут иметь тенденцию распространяться среди населения. Едва ли это было бы так, если бы мутантный ген был полезен в гомозиготном, а не гетерозиготном состоянии. Вновь появившаяся мутация, которая могла бы сохраняться только в гомозиготном состоянии, обычно не имеет шансов на сохранение в популяции. Следует указать, что, за исключением случая очень малой популяции (тесный инбридинг), замещение данного гена мутантным в какой-либо популяции зачастую требует двух последовательных мутаций. После первой мутации идет отбор мутации в гетерозиготном состоянии. Это позволяет мутантному гену сохраняться, но одновременно сохраняется и соответствующий ген дикого типа. Для того чтобы элиминировать ген дикого типа, должна произойти вторая мутация. Эта мутация должна быть такой, чтобы дважды мутировавший ген был наиболее благоприятен в гомозиготном состоянии. Эта двойная мутация не будет вызывать ничего похожего на молекулярную болезнь (в отличие от предшествующей ей одиночной мутации). С этой точки зрения молекулярная болезнь часто может представлять собой промежуточную ступень в последовательности эволюционных событий, в результате которых ген полностью замещается в популяции своим мутантным аллелем. При этом в первую очередь необходимо, чтобы гетерозиготное состояние было выгодным. На протяжении этой фазы гомозиготное состояние часто может оказываться вредным.

## ГЕМОГЛОБИН, МНОГООБРАЗИЕ ЕГО ФОРМ И ЭВОЛЮЦИЯ

### Молекула гемоглобина

Выясняя роль молекулярных болезней в эволюции, мы неизбежно приходим к рассмотрению в первую очередь молекулы гемоглобина. В настоящее время эта молекула наиболее хорошо изучена во многих отношениях. Так, известны ее аминокислотная последовательность, структура той части,



которая специфически определяет ее функцию, структурные изменения, ведущие к возникновению молекулярной болезни, структурное разнообразие ее форм в норме, скорости синтеза структурно различных «изданий» этой молекулы и их изменение с течением времени.

Гемоглобин всех позвоночных, кроме самых примитивных, по-видимому, состоит из четырех полипептидных цепей, связанных друг с другом связями, намного более слабыми, чем пептидные связи, определяющие одномерное выстраивание аминокислот в этих цепях. Каждая из этих цепей содержит около 150 аминокислот и несет геминную группу, в которую входит атом железа, способный обратимо связывать кислород. Цепь аминокислот свернута в пространстве весьма специфичным способом, который, по-видимому, одинаков у всех переносящих кислород пигментов позвоночных, так как даже миоглобин (мышечный гемоглобин) кашалота обладает подобной же конформацией, несмотря на то что его аминокислотная последовательность очень сильно отличается от последовательностей, найденных до сих пор в гемоглобинах крови [96]. Природа произвела великое множество таких цепей гемоглобина и миоглобина, различающихся по последовательности аминокислот, а следовательно, и по своим физико-химическим свойствам, причем эти цепи, по-видимому, остаются сходными по своей конформации и основным свойствам связи с геминной группой. Аминокислотные последовательности этих цепей варьируют у разных видов животных (за исключением, возможно, некоторых очень близких видов); однако известно также, что каждый отдельный организм данного вида синтезирует различные формы гемоглобина, частью последовательно, частью одновременно.

Насколько известно, содержащая четыре гема молекула гемоглобина высших позвоночных всегда состоит из цепей двух типов, которые комбинируются попарно. Так, гемоглобин взрослого человека, HbA, содержит две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -цепи [78, 79]. Гемоглобин, синтезируемый в процессе утробного развития, гемоглобин плода (fetal), состоит из двух  $\alpha$ - и двух  $\gamma$ -цепей [88, 90]. В период постнатального развития гемоглобин крови содержит также в небольших количествах  $\delta$ -цепь. Две  $\alpha$ -цепи, соединяясь с двумя  $\delta$ -цепями, образуют минорный компонент гемоглобина, известный как HbA<sub>2</sub> [37, 49, 50]. Таково известное сейчас структурное разнообразие *нормальных* цепей гемоглобина человека. Изредка, например при талассемии, один или два типа цепей содержатся в меньшем количестве. Иногда, напротив, происходит избыточный синтез «цепей-партнеров». Такие цепи соединяются друг с другом, образуя тетрамеры. Это приводит к созданию аномального гемоглобина HbH, состоящего из четырех  $\beta$ -цепей [44, 45], или «Бартовского» гемоглобина, состоящего из четырех  $\gamma$ -цепей. Таким образом, тетрамеры образуются не только при ассоциации цепей двух различных типов, хотя при таком соединении обеспечивается наиболее прочная связь. Все известные нормальные гемоглобины человека имеют один общий тип цепи. —  $\alpha$ -цепь, для организмов же других видов это не обязательно (примером может служить гемоглобин кур) [64].

### Гетерогенность гемоглобина

Замечательно, что гетерогенность цепей гемоглобина была обнаружена у всех видов. Правда, до сих пор в этом отношении исследованы только позвоночные, однако диапазон изученных классов очень широк — от млекопитающих до рыб и круглоротых [24, 30]. Гемоглобин круглоротых, наиболее примитивных позвоночных (современные их представители — миксины и миноги), по-видимому, имеет молекулы, состоящие из одиночных полипептидных цепей [52, 82, 94], вероятно принадлежащих

к тому же общему типу, который образует тетрамеры у высших форм. В этом отношении гемоглобины круглоротых напоминают миоглобины. Несмотря на то что цепи молекул гемоглобина миноги обычно не образуют более сложных молекулярных единиц, цепи гемоглобина этих животных существуют в нескольких модификациях [5]. Очевидно, ассоциация цепей гемоглобина друг с другом возникла в процессе эволюции как следствие многообразия их форм. Этот вывод подтверждается существованием у всех индивидуумов миоглобинов различных типов [21, 83, 84, 85], хотя пептидные цепи миоглобина обычно не ассоциируются с образованием молекулярных единиц более высокого порядка. Для беспозвоночных доказательство присутствия в растворе димеров миоглобина было получено Мэнвеллом [58, 59]. В настоящее время можно, по-видимому, экстраполировать такого рода наблюдения на полипептиды и белки и вообще ожидать, что самые разнообразные белки и полипептиды могут сосуществовать в организме в виде различных по структуре форм. Некоторые из них могут синтезироваться в одних и тех же клетках, как, например, в случае гемоглобина плода и гемоглобина взрослого [39, 47]; другие могут производиться различными тканями. Это обобщение можно сделать на основании ряда работ, в том числе работ Маркерта и Мёллера [61], а также Каплана и др. [46]. Последние авторы показали, что как у позвоночных, так и у беспозвоночных дегидрогеназы молочной кислоты, выделенные из различных тканей одного и того же животного, отличаются друг от друга. По аналогии с гемоглобином можно предположить, что для большинства типов белков, кроме главных компонентов, сменяющих друг друга по мере развития животного или существующих в различных тканях, в каждом организме будут найдены минорные компоненты различной структуры. Роль этих компонентов, вероятно, незначительна с точки зрения функции, но не с точки зрения эволюции. Молекулярные болезни, несомненно, связаны только с количественно преобладающими главными компонентами. Отсюда вытекает, что чем больше роль минорных компонентов в эволюции, тем меньшую роль играют в эволюции молекулярные болезни.

Если эта картина верна, а это, вероятно, так и есть, то количество различных белков в человеческом организме, которое (по подсчету Полинга) равно примерно 100 000, должно быть еще умножено на какой-то коэффициент, величина которого в настоящее время неизвестна.

Необходимо отметить, что некоторые минорные компоненты гемоглобина, по-видимому, не отличаются по последовательностям аминокислот от какого-либо из главных компонентов [43]. Некоторые из них возникают, очевидно, в результате вторичного соединения с какой-либо другой молекулой, например молекулой глутатиона [68]. Другие могут быть продуктами окисления или денатурации, а также представлять собой артефакты, связанные с хроматографией, или возникать в результате необычных комбинаций цепей димеров или мономеров или в результате образования полимеров гемоглобина. Наконец, остается возможность (хотя еще экспериментально и не подтвержденная) того, что некоторые минорные компоненты имеют измененную последовательность аминокислот не в результате мутации соответствующего гена, а в результате «ошибок» при синтезе нормальных цепей гемоглобина [72].

Рассматривая различные по своей структуре цепи гемоглобина человека, мы можем разделить их на две группы. В одной из групп цепи отличаются друг от друга более чем по одной аминокислоте. Так, при сравнении  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей число различных изменений варьирует примерно от 6 до 80 (рассчитано по [10, 11, 37, 48, 89]). Было обнаружено,

что все эти различные по своей структуре цепи синтезируются под контролем различных генетических локусов [14, 15, 37, 40, 92]. Все эти формы присутствуют у всех здоровых людей. Во второй группе мы находим цепи, которые отличаются друг от друга лишь по одной аминокислоте. Во всех исследованных до сих пор случаях было обнаружено, что ген, который детерминирует такую цепь, является аллелем гена, детерминирующего очень похожую цепь. Каждый из этих различных аллелей встречается только у небольшой части населения в различных районах мира. Это аномальные гемоглобины. Некоторые из них остаются незамеченными их носителями, тогда как другие в гомозиготном состоянии приводят к явным молекулярным болезням (см., например, [34, 40, 42, 69]). Конечно, могут быть открыты и цепи, отличающиеся более чем по одной аминокислоте и вместе с тем контролируемые аллельными генами, однако они будут, по-видимому, составлять незначительное меньшинство; как будет ясно позднее, следует ожидать, что цепи, в которых имеется более чем одно мутационное изменение, обычно контролируются различными генетическими локусами.

Вместе с тем у разных видов гемоглобиновые цепи, обусловленные соответствующими генетическими локусами, могут значительно различаться по своим аминокислотным последовательностям. Конечно, это только предположение, поскольку мы не знаем способов сравнения генетических локусов различных видов. Например, существует, по-видимому, различие в двух участках между  $\alpha$ -цепями гемоглобина человека и гориллы [98], и все же у нас нет никаких оснований предполагать, что генетические локусы, контролирующие их синтез, не гомологичны.

Можно предположить, однако, что, в то время как у разных видов заметно различающиеся гемоглобиновые цепи, вероятно, очень часто контролируются гомологичными локусами (т. е. генами, аллельность которых можно было бы доказать, если бы соответствующие межвидовые гибриды были плодовиты), в пределах одного вида большее различие между цепями связано с большей независимостью генетического детерминирования. В связи с этим можно отметить, что гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, наиболее сильно отличающиеся друг от друга у данного вида, оказывается, находятся в разных хромосомах или по крайней мере не имеют тесной связи [92], в то время как гены  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей, которые наиболее близки друг к другу, по-видимому, сцеплены между собой [15].

### Эволюция цепей гемоглобина

Вышеупомянутые наблюдения сразу становятся понятными, если допустить, что с течением времени гены, ответственные за синтез цепей гемоглобина, дублируются, причем потомки дубликатных генов мутируют независимо друг от друга и дубликаты распределяются в различных частях генома посредством транслокаций. Можно думать, что именно так возникают из первоначального материнского гена различные неаллельные гены. Так как эффективные аминокислотные замещения, следует ожидать, что гены, связанные общим предшественником, но не сцепленные, будут отличаться друг от друга целым рядом мутационных изменений, что и соответствует наблюдениям. Идеи такого рода были развиты Бриджесом [13], Метцом [62], а главным образом Льюисом [53]; они были недавно применены для анализа эволюции гемоглобина Итано [40], успешно развиты Ингрэмом [35] и детально разработаны совершенно независимо нами в 1960 г. Представляется весьма вероятным, что *внутривидовое* многообразие белков данного

типа должно объясняться именно таким образом. Значительные *межвидовые* различия между белками определенного типа могут быть совместимы, о чем уже упоминалось ранее, с гомологией генетических локусов, причем не требуется предположения о дупликации генов. Дивергенция признаков у различных видов отражает, по-видимому, такой же процесс, происходящий с гомологичными локусами.

В настоящее время мы можем судить о гомологичности структуры цепей лишь по наличию соответствия между аминокислотными последовательностями в цепях различных гемоглобинов. Наличие такой гомологии, межвидовой или внутривидовой, указывает на общее эволюционное происхождение молекул гемоглобина. Можно выдвинуть и противоположную гипотезу, согласно которой существующие цепи гемоглобина есть результат конвергентного развития под действием отбора функционально наиболее выгодных цепей. Хотя конвергенция может играть значительную роль, эта роль скорее всего не выходит за рамки относительно немногих черт аминокислотной последовательности. Общее сходство должно быть отражением эволюционной истории. На это указывает постепенно возрастающее число различий при последовательном сравнении гемоглобина человека с гемоглобинами организмов все более отдаленных видов [64, 98]. Различие между гемоглобинами человека и рыбы таково, что изучение триптических гидролизатов гемоглобина с помощью электрофореза и хроматографии не выявило никакого сходства, за исключением наличия в обоих случаях свободного лизина. Отсутствие общих свойств, обнаруживаемых этими методами, хотя и не означает отсутствия значительных по протяженности участков со сходной аминокислотной последовательностью, но все же качественно отражает степень различия. Подобный результат был получен также при сравнении инсулина млекопитающих и рыб [97]. Инсулин в целом, по-видимому, менее изменчив, чем гемоглобин, даже если учесть его меньший молекулярный вес.

Беря другой крайний случай, можно сравнить гемоглобины человека и гориллы. Аминокислотный анализ изолированных пептидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина гориллы и человека показывает, что между этими гемоглобинами имеются только два различия в  $\alpha$ -цепях и одно в  $\beta$ -цепях. Аминокислотный анализ отдельных пептидов, полученных действием трипсина на гемоглобин гориллы, закончен только на две трети, однако до сих пор не обнаружено каких-либо дополнительных изменений. Возможно поэтому, что  $\beta$ -цепь гемоглобина гориллы и нормальная и аномальная  $\beta$ -цепи гемоглобина человека образуют одну общую популяцию. (Как упоминалось ранее, аномальные цепи человека отличаются от нормальных только по одной аминокислоте.) Поэтому можно считать, что если бы  $\beta$ -цепь гемоглобина гориллы присутствовала у человека, то это не выразилось бы в молекулярной болезни. Окислительные свойства гемоглобина должны быть довольно близкими у этих двух видов, столь сходных в других отношениях. Таким образом, присутствие  $\beta$ -цепи гемоглобина гориллы у человека, вероятно, осталось бы незамеченным врачами. Более того, ее присутствие нельзя было бы обнаружить обычными методами, так как отличие ее от  $\beta$ -цепи гемоглобина человека (вероятно, оно состоит в замене остатка лизина аргинином), видимо, слишком мало. И обратно, возможно, что  $\beta$ -цепи, характерные для человека, встречаются также у некоторых горилл.

Можно ожидать, что некоторые цепи гемоглобина, одновременно существующие у одного индивидуума, отличаются друг от друга в той же или даже большей степени, чем соответствующие цепи у самых далеких друг от друга видов позвоночных. Хотя  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи гемоглобина человека разли-

чаются довольно незначительно, однако это различие гораздо больше, чем различие между  $\gamma$ -цепями гемоглобина гориллы и человека. Поэтому гемоглобин взрослого человека гораздо ближе к гемоглобину взрослой гориллы, чем к гемоглобину плода человека. Морфологические наблюдения также доказывают эту взаимосвязь, существование которой ныне подтверждается и на биохимическом уровне.  $\alpha$ -Цепь гемоглобина человека значительно сильнее отличается от его  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей, чем эти последние отличаются друг от друга. Тем не менее сходство  $\alpha$ -цепи с другими цепями поразительно. Когда в результате работы лаборатории Брауничера стала известна последовательность первых 30 аминокислот  $\beta$ -цепи, наши знания о строении  $\alpha$ -цепи ограничивались знанием аминокислотных последовательностей в пептидах, полученных с помощью гидролиза трипсином [89]. Последовательность этих пептидов вдоль  $\alpha$ -цепи не была известна. Накладывая их на  $\beta$ -цепь так, чтобы получалась максимальная гомология, удалось предсказать расположение первых 31 остатков  $\alpha$ -цепи. Позднее это было непосредственно подтверждено Брауничером и др. [12]. Это впервые показало, что даже в случае значительно различающихся цепей принцип гомологии может эффективно действовать.

Можно весьма приближенно оценить время, прошедшее с тех пор, как имеющиеся у данного вида две гемоглобиновые цепи, детерминируемые неаллельными генами, образовались от общего предка. Исходным материалом для такой оценки служат: число различий между этими цепями, число различий между соответствующими цепями у различных видов животных, а также геологический период, в котором мог жить общий предок интересующих нас разных видов. Недавно Брауничер и Матсуда [9] обнаружили, что существует по меньшей мере 15 различий в последовательностях  $\alpha$ -цепей гемоглобина человека и лошади. (Был проанализирован только один из двух главных компонентов гемоглобина лошади.) Вряд ли в результате дальнейших исследований число найденных изменений удастся увеличить. Если допустить, что истинное число различий лежит между 15 и 20, то можно считать наиболее вероятным средним значением 18 различий. По данным палеонтологии, общий предок человека и лошади жил в меловом или, быть может, в юрском периоде, т. е. примерно 100—160 млн. лет назад [20, 76]. При расчете принимается, что наиболее эффективные мутации приводят к замещению одной аминокислоты, как это показано для аномальных гемоглобинов человека, и что частота эффективных мутаций, т. е. частота мутаций, которые не элиминируются естественным отбором, флуктуирует в течение эволюции гемоглобина вокруг некоторого среднего значения, не обнаруживая сколько-нибудь явной тенденции к увеличению или уменьшению. При этих условиях наличие 18 различий между  $\alpha$ -цепями гемоглобина человека и лошади указывает на то, что каждая цепь претерпевает в среднем 9 эффективных мутаций за 100—160 млн. лет. Это соответствует 11—18 млн. лет на одно аминокислотное замещение в цепи, состоящей примерно из 150 аминокислот (в среднем 14,5 млн. лет). Наши результаты для гемоглобина гориллы дают несколько иные цифры. Вследствие возможности значительных флуктуаций в тех случаях, когда число эволюционно эффективных мутаций было очень мало, по-видимому, целесообразно использовать значение, полученное лишь для  $\alpha$ -цепей гемоглобина лошади. Когда станут известны аминокислотные последовательности гемоглобиновых цепей многих животных и палеонтологические данные будут уточнены, расчет придется пересмотреть. Необходимо также до некоторой степени пересмотреть данные о числе различий между цепями гемоглобина человека, особенно сравнение  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей, основанное на результатах

Шредера и др. [89], Шредера и Шелтона (личное сообщение, 1961) и Ингрэма и Стреттона [37].

Таблица 1

## Время происхождения различных цепей гемоглобина от их общего предка

Сравниваемые цепи	Число различий *	Предполагаемое время происхождения от общего предка	Соответствующий геологический период
$\beta$ - и $\delta$ -Цепи	~6	44·10 <sup>6</sup> лет	Эоцен
$\beta$ - и $\gamma$ -Цепи	~36	260	Начало каменноугольного периода
$\alpha$ - и $\beta$ -Цепи	78	565	Ближе к концу докембрийского периода
$\alpha$ - и $\gamma$ -Цепи	~83	600	Ближе к концу докембрийского периода
$\alpha$ -Цепь гориллы и человека	2	14,5	Плиоцен
$\beta$ -Цепь гориллы и человека	1	7,3	
		} в среднем 11	

\* Присутствие или отсутствие сразу нескольких смежных аминокислотных остатков в одной из цепей считается результатом одного мутационного изменения.

Момент разделения  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей (табл. 1) совпадает со временем происхождения приматов или несколько более ранним периодом. Это согласуется с тем, что до сих пор  $\delta$ -цепи обнаружены только у приматов [50]. Тем самым подтверждается, что по крайней мере для сравнительно недавно прошедших этапов эволюции такое представление, по-видимому, не противоречит истине. Кроме того, время происхождения человека и гориллы от их общего предка, составляющее (по расчетам, основанным на цифрах, полученных при исследовании гемоглобина человека и лошади) 11 млн. лет, совпадает с нижним пределом установленного палеонтологией интервала в 11—35 млн. лет.

Несомненно, по мере удаления в глубь времен неопределенность возрастает. Общий предок  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей гемоглобина существовал в начале каменноугольного периода, т. е. в эпоху распространения первых амфибий. Различия между эмбриональным и взрослым гемоглобинами были обнаружены у современных рыб [56, 57]. Возможно, что эти измененные гемоглобины появились в результате дубликации генов, независимой от той дубликации, которая привела к образованию  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей.  $\alpha$ - и  $\beta$ -Цепи настолько различны, что в настоящее время их общего предка относят к докембрийскому периоду, предшествовавшему по времени началу эволюции позвоночных. Различие между  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепями примерно такое же, как и различие между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями. Если наши цифры не завышены, то, по-видимому, можно предположить, что гемоглобин позвоночных с различиями в его полипептидных цепях произошел от гемоглобина беспозвоночных. Таким образом, предки современных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей должны были присутствовать в виде уже дифференцированных цепей у тех примитивных позвоночных, у которых цепи гемоглобина, вероятно, еще не ассоциированы в тетрамеры, как, например, у современных круглоротых, о которых уже говорилось. В пользу этого свидетельствует обнаруженная Андинольфи и др. [5] гетерогенность гемоглобина у миноги.

Цифры, приведенные в табл. 1, также противоречат представлению о том, что соответствующие цепи, скажем  $\alpha$ -цепи и их гомологи у животных, у наиболее далеких друг от друга видов позвоночных должны отличаться друг от друга больше, чем  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи человека. Эти цифры также подтверждают предположение о том, что гемоглобин у позвоночных не возникал независимо у различных видов в ходе эволюции; по-видимому, даже наиболее примитивные предки позвоночных уже унаследовали свой гемоглобин от других форм.

Полипептидные цепи, явно не являющиеся гомологичными, как, например, цитохром *c* из сердца лошади и цепи гемоглобина млекопитающих, все еще могут иметь общего молекулярного предка в том смысле, в каком могли бы его иметь все белковые молекулы данного организма. Однако такой предок существовал в настолько далекие докембрийские времена, что сравнительные исследования на современных организмах не имеют сколько-нибудь значительных шансов обнаружить хотя бы некоторое сходство. Поэтому для всех практических целей будет правильным считать, что цитохром *c* из сердца лошади и цепи гемоглобина лошади возникли независимо. Лучшим оправданием попыток дать приведенные оценки служит то, что они дают нам случай указать, в чем лежит возможная причина их ложности. Источником ошибок являются некоторые факторы эволюции генов, о которых здесь говорить не стоит.

Мы не знаем, произошли ли современные главные компоненты гемоглобина от минорных компонентов. Роль минорных компонентов как переносчиков кислорода большей частью пренебрежимо мала. Если только они не имеют других, неизвестных нам функций, то естественный отбор не должен был оказывать на них никакого действия. Таким образом, все мутации, вероятно, должны сохраняться в форме минорных компонентов, пока не произойдет одно из трех возможных событий: 1) мутация, которая делает такой компонент совершенно отличным от цепей гемоглобина; 2) мутация, которая приведет к полному прекращению его синтеза, и, наконец, 3) мутационное изменение, которое преобразует его в основной компонент. Если предки преобладающих у человека цепей гемоглобина (т. е.  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей) возникли из минорных компонентов, то в течение того далекого периода они могли испытывать в единицу времени значительно большее число мутаций, чем мы предполагали. С этой точки зрения цифры, приведенные в табл. 1, могут быть завышенными.

Но в то же время эти цифры в силу целого ряда обстоятельств могут оказаться и заниженными. Цепи можно было бы сравнивать в том случае, если бы число возможных обратных мутаций, о которых мы ничего не знаем, было бы мало, так же как и число различных последовательных эффективных замещений в одном и том же аминокислотном фрагменте полипептидной цепи. Вероятность этих явлений увеличивается с ростом числа аминокислотных замещений в данной цепи. Таким образом, истинное число эффективных мутационных событий, происшедших с момента возникновения  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей из одного общего предка, может оказаться значительно большим, чем мы предполагаем.

Более того, даже если принять, что частота возникновения мутаций, свойственная генам, контролирующим синтез цепей гемоглобина, остается довольно постоянной на протяжении целых геологических периодов, невзирая на возможные влияния изменений температуры и интенсивности ионизирующего излучения, то эффективная частота мутаций может варьировать в широких пределах в зависимости от «экологических» условий среды внутри и вне организма. В частности, во время эволюционных переходных перио-

дов, таких, как, например, переход из воды на сушу, частота эффективных мутаций может стать гораздо выше, чем в другие периоды. Размер популяций на каждой стадии также имеет первостепенное значение в определении частоты эффективных мутаций. Необходимо также принять во внимание некоторые другие факторы, влияние которых столь же трудно оценить. К счастью, общий результат взаимодействия всех факторов выражается в скорости эволюции, которая и была оценена. Основной факт, который при этом выявился, состоит в том, что с течением времени эволюция ускоряется [77]. Возникшие позднее группы наземных животных развивались в среднем быстрее, чем более древние группы, обитавшие в воде. Следует ожидать, что это обобщение, основанное на морфологических характеристиках, находит свое отражение в скорости эволюции дезоксирибонуклеиновой кислоты и белков. Таким образом, на начальных этапах эволюции позвоночных молекулы гемоглобина испытывали в среднем меньшее число эффективных мутаций в единицу времени, чем в последующие периоды. Мы предполагаем, что числа, приведенные в табл. 1, скорее занижены, чем завышены.

В наших расчетах, приведенных выше, мы приравнивали одно мутационное событие к одному аминокислотному замещению в полипептидной цепи. Как упоминалось, имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что это наиболее часто встречающийся тип эволюционно эффективных мутаций генов гемоглобина. Однако еще слишком рано переносить этот вывод на структурные гены вообще. В нескольких лабораториях ведутся работы, имеющие отношение к этому вопросу, например исследования группы Яновского в Станфордском университете по триптофансинтетазе кишечной палочки, работа группы Френкеля-Конрата в Беркли на мутантах вируса табачной мозаики (ВТМ), группы Левинтала в Массачусетском технологическом институте — на щелочной фосфатазе кишечной палочки и, наконец, группы Бреннера при Кэвендишской лаборатории — на белке головки фага. Существуют многочисленные примеры мутаций, приводящих к иным последствиям, чем замена одной аминокислоты в полипептидной цепи. Ряд таких данных получен при сравнении самих  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина. В некоторых участках обеих цепей отсутствует по несколько смежных аминокислот — от 1 до 5 (или 6, если мы включим сюда же С-концевую последовательность миоглобина кашалота, которая, как уже говорилось, в своем роде уникальна). В основе наблюдаемых явлений могут, по-видимому, лежать три типа механизмов: рост концевой части цепи в случае различий в концевых участках цепи, делеции и, наконец, включения новых аминокислот («вставка»). Последние могут быть следствием дубликации участков цепи, связанной или не связанной с переворачиванием этих участков. Хотя явления, происходящие на уровне хромосомы или на уровне отдельной молекулы ДНК, могут быть качественно совершенно различными, нельзя не принимать в расчет возможности того, что явление, аналогичное включению в хромосому какого-либо удвоенного ее участка (впервые описано Стертевантом в 1925 г.), может происходить и в пределах одного структурного гена.

В  $\alpha$ -цепи по сравнению с  $\beta$ -цепью имеется два «пропуска» (по одной аминокислоте в каждом); в  $\beta$ -цепи по сравнению с  $\alpha$ -цепью — один «пропуск» из двух аминокислот и один «пропуск» из пяти аминокислот. Если каждый из них попытаться приписать единичному мутационному событию, то тогда из общего числа 78 мутаций, приведших к существующей в настоящее время разнице между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями, 4 мутации, то есть 5% общего числа, представляют собой делеции, включения и наращивания конца цепи. Если такие мутации бывают летальными чаще, чем замещения, что кажется вполне



вероятным, то возможно, что действительный процент мутаций, не связанных с замещением одной аминокислоты в полипептидной цепи, окажется намного выше.

Если такие «мутации замещения», какие до сих пор всегда находили в мутантных аллелях генов, контролирующих синтез цепей гемоглобина, происходят в гене, ответственном за синтез главного компонента, то либо они будут довольно быстро элиминированы, либо в конце концов они полностью заменят ген дикого типа. Подобным же образом «мутации замещения», вызывающие молекулярные болезни, либо будут элиминированы до того, как в таком мутанте успеет произойти вторая мутация, либо, если особые обстоятельства благоприятствуют выживанию гетерозигот, как, например, в случае гемоглобина серповидных клеток, такие замещения произойдут у очень немногих индивидуумов, так что появление второй мутации в том же самом локусе будет маловероятным. Для данного вида существуют лишь две возможности, при которых становится вероятным появление более чем одного различия между первоначально идентичными генами в результате повторного единичного замещения: 1) случай, когда гетерозиготное состояние во всех отношениях благоприятнее гомозиготы по гену дикого типа; это относится к гемоглобину серповидных клеток в местностях, где население постоянно болеет малярией; 2) случай, когда при дупликации гена измененная структура дубликатного гена по сравнению с исходным сама по себе не создает преимуществ при отборе; если считать, что дубликатный ген участвует в синтезе белка, то отбор будет благоприятствовать сохранению новой структуры лишь в том случае, если увеличение «выхода» соответствующей полипептидной цепи, происшедшее в результате удвоения гена, выгодно организму.

#### **Судьба дублицированных генов и значение множественности генов**

Допустив, что дупликация гена есть один из способов увеличения выхода данного белка, разграничим связанные с этим процессы на две фазы. До тех пор пока число дубликаций не достигло своего оптимального значения, будут избирательно сохраняться лишь такие копии, которые обладают структурой, идентичной материнскому гену, и расположены вблизи него. После того как число дубликатов превысило оптимальное, копии генов будут все сильнее подвергаться действию отбора. Часть таких генов вместе с их носителями будет уничтожена, а другая часть будет подвергаться постепенным изменениям. Судьба этих сохраненных и измененных генов может быть тройкой. Во-первых, они могут обуславливать новые полезные функции. В этом случае они останутся активными генами и в тех пределах, в которых выход полипептидов зависит от генных дубликаций, их собственные дубликаты не изменятся в процессе отбора. Во-вторых, нефункционирующие или не обладающие полезными свойствами дубликаты, в свою очередь дублицируясь (причем их дубликаты под давлением отбора будут устраняться), сами могут перемещаться в другие части хромосомы (транслокация), превратившись в силу эффекта положения в гены минорных компонентов. Некоторые из таких генов минорных компонентов, претерпевших тем временем более или менее значительные изменения, могут в ходе дальнейшей эволюции снова преобразоваться в гены главного компонента. В-третьих, активность такой копии гена может оказаться равной нулю.

Такая утрата активности гена в свою очередь может быть следствием трех причин: 1) измененный структурный ген может быть утрачен в резуль-

тате выпадения того участка хромосомы, где он находится; 2) он может измениться до такой степени, что его продукты, хотя и присутствуют в значительных количествах, не имеют ничего общего с первоначальным белком; 3) он может сохраниться в измененном состоянии, однако при этом он полностью или почти полностью теряет способность к выражению (неактивен).

Хотя существование таких «дремлющих генов» и трудно подтвердить, все же два рода фактов, возможно, свидетельствуют об этом. Во-первых, в пользу этого предположения говорит то, что в некоторых тканях, например в кроветворной, были найдены главные и минорные структурно различные компоненты полипептидной цепи данного типа. Так как в любой данный момент относительное содержание отдельных цепей гемоглобина варьирует от 100 до 1%, то другие генетически отличные минорные компоненты могут присутствовать в таких малых количествах, что они практически необнаружимы. Во-вторых, существуют многочисленные примеры белков, синтезирующихся исключительно в тканях одного типа, причем в других тканях ныне имеющимися аналитическими методами не удается обнаружить даже следы таких белков. Одним из таких примеров служит неспособность мышечных клеток синтезировать гемоглобин и неспособность ретикулоцитов синтезировать миоглобин. Этот пример показывает, что одни структурные гены внутри данной ткани обладают значительной способностью к выражению, тогда как другие (даже близкие к ним) — вовсе не выражаются. (Мы должны допустить, что все структурные гены в процессе эмбрионального развития были переданы всем клеточным линиям.) Вследствие всего этого весьма вероятно, что в каждом организме имеется много структурных генов, которые ни в одной из тканей этого организма не находят условий, благоприятных для своего выражения. Таким образом, эти гены остаются все время «дремлющими».

Более того, относительное структурное сходство минорных компонентов гемоглобина с одним из главных его компонентов дает возможность привести еще один аргумент в пользу существования «дремлющих» генов. В самом деле, как мы уже видели,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина человека очень сходны. Структурно различные компоненты гемоглобина орангутана также оказались очень сходными. То же самое справедливо и для компонентов гемоглобина свиньи (Цукеркандль, Джонс, Нишиваки и Полинг, 1959—1961, неопубликованные данные). Если бы получившиеся в результате дубликации гены, как правило, были бы выражены, то можно было бы надеяться найти ряд цепей минорных компонентов, столь же отличающихся от других цепей, как различаются между собой  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина человека. Однако это не так. Остается предположить, что дубликаты генов для минорных компонентов очень часто оказываются лишенными способности к выражению. Нет никаких оснований полагать, что в большинстве случаев они отсутствуют. Другие возможности заключаются в том, что они подверглись транслокации, что произошла мутация или перенос регулирующего элемента (репрессора) или что структурно измененный в результате мутации ген приобрел специфические свойства, не согласующиеся с теми специфическими требованиями для синтеза полипептида, которые имеют место в клетке.

Конечно, «дремлющие» гены являются таковыми только в отношении функционирования, но не в отношении мутабельности. Мутации «дремлющих» генов и генов минорных компонентов никогда не будут летальными; мутация гена минорного компонента может, однако, оказаться летальной, если этот ген несет какие-то специфические функции, так что мы можем рассматривать его как ген главного компонента иного типа белка. Таким

образом, гены минорных компонентов и в основном «дремлющие» гены могут поставлять природе значительную, а возможно, и основную часть генетического сырья для ее эволюционных экспериментов на организмах. Новая транслокация, перенос регулирующего элемента, вроде описанного Мак-Клинток [55], или же некоторые другие генетические изменения могут реактивировать «дремлющий» ген спустя очень длительный промежуток времени, в течение которого ген был настолько изменен мутациями, что стал теперь производить белок другого типа. Таким образом могут возникать новые ферменты с новыми функциями без соответствующей потери старых ферментов со старыми функциями. Выше мы подчеркивали значение для эволюции утраты тех или иных функций в результате мутации активных генов. Но ясно, что эволюция не может основываться на одних лишь потерях и молекулярных болезнях. В настоящее время существует значительно большее число различных функций, осуществляемых множеством гораздо более разнообразных ферментов, чем, по-видимому, могло существовать на ранних ступенях эволюции. Первичные живые системы характеризовались несколькими простыми функциями. Представление об эволюции в целом складывается из рассмотрения эволюции, связанной с приобретениями, равно как и эволюции, связанной с потерями.

Важный вклад в наши представления об эволюции ферментов внес Горовиц [29]. Он описал, как в определенных условиях в результате случайного сочетания необходимых генов могут возникать новые реакционно-способные цепи, и предложил общий механизм, по которому шаг за шагом могут строиться сложные ферментные системы, дав нам возможную схему макроэволюции на молекулярном уровне. Ясно, что чем сложнее ферментная система, тем больше число необходимых ферментных молекул. Есть причины считать, что одна и та же молекула не может осуществлять несколько различных ферментных функций. Поэтому возникновение новых функций обусловлено возникновением новых генов. Здесь представление о мутационной реактивации «дремлющих» генов дополняет картину Горовица. Хотя для генов минорных компонентов подобная роль и не исключена, однако они обычно еще не отличаются от породивших их генов настолько, чтобы они могли осуществлять новые функции. Большая часть генов минорных компонентов, как было установлено выше, должна в конце концов преобразоваться в «дремлющие» гены вследствие того, что естественный отбор не будет мешать ни их переходу в неактивные в отношении синтеза области хромосом, ни их попаданию под влияние гена-репрессора, ни структурным изменениям, которые могут освободить ген от специфического влияния макромолекул, участвующих наряду с геном в синтезе белка. Когда после длительных периодов неактивного существования, возможно соответствующих геологическим эпохам, «дремлющие» гены реактивируются, они могут оказаться способными производить ферменты, которые не нарушают существующих цепей реакций и в то же время приводят к новым дополнительным процессам, возможно, теми путями, которые были описаны Горовицем. Один из возможных механизмов реактивации «дремлющих» генов состоит в реактивации участка хромосомы, в котором этот ген расположен, в результате изменения внутриклеточной среды. Можно надеяться, что таким способом удастся продемонстрировать существование «дремлющих» генов. Такое изменение внутриклеточной среды может возникнуть при адаптации организма к изменениям во внешней среде. При адаптивных изменениях в течение начальной фазы мутации, связанные с приобретением или утратой функции, могут быть сбалансированы. Но могут происходить и одни лишь мутации, связанные с утратой; поэтому общая сложность орга-

низма либо не изменяется, либо уменьшается. Однако при этих процессах в некоторых тканях может измениться среда, окружающая хромосомы, в результате чего гены окажутся активированными в одних частях хромосомы и инактивированными в других. Такого рода инактивации будут в большинстве своем летальны, и в процессе отбора сохранятся лишь те геномы, у которых соответствующие участки хромосом окажутся устойчивыми к инактивации. Вместе с тем вновь активированные гены будут способны участвовать в адаптации и будут снабжать организм мутациями, связанными с приобретением функции, причем эти мутации не будут сопровождаться соответствующими мутациями, связанными с потерей функции. Эта концепция частично подтверждена непосредственными наблюдениями. Изменения конформации молекул генной ДНК, по-видимому, связаны с изменениями активности генов, причем Шмитт [87] показал, что состояние хромосомной ДНК зависит от химического окружения хромосом. Кроме того, было обнаружено, что у мыши гены, активность которых одинакова на протяжении всей жизни животного, тесно сцеплены в одной хромосоме.

Поскольку «дремлющие» гены могут реактивироваться в результате изменения внутриклеточной среды, начальный сильный адаптационный стресс, по-видимому, служит тем инструментом, который природа использует для увеличения сложности организма. Таким образом, был разрешен старый парадокс, заключающийся в следующем вопросе: почему организмы стремятся стать более сложными, если и более простые организмы, по-видимому, столь же хорошо приспособлены к окружающей среде? Биология еще раз показала, что это может быть осуществлено без участия какой-либо «жизненной силы», или «энтелехии».

Приведенная концепция заставляет предположить, что наиболее быстрая эволюция к более высокоорганизованным формам должна наступать после возникновения крупных изменений окружающей среды. История эволюции подтверждает это предположение. Палеонтологи давно уже заметили, что начальные фазы развития форм новых типов носят характер «взрыва» (см., например, [77]). В согласии с настоящей теорией мы полагаем, что такая взрывная эволюционная фаза началась с изменения внутриклеточной среды, что привело к реактивации большого числа генов, ранее находившихся в неактивном состоянии («дремлющие гены»). Ренш считает, что явление эволюционного «взрыва» объясняется усиленным естественным отбором, сопровождающим завоевание новых биотопов. Таким образом, движущей силой эволюции он считает только изменение внешней среды. Этим, однако, нельзя объяснить, почему эволюция направлена в сторону возрастания сложности.

Резюмируя, можно сказать, что мутации активных генов, детерминирующих главные белковые компоненты, позволяют объяснить, как организм может приспособиться к изменениям среды. Мутации же генов минорных компонентов и мутации «дремлющих» генов, по-видимому, снабжают организм генетическим сырьем, что в итоге позволяет организму не только приспособиться к новой среде, но также стать более высокоорганизованным. Гены минорных компонентов и «дремлющие» гены могут, таким образом, подготавливать главные шаги эволюции.

Многообразие наблюдается не только у минорных компонентов. Белки главного компонента также могут быть весьма многообразны, особенно в том случае, когда это связано с определенной последовательностью главных компонентов во времени. Почему  $\gamma$ -цепи гемоглобина замещаются  $\beta$ -цепями? Причина заключается не в том, что  $\beta$ -цепи не способны обеспечи-

вать дыхание в период внутриутробной жизни, а  $\gamma$ -цепи не отвечают требованиям зрелого организма. Скорее всего дело в том, что структурные гены, соответствующие этим двум цепям, локализованы в двух различных участках хромосомы. Один из этих участков активируется в условиях внутриклеточной среды, существующих на ранних стадиях развития организма, тогда как другой участок хромосомы, напротив, активируется только в конце эмбрионального развития благодаря наличию или отсутствию в это время в клетке некоторых специфических факторов.

Итак, для осуществления данной функции клетке недостаточно только присутствия необходимого структурного гена. Следующее необходимое условие состоит в том, что ген либо должен быть локализован в таком участке хромосомы, который остается активным, несмотря на изменения внутриклеточной среды, происходящие в процессе развития, как это имеет место для гена  $\alpha$ -цепи гемоглобина, либо должны существовать несколько копий гена, каждая из которых расположена в участке хромосомы, сохраняющем активность лишь на определенных стадиях развития. Эти копии должны быть распределены по геному таким образом, чтобы в любой момент развития по крайней мере один из них находился «на посту». Эти гены никогда не будут одинаковыми, хотя и можно предположить, что они возникли путем дупликации одного и того же исходного гена. В самом деле, транслокация — явление, по-видимому, явно более редкое, чем аминокислотное замещение; поэтому следует ожидать, что транслоцированные гены будут отличаться друг от друга более, чем заменой одной аминокислоты.

Таким образом, для осуществления одних и тех же жизненных функций часто необходимо иметь несколько «изданий» генов данного типа, расположенных в нескольких участках генома. Эти участки последовательно активируются и инактивируются в отношении способности синтезировать белки. Эта идея выдвигается для объяснения большинства самых важных типов многообразия белков «главного компонента». С одной стороны, существуют различные последовательные «издания» данного белка для эмбриона и для взрослого организма, а с другой — различные «издания», обнаруживаемые одновременно, но в разных тканях одного и того же животного. О последнем типе гетерогенности белков уже упоминалось ранее; такую гетерогенность можно объяснить аналогичным образом. В каждой ткани специфическая внутриклеточная среда создает различные условия для распределения активных и неактивных участков генома. Это приводит к тому, что в разных тканях находятся «на посту» различные дубликаты данного гена, рассматривающиеся, таким образом, как результат различных транслокаций.

В итоге получается, что неизбежное изменение внутриклеточной среды на протяжении эмбрионального развития бросает вызов самому эмбриональному развитию вследствие необходимости синтеза многих жизненно важных белков во время этого изменения и невзирая на это изменение. Поэтому можно осмелиться заявить, что без дупликации генов, сопровождаемой их транслокацией, не было бы и эмбрионального развития. Согласно этой теории, генетическое сырье как для эволюции, так и для онтогенеза возникает в результате одних и тех же явлений.

Конечно, имеются гены и других типов, которые активно участвуют в синтезе белков только на протяжении какой-либо одной стадии онтогенетического развития. Определенные функции, например, развиваются только в зрелом организме. Задержка или ускорение их проявления приводят к педоморфозу или палингенезу (см., например, [77]). Можно предположить, что явления такого типа, протекающие в хромосомах, лежат в основе также и этих процессов.

После детального разбора причин и роли множественности генов, особенно в связи со структурной гетерогенностью гемоглобина, мы должны здесь указать, что существует предел гетерогенности гемоглобина, по крайней мере в том, что касается ее фенотипического проявления. Мы находимся на пути установления факта всеобщего внутривидового многообразия структуры у белков всех типов. Обнаружение этого может оказаться важным шагом вперед в понимании сущности биологических процессов. Однако этот шаг связан с отказом от прежних предположений относительно гетерогенности белков. Это привело к постулированию существования непрерывного спектра структурных вариантов для каждого белка. Тогда предполагаемый аминокислотный состав белка был бы лишь усредненным составом и белки не существовали бы как строго определенные химические образования. Исследования последних лет показали, что, за исключением незначительного числа возможных «ошибок» при синтезе, химические формулы белков столь же строго определены, как и формулы простых молекул. Мы не можем больше соглашаться с Холденом и Пристли, которые писали в 1935 г.: «Каждый индивидуум, по-видимому, имеет ему одному присущий гемоглобин, так же как он имеет ему одному присущий нос». Изучение аминокислотных последовательностей цепей гемоглобина человека у различных индивидуумов, проведенное Брауницером в институте Макса Планка в Мюнхене, Шредером в Калифорнийском технологическом институте, Хиллом и Конигсбергом в Рокфеллеровском институте, а также сравнение триптических гидролизатов различных гемоглобинов человека [32] показывают, что дело обстоит совсем иначе. Конечно, по-видимому, производится большее число различных цепей гемоглобина человека, чем известно в настоящее время. Это особенно справедливо в отношении аномальных человеческого гемоглобинов, из которых до сих пор описано около тридцати; этот перечень, вероятно, никогда нельзя будет считать законченным. Это справедливо также и для нормальных цепей гемоглобина человека, детерминируемых неаллельными генами, известное число которых в итоге может несколько увеличиться.

Некоторые исследователи идут в этом отношении дальше, считая, что в популяции существует ряд еще не обнаруженных аллельных генов гемоглобина. Некоторые цепи, соответствующие разным аллелям, могут казаться идентичными, если они ведут себя одинаково при электрофорезе. Тем не менее они могут различаться незаряженными аминокислотами. Полинг и Итано [40] предложили эту идею в качестве возможного объяснения подавления синтеза гемоглобина при молекулярной болезни, известной под названием талассемии. Изменения в структурных генах действительно могут привести к подавлению и даже к полной утрате способности синтезировать белок. Ингрэм и Стреттон [36] развили эту идею в качестве одного из возможных объяснений талассемии. Теперь кажется невероятным, чтобы такие скрытые мутанты были широко распространены среди обычных популяций. Поразительное сходство между цепями гемоглобина человека и гориллы — еще одно свидетельство против такой точки зрения. За исключением одного различия, касающегося остатка серина в одной из цепей, все другие незаряженные аминокислоты могут быть у обеих цепей одинаковыми. Это сходство доказывает, что структурные варианты цепей гемоглобина, не являющиеся патогенными и потому с трудом обнаружимые, по-видимому, встречаются весьма редко, если не принять, что человек чаще похож на гориллу, чем на своих собратьев. В общем эта гипотеза подтверждается большим числом наблюдений, чем большинство биологических теорий.

### ТРИ ТИПА МОЛЕКУЛЯРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Рассмотрев молекулярные болезни и изменчивость генов в связи с эволюцией, мы можем теперь перейти к рассмотрению изменчивости генов в связи с молекулярными болезнями. Молекулярные болезни можно разделить на три типа. Мутации могут, во-первых, нарушать функции молекул, во-вторых, мешать адаптации молекулы к внутриклеточной среде и, в-третьих, уменьшать необходимую скорость синтеза молекул. При анализе мутантов гемоглобина мы сталкиваемся с примерами всех трех типов.

#### Нарушение функции

Единственными известными изменениями в аминокислотной последовательности, непосредственно приводящими к нарушению окислительной функции гемоглобина, являются изменения, приводящие к образованию гемоглобинов, в совокупности называемых HbM. Все они характеризуются образованием метгемоглобина, в котором железо окислено до трехвалентного [23]. Недавно было показано, что некоторые определенные мутации вызывают образование аномального метгемоглобина [22]. Структурные исследования показали, что все аминокислотные замещения, приводящие к образованию HbM, расположены в определенном участке полипептидных цепей гемоглобина. Этот участок был назван «основным центром», так как он включает в себя относительно много аминокислот, обладающих основными свойствами. Мы можем назвать его «основным центром I», чтобы отличить его от второго основного центра, находящегося дальше по цепи. Оба основных центра сходны в том отношении, что содержат гистидин, который, по-видимому, связан с атомом железа гема. Предполагается, что главная связь железа гема с глобином осуществляется гистидином «центра II», а гистидин «центра I», по имеющимся сейчас данным [96], расположен против шестой координационной связи железа, той, которая связывает кислород в окисленном и воду в восстановленном состоянии [27]. Может быть, второй гистидин — это тот, о котором упоминали Конант [16], а также Кориэлл и Полинг [18]. Табл. 2 иллюстрирует изменчивость некоторых деталей последовательности и постоянство других ее черт в пептидном участке вблизи «центра I» у различных видов животных. Приводятся также мутации гемоглобина человека, затрагивающие этот пептидный участок. Соответствующие результаты относительно «центра II» еще не появлялись.

В табл. 2 приведены 56—62-й аминокислотные остатки  $\alpha$ -цепи и 61—67-й остатки  $\beta$ -цепи, считая от N-конца. Видно, что в некоторых нормальных дыхательных пигментах могут быть замещены три из семи остатков. Кроме того, некоторые изменения, как видно на примере  $\alpha$ -цепи гемоглобина быка и одной из цепей гемоглобина орангутана, могут заключаться в замене кислотной аминокислоты на нейтральную. При этом функция гемоглобина не нарушается сколько-нибудь значительно. Несомненно, следует ожидать, что такие замещения влияют на один или несколько физических параметров окисления. Уменьшение щелочных свойств этого пептидного участка еще заметно в миоглобине кашалота. Если в обоих типах цепей гемоглобинов человека, гориллы, шимпанзе, быка и лошади и в одной из цепей гемоглобина орангутана, а также в  $\beta$ -цепи гемоглобина овцы и козы находятся четыре основных аминокислоты из семи, показанных в таблице, то в миоглобине кашалота, наряду с начальным лизином, остается лишь гистидин, расположенный против геминовой группы. Как показывает исследование триптических гидролизатов [99], у различных видов рыб соответствующий пептид также

Таблица 2

Цепи гемоглобина, различающиеся по последовательности аминокислот «центра I» от  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепей человека

Цепь гемоглобина	Последовательность аминокислот	Источник данных
$\alpha$ -Цепь, человек, норма	-лиз-гли-гис-гли-лиз-лиз-вал-	[89]
$\beta$ -Цепь, человек, норма	-лиз-ала-гис-гли-лиз-лиз-вал-	[12]
$\alpha$ -Цепь, человек, Норфолк	-лиз-асп-гис-гли-лиз-лиз-вал-	[6]
$\beta$ -Цепь, человек, М <sub>Милуоки</sub>	-лиз-ала-гис-гли-лиз-лиз-глу-	Джеральд и др., личное сообщение
$\alpha$ -Цепь, человек, М <sub>Бостон</sub>	-лиз-гли-тир-гли-лиз-лиз-вал-	То же
$\beta$ -Цепь, человек, М <sub>Эмори</sub>	-лиз-ала-тир-гли-лиз-лиз-вал-	» »
$\beta$ -Цепь, человек, Цюрих	-лиз-ала-арг-гли-лиз-лиз-вал-	[65]
$\alpha$ -Цепь, бык	-лиз-гли-гис-гли-ала-лиз- (или арг)	[64]
$\alpha$ -Цепь, овца	-лиз-гли-гис-гли-глу-лиз- (или арг)	[64]
$\alpha$ -Цепь, коза	-лиз-гли-гис-гли-глу-лиз- (или арг)	[64]
$\alpha$ -Цепь, лошадь	-лиз-ала-гис-гли-лиз-лиз-	[9]
$\alpha$ - или $\beta$ -цепь, орангутан	-лиз-асп-гис-гли-лиз-лиз- (или глу)	Бальони, личное со- общение
Миоглобин кашалота	-лиз-вал-гис-гли-илей-глу-вал- (или глу)	[21, 96]

содержит меньше основных аминокислот, чем пептид человека. Однако до сих пор не обнаружено изменений в четырех аминокислотных остатках ни у одного из нормальных дыхательных пигментов. Это может означать, что они существенны для окислительной функции.

Во всех известных до сих пор случаях образование метгемоглобина у человека вызывается замещениями двух различных остатков, причем одно из этих замещений было обнаружено и в  $\alpha$ -, и в  $\beta$ -цепях. У НбМ<sub>Милуоки</sub> замещен валин в четвертом положении в сторону С-конца от гистидина, который предположительно связан с железом гема. У двух других типов НбМ—НбМ<sub>Бостон</sub> и НбМ<sub>Эмори</sub> — именно этот остаток гистидина замещен тирозином. Однако замена этого остатка гистидина другой аминокислотой не обязательно приводит к метгемоглобинемии, поскольку эта болезнь не была обычным симптомом в семьях, характеризующихся Нб<sub>Цюрих</sub> [28], хотя окисление этого гемоглобина происходит, по-видимому, легче. В Нб<sub>Цюрих</sub> данный гистидин замещен аргинином. Таким образом, в защите железа гема от окисления основные свойства гистидина, по-видимому, более существенны, чем его специфическая структура. Значительно большее родство к тяжелым металлам у гистидина по сравнению с аргинином, вероятно, также не имеет существенного значения [1].

Так как участок «центра I», по-видимому, представляет собой часть  $\alpha$ -спирали, как в случае соответствующего участка в миоглобине кашалота (спиральный участок E) [96], то на такой спирали четвертый остаток после определяющего гистидина как раз должен лежать вслед за этим участком. Вероятно, кислый остаток, находящийся в этом положении, в случае



Hb<sub>Милуоки</sub> нарушает функцию гистидина. И так, все до сих пор проанализированные типы HbM, по-видимому, характеризуются изменением того участка, где должен быть расположен определяющий остаток гистидина. Вместе с тем аспарагиновая кислота, заменившая нейтральную аминокислоту в Hb<sub>Норфолк</sub>, по-видимому, существенно не нарушает функцию соседнего гистидинового остатка. Это, вероятно, связано с тем, что из-за различной ориентации соседних остатков в спирали их белковые цепи могут оказаться более отдаленными друг от друга, чем боковые цепи каждого четвертого остатка.

Еще одно интересное наблюдение, связанное с «центром I», состоит в том, что изменение в пептиде орангутана, по-видимому, аналогично изменению в аномальном Hb<sub>Норфолк</sub> [6]. В этом отношении Hb<sub>Норфолк</sub> у человека сходен с гемоглибином орангутана. Болезнь не носит острого характера (правда, ген этого гемоглибина еще не наблюдали в гомозиготном состоянии). Поэтому то, что является «молекулярной болезнью» для одного вида, может быть нормой для других.

### Нарушение нормальных межмолекулярных взаимосвязей

Мутации, не оказывающие значительного влияния на окислительную функцию гемоглибина, тем не менее могут приводить к тяжелым молекулярным болезням, если они изменяют физико-химические свойства, важные для связи с сестринскими молекулами и с другими компонентами красных кровяных клеток. Одним из наиболее важных свойств такого рода является растворимость. Ввиду того что неполярные группы в белках обычно составляют весьма большую часть, растворимая белковая молекула должна быть построена очень специфично. Легкость, с которой растворимость утрачивается при изменении пространственной конфигурации (денатурация), наглядно показывает, что растворимость белков очень чувствительна к распределению их боковых групп в пространстве. Таким образом, можно ожидать, что мутации, которые вызывают замещение полярного аминокислотного остатка неполярным, наряду с другими мутациями, уменьшающими конформационную стабильность, часто будут влиять на степень растворимости белка. Можно подозревать, что многие молекулярные болезни связаны с такой потерей растворимости. Если оправдан взгляд на старение как на комплексную молекулярную болезнь, возникающую в результате соматических мутаций, то старение, вероятно, также частично выражается в потере растворимости определенных белков.

Следует ожидать, что гемоглибин является в этом отношении особенно чувствительным к мутационному изменению, так как его концентрация в растворе в красной кровяной клетке составляет около 30%, а такой концентрации способны достичь далеко не всякие молекулы. Даже незначительное изменение молекулярных взаимодействий может в таких условиях вызвать значительный эффект. Аномальные человеческие гемоглибины H (состоящие из четырех  $\beta$ -цепей [44]) и Hb<sub>Цюрих</sub> [28] могут при определенных условиях выпадать в осадок в красных кровяных клетках. Подходящим примером служит также одна из наиболее типичных и наиболее хорошо изученных молекулярных болезней — серповидноклеточная анемия, связанная с гемоглибином HbS, который химически характеризуется замещением глутаминового остатка валиновым в шестом положении от N-конца  $\beta$ -цепи [33]. Это замещение не приводит к уменьшению растворимости оксигемоглибина [75]. Но при восстановлении молекул, находящихся в достаточно концентрированном растворе, они выстраиваются в нити. Эти нити,

по-видимому, образуют сетку, наподобие той, которая получается при образовании геля [8]. На клеточном уровне этот процесс проявляется в виде образования тактоидов [26], которые, деформируя клеточную мембрану, приводят к преждевременному разрушению красных кровяных клеток и нарушению потока крови в капиллярах.

Аминокислотные замещения, которые нарушают связи дыхательного пигмента с окружающей его клеточной средой, могут изменять положение и форму кривой диссоциации кислорода и зависимость диссоциации от pH, делая таким образом пигмент непригодным для функционирования в данных условиях. Сродство к кислороду у эритроцитов с HbS ниже, чем у эритроцитов с HbA [7], хотя в бесклеточных растворах оба пигмента в этом отношении очень сходны [2]. Однако недавние данные показывают, что и в бесклеточном растворе сродство к кислороду у HbS ниже, чем у HbA [81]. Что касается HbF, то он имеет в красных кровяных клетках большее сродство к кислороду, чем HbA, но в бесклеточном диализованном растворе способность связывать кислород у HbA и HbF, по-видимому, почти одинакова [3]. Разница появляется лишь при величинах pH меньше 7 [59]. Красные кровяные клетки, содержащие соответственно HbF и HbA, отличаются друг от друга такими параметрами, как, например, величина поверхности, объем и толщина [80]. Эти различия, возможно, являются следствием влияния структурных характеристик молекулы гемоглобина на структурные характеристики красных кровяных клеток. Общеизвестно, что и другие факторы, такие, как относительные скорости синтеза различных гемоглобинов, также будут здесь иметь место. Это прямо ведет нас к рассмотрению третьего типа молекулярных болезней, связанных с нарушением белкового синтеза.

### Нарушение синтеза

Нарушение синтеза гемоглобина может осуществляться различными путями. Один из наиболее очевидных путей связан с отсутствием производства красных кровяных клеток. Это, по-видимому, происходит в норме у родичей антарктических костистых рыб (*Chaenichthyidae*) [86]. Наследственной чертой многих человеческих семей является меньшее число гемоглобиновых цепей на 1 красную кровяную клетку. Большинство известных аномальных гемоглобинов человека, несмотря на то что они пригодны в качестве переносчиков кислорода, присутствуют в красных кровяных клетках в количествах меньше нормального. HbJ, присутствующий в клетке в больших количествах, чем HbA, является до сих пор единственным исключением из этого правила [95]. Можно предположить, что уменьшенное отношение аномальных гемоглобинов к нормальным отражает понижение у первых относительной скорости синтеза.

Итано [38, 40] первым указал, что структура гена может непосредственно влиять на его синтетическую активность. Можно отчетливо представить себе по крайней мере два различных пути наблюдаемого понижения скорости синтеза у большинства аномальных гемоглобинов. Это понижение может быть связано или с изменением взаимодействия между структурным геном и субстратом, представляющим собой составную часть хромосомы, или с изменением взаимодействия между геном и внехромосомными макромолекулами, которые следовало бы назвать содетерминантными факторами. Предполагается, что для белкового синтеза необходимо совместное участие содетерминантных факторов и генов или первичных продуктов активности гена. Повреждение генной структуры нарушило бы равновесие сил притяжения и отталкивания (электростатических, ван-дер-ваальсовых или свя-

занных со стерическими факторами) между этими молекулами. Пониженная скорость синтеза была бы тогда следствием уменьшенной степени соответствия между этими двумя системами. Ранее мы уже указали на возможность изменения состояния генов на протяжении различных стадий развития организма. Содетерминантные факторы также могут изменять третичную структуру в зависимости от изменения внутриклеточных условий. Или же они могут соединяться с меньшими молекулами, возможно гормонами, которые способны изменять их специфичность и активность. Таким образом, скорость белкового синтеза как функция внутриклеточной среды может определяться изменениями состояния генов в хромосоме, а также изменениями состояния других макромолекул, находящихся в растворе.

Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что большие участки белковой молекулы не связаны ни с одной из их известных специфических функций. Этот факт можно попытаться объяснить с помощью различных гипотез, например стабилизацией третичной структуры у белков с большим молекулярным весом, случайным сохранением структур, полезных на ранних стадиях эволюционного развития, и уменьшением способности к диффузии у более крупных молекул [73]. Необходимо также учитывать возможность того, что многие части белковой молекулы, которые кажутся несвязанными с функцией, на самом деле могут быть предназначены для обеспечения необходимой скорости синтеза белка. Вполне возможно, что естественный отбор действует не только на уровне законченного белкового продукта, но также и на процесс его синтеза.

Понижение скорости синтеза цепей гемоглобина при талассемии часто более значительно, чем в случае аномальных гемоглобинов. Хотя отдельная мутация гена, вероятно, вызывает как аминокислотное замещение, так и изменение в скорости синтеза аномальных гемоглобинов [41], существуют данные о том, что талассемия вызывается более чем одной мутацией. Механизм этих болезней исследуется во многих лабораториях. Недавно он обсуждался Ингрэмом и Стреттоном [36], а также и другими авторами. Ни одна из до сих пор предложенных теорий не является целиком удовлетворительной. Какой бы ни была теория, она должна учитывать тот факт, что подавление белкового синтеза — явление неспецифичное. Так, может существовать несколько типов талассемии не только, как это общепризнано, связанных с наиболее тяжелыми поражениями данной гемоглобиновой цепи, но также связанных с различными механизмами, приводящими к одному и тому же поражению этой цепи.

#### БОРЬБА С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ

В более или менее далеком будущем ферментная недостаточность, наподобие той, что вызывает фенилкетонурию, будет компенсироваться постоянным введением в организм определенного количества стабильного искусственного фермента (Полинг, 1956). Конечно, такое решение вряд ли возможно в случае дыхательного пигмента, когда требуется вводить фермент не в каталитических, а в стехиометрических количествах по отношению к «субстрату».

Другим разумным способом борьбы с молекулярной болезнью является активация с помощью лекарственных веществ генов минорных компонентов определенной ткани или «дремлющих» генов, представляющих собой функционально подходящие копии нефункционирующих мутантных главных компонентов. Возможность такого лечения зависит от природы регуляции активности гена. Если эта активность частично регулируется с помощью

эффекта положения, то медицинские исследования могут пойти по такому пути. При этом, конечно, придется преодолеть трудности, связанные с проблемами клеточной проницаемости и проблемой токсичности в отношении активности других важных генов, контролирующих синтез агентов, способных специфически изменять внутриклеточную среду. Тем не менее сама возможность постановки такого вопроса показывает, что исследования механизмов регуляции активности генов имеют не только фундаментальное значение для биологии, но представляют также большой интерес для медицины.

Достигнутые успехи позволяют нам надеяться, что рост наших знаний о молекулярных болезнях с течением времени приведет к значительному уменьшению числа страдающих от них людей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Albert A., *Biochem. J.*, **50**, 690 (1952).
2. Allen D. W., Wyman J., Jr., *Rev. hematol.*, **9**, 155 (1954).
3. Allen D. W., Wyman J., Jr., Smith C. A., *J. Biol. Chem.*, **203**, 81 (1953).
4. Allison A. C., *Exptl. Parasitol.*, **6**, 418 (1957).
5. Andinolfi M., Chieffi G., Siniscalco M., *Nature*, **184**, 1325 (1959).
6. Baglioni C., *Federation Proc.*, **20**, 254 (1961).
7. Becklake M. R., Griffith S. B., McGregor M., Goldman H. I., Schreve J. P., *J. Clin. Invest.*, **34**, 751 (1955).
8. Bessis M., Nomarski G., Thiery J. P., Breton-Gorini J., *Rev. hematol.*, **13**, 249 (1958).
9. Braunitzer G., Matsuda G., *Z. physiol. Chem.*, **324**, 91 (1961).
10. Braunitzer G., Rudloff V., Hilse K., Liebold B., Müller R., *Z. physiol. Chem.*, **320**, 283 (1960).
11. Braunitzer G., Hilschmann N., Hilse K., Liebold B., Müller R., *Z. physiol. Chem.*, **322**, 96 (1960).
12. Braunitzer G., Hilschmann N., Rudloff V., Hilse K., Liebold B., Müller R., *Nature*, **190**, 480 (1961).
13. Bridges C. B., *J. Heredity*, **26**, 60 (1935).
14. Cepellini R., *Acta Genet. Med. et Gemellol.*, **8**, Suppl. II, p. 47 (1959).
15. Cepellini R., In «*Biochemistry of Human Genetics*» (Ciba Foundation Symposium), p. 133, Churchill, London, 1959.
16. Conant J. B., *Harvey Lectures Ser.*, **28**, 159 (1934).
17. Cori G. T., *Harvey Lectures Ser.*, **48**, 145 (1954).
18. Coryell C. D., Pauling L., *J. Biol. Chem.*, **132**, 769 (1940).
19. Crick F. H. C., *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, **12**, 138 (1958).
20. Dodson E. O., «*Evolution: Process and Product*», 352 pp, Reinhold, New York, 1960.
21. Edmundson A. B., Hirs C. H. W., *Nature*, **190**, 663 (1961).
22. Gerald P. S., *Blood*, **13**, 936 (1958).
23. Gerald P. S., In «*The Metabolic Basis of Inherited Disease*» (J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, and D. S. Fredrickson, eds.), pp. 1068—1085, McGraw-Hill, New York, 1960.
24. Gratzer W. B., Allison A. C., *Biol. Revs.*, **35**, 459 (1960).
25. Haldane J. S., Priestley J. G., «*Respiration*», New ed., 493 pp., Clarendon Press, Oxford, 1935.
26. Harris J. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **75**, 197 (1950).

27. H a u r o w i t z F., In «Haemoglobin» (P. J. W. Roughton and J. C. Kendrew, eds.), pp. 53—56, Interscience, New York, 1949.
28. H i t z i g W. H., F r i c k P. G., B e t k e K., H u i s m a n T. H. J., *Helv. Paediat. Acta*, **15**, 499 (1960).
29. H o r o w i t z N. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **31**, 153 (1945).
30. H u i s m a n T. H. J., v a n d e B r a n d e J., M e y e r i n g C. A., *Clin. Chim. Acta*, **5**, 375 (1960).
31. H u n t J. A., *Nature*, **183**, 1373 (1959).
32. I n g r a m V. M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **28**, 539 (1958).
33. I n g r a m V. M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **36**, 402 (1959).
34. I n g r a m V. M., «Hemoglobin and its Abnormalities», 153 pp., Charles C Thomas, Springfield, Illinois, 1961.
35. I n g r a m V. M., *Nature*, **189**, 704 (1961).
36. I n g r a m V. M., S t r e t t o n A. O. W., *Nature*, **184**, 1903 (1959).
37. I n g r a m V. M., S t r e t t o n A. O., *Nature*, **190**, 1079 (1961).
38. I t a n o H. A., *Am. J. Human Genet.*, **5**, 34 (1953).
39. I t a n o H. A., *Ann. Rev. Biochem.*, **25**, 331 (1956).
40. I t a n o H. A., *Advances in Protein Chem.*, **12**, 215 (1957).
41. I t a n o H. A., In «Abnormal Haemoglobins» (J. H. P. Jonxis and J. F. Delafresnaye, eds.), pp 1—17, Charles C Thomas, Springfield, Illinois, 1959.
42. I t a n o H. A., P a u l i n g L., *Svensk Kem. Tidskr.*, **69**, 509 (1957).
43. J o n e s R. T., *Chromatographic and Chemical Studies of Some Abnormal Human Hemoglobins and Some Minor Hemoglobin Components*. Ph. D. Thesis, California Institute of Technology, 1961.
44. J o n e s R. T., S c h r o e d e r W. A., B a l o g J. E., V i n o g r a d J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3161 (1959).
45. J o n e s R. T., S c h r o e d e r W. A., V i n o g r a d J. R., *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 4749 (1959).
46. K a p l a n N. O., C i o t t i M. M., H a m o l s k y M., B i e b e r R. E., *Science*, **131**, 392 (1960).
47. K l e i h a u e r E., B r a u n H., B e t k e K., *Klin. Wochschr.*, **35**, 637 (1957).
48. K o n i g s b e r g W., G u i d o t t i G., H i l l R. J., *J. Biol. Chem.*, **236**, PC55 (1961).
49. K u n k e l H. G., W a l l e n i u s G., *Science*, **122**, 288 (1955).
50. K u n k e l H. G., C e p p e l l i n i R., M u l l e r - E b e r h a r d U., W o l f J., *J. Clin. Invest.*, **36**, 1615 (1957).
51. L e h m a n n H., *Nature*, **184**, 872 (1959).
52. L e n h e r t P. G., L o v e W. E., C a r l s o n F. D., *Biol. Bull.*, **111**, 293 (1956).
53. L e w i s E. B., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **16**, 159 (1951).
54. L w o f f A., «L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les microorganismes», 308 pp., Hermann, Paris, 1943.
55. M c C l i n t o c k B., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **21**, 197 (1956).
56. M a n w e l l C., *Science*, **126**, 1175 (1957).
57. M a n w e l l C., *Physiol. Zool.*, **31**, 93 (1958).
58. M a n w e l l C., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **52**, 341 (1958).
59. M a n w e l l C., *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**, 267 (1960).
60. M a r g o l i a s h E., T u p p y H., Presented at the 138th Annual Meeting of the American Chemical Society, New York, September 1960.
61. M a r k e r t C. L., M ø l l e r F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 753 (1959).
62. M e t z C. W., *Am. Naturalist*, **81**, 81 (1947).
63. M i z u s h i m a S. I., S h i m a n o u c h i T., *Advances in Enzymol.*, **23**, 1 (1961).
64. M u l l e r C. J., *A Comparative Study on the Structure of Mammalian and Avian Hemoglobins*. Ph. D. Thesis, Groningen, Netherlands, 1961.

65. Muller C. J., Kingma S., *Biochim. et Biophys. Acta*, **50**, 595 (1961).
66. Muller H. J., *Acta genet. statist. med.*, **6**, 157 (1956).
67. Muller H. J., *Perspectives in Biol. and Med.*, **3**, 1 (1959).
68. Muller H. J., *Science*, **134**, 643 (1961).
69. Neel J. V., In «Abnormal Haemoglobins» (J. H. P. Jonxis and J. F. Delafresnaye, eds.), p. 158, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1959.
70. Paigen K., Noell W. K., *Nature*, **190**, 148 (1961).
71. Pauling L., *Am. J. Psychiat.*, **113**, 492 (1956).
72. Pauling L., In «Arbeiten aus dem Gebiet der Naturstoffchemie. Festschrift Arthur Stoll», p. 597, Birkhäuser, Basel, 1957.
73. Pauling L., *Am. Inst. Biol. Sci. Publ. No. 2*, 186 (1957).
74. Pauling L., Itano H. A., Singer S., Wells I. C., *Science*, **110**, 543 (1949).
75. Perutz M. F., Mitchison J. M., *Nature*, **166**, 677 (1950).
76. Piveteau J., In «Traité de Zoologie» (P. P. Grasse, ed.), vol. 17, p. 1, Masson, Paris, 1955.
77. Rensch B., «Neuere Probleme der Abstammungslehre. Die transspezifische Evolution», 2nd ed., 346 pp., Ferdinand Enke, Stuttgart, 1954.
78. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Pauling L., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4682 (1957).
79. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Martin N., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3358 (1958).
80. Riegel K., Bartels H., Schneider J., *Z. Kinderheilk.*, **83**, 209 (1959).
81. Riggs A., Wells M., *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 243 (1961).
82. Roche J., Fontaine M., *Ann. inst. oceanog.*, **20**, 77 (1940).
83. Rossi-Fanelli A., Antonini E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 587 (1956).
84. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Giuffrè R., *Nature*, **186**, 896 (1960).
85. Rumen N. M., *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1542 (1954).
86. Ruud J. T., *Nature*, **173**, 848 (1954).
87. Schmitt F. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 806 (1956).
88. Schroeder W. A., Matsuda G., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1521 (1958).
89. Schroeder W. A., Jones R. T., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J., McCalla K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 811 (1961).
90. Shelton J. R., Schroeder W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3342 (1960).
91. Siniscalco M., Bernini L., Latte B., Motulsky A. G., *Nature*, **190** (1179).
92. Smith E. W., Thorbert J. V., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **101**, 38 (1958).
93. Sturtevant A. H., *Genetics*, **10**, 117 (1925).
94. Svedberg T., *J. Biol. Chem.*, **103**, 311 (1933).
95. Thorup O. A., Itano H. A., Wheby M., Leavell B. S., *Science*, **123**, 889 (1956).
96. Watson H. C., Kendrew J. C., *Nature*, **190**, 670 (1961).
97. Wilson S., Dixon G. H., *Nature*, **191**, 876 (1961).
98. Zuckerkandl E., Schroeder W. A., *Nature*, **192**, 984 (1961).
99. Zuckerkandl E., Jones R. T., Pauling L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 1349 (1960).

# ЗНАЧЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ В ОПТИЧЕСКОМ ВРАЩЕНИИ И КАТАЛИЗЕ

Г. ЭЙРИНГ,<sup>1</sup> Л. ДЖОНС, ДЖ. СПАЙКС

## ВВЕДЕНИЕ

Большое значение оптически активных молекул в биологических процессах впервые было показано Пастером, который обратил внимание на то, что растения производят только один из изомеров винной кислоты. Между тем при обычных химических синтезах получают одинаковые количества D- и L-форм данного соединения. Пастер показал также, что при выращивании плесневого гриба *Penicillium glaucum* на среде, содержащей смесь рацематов винной кислоты, в метаболические реакции включался лишь правовращающий изомер. За время, прошедшее с тех пор, было показано, что, по существу, все биохимические процессы специфичны по отношению к одному из двух возможных оптических изомеров. Специфичность ферментов по отношению к определенным оптическим изомерам сахаров привела Эмиля Фишера в 1894 г. к мысли об аналогии ферментативных реакций, в которых реагирующая молекула должна соответствовать определенному участку молекулы фермента, с взаимодействием между ключом и замком. Эта специфичность свидетельствует о том, что молекулы субстрата и фермента должны взаимодействовать по крайней мере в трех точках, поскольку, для того чтобы выделить какую-то конфигурацию оптически активной молекулы, необходимо локализовать в пространстве три различные группы. Это трехточечное взаимодействие может заключаться просто в образовании водородных связей в двух группах и наличии стерического ограничения для третьей. Это имеет место, например, при селективном выборе L-аминокислот, когда группы  $-\text{COOH}$  и  $-\text{NH}_2$  соединяются с поверхностью фермента водородными связями, оставляя для третьей группы лишь место, достаточное для атома водорода. Такая схема предусматривает полное исключение образования соответствующих D-аминокислот. Отсюда ясно, что изучение оптической активности может быть полезно для детального понимания роли конфигурации в каталитических процессах.

Измерения оптической активности могут использоваться также при изучении кинетики различных реакций. Первым примером такого количественного изучения химического взаимодействия было исследование инверсии сахара кислотами, проведенное Вильгельми [34] с помощью поляриметрического метода (1850 г.). Сложные реакции, приводящие к образова-

нию хромофора в молекуле оптически активного продукта, могут быть прослежены по изменению вращения плоскости поляризации света с длиной волны, близкой к области максимального поглощения хромофора. Вращательная способность такого соединения может изменяться на тысячи градусов, в то время как у других образующихся продуктов, не содержащих хромофора, вращательная способность ничтожно мала по сравнению с этой величиной.

Пожалуй, самым интересным применением метода дисперсии оптического вращения было выяснение конформации синтетических полипептидов и природных белков [4]. Чаще всего этим методом пользуются для определения вторичной структуры полипептидов, имеющих спирализованные молекулы. Оптическое вращение, характерное для такого полипептида, складывается из вращения, обусловленного строением индивидуальных единиц цепи, и вращения, отражающего форму спирали в целом, которое зависит от направления спирали. Величина оптического вращения всей спирали не зависит от природы групп, входящих в ее состав. Так, для полипептида, молекула которого представляет собой правую спираль, вклад спиральной конформации в общую величину оптического вращения всей молекулы равен по абсолютному значению величине оптического вращения левой спирали аналогичной структуры. В этом случае оптическое вращение лишь меняет свой знак. Если же полипептид только частично обладает спиральной конформацией, величина этого вклада пропорционально уменьшается, достигая нулевого значения, когда конфигурация полипептида становится полностью неупорядоченной. О важности метода дисперсии оптического вращения свидетельствует недавно прошедший международный симпозиум, посвященный теории и применению этого метода. Труды симпозиума опубликованы в томе 13 журнала «Tetrahedron» (1961).

Изучение дисперсии оптического вращения может использоваться для нахождения абсолютной конфигурации частей молекулы вблизи хромофорной группы, например у таких молекул, как стероиды [11, 12].

В случае замещенных циклогексанонов и декалонов, кольцо которых может иметь различные конформации, метод оптического вращения совместно с правилом октантов позволяет быстро определять конформацию кольца. Молекула винной кислоты может существовать в двух формах с различными внутренними водородными связями. В одном случае образуется пятичленное кольцо, а в другом — правовращающая шестичленная замкнутая структура. Изучение влияния природы растворителя на оптическое вращение диэтилартрата показало, что в различных растворителях молекула этой соли принимает ту или иную форму (правовращающую или левовращающую). Было исследовано также влияние температуры на оптическое вращение растворов диэтилартрата в разных растворителях. Оказалось, что при высокой температуре во всех растворителях оптическое вращение становится одинаковым и приближается к определенной предельной величине. Это значение, по-видимому, характеризует структуру, не имеющую водородных связей и обладающую поэтому свободным внутримолекулярным вращением.

Остальная часть этой статьи будет посвящена обсуждению двух основных вопросов. Сначала мы выясним связь между оптической активностью молекулы и ее абсолютной конфигурацией, пользуясь моделью гармонического осциллятора. Затем мы обсудим интереснейшую проблему почти универсальной избирательности живых организмов по отношению к одному из двух возможных оптически активных изомеров. Для этого придется кратко остановиться на происхождении и эволюции живой материи.



## ПРИРОДА ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ

Прежде всего необходимо выяснить вопрос о том, каков физический механизм вращения плоскости поляризации света асимметричной молекулой. Когда молекула поглощает квант света и электрон перескакивает на уровень с большей энергией, то на прежнем месте остается дырка и электроны из других частей молекулы начинают двигаться по направлению к дырке. Если молекула асимметрична, то электроны будут двигаться к дырке винтообразно. Направление вращения этого электронного вихря определяется характером винтовой асимметрии молекулы, т. е. направления вращения для левого и правого изомеров будут противоположными. Это вращательное движение заряженных частиц (электронов), движущихся к дырке, создает добавочную магнитную компоненту в световой волне, испускаемой молекулой. Это приводит к вращению плоскости поляризации, направления которого зависит от характера асимметрии молекулы.

Величина оптического вращения, производимого молекулой, зависит от длины волны проходящего света. Эта зависимость может быть выражена уравнением Друде:

$$\varphi = \sum_i \frac{R_i}{\lambda_i^2 - \lambda^2}, \quad (1)$$

где  $\lambda$  — длина волны падающего света,  $\lambda_i$  — длина волны, соответствующая данному электронному переходу в молекуле, а  $R_i$  — положительный или отрицательный параметр, величина которого зависит от электронных переходов и конфигурации молекулы вблизи той группы, в которой происходит данный электронный переход. Группа, в которой осуществляется переход, называется хромофорной группой. Ей соответствует полоса поглощения молекулы с длиной волны  $\lambda_i$ . Эта полоса поглощения характерна для данной хромофорной группы и существует независимо от того, находится ли хромофорная группа в асимметричном окружении или нет. Таким образом, полоса поглощения и связанная с ней полоса вращения плоскости поляризации характеризуются конкретным физическим процессом, представляющим собой либо электрический дипольный переход, либо магнитный дипольный переход, причем в первом случае поглощение сильное, а во втором — слабое.

Для того чтобы описать это явление на основе современных физико-химических представлений, необходимо воспользоваться строгим языком квантовой механики. Созная, что большинство биологов не сможет разобраться во всех деталях такого описания, мы приводим его здесь лишь кратко, в самом общем виде.

ОПИСАНИЕ ЯВЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ  
МОДЕЛИ ГАРМОНИЧЕСКОГО ОСЦИЛЛЯТОРА

Квантовомеханическое выражение для величины оптического вращения было получено Розенфельдом [28]. Эйринг и др. [14] дали следующую удобную форму этого уравнения:

$$\varphi = \frac{16\pi^2 N_i}{3ch} \left( \frac{n^2 + 2}{3} \right) \sum_i \frac{R_{i0} v^2}{v_{i0}^2 - v^2}, \quad (2)$$

где  $\varphi$  — вращение, выраженное в радианах на 1 см. Если переход происходит из основного состояния, которому соответствует собственная функция

$\psi_0$ , в возбужденное состояние с собственной функцией  $\psi_i$ , то  $R_{i0}$  есть мнимая часть скалярного произведения электрического и магнитного моментов перехода  $\psi_0 \rightarrow \psi_i$ .

$$R_{i0} = \text{Im} \{ (\psi_0 | R | \psi_i) \cdot (\psi_i | M | \psi_0) \}. \quad (3)$$

$N_i$  — число оптически активных молекул в  $1 \text{ см}^3$ ,  $n$  — коэффициент преломления раствора,  $\nu_{i0}$  — частота, соответствующая переходу из состояния  $\psi_0$  в состояние  $\psi_i$ , а  $\nu$  — частота падающего света.

Так как собственные функции, описывающие молекулы, неизвестны, то непосредственный расчет вращения невозможен. Необходимо создать модель оптически активной молекулы. Такой простейшей моделью является модель Кондона и др. [10], описывающая оптическое вращение с помощью анизотропного асимметричного гармонического осциллятора. Эти авторы воспользовались следующим выражением для потенциальной энергии:

$$V = \frac{1}{2} k_1 x^2 + \frac{1}{2} k_2 y^2 + \frac{1}{2} k_3 z^2 + Axyz. \quad (4)$$

Гармоническая часть этого выражения была использована для получения исходных собственных функций, а член  $Axyz$  рассматривался как возмущение. Если начальное состояние гармонического осциллятора характеризуется квантовыми числами  $n_1, n_2, n_3$  для колебаний в направлениях  $x, y$  и  $z$  соответственно, то для вращения получается следующее выражение:

$$\begin{aligned} & \rho [(n^2 + 2) NAhe^2 / (144\pi^3 \mu^3)] \{ (1/\nu_2 - 1/\nu_1) (n_1 + n_2 + 1) \{ [(\nu_1 + \nu_2)^2 - \nu^2] \times \\ & \times (\nu_3^2 - \nu^2) \}^{-1} + (1/\nu_1 + 1/\nu_2) (n_2 - n_1) \{ [(\nu_1 - \nu_2)^2 - \nu^2] (\nu_3^2 - \nu^2) \}^{-1} \} \end{aligned} \quad (5)$$

+ члены, получаемые заменой индексов 1, 2, 3 индексами 3, 1, 2 и 2, 3, 1. Здесь  $\mu$  — приведенная масса электронных осцилляторов и величины

$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_i}{\mu}}$$

представляют собой частоты, соответствующие переходам в каждом из главных направлений. Легко видеть, что, когда частоты переходов в двух главных направлениях одинаковы, вращение пропадает.

Эта модель несколько искусственна, так как не существует хромофоров, потенциал которых описывается выражением (4); тем не менее можно выразить истинные собственные функции через собственные функции гармонического осциллятора, выбирая квантовые числа  $n_1, n_2, n_3$  и частоты  $\nu_1, \nu_2$  и  $\nu_3$  таким образом, чтобы собственные функции гармонического осциллятора давали правильные энергетические уровни хромофора. Взаимодействие между хромофором и остальными частями молекулы также может быть представлено в виде рядов, причем первые из членов каждого ряда, описывающие вращение, имеют вид  $Axyz$ , где  $A$  — функция, зависящая от расстояния до соседних групп и от характера взаимодействия.

При использовании этой модели удобно выбирать координаты таким образом, чтобы направление  $z$  было направлением наибольшей поляризуемости, т. е. переход в направлении  $z$  должен проходить с наименьшей энергией. Для оси  $y$  выбирается направление наибольшей поляризуемости из оставшихся, а направление оси  $x$ , в котором поляризуемость наименьшая, выбирается так, чтобы оси  $x, y$  и  $z$  образовывали правую систему координат. При таком выборе получается следующее соотношение между частотами:  $\nu_1 > \nu_2 > \nu_3$ . Что касается перехода с наименьшей энергией в хромофоре, то здесь возможны два случая. Если переход носит характер разрешенного электрически дипольного перехода, то направление его соответствует пере-

ходу из состояния, которое может характеризоваться основным состоянием гармонического осциллятора  $(0, 0, 0)$ , в состояние с возбуждением вдоль оси  $z$   $(0, 0, 1)$ ; другим возможным переходом является магнитный дипольный переход из состояния с возбуждением вдоль оси  $y$   $(0, 1, 0)$  в состояние с возбуждением вдоль оси  $x$   $(0, 0, 1)$ . Последнему переходу соответствует частота  $\nu_1 - \nu_2$ . Этот переход представляет собой наиболее важный магнитный переход, так как хромофор обычно имеет приблизительную цилиндрическую симметрию относительно оси  $z$ , вследствие чего частоты  $\nu_1$  и  $\nu_2$  примерно одинаковы и разность  $\nu_1 - \nu_2$  мала.

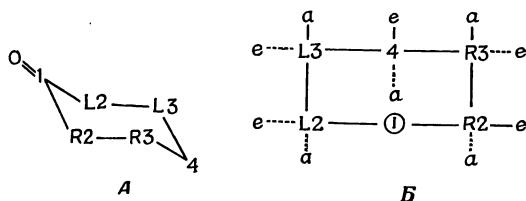
В этих двух случаях мы можем ограничиться рассмотрением только тех членов, в знаменатели которых входят  $(\nu_3^2 - \nu_1^2)$  и  $(\nu_1 - \nu_2)^2 - \nu^2$ . Эти члены приведены полностью в уравнении (5). Так как  $n$  не может принимать никаких других значений, кроме  $n_1 = 0$ ,  $n_2 = 0$  или  $1$ ,  $n_3 = 0$ , и так как  $\nu_1 > \nu_2 > \nu_3$ , то из уравнения (5) вытекает, что при частоте падающего света, меньшей чем частота самого низкочастотного перехода [ $\nu < \nu_3$  и  $\nu < (\nu_1 - \nu_2)$ ], направление вращения будет определяться знаком параметра  $A$ , причем комбинация всех остальных членов правой части уравнения будет существенно положительной.

Вклад во вращение групп, лежащих вне главных осей поляризации, дается членом  $Axuz$ , описывающим возмущение. Вклад некоторой соседней группы в член  $Axuz$  будет отрицательным, если потенциальная энергия электрона хромофора в направлении данной группы повысилась бы при замене этой группы такой группой, благодаря которой в хромофоре появилась бы плоскость симметрии. Такая группа будет легче поляризоваться, чем группа, которая сделала бы хромофор симметричным; иначе говоря, она будет нести больший эффективный положительный заряд. Если же эффективный заряд соседней группы отрицателен, то ее вклад в член  $Axuz$  будет положительным в соответствии с высоким потенциалом, который нужно преодолевать электрону хромофора при движении в этом направлении.

Для примера рассмотрим вклад карбонильного перехода с соответствующей ему длиной волны около  $290 \text{ м}\mu$  в оптическое вращение замещенных циклогексанонов. На фиг. 1, *A* изображено циклогексановое кольцо, а фиг. 1, *B* показывает, как выглядит это кольцо, если на него смотреть от кислорода вдоль  $C-O$  связи. Схема построена исходя из того, что все углы тетраэдрические. Мы принимаем, что боковые группы не дают циклогексановому остову возможности выйти из этой конфигурации, подобно тому как это происходит в бициклических системах. Ось  $z$  направлена от кислорода в сторону смежного с ним углерода и соответствует максимальной величине поляризации. Ось  $y$  перпендикулярна оси  $z$  и расположена в плоскости, содержащей четыре атома: кислород,  $C1$ ,  $CR2$  и  $CL2$ , и направлена в сторону атома  $CR2$ . Тогда ось  $x$ , соответствующая минимальной поляризации, будет направлена вверх (см. фиг. 1, *B*). В карбонильной группе возможен магнитный дипольный переход неподеленного электрона кислорода  $2p_z$  на разрыхляющую молекулярную орбиту  $\pi_x$ , общую для атомов кислорода и углерода. Видно, что такой переход удовлетворяет условиям построения эллипсоида поляризуемости способом, описанным выше.

Рассмотрим теперь тот вклад, который вносят в оптическое вращение заместители, занимающие разнообразные экваториальные и аксиальные положения. Удобно принять, что, когда все эти положения заняты атомами водорода, молекула не обладает свойством оптического вращения. В этом случае вклад в параметр  $A$  будет связан с различием в свойствах между замещающей группой и атомом водорода. Заместитель в положении  $R2e$

будет лежать приблизительно в плоскости, определяемой осями  $x$  и  $y$ , и поэтому не дает вклада во вращение. Заместитель в положении R2a будет лежать в октанте, в котором координаты  $y$  и  $z$  положительны, а  $x$  отрицателен, так что их произведение отрицательно. Когда поляризуемость заместителей больше, чем поляризуемость водорода, как в случае брома, хлора или метила, соответственно большее число электронов будет течь в положительную дырку, оставленную возбужденным электроном хромофора. В результате возникает особый тип дырки, связанный с перемещением нескольких электронов в соседнюю группу. Возникшая ситуация аналогична перемещению электрона хромофора, вызываемому потенциалом



Фиг. 1.

*A* — циклогексановое кольцо;  $z$  — направление от кислородного атома к смежному атому углерода C1; *B* — вид циклогексанового кольца при рассматривании его вдоль оси  $z$  со стороны кислородного атома;  $e$  и  $a$  — экваториальные и аксиальные заместители соответственно.

в месте локализации данной группы, член  $A_{xyz}$  которого теперь имеет отрицательный знак. В соответствии с этим у рассматриваемых заместителей при R2a величина  $A$  должна быть положительна и вклад этой группы во вращение будет положительным. Если заместителем служит фтор, обладающий меньшей поляризуемостью, чем водород, то член  $A_{xyz}$  должен быть положительным в этом квадранте и, следовательно, величина  $A$  должна быть отрицательна. Результаты подобного анализа для других мест замещения у циклогексанового кольца даны в табл. 1, в которой приведены вклады во вращение таких более поляризуемых, чем водород, заместителей, как бром, хлор или метил. Для заместителей, менее поляризуемых, чем водород, например фтора, все знаки, соответствующие вкладу в  $A$ , необходимо изменить на обратные. Величина вклада во вращение примерно пропорциональна разности поляризуемостей данного заместителя и водорода. Приведенные сведения послужили основой для так называемого «правила октантов», которое было предложено Джерасси с сотр. [11] на основании большого числа измерений дисперсии оптического вращения, проведенных на замещенных стероидах.

Этот метод может быть далее проиллюстрирован на примере молочной кислоты. Хромофором в этом случае является карбоксильная группа. Поэтому можно ожидать, что оптическое вращение будет наблюдаться в видимой области. Предположим, что кислородный атом карбоксильной группы связан водородной связью с оксигруппой, как это показано на фиг. 2. Примем за ось  $z$  направление C—O-связи, считая положительным направление на атом углерода. Следующее направление наибольшей поляризации,  $y$ , будет лежать в плоскости кольца. За положительное примем направление на атом водорода оксигруппы. Ось  $x$  будет тогда направлена вверх, перпендикулярно плоскости чертежа. Наиболее поляризуемой

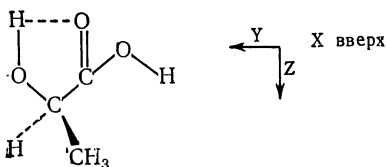
Таблица 1

Знаки вкладов смежных групп (в большей степени поляризованных, чем водород) во вращение хромофорной карбонильной группы замещенных циклогексанонов

Положение	Заместитель *	Октант			Знак вклада в $A$
		$x$	$y$	$z$	
R2	a	—	+	+	+
	e	0	+	+	0
R3	a и e	+	+	+	—
	a и e	+	0	+	0
L3	a и e	+	—	+	+
L2	a	—	—	+	—
	e	0	—	+	0

\* В столбце заместителей а и е относятся к аксиальному и экваториальному положениям, соответственно.

группой, лежащей вне плоскости кольца, является метильная группа, находящаяся в октанте  $x = +$ ,  $y = +$ ,  $z = +$ . Так как член  $Axyz$  должен



Фиг. 2. Структурная формула D-молочной кислоты. Объяснение данной ориентации системы координат см. в тексте.

быть отрицательным, то вращение также должно быть отрицательно в полном соответствии с тем, что наблюдается для D-молочной кислоты.

#### ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ И СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ

Возможно, что применение метода оптического вращения для изучения конформации молекул важнее, чем применение этого метода в исследовании абсолютной конфигурации. Одноэлектронная теория была развита в целой серии статей, начиная с работы Кондона и др. [10] и кончая статьей Куо и Эйринга [22]. За редкими исключениями, многоэлектронный эффект, или эффект связанного осциллятора, затмевает в оптическом вращении эффект, обусловленный одним электроном, так что важно обсудить способ определения эффективного значения величины  $A$  в уравнении (5) для случая многих электронов.

Как уже сообщалось ранее, возбуждение электрона светом, падающим на хромофорную группу, заставляет соседние электроны устремиться в положительно заряженную дырку, аналогично тому, что происходит при индукционных или резонансных эффектах, когда заместители либо получают электроны, либо отдают их; эти эффекты наглядно проявляются в изменении

констант скорости реакции или констант ионизации. Это дает основания полагать, что эффективный вклад, обусловленных многоэлектронными эффектами соседних групп ( $A''$ ), в величину  $A = A' + A''$  уравнения (5) может быть записан в виде:

$$A'' = \sum l_i m_i n_i q_i \sigma_i. \quad (6)$$

Выражение такого же вида справедливо и для одноэлектронной части  $A'$ . Индекс  $i$  равенства (6) относится к  $i$ -й соседней группе, и суммирование осуществляется по всем таким группам;  $l_i$ ,  $m_i$  и  $n_i$  — направляющие косинусы вектора, соединяющего центр данной группы с началом координат, лежащим в точке, соответствующей положению равновесия хромофорного электрона. Выражение (6) берется со знаком минус для групп, поляризуемость которых больше, чем у водорода, и со знаком плюс для групп с меньшей, чем у водорода, поляризуемостью. Как уже было сказано выше, выбирается правая система координат с осью  $z$  в наиболее поляризуемом, осью  $y$  в следующем по поляризуемости и осью  $x$  в наименее поляризуемом из направлений для хромофорного электрона;  $\sigma_i$ , так же как и в соотношении Гамметта [18], служит характеристикой данной группы и является величиной, тесно связанной с поляризуемостью. Член  $q_i$  характеризует структуру молекулярных связей, по которым электроны соседней группы текут к хромофору, и связан с эффективностью работы «насоса», выкачивающего электроны из соседней группы при возбуждении хромофора. Нам будет удобнее выражать энергию  $q_i \sigma_i$  в абсолютных единицах, а не в единицах  $kT$ , как это обычно принято при рассмотрении процессов ионизации и кинетики реакций [18].

Если молекула изменяет свою конформацию, например при изменении растворителя или температуры, то соответствующее изменение произойдет также в произведениях  $l_i m_i n_i$  направляющих косинусов. Если, кроме того, соседняя группа придвинется ближе к хромофору, то благодаря более легкому прохождению электронов через разделяющее пространство произойдет соответствующее изменение  $q_i$ , но сам поток электронов вдоль связей изменится незначительно.

Другой важной для нас сферой приложения оптического вращения является исследование отдельных вкладов разных хромофорных групп. Эта задача решается сравнительным изучением молекул с определенным образом измененными структурами, а также анализом индивидуальных вкладов в оптическое вращение отдельных членов уравнения Друде. Умело применяемый метод оптического вращения представляет собой один из наиболее тонких способов установления абсолютной конфигурации; он очень удобен также для описания конформационных изменений.

#### КОНФОРМАЦИЯ ПРОДУКТОВ КОНДЕНСАЦИИ НАФТИЛФЕНИЛАМИНОМЕТАНА

Приведенное нами теоретическое рассмотрение позволяет дать рациональное объяснение данным, полученным Бетти [3] (табл. 2). На фиг. 3, *A* изображена структура замещенного нафтилфениламинометана, а фиг. 3, *B* изображает соответствующую кислоту.

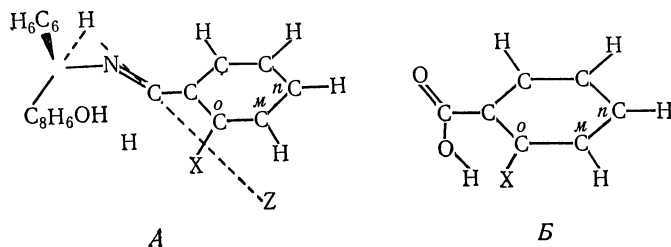
В первом столбце табл. 2 приведены величины оптического вращения замещенных нафтилфениламинометанов,  $C_6H_5CH(C_{10}H_6OH)N = HC \cdot R$ , а во втором — соответствующие альдегиды. В последнем столбце указаны константы диссоциации,  $K$ , соответствующих кислот,  $RCOOH$ . Если группа  $N = C$  является хромофором, эллипсоид поляризуемости которого распо-

Таблица 2

Молярные величины оптического вращения  $[M]_D$ , ряда альдегидных производных  $\beta$ -нафтилфениламинометана, а также константы ионизации кислот, соответствующих каждому замещенному альдегиду [3]

$[M]_D$ альдегидного соединения	Альдегидный заместитель	$K \cdot 10^5$ для соответствующей кислоты 25°
+2676,0°	<i>n</i> -Диметиламинобензойный альдегид	0,94
+1049,5°	<i>n</i> -Оксибензойный альдегид	2,9
+648,0°	3-Бром- <i>n</i> -оксибензойный альдегид	—
+588,8°	Протокатехиновый альдегид	3,3
+559,6°	3-Нитроанисовый альдегид	—
+504,5°	<i>m</i> -Толуоловый альдегид	5,6
+373,1°	Бензойный альдегид	6,6
+362,6°	<i>m</i> -Оксибензойный альдегид	8,33
+311,8°	<i>n</i> -Хлорбензойный альдегид	9,3
+280,9°	<i>m</i> -Бромбензойный альдегид	13,7
+255,9°	<i>m</i> -Хлорбензойный альдегид	15,5
+167,6°	<i>m</i> -Нитробензойный альдегид	34,8
—85,7°	Салициловый альдегид	106
—128,4°	<i>o</i> -Хлорбензойный альдегид	132
—308,2°	<i>o</i> -Бромбензойный альдегид	145
—990,7°	<i>o</i> -Нитробензойный альдегид	657

ложен вдоль связи  $N = C$ , как это показывает ось  $z$  (см. фиг. 3, А), то для *орто*-заместителя  $X$  знак произведения направляющих косинусов равенства (6) будет отличаться от знака этого произведения для заместителя  $X$  в *мета*- и *пара*-положениях, указанных на фиг. 3, А буквами *m* и *n* соответственно. Именно этим и объясняется различие в знаке вращения



Фиг. 3.

А — структурная формула замещенного  $\beta$ -нафтилфениламинометана; Б — структурная формула кислоты, соответствующей соединению, приведенному на фиг. 3, А.

у *орто*-соединений по сравнению с *мета*- и *пара*-соединениями. Ожидаемые абсолютные величины произведений  $l_i m_i n_i$  должны быть наибольшими для *пара*- и наименьшими для *орто*-соединений. Это объясняет наблюдаемые величины наклонов кривых, выражающих зависимость  $\lg K$  от оптического вращения,  $[M]_D$ . Эти данные приведены в обзоре Каузмана и др. [21], где вы найдете также много других примеров, которые могут быть объяснены с помощью равенства (6). Наличие вращательного движения фенильной группы, с которой связан заместитель  $X$ , вокруг оси группы  $\rightarrow N = C$

не влияет на сделанные нами качественные выводы и в то же время объясняет, почему зависимость между оптическим вращением и  $\lg K$  отклоняется от прямой пропорциональности. Всевозможные другие конформационные изменения также могут усложнять эту модель. Хотя предложенная молекулярная конформация и является спекулятивной, однако такая или подобная ей модель необходима для объяснения экспериментально полученных данных. Величина  $\rho_i \sigma_i$ , входящая в выражение для оптического вращения, может быть получена либо с помощью измерения соответствующих дипольных моментов [29], либо с помощью измерения скоростей реакции [27].

## ОПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЖИЗНЬ

### Введение

В предыдущих разделах этой статьи мы обсудили атомно-молекулярную основу оптической активности. Большое количество разнообразных органических молекул, входящих в состав живой материи, представляет собой оптически активные соединения. Одна из наиболее увлекательных проблем, связанная с абсолютной конфигурацией молекул, заключается в том, что живые организмы, вообще говоря, производят не рацемическую смесь данного соединения, а лишь один из его изомеров: либо D-форму, либо L-форму. Например, белки всех живых организмов, обитающих на Земле, состоят, за редкими исключениями, из одних и тех же двадцати аминокислот, и во всех случаях в их состав входят только L-изомеры. По-видимому, даже если единственная аминокислота белкового остова окажется замещенной ее D-изомером, конфигурация белковой молекулы значительно изменится. В организмах встречаются и некоторые D-аминокислоты, но их никогда не находили в белках. Например, некоторые из полипептидных антибиотиков (грамидин, бацитрацин и т. д.) содержат D-аминокислоты, а вещества, входящие в состав стенки и капсулы и клеточной стенки нескольких типов микроорганизмов, содержат D-глутаминовую кислоту и D-аланин.

Среди оптически активных сахаров, входящих в состав живых организмов, также встречается большей частью лишь один изомер; однако это правило выполняется не столь строго, как у аминокислот в белках. Так, среди пентоз мы находим лишь D-рибозу или D-дезоксирибозу и D-ксилозу, арабиноза же встречается как в D-, так и L-форме. Из природных гексоз глюкоза и манноза встречаются только в D-форме, в то время как галактоза — в обеих.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является тем веществом клетки, которое в первую очередь ответственно за передачу генетической информации при делении клетки. Модель ДНК, предложенная Уотсоном и Криком, представляет собой две полинуклеотидные цепи, образующие спиральную структуру. Каждая цепь состоит из чередующихся фосфатных групп и остатков D-дезоксирибозы, причем каждая молекула сахара соединена с основанием (пуриновым или пиримидиновым), образующим боковую группу. Стабильность и симметрию двойной спирали обеспечивают водородные связи между парами оснований: аденин — тимин и гуанин — цитозин. Ясно, что однородная спираль не могла бы образоваться, если бы в цепь была введена хоть одна молекула L-дезоксирибозы<sup>1</sup>. Таким образом, мы

<sup>1</sup> Однако однородная спираль возможна, если все D-сахара ДНК заменить на L-сахара; правда, направление закрученности ее изменится на противоположное, в чем легко убедиться, рассматривая отражение модели ДНК в зеркале. — *Прим. перев.*



снова встречаемся с абсолютным требованием наличия изомера только одного типа в биологических системах. Аналогично рибонуклеиновая кислота содержит только D-рибозу.

Для нас наиболее интригующей проблемой в биологии является универсальное, от вирусов до человека, присутствие только L-аминокислот в белках и только D-сахаров в нуклеиновых кислотах. Возникает два основных вопроса: во-первых, каким образом происходит отбор этих изомеров в организмах и, во-вторых, какова основная зависимость, если таковая имеется, между спиральной конформацией белка, построенного из цепочки L-аминокислот, и спиральной структурой нуклеиновой кислоты, представляющей собой цепочки с чередующимися остатками D-пентозы и фосфата? Обычно считается, что организмы приспосабливаются к среде в результате мутаций и выживания наиболее приспособленных. Это, однако, не объясняет того, что в белках присутствуют исключительно L-аминокислоты, а в нуклеиновых кислотах — D-сахара, поскольку жизнь, основанная на молекулах, являющихся зеркальным отражением существующих, должна была бы быть в равной степени возможной. Как ни странно, за несколькими исключениями [5, 30], последние дискуссии о происхождении и эволюции жизни уделяют мало внимания этой проблеме, представляющей нам столь важной [2, 6, 7, 8, 15, 25, 31]. Чтобы понять причины отбора живыми организмами определенных оптических изомеров, мы должны бросить взгляд назад через историю эволюции к началу жизни. В ныне существующей живой материи, по-видимому, все оптически активные молекулы синтезируются с помощью соответствующих оптически активных матриц. Поэтому мы должны допустить, что существующие сейчас матрицы произошли в далеком прошлом от единственной оптически активной матрицы, которая каким-то образом оказалась настолько лучше других, что уничтожила всех конкурентов и наполнила мир своими репликами. Чтобы рассмотреть этот вопрос более тщательно, мы теперь вкратце остановимся на добиологическом образовании органических веществ в связи с проблемой происхождения жизни.

### **Добиологическое образование органических соединений**

Как установлено, земная кора образовалась около 4,5 млрд. лет назад [31]. Это положило начало процессам, необходимым для возникновения жизни. Вероятно, потребовалось относительно немного времени для того, чтобы на поверхности земли образовалось достаточное количество органических веществ, возникших в результате неббиологических реакций. Существует много путей, по которым эти соединения могли образоваться. Как указали Ледерберг и Хартлайн [23], в результате простой конденсации свободных атомов при образовании звезд возникли огромные количества органических веществ. Этому не было никаких препятствий, так как водород, углерод, кислород и азот в изобилии встречаются в космическом пространстве. В какой степени на планетах еще возможен синтез таких неббиологических органических соединений, неизвестно. Тем не менее можно указать, что по крайней мере некоторые метеориты содержат органические соединения и что спектры комет свидетельствуют о присутствии группировок атомов, характерных для органических соединений [9]. Другой предполагаемый источник добиологического образования органического вещества заключается в получении олефинов при взаимодействии карбидов металлов с водой (см., однако, [2]) и последующих реакциях олефинов с аммиаком и водой.

Вероятно, большинство органических соединений возникло в результате взаимодействий ионизирующего и ультрафиолетового излучений, электрических разрядов и тепла с первозданной атмосферой Земли. Совсем недавно Саган опубликовал обзор на эту тему [31]. Еще до 1950 г. Кальвин подвергал смеси воды и углекислого газа действию излучения циклотрона и наблюдал появление муравьиной кислоты, уксусной кислоты и других восстановленных углеродных соединений. Вероятно, сама атмосфера до появления жизни на Земле состояла из таких восстановленных продуктов, как аммиак, метан, водяной пар и т. п. По-видимому, она стала «окисленной» намного позднее, так как это было вызвано активностью фотосинтезирующих организмов. Пропуская электрические заряды через такую смесь, Миллер [24] получил разнообразные органические соединения, в том числе биологически важные аминокислоты — глицин и аланин. Фокс с сотр. [19] изучил термическую полимеризацию в смесях весьма разнообразных аминокислот. В результате таких реакций были получены линейные пептиды. Фокс и Харада [16] провели термический синтез урацила в условиях среды, сходной с добиологической. Оро и Камат [26] обнаружили, что нагревание HCN-аммониевых смесей даже до температур меньше 100° приводило к образованию наряду с полимерными веществами различных более простых органических соединений. В частности, они сообщили о получении пурина аденина и двух имидазолов. Представляется вполне разумным допустить добиологическое образование на достаточно длительное время всех аминокислот, необходимых для синтеза белка, белковоподобных веществ, пуриновых и пиримидиновых оснований, необходимых для образования нуклеиновых кислот, а также различных углеводов. Более того, имевшиеся количества таких соединений, вероятно, были достаточно велики. Так, было высказано предположение о том [32], что первичный океан представлял собой 1-процентный раствор органического вещества (см. также [31]).

Следует подчеркнуть, что этот первозданный органический мир был миром рацематов, ибо ни один из описанных выше процессов не может приводить к избирательному образованию одной из двух изомерных форм молекулы. Однако именно этот период накопления органических веществ породил важный этап так называемой добиологической эволюции.

### Добиологическая эволюция

Как отметил Руш [30], биологи имеют склонность представлять себе эволюцию исключительно как процесс естественного отбора, происходящего только на уровне живых существ. Однако даже и простые молекулы могут вполне реально «подвергаться отбору» и «выживать» в данной физико-химической среде. Например, в среде, содержащей ионы хлора в очень низких концентрациях, содержание ионов серебра будет относительно велико; при наличии же высоких концентраций ионов галоидов концентрация ионов серебра будет очень низка. В первичной среде совокупность органических соединений становилась все более и более сложной, поскольку тепло и радиация поставляли энергию, активирующую взаимодействия между более простыми молекулами. Некоторые из этих молекул оказывались в условиях данной среды более стабильными и, таким образом, могли накапливаться. В частности, многие типы молекул, по-видимому, собирались на таких специфических местах, как поверхности раздела мелкодисперсных частиц глины, и в коацерватах. Именно эти области могли создавать среду, необходимую для развития более сложных систем, являющихся первым шагом на пути к самой жизни.

Недавно Кальвин [7] рассмотрел значение автокаталитических процессов в избирательном выживании определенных молекул на протяжении этого периода химической эволюции. Если в ряду конкурирующих процессов какая-нибудь одна реакция оказывалась автокаталитической, то в короткое время она, вероятно, начинала доминировать над всеми более простыми процессами, конкурирующими за один и тот же фонд молекул-предшественников. Кальвин также указал на то, что нынешние ферментные катализаторы имеют своих предшественников в простых системах. Ионы трехвалентного железа в водном растворе, например, катализируют разложение перекиси водорода. Если ион трехвалентного железа окружен порфириновым кольцом, как это имеет место в молекуле гема, то каталитическая активность возрастает в тысячи раз. А когда железосодержащий порфирин, соединяясь с белком, образует фермент каталазу, то каталитическая активность возрастает еще в  $10^7$  раз. Таким образом, в любой системе, где распад перекиси дает некоторые преимущества, железосодержащие порфирины будут иметь гораздо больше преимуществ при отборе, чем ферри-ион, а катализа даже еще больше.

Подводя итоги, разумно предположить, что существовал долгий период добиологической эволюции, в течение которого огромные множества молекул и молекулярных агрегатов образовывались, изменялись и вновь создавались. Этот период, вероятно, был необходим для первичного появления реплицирующихся структур. Было отмечено [17], что те условия среды, которые первоначально способствовали возникновению жизни, по-видимому, сейчас уже установить невозможно. Происшедшие изменения среды включают исчезновение из атмосферы газообразного водорода, предотвращение попадания коротковолнового ультрафиолета на земную поверхность, появление молекулярного кислорода в высоких концентрациях, а также окислительное и метаболическое разрушение первоначально возникших органических веществ. Поэтому если бы вся нынешняя жизнь оказалась стертой с лица земли, например в результате атомной войны, то новая жизнь, вероятно, развивалась бы совершенно по-иному в условиях сильно окисляющей исходной среды.

### Происхождение жизни

Обычно происхождение жизни связывают с образованием в доисторическом прошлом достаточно стабильных самовоспроизводящихся мутабельных молекулярных структур. После же того как такие структуры уже образовались, сразу же, в принципе, может начаться естественный отбор и эволюция. Так как в существующей сейчас живой материи все процессы размножения связаны с нуклеиновыми кислотами, то обычно предполагают, что первичной формой «жизни» была нуклеиновая кислота.

В течение описанной выше эры добиологической, или химической, эволюции зачаточные ферменты и нуклеиновые кислоты, вероятно, непрерывно образовывались, распадались и создавались вновь. Саморепликация нуклеиновых кислот была настолько несовершенна, что молекулы, способные служить матрицами, обычно распадались еще до начала собственного воспроизведения. Но даже при таком положении уже существовала возможность цепной реакции, начинавшейся сразу же после того, как возникала матричная молекула, способная произвести до распада более чем одну собственную реплику. С этого момента наступил конец неэффективной, беспорядочной химической эволюции и появился самовоспроизводящийся мир, который положил начало эволюции биологической.

Этот шаг означал также и конец мира рацематов, ибо с появлением все более и более эффективных матриц начали синтезироваться все большие и большие количества органических соединений со специфической конфигурацией. Наиболее вероятно, что в это время и произошел отбор L-аминокислот для построения белков и D-пентозных нуклеиновых кислот. В заключение можно сказать, что появившаяся однажды по-настоящему эффективная оптически активная матрица, обладающая способностью непосредственно синтезировать согласованно действующие ферменты, должна была обладать столь большими преимуществами при отборе, что ее оптический изомер не имел бы никакой возможности образоваться.

### Стадия отбора L-аминокислот в синтезе белка

У современных организмов синтез белка не происходит посредством простой полимеризации в аминокислотных смесях, хотя *in vitro* таким способом белковоподобные вещества могут быть получены [19]. Естественно возникает вопрос о том, в каком именно месте протоплазмы осуществляется та стадия белкового синтеза, на которой происходит отбор L-аминокислот. В настоящее время мы можем лишь предполагать, как развивался этот процесс, основываясь на большом количестве весьма изящных работ о синтезе белка, которые появились в течение последних нескольких лет [33].

В живой клетке для синтеза белковой молекулы определенного типа необходим чрезвычайно сложный субклеточный механизм, включающий около двадцати различных специфических ферментов-активаторов аминокислот, приблизительно двадцать разных специфических типов растворимой рибонуклеиновой кислоты с низким молекулярным весом (s-РНК) и определенного рода матрицу, определяющую последовательность аминокислот в белке. Этими матрицами, по-видимому, служат крупные молекулы РНК, присутствующие в субклеточных частицах, называемых рибосомами, но синтезируемые в ядрах под контролем ДНК. Кроме того, вероятно, также требуется определенный набор ферментов для синтеза пептидной связи, для снятия готовой молекулы белка с рибосомной матрицы, а также для реактивации s-РНК. Кроме того, на соответствующих этапах синтеза белков в систему должна поставляться энергия в форме аденозинтрифосфата (АТФ).

Процесс синтеза, вероятно, протекает следующим образом: сначала аминокислота, активируясь посредством реакции с АТФ, образует аминокциладенилат. Для осуществления этой стадии необходимо присутствие фермента, и, по-видимому, для разных аминокислот требуются различные ферменты. Аминокциладенилат, который, очевидно, остается прикрепленным к активирующему ферменту, затем переносится к s-РНК (называемой по-разному: растворимая РНК, транспортная РНК или акцепторная РНК). На следующей стадии каждая частица, представляющая собой комплекс s-РНК и активированной аминокислоты, связывается со специфическим местом на матричной рибосомной РНК. Таким образом, аминокислоты выстраиваются в последовательность, определяемую матрицей. Возможно, что после этого целый ряд ферментов осуществляет сборку выстроенных на матрице аминокислот в соответствующую белковую цепь и затем отделяет полученную макромолекулу от s-РНК.

Отбор L-аминокислот, таким образом, по-видимому, происходит на стадии активации, потому что активирующие ферменты специфичны по отношению к L-аминокислотам. Возможно, что выбор именно этой стадии для отбора L-аминокислот относится ко времени зарождения жизни. Конечно, не известно, какого рода молекулы произвели впервые выбор данного изо-

мера на заре возникновения жизни. Однако, исходя из той роли, которую ДНК играет в установлении определенной конфигурации молекул ферментов у современных организмов, можно предполагать, что эти соединения были близки к ДНК. Но не исключено, что это было вещество, подобное белку или РНК. Таким образом, в настоящее время еще нельзя ответить определенно, что появилось раньше — нуклеиновые кислоты или белки.

### Применение теории абсолютных скоростей реакций к проблеме происхождения жизни

При обсуждении проблемы возникновения жизни всегда возникает одно сомнение, связанное с фактором времени, а именно, является ли промежуток времени между стабилизацией земной коры и моментом появления жизни достаточным для того, чтобы могли произойти процессы, описанные выше. В самом деле, были приведены доводы, говорящие о том, что соединения с необходимой для самовоспроизведения сложностью не могли возникнуть случайно. Недавно эти вопросы были рассмотрены Эйрингом и Джонсоном [13] на основе теории абсолютных скоростей реакций [20]. Теория абсолютных скоростей реакций позволяет написать для любой химической реакции следующее уравнение:

$$\frac{dc}{dt} = c_1 c_2 \dots c_n k \left( \frac{kT}{h} \right) e^{-\frac{\Delta F^*}{RT}}. \quad (7)$$

В данном случае  $\frac{dc}{dt}$  представляет собой наиболее вероятную скорость образования критического комплекса, приводящего к созданию первой успешно самовоспроизводящейся молекулы;  $c_1, c_2 \dots c_n$  — концентрации различных участвующих в процессе реагентов, а  $k$  — переходный коэффициент со значением порядка единицы. Выражение  $\frac{kT}{h}$  называется частотой реакции активированного комплекса, а  $k, T$  и  $h$  представляют собой постоянную Больцмана, абсолютную температуру и постоянную Планка соответственно.  $\Delta F^*$  — это свободная энергия активации, а  $R$  — газовая постоянная.

Уравнение (7) можно привести к форме, более удобной для целей нашего обсуждения, заменяя концентрации общим числом реагентов типа  $n$ :

$$\frac{dn}{dt} = n_1 c_2 \dots c_n \left( \frac{kT}{h} \right) e^{-\frac{\Delta F^*}{RT}}. \quad (8)$$

Это уравнение дает число критических комплексов, образуемых за 1 сек, т. е.  $\frac{dn}{dt}$ . Чтобы применить полученное уравнение, мы должны сделать ряд до некоторой степени произвольных допущений, а именно все концентрации считать 0,001-молярными, температуру принять равной 300° К, а также предположить, что при образовании критического комплекса  $m$  реагентов будут связаны линейно, и вклад каждой из образованных таким путем  $(m - 2)$  связей критического комплекса в константу образования активированного комплекса  $K^*$  принять равным 0,01; кроме того, предположим, что окончательное образование связи при прохождении потенциального барьера, соответствующего активированному комплексу, вносит в  $K^*$  вклад в виде множителя  $e^{-(30000/RT)}$ . Фактор 0,01, приписываемый каждой связи, соответствует вкладу + 2,6 ккал в  $\Delta F^*$ , что примерно соответствует энергии образования пептидной связи. Теперь мы можем определить общее число молекул типа  $n$ , имеющееся на всей поверхности Земли, принимая

средний объем воды равным  $10^6$  л на  $1$  км<sup>2</sup>. Расчет дает величину порядка  $1,2 \cdot 10^{35}$  молекул. Если теперь предположить, что наш критический комплекс образуется только один раз в миллиард лет, то уравнение (8) дает нам величину  $m = 10$  для числа реагентов, соединяющихся при образовании критического комплекса. Эту величину можно принять за минимальный размер первоначальной самовоспроизводящейся молекулы.

### Заключение

Недавнее вторжение человека в космос, а также возможность получения в ближайшие десять лет или около этого информации из первых рук о других планетах снова привлекли внимание к вопросу о том, что жизнь вне Земли возможна. Вместе с тем значительно возрос интерес к проблеме происхождения жизни. Мы подытожили некоторые современные взгляды в этой области, рассматривая их под углом зрения теории абсолютных скоростей реакций и роли оптически активных молекул. Мы сделали особенный упор на интереснейшую проблему универсального присутствия в живых организмах только L-аминокислот в белках и только D-рибозы и D-дезоксирибозы в нуклеиновых кислотах.

Вполне законен следующий вопрос: в каком направлении следует двигаться дальше при изучении происхождения жизни? Несомненно, следует расширить те описанные выше экспериментальные подходы, которые наметили Миллер, Кальвин, Фокс и др.; нам необходимо знать гораздо больше о типах образуемых молекул и о механизмах синтеза в условиях добиологической среды. При изучении этих вопросов все возрастающую роль должна играть теория абсолютных скоростей реакций. Например, уравнение (8) показывает, что если мы увеличим концентрацию реагентов до 0,5-моляльной, а  $n$  примем равным только 1 молю ( $6 \cdot 10^{23}$  молекул), то скорость самопроизвольного возникновения критического комплекса при  $m = 10$  увеличится от одного раза в миллиард лет до одного раза в каждые 9 дней; эта же последняя скорость лежит в пределах возможности экспериментального изучения.

Существует большое количество и других интересных проблем, которые можно исследовать экспериментально. Например, необходимо провести более широкое исследование белков, входящих в состав существующих в настоящее время организмов, для того чтобы определить, насколько все-таки универсально присутствие в них L-аминокислот. Должны быть проведены более детальные исследования аминокислот и других органических соединений в окаменелостях, подобные тем, что проводил Абельсон [1], чтобы выяснить, было ли распределение изомеров в прошлом таким же, как теперь. Было бы интересно понять роль тех D-форм аминокислот, которые встречаются в некоторых полипептидных антибиотиках, и выяснить, необходимы ли эти D-формы для антибиотической активности. Американские хвойные деревья как будто производят L-пинен, в то время как европейские — D-пинен [30]. Эти, а также другие региональные особенности в распределении специфических изомеров должны быть рассмотрены и оценены с эволюционной точки зрения. Работы, подобные работе Кальвина [8], связанные с исследованием органических соединений в метеоритах, должны быть расширены не только для определения типа присутствующих там органических соединений, но и для выяснения того, какие оптические изомеры этих соединений там имеются. Следует задуматься над взаимоотношением между абсолютными конфигурациями L-аминокислотных спиралей белков и D-пентозных спиралей нуклеиновых кислот, рассматривая этот

вопрос в свете их происхождения и эволюции, а также в связи с их ролью как каталитических агентов и кодирующих единиц. Нам кажется, что наступающая эра космических исследований, позволяющая сочетать основные лабораторные исследования по очень трудной биологической проблеме — проблеме происхождения жизни — с исследованиями в пространстве, не может не стать эрой великих и плодотворных открытий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abelson P. H., Mem. Geol. Soc. Am., **67**, 87 (1957).
2. Barghoorn E. S., Mem. Geol. Soc. Am., **67**, 75 (1957).
3. Betti M., Trans. Faraday Soc., **26**, 337 (1930).
4. Blout E. R., In «Optical Rotatory Dispersion: Applications to Organic Chemistry» (C. Djerassi, ed.), Chapter 17, McGraw-Hill, New York, 1960.
5. Blum H. F., In «Rhythmic and Synthetic Processes in Growth» (D. Rudnick, ed.), pp. 155—170, Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, 1957.
6. Calvin M., Am. Scientist, **44**, 248 (1956).
7. Calvin M., Science, **130**, 1170 (1959).
8. Calvin M., Ann. Internal Med., **54**, 954 (1961).
9. Calvin M., Chem. Eng. News, **39**, 96 (1961).
10. Condon E. U., Altar W., Eyring H., J. Chem. Phys., **5**, 735 (1937).
11. Djerassi C. (ed.), «Optical Rotatory Dispersion: Applications to Organic Chemistry», McGraw-Hill, New York, 1960.
12. Djerassi C., Science, **134**, 649 (1961).
13. Eyring H., Johnson F. H., In «The Influence of Temperature on Biological Systems» (F. H. Johnson, ed.), pp. 1—8, Ronald Press, New York, 1957.
14. Eyring H., Walter J., Kimball G. E., «Quantum Chemistry», Wiley, New York, 1944. (Г. Эйринг, Дж. Уолтер, Дж. Кимбал, Квантовая химия, ИЛ, М., 1948.)
15. Fox S. W., Am. Scientist, **44**, 347 (1956).
16. Fox S. W., Harada K., Science, **133**, 1923 (1961).
17. Gaffron H., In «Rhythmic and Synthetic Processes in Growth» (D. Rudnick, ed.), pp. 127—154, Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, 1957.
18. Hammett L. P., «Physical Organic Chemistry», McGraw-Hill, New York, 1940.
19. Harada K., Fox S. W., Arch. Biochem. Biophys., **86**, 274 (1960).
20. Johnson F. H., Eyring H., Polissar M. J., «The Kinetic Basis of Molecular Biology», Wiley, New York, 1960.
21. Kauzmann W. J., Walter J. E., Eyring H., Chem. Revs., **26**, 339 (1940).
22. Kwoh T. C., Eyring H., J. Chem. Phys., **18**, 1186 (1950).
23. Lederberg J., Hartline H. K., In «Science and Space», Chapter IX. National Academy of Sciences—National Research Council, Washington, D. C., 1960.
24. Miller S. L., Biochim. et Biophys. Acta, **23**, 480 (1957).
25. Опарин А. И., «The Origin of Life», 3rd ed. (translated by A. Sygne), Oliver and Boyd, London, 1957.
26. Oro J., Kamat S. S., Nature, **190**, 442 (1961).
27. Ree T., Eyring H., J. Chem. Phys., **8**, 433 (1940).
28. Rosenfeld L., Z. Physik, **52**, 161 (1928).
29. Rule H. G., Trans. Faraday Soc., **26**, 321 (1930).
30. Rush J. H., «The Dawn of Life», Hanover House, Garden City, New York, 1957.
31. Sagan C., Radiation Research, **15**, 174 (1961).
32. Urey H. L., «The Planets», Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut, 1952.
33. Webster G., Ann. Rev. Plant Physiol., **12**, 113 (1961).
34. Wilhelm y L., Ann. Physik, **81**, 413, 499 (1850).

# О РОЛИ ФОСФОРОЛИЗА И ПИРОФОСФОРОЛИЗА В МЕТАБОЛИЗМЕ

А. КОРНБЕРГ

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение действия ферментов в бесклеточных системах показало, что ферменты катализируют обратимые изменения, возможные с термодинамической точки зрения. В силу этого представлялось вероятным, что и в клетке один и тот же фермент осуществляет как разрушение, так и синтез данного соединения. Однако за последнее десятилетие стало ясно, что протеазы не участвуют в белковом синтезе, что синтез нуклеиновых кислот не является процессом, обратным по отношению к действию нуклеаз, и что пути синтеза и распада жирных кислот совершенно различны. То же самое справедливо для процессов биосинтеза и распада аминокислот, нуклеотидов, коферментов, фосфолипидов и стероидов. Наконец, вопрос о возможности рассматривать синтез гликогена как обращение действия фосфорилазы был решен в результате обнаружения независимого пути синтеза, начинающегося от УДФГ<sup>1</sup> [53]. В действительности единственный существенный пример процесса, который идет в двух направлениях, это путь превращения гексоз в пируват по схеме Эмбдена — Мейергофа. Можно ли предполагать, что и в этом случае существует какой-то иной путь синтеза глюкозы из пирувата? К этому вопросу мы вернемся позднее.

Сейчас мы приступаем к рассмотрению роли реакций фосфоролиза и пирофосфоролиза в метаболизме и попытаемся выяснить, какие из них следует относить к путям биосинтеза, а какие — к процессам деградации. Фосфорилазы используют неорганический ортофосфат для разрыва гликозидных связей в полисахаридах и нуклеозидных, а также для разрыва фосфодиэфирных связей в рибонуклеиновой кислоте (РНК). Легкая обратимость этих реакций позволяет сразу же предположить, что они могут быть использованы также в процессах синтеза гликогена, нуклеозидов и РНК клеткой. Пирофосфорилазы получили свое наименование по аналогии с фосфорилазами [44], так как они могут использовать неорганический пирофосфат для разрыва гликозидных и фосфатных связей. Однако в первую очередь роль этих ферментов была выявлена в связи с синтезом коферментов, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и целого ряда нуклеотидных производных. В этих процессах высвобождается неорганический пирофосфат. Возможно ли, что функции фосфорилаз и пирофосфорилаз *in vivo*

---

<sup>1</sup> УДФГ — уридиндифосфоглюкоза; ПФ — неорганический пирофосфат; ФРПФ — 5'-фосфорибозилпирофосфат.



в основном связаны с процессами распада, как это соответствует их наименованию? В ранее опубликованном обзоре [48] мы, напротив, подчеркивали роль этих двух ферментов в биосинтезе. Однако нам было ясно, что оба типа реакций значительно отличаются друг от друга. Определенный этап синтеза ДНК, коферментов и белков связан с освобождением пирофосфата. Нам представлялось, что пути биосинтеза, связанные с освобождением пирофосфата, по-видимому, легко управляются и становятся «необратимо анаболическими» в результате гидролитического разрушения пирофосфата (ПФ), следующего за его освобождением. Аналогичную точку зрения высказывает Гофман-Остенгоф и Шлехта [38] в своем обзоре по метаболизму пирофосфата. С другой стороны, через фосфоролитиз, по-видимому, идут процессы распада различных соединений (например, гликогена), используемых для обеспечения энергетических потребностей клетки.

В пользу такой трактовки физиологического значения фосфорилаз и пирофосфорилаз говорят и два обнаруженных недавно новых факта. Во-первых, как это уже упоминалось, в синтезе гликогена с помощью УДФГ трансгликозилированию предшествует освобождение пирофосфата [53]. В силу этого кажется более вероятным, что фосфорилаза гликогена служит главным образом для расщепления и использования полисахаридов. Во-вторых, синтез РНК на матрице ДНК [12, 16, 39, 99, 105, 106], синтез РНК на матрице РНК [86] и завершение построения цепей акцепторной РНК [36, 83] происходят путем конденсации нуклеозидтрифосфатов с сопутствующим этому процессу освобождением пирофосфата. Здесь также полинуклеотидфосфорилаза, по-видимому, обеспечивает в основном именно распад, а не синтез РНК.

В настоящей работе автор предлагает гипотезу, согласно которой, во-первых, процессы распада часто включают в себя фосфоролитические механизмы и, во-вторых, реакции биосинтеза часто связаны с освобождением пирофосфата.

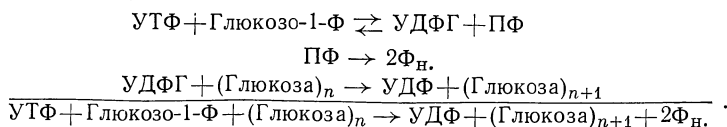
Таким образом, несмотря на ряд исключений, можно считать термин «фосфорилаза» оправданным; однако ферменты, ведущие реакции синтеза, связанного с освобождением пирофосфата, лучше именовать «синтетазами». В недавно опубликованной статье Стеттен [98] также указывается на синтетическую роль реакций, идущих с освобождением пирофосфата.

#### ПУТИ БИОСИНТЕЗА, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ РЕАКЦИЙ, В КОТОРЫХ ОСВОБОЖДАЕТСЯ ПИРОФОСФАТ

Из приведенного в табл. 1 перечня синтетаз, освобождающих пирофосфат, видно, что к их числу принадлежат ферменты, играющие ключевую роль в синтезах нуклеиновых кислот, коферментов, белков, углеводов и липидов. В случае нуклеиновых кислот, нуклеотидов, некоторых коферментов, а также терпенов сам процесс сборки составляющих единиц катализируется реакцией, в которой освобождается пирофосфат. При синтезе олиго- и полисахаридов, фосфолипидов и, возможно, белков связанная с освобождением пирофосфата синтетаза сдвинута на один или более этапов.

Почти во всех названных реакциях изменение свободной энергии, сопутствующее освобождению пирофосфата, относительно невелико, причем реакция синтеза при добавлении пирофосфата идет в обратном направлении. Однако почти во всех обследованных клеточных экстрактах обнаруживается исключительно активная неорганическая пирофосфатаза [73, 90], а пирофосфат если и присутствует в тканях, то в чрезвычайно малых количе-

ствах. Если принять, что происходит быстрый гидролиз освобождающегося пирофосфата, то реакция, например, трансгликозилирования должна идти практически в сторону синтеза



Какие факты противоречат предположению о том, что синтетазы, освобождающие пирофосфат, играют преимущественную роль в биосинтетических реакциях, и какие данные, которые могли бы подтвердить это предположение, пока отсутствуют? Можно привести следующие четыре соображения:

1. Происходит ли распад пирофосфата достаточно быстро и эффективно в тех частях клетки, где он образуется? В настоящее время на этот вопрос нельзя дать определенного ответа. Необходимо с помощью чувствительных методов провести измерения равновесных концентраций пирофосфата в активно растущих клетках; необходимо также располагать данными по кинетике реакций и значениями констант диссоциации комплексов пирофосфата с различными неорганическими пирофосфатазами и синтетазами. Следует выяснить роль пирофосфата в грибах, где он был обнаружен Манном [64]. Пирофосфат был найден также в тех культурах, которые в неблагоприятных для роста и биосинтетических процессах условиях накапливают неорганические полифосфаты. Наиболее вероятная трактовка этого явления состоит в предположении о быстром и интенсивном распаде запасенного полифосфата в клетках, находящихся в фазе замедления роста или автолиза [47, 50]. Ни в одном из исследований метаболизма полифосфатов не было замечено, чтобы в популяции растущих клеток синтезировалось ощутимое количество пирофосфатов.

Следует упомянуть также о накоплении пирофосфата у личинок морского ежа, подвергнутых действию высоких концентраций лития [57]. Хотя в этих условиях невозможно нормальное развитие личинок, они продолжают интенсивно расти.

2. Действие синтетазы, освобождающей пирофосфат, поскольку она связана с неорганической пирофосфатазой, представляет собой процесс, с энергетической точки зрения расточительный. Однако с точки зрения конечного результата затраты все же оказываются весьма небольшими. Синтез ДНК *de novo* требует затраты энергии, эквивалентной 60 молекулам АТФ на 1 нуклеотид. Ценой только двух добавочных молекул АТФ (возникающих за счет гидролиза ПФ) обеспечивается постоянство содержания ДНК, несмотря на изменения в концентрации пирофосфата. В процессе синтеза гликогена через УДФГ потребляется по две молекулы АТФ на каждую полимеризованную единицу глюкозы в отличие от одной молекулы, используемой в том случае, когда реакция идет через фосфорилазу. Однако механизм с участием фосфорилазы может быть вовсе недоступен, равно как и другие процессы, альтернативные по отношению к процессу, идущему через УДФГ. В этом случае глюкоза могла бы быть окислена и, таким образом, полностью «потеряна» в виде тепла. В этом свете затрата одной дополнительной молекулы АТФ с потенциалом в 40 эквивалентов на глюкозу представляется не слишком высокой ценой.

3. В табл. 1 не включены две реакции, сопровождающиеся освобождением пирофосфата и не связанные явным образом с биосинтезом. Это, во-первых, образование адениллюциферина, который при взаимодействии

Таблица 1

## Пути биосинтеза, идущие через реакции с освобождением ПФ\*

Путь биосинтеза	Синтезируемое соединение	Реагенты	Источник данных
<i>Коферменты переноса электронов</i> ДПН, ТПН, ФАД	5'-Фосфорибозилникотиновая кислота Дезамино-ДПН	Никотиновая кислота + ФРПФ 5'-Фосфорибозилникотиновая кислота + АТФ	[82] [82]
Тиамин-ПФ	ДПН ФАД	Дезамино-ДПН, глутамин + АТФ Рибофлавин-5'-Ф + АТФ	[82] [91]
<i>Нуклеиновые кислоты</i>	Тиамин-Ф ДНК	«Тиазол»-Ф, «Пиримидин»-ПФ ДНК-матрица + АТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ	[13, 14] [49]
<i>Нуклеотиды</i>	Акцепторная РНК Синтез РНК на матрице ДНК Синтез РНК на матрице РНК	РНК-матрица + АТФ, ЦТФ ДНК-матрица + АТФ, ЦТФ, УТФ, ГТФ РНК-матрица + АТФ, ЦТФ, УТФ, ГТФ	[36, 83] [12, 16, 39, 99, 105, 106] [86]
Синтез de novo: Пиримидины Пурины	Оротидилат 5-Фосфорибозиламин Гуанилат	Оротат + ФРПФ Глутамин + ФРПФ Ксантиллат, глутамин (или H <sub>3</sub> ) + АТФ	[55] [31, 32] [1, 52, 67]
Синтез из предшественников: Пиримидины Пурины Белки	Уридилат Аденилат, инозинат, гуанилат Аминоацил-РНК	Урацил + ФРПФ Аденин, гипоксантин, гуанин + ФРПФ Аминоокислота + Акцепторная РНК + АТФ	[20] [46, 87] [9, 10, 41]

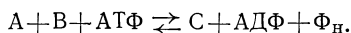
<i>Аминокислоты</i>			
Гистидин	Фосфорибозил-АТФ	АТФ + ФРПФ	[2, 68]
Триптофан (нидолглицерофосфат)	Ф-рибозилантраниловая кислота	Антраниловая кислота + ФРПФ	[23, 95]
Аргинин	Аргининсукцинат	Цитруллин + Аспаргат + АТФ	[80]
<i>Липиды</i>	Ацил-КоА	Жирная кислота + КоА + АТФ	[8, 45, 62]
<i>Фосфолипиды**</i>	ЦДФ-холин	Ф-холин + ЦТФ	[42, 43]
	ЦДФ-этаноламин	Ф-этаноламин + ЦТФ	[42, 43]
<i>Полисахариды**</i> (пектины, хитины), дисахариды, оболочка бактериальных клеток, капсулы бактерий, аскорбаты, ДНК Т-чегных бактериофагов, гликолипиды, ганглиозиды	ЦДФ-диглицерид	Фосфатидиловая кислота + ЦТФ	[78]
	УДФ-глюкоза	Глюкозо-1-ф + УТФ	[29, 70]
	УДФ-N-ацетилглюкозамин	N-ацетилглюкозамин-1-ф + УТФ	[30, 63, 93, 101, 102]
	УДФ-ксилоза	Ксилозо-1-ф + УТФ	[28]
	ГДФ-манноза	Манново-1-ф + ГТФ	[71, 72]
	ТДФ-глюкоза	Глюкозо-1-ф + ДТФ	[51, 79]
<i>Стероиды, терпены</i>	Геранил-ПФ	Изопентенил-ПФ + Диметилаллил-ПФ	[59]
	Фарнезил-ПФ	Изопентенил-ПФ + Геранил-ПФ	[59]
	Сквален	Фарнезил-ПФ + Фарнезил-ПФ	[33, 58, 81]
<i>Кофермент ацилирования, КоА</i>	Холил-КоА	Холевая кислота + КоА + АТФ	[24]
	Пантотенат	Пантотеновая кислота + β-аланин + АТФ	[60]
	Дефосфо-КоА	Фосфопантотенн + АТФ	[37]
<i>Кофермент сульфирования</i>			
Фосфоаденилсульфат	Аденилсульфат	Сульфат + АТФ	[88, 89, 107]
<i>Полиамины, трансметилирование</i>	Аденозилметинонин	Метинонин + АТФ	[69]

\* Под термином «пути биосинтеза» подразумеваются такие реакции, которые прямо или в составе комплексных реакций ведут к образованию продуктов более сложных, чем реагенты, приведенные в таблице.

\*\* ЦДФ рибит [4, 5, 6, 102], ЦДФ-глицерин [3, 7] и УДФ-диоксиацетон [94] представляют собой природные соединения, которые, по-видимому, синтезируются посредством реакций, аналогичных указанным в таблице.

с люциферазой обуславливает люминесценцию у светляка [61], и, во-вторых, образование оксалоацетата в процессе фосфоролитического расщепления фосфопирувата при пропионовокислом брожении [92].

4. Существует группа реакций, описываемых общим уравнением



Реакции такого типа имеют место при синтезе глутатиона [96, 97] и глутамина [65, 66], при аминировании пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов [15, 51, 52], а также при формилировании тетрагидрофолевой кислоты [34, 84]. Для сохранения предложенной концепции приходится сделать допущение, что эти реакции (если исключить другие причины, ведущие к их кинетической необратимости) в действительности могут быть обращены под воздействием повышенных концентраций неорганического фосфата. Синтезируемые при этом соединения должны распадаться под действием тех же самых ферментов, которые участвуют в их образовании, или же должны существовать иные, еще не обнаруженные синтетазы, возможно, обуславливающие освобождение пирофосфата.

Ни одно из приведенных соображений не ослабляет сколько-нибудь существенным образом предложенную выше концепцию, согласно которой реакции, идущие с освобождением пирофосфата, предназначены для реализации функций биосинтеза. Вместе с тем возможно, что такого рода реакции могут использоваться и в процессах несинтетического характера, таких, как цикл мочевины, реакции, связанные с люминесценцией у светляка, упоминавшиеся выше, и этап пропионовокислого брожения, идущий с образованием дикарбоновой кислоты. Наконец, очевидно, что, помимо группы синтетаз, освобождающих пирофосфат, существуют гидролитические и иные механизмы реакций, также эффективные как при биосинтезе, так и в процессах распада.

#### РЕАКЦИИ РАСПАДА, ИДУЩИЕ ПУТЕМ ФОСФОРОЛИЗА

Обнаруженная Кори реакция фосфоролитического расщепления гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата послужила первым указанием на то, каким образом может сберегаться в организме энергия, извлекаемая из типичного гликозида (табл. 2). Хотя обычно триозофосфатдегидрогеназу не относят к числу фосфорилаз, она может быть включена в состав этой группы ферментов ввиду той роли, которую она выполняет в фосфоролитическом промежуточном тиоловом эфире.

Другие «фосфорокластические» реакции (см. табл. 2), а также реакции, катализируемые нуклеозидфосфорилазами, представляют собой дальнейшие примеры накопления энергии, возможного в результате фосфоролитического расщепления. Полинуклеотидфосфорилаза была выделена Коном из семейства фосфорилаз вследствие того, что она расщепляет фосфодиэфирную связь; однако ее близость к фосфорилазам может быть установлена и на том основании, что она также использует фосфоролитическое расщепление для эффективного использования энергии, заключенной в полинуклеотидной цепи.

Возникает вопрос о том, можно ли утверждать, что реакции фосфоролита, приведенные в табл. 2, являются лишь этапами путей, ведущих к распаду метаболитов. Такая оценка физиологических функций полисахарид-, нуклеотид- и полинуклеотидфосфорилаз основана главным образом на двух соображениях. Во-первых, известно, что физиологические концен-

Таблица 2

## Реакции распада, идущие путем фосфоролита\*

Превращение	Субстрат, подвергающийся расщеплению	Фосфорилированный продукт	Источник данных
Полисахарид → моносахарид	Гликоген	$\alpha$ -Глюкозо-1-фосфат	[19]
	Сахароза	$\alpha$ -Глюкозо-1-фосфат	[21]
	Мальтоза	$\beta$ -Глюкозо-1-фосфат	[22]
Моносахарид → ацилфосфат	3-Фосфоглицеральдегид (3-фосфоглицерил-S-фермент)	1,3-Дифосфоглицериновая кислота	[85, 103]
	Ксилулозо-5-фосфат	Ацетилфосфат	[35]
	Пируват	Ацетилфосфат	[74, 100, 108]
Треонин → ацилфосфат	Аспартат-3-полуальдегид	Аспартилфосфат	[11]
	Промежуточные продукты аэробного фосфорилирования	АТФ (Ф <sub>n</sub> -Х)	[17, 104]
«Ацетил» → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	РНК	Нуклеозиддифосфаты	[75]
Нуклеиновая кислота	Рибонуклеозиды	Рибозо-1-фосфат	[40, 76, 77]
	Дезоксирибонуклеозиды	Дезоксирибозо-1-фосфат	[45, 26, 27]

\* Термин «реакции распада» объединяет как реакции, ведущие непосредственно к образованию менее сложных продуктов из более сложных, так и реакции, которые входят в состав некоей последовательности процессов, ведущей к использованию энергии.

трации неорганического ортофосфата стимулируют преимущественно процессы распада с участием фосфоролита, а не процессы синтеза. Во-вторых, существуют другие пути реакций (см. табл. 1), в полной мере подходящие для целей синтеза. Однако употребление термина «ферменты распада» может вызвать возражение в силу того обстоятельства, что продукты всех этих фосфоролитических реакций (сахар, фосфаты, пурины, пиримидины и нуклеотиды) в конце концов используются в реакциях биосинтеза. Точно так же в процессе распада моносахаридов обеспечивается поставка аминокислот, необходимых для синтеза белков и нуклеиновых кислот. Можно было бы сказать, что все реакции, протекающие в клетке, включая и гидролитические реакции, в конечном счете служат целям биосинтеза; но для чего в таком случае вообще различать процессы анаболизма и катаболизма?

## РАЗДЕЛЬНЫЕ ПУТИ БИОСИНТЕЗА И РАСПАДА

Клетка подобна хорошо организованной фабрике, и можно ожидать, что механизмы, которые обеспечивают ее энергией, отделены в ней от механизмов, с помощью которых эта энергия используется в различных процессах биосинтеза. Хотя эта аналогия в известной мере оправдана и может быть развита дальше, она не так уж важна, так как у нас имеются факты, основанные на непосредственном анализе реальных путей и процессов биосинтеза и распада в клетке. Во всех исследованных случаях (для белков, липидов, полисахаридов или нуклеиновых кислот) обнаружено, что пути

синтеза отличны от путей сгорания. Единственным существенным исключением служит, как уже упоминалось во введении, сбраживание глюкозы с образованием молочной кислоты или спирта. Теперь можно поставить вопрос, используют ли клетка или орган, которые растут на среде, содержащей ацетат, лактат или сукцинат, путь Эмбдена — Мейергофа для построения необходимых структурных полисахаридов. Уже сейчас ясно, что в определенных условиях превращение пирувата в фосфопируват может идти не путем прямого обращения реакции с участием пируватфосфокиназы, а обходным путем через дикарбоновую кислоту. Точно так же, быть может, существуют обходные пути, ведущие от гексозодифосфатов непосредственно к гексозомонофосфатам без участия триозофосфатдегидрогеназы. Быть может, вездесущие уридиндифосфосахара будут обнаружены в роли агентов, ведущих восстановление глицератов до триоз?

Энергия, выделяющаяся при распаде сахара с образованием пирувата и  $\text{CO}_2$ , вполне достаточна для обеспечения потребностей биосинтетических процессов клетки. Вместе с тем при таком распаде поставляется строительный материал, используемый для целей биосинтеза. Однако в растущей клетке процессы, поставляющие энергию, и процессы синтеза должны идти одновременно! Кажется вполне вероятным, что, как и в случае белков, нуклеиновых кислот и липидов, синтез важнейших углеводных компонентов клетки и их распад, при котором выделяется энергия для нужд клетки, осуществляются различными путями. После того как будет установлено функциональное различие между анаболическими и катаболическими реакциями, исследования могут быть сосредоточены на отыскании переключающих механизмов, направляющих данную молекулу по тому или другому метаболическому пути.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор ферментативных реакций, использующих неорганические орто- и пирофосфат, приводит нас к некоторым общим выводам.

1. Фосфорилазы участвуют в основном в процессах распада. Они катализируют фосфоролитическое расщепление с образованием фосфорилированных промежуточных продуктов, в которых сохраняется энергия, содержащаяся в гликозидных или фосфодиэфирных связях исходных соединений. Однако основное направление реакций, протекающих с участием фосфорилаз, — продуцирование энергии.

2. Пирофосфорилазы, напротив, должны рассматриваться как синтазы, освобождающие неорганический пирофосфат. Гидролиз этого последнего с помощью неорганической пирофосфатазы обеспечивает необратимость синтетических процессов, ведущих к образованию коферментов, нуклеиновых кислот, белков, структурных углеводов и липидов.

Эти общие выводы могут послужить основой для ряда предположений. По-видимому, некоторые из тех путей биосинтеза, которые еще предстоит обнаружить, будут использовать в качестве ключевой реакции освобождение неорганического пирофосфата при помощи соответствующей синтазы. Кроме того, в процессах распада, ведущих к продуцированию энергии, могут использоваться фосфоролитические или аналогичные им реакции переноса групп, однако эти процессы, по-видимому, отличны от биосинтетических процессов. Конкретно говоря, возможно, будет найден путь, минующий 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназу, — путь, по которому должен идти синтез углеводов из низкомолекулярных предшественников.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abrams R., Bentley M., Arch. Biochem. Biophys., **79**, 91 (1959).
2. Ames B. N., Martin R. G., Garry B. J., J. Biol. Chem., **236**, 2019 (1961)
3. Baddiley J., Buchanan J. G., Mathias A. P., Sanderson A. R., J. Chem. Soc., p. 4186 (1956).
4. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., Mathias A. P., J. Chem. Soc., p. 4583 (1956).
5. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., J. Chem. Soc., p. 1869 (1957).
6. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., J. Chem. Soc., p. 4058 (1957).
7. Baddiley J., Buchanan J. G., Sanderson A. R., J. Chem. Soc., p. 3107 (1958).
8. Berg P., J. Biol. Chem., **222**, 991 (1956).
9. Berg P., Ofengand E. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **44**, 78 (1958).
10. Berg P., Bergmann F. H., Ofengand E. J., Dieckmann M., J. Biol. Chem., **236**, 1726 (1961).
11. Black S., Wright N. G., J. Biol. Chem., **213**, 39 (1955).
12. Burma D. P., Kröger H., Ochoa S., Warner R. C., Weill J. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **47**, 749 (1961).
13. Camiener G. W., Brown G. M., J. Biol. Chem., **235**, 2404 (1960).
14. Camiener G. W., Brown G. M., J. Biol. Chem., **235**, 2411 (1960).
15. Carter C. E., Cohen L. H., J. Biol. Chem., **222**, 17 (1956).
16. Chamberlin M., Berg P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **48**, 81 (1962).
17. Chance B., J. Biol. Chem., **236**, 1569 (1961).
18. Cohn M. (личное сообщение).
19. Cori G. T., Cori C. F., J. Biol. Chem., **151**, 57 (1943).
20. Crawford I., Kornberg A., Simms E. S., J. Biol. Chem., **226**, 1093 (1957).
21. Doudoroff M., Barker H. A., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., **168**, 725 (1947).
22. Doudoroff M., In «Methods in Enzymology» (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. I, p. 225, Academic Press, New York, 1955.
23. Doy C. H., Rivera A., Jr., Srinivasan P. R., Biochem. Biophys. Research Commun., **4**, 83 (1961).
24. Elliott W. H., Biochem. J., **65**, 315 (1957).
25. Friedkin M., Kalckar H. M., J. Biol. Chem., **184**, 437 (1950).
26. Friedkin M., J. Cellular Comp. Physiol., **41**, Suppl. I, 261 (1953).
27. Friedkin M., J. Biol. Chem., **209**, 295 (1954).
28. Ginsburg V., Neufeld E. F., Hassid W. Z., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **42**, 333 (1956).
29. Ginsburg V., J. Biol. Chem., **232**, 55 (1958).
30. Glasser L., Brown D. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **41**, 253 (1955).
31. Goldthwait D. A., Greenberg G. R., Peabody R. A., Biochim. et Biophys. Acta, **18**, 148 (1955).
32. Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., **222**, 1051 (1956).
33. Goodman D. S., Popjak G., J. Lipid Research, **1**, 286 (1960).
34. Greenberg G. R., Jaenicke L., Silverman M., Biochim. et Biophys. Acta, **17**, 589 (1955).
35. Heath E. C., Hurwitz J., Horecker B. L., J. Am. Chem. Soc., **78**, 5449 (1956).
36. Hecht L. I., Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Scott J. F., J. Biol. Chem., **233**, 954 (1958).
37. Hoagland M. B., Novelli G. D., J. Biol. Chem., **207**, 767 (1954).



38. Hoffmann-Ostenhof O., Slechta L., Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem., Tokyo, p. 180 (1957).
39. Hurwitz J., Bresler A., Diring R., Biochem. Biophys. Research Communs., **3**, 15 (1960).
40. Kalckar H. M., J. Biol. Chem., **167**, 477 (1947).
41. Keller E. B., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem., **221**, 45 (1956).
42. Kennedy E. P., Ann. Rev. Biochem., **26**, 119 (1957).
43. Kennedy E. P., In «The Enzymes» (P. D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck, eds.), Vol. 2, p. 63, Academic Press, New York, 1960.
44. Kornberg A., J. Biol. Chem., **182**, 779 (1950).
45. Kornberg A., Pricer W. E., Jr., J. Biol. Chem., **193**, 481 (1951).
46. Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., J. Biol. Chem., **215**, 417 (1955).
47. Kornberg A., Kornberg S. R., Simms E. S., Biochim. et Biophys. Acta, **20**, 215 (1956).
48. Kornberg A., Advances in Enzymol., **18**, 191 (1957).
49. Kornberg A., Science, **131**, 1503 (1960).
50. Kornberg S. R., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 294 (1957).
51. Kornfeld S., Glaser L., J. Biol. Chem., **236**, 1791 (1961).
52. Lagerkvist U., J. Biol. Chem., **233**, 143 (1958).
53. Leloir L. F., Olavarria J. M., Goldemberg S. H., Carminat ti H., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 508 (1959).
54. Lieberman I., J. Am. Chem. Soc., **77**, 2661 (1955).
55. Lieberman I., Kornberg A., Simms E. S., J. Biol. Chem., **215**, 403 (1955).
56. Lieberman I., J. Am. Chem. Soc., **78**, 251 (1956).
57. Lindahl P. E., Kiessling K., Arkiv Kemi, **3**, 97 (1951).
58. Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessel I., Angew. Chem., **70**, 738 (1958).
59. Lynen F., Agranoff B. W., Eggerer H., Henning U., Mösl ein E. M., Angew. Chem., **71**, 657 (1959).
60. Maas W. K., Federation Proc., **15**, 305 (1956).
61. McElroy W. D., Seliger H. H., In «Light an Life» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 219, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961.
62. Mahler H. R., Wakil S. J., J. Biol. Chem., **204**, 453 (1953).
63. Maley F., Maley G. F., Lardy H. A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 5303 (1956).
64. Mann T., Biochem. J., **38**, 345 (1944).
65. Meister A., Physiol. Revs., **36**, 103 (1956).
66. Meister A., In «Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry» (J. T. Edsall, ed.), p. 85, Academic Press, New York, 1960.
67. Moyed H. S., Magasanik B., J. Biol. Chem., **226**, 351 (1957).
68. Moyed H. S., Magasanik B., J. Biol. Chem., **235**, 149 (1960).
69. Mudd H. S., Cantoni G. L., J. Biol. Chem., **231**, 481 (1958).
70. Munch-Peterson A., Acta Chem. Scand., **9**, 1523 (1955).
71. Munch-Peterson A., Arch. Biochem. Biophys., **55**, 592 (1955).
72. Munch-Peterson A., Acta Chem. Scand., **10**, 928 (1956).
73. Nordlie R. C., Lardy H. A., Biochim. et Biophys. Acta, **50**, 189 (1961).
74. Novelli G. D., Biochim. et Biophys. Acta, **18**, 594 (1955).
75. Ochoa S., Heppel L. A., In «The Chemical Basis of Heredity» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 615, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland. (Химические основы наследственности, ИЛ, М., 1960.)
76. Paegge L. M., Schlenk F., Arch. Biochem. Biophys., **28**, 348 (1950).
77. Paegge L. M., Schlenk F., Arch. Biochem. Biophys., **40**, 42 (1952).

78. Paulus H., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., **235**, 1303 (1960).
79. Pazur J. H., Shuey E. W., J. Biol. Chem., **236**, 1780 (1961).
80. Petrack B., Ratner S., J. Biol. Chem., **233**, 1494 (1958).
81. Popjak G., Goodman D. S., Cornforth J. W., Cornforth R. H., Ryhage R., J. Biol. Chem., **236**, 1934 (1961).
82. Preiss J., Handler P., J. Biol. Chem., **233**, 493 (1958).
83. Preiss J., Dieckmann M., Berg P., J. Biol. Chem., **236**, 1748 (1961).
84. Rabinowitz J. C., Pricer W. E., Jr., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4176 (1956).
85. Racker E., Krimsky I., J. Biol. Chem., **198**, 731 (1952).
86. Reddi K. K., Science, **133**, 1367 (1961).
87. Remy C. N., Remy W. T., Buchanan J. M., J. Biol. Chem., **217**, 885 (1955).
88. Robbins P. W., Lipmann F., J. Biol. Chem., **233**, 681 (1958).
89. Robbins P. W., Lipmann F., J. Biol. Chem., **233**, 686 (1958).
90. Schmidt G., In «Phosphorus Metabolism» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), Vol. 1, p. 443, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1951.
91. Schrecker A. W., Kornberg A., J. Biol. Chem., **182**, 795 (1950).
92. Siu P. M. L., Wood H. G., Stjernholm R. L., J. Biol. Chem., **236**, 21P (1961).
93. Smith E. E. B., Mills G. T., Biochim. et Biophys. Acta, **13**, 386 (1954).
94. Smith E. E. B., Galloway B., Mills G. T., Biochem. Biophys. Research Commun., **5**, 148 (1961).
95. Smith O. H., Yanofsky C., J. Biol. Chem., **235**, 2051 (1960).
96. Snoke J. E., Bloch K., J. Biol. Chem., **199**, 407 (1952).
97. Snoke J. E., Yanari J., Bloch K., J. Biol. Chem., **201**, 573 (1953).
98. Stetten D., Jr., Am. J. Med., **28**, 867 (1960).
99. Stevens A., Biochem. Biophys. Research Commun., **3**, 92 (1960).
100. Strecker H. J., J. Biol. Chem., **189**, 815 (1951).
101. Strominger J. L., Smith M. S., J. Biol. Chem., **234**, 1822 (1959).
102. Strominger J., Physiol. Revs., **40**, 55 (1960).
103. Velick S. F., In «The Mechanism of Enzyme Action» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 491, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1954.
104. Wadkins C. L., Lehninger A. L., J. Biol. Chem., **233**, 1589 (1958).
105. Weiss S. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **46**, 1020 (1960).
106. Weiss S. B., Nakamoto T., J. Biol. Chem., **236**, 18P (1961).
107. Wilson L. G., Bاندurski R. S., J. Biol. Chem., **233**, 975 (1958).
108. Wolfe R. S., O'Kane D. J., J. Biol. Chem., **215**, 637 (1955).

# КАТАЛИЗ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ И В ПРОБИРКЕ

Д. КОШЛАНД

## ВВЕДЕНИЕ

Когда мы думаем о горизонтах в науке, мы пытаемся разглядеть тучоку в смутно различимом будущем, где мир реальности встречается с миром мечты. Пользуясь научной терминологией, можно сказать, что это точка пересечения *линейной экстраполяции* строгой науки с гиперболическими фантазиями научного воображения. Эту главу «Горизонтов биохимии» мы начнем с краткого изложения того, что нам сейчас известно в области энзимологии, а далее направимся в область неведомого; окажется ли действительность ближе к разумной экстраполяции или к научным фантазиям, может решить только будущее.

За последнее время мы перестали испытывать благоговейный трепет перед ферментами. Мы теперь научились выделять их в кристаллическом состоянии; мы можем разбить их на отдельные аминокислоты и определить их последовательность; мы облучаем их рентгеновскими лучами. Ферменты можно модифицировать, денатурировать и ренатурировать. Наши знания все время углубляются, и все же секреты удивительных свойств ферментов по-прежнему скрыты от нас. Однако темпы развития науки растут, и это позволяет думать, что понимание механизма действия ферментов может оказаться одним из завоеваний биохимии ближайшего десятилетия.

## КАТАЛИЗ В ПРОЦЕССАХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

В живых организмах катализ осуществляют ферменты, представляющие собой белковые молекулы. Некоторые из ферментов — весьма стабильные и растворимые соединения, и потому они сравнительно легко поддаются выделению и очистке. При работе с такими ферментами нетрудно показать, что процессы, связанные с их выделением, не изменяют свойств, которыми обладают эти катализаторы *in vivo*. Таким образом, ферменты образуют класс биологически активных соединений, способных осуществлять *in vitro* точно такие же функции, какие они выполняют *in vivo*.

При изучении ферментов бросаются в глаза две особенности, отличающие их от обычных химических катализаторов. Первая — это способность ферментов служить превосходными катализаторами химических реакций, протекающих в очень мягких условиях, например при pH 7, в водных растворах и при комнатной температуре. Вторая особенность — высокая специфичность ферментов. Химические же катализаторы весьма эффективны

обычно лишь в критических условиях, например при высокой температуре и в очень кислой среде. Кроме того, такой катализ весьма малоспецифичен.

Изучение структуры белка не позволяет непосредственно объяснить такое превосходство ферментов над катализаторами, изготовленными руками человека. Аминокислоты их боковых цепей содержат сульфгидрильные, имидазольные, индольные и другие группы, химические свойства которых хорошо известны. Отдельные группы могут выступать в некоторых случаях в качестве катализаторов, но в отношении своей каталитической активности они весьма заурядны. (Термин «каталитическая активность» будет использоваться для обозначения способности фермента изменять характер ковалентных связей в отличие от его специфичности.) Каким образом эти группы, обладающие сравнительно слабой каталитической активностью, в составе гигантской молекулы белка приобретают столь исключительные свойства? Поиски ответа на этот вопрос за последнее время привлекают все больше внимания.

Уже сделан важный шаг на пути решения этой проблемы. Для целого ряда ферментативных реакций найдены модельные реакции. Некоторые из таких моделей были обнаружены уже на ранних стадиях исследований; известно, например, что гидролиз сахарозы может катализироваться как сахаразой (инвертазой), так и кислотой. Для обнаружения других аналогий потребовалось длительное время, а иногда и осуществление очень сложных химических процессов. В настоящее время искусственно синтезированы аналоги для таких различных ферментных систем, как пиридоксальевые ферменты [34, 35], ДПН-зависимые ферменты [1, 33], протеолитические ферменты [7, 8, 12, 25, 44], каталаза [43], а также система реакций конденсации, катализируемых тиамином [10, 11]. Более того, свойства ферментов в общем виде были осмыслены на базе известных физических принципов органической химии для случаев присоединения по двойным связям [2, 18, 19, 38], для реакций конденсации [9, 37], действия протеолитических ферментов [21, 22, 46] и ферментов переноса [27]. Фактически можно уже, вероятно, считать, что для любой ферментативной реакции существует или может быть найдена без особых усилий соответствующая модельная реакция.

Прежде чем обсуждать обнадеживающие аспекты этого заключения, следует сделать одно замечание. Существование модельной реакции вовсе не означает, что в основе действия ферментов лежат те же механизмы, которые характерны для соответствующей модельной реакции. Во многих случаях для данной ферментативной реакции можно найти несколько различных модельных реакций. В качестве катализаторов распада перекиси водорода выступает множество разнообразных агентов, начиная от пыли и кончая ионами железа. При гидролизе АТФ катализаторами могут служить ионы водорода и ионы металлов. Гидролиз эфиров катализируется кислотами и основаниями и т. д. Таким образом, существование модели еще отнюдь не означает, что найден истинный механизм действия фермента. Например, разрыв гликозидных связей в молекуле крахмала может катализироваться как ферментом  $\beta$ -амилазой, так и ионами водорода. Однако мы не можем объяснить, почему фермент обеспечивает избирательный разрыв второй от невосстанавливающего конца глюкозильной связи, тогда как кислота действует на молекулу крахмала случайным образом на всем ее протяжении. Остается также неясной причина, обуславливающая способность фермента вести быстрый гидролиз крахмала при комнатной температуре и при концентрации ионов водорода  $10^{-7}M$ , тогда как катализируемая кислотой реакция идет при повышенной температуре в присутствии

1 M кислоты. Нам пока еще не удалось построить уникальную модель хотя бы для какой-нибудь одной ферментативной реакции. Точно так же мы не можем детально объяснить причины эффективности и избирательности действия биологических катализаторов.

Тем не менее неизменный успех поисков модельных реакций, идущих без участия ферментов, указывает на возможные пути решения этих проблем. Физическая химия органических и неорганических веществ дает возможность объяснить те или иные реакции и механизмы, используя понятия об электронных плотностях и пространственных взаимоотношениях. Если действие ферментов не связано с «черной магией» и если они катализируют лишь те реакции, которые идут и без них, хотя бы и с меньшей скоростью и не столь избирательно, то представляется разумным именно здесь начать поиски новых принципов и пересмотр старых принципов в свете новых проблем, возникших перед биохимией. В следующих двух разделах обсуждаются возможности такого приближения к некоторым аспектам проблем каталитической активности и специфичности.

### КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Как уже упоминалось, ферменты обладают способностью в очень мягких условиях увеличивать скорость протекания реакции на несколько порядков. Если к двум компонентам, которые в водном растворе и при нейтральном рН практически не реагируют друг с другом, добавить фермент в весьма низкой концентрации, реакция ускоряется в такой степени, что исходные соединения полностью превращаются в продукты реакции в течение нескольких минут.

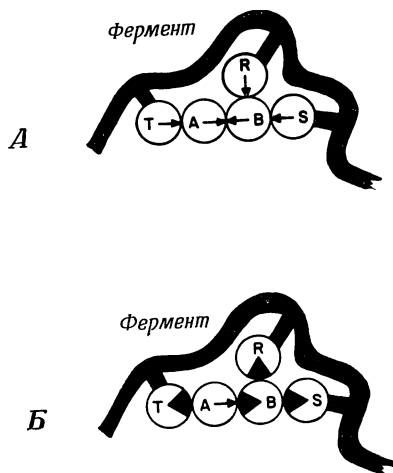
Необходимо ввести какие-то количественные оценки этой каталитической активности. Однако задача эта достаточно сложна. Часто пользуются для этого определением числа оборотов. При такой оценке в категорию наиболее активных ферментов попадает каталаза (число оборотов для этого фермента очень велико). Однако реакция, которую она катализирует, — расщепление  $H_2O_2$  — идет с заметной скоростью и в отсутствие катализатора и может быть ускорена даже такими неспецифичными и слабыми «катализаторами», как частицы пыли и стенки сосуда.

Более осмысленным критерием для сравнения активности различных ферментов может служить отношение скоростей данной реакции в присутствии фермента и в его отсутствие. При этом иногда получаются очень большие величины [28]. Так, например, гексокиназа ускоряет реакцию глюкозы с АТФ более чем в  $10^{11}$  раз, химотрипсин ускоряет реакцию между эфиром и водой по крайней мере в  $10^6$  раз, а алкогольдегидрогеназа повышает скорость окисления спирта с помощью дифосфопиридиннуклеотида (ДПН) более чем в  $10^9$  раз.

Такой способ оценки ферментативной активности более прогрессивен. Он дает исследователю возможность произвести количественную оценку активности фермента. Полученная величина может также служить отправной точкой для оценки наших неферментных моделей. Однако этот способ не указывает путей конструирования таких моделей. Чтобы найти эти пути, необходимо провести сравнение на базе теоретических принципов, позволяющих оценивать вклад различных видов катализа в определение общей скорости процесса. Например, во многих случаях кинетика действия фермента объясняется образованием «тройного комплекса» между ферментом и двумя субстратами. По-видимому, субстраты должны адсорбироваться на соседних участках поверхности белка до начала реакции. Важно количе-

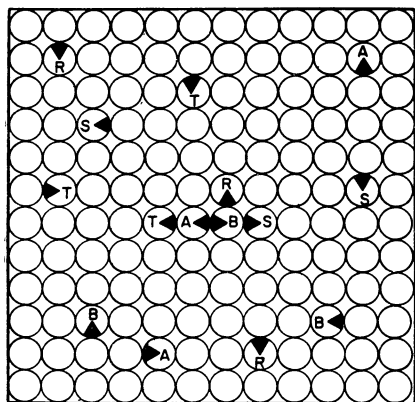
ственно оценить значение образования тройного комплекса в процессе катализа под действием данного фермента. Может ли само по себе образование такого комплекса обусловить увеличение скорости в  $10^9$ — $10^{12}$  раз или же его действие лишь частично ответственно за это увеличение? Этот вопрос возникает при анализе любой другой полной или неполной модели

Фиг. 1. Схематическое изображение гипотетической реакции, идущей на поверхности фермента, в которой участвуют два субстрата, А и В, и три каталитических группы фермента — R, S и T. Ориентация, соответствующая максимальной реакционной способности, указана стрелками (А). Зачерненные сектора обозначают ту часть поверхности молекулы, на которой может протекать реакция (Б). Активные группы удерживаются на своих местах за счет особенностей структуры фермента, субстраты — за счет специфичности адсорбционных процессов.



механизма действия фермента. В поисках путей построения моделей действия фермента и в оценке результатов этих поисков нам необходим количественный критерий, базирующийся на теоретических, а не на чисто эмпирических принципах.

Недавно был разработан такого рода метод оценки и сравнения [31, 32]; имеет смысл вкратце остановиться на анализе его особенностей и возможно-



Фиг. 2. Схематическое изображение той же реакции, что на фиг. 1, но идущей в растворе в отсутствие фермента.

Группы R, S и T представляют собой те же реакционноспособные группы, но уже не связанные со структурой белка. Комбинация из пяти молекул, расположенных так, как это необходимо для протекания реакции, показана в центре. Комбинации промежуточного типа, например R с B, также могут иметь место, хотя они и не показаны. Содержание различных комбинаций можно вычислить, исходя из предположения о случайной ассоциации компонентов или на основании анализа констант диссоциации.

стей. Подробные математические выкладки уже опубликованы; здесь мы приводим лишь примерные расчеты. Несколько упрощенная формула для подсчета максимальной скорости реакции  $V_E$  исходя из скорости реакции в отсутствие фермента  $V_0$  представлена уравнением (1), где величины  $\theta$  суть ориентационные факторы, величина  $[E_T]$  обозначает концентрацию фермента, а  $[R]$ ,  $[S]$  и  $[T]$  — концентрации молекул-катализаторов, участвующих в неферментативной реакции:

$$\frac{V_E}{V_0} = \frac{[E_T] (55,5)^4 \theta_A \theta_B \theta_R \theta_S \theta_T}{[A] [B] [R] [S] [T]} \quad (1)$$

Предположим, что какой-то фермент катализирует реакцию между двумя субстратами, А и В, посредством согласованного действия трех каталитических групп. В этом случае активный центр фермента можно схематически изобразить так, как показано на фиг. 1, А. Стрелки, изображенные внутри кружков, соответствующих А, В, R, T и S, показывают, что эти молекулы не имеют сферической симметрии и, следовательно, должны обладать определенной ориентацией, благоприятствующей протеканию реакции. Каталитические группы R, S и T соединены с ферментом ковалентными связями (жирные линии); именно так обстоит дело в случае боковых цепей, например таких, как имидазол или геминные простетические группы. Однако, как мы увидим далее, и в случае иона металла, удерживаемого нековалентными связями, характер рассуждений не меняется. Таким образом, субстраты адсорбируются на поверхности, на которой закреплены в определенных положениях каталитические группы фермента; расположение самих субстратов при этом обуславливается действием специфических сил со стороны белка.

Однако, поскольку абсолютно строгая ориентация молекул, по-видимому, не важна, модель, изображенная на фиг. 1, Б, вероятно, более реальна. Здесь в кружках вместо стрелок изображены зачерненные секторы, ограничивающие ту часть поверхности  $\left(\frac{1}{\theta}\right)$ , на которой может протекать ферментативная реакция.

Если единственная функция фермента состоит в том, чтобы обеспечить правильное взаимное расположение соответствующих групп катализатора и субстратов, то отношение скоростей ферментативной и неферментативной реакций будет зависеть от соотношения числа активных центров фермента и числа компактных конфигураций из 5 молекул, как это изображено на фиг. 2. Здесь R, S и T обозначают те же каталитические группы, что и ранее, с той разницей, что они находятся в растворе в свободном состоянии; например, R представляет собой уже не боковую цепь гистидина, а свободную молекулу имидазола. Такого типа соотношения были использованы при выводе уравнения (1). Другими словами, вычисленная величина  $\frac{V_E}{V_0}$  будет согласовываться с наблюдаемой в эксперименте величиной только в том случае, если действие фермента сводится лишь к установлению определенной взаимной ориентации реагирующих молекул и групп. Если же механизм действия фермента включает какие-то другие взаимодействия, то полученная с их помощью величина отношения скоростей окажется значительно ниже экспериментально полученного значения и степень расхождения будет количественно отражать участие в реакции механизма катализа именно такого типа. Приложение записанного выше уравнения к расчету некоторых конкретных примеров ферментативных реакций будет опубликовано в другом месте; здесь же мы рассмотрим лишь некоторые связанные с ним общие соображения.

Предположим сначала, что для каждого из субстратов и катализаторов справедливо утверждение, что реакция может протекать на поверхности, составляющей 10% поверхности этих молекул, т. е. что  $\theta_A = \theta_B = \theta_R = \theta_S = \theta_T = 10$ . В соответствии с обычно используемыми концентрациями можно принять для нашего примера концентрации А, В, R, S и T равными  $10^{-3}$  М и концентрацию  $E_T = 10^{-5}$  М. Подставляя эти величины в уравнение (1), получаем:  $\frac{V_E}{V_0} = 10^{21}$ . Это означает, что реакция, включающая в себя взаимодействие двух субстратов и трех катализаторов при отсут-

ствии жестких требований к их взаимной ориентации, будет протекать в  $10^{21}$  раз быстрее на поверхности фермента, чем в растворе, даже если функция этого фермента сводится к обеспечению такого ориентированного взаимного расположения. Это много больше, чем приведенная выше величина ( $10^{12}$ ). Ввиду этого возникает соблазн предположить, что такой механизм вполне достаточен для объяснения большой скорости ферментативных реакций.

Для некоторых случаев такой подсчет дает достаточно высокие значения для объяснения каталитической активности ферментов. Но будут ли они достаточными во всех случаях? Результат зависит от величины факторов  $\theta$  и от того, действительно ли в реакции участвует несколько каталитических групп. Примем для  $\theta$ -факторов и для концентраций те же значения, что и выше. Если в реакции принимают участие одна каталитическая группа и два субстрата, отношение  $\frac{V_E}{V_0}$  становится равным  $10^{10}$ . Если в реакции действуют только два субстрата, или один субстрат и одна каталитическая группа, или же, наконец, два субстрата и одна каталитическая группа (в последнем случае одним из субстратов служит вода), то величина отношения скоростей уменьшается до  $10^3$ . С другой стороны, при участии в реакции двух субстратов, у каждого из которых величина  $\theta$ -фактора равна  $10^3$ , значение  $\frac{V_E}{V_0}$  будет составлять  $10^8$ . Таким образом, решение вопроса о том, можно ли действие данного фермента свести к обеспечению ориентированного взаимного расположения компонентов, зависит от величин соответствующих  $\theta$ -факторов и от числа каталитических групп, принимающих участие в реакции.

Некоторую оценку минимальной величины фактора  $\theta$  можно получить на основе рассмотрения таких реакций, как вальденовское обращение, в которой атака осуществляется с тыльной стороны молекулы. Наблюдающаяся в ходе реакции инверсия асимметричного атома углерода указывает на то, что  $\theta$ -фактор должен быть равен по крайней мере 4, а реакции в конденсированных системах заставляют предполагать, что его величина может быть и значительно выше [16]. Таким образом, в первом приближении можно принять значение  $\theta = 10$ , однако в каждом конкретном случае необходимо проводить специальное предварительное исследование для установления этой величины.

Идея полифункционального катализа получила некоторое подтверждение [40], хотя надежность приводимых данных подвергается сомнению [5, 6]. Во всяком случае, совершенно ясно, что такой катализ трудно осуществить в отсутствие фермента. Любая реакция, идущая с изменением ковалентных связей, предполагает участие двух противоположных по характеру электронных компонентов. Электроны должны стягиваться к одному месту и уходить от другого. Реагенты, которые могли бы содействовать протеканию такой электронной перестройки, это соответственно кислота и основание. Но в одном и том же растворе невозможно создать одновременно высокие концентрации обоих этих соединений, поскольку они нейтрализуют друг друга. То же самое относится к окислительным и восстановительным агентам. Благодаря закреплению каталитических групп на трехмерной белковой матрице прямой реакции нейтрализации не происходит<sup>1</sup>. Кроме того, ориентационные требования, предъявляемые к множественному

<sup>1</sup> Может также осуществляться непрямая нейтрализация через буферные ионы раствора; однако в нашей упрощенной схеме мы сознательно не учитываем этой возможности.



соударению свободных молекул, как мы уже видели, огромны. Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные в пользу согласованного действия катализаторов в свете приведенных соображений представляются заслуживающими внимания, и нет аргументов, говорящих о невозможности существования таких катализаторов на поверхности фермента.

Очевидно, что между требованиями, накладываемыми на систему факторами ориентации, и числом каталитических групп существует взаимная зависимость. Если значения  $\theta$ -факторов велики, то число каталитических групп, соответствующее данной величине отношения  $\frac{V_E}{V_0}$ , будет меньше. Если число каталитических групп равно 3 или больше, то достаточными оказываются сравнительно умеренные значения  $\theta$ -факторов. Приведенные выше рассуждения показывают, что взаимная ориентация субстратов и катализаторов играет, по-видимому, значительную роль, а может быть, и целиком обуславливает поразительно высокую каталитическую активность ферментов.

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

К числу наиболее важных особенностей биологических систем относится их способность различать очень близкие химические структуры. Эта способность присуща не только ферментам, но и антителам, проницаемым мембранам и системам синтеза адаптивных ферментов. Высокая избирательность наблюдается также и при лекарственном или токсическом действии различных веществ, однако пока еще не известно, связана ли в этом случае высокая специфичность с наличием особых специфических участков, способных взаимодействовать с этими веществами, или же она является результатом взаимодействия с системами, перечисленными ранее. Тем не менее сходство экспериментальных результатов, получающихся при изучении специфического взаимодействия субстрата с ферментом, гаптена с антителом или индуктора с системой синтеза индуцируемого фермента, указывает на то, что процессы, определяющие специфичность во всех этих системах, если не одинаковы, то по крайней мере очень сходны друг с другом. Поэтому не удивительно, что изучение специфичности ферментов базируется на результатах исследований, проведенных на других системах, и в свою очередь вносит свой вклад в эти исследования.

Общепринятая трактовка специфичности ферментов основывается на классической модели «шаблона», или «ключа и замка», предложенной Фишером, Эрлихом и др. В этой модели часть поверхности молекулы фермента рассматривают как трехмерный слепок некоторой части молекулы субстрата. Иными словами, эта модель исходит из того, что поверхность молекулы субстрата изначально, еще до взаимодействия, комплементарна поверхности молекулы фермента.

Однако недавно было высказано соображение, что такого пространственного соответствия недостаточно для объяснения специфичности действия ферментов [29, 30]. Если не все, то по крайней мере некоторые ферменты претерпевают значительные изменения своей конфигурации в ходе взаимодействия с соответствующими субстратами. Не все ферменты в нативном состоянии существуют просто как слепки субстратов, и соответствие между субстратом и ферментом не может быть установлено, исходя только из рассмотрения их внешней конфигурации. Пожалуй, удачнее всего было бы применить сравнение с «перчаткой». Перчатка вовсе не является слепком с руки, и до тех пор пока она не надета на руку, она может быть различ-

ным образом сложена, свернута и т. п.; только будучи надетой на руку, она вполне соответствует ей по форме. В случае фермента, по-видимому, имеют место аналогичные взаимоотношения; сам субстрат взаимодействует с ферментом таким образом, что создается необходимое расположение каталитических групп, в результате чего становится возможным ферментативное воздействие на субстрат. Таким образом, в этой теории сохраняется требование пространственного соответствия, характерное для теории «шаблона», но вводится дополнительное условие индуцированного изменения белковой структуры фермента. Такое дополнение позволяет понять и объяснить ряд явлений, которые для гипотезы «шаблона» представляются или странными, или вовсе необъяснимыми.

Эта новая гипотеза еще далеко не доказана, но все возрастающее число фактов, обнаруженных как в нашей лаборатории [31, 41], так и в лабораториях других исследователей [15, 20, 36, 42] и получивших благодаря этой гипотезе свою трактовку, заставляет думать, что она призвана сыграть большую роль в объяснении проблем биологической специфичности. Ввиду этого целесообразно обсудить здесь некоторые особенности предлагаемой гипотезы, равно как и вытекающие из нее следствия.

1. Тот факт, что происходит разворачивание молекулы белка, вовсе не означает, что оно должно быть бесконтрольным и носит случайный характер. Скорее следует предположить, что оно регулируется и катализируется субстратом. При этом процесс может инициироваться тем, что одна из групп субстрата вступает в контакт с комплементарной группой, принадлежащей ферменту. Связывание этих двух групп, возможно, приведет к частичному разворачиванию молекулы белка таким образом, что обнажается еще одна из групп молекулы фермента, ранее скрытая, так что теперь становится возможным ее контакт со второй группой субстрата и т. д. Таким образом, концепция «гибкого» фермента вовсе не предполагает, что фермент первоначально существует в виде молекулы с неупорядоченной структурой; она лишь утверждает, что структура фермента может изменяться в процессе его взаимодействия с субстратом. В этой концепции не отвергается необходимость жесткой структуры субстрата. Речь идет только о конечном комплексе фермента и субстрата и о том, что изменения, приводящие к их комплементарной ассоциации, могут состоять также и в конформационных изменениях самого субстрата.

2. Мы не можем сказать а priori, как велики должны быть изменения конфигурации молекулы белка. Требование сводится к тому, чтобы эти изменения были достаточными для обеспечения необходимого расположения каталитических групп. Как было указано в предыдущем разделе, в иных случаях существуют очень жесткие требования к такому расположению активных групп в пространстве; тогда переход от неупорядоченного расположения к необходимому порядку может достигаться за счет лишь очень малых изменений формы. Более того, есть основания считать, что весь активный центр фермента составляет очень небольшую долю всей молекулы. Из сравнения молекулярных весов белков-ферментов, обычно очень больших, с молекулярными весами субстратов, которые обычно малы, становится ясно, что в каждый данный момент времени лишь малая доля аминокислот, входящих в состав белка, может находиться в контакте с субстратом. При попытке получить прямые доказательства изменения структуры белка в ходе катализа мы встречаемся с типичной задачей определения малой разности двух больших величин. Нет ничего удивительного в том, что эти изменения оставались до сих пор незамеченными. Однако в настоящее время уже имеются данные, хотя и предварительного характера [47],

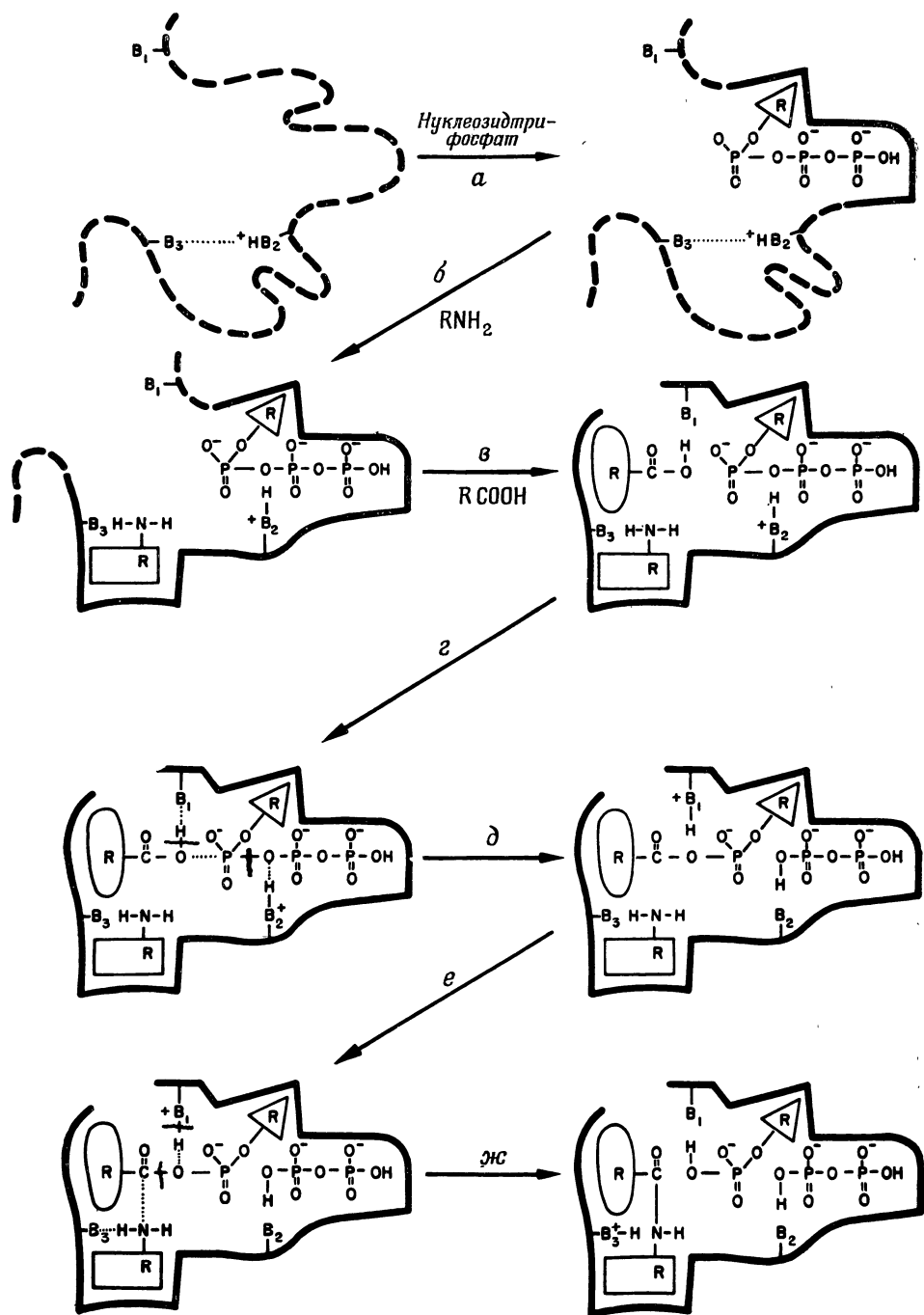
о том, что в некоторых случаях индуцированные субстратом изменения структуры фермента могут быть вполне ощутимыми. Изучение рибонуклеазы и химотрипсина показало, что в работе этих ферментов, по-видимому, участвуют аминокислотные остатки, далеко отстоящие друг от друга в линейной последовательности аминокислот белковой цепи [17, 24, 39]. Это еще не означает, что для того, чтобы занять соответствующее положение, эти остатки должны переместиться на значительное расстояние, однако такая возможность не исключена. Если такие изменения происходят со скоростью диффузии, то на это может потребоваться значительно меньше времени, чем на изменения ковалентных связей, хотя возможно, что в некоторых случаях именно конформационные изменения могут ограничивать скорость ферментативной реакции.

Всякая новая теория требует пересмотра старых представлений и экспериментальных данных. Удивительно, что данные, которые, казалось, бесспорно «свидетельствовали» в пользу определенного постулата, оказываются не такими уж ясными, если их рассматривать с другой точки зрения. Так, например, утрата способности сульфгидрильных групп фермента реагировать с йодацетамидом в присутствии субстрата дала основание для вывода о том, что сульфгидрильные остатки входят в состав активного центра фермента и их блокирование является результатом внедрения субстрата между SH-группами и соответствующим реагентом. Но если предположить, что субстрат индуцирует конформационные изменения, приводящие к разворачиванию белка, может иметь место «демаскировка» или, наоборот, «маскировка» остатков, не находящихся в непосредственном контакте с субстратом. Приведенный пример может представлять собой как раз случай такой «маскировки». Отсюда следует, что иногда «маскировку» групп фермента в присутствии субстрата можно отнести за счет конформационных изменений самого фермента, а не приписывать их непосредственному защитному действию субстрата.

В качестве второго экспериментального критерия, обычно используемого для идентификации групп, входящих в состав активного центра фермента, выступает конкурентное подавление. Если какое-то соединение играет роль конкурентного ингибитора, то оно, по-видимому, конкурирует с истинным субстратом за активный центр или какую-то его часть.

В большинстве случаев такая трактовка безусловно правильна. Но если связывание с ферментом некоего компонента X сопровождается изменением формы белка, то результирующая молекула может утрачивать способность связываться с истинным субстратом. Кинетика такого сложного взаимодействия будет как раз соответствовать кинетике конкурентного подавления, несмотря на то что компонент X и субстрат связываются с различными участками фермента.

Представление о взаимодействии «гибкого» фермента с субстратом дает возможность объяснить случаи последовательной адсорбции и реакции различных субстратов на поверхности одного фермента. Иногда такая последовательность имеет четко выраженное биологическое значение для организма. На фиг. 3 приведен пример, который можно рассматривать как объяснение реакции некоторых ферментов типа синтетазы. Для рассмотрения взята гипотетическая реакция, на примере которой можно объяснить отдельные этапы суммарной реакции, представленной уравнением (2). Аналогичные уравнения могут быть записаны для реакций, идущих с участием глутаматсинтетазы, пантотенатсинтетазы, ацетил-КоА-синтетазы и для реакции активирования аминокислот. В разных реакциях акцепторами будут служить различные молекулы; при расщеплении АТФ может образо-



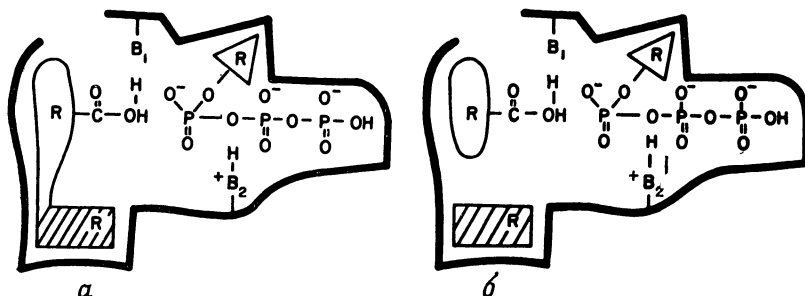
Фиг. 3. Схематическое изображение процесса образования на поверхности фермента промежуточного продукта, обладающего высокой реакционной способностью ( $a - жс$ ).  $B_1$ ,  $B_2$  и  $B_3$  представляют собой каталитические группы, соответствующее расположение которых должно быть индуцировано для того, чтобы реакция могла начаться. Жирной линией показана часть молекулы белка. Прерывистая линия — нативная структура в отсутствие субстрата; сплошная линия обозначает измененную конформацию того же участка фермента после адсорбции субстрата. На фигуре не показаны этапы, связанные с десорбцией продуктов реакции и регенерацией фермента.

ываться либо аденозиндифосфат (АДФ) и неорганический ортофосфат, либо аденозин-5'-фосфат (АМФ) и пирофосфат, но все эти отличия не имеют принципиального значения. Как видно на фиг. 3, АТФ, амин и карбоновая



кислота адсорбируются на ферменте по очереди, причем всякий раз в белковой молекуле возникают конформационные изменения. Когда адсорбированы все три молекулы, каталитические группы  $B_1$ ,  $B_2$  и  $B_3$  приобретают соответствующее расположение для того, чтобы могла идти реакция.

Начальная реакция, ведущая к образованию ациладенилата, не может начаться раньше, чем амин займет свое место на ферменте, так как до присоединения амина каталитические группы, активирующие реакцию между карбоксилем и АТФ, еще не находятся в нужном положении. Как только амин займет свое место, начинается первый этап реакции, а за ним сразу



Фиг. 4. Схематическое изображение группы R, либо связанной с карбоновой кислотой (а), либо существующей в виде отдельной молекулы (б).

Эта группа сама участия в реакции не принимает, но индуцирует соответствующее изменение конфигурации белка, необходимое для протекания реакции между карбоксилем и АТФ (аналогично той роли, которую выполняет группа  $\text{RNH}_2$  на фиг. 3).

же следует второй этап, поскольку и субстрат и все активные группы находятся на своих местах. Такая последовательность событий имеет определенный биологический смысл, так как реакционная способность ациладенилата очень высока и при наличии возможности свободно диффундировать в клетке он неизбежно должен был бы расходоваться на многочисленные побочные реакции. Одна только адсорбция на поверхности фермента в этом смысле была бы менее эффективна. Известно, например, что ДПН, даже адсорбированный на ферменте, может быть гидролизован ДПН-азой нейроспоры [3]. Таким образом, адсорбция сама по себе не может служить достаточным препятствием для протекания побочных реакций. Таким образом, «гибкий» фермент может нести еще одну полезную функцию регуляции поведения высокореакционноспособных промежуточных продуктов.

Рассмотрим ряд дополнительных возможностей, вытекающих из представления об этом механизме. Молекула, приводящая к правильному размещению каталитических групп, ответственных за реакции с участием ациладенилата, сама может не обладать способностью вступать в реакцию. Это может быть некая группа на самом субстрате (фиг. 4, а) или какое-либо химически инертное соединение R (фиг. 4, б). Первый вариант позволяет понять, чем определяется во многих случаях минимальная величина молекул субстрата. Ацил без R-группы не сможет вступить в реакцию, так как не будет обеспечено соответственное расположение каталитических групп. Второй вариант проливает свет на роль гормонов. Действительно, функцию

химически неизменного соединения R, необходимого для протекания реакции между двумя субстратами, могут с успехом выполнять стероиды или полипептиды.

Рассматриваемая модель позволяет разобраться и в сложном вопросе о специфическом действии лекарств. Лекарственное вещество, примененное вместо гормона R, может либо полностью ингибировать ферментативную реакцию, либо, напротив, оказаться более эффективным активатором, чем природный гормон. Более того, модель допускает и возможность того, что лекарственное вещество окажется эффективным в тех случаях, для которых не существует природного гормона.

Конфигурация ферментов не всегда допускает оптимальную реализацию присущей ферменту активности. Некоторые реагенты, изменяющие структуру белков, могут увеличивать их ферментативную активность. Так, например, активность АТФ-азы мышечного белка миозина увеличивается при действии на нее как динитрофенола, так и парахлормеркурибензоата [14, 26]. Логично сделать вывод, что искусственно синтезированные молекулы R могут влиять на структуру белка и таким образом ускорять или угнетать нормальную активность фермента. Если это так, то прогресс наших знаний в области структуры и механизмов специфического действия ферментов должен в значительной степени влиять на проблему создания и применения новых лекарственных препаратов.

#### СЛЕДСТВИЯ ИЗ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

В предыдущих разделах обсуждались некоторые новые идеи, связанные с развитием специфической области биохимии — изучения действия ферментов. Быть может, имеет смысл в заключение рассмотреть возможность распространения этих идей на другие разделы биохимии.

Начнем с проблемы управления метаболизмом. Ясно, что кинетические характеристики ферментативных реакций играют решающую роль в познании сложной метаболической системы клетки. Для того чтобы реально оценить влияние изменений внутриклеточной среды на скорости ферментативных реакций, необходимо предварительное изучение изменений кинетики реакций в зависимости от рН и действия восстановительных агентов в результате мутаций и т. п. Поведение живых систем может быть в конце концов проанализировано при помощи вычислительных машин на основе данных, полученных из опытов *in vitro*. Первые шаги в этом направлении уже сделаны [13]. Растворимые ферменты сравнительно легко поддаются подобному изучению. Хуже обстоит дело с нерастворимыми ферментами, поскольку в этом случае почти невозможно выделить фермент, сохранивший свою нативную структуру. Так, например, фермент может оказаться связанной ковалентной связью с какой-либо частицей, мембраной или другим ферментом. Является ли это препятствие непреодолимым? По-видимому, нет. Вполне возможно выделить фермент, сохранивший, несмотря на изменение нативной структуры, присущую ему активность. Известно, что большая часть молекулы фермента может быть изменена без ущерба для его каталитической активности. На активности фермента могут практически не отразиться изменения заряда, характера отдельных групп и даже утрата значительного участка боковой цепи [23]. Для изучения нерастворимых ферментов эти данные представляют особую ценность, так как они подтверждают возможность выделения фермента из нерастворимого материала даже путем разрыва ковалентных связей, таким образом, что активность

фермента при этом не пострадает. Ведь для анализа собственно кинетики существенное значение имеет именно эта присущая ферменту активность, а не нативность структуры.

С другой стороны, наши представления о структуре ферментов могут уберечь нас от слишком поспешных выводов. Специфичность фермента может изменяться при изменении определенных участков белка или даже при изменении рН, концентрации ионов металлов и т. п. Так, например, выделенная при обработке митохондрий ультразвуком АТФ-аза *in situ* могла быть совсем другим ферментом. В столь жестких условиях может происходить превращение нормальной киназы в АТФ-азу. Таким образом, знание структуры белков необходимо не только для сохранения нативной активности ферментов при их выделении, но и для того, чтобы оценить, в каких случаях эта активность может оказаться модифицированной.

Другое направление, которое рисуется нам в перспективе, — поиски возможностей получения синтетических ферментов значительно меньшего молекулярного веса, чем природные. Большое число данных говорит о том, что каталитическая активность и специфичность действия ферментов определяются «активным центром», представляющим собой лишь *очень небольшую* часть белковой молекулы. Остальная часть структуры рисуется как некий каркас, назначение которого сводится к сохранению соответствующего взаиморасположения в пространстве групп, определяющих каталитическую активность и специфичность. По-видимому, рано или поздно будут найдены пути синтеза соединений, в которых активные центры фиксированы с помощью низкомолекулярной дополнительной структуры, например типа молекулы фенантрена. Такие молекулы будут несравненно устойчивее белков, а следовательно, они смогут эффективно применяться в промышленном производстве. Колонка, наполненная синтетическим ферментом, через которую протекают соответствующие реагенты, сможет функционировать неограниченно долго. Колонка, наполненная адсорбированным белковым ферментом, уже была сконструирована Качальским [4]. В колонках, заполненных в определенном порядке ферментами, можно в условиях лаборатории или промышленного химического производства осуществлять последовательности реакций, идущих в живой клетке.

Однако еще большее значение имеют потенциальные возможности использования синтетических ферментов в медицине. В первую очередь они, по-видимому, найдут себе применение в области терапии наследственных нарушений обмена и в борьбе с процессом старения. По мере закрепления успехов медицины в области борьбы с инфекционными заболеваниями с помощью антибиотиков и антиметаболитов вопросы терапии наследственных дегенеративных заболеваний, а также борьбы с процессами старения приобретают первостепенное значение. Какова должна быть терапия этих заболеваний?

Терапию наследственных нарушений обмена можно будет осуществлять с помощью инъекций синтетических ферментов или синтетических ингибиторов в зависимости от того, что лежит в основе заболевания — нехватка или избыток фермента. В качестве несколько отдаленной аналогии такого рода терапии может служить введение инсулина при диабете. Более эффективным средством явилось бы исправление наследственного дефекта в самой его первооснове, т. е. на хромосоме. Современные представления о синтезе белков приводят к выводу, что химическое изменение в определенном локусе молекулы ДНК приводит к синтезу неполноценного фермента, что влечет за собой нарушение обмена. Восстановление поврежден-

ного локуса молекулы ДНК (особенно в тех случаях, когда происшедшие изменения невелики) потребует применения реагентов, высокоспецифичных по отношению к поврежденному локусу. Быть может, именно использование синтетических ферментов позволит решить эту проблему.

Сущность процесса старения в настоящее время остается неясной. Для ее объяснения предлагаются самые разнообразные теории. В качестве еще одной умозрительной гипотезы, опирающейся на приведенные выше соображения о структуре ферментов и механизме действия гормонов, можно выдвинуть предположение о существовании «гормона смерти». Прочие гормоны — гормоны роста, прессирующие и гонадотропные гормоны — полезны для жизнедеятельности организма. Мысль о возможности синтеза также и вредоносного гормона, предназначенного для разрушения организма, может показаться нелепой. Однако, если вдуматься, смерть, как ни «неприятна» она для отдельного индивидуума, полезна для развития вида в целом. Смерть — инструмент улучшения вида в процессе эволюции. Она является естественным элементом процесса исправления ошибок и создания новых и все более эффективных живых систем. Она позволяет живым системам приспосабливаться к изменениям окружающей среды. Когда развились способные к адаптации и менее зависящие от окружающей среды формы жизни, функции регуляции их роста и развития перешли к специальным гормональным агентам, связанным с неким внутренним расписанием. Почему не предположить, что в их число входит и такой агент, который гарантирует, что смерть наступит естественным путем даже в отсутствие несчастного случая?

Что же это за гормон и каков возможный механизм его действия? Анализ симптомов старения (к ним относятся, например, обезвоживание, замедление процессов метаболизма и др.), по-видимому, может подсказать некоторые экспериментальные подходы к поискам такого гормона. В свете предыдущего обсуждения можно предположить, что «гормон смерти» должен играть роль ингибитора, общего для всех ферментов. Действие ювенильного гормона явно сводится к ингибированию гормонов или ферментов, ответственных за метаморфоз [45], так что нам уже известен механизм, который может служить прецедентом для существования подобного механизма. Во всяком случае, если живые системы действительно вырабатывают какой-то гормон, управляющий угасанием жизненных функций с течением времени, то поиски фермента или иного препарата, способного воздействовать на этот гормон, представляют значительный интерес.

#### ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Статья спекулятивного характера не должна иметь заключения. Время — лучший судья. Ученым хорошо известно, сколь рискованно предсказывать эксперимент даже завтрашнего дня, а тем более оценивать научные перспективы будущего. Здесь исследователя ждет опасность увлечься построением воздушных замков; однако и чрезмерная робость была бы неуместной. Кто из нас даже в 30-х годах поверил бы, что уже в начале 60-х годов мы будем вести синтез ДНК в бесклеточной системе или изучать структуры боковых цепей глобулярных белков при разрешении 2Å? Автор подобной статьи может лишь надеяться на то, что некоторые идеи окажутся верными, другие послужат стимулом для открытий, которые иначе дольше ожидали бы своей очереди, а иные хотя бы будут соответствовать по своей фантастичности темпам развития современной науки.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Abeles R., Hutton R., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., **79** 712 (1957).
2. Alberty R. A., Bender P., J. Am. Chem. Soc., **81**, 542 (1959).
3. Astrachan L., Federation Proc., **13**, 177 (1954).
4. Bar-Eli A., Katchalski E., Nature, **188**, 856 (1960).
5. Bell R. P., Clunie J. C., Proc. Roy. Soc., **A212**, 33 (1952).
6. Bell R. P., Jones P., J. Chem. Soc., p. 88 (1953).
7. Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., **79**, 1258 (1957).
8. Bender M. L., Novau M. C., J. Am. Chem. Soc., **80**, 5388 (1958).
9. Bloom B., Topper Y. T., Science, **124**, 982 (1956).
10. Breslow R., J. Am. Chem. Soc., **79**, 1762 (1957).
11. Breslow R., Chem. and Ind. (London), p. 893 (1957).
12. Bruice T. C., Schmir G. L., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4552 (1959).
13. Chance B., J. Biol. Chem., **235**, 2440 (1960).
14. Chappel J. B., Perry S. V., Biochim. et Biophys. Acta, **16**, 285 (1955).
15. Christensen H. N., Advances in Protein Chem., **15**, 239 (1960).
16. Cristol S., Arganbright R. P., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3441 (1957).
17. Dixon G. H., Kauffman D. L., Neurath H., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1260 (1958).
18. Fisher H. F., Frieden C., McKee J. S. M., Alberty R. A., J. Am. Chem. Soc., **77**, 4436 (1955).
19. Gawron O., Glaid A. J., Fondy T. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3634 (1961).
20. Crisolia S., Joyce B. B., Biochem. Biophys. Research Commun., **1**, 280 (1959).
21. Gutfreund H., Sturtevent J. M., Biochem. J., **63**, 656 (1956).
22. Gutfreund H., Sturtevent J. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **42**, 719 (1956).
23. Hill R. L., Smith E. L., Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 376 (1956).
24. Hirs C. H. W., Halmann M., Kyscia J., In «Biological Structure and Function» (T. W. Goodwin and D. Lindberg, eds.), Vol. I, p. 41, Academic Press, New York, 1961.
25. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Biol. Chem., **234**, 1272, 1280 (1959).
26. Kielley W. W., Bradley L. B., J. Biol. Chem., **218**, 653 (1956).
27. Koshland D. E., Jr., In «Mechanism of Enzyme Action» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 608, The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1954.
28. Koshland D. E., Jr., J. Cellular Comp. Physiol. Suppl., **1**, 47, 217 (1956).
29. Koshland D. E., Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **44**, 98 (1958).
30. Koshland D. E., Jr., J. Cellular Comp. Physiol. Suppl., **1**, 54, 245 (1959).
31. Koshland D. E., Jr., Advances in Enzymol., **22**, 45 (1960).
32. Koshland D. E., Jr., J. Theoret. Biol. (1962) (в печати).
33. Mauzerall D., Westheimer F. H., J. Am. Chem., **77**, 2261 (1955).
34. Metzler D. E., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **74**, 979 (1952).
35. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 648 (1954).
36. Nirenberg M. W., Jakoby W. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **46**, 206 (1960).
37. Rieder S. V., Rose I. A., J. Biol. Chem., **234**, 1007 (1959).
38. Speyer J. F., Dickman S. R., J. Biol. Chem., **220**, 193 (1956).
39. Stein W. H., Brookhaven Symposia in Biol., № **13**, 104 (1960).
40. Swain C. G., Brown J. F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2534, 2538 (1952).
41. Thomas J. A., Koshland D. E., Jr., J. Biol. Chem., **235**, 2511 (1960)

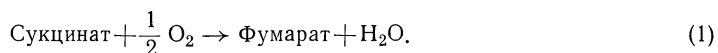
42. Tomkins G. M., Yielding K. L., Curran J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **47**, 270 (1961).
43. Wang J. H., J. Am. Chem. Soc., **54**, 822, 4715 (1955).
44. Westhead E. H., Jr., Morawetz H., J. Am. Chem. Soc., **80**, 237 (1958).
45. Williams C. R., Nature, **178**, 212 (1956).
46. Wilson I. B., In «The Enzymes» (P. D. Boyer, H. A. Lardy, and K. Myrbäck, eds.), Rev. ed., Vol. IV, p. 501, Academic Press, New York, 1960.
47. Yankeelov J., Koshland D. E., Jr., In «Biological Structure and Function», Pergamon Press, New York (в печати).

# АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОЧНАЯ СТРУКТУРА

Х. КРЕБС

Изучение выделенных и очищенных ферментов составляет одно из главных направлений в современной биохимии. Такой подход основан на предположении о том, что живая клетка вполне может служить объектом химического анализа, как и любая другая химическая система. Говоря словами Грина [4], подобные системы «должны быть расчленены на составляющие компоненты, отдельные их части должны быть охарактеризованы химически, причем способ их соединения между собой следует рассматривать как проблему химическую, подобно изучению самих составляющих систему частей». Такой традиционный химический подход вполне оправдан. Однако несомненно, что это не единственный возможный подход. Свойства ферментов *in situ* зачастую во многих отношениях отличаются от свойств чистых ферментов, и именно эти отличия представляют большой физиологический интерес, так как они помогают пролить свет на те факторы, которые регулируют активность ферментов.

Следующие опыты, проведенные с системой оксидазы янтарной кислоты, наглядно демонстрируют, до какой степени простые химические и физические воздействия могут изменять свойства фермента. Исследовалась реакция окисления сукцината молекулярным кислородом:



Скорость этой реакции зависит от активности сукцинатдегидрогеназы и от переносчиков электрона от сукцинатдегидрогеназы к кислороду.

Опыты проводились, как правило, на грудной мышце голубя, измельченной в мельнице Латапи и суспендированной в солевом растворе. Этот материал был введен в практику биохимических исследований Сент-Джёрджи более 25 лет назад [12]. Концентрация ткани и время инкубации в различных опытах обычно были одинаковы, и, таким образом, величины скоростей, приводимые в разных таблицах, можно сравнивать непосредственно.

Тщательно отмытую грудную мышцу, хранившуюся при  $-15^\circ$  в течение не менее чем 24 час, ресуспендировали и инкубировали с сукцинатом в присутствии кислорода. Скорость исчезновения сукцината оказалась сравнительно низкой — примерно в 3—4 раза меньше, чем для свежей мышцы, а молярное отношение количества израсходованного сукцината к количеству использованного кислорода было близко к 2. Отсюда следует,

что окисление шло только путем реакции (1). Добавление динитрофенола (0,5 мМ), амитала (1,25 мМ) или аденозинтрифосфата (АТФ) не сказывалось заметным образом на скорости реакции (табл. 1).

Таблица 1

Влияние амитала, динитрофенола и АТФ на окисление сукцината измельченной, промытой и замороженной грудной мышцы голубя\*

Добавленное вещество	Конечная концентрация, мМ	Потребление $O_2^{**}$ , $\mu\text{моль}$	Убыль сукцината**, $\mu\text{моль}$	Отношение сукцинат/ $O_2$
Без добавок	—	16,7	34,7	2,08
Динитрофенол	0,5	14,5	30,0	2,07
Амитал . . . . .	1,25	16,8	33,6	2,10
АТФ . . . . .	2,0	15,8	31,9	2,02

\* Измельченную мышцу четыре раза промывали 10 объемами 0,01 М Na-фосфатного буфера (рН 7,4) и хранили в течение нескольких дней при  $-15^\circ$ . Замороженную ткань суспендировали в солевой среде.

\*\* Данные относятся к 4 мл суспензии, содержащим 400 мг (сырой вес) ткани и 120  $\mu\text{моль}$  сукцината; температура  $30^\circ$ ; инкубация в течение 30 мин в присутствии кислорода.

При работе со свежей, не отмытой и не замороженной тканью были получены другие результаты (табл. 2). Оказалось, что скорость расходования сукцината примерно в 3 раза, а потребление кислорода — в 4 с лишним раза выше, чем в предыдущем случае. Величина отношения израсходованной сукцинат/использованный  $O_2$  менее 2, так как, помимо сукцината, окисляются и другие вещества. Динитрофенол служит весьма эффективным ингибитором окисления сукцината, а до некоторой степени и ингибитором потребления  $O_2$ ; это подавление в значительной степени снимается амиталом. АТФ дает эффект только в присутствии динитрофенола, несколько ослабляя подавляющее действие этого последнего на окисление сукцината.

Таблица 2

Влияние амитала, динитрофенола и АТФ на окисление сукцината в суспензии свежей измельченной грудной мышцы голубя\*

Добавленное вещество	Конечная концентрация, мМ	Потребление $O_2$ , $\mu\text{моль}$	Убыль сукцината, $\mu\text{моль}$	Отношение сукцинат/ $O_2$
Без добавок . . . . .	—	51,8	65,0	1,25
Динитрофенол . . . . .	0,5	47,1	34,5	0,73
Амитал . . . . .	1,25	57,6	80,6	1,40
Динитрофенол, амитал . . . . .		50,3	55,5	1,10
АТФ . . . . .	2	58,7	64,0	1,09
АТФ, динитрофенол . . . . .		49,0	44,9	0,92
АТФ, амитал . . . . .		63,6	83,9	1,32
АТФ, амитал, динитрофенол . . . . .		53,4	56,0	1,05

\* Данные относятся к 4 мл суспензии, содержащей 400 мг (сырой вес) ткани и 120  $\mu\text{моль}$  сукцината. Температура  $30^\circ$ ; инкубация в течение 30 мин; аэробные условия.

Совсем иные результаты получали в том случае, когда кусочки грудной мышцы, тщательно промытые солевым раствором, исследовали сразу после промывки (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Влияние амитала, динитрофенола и АТФ на окисление сукцината в препарате промытых частиц грудной мышцы голубя\*

Добавленное вещество	Конечная концентрация, мМ	Потребление $O_2$ , $\mu$ моль	Убыль сукцината, $\mu$ моль	Отношение сукцинат/ $O_2$
Без добавок . . . . .		11,3	9,5	0,84
Динитрофенол . . . . .	0,5	10,5	12,5	1,19
Амитал . . . . .	1,25	15,4	18,4	1,19
Динитрофенол, амитал . . . . .		12,3	16,7	1,36
АТФ . . . . .	2	38,5	45,7	1,19
АТФ, динитрофенол . . . . .		24,0	20,7	0,86
АТФ, амитал . . . . .		43,7	64,5	1,47
АТФ, амитал, динитрофенол . . . . .		36,5	40,5	1,11

\* Данные относятся к 4 мл суспензии, содержащей отмытые, как указано в тексте, частицы. Прочие условия приведены в примечаниях к табл. 4.

Скорости потребления кислорода и расходования сукцината в этом материале были в 4 раза ниже, чем в непромытом материале. Динитрофенол и амитал несколько ускоряют скорость расходования сукцината. АТФ оказался весьма активным; он в несколько раз увеличивал как скорость потребления  $O_2$ , так и скорость расходования сукцината, доводя их до уровня, характерного для непромытого материала. Это, между прочим, означает, что в промытых суспензиях без добавок каталитическая способность переносчиков электронов не является лимитирующим фактором. Окисление, идущее в присутствии АТФ, в отличие от окисления, идущего в его отсутствие, подавляется динитрофенолом, причем это подавление в значительной степени снимается амиталом. Добавление дифосфодинуклеотида или КоА не вызывает дальнейшей стимуляции реакции (эти данные не включены в табл. 3).

Некоторые из этих наблюдений не являются неожиданностью и были сделаны ранее на других объектах [3, 11]. Можно думать, что стимуляция окисления в отмытых частицах в присутствии АТФ представляет собой результат того, что в этой системе дыхание связано с фосфорилированием и регулируется наличным уровнем аденозиндифосфата (АДФ). АТФ при этом служит источником АДФ. Однако некоторые данные не укладываются в общепринятую схему; это относится, например, к подавлению окисления сукцината динитрофенолом и к снятию этого подавления амиталом (см. табл. 2). Далее, если бы было верно предположение о том, что АТФ ускоряет процесс окисления сукцината, выступая в качестве источника АДФ, то сам АДФ должен был бы оказывать точно такой же эффект, тогда как аденозинмонофосфат (АМФ) должен быть неактивным. Действительно, АДФ оказался таким же активным стимулятором, как АТФ; однако и АМФ не является в этом смысле полностью инертным (табл. 4); АМФ дает, хотя и меньший, чем АТФ, но вполне заметный эффект. Впрочем, не исключена возможность того, что АМФ фосфорилируется до АДФ.

Таблица 4  
Влияние аденозиннуклеотидов на процесс окисления сукцината  
в отмытых частицах грудной мышцы голубя\*

Добавленное вещество	Потребление $O_2$ , $\mu\text{моль}$	Убыль сукцината, $\mu\text{моль}$	Отношение сукцинат/ $O_2$
Без добавок . . . . .	16,4	23,9	1,46
Динитрофенол . . . . .	9,3	13,5	1,45
АМФ . . . . .	22,5	35,3	1,57
АМФ, динитрофенол . .	10,9	18,4	1,68
АДФ . . . . .	33,2	48,7	1,38
АДФ, динитрофенол . .	17,1	22,0	1,29
АТФ . . . . .	38,1	47,5	1,25
АТФ, динитрофенол . .	20,1	22,0	1,10

\* Данные относятся к 4 мл отмытых частиц, приготовленных, как указано в тексте. 4 мл содержали 12  $\mu\text{моль}$  сукцината. Концентрация динитрофенола была 0,5 мМ, аденозиннуклеотидов — 2 мМ.

Таким образом, основной пробел в объяснении полученных данных относится к подавлению окисления сукцината динитрофенолом и снятию этого подавления амиталом. Известно, что действие динитрофенола в такого рода системах заключается в подавлении окислительного фосфорилирования, а единственный изученный эффект амитала состоит в блокировании переноса электронов от восстановленного дифосфопиридиннуклеотида к цитохромам. Поскольку оба эти эффекта не могут непосредственно явиться причиной подавляющего действия динитрофенола на окисление сукцината или причиной снятия этого подавления амиталом, должны существовать какие-то дополнительные или вторичные эффекты действия обоих этих ингибиторов. Было сделано предположение, что ключевым фактором, влияющим на скорость окисления сукцината, может быть уровень содержания оксалоацетата [3, 10, 11, 14]. Как показано в работе Даса [1] из лаборатории Сцент-Дьёрдьи, оксалоацетат при добавлении его к отмытым препаратам грудной мышцы голубя может действовать как эффективный ингибитор сукцинатдегидрогеназы (см. также [13]). В условиях опыта, указанных для табл. 1, оксалоацетат в количестве 0,06 мМ подавляет окисление сукцината на 84%. Предположение о том, что оксалоацетат регулирует скорость окисления сукцината, весьма привлекательно, однако некоторые факты явно противоречат этой гипотезе. Добавление оксалоацетата даже в концентрации 10 мМ к суспензии свежей мышцы не дает заметного ингибиторного эффекта (табл. 5), быть может, потому, что это соединение очень быстро включается в процессы метаболизма, идущие в измельченной грудной мышце [8]. Скорость использования оксалоацетата тканью не зависит от присутствия динитрофенола (табл. 6).

Поскольку окисление сукцината не подавляется при добавлении оксалоацетата, трудно понять предположение о том, что торможение окисления сукцината динитрофенолом объясняется накоплением оксалоацетата. Приходится постулировать, что внутри митохондрии оксалоацетат распределен неравномерно. Образующийся в определенных местах оксалоацетат накапливается в месте нахождения сукцинатдегидрогеназы, тогда как оксалоацетат, добавляемый извне, вступает в реакцию в других местах.

Таблица 5

## Влияние оксалоацетата на процесс окисления сукцината в свежей измельченной грудной мышце голубя\*

Добавленное вещество	Конечная концентрация, мМ	Потребление $O_2$ , $\mu\text{моль}$	Убыль сукцината, $\mu\text{моль}$	Отношение сукцинат/ $O_2$
Без добавок	—	25,2	36,2	1,44
Оксалоацетат	10	23,5	35,1	1,49
Оксалоацетат	5	23,9	33,6	1,41
Динитрофенол	1,25	16,9	6,4	0,38

\* Данные относятся к 4 мл суспензии, инкубированной в течение 40 мин при 20°. Более низкая температура была выбрана в связи с большей стабильностью оксалоацетата при этой температуре. Следует заметить, что подавление окисления сукцината динитрофенолом при 20° больше, чем при 30°.

Таблица 6

## Влияние сукцината и динитрофенола на убыль оксалоацетата в суспензии грудной мышцы голубя\*

Добавленное вещество	Конечная концентрация, мМ	Количество оксалоацетата в 4 мл суспензии через различные промежутки времени, $\mu\text{моль}$			
		0 мин	5 мин	10 мин	20 мин
Без добавок . . . . .	—	39,2	15,6	8,1	2,4
Сукцинат . . . . .	30	39,2	21,8	16,0	9,2
Сукцинат+динитрофенол . . . . .	30+0,5	39,2	21,4	15,4	8,9
Динитрофенол . . . . .	0,5	39,2	14,8	8,4	3,3

\* К 10-процентной суспензии добавляли 39,2  $\mu\text{моль}$  оксалоацетата; температура 30°;  $O_2$ . Сукцинат подавляет окисление оксалоацетата (см. [13]); динитрофенол никакого эффекта не оказывает.

Известно, что способность карбоновых кислот проникать в митохондрии может быть ограничена, как это имеет место, например, для лимонной кислоты; однако тот факт, что оксалоацетат при добавлении его к митохондриям легко включается в метаболические процессы, свидетельствует против того, что проникновение оксалоацетата в митохондрию или диффузия внутри митохондрии могут быть заторможены из-за наличия барьера проницаемости.

Таблица 7

## Подавление сукцинатоксидазы высокими концентрациями динитрофенола\*

Конечная концентрация динитрофенола, мМ	Потребление $O_2$ , $\mu\text{моль}$	Убыль сукцината, $\mu\text{моль}$	Отношение сукцинат/ $O_2$	Подавление удаления сукцината, %
0	13,0	—27,1	2,08	—
2,5	8,3	—16,4	1,98	39,5

\* Приготовление сукцинатоксидазы и условия даны в примечаниях к табл. 1.

Одно из наблюдений, могущих иметь отношение к рассматриваемой проблеме, состоит в том, что сукцинатоксидаза подавляется динитрофенолом в довольно высоких концентрациях: при концентрации в 2,5 мМ реакция подавляется на 40%, а при концентрации 0,5 мМ — на 13% (табл. 7). В свежей мышце (см. табл. 2) 0,5 мМ динитрофенол подавляет удаление сукцината на 47%, а в свежееотмытых частицах, к которым был добавлен АТФ, ингибирование составляло 55% (см. табл. 3). Все эти данные говорят о том, что ферментная система может в значительной мере изменяться в процессе отмывки и замораживания. О природе этих изменений приходится лишь догадываться. В качестве возможных предположений можно назвать «денатурацию», превращение в изофермент [9] или образование фрагментов, обладающих менее высокой ферментативной активностью.

Мы не будем пытаться давать этим фактам объяснения, которые неизбежно должны носить спекулятивный характер. В задачу нашей статьи входит лишь иллюстрация того положения, что в ходе очистки ферментов их свойства могут изменяться и что поэтому необходимо исследовать поведение ферментов не только в очищенном виде, но и *in situ*. Изучение неочищенных ферментов может выявить их важные особенности, ускользающие от внимания исследователя, работающего с очищенными ферментами. Ведь живая клетка относится к числу таких систем, для которых целое не просто сумма отдельных компонентов, а нечто большее. Процесс объединения компонентов в одно целое означает их взаимодействие, изменяющее поведение каждого из них.

В химическом отношении такое взаимодействие приводит к тому, что компоненты клетки взаимно модифицируют способность каждого из них вступать в различные реакции, и это играет важнейшую роль в работе регуляторных механизмов. Оно отличает сложное целое от сложной смеси. В качестве примеров подобного взаимодействия можно назвать подавление синтеза аминокислот и пиримидинов по принципу обратной связи (подавление конечным продуктом), а также репрессию (подавление синтеза) и ингибирование (подавление активности) ферментов различными метаболитами.

#### МЕТОДИКА

Грудную мышцу голубя измельчали в мельнице Латапи и суспендировали в 6,5 объемах солевой среды, содержащей 90 мл 0,155 М КСl, 20 мл 0,1 М К-фосфатного буфера (рН 7,4) и 1 мл 0,1 М MgCl<sub>2</sub>. 3 мл суспензии переносили пипеткой в основную часть конического сосудика Варбурга и добавляли 1 мл смеси остальных компонентов; конечный объем составлял 4 мл; инкубируемая смесь содержала 10% ткани (по весу). Обычно субстраты, ингибиторы и другие вещества добавляли через боковой отросток после 10-минутного встряхивания в водяной бане при 30°. Газовое пространство заполнено O<sub>2</sub>, в центральном резервуаре — 0,2 мл 2 н. NaOH. Приведенные данные относятся к 30-минутному периоду инкубации, считая от конца периода уравнивания.

Отмытые частицы ткани получали, суспендируя ткань в 6,5 объема описанной выше среды и центрифугируя суспензию при 24 000 g в течение 5 мин. Эту операцию повторяли еще два раза и наконец суспендировали ткань в таком же объеме среды.

Потребление кислорода измеряли манометрически. Для определения сукцината в конце периода инкубации добавляли по возможности быстро 1 мл 15-процентной трихлоруксусной кислоты. Осадок отбрасывали центрифугированием, а надосадочную жидкость нагревали в течение 90 мин



в кипящей бане для удаления трихлоруксусной кислоты, принимая меры к тому, чтобы не потерять воду. Оказалось, что можно было обойтись без экстрагирования янтарной кислоты эфиром, так как количества сукцината были сравнительно велики, а вещества, мешающие определению, отсутствовали. Сукцинат определяли манометрически в 1 мл (см. [6]). Для определения оксалоацетата ферментативные реакции останавливали, добавляя к содержимому сосуда 1 мл 1 н. HCl; депротеинизацию проводили с помощью HClO<sub>4</sub>. Оксалоацетат определяли либо ферментативным методом [5], либо с анилинцитратом [2].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Das N. B., *Biochem. J.*, **31**, 1124 (1937).
2. Edson N. L., *Biochem. J.*, **29**, 2082 (1935).
3. Ernster L., In «Biological Structure and Function» First IUB/IUBS Joint Symposium, Stockholm, September 12—17, 1960 (T. W. Goodwin and O. Lindberg, eds.), Vol. II, p. 139, Academic Press, New York, 1961.
4. Green D. E., V Международный Биохимический конгресс, т. I, II, Москва (1961).
5. Hohorst H. J., Kreuz F. H., Bücher T., *Biochem. Z.*, **332**, 18 (1959).
6. Krebs H. A., *Biochem. J.*, **31**, 2095 (1937).
7. Krebs H. A., Eggleston L. V., Kleinzeller A., Smyth D. H., *Biochem. J.*, **34**, 1234 (1940).
8. Krebs H. A., Eggleston L. V., d'Allessandro A., *Biochem. J.*, **79**, 537 (1961).
9. Markert C. L., Møller F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 753 (1959).
10. Schollmeyer P., Klingenberg M., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **4**, 43 (1961).
11. Slater E. C., Hülsman W. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1109 (1961).
12. Szent-Györgyi A., *Z. physiol. Chem.*, **236**, 1 (1935).
13. Tyler D. B., *Biochem. J.*, **76**, 293 (1960).
14. Williams G. R., *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **39**, 103 (1961).

# ГИГАНТСКИЕ МОЛЕКУЛЫ И ПОЛУПРОВОДНИКИ

Л. Б Р И Л Л Ю Э Н

## ВВЕДЕНИЕ

Блестящая идея сопоставления свойств гигантских биологических макромолекул со свойствами полупроводников, которые изучаются в физике твердого тела, была впервые выдвинута А. Сцент-Дьёрдьи в 1941 г. [15] (см. также [16]). Эта идея сразу же вызвала огромный интерес. Для объяснения многих экспериментальных результатов совершенно необходимо было найти механизм, посредством которого могла бы осуществляться миграция энергии вдоль молекулы. Однако, так как теоретическое рассмотрение вопроса было не слишком успешным, эта гипотеза в течение ряда лет не разрабатывалась. Проведенные за последнее время исследования вновь возродили интерес к этой проблеме, а множество убедительных результатов показало возможность найти пути для преодоления имевшихся ранее теоретических трудностей. После устранения этих препятствий открываются новые, очень широкие перспективы для постановки дальнейших исследований, которые могут привести к самым разнообразным открытиям.

В настоящей работе кратко рассматривается теория полупроводников и обсуждаются в общих чертах те условия, при которых теорию полупроводников можно применить к макромолекулам. Близость двух этих проблем (с теоретической точки зрения) позволяет высказать некоторые предположения относительно тех факторов, которые могут иметь значение для рассмотрения этих проблем. Что, например, необходимо для того, чтобы макромолекула могла играть роль транзистора, или «туннельного» диода? Данная работа является теоретической и не затрагивает непосредственно вопросов, связанных с экспериментальной биологией.

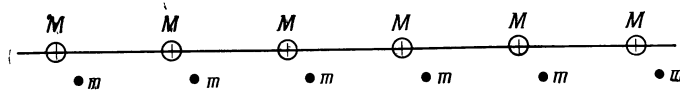
## ЭЛЕКТРОННЫЕ ВОЛНЫ В ПЕРИОДИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ; ЗОННАЯ СТРУКТУРА

Начнем с краткого рассмотрения теоретических положений, на основе которых формулируется различие между проводниками и диэлектриками. Эти теоретические положения развивались автором данной статьи с 1930 г. и подробно обсуждались в ряде статей [1, 2, 3, 4] и монографий [5, 6].

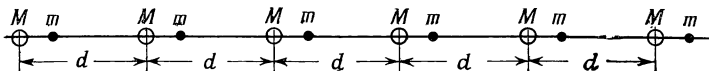
Наиболее важная часть теории, относящаяся к этой физической проблеме, связана с вопросом о распространении волн в кристалле, обладающем типичной трехмерной периодической структурой. Однако трехмерная периодичность вносит только некоторые математические усложнения; основные выводы теории могут быть значительно более просто получены

из рассмотрения одномерной периодической структуры. Кстати, результаты решения именно одномерной задачи могут быть непосредственно использованы применительно к длинным макромолекулам.

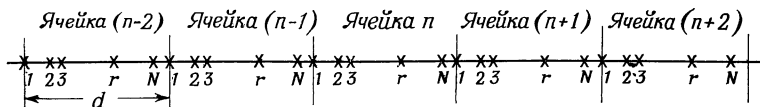
Рассмотрим длинную одномерную цепочку, состоящую из атомов, в которой через постоянный интервал  $d$  повторяется одна и та же атомная



Фиг. 1. Модель Кальвина для дисперсии оптического вращения.



Фиг. 2. Цепь, состоящая из двухатомных молекул.



Фиг. 3. Цепь, состоящая из многоатомных молекул.

конфигурация (группа атомов). На фиг. 1, 2 и 3 приведено три различных примера цепочек такого типа. Дополнительные комментарии к этим схемам излишни.

Совершенно не обязательно, чтобы повторяющиеся группы атомов располагались вдоль прямой линии; с таким же успехом эта линия может быть зигзагообразной. При этом только необходимо, чтобы вдоль линии данная группа атомов периодически повторялась через постоянный интервал  $d$ .

Рассмотрим теперь, как распространяются волны вдоль такой цепочки. Так как наибольший интерес для нас представляет движение электронов по такой цепочке, мы будем изучать свойства электронных волн де Бройля, хотя, вообще говоря, теория является общей и может быть применена к любому виду волн. В монографиях автора настоящей работы обсуждение обычно начинается с рассмотрения распространения упругих волн, для которых физическая модель наиболее наглядна.

*Периодическая структура системы непосредственно приводит к дискретному спектру допустимых частот (полосам частот).* Такова основная идея, развиваемая в работах автора. Лучше всего это можно показать на простом графике (фиг. 4).

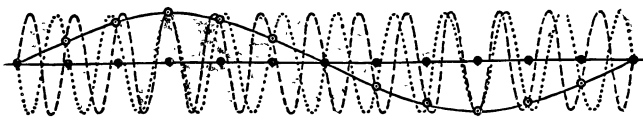
Рассмотрим цепочку, состоящую из частиц, расположенных вдоль оси  $x$  с периодом  $d$ . Такие величины, как смещение из положения равновесия, электрическая поляризация и т. д., мы можем измерить только в тех точках, где имеются частицы, т. е. в точках

$$x_0=0, \quad x_1=d, \quad x_2=2d, \quad \dots, \quad x_n=nd. \quad (1)$$

Распространение колебаний частоты  $\nu$  вдоль цепочки можно описывать при помощи функции

$$\psi = A \cos 2\pi (\nu t - ax); \quad a = \frac{1}{\lambda}; \quad \lambda - \text{длина волны.} \quad (2)$$

Следует помнить, что функция  $\psi$  определена только для точек, принадлежащих совокупности (1). Очевидно, что замена величины  $a$  другой



Фиг. 4. Различные синусоидальные кривые, проходящие через положения частиц.

— синусоидальная волна для наименьшей величины  $a = a_0 < 1/d$ .

- - - - - синусоидальная волна для величины  $a_1 = a_0 + \frac{1}{d}$ .

. . . . . синусоидальная волна для величины  $a_{-1} = a_0 - \frac{1}{d}$ .

Видно, что первые две волны движутся в правую сторону, тогда как третья волна распространяется в обратную, левую сторону; величины  $a_0$  и  $a_1$  положительны, а  $a_{-1}$  — отрицательна.

величиной,

$$a' = a + \frac{m}{d} \quad (m - \text{положительное или отрицательное целое число}), \quad (3)$$

не внесет никаких изменений в волновое движение. В этом легко убедиться, подставив (3) вместо  $a$  в аргумент функции (2) для точки  $x_n$ ; действительно,

$$\begin{aligned} \cos 2\pi (\nu t - a'x_n) &= \cos 2\pi \left( \nu t - ax_n - \frac{mx_n}{d} \right) = \\ &= \cos 2\pi (\nu t - and - mn) = \cos 2\pi (\nu t - and), \end{aligned} \quad (4)$$

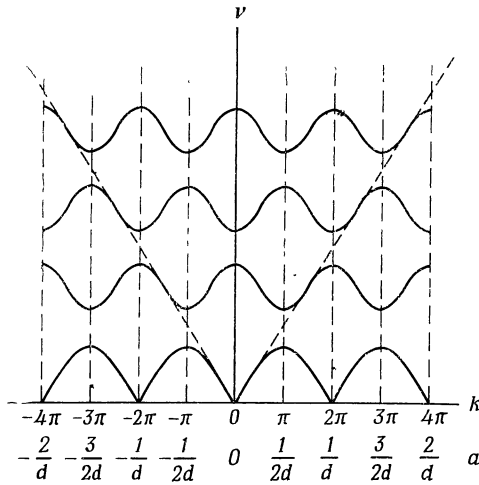
поскольку  $x_n/d = n$ , а член  $2\pi mn$  в фазе волны не меняет значение косинуса.

Для описания распространения волны функция (2), записанная с величиной  $a$ , эквивалентна той же функции, записанной с величиной  $a'$ . Фиг. 4 иллюстрирует это утверждение.

Таким образом, выражаясь математически, про условие (3) можно сказать, что величина  $a$  определена с точностью до постоянного слагаемого, кратного  $1/d$ . Отсюда прямо следует, что у волны с  $a$  и с  $a'$  частота  $\nu$  имеет то же значение.

В периодической структуре (период  $d$ ) частота является периодической функцией от  $a$  (равного  $1/\lambda$ ) с периодом  $1/d$ . Из этой общей теоремы непосредственно вытекает существование спектра, а именно полос частот. Лучшее всего это можно показать, пользуясь рядом диаграмм и рисунков. Характерный пример приведен на фиг. 5, где графически изображена зависимость частоты  $\nu$  от величины  $a$  (или от  $k = 2\pi a$ ;  $k$  называется волновым числом). Для непрерывной однородной среды, в которой волны распространяются с постоянной скоростью  $\omega = v|a|$ , зависимость частоты от волнового числа  $k$  изображается в виде прямых (пунктирных) линий. Если же вместо непрерывной среды мы будем рассматривать дискретную периодическую структуру с периодом  $d$ , то частота  $\nu$  распространяющихся в ней волн также окажется периодической функцией от  $a$  с периодом, равным  $1/d$ . Зависимость частоты  $\nu$  от величины  $a$  изображена на фиг. 5 сплошными линиями. В середине интервалов шириной  $\pi$  эти кривые очень близки к пунктирным линиям. Непрерывная кривая соответствует системе полос частот: колебания с одними частотами распространяться могут, а с другими частотами — не могут. На фиг. 6 изображена та же ситуация. Учтывая периодичность

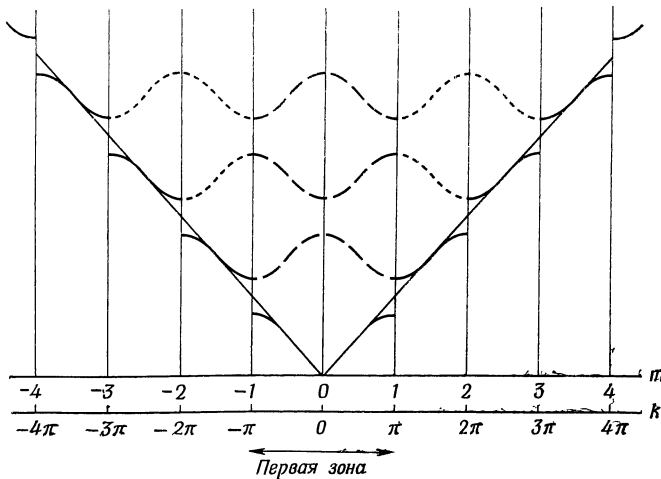
кривых, нет необходимости рисовать их в полном интервале по  $a$  от  $-\infty$  до  $+\infty$ , а достаточно дать кривую за один единичный период, например для значений  $-(1/2d) \leq a \leq (1/2d)$ , или, что то же,  $-\pi \leq k \leq +\pi$ .



Фиг. 5.

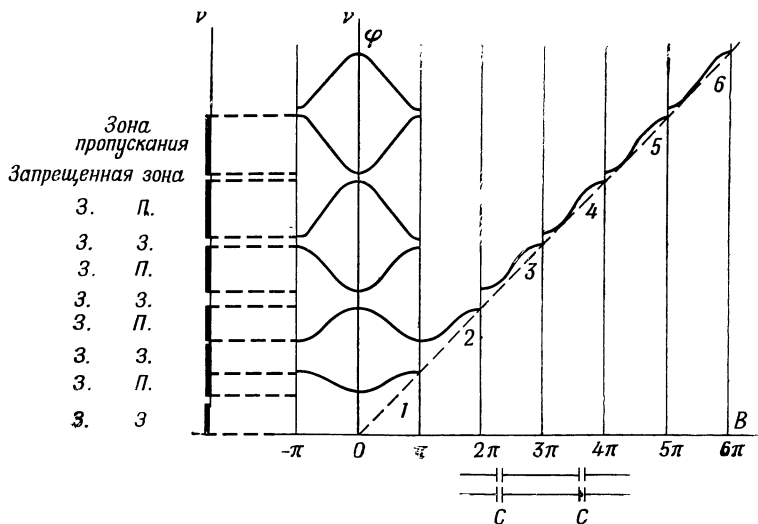
.....  $\nu$  как функция  $k (= 2\pi a)$  или  $a$  в непрерывной среде;  
 ———  $\nu$  как функция  $k$  или  $a$  в периодической структуре с периодом  $d$  вдоль оси  $x$ .

Другой подобный пример, приведенный на фиг. 7, показывает только сведение кривой к основному интервалу  $-\pi \leq k \leq +\pi$ . Периодичность по  $a$  (или по  $k$ ) приводит к тому, что кривая разрывается, превращаясь



Фиг. 6:

в последовательность периодических ветвей. Имеются «полосы пропускания», соответствующие частотам тех колебаний, которые могут распространяться в данной среде, и «полосы запрещенных частот» колебаний с такими частотами, которые в данной среде распространяться не могут.



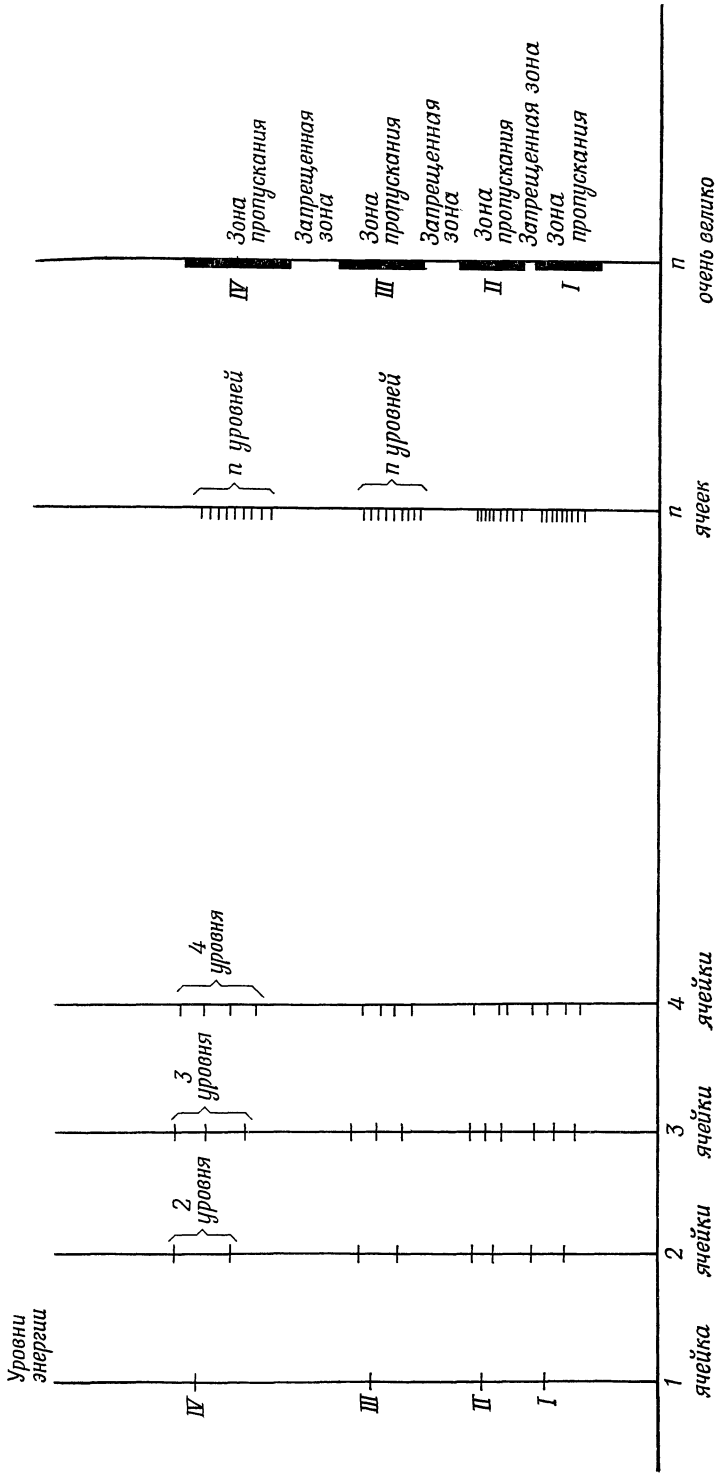
Фиг. 7

### ПРИНЦИП ПАУЛИ. РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ ПРОВОДНИКАМИ И ДИЭЛЕКТРИКАМИ

Эту же проблему можно рассматривать с другой точки зрения. Вместо непосредственного обсуждения свойств бесконечно длинной периодической структуры мы можем исследовать, что произойдет, если к одной ячейке (группе атомов), которая является элементарным строительным блоком, добавлять последовательно такую же вторую, третью... любое число аналогичных ячеек, образуя тем самым целую цепочку, состоящую из соединенных друг с другом звеньев.

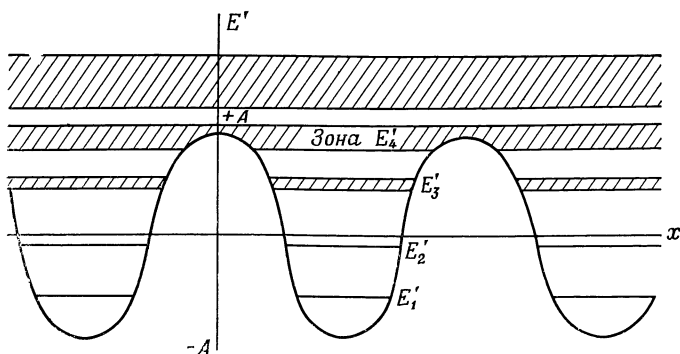
Результаты расчетов приведены на диаграмме фиг. 8, где изображено типичное распределение энергетических уровней. С левой стороны отложены значения энергий дискретных энергетических уровней для одной изолированной ячейки, пронумерованные соответственно I, II, III, IV и т. д. Далее мы предполагаем, что две подобные ячейки *соединяются*. Тогда каждый из ранее имевшихся уровней расщепляется на два отдельных уровня. Для цепи, состоящей из трех ячеек, мы получаем группы из 3 уровней. Четыре соединенные ячейки образуют группы из 4 энергетических уровней, а  $n$  соединенных ячеек дают группы I, II, III, IV и т. д., каждая из которых содержит  $n$  близко расположенных энергетических уровней. Когда число  $n$  становится очень большим, то эти группы образуют почти непрерывные энергетические полосы, которые мы можем пронумеровать I, II, III, IV и т. д. Каждая из энергетических полос соответствует одному первоначальному уровню. Эти энергетические полосы (или зоны) пропускания разделены запрещенными полосами (зонами).

Таково положение в случае не слишком сильных взаимодействий между соседними ячейками, составляющими цепь. В случае сильных взаимодействий энергетические полосы I, II, III, IV, ... могут частично перекрываться, и описание их становится более сложным, однако основные особенности зонной структуры сохраняются.



Фиг. 8.

На фиг. 9 приведена другая диаграмма, исходя из которой также удается получить общие результаты. Предположим, что электроны могут перемещаться через последовательность потенциальных барьеров. Внутри потенциальных ям может находиться несколько энергетических уровней  $E'_1$ ,  $E'_2$ ,  $E'_3$ . Взаимодействие между соответствующими энергетическими уровнями разных потенциальных ям очень мало, переход электрона из одной потенциальной ямы в другую, т. е. через потенциальный барьер, может осуществляться только посредством туннельного эффекта. Эти уровни остаются по-прежнему дискретными, и соответствующие им энергетические зоны



Фиг. 9.

очень узки. Энергетический уровень  $E'_3$ , лежащий вблизи вершины потенциального барьера, дает более широкую полосу. Уровни  $E'_4$  и  $E'_5$ , лежащие выше потенциального барьера, дают очень широкие полосы пропускания, отделенные друг от друга узкими запрещенными зонами.

Аналогичная зонная структура показана на фиг. 10, где частота  $\nu$  отложена как функция волнового числа  $a$ , изменяющегося в интервале от  $-(1/2d)$  до  $(1/2d)$ .

При рассмотрении вопроса о распространении электронных волн де Бройля необходимо помнить принцип Паули. Согласно этому принципу, на каждом энергетическом уровне одновременно может находиться не более двух электронов (при этом ориентация спинов у этих электронов противоположна). Таким образом, если число ячеек, образующих цепь, равно  $n$ , то каждая из зон I, II, III, IV включает  $n$  энергетических уровней и может содержать  $2n$  электронов. Каково же общее число электронов во всех полосах пропускания и как они там распределены? Мы предполагаем, что значения энергии, которые характеризуют уровни, входящие в зоны, имеют величины порядка нескольких электронвольт, т. е. значительно большие, чем значения тепловой энергии при температуре  $T$ . При комнатной температуре значение  $kT$  равно приблизительно  $0,03$  эв, тогда как значения энергии, соответствующие нашим зонам, могут иметь порядок нескольких электронвольт. Тепловые колебания будут лишь слегка возмущать общее стабильное распределение, которое соответствует абсолютному нулю температуры. Электроны скапливаются на самых нижних уровнях и полностью заполняют нижние энергетические зоны. Мы можем предположить, что зоны I и II заполнены целиком, т. е. в каждой из них имеется ровно по  $2n$  электронов, а, например, зона III, соответствующая большим энергиям, — не целиком. При этом необходимо различать два случая.



А) Число электронов, приходящихся на одну ячейку,  $N$ , является *четным* ( $N = 2p$ ). Таким образом, мы имеем  $2pr$  электронов, которые целиком заполняют  $p$  зон пропускания. В предыдущем примере  $p = 3$ , т. е. все зоны, включая и самую верхнюю, заполнены целиком.

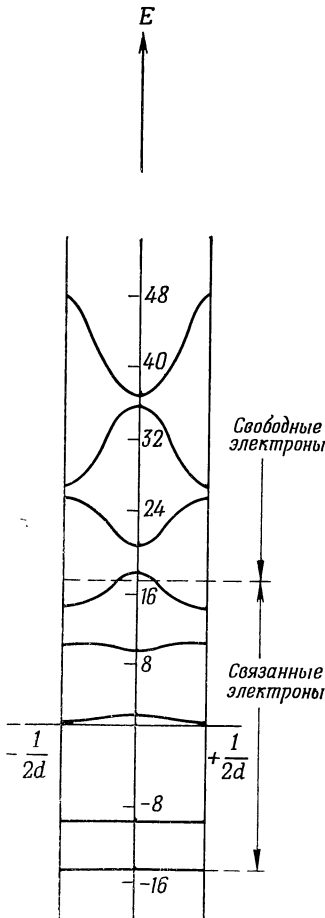
Б) Число электронов, приходящихся на одну ячейку, является *нечетным* ( $N = 2p + 1$ ). В этом случае мы имеем  $p$  целиком заполненных зон, но самая верхняя зона заполнена только наполовину.

Случай А соответствует диэлектрику (изолятору), так как электроны, целиком заполнившие все зоны, не могут перемещаться. При помещении такой системы в электрическое поле никаких эффектов не возникнет.

В случае Б мы имеем дело с *проводником*. Электроны в наполовину заполненной верхней зоне могут перемещаться по незаполненным уровням и приходят в движение под действием электрического поля.

Следует отметить, что мы предполагали наличие идеальной совершенно периодической структуры, в которой все ячейки абсолютно одинаковы. Этот идеальный случай соответствует структуре идеального кристалла, которая практически никогда не реализуется. В кристаллах всегда имеются некоторые примеси или дефекты, нарушающие упорядоченность структуры (одну из разновидностей таких нарушений физики-кристаллографы называют «мозаичной структурой» и определяют ее наличие по рентгенограммам). Значение этих примесей мы рассмотрим позже и покажем, что они играют важную роль. Здесь же мы будем лишь считать, что при наличии таких примесей среднее число электронов  $N$ , приходящихся на одну ячейку, будет не четным и не нечетным, а дробным.

*Уровень Ферми* — это высший энергетический уровень, заполненный электронами. В идеальном случае А он соответствует вершине  $p$ -й зоны, а в идеальном случае Б проходит посередине  $(p + 1)$ -й зоны.



Фиг. 10

ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛУЧАЙ — ПОЛУПРОВОДНИКИ; ДОНОРНЫЕ И АКЦЕПТОРНЫЕ ПРИМЕСИ

Из сказанного выше ясно, что условия, необходимые для существования диэлектриков (непроводящих кристаллов), являются очень жесткими, т. е. в некоторых случаях электрические свойства непроводящих кристаллов должны быть весьма неустойчивыми. Верхняя энергетическая зона должна целиком точно соответствовать числу уровней в ней. Не может быть ни *переполнения*, что привело бы к физически невозможному избытку электронов в верхней заполненной зоне, ни *недозаполнения*, так как в этом случае в верхней зоне осталось бы некоторое количество незанятых уровней (дырок), что привело бы к возможности перемещения

электронов. Необходимо обсудить две основные причины нарушения этих жестких условий: тепловые колебания и наличие примесей.

*Тепловые колебания* могут сообщать электронам при комнатной температуре дополнительную энергию порядка  $0,03 \text{ эв}$ . Эта величина очень мала по сравнению с шириной запрещенной зоны, которая расположена над зоной пропускания. Ширина запрещенной зоны имеет обычно порядок нескольких электронвольт, т. е. она слишком велика и электроны не могут ее преодолеть только за счет энергии тепловых колебаний. Для того чтобы такой переход мог иметь место, необходимы значительно более высокие температуры.

При наличии *примесей* картина существенно изменяется. В кристалле германия, валентность которого равна 4, на каждый атом приходится по четыре электрона, т. е. могут быть целиком заполнены две энергетические зоны. Если мы добавим в кристалл несколько атомов мышьяка (валентность которого равна 5), не нарушая правильной структуры кристаллической решетки, то каждый из этих атомов принесет с собой по 5 свободных электронов. Эти дополнительные электроны не могут попасть в уже целиком заполненную энергетическую зону; они окажутся в более высокой энергетической зоне, где будут иметь возможность свободно перемещаться. Атом примеси в этом случае называют *донорным*.

Мы можем также ввести в кристалл другой атом, валентность которого равна 3, например атом бора. Этот атом имеет на один электрон меньше, чем у германия; он может захватить электрон из заполненной зоны, что приводит к появлению дырок в ней (незанятых уровней). Это означает, что первоначально неподвижные электроны получают некоторую свободу движения. Было показано, что *дырка* ведет себя подобно *положительному заряду*, точно равному по абсолютной величине заряду электрона, но масса которого отлична от массы электрона. Такой примесный атом (в данном случае атом бора) называется *акцепторным*.

Наличие *донорных* примесей создает некоторую незначительную проводимость, обусловленную появлением в верхней полосе некоторого количества свободных электронов. Носителями заряда в этом случае являются отрицательные электроны; такие полупроводники относятся к *n*-типу (от слова negative). Если в кристалл введены акцепторные атомы, то небольшая проводимость обусловлена движением дырок в первоначально заполненной зоне. Дырки ведут себя как положительные заряды, и в этом случае мы имеем дело с полупроводником *p*-типа (от слова positive).

Эти общие идеи являются основой теории полупроводников и позволяют объяснить механизмы действия кристаллических выпрямителей, транзисторов, туннельных диодов и т. д. По этим вопросам опубликовано много монографий и учебников.

В предыдущем разделе мы разобрали одномерную модель, которой будет достаточно для нашего дальнейшего рассмотрения. Технические же полупроводники, которые играют очень важную роль в современной радиотехнике, являются кристаллами с трехмерной периодической структурой.

Распространение полученных нами результатов на случай трехмерных решеток приводит к появлению сложных геометрических образований, которые я назвал «зонами». Эти зоны (называемые теперь зонами Бриллюэна) были впервые открыты в 1930 г. [1—6] и играют центральную роль во всех теориях, касающихся действия полупроводников, а также в вопросах их практического использования.

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ, КАСАЮЩИЕСЯ ГИГАНТСКИХ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Биохимики очень интенсивно исследовали структуры и свойства таких гигантских молекул, как молекулы белков, рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Многие из этих молекул представляют собой длинные цепи, состоящие из одинаковых ячеек. Это строго периодические структуры, и мы можем попытаться начать рассмотрение с периодической модели, которая будет первым приближением по отношению к реально существующей молекуле. Мы можем, следовательно, установить сходство между биологическими молекулами и одномерными периодическими структурами. Такое предположение дает нам возможность использовать многие из основных результатов, которые были получены ранее.

Эта точка зрения явилась отправной и для Сцент-Дьёрдьи [15], когда он впервые в 1941 г. выдвинул гипотезу о том, что гигантские биологические молекулы могут быть полупроводниками. Его интересовала возможность объяснения с помощью этой гипотезы ряда экспериментальных результатов.

В процессе *фотосинтеза* тысячи молекул хлорофилла действуют как одна функциональная единица и могут поглощать четыре кванта света, необходимых для восстановления  $\text{CO}_2$ , в удаленных точках. Это позволяет предположить, что возбужденные электроны должны иметь возможность свободно перемещаться по структуре, построенной из молекул хлорофилла. Многие экспериментальные результаты говорят в пользу того, что в молекулах белка имеются обобщенные энергетические уровни. Энергия, поглощенная в одной точке молекулы, может быть использована для разрыва связи в другой (весьма удаленной от первой) точке. В случае волокнистых структур можно, по-видимому, предполагать, что у последовательности, состоящей из многих молекул, имеется квазипериодическая структура.

Веским аргументом в пользу справедливости высказанной гипотезы являются данные о мышечном сокращении. Энергия, полученная в результате расщепления АТФ в одной точке, передается вдоль мышечного волокна очень большому числу молекул миозина.

С тех пор как Сцент-Дьёрдьи впервые указал на необходимость существования некоего механизма, посредством которого мог бы осуществляться перенос энергии через молекулы белка, было накоплено большое количество экспериментальных данных [19].

Те же вопросы, связанные с возможными механизмами переноса энергии, обсуждались недавно в замечательных монографиях Сцент-Дьёрдьи [17, 18]; в этих работах автор еще раз подчеркнул важность первоначально высказанной им полупроводниковой гипотезы, а также большое сходство между биологическими молекулами и полупроводниками.

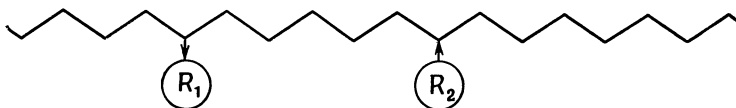
Эта гипотеза, встреченная сначала с большим энтузиазмом, была полностью оставлена после выхода работы Ивенса и Гергели [7], в которой теоретически рассматривались энергетические зоны в белках и было показано, что ширина запрещенной зоны имеет величину около 3 эв. Исходя из этого, стало совершенно очевидно, что электрон не может за счет энергии тепловых колебаний перейти из целиком заполненной зоны в верхнюю незаполненную зону пропускания, так как величина тепловой энергии составляет только 1/100 необходимой для такого перехода величины энергии. Эти первые расчеты были очень грубыми и требуют дальнейшего уточнения. Тем не менее уже порядок величины энергии (несколько эв)

указывает на невозможность использования при таких переходах энергии тепловых колебаний.

Это обстоятельство, по-видимому, обескуражило биохимиков, однако, как мы уже отмечали в разделах III и IV, для кристаллических полупроводников дело обстоит точно так же. Энергия тепловых колебаний не может быть основной причиной возникновения возбужденных состояний, тогда как примеси, действующие в качестве доноров и акцепторов электронов, должны играть очень важную роль в этих процессах. Сможем ли мы обнаружить аналогичные случаи в биохимии?

#### УПРОЩЕННАЯ МОДЕЛЬ ПОЛУПРОВОДНИКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ

Для того чтобы четко сформулировать нашу точку зрения, воспользуемся весьма упрощенной моделью, изображенной на фиг. 11. Рассмотрим цепь, состоящую из атомов углерода, каждый из которых связан с одним и тем же числом атомов водорода. Такая цепь обладает совершенной периодической структурой, и ее электронный спектр должен содержать описанные ранее разрешенные и запрещенные энергетические зоны (или полосы



Фиг. 11.

Стрелка указывает направление силы, действующей вдоль связи на электроны.  
 $R_1$  — акцептор,  $R_2$  — донор.

пропускания и полосы запрещенных частот). Нижняя разрешенная энергетическая зона будет целиком заполнена электронами, и система в целом будет типичным диэлектриком. Добавим теперь несколько боковых групп  $R_1, R_2, \dots$ , замещающих некоторые из атомов водорода. Мы получаем нарушенную периодическую решетку с примесями  $R_1, R_2, \dots$ . Задача заключается в том, чтобы показать, как такие боковые группы могут играть роль доноров или акцепторов электронов.

Общеизвестно, что свободные молекулы, присоединенные к основной цепи, можно разделить на две группы: электроположительные и электроотрицательные. Теоретически это соответствует тому, что вдоль связи молекулы с основной цепью имеется электрическое поле даже в том случае, если молекула в целом не несет электрического заряда. Такое электрическое поле вдоль связи возникает в результате наличия дипольных, квадрупольных, ... мультипольных структур внутри молекулы и из-за нескомпенсированных обменных взаимодействий.

Электроположительность и электроотрицательность соответствуют двум противоположным направлениям электрического поля между молекулой и цепью.

Молекулы одного типа ( $R_1$ ) будут притягивать и фиксировать (в среднем) отрицательный заряд в цепи около связи. Молекулы другого типа ( $R_2$ ) отталкивают (в среднем) отрицательные электроны цепи. Молекулы первого типа соответствуют *акцепторам*, а второго — *донорам* электронов.

Здесь имеется, однако, ряд отличий от случая кристаллического полупроводника. Каждый инородный атом, введенный в кристалл, может отдавать или принимать один электрон или несколько электронов. В интересующей нас проблеме эффекты определены не столь четко. Наличие одной

связи может привести к фиксации или освобождению (в среднем) части электронного заряда, и для переноса полного электронного заряда может потребоваться несколько параллельно работающих связей.

Тем не менее в целом характер действия примесей в обоих случаях весьма сходен. Боковые группы могут играть роль примесей в обычных полупроводниках и создавать вдоль цепи последовательность участков типа  $n$  или  $p$ .

Таким образом, длинные биомолекулы должны иметь свойства, очень близкие к свойствам полупроводников, в которых  $n$ - и  $p$ -области расположены в определенном порядке. Акцепторы «отсасывают» электроны из заполненной зоны, в результате чего в ней образуются дырки. Доноры «выталкивают» электроны в первоначально пустую зону, расположенную над нормальным уровнем Ферми. Новым является то, что здесь для осуществления этого процесса требуется определенное число электроположительных или отрицательных боковых групп.

### ДОНОРЫ И АКЦЕПТОРЫ РАСЧЕТЫ Б. ПЮЛЬМАНА И А. ПЮЛЬМАН

Очень важный шаг вперед был сделан Б. Пюльманом и А. Пюльманом [14], рассчитавшими донорные и акцепторные свойства различных молекул. Это дало им возможность более точно установить, какую роль играют

Таблица 1

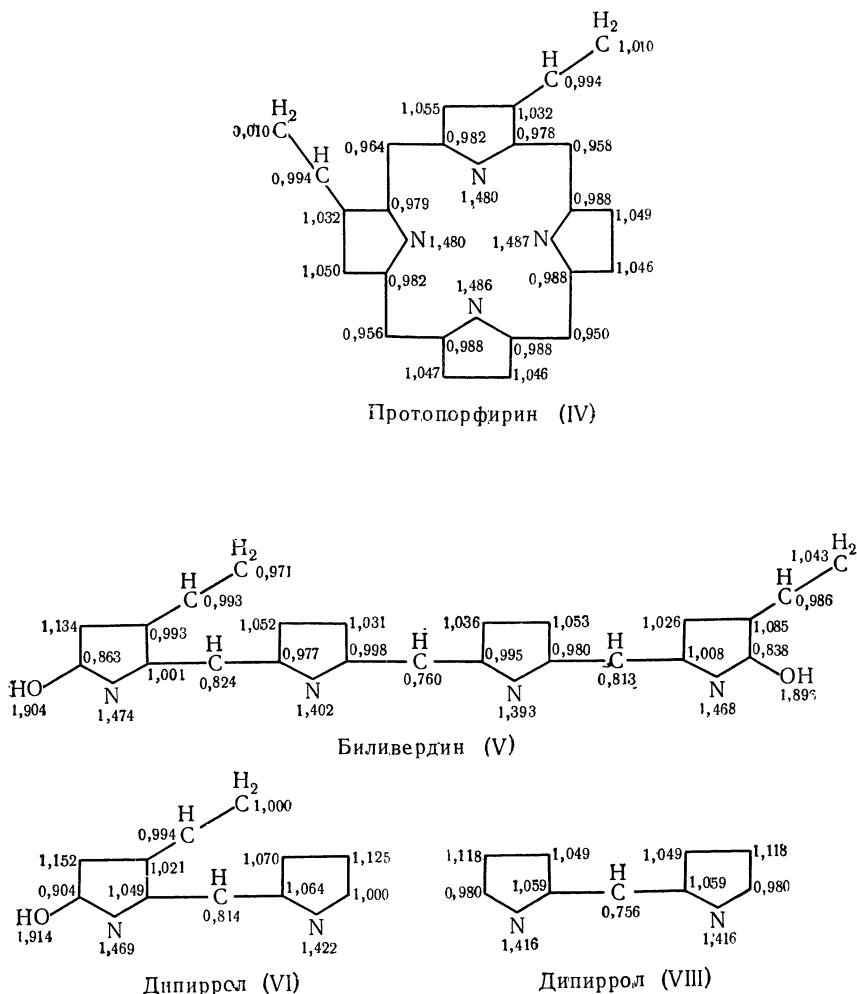
Соединение	Значения энергии наивысших заполненных молекулярных орбит	Значения энергии самых низких незаполненных молекулярных орбит	Соединение	Значения энергии наивысших заполненных молекулярных орбит	Значения энергии самых низких незаполненных молекулярных орбит
Аденин . . . . .	0,486	-0,865	Урацил . . . . .	0,517	-0,960
Гуанин . . . . .	0,307	-1,050	Тимин . . . . .	0,510	-0,958
Гипоксантин . . . . .	0,402	-0,882	Цитозин . . . . .	0,595	-0,795
Ксантин (IV) . . . . .	0,397	-1,197	5-Метилцитозин . . . . .	0,530	-0,796
Ксантин (V) . . . . .	0,442	-1,005	Барбитуровая кислота	1,033	-1,295
Мочевая кислота . . . . .	0,172	-1,194	Аллоксан . . . . .	1,033	-0,757
1-Метил } гуанин	0,303	-1,064	Фенилаланин* . . . . .	0,908	-0,993
9-Метил } . . . . .	0,302	-1,074	Тирозин* . . . . .	0,792	-1,000
1-Метил } ксантин (IV)	0,397	-1,198	Гистидин* . . . . .	0,660	-1,160
3-Метил } . . . . .	0,354	-1,197	Триптофан* . . . . .	0,534	-0,863
9-Метил } . . . . .	0,394	-1,213	Рибофлавин* . . . . .	0,500	-0,344
1-Метил } ксантин (V)	0,442	-1,009	Птеридин . . . . .	0,864	-0,386
3-Метил } . . . . .	0,395	-1,009	2-Амино-4-оксиптери-		
7-Метил } . . . . .	0,429	-1,049	дин . . . . .	0,489	-0,650
1-Метил } мочева	0,172	-1,201	2,4-Диаминоптеридин	0,544	-0,508
3-Метил } . . . . .	0,153	-1,204	2,4-Диоксиптеридин	0,653	-0,663
7-Метил } кислота	0,133	-1,200	Фолиевая кислота . . . . .	0,526	-0,647
9-Метил } . . . . .	0,161	-1,204			

\* Предполагалось, что система  $\pi$ -электронов у фенилаланина такая же, как у толуола; у тирозина — такая же, как у фенола; у гистидина — такая же, как у имидазола; у триптофана — такая же как у индола; у рибофлавина — такая же, как у изоаллоксазина.

такие радикалы в биохимических структурах. Расчет был проведен по методу молекулярных орбит [13]. Значения энергии уровней радикалов вычислялись по формуле

$$E = \alpha + k_i \beta, \quad (5)$$

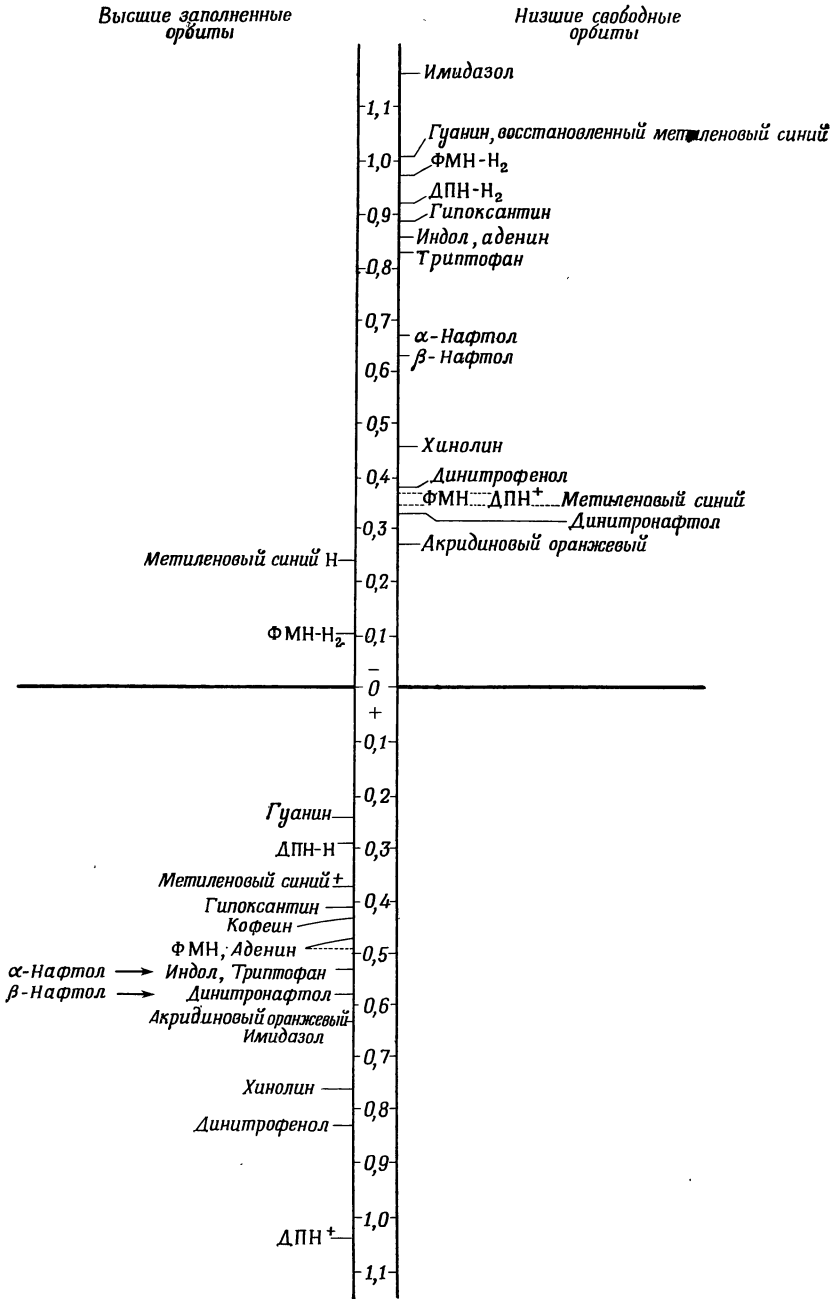
где  $\alpha$  — интеграл кулоновского взаимодействия,  $\beta$  — интеграл резонансного взаимодействия, а  $k_i > 0$  и  $k_i < 0$  соответствуют заполненным и



Фиг. 12. Распределение электронных зарядов.

незаполненным уровням соответственно. Часть полученных результатов суммирована в табл. 1.

Приведенные в таблице числа представляют собой значения величины  $k_i$ . Поскольку значение  $\beta$  приблизительно равно  $3,26 \text{ эв}$ , произведение величины  $k_i$  на  $3,26$  дает значение энергии соответствующего уровня в  $\text{эв}$ . Разность значений энергии, вычисленная как разность между величинами, приведенными в двух столбцах табл. 1, дает величину поглощенного кванта  $h\nu$ , которую можно получить из спектра оптического поглощения, так как

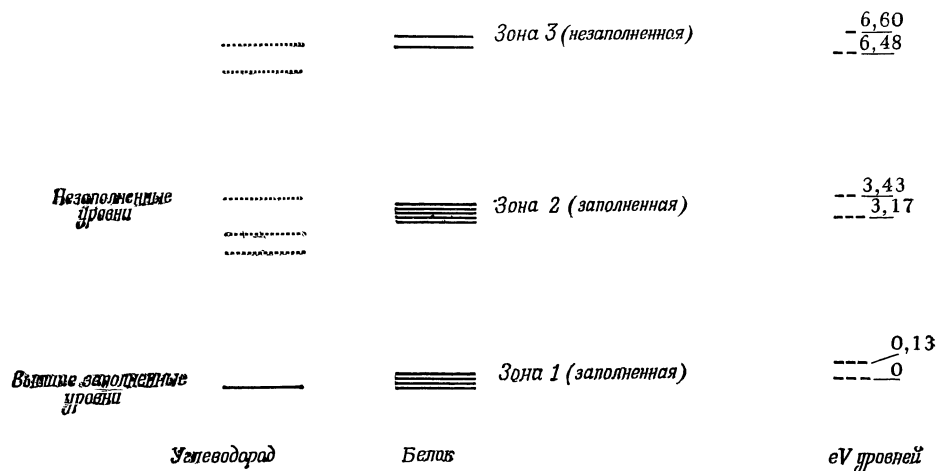


Фиг. 13. Значения величины  $k$  для наивысших заполненных и самых нижних незаполненных молекулярных орбит [18].

этот спектр соответствует переходу одного электрона с заполненного уровня на незаполненный. Энергия наивысшей заполненной орбиты представляет собой энергию ионизации. Чем ниже потенциал ионизации данного соединения, тем легче ему играть роль донора электронов. Значение энергии

самой нижней незаполненной орбиты характеризует энергию электронного сродства: чем ниже значение этой энергии для данного соединения, тем легче оно может принимать дополнительный электрон.

Б. Пюльман и А. Пюльман рассчитали также распределение электронных зарядов для ряда структур (на фиг. 12 приведены различные интересные примеры этих расчетов). Эти примеры показывают, что картины распределения положительных и отрицательных зарядов отличаются друг от друга. Поэтому структура, которая в среднем нейтральна, представляет собой по существу очень сложный электрический мультиполь. Это один из тех эффектов, который мы уже отмечали ранее и который в совокупности



Фиг. 14.

с обменными взаимодействиями относительно связи обуславливает донорные или акцепторные свойства молекул. На фиг. 13 приведены результаты, полученные Сцент-Дьёрдьи [18].

Результаты, полученные Б. Пюльманом и А. Пюльман, нашли многочисленные применения [8].

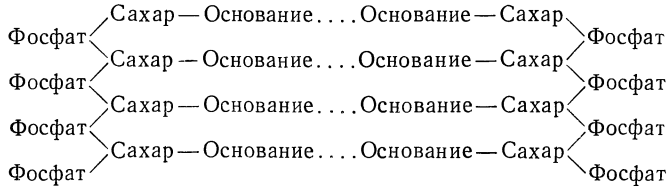
Другие очень интересные данные могут быть найдены в работах Мезона [9, 10, 11]. На фиг. 14, взятой из работ этого автора, приведен пример того, как может углеводород (энергетические уровни в левом столбце) действовать в качестве акцептора электронов по отношению к молекуле белка (уровни в центральном столбце). В самом деле, электроны из заполненной зоны II белка могут переходить на незанятые уровни углеводорода, значение энергии которых практически такое же, как и у зоны II. Схема уровней энергий, приведенная на фиг. 14, представляет собой практический пример, рассматриваемый Мезоном.

Эта схема подчеркивает тот существенный элемент, без которого не может осуществляться перенос электрона от белковой структуры к данной молекуле. Для того чтобы какая-либо молекула могла выступать в роли донора электронов по отношению к белковой структуре, необходимо, чтобы она имела заполненные уровни на самом вершху диаграммы — там же, где расположена незаполненная зона III белка.



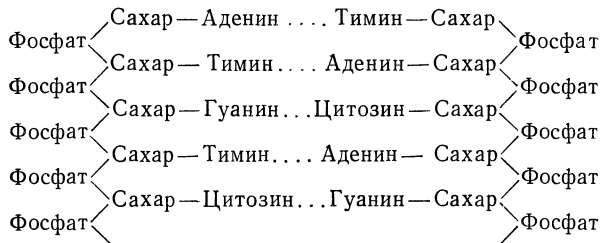
### МОЛЕКУЛА ДНК КАК ПРИМЕР ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВОЙ ТЕОРИИ

Рассмотрим на типичном примере возможность практического применения полученных ранее результатов и выводов. Молекулу ДНК можно представить в виде винтовой лестницы, по бокам которой расположены фосфаты сахаров, а ступеньками являются органические основания (пуриновые или пиримидиновые четырех различных видов), соединенные между собой так называемыми водородными связями (фиг. 15).



Фиг. 15. Химическая структура ДНК.  
Пунктиром обозначены водородные связи.

Эта структура винтовой лестницы была впервые открыта Полингом, а позднее модифицирована Уотсоном и Криком. Основания четырех видов, расположенные вдоль такого спиралевидного остова, образуют своеобразный четырехбуквенный код. Эти четыре буквы, взятые в той или иной последовательности, составляют очень длинные слова чрезвычайно обширного «словаря жизни» и несут в себе важную информацию, которая используется в биологических реакциях. Мы, к сожалению, в настоящее время еще не умеем читать эти зашифрованные сведения<sup>1</sup>. На фиг. 16 и 17 представлены более подробные данные относительно структуры ДНК. Эти данные взяты из очень интересной работы Перуца [12].



Фиг. 16. Образование пар оснований между двумя цепями двуспиральной молекулы ДНК.

Пунктиром обозначены водородные связи.

Вернемся опять к структуре молекулы ДНК. Если пренебречь в первом приближении различиями между отдельными основаниями, то мы получим длинную периодическую структуру. В этой структуре имеется, во-первых, короткий период,  $L_1$ , определяемый высотой каждой лестничной ступеньки, и, во-вторых, более длинный период,  $L_2$ , который определяется высотой одного полного витка спирали (один этаж винтовой лестницы).

<sup>1</sup> К счастью, это указание автора уже устарело. В 1961—1963 гг. Криком и Бен-зетром, с одной стороны, и Очоа с сотр., с другой, были достигнуты решающие успехи в расшифровке кода, связывающего последовательность нуклеотидов в нуклеиновых кислотах с последовательностью аминокислот в синтезируемых по их матрице белках.— *Прим. ред.*

Эта двойная периодическая структура простирается на значительное расстояние по вертикали (подразумевается полная высота всей молекулы ДНК), затем обрывается, делает резкий поворот и начинает разворачиваться в обратном направлении.

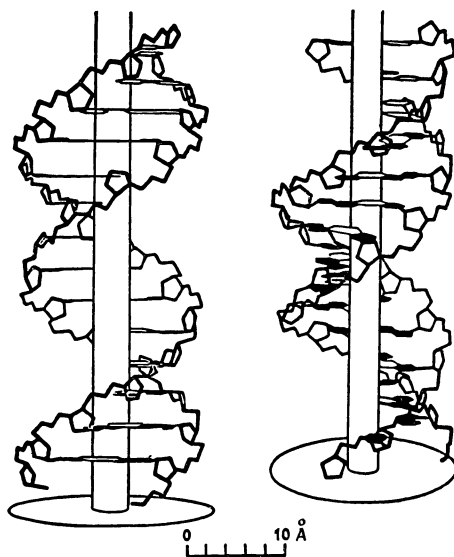
Рассмотрим одну длинную спиральную лестницу. Она представляет собой одномерную периодическую структуру, имеющую два периода —  $L_1$  и  $L_2$ . Это дает нам возможность воспользоваться результатами, полученными в начале статьи, и предсказать, что такой структуре свойствен полосатый (зонный) спектр. Величина  $a$ , пропорциональная волновому числу  $k$  ( $a = 1/\lambda$ ;  $k = 2\pi/\lambda$ ), соответствует двум периодам: длинному, равному  $1/L_1$ , и короткому, равному  $1/L_2$ .

Распространение в такой структуре электронных волн де Бройля может осуществляться вдоль ее боковых цепей как вверх, так и вниз. Если между обеими этими боковыми цепями отсутствуют какие бы то ни было связи (т. е. если все ступеньки лестницы разрушены), то для каждой такой цепи мы получим одно и то же значение средней скорости распространения электронных волн. Однако в реальном случае соединение цепей осуществляется посредством водородных связей, создающих горизонтальные ступеньки. Эти связи имеют следующую структуру:



Они значительно слабее химических связей в основных цепях, образующих лестницу. В результате образования таких связей возникает слабое взаимодействие между обеими боковыми цепями, что в свою очередь приводит к раздвоению энергетических полос. Возможны два типа взаимодействий: первый тип обуславливает образование энергетических полос в результате параллельного распространения электронных волн вдоль обеих боковых цепей, вторая же полоса образуется как результат взаимодействия, при котором электронные волны распространяются по боковым цепям в противоположных направлениях (второй тип взаимодействия). Если же взаимодействия отсутствуют, то энергии этих полос должны совпадать и полосы должны иметь одинаковые свойства. Взаимодействие же приводит к отделению этих полос друг от друга, так что каждому волновому числу  $a$  соответствуют две различные частоты.

Далее необходимо учесть роль спинов электронов, которые также будут удваивать число уровней в полосах в соответствии с возможными ориентациями спина. В конечном счете мы можем ожидать появления четырехкратно расщепленных полос. В зависимости от типа взаимодействия могут образовываться либо два дублета, либо один синглет и один триплет. Последний тип, синглет — триплетная структура, встречается, по-видимому, во многих биохимических структурах.

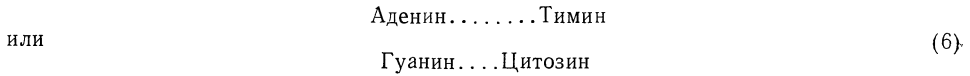


Фиг. 17. Двойная спираль ДНК.

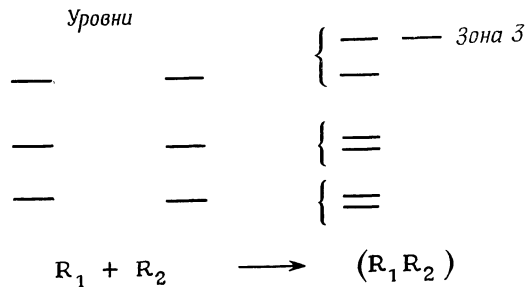
Кольца и обозначенные изогнутыми линиями связи представляют фосфоэфирную цепь. Пластины между ними изображают основания [20].

## ОСНОВАНИЯ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ДОНОРЫ И АКЦЕПТОРЫ

Все наши предыдущие рассуждения основывались на предположении об идентичности оснований, так как в первом приближении мы пренебрегали различиями между четырьмя основаниями, показанными на фиг. 16. Эти основания объединяются в пары:



Специальное исследование должно показать, могут ли эти основания играть роль доноров или акцепторов. Исходя из данных, приведенных в табл. 1 и на фиг. 13, мы предполагаем, что основания, расположенные с левой стороны (аденин и гуанин), могут быть донорами, тогда как тимин и цитозин могут играть роль акцепторов. Это предположение является грубым и принимается лишь для того, чтобы можно было подойти к более точным расчетам. Если такое предположение окажется некорректным, то полученные с его помощью результаты могут быть легко видоизменены соответствующим образом.



Фиг. 18.

Каждая из двух групп, приведенных выше [6], будет действовать как своеобразный насос, перемещающий часть электронного заряда с левой стороны на правую. Как велика может быть эта перемещенная часть? Некоторые сведения по этому вопросу мы можем получить, исходя из данных, приведенных на фиг. 12, где представлены результаты расчетов плотности электронного заряда для различных атомов. Большинство атомов азота содержит, как правило, в среднем примерно 0,5 избыточного заряда электрона. В то же время атомы углерода обладают зарядом, который больше или меньше заряда одного электрона на 0,1 или 0,2 его величины. Помня, что водородная связь содержит один очень активный атом азота, мы предполагаем, что в каждой паре оснований [6] слева направо может быть перенесено в среднем примерно 0,5 заряда электрона. Это предположение также является достаточно грубым и требует более детальной проверки. Тем не менее если порядок приведенной величины верен, то для образования дырки в заполненной зоне слева или для переноса одного полного электрона в незаполненную зону проводимости справа необходимо образование двух параллельно действующих водородных связей. Таким образом, слева мы получим полупроводник, обладающий *p*-типом проводимости, а справа — *n*-типом проводимости.

Если же рассматриваемая структура имеет на каждой данной ступеньке лестницы только одну связь определенного типа, с «половиной» дырки слева и «половиной» электрона справа, то мы имеем дело с «экситоном»,

для которого дырка и электрон не могут быть разделены и должны перемещаться вместе. Возможную роль экситонов в биохимических молекулах многократно отмечал Каша. Здесь мы снова подчеркиваем их важность.

Таковы основные идеи, возникающие при рассмотрении новейших литературных данных. Многие вопросы, связанные с протекающими в биохимических макромолекулах процессах, подлежат дальнейшему обсуждению как с теоретической, так и с экспериментальной точки зрения. Хочется подчеркнуть одну особенность, на которую раньше никто не обращал внимания: хотя молекула и может обладать достаточно высокими заполненными уровнями, которые все же лежат ниже, чем первые незаполненные уровни молекулы белка, такая молекула сама по себе не может быть донором электронов. Однако взаимодействие этой молекулы с соседней (которая также не может быть сама по себе донором электронов) может в конечном счете придать ей «донорный» характер. Так как первоначально эти молекулы обладают очень близкими энергетическими уровнями, то в результате взаимодействия образуются двойные уровни, из которых верхний может поставлять электроны в зону 3 (незаполненную) белка. Схематически это изображено на фиг. 18. На практике может встретиться много примеров такого рода.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brillouin L., J. phys., 1, 377 (1930).
2. Brillouin L., «Quanten Statistik», Springer, Berlin, 1931.
3. Brillouin L., J. phys., 3, 565 (1932).
4. Brillouin L., J. phys., 4, 1, 333 (1933).
5. Brillouin L., «Wave Propagation in Periodic Structures», McGraw-Hill, New York, 1953; Dover, New York, 1946.
6. Brillouin L., Parodi M., «Propagation des Ondes dans les milieux périodiques», Masson, Paris, 1958. (Л. Бриллюэн и М. Пароди, Распространение волн в периодических структурах, Москва, 1959.)
7. Evans M. G., Gergely J., Biochim. et Biophys. Acta, 3, 188 (1949).
8. Isenberg I., Szent-Györgyi A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 45, 1232 (1959).
9. Mason R., Brit. J. Cancer, 12, 469 (1958).
10. Mason R., Nature, 181, 820 (1958).
11. Mason R., Discussions Faraday Soc., 27, 129 (1959).
12. Perutz M. F., Endeavour, 190, (1958).
13. Pullman B., Pullman A., «Theories Electroniques de Chimie Organique», Masson, Paris, 1952.
14. Pullman B., Pullman A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 44, 1197 (1958).
15. Szent-Györgyi A., Nature, 148, 157 (1941).
16. Szent-Györgyi A., Nature, 157, 875 (1946).
17. Szent-Györgyi A., «Bioenergetics», pp. 9, 15, 22, 60, Academic Press, New York, 1957.
18. Szent-Györgyi A., «Introduction to a Submolecular Biology», pp. 3, 14, 48—75, Academic Press, New York, 1960.
19. Wurmser R., Bull. soc. chim. biol., 40, 2091 (1958).

# ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ДНК САМОВОСПРОИЗВОДЯЩЕЙСЯ МОЛЕКУЛОЙ?

К вопросу о взаимосвязи физики, химии и биологии в наши дни

Б. КОММОНЕР

Одним из крупнейших вкладов Альберта Сцент-Дьёрдьи в науку является последовательно проводимая им на протяжении ряда лет кампания, направленная на установление связи между жизненными явлениями и поведением молекул, атомов и субатомных частиц, из которых состоит всякая живая материя. В 1960 г. Сцент-Дьёрдьи [9] писал: «Мы действительно приблизимся к пониманию жизни только тогда, когда наши знания обо всех структурах и функциях на всех уровнях — от электронного до надмолекулярного — сольются в единое целое». Поэтому теперь было бы уместно проанализировать, как далеко мы сумели продвинуться по намеченному им пути.

Что мы можем выиграть, пытаясь перекинуть мост между биологией и современной физикой? Преимущества такого подхода весьма значительны.

Живые организмы представляют собой очень сложные гетерогенные системы, свойства которых изменяются во времени. Некоторые из них очень чувствительны к изменениям окружающей среды; другие же, наоборот, стойко переносят все, кроме самых грубых воздействий. Хотя всякая живая система характеризуется очень высокой степенью организации и, следовательно, с точки зрения термодинамики вероятность существования такой системы крайне мала, тем не менее подобные системы не только сохраняются, но даже увеличиваются в объеме и воспроизводятся. Анализ таких систем, который дал бы возможность предвидеть и регулировать их поведение, чрезвычайно труден. Насколько скромны еще наши успехи в этой области, наиболее отчетливо видно хотя бы из того, как мало мы умеем управлять процессами жизни. Например, в сельском хозяйстве, как и тысячи лет назад, роль человека сводится лишь к созданию удовлетворительных условий для развития животных и растений, которые, будучи одомашнены человеком, очень мало отличаются от своих диких предков. Наши крупнейшие достижения в медицине ограничиваются разработкой различных способов уничтожения или удаления вредных или поврежденных клеток без чрезмерного ущерба для человеческого организма. Задача коренной *перестройки* живого, изменяющей весь ход его развития, по существу отлична от простой задачи уничтожения, выращивания или подавления тех или иных организмов. На сегодняшний день эта задача в основном еще не решена.

Мы то и дело убеждаемся, что физика добивается успеха там, где биология оказывается явно бессильной. Физические исследования, выполненные за последние 50 лет, дали нам столь глубокие и обобщающие знания о свойствах материи, что в результате были открыты системы, ранее совершенно неизвестные человеку. Прямым следствием этого явилось осуществление в большом масштабе ядерных и молекулярных превращений, отсутствовавших раньше на нашей планете. Основные идеи и методы новой отрасли знания — квантовой физики — по существу безоговорочно применимы к любым формам материи, и до сих пор нам неизвестны факты, противоречащие этому положению. Но если это так, то можно ожидать, что современную физику удастся использовать для исследования живых систем столь же успешно, как и для исследования атомных и молекулярных систем; мощь ее экспериментальных методов и теоретических концепций разрушит преграды, столь долго защищавшие основные жизненные явления от атак экспериментаторов.

В какой мере оправдались уже сейчас эти ожидания? За последние 20—30 лет непрерывно возрастало число работ, в которых усиленно пытались использовать экспериментальные методы современной физики (и смежных областей химии) для изучения биологических проблем. На этом пути были достигнуты большие успехи, и может показаться, что нам предстоит лишь дать обзор этих достижений. Однако большинство успешных работ относится к таким свойствам живой материи, которые одновременно присущи и многим неживым системам; к ним относятся, например, процессы превращения энергии. Поэтому нам могут возразить, что эти успехи не дают действительного доказательства перспективности применения современной физики и химии к изучению таких уникальных проявлений жизни, как воспроизведение и наследственность.

Теперь и в этой стене возникла брешь; на наших глазах создается физико-химическая теория воспроизведения и наследственности. Это в свою очередь позволяет проверить идею о том, что в основе процессов жизнедеятельности при всей их специфичности лежат физико-химические свойства компонентов, из которых построена живая материя.

В настоящей статье я намереваюсь рассмотреть некоторые аспекты этой взаимосвязи в надежде, что это поможет нам глубже понять мысли Сцент-Дьёрди.

В последние годы применение физики и физической химии к решению биологических проблем привело к появлению довольно простой концепции, которая обещает объяснить нам одно из фундаментальных свойств живой материи — способность к самовоспроизведению. Основные положения новой концепции хорошо известны. Вкратце они сводятся к утверждению, что процессы воспроизведения и передачи наследственных свойств в конечном счете регулируются молекулами особого химического вещества — дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). По этой теории, ДНК обладает свойством воспроизводить самое себя и определять специфическую химическую структуру белков (в частности, ферментов), ответственных за установление совокупности тех химических процессов, которые характерны для данного организма. Была предложена детальная модель физической структуры ДНК и объяснение поведения этого вещества при биологической репликации. Разделение комплементарных цепей и их комплементарное воспроизведение объясняло в рамках этой концепции биологическое явление наследственности. На основе различных физических принципов были сделаны попытки описать структуру ДНК, объяснить ее физические свойства и оценить вероятность преобразования структуры этой молекулы в структуру

ее реплики или в соответствующий белок. В целом эти достижения, по-видимому, представляют пример успешного сотрудничества физики и биологии.

Однако в силу ряда обстоятельств нам приходится проявлять осторожность в своих оценках. Изучая биологические свойства живой материи (такие, как наследственность и способность к развитию), биологи, конечно, создали ряд положений, описывающих поведение живых организмов и их взаимодействие с окружающей средой. Действительно, то немногое, что мы способны сделать в смысле управления протеканием жизненных процессов (например, эмбриональная индукция), основывается как раз на этих принципах, сформулированных биологами. Биологи относятся к этим принципам с большим доверием, но, к несчастью, обнаружилось, что некоторые из них явно противоречат выводам, вытекающим из новых физических исследований, касающихся природы ДНК.

Так, например, предположение о способности молекулы ДНК к самовоспроизведению противоречит одной из важнейших концепций биологии — клеточной теории, согласно которой клетка представляет собой наименьшую возможную единицу, проявляющую свойства живого (в том числе и свойство самовоспроизведения).

Конфликт между принципами биологии и физики, быть может, ярче всего проявился в противоречиях между основными физико-химическими выводами, касающимися свойств ДНК, и некоторыми биологическими концепциями развития — процесса, свойственного живой материи. Главная проблема, лежащая в основе всего изучения процесса развития, заключается в выяснении того, каким образом многочисленные специфические признаки, наследуемые организмом, возникают из в высшей степени недифференцированного предшественника — оплодотворенного яйца. Наука эмбриология создавалась в обстановке глубоких расхождений в объяснении этого замечательного явления. Одни эмбриологи, используя очень несовершенные в то время микроскопы, объявили, что в человеческом яйце, или спермии, уже заключен крохотный зародыш. Они полагали, что черты взрослого организма уже предсуществуют в миниатюре в зародышевой клетке и что для его возникновения необходимо лишь увеличение размеров, т. е. рост. С усовершенствованием микроскопов эти взгляды были опровергнуты новыми фактами; теория преформации была заменена теорией эпигенеза, которая исходит из того, что характерные признаки взрослого организма не содержатся в зародышевой клетке, а постепенно возникают при взаимодействии специфических стимуляторов (внутренних или внешних) с первоначальной структурой развивающегося яйца. Последующие детальные исследования показали, что действительно очень многие специфические процессы развития организмов находят себе объяснение именно с позиций теории эпигенеза; это вызывало чувство удовлетворенности если не у всех биологов, то по крайней мере у эмбриологов.

Однако новые данные о генетических функциях ДНК противоречат концепции эпигенеза. Согласно гипотезе о генетическом коде, роль гомункула преформистов берут на себя последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. Новая теория наследственности исходит из того, что признаки взрослого организма формируются в процессе его развития в полном соответствии с предсуществующим кодом; при этом не происходит никакой потери или приобретения информации, заключенной в молекулах ДНК. Это приводит к необходимости признания однозначного соответствия между признаками организма и их отображением, закодированным в ДНК зиготы. Эльзассер [5] в 1958 г. охарактеризовал новую гипотезу как «модернизированный вариант» преформистских принципов. На языке теории информации

гипотеза о генетическом коде, заключенном в ДНК, означает, что весь объем информации взрослого организма равен объему информации зародышевых клеток, тогда как по теории эпигенеза организм в процессе своего развития может черпать информацию из других источников. Отправные пункты теории кода, заключенного в молекулах ДНК, были впервые сформулированы Кастлером, который заявил: «...в каждом сперматозоиде или каждой яйцеклетке действительно существует реальный гомункулус, но он похож на маленького человечка не более, чем описание походит на описываемый предмет».

Таким образом, налицо несомненное противоречие между теми объяснениями механизма репликации, которые вытекают из данных биологии, и теми, которые основываются на данных современных физических исследований. Означает ли это противоречие, что мечта Сцент-Дьёрдьи о единстве биологии и современной физики тщетна? Или, быть может, оно указывает на то, что одна из двух противоречащих друг другу теорий ошибочна? Нельзя ли допустить, что теория эпигенеза является лишь грубым приближением, основанным на неизбежно неточных данных эмбриологии, и что теперь эта теория должна отступить перед точными и надежными данными о структуре ДНК? Или, напротив, ошибочна теория о заложенном в ДНК генетическом коде? Ниже я вкратце проанализирую основные источники этого конфликта и возможные пути его разрешения.

Для начала было бы полезно определить возможно точнее область расхождений. Это требует ясной и четкой формулировки того, что мы подразумеваем под общим термином *самовоспроизведение*, в особенности под идеей о «самовоспроизводящейся молекуле».

В биологии термин *самовоспроизведение* применяют для обозначения специфической способности живой клетки воспроизводить самое себя, т. е. автономию клетки. Хотя репликация клетки происходит только в благоприятной внешней среде, способной поставлять клетке различные вещества, необходимые для ее роста, однако главный *результат* репликации, т. е. совкупность наследственных признаков дочерней клетки, почти не зависит от состава окружающей среды. По данным биологии самовоспроизведение представляет собой процесс репликации, в котором наследственные признаки потомства контролируются *только* признаками родителей, даже если процесс может протекать лишь в специфической среде. Известны случаи, когда внешняя среда может оказывать некоторое влияние на формирование этих признаков (например, «длительные модификации»), но, по-видимому, это всего лишь результат изменения относительных скоростей роста различных внутриклеточных структур, таких, например, как хлоропласты.

Следовательно, для доказательства правомерности утверждения, что ДНК является «самовоспроизводящейся молекулой», необходимо показать, что процесс ее репликации в клетке (или *in vitro*) приводит к образованию новой молекулы, специфическая последовательность нуклеотидов которой определяется *только* последовательностью нуклеотидов в родительской молекуле. Нужно также доказать, что, хотя клетка и заключает в себе специфическую среду, необходимую для протекания этого процесса, однако никакие особенности внутриклеточной среды не оказывают влияния на структурную специфичность новой полинуклеотидной цепи. Крик сформулировал основной постулат гипотезы о молекуле ДНК как носителе генетической информации следующим образом: содержащаяся в молекуле ДНК информация может быть использована, тогда как информация, перенесенная с ДНК на белок, уже никуда не может быть передана [4]. Согласно



этому тезису, белки не вносят никакой информации в синтез ДНК. Это исключает основной возможный источник посторонней информации при репликации ДНК.

Мы можем теперь сформулировать нашу проблему более четко: как можно подтвердить гипотезу о том, что при репликации ДНК генетическая специфичность (т. е. последовательность нуклеотидов) вновь образованного полинуклеотида полностью определяется последовательностью нуклеотидов в родительской молекуле, т. е., иными словами, что никакие иные источники специфичности не играют существенной роли в этом процессе?

Ясно, что лучшим путем для ответа на этот вопрос был бы прямой путь: экспериментальное изучение физических процессов, протекающих при репликации ДНК. К несчастью, имеющиеся в нашем распоряжении очень интересные экспериментальные данные о репликации ДНК не говорят ничего определенного по этому частному вопросу. Ни один из интереснейших проведенных *in vivo* экспериментов (например, появление у микроорганизмов после нескольких циклов репликации гибридной ДНК, содержащей 50% метки) не дал сведений, имеющих какое-либо отношение к этой проблеме. Результаты таких опытов лишь указывают на существование какого-то весьма точного механизма репликации ДНК и могут свидетельствовать о том, что ранее существовавшие молекулы ДНК участвуют в процессе, который определяет структуру новых ее молекул. Но это отнюдь не дает оснований исключить возможность того, что и другие структурно специфичные и биохимически активные агенты (например, ферменты) также участвуют в определении последовательности нуклеотидов в новых молекулах ДНК. Допущение, что специфичность ферментов, участвующих в процессе репликации, сама определяется некоторой специфичной формой ДНК, не спасает положения. Такое допущение основано на предположении, что только ДНК является носителем биологической непрерывности, так что в конечном счете специфичность всех других компонентов клетки определяется специфичностью ДНК. Однако для такого утверждения в настоящее время нет никаких эмпирических оснований. Каждая клетка происходит от другой клетки, содержащей, помимо сравнительно большого количества ДНК, самые различные цитоплазматические вещества. В то же время клетки, обладающие полным комплектом ДНК, но очень малым количеством цитоплазмы (например, сперматозоиды), не способны делиться и самостоятельно выполнять функции носителя биологической непрерывности.

Осуществление синтеза ДНК *in vitro* в системах, содержащих ДНК-затравку и нужные ферменты, порождает надежду (все еще не осуществленную, впрочем) получить решающее доказательство физической основы специфичности репликации ДНК. Изучение процесса репликации в такой системе действительно показывает, что нуклеотидный состав вновь синтезированной ДНК отражает состав ДНК-затравки; однако из этих опытов все еще не вытекает, что в определении состава ДНК специфичность ДНК-затравки является фактором не только необходимым, но и *достаточным*. В системе обязательно присутствуют некоторые специфичные ферменты, без которых синтез новой ДНК не происходит. Следовательно, пока еще нельзя исключить возможность того, что нуклеотидный состав определяется совместно ДНК-затравкой и ферментами. Некоторые данные свидетельствуют о том, что полинуклеотиды хотя и с простыми, но не случайными нуклеотидными последовательностями могут образовываться также в отсутствие затравки. Если это действительно так, то ферменты в какой-то мере определяют последовательность нуклеотидов и, значит, репликация ДНК не сводится к самовоспроизведению.

Поскольку прямые физические данные о механизме репликации ДНК отсутствуют, мы вынуждены оперировать с менее удовлетворительными данными, способными подтвердить теорию о ДНК как «самовоспроизводящейся молекуле». При таком положении вещей вообще можно было бы заявить, что, поскольку прямые данные отсутствуют, теорию нельзя считать доказанной и, следовательно, нельзя противопоставлять ее концепции эпигенеза, которая в конце концов представляет собой прочно укоренившийся и до сих пор никем не оспаривавшийся принцип биологии.

Однако, конечно, существует ряд важных данных, подтверждающих теорию самовоспроизводящейся молекулы ДНК. И это прежде всего — сама структура ДНК, хорошо согласующаяся со многими принципами физики и укладывающаяся также в *возможную модель* процесса самоудвоения. Эта модель разумна, ибо она отражает процесс, уже известный нам на макроскопическом уровне, — процесс матричного копирования. Более того, для описания возможных механизмов передачи закодированной в ДНК информации дочерним молекулам, а также для описания перевода этой информации в молекулы белка или РНК можно применить некоторые элементарные аспекты теории информации — дисциплины, строго обоснованной твердо установленными физическими принципами. Вообще сила гипотезы о самовоспроизведении молекулы ДНК базируется на правдоподобии физической и химической структуры этой молекулы, а также тех моделей процесса самовоспроизведения, которые выводятся на основании этой структуры.

Таким образом, для разрешения очевидного противоречия между биологически установленным принципом эпигенеза и преформистской гипотезой генетического кода ДНК нам необходимо выяснить, насколько последняя соответствует принципам физики и химии.

Мы обязаны Эльзассеру [5] инициативой в развитии подхода, основанного на строгой и всесторонней физической проверке модели кодовой ДНК. Он указал, что физические требования к удовлетворительному коду могут быть определены, исходя из имеющегося сейчас значительного опыта хранения информации в современных вычислительных машинах. Главную проблему представляет собой «шум», т. е. случайные тепловые флуктуации, действие которых приводит к необратимому уничтожению закодированной информации. В вычислительных машинах коды штампуются на таких механически стабильных структурах, как ленты, перфокарты или проволоки. Эльзассер показывает, что для «кодовой библиотеки», сконструированной на молекулярном уровне, потери информации из-за тепловых взаимодействий фактически неизбежны. Этот вывод подтверждается существующим инженерным опытом использования миниатюрнейших из известных запоминающих устройств — криотронных устройств памяти. Даже и в этих устройствах, которые, конечно, значительно крупнее и более термостабильны, чем молекулярные структуры, потери информации из-за тепловых флуктуаций настолько серьезные, что с ними приходится бороться с помощью высокой избыточности и с помощью специальных устройств, периодически восстанавливающих исходную информацию по остающимся избыточным элементам кода [7]. Иными словами, из относительно простых термодинамических соображений следует, что ни ДНК, ни какая-либо другая молекула не может служить надежным хранителем информации.

Недавно Вигнер, исследуя условия, необходимые для существования самовоспроизводящейся структуры, рассмотрел эту проблему с точки зрения квантовой механики [10]. Его подход состоял в квантовомеханическом описании соответствующих физических состояний. Пусть  $N$  — число ком-

понент, которые должны быть определены для того, чтобы описать любое возможное состояние вещества, строящего живую систему. Это означает, что «пространство» организма является  $N$ -мерным. Пусть далее пространство питательной среды, не включенной в организм, имеет  $R$  измерений. Из множества возможных векторов состояния в  $N$ -мерном пространстве лишь очень малое число их ( $n$ ) соответствует состояниям живой системы, т. е. системы, способной к самоудвоению. Вигнер исследует зависимость способности к самоудвоению от свойств величины  $S$ , отражающей взаимодействие между состояниями вещества, образующего организм, и состояниями вещества, образующего питательную среду организма.

При отсутствии дополнительных ограничений величина  $S$  связана с матрицей вероятностей, не обладающей специальными свойствами. Можно показать, что если происходит воспроизведение, то  $N$  и  $n$  должны быть связаны уравнением, в котором члены  $N^2$  и  $n$  находятся в разных частях равенства. Так как величина  $N$  должна быть много больше, чем  $n$ , то равенство в общем случае не удовлетворяется. Как показал Вигнер, оно удовлетворяется только в том случае, если величина  $S$  не случайна. Он заключает: «Мы приходим к выводу, что если величина  $S$  не «скроена» специально таким образом, чтобы осуществлялось воспроизведение, то бесконечно мала вероятность существования *какого-либо* состояния питательной среды, при котором могло бы происходить умножение некоторого набора состояний, составляющего весьма малую часть возможных состояний системы». Поскольку  $S$  отражает историю изменений состояния воспроизводящей системы во времени, это заключение означает, что результат воспроизведения определяется не только начальным состоянием организма, но также и специфически зависящим от времени взаимодействием со средой, в которой происходит удвоение. С биологической точки зрения это означает, что специфичность воспроизведения неразрывно связана со специфичностью *развития*. Именно это и наблюдается для обычных живых существ; однако в матричной модели молекулярного самоудвоения это условие не выполняется, потому что в этом случае специфичность (информация) целиком «содержится» в структуре исходной молекулы ДНК и просто передается от молекулы к молекуле посредством процесса комплементарного копирования, а для этого процесса не требуется, чтобы в результате взаимодействия с другими агентами в процессе развития система приобретала дополнительную специфичность. Соображения Вигнера подчеркивают, что «молекулярное самоудвоение» — явление, при котором вся специфичность содержится только в молекулярной структуре, — есть «бесконечно маловероятное» событие. Таким образом, эти соображения говорят о том, что предложенная модель самоудвоения ДНК противоречит не только некоторым принципам биологии, но также и определенным законам физики.

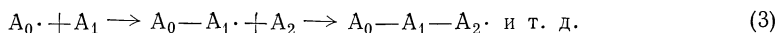
Мы можем также искать подтверждения (или опровержения) теории самоудвоения ДНК в тех данных, которые получены из обширного опыта в области *химического синтеза* полимеров. Ныне в огромном изобилии могут синтезироваться искусственные линейные полимеры — соединения, весьма схожие с полинуклеотидами и другими биологическими макромолекулами. Ясно, что определенные выводы о процессах, связанных с синтезом таких полимеров, будут способствовать выяснению некоторых сторон нашей проблемы.

В этой связи наиболее интересными представляются механизмы, управляющие образованием линейных сополимеров, т. е. полимеров, составленных из мономерных единиц двух различных типов (А и В). Обычно образование таких полимеров инициируется добавлением катализатора свободно-

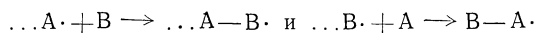
радикального типа ( $X\cdot$ ) к смеси веществ А и В, например, в соотношении 1 : 1. При этом идут две реакции:



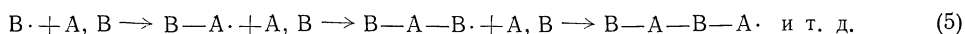
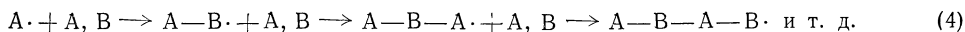
Оба продукта этих реакций ( $A\cdot$  и  $B\cdot$ ) представляют собой весьма реакционноспособные свободные радикалы, каждый из которых может осуществлять реакцию, проходящую с образованием линейного полимера. В простейшем случае это однородный полимер, образуемый по схеме:



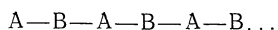
В системе из двух мономеров возможны четыре различные реакции, две из которых приводят к двум однородным цепям типа (3), а две другие — к двум разнородным цепям:



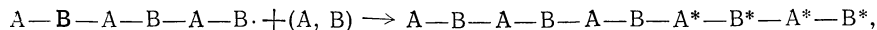
Тип полимера, образуемого в такой системе, определяется относительными концентрациями А и В, а также относительными константами скорости четырех возможных реакций. Хорошо известны примеры, когда константы скорости реакций образования разнородных цепей намного превосходят константы скорости реакций образования однородных цепей. В этом случае только два из четырех типов процессов будут осуществляться со значительными скоростями, и инициаторы цепи,  $A\cdot$  и  $B\cdot$ , возникшие в результате реакций (1) и (2), будут реагировать по следующей схеме:



В этой системе распространяющиеся цепные реакции будут производить из смеси мономеров А и В два следующих полимера, обладающих специфической структурой:



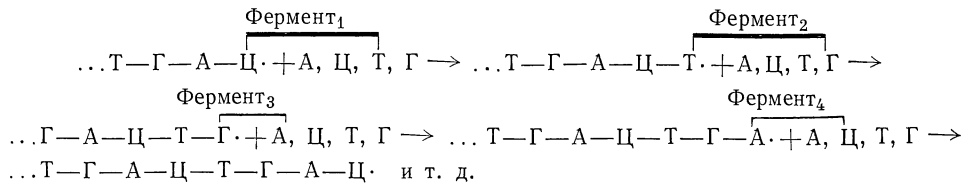
В какой степени процесс, протекающий в такой системе, сходен с процессом репликации, как его понимают в биохимии? Этот процесс является автокаталитическим в том смысле, что свободнорадикальные концы катализируют включение мономеров в растущий полимер. Чтобы продемонстрировать присущий такой системе процесс репликации, нужно только посмотреть, что получается при добавлении короткой растущей цепи, оканчивающейся свободным радикалом, к свежей смеси мономеров:



где звездочкой помечен сегмент полимера, представляющий собой заново синтезированную реплику исходной структуры.

Этот пример приведен только для того, чтобы показать, что синтез линейных полимеров несет в себе зачатки репликации. Эта система легко подгоняется под эмпирические наблюдения репликации полимеров в биологических системах. Если в системе вместо 2 присутствует 4 или 5 мономеров, а также катализаторы, регулирующие скорости присоединения специ-

фических мономеров, то в ней мог бы происходить следующий процесс:



(Для того чтобы подчеркнуть биологическое значение данного процесса, мы используем обозначения А, Т, Г, Ц для мономеров.) Ферментам, входящим в состав этой системы, приданы произвольные, но вполне правдоподобные специфические функции. Фермент<sub>1</sub> специфически катализирует присоединение Т к концевому Ц; фермент<sub>2</sub> — присоединение Г к концевому Т; фермент<sub>3</sub> — присоединение А к концевому Г и фермент<sub>4</sub> — присоединение Ц к концевому А.

Эта система в свехупрощенной форме, приведенной выше, будет осуществлять линейную репликацию последовательности ... Т—Г—А—Ц... Конечно, в такой системе разнообразие получаемых цепочек будет невелико. Но это легко преодолеть, введя не только катализаторы, специфичные по отношению к концевому мономеру цепи, но и катализаторы, специфичные по отношению к концевой паре мономеров, т. е. катализатор оказывается специфичным также по отношению к предпоследнему мономеру. (Такие явления известны в химии полимеров.) Так как в этом случае возможны уже 16 пар, то очевидно, что сложность получающегося полимера очень резко возрастает и в конце концов может оказаться сравнимой со сложностью природных полинуклеотидов.

Основная цель предшествующего изложения — показать, что данные по синтезу линейных полимеров в небиологических системах лежат в основе интересной возможности объяснения репликации в результате линейного присоединения мономеров; специфичность такой репликации частично определяется особенностями сложной системы реакций. Описанная система в том виде, как она здесь представлена, конечно, не может служить моделью биологической репликации полинуклеотидов, так как не отвечает на следующие вопросы: чем определяются длины молекул? Почему более короткие молекулы биологически неактивны? И тому подобное. Но так же как и в случае матричной модели репликации ДНК, трудности такого типа, возможно, легко преодолеть, по крайней мере теоретически, путем искусных умозрительных рассуждений.

Моей целью вовсе не является создание собственной новой модели репликации ДНК. Просто я ищу точки соприкосновения между проблемой репликации ДНК и принципами современной физики и химии. Из предшествующих рассуждений вытекает, что механизмы, лежащие в основе синтеза искусственных полимеров, обладают следующими особенностями, имеющими отношение к нашей проблеме: во-первых, макромолекула образуется посредством концевого присоединения мономеров, т. е. синтезируется линейно; во-вторых, процессы синтеза носят принципиально авткаталитический характер и поэтому представляют собой зачаток реплицирующейся системы; последовательное присоединение осуществляет активированный концевой мономер, часто представляющий собой свободный радикал; в-третьих, в сложных сополимерах последовательность мономерных остатков в синтезируемой молекуле определяется частично характеристиками скоростей реакций, происходящих между концом полимера и имеющимися в среде свободными мономерами; в-четвертых, специфическая структура

полученного полимера может определяться совместно как природой затравки, так и специфическими особенностями (главным образом константами скоростей реакций) присутствующих в системе катализаторов.

Эта модель линейной репликации отличается от общепринятой матричной модели ДНК рядом важных особенностей. В последнем случае силы, определяющие структуру вновь синтезирующегося полимера, действуют перпендикулярно цепи молекулы и матричная гипотеза не накладывает ограничений на линейную последовательность. Репликация осуществляется непосредственно и зависит только от исходной структуры; поэтому данная модель принципиально преформистская. Вся информация родительской молекулы передается потомкам непосредственно и, по существу, одновременно.

В линейной модели репликация не является непосредственной. Ее ход регулируется не всей структурой исходной молекулы, а относительно небольшим концевым сегментом. Таким образом, сама молекула поставляет малое количество информации для синтеза специфических цепей; это возможно благодаря тому, что затравка взаимодействует с очень сложной системой синтеза, которая и вносит основной вклад в специфичность конечного продукта. Активный конец молекулы-затравки можно рассматривать как стимулятор, специфичность которого определяется всей предшествующей ему цепью. Эти стимуляторы по очереди запускают в уже существующей системе такие серии цепных реакций, которые создают в конечном счете реплику первоначальной полимерной молекулы. В этой модели исходные молекулы не могут рассматриваться как самовоспроизводящиеся, поскольку лишь часть необходимой информации содержится в структуре самой исходной молекулы, остальная же часть содержится в специфической каталитической системе. В итоге линейная модель репликации полимеров носит в основном эпигенетический, а не преформистский характер.

Таким образом, не существует прямых экспериментальных доказательств концепции о том, что репликация ДНК происходит посредством самовоспроизведения, т. е. что нуклеотидная последовательность продукта определяется исключительно нуклеотидной последовательностью исходной молекулы. Идея о том, что ДНК управляет биологической наследственностью посредством процесса самовоспроизведения, противоречит определенным твердо установленным принципам биологии, в частности принципу эпигенеза. Эту концепцию можно рассматривать как правдоподобное развитие наших знаний о физической структуре ДНК, только если удастся показать, что в процессе самовоспроизведения соответствующие нуклеотиды подстраиваются латерально к исходному полимеру (матрице). Но строгий анализ физических проблем, связанных с матричным самовоспроизведением, показывает, что вероятность этого процесса, как и всякого процесса, связанного с хранением информации на молекулярном уровне, чрезвычайно мала. Автокаталитические же механизмы, несущие в себе зачатки репликации, осуществляют синтез искусственных полимеров за счет линейного наращивания, а не путем матричного копирования, причем специфичность полимеров определяется частично свойствами реагирующей системы, а не только структурой исходной молекулы.

Таким образом, в своих попытках разрешить противоречие между концепцией самовоспроизведения ДНК и биологическим принципом эпигенеза, обращаясь к опыту физики и химии, мы получили подтверждение моделей репликации *несамовоспроизводящейся* ДНК. Действительно, изучение химии полимеров дает возможность выдвинуть особый способ репликации, не связанный с самовоспроизведением, — линейное наращивание, удовле-

творяющее требованиям, вытекающим как из биологических данных, так и из данных физики и химии.

Остается только упомянуть, что концепция репликации макромолекул, которая удовлетворяла бы концепциям эпигенеза, вовсе не нова. Подобные схемы предлагались несколькими авторами, в частности Клаудом [1] и Хиншелвудом [6], и были основаны на биохимических данных. Хиншелвуд, например, указывал, что сложные циклические химические системы, столь характерные для процессов жизнедеятельности, в своей основе подобны системам с цепными реакциями. Эти системы обладают автокаталитическими свойствами и способностью к репликации, но *самовоспроизведения* отдельных молекул в них не происходит. В таких системах репликация новой молекулы частично управляется специфической структурой предсуществующей молекулы, но эта взаимосвязь косвенная и также осуществляется за счет ряда химически специфичных реакций. Очень простым примером является образование трипсина с помощью катализируемого трипсином превращения трипсиногена. Более сложный пример — зависящий от аденозинтрифосфата (АТФ) синтез АТФ, когда при гликолизе каждая молекула глюкозы окисляется только после того, как на ее фосфорилирование будут затрачены 2 молекулы АТФ. Но будучи однажды активирована таким способом, молекула глюкозы создает вдвое большее число молекул АТФ.

Несомненно, что такие прямые циклические процессы весьма характерны для процессов клеточной химии, и, как указывает Хиншелвуд, «система взаимосвязанных частей, каждая из которых оказывает на другую нечто вроде ферментативного действия, в стационарном состоянии будет, как можно легко показать, работать как автосинтезирующая система. Ни одна отдельная часть такой системы не может считаться наделенной некоей новой и таинственной силой, с помощью которой эта часть воспроизводит самое себя» [6].

В сущности, обобщая довольно обширный опыт, относящийся к автокаталитическому синтезу специфических веществ в биологических системах, мы убеждаемся, что действующие здесь механизмы являются прямыми, а специфичность конечного продукта определяется специфичностью целого ряда взаимосвязанных реакций. Такая система по своему характеру является эпигенетической, а не реформистской.

В связи с этим интересно вспомнить недавние исследования по биосинтезу вируса табачной мозаики (ВТМ), которые дали прямое доказательство эпигенетического характера процесса репликации [2]. Коротко говоря, показано, что палочковидная частица ВТМ синтезируется линейно, причем нить рибонуклеиновой кислоты (РНК) и окружающие ее белковые субъединицы в данном линейном участке вирусной частицы образуются одновременно. Единственное правдоподобное объяснение этих эмпирических наблюдений состоит в том, что относительно короткий концевой сегмент РНК помогает детерминировать структуру белковой субъединицы. Эти субъединицы ложатся на концевые структуры, состоящие из субъединиц. Вновь присоединенные белковые субъединицы в свою очередь определяют выбор новых нуклеотидов, которые пристраиваются к концу нити РНК. Такой процесс является эпигенетическим в том смысле, что репликация специфической нуклеотидной последовательности РНК определяется частично структурой короткого концевого сегмента нити РНК и частично — химической спецификой ферментативных процессов белкового синтеза. Линейный характер наращивания вирусной РНК, по-видимому, исключает возможность ее репликации с помощью матричного механизма самовоспроизведения.

Эти рассуждения заставили меня усомниться в правильности гипотезы о том, что в основе воспроизведения и наследственности живых существ лежит самовоспроизведение ДНК (или какой-то иной молекулы). Во-первых, не существует прямых экспериментальных данных, которые бы доказывали, что генетически специфичная нуклеотидная последовательность ДНК, возникшая в ходе биологической репликации, определяется исключительно нуклеотидной последовательностью исходной цепи ДНК. Далее, важные свойства модели ДНК как «самовоспроизводящегося кода» противоречат основным принципам физики. Химический механизм, предлагаемый для объяснения самовоспроизведения ДНК, — подстраивание сбоку от матрицы новых нуклеотидов — неизвестен в химии небиологических полимеров; альтернативой является линейный, не связанный с самовоспроизведением механизм репликации биологических полимеров. Наконец, идея о том, что в основе наследственности и развития лежит самовоспроизведение ДНК, непосредственно противоречит определенным биологическим принципам (в частности, принципу эпигенеза), которые твердо установлены с помощью наблюдений и экспериментов над живыми существами.

Означает ли все это, что не следует тешить себя надеждой, столь привлекательно выраженной Сцент-Дьёрдьи, — надеждой объяснить жизнь, расчленив ее на молекулярные, атомные и субатомные компоненты? Я считаю, что это не совсем так. Однако, как уже говорилось, модель самовоспроизводящейся ДНК отнюдь не может считаться совершенной ни с химической, ни с физической точек зрения, и поэтому ее нельзя использовать для подтверждения идеи о том, что биологию можно свести к физике и химии.

Как я уже указывал в другом месте [3], один из наиболее сильных ударов по гипотезе самовоспроизведения ДНК связан со взглядами Бора на взаимосвязь между живыми системами и принципом дополнительности — одним из наиболее общих научных принципов. По-видимому, существует некоторая опасность того, что использование блестящих экспериментальных методов современной физики без одновременного применения принципов, послуживших источником этих методов, может стать источником ошибок.

Обоснования концепции самовоспроизведения ДНК с точки зрения биологической теории также уязвимы. Некоторые черты менделевской генетики носят явно преформистский характер, и поэтому возникает предположение, что ее можно связать с существованием какого-то молекулярного «кода». До некоторой степени это, конечно, дает биологическое обоснование теории генетического кода, заключенного в ДНК. Однако такой тип наследственности является лишь частным и, вероятно, подчиненным аспектом биологической репликации, которая включает в себя наряду с эпигенетическими явлениями развития цитоплазматическую наследственность и неменделевскую ядерную наследственность. Слабость гипотезы о коде, заключенном в ДНК, частично связана с ее неспособностью объяснить *все* принципы наследственности и развития.

Для того чтобы построить прочный мост между биологией и физикой, необходимо базироваться в равной мере как на основных принципах физики, так и на основных принципах биологии. Эта задача все еще стоит перед нами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Claude A., *Advances in Protein Chem.*, 5, 423 (1949).
2. Compton B., *Nature*, 184, 1998 (1959).



3. C o m m o n e r B., Science, **133**, 1745 (1961).
4. C r i c k E. H. C., Symposia Soc. Exptl. Biol., **12**, 138 (1961).
5. E l s a s s e r W. M., «The Physical Foundation of Biology», Pergamon Press, New York, 1958; J. Theoret. Biol., **1**, 27 (1961).
6. H i n s h e l w o o d C., Proc. Roy. Soc., **B146**, 155 (1956).
7. I t t n e r W. B., III, K r a u s C. J., Sci. American, **205**, 124 (1961).
8. Q u a s t l e r H., Lab. Invest., **8**, 480 (1959).
9. S z e n t - G y ö r g y i A., «Introduction to a Submolecular Biology», Academic Press, New York, 1960.
10. W i g n e r E., In «The Logic of Personal Knowledge, Essays Presented to Michael Polanyi», p. 231, The Free Press, Glencoe, Illinois, 1961.

# НЕКОТОРЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ж. Д Ю Ш Е Н Ь

Несколько лет назад автор настоящей статьи совместно с Монфилсом [6, 7] разработал метод обнаружения слабовыраженных пьезоэлектрических свойств различных веществ. Сущность метода заключается в следующем: исследуемое соединение помещают в переменное поле конденсатора, включенного в цепь суперрегенеративного усилителя того же типа, какой применяется в приборах для исследования ядерного квадрупольного резонанса. Несколько органических соединений, исследованных нами с помощью этого метода, давали ряд резонансных линий, лежащих в довольно широком диапазоне радиочастот, главным образом от 20 до 40 *мгц* [6, 8]. В частности, было показано, что при изменениях температуры резонансные линии, о которых говорилось выше, могут претерпевать обратимые сдвиги; величина смещения,  $\Delta$ , определяется при этом простым соотношением:

$$\Delta = -\frac{1}{\nu} \cdot \frac{d\nu}{dT} = \alpha\gamma,$$

где  $\alpha$  — тепловой коэффициент объемного расширения исследуемого вещества и  $\gamma$  — константа Грюнейзена, характеризующая зависимость сжимаемости вещества от давления. Основным достоинством предложенного метода является его высокая чувствительность, достигаемая за счет использования эффекта супергенерации, что дает возможность исследовать вещества, у которых пьезоэлектрические свойства выражены весьма слабо. В целом можно сказать, что новый метод весьма прост и вместе с тем позволяет получать важную информацию об электрических, термических и механических свойствах исследуемого вещества. В этом заключается его несомненная ценность.

После некоторых методических усовершенствований мы решили испробовать в качестве объекта исследований дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Нам казалось, что наличие в молекулах ДНК высокой упорядоченности и дальних взаимодействий может привести к появлению совершенно неожиданных физических свойств. Исследование ДНК на нашем «пьезоэлектрическом спектрографе» показало, что в указанном выше диапазоне 20—40 *мгц* она дает несколько резонансных линий. Поскольку при исследовании с помощью нашей методики не только нуклеиновые кислоты, но и нуклеопротеиды и белки давали по несколько линий, можно, по-видимому, считать, что в практику эксперимента входит новый тип радиочастотной спектроскопии макромолекул.

При исследовании ДНК наше внимание привлек следующий весьма интересный факт. В отличие от большинства органических соединений, для которых положение резонансных линий в диапазоне радиочастот, как правило, сильно зависело от температуры, линии, характерные для ДНК, оказались чрезвычайно стабильными. Изученные нами натриевые соли ДНК, выделенной из дрожжей, тимуса телят и молок сельди, характеризовались очень низкими значениями постоянной  $\Delta$  (около  $3 \cdot 10^{-5}$ ). Интересно, что это значение очень близко к значениям  $\Delta$  для кварца и таких металлов, как платина и железо, для которых оно равно примерно  $5 \cdot 10^{-5}$ . Постоянная  $\gamma$  для кварца, платины и железа имеет значения: 0,7; 2,5; 1,5 соответственно [14]. Напротив, например, для виннокислого калий — натрия и ряда антибиотиков значения  $\Delta$  оказались в сотни раз больше [6, 8]. К сожалению, разработанный нами метод не позволяет получать отдельно значения  $\alpha$  и  $\gamma$ . Однако для исследованных нами до настоящего времени соединений разброс значений  $\gamma$  оказался небольшим. Это дает основания считать, что очень малые значения  $\Delta$  для ДНК в основном связаны с ее низким термическим коэффициентом объемного расширения  $\alpha$ . Интересно также отметить, что хотя выделенная из дрожжей высокополимерная РНК во многом ведет себя подобно ДНК, однако при изменении температуры ее резонансные линии смещаются в противоположную сторону. Физический смысл этого явления в настоящее время изучается в нашей лаборатории.

Наиболее существенным результатом этих работ, по нашему мнению, является выяснение аналогии между термомеханическими свойствами нуклеиновых кислот и металлов. Кроме того, эмпирические соотношения [10], согласно которым термическая проводимость изоляторов обратно пропорциональна величине  $\Delta$ , позволяют ожидать, что ДНК должна быть хорошим проводником тепла. В настоящее время в нашей лаборатории проводятся соответствующие эксперименты с целью проверки этих соображений.

Наличие пьезоэлектрических свойств вещества мы устанавливали по скачкообразному изменению реактивного емкостного сопротивления (т. е. сопротивления конденсатора, заполненного исследуемым соединением) при определенных значениях резонансных частот. Однако мы до сих пор сталкиваемся с большими трудностями при определении природы и величины поляризации исследуемых веществ. Тем не менее нельзя исключить возможность того, что пьезоэлектрическими свойствами обладают отдельные небольшие участки исследуемого вещества или даже отдельные макромолекулы. Это предположение подтверждается важными экспериментами, проведенными группой японских исследователей [11, 12]. Недавно было показано [5, 13], что экспериментально установленные соотношения между электрическим полем и создаваемой им поляризацией таковы, что есть основания предполагать наличие у исследуемого вещества ферроэлектрических и антиферроэлектрических свойств. При этом нужно учитывать, что эти явления наблюдались лишь в тех случаях, когда образцы содержали не менее 20% воды; когда же содержание воды доходило до 40%, эффекты были максимальными. В связи с этим необходимо отметить, что зависимость пьезоэлектрических свойств от количества воды в исследуемом материале была показана и в наших опытах; однако причины и характер этой зависимости еще не выяснены.

Теперь обратимся к проблеме электропроводности. Было показано [9], что при приложении к образцам ДНК постоянного напряжения зависимость ее проводимости от температуры определяется общеизвестным соотношением, установленным для полупроводников. При работе с ДНК, выделенной из молок сельди или тимуса телят, энергия активации, определенная в температурном интервале  $273^\circ$ — $313^\circ$ , оказалась равной  $1,8$  эв. Для

сравнения укажем, что для белков энергия активации обычно имеет значения около 3 эв. Однако снижение энергии активации ДНК по сравнению с белками, возможно, не является характерным для самого этого соединения, а лишь представляет собой следствие его ассоциации с водой.

Параллельно с этими работами в последние годы Л. А. Блюменфельд проводил важные исследования, касающиеся магнитных свойств нуклеиновых кислот [1, 2]. Можно считать, что в этих работах было показано, что исследованные образцы ДНК характеризуются содержанием необычайно большого числа неспаренных электронов в отдельных нуклеотидах и что все эти электроны взаимодействуют между собой в целостной молекулярной структуре. Авторы сделали вывод, что неспаренные электроны представляют собой  $\pi$ -электроны, принадлежащие основаниям, входящим в состав ДНК, и что псевдоферромагнитный характер поведения ДНК объясняется взаимодействием между  $\pi$ -электронами. Однако эффекты, описанные в этих работах, могли бы иметь место лишь при довольно больших значениях интегралов, соответствующих обменному взаимодействию между основаниями, что, по мнению авторов [1, 2], обеспечивалось значительной длиной молекулярной системы<sup>1</sup>.

Если допустить, что все это действительно имеет место, то, очевидно, ферромагнитные свойства ДНК должны были бы проявляться сильнее всего в том случае, когда плоскости оснований ДНК ориентированы перпендикулярно к оси молекулы, так как при этом происходит максимальное перекрывание  $\pi$ -орбит. При изменении ориентации оснований должно происходить уменьшение перекрывания орбит  $\pi$ -электронов, сопровождающееся уменьшением величин соответствующих обменных интегралов. Согласно сделанным нами грубым расчетам, изменение наклона плоскости оснований на  $15^\circ$  должно вызывать уменьшение величины соответствующих обменных интегралов на 15%. Вместе с тем результаты последних исследований инфракрасных спектров ДНК [3] решительно подтвердили тот факт, что в ее натриевых солях основания могут быть расположены либо перпендикулярно к оси молекулы, когда образцы содержат более 40% воды (форма В), или наклонены к направлению оси молекулы под углом не менее  $13^\circ$  при меньшей концентрации воды в ДНК (форма А). Учитывая эти данные, можно сделать вывод, что обменные интегралы должны зависеть от подобных структурных изменений и, следовательно, псевдоферромагнитные свойства ДНК не должны оставаться при этом постоянными. Они должны были бы проявляться наиболее сильно у В-формы ДНК. Это предположение, нуждающееся в некоторых количественных уточнениях, связанных с тем, что исследовалась не сама ДНК, а ее натриевая соль, несомненно, должно подвергнуться тщательной экспериментальной проверке. Указанные особенности поведения молекулы ДНК, конечно, не должны связываться лишь с ее псевдоферромагнитными свойствами. Они должны, по-видимому, проявляться в пьезоэлектрических, ферроэлектрических и даже полупроводниковых свойствах нуклеиновой кислоты. Возможно, наиболее важными являются именно полупроводниковые свойства ДНК. Нам представляется очень интересным вопрос о том, нельзя ли при данном содержании воды

<sup>1</sup> В последнее время вопрос о природе так называемых широких линий парамагнитного резонанса, открытых Л. А. Блюменфельдом, стал предметом очень оживленной дискуссии. Ряд экспериментальных фактов и теоретических соображений привел многих исследователей к заключению, что эти явления связаны не со специфической структурой ДНК, а с наличием в исследуемых объектах некоторого количества железа в ферромагнитной форме. Вопрос в целом нельзя еще считать окончательно решенным. — *Прим. ред.*

в образцах получить более низкие значения энергии активации, чем найденные нами (1,8 эв). Если бы такие опыты увенчались успехом, то это по-новому поставило бы важную проблему о миграции энергии в молекуле ДНК.

В качестве основного вывода (мы надеемся, что это не будет носить излишне спекулятивный характер) хочется предложить следующее: находясь в клетке, ДНК испытывает во время митоза ряд скачкообразных изменений своих физических свойств, обусловленных изменениями молекулярной структуры, вызываемыми различиями в степени ее гидратации. Эти процессы, вероятно, представляяют собой наиболее замечательную черту динамики клетки, что сильно затрудняет понимание механизма процессов митоза, который (это ясно чувствуется) должен тем не менее, по крайней мере частично, в отношении природы действующих здесь сил быть связан с описанной выше картиной.

По-видимому, эти соображения открывают новый подход к исследованию некоторых аспектов этой фундаментальной проблемы. Описанный здесь ряд последовательных превращений ДНК наводит на мысль о возможности существования некоторой универсальной константы, управляющей подобными биологическими процессами на клеточном уровне.

#### РЕЗЮМЕ

В данной статье обсуждаются термические, электрические и магнитные свойства ДНК. Отмечена возможная зависимость этих свойств нуклеиновой кислоты от количества содержащейся в ней воды.

Высказаны предположения о возможной роли этих факторов в процессах, происходящих на протяжении митотического цикла.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блюменфельд Л. А., Биофизика, 4, 515 (1959).
2. Блюменфельд Л. А., Калмансон А. Е., Шень Пей-Жен, ДАН СССР, 124, 1144 (1959).
3. Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R., J. Mol. Biol., 3, 301 (1961).
4. Cardew M. H., Eley D. D., Discussions Faraday Soc., 27, 115 (1959).
5. Douzou P., Francq J., Polonsky J., Sadron Ch., Compt. rend. acad. sci., 251, 976 (1960).
6. Duchesne J., Monfils A., Bull. classe Sci., Acad. roy. Belg., 41, 165 (1955).
7. Duchesne J., Monfils A., J. Chem. Phys., 23, 762 (1955).
8. Duchesne J., Monfils A., Compt. rend. acad. sci., 241, 749 (1955).
9. Duchesne J., Depireux J., Bertinchamps A., Cornet N., van der Kaas J. M., Nature, 188, 405 (1960).
10. Dugdale J. S., MacDonald D. K. C., Phys. Rev., 98, 1751 (1955).
11. Kojima K., Tsukada K., Ogawa S., Shimauchi A., Phys. Rev., 92, 1571 (1953).
12. Kojima K., Tsukada K., Ogawa S., Shimauchi A., Matsu-miya N., J. Phys. Soc. Japan, 10, 265 (1955).
13. Polonsky J., Douzou P., Sadron Ch., Compt. rend. acad. sci., 250, 3414 (1960).
14. Slater J. C., «Introduction to Chemical Physics», McGraw-Hill, New York, 1939.

# ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Д. Э Л И

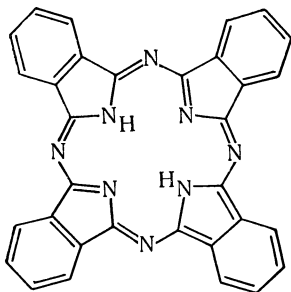
## ВВЕДЕНИЕ

Около 20 лет назад профессор Сцент-Дьёрдьи [99] затронул вопрос об изучении энергетических уровней у соединений, играющих важную роль в биохимии. Целый ряд проблем, связанных, например, с работой фотосинтезирующей единицы хлоропласта [73] или возникновением спектра инактивации уреазы [52], можно интерпретировать, исходя из представлений о фотовозбуждении электрона с переходом его в энергетическую зону, характерную для данной макромолекулы или группы молекул. Такое предположение позволяло объяснить факт проявления действия этих электронов в точках, достаточно удаленных от места первоначального поглощения кванта возбуждающей энергии. В то же время Сцент-Дьёрдьи предположил, что молекулы *фибриллярных* белков могут соединяться друг с другом, образуя непрерывную структуру, по которой могут перемещаться возбужденные электроны, и что такие системы могут соединять нерастворимые окислительные ферменты клетки. Так, Бэкстер и Кэзи [9] показали, что система шерсть — вода (>8% воды) обладает свойством полупроводимости, подчиняющейся закону Ома; энергия активации для этой системы составляет 1,3 эв. Аналогичные результаты были получены для системы шерсть — метиловый спирт и стекло — вода. Было высказано предположение [9], что возникновение зоны проводимости связано с адсорбцией воды на молекулах или поверхностях раздела клеток. Эти работы были опубликованы в тот период, когда автор данной статьи занимался вопросом о роли молекул глобулярных белков в стимуляции действия простетических групп ферментов. Можно было предположить, что такие взаимодействия, как, например, взаимодействие между гемом и глобином в гемоглобине, могут быть связаны с вероятностью перехода электронов между двумя этими частями молекулы.

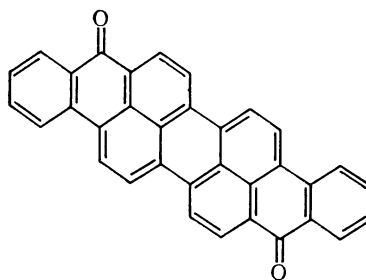
Сначала в Бристольском, а позднее в Ноттингемском университете был проведен целый ряд экспериментов по изучению электрической проводимости органических молекул, связанных с биологической активностью различных веществ. В качестве объектов исследования были выбраны фталоцианин (I) и фталоцианин меди. Эти соединения устойчивы к нагреванию, и их удельное сопротивление не меняется с изменением температуры [22]. Было высказано предположение [9], что перекрывание  $\pi$ -орбит между отдельными молекулами приводит к образованию энергетической зоны, общей для всего кристалла, и что наблюдаемая энергия активации равна половине разности энергий между заполненной основной зоной и незаполненной (свободной) первой возбужденной зоной (полуширине запрещенной

зоны). Эта гипотеза с небольшими изменениями остается в силе и в настоящее время.

Почти одновременно аналогичные результаты для фталоцианина были получены Варганияном [108]. Опубликованные им данные являются итогом целого ряда исследований процесса фотопроводимости ионных красителей (работы лаборатории А. Теренина). Эти исследования привели также к рассмотрению вопроса о темновой проводимости в неионных веществах. Сотрудником той же лаборатории Пуцейко было показано [84], что большинство носителей заряда в обладающем фотопроводимостью фталоцианине имеет положительный знак. Недавно эта работа была рассмотрена Терениным [105]. Сцент-Дьёрдьи [100] описал явления фотопроводимости, обнаруженные на желатине, окрашенной различными ионными красителями. Дальнейшие исследования ионных красителей были произведены Нелсоном [76; см. также 111]. Данные по исследованию фталоцианина и гипотеза о возникновении полупроводимости благодаря наличию в его молекуле сопряженных систем  $\pi$ -электронов были подтверждены в экспериментах с изодибензантроном (II).



(I)



(II)

Для того чтобы установить, что электронная полупроводимость является свойством, характерным для многих органических соединений, потребовалась напряженная исследовательская работа на протяжении ряда последних лет. И тем не менее, как показала Международная конференция по этому вопросу, состоявшаяся в 1960 г., в этой области еще остается много нерешенных и спорных вопросов. На этой конференции большое внимание было уделено электродным эффектам. Однако, хотя эффекты поляризации электродов могут играть решающую роль в случае химически реагирующих иодных электродов [54], можно считать, что для большинства случаев, рассмотренных в данной работе, эти эффекты играют второстепенную роль. (В подтверждение этой точки зрения см. [115].) Здесь мы будем в основном разбирать исследования автора этой статьи; многие другие важные результаты за недостатком места рассматриваться не будут. Будет также сделана попытка выдвинуть последовательную теорию органических полупроводников.

## ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ СВОЙСТВА

### Удельная проводимость

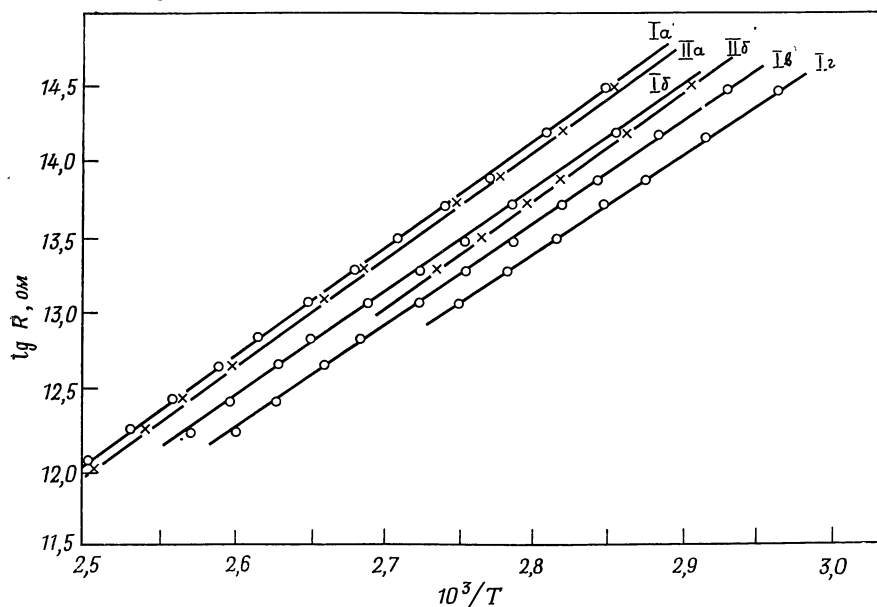
Удельное сопротивление  $\rho$  связано с измеряемым сопротивлением  $R$  соотношением  $\rho = \frac{RAV}{l}$ , где  $A$  — площадь образца,  $l$  — толщина образца, а  $V$  —

коэффициент заполнения, имеющий для порошков значения меньше единицы. Величина удельной проводимости  $k = \frac{1}{\rho}$ .

Под полупроводниками мы подразумеваем такие вещества, у которых зависимость величины удельной проводимости  $k$  или сопротивления  $R$  от температуры может быть представлена в следующем виде:

$$k = k_0 e^{-\frac{\Delta \varepsilon}{2kT}}, \quad R = R_0 e^{\frac{\Delta \varepsilon}{2kT}}, \quad (1)$$

где  $\Delta \varepsilon$  — так называемая ширина запрещенной зоны, или энергетическая щель. Разделение на полупроводники и проводники достаточно произвольно и связано с характеристиками применяющихся приборов, чувствительность



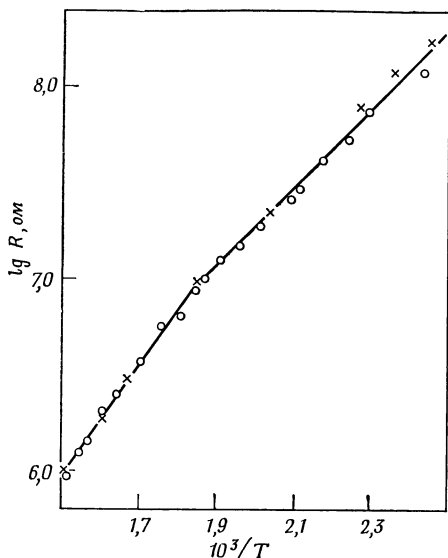
Фиг. 1. Зависимость сопротивления от температуры для типичного случая нативного гемоглобина (1*d*).

Образцы были денатурированы путем нагревания до различных температур: 150° (I*a*), 125° (I*b*), 115° (I*в*), 95° (I*г*), а также путем действия спирта при нагревании: 145° (II*a*), 95° (II*б*).

которых практически позволяет измерять значения  $k > 10^{-16} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Большинство измерений было проведено при пропускании постоянного тока через образцы, плотно запрессованные между электродами, чтобы исключить вклад в сопротивление, обусловленный контактами между отдельными частицами. Влияние этих контактов можно также исключить, проводя измерения при переменном токе высокой частоты. Эти методы дают возможность измерять значения  $k \geq 10^{-9} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . При проведении параллельных измерений с помощью обоих методов для ширины запрещенной зоны  $\Delta \varepsilon$  получались близкие значения. Однако при этих же измерениях значения между величинами предэкспоненциального множителя  $k_0$  в выражении (1) иногда имелись расхождения. Измерения, проведенные на монокристаллах и спрессованных порошках, дали близкие значения величины  $\Delta \varepsilon$ . Проводимость белков и нуклеиновых кислот в сухом состоянии слишком мала для того, чтобы ее можно было определять с помощью переменного тока; обычно при изучении этих объектов использовался постоянный ток.



На фиг. 1 показана зависимость сопротивления от температуры для гемоглобина на различных стадиях денатурации [27]. Этот пример может служить иллюстрацией к данным, изложенным выше.



Фиг. 2. Изменение величины полупроводимости с температурой от примесной до присущей чистому веществу (фталоцианин).

высокой степенью достоверности, в частности для органических примесей в полициклических углеводородах [78].

Для того чтобы получить истинное значение величины  $\Delta\varepsilon$  для нативных белков в сухом состоянии, нельзя нагревать образец выше чем до  $100^\circ$ . Однако влияние денатурации на величину  $\Delta\varepsilon$  оказалось малым ( $\Delta\varepsilon$  возрастает лишь от 2,63 до 2,88 эв).

В выражении (1) подразумевается, что для данного вещества выполняется закон Ома, что вполне справедливо при напряженности электрического поля выше  $100 \text{ в}\cdot\text{см}^{-1}$ .

В тех случаях, когда проводимость обусловлена наличием примесей, были обнаружены (как и для неорганических кристаллов) изменения величины  $\Delta\varepsilon$  от малых значений при низкой температуре до больших при высокой температуре<sup>1</sup>. Пример, приведенный на фиг. 2, характерен для предполагаемых металлических примесей во фталоцианине [26], а сам эффект был обнаружен с достаточно

Таблица 1

Значения  $\Delta\varepsilon$  и  $\lg k_0$  для ряда органических полупроводников\*

Вещество	$\Delta\varepsilon$ , эв	$\lg k_0$ , ом <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>
Дифенилпикрилгидрозил . . .	0,26	$\bar{6}$ ,1
Диметиланилинброманиловый комплекс . . . . .	0,45	$\bar{6}$ ,7
Изодинбензантрон . . . . .	0,96	2,3
Фталоцианин . . . . .	1,49	0,9
Гем . . . . .	1,74	$\bar{2}$ ,8
Нуклеиновая кислота из тимуса	2,44	3,45
Антрацен [50] . . . . .	2,7	2,0
Гемоглобин . . . . .	2,75	4,6
Полиглицин . . . . .	2,99	6,3

\* Все вещества изучались в сухом виде под вакуумом.

<sup>1</sup> В первом случае (низкие температуры) проводимость обусловлена в основном примесями и измеренное значение  $\Delta\varepsilon$  дает разность энергий между полосой проводимости и примесным уровнем; во втором случае (высокие температуры) влияние примесей незначительно и мы измеряем собственную проводимость вещества.  $\Delta\varepsilon$  в этом случае представляет собой разность энергий между полосой проводимости и заполненной зоной (основной полосой).— Прим. ред.

В работе Гарретта [41] собраны все опубликованные до 1959 г. значения величин  $\Delta\varepsilon$  и  $k_0$ . Значения величин, приведенные в табл. 1, иллюстрируют наиболее характерные особенности, обнаруженные для основных групп веществ (все данные, за исключением данных по исследованию антрацена, взяты из работ, выполненных в Ноттингеме) [23]. Некоторые сомнения вызывают лишь значения, полученные для антрацена. Точность измерений величины  $\Delta\varepsilon$  составляет во многих случаях  $\pm 0,05$  эв, но определение с такой же степенью точности  $\lg k_0$  остается задачей дальнейших работ. Рассмотрим модель процесса полупроводимости в органических соединениях, на основе которой можно будет обсудить эти экспериментальные данные.

### Перенос электронов в кристаллах

Риль [86, 87] рассмотрел два типа затрат энергии: энергию  $\Delta\varepsilon_1$ , необходимую для переноса электрона от данной молекулы к ее ближайшему соседу в кристаллической решетке, и энергию  $\Delta\varepsilon_2$ , требующуюся для переноса электрона из данной молекулы в удаленную точку кристаллической решетки. Лайонс [66], более подробно проанализировавший возможные процессы переноса электронов, предложил для определения этих значений энергии следующие соотношения:

$$\Delta\varepsilon_1 = I - A - \frac{e^2}{r} - P \cdot \mu$$

$$\Delta\varepsilon_2 = I - A - 2P_i,$$

где  $I$  — потенциал ионизации;  $A$  — энергия электронного сродства молекулы в вакууме;  $\frac{e^2}{r}$  — энергия кулоновского взаимодействия ионной пары;  $P \cdot \mu$  — поляризация кристалла, обусловленная наличием ионной пары, и, наконец,  $2P_i$  — поляризация кристалла, обусловленная присутствием двух отдельных ионов. Расчеты Лайонса, выполненные для антрацена, дали значения  $\Delta\varepsilon_1 = 2,2$  эв и  $\Delta\varepsilon_2 = 3,8$  эв. Последнее значение энергии должно соответствовать значению  $\Delta\varepsilon$ , определенному из экспериментальных данных. Однако на практике получались меньшие значения: 2,7 эв [50] и 1,95 эв [77]. Были сделаны по крайней мере три попытки согласовать рассчитанные значения  $\Delta\varepsilon_2$  с экспериментальными значениями величины  $\Delta\varepsilon$ . Лайонс предположил, что электрон захватывается ловушкой, что обуславливает введение дополнительного отрицательного члена в выражение для  $\Delta\varepsilon_2$  и является причиной того, что обычно обнаруживаемая фотопроводимость антрацена относится к  $p$ -типу. Фокс [39] полагает, что Лайонс недооценил значение энергии поляризации, и указывает, что истинную величину  $\Delta\varepsilon_2$  можно получить, рассчитывая эту величину для узкой полосы на основе квантовомеханических соображений. Нортроп [77] отмечал, что если величина  $I - A = {}^1E_1$  есть энергия синглет — синглетного перехода, обуславливающего основную полосу, то рассчитанные значения разности энергий согласуются с экспериментальными данными. Такое допущение является лишь грубым приближением; в случае антрацена, например, оно дает ошибку в 2,5 эв. Однако нет сомнения, что для больших молекул это допущение гораздо более оправданно. Автор настоящей статьи принял аналогичное допущение при создании своей модели.

В своих работах автор постоянно применяет модель потенциального ящика, на основе которой удается получить очень хорошее совпадение экспериментальных и теоретических данных. Однако в выражении для разности энергий он пренебрегает кулоновским (за исключением случая

комплексов донор — акцептор) и поляризационным членами. Прежде чем описывать эту модель, стоит рассмотреть эти приближения в связи с расчетами величины  $\Delta\epsilon_1$  для ионной пары. Рассмотрим молекулу, содержащую  $n$   $\pi$ -электронов, и, обозначив диэлектрическую проницаемость буквой  $D$ , примем: 1) что энергия электронного сродства молекул  $A$  равна энергии самого нижнего незанятого уровня нейтральной молекулы (в действительности она должна быть заряжена отрицательно), находящейся в основном состоянии, т. е.  $(E \frac{n}{2} + 1)$ , и 2) что кулоновским членом  $\frac{e^2}{r}$  (или  $\frac{e^2}{Dr}$ ) и поляризационным членом  $P\mu$ , входящими в выражение для разности энергий, можно пренебречь.

Для антрацена ошибка, связанная с отождествлением энергии электронного сродства с величиной  $E(\frac{n}{2} + 1)$ , составляет  $-2,5$  эв, а из-за пренебрежения кулоновским и поляризационным членами в выражении для разности энергий она составляет  $+3,4$  эв (при  $D=1$ ) или  $1,8$  эв (при  $D=2,29$ ). Не совсем ясно, какое значение величины  $D$  должно быть взято для расчета, однако в направлении оси  $c$  нужно, по-видимому, брать значение  $2,29$  эв, так как весьма вероятно, что заряды разделены двумя бензольными кольцами. Приведенные выше расчеты относятся к случаям межионных расстояний порядка  $5,23$  Å [66], но не исключено, что в направлении оси  $c$  эти расстояния могут быть много больше. Во всяком случае, существенно то обстоятельство, что ошибки имеют тенденцию к взаимной компенсации и для больших молекул (фталоцианин, изодибензантрон) предствление величины разности энергий в виде

$$\Delta\epsilon_2 = I - A = - \left[ E \left( \frac{n}{2} \right) - E \left( \frac{n}{2} + 1 \right) \right]$$

не может приводить к слишком большим ошибкам.

### Модель потенциального ящика (электронного газа)

На основе этой модели, предложенной Бэйлисом, Симпсоном и др., удалось достичь значительных успехов в объяснении спектроскопических свойств молекул с сопряженными связями [44]. Рассмотрим молекулу, содержащую четное число  $n$   $\pi$ -электронов, заключенных в одномерный ящик длины  $l$ . В случае полиаценов эти  $n$   $\pi$ -электронов распределены вдоль «периметра» общей протяженностью  $l = nd$ , где  $d$  — длина ароматической C—C-связи. Эта структура может быть либо открытой, либо изогнутой и образующей замкнутое кольцо, которое иногда называют «моделью бублика». В любом случае задача сводится к нахождению энергетических уровней электрона, находящегося внутри потенциального ящика, как это схематически показано на фиг. 3,  $A$  для  $n=6$  (бензол или гексатриен). Предполагая, что мы имеем дело с электронным газом, можно рассчитать энергетические уровни и определить энергию  $\Delta\epsilon$ , необходимую для перевода электрона с самого верхнего заполненного уровня с номером  $n/2$  на самый нижний незаполненный  $(\frac{n}{2} + 1)$ -й уровень. Величину  $\Delta\epsilon$  можно представить в следующем виде:

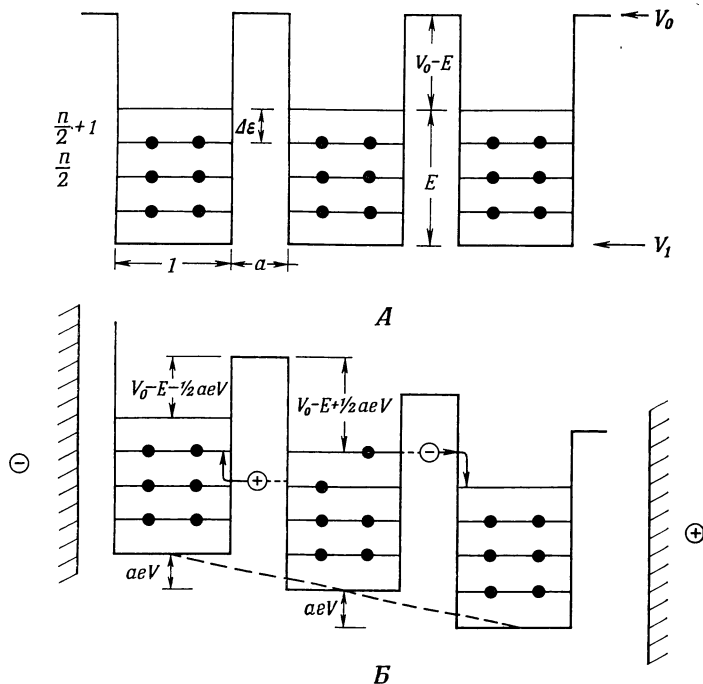
$$\Delta\epsilon = \frac{h^2}{8m_e l^2} (n+1) = \frac{h^2}{8m_e d^2} \frac{n+1}{n^2}$$

для открытой структуры и

$$\Delta\epsilon = \frac{h^2}{4m_e l^2} n = \frac{h^2}{4m_e d^2} \frac{1}{n}$$

для замкнутого кольца, где  $m_e$  — эффективная масса электрона.

Если электроны имеют антипараллельные спины, то  $\Delta\varepsilon = {}^1E_1$  есть энергия, соответствующая синглет — синглетному переходу в основной полосе поглощения молекулы. Если электроны обладают параллельными спинами, то  $\Delta\varepsilon = {}^3E_1$  есть энергия синглет — триплетного (оптически запрещенного) перехода. Модель электронного газа не позволяет энергетически различать два эти состояния, однако практически энергия синглет — триплетного перехода всегда значительно меньше, чем энергия синглет — синглетного



Фиг. 3. Потенциальный ящик, или модель проникновения электронов через потенциальный барьер посредством туннельного эффекта.

Параметры барьера: ширина —  $a$ , высота —  $V_0 - E$ . Объяснение см. в тексте.

перехода. Такой возбужденный электрон может посредством туннельного эффекта переходить через межмолекулярный потенциальный барьер на соответствующий незанятый уровень следующей молекулы, создавая таким образом пару ионов. При этом энергия  $\Delta\varepsilon$  в рассматриваемом приближении равна величине  $\Delta\varepsilon_1$  (см. предыдущий раздел). Перенос электрона будет осуществляться преимущественно в направлении приложенного поля напряженностью  $V \text{ в} \cdot \text{см}^{-1}$ , которое создает на один электрон перепад потенциальной энергии между молекулами, равный в расчете на 1 электрон  $aeV$ . Схематическая картина влияния приложенного потенциала представлена на фиг. 3, Б. Одновременно вакансия на свободном энергетическом уровне в центральной молекуле может быть заполнена электроном из молекулы, расположенной с левой стороны, что эквивалентно движению положительной дырки в противоположном направлении.

В первом расчете данной модели [26] предполагалось, что взаимодействие между возбужденными  $\left(\frac{n}{2} + 1\right)$ -уровнями достаточно велико для образования энергетической зоны. В настоящее время установлено, что хотя формально это и может иметь место, однако энергетическая зона должна быть

при этом очень узкой, и наиболее правильный путь решения задачи о движении зарядов сводится к рассмотрению вопроса о возможности проникновения электронов (и дырок) через межмолекулярные барьеры посредством туннельного эффекта [31]. Общая сила тока в этом случае может быть представлена в виде

$$i = e (n_e v_{de} + n_h v_{dh}),$$

где  $n_e$  — число возбужденных электронов на  $1 \text{ см}^3$ ,  $v_{de}$  — скорость их движения, определяемая величиной напряженности приложенного поля,  $n_h$  и  $v_{dh}$  — те же величины для дырок, а  $e$  — заряд электрона. Принимая для равновесия электронов и дырок выражение

$$n_e = n_h = AT^{3/2} (m_e m_h)^{3/4} \exp\left(-\frac{\Delta \epsilon}{2kT}\right),$$

которое дает зонная теория, и приравнивая скорости  $v_{de}$  и  $v_{dh}$ , получаем для силы тока выражение

$$i = 2ev_{de}AT^{3/2} (m_e m_h)^{3/4} \exp\left(-\frac{\Delta \epsilon}{2kT}\right) a \cdot \text{см}^{-2}.$$

Скорость движения  $v_{de}$  теперь можно рассчитать как произведение частоты столкновений электронов с барьером на разность вероятностей перехода электрона через барьер в направлении вдоль и против поля. Результат может быть представлен в следующем виде:

$$i = A \sin hbv \exp\left(-\frac{\Delta \epsilon}{2kT}\right),$$

где  $A$  — член, учитывающий параметры барьера, указанные на фиг. 3, эффективные массы носителей заряда и температуру. При низких напряжениях зависимость тока от напряжения становится линейной, и при постоянной температуре выполняется закон Ома.

$$i = AbV \exp\left(-\frac{\Delta \epsilon}{2kT}\right),$$

так что

$$k = \frac{i}{V} = Ab \exp\left(-\frac{\Delta \epsilon}{2kT}\right)$$

и

$$k_0 = Ab \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-1}.$$

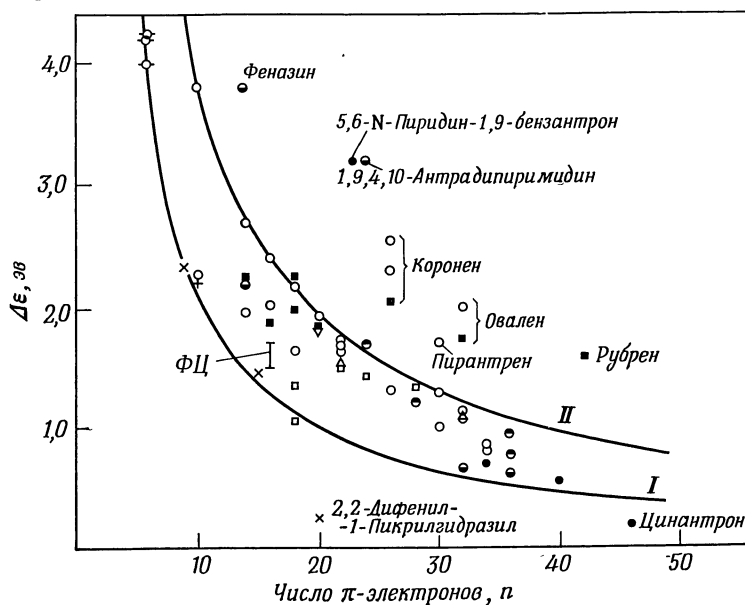
### Запрещенная зона

На фиг. 4 показана зависимость величины  $\Delta \epsilon$  от общего числа  $\pi$ -электронов молекулы. Исключением является случай молекулы фталоцианина, для которой в соответствии с известной сопряженной структурой [64]  $n$  принято равным 16. Это исправленный вариант полученной ранее зависимости [26], который содержит ряд дополнительных данных. Большинство экспериментальных точек располагается на графике между двумя линиями, соответствующими замкнутой и открытой сопряженным структурам.

Некоторые отмеченные на графике точки лежат заведомо вне этой области. Так, едва ли можно сомневаться в том, что значения  $\Delta \epsilon$ , приведенные на фиг. 4 для коронена (по данным трех авторов) и для овалена (по данным двух авторов), не укладываются между линиями двух графиков. Достоверность других точек недостаточна, и желательно дальнейшее исследование этих соединений. При проведении любого определения величины  $\Delta \epsilon$

следует обратить внимание на ряд факторов, могущих исказить результаты измерений.

1. П р и м е с и. Укажем, например, что наличие на поверхности антрацена следов антрахинона увеличивает его фотопроводимость [12]. Для единичных кристаллов антрацена были получены значения  $\Delta\varepsilon=2,7 \text{ эв}$  [50] и  $1,95 \text{ эв}$  [77]. Эти расхождения могут быть отнесены за счет неодинаковой чистоты препаратов.



Фиг. 4. Зависимость разности энергий  $\Delta E$  от числа сопряженных  $\pi$ -электронов в молекуле.

Расчеты проведены для открытой (I) и закрытой (II) структур с сопряженными связями. Точки на графике соответствуют экспериментальным данным:  $\circ$  — полиацены;  $\ominus$  — присутствуют атомы N;  $\bullet$  — присутствуют атомы O;  $\odot$  — присутствуют атомы N и O;  $\square$  — катيونные красители;  $\blacksquare$  — данные из работ Вилка;  $\times$  — три свободных радикала в твердом состоянии;  $\triangle$  — каротин (Розенберг);  $\nabla$  — порфирины;  $+$  — дипирромитин (присутствуют атомы Br);  $\ominus$  — фталевый ангидрид, *p*-диоксбензол и  $\beta$ -резорцин [116, 117, 118]. ФЦ — фталоцианин [23].

2. Д е ф е к т ы с т р у к т у р ы. Афтергут и Браун [1] получили для феназина значения  $\Delta\varepsilon=2,1 \text{ эв}$  в случае образцов, подвергавшихся зонной очистке, тогда как для образцов, очищенных путем возгонки, было получено значение  $\Delta\varepsilon=3,8 \text{ эв}$ . Эти отклонения они приписывают различиям в дефектах структуры.

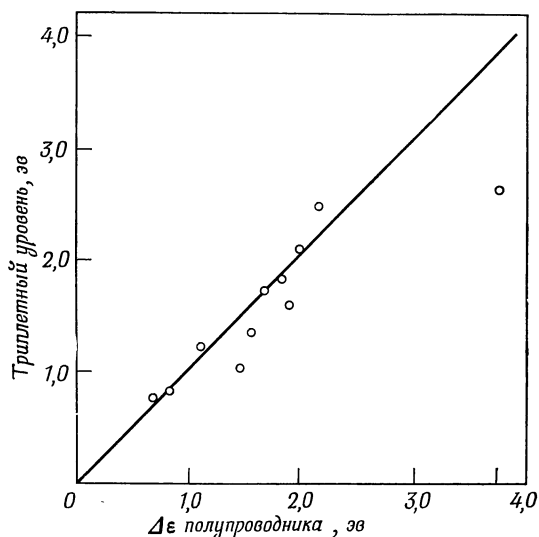
3. Ф а к т о р, у ч и т ы в а ю щ и й р а с п о л о ж е н и е п л о с к о с т е й р е ш е т к и. Проводимость антрацена в трех основных направлениях различна [58, 72]. В связи с этим полиморфные формы фталоцианина ведут себя по-разному [26, 113].

4. Ф о р м а о б р а з ц а (е д и н и ч н ы е к р и с т а л л ы, п о л и к р и с т а л л ы, п л е н к и, п о л у ч е н н ы е и с п а р е н и е м). Значения разности энергий для этих образцов обычно находятся в хорошем согласии, в значениях же величины  $k_0$  были отмечены некоторые расхождения [77].

5. М е т о д и з м е р е н и я. Значения разности энергий, полученные при измерении на постоянном токе с образцами, запрессованными между электродами, и при измерении на переменном токе [26], обычно хорошо согласуются друг с другом. При измерениях на переменном токе часто получают

несколько меньшее значение величины удельного сопротивления, чем при измерении на постоянном токе при  $20^\circ$ . Например, для комплексов с переносом заряда отношение полученных значений  $\rho$  может изменяться от 1,5 до 150 [33]; для 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила [25] это отношение равно примерно 100. Этот вопрос сейчас изучается, и можно думать, что в случае переменного тока существует путь проводимости, локализованный в ограниченном числе молекул. Вартанян [105] получил хорошее совпадение величин  $\Delta\varepsilon$ , определенных из данных по теплопроводности и фотопроводности.

Было предпринято несколько попыток сопоставить точно известные энергетические уровни молекул с величинами разности энергий  $\Delta\varepsilon$ . Так,



Фиг. 5. Зависимость экспериментальных значений величины  $\Delta\varepsilon$  от энергии первого триплетного возбужденного состояния для одиннадцати полиаценов.

сначала было предпринято сравнение энергий оптических переходов в растворах со значениями энергетического разрыва между зонами в кристаллическом состоянии [32]. Для антрацена разности энергетических уровней молекулы равны  $3,33$  эв, тогда как  $\Delta\varepsilon = 1,65$  эв, для фталоцианина оптический период соответствует энергии  $1,75$  эв (а  $\Delta\varepsilon$  имеет значение от  $0,86$  до  $1,13$  эв). Было высказано предположение о том, что полоса проводимости соответствует первому возбужденному синглетному уровню молекулы, уширенному в результате взаимодействий в твердой фазе. Между тем спектры поглощения в твердой фазе и в растворе отличаются очень незначительно, так что эти предполагаемые взаимодействия должны быть также малы [55]. Однако во многих случаях полоса проводимости лежит энергетически ниже первого возбужденного синглетного уровня, поэтому некоторые авторы полагают, что в создании полосы проводимости участвует первый триплетный уровень [16, 79, 104]. Совпадение величин  $\Delta\varepsilon$  и  ${}^3E_1$  для ряда полиаценов вполне удовлетворительно [66, 114] (фиг. 5). Но наряду с этим имеется также и случай хорошего совпадения между значениями величин  $\Delta\varepsilon$  и  ${}^1E_1$  [77, 114]. В частности, такое хорошее совпадение величин  $\Delta\varepsilon$  и  ${}^1E_1$  удается наблюдать в случае фталоцианинов, если взять исправленное значение  $\Delta\varepsilon$  [38]. Отмеченные выше различия возникают, по всей вероятности, вследствие того, что для фталоцианинов принимали чересчур низкое значение величины  $\Delta\varepsilon$  (правильное значение этой величины составляет  $1,5$ — $1,7$  эв) [23].

Хорошее совпадение между величинами  $\Delta\epsilon$  и  ${}^1E_1$  было также обнаружено для порфиринов [30]. Другим веществом, для которого  $\Delta\epsilon$  может быть равно  ${}^1E_1$ , является дифенилоктатетраен; его темновая проводимость не могла быть измерена в 1953 г. Для этого вещества  ${}^1E_1 = 3,3 \text{ эв}$ . Правда, в настоящее время трудно понять результат, полученный для этого полиена, так как, исходя из фиг. 4, для 20  $\pi$ -электронов следовало бы ожидать значения  $\Delta\epsilon = 1,5 \pm 0,5 \text{ эв}$ , и действительно,  $\beta$ -каротин с 22  $\pi$ -электронами дает значение  $\Delta\epsilon = 1,5 \text{ эв}$  [90]. При построении графиков фиг. 4 практически были исключены все соединения, содержащие дополнительную фенильную группу (за исключением рубрена), так как представляется маловероятным, что фенильная группа может быть полностью сопряжена как с цепью полиена (как в дифенилоктатетраене), так и с полиаценом (как в рубрене или дифенилантраcene) [114]. Значения  $\Delta\epsilon$ , вычисленные исходя из полного числа  $\pi$ -электронов, гораздо меньше значений, определенных экспериментально. Мы считаем, что в дифенилоктатетраене определяющая сопряженная структура представляет собой открытую цепь с восемью  $\pi$ -электронами, для которой предполагаемое значение величины  $\Delta\epsilon$  составляет примерно 2,8 эв. Современная экспериментальная техника уже дает возможность непосредственно измерить эту величину.

Возвращаясь снова к фиг. 4, следует отметить, что Эпштейн и Вильди [34] нашли для полимеризованного фталоцианина меди, содержащего 140  $\pi$ -электронов, значение  $\Delta\epsilon = 0,25 \text{ эв}$ . Эта величина хорошо согласуется со значением 0,2 эв, полученным из графика.

### Закон Ома и $k_0$

Отклонения от закона Ома тесно связаны с изменениями величины  $k_0$ , так как в выражение для суммарной силы тока входит величина  $bV$ , а в выражение для удельной проводимости — величина  $Ab$ . Мы предполагаем, что  $\sin hbV$  равен приблизительно  $bV$  вплоть до значения  $bV = 0,3$ , при котором эти две величины отличаются друг от друга всего лишь на 1,3%. Теория туннельного эффекта позволяет определить параметр  $b$ . Исходя из наиболее типичных и характерных значений молекулярных величин, было предсказано, что закон Ома должен выполняться с достаточно высокой степенью точности вплоть до значений напряженности внешнего электрического поля  $V \cong 5 \cdot 10^7 \text{ в} \cdot \text{см}^{-1}$ . Однако у большинства веществ, исследованных в лаборатории автора как в виде пленок, так и в поликристаллическом виде, отклонения от закона Ома наблюдались уже при значениях напряженности поля порядка  $10^8 \text{ в} \cdot \text{см}^{-1}$ . Эли и Виллис [31] предположили, что эти отклонения обусловлены туннельным проникновением электронов через *межкристаллические* барьеры, а не через межмолекулярные. Тот факт, что для единичных кристаллов и для порошков фталоцианина было получено одно и то же значение величины  $k_0$ , противоречил этому предположению. Действительно, отклонения от закона Ома показывают, что существует систематическая корреляция между этими отклонениями и химической природой веществ, проявляющаяся в том, что у белков с большими значениями  $\Delta\epsilon$  отклонения невелики, а по мере уменьшения величины  $\Delta\epsilon$  они систематически возрастают и становятся значительными для комплексов с переносом заряда и для 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила. Однако предсказания гипотезы Эли и Виллиса вполне подтверждаются в случае антрацена, единичные кристаллы которого характеризуются большим значением величины  $k_0$  и у которого не наблюдается заметных отклонений от закона Ома вплоть до значений напряженности электрического поля, равных



$10^5 \text{ в} \cdot \text{см}^{-1}$  [77]. Единичные кристаллы, используемые в этих опытах, выращивались непосредственно на электродах.

### Подвижность

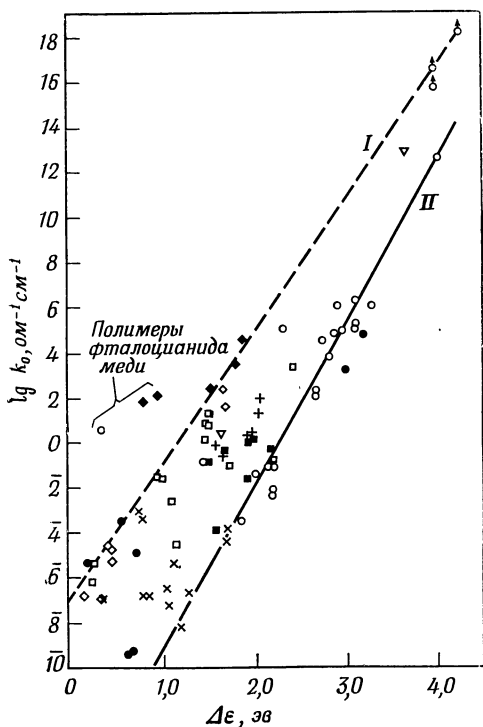
Эли и Парфит [26] предприняли попытку рассмотреть вопрос о подвижности носителей заряда, исходя из уравнения для полупроводников, даваемого зонной теорией [74]:

$$k_0 = \frac{2(\pi m k T)^{3/2}}{h^3} e \mu = 4\mu \quad (20^\circ),$$

где  $\mu$  — подвижность электронов и дырок. Это уравнение дает для 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила значение  $\mu = 10^{-6} \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ , для изодибензантрона  $\mu = 10^{-2}$  и для фталоцианина  $\mu = 2$ . Мэни, Гарник и Герлих [68],

исходя почти из тех же предположений, определили значения величины  $\mu$  для 29 соединений, основываясь главным образом на данных Акамату и Инокути [2, 3, 4] по полиаценам. Они нашли, что значение величины  $\mu$  изменяется от  $10^{-12}$  до  $10^{11}$  в соответствии с возрастанием значений  $\Delta \epsilon$ . Этот результат они связали с туннельным проникновением электронов через потенциальный энергетический барьер.

Обозначим через  $\mu_{fe}$  (подвижность свободных электронов) значения подвижности, рассчитанные из теоретических уравнений для удельной проводимости  $k_0$ , в предположении, что  $m$  — масса свободного электрона. Законность такого предположения не очевидна, так как зонная теория дает для очень узких энергетических зон, с которыми мы имеем дело в случае молекулярных кристаллов, значительно большие значения эффективной массы электрона. Описанная выше теория туннельного эффекта связывает величину  $\mu$  с размерами барьера; пользуясь наиболее типичными значениями размеров молекул, мы получили значения



Фиг. 6. Зависимость  $k_0$  от  $\Delta \epsilon$  по экспериментальным данным.

I — для комплексов с переносом заряда и фталоцианинов; II — для белков и аминокислот.

удельной проводимости  $k_0$  в интервале от  $10^{-3}$  до  $10^{-1}$  [31]. Отметим, что значения подвижности носителей заряда для антрацена, определенные независимо от значения массы  $m$  при импульсных измерениях фотопроводимости, оказались величинами одного и того же порядка (от  $0,3$  до  $3 \text{ см}^2 \text{ в}^{-1}$ ) [58, 63].

Для полимеризованного фталоцианина меди величина холловской подвижности оказалась равной  $10 \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ . Весьма возможно, что в полимерах удастся обнаружить и более высокие значения подвижности носителей заряда, так как межмолекулярные потенциальные барьеры в молекулах

полимеров будут встречаться реже, чем у полиаценов. Автор считает, что дальнейшее исследование вопроса о холловской подвижности является совершенно необходимым.

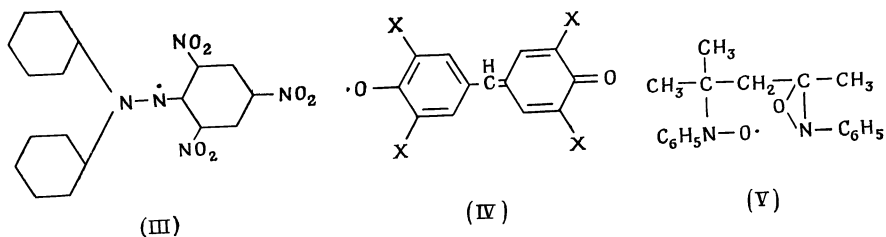
В заключение приведем несколько измененный вариант графика (фиг. 6) [26]. На фиг. 6 показана зависимость между величинами  $k_0$  и  $\Delta\varepsilon$  (по известным литературным данным). Правая граница полосы, изображенной на графике, определена из данных, полученных для аминокислот. Левая граница определена главным образом на основании данных для фталоцианинов и комплексов с переносом заряда. Разброс точек на графике может частично объясняться различиями в степени кристалличности вещества или разной концентрацией дефектов структуры, что, как известно, влияет на величину удельной проводимости  $k_0$ . Однако две крайние линии могут достаточно хорошо соответствовать различным формам межмолекулярных потенциальных барьеров, которыми определяется вероятность туннельного проникновения. Три точки при  $\Delta\varepsilon < 1,0$  эв, лежащие значительно выше штриховой линии, соответствуют полимерам фталоцианида [34, 36]. Это говорит о том, что даже в тех случаях, когда  $\Delta\varepsilon$  мало, возбужденные  $\pi$ -электроны обширной сопряженной системы могут обладать высокой подвижностью, что проявляется в высокой удельной проводимости  $k_0$  этих веществ. Все это говорит в пользу нашего объяснения высоких значений величины  $k_0$  для белков, которые характеризуются также большими значениями ширины запрещенной зоны. В белках электроны перемещаются по обширной системе сопряженных водородных связей [27].

## НЕКОТОРЫЕ ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ

### Свободные радикалы в твердом состоянии

Исходя из теории потенциального ящика, можно предсказать, что у свободных радикалов в твердом состоянии, у которых самая верхняя заполненная молекулярная орбита имеет только один электрон, ширина запрещенной зоны  $\Delta\varepsilon$  должна быть либо очень мала, либо равняться нулю. Это возможно в том случае, если электрон может в результате туннельного эффекта переходить от одной молекулы к другой без возбуждения (мы не учитываем возможное кулоновское взаимодействие зарядов). Это предсказание было проверено и подтверждено на примере дифенилпикрилгидрозила (III). Для того чтобы получить достоверное значение ширины запрещенной зоны ( $0,26 \pm 0,10$  эв) [25, 26], необходимо было подвергнуть дифенилпикрилгидрозил многократной перекристаллизации из диэтилового эфира. Исходя из данных, приведенных на фиг. 4, можно ожидать, что значение  $\Delta\varepsilon$  для молекулы с 20  $\pi$ -электронами равно  $1,5-0,5$  эв. Эксперимент же дает более низкое значение; это, вероятно, обусловлено остаточной энергией кулоновского взаимодействия. Недавно аналогичные исследования были проведены еще с двумя свободными радикалами, однако их поведение оказалось существенно иным [31]. Для радикала (IV) значение  $\Delta\varepsilon = 1,45$  эв, а для радикала (V)  $\Delta\varepsilon = 2,31$  эв. Эти величины примерно соответствуют значению оптического порога, определенного спектрофотометрически в твердом состоянии. Очевидно, в этих случаях необходимо перевести электрон посредством возбуждения на более высокий энергетический уровень, т. е. перевести его из основного дублетного состояния в первое возбужденное состояние для того, чтобы увеличить вероятность его туннельного проникновения через неблагоприятный межмолекулярный барьер. Данная работа, а также исследование  $\alpha$ - и  $\beta$ -фталоцианина наводят на мысль о возможности

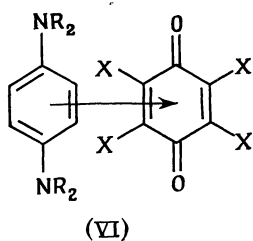
влияния упаковки молекул на межмолекулярный потенциальный барьер. Эта упаковка молекул облегчает туннельный эффект на основном уровне в случае дифенилпикрилгидразила, но менее благоприятна в случае двух других исследованных радикалов.



### Комплексы с переносом заряда

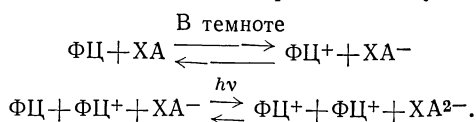
Комплексы с переносом заряда обладают полупроводниковыми свойствами, и в первом приближении их можно разделить на два класса: комплексы неорганических веществ с органическими и комплексы органических веществ с органическими. К первому классу относятся комплексы антрацена со щелочными металлами [47, 95]. Эти комплексы имеют переменный состав от  $M_1An$  до  $M_2An$  и характеризуются типичными значениями ширины запрещенной зоны 2,68 эв для  $Li_{1,16}An$ , 2,40 эв для  $Na_{1,08}An$  и 2,20 эв для  $K_{1,18}An$ . Если мы примем, что значение  $\Delta\varepsilon$  для самого антрацена равно 2,7 эв [50], то можно считать, что щелочные атомы образуют донорные уровни непосредственно над верхней границей «валентной зоны». Аналогичные результаты были получены и для комплексов с бензохинолином. Измерения плотности обнаружили в этих комплексах наличие некоторой электрострикции, что указывает на высокую степень ионизации атомов Na в антрацене.

Поразительные результаты были также получены при изучении комплексов полиаценов с молекулами галогенов [5]. Были обнаружены очень высокие значения проводимости и низкие значения  $\Delta\varepsilon$ —от 0,1 до 0,2 эв. Однако эти комплексы проявляли неустойчивость к действию некоторых химических агентов. Коммандер и Зингер [60] детально исследовали комплексы пирен- $2I_2$  и 2 перилен- $3I_2$  и, изучая эффект Холла для этих соединений, определили, что максимальное значение подвижности носителей заряда не превышает  $10^{-2} \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ . Они нашли, что концентрация электронов с ориентированными спинами, определенная из опытов по электронному парамагнитному резонансу (ЭПР), имеет ту же зависимость от температуры, что и проводимость. Это свидетельствует о том, что сигнал ЭПР возникает благодаря наличию носителей заряда. Однако в системах индол- $I_2$  [96] и каротин- $I_3$  [48] подобное соответствие не было обнаружено, так что вопрос еще остается открытым.



Имеется множество различных типов органических донорно-акцепторных комплексов (т. е. комплексов, в которых как донор, так и акцептор являются органическими соединениями) — от ковалентных до ионных [75]. Вероятность ионизации в таких комплексах была впервые рассмотрена Вейсом [112]. Концентрация электронов с ориентированными спинами в них меняется в довольно широких пределах, причем комплексы, имеющие наиболее ярко выраженную ионную структуру, как правило, обладают более высокой спиновой концентрацией [53]. Было исследовано шесть 1:1 комплексов, в которых донорами служили диметиланилин (ДМА) и тетраметилпарафенилендиамин (ТМПД), а акцепторами — три тетрагалогидозамещенных (Cl, Br и I) парахинона (см. формулу VI) [33]. Эти комплексы были рассмотрены в качестве примера чередующихся донорных и акцепторных молекул, наложенных одна на другую так, что их молекулярные плоскости параллельны, как в стопке монет [110].

Комплексы, имеющие в своем составе сильный донор ТМПД, дают сигнал ЭПР и обладают значительно большей проводимостью, чем комплексы, содержащие ДМА, у которых сигнал ЭПР отсутствует. Однако в ряду комплексов, содержащих ТМПД, порядок возрастания проводимости — ТМПД-иоданил (20) < ТМПД-броманил (2) < ТМПД-хлоранил (0,2) — явно противоположен порядку возрастания концентрации свободных радикалов, указанной в скобках. Комплексы, содержащие ДМА, обладают низкой проводимостью и имеют меньшие значения  $\Delta\varepsilon$ . Исходя из этого, можно предположить, что межмолекулярные потенциальные барьеры таких комплексов менее проницаемы, чем потенциальные барьеры комплексов, содержащих ТМПД. Поведение комплексов с ТМПД также заметно отличалось от того, которое следует из закона Ома, что указывает на возможность различий в размерах потенциальных барьеров. Более того, во время как изменение температуры оказывает заметное влияние на величину проводимости и дает значение  $\Delta\varepsilon \approx 0,5 \text{ эв}$ , оно не влияет на величину сигнала ЭПР. В настоящее время имеются данные по 23 комплексам такого типа [61]. Кальвин и его коллеги [57, 107] воспользовались представлением о донорно-акцепторных комплексах для изучения чередующихся слоев, образованных путем выпаривания растворов *o*-хлоранила (ХА) на слоях, например, фталоцианина (ФЦ). Они обнаружили возрастание темновой проводимости в  $10^7$  раз, а проводимости при стационарном подсвечивании в  $10^5$  раз. Эти изменения были приписаны следующим переносам электронов между слоями:



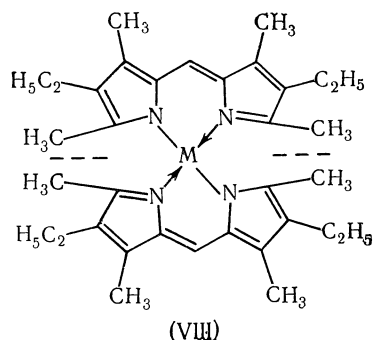
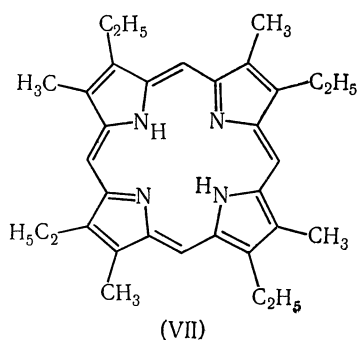
В обоих случаях принималось, что носителями заряда во фталоцианине являются положительные дырки. Первая реакция приводит к увеличению сигнала ЭПР (связанному с образованием  $\text{ХА}^-$ ), а вторая — к уменьшению сигнала ЭПР (из-за образования  $\text{ХА}^{2-}$ ). Эти результаты имеют важное значение в связи с возможной ролью ламеллярных биологических систем.

Суммируя вышеизложенное, можно сказать, что большинство комплексов с переносом заряда принадлежит к числу органических кристаллов с наиболее высокой проводимостью. Следует отметить, что хотя в принципе применение модели потенциального ящика возможно и для случаев комплексов с переносом заряда [33], тем не менее здесь возникает ряд трудностей при установлении корреляции между сигналами ЭПР и величиной проводимости. Эти трудности могут быть связаны с различиями в степени прозрач-

ности энергетических потенциальных барьеров между примыкающими друг к другу донорными и акцепторными молекулами в молекулярной упаковке, т. е. с различиями в величине подвижности носителей заряда, связанными с особенностями кристаллической структуры. Причиной более высокой проводимости комплексов, содержащих ТМГД, по сравнению с комплексами, содержащими ДМА, может быть и уменьшение межплоскостных расстояний. Прежде чем делать далеко идущие выводы в этой области, необходимо более детально исследовать структуру этих комплексов с помощью рентгеноструктурного анализа.

### Порфирины

Формулы (I), (VII), и (VIII) изображают строение фталоцианина, порфирина (точнее, этиопорфирина I) и металлического (M) комплекса дипиррометина I [51]. Известно, что соединения (I) и (VII) содержат металлпроизводные, образующиеся в результате замещения двух атомов водорода у двух центральных атомов азота металлом и образования двух координационных связей между этими атомами металлов и другими атомами азота, в результате чего получается структура с четырьмя координационными связями. Для ширины запрещенной зоны  $\Delta\varepsilon$  фталоцианина в четырех лабораториях четырьмя различными методами были получены значения, лежащие в интервале от 1,44 до 1,87 эв [23]. Для фталоцианина в  $\beta$ -модификации недавно было получено значение  $\Delta\varepsilon = 1,82$  эв [113]. Для производных фталоцианина, содержащих Cu, Ni, Co и Pt, величины  $\Delta\varepsilon$  также лежат в интервале 1,5—1,8 эв [36, 38]. Поразительно, что введение металлов оказывает столь незначительное влияние на величину проводимости данного соединения. Для железосодержащего гема, выделенного из гемоглобина, т. е. для железосодержащего протопорфирина, было получено значение  $\Delta\varepsilon = 1,74$  эв [15]. По последним данным, эта величина составляет 1,80 эв. Эли и Спиви [29] дополнили исследование этих порфиринов, изучив этиопорфирин I, а также его кобальтовые, никелевые, медные и магниевые производные, для которых значения  $\Delta\varepsilon$  оказались лежащими в интервале от 1,81 до 1,99 эв; для копропорфирина III  $\Delta\varepsilon$  оказалось равным 1,99 эв. Эти значения близки к значениям  $\Delta\varepsilon$  для близких по структуре фталоцианинов; это еще раз подтверждает, что центральный атом металла оказывает очень слабое влияние и снижает величину  $\Delta\varepsilon$  не больше чем на 0,2 эв.



Комплексы дипиррометина по своей структуре сходны с порфиринами, за исключением того, что по стерическим причинам обе половины молекулы не могут находиться строго в одной плоскости. Однако для медных и кобальтовых комплексов дипиррометина (VIII) значения  $\Delta\varepsilon$  равны соответственно

1,88 и 1,85 эв, т. е. близки к значениям этой величины для порфиринов. По-видимому, в этих двух случаях сопряжение  $\pi$ -электронов осуществляется через атом металла. Для другой группы дипиррометиновых комплексов, где заместителями в двух пиррольных кольцах являются не  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_3$  [как в (VIII)], а  $\text{Br}$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_3$ , мы получаем значение  $\Delta\varepsilon$ , равное 2,3 эв, т. е. фактически то же, что и для бромистоводородной соли самого дипиррометина [часть молекулы, лежащая выше штриховой линии в формуле (VIII)]. По всей вероятности, замещающий атом брома благодаря своей способности притягивать электроны уменьшает электронную плотность связи металла с азотом и разрушает таким образом сопряжение, которое в противном случае должно было бы осуществляться через атом металла.

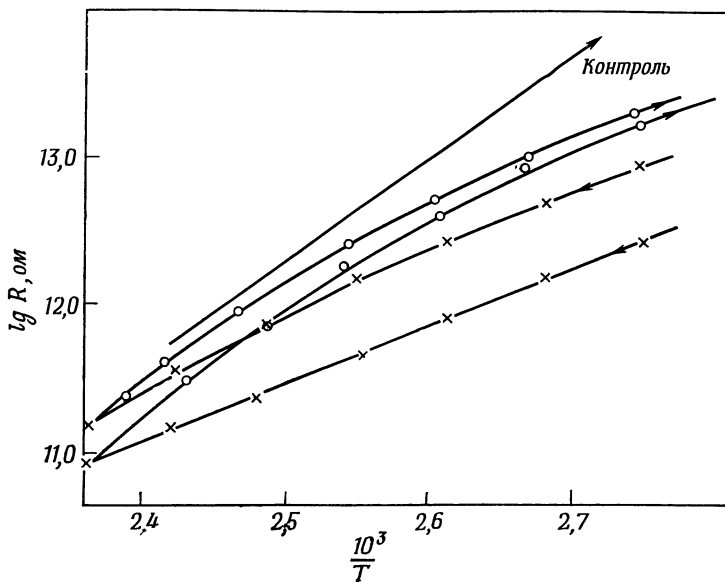
## БЕЛКИ

### Проводимость и носители заряда

Бэкстер [8] исследовал *фибрилярные* белки: коллаген, белки шерсти и шелка. При содержании от 3 до 28,5% все три белка имеют значения величины  $\Delta\varepsilon$  около 2,7 эв, тогда как для белков хлопка эта величина равна 1,92 эв. Для шерсти, высушенной в токе сухого азота, было найдено более низкое значение  $\Delta\varepsilon$  (2,2 эв). Бэкстер предположил, что носителями заряда являются электроны, которые перемещаются посредством туннельного эффекта из одной адсорбированной молекулы воды в другую. В то же время Кинг и Медли [59] обнаружили, что прохождение тока через кератин, содержащий 15% воды, вызывает выделение 0,88 эквивалента водорода. Они связали проводимость с движением каких-то неидентифицированных ионов и объяснили влияние температуры и диэлектрической проницаемости, исходя из теории ионной диссоциации Бьеррума.

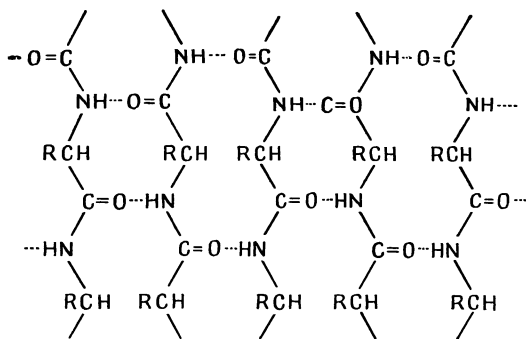
Эли с сотр. [32] изучали *глобулярные* белки: сывороточный альбумин, фибриноген и эдестин, высушенные в атмосфере сухого азота, и получили для них значения  $\Delta\varepsilon$ , равные 2,2, 2,7 и 2,5 эв соответственно. Адсорбированная вода снижает значение величины  $\Delta\varepsilon$  для сывороточного альбумина до 1,7 эв. Кардью и Эли [15] улучшили экспериментальную технику этих исследований, создав аппаратуру для работы с белками в абсолютно сухом виде под высоким вакуумом. В настоящее время известно, что в таких условиях удельная проводимость большинства белков при 30° С представляет собой величину, меньшую  $10^{-18}$  ом·см<sup>-1</sup>, и  $\Delta\varepsilon$  имеет значения около 2,7 эв (см. фиг. 1) [27]. Те же авторы показали, что для свободного от солей порошкообразного гемоглобина  $\Delta\varepsilon = 2,75$  эв. Отсутствие сколько-нибудь заметной поляризации в этих белках говорит в пользу того, что носителями зарядов в них являются электроны и дырки. Добавление примерно 1% NaCl приводит к тому, что зависимость  $\lg R$  от  $T^{-1}$  перестает быть линейной. Это говорит о том, что линейная зависимость для тщательно диализованных белков не может быть связана с проводимостью, обусловленной присутствием случайных ионов. Графики Эли и Кардью, представленные на фиг. 7, публикуются впервые; они ясно показывают влияние солевых примесей на температурный ход проводимости гемоглобина. Ряд аминокислот и полиглицин дали результаты, сходные с данными, полученными для диализованного сухого гемоглобина; исходя из этого, авторы связывают проводимость с движением  $\pi$ -электронов по  $\text{CO} \cdots \text{NH}$ -связям, которые имеются во всех рассматриваемых системах. Ивенс и Гергели [35] несколько лет назад применили методы теории молекулярных орбит к рассмотрению

вопроса о водородных связях в  $\beta$ -цепях белковых структур (см. фиг. 8). Они показали, что энергетические уровни распадаются на три узкие полосы шириной около 0,2 эв, причем две нижние полосы заполнены, а самая верхняя не заполнена. Для модели, в которой предполагается, что атомы азота



Фиг. 7. Влияние 1-процентного NaCl на сухой гемоглобин.  
x — нагревание; o — охлаждение.

обладают тригональным  $sp^2$ -расположением связей, расчет ширины запрещенной зоны дает значение 3,05 эв, что хорошо согласуется с полученными нами экспериментальными данными. Было найдено также, что

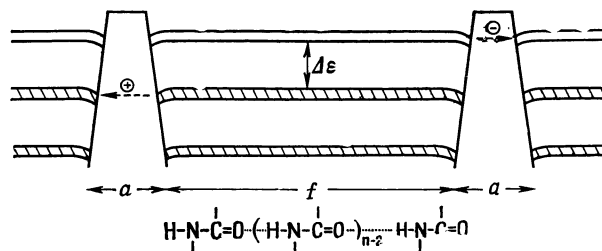


Фиг. 8. Система водородных связей в  $\beta$ -цепи белка.

проводимость отдельных кристаллов глицина больше в направлении *вдоль*, чем *поперек* водородных мостиков. Как и следовало ожидать, для собственно электронных полупроводников величина термо-э.-д.-с. мала, хотя ее и можно обнаружить экспериментально. Гемоглобин обладает проводимостью  $p$ -типа, а глицин  $n$ -типа. Данные, касающиеся гемоглобина, могут быть несколько завышены вследствие возможного захвата электронов в ловушках.

В то же время Риль [87, 88] нашел, что для желатины, содержащей некоторое количество воды,  $\Delta\varepsilon = 1,8 \text{ эв}$ ; так как такое же значение было получено им для льда, то он пришел к выводу, что носителями заряда в желатине являются протоны, связанные с неподвижными молекулами воды, которые структурно соединены с белком. Однако Брэдли [11] позднее получил из измерений электропроводности льда значительно более низкое значение величины  $\Delta\varepsilon$ , равное  $1,07 \text{ эв}$ ; это хорошо согласуется с величиной  $1,2 \text{ эв}$ , полученной Гренихером и сотр. [42]. В связи с этим совпадение значений  $\Delta\varepsilon$  для льда и желатины, полученное Рилем, по-видимому, недостаточно.

Эли и Спиви [27] тщательно изучили влияние на величину  $\Delta\varepsilon$  предварительной денатурации сухого гемоглобина и инсулина нагреванием



Фиг. 9. Применение модели потенциального ящика к белкам (или другим полимерам).

или под действием спирта. В первом случае денатурация приводила к возрастанию значения  $\Delta\varepsilon$  от  $2,63$  до  $2,89 \text{ эв}$ . Гемоглобин, исследованный Эли и Кардью ( $\Delta\varepsilon = 2,75 \text{ эв}$ ), был, по-видимому, частично денатурирован. В отсутствие влаги нагревание гемоглобина до  $100^\circ$  не приводит к денатурации. Данные Спиви о влиянии предварительной денатурации гемоглобина представлены на фиг. 1. Аналогичные результаты были получены и для инсулина. Как показал эксперимент, для многих белков в сухом виде величина  $\Delta\varepsilon$  имеет значения около  $2,7 \text{ эв}$ . Расчет показывает, что носители заряда в белках должны обладать очень высокой подвижностью. Эти результаты были получены путем применения к белковым системам теории потенциального барьера. Схематическое изображение модели, соответствующей данной теории, показано на фиг. 9. Предполагается, что энергетические зоны, обязанные своим происхождением наличию системы  $\text{CO}\cdots\text{HN}$ -связей, простираются до конца  $\alpha$ -кератиновой спирали или до возможных разрывов в  $\beta$ -белковом слое. В такой системе водородных связей возбужденный электрон может посредством туннельного эффекта проникать через потенциальный барьер и, следовательно, мигрировать по всей системе в целом. Это должно давать довольно значительное суммарное смещение электрона, т. е. приводить к высокой его подвижности.

Тейлор [103] изучал проводимость цитохрома *c*. Для объяснения влияния влажности на величину проводимости он принял точку зрения Кинга и Медли, которые считали, что наличие воды приводит главным образом к увеличению диэлектрической постоянной белковой системы, что способствует разделению ионов. Тейлор полагает, что подвижными ионами являются протоны. Однако Розенберг [91] показал, что те же соображения справедливы и для случая разделения электронов и положительных дырок.

Таким образом, было постулировано, что носителями заряда в белках являются протоны, ионы и электроны в совокупности с положительными дырками. В свете результатов, полученных Кингом и Медли, представляется вполне вероятным, что в белках с высокой степенью гидратации носителями

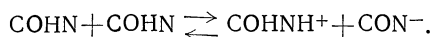


заряда могут быть протоны. Однако в сухих белках носителями заряда, по-видимому, служат электроны. Дэвис, Эли и Снарт [20] нашли, что включение незначительного количества электроноакцепторного хлоранила в такие белки, как сывороточный альбумин, увеличивает проводимость сухих белков в  $10^6$  раз. Совершенно очевидно, что наличие хлоранила обуславливает *p*-тип полупроводимости белков; добавление влаги к такой системе уменьшает величину проводимости в 10 раз. Поскольку вода служит донором электронов, то, по-видимому, вначале ее действие сводится к тому, что заполняются положительные дырки (уменьшение величины проводимости в  $10^6$  раз), а затем электроны передаются белкам, что создает *n*-тип проводимости и приводит к увеличению проводимости в  $10^5$  раз. Таким образом, в конечном счете присутствие воды снижает величину проводимости в 10 раз.

Исходя из выражения для  $k_0$ , даваемого зонной теорией, и считая, что масса носителя заряда равна массе свободного электрона, удалось рассчитать среднее значение подвижности  $\mu_{fe}$ , которое оказалось равным  $10^4 \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ . Подобные значения были найдены для всех белков. Объяснение такой высокой подвижности носителей заряда было приведено ранее.

### Сравнение с полиамидами

В ранней работе Бэйкера и Ягера [7] была обнаружена проводимость полиамидов 66 и 610 для постоянного тока; при этом предполагалось, что носителями заряда являются протоны амидов. Одна из последних работ, выполненных в нашей лаборатории, подтвердила эту точку зрения [28, 29]. Было найдено, что для девяти исследованных полиамидов проводимость в  $10^3$  раз превосходит проводимость белков и аминокислот, которые считались электронными полупроводниками. Проводимость полиамидов связана с сильной зависимостью поляризации от времени и заметно отличается от омической. Зависимость логарифма проводимости от  $T^{-1}$  изображается графически двумя прямыми линиями разного наклона, которые пересекаются при температуре около  $100^\circ$ . Исходя из ряда других данных, это связывают с вращением CONH-групп в цепях. Ниже этой температуры энергия активации  $E_1$  в выражении для проводимости  $k_0 \exp(-E/kT)$  равна примерно  $2,5 \text{ эв}$ , а выше — падает до значения  $E_2 = 1,0 \text{ эв}$  (термин «энергетическая щель»  $\Delta\epsilon = 2E$  мы сохраняем для случая электронной проводимости). Энергия активации  $E_1$  при значениях температуры выше  $100^\circ$  представляет собой, по-видимому, энергию, необходимую для самоионизации:



При этом различные участки цепи свободно вращаются, а протоны могут переходить от одной NH-группы к другой или в соседнюю цепь. Ниже температуры перехода скорость процесса определяется вращением участков цепи, а значение энергии активации, равное  $2,5 \text{ эв}$ , соответствует величине энергии, необходимой для одновременного разрыва примерно 11 водородных связей (для разрыва одной такой связи требуется  $0,217 \text{ эв}$ ).

Таким образом, вращение цепи является существенным условием для возникновения протонной проводимости. В полиамидах этому благоприятствует присутствие между CONH-группами участков  $(\text{CH}_2)_n$ , которые сообщают всей системе внутреннюю пластичность. Число водородных связей между примыкающими друг к другу цепями в белках значительно больше. Это является существенным препятствием для каких бы то ни было враще-

ний цепи (значение температуры перехода для белков превышает ту температуру, при которой начинается химическое разложение). Остается, следовательно, только возможность электронной проводимости, которая и может быть в настоящее время обнаружена. Электронная проводимость в полиамидах может маскироваться протонной проводимостью.

### Протестические группы

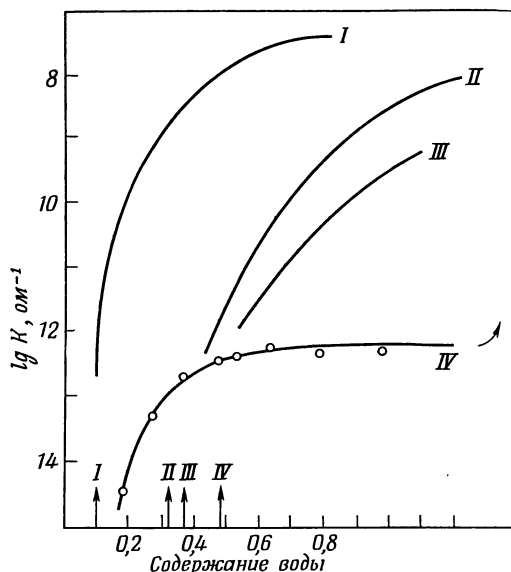
Влияние гема на электрическую проводимость глобина в сухом виде сводится к понижению значения  $\Delta\epsilon$  с 2,97 до 2,75 эв и увеличению в 25 раз удельной проводимости при температуре 20°. Значение  $\Delta\epsilon$  для кристаллического гема равно примерно 1,74—1,80 эв; следовательно, включения молекул гема в белковую матрицу гемоглобина достаточно редки и изолированы друг от друга [15]. Поведение цитохрома *c*, для которого  $\Delta\epsilon = 2,60$  эв, совершенно аналогично [27]. Нуклеопротеид, выделенный из тимуса, имеет  $\Delta\epsilon = 2,57$  эв и содержит 37% ДНК, для которой значение  $\Delta\epsilon$  равно 2,44 эв. Если мы предположим, что 50% белка имеет  $\Delta\epsilon = 2,8$  эв, то наблюдаемое значение величины  $\Delta\epsilon$  для нуклеопротеида будет промежуточным между значениями  $\Delta\epsilon$  для его компонентов [27]. Зрительный пигмент родопсин, входящий в состав ретинена, будучи связан с белком опсином, имеет значение  $\Delta\epsilon = 2,2$  эв [93]. Так как ретинен представляет собой открытую сопряженную систему, содержащую 10  $\pi$ -электронов, то, исходя из данных фиг. 4, можно предсказать, что эта молекула должна иметь значение  $\Delta\epsilon = 2,2$  эв. Таким образом, вполне вероятно, что ретинен и опсин соединены так, что возбужденные  $\pi$ -электроны ретинена могут попадать в зону проводимости белка. Ситуация в данном случае совершенно противоположна той, которая имеет место для гемоглобина.

### Гидратация

Адсорбция воды на кристаллах белков в большинстве случаев проходит по изотерме Брунауэра — Эммета — Теллера, которая позволяет оценить число молекул воды, адсорбированных в «монослое» ( $V_m$ ). Полинг [80] показал, что это число в первом приближении соответствует числу полярных белковых групп в белке, если предположить, что молекулы воды обладают способностью проникать через весь кристалл, достигая этих благоприятных для адсорбции участков. Полинг считал, что относительно слабая адсорбция воды на нейлоне указывает на то, что пептидные связи не адсорбируют воду. Однако этот вопрос пока еще остается нерешенным, так как имеются указания на существование подобной адсорбции на диглицилглицине [40] и полиглицине [71]. Кардью и Эли [14] изучали адсорбцию воды на гемоглобине, который, как известно из рентгеноструктурных исследований Перуца, связывает воду, адсорбирующуюся только на поверхности молекулы. Из размеров молекул можно вычислить, что площадь их поверхности должна соответствовать насыщенной пленке из 1160 молей воды на  $10^5$  г белка. С помощью химического анализа было обнаружено содержание 435 молей полярных боковых групп, которые, вероятно, расположены главным образом на поверхности молекулы. Монослой, определенный по методу Брунауэра — Эммета — Теллера, содержит 319 молей воды, что соответствует 73% общего числа имеющихся полярных боковых групп.

Наличие в белках адсорбированной воды приводит к возрастанию электрической проводимости. Наши собственные экспериментальные данные

[28] показывают, что величина проводимости достигает насыщения при большем содержании адсорбированной воды, чем это нужно для образования монослоя  $V_m$ . Эти данные совместно с другими опубликованными результатами представлены на фиг. 10. Как видно из этой фигуры, влияние воды на возрастание величины проводимости носит различный характер для разных белков. Электронодонорное действие воды при малом ее содержании было установлено по уменьшению проводимости белков  $p$ -типа, т. е. белков, содержащих примеси акцепторов электронов. Мы полагаем поэтому,



Фиг. 10. Адсорбция воды и электрическая проводимость белков.

*I* — нейлон, *II* — кератин, *III* — желатина, *IV* — гемоглобин. Стрелки указывают монослойное покрытие Брунауэра — Эммета — Теллера. Содержание воды выражено числом молей на 100 г белка.

что первичное действие воды сводится к переносу электронов в зону проводимости белка. А это в свою очередь предполагает, что некоторые из участков молекулы, на которых адсорбируется вода, либо являются CONH-группами, либо по крайней мере примыкают к ним. Величина проводимости достигает насыщения, когда все полярные группы, находящиеся на поверхности, заняты, т. е. когда число адсорбированных молекул воды близко к  $V_m$ , что для гемоглобина составляет площадь, равную примерно одной четверти полной поверхности молекулы. Протонная проводимость становится возможной, когда общая пригодная для адсорбции поверхность покрыта водой. При этом, как и предполагал Риль, она осуществляется посредством механизма Гротгуса, в котором участвуют соседние адсорбированные молекулы воды. В кератине можно ожидать наступления такого процесса при содержании 15% адсорбированной воды, что соответствует  $2,5 V_m$ . Очень сильное влияние воды на величину проводимости в нейлоне обусловлено, по-видимому, тем, что, как и предполагалось [7], вода обладает пластифицирующей способностью, в результате которой становится возможным вращение отдельных цепей и перенос протона между NH-группами в смежных цепях.

## НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты состоит из двух переплетенных спиральных цепей, построенных из повторяющихся единиц: основание — пентоза — фосфат. Основания направлены к центру спирали и связаны водородными связями попарно: аденин с тиминном и гуанин с цитозинном. Эти связи и обеспечивают стабильность двуспиральной структуры [19]. Каждое основание имеет 10  $\pi$ -электронов, так что каждая пара оснований обладает 20  $\pi$ -электронами. Пары оснований расположены друг над другом подобно стопке монет. Межплоскостные расстояния равны примерно 3,4 Å, т. е. близки к тем, которые были найдены в структуре графита. Исходя из фиг. 4, можно было предполагать, что для кристалла, состоящего из молекул, содержащих по 10  $\pi$ -электронов, ширина запрещенной зоны  $\Delta\epsilon$  должна иметь значение  $3,0 \pm 1,0$  эв. Если бы сопряжение было совершенным, т. е. каждая пара оснований имела бы общую сопряженную систему  $\pi$ -электронов, то для кристалла, содержащего молекулы с 20  $\pi$ -электронами,  $\Delta\epsilon$  должна была бы иметь значение  $1,5 \pm 0,5$  эв. Был исследован ряд образцов ДНК в сухом виде и обнаружено, что при 400° К удельное сопротивление ДНК равно  $5 \cdot 10^{11}$  ом·см, а  $\Delta\epsilon = 2,42$  эв [30]. Это дает основания считать сопряжение между парой оснований, обусловленное водородными связями, сравнительно малым, так что молекулы функционируют как отдельные единицы, имеющие по 10  $\pi$ -электронов. Это хорошо согласуется с малым значением энергии стабилизации, полученным при расчете по методу молекулярных орбит [83]. Отсюда напрашивается вывод, что  $\pi$ -электронная проводимость имеет место вдоль оси молекулы; это соответствует результатам расчетов перекрывания орбит [62]. Для одного образца РНК, выделенной из дрожжей, были получены практически такие же результаты, как и для ДНК, что является достаточно неожиданным, если учесть различие в структурах этих объектов. Весьма вероятно, что исследованные образцы ДНК были до некоторой степени денатурированными. Дюшень и др. [21] нашли, что для ДНК значение  $\Delta\epsilon$  равно 1,8 эв; однако они отмечают, что в их опытах не было исключено присутствие адсорбированной воды, а это, с нашей точки зрения, может объяснить расхождение между двумя приведенными значениями  $\Delta\epsilon$ .

Было найдено, что для вируса табачной мозаики (6% РНК) в сухом состоянии  $\Delta\epsilon = 2,92$  эв, тогда как для нуклеопротеида, выделенного из тимуса и содержащего 37% ДНК,  $\Delta\epsilon = 2,57$  эв. Такие значения можно было бы ожидать в случае простого суммирования электронных взаимодействий в молекулах нуклеиновой кислоты и в молекулах белка.

Исходя из уравнений зонной теории и считая, что масса носителя заряда равна массе свободного электрона, удастся, как и в случае белков, рассчитать значение подвижности носителей заряда, которое оказалось равным  $10^4$  см<sup>2</sup>в<sup>-1</sup>сек<sup>-1</sup>. Точно так же мы можем предположить, что для того, чтобы электрон мог перейти посредством туннельного эффекта из одной спирали ДНК в другую, необходимо тепловое возбуждение, но что в активированном состоянии электрон может пройти вдоль всей молекулы.

## Фотопроводимость

Энергия, необходимая для образования электрона и дырки, может быть получена либо за счет поглощения кванта света, либо за счет нагревания. Однако точного соответствия между этими двумя видами возбуждения не установлено. График зависимости фототока от длины волны в большин-

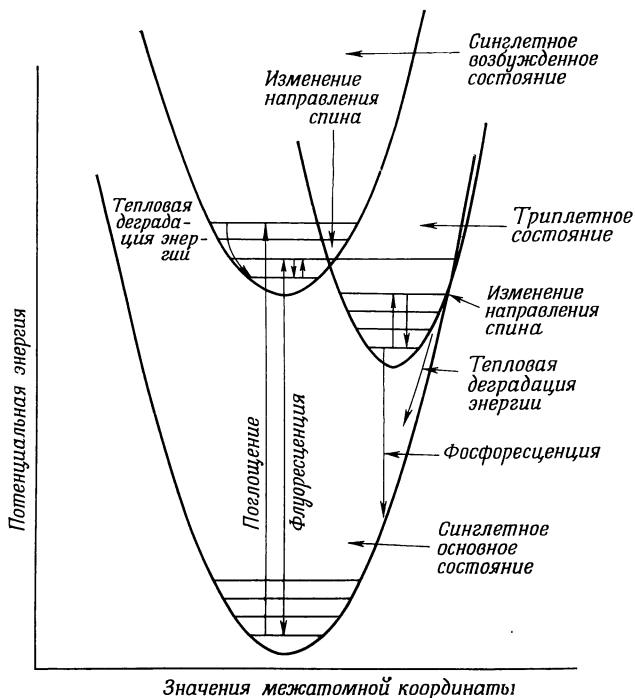
стве случаев соответствует спектру поглощения органического кристалла [67]. Такую зависимость удается наблюдать с помощью так называемой поверхностной ячейки (оба электрода расположены на освещенной поверхности образца). В ячейках типа «сэндвич» (образец помещается между двумя электродами, из которых один прозрачен и через него производится освещение образца) была обнаружена другая зависимость фототока от длины волны. Значения величины  $\Delta\epsilon$  равны минимальному значению кванта энергии, вызывающего фотопроводимость (метод Инокути), и значению энергии, соответствующему половине максимальной амплитуды на кривой фотопроводимости (метод  $\lambda_{1/2}$ , или метод Вартапяна). Последний метод основан на зонной теории, разработанной для неорганических веществ [74]. Соответствие с термически определенным значением  $\Delta\epsilon$  наблюдалось для обоих методов; в первом случае для полиацинов [3, 49], а во втором для фталоцианинов [109]. Вартапян также широко использовал метод «фотоэлектрических линий» [74] для определения энергии порогового кванта; для фталоцианинов результаты, полученные по этому методу и по методу  $\lambda_{1/2}$ , совпали с точностью до 0,05 эв. Вартапян обнаружил также соответствие между значением ширины запрещенной зоны, определенной термически, и значением энергии порогового кванта для катионных, анионных и нейонных красителей [105].

Ранее мы упоминали гипотезу Лайонса [66] и Теренина [104] о том, что явление полупроводимости связано с триплетными состояниями, т. е. с образованием в результате взаимодействия этих молекулярных состояний узкой энергетической полосы, имеющей несколько меньшую энергию. Однако фотопроводимость может иметь место только в результате оптических разреженных синглет — синглетных переходов, так что значение энергии активации должно было бы быть *больше*, чем в случае полупроводимости, осуществляемой через триплетные состояния. Основываясь на упомянутых выше совпадениях значений энергии активации, Теренин [105] пришел к заключению, что в явлении полупроводимости существенную роль играют синглетные состояния.

Розенберг [89, 90, 92] показал, что зависимость фототока от температуры в ряде случаев свидетельствует о наличии проводимости по триплетным состояниям. Комптон, Шнейдер и Уоддингтон [18] нашли, что для антрацена выражение  $i = i_0 \exp(-E/kT)$  дает для энергии активации значение  $E = 0,17$  эв, что вполне согласуется с данными Розенберга. Если мы обратимся к фиг. 11, то увидим, что за фотовозбуждением молекулы, в результате которого она переходит на первый возбужденный синглетный уровень, может последовать термически активированный переход в триплетное состояние, которое, по-видимому, обуславливает фотопроводимость. Энергия такой активации может соответствовать одному или более квантам колебательной энергии. Приведенное выше значение  $E$  соответствует энергии одного такого кванта. Нарастание и затухание фотопроводимости в антраcene подчиняется кинетике реакций первого порядка и имеет постоянную времени, равную 0,6 мсек. Это хорошо согласуется с моделью, связывающей явление полупроводимости с наличием триплетных состояний.

Адсорбция газов может приводить как к увеличению, так и к уменьшению тока фотопроводимости [108]. Шнейдер и Уоддингтон [94] рассматривали влияние газов на проводимость антрацена с точки зрения их способности принимать или отдавать электроны. Присутствие акцепторов электронов приводит к возрастанию фототока, при этом предполагается, что большая часть носителей заряда положительна. Розенберг [90] нашел, что для транс- $\beta$ -каротина значение термической энергии активации фототока

равно 0,37 эв. Величина этой энергии не зависит от присутствия кислорода, хотя фототок увеличивается при этом в 25 раз. Однако в случае  $\beta$ -каротина присутствие кислорода приводит к уменьшению разности энергий  $\Delta\epsilon$  от 1,52 до 1,29 эв и к возрастанию темновой проводимости при температуре 25° в 1100 раз. Согласно предположению Розенберга, тот факт, что значение



Фиг. 11. Роль триплетных состояний в процессах фотопроводимости [89].

энергии триплетного состояния хлорофилла (1,43 эв) лежит посредине между приведенными выше значениями  $\Delta\epsilon$  для  $\beta$ -каротина, можно объяснить с помощью гипотезы, выдвинутой Платтом [81].

Целый ряд исследователей [92, 97] пытались объяснить отсутствие заметной фосфоресценции у хлорофилла с помощью триплетного механизма.

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

В этом разделе будут рассмотрены возможности использования теории полупроводников для объяснения функций цитохромных систем, хлоропластов, палочек сетчатки и для выяснения вопросов, связанных с действием облучения и канцерогенезом. Кроме того, данные по полупроводимости могут пролить свет на природу взаимодействия между простетическими группами и белками.

#### Системы цитохромов

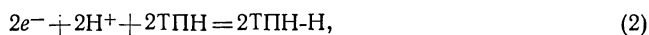
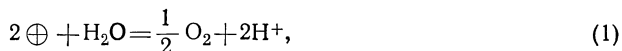
Перенос электронов между цитохромами, расположенными в митохондриях, может осуществляться посредством полупроводникового механизма. Однако Кардью и Эли [15] показали, что сопротивление сухих белков слишком велико — примерно в  $10^{16}$  раз больше того, при котором проходя-

щий электронный ток мог бы соответствовать интенсивности дыхания, наблюдаемой в яйце морского ежа. При гидратации белков сопротивление понижается в  $10^8$  раз, тем не менее еще сохраняется значительное несоответствие. Весьма вероятно, что такие акцепторы электронов, как хиноны, могут стимулировать образование белковых систем, обладающих высоким значением проводимости  $p$ -типа (в гидрофобной среде). Для того чтобы дать окончательный ответ о возможности применения полупроводникового механизма к цитохромным системам, необходимы дальнейшие эксперименты с митохондриями. Однако в настоящее время такая возможность кажется маловероятной.

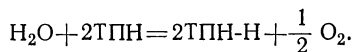
### Хлоропласты

Кац [56] и Брэдли и Кальвин [10] обсуждали возможность того, что хлоропласты функционируют как некие полупроводниковые объединения (см. последний обзор Кальвина [13]). Поглощение света может приводить к образованию в хлорофилле электронов и положительных дырок. Если молекулы хлорофилла расположены между слоем с проводимостью  $p$ -типа и слоем липидов или липопротеидов (хлоропласт имеет ламеллярную структуру) с проводимостью  $n$ -типа, то электроны и дырки могут диффундировать в противоположных направлениях, «запуская» химические циклы восстановления и окисления.

Поглощенный квант красного света может вызвать в молекуле хлорофилла образование электрона и положительной дырки со свободной энергией 40 ккал/моль; из них 5 ккал могут быть потеряны в процессе переноса и, следовательно, остается 35 ккал. Возникновение этого химического потенциала позволяет идти пространственно разделенным реакциям окисления и восстановления:



что приводит к полному переносу водорода:



В этой первичной реакции водород, полученный в результате фотолиза воды, восстанавливает трифосфопиридиннуклеотид. Кальвин предположил, что полупроводимость в данном случае обуславливается слоем молекул каротина, встроенных в липидную матрицу, обладающую свойствами изолятора. Другой механизм был предложен недавно автором этой статьи: слой, обладающий проводимостью  $p$ -типа, может состоять из комплексов белка с витамином К, а слой, имеющий  $n$ -тип проводимости, — из комплексов белка с водой. Витамин К, который, как известно, является хиноном, представляет собой важный компонент хлоропласта и играет существенную роль в реакции Хилла [65]. Спектры ЭПР, наблюдаемые для влажных хлоропластов, по-видимому, обусловлены захваченными в ловушки электронами, ответственными за реакцию (2) [98].

Фотопроводимость и полупроводниковые свойства хлорофилла были исследованы рядом авторов [92, 97, 106]. Розенберг нашел, что для кристаллического хлорофилла значение энергии активации, необходимой для возникновения полупроводимости, составляет 1,44 эв. Эта же величина была найдена Снартом для аморфных слоев смешанного хлорофилла. Температурный коэффициент фотопроводимости, по данным Розенберга,

равен 0,33 эв, а по данным Снарта — 0,15 эв. Розенберг отмечает противоречие между этими результатами и наблюдениями Рабиновича о независимости первичного фотофизического процесса фотосинтеза от температуры. Однако он отмечает, что до тех пор, пока комплекс хлорофилла с белком не исследован достаточно глубоко, мы не можем отказаться от предположения об определяющей роли фотопроводимости в процессе фотосинтеза.

### Канцерогенез

Было предпринято несколько попыток объяснить относительную канцерогенную активность полиароматических соединений. Так, А. Пюльман и Б. Пюльман [82] связывают это свойство с наличием высокой электронной плотности в К-области углеводорода. Мэзон [69, 70] считал, что первичный процесс сводится к переносу одного электрона высшего заполненного энергетического уровня молекулы белка (модель Ивенса — Гергели) на незаполненные уровни молекулы углеводорода, как показано на фиг. 10. Это приводило бы к образованию положительных дырок в валентной зоне молекул белка. При этом Мэзон предполагает, что для эффективного переноса электронов необходимо строгое соответствие между электронными энергетическими уровнями. Исходя из этих соображений, Мэзон пришел к выводу, что значение энергии возбуждения углеводородов должно составлять  $3,23 \pm 0,19$  эв в соответствии с разностью энергий ( $E_2 - E_1$ ) для первой и второй валентных зон белка. Хотя расчеты Ивенса — Гергели являются весьма приближенными, однако хорошее совпадение между рассчитанной ими и найденной Эли и Кардью величиной термической разности энергий ( $E_3 - E_2$ ) говорит о возможности использования таких расчетов в данном случае. Интересно отметить, что пять наиболее активных углеводородов (общее число углеводородов равно 34) обладают энергией возбуждения, значение которой лежит именно в этом интервале, в то время как для большинства остальных соединений значения энергии возбуждения лежат за его пределами.

По поводу этой модели можно высказать следующие критические замечания.

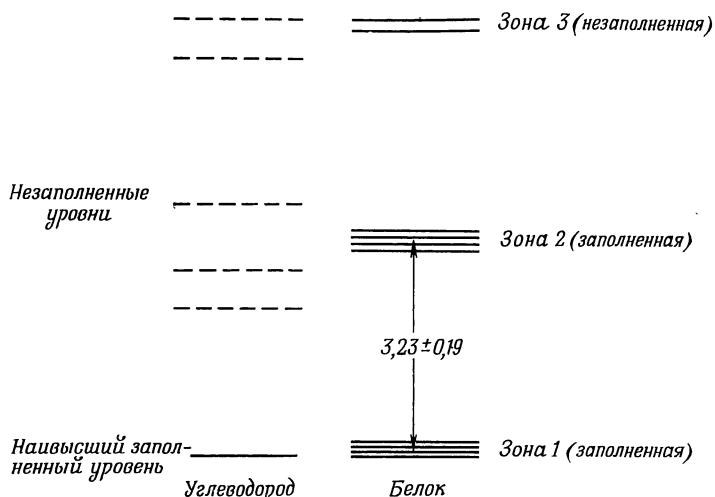
1) При составлении схемы энергетических уровней для двух молекул следовало бы исходить из того, что энергия свободного электрона равняется нулю, а не из того, что энергии валентных зон размещаются на одном уровне, как это показано на фиг. 12.

2) Точное совпадение энергетических уровней необходимо для образования единичной электронной связи, а не для переноса электрона от белка к углеводороду. Для переноса же требуется, чтобы наивысший заполненный уровень молекулы белка имел большую энергию, чем самый нижний незаполненный уровень углеводорода [24].

Переносы электронов такого рода от молекул белка к очень сильным акцепторам, таким, как хлоранил, действительно имеют место; они приводят к образованию положительно заряженных дырок в молекуле белка, что значительно повышает проводимость. Однако углеводороды являются относительно слабыми акцепторами, поэтому, считая соответствия, отмечаемые Мэзоном, правильными, мы можем заключить, что в основе их лежит образование единичных электронных связей, а не полный перенос электрона. Метод изучения проводимости, по-видимому, даст возможность проверить правильность гипотезы Мэзона; исследования в этом направлении уже начаты в Ноттингеме. Совсем недавно Гофман и Лэдик [46] с помощью метода молекулярных орбит рассчитали структуру энергетических зон ДНК.



Они пришли к заключению о возможности переноса электрона от молекулы ДНК к молекуле канцерогенного углеводорода. Далее они постулировали наличие электрического поля, вызывающего движение положительных зарядов на расстояния до 15 мк вдоль частицы ДНК; предполагалось, что



Фиг. 12. Перенос электрона от белка к углеводороду [69].

энергия возникающего при этом кулоновского отталкивания будет достаточной для инициирования разделения двух цепей ДНК (первая стадия удвоения). Возникновение зарядов может происходить как под действием излучения, так и под действием канцерогенов.

### Превращения энергии в палочках сетчатки

Когда световой квант (соответствующий зеленой области спектра) поглощается одной из миллиона молекул родопсина в адаптированной к темноте палочке сетчатки человека, то, как было показано, вероятность образования нервного импульса составляет 30% [45]. Хагинс и Дженнингс [43] указали на необходимость существования определенного механизма миграции энергии в системе палочек сетчатки. Эти авторы показали отсутствие для палочек сетчатки явления фотодихроизма, что говорит об эффективности процессов межмолекулярного безызлучательного переноса энергии. Однако даже очень концентрированные растворы витамина А, молекула которого тесно связана с ретином и является протетической группой родопсина, дают в высокой степени поляризованную флуоресценцию, что говорит об относительно малой эффективности процессов безызлучательного переноса энергии. Отсюда авторы делают вывод, что фотосенсибилизирующее действие родопсина зависит от ряда других процессов, связанных с передачей сигнала, таких, как фотопроводимость, электролитическая проводимость или молекулярная диффузия. Розенберг, Орландо и Орландо [93], исследуя как промытые в воде, так и промытые в сахарозе высушенные палочки сетчатки овцы, нашли, что в обоих случаях значение энергии активации, необходимой для возникновения проводимости в этом полупроводнике, равно  $2,29 \pm 0,3$  эв. Но только у второго образца была обнаружена фотопроводимость, которую они приписали присутствию остаточной воды

в образце. Спектр действия точно промерен не был, однако есть данные, говорящие о том, что он соответствует известному спектру оптического поглощения родопсина. При длительном освещении величина фотопроводимости уменьшалась. Это может быть связано с превращением *цис*-ретины в *транс*-ретины, все еще связанный с опсином. Описанное превращение является своего рода световой адаптацией.

### Облучение белков

Кардью и Эли [15] нашли, что квант энергии в 3 эв (4112 Å) должен быть достаточен для фотовозбуждения электрона в зону проводимости белка. При этом в валентной зоне остается положительная дырка. На примере сывороточного альбумина было показано, что гидратация может приводить к уменьшению этого значения энергии [32]. Розенберг [91] получил линейную зависимость между понижением значения ширины запрещенной зоны  $\Delta\varepsilon$  и содержанием воды в гемоглобине. Это, по-видимому, связано с тем, что в случае гемоглобина вода адсорбируется только на поверхности молекулы, тогда как другие белки могут адсорбировать воду значительно более сложным образом. Поэтому, как уже отмечалось ранее ([28] и фиг. 10), гидратация может различным образом влиять на разные белки. Таким образом, фотоинаktivация уреазы и фотодиссоциация углерода оксигемоглобина могут происходить в результате образования в белке экситона (пара электрон — дырка), мигрирующего к реакционному центру. Недавно Аллен и Ингрэм [6] методом ЭПР обнаружили, что квант света, соответствующий длине волны 3600 Å (3,4 эв), приводит к образованию устойчивых свободных радикалов в яичном альбумине и бычьем сывороточном альбумине. При этом сигналы ЭПР сохраняются и при температуре жидкого азота. Три аминокислоты в водном растворе вообще не давали сигнала, а четвертая, лейцин, давала сигнал, но очень слабый. Исходя из этого, авторы связывают наблюдаемые сигналы ЭПР с переходом электрона в зону проводимости твердого белка. При нагревании порошкообразных образцов белков в вакууме до комнатной температуры сигнал ЭПР сохранялся, а при нагревании белков в водном растворе исчезал. У кристаллов яичного альбумина после облучения и нагревания до комнатной температуры в вакууме был обнаружен явно выраженный дублет. Это говорит о том, что электрон захватывается протоном, который, возможно, локализован в системе водородных связей. Проводилось также облучение порошкообразных образцов белков при температуре жидкого азота светом с длиной волны 2537 Å. Это приводило к появлению более асимметричных сигналов ЭПР, которые не исчезали при нагревании до комнатной температуры даже в присутствии влаги.

Интересно также отметить, что было обнаружено появление интенсивных неустойчивых линий после облучения фибриллярных белков и аминокислот рентгеновскими лучами. *g*-Фактор этих линий имел значение, близкое к значению для свободного спина. Кроме того, наблюдалось возрастание электрической проводимости, которая после окончания облучения снова уменьшалась.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ряд фактов показывает, что очень большое число молекул, представляющих интерес с точки зрения биологии, обладает полупроводниковыми свойствами как в кристаллическом, так и в аморфном состоянии. Полупроводниковыми свойствами обладают также определенным образом организованные системы, например хлоропласты и палочки сетчатки; ламел-

лярная структура таких систем должна, как это отмечал Кальвин, в какой-то мере объяснять и их электрические свойства (см. [37]). Сцент-Дьёрдьи много раз поднимал вопрос о биологическом значении явлений полупроводимости [99] и гидратации [101], а также о роли комплексов с переносом заряда в биологических системах [102]. Автор данной работы полагает, что одна из важнейших функций адсорбированной воды заключается в передаче электрона таким биологически важным молекулам, как белки и нуклеиновые кислоты; при этом образуются слои с проводимостью *n*-типа. Взаимодействие хинонов и других акцепторов электронов, являющихся источником свободных радикалов, с белками в липоидном окружении приводит далее к образованию слоев с проводимостью *p*-типа. Наложение друг на друга таких структур создает, как и в случае транзисторов, благоприятные условия для возникновения электронной проводимости и позволяет локализовать процессы окисления и восстановления в хлоропластах, митохондриях и т. д. Такая локализация может быть связана и с определенными стереохимическими факторами, которые обуславливают высокую степень специфичности. Эта новая гипотеза может способствовать доказательству правильности указанной выше точки зрения Сцент-Дьёрдьи. Несомненно, что эта гипотеза требует дальнейшего исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Aftergut S., Brown G., Nature, **189**, 827 (1961).
2. Akamatu H., Inokuchi H., J. Chem. Phys., **18**, 810 (1950).
3. Akamatu H., Inokuchi H., J. Chem. Phys., **20**, 1481 (1952).
4. Akamatu H., Inokuchi H., In. «Carbon: Proceedings of the Third Biennial Conference» (S. Mrozowski, M. Studebaker and P. L. Walker, eds.), p. 51, Pergamon Press, New York, 1959.
5. Akamatu H., Inokuchi H., Matsunaga Y., Bull. Chem. Soc., Japan, **29**, 213 (1956).
6. Allen B. T., Ingram D. J. E., «Free Radicals in Biological Systems», p. 215, Academic Press, New York, 1961.
7. Baker W. O., Yager W. A., J. Am. Chem. Soc., **64**, 2171 (1942).
8. Baxter S., Trans. Faraday Soc., **34**, 207 (1943).
9. Baxter S., Cassie A. B. D., Nature, **148**, 408 (1941).
10. Bradley D. F., Calvin M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **41**, 563 (1955).
11. Bradley R. S., Trans. Faraday Soc., **53**, 687 (1957).
12. Bree A., Lyons L. E., J. Chem. Soc., p. 5719 (1960).
13. Calvin M., Rev. Modern Phys., **31**, 147, 157 (1959).
14. Cardew M. H., Eley D. D., «Fundamental Aspects of the Dehydration of Foodstuffs» (Society of Chemical Industry), p. 24, Macmillan, New York, 1958.
15. Cardew M. H., Eley D. D., Discussions Faraday Soc., **27**, 115 (1959).
16. Carswell D. J., Ferguson J., Lyons L. E., Nature, **173**, 736 (1954).
17. Chynoweth A. G., Schneider W. G., J. Chem. Phys., **22**, 1021 (1954).
18. Compton D. M. J., Schneider W. G., Waddington T. C., J. Chem. Phys., **27**, 160 (1957).
19. Crick F. H. C., Watson J. D., Proc. Roy. Soc., **A223**, 80 (1954).
20. Davis K. M. C., Eley D. D., Smart R. S., Nature, **188**, 724 (1960).
21. Duchesne J., Depireux J., Bertinchamps A., Cornet N., van der Kaa J. M., Nature, **188**, 405 (1960).
22. Eley D. D., Nature, **162**, 819 (1948).
23. Eley D. D., Research, **12**, 1293 (1959).
24. Eley D. D., Discussions Faraday Soc., **27**, 242 (1959).

25. Eley D. D., Inokuchi H., *Z. Electrochem.*, **63**, 29 (1959).
26. Eley D. D., Parfitt G. D., *Trans. Faraday Soc.*, **51**, 1529 (1955).
27. Eley D. D., Spivey D., *Trans. Faraday Soc.*, **56**, 1432 (1960).
28. Eley D. D., Spivey D., *Nature*, **188**, 725 (1961).
29. Eley D. D., Spivey D., *Trans. Faraday Soc.*, **57**, 2280 (1961).
30. Eley D. D., Spivey D., *Trans. Faraday Soc.*, **58**, 405, 411 (1962).
31. Eley D. D., Willis M. R., In «Symposium on Electronic Conductivity in Organic Solids», Duke Univ. Conf. (B. H. Kallmann, ed.). Interscience, New York, 1960.
32. Eley D. D., Parfitt G. D., Perry M. J., Taysum D. H., *Trans. Faraday Soc.*, **49**, 79 (1953).
33. Eley D. D., Inokuchi H., Willis M. R., *Discussions Faraday Soc.*, **28**, 54 (1959).
34. Epstein A., Wildi B. S., *J. Chem. Phys.*, **32**, 324 (1960).
35. Evans M. G., Gergely J., *Biochim. et Biophys. Acta*, **3**, 188 (1949).
36. Felmayr W., Wolf I., *J. Electrochem. Soc.*, **105**, 141 (1958).
37. Fernández-Morán H., *Rev. Modern Phys.*, **31**, 319 (1959).
38. Fielding P. E., Gutmann F., *J. Chem. Phys.*, **26**, 411 (1957).
39. Fox D., *J. Phys. Chem. Solids*, **8**, 439 (1959).
40. Frey H. J., Moore W. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3644 (1948).
41. Garrett C. G. B., In «Semiconductors» (N. B. Hannay, ed.), p. 634, Reinhold, New York, 1959.
42. Gränicher H., Jaccard C., Scherrer P., Steinmann A., *Discussions Faraday Soc.*, **23**, 50 (1957).
43. Hags W. A., Jennings W. H., *Discussions Faraday Soc.*, **27**, 180 (1959).
44. Hall G. G., *Rev. Progr. Phys.*, **22**, 1 (1959).
45. Hecht S., Schlaer S., Pirenne M. H., *J. Gen. Physiol.*, **25**, 819 (1942).
46. Hoffmann T. A., Ladik J., *Cancer Research*, **21**, 474 (1961).
47. Holmes-Walker W. A., Ubbelohde A. R., *J. Chem. Soc.*, p. 720 (1954).
48. Huggins C. M., LeBlanc O. H., *Nature*, **186**, 552 (1960).
49. Inokuchi H., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **27**, 1 (1954).
50. Inokuchi H., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**, 131 (1956).
51. Johnson A. W., Kay I. T., Markham E., Price R., Shaw K. B., *J. Chem. Soc.*, p. 3416 (1959).
52. Jordan P., *Naturwissenschaften*, **26**, 693 (1938).
53. Kainer H., Bijl D., Rose-Innes A. C., *J. Chem. Phys.*, **30**, 765 (1960).
54. Kallmann H., Pope M., *Nature*, **186**, 31 (1960).
55. Kasha M., *Rev. Modern Phys.*, **31**, 162 (1959).
56. Katz E., In «Photosynthesis in Plants» (J. Franck and W. E. Loomis, eds.), Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1949.
57. Kearns D. R., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2110 (1961).
58. Kepler R. G., *Phys. Rev.*, **119**, 1226 (1960).
59. King G., Medley J. A., *J. Colloid Sci.*, **4**, 1, 9 (1949).
60. Kommandeur J., Singer L. S., In Symposium on Electronic Conductivity in Organic Solids (B. H. Kallmann, ed.), Duke Univ. Conf. Interscience, New York, 1960.
61. Labes M. L., Sehr R., Bose M., *J. Chem. Phys.*, **33**, 868 (1960).
62. Ladik J., *Acta Phys. Acad. Sci. Hung.*, **11**, 239 (1960).
63. LeBlanc O. H., *J. Chem. Phys.*, **33**, 626 (1960).
64. Lonsdale K., *Proc. Roy. Soc. A* **159**, 149 (1937).
65. Lynch V. H., French C. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 382 (1957).
66. Lyons L. E., *J. Chem. Soc.*, p. 5001 (1957).
67. Lyons L. E., Morris G. C., *J. Chem. Soc.*, p. 3648 (1957).
68. Many A., Harnik E., Gerlich D., *J. Chem. Phys.*, **23**, 1733 (1955).

69. Mason R., *Nature*, **181**, 820 (1958).
70. Mason R., *Discussions Faraday Soc.*, **27**, 129 (1959).
71. Mellon E. F., Korn A. H., Hoover S. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3040 (1948).
72. Mette H., Pick H., *Z. Physik*, **134**, 566 (1953).
73. Möglich F., Schön M., *Naturwissenschaften*, **26**, 199 (1938).
74. Moss T. S., «Photoconductivity in the Elements», p. 15, Academic Press, New York, 1952.
75. Mulliken R. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 811 (1952).
76. Nelson R. C., *J. Chem. Phys.*, **19**, 798 (1951).
77. Northrop D. C., *Proc. Phys. Soc.*, **74**, 756 (1959).
78. Northrop D. C., Simpson O., *Proc. Phys. Soc.*, **67**, 892 (1954).
79. Northrop D. C., Simpson O., *Proc. Roy. Soc.*, **A234**, 123 (1956).
80. Pauling L., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 555 (1945).
81. Platt J. R., *Science*, **129**, 372 (1959).
82. Pullman A., Pullman B., *Advances in Cancer Research*, **3**, 117 (1955).
83. Pullman B., Pullman A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **36**, 343 (1959).
84. Пуцеев Е. К., *ДАН СССР*, **59**, 471 (1948).
85. Rajewsky B., Redhardt A., *Intern. Biophys. Congr.*, Stockholm, Abstracts, p. 98 (1961).
86. Riehl N. V., *Журнал Физической химии (СССР)*, **29**, 1152.
87. Riehl N. V., *Naturwissenschaften*, **43**, 145 (1956).
88. Riehl N. V., *Kolloid-Z.*, **151**, 66 (1957).
89. Rosenberg B., *J. Chem. Phys.*, **29**, 1108 (1958).
90. Rosenberg B., *J. Chem. Phys.*, **34**, 812 (1961).
91. Rosenberg B., *J. Chem. Phys.*, **36**, 816 (1962).
92. Rosenberg B., Camiscoli J. F., *J. Chem. Phys.*, **35**, 982 (1961).
93. Rosenberg B., Orlando R. A., Orlando J. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 395 (1961).
94. Schneider W. G., Waddington T. C., *J. Chem. Phys.*, **25**, 358 (1956).
95. Slough W., Ubbelohde A. R., *J. Chem. Soc.*, p. 983 (1957).
96. Smaller B., Isenberg I., Baird S. L., *Nature*, **191**, 168 (1961).
97. Snart R. S., Eley D. D. (в печати).
98. Sogo P. B., Pon N. G., Calvin M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **43**, 387 (1957).
99. Szent-Györgyi A., *Nature*, **148**, 157 (1941).
100. Szent-Györgyi A., *Nature*, **157**, 875 (1946).
101. Szent-Györgyi A., «Bioenergetics». Academic Press, New York, 1957.
102. Szent-Györgyi A., «Introduction to a Submolecular Biology». Academic Press, New York, 1960.
103. Taylor C. P. S., *Intern. Biophys. Congr.*, Stockholm, Abstracts, p. 214 (1961).
104. Теренин А. Н., *Радиотехника и электроника (СССР)*, **1**, 1127.
105. Теренин А. Н., *Proc. Chem. Soc.*, 321 (1961).
106. Теренин А. Н., Пуцеев Е. К., Акимов И., *Discussion Faraday Soc.*, **27**, 83 (1959).
107. Tollin G., Kearns D. R., Calvin M., *J. Chem. Phys.*, **32**, 1013, 1020 (1960).
108. Вартанян А. Т., *Журнал Физической химии (СССР)*, **22**, 769 (1948).
109. Вартанян А. Т. и Карпович И. А., *Журнал Физической химии (СССР)*, **32**, 274 (1958).
110. Wallwork S. C., *J. Chem. Soc.*, p. 494 (1961).
111. Weigl J. W., *J. Chem. Phys.*, **24**, 364 (1956).
112. Weiss J., *J. Chem. Soc.*, p. 245 (1942).
113. Wiksne K., Newkirk A. E., *J. Chem. Phys.*, **34**, 2184 (1961).
114. Wilk M., *Z. Elektrochem.*, **64**, 930 (1960).
115. Reucroft P. Y., *J. Chem. Phys.*, **36**, 1114 (1962).

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗУЮЩИХ СИСТЕМ

Д. ГРИН, С. ФЛЕЙШЕР

## ВВЕДЕНИЕ

Живые системы содержат разнообразные структуры, преобразующие энергию из одной формы в другую, например световую энергию в химическую, химическую — в механическую, химическую — в световую и т. д. Эти структуры (преобразующие системы) играют решающую роль в процессах жизнедеятельности клеток; без таких структур процессы, протекающие в клетке, были бы невозможны [30]. Любой физиологический процесс, например передача нервного импульса, мышечное сокращение или зрительное восприятие, протекает при согласованном взаимодействии целого ряда таких структур. Так, при передаче нервного импульса функционируют как митохондрии, так и мембранные структуры, при мышечном сокращении — митохондрии и миофибриллы, а при зрительном восприятии — митохондрии, светочувствительные палочки и колбочки сетчатки и, наконец, окончания зрительных нервов.

Различные системы, способные к преобразованию энергии, имеют ряд общих свойств. Они находятся в субклеточных частицах или мембранах, характеризующихся очень сложной структурой. Они не встречаются поодиночке, а лишь в виде скоплений большого числа повторяющихся единиц, встроенных в некоторую структурированную среду. Характерными признаками подобных систем являются высокое процентное содержание липидов и наличие ламеллярных структур типа двойных мембран.

Преобразование энергии представляет собой молекулярный процесс, протекающий за счет циклических изменений специфических веществ. Структура преобразующих систем в высокой степени приспособлена для функционирования этих специфических веществ. Хлорофилл в фотосинтезирующих хлоропластах [26], люциферин у светляка [64], родопсин в палочках и колбочках сетчатки глаза [74] и, наконец, миозин и актин в миофибриллах [75], несомненно, являются типичными представителями класса преобразующих молекул. Ключом к пониманию явлений преобразования энергии, конечно, служит механизм действия этих преобразующих молекул, но необходимо твердо помнить, что их функционирование можно изучать лишь в тех случаях, когда они входят в определенным образом организованную структуру. Структура и функция связаны собой столь тесно, что утрата одной неизбежно влечет за собой утрату другой. Так, например, для реализации последовательности событий, включающей в себя поглощение хлорофиллом фотона и перенос электрона к следующему звену цепи

переноса электронов, необходима специальная структура — хлоропласт, и если эта структура необратимо повреждена, то хлорофилл теряет способность нормально функционировать.

Сложность связей между структурой и функцией, а кроме того, трудности работы с маленькими частицами и ряд других технических факторов воздвигли труднопреодолимый барьер на пути исследования преобразующих систем. Поэтому до недавнего времени биохимики старались избегать их в своих исследованиях. Однако имелись две причины, по которым изучение одного из представителей преобразующих систем — митохондрии — нельзя было больше откладывать. Во-первых, именно в митохондриях протекают реакции цикла Кребса, т. е. они являются первичным источником освобождающейся при окислительных процессах энергии [52, 70]. Нельзя было более избежать исследований, направленных на раскрытие тайн ключевой системы синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), так как от нее прямо или косвенно заимствуется энергия, необходимая для протекания всех важнейших биохимических процессов. Во-вторых, природа происходящих в митохондриях процессов преобразования чисто химическая, и, следовательно, решение возникающих при изучении митохондрий проблем не уводило исследователей далеко от привычного мира химии.

#### ЧАСТИЦЫ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Прежде чем называть митохондрии частицами, необходимо выяснить, что мы подразумеваем под этим термином. Частицей мы называем водонерастворимый комплекс, легко выпадающий в осадок в относительно слабых гравитационных полях. Положение несколько осложняется отсутствием резкой границы между частицами и растворимыми белками. Один и тот же комплекс может в одних условиях вести себя как растворимый белок, а в других — как нерастворимая частица. Различие между частицей и растворимым белком до некоторой степени произвольно и имеет только описательную или операциональную ценность. Так, известны, с одной стороны, частицы, мономеры которых имеют относительно небольшой молекулярный вес, а с другой — растворимые белки с весьма большим молекулярным весом. Таким образом, основным признаком, по которому можно судить, имеем мы дело с частицей или нет, является не молекулярный размер данного комплекса, а наличие в его составе водонерастворимых групп.

Таким образом, так же как мы можем говорить о «чистых» водорастворимых белках, можно установить определенные критерии и для описания того, что можно назвать «чистой» частицей. Слово «чистая» означает здесь, что все частицы данного вида имеют одинаковый химический состав, хотя и могут отличаться по размерам. В настоящее время известно много способов выделения и очистки частиц; совершенствуются методы выделения и очистки от примесей вирусных, митохондриальных или субмитохондриальных частиц.

Частица может представлять собой либо отдельную молекулу некоторого белка, или его полимер, или комплекс белковых молекул, связанных друг с другом некоторым вполне определенным образом. Теоретически следовало бы ожидать, что клеточные частицы будут представлять собой случайные статистические агрегаты, однако полученные к настоящему времени экспериментальные данные опровергают этот вывод. Было показано, что при надлежащей методике выделения всегда получаются тождественные (по критерию о химическом составе частиц) молекулы или комплек-

сы, и их свойства могут быть описаны с такой же определенностью, как и для случая любого гомогенного водорастворимого белка.

Составные элементы клеточных частиц удерживаются вместе самыми разнообразными типами связей — ковалентными, гидрофобными, водородными, электростатическими и др. Если исходить из положения, что эти частицы представляют собой молекулы или комплексы молекул с высокой степенью воспроизводимости, то, очевидно, можно определить их структуру, применяя к этому специальному случаю методы классической химии. Мне хотелось бы особенно подчеркнуть эти элементарные и очевидные трюизмы, так как они подрывают основы широко распространенных воззрений, согласно которым исследование частиц выходит за рамки возможностей и компетенции химии. Наоборот, ни большие «молекулярные» размеры, ни водонерастворимость частиц не являются препятствиями для исследования их методами химии.

То, что преобразующие системы встречаются в виде частиц, вряд ли случайно; нетрудно путем логических умозаключений прийти к выводу, что такая организация действительно обладает рядом преимуществ для формирования структур. Природа, если не всегда, то по крайней мере часто, организует белки и другие компоненты частиц в виде определенных последовательностей структур. Твердое тело характеризуется определенной степенью жесткости и прочности на разрыв — качествами, которые трудно реализуемы в растворе. Образование частиц и биологическая организация — две стороны одной медали. Нерастворимость в воде и образование надмолекулярных структур представляют собой отличительные признаки биологических систем, осуществляющих преобразование энергии из одного вида в другой. Теперь уже не приходится оспаривать эти положения; необходимо отыскивать подходы для исследования гигантских молекул, составляющих преобразующие системы.

Теперь мы можем более конкретно сформулировать задачи, возникающие при исследовании преобразующих энергию систем. Эти системы состоят из отдельных нерастворимых в воде частиц, имеющих совершенно определенный состав. Они содержат некоторые специфичные белки, которые связаны друг с другом и с липидами в определенных структурных и стехиометрических соотношениях. При этом возникают три проблемы: 1) выделение частиц различных типов; 2) определение состава частиц, их структуры и расположения в этой структуре отдельных компонентов; 3) определение механизма, посредством которого осуществляется преобразование энергии. Перечисленные выше проблемы носят в значительной степени химический характер, и интересно отметить, что из всех подходов к проблемам митохондрий до настоящего времени наиболее плодотворными оказались чисто химические подходы [28].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МИТОХОНДРИЙ

Имеются два пути изучения митохондрий. Классическим методом является осуществленное в 1956 г. Чансом и Вильямсом [8] исследование интактных систем. Подвергая митохондрии воздействию различных реагентов, ингибиторов и факторов внешней среды, спектрофотометрически изучали изменения хромофорных групп. Ферментативная активность измерялась в различных условиях с использованием целого ряда методов. При этом определяли такие параметры, отражающие внешнее поведение системы, как увеличение размеров, сжатие, изменение формы. Из резуль-



татов таких опытов делались выводы о свойствах исследуемой системы. Здесь можно провести аналогию с автоматом, срабатывающим от монеты. На систему воздействуют тем или иным образом и наблюдают происходящие изменения. Недостатком такого подхода, по нашему мнению, является невозможность проникнуть «за кулисы»; поэтому мы узнаем весьма немногое непосредственно о самой исследуемой системе.

Прямые химические подходы предоставляют нам возможности для проведения более кардинальных экспериментов [28]. Митохондрию при этом разрушают до менее сложных фрагментов, каждый из которых выделяют в чистом виде, после чего определяют его свойства. При распаде на различные субъединицы полная ферментативная активность митохондрий распределяется по различным фракциям (т. е. эта активность как бы разлагается на составляющие активности, поскольку отдельные субъединицы митохондрий обладают лишь определенной частью полной активности). Черты организации системы анализируются в рамках химических представлений и изучается зависимость организации и строения системы от ее функции. Для проведения описанных выше исследований необходимо выделение митохондрий в довольно больших количествах [11]. Митохондрии при этом рассматривают как химическое целое, которое можно последовательно разлагать на составные части и затем синтезировать из этих частей исходный продукт.

Митохондрии можно исследовать с точки зрения их химического состава, структурных и физических характеристик, кинетики соответствующих реакций и ферментативной активности, а также механизмов различных процессов. Митохондрии необходимо изучать, используя самые различные подходы и методы, так как это единственная возможность достигнуть реального прогресса в понимании их функций. По-видимому, вначале это неизбежно приведет к ряду поверхностных выводов и концепций, но затем путем последовательных приближений мы сможем подойти к пониманию полной картины явления, хотя на ней неизбежно останутся белые пятна. Попытка понять общую картину происходящих в митохондриях процессов (несмотря на неизбежные несовершенства) имеет гораздо большие тактические преимущества, чем детальные исследования лишь небольшой части проблемы. Последовательное приближение к решению проблем, связанных со структурой и функцией митохондрий, включает в себя получение ответов на следующие основные вопросы.

1. Какова минимальная единица, обладающая полной митохондриальной активностью?
2. Из каких субъединиц она состоит?
3. Как связаны между собой эти субъединицы?
4. Как функционируют эти субъединицы, каждая в отдельности и в сочетании друг с другом?

Ответы на эти вопросы можно получить, исследуя явления, лежащие на границе физики, химии и биологии. Это приводит к необходимости иметь дело почти со всеми разделами биохимии — от вопросов промежуточного метаболизма до химии белков и липидов, от биохимии макромолекул до изучения роли ионов металлов и кофакторов. Как это ни странно, система, в которой различные компоненты митохондрии соединены вместе (т. е. интактные митохондрии), характеризуется большой простотой. Подлинная сложность выявляется тогда, когда отдельные части митохондрии разделены. Многочисленные химические и физические механизмы, лежащие в основе структуры и функции митохондрий, в настоящее время еще в значительной мере неясны.

СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ЧАСТИЦЫ, РЕАЛИЗУЮЩИЕ  
ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Основной функцией митохондрий является окисление пировиноградной кислоты до углекислого газа и воды (через цикл трикарбоновых кислот) и фиксация освобождающейся при этом энергии в форме макроэргической связи, получающейся при присоединении к молекуле аденозиндифосфата (АДФ) молекулы неорганического ортофосфата (синтез АТФ). Окисление пировиноградной кислоты до воды и углекислого газа может происходить в анаэробных условиях; формально цикл трикарбоновых кислот можно рассматривать как некий механизм, снабжающий высокоэнергетическими электронами «топку», где сгорают субстраты. На самом деле такой «топкой» является цепь переноса электронов, конечным акцептором которых служит молекулярный кислород [47]. Как было показано рядом исследователей [6, 46, 51], при прохождении по этой цепи пары электронов три молекулы неорганического фосфата соединяются с тремя молекулами АДФ, образуя три молекулы АТФ. Таким образом, функция митохондрий сводится к трем процессам: 1) получение высокоэнергетических электронов из субстратов цикла трикарбоновых кислот или иных соединений, 2) перенос их по цепи переноса электронов, 3) сопряжение переноса электронов с образованием АТФ.

Интактные митохондрии выполняют все эти функции. При обработке митохондрий ультразвуком они распадаются на субъединицы, которые теряют способность извлекать из субстратов электроны с высокими энергиями, но по-прежнему способны осуществлять остальные функции [57]. В качестве источника электронов при этом используются не промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, а сукцинат или дифосфопиридиннуклеотид (ДПН-Н). Если при обработке митохондрий ультразвуком не принято специальных мер предосторожности, то получающиеся при этом частицы теряют способность окислять субстраты цикла трикарбоновых кислот и вести синтез АТФ, сопряженный с переносом электронов. Это позволяет чрезвычайно упростить исследование функций митохондрий. Обработка ультразвуком дает возможность разбить митохондрии на весьма малые частицы, которые лишены набора кофакторов и ферментов, необходимых для функционирования окислительного цикла и сопряженного фосфорилирования. Интактной у них остается лишь цепь переноса электронов. Таким образом, разбивая митохондрии на те или иные субъединицы, мы можем изучать перенос электронов в чистом виде, когда он не сопряжен с синтезом АТФ, или сопряженное фосфорилирование независимо от окисления субстратов в цикле трикарбоновых кислот, или, наконец, окислительные процессы в цикле Кребса независимо от двух последующих процессов (табл. 1). Частицы, полученные при обработке митохондрий ультразвуком, или сокращенно ЧПЭ (частицы, переносящие электроны), образуют жесткую структурированную сердцевину митохондрии. Их структура напоминает мозаику, составленную из белковых и липидных компонентов. В этой центральной части отсутствуют различные вспомогательные элементы митохондрий.

Как уже говорилось выше, обработка митохондрий ультразвуком приводит к распаду их на ЧПЭ, у которых нарушена функция сопряжения электронного потока с синтезом АТФ. Возникает вопрос: не связана ли утрата этой функции с изменениями в цепи переноса электронов? Однако было показано [56, 63, 76], что сопряжение переноса электронов с фосфорилированием может быть восстановлено при добавлении к частицам ряда специфических ферментов. Это дает серьезные основания считать, что основные черты

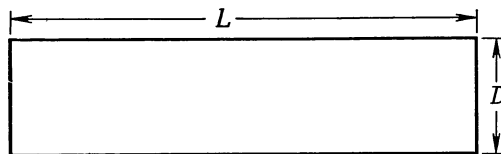
процесса переноса электронов не изменились при распаде митохондрий на ЧПЭ.

Таблица 1.  
Свойства митохондрий, ЧПЭ<sub>Н</sub> и ЧПЭ\*

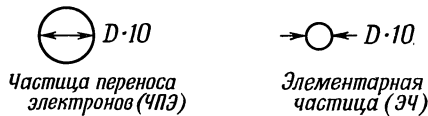
	Окисление в цикле трикарбоновых кислот	Перенос электронов	Окислительное фосфорилирование (функция сопряжения)
Митохондрии	+	+	+
ЧПЭ <sub>Н</sub>	0	+	+
ЧПЭ	0	+	0

\* Знак «+» означает наличие, а цифра «0» — потерю активности. ЧПЭ — частицы с функционирующей цепью переноса электронов; ЧПЭ<sub>Н</sub> — частицы, у которых перенос электронов сопряжен с функцией окислительного фосфорилирования.

Частицы, полученные при действии ультразвука на митохондрии характеризуются значительно меньшими размерами, чем последние [80]



Митохондрия сердечной мышцы быка (МСБ)



Частица	L	D	V
МСБ	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-13}$
ЧПЭ		$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-18}$
ЭЧ		$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-19}$

Фиг. 1. Сравнительные размеры митохондрий, выделенных из сердечной мышцы быка (МСБ), частиц, в которых реализуется перенос электронов (ЧПЭ), и элементарных частиц (ЭЧ).

Данные по митохондриям и частицам с интактной цепью переноса электронов заимствованы из работы [34]. Расчет объема (V) элементарной частицы и частицы с нормальной цепью переноса электронов сделан при допущении, что частицы обладают идеальной сферической формой с диаметрами  $1 \cdot 10^{-6}$  см и  $2 \cdot 10^{-6}$  соответственно.

Их объем примерно в 50 000 раз меньше объема неразрушенной митохондрии (фиг. 1). Другими словами, отдельная митохондрия состоит из

нескольких тысяч субъединиц, каждая из которых содержит полную цепь сопряженного с синтезом АТФ переноса электронов [34]. Когда митохондрии разрушаются ультразвуком, что приводит к образованию водонерастворимых ЧПЭ, группа ферментов, связанных с циклом окисления трикарбоновых кислот, переходит в водорастворимое состояние и, таким образом, отделяется от частиц.

Оказалось [56], что при обработке митохондрий ультразвуком частицы, сохранившие содержащийся в них ранее магний, сохраняют и способность к фосфорилированию, сопряженному с переносом заряда. Если условия обработки ультразвуком таковы, что частицы теряют содержащийся в них ранее магний, то утрачивается и способность к сопряженному фосфорилированию. Оба типа частиц, получаемых при различной обработке митохондрий ультразвуком, мы обозначили ЧПЭ, но, чтобы различать их между собой, первый тип, сохраняющий способность к синтезу АТФ, мы будем отмечать индексом «Н» (ЧПЭ<sub>Н</sub>), что отражено в табл. 1.

Если не считать высвобождающегося из митохондрий растворимого белка (в митохондриях сердца, например, на его долю приходится 20% веса), то превращение митохондрий в ЧПЭ происходит количественно. Это означает, что по крайней мере для митохондрий сердца на долю ЧПЭ приходится около 80% сухого веса митохондрий, т. е. митохондрии в основном состоят именно из этих частиц.

Получение частиц, в которых осуществляется перенос электронов, знаменовало собой новый этап исследования, ибо теперь при изучении митохондриальных систем можно было иметь дело с более простым объектом, а это значительно облегчало задачу. В распоряжении исследователей оказалась относительно простая, стабильная система, которая позволяла сравнительно просто исследовать одну из основных функций митохондрий — перенос электронов.

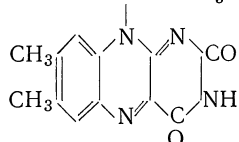
### ЦЕПЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Цепь переноса электронов представляет собой как бы структурированную мозаику из белков и липидов. Эта система содержит набор различных осуществляющих окислительно-восстановительные реакции компонентов, через которые электроны переходят от сукцината или ДПН-Н к молекулярному кислороду [31]. Последовательность этих компонентов и их стехиометрические соотношения постоянны для данной цепи. Иными словами, цепь переноса электронов представляет собой воспроизводимое и единое целое. Лишь сложность устройства отличает такую интегрированную единицу от классического белка.

Цепь переноса электронов состоит по крайней мере из шести различных белков с функциональными группами, обеспечивающими участие этих белков в окислительно-восстановительных процессах; кроме того, сюда входит один белок, лишенный подобных групп (о нем будет говориться позднее). Группа белков, способных участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, состоит из двух флавопротеидных ферментов и четырех цитохромов (фиг. 2). Согласно неопубликованным данным, полученным одним из авторов настоящей статьи с сотрудниками [81, 82], эти белки содержатся в следующих пропорциях: на каждую молекулу флавопротеида сукцинатдегидрогеназы ( $\Phi_c$ ) приходится одна молекула флавопротеида ДПН-Н-дегидрогеназы ( $\Phi_d$ ), одна молекула цитохрома  $c_1$ , три молекулы цитохрома  $b$  и шесть молекул цитохрома  $a$ . Кроме того, на каждую молекулу сукцинатдегидрогеназы ( $\Phi_c$ ) приходится по крайней мере одна моле-

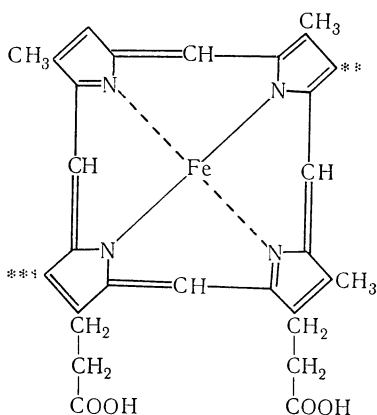
Белок	Символ	Функциональная группа	Металл (не геминный)
Сукцинатдегидрогеназа	Ф <sub>С</sub>	Флавиндинуклеотид (1)	Железо (3)
ДПН-Н-дегидрогеназа	Ф <sub>Д</sub>	Флавиндинуклеотид (1)	Железо (3)
Цитохром <i>a</i>	<i>a</i>	Цитодейтерогем (2)	Медь (4)
Цитохром <i>b</i>	<i>b</i>	Протогем (2)	
Цитохром <i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	Мезогем (2)	
Цитохром <i>c</i>	<i>c</i>	Мезогем (2)	

1. Рибитил—НО<sub>3</sub>РОРО<sub>3</sub>Н—Рибоза—Аденин

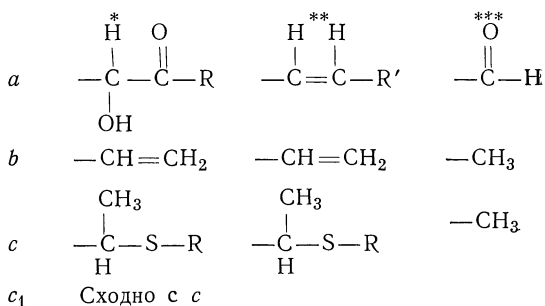


Флавиндинуклеотид

2.



Геминное кольцо



3.

Негеминное железо

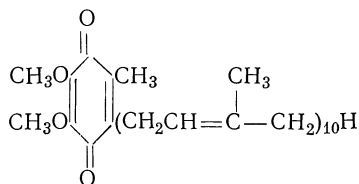
1. Соединено с Ф<sub>С</sub> [Ф<sub>С</sub> (Fe)<sub>5</sub>]
2. Соединено с Ф<sub>Д</sub> [Ф<sub>Д</sub> (Fe)<sub>5</sub>]
3. Соединено с *b* + *c*<sub>1</sub> [(*b*)<sub>2</sub>—Fe—*c*<sub>1</sub>]

4.

Медь

Соединено с *a* [*a*—Cu]

5.



Кофермент Q<sub>10</sub> (Убихинон)

Фиг. 2. Шесть окислительно-восстановительных белковых компонентов цепи переноса электронов и кофермент Q.

кула цитохрома *c*, но по причинам, которые станут ясны в дальнейшем, мы не будем уточнять количество этого белка в цепи переноса электронов.

Кроме флавиновых и геминовых групп, связанных с шестью перечисленными выше белками (по одной флавиновой или геминовой группе на каждую молекулу белка), имеются и две дополнительные связанные с белками группы, которые тоже способствуют протеканию окислительно-восстановительных реакций. Так, с некоторыми группами  $F_c$ ,  $F_d$  и цитохромов *b* и  $c_1$  связано железо в форме, отличной от ферропорфиринов. С белком цитохрома *a* связана медь. На одну молекулу  $F_c$  в цепи переноса электронов приходится около 11 атомов негеминового железа и приблизительно 4 атома меди.

И, наконец, для полноты списка необходимо упомянуть еще об одном дополнительном участнике окислительно-восстановительных процессов — коферменте Q (убихиноне). Он представляет собой полностью замещенный бензохинон с длинной боковой цепью, состоящей из 10 изопреноидных групп у 5-го атома углерода в кольце. На каждую молекулу  $F_c$  в цепи переноса электронов приходится около 15 молекул кофермента Q.

Перечисленные в этом параграфе соединения имеет смысл разбить на две группы. В первую войдут такие компоненты цепи переноса электронов, как кофермент Q и цитохром *c*, которые могут быть легко экстрагированы из митохондрий или частиц ЧПЭ и так же легко введены обратно на свои места; ко второй группе относятся остальные окислительно-восстановительные компоненты, которые лишь с трудом могут быть извлечены из цепи переноса электронов. Соединения первой группы представляют собой подвижные компоненты цепи. Вещества же, вошедшие во вторую группу, фиксированы в структуре цепи переноса электронов. В связи с вышеизложенным отметим, что приготовление из митохондрий субмитохондриальных частиц сопровождается экстракцией части цитохрома *c* и для восстановления полной ферментативной активности частиц необходимо добавлять к ним этот белок.

#### ФРАГМЕНТАЦИЯ И РЕКОНСТРУКЦИЯ ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Цепь переноса электронов напоминает нечто вроде деревянной головоломки, которую можно расчленить на составные элементы только одним способом. Цепь можно разложить на отдельные функционирующие части лишь в том случае, если разделение будет вестись по естественным линиям раздела, где силы связей наиболее слабы. Липиды являются одним из основных связующих веществ, удерживающих вместе различные части цепи переноса электронов. Поэтому для разложения цепи пригодны лишь те реагенты, которые могут разрывать связи типа липид — белок или липид — липид. Фактически для этого могут быть использованы лишь весьма немногие реагенты. К ним относятся холат и дезоксихолат (желчные кислоты), третичный амиловый спирт и бутиловый спирт (класс низших спиртов) и, наконец, циклогексан и петролейный эфир (углеводороды). Отметим, что желчные кислоты эффективны лишь в присутствии солей, тогда как углеводороды эффективны в присутствии желчных кислот.

В нашей лаборатории было показано [18, 19], что в условиях, когда частицы, содержащие интактную цепь переноса электронов, подвергаются фрагментации, содержащиеся в них липиды могут эффективно замещаться липидами, добавленными извне. Возможно, этот факт свидетельствует о том, что фрагментация цепи переноса электронов происходит за счет ослабления связей типа липид — липид или белок — липид.

Отметим попутно, что не все детергенты, действующие на связи липид — липид или липид — белок, можно успешно применять при такой фрагментации. Помимо подавляющего действия, существуют, очевидно, также весьма критические стерические и электростатические требования к реагентам, и эти факторы жестко лимитируют число возможных реагентов, с помощью которых можно осуществлять фрагментацию митохондрий.

Цепь переноса электронов может быть расчленена на четыре комплекса (I, II, III, IV). Это расчленение проходит через различные промежуточные стадии, как это видно из схемы 1 [33]:

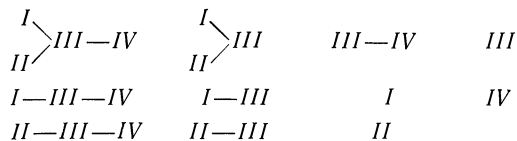


Схема 1

На приведенной выше схеме линии, соединяющие комплексы, соответствуют связям, удерживающим вместе отдельные комплексы. Каждый из четырех комплексов может быть выделен с весьма высокой степенью чистоты. Все комплексы, кроме одного, имеют «молекулярный вес» порядка 250 000 или ниже. Ниже приведены компоненты, характеризующие каждый из этих комплексов.

I. Флавин, который может быть экстрагирован трипсином, и негеминовое железо [79].

II. Флавин, экстрагируемый кислотой, и негеминовое железо [42].

III. Цитохром *b*, цитохром *c*<sub>1</sub> и негеминовое железо [43].

IV. Цитохром *a* и медь [38, 61].

Негеминовое железо, содержащееся в комплексах I, II и III, обладает различными свойствами. Так, оно характеризуется различной чувствительностью к ингибиторам и дает разные спектры электронного парамагнитного резонанса [4, 5, 16, 78]. По-видимому, химическая природа и функции этих трех типов негеминового железа характеризуются весьма высокой специфичностью. Однако до сих пор химикам не удалось найти различий между ними; поэтому все эти три типа до сих пор имеют общее название.

Расчленение цепи переноса электронов производится по функциональным критериям. Из рассмотрения схемы 2 видно, что в каждой из точек раздела, отмеченных на схеме пунктирной линией, интактная цепь переноса электронов может быть расчленена на два отрезка,

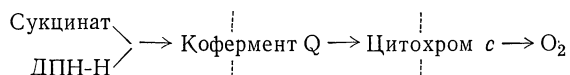
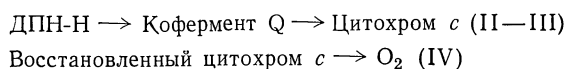


Схема 2

один из которых является окислителем того или иного компонента, а другой — восстановителем. Так, например, ДПН-Н-оксидаза, которую можно рассматривать как соединенные друг с другом комплексы II, III и IV, может быть разделена на ДПН-Н-цитохром-*c*-редуктазу, что соответствует комплексу II—III [44], и восстановленную цитохром-*c*-оксидазу (IV).







Если четыре комплекса, из которых состоит цепь переноса электронов, смешать вместе в благоприятных условиях, то они соединяются, образуя точную копию исходной системы, и, как уже говорилось выше, у этих вновь синтезированных частиц восстанавливается полная активность в отношении переноса зарядов. Несомненно, имеется ряд факторов, которые могут осложнять или даже маскировать специфичность реакций рекомбинации комплексов, но тем не менее при этом обязательно должно происходить весьма точное упорядочение расположения отдельных компонентов при их интеграции в единое целое. Подобно отдельным звеньям деревянной головоломки, четыре комплекса цепи переноса электронов должны быть связаны между собой в строго определенном порядке, и реакции рекомбинации этих комплексов должны воссоздавать этот порядок. При 0° для рекомбинации комплексов требуется несколько секунд. Но для эффективного протекания процесса рекомбинации необходимо, чтобы концентрация по крайней мере одного из комплексов была относительно высокой. Разбавление компонентов перед их смешиванием приводит к понижению скорости рекомбинации и уменьшению выхода продукта по логарифмическому закону. Если же комплексы прореагировали друг с другом, то последующее разбавление не дает никакого эффекта [34, 35, 43].

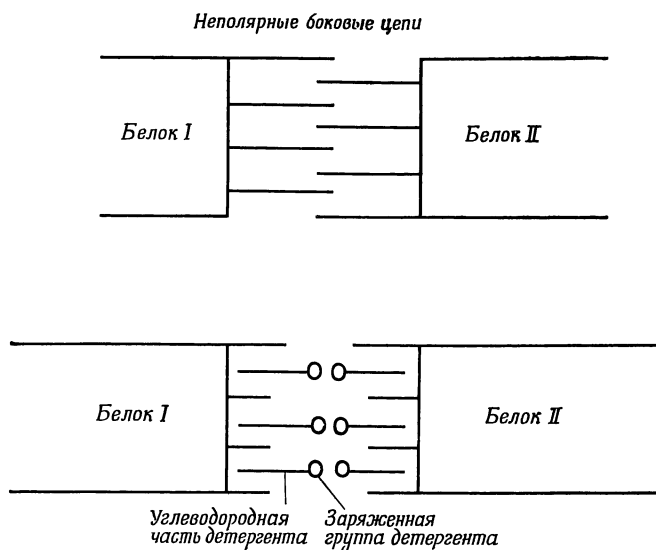
#### СТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК

От 40 до 50% белка митохондрий приходится на долю белков, которые участвуют в окислительно-восстановительных процессах, связанных с переносом электронов, и на долю ассоциированных с ними комплексов. Остальная часть представляет собой бесцветный белок, лишенный групп, ответственных за окислительно-восстановительные процессы [36]. Это так называемый структурный белок. При нейтральных значениях pH он присутствует только в полимерной форме и практически нерастворим в воде. Чтобы перевести полимеризованный структурный белок в раствор, необходимо обработать его разведенной щелочью, 60-процентной уксусной кислотой или катионными детергентами, например додецилсульфатом. Подобная обработка приводит просто к деполимеризации белка, так как он растворяется в воде лишь в мономерной форме (молекулярный вес мономера около 25 000).

Сходными свойствами обладают и цитохромы *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>. При нейтральных pH они также существуют лишь в полимерной форме, причем цитохром *c*<sub>1</sub> растворяется, а цитохромы *a* и *b* не растворяются в воде. Аналогично эти полимеры могут быть деполимеризованы до уровня мономеров обработкой разбавленными щелочами, детергентами или концентрированной уксусной кислотой. Молекулярный вес мономеров этих цитохромов относительно невелик (30 000—40 000).

Мономеризация полимеров под действием разбавленных растворов детергентов служит указанием на гидрофобную связь. Предполагается, что молекулы структурного белка и молекулы цитохромов *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> содержат области с неполярными аминокислотными боковыми цепями. Эти локализованные липидоподобные, или гидрофобные, участки и ответственны за тенденцию таких белков к полимеризации. Соединение таких гидрофобных участков двух взаимодействующих белковых молекул лежит в основе процесса полимеризации. По-видимому, все белки, у которых имеются многочисленные области с ясно выраженными гидрофобными свойствами, спонтанно полимеризуются при физиологических значениях pH. Очевидно, что для обеспечения полимеризации белков эти гидрофобные участки должны на-

ходиться близ периферии белковых молекул. Действие щелочей и концентрированных кислот сводится к тому, что последние за счет действия электростатических сил отталкивания разрывают гидрофобные связи, удерживающие молекулы белков вместе, что приводит к деполимеризации. Возможный механизм деполимеризующего действия детергентов представлен на фиг. 3. Он сводится к образованию гидрофобного комплекса белок — детергент за счет реакций смещения. Вместо комплекса белок — белок образуется комплекс белок — детергент, причем полимеризованный белок распадается



Фиг. 3.

на отдельные мономеры<sup>1</sup> [37]. Принимается, что в полимеризованном белке каждая отдельная молекула (кроме тех, которые расположены на концах) соединяется гидрофобными связями по крайней мере с двумя другими молекулами.

Легкость, с которой молекулы структурного белка образуют друг с другом гидрофобные связи, наводит на мысль, что они должны обладать аналогичными свойствами и по отношению к молекулам цитохромов. Действительно, были получены и всесторонне исследованы комплексы структурного белка с каждым из трех цитохромов [13]. Во всех трех комплексах на одну молекулу белка приходилась одна молекула соответствующего цитохрома. Все эти комплексы очень стабильны и образуются весьма легко и быстро. Расщепление этих комплексов на составляющие их белковые молекулы осуществляется под действием тех же реагентов, которые деполимеризуют полимерные формы структурного белка и цитохромов.

### ЛИПИДЫ

Около 30% сухого веса митохондрий составляют липиды [22]. Более 90% из них приходится на долю фосфолипидов. В митохондриях, выделенных из сердечной мышцы быка, основную массу фосфолипидов [98] состав-

<sup>1</sup> Фактически при этом образуются комплексы отдельных молекул белка с молекулами детергента.— *Прим. перев.*

ляют четыре: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозит и кардиолипин (полиглицерофосфатид).

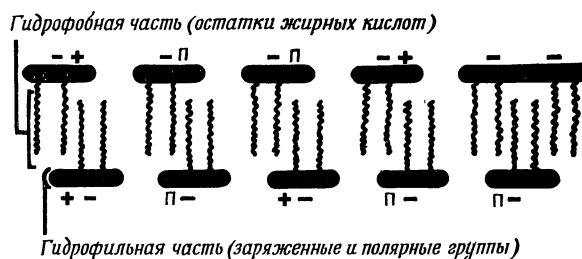
Если не преследуется цель получения из митохондрий частиц с определенными функциями и фрагментация ведется бессистемно, то получающиеся при этом частицы характеризуются самым различным содержанием липидов — от 0 до 96% по весу. Однако когда обработка ведется с целью сохранения определенных функций интактных систем, то содержание в этих частицах липидов примерно такое же, как и в исходных митохондриях, т. е. около 30% [22].

Характерными свойствами липидов являются их растворимость в органических растворителях и нерастворимость в воде. Если, например, триглицерид встряхнуть с водой, то он отделяется от нее, образуя отдельную рыхлую фазу, причем в водной фазе не удается найти даже следов триглицерида. Фосфолипиды, однако, принципиально отличаются от нейтральных липидов тем, что у них на конце имеется полярная группа; боковые цепи у обоих классов липидов неполярны. В принципе бимодальные молекулы могут ориентироваться в воде таким образом, что у них появляется тенденция к образованию мицелл. В нашей лаборатории различные митохондриальные фосфолипиды были исследованы в водной фазе по отдельности и в смеси [20]. Препараты получались оптически чистые или, в худшем случае, имеющие слабую опалесценцию. В этих оптически чистых «растворах» фосфолипидов имелись мицеллы, в которых полярные группы были ориентированы к периферии, а неполярные углеводородные цепи были повернуты внутрь мицелл [40, 66] (фиг. 4). Стабильность фосфолипидных мицелл определяется рядом факторов: природой заряда электрически активных групп, степенью ненасыщенности остатков жирных кислот, наличием в мицелле примесей и т. д. Мицеллы, образованные смесью различных фосфолипидов, сильно отличаются по своим свойствам от мицелл, образованных каким-либо одним фосфолипидом. Сильное влияние на форму, размеры и другие свойства мицелл, особенно на их способность включать в себя неполярные водонерастворимые молекулы, оказывает степень ненасыщенности остатка жирной кислоты данного фосфолипида. Если природные фосфолипиды, которые характеризуются высокой степенью ненасыщенности остатков жирной кислоты, гидрогенизировать до насыщения, то в воде уже не получают оптически чистые тонкодисперсные взвеси мицелл [20, 66]. Таким образом, свойства мицелл сильно зависят от множества факторов, и именно поэтому существует столь большое количество различных типов мицелл. Природа в процессе эволюции «научилась» весьма изобретательно использовать различные физические и химические свойства молекул, объединившихся в мицеллы.

В связи с обсуждением различных свойств мицелл нужно отметить следующий факт: многие соединения, обычно нерастворимые в воде, могут солюбилизироваться при взаимодействии с фосфолипидными мицеллами. Так, кофермент Q и холестерин — два совершенно не растворяющихся в воде вещества — могут легко переходить в водную фазу с помощью фосфолипидных мицелл в количестве, достигающем до 20% веса последних [3, 18]. Вряд ли можно сомневаться, что перенос различных водонерастворимых соединений в крови также частично происходит за счет использования фосфолипидных мицелл. (Встречаются также модификации мицелл, образующиеся при присоединении к ним некоторых специфических белков; такие системы обычно называются липопротеидами.)

Принимая во внимание все эти замечательные свойства молекул фосфолипидов, вряд ли можно отнести за счет случайностей эволюционного

развития то обстоятельство, что основную массу липидов митохондрий составляют фосфолипиды и что остатки жирных кислот этих фосфолипидов характеризуются высокой степенью ненасыщенности. Учитывая всю совокупность приведенных выше фактов и соображений, свидетельствующих о наличии в митохондриях идеальных условий для образования мицелл, вряд ли можно допускать возможность существования в митохондриях или субмитохондриальных частицах фосфолипидов в виде сплошной фазы. Прямые электронномикроскопические наблюдения также не обнаруживают существования липидов в виде некоторой отдельной массы. Следовательно,



Фиг. 4. Схематическое изображение отдельного сегмента «растворимой» фосфолипидной мицеллы, полученной из смеси различных фосфолипидов.

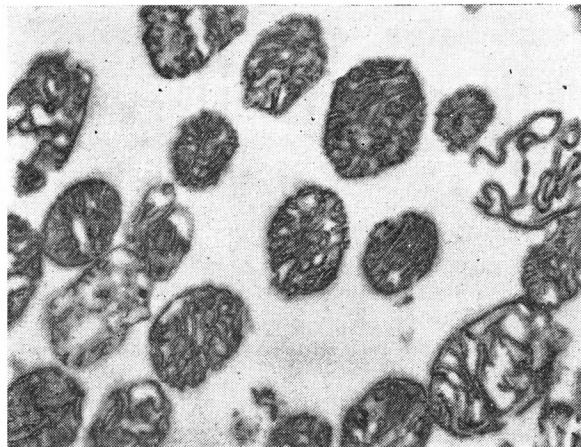
Мицелла может состоять из многих сот подобных парных образований, причем последние могут скручиваться, получаются спирали или сложные ламеллярные образования. Наиболее важным в этой структуре является чередование молекул с гидрофобными и гидрофильными поверхностями. П — полярные группы.

для правильного понимания функций фосфолипидов мы должны сосредоточить наше внимание на их способности образовывать мицеллы и на тех возможностях, которые дают эти комплексы, служа «мостиками» между водной и неводной фазами. Высокая концентрация структурированных фосфолипидов в клеточных мембранах позволяет предполагать, что фосфолипидные структуры играют определяющую роль в явлениях клеточной проницаемости.

До недавнего времени кофермент Q считался единственным липидом, абсолютно необходимым для функционирования митохондрий [53]. Мы решили получить ответ на вопрос, нужны ли какие-нибудь другие липиды для функционирования цепи переноса электронов. Имеется обширная научная литература, посвященная активирующему действию жирных кислот, спиртов и альдегидов, а также действию детергентов. Большинство этих эффектов не имеет никакого отношения к проблеме участия липидов в процессе. Мы исходили из положения, что для доказательства существенной роли липидов в функционировании цепи переноса электронов необходимо проделать следующее: 1) извлечь липиды из частиц; 2) показать, что существует корреляция между извлечением липидов и потерей активности частиц; 3) обнаружить корреляцию между восстановлением частиц и потреблением липидов. В соответствии с этой программой были разработаны методы удаления липидов из митохондрий [54]. Действительно, оказалось, что экстракция липидов приводит к потере функции переноса электронов, а последующее присоединение липидов является необходимой предпосылкой для восстановления потерянной активности [20, 21], причем эта зависимость количественная. За потерю активности и ее восстановление ответственны не липиды вообще, а именно фосфолипиды. Молекулы некоторых близких к липидам веществ, не встречающихся в митохондриях, могут до некоторой

степени заменять фосфолипиды в стимуляции активности системы переноса электронов, и этот факт несколько не противоречит утверждению, что присутствие фосфолипидов существенно необходимо для проявления ферментативной активности. По-видимому, эти молекулы обладают рядом специфических физических свойств, сходных с теми, которые определяют активность фосфолипидов в системе переноса электронов. Это напоминает применение некоторых синтетических соединений, которые могут с успехом использоваться вместо природных стероидных гормонов.

Для функционирования одного из содержащихся в митохондриях пириндинсодержащих ферментов —  $\beta$ -оксибутират-дегидрогеназы — необходимо



Фиг. 5. Электронная микрофотография водной суспензии обработанных ацетоном митохондрий [54].

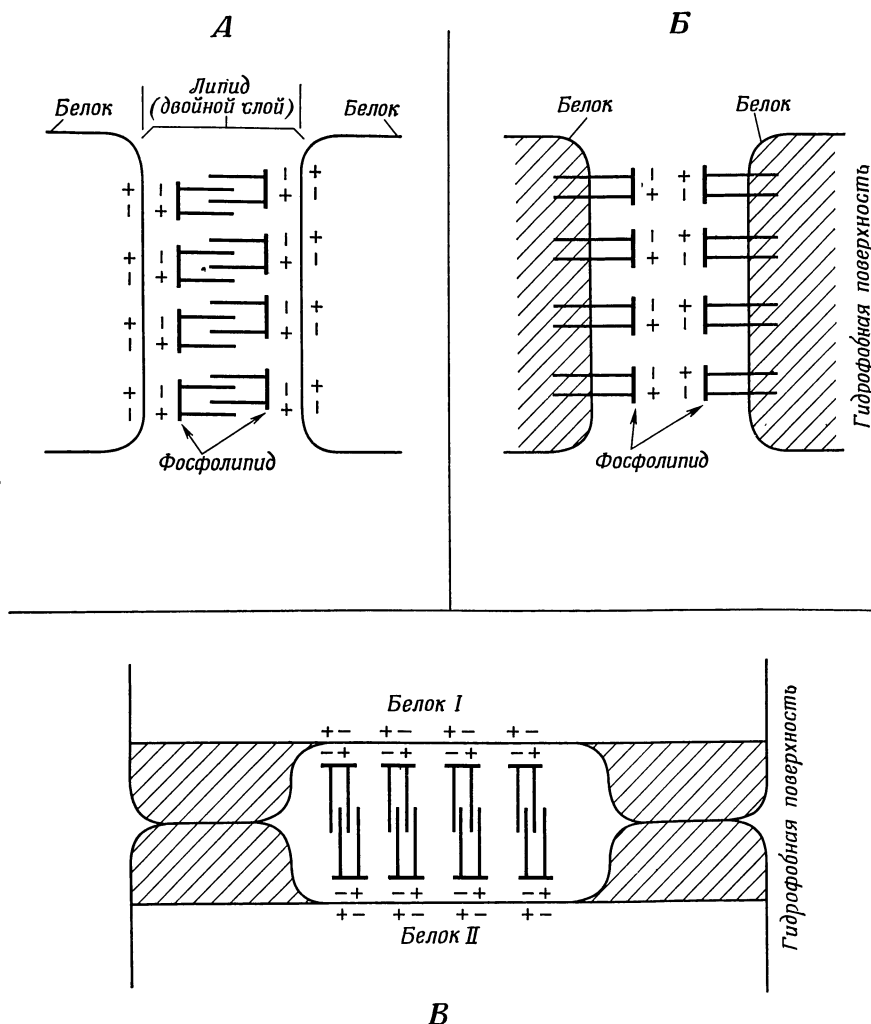
Эта обработка лишает митохондрии 75—80% содержащихся в них липидов [21].

обязательное присутствие определенного фосфолипида — лецитина. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что лецитин соединяется с белком и что ферментный белок приобретает необходимую для его активности конформацию только при комплексировании с лецитином [45, 71].

Нет никаких данных, которые указывали бы на распад митохондрий при экстракции из них липидов. Напротив, осуществить фрагментацию митохондрий после экстракции значительно труднее, чем до нее. Реагенты, весьма эффективные по отношению к нормальным митохондриям, теряют свою активность по отношению к митохондриям, из которых были экстрагированы липиды. Приведенная на фиг. 5 электронная микрофотография показывает, что после экстракции из митохондрии 75—80% фосфолипидов целостность ее структуры не нарушается и она лишь незначительно отличается от нормальной.

Недавно мы обнаружили, что содержащиеся в митохондриях фосфолипиды могут замещаться на добавленные извне водорастворимые фосфолипиды (меченные по  $R^{32}$ ); однако этот обмен фосфолипидов происходил лишь в присутствии тех соединений, которые эффективны при фрагментации митохондрий [19]. Более того, после удаления этих реагентов молекулы фосфолипидов вновь оказывались прочно связанными в митохондриях и обмен становился невозможным.

В настоящее время нет возможности дать сравнительную оценку важности различных связей (электростатических, гидрофобных и их комбинации), соединяющих белки с липидами (указанные три типа связей представлены схематично на фиг. 6). Тот факт, что величина нескомпенсирован-



Фиг. 6. Схематическое изображение различных типов связей, соединяющих липиды с белками.

А — электростатическая связь липида с белком; Б — присоединение липида к гидрофобной поверхности белка; В — электростатическое взаимодействие липида с белком в замкнутом пространстве, образующемся при взаимодействии соответствующих гидрофобных поверхностей двух белков.

ного заряда фосфолипидов определяет прочность его связи с белком (фосфолипиды, несущие лишь отрицательные заряды, более реакционноспособны, чем фосфолипиды, несущие как положительные, так и отрицательные заряды), как будто свидетельствует о первостепенном значении электростатических сил. Однако в этом случае возникают большие затруднения при объяснении действия желчных кислот.

К счастью, теперь появилась возможность изучать взаимодействие фосфолипидов с белками на модельных системах. Возможно, что работа в этом направлении приведет к появлению критерия, который позволит сделать выбор между различными типами связей. Цитохром *c* образует с фосфолипидами растворимые в углеводородах мицеллы [77], что является существенным свидетельством в пользу электростатического характера сил, связывающих молекулы цитохрома с молекулами фосфолипидов. Далее известно, что при смешении некоторых фосфолипидов происходит образование мицелл, тогда как индивидуальные фосфолипиды, взятые по отдельности в тех же экспериментальных условиях, совсем не образуют мицелл (неопубликованные данные авторов). Разгадка этого явления, вероятно, кроется в распределении зарядов на молекуле белка.

Исследование подобных модельных систем, возможно, избавит биохимиков от необходимости основываться лишь на различных гипотезах о природе взаимодействия липидов с белками. Теория в этом вопросе сильно отстала от практических потребностей, и сейчас назрела необходимость сократить этот разрыв.

### КОНЦЕПЦИЯ ЭЛЕМЕНТАРНОЙ ЧАСТИЦЫ

Сравнение объемов ЧПЭ и митохондрий дает возможность рассчитать примерное число таких частиц в последней. Митохондрии, выделенные из сердечной мышцы быка, имеют форму правильного круглого цилиндра с закругленными концами [34] (см. фиг. 1). Средние размеры митохондрий таковы: длина порядка  $1,6 \cdot 10^{-4}$  см, а радиус порядка  $2 \cdot 10^{-5}$  см. Объем такого цилиндра составляет  $1,8 \cdot 10^{-13}$  см<sup>3</sup>. При обработке митохондрий ультразвуком, когда они распадаются на отдельные частицы, сохранившие функцию переноса электронов (ЧПЭ), последние имеют «молекулярный вес» порядка  $4,6 \cdot 10^6$  (цифра получена на основании анализа химического состава частиц). Если допустить, что частицы имеют сферическую форму, то нетрудно подсчитать их объем при данном «молекулярном весе»; этот объем составит примерно  $6 \cdot 10^{-18}$  см<sup>3</sup>. Отсюда следует, что каждая митохондрия может включать в себя до  $1,8 \cdot 10^{-13} / 6 \cdot 10^{-18}$ , т. е. 30 000 отдельных частиц в том случае, если в ней нет пустых пространств. Поскольку структурированные образования занимают не более 50% полного объема митохондрий, более вероятным числом будет 15 000. В каждой частице на долю белков приходится примерно  $3 \cdot 10^6$  молекулярных весовых единиц. Если учесть содержащиеся в частицах липиды, то наиболее вероятная величина их «молекулярного веса» составляет приблизительно  $4 \cdot 10^6$  [34]. Каждая такая частица содержит по одной молекуле сукцинатдегидрогеназы и ДПН-Н-дегидрогеназы и соответствующее число молекул других компонентов цепи переноса электронов, о которых говорилось ранее. Согласно всем химическим критериям, такая частица является наименьшей субъединицей, еще сохраняющей митохондриальные функции.

Однако два обстоятельства привели к переоценке этого положения: 1) мы показали [36], что на долю тех типов структурного белка, которые не имеют групп, позволяющих им участвовать в окислительно-восстановительных процессах, приходится 50—60% общего веса всех белков митохондрии; 2) электронномикроскопические исследования Фернандез-Морана показали, что митохондрии содержат многократно повторяющиеся субъединицы с диаметром порядка 125 Å и предполагаемым «молекулярным весом»  $1,2 \cdot 10^6$  (неопубликованные данные). Обнаружение этих субъединиц наводит на мысль, что частицы, осуществляющие перенос электронов к молекуляр-

ному кислороду, состоят из подобных субъединиц и структурного белка и что существует возможность отделить эти субъединицы от окружающего их структурного белка. Действительно, частицы подобных размеров удалось выделить в нашей лаборатории (Од, Блер и Грин, неопубликованные данные). Они также содержат все компоненты цепи переноса электронов, но в концентрациях втрое более высоких, чем в интактных митохондриях (табл. 2).

Таблица 2  
Сравнение концентрации компонентов и активности митохондрий и элементарных частиц

	Митохондрии, тмоль на 1 мг белка	Элементарные частицы, тмоль на 1 мг белка
Ф <sub>C</sub> . . . . .	0,23	0,81
Ф <sub>D</sub> . . . . .	0,26	0,81
Цитохром <i>a</i> . . . . .	1,53	5,00
Цитохром <i>b</i> . . . . .	0,72	2,62
Цитохром <i>c</i> + <i>c</i> <sub>1</sub> . . . . .	0,43	1,12
Медь . . . . .	1,3	3,8
Негеминное железо . . . . .	3,3	—
Сукцинатоксидазная активность, число μмолей сукцината, окисленного за 1 мин, на 1 мг белка . . . . .	1,0	3,0

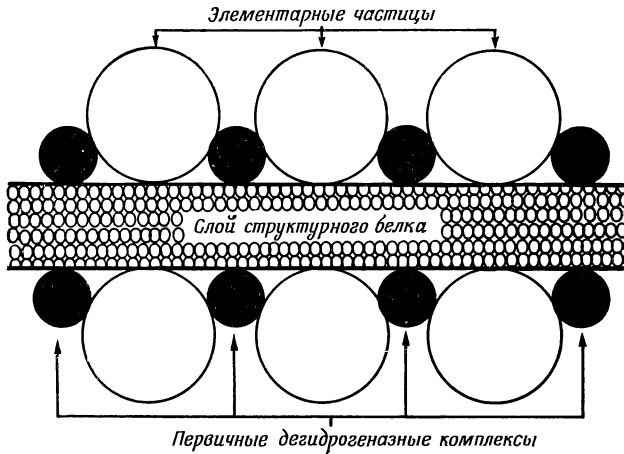
Получение этих частиц, которые Фернандец-Моран называет «элементарными частицами», сопровождается разделением митохондрий на три фракции: 1) бесцветный структурный белок; 2) интенсивно окрашенная фракция, состоящая из «элементарных частиц»; 3) надосадочная фракция, содержащая водорастворимые белки и прочие соединения, освобожденные при разделении митохондрий (Грин, неопубликованные данные). Содержащийся в исходных митохондриях белок разделяется на три фракции таким образом: 60% — структурный белок, 20% — белок элементарных частиц и 20% — в надосадочной фракции. Вся сукцинатоксидазная и ДПН-Н оксидазная активность исходных митохондрий локализована в элементарных частицах. Мы думаем, что, основываясь на приведенных здесь экспериментальных данных, мы вполне можем отождествлять наши частицы с «элементарными частицами» Фернандец-Морана, имеющими диаметр около 125 Å.

Элементарные частицы катализируют окисление сукцината и ДПН-Н молекулярным кислородом через цепь переноса электронов, и этот процесс подавляется теми же специфическими реагентами, которые подавляют окисление субстратов интактными митохондриями. Однако два других процесса, присущих интактным митохондриям, — цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование — уже не идут в элементарных частицах. Можно показать, что ферменты, ответственные за протекание цикла трикарбоновых кислот, экстрагируются в процессе получения элементарных частиц. Эти ферменты обычно входят в комплексы, которые в нормальных условиях довольно тесно связаны со структурами цепи переноса электронов, но легко



переходят в свободное состояние при обработке митохондрий ультразвуком или при действии на них желчных кислот (что имеет место при получении элементарных частиц). Утрата элементарными частицами функции окислительного фосфорилирования в значительной мере также связана с потерей ряда ферментов, осуществляющих сопряжение электронного потока со связыванием фосфата.

Элементарные частицы располагаются на внешних мембранах и внутренних перегородках (кристах) митохондрий в виде двойных рядов. Легкость, с которой ферменты цикла трикарбоновых кислот теряются при получении элементарных частиц, наводит на мысль, что различные комплексы,



Фиг. 7. Схема фиксации первичных дегидрогеназных комплексов в промежутках между элементарными частицами.

содержащие эти ферменты, возможно, располагаются между спаренными элементарными частицами (примерная схема их упаковки показана на фиг. 7). Согласно этой интерпретации, структуры типа двойных мембран образуют нечто вроде молекулярных ячеек, в которых и фиксируются различные комплексы. Силы, связывающие эти комплексы с элементарными частицами и с матриксом структурного белка, могут быть относительно слабыми, но тем не менее при наличии спаренной структуры системы в целом остается стабильной. При нарушении такой структуры силы, связывающие комплексы с элементарными частицами, ослабляются настолько, что происходит их разделение. Нельзя недооценивать значение стерического фактора в общем комплексе факторов, обеспечивающих связь отдельных компонентов в интактных митохондриях. Интересно отметить, что при фрагментации митохондрий с целью получения элементарных частиц комплексы, несущие в себе ферменты цикла трикарбоновых кислот, обнаруживаются лишь во фракции, содержащей структурный белок.

#### МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Когда четыре комплекса, о которых говорилось ранее, соединены между собой надлежащим образом, они образуют цепь, по которой электроны переносятся от сукцината или ДПН-Н на молекулярный кислород (схема 4).

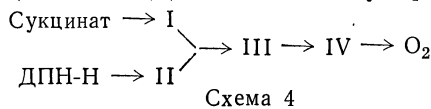


Схема 4

Между последовательно расположенными комплексами (I и III; II и III; III и IV) электроны переносятся за счет челночных движений специфических и весьма мобильных коферментов. Так, например, кофермент Q осуществляет связь между комплексами I и III и II и III; цитохром *c* — между комплексами III и IV. Эти мобильные коферменты служат акцепторами электронов по отношению к предшествующему им в цепи комплексу и донорами электронов по отношению к последующему комплексу. Каждый комплекс имеет по крайней мере две связанные группы, обеспечивающие его участие в окислительно-восстановительных реакциях, и, кроме того, еще две аналогичные в функциональном отношении группы, которые могут диссоциировать (табл. 3).

Таблица 3

## Связанные и способные к диссоциации группы комплексов цепи переноса электронов\*

Комплекс	Связанные группы	Группы, способные диссоциировать	Последовательность	Источник данных
I	$\Phi_C$ ; Fe; <i>b</i>	Сукцинат; Q	Сукцинат $\rightarrow \Phi_C \rightarrow Fe \rightarrow Q$	[79]
II	$\Phi_D$ ; Fe	ДПН-Н; Q	ДПН-Н $\rightarrow \Phi_D \rightarrow Fe \rightarrow Q$	[42]
III	<i>b</i> ; $c_1$ ; Fe	$QH_2$ ; $c^{..}$	$QH_2 \rightarrow b \rightarrow Fe \rightarrow c_1 \rightarrow c$	[42]
IV**	<i>a</i> ; Cu	$c^{..}$ ; $O_2$	$c^{..} \rightarrow a \rightarrow Cu \rightarrow O_2$	[38]

\* Группы, способные к диссоциации, находятся в начале и в конце последовательности переноса электронов, катализируемой отдельными комплексами. Стрелки обозначают направление потока электронов.

\*\* Восстановленная цитохром-*c*-оксидаза (IV) представляет собой полимерную молекулу, содержащую 6 молекул цитохрома *a* и 6 атомов меди.

Смысл такого усложнения цепи переноса электронов заключается в следующем. Окисление как сукцината, так и ДПН-Н происходит в три стадии (табл. 4).

Таблица 4

## Стадии окисления сукцината и ДПН-Н

Стадия	Сукцинат	ДПН-Н
1	Сукцинат $\rightarrow Q$	ДПН-Н $\rightarrow Q$
2	$QH_2 \rightarrow c^{..}$	$QH_2 \rightarrow c^{..}$
3	$c^{..} \rightarrow O_2$	$c^{..} \rightarrow O_2$

Каждая стадия катализируется каким-либо одним комплексом. Энергия, которая освобождается при суммарном окислении ДПН-Н кислородом, делится при переносе заряда по цепи на три более или менее равные части соответственно числу комплексов-переносчиков. При окислении сукцината первая порция освобождающейся энергии меньше, чем две другие; как мы увидим в дальнейшем, возможно, это и является причиной того, что

при окислении сукцината отношение  $P/O = 2$ , тогда как при окислении ДПН-Н это отношение равно 3.

Комплексы — это наименьшие элементарные ячейки, составляющие цепь переноса электронов. Рассмотрим, например, комплекс, который катализирует окисление восстановленного кофермента Q цитохромом *c* [42]. Он содержит связанные между собой цитохромы *b* и *c*<sub>1</sub>, а также негеминное железо. Цитохромы *b* и *c*<sub>1</sub> могут быть выделены из комплекса, но при этом теряется вся его ферментативная активность. Эту активность уже не удается восстановить, смешивая цитохромы *b* и *c*<sub>1</sub> в первоначальных соотношениях [66]. Кроме того, содержащееся в интактном комплексе негеминное железо дает характерный сигнал электронного парамагнитного резонанса. Если связь между цитохромами этого комплекса разрывается, сигнал исчезает и уже не появляется даже при смешивании двух цитохромов [66].

В состав каждого из четырех комплексов элементарной частицы входит тяжелый металл (железо или медь), который дает характерные сигналы электронного парамагнитного резонанса. Заметим, что эти металлы не являются частью тетрапиррольного ядра [4, 5, 15, 19, 39]. Железо встречается в трех комплексах, в то время как медь присутствует лишь в одном — в восстановленной цитохром-*c*-оксидазе. Для того чтобы отличить железо, с которым ассоциируется сигнал электронного парамагнитного резонанса, от железа, содержащегося в геме, мы будем называть его негеминным железом. В каждом из этих комплексов железо может подвергаться циклическому восстановлению и окислению. Некоторые специфические реагенты могут оказывать на этот процесс ингибирующее действие. Так, теноилтрифторацетон является специфическим ингибитором окисления и восстановления негеминного железа, содержащегося в сукцинат-Q-редуктазе [16]; амитал ингибирует аналогичное окисление и восстановление негеминного железа, содержащегося в ДПН-Н-Q-редуктазе [42]; антимицин А ингибирует окисление-восстановление негеминного железа QH<sub>2</sub>-*c*-редуктазы [66] и, наконец, цианид оказывает такое же действие на окисление-восстановление меди восстановленной цитохром-*c*-оксидазы [39]. Совокупность имеющихся в нашем распоряжении данных говорит о том, что содержащиеся в четырех комплексах металлы действительно участвуют в цепи процессов, связанных с дыханием. Всякий специфический окислитель или восстановитель любого из четырех комплексов обязательно является окислителем или восстановителем содержащегося в нем атома тяжелого металла. Например, негеминное железо сукцинат-Q-редуктазы может быть восстановлено сукцинатом (но ни в коем случае не ДПН-Н) и окислено коферментом Q. Медь восстановленной цитохромоксидазы может восстанавливаться восстановленным цитохромом *c* и окисляться молекулярным кислородом.

В настоящее время еще не существует достаточно обоснованных объяснений роли этих металлов в комплексах дыхательной цепи. Медь легко вступает в реакцию с кислородом. Это обстоятельство хорошо согласуется с той ролью, которую играет медь в восстановленной цитохром-*c*-оксидазе. Но роль негеминного железа в трех остальных комплексах до сих пор не ясна. Быть может, существует прямая зависимость между связыванием неорганического фосфата и присутствием тяжелого металла, но пока что у нас нет данных, подтверждающих это предположение.

Процесс переноса электронов требует для своего осуществления значительно большего количества железа, чем процессы окисления-восстановления (2 : 1 по данным Дога и Циглера, в печати). Железо и медь прочно связаны с белками, и их высвобождение из комплексов происходит лишь в определенных условиях. При добавлении радиоактивного неорганического

железа равновесного замещения негеминового железа не происходит. То же справедливо и для атомов меди.

Если цепь переноса электронов разделяется на отдельные сегменты, то при этом линия раздела обязательно пройдет по какому-нибудь компоненту цепи, причем этот компонент будет поделен между образовавшимися в результате раздела комплексами. Так, у одного он будет находиться в конце, а у другого — в начале цепи переноса электронов. Все прочие компоненты, входящие в состав того или иного комплекса, будут по-прежнему прочно соединены с белком. В противоположность этому компонентам цепи, которые движутся между отдельными комплексами, являются единственными мобильными элементами системы переноса электронов. Эти подвижные компоненты ставят перед исследователями целый ряд проблем. С одной стороны, они должны быть достаточно подвижными для осуществления связи между соседними комплексами; с другой — не должны быть чересчур свободными, что могло бы повести к их быстрому удалению из частиц.

Таковыми подвижными коферментами являются ДПН, кофермент Q и цитохром *c*. Выделение из комплекса ДПН проходит очень легко; кофермент Q значительно труднее отделяется от комплекса, а цитохром *c* в этом отношении занимает промежуточное положение. Кофермент Q практически нерастворим в воде, что делает невозможным его экстракцию из водной суспензии частиц. Экстракция этого кофермента требует применения органических растворителей вроде ацетона, эфира и др. [53]. Цитохром *c* может быть выделен в виде водорастворимого белка с молекулярным весом 13 000, с сильно выраженными основными свойствами (изоэлектрическая точка при pH 11) [48, 73]. Если цитохром *c* смешивается с мицеллами, состоящими из растворимых фосфолипидов митохондрий, то образуются комплексы, легче растворимые в углеводородах, чем в воде. Имеется довольно много данных, свидетельствующих о том, что цитохром *c* присутствует в митохондриях в жирорастворимой форме [1]. Переход цитохрома *c* из водорастворимой в жирорастворимую форму протекает чрезвычайно быстро. Этот процесс обратим. Присутствие солей сильно влияет на равновесие процесса. Именно этот обратимый переход из одной формы в другую объясняет, почему при определенных условиях, например в присутствии фосфатных ионов, цитохром *c* может частично переходить в водную среду. В обычных условиях экстракция цитохрома *c* происходит лишь при использовании желчных кислот или при добавлении к частицам фосфолипазы. Экстракция же ДПН протекает так легко, что для ее предотвращения приходится принимать специальные меры. Так, при определенных условиях можно предотвратить экстракцию ДПН, используя свежую суспензию митохондрий в 0,5 М сахарозе [55]. Однако старение митохондрий, а также изменение их формы или размеров обязательно приводит к диффузии ДПН во внешнюю среду. Обработка митохондрий ультразвуком или желчными кислотами ведет к потере всего пиридиннуклеотида. Фактически нуклеотид удерживается в митохондриях лишь тогда, когда последние выдерживаются в отсутствие кислорода в особых условиях (например, в присутствии версена или сывороточного альбумина) или же в аэробных условиях, когда митохондрии активно участвуют в окислительном процессе, сопровождающемся синтезом АТФ.

В настоящее время нет недостатка в данных, свидетельствующих о том, что цитохром *c*, ДПН и даже кофермент Q слабо связаны с частицами и что любая причина, вызывающая нарушение этих связей, приводит к нарушению функционирования соответствующих комплексов. Благодаря этому взаимодействию с белком связанный кофермент приобретает ряд свойств, которыми он не обладает в свободном состоянии. Можно думать, что в свя-

занном коферменте окислительно-восстановительные процессы протекают иначе, чем в коферменте, выделенном из митохондрий. Этим и объясняется, по-видимому, разница в функционировании цепи переноса электронов с сопряженным синтезом АТФ и цепи переноса электронов при отсутствии последнего.

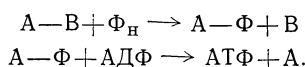
#### ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

С сожалением приходится констатировать, что, несмотря на огромные успехи, достигнутые в исследовании молекулярной структуры митохондрий, процесс сопряженного с переносом электронов фосфорилирования, в котором заключен биологический смысл биохимического аппарата митохондрий, до сих пор представляется нам загадкой. Обычное техническое устройство может работать или не работать, оно может почему-либо работать плохо, но даже в этом случае принципы его работы не изменятся. Иное положение с микроскопическими трансформирующими устройствами — митохондриями. Они могут осуществлять перенос зарядов по цепи переноса электронов как при наличии, так и при отсутствии сопряженного фосфорилирования. Так, при добавлении к митохондриям 2,4-динитрофенола перенос электронов по цепи уже не сопровождается синтезом АТФ [14, 58]. Не менее интересен и тот факт, что прекращение сопряженного синтеза АТФ может происходить даже без воздействия специальных реагентов. Известно, что после замораживания или инкубации при 0° суспензия митохондрий может утратить функцию сопряженного фосфорилирования. С помощью методов, имеющих в нашем распоряжении, в митохондриях не удается обнаружить при этом никаких качественных изменений. В них присутствуют все компоненты цепи переноса электронов; электроны идут по ним в той же последовательности, однако поведение системы существеннейшим образом меняется. Мы можем указать на две возможные причины прекращения сопряженного с переносом электронов синтеза АТФ. Допустим, что возникновение потока электронов вызывает установление определенной связи между некоторыми компонентами цепи А и В. В дальнейшем эта связь преобразуется или распадается таким образом, что заключающаяся в ней энергия используется для синтеза АТФ. Тогда повреждение ферментного аппарата, ответственного за преобразование связи между А и В, вызовет нарушение сопряженного фосфорилирования. При этом не происходит использования энергии связи А с В для синтеза; комплекс АВ спонтанно распадается на отдельные составляющие А и В, а освобождающаяся энергия связи переходит в тепло. В ряде случаев такое объяснение прекращения сопряженного с электронным потоком синтеза АТФ, вероятно, правильно. Например известно, что частицы, полученные при обработке митохондрий ультразвуком, осуществляют функцию сопряженного фосфорилирования лишь тогда, когда к ним добавляется водорастворимый компонент митохондрий, ушедший в процессе фрагментации в раствор [56, 63]. Очевидно, в этом частном примере водорастворимый компонент имеет прямое отношение к трансформации первичной высокоэнергетической связи, приводящей к образованию АТФ. Таким образом, по крайней мере в этом случае, можно считать, что в основе нарушения сопряжения фосфорилирования с переносом электронов лежит не потеря частицами способности к образованию таких связей, а отсутствие одного или нескольких факторов, катализирующих преобразование энергии этой связи в макроэргическую связь АТФ.

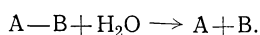
Очень важно осознать, что, каков бы ни был механизм сопряжения фосфорилирования с переносом электронов, первичная богатая энергией связь может возникнуть лишь между теми компонентами цепи переноса электро-

нов, которые участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Таким образом, говоря об образовании первичной высокоэнергетической связи между компонентами А и В, мы подразумевали, что либо оба эти компонента, либо один из них являются компонентами цепи переноса электронов, непосредственно участвующими в окислительно-восстановительных процессах.

Быть может, эта концепция нуждается в некотором развитии, чтобы облегчить обоснование других возможных объяснений механизма сопряженного фосфорилирования. Превращение энергии связи А — В в энергию макроэргической связи АТФ может происходить различными путями, но, поскольку в основе развиваемой нами гипотезы не лежит какой-либо конкретный механизм, можно допустить, что эта конверсия происходит следующим образом:



В том случае, когда механизм сопряженного фосфорилирования нарушен, комплекс А — В не взаимодействует с неорганическим фосфатом, а распадается гидролитически на компоненты А и В:



Вернемся, однако, к рассмотрению частиц, получающихся при обработке митохондрий ультразвуком. Независимо от того, осуществляется ли в них сопряженное фосфорилирование или нет, скорость электронного потока в них одна и та же. Отсюда вытекает, что скорость передачи энергии комплексов А — В на АТФ при наличии у частиц сопряженного фосфорилирования равна скорости спонтанного распада комплекса А — В на А и В при прекращении синтеза АТФ. В присутствии же фактора, обеспечивающего сопряжение, процесс спонтанного гидролитического распада А — В не происходит и распад на составляющие компоненты идет лишь при последовательном взаимодействии АВ с ортофосфатом и АДФ. Динитрофенол нарушает течение процессов, приводящих к синтезу АТФ; фактор сопряжения предотвращает гидролитическое разложение комплекса А — В. Необходимость решения на молекулярном уровне вопроса о том, как система выбирает тот или иной путь перехода из одного состояния в другое, делает проблему сопряженного фосфорилирования столь увлекательной и столь трудной.

Однако имеется еще одна гипотетическая возможность для объяснения прекращения сопряженного с переносом электронов фосфорилирования. Допустим, что протекание потока электронов не вызывает образования стабильной связи между компонентами А и В. Вернее, связь может образоваться, но среднее время ее существования так мало, что любые ферментативные взаимодействия исключаются. Возможно, что именно к этому сводится реальная проблема сопряженного фосфорилирования. Предположим, что протекание зарядов по цепи переноса электронов приводит к образованию связей между некоторыми тремя парами компонентов (А — В; С — D; E — F). Только в том случае, когда митохондрии пребывают, так сказать, в нормальном состоянии, образовавшиеся связи стабильны. Если же частицы испытали некую деформацию или были каким-то образом модифицированы, то взаимосвязь между А и В, С и D, E и F нарушается и вместо стабильных связей образуются метастабильные связи, которые уже не могут быть использованы трансфосфорилирующими ферментами.

Получается нечто вроде физического принципа неопределенности на уровне митохондрий. Интактные митохондрии достаточно стабильны, но

как объект изучения они чересчур сложны. Если же митохондрии разбираются на мелкие частицы, которые открывают богатые возможности для изучения протекающих в них процессов, то нестабильность первичных высокоэнергетических связей сводит на нет достигнутые при этом преимущества, связанные с упрощением объекта. Эти трудности являются, вероятно, лишь временными, однако без их преодоления вряд ли возможен существенный прогресс в понимании механизма сопряженного фосфорилирования.

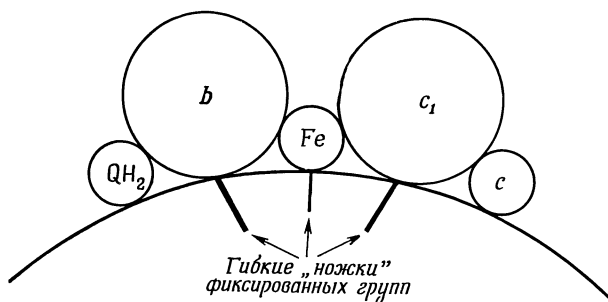
Основу проблемы механизма сопряженного фосфорилирования составляет вопрос о природе комплекса А — В. Образование связи между А и В вследствие прохождения зарядов по цепи переноса электронов означает консервацию энергии. В этом и состоит первичный процесс сопряжения. Распад комплекса А — В на А и В, который совершается в присутствии АДФ и неорганического ортофосфата и сопровождается синтезом АТФ, является вторичным процессом окислительного фосфорилирования, не связанным с первичным процессом. Имеются достаточно веские основания считать, что из четырех комплексов, составляющих цепь переноса зарядов частицы, три образуют между собой высокоэнергетические связи, о которых говорилось выше. Но при этом ничего не известно о том, какие пары окислительно-восстановительных компонентов в каждом из трех комплексов включаются в образование этих связей и какова природа этих связей.

В цепи переноса электронов имеется около 10 пар групп, непосредственно взаимодействующих друг с другом в окислительно-восстановительных процессах, и происходит лишь три фосфорилирования. Так как окислительное фосфорилирование представляет собой высокоэффективный процесс, то запасание энергии лишь в 3 из 10 последовательных окислительно-восстановительных реакций цепи переноса электронов не только было бы очень невыгодным, но нам кажется сомнительным, чтобы более чем одна окислительно-восстановительная пара соединений могла поставлять энергию, достаточную для синтеза АТФ. Если же цепь переноса электронов в каждом из комплексов эквивалентна одной окислительно-восстановительной системе, то полная энергия, освобождающаяся при окислении субстрата, может запасаться в этих комплексах и каждый из них будет превращать одну молекулу АДФ в АТФ.

Рассмотрим с точки зрения этой гипотезы какой-нибудь комплекс цепи переноса электронов. Так,  $\text{QH}_2$ -цитохром-*c*-редуктазу можно рассматривать как комплекс цитохромов *b* и *c*<sub>1</sub> с негеминовым железом, которое каким-то образом соединяется с обоими цитохромами и служит как бы «электронным мостиком» между ними [42, 66]. Кроме того, белковая часть молекулы цитохрома *b* имеет особый участок, к которому специфически присоединяется восстановленный кофермент Q, а белковая часть молекулы цитохрома *c*<sub>1</sub> имеет особый участок для специфического соединения с цитохромом *c*. Этот комплекс содержит также липиды, которые могут составлять до 28% его веса. Наиболее разумным развитием данной гипотезы является допущение, что наш комплекс служит наименьшей единицей, осуществляющей перенос электронов. Металл и флавины, с которыми он соединен в молекулах металлфлавопротеидов, рассматриваются не как отдельные группы, а как части единого резонансного комплекса [59].  $\text{QH}_2$ -цитохром-*c*-редуктаза (так же как и три других комплекса цепи переноса электронов) содержит несколько окислительно-восстановительных групп, которые могут находиться достаточно близко друг к другу, чтобы образовать непрерывную цепь, по которой электроны плавно переходят от одного компонента к другому. Все будет происходить так, как если бы все компоненты комплекса объединились в единую окислительно-восстановительную систему, которая

катализирует перенос электронов от  $\text{QH}_2$  к цитохрому  $c$  (фиг. 8.). Однако независимо от действительного механизма переноса электронов совершенно ясно, что в любом случае энергия, полученная при нескольких последовательных этапах окисления-восстановления, должна быть запасена для реализации акта синтеза молекулы АТФ.

Накапливаются данные, согласно которым перенос электронов внутри комплексов осуществляется за счет взаимодействия примыкающих друг к другу функциональных окислительно-восстановительных групп. Эти группы (например, лизиновая группа), соединенные с соответствующими белками посредством гибких молекулярных «ножек», или связей, расположены столь близко друг к другу, что могут соударяться при вращательных



Фиг. 8. Размещение пяти окислительно-восстановительных компонентов комплекса  $\text{QH}_2$ -цитохром- $c$ -редуктазы, обеспечивающее образование непрерывной цепи.

Присоединение фиксированных групп цитохрома  $b$ , негеминного железа, цитохрома  $c_1$  к молекуле белка посредством гибких боковых цепей дает возможность сохранить вращательные и колебательные степени свободы.

или колебательных движениях. Следовательно, идея, лежащая в основе функционирования такого многокомпонентного комплекса, заключается в том, что белки закрепляются в определенных положениях внутри комплексов, а их простетические группы имеют возможность вращаться или колебаться, что приводит к столкновениям, сопровождающимся передачей электронов.

Возможно, что липидная оболочка каждого из этих комплексов является той средой, в которой может осуществляться перенос электронов по компонентам цепи окислительного фосфорилирования. Стабильность связей А — В, С — Д и Е — F может в очень сильной степени ослабляться в присутствии воды. Это означает, что проблема сохранения функции сопряженного с переносом электронов фосфорилирования в основном сводится к проблеме сохранения целостности поверхностей раздела между липидами и белками.

#### СБОРКА МИТОХОНДРИЙ *in vivo*

Интактные митохондрии содержат по крайней мере 20 различных белков и 9 отдельных комплексов. Сложность этих трансформирующих энергию систем благоприятствовала возникновению гипотезы о том, что митохондрии можно рассматривать как некоторые единые системы, строящиеся на определенной матрице. Появилась даже школа исследователей, которая приписывала митохондриям свойства самовоспроизводящейся системы. Для таких гипотез нет достаточно убедительных оснований. Наоборот, имеется много данных, говорящих о том, что процесс сборки митохондрий идет ступенчато. Восстановление цепи переноса электронов в результате



случайной агрегации четырех отдельных комплексов наводит на мысль, что для сборки митохондрии не нужно никаких управляющих факторов, кроме комплементарности соприкасающихся поверхностей [43]. Структурный белок может самопроизвольно соединяться с цитохромами и фосфолипидами [13]. Здесь снова проявляется способность отдельных компонентов митохондрии к быстрому самопроизвольному взаимодействию; специфичность структуры обеспечивает способность давать при агрегации правильные комбинации комплексов.

Имеются основания полагать, что все компоненты митохондрии синтезируются одновременно, но не обязательно в одном и том же месте живой системы, а также что они соединяются спонтанно, образуя митохондрию. Сходное явление имеет место при воссоединении двух комплементарных цепей нуклеиновой кислоты с восстановлением первоначальной двухцепочечной структуры. Исследования доктора Санади [23], касающиеся обновления митохондрий печени, привели к установлению двух интересных фактов: 1) период полусуществования митохондрий составляет около 10 дней; 2) компоненты, из которых «монтируются» митохондрии, синтезируются с одинаковой скоростью.

#### ФАРМАКОЛОГИЯ И ПРЕОБРАЗУЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Механизм действия ряда наиболее сильнодействующих фармакологических средств (аспирин, алкалоиды наперстянки, кодеин, морфий, никотин, белладонна и др.), так же как и большинства гормонов (адренкортикотропный гормон, инсулин, питуитрин, адреналин и др.), до сих пор является загадкой, несмотря на то что этой проблемой, особенно в течение последних трех лет, занимается целая армия исследователей. Все больше и больше накапливается фактов, говорящих о том, что действие этих мощных фармакологических и регуляторных агентов направлено главным образом на преобразующие энергию системы живых организмов, такие, как скелетные мышцы, нервы, сердечная мышца, почечные каналы, элементы клеточных мембран коры головного мозга и т. д. В этом плане изучение митохондрий пролило свет на механизм действия целого ряда соединений, наиболее интересными из которых являются цианид, амитал, 2,4-динитрофенол и антимицин А, а также привело к выяснению места действия этих соединений. В сильно разведенных растворах эти соединения действуют исключительно на ферменты митохондрий.

В связи с вышесказанным хочется подчеркнуть, что границы фармакологии как науки сомкнулись с границами отделов биологии, изучающих преобразующие системы, и что, пока не будут решены многочисленные загадки этих систем, механизм действия наиболее мощных агентов из арсенала фармакологов будет по-прежнему выглядеть весьма туманным. Некоторые структуры и компоненты преобразующих систем являются уникальными в своем роде, и фармакологические препараты благодаря их сродству или комплементарности к этим структурам могут кардинальным образом изменять поведение соответствующих преобразующих систем. Как только будут подобраны пары реагентов и структур, на которые они действуют, и будут разработаны химические концепции их взаимодействия, фармакология, очевидно, сведется к подбору соответствующих агентов для данной преобразующей системы. Совершаемая клеткой работа происходит в основном в ее преобразующих системах; логично предположить, что именно эти системы и являются мишенями, на которые направлено действие реагентов, предназначенных для контроля и регулирования клеточной активности.

УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРИНЦИПОВ СТРУКТУРЫ  
И ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии были выделены из самых различных биологических источников—животных, растений и бактерий. Было получено немало свидетельств о том, что независимо от источника получения митохондрии содержат по существу одни и те же компоненты и выполняют одни и те же основные функции. Правда, митохондрии иногда довольно сильно отличаются по форме, но эти отличия не оказывают существенного влияния на их функционирование. Это относится и к некоторым различиям в процессах переноса электронов у разных митохондрий. Митохондрии могут иметь палочкообразную или сферическую форму, причем митохондрии, выделенные из одного и того же источника, могут существовать в обеих формах в зависимости от внешних условий. Осмотические процессы в значительной мере влияют на форму митохондрий; поэтому ясно, что эти изменения внешней формы митохондрий не отражают каких-либо кардинальных различий их структуры. Число крист у митохондрий также варьирует в широких пределах. В митохондриях печени их относительно мало и пространства между ними занимают значительную часть общего объема [62, 72]. В митохондриях, выделенных из сердца или из летательных мышц, значительная часть внутреннего объема занята многочисленными кристами и лишь небольшая его часть приходится на свободные пространства [9, 80]. В общем можно сделать вывод, что митохондрии (например, митохондрии печени), которые осуществляют ряд вспомогательных ферментативных функций, т. е. процессов, не имеющих отношения к первичному преобразованию энергии, имеют немногочисленные кристы. Те же митохондрии, которые «специализируются» на реализации интенсивных процессов преобразования энергии (например, митохондрии сердца или летательной мышцы), в основном заполнены многочисленными кристами. Таким образом, различные экспериментальные данные говорят о том, что многие (если не все) вспомогательные ферментные системы размещаются в находящихся между кристами пространствах. Многие из этих вспомогательных ферментных систем катализируют метаболические процессы, протекающие с потреблением АТФ (например, синтез гиппуровой кислоты из глицина и бензойной кислоты) [69]. Эта потребность в АТФ может обуславливать локализацию ряда синтетических процессов в митохондриях. Таким образом, некоторые митохондрии несут в себе дополнительный ферментативный «багаж», компоненты которого не имеют отношения к процессам преобразования энергии, и этот дополнительный «багаж» может быть специфичным для митохондрий, получаемых из некоторого определенного материала. Но, во всяком случае, эта специфика некоторых типов митохондрий не является выражением каких-либо существенных их особенностей. Наиболее непонятные искажения внешней формы митохондрий, а также их функций наблюдались у бактериальных систем, и в течение долгого времени господствовало основанное на этих фактах убеждение, что бактерии лишены митохондрий. Однако это лишь иллюстрирует замечательное свойство бактерий, осуществляющих сборку митохондрий в соответствии с рядом довольно строгих требований, логически вытекающих из специфичности этих живых организмов.

Если не большинство, то по крайней мере некоторые бактерии лишены таких внутренних телец или структур, которые ученые, занимающиеся электронной микроскопией, назвали бы митохондриями [50]. Однако бактерии содержат структурированные двойные мембраны, которые обычно прикрепляются к оболочке клетки. Эти мембраны не отличаются по своим

размерам от крист типичных митохондрий. В самом деле, при получении из бактерий субклеточных частиц, сохранивших функции типичных митохондрий, они оказываются весьма сходными со структурированными двойными мембранами, которые наблюдались у исходных клеток под электронным микроскопом. Таким образом, изучение бактерий приводит к важному выводу, что основным в митохондриальной структуре является наличие двойных структурированных мембран. Наличие же некоторой упорядоченной системы крист, заключенных в наружную мембрану, не является обязательным признаком митохондрий или по крайней мере является лишь признаком второстепенного значения. Некоторые бактериологи подчеркивали тот факт, что дыхательные частицы представляют собой скорее впячивания мембран бактериальных клеток, чем тельца, находящиеся внутри клетки. Это также весьма несущественное обстоятельство, и оно никак не сказывается на узловых проблемах функции митохондрий. Куда более серьезная проблема возникает в связи с тем, что в некоторых бактериальных частицах не протекают реакции цикла трикарбоновых кислот. Это обстоятельство не из тех, которые можно безбоязненно игнорировать.

Основная функция митохондрий заключается в сопряжении переноса электронов с синтезом АТФ. Обычно первичными источниками электронов служат субстраты цикла трикарбоновых кислот. Но это не единственные доноры электронов для цепи дыхательных ферментов. В митохондриях, выделенных из некоторых животных тканей, источником электронов служит  $\alpha$ -глицерофосфат [68] или  $\beta$ -оксибутират [35], а не субстраты цикла трикарбоновых кислот. Независимо от того, могут ли подобные соединения целиком заменять субстраты цикла трикарбоновых кислот или же эта замена частичная, можно утверждать, что источник электронов непостоянен и, следовательно, он не оказывает влияния на основные функции митохондрий. Основным митохондриальным процессом в любом случае является сопряжение переноса электронов с синтезом АТФ, а донором электронов при этом может быть любое подходящее соединение. Так, у бактерий источником электронов могут служить очень многие соединения. Но независимо от того, какое именно соединение было донором электронов, результатом во всех случаях является аналогичный перенос зарядов по цепи дыхательных ферментов, который сопровождается аналогичными процессами сопряженного фосфорилирования.

ЧПЭ, выделенные из *Azotobacter vinelandii*, обладают теми же компонентами цепи переноса электронов (два флавопротеида, четыре цитохрома, кофермент Q, негеминовое железо, медь, липиды и т. д.), и эти компоненты находятся в тех же отношениях друг к другу, что и в митохондриях, выделенных из сердечной мышцы быка. При химическом анализе митохондрий, полученных из любой живой ткани, исследователи всегда приходили к одному и тому же заключению: основные химические свойства, а также принципы организации митохондрий неизменны. По-видимому, митохондрии возникли на ранних этапах эволюции живой материи, и, если не считать некоторых второстепенных изменений, их структура сохранилась в неизменном виде до нашего времени. Митохондрии, несомненно, приобрели присущую им организацию еще до того, как в атмосфере нашей планеты появился кислород, способный служить окислительным агентом для нужд преобразования энергии. Процесс развития митохондрий, по-видимому, закончился еще до появления многоклеточных форм.

Митохондрии — это структура, которую все аэробные клетки унаследовали от одноклеточных организмов в процессе их эволюционного развития к многоклеточным формам живой материи. В основе изменчивой

и многообразной живой природы лежат такие важнейшие структуры, как митохондрии, сохранившие неизменными свою организацию и свои функции в процессе эволюции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ambe K. S., Crane F. L., *Science*, **129**, 98 (1959).
2. Ambe K. S., Venkataraman A., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **1**, 133 (1959).
3. Basford R. E., Green D. E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **33**, 185 (1959).
4. Beinert H., Lee W., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **5**, 40 (1961).
5. Beinert H., Sands R. H., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **1**, 171 (1959).
6. Belitzer B. A., Tsibikova E. T., *Biokhimiya*, **4**, 516 (1939).
7. Bruemmer J. H., Wilson P. W., Glenn J. L., Crane F. L., *J. Bacteriol.*, **73**, 113 (1957).
8. Chance B., Williams G. R., *Advances in Enzymol.*, **17**, 65 (1956).
9. Chapman J. B., *J. Morphol.*, **95**, 237 (1954).
10. Clark W. M., *Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems*, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 1960.
11. Crane F. L., Glenn J. L., Green D. E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **22**, 475 (1957).
12. Criddle R., Bock R., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **1**, 138 (1959).
13. Criddle R. S., Bock R. M., Green D. R., Tisdale H. D., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **5**, 75 (1961).
14. Cross R. S., Taggart J. V., Covo G. A., Green D. E., *J. Biol. Chem.*, **177**, 655 (1949).
15. Doeg K. A., Ziegler D. M., *Biochim. et Biophys. Acta* (1962).
16. Doeg K. A., Ziegler D. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 37 (1962).
17. Fernández-Morán H., неопубликованные экспериментальные данные.
18. Fleischer S., Brierley G., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **5**, 367 (1961).
19. Fleischer S., Brierley G., *Biochim. et Biophys. Acta*, **53**, 609 (1961).
20. Fleischer S., Klouwen H., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **5**, 378 (1961).
21. Fleischer S., Brierley G., Klouwen H., Slautterback D. B., *J. Biol. Chem.* (1962), в печати.
22. Fleischer S., Klouwen H., Brierley G., *J. Biol. Chem.*, **236**, 2936 (1961).
23. Fletcher M. J., Sanadi D. R., *Biochim. et Biophys. Acta*, **51**, 356 (1961).
24. Fowler L. R., Hatéfi Y., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **5**, 203 (1961).
25. Fowler L. R., Richardson S. H., (1962), в печати.
26. Gaffron H., Brown A. H., French C. S., Livingston R., Rabinowitch E. I., Strehler B. L., Tolbert W. E., eds., *Research in Photosynthesis*, Interscience, New York, 1957.
27. Goldberger R., Smith A. L., Tisdale H. D., Bomstein R., *J. Biol. Chem.*, **236**, 2788 (1961).
28. Green D. E., *Harvey Lecture Ser.*, **52**, 177 (1958).
29. Green D. E., Burkhard R. K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 312 (1961).
30. Green D. E., Fleischer S., In «Enzymes in Health and Disease» (D. M. Greengard and H. A. Harper, eds.), pp. 51—72, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1960.

31. Green D. E., Fleischer S., In «Metabolic Pathways» (D. M. Greenberg, ed.), Vol. I, p. 41, Academic Press, New York, 1960.
32. Green D. E., Fleischer S., (1961—1962), неопубликованные данные.
33. Green D. E., Hatefi Y., Science, **133**, 13 (1961).
34. Green D. E., Oda T., J. Biochem. (Japan), **49**, 742 (1961).
35. Green D. E., Dewan J. G., Leloir L. F., Biochem. J., **31**, 934 (1937).
36. Green D. E., Tisdale H. D., Criddle R. S., Chen P. Y., Bock R. M., Biochem. Biophys. Research Commun., **5**, 109 (1961).
37. Green D. E., Tisdale H. D., Criddle R. S., Bock R. M., Biochem. Biophys. Research Commun., **5**, 81 (1961).
38. Griffiths D. E., Wharton D. C., J. Biol. Chem., **236**, 1850 (1961).
39. Griffiths D. E., Wharton D. C., J. Biol. Chem., **236**, 1857 (1961).
40. Hartley G. S., In «Solutions of Soap-Like Substances», Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids (R. T. Holman, W. O. Lundberg and T. Malkin, eds.), p. 19, Pergamon Press, New York, 1955.
41. Hatefi Y., Biochim. et Biophys. Acta, **34**, 184 (1959).
42. Hatefi Y., Haavik A. G., Griffiths D. E., Biochem. Biophys. Research Commun., **4**, 441 (1961).
43. Hatefi Y., Haavik A. G., Griffiths D. E., Biochem. Biophys. Research Commun., **4**, 447 (1961).
44. Hatefi Y., Haavik A. G., Jurtshuk P., Biochim. et Biophys. Acta, **52**, 106 (1961).
45. Jurtshuk P., Sekuzu I., Green D. E., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 76 (1961).
46. Kalckar H. M., Biochem. J., **33**, 631 (1939).
47. Keilin D., Ergeb. Enzymforsch., **2**, 239 (1933).
48. Keilin D., Hartree E. F., Proc. Roy. Soc., B125, 171 (1938).
49. Krebs H. A., Lowenstein J. M., In «Metabolic Pathways» (D. M. Greenberg, ed.), Vol. I, p. 129, Academic Press, New York, 1960.
50. Kubai D., Ziegler D. M., Ris H., Am. Soc. Cellular Biol., p. 119 (Nov. 1961).
51. Lardy H. A., Proc. Intern. Congr. Biochem., 3rd Congr., Brussels, 1955, p. 287 (1956).
52. Lehninger A. L., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., **179**, 957 (1949).
53. Lester R. L., Fleischer S., Arch. Biochem. Biophys., **80**, 470 (1959).
54. Lester R. L., Fleischer S., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 358 (1961).
55. Lester R. L., Hatefi Y., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 103 (1958).
56. Linnane A. W., Titchener E. B., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 469 (1960).
57. Linnane A. W., Ziegler D. M., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 630 (1958).
58. Loomis W. F., Lipmann F., J. Biol. Chem., **173**, 807 (1948).
59. Mahler H. R., Advances in Enzymol., **17**, 233 (1956).
60. Oda T., Blair P., Green D. E. (1961—1962), неопубликованные данные.
61. Okunuki K., Sekuzu I., Yonetani T., Takemori S., J. Biochem. (Japan), **45**, 847 (1958).
62. Pallade G. E., In «Enzymes: Units of Biological Structure and Function» (O. H. Gaebler, ed.), p. 185, Academic Press, New York, 1956.
63. Pullman M. E., Penefsky H., Racker E., Arch. Biochem. Biophys., **76**, 227 (1958).
64. Rhodes W. C., McElroy W. D., J. Biol. Chem., **233**, 1528 (1958).
65. Rieske J., Tisdale H. D., Green D. E. (1961—1962).
66. Rieske J., Wharton D., Zaugg W. (1962), в печати.
67. Rouser G., Am. J. Clin. Nutrition, **6**, 681 (1958).
68. Sacktor B., Cochran D. G., Arch. Biochem. Biophys., **74**, 266 (1958).

69. Sarkar N. K., Beinert H., Fuld M., Green D. E., Arch. Biochem., **37**, 140 (1952).
70. Schneider W. C., Potter V. R., J. Biol. Chem., **177**, 893 (1949).
71. Sekuzu I., Jurtshuk P., Green D. E., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 71 (1961).
72. Sjostrand F. S., Revs. Modern Phys., **31**, 301 (1959).
73. Theorell H., Akesson A., J. Am. Chem. Soc., **63**, 1804 (1941).
74. Wald G., In «Enzymes: Units of Biological Structure and Function» (O. H. Gaebler, ed.), Academic Press, New York, 1956.
75. Weber H. H., «The Motility of Muscle and Cells», Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 1958.
76. Webster G., Biochem. Biophys. Research Commun. (1962), в печати.
77. Widmer C., Crane F. L., Biochim. et Biophys. Acta, **27**, 203 (1958).
78. Ziegler D. M., In «Biological Structure and Function» (T. W. Goodwin and O. Lindberg, eds.), Vol. II, p. 253, Academic Press, New York, 1961.
79. Ziegler D. M., Doeg K. A., Biochem. Biophys. Research Commun., **1**, 344 (1959).
80. Ziegler D. M., Linnane A. W., Green D. E., Dass C. M. S., Ris H., Biochim. et Biophys. Acta, **28**, 524 (1958).

# СВЯЗАННЫЕ С ДЫХАНИЕМ МЕХАНОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

А. ЛЕНИНГЕР

В настоящей работе мне хотелось бы коснуться некоторых экспериментальных работ и идей, связанных с изменениями проницаемости и конформации митохондриальных мембран, которые возникают при поглощении и выталкивании воды митохондриями. Эти «механохимические», или конформационные, изменения мембран тесно связаны с промежуточными стадиями процесса образования аденозинтрифосфата (АТФ) при окислительном фосфорилировании. Поднимаемая в этой работе дискуссия развернута вокруг основных предпосылок распространенной концепции, согласно которой освобождающаяся при окислительно-восстановительных процессах в цепи переноса электронов энергия используется для осуществления трех отдельных процессов: 1) синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата; 2) активного переноса некоторых ионов; 3) механохимических изменений митохондриальных мембран, о которых говорилось выше.

Более традиционная точка зрения на процесс преобразования энергии в дыхательных цепях сводится к тому, что энергия аккумулируется только в макроэргических связях АТФ, а затем уже используется во вторичных реакциях для осуществления ряда эндергонических процессов, таких, как активный перенос ионов, механохимические изменения, а также различные реакции биосинтеза. Однако экспериментальные исследования, проведенные в последнее время в нашей и в ряде других лабораторий, свидетельствуют о том, что высокоспецифичные ключевые процессы (я имею в виду связанные с дыханием процессы переноса ионов и механохимические изменения мембран) вызываются теми катализаторами или теми структурами цепи переноса электронов, которые связаны с образованием АТФ. Таким образом, вырисовываются три различных типа преобразования энергии в дыхательной цепи митохондрий. Мы полагаем, что подобная концепция о нескольких типах превращения энергии в дыхательной цепи (эта концепция впервые была обоснована в наших работах [19—22, 25, 27], а также в работах других авторов [37, 38, 43]) открывает новые экспериментальные и теоретические подходы к проблеме механизма окислительного фосфорилирования, который раньше исследовался лишь в одном плане, а именно с точки зрения традиционных представлений о том, что дыхательная цепь представляет собой полиферментную систему, осуществляющую единственную функцию — сохранение энергии окислительно-восстановительных процессов в форме макроэргических связей АТФ.

Положение о том, что сопряженное с фосфорилированием дыхание аэробных клеток является движущей силой процессов активного переноса ионов, получило в настоящее время широкое признание. Основная мысль, согласно которой активный перенос некоторых ионов вызывается различными скоростями утечки ионов  $H^+$  и  $OH^-$  из дыхательной цепи в изолированные клеточные отсеки, была впервые высказана в 1940 г. Лундегардом [36], а затем неоднократно подтверждалась рядом других исследователей (напр. [3, 5]; см. также обзор Робертсона [46]). К различным идеям, касающимся использования клеткой дыхательной цепи в качестве своеобразного «окислительно-восстановительного» насоса, в последнее время добавились теоретические соображения, привлекающие сюда механизм обмена протонов, сопровождающего процессы фосфорилирования в трех пунктах дыхательной цепи. В некоторых работах ([5] и частично [37, 38]) было показано, что сопряженный с дыханием синтез АТФ из АДФ и ортофосфата, который формально представляет собой процесс дегидрирования, может приводить к выходу воды в виде ионов  $H^+$  и  $OH^-$  в отдельные «отсеки» клетки. Такие процессы лежат в основе современных представлений о молекулярном механизме активного переноса ионов. Эти идеи получили новое подтверждение в недавних работах [14, 48, 49], в которых было показано, что гидролиз АТФ во фракциях мембран нейронов стимулируется ионами  $K^+$  и  $Na^+$ . Аналогичные данные были получены Постом и др. [42] при исследовании АТФ-азы мембран эритроцитов. Авторы последней работы предположили, что АТФ-азные системы расположены в клеточных мембранах таким образом, что гидролиз АТФ служит источником движущей силы для переноса ионов  $Na^+$  и  $K^+$  через мембрану. Мы показали, что способные к фосфорилированию фрагменты митохондриальных мембран, полученные обработкой дигитонином, могут связывать ионы  $K^+$  в процессе дыхания [33]; Гэмбл [10] обнаружил, что связывание ионов  $K^+$  — высокоспецифичный процесс, который может протекать в отсутствие АДФ и АТФ; необходимо лишь перенос электронов по дыхательной цепи. Однако в этих же экспериментальных условиях связывание ионов  $K^+$  блокируется 2,4-динитрофенолом. Из описанных выше опытов следует, что связывание ионов  $K^+$  зависит от некоторых промежуточных реакций в цикле преобразования энергии, предшествующих реакциям синтеза АТФ. Оказалось [50], что ионы  $Ca^{++}$  также могут связываться митохондриальными фрагментами, но этот процесс не идет в присутствии разобщающих агентов.

Эти наблюдения, а также опыты, которые будут описаны позднее, приводят к заключению, что для протекания упомянутых выше реакций присутствие АТФ не обязательно; эти реакции вызываются каким-то иным высокоэнергетическим промежуточным продуктом фосфорилирования.

Рассмотрим теперь различные направления современных исследований механизма окислительного фосфорилирования. Прошло уже около тридцати лет с тех пор, как Кейлин и Варбург установили в общих чертах картину дыхательной цепи, и свыше двадцати лет с тех пор, как Белицер и Цыбакова впервые показали, что фосфорилирование в митохондриях сопряжено с переносом по дыхательной цепи электронов. За это время было сделано много важных открытий, касающихся различных деталей процесса переноса электронов, а также локализации мест сопряженного с этим переносом фосфорилирования и некоторых его особенностей. В сущности стратегия всех исследований окислительного фосфорилирования, выполненных в этот период, основывалась на надежде, что исследуемая сложная полиферментная система окажется в принципе сходной с такими хорошо изученными ферментными системами, как гликолитический цикл или цикл мочевины.



Ожидалось, что и в случае окислительного фосфорилирования функционирование системы также сведется к последовательному действию ферментов, каждый из которых взаимодействует с продуктом предыдущей реакции. Тогда оказалось бы возможным представить окислительное фосфорилирование в виде системы химических реакций, или, иначе говоря, составить «метаболическую карту» этого процесса. Все это не выходило бы за рамки уже ставших привычными представлений о взаимодействии специфических ферментных систем, промежуточных продуктов и протестических групп.

Даже после того как было показано, что ферменты дыхательной цепи жестко закреплены в мембранах митохондрий с их типичной слоистой липидно-белковой ультраструктурой, мало кто усомнился в том, что механизмы переноса электронов и окислительного фосфорилирования могут быть в конечном счете поняты в рамках классической энзимологии. Конечно, это открытие поставило на повестку дня новые сложные проблемы, связанные с техническими трудностями выделения в раствор отдельных компонентов ферментной системы и последующей реконструкции дыхательной цепи, что связано с посадкой выделенных ферментов обратно на их специфические места в твердой фазе (полиферментной системе). Все эти эмпирические методы непрерывно совершенствуются. Некоторые исследователи добились в последнее время значительных успехов в реконструкции цепи переноса электронов. Следует отметить работы Кейлина и Кинга [15], в которых удалось сначала извлечь сукцинатдегидрогеназу, а затем ввести ее обратно на свое место во фрагментах митохондриальных мембран. Сюда же можно отнести и выполненную в лаборатории Грина работу по реконструкции частиц из отдельных участков дыхательной цепи, что приводило к ее реставрации и восстановлению полной, связанной с ДПН, хотя и не фосфорилирующей цепи переноса электронов при участии кофермента Q [8]. В лаборатории Рэкера удалось с помощью растворимой АТФ-азы восстановить сопряженное с переносом электронов фосфорилирование [41, 44]. Наконец, в нашей лаборатории недавно было исследовано восстановление чувствительности к ингибирующему действию динитрофенола в очищенной растворимой системе ферментов, ответственных за взаимные переходы АТФ—АДФ [51]. Таким образом, действительно можно надеяться, что широко применяемые в классической энзимологии методы выделения ферментов и реконструкции ферментных систем, приспособленные к работе с «нерастворимыми» системами, удастся использовать при изучении митохондрий, что позволит осуществить классическое чисто химическое описание окислительного фосфорилирования. Однако на фоне быстрого развития современной энзимологии прогресс в области изучения окислительного фосфорилирования довольно незначителен. Это в известной мере может быть обусловлено тем, что исследователи не принимают в расчет упомянутых выше осмотических и механохимических функций, имеющих непосредственное отношение к процессам, протекающим в дыхательной цепи. Нет сомнения в том, что их изучение может пролить свет на процессы окислительного фосфорилирования.

Не следует думать, однако, что все эти рассуждения имели своей целью убедить читателя в безнадежности положения. Мы не считаем проблему окислительного фосфорилирования безнадежно трудной для разрешения; мы не считаем также, что применение в этой области методов классической энзимологии не имеет смысла. Лично я придерживаюсь мнения, что многие (если не большинство) отдельные этапы процесса переноса электронов и синтеза АТФ будут изучены методами классической энзимологии и соответствующие системы окажутся ферментными системами в классическом смысле, с той разницей, что «промежуточные продукты» будут представлять собой

связанные, не способные к диффузии простетические или активные группы ферментов. Однако я полагаю, что в трех ключевых пунктах цепи переноса электронов исследователи найдут специфичные молекулярные структуры, которые и осуществляют преобразование энергии не только в химическую энергию предшественника АТФ, но и по другим каналам; это и вызывает к жизни описанные выше осмотические и механохимические явления, которые вряд ли удастся свести к ряду простых ферментативных реакций без учета влияния структурных и стерических факторов.

Таким образом, принципы классической энзимологии и принципы молекулярной организации упорядоченных структур должны использоваться совместно для успешного решения проблемы окислительного фосфорилирования на молекулярном уровне. Но даже такой подход к проблеме может оказаться недостаточно радикальным. Митчелл недавно выпустил в свет очень важную и глубокую работу [38], в которой он предлагает для процесса окислительного фосфорилирования новую схему без участия каких-либо промежуточных соединений. По Митчеллу, фосфорилирование сводится к последовательности актов разделения ионов  $H^+$  и  $OH^-$  и концентрации их в двух автономных отсеках с помощью АТФ-азы, которая расположена анизотропно в мембране, разделяющей эти отсеки. Эта АТФ-аза катализирует процесс дегидратирования АДФ и образования АТФ из фосфора и АДФ. Согласно этой гипотезе, движущая сила для разделения ионов и образования АТФ создается ловушками двух типов — для ионов  $H^+$  и  $OH^-$ , которые, как предполагают, разряжаются в этих отсеках анизотропно расположенной системой переноса электронов. Следовательно, гипотеза Митчелла избавляет энзимологов от необходимости искать «промежуточные продукты»; все сводится к наличию анизотропно расположенной в перегородках АТФ-азы. Впрочем, существование анизотропной АТФ-азы предположил еще раньше Скоу [48, 49] и недавно Ярнефельт [14] для объяснения наблюдаемого при наличии АТФ перемещения ионов  $Na^+$  и  $K^+$  в нерве.

В сущности, нет никакой необходимости в том, чтобы ферментные системы, ответственные за преобразование энергии, освобождающейся в процессах окисления, в энергию фосфатной связи АТФ, пребывали в водонерастворимом состоянии в составе частиц. Хорошо изученная водорастворимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа также является весьма эффективной ферментной системой, участвующей в сопряженном преобразовании энергии; то же самое справедливо для енолазы. Эти две ферментные системы и являются основными поставщиками энергии в анаэробных клетках. В принципе у аэробных клеток известен ряд аналогичных водорастворимых ферментных систем «классического» типа, которые также могут эффективно осуществлять преобразование энергии в форму энергии макроэргических фосфатных связей АТФ при прохождении через эти системы электронов от электроотрицательных субстратов к молекулярному кислороду. Но в ходе биохимической эволюции эти пути преобразования энергии были забракованы природой, и в наши дни во всех аэробных клетках ферментные системы дыхательных цепей, ответственные за сопряженное с окислением субстратов преобразование энергии, фиксированы в мембранах, характеризующихся структурной анизотропией входящих в их состав липидов и белков. У аэробных бактерий эти мембраны расположены прямо в протоплазме, а в клетках высших организмов — в митохондриях. Размещение в ходе эволюционного процесса дыхательных цепей живых организмов в мембранах вполне оправдано биологически, если учесть, что энергия, вырабатываемая этими цепями, используется при регуляции направленного движения электролитов, необходимого для сохранения постоянства химического

состава внутриклеточной среды и для реализации конформационных перестроек, которые, по-видимому, контролируют приток и утечку метаболитов и воды.

Теперь рассмотрим более подробно механохимические аспекты сопряженного с окислением фосфорилирования в митохондриях, о которых мы уже говорили. Многие исследователи, начиная с Рафлауба [45], наблюдали набухание изолированных митохондрий за счет поглощения ими воды в присутствии различных специфических природных соединений, включая  $\text{Ca}^{++}$ , фосфат, тироксин, фторидзин, окисленный и восстановленный глутатион [39], высшие жирные кислоты, а также гормоны, характеризующиеся наличием дисульфидных мостиков [31]. Этот эффект наблюдался при столь малых концентрациях этих соединений, что осмотические свойства среды практически не менялись (см. обзоры автора [26, 29]). Это набухание, которое можно легко наблюдать оптическими методами или же контролировать прямыми гравиметрическими измерениями объема, связано с процессом дыхания, так как поглощение воды прекращается в анаэробных условиях, а также при действии таких специфических ингибиторов дыхания, как цианид и антимицин А. Как и процесс дыхания, набухание этого типа ингибируется 2,4-динитрофенолом, действующим как разобщающий агент. Это дает дополнительные основания утверждать, что связь между поглощением воды и дыханием зависит от деятельности ферментов. Однако набухания митохондрий не наблюдается, когда процесс дыхания полностью сопряжен с фосфорилированием и в суспензии присутствуют акцепторы неорганического фосфата. В отсутствие же акцептора фосфата происходит специфичное набухание (ср. [21]). При таком набухании наблюдается увеличение проницаемости по отношению к таким веществам, как, например, сахароза, хотя в нормальных условиях подобные соединения проходят через мембраны довольно медленно [32].

Обратный процесс сокращения набухших митохондрий, сопровождающийся выделением из них воды, может быть вызван либо восстановлением полностью сопряженного с дыханием фосфорилирования при добавлении АДФ, либо, когда дыхания не происходит, — добавлением к митохондриям АТФ и ионов  $\text{Mg}^{++}$ . Интересно отметить, что сокращение митохондрий в присутствии АТФ не связано с процессом дыхания; введение в суспензию ингибиторов дыхания — цианида и динитрофенола — не оказывает влияния на сокращение митохондрий, вызванное введением АТФ. В то же время специфические ингибиторы окислительного фосфорилирования (азид, олигомицин и сахароза) полностью подавляют сокращение митохондрий, индуцированное АТФ [23, 24]. Таким образом, можно заключить, что поглощение воды митохондриями зависит от переноса электронов по дыхательной цепи, но не требует реализации всего комплекса процессов окислительного фосфорилирования, тогда как обратный процесс — вытеснение воды из митохондрий — зависит от функционирования некоторых конечных стадий окислительного фосфорилирования, ответственных за синтез АТФ, и может протекать в отсутствие дыхания.

Набухание и сокращение митохондрий изучалось *in vitro* при различных условиях. Во-первых, митохондрии помещали в условия, соответствующие так называемым «низкоамплитудным» циклам набухания — сокращения [13, 39]. В этих опытах изменения объема митохондрий, которые контролировались оптическими методами, достигали всего 1—2% исходного объема. При этом на протяжении нескольких «низкоамплитудных» циклов набухания — сокращения дыхание оставалось сопряженным с фосфорилированием. В этих условиях циклы набухания — сокращения характери-

зовались свойствами, позволявшими считать, что они представляют собой простые обратимые процессы, зависящие от концентрации какого-то высокоэнергетического промежуточного продукта окислительного фосфорилирования. Но такое упрощенное представление едва ли применимо к опытам, проводившимся в условиях второго типа (в этих условиях наблюдаются так называемые «высокоамплитудные» циклы набухания— сокращения [29]). Если набухание длится достаточно долго (10—20 мин), то объем митохондрий может возрасти в 2 и даже в 3 раза по сравнению с первоначальным. При этом можно прямыми методами измерить количество поглощенной воды, которая затем может быть вновь выделена наружу при добавлении АТФ. Выделение воды из митохондрий при их сокращении, стимулируемом АТФ, говорит об обратимости «высокоамплитудных» циклов; однако при этом нарушается нормальное сопряжение дыхания с функционированием акцептора фосфата и в аппарате окислительного фосфорилирования происходят необратимые изменения. По-видимому, этот тип набухания митохондрий представляет собой процесс, вышедший из-под нормального клеточного контроля. Но зато исследования в этих условиях открывают богатые возможности определения критических, узловых точек сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования и осмотических и механохимических явлений, так как при этом их строгая взаимосвязанность «расшатывается».

Исследования митохондрий именно в этих экспериментальных условиях (в режиме «высокоамплитудных» циклов) привели к выводу, что набухание митохондрий связано с процессами дыхания, тогда как сокращение митохондрий может происходить совершенно независимо от процессов переноса электронов по дыхательной цепи, но нуждается в какой-то (чувствительной к азиду или олигомицину) стадии окислительного фосфорилирования. Независимость способности митохондрий к сокращению от переноса электронов через дыхательную цепь хорошо иллюстрируется также следующим опытом: митохондрии выдерживали в условиях, когда они максимально разбухали, в течение нескольких часов; процессы фосфорилирования и дыхания у таких митохондрий прекращались, однако они по-прежнему сохраняли способность к сокращению при добавлении АТФ. Таким образом, нет никакой необходимости считать, что набухание и сокращение — это проявления одного и того же обратимого процесса. Это положение играет важную роль для правильного понимания природы физических изменений в структуре митохондрий. По крайней мере вряд ли можно объяснить процессы набухания и сокращения митохондрий изменениями проницаемости по отношению к какому-то веществу, растворенному в окружающей митохондрии среде. Некоторые данные говорят о том, что поглощение воды является следствием увеличения проницаемости мембраны митохондрий по отношению к некоторым растворенным в среде соединениям; поступление этих соединений в митохондрию сопровождается поглощением воды. Однако вряд ли можно объяснить сокращение митохондрий, проходящее с выделением воды при действии на них АТФ, уменьшением проницаемости. Такое уменьшение проницаемости, напротив, должно было бы просто «запереть» поглощенную воду с растворенными в ней соединениями внутри митохондрии. В настоящее время накапливается все больше фактов, говорящих о том, что вытеснение воды из набухших митохондрий происходит вследствие конформационных изменений, сопровождающих сокращение митохондриальных мембран [29].

Изучение «высокоамплитудных» циклов изменения объема митохондрий позволяет сделать еще один важный вывод. Как уже говорилось выше, при дыхании в интактных митохондриях происходит активный перенос ионов

между внутримитохондриальным и внемитохондриальным пространством. Можно было бы предположить, что поглощение и выделение воды митохондриями представляет собой вторичный процесс, связанный с передвижением ионов внутрь митохондрий и обратно. Однако эту гипотезу следует отбросить, так как, несмотря на то что в нормальных условиях как движение ионов, так и сокращение митохондрий связаны с сопряженным фосфорилированием, оба эти процесса в настоящее время удалось четко разделить. При старении митохондрий в набухшем состоянии они теряют не только способность к дыханию и сопряженному фосфорилированию, но и способность к специфическому связыванию находящихся в среде ионов  $K^+$ . Однако эти митохондрии по-прежнему способны сокращаться при добавлении к ним АТФ за счет протекания чувствительной к олигомицину реакции. Более того, стимулированное АТФ сокращение митохондрий относительно нечувствительно к ионному окружению [28].

Один из наиболее перспективных подходов к проблеме ферментативного сокращения митохондрий при наличии АТФ появился с открытием специфического митохондриального белка, участвующего в этом процессе. Я буду называть его «фактором сокращения» (С-фактор). Как уже упоминалось выше, для набухания митохондрий, помимо активного дыхания, необходимо еще присутствие специфического агента-стимулятора. АТФ вызывает обращение процесса набухания митохондрий, стимулируемого любым из этих агентов, за исключением восстановленного глутатиона. Последний оказывается одним из наиболее сильных стимуляторов набухания митохондрий [24, 32]. Оказалось, что неспособность АТФ вызывать (в присутствии ионов  $Mg^{++}$ ) сокращение митохондрий, набухших при действии восстановленного глутатиона, объясняется тем, что этот агент-стимулятор вызывает отщепление от структур митохондрий водорастворимого термолabileного С-фактора, что приводит к его утечке из митохондрий в окружающую среду [30]. Сокращение митохондрий идет лишь в присутствии этого специфического белка; при отщеплении и уходе из митохондрий его концентрация в суспензии становится столь малой, что он уже не может эффективно участвовать в процессе сокращения, стимулируемом АТФ. Однако при добавлении к суспензии избытка С-фактора митохондрии, набухшие в присутствии восстановленного глутатиона, легко сокращаются в присутствии АТФ.

Мы извлекали С-фактор как из среды, содержавшей митохондрии в присутствии восстановленного глутатиона, так и из экстрактов, полученных при разрушении митохондрий ультразвуком. Одно из наиболее удивительных свойств С-фактора состоит в том, что если добавлять его во все возрастающих концентрациях к набухшим в присутствии восстановленного глутатиона митохондриям (в присутствии АТФ), то возрастания скорости сокращения митохондрий не наблюдается; вместо этого постепенно меняется (после добавления каждой новой порции С-фактора) равновесная величина суммарного объема митохондрий. Таким образом, набухшие митохондрии могут в буквальном смысле слова титроваться С-фактором в присутствии избытка АТФ до тех пор, пока почти вся поглощенная ими при набухании вода не выйдет наружу. Этот факт со всей определенностью говорит о том, что в мембранах С-фактор необходим в стехиометрических количествах; поэтому гипотезу о каталитическом действии С-фактора можно отбросить [30]. Другое интересное свойство С-фактора заключается в том, что, по-видимому, как этот фактор, так и АТФ закрепляются на мембранах митохондрий в каком-то довольно специфическом взаимозависимом порядке, поскольку эффект сокращения митохондрий проявляется лишь при добавлении этих реаген-

тов в определенном порядке. Если к набухшим в присутствии восстановленного глутатиона митохондриям С-фактор добавлять после АТФ, то никакого сокращения объема не происходит. Иначе обстоит дело в том случае, если к митохондриям сначала добавить С-фактор, а затем АТФ. При этом наблюдается максимальное сокращение объема митохондрий [39]. Напомним, что для проявления активности С-фактора необходимы ионы  $Mg^{++}$ .

Работая с набухшими при действии восстановленного глутатиона митохондриями, мы пришли к заключению, что С-фактор может быть экстрагирован в растворимой форме из митохондрий любого типа (например, из митохондрий печени, мозга, почек, сердечной мышцы и из асцитной опухоли Эрлиха [47]). Кроме того, можно показать присутствие С-фактора в экстрактах фрагментов фосфорилирующих митохондриальных мембран, полученных при обработке митохондрий дигитонином или ультразвуком. Таким образом, С-фактор присутствует во всех препаратах митохондрий, в которых может осуществляться окислительное фосфорилирование. Любопытно отметить, что удалось наблюдать активность, соответствующую С-фактору, в экстрактах из зрелых эритроцитов и из протопластов *Micrococcus lysodeikticus* [47]. Напомним, что эритроциты, как и некоторые бактериальные протопласты, также подвержены циклическим набуханиям и сокращениям, сопряженным с метаболическими процессами или с АТФ. Таким образом, С-фактор является, возможно, общим компонентом самых различных мембранных структур [27, 47].

Еще одним важным открытием явилось обнаружение активности, свойственной С-фактору, в растворимой фракции тканей и полное отсутствие ее в микросомах или ядрах клеток. Этот факт и ряд других экспериментальных данных говорят о возможности существования динамического равновесия между количеством С-фактора в митохондриях и в окружающей их цитоплазме. Это равновесие, по-видимому, определяется содержанием глутатиона или же соотношением его окисленной и восстановленной форм [39]. Таким образом, мы приходим к выводу, что растворимые цитоплазматические факторы могут весьма эффективно регулировать форму и свойства митохондрий в живой клетке. Учет их возможного влияния помогает понять тот факт, что в интактных, не подвергавшихся фиксации клетках, например в фибробластах, объем и форма митохондрий могут претерпевать выходящие за пределы нормы изменения, которые, по-видимому, обратимы. Методом фазово-контрастной микроскопии было показано, что эти изменения митохондрий *in vivo* могут подавляться цианидом и динитрофенолом, а также другими ингибиторами дыхания [9].

Если в действительности между дыханием, ферментативным синтезом АТФ и механохимическими изменениями митохондрий (набухание и сокращение) существует функциональная связь, то изучение специфичной ферментативной активности С-фактора (помимо его активности, связанной с сокращением) представляет несомненный интерес. Мы обнаружили, что очищенный С-фактор не катализирует реакции обмена типа АТФ — АДФ или АТФ —  $P_n^{32}$  и в свежеприготовленном виде не обладает АТФ-азной активностью. Однако доктор Нейберг и доктор Грегг показали, что в особых условиях С-фактор может значительно повышать отношение Р/О для митохондрий или фрагментов мембран. Кроме того, препараты С-фактора часто обладают и активностью М-фактора; последняя выражается в способности придавать обменным реакциям АТФ — АДФ в фосфорилирующих фрагментах мембран чувствительность к динитрофенолу [51]. Отсюда видно, что С-фактор, помимо его активности как фактора сокращения мембран, может также быть ферментным компонентом, участвующим в синтезе АТФ.

В результате последних исследований по рассеянию света фрагментами мембран, полученными при обработке митохондрий ультразвуком, появился еще один экспериментальный подход к биохимии механохимических изменений в мембранах. Такие фрагменты, сохранившие способность к окислительному фосфорилированию, обнаруживают в суспензии значительные изменения в поглощении света при добавлении к ним сукцината и АТФ. Далее, медленнее осаждающиеся фрагменты также обнаруживают изменения в асимметрии рассеяния света при добавлении АТФ [11]. В частности, наблюдается изменение отношения количеств света, рассеянного под углами 135 и 45°. Оба описанных выше эффекта не наблюдаются в присутствии олигомицина. Эти эксперименты не только подтверждают зависимость процессов механохимических изменений мембран от ферментов окислительного фосфорилирования, но и демонстрируют тот факт, что эти изменения могут происходить даже в хорошо отмытых фрагментах мембран, в которых отсутствуют водорастворимые компоненты митохондриальной матрицы.

Исходя из этих фактов, мы пришли к выводу, что молекулы некоторых ферментов образуют «дыхательные ансамбли», встроенные в белковые монослои митохондриальных мембран. Эти образования, которые мы можем назвать «механоферментами», и несут, по нашему мнению, ответственность за конформационные изменения, зависящие от состояния дыхательной цепи [23, 24, 26—29]. Для более детальной трактовки этих процессов можно предположить, что уровень окисленности переносчиков электронов или же пребывание различных ферментов сопряжения в фосфорилирующей или дефосфорилирующей формах определяют конформационные изменения как в индивидуальных молекулах этих агрегатов, так и в их третичных структурах или во всем ансамбле путем изменения связей между отдельными молекулами, например в результате электростатических или конформационных изменений. Если учесть, что ферменты этих дыхательных ансамблей составляют от 25 до 50% белка митохондриальных мембран, то становится понятным, что в результате конформационных изменений в отдельных «дыхательных ансамблях» могут изменяться проницаемость мембран, форма крист, а также размеры мембран, что, разумеется, не может не влиять на связанное с дыханием поглощение или выделение воды [23—29].

Термины «механохимия» и «механоферменты», конечно, заимствованы у В. А. Энгельгардта, который впервые ввел их для описания связи между АТФ-азой миозина и «механическими» изменениями, наблюдаемыми в этой системе [6, 7]. Но эти термины не были перенесены в новую область исследований лишь в силу того, что сходство связанных с АТФ механохимических изменений в митохондриях и в миофибриллах носит несколько поверхностный характер. Впрочем, механохимические явления в этих двух системах характеризуются также рядом глубоких аналогий, которые заслуживают пристального внимания. Во-первых, как миозин, так и митохондриальные мембраны обладают потенциальной АТФ-азной активностью. Гидролиз АТФ не является обычным спутником процесса окислительного фосфорилирования. Вероятно, это справедливо также и для процесса сокращения актомиозина. В обоих случаях гидролиз АТФ вызывается некоторыми побочными или же аномальными реакциями, в которых вместо обычного реагента участвует вода. Подобный гидролиз АТФ может быть вызван либо структурными изменениями в митохондриальных мембранах, либо ненормальной ориентацией актина и миозина, вроде той, которая, очевидно, встречается в растворах актомиозина. Далее, обе АТФ-азные активности стимулируются 2,4-динитрофенолом [12] (это открытие весьма важно, так как ранее не были известны случаи влияния динитрофенола на

ферментативные реакции). Как митохондрии, так и миозин катализируют обмен  $O^{18}$  между водой и фосфатом [1, 35]. Еще одно сходство обеих систем заключается в том, что обе они одинаково зависят от сульфгидрильных групп. Ионы серебра, будучи взяты в низких концентрациях, стимулируют АТФ-азную активность как митохондрий, так и миозина; в высоких концентрациях они действуют как ингибиторы фермента. При титровании сульфгидрильных групп миозина [17] и фрагментов митохондриальных мембран [4, 16] было показано, что по своим свойствам эти группы подразделяются на два типа: первый тип в нормальных условиях подавляет АТФ-азную активность; после того как эти группы оттитрованы, АТФ-азная активность проявляется благодаря наличию сульфгидрильных групп второго типа.

Все эти черты сходства становятся еще более убедительными, если учесть, что обе системы участвуют в механохимических процессах, в которых ориентация и расположение молекул, входящих в состав агрегатов или даже их отдельных групп, по отношению друг к другу может существенно влиять на течение таких процессов, как связывание и расщепление АТФ. Сходство обеих систем позволяет по крайней мере предположить, что в процессе эволюции они имели общего предшественника; на основании этого сходства можно также оценить возможное значение активности С-фактора, свойственной актину. Изучение механохимической активности митохондрий не является единственным путем успешного исследования окислительного фосфорилирования; изучение механохимической активности системы актомиозина, особенно ее субъединиц — F-актина, G-актина, L-меромиозина и H-меромиозина, впервые открытых Сент-Дьёрдьи и его школой, — также может пролить свет на эту проблему.

Концепция «механоферментов» или «механобелков» не является чем-то радикально новым; она не базируется на каких-либо новых принципах, относящихся к структуре белков. Теперь нам ясно, что конформация или третичная структура многих белков и ферментов могут изменяться вследствие их связывания с субстратами или же в зависимости от состояния окисленности или восстановленности. Подобные механохимические изменения наблюдаются, например, у гемоглобина или у цитохрома *c* и зависят соответственно от степени насыщенности кислородом или от окислительно-восстановительного уровня. Механохимические и конформационные изменения, в сущности, лежат в основе концепций о взаимодействии ферментов с субстратами (см. теорию «индуцированного соответствия» Кошланда [18]).

Хотелось бы надеяться, что в настоящей статье мне удалось хотя бы в общих чертах обрисовать взаимосвязь между химическими и механическими явлениями, сопряженными с окислительным фосфорилированием, а также оттенить идею, согласно которой оба типа явлений могут быть отражением функций и свойств одних и тех же ансамблей молекул, участвующих в преобразовании энергии в дыхательной цепи. Мы не будем обсуждать здесь вопрос о сопряжении осмотических явлений с процессами, происходящими в дыхательной цепи, хотя он также имеет непосредственное отношение к затронутым здесь проблемам. Этот вопрос обсуждается в интересной статье Митчелла [37], в которой постулируется, что химические и осмотические явления, имеющие отношение к сопряжению, представляют собой различные стороны одного и того же процесса, который он назвал «хемоосмотическим» сопряжением. Митчелл в своей работе также выявил необходимость учета механохимических явлений. Он предполагает, что их можно объяснить электрическими и механическими напряжениями в мембранах, возникающими при разделении ионов. Отрицание Митчеллом наличия «промежуточных продуктов» в цепи реакций окислительного фосфори-



лирования, возможно, ничем не оправдано и к тому же в нем нет необходимости. Возможно, что само понятие «промежуточный продукт» должно быть уточнено. Однако для другого его вывода, который дословно звучит следующим образом [38]: «... если перенос и обмен веществ представляют собой цепь последовательных процессов, то не только обмен веществ может вызывать к жизни процессы переноса, но и перенос в свою очередь обуславливает обмен веществ; процессы обмена и переноса, как их обычно понимают биохимики, могут с успехом трактоваться как различные аспекты одного и того же процесса — *направленного обмена веществ*», — имеются достаточные основания.

Таким образом, в настоящее время имеется ряд фактов, которые, по крайней мере в общих чертах, находятся в соответствии с развитой здесь концепцией; согласно этой концепции, молекулы ферментов, образующие дыхательную цепь и встроенные в митохондриальные мембраны, не только реализуют сопряженный синтез АТФ, но также участвуют в осмотических и механических процессах. Возможно, что выявление этих трех аспектов превращения энергии откроет возможности для более рациональных подходов к проблеме реконструкции дыхательной цепи из отдельных компонентов. Известно, что компоненты актомиозиновой системы можно соединять самыми различными способами, причем физическая и химическая реакции этой системы на присутствие АТФ будут совершенно различны в зависимости от взаимной ориентации компонентов. Мы можем надеяться, что в будущем удастся реконструировать дыхательную цепь из отдельных катализаторов таким образом, что она окажется способной выполнять различные функции. Некоторые из этих реконструированных систем смогут осуществлять перенос электронов и сопряженное фосфорилирование АДФ, подобно тому как искусственная нить актомиозина может в определенных условиях сокращаться в присутствии АТФ. Но структуру такой нити отделяет от структурной организации миофибриллы «дистанция огромного размера». В свете этого различия очень важно будет детально исследовать искусственно реконструированные системы, реализующие дыхательный процесс и окислительное фосфорилирование, чтобы выявить в них наличие структурных элементов, необходимых для осуществления сопряженных осмотических и механохимических процессов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chan P. C., Lehninger A. L., Enns T. E., J. Biol. Chem., **235** 1790 (1960).
2. Chance B., Williams G. R., Advances in Enzymol., **17**, 65 (1956).
3. Conway E. J., Intern. Rev., Cytol., **2**, 419 (1953).
4. Cooper C., J. Biol. Chem., **235**, 1815 (1960).
5. Davies R. E., Ogston A. G., Biochem. J., **46**, 324 (1950).
6. Энгельгардт В. А. и Любимова М. Н., Nature, **144**, 668 (1939).
7. Энгельгардт В. А. и Любимова М. Н., Известия АН СССР, **30**, 644 (1941).
8. Fowler L. R., Hatofi T., Biochem. Biophys. Research Commun., **5**, 203 (1961).
9. Frederic J., Arch. biol. (Liège), **69**, 167 (1958).
10. Gamble J. L., Jr., J. Biol. Chem., **228**, 955 (1957).
11. Gotterer G. E., Thompson T. E., Lehninger A. L., J. Biophys. Biochem. Cytol., **10**, 15 (1961).

12. Greville G. D., Reich E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **20**, 440 (1956).
13. Holton F. E., *Biochem. J.*, **66**, 37P (1957).
14. Järnefelt J., *Biochim. et Biophys. Acta*, **48**, 104 (1961).
15. Keilin D., King T. E., *Proc. Roy. Soc.*, **B152**, 163 (1960).
16. Kielley W. W., *Международный Биохимический конгресс*, т. I, II, Москва, 1961.
17. Kielley W. W., Bradley L. B., *J. Biol. Chem.*, **218**, 263 (1956).
18. Koshland D. E., Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 98 (1958).
19. Lehninger A. L., *Harvey Lectures*, Ser. **49**, 176 (1955).
20. Lehninger A. L., In «*Enzymes: Units of Biological Structure and Function*» (O. H. Gaebler, ed.), p. 217, Academic Press, New York, 1956.
21. Lehninger A. L., In «*A Symposium on Molecular Biology*», Chicago, 1957—1958 (R. E. Zirkle, ed.), p. 122, Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1959.
22. Lehninger A. L., *Rev. Modern Phys.*, **31**, 136 (1959).
23. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.*, **234**, 2187 (1959).
24. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.*, **234**, 2465 (1959).
25. Lehninger A. L., In *Symposium Issue. Federation Proc.*, **19**, 952 (1960).
26. Lehninger A. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **86**, 484 (1960).
27. Lehninger A. L., In «*Symposium on Biological Structure and Functions, Stockholm, 1960*» (T. W. Goodwin, ed.), Academic Press, New York, Vol. II, p. 31, 1961.
28. Lehninger A. L., *Biochim. et Biophys. Acta*, **48**, 324 (1961).
29. Lehninger A. L., *Physiol. Rev.* (1962).
30. Lehninger A. L., Gotterer G. S., *J. Biol. Chem.*, **235**, 8P (1960).
31. Lehninger A. L., Neubert D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1929 (1961).
32. Lehninger A. L., Schneider M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 109 (1959).
33. Lehninger A. L., Wadkins C. L., Cooper C., Devlin T. M., Gamble J. L., Jr., *Science*, **128**, 450 (1958).
34. Lehninger A. L., Ray B. L., Schneider M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 97 (1959).
35. Levy H. M., Sharon N., Lindemann E., Koshland D. E., Jr., *J. Biol. Chem.*, **235**, 2628 (1960).
36. Lundegårdh H., *Lantbruks-Hogskol. Ann.*, **8**, 233 (1940).
37. Mitchell P., In «*Symposium on Biological Structure and Function, Stockholm 1960*» (T. W. Goodwin, ed.), Academic Press, New York, Vol. II, p. 581, 1961.
38. Mitchell P., *Nature*, **191**, 144 (1961).
39. Neubert D., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.*, **237**, 952 (1962).
40. Packer L., *J. Biol. Chem.*, **235**, 242 (1960).
41. Penefsky H. S., Pullman M. E., Datta A., Racker E., *J. Biol. Chem.*, **235**, 3330 (1960).
42. Post R. L., Merritt C. R., Kinsolving C. R., Albright C. D., *J. Biol. Chem.*, **235**, 1796 (1960).
43. Price C. A., Fonnesu A., Davies R. E., *Biochem. J.*, **64**, 754 (1956).
44. Pullman M. E., Penefsky H. S., Datta A., Racker E., *J. Biol. Chem.*, **235**, 3322 (1960).
45. Raaflaub J., *Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta*, **11**, 142—157 (1953).
46. Robertson R. N., *Biol. Revs.*, **35**, 231 (1960).
47. Rose T. H., Neubert D., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* (1962).
48. Skou J. C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **23**, 394 (1957).
49. Skou J. C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **42**, 6 (1960).
50. Vasington F. V., *J. Biol. Chem.* (1961).
51. Wadkins C. L., Lehninger A. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 1576—1582 (1960).

# ПСИХОФИЗИКА НА МОЛЕКУЛЯРНОМ И СУБМОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЯХ

Ф. Ш М И Т Т

## І. ВВЕДЕНИЕ

Человек отличается от животных тем, что в результате процессов обучения он приобретает способность воспринимать, запоминать, воскрешать в памяти и использовать информацию; он может вести сознательную, познавательную деятельность; наконец, он способен сообщать свои мысли — пусть несовершенно — другим людям посредством преобразования мыслей в звуковые или письменные символы. Высшее проявление этих свойств человека, особенно интенсивно развивавшихся в течение нескольких последних столетий, — уровень развития науки, достигнутый в настоящее время. В нынешнем году мы отмечаем четырехсотлетие со дня рождения Фрэнсиса Бэкона, которого многие ученые считают основоположником современного научного метода. Огромное влияние революции в науке (вероятно, лучше было бы назвать ее «эволюцией»), в частности в чистой и прикладной физике, явно ощущается во всех областях человеческой жизни. Биология и медицина, достигшие столь многого в борьбе с различными заболеваниями, атакуют сейчас уже само старение. Существенное увеличение средней продолжительности жизни человека и расширение производства продуктов питания влечет за собой рост народонаселения, в результате чего уже возникают серьезные проблемы этического порядка. Быть может, человеку удастся разрешить эти проблемы и в то же время далеко уйти вперед в своем эволюционном развитии, обретая фундаментальные познания о природе своего собственного бытия, что считается многими современными мыслителями величайшей задачей всей науки.

Какова может быть природа того шага в эволюционном развитии человечества, который мог бы существенно улучшить приспособленность человека не только к окружающей его физической и биотической среде, но и к самому себе и к цивилизации — той цивилизации, которая на современной ступени своего развития плохо приспособлена к потребностям человека атомного века? Быть может, человеку удалось бы достигнуть значительных успехов, если бы он направил свои аналитические и творческие способности, обеспечившие, например, развитие современной теоретической физики, на создание даже более важной с точки зрения человечества научной дисциплины — теоретической биологии, науки, до сих пор фактически не существующей. Выполнение такой задачи потребует привлечения самых различных средств и методов: холистических методов, применяемых в описательных науках — таксономии, эволюционном учении и учении о поведении; методов аналитических дисциплин — психологии, биохимии и биофизики;

вероятно, придется также найти и разработать новые математические методы исследования проблем, с которыми никогда ранее в физике сталкиваться не приходилось.

Исследование физического и химического механизмов человеческого мышления должно стать основной целью таких исследований, ибо существенный прогресс в этой области позволит открыть неизведанные возможности связи между людьми, что может оказаться поворотным пунктом в деятельности человека на нашей планете, а быть может, и вне ее.

Настоящая статья — это скромный вклад в анализ проблем и возможностей психофизики<sup>1</sup>, рассматриваемой на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

## II. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕЙРОНОВ И НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Нейроны и нейронные сети возникли как средства передачи отдельных координирующих информационных сигналов, потребовавшиеся в связи с увеличением размера организмов на ранних стадиях эволюции. Благодаря способности как тела нервной клетки, так и ее окончаний к синаптической интеграции, а также благодаря наличию аксонов, служащих каналами связи, нейроны оказываются прекрасно приспособленными для осуществления координации даже у высших организмов. Возбуждение и распространение биоэлектрических изменений («импульсов») в этих нейронных сетях (изменений, связанных только с мембраной) — вот те элементарные процессы, с которыми приходится иметь дело в нейрофизиологических исследованиях функции центральной нервной системы.

Биофизический анализ механизма этого самораспространяющегося изменения свойств мембраны при передаче импульса привел к возникновению совершенно новых представлений о механизме нервного проведения, совокупность которых можно было бы назвать «неорганической электрохимией нервного проведения». Согласно этим представлениям, при передаче возбуждения по нерву мы имеем дело с потоком определенных неорганических ионов, главным образом ионов натрия и калия, которые, по-видимому, служат основными носителями зарядов во внеклеточной и внутриклеточной фазах, а также при прохождении ионов через мембрану во время возбуждения. Объем общих сведений о структуре и свойствах мембран быстро увеличивается [13—16, 28, 49, 54, 60], но ферментативные, структурные и химические аспекты быстрых обратимых изменений, происходящих в мембране во время нервного возбуждения, выяснены еще очень мало.

Когда импульс, распространяющийся по аксону, достигает области синапса, возбуждение передается через межклеточное пространство (шириной порядка  $10^2$  Å), вероятно, при помощи весьма мощного гормонального передатчика (например, ацетилхолина или норадреналина), выделяемого в определенных количествах в синаптическую жидкость. Мы мало знаем о месте синтеза этих гормонов внутри нейронов и еще меньше — о механизме их выделения под действием импульса и о регулировании их количества близ нервных окончаний в зависимости от частоты разрядов [15, 37].

<sup>1</sup> Здесь термин «психофизика» используется в соответствии с его значением, определяемым в толковом словаре Вебстера, т. е. в смысле «научного исследования связей между процессами мышления и законами физики, а не в том смысле, в котором обычно применяют его экспериментаторы-физиологи, понимающие под психофизикой изучение реакций на физическое раздражение, в частности восприятие физических воздействий».

Электрофизиология, т. е. наука о возникновении, передаче и преобразовании биоэлектрических сигналов (потенциал  $10^{-6}$ — $10^{-1}$  в, длительность  $10^{-4}$ — $10^{-1}$  сек, скорость распространения  $10^{-1}$ — $20^2$  м/сек, регистрация микро- и макроэлектродами) в нейронах центральной и периферической нервной системы стала в высшей степени сложной наукой. Овладение ею необходимо для понимания интегративных и регуляторных функций нервных клеток (в том числе для понимания процесса «обработки» в нейронах внешней и внутренней по отношению к организму информации [3, 55]) и функции локальных областей центральной нервной системы в ее нормальном и аномальном состояниях [42]. Применение методов вычислительной техники и теории информации [43] еще больше увеличивает роль электрофизиологии в неврологии, невропатологии, психиатрии и других отраслях теоретической и практической медицины. Однако для достижения существенных успехов в психофизике уже недостаточно вести исследования на уровне нейронов; необходимо заняться изучением свойств макромолекул и сложных макромолекулярных систем.

### III. ГРАНИЦЫ ПРИМЕНИМОСТИ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ ПРИ ПСИХОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

До относительно недавнего времени было широко распространено представление о том, что основой долговременной памяти служит разряд нейронов в замкнутых цепях (реверберирующие цепи). Сложные нейронные сети, будучи однажды возбуждены, продолжают давать разряд, образуя реверберирующие цепи. В том, что разряды в нейронных сетях служат существенным фактором в явлениях настороженности, осведомленности и оперативной памяти, сомневаться не приходится. Однако теорию реверберирующих цепей следует дополнить молекулярным механизмом записи долговременной памяти, ее хранения и воспроизведения. В самом деле, если возникновение разрядов в нейронах облегчается прежними возбуждениями, то это должно быть связано с какими-то процессами и структурами на молекулярном уровне.

Против объяснения долговременной памяти на основе теории реверберирующих цепей можно привести следующие соображения. Когда животное либо погружают в глубокий наркоз, либо подвергают его глубокому охлаждению или электрошоку, электрическая активность мозга исчезает на все время воздействия и на различные периоды после его прекращения. Но ни ослабления долговременной памяти, ни ее разрушения по окончании опыта не отмечается. Согласно Мореллу [46], «... на клеточном уровне даже при использовании микроэлектродной техники никогда не удавалось обнаружить явлений, связанных с памятью». Конечно, постоянно сохраняемые следы памяти, или энграммы, следует искать не на уровне нейронов и нейронных сетей, рассматриваемых как функциональные единицы, а на молекулярном или макромолекулярном уровне.

Только часть мозга участвует в получении сенсорной информации извне, в ее переработке и в посылке импульсов по эфферентным волокнам к эффекторам (мышцы, железы и т. д.) в виде «приказов», основанных на «решениях», принятых в нервных центрах. В самом деле, число аксонов, несущих импульсы к мозгу и из него, мало по сравнению с числом нейронов и клеток нейроглии в мозге и очень мало по сравнению с числом синапсов между нейронами в мозге. Значительную часть активности мозга, по-видимому, нельзя обнаружить обычными электрофизиологическими методами; мышление, запоминание, обучение и другие процессы познания могут включать в себя

важные компоненты, не дающие при использовании этих методов электрической реакции. Конечно, возможно, что импульсы, поступающие из центральной нервной системы, «могут обуславливаться активностью различных типов, и поэтому даже их сходство не обязательно указывает на физиологическую или фармакологическую взаимосвязь» [25]; автор приведенного выше высказывания отмечает также «... необходимость пересмотра вопроса о значении результатов исследования электрической реакции коры, которые в одном случае могут оказаться весьма существенными, а в другом — почти бессмысленными».

Каков же должен быть такой пересмотр? Какое направление психофизических исследований обещает быть наиболее плодотворным? Изучение генетической «памяти» (т. е. механизмов наследственности) сразу начало очень быстро продвигаться вперед, как только генетики в своих исследованиях перешли с уровня организма или клетки на уровень макромолекул (нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды), т. е. на самый низкий уровень, на котором структуры обладают многообразием, необходимым для создания наследственного кода, и вместе с тем поддаются тщательному изучению биохимическими и биофизическими методами. Аналогичные соображения применимы и к изучению иммунологических механизмов — химической «памяти» организмов. Недавно стала совершенно очевидной необходимость обращения к макромолекулярному уровню и в психофизике; однако до сих пор в этой области сделано еще очень мало. Ниже мы приводим наглядные примеры некоторых путей подхода к интересующей нас проблеме, подсказанных опытом автора; другие, быть может более плодотворные, пути, безусловно, будут предложены и другими авторами.

#### IV. ПЕРСПЕКТИВЫ ПСИХОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Если бы было предпринято широкое исследование процессов мышления с привлечением методов, применяемых в различных науках, с той серьезностью и теми темпами, каких заслуживает объект изучения, то смена идей происходила бы, несомненно, чрезвычайно быстро, а время жизни гипотез оказалось бы относительно коротким. Такая программа должна была бы включать в себя не только отыскание еще не открытых механизмов, структур и субстанций, но и интенсивное повторное исследование тех из них, которые уже давно известны, но функции которых остаются до сих пор невыясненными. Приведем в качестве иллюстраций ряд примеров.

##### **Исследование уже известных, но плохо понятых систем**

###### *Роль клеток-сателлитов*

Нейроны всегда связаны с клетками-сателлитами. В центральной нервной системе эти клетки-сателлиты, или глиальные клетки, число которых примерно в 10 раз больше числа нейронов (около  $10^{11}$  клеток), существуют в нескольких формах в соответствии с их различными функциями. Например, одна их разновидность, по-видимому, обеспечивает быстрое распределение растворенных веществ между нейронами и кровью. Другие клетки окутывают аксоны центральной нервной системы, образуя вокруг них многослойную миелиновую оболочку. В миелинизации нервных волокон периферической нервной системы участвуют клетки-сателлиты другого типа, называемые «шванновскими клетками» [6].

Обычно предполагается, что клетки-сателлиты участвуют не только в развитии, т. е. в миелиногенезе, но и выполняют трофическую функцию; они служат, так сказать, «бесплатной столовой» для нейронов. Типы необходимых метаболитов, которые могли бы таким образом поставляться клетками-сателлитами, известны нам довольно плохо.

В периферических нервах наиболее удаленные участки аксона могут находиться на большом расстоянии от тела нейрона, и естественно было бы считать, что шванновские клетки поставляют нервному волоску необходимые метаболиты — быть может, такие богатые энергией вещества, как аденозинтрифосфат. Вообще говоря, биохимическая и физиологическая роль шванновских клеток известна нам очень плохо. Если между ними и аксоплазмой нейрона происходит интенсивный обмен растворенными веществами, то молекулы последних должны проходить через тонкие (примерно 100—200 Å) водные каналы между поверхностной мембраной аксона и мембраной шванновской клетки. Многие из этих метаболитов представляют собой органические электролиты и поэтому могут влиять на быстрый вход и выход неорганических ионов. Следовало бы также помнить, что клетки-сателлиты, образуя эти водные соединительные каналы, могут также обеспечивать субструктурную непрерывность для биофизических явлений, в настоящее время еще не выясненных, но, вероятно, имеющих значение в психофизических процессах.

В центральной нервной системе не столь очевидна потребность в дополнительном снабжении нейрона за счет метаболических процессов в других клетках, помимо специализированного снабжения его за счет крови. По данным ультраструктурных и биохимических исследований, нейрон принадлежит к весьма активным клеткам, в которых процессы биосинтеза протекают очень интенсивно, и в этом отношении он очень сходен с экзокринными секреторными клетками. Среди веществ, синтезируемых нейроном и клетками нейроглии, мы встречаем нуклеотиды и рибонуклеиновые кислоты (РНК). Недавно были разработаны изящные микрометоды, при помощи которых можно проследить за обновлением этих веществ (а также белков и других метаболитов) как в нейронах, так и в клетках нейроглии [9, 11, 12, 29—31]. Полученные результаты указывают на тесную функциональную связь между нейронами и клетками нейроглии, непосредственно окружающими нейроны. По-видимому, эти клетки снабжают нейроны богатыми энергией соединениями, особенно во время усиления активности мозга. Изменения содержания нуклеотидов и оснований РНК в нейронах и в клетках нейроглии носят реципрокный характер; это позволяет предполагать, что нейроглия, поставляя основания, необходимые для синтеза РНК, способна обеспечивать высокий уровень этого синтеза в нейронах. Такие процессы особенно интересны в свете теорий, рассматривающих РНК или белки (для синтеза последних необходимы некоторые специфические РНК) как молекулярную основу кодов памяти.

В культуре ткани нейроглии обладает интересными электрическими и механическими свойствами, которые могут носить осцилляторный характер [22, 27, 67]. При электрическом раздражении она, по-видимому, способна сжиматься и давать электрический ответ [7, 63]. Физиологическая роль этих процессов неясна.

Галамбош [17, 18] полагает, что клетки нейроглии, возможно, играют не только вспомогательную, второстепенную, трофическую роль в процессах, происходящих в мозге, но, организуясь в сети с «глиальными синапсами» (аналогичными синаптическим соединениям в нейронных сетях), служат местом хранения закодированной информации (память)

и фактически могут программировать работу нейронов при считывании этого кода.

Ясно, что роль клеток-сателлитов в процессах мышления, так же как и в процессах регуляции соматических функций, заслуживает детальных и энергичных исследований.

#### *Значение высокой метаболической активности нейронов*

По уровню своего газового обмена и интенсивности протекающих в них химических превращений нейроны относятся к самым активным клеткам. Ультраструктура нейрона с его высокоразвитым эндоплазматическим ретикулумом, обильно снабженным рибосомами (то, что в классической нейрогистологии было известно как субстанция Ниссля), весьма сложна, что характерно для клеток с высоким уровнем биосинтеза. Такая мобилизация энергии и быстрый биосинтез РНК и белка вряд ли необходимы для генерирования волн потенциала действия, при помощи которых нейроны передают импульсы; для этого процесса требуется лишь небольшая доля всей мобилизованной энергии.

Нейроплазма, очевидно, должна продуцироваться в фазах развития, когда после дифференцировки нейробластов в нейроны из тела клетки образуется аксон. Таким образом удовлетворяется потребность в связи с интегративной координацией на больших расстояниях. Существенно, чтобы при дифференцировке нейронов клеточное деление было подавлено<sup>1</sup>. В самом деле, если бы после того как в процессе эмбриогенеза был создан нормальный мозг, представляющий собой неимоверно сложное переплетение нейронов, нервные клетки начали делиться, в результате мы получили бы хаос. Возможно, что связь этих двух факторов — быстрого синтеза нейроплазмы и подавления митоза — имеет какой-то эволюционный и физиологический смысл. Дифференцированная клетка приобретает способность поддерживать устойчивое производство нейроплазмы [65] (о чем свидетельствует постоянное перемещение аксоплазмы к периферии аксона) и регенерировать новый аксон после его повреждения.

Представляется вероятным, что в клеточных механизмах, обеспечивающих жизнь отдельного организма и его приспособление в процессе эволюции, так же как и в клеточных механизмах нервной системы, клеточные процессы могут одновременно осуществлять несколько функций. Так, может оказаться, что высокий уровень биосинтеза белка и РНК в нейронах тесно связан не только с образованием и регенерацией аксонов, но и с производством макромолекулярной субстанции энграммы — телеграфной ленты памяти, которая записывает, хранит и вновь выдает эмпирическую информацию, поступившую ранее по сенсорным каналам.

#### *Функциональная роль тонкой фибриллярной структуры нейронов*

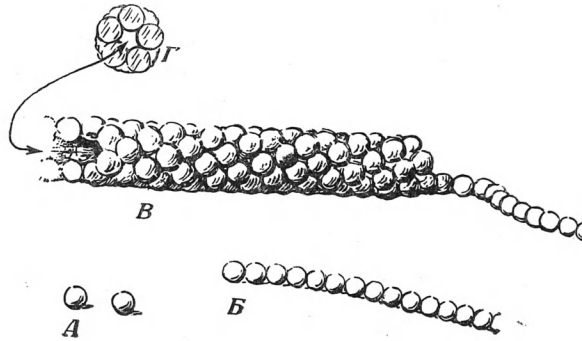
При микроскопическом изучении в теле клеток и<sup>т</sup>в аксонах некоторых свежих, нефиксированных нейронов удалось обнаружить тонкие нити (нейрофибриллы) [66]; такие же нити наблюдаются практически во всех ней-

<sup>1</sup> У некоторых микроорганизмов, лишенных витамина В<sub>12</sub> (или дезоксирибозидов), также наступает аналогичное подавление клеточного деления, вызванное нарушением синтеза ДНК, и они тоже приобретают вытянутую нитевидную форму [2]. В настоящее время изучается роль витамина В<sub>12</sub> (значение которого в развитии некоторых невропатий известно уже давно), а также роль других факторов, существенно влияющих на синтез ДНК в процессе дифференцировки нейробластов в нейроны.



ронах, подвергнутых соответствующей гистологической обработке [26]. Столь широкая распространенность нейрофибрилл настойчиво указывает на то, что они играют важную физиологическую роль. Однако и после 100 лет исследований мы еще ничего не знаем о функции этих фибриллярных белков. На электронных микрофотографиях тонких срезов хорошо видны отдельные структурные единицы нейрофибрилл — гладкие, хорошо очерченные нити диаметром 80—100 Å (нейрофиламенты). Нейрофибриллы, наблюдаемые в гистологических препаратах, представляют собой пучки нейрофиламентов. Они располагаются тангенциально к ядру тела клетки и тянутся по аксону без видимых разрывов через перехваты Ранвье и, вероятно, через весь аксон до самого его конца.

Этот фибриллярный белок был выделен из аксоплазмы гигантского волокна краба *Dosidicus gigas* и очищен, после чего были описаны его физико-химические свойства. В течение многих лет считали, что нейрофиламенты



Фиг. 1. Схематическое изображение предполагаемой организации нейрофиламента.  
× ~ 3 · 106.

А — глобулярная субъединица ( $s_{20w} = 2-4$  ед. Сведберга); Б — линейная агрегация субъединиц в нить; В — схема нейрофиламента, показывающая, как при спиральной упаковке нитей получается структура постоянной толщины (80—100 Å) с полостью «сердцевинной» диаметром 20—30 Å; Г — вид с торца, на котором видны субъединицы и полая «сердцевина». На этой схеме не указано число нитей, образующих нейрофиламент, так как оно неизвестно.

образованы параллельными рядами весьма асимметричных белковых макромолекул. Однако совсем недавно Дэвисон и Тейлор [10] предположили, что структурной единицей нейрофиламента служит относительно маленькая (молекулярный вес порядка  $10^4$ ) глобулярная молекула. Эти молекулы собираются в нити и закручиваются вокруг общей оси в спирали, образуя структуры, напоминающие белковый компонент вируса табачной мозаики. Структура нейрофиламентов, предложенная Дэвисоном и Тейлором, схематически показана на фиг. 1. Так же как и в частице вируса табачной мозаики, в них, по-видимому, есть полая «сердцевина» диаметром примерно 20—30 Å. Наличие полости не является обязательным признаком спиральной нитевидной структуры; однако отверстия приблизительно такого размера были обнаружены на электронных микрофотографиях поперечного среза нейрофиламентов [14, 23, 48]. Исследования аминокислотного состава показали, что нейрофиламенты состоят из какого-то кислого белка. В них не было обнаружено ни нуклеиновой кислоты, ни липидов.

Представление о новой ультраструктуре нейрофиламентов (в частности, о наличии водной сердцевинки) и их большая длина (вероятно, нейрофиламенты достигают окончаний аксона) породили спекуляции, касающиеся их функций [57]. Мы не знаем, принимают ли белки, из которых они состоят, какое-либо участие в создании или считывании энграммы. Чувствительность

этих белков к действию протеаз позволяет нам воспользоваться ими как средством для проверки справедливости различных функциональных гипотез, во всяком случае постольку, поскольку размер нейрона достаточно велик, чтобы в него можно было ввести препараты протеаз.

#### *Природа и функция ритмической электрической активности мозга*

Одно из наиболее характерных свойств мозга состоит в том, что в периоды бодрствования в нем наблюдаются характерные ритмы электрической активности; из них наиболее резко выражены  $\alpha$ -ритмы частотой около 10 *гц*, которые легко обнаружить на электроэнцефалограмме.

Несмотря на многолетние исследования и наличие обширной литературы, между наиболее компетентными в этой области учеными нет единодушия в вопросе происхождения этих ритмов и об их физиологической функции; анализ их представляет собой лишь один из удобных методов диагностики нарушений функции мозга. Ритмические разряды, тесно связанные с процессами, лежащими в основе сознания, исчезают во время сна, но не во время сновидений, с которыми, по-видимому, они также связаны. Вероятно, это явление играет важную роль в физике процессов мышления; однако объяснить его с позиций современной электрофизиологии пока не удается.

#### **Попытки обнаружения еще неоткрытых процессов**

Хотя исследования уже известных структур и процессов в центральной нервной системе, несомненно, должны оказаться весьма плодотворными, наибольший интерес — особенно для физиков, химиков, математиков и инженеров, занимающихся психофизикой, — представляют поиски тех понятий и явлений, которые пока еще не известны в естествознании (или, во всяком случае, в физике), но могут играть жизненно важную роль в процессах, лежащих в основе сознания, обучения, памяти и познавательной деятельности; чрезвычайно интересны также аспекты человеческого бытия, которые до настоящего времени считали неподдающимися изучению. Некоторые из них, уже смутно различимые или медленно приобретающие очертания, можно приближенно охарактеризовать, что мы и попытаемся сделать ниже.

#### *Макромолекулярное разнообразие и специфичность как физическая основа долговременной памяти*

После того как попытки выяснить природу записи долговременной памяти (энграммы) электрофизиологическими методами потерпели неудачу, внимание исследователей переключилось с возбуждения и распространения потенциалов действия на другие процессы, идущие на том же, довольно грубом, нейронном уровне. В частности, изучались пластические структурные изменения, перераспределение, разъединение и воссоединение отдельных аксонных и дендритных окончаний. Однако исследования последнего десятилетия показали, что необходимые свойства механизма памяти, в частности колоссальное разнообразие, обеспечивается только крупными макромолекулами, образовавшимися в результате полимеризации ряда отдельных мономеров: белки содержат около 20 различных типов мономеров [38], нуклеиновые кислоты (РНК) — 4 типа мононуклеотидов [8, 19, 20, 29, 30, 34, 44—46]. Даже если молекула такого полимера содержит всего тысячу остатков, т. е. относительно невелика, то число возможных комбинаций

этих мономеров оказывается поистине огромным —  $20^{1000}$  для белков и  $4^{1000}$  для РНК. Хотя реально представить себе такие числа довольно трудно, они показывают, что наличие гигантских полимеров легко может объяснить способность человека переработать за 70 лет жизни объем информации, составляющий, как предполагают,  $10^{15}$ — $20^{20}$  битов [64].

В гипотезах о физико-химической записи и считывании записанной в памяти информации (опыта) различают три процесса: 1) фиксация, или запечатление, опыта (здесь применяется термин, предложенный Джерардом [19, 20]; 2) делегализация и длительное хранение полученной информации и 3) воскрешение в памяти, или считывание, этой информации в сознательной, познавательной деятельности. Остановимся коротко на этих процессах, которые были недавно рассмотрены мной более подробно в серии лекций [58].

*а. Фиксация опыта, или преобразование сенсорных входных сигналов в стабильную макромолекулярную форму.* Для простоты предположим, что этот процесс состоит в преобразовании некоторого электрического сигнала, т. е. характерного потока ионов или других носителей зарядов, зависящего каким-то образом от времени, в изменение последовательности мономерных составляющих в большой линейной макромолекуле. В этом процессе могут также участвовать химические передатчики (гормоны), хотя их роль в синаптической передаче в мозге еще неясна и довольно трудно представить себе картину распределения концентраций гормонов так же, как мы можем представить себе картину распределения частотномодулированных ионных токов, обусловленную временной и пространственной суммацией сенсорных токов действия. Даже если допустить участие в этом какого-то химического передатчика, следует думать, что он, вероятно, не играет роли в самом жизненно важном процессе преобразования, а служит просто причиной электрических разрядов в постсинаптических мембранах; результирующее электрическое возмущение по-прежнему оставалось бы некоторым видом трансдукции.

В данном случае мы ограничимся общей дискуссией и оставим в стороне даже такой фундаментальный вопрос, как вопрос о том, связан ли преобразующийся электрический параметр только с нейронными сетями или он может действовать вненейронно посредством ионного потока, электрического поля, потенциала или какого-либо другого физического фактора.

Нет необходимости уточнять, происходит ли интересующее нас преобразование в теле нейрона или в соме нейроглии (см. [17, 18]), из которой сложный сигнал (энграмма) поступает в нейроны для программирования.

Для отыскания ключей к природе этого преобразования полезно рассмотреть современные представления об определении специфичности в генетике (долговременная генетическая «память» вида) и в иммунологии, в которой при рассмотрении соотношения антиген — антитело приходится иметь дело с долговременной химической «памятью» организма, обеспечивающей его защиту от того или другого заболевания. Преобразование закодированной в хромосомной ДНК информации для целей химической регуляции синтеза белка (фермента), по-видимому, происходит как направляющий, *инструктивный* процесс, в котором отрезок цепи ДНК точно (но в виде комплементарной последовательности) копируется отрезком цепи РНК эквивалентной длины; последний, отделившись от ДНК, передает инструкцию в цитоплазматические участки синтеза (нуклеопротеид рибосом), где код считывается в виде определенной специфической последовательности аминокислотных остатков в синтезируемом белке [4, 33]. В иммунохимических процессах механизм превращения информации, вероятно, носит *селективный*

характер. Антиген не передает инструкций макромолекулам, кодирующим белок ( $\gamma$ -глобулин), заставляя их принимать какую-то специфическую, характерную для данного антигена конфигурацию, а выбирает из огромного числа возможных конфигураций, созданных клеткой, одну, которая функционирует после этого выбора как антитело, специфичное по отношению к данному антигену [21, 40].

Логично предположить, что если значительная часть тока (потока ионов), создаваемого волной потенциала действия в сенсорных нейронах или в непосредственной близости от них, переходит в нервные клетки или в клетки нейроглии, где происходит преобразование (фиксация опыта), то электрический эффект может влиять на биосинтетически активную систему, находящуюся в термодинамически стабильном состоянии, одним из двух описанных выше способов: либо (1) направляющим инструктивным способом, т. е. путем *качественного* изменения, влияя на *последовательность* структурных единиц (нуклеотидов в случае РНК и аминокислот в случае белков), которые находятся в депо предшественников и включаются в состав макромолекулы в момент преобразования, либо (2) селективным способом, т. е. путем *количественного изменения*, влияя на *длину* макромолекулы, синтезируемой в момент преобразования, но не изменяя последовательности остатков в синтезированном фрагменте макромолекулы.

Механизм преобразования, предложенный Хиденом [29], относится к инструктивному типу; согласно его гипотезе, поток ионов, создаваемый приходящей волной потенциала действия в сенсорных нейронах, нарушает ионное равновесие в цитоплазме и, таким образом, изменяет нуклеотидные основания, входящие в состав определенных участков. При этом те или иные основания заменяются другими из депо, окружающего нейрон, и измененная таким образом РНК в свою очередь изменяет синтезируемый белок. Этот белок или его комплемент отлагается в постсинаптической структуре, где он вынуждает нейрон к разрядам при поступлении следующего частотно модулированного сигнала, идентичного тому, который «запустил» первоначальный процесс образования специфической РНК и белковых макромолекул. Реакция любой клетки, несущей в своей синаптической мембране некую макромолекулярную энграмму, которая служит кодом для единицы сенсорной информации, и есть процесс считывания. Подобный механизм не требует строгой локализации в мозге: отдельные нейроны могут участвовать в нем как субъединицы ряда нейронных сетей. Хиден не высказывал никаких предположений о деталях механизма, при помощи которого осуществляется такое преобразование. Не высказывали их, насколько нам известно, и другие авторы, считающие молекулярную конфигурацию энграммой устойчивой долговременной памяти.

Вероятно, полезно рассмотреть также механизмы селективного типа; опишем для наглядности один из возможных вариантов такого механизма. К самовоспроизведению способны не только ДНК или вирусная РНК. Недавно было установлено [47, 50], что некоторые типы РНК после своего образования на ДНК-матрицах, по-видимому, приобретают способность к воспроизведению (РНК-шаблон) в каком-то неизвестном участке клетки, но, вероятно, не в рибосомах. Быть может, при взаимодействии преобразуемого электрического сигнала с термодинамически стабильной системой, производящей РНК-шаблон, от этой последней отщепляются фрагменты частично синтезированной РНК. Тогда любой фрагмент, размер которого превышает некоторую критическую величину, мог бы служить энграммой, получаемой из обычной последовательности нуклеотидных остатков в результате какого-то процесса выбора, изменяющегося во времени.

б. *Хранение энграммы. Воспроизведение, сопровождающееся делекализацией.* Если запись памяти — это какой-то вариант некоторого определенного вида макромолекул, обладающий специфической конфигурацией и составом, то долготейшее существование подобных записей говорит о том, что либо энграмма чрезвычайно устойчива, т. е. не разрушается в процессе метаболизма, что в высшей степени маловероятно, либо она способна к самовоспроизведению, т. е. к неограниченно долгой жизни. Способность к самовоспроизведению могла бы, пожалуй, осветить другую кажущуюся тайну, а именно то, что энграмма не остается локализованной в нейронных сетях, в которых она была первоначально записана, а широко распространяется в мозге [39]. Самовоспроизведение является свойством ДНК и вирусной РНК, а, возможно, также и внутриклеточной РНК типа «шаблона». Хотя белки, по-видимому, лишены этой способности, они, несомненно, участвуют в клеточных процессах восприятия, хранения и считывания информации и могут играть жизненно важную роль в образовании энграммы. Таким образом, в поисках субстрата энграммы следует, вероятно, сосредоточить внимание на макромолекулах типа РНК и комплексов РНК — белок, что совместимо с имеющимися в настоящее время данными о связи синтеза РНК и ее обновления с функцией нейронов [29, 30] и с фактами, выявленными недавно в изящных и весьма обнадеживающих опытах Моррелла [44—46]. В этих опытах было показано, что хроническое эпилептогенное повреждение, произведенное в небольшой области на поверхности одного полушария головного мозга, вызывает через несколько дней появление эпилептиформных нейронных разрядов в гомотопном участке противоположного полушария («зеркальный очаг»). Эти вторичные разряды, вначале определяемые разрядами в области первичного повреждения, могут стать независимыми, т. е. непосредственно не затронутые нейроны «научаются» поведению нового типа. Гистохимические исследования показали, что эти изменения, возникшие в результате «обучения», сопровождаются изменениями РНК.

То обстоятельство, что рибонуклеаза способна при определенных условиях разрушать записи памяти, возникшие в результате обучения или выработки условного рефлекса [8], согласуется с гипотезой о роли РНК в рассматриваемом процессе. Однако само по себе оно не может служить решающим доказательством, поскольку всегда есть опасность загрязнения препарата рибонуклеазы следами других ферментов, например следами протеаз; кроме того, рассматриваемая нами система — это не простая система, в которой идет реакция чистого субстрата с чистым ферментом, а в высшей степени сложная неоднородная система клеток или целых организмов.

в. *Считывание (воскрешение в памяти).* Из трех гипотетических психофизических процессов, перечисленных выше, меньше всего известен процесс, посредством которого молекулярное представление энграмм, вероятно, широко распространенное в клетках мозга, может быть считано при сознательном (или подсознательном) воскрешении в памяти. Существует предположение [29, 30], что наличие энграмм или их компонентов в синаптических мембранах нейронов облегчает разряд этих нейронов при повторном воздействии стимулов, послуживших причиной первоначального создания энграммы. Каким образом происходит эта активация, т. е. каким образом некоторые физико-химические свойства определенных макромолекул, включенных в организованную систему ультраструктурных компонентов, транспортируются в возбуждение нейронных мембран, мы до сих пор не знаем. Число нерешенных проблем в этой области чрезвычайно велико, но это не должно нас обескураживать. Вспомним, что, несмотря на громадное количество исследований и чрезвычайно важных достижений молекулярной

генетики за последние два десятилетия, относительно подобного рода считывания в генетических процессах также удалось пока выяснить крайне мало. Эта загадка становится еще более таинственной, если учесть, что в окончательном считывании преформированного генетического кода участвуют также регуляторные и модулирующие процессы роста и развития. Однако отсутствие фактических и теоретических сведений относительно механизма считывания генетического кода не умаляет ценности гипотезы, основанной на роли ДНК в генетической детерминации. Разработка полезных гипотез макромолекулярного кодирования процессов мышления, вероятно, также потребует предварительных исследований, но это не должно задерживать начала согласованного наступления на проблемы записи и хранения энграммы, представляющиеся более простыми.

### *Роль быстрых реакций*

После разработки и плодотворного применения электронной микроскопии (и других методов исследования ультраструктуры) к изучению функций клеток и тканей стало ясно, что наиболее важные клеточные процессы требуют для своего осуществления какой-то исключительно тонкой и сложной организации на молекулярном и субмолекулярном уровнях. Для облегчения участия молекул субстрата в сопряженных реакциях ферменты группируются в определенные последовательности. Примером может служить цикл Кребса или цепь переноса электронов в митохондриях. По-видимому, в клетке существуют специфические структуры со свойствами, напоминающими свойства твердого тела, в которых разыгрываются жизненно важные биохимические реакции взаимопревращения энергии, ее мобилизации и сопряжения [24, 42]. В настоящее время при помощи электронных микроскопов с высокой разрешающей способностью такие структуры удалось обнаружить [15, 16]; дальнейшее усовершенствование техники исследований, возможно, приведет к обнаружению новых жизненно важных молекулярных механизмов.

Сейчас уже удалось достичь довольно высокого *пространственного* разрешения. Так, разрешающая способность при электронной микроскопии биологического материала, равная  $10 \text{ \AA}$ , уже не считается особым достижением; возможно, что ее скоро удастся довести до  $5 \text{ \AA}$  или даже добиться еще большего разрешения. Такое усовершенствование методов исследования, по-видимому, будет связано с огромным скачком в наших знаниях — скачком даже более значительным, чем тот, который последовал за первыми попытками применения электронной микроскопии в биологии. Однако наши возможности *временного* разрешения все еще относительно малы. Сокровенные жизненные процессы протекают очень быстро. Для достижения существенного прогресса, особенно в области психофизики, следует значительно усовершенствовать методы изучения отдельных быстрых реакций и механизмов сопряжения. Представляется вероятным, что дальнейшие успехи в этом направлении будут связаны с использованием приемов, разработанных в физике твердого тела, физической химии и квантовой химии (см. [1.32]).

Среди быстрых процессов переноса, существенных для водных биомолекулярных систем, наибольшее значение имеют: 1) перенос элементарных заряженных частиц — перенос электронов (этот процесс обеспечивает полупроводимость молекулярных агрегатов) и перенос протонов по системам организованных водородных связей (как в гидратных оболочках макромолекул) и 2) перенос энергии, в том числе передача возбуждения (существенно

в фоторецепторах), взаимодействие, связанное с переносом зарядов (взаимодействие донор — акцептор), и передача энергии по цепи переноса электронов (освобождение энергии в митохондриях). Со всем этим мы уже встречались [45, 56].

Вероятно, такие реакции непосредственно участвуют в преобразованиях, обеспечивающих возможность познавательного поведения, скорее всего — в фиксации сенсорной информации в виде устойчивых макромолекулярных конфигураций и в считывании этой информации при воспоминании, и поэтому рассмотрение этого вопроса в сборнике, посвященном Альберту Сцент-Дьёрдьи, кажется нам вполне уместным. Более чем кто-либо другой Сцент-Дьёрдьи подчеркивал важность изучения субмолекулярных процессов, лежащих в основе наиболее важных биохимических и биофизических явлений [61, 62].

В предыдущей серии докладов [58], посвященных роли макромолекулярной специфичности в биологической памяти, Каша [36] рассмотрел различные типы переходных, неустановившихся молекулярных процессов, которые могли бы служить основой для моделей кодирования и считывания записей долговременной памяти. Сюда относятся молекулярное электронное возбуждение, внутримолекулярный перенос энергии, взаимодействие возбужденных состояний в фотовозбудимых макромолекулярных и ламеллярных системах, обратимые фотохимические процессы, фотообратимые фотохимические процессы и обратимая электролюминесценция. Изучение последней (при ее использовании, вероятно, на инфракрасных и микроволновых частотах) представляется весьма перспективным. Значение биологически структурированных микрополей и стохастических моделей памяти было рассмотрено О. Шмиттом [59].

Поиски квантовохимических и бионических (см. [3]) моделей, основанных на физике твердого тела, следовало бы связать с одновременными исследованиями микросостава нейронов и клеток-сателлитов при помощи электронной микроскопии высокой разрешающей силы и других биофизических и биохимических методов. Если бы удалось исследовать (с помощью ультрамикроразрядов) электрические свойства макромолекулярной субструктуры клеток мозга (и других клеток!), можно было бы обнаружить сильные электрические поля, направленные поперек клеточных поверхностей раздела (аналогичные полям поверхностной мембраны аксона), и, возможно, весьма специфические неустановившиеся процессы электростатического и электромагнитного характера, связанные с этими полями.

Лишь через полвека после того как Гальвани обнаружил существование животного электричества, Дюбуа-Реймон, физиолог биофизического направления, получил доказательства его физической природы. Следует надеяться, что в современных психофизических исследованиях удастся избежать такой ненужной потери времени. Достигнуть этого можно четко согласованным взаимодействием ученых различных направлений, для которых представляет серьезный интерес изучение мышления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Augustine L. G., ed., «Bioenergetics», Radiation Research, Suppl., 2, 685 pp., Academic Press, New York, 1960.
2. Beck W. S., Hook S., Barnett B. H., Biochim. et Biophys. Acta (1962).
3. «Bionics Symposium (Living Prototypes — The Key to New Technology)». Wright Air Development Division Technical Report 60—600, December, 499, pp. U. S. Air Force, Wright-Patterson Air Force Base, Ohio, 1960.

4. Brenner S., Jacob F., Meselson M., *Nature*, **190**, 576—581 (1961).
5. Castillo J. del., Katz B., In «Progress in Biophysics» (J. A. V. Butler, ed.), Vol. 6, pp. 121—170. Pergamon Press, New York, 1956.
6. Causey G., «The Cell of Schwann», 120 pp., E. and S. Livingstone, London, 1960.
7. Chang J. J., Hild W., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **53**, 139—144 (1959).
8. Corning W. C., John E. R., *Science*, **134**, 1363—1365 (1961).
9. Cummins J., Hydén H., V Международный Биохимический конгресс, т. I, II, Москва, 1961.
10. Davison P. F., Taylor E. W., *J. Chem. Physiol.*, **43**, 801—823 (1960).
11. Edström J. E., Fichner D., Schor N., In «Regional Neurochemistry» (S. S. Kety and J. Elkes, eds.), pp. 274—278, Pergamon Press, New York, 1961.
12. Egházi E., Hydén H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 403—410 (1961).
13. Fernández-Morán H., In «Biophysical Science—A Study Program» (J. L. Oncley et al., eds.), pp. 319—330, Wiley, New York, 1959.
14. Fernández-Morán H., In «Macromolecular Complexes» (M. V. Edds, Jr., ed.), pp. 113—158, Ronald Press, New York, 1961.
15. Fernández-Morán H., *J. Assoc. Research Nervous Mental Diseases*, Suppl. (1961).
16. Fernández-Morán H., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
17. Galambos R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 129—136 (1961).
18. Galambos R., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
19. Gerard R. W., In «Handbook of Physiology», Section I: Neurophysiology (H. W. Magoun, Section ed.), Vol. III, pp. 1919—1965. American Physiology Society, Washington, D. C., 1960.
20. Gerard R. W., In «Brain Mechanisms and Learning» (J. F. Delafresnaye, A. Fresard, R. W. Gerard and J. Konorski, eds.), pp. 21—32, Blackwell, Oxford, 1961.
21. Gitlin D., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
22. Giles P., «Neuroglia, Morphology and Function», 110 pp., C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1955.
23. Gray E. G., *J. Anat.*, **93**, 420—433 (1959).
24. Green D. E., *Radiation Research*, Suppl., 2, 504—527 (1960).
25. Grundfest H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **92**, 877—889 (1961).
26. Hild W., In «Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen» (W. v. Möllendorf and W. Bargmann, eds.), Vol. IV/4, pp. 1—184, Springer, Berlin, 1959.
27. Hild W., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
28. Hodgson A. J., In «Biophysical Science — A Study Program» (J. L. Oncley et al., eds.), pp. 331—341, Wiley, New York, 1959.
29. Hydén H., In «Biochemistry of the Central Nervous System», Proceedings of the 4th International Congress of Biochemistry, Vol. III, pp. 64—89, Pergamon Press, London, 1959.
30. Hydén H., In «The Cell» (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.), Vol. IV, Part. I, pp. 215—323, Academic Press, New York, 1960.
31. Hydén H., Lange P., In «Regional Neurochemistry» (S. S. Kety and J. Elkes, eds.), pp. 190—199, Pergamon Press, New York, 1961.



32. «International Colloquium of Fast Reactions in] Solutions», *Z. Elektrochem.*, **64**, № 1 (1960).
33. J a c o b F., M o n o d J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 318—356 (1961).
34. J o h n E. R., In «Toward a Definition of Mind» (J. Scher, ed.), Free Press, Glencoe, Illinois, 1960.
35. K a s h a M., In «Fast Fundamental Transfer Processes in Aqueous Biomolecular Systems», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1960, in the Department of Biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), Cambridge, Massachusetts, 1960.
36. K a s h a M., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
37. K a t z B., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **102**, 275—312 (1958).
38. K a t z J. J., H a l s t e a d W. C., *Comp. Psychol. Monogr.*, **20**, 1 (1950).
39. L a s h l e y K., In «Physiological Mechanisms in Animal Behavior», Symposia of the Society for Experimental Biology. № IV, pp. 454—482, Cambridge University Press, London and New York, 1950.
40. L e d e r b e r g J., *Science*, **131**, 269—276 (1960).
41. L e h n i n g e r A. L., In «Biophysical Science — A Study Program» (J. L. Oncley et al., eds.), pp. 136—146, Wiley, New York, 1959.
42. M a g o u n H. W., ed., «Handbook of Physiology», Section I: Neurophysiology, Vol. III. American Physiological Society Washington, D. C., 1960.
43. «Mechanisation of Thought Processes». National Physical Laboratory Symposium No. 10, Vols. I and II, 980 pp., Her Majesty's Stationery Office, London, 1959.
44. M o r r e l l F., *Physiol. Revs.*, **41**, 443—494 (1961).
45. M o r r e l l F., In «Brain Mechanisms Learning» (J. F. Delafresnaye, A. Fessard, R. W. Gerard, and J. Konorski, eds.), pp. 375—389, Blackwell, Oxford, 1961.
46. M o r r e l l F., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
47. O c h o a S., Paper presented at Symposium on a Multidisciplinary Research Program in a Mental Hospital. McLean Hospital, Belmont, Massachusetts, May 15, 1961.
48. P a l a y S. L., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T. (F. O. Schmitt, ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
49. P o n d e r E., In «The Cell» (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.), Vol. II, pp. 1—84, Academic Press, New York, 1961.
50. R e d d i K. K., *Science*, **133**, 1367 (1961).
51. R o b e r t s o n J. D., In «Molecular Biology» (I) (D. Nachmansohn, ed.), pp. 87—151, Academic Press, New York, 1960 (см. Молекулярная биология, ИЛ, Москва, 1963).
52. R o b e r t s o n J. D., In «Progress in Biophysics» (J. A. V. Butler and B. Katz, eds.), Vol. 10, pp. 343—418, Pergamon Press, New York, 1960.
53. R o b e r t s o n J. D., In «Regional Neurochemistry» (S. S. Kety and J. Elkes, ed.), pp. 497—534, Pergamon Press, New York, 1961.
54. R o b e r t s o n J. D., In «Electron Microscopy in Anatomy» (J. D. Boyd F. R. Johnson, and J. D. Lever, eds.), pp. 74—99, Edward Arnold, London, 1961.
55. R o s e n b l i t h W. A., ed., «Sensory Communication», 844 pp., The M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, and Wiley, New York, 1961.
56. S c h m i t t F. O., ed., «Fast Fundamental Transfer Processes in Aqueous Biomolecular Systems», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T., Cambridge, Massachusetts, 1960.
57. S c h m i t t F. O., D a v i s o n P. F., *Actualités Neurophysiologiques* (A. M. Monnier, ed.), pp. 355—369, Masson, Paris, 1961.

58. Schmitt F. O., ed., «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T., M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
59. Schmitt O. H., In «Macromolecular Specificity and Biological Memory», Proceedings of Lecture Seminar Series, Spring Term 1961, in the Department of Biology, M. I. T., M. I. T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
60. Sjöstrand F. S., In «Biophysical Science — A Study Program» (J. L. Oncley et al., ed.), pp. 310—318, Wiley, New York, 1959.
61. Szent-Györgyi A., «Bioenergetics», 143 pp., Academic Press, New York, 1957.
62. Szent-Györgyi A., «Introduction to a Submolecular Biology», 135 pp., Academic Press, New York, 1960.
63. Tasaki I., Chang J. J., Science, **128**, 1209—1210 (1958).
64. Von Neumann J., «The Computer and the Brain», 85 pp., Yale Univ. Press New Haven, Connecticut, 1958.
65. Weiss P., In «Regional Neurochemistry» (S. S. Kety and J. Elkes, eds.), pp. 220—242, Pergamon Press, New York, 1961.
66. Weiss P., Wang H., Anat. Record., **67**, 105—117 (1936).
67. Windle W. F., ed., «Biology of Neuroglia», 340 pp., C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1958.

# РОЛЬ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИ В ПРИРОДЕ

Я. ФРИДЕН

## ВВЕДЕНИЕ

В сборник, посвященный вкладу Сцент-Дьёрдьи в биологические исследования, по праву должна входить глава о роли меди в природе. В 1928 г. Сцент-Дьёрдьи сообщил о выделении витамина С, или аскорбиновой кислоты<sup>1</sup>. В 1930 г. Сцент-Дьёрдьи обнаружил в листьях капусты фермент, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту. Позднее было показано, что этот фермент (оксидаза аскорбиновой кислоты) содержит в качестве протетической группы медь. В литературе того времени возникли споры относительно ферментативной природы этой реакции. Эффективность самого иона двухвалентной меди при рН 5—9 в качестве катализатора реакции окисления аскорбиновой кислоты и других субстратов служит одним из наиболее типичных примеров простой ферментной модели. Так называемый автокатализ аскорбиновой кислоты происходит настолько часто, что лишь многолетние тщательные исследования [4, 5] позволили в конце концов с определенностью установить наличие в растениях оксидазы аскорбиновой кислоты — гомогенного медьсодержащего белка, обладающего каталитическими свойствами, отличными от каталитических свойств самой меди.

Сцент-Дьёрдьи занимался также исследованием и других свойств биологически активной меди. Значительное число его ранних работ посвящено окислительному обмену и окислительным циклам. В настоящее время считается весьма вероятным, что наиболее важные концевые оксидазы растений и животных содержат ионы меди, служащие основными функциональными элементами. Так, после длительных споров ученые пришли к заключению, что цитохромоксидаза содержит ионы меди, служащие основными функциональными элементами, но точная роль этого иона остается пока неизвестной [19]. В этом отношении возможным исключением среди обычных оксидаз служат флавопротеиды, однако их участие в последней стадии окисления весьма сомнительно. Медьсодержащие ферменты непосредствен-

---

<sup>1</sup> Сцент-Дьёрдьи воспользовался своим правом дать имя новому неизвестному веществу, которое впоследствии оказалось витамином С. Убедившись, что новое соединение представляет собой моносахарид, структура которого ему неизвестна, он предложил английскому журналу «Нейчер» название «igpose». Когда редакция попросила его дать менее шутовское название, он предложил им в качестве замены «Бог его знает». Позднее Сцент-Дьёрдьи дал этому соединению временное название «гексуруновая кислота», переименовав его впоследствии в аскорбиновую кислоту для идентификации его физиологической функции.

но участвуют в биологическом окислении — процессе, которому посвятили столько внимания Сцент-Дьёрдьи и его сотрудники.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МЕДИ

### Медьсодержащие ферменты и белки

Наиболее четко функция меди в организме как растений, так и животных проявляется в той чрезвычайно важной роли, которую она играет в главных концевых оксидазах, в частности в цитохромоксидазе, оксидазе аскорбиновой кислоты и тирозиназе. Действительно, высокая чувствительность растений и животных к отравлению ионами цианида, по-видимому, обусловлена подавлением ферментативных реакций, вызванным действием иона цианида на часть фермента, содержащую ион меди. Впрочем, в случае цитохромоксидазы в этом процессе может участвовать также геминовая группа фермента. В настоящее время тесная связь между медью и активностью цитохромоксидазы хорошо установлена опытами *in vivo* и *in vitro*. Так, по данным Гублера с сотрудниками, цитохромоксидазная активность у животных с недостаточным содержанием меди в организме оказывается в 8 раз ниже, чем в норме. Пока еще не установлено, обусловлено ли такое уменьшение активности прямым или косвенным действием ионов меди на синтез этого важного фермента. Бекер и Нелсон обнаружили, что при дыхании срезов картофеля свыше 85% всего поглощения кислорода катализируется тирозиназой. Исследования других авторов [20] показали, что в зародышах ячменя при созревании растений основная роль на последней стадии окисления переходит от цитохромоксидазы к оксидазе аскорбиновой кислоты.

Именно на стадии концевой оксидазы медьсодержащие ферменты могут существенно влиять на чувствительность тканей к лучевым повреждениям. Согласно теории Шуберта, под действием ионизирующего излучения образуются органические перекиси, которые в свою очередь окисляют  $Cu(I)$ -белки в  $Cu(II)$ -белки, например в цитохромоксидазе.  $Cu(II)$ -белки «фиксируются» в этом состоянии окисленности и теряют способность вступать в реакцию с молекулярным кислородом, понижая таким образом уровень дыхательного обмена. В настоящее время имеется еще мало данных в пользу этого утверждения. Шуберт сообщает, что стабилизация  $Cu(I)$ , непосредственное разрушение перекиси и восстановление кислорода в тканях могут служить защитой от ионизирующего излучения всех типов даже после облучения. Стабилизаторы  $Cu(II)$  оказывают обратное действие, вызывая увеличение чувствительности к облучению.

У низших организмов медьсодержащие белки участвуют в некоторых важных специализированных функциях. У определенных групп животных, в частности у ракообразных и моллюсков, гемоцианин служит внеклеточным белком — переносчиком кислорода. В данном случае эти медьсодержащие белки заменяют железосодержащие белки. У животных образование пигментов кожи, например меланина, также требует участия тирозиназы. Кожные пигменты не только защищают животное от чрезмерного поглощения света, но и играют какую-то роль в образовании покровительственной защитной окраски. У насекомых меланин становится настолько плотным, что возникает склеротизация, обеспечивающая дополнительную механическую защиту организма от обезвоживания. Однако, пожалуй, более существенным для некоторых растений и низших животных является возможное антибиотическое действие продуктов окисления хинона, образующихся при разрушении кожного покрова. При повреждении появляется тирози-

назная активность, в результате чего наступает быстрое почернение области поражения. Образовавшиеся продукты хромогенного окисления обладают способностью подавлять рост бактерий и других паразитов в области повреждения. Пигментацию меланомы также связывают с наличием тирозиназ. В родственных меланоме непигментированных опухолях тирозиназы обнаружено не было. Тирозиназа была найдена в зачатках красных и черных перьев кур, но она отсутствовала в зачатках перьев белых леггорнов. Окраску морских свинок также связывают с наличием тирозиназы.

Недавно была установлена роль меди в транссульфировании, аналогичная ее роли в трансоксигенировании [23]. Из печени крысы был выделен медьсодержащий фермент,  $\beta$ -меркаптопируваттранссульфураза, переносящий серу субстрата к соответствующему акцептору, например сульфитному иону. Приведенные выше данные указывают, что медьсодержащие ферменты играют в процессах обмена более важную роль, чем это предполагалось ранее.

Недавно из хлоропластов ряда растений был выделен новый медьсодержащий белок, пластоцианин, который, по-видимому, участвует в фотосинтезе [21]. В листьях некоторых растений примерно половина всей меди находится в виде этого медьсодержащего белка; его содержание в этих растениях превышает содержание цитохрома *c*. Отношение содержания в листьях хлорофилла и пластоцианина составляет менее 300 : 1, тогда как отношение содержания хлорофилла и цитохрома *c* равно примерно 400 : 1. Так как пурпурные бактерии, по-видимому, не содержат пластоцианина, было высказано предположение, что он участвует в механизме выделения кислорода, отсутствующем в фотосинтетической системе пурпурных бактерий [21]. Пластоцианин может также стимулировать процесс фотовосстановления; причем это природное соединение действует в качестве окислителя в реакции Хилла. Таким образом, еще одна его роль может состоять в участии в качестве окислительно-восстановительного звена в переносе электронов в процессе обмена у растений.

#### БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА

В настоящее время функция церулоплазмينا [7] только начинает проявляться. Хотя он обладает слабыми каталитическими свойствами, эту функцию вовсе не обязательно связывать с его чрезвычайно высокой биологической активностью. Возникшая была надежда на то, что определение уровня церулоплазмينا в крови можно использовать при диагнозе шизофрении, не оправдалась. Однако было высказано предположение, что увеличение содержания церулоплазмينا может служить «биохимическим защитным мероприятием», т. к. он, действуя в качестве фермента, приводит к удалению некоторых биологически активных ароматических аминов.

В церулоплазмине содержится свыше 90% всех ионов меди сыворотки, и поэтому вначале было высказано предположение о тесной связи этого сывороточного белка с переносом меди. Однако церулоплазмин, по-видимому, не участвует в переносе ионов меди из кишечника в печень, поскольку ионы меди начинают связываться с церулоплазмином лишь после переноса их в печень. Возможно, что церулоплазмин представляет собой удобное депо ионов меди, образуя естественную буферную систему. Имеющиеся в настоящее время данные говорят в пользу того, что у человека  $Cu(II)$  выводится с калом, а не с мочой. Потребность в меди для биохимических реакций, по-видимому, довольно постоянная. Поскольку медь очень токсична, в организме, вероятно, существует какой-то быстродействующий биохимический механизм, позволяющий поддерживать уровень меди в крови на постоянном уровне.

мический механизм, обеспечивающий выделение поступившей с пищей меди через несколько часов после ее попадания в кровяное русло. Быть может, церулоплазмин как раз и обеспечивает тот механизм, который позволяет избегать возникновения токсического уровня свободных ионов меди в печени или в сыворотке. При оценке каталитической активности по стабильности ряда окисляемых биологических компонентов (например, аскорбатов, полифенолов и психогенных аминов) оказывается, что при рН 7 свободная  $\text{Cu(II)}$  активнее иона меди церулоплазмينا. Поэтому церулоплазмин можно считать безвредной формой иона меди. Возможно также, что церулоплазмин способствует поддержанию ионов меди в растворимой форме при значениях  $\text{pH} \geq 7$ .

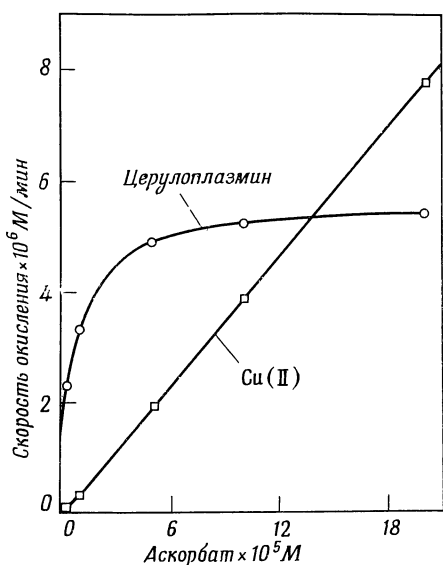
Предварительные клинические исследования, проведенные в Японии, позволили Шимицу и его сотрудникам предположить, что церулоплазмин выполняет целый ряд функций. Постулируется, что церулоплазмин служит регулирующим фактором в кроветворной системе, ускоряющим потребление и накопление железа, в результате чего содержание железа в печени заметно увеличивается. Церулоплазмин вызывает пролиферацию молодых клеток эритропоэтической и гранулопоэтической систем, что в конце концов приводит к гиперплазии костного мозга. При анемии отношение содержания меди в церулоплазмине к общему содержанию меди в сыворотке понижено, но введение небольших доз церулоплазмينا позволяет довести это отношение до нормы. У кроликов церулоплазмин повышает уровень дыхания ткани печени и увеличивает ее каталазную активность. Утверждается также, что введение церулоплазмينا позволяет добиться улучшения при некоторых типах анемии. У кроликов при анемии, развившейся в результате кровотечения или гемолиза, вызванного фенилгидразином или фибринолитическими ферментами, наблюдается одновременное увеличение количества церулоплазмينا. Считается, что понижение уровня церулоплазмينا способствует ускорению клеточного деления уже существовавших предшественников эритроцитов. Обычный окисленный церулоплазмин ускоряет рост юных клеток гранулопоэтической системы. Содержание церулоплазмينا в сыворотке человека повышается при инфекциях, беременности, анемиях и злокачественных опухолях. Оно понижено при болезни Уилсона (наследственной гепатолентикулярной дегенерации) и хроническом нефрите. Следует подчеркнуть, что эти данные и предположения Шимица и др. требуют еще подтверждения.

Недавно Браун и Уайт показали, что в анаэробных условиях фракция частиц, выделенная из гомогената сердечной мышцы, медленно восстанавливает церулоплазмин. В аэробных условиях окисленный церулоплазмин ингибирует перенос электронов. Хотя данные о наличии церулоплазмينا в этих тканях отсутствуют, отмечается его возможная роль в регулировании процесса окисления.

Не исключено также, что церулоплазмин — это оксидаза аскорбиновой кислоты млекопитающих, которую уже давно пытались обнаружить. Этот фермент, несомненно, имеется в растениях, грибах и бактериях, но до сообщения Хольмберга и Лоурелла [7] его присутствие в организме млекопитающих не было доказано. Недавно было установлено [12], что активность церулоплазмينا, характерная для оксидазы аскорбиновой кислоты, обусловлена наличием примесей  $\text{Cu(II)}$  в препаратах церулоплазмينا. Вальтер и Фриден, приняв меры, обеспечивающие отсутствие  $\text{Cu(II)}$  в изучаемом материале, заново исследовали этот вопрос и обнаружили значительные количественные и качественные различия в катализе этого процесса окисления церулоплазмином и  $\text{Cu(II)}$  при рН 5,2. Их данные убедили нас в том,

что церулоплазмин обладает активностью оксидазы аскорбиновой кислоты. Мы можем суммировать наши данные следующим образом.

1. Кинетические параметры реакций с участием  $\text{Cu(II)}$  и церулоплазмينا при эквивалентных концентрациях меди отличаются друг от друга на несколько порядков величин. Катали-



Фиг. 1. Различия в кинетике реакций окисления аскорбата, катализируемых церулоплазмином и  $\text{Cu(II)}$ , в  $0,2 \text{ M}$  ацетате при  $\text{pH } 5,2$ .

Концентрация использованных препаратов в расчете на  $\text{Cu(II)}$  составляла  $1,76 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

ной активности церулоплазмينا. Однако первоначальную оксидазную активность в отношении обоих этих субстратов можно полностью восстановить путем диализа комплекса ЭДТА — церулоплазмин. Приведенные опыты показывают, что эти каталитические активности связаны с недиализуемой частью препаратов церулоплазмينا.

### Роль меди *in vivo*

Роль меди в других обменных функциях только сейчас начинает получать признание. В классических исследованиях действия меди (и других веществ, присутствующих в следовых количествах), делая выводы относительно ее вероятной роли, руководствовались симптомами, развивающимися при недостаточности меди или в результате ее токсического действия. Недавно появилось несколько обзорных работ по этому вопросу, в том числе интересный новый обзор [12], в котором особое внимание уделяется обмену меди у млекопитающих. Поэтому здесь мы приведем только краткую сводку имеющихся данных.

Недостаточность меди у животных, по-видимому, встречается реже, чем проявления ее токсического действия. Однако, как и следовало ожидать, изучение симптомов, развивающихся при недостаточности меди, способствовало пониманию роли этого элемента в природе. Важная роль меди в организме самых различных животных была ясно показана. Ниже пере-

зованное церулоплазмином окисление аскорбата следует типичной кинетике Михаэлиса — Ментен с  $K_M$ , равной  $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , и с константой скорости, равной 3,2 на каждый атом меди. Реакции с участием  $\text{Cu(II)}$  обычно являются реакциями первого порядка, если содержание аскорбата составляет менее  $10^{-4} \text{ M}$ ; вычисленное значение  $K_M$  составляет  $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , и константа скорости равна 150 на 1 атом  $\text{Cu(II)}$  (фиг. 1).

2. Ион меди церулоплазмينا обратимо восстанавливается и обесцвечивается аскорбатом.

3. Неокупроин не влияет ни на активность оксидазы аскорбиновой кислоты, ни на *n*-фенилендиаминоксидазную активность церулоплазмينا. Неокупроин полностью подавляет катализируемое  $\text{Cu(II)}$  окисление аскорбиновой кислоты при  $\text{pH } 6,8$ .

4. ЭДТА подавляет всю активность оксидазы аскорбиновой кислоты и около 60% фенилендиаминоксидаз-

числены основные нарушения обмена, возникающие в результате недостаточности меди.

1. Уменьшение всасывания и использования железа, ведущее к гипохромной и микроцитарной анемии, к недостаточности ферментов, содержащих группу гелия, в том числе цитохромоксидазы.

2. Нарушение биосинтеза фосфолипидов, ведущее к демиелинизации («энзоотической атаксии» у ягнят).

3. Нарушение остеогенеза, ведущее у некоторых животных к изменениям скелета, аналогичным его изменениям при рахите.

4. Аномалии в образовании кератина и пигмента, ведущие к возникновению дефектов шерстного покрова у ягнят и к ахромотрихии у крыс.

Отравление медью вызывает у экспериментальных животных сложный синдром, включающий анемию, заболевание печени, болезнь Вильсона. Синдром отравления медью возникает у человека редко, что обусловлено наличием тонких механизмов всасывания и отвода меди. Высказано также предположение, что в процессе старения может играть роль накопление в тканях ионов некоторых тяжелых металлов, в частности ионов меди и железа. В низких концентрациях  $Cu(II)$  подавляет функцию многих ферментных систем, в том числе активность ряда медьсодержащих ферментов.

Липнер получил данные, указывающие на эндокринную регуляцию содержания меди в некоторых тканях крысы. Общий уровень меди в тканях печени, почек и сердца у крыс линии Вистар оказался связанным обратным соотношением с состоянием щитовидной железы животного. Для объяснения этих наблюдений было высказано предположение о том, что при повышенной функции щитовидной железы происходит уменьшение содержания меди, служащей ингибитором, что приводит к повышению уровня окислительного обмена, вероятно, с участием цитохромоксидазной системы. В своей ранней работе Сузуки отмечал, что тироксин активирует препараты цитохромоксидазы. Мы объясняли процесс активации оксидазы аскорбиновой кислоты тироксином и его аналогами удалением следов  $Cu(II)$ , действующей как ингибитор, или изменениями, затрагивающими сульфгидрильные группы [18].

## МЕДЬ В ПРИРОДЕ

Ионы меди, по-видимому, входят в состав ряда белков животных и растительных организмов. Даже в таких жидкостях организма, как кровь, можно обнаружить мало свободных ионов меди. Например, при введении радиоактивной меди ( $Cu^{64}$ ) в организм взрослого мужчины она появляется прежде всего в сыворотке в связанной с сывороточным альбумином форме, быстро проникает в печень и затем выходит из нее в виде медьсодержащего белка — церулоплазмينا. Несомненно, некоторое малое количество меди существует и в виде ионов меди [вероятно, в виде  $Cu(II)$ ]. Солтман и его сотрудники установили, что включение ионов меди срезами печени крысы можно объяснить, предположив наличие специфических участков связывания ионов меди. На фиг. 2 приведена более подробная схема обмена ионов меди в организме человека.

Имеется множество пока еще неизвестных особенностей обмена меди, которые могут открыть нам новые типы встречающихся в природе медных соединений. Например, мы не знаем, в какой форме находится медь в желчи или как всасываются ионы меди в пищеварительном тракте. По всей вероятности, и в желчи и в кишечнике она встречается в форме низкомолекулярных комплексов. Конечно, нельзя также исключить существования других





литическая активность. Медьсодержащие ферменты составляют значительную часть группы металлоферментов, роль и число которых непрерывно возрастают. Ферменты этой группы резко отличаются от ферментов, активируемых ионами металла, по трем основным признакам.

Таблица 1

Наиболее важные медьсодержащие ферменты и некоторые их свойства

Фермент	Наилучший источник	Содержание Cu, %	Молекулярный вес, $10^3$ г	Cu/моль	Ферментативная активность
1. Тирозиназа (растений)	Грибы шляпочные	0,20	100	3—4	Окисление фенола и полифенола
2. Тирозиназа (млекопитающих)	Меланома	—	—	—	Тирозин
3. Фенолоксидаза насекомых	Синяя муха	—	500	—	ДОПА → меланин
4. Лакказа	Японское лаковое дерево	0,22	120	4	Окисление ароматических аминов, фенолов
5. Оксидаза аскорбиновой кислоты	Тыква	0,25	150	6	Аскорбат → дегидроаскорбат
6. Цитохромоксидаза	Сердце, печень	0,09	70	1	Окисление восстановленного цитохрома с
7. Уриказы	Печень	0,007—0,067	120	1	Урикат → аллантоин
8. β-Меркаптопируваттранссулфураза	Печень	0,17	35	1	β-Меркаптопируват → пируват
9. Медьсодержащий белок <i>Pseudomonas</i>		0,35	17	1	Промежуточное звено в переносе электронов
10. Пластоцианин	<i>Chlorella</i> , листья зеленых растений	—	—	—	Фотосинтез
11. Церулоплазмин	Сыворотка	0,34	150	8	Окисление <i>n</i> -фенилдиамина, окисление аскорбата

1. *Связь иона металла с белком.* Основным отличием металлсодержащих ферментов от ферментов, активируемых ионами металла, служит прочность связи иона металла с белком. В металлсодержащих ферментах обычно нельзя обнаружить диссоциации иона металла; константа диссоциации комплекса ион металлов — белок, безусловно, меньше  $10^{-10}$  М. Ион металла нельзя отделить диализом. При очистке препарата отношение  $\frac{\text{ионы металла}}{\text{белок}}$  непрерывно увеличивается и достигает наконец постоянной величины

(соответствующей по крайней мере одному атому иона металла на минимальный молекулярный вес белка). В противоположность этому легко обнаружить и измерить диссоциацию иона металла в случае ферментов, активируемых ионом металла. При очистке ионы металла легко удаляются, в резуль-

Таблица 2

## Медьсодержащие белки и некоторые их свойства

Белок	Наилучший источник	Содержание Cu, %	Молекулярный вес, $10^3$ г	Cu/моль	Возможные функции
Церулоплазмин	Сыворотка	0,34	150	8	Множество возможных функций (см. в тексте)
Гемоцианин	Плазма омара и улитки	0,16 0,19	780 6700	20 200	Перенос кислорода
Цереброкупреин	Мозг	0,30	35	2	Накопление меди и др.
Эритрокупреин*	Эритроциты человека	0,35	34	2	То же
Гемокупреин**	Эритроциты быка	0,35	30	2	То же
Гепатокупреин	Печень лошади и быка	0,34	35	2	То же
Медьсодержащий белок молока	Молоко	0,19	—	—	То же
Медьсодержащий белок <i>Rhus vernicifera</i>	Японское лаковое дерево	0,33	25	1	Неизвестны

\* Появились дополнительные сообщения о менее точно идентифицированных медьсодержащих белках, выделенных из различных источников, в том числе из пивных дрожжей (0,12% Cu) и из вируса коровьей оспы (0,05% Cu).

\*\* До сих пор не подтверждено явное различие между этими белками.

тате чего отношение  $\frac{\text{ионы металла}}{\text{белок}}$  уменьшается. Ионы металла можно также удалить путем длительного диализа.

2. *Специфичность ионов металла.* В случае металлсодержащих ферментов специфичность ионов металла обычно очень велика. Чаще всего встречаются ионы Zn, Cu, Fe, Mo, а также, по-видимому, ионы Mn и Co. Обычно активность металлсодержащих ферментов не сохраняется при замене ионов одних металлов ионами родственных им металлов. Ферменты, активируемые ионами металла, не обладают высокой специфичностью, и близкие по своим свойствам ионы легко заменяют в них друг друга. В сущности, было показано, что ионы всех металлов периодической системы, в том числе ионы таких «экзотических» металлов, как Nd, La или Sm, активируют ту или иную ферментную систему. Однако в наших представлениях об этих критериях следует сохранять некоторую гибкость. Недавно Кольман и Воли получили апокарбоксипептидазу и обнаружили, что для восстановления пептидазной активности этого природного металлсодержащего фермента ион Zn можно заменить ионами Co, Ni и в меньшей степени — ионом Mn. Для восстановления его эстеразной активности ион Zn можно заменить

также ионами Hg, Cd и Pb. Из восьми исследованных ионов переходных металлов один только ион меди не восстанавливал ни одной из каталитических активностей апокарбоксипептидазы. Этот факт, вероятно, отражает неспособность Cu(II) образовывать соответствующие группы, обуславливающие каталитическое действие, но он может также указывать на наличие другой реакции, в которой Cu(II) окисляет некоторые «ключевые группы» в апокарбоксипептидазе с образованием неактивной формы апофермента. Такие взаимодействия белков с Cu(II) изучались в целом ряде лабораторий, в том числе в лаборатории автора [16].

3. *Роль иона меди в кинетике реакций.* При определении роли иона металла в обеих группах ферментов решающим служит наличие частичной или полной зависимости ферментной активности от присутствия иона данного металла. При полном отсутствии ионов металла металлсодержащие ферменты лишены какой бы то ни было активности. После добавления иона металла (при условии постоянства остальных параметров) наблюдается прямая пропорциональность между количеством добавленных ионов и активностью фермента. Получение апофермента данного металлсодержащего фермента может оказаться затруднительным из-за прочности связей между ионом металла и белком. Ферменты, активируемые ионами металла, легко получить в свободном от ионов металла виде; однако часто они обладают некоторой, хотя и слабой, активностью. При добавлении иона соответствующего металла реакция следует видоизмененной кинетике Михаэлиса — Ментен.

Все медьсодержащие ферменты, перечисленные в табл. 1, относятся к группе металлсодержащих ферментов. В настоящее время нет точно проверенных данных о существовании ферментов, активируемых ионами меди. Возможно, что это обусловлено особенно сильным сродством иона меди к белкам. Из всех ионов металла, обнаруженных в биологических системах, Cu(II), по-видимому, наиболее прочно связывает белки. Для того чтобы гарантировать использование иона меди для своих каталитических нужд, белок должен прочно включать ион меди в свои спирали. Это обеспечивает удержание иона меди медьсодержащими ферментами, несмотря на наличие конкурентных белков. Единственным возможным исключением служит нитритредуктаза, выделенная из *Neurospora*; активность ее неочищенного препарата может увеличиться при добавлении Cu(II). Целый ряд ферментов утрачивает свою активность при добавлении Cu(II); возможно, что это является следствием окисления сульфгидрильных групп.

В своем обзоре 1950 г., посвященном роли ионов металла в ферментных системах, Ленингер [8] постулировал три их основные возможные функции, которые не обязательно взаимно исключают друг друга. Высокое сродство белков к ионам меди ограничивает возможную роль последних в каталитической функции медьсодержащих ферментов. Нельзя ожидать, что ион меди будет осуществлять свой ферментный контроль, противодействуя активирующему влиянию иона какого-либо другого металла на определенную ферментную систему. Однако, так же как и в случае церулоплазмينا, ион меди может быть полезен в качестве связывающей группы, обеспечивающей правильное взаимное расположение фермента и субстрата. Наконец, логично предположить, что ион меди должен входить в истинный активный центр фермента, особенно если учесть обнаруженные изменения степени окисленности этого иона во время проявления каталитической активности.

Составление перечня медьсодержащих ферментов, аналогичного их перечню в табл. 1, требует некоторых произвольных определений того, что следует понимать под различными типами ферментов или ферментативной

активности. Например, хотя в таблице перечислено только три типа фенолоксидаз, их, по всей вероятности, больше, например тирозиназа из *Neurospora*, тирозиназа насекомых и т. д. До сих пор нет полной уверенности в том, что даже сравнительно хорошо идентифицированный фермент шляпочных грибов не представляет собой сочетания двух ферментов, обладающих монофенолазной и полифенолоксидазной активностью соответственно. Специфичность ферментов, носящих название лакказ, установлена относительно плохо. Зингер и Кирни [13] определяли лакказы в основном как фенолоксидазы, отличающиеся по своей специфичности от тирозиназ тем, что они не действуют на монофенолы, но окисляют *n*-фенилендиамин и гидрохинон, а также *o*-двухатомные фенолы. Хотя церулоплазмин не точно подходит под такое определение, он больше похож на лакказу, чем на тирозиназу. Церулоплазмин катализирует также окисление аскорбиновой кислоты; это настолько осложняет его отнесение к тому или иному классу ферментов, что его приходится рассматривать отдельно.

В приведенном выше списке пропущены два фермента, в которых, как утверждалось ранее, медь служит неотъемлемой частью белка. Показано, что ни бутирилкофермент-А-дегидрогеназа, ни дегидраза  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты не требуют наличия меди для проявления своей ферментативной активности. По всей вероятности, содержание в них меди, о котором сообщалось ранее, объясняется загрязнением белка, выделенного из какого-либо источника, или загрязнением, внесенным во время процесса выделения. Необходимы также дополнительные подтверждения того, что уриказа представляет собой медьсодержащий белок. Было установлено [9], что ни диализ против иона цианида, ни действие среды с кислым значением pH не могут привести к удалению относительно малого количества ионов меди из уриказы. Эти две процедуры почти неизменно приводят к выделению меди из всех истинных медьсодержащих белков, за исключением цитохром-оксидазы.

### Медьсодержащие белки

Оказалось невозможным точно описать биологическую роль медьсодержащих белков, перечень которых приведен в табл. 2. Хотя белок не всегда должен обладать специфической функцией, однако часто это имеет место. Не обязательно также, чтобы биологическая активность медьсодержащего белка была связана с содержанием в нем меди, однако такое предположение вполне логично, и на нем можно строить дальнейшие эксперименты. Итак, мы предполагаем, что в определенной ткани медьсодержащий белок участвует в поглощении, переносе или выделении меди, или служит буфером для меди, или играет какую-то роль в каталитической активности данной ткани. Возможно, что церулоплазмин играет роль в переносе меди, однако в настоящее время можно только предположить, что большинство белков участвует в накоплении ионов меди. До тех пор пока не будут перепробованы все возможные субстраты и все оптимальные условия, любой природный глобулярный белок следует подозревать в участии в катализе. Оптимальные условия могут оказаться особенно существенными для обнаружения активности медьсодержащих белков. Например, для обнаружения относительно слабой каталитической активности церулоплазмينا требуется чрезвычайно тщательный подбор надлежащего значения ионной силы и pH. Предполагается, что после более подробного исследования медьсодержащих белков удастся создать оптимальные условия в окружающей среде и обнаружить их каталитическую активность. Можно себе представить, что с физиологической точки зрения

выгодно было бы иметь серию окисляющих ферментов, подобных медьсодержащим белкам, которые будут служить ферментами лишь при достижении определенных значений рН или определенных концентраций солей. Поскольку речь идет о рН, щелочные и кислые фосфатазы уже иллюстрируют это положение.

### Общие свойства медьсодержащих белков и ферментов

2. *Молекулярный вес и содержание меди.* За исключением гемоцианина, все медьсодержащие белки имеют молекулярный вес, не превышающий  $1,5 \cdot 10^5$ . В некоторых медьсодержащих белках примерно 17 000 г белка приходится на 1 атом меди. Это напоминает гемопротеиды, например гемоглобин, для которого отношение количества белка к количеству гема имеет примерно ту же величину. По аналогии можно ожидать, что медьсодержащие белки также состоят из диссоциируемых субъединиц, соответствующих  $\alpha$ -,  $\beta$ - или другим цепям гемоглобина, но субъединицы значительно больших размеров обнаружены только в высокомолекулярных гемоцианинах. Медьсодержащие ферменты трудно классифицировать по этому признаку, так как для них отношение  $\frac{\text{белок}}{\text{медь}}$  колеблется от 17 000 до 100 000. Гемоцианины, по-видимому, представляют особый тип медьсодержащих белков, но они отражают общую тенденцию в молекулярной эволюции белков — переносчиков кислорода. Там, где несущие кислород белки остались вне клеток, произошла их агрегация в гигантские молекулы; смысл этого, по-видимому, в том, чтобы уменьшить их вклад в осмотическое давление в крови и в лимфе. В табл. 2 приведены только два крайних значения размера молекулы гемоцианина.

### Оптические характеристики

Большинство медьсодержащих белков и медьсодержащих ферментов имеет красивый синий или сине-зеленый цвет; их полосы поглощения лежат в области 600—665 мкм. Известно, что уриказа и гепатокупреин печени быка бесцветны. Тирозиназу долгое время связывали с наличием интенсивной пигментации, но после разработки различных новых методов ее очистки оказалось, что она тоже практически бесцветна. Такое отсутствие окраски согласуется с предположением о том, что в тирозиназе медь находится в состоянии  $\text{Cu(I)}$  [22]. Это предположение основано на внешнем виде комплекса  $\text{Cu(I)}$ -купроин, образующегося после удаления иона меди из тирозиназы ледяной уксусной кислотой. Фриден [16] отмечает, что подобный тест может привести к ложным выводам, так как боковые цепи белков содержат различные группы, которые быстро восстанавливают  $\text{Cu(II)}$  до  $\text{Cu(I)}$ . Роберт указал, что эти реакции выражены сильнее при кислых значениях рН. Поэтому считается, что для бесспорного обнаружения  $\text{Cu(I)}$  в тирозиназе следует дожидаться разработки новых методов, а также модификации существующих химических методов (например, методов Фельзенфельда). Особенно подходящими будут методы, не требующие удаления иона меди из белка, например метод электронного парамагнитного резонанса, уже использованный при изучении лакказы (см. [24]).

Недавно было установлено, что интенсивность видимого спектра иона меди медьсодержащих белков очень высока. В простых соединениях, содержащих ион двухвалентной меди, молярные коэффициенты поглощения

$E_{\text{макс}}$  редко превышают 200, тогда как для гемоцианина, церулоплазмينا и оксидазы аскорбиновой кислоты  $E_{\text{макс}}$  равно 750, 1200 и 767 соответственно. Эти полосы исчезают при удалении иона меди с помощью цианида или, в некоторых случаях, при восстановлении иона меди до иона одновалентной меди. Оргель [11] предположил, что такое увеличение интенсивности поглощения обусловлено наличием комплекса с переносом заряда на низком энергетическом уровне. Поскольку участвующие в этом структуры требуют связывания кислорода либо в виде комплекса с переносом заряда, либо в виде иона двухвалентной меди, модифицированного крупной компонентой комплекса с переносом заряда, такое увеличение интенсивности спектра служит хорошим тестом для обнаружения переносчиков кислорода. Гемоцианин имеет полосу поглощения при 345 мк, которую, так же как и полосу при 600 мк, можно заставить исчезнуть, удалив ион меди цианидом.

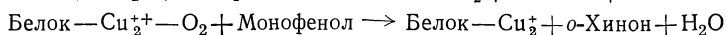
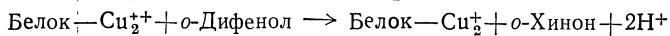
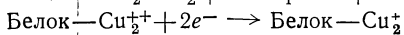
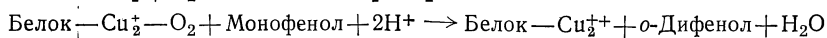
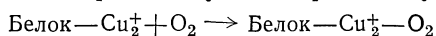
До сих пор наше внимание в основном сосредоточивалось на поглощении в видимой части спектра, обусловленном наличием меди. Изучение ультрафиолетового спектра поглощения, отражающего прежде всего поглощение в белках, также может способствовать выяснению деталей структуры медьсодержащих белков. Согласно опубликованному данным [22], гомогенная тирозиназа отличается необычайно сильным поглощением: при 280 мк  $E_{1\%}^{1\text{см}} = 27$ . Это указывает, вероятно, на необычайно высокое относительное содержание тирозина или триптофана либо говорит о наличии остаточных весьма хромогенных загрязнений. Для церулоплазмينا также получается несколько повышенное значение  $E_{1\%}^{1\text{см}}$ , равное 15,5. В то же время для церebroкупреина и уриказы приводятся типичные для белков значения — 9,7 и 11,5.

### Степень окисленности меди в медьсодержащих белках

Для того чтобы ионы меди в медьсодержащих белках могли служить протетической группой при терминальном окислительном катализе, они должны обладать способностью принимать электроны из соответствующего субстрата и, по-видимому, непосредственно передавать эти электроны кислороду. Считается, что это влечет за собой непрерывный переход меди из состояния Cu(II) в состояние Cu(I) или наоборот. Предполагается, что в синих медьсодержащих ферментах после истощения источника электронов и при наличии достаточного количества кислорода ион меди фермента остается в состоянии Cu(II). Он может существовать в состоянии Cu(I) только при наличии субстрата. Накамура [24] подтвердил это предположение для иона меди лакказы. Основываясь на измерениях магнитной восприимчивости, он заключил, что в окисленной или нативной лакказе растительного происхождения медь присутствует только в виде Cu(II). При восстановлении лакказы аскорбиновой кислотой медь фермента количественно восстанавливалась до Cu(I). Мальмстрём и др. опубликовали данные о таком же сдвиге в степени окисленности лакказы, выделенной из грибов. Аналогичные заключения напрашиваются на основании наблюдений Джозелу и Доусона, которые нашли, что ион меди оксидазы аскорбиновой кислоты обменивается с  $\text{Cu}^{64}$  только при работе фермента и что, по-видимому, ион меди фермента может находиться в восстановленном состоянии. О проблемах, связанных с обнаружением Cu(I) в белках [16], уже упоминалось в предыдущем разделе. Здесь мне хотелось бы подчеркнуть желательность использования физических методов исследо-

вания интактных белков для определения состояния иона меди в медьсодержащих белках.

Интересная, но сложная ферментная система тирозиназы, пожалуй, представляет собой особый случай. Был предложен механизм, объясняющий неактивное состояние этого фермента, содержащего  $\text{Cu(I)}$ , и обнаруженную в нем фенолазную и дифенолазную активности:



В недавно вышедшей книге Ингрэма «Механизмы биохимических реакций»<sup>1</sup> высказывается предположение о возможном участии комплексов, аналогичных ионам  $\text{CuO}^+$  и  $\text{CuO}_2^+$ , в тирозиназной активности.

На основании опытов по обмену  $\text{Cu}^{64}$ , проведенных как с активной, так и с неактивной тирозиназой, было постулировано [15], что окисление монофенола не может идти через *o*-дигидрофенол. Данные по обмену  $\text{Cu}^{64}(\text{II})$  подтверждают предположение о наличии двух различных активных центров (или ферментов) в тирозиназе, а именно центров катехолазной и крезолазной активности. Ион меди, содержащийся в участках крезолазной активности, не способен к обмену, тогда как в участках катехолазной активности он может обмениваться с  $\text{Cu}^{64}(\text{II})$ . Был отмечен [10] функциональный параллелизм между гемсодержащими и медьсодержащими белками. В белках каждого типа присутствуют переносчик кислорода, содержащий восстановленный металл (гемоглобин и гемоцианин), переносчик электронов (цитохром и цитохромоксидаза) и окисляющий фермент (пероксидаза и тирозиназа).

### Выводы из данных о действии лигандов на медьсодержащие ферменты

Из данных о действии ряда лигандов на определенные медьсодержащие ферменты, приведенных в табл. 3, можно сделать некоторые важные выводы. Ион цианида, по-видимому, оказывается наиболее эффективным из всех действующих на ион меди реагентов, вероятно потому, что его малые размеры позволяют ему ближе всего подойти к иону меди медьсодержащих белков. По-видимому, он выгодно отличается от других лигандов относительно сильным взаимодействием с ионами меди. Так, ион цианида подавляет активность всех известных медьсодержащих ферментов. Часто ион цианида быстро отнимает ион меди от медьсодержащих белков, образуя с ней комплексы или восстанавливая ее, в результате чего в некоторых случаях возникают способные к реактивации апоферменты. Исключением служит цитохромоксидаза, активность которой подавляется при действии иона цианида. Предполагается, что именно это обуславливает летальное действие цианида на организм человека. Не установлено, влияет ли ион цианида непосредственно на ион меди цитохромоксидазы, так как это единственный медьсодержащий фермент, у которого на каждый ион меди приходится одна группа гема. Конечно, общеизвестно, что ион цианида практически уничтожает активность всех гемоферментов.

<sup>1</sup> Книга переведена на русский язык: Ингрэм Л., Механизмы биохимических реакций, изд. «Мир», М., 1964.



Таблица 3

## Действие лигандов на некоторые медьсодержащие ферменты\*

Фермент	CN	CO	ЭДТА	ДИЭ-КА	1,10-Фенантролин	Неокупроин	8-оксихинолин	Тиросин	Cu (II)	CN-удаляет Cu из белка
Оксидаза аскорбиновой кислоты**	П 4,0	+	А	П 5			П 4	А	П 6—7	Да
Церулоплазмин**	П 5,5	Нет	П 5,3	П	П 5,3	Нет	П 4	Нет	Нет	50%
Цитохромоксидаза	П 5,3	П	Нет	±		Нет	Нет	А		Нет
Тирозиназа**	П 4,9	П	П 4,5	П 4,5		П 4,7			Нет	Да
Уриказа	П 5,3		П	П			П			Нет
Лакказа	П	Нет	±							Да
β-Меркаптопируваттранссульфуразы Cu (II)**	П	Нет		±		±	П		П	Да
Окисление аскорбата	П		П	П	П А	П	П	П		

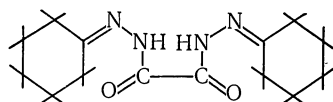
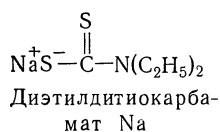
\* Числа под буквенными обозначениями — это значения  $-\log (P)$ , необходимые для подавления активности по крайней мере на 50%, П — подавление, А — Активация, ± — подавление не более чем на 35% при концентрации  $10^{-3} - 10^{-4} M$ .

\*\* Данные опубликованных и неопубликованных работ нашей лаборатории.

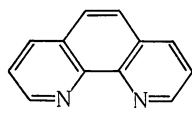
Рассмотрим другие лиганды, часто используемые при исследовании медьсодержащих ферментов. Химическая структура ряда лигандов показана на фиг. 3. Конечно, нельзя называть эти соединения «реагентами на ион меди». Правда, при сравнении их действия на большинство металлов переходной группы оказывается, что эти лиганды образуют хелаты с ионами меди легче, чем с ионами Ni(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Zn(II), Mn(II), но это различие носит количественный, а не качественный характер. В любой биологической системе может быть достигнута специфичность взаимодействия. Однако это должно быть доказано для каждого отдельного случая, и обобщения, сделанные на основании частных случаев, следует производить с большой осторожностью. Например, 1,10-фенантролин настолько активен в отношении образования хелатов с ионами Fe, Zn и Cu во многих белках, что никак нельзя говорить о его специфичности. Джеймс [20] применил диэтилдитиокарбамат натрия (ДИЭКА) для оценки роли медьсодержащих ферментов в терминальной стадии процесса дыхания растений. Его метод заключался в использовании иона цианида для обнаружения процессов дыхания, обусловленных терминальной стадией окисления, в которой принимают участие ферменты, содержащие и железо и медь, а диэтилдитиокарбамата натрия — для обнаружения процессов, идущих под действием одних только медьсодержащих ферментов. Считалось, что во всех остальных случаях дыхание обусловлено флавопротеидами. Хотя эти данные весьма интересны и наводят на размышления, однако использование диэтилдитиокарбамата натрия не позволяет получить вполне

точных результатов, на которые рассчитывал Джеймс. Применяемый им реактив очень неустойчив, а его специфичность в отношении медьсодержащих ферментов весьма сомнительна.

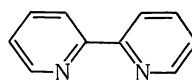
В последние годы было обнаружено несколько чрезвычайно полезных лигандов для ионов металла; они появились настолько недавно, что не успели еще получить широкого распространения, которого они безусловно заслуживают. Особый интерес представляет неocupроин, достаточно хорошо растворимый в воде. Неocupроин, вероятно, более специфичен в отношении иона



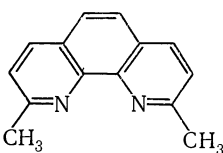
бис-Циклогексанондиоксальдигидразон (купризон)



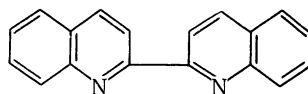
1,10-Фенантролин



2,2'-Бипиридин



2,9-Диметил-1,10-фенантролин (неocupроин)



2,2'-Бихинолин (купроин)

Фиг. 3. Структура лигандов, часто используемых при изучении медьсодержащих и других металлсодержащих ферментов.

меди, чем его более простой аналог 1,20-фенантролин (см. фиг. 3). Однако неocupроин тоже нельзя считать специфическим реактивом на  $\text{Cu(I)}$ . Скорее можно было бы сказать, что неocupроин преимущественно связывает ион  $\text{Cu(I)}$ , поскольку было показано, что он образует также хелаты с  $\text{Cu(II)}$ . Действие этих крупных лигандов для ионов меди нельзя предсказать с той же точностью, как действие цианида. Неocupроин мгновенно и неконкурентно подавляет активность тирозиназы, но не подавляет *n*-фенилэтилендиаминной активности или активности оксидазы аскорбиновой кислоты церулоплазмينا или цитохромоксидазы. В противоположность этому ЭДТА мгновенно подавляет активность оксидазы аскорбиновой кислоты, церулоплазмينا и уриказы, после нескольких часов подавляет активность тирозиназы, однако не оказывает влияния на цитохромоксидазную активность.

Различия в реакции медьсодержащих ферментов на действие различных лигандов иона меди обусловлены четырьмя факторами.

1. *Сродство лиганда к меди, содержащейся в молекуле белка.* Для всех обычно применяемых лигандов характерна сильная тенденция к образо-

ванию хелатов, или комплексов со свободными ионами меди. Хотя взаимодействия такого рода не всегда одинаковы, однако нельзя считать, что различия между ними определяют различия в действии отдельных лигандов. Возможно, впрочем, что эти незначительные различия усиливаются, когда ион меди частично связан с белком.

2. *Число и тип связей с ионом меди.* Концевые, или способные к замещению, связи, доступные лиганду иона меди, определяют возможный тип образуемого комплекса. Можно предположить, что прочность связей меди в большинстве медьсодержащих ферментов указывает на наличие по меньшей мере 4—6 связей между ионом меди и белком, если только речь не идет о двух смежных сульфгидрильных группах. Это может даже найти свое отражение в скорости реакции между лигандом и медьсодержащим ферментом. Например, реакция ЭДТА с церулоплазмином протекает мгновенно, в то время как реакция этого лиганда с тирозиназой идет очень медленно.

3. *Стерическая доступность участка локализации меди.* Геометрия участка, смежного с участком локализации меди, может быть такова, что она ограничивает подход или проникновение некоторых лигандов более крупных размеров. Ион цианида, по-видимому, представляет собой лиганд наименьшего размера и подавляет активность медьсодержащих ферментов; ион цианида и окись углерода — это, по-видимому, единственные соединения, способные проникать к меди или к группе гема цитохромоксидазы. Стерические соображения позволяют объяснить тот факт, что на церулоплазмин действует 1,10-фенантролин, а на его 2,9-диметилловое производное — неocupроин.

4. *Степень окисленности меди.* Активность использованных лигандов в отношении образования комплексов с  $\text{Cu(I)}$  и  $\text{Cu(II)}$  различна, и поэтому совершенно очевидно, что степень окисленности меди может влиять на их взаимодействие с любым медьсодержащим ферментом. Возможно, что чувствительность тирозиназы к неocupроину обусловлена тем, что, как предполагают, в этом ферменте медь находится в состоянии  $\text{Cu(I)}$  [22].

### Взаимодействие ионов меди с белками

К сожалению, в данной статье невозможно точно описать структуру участка локализации меди в любом медьсодержащем белке, как это можно сделать для железа в железосодержащих гемопротейдах. Мы приведем здесь лишь ряд общих соображений и рассмотрим некоторые выводы относительно участков локализации меди в специфических медьсодержащих белках.

Для всех медьсодержащих белков характерна столь прочная связь с ионом меди, что его нельзя удалить диализом при нейтральных значениях рН. По мере уменьшения рН до величины, меньшей 5, в большинстве медьсодержащих белков начинается отщепление иона меди; следует отметить, что пока существуют только предварительные исследования по этому вопросу. Так, в интервале рН от 5 до 8 нельзя обнаружить никакой диссоциации меди в результате диализа. Такая прочная связь между ионами меди и белками позволяет уверенно отличать медьсодержащие белки от множества других металлопротеидов. Она служит как бы внутренней меткой медьсодержащего фермента, дающей возможность идентифицировать активные центры ряда таких ферментов или хотя бы участки локализации меди в молекуле медьсодержащего фермента. В лаборатории автора в настоящее время проводятся исследования, в которых делается попытка выделить и идентифицировать активные центры ряда медьсодержащих ферментов,

например тирозиназы и церулоплазмينا. Несколько лет назад предварительные исследования выявили заметную устойчивость тирозиназы к протеолизу химотрипсином и трипсином в случае, когда отношение тирозиназы к протеазе составляло 50—100 к 1, что, возможно, отражает инактивацию этих протеаз тирозиназой. Более энергичное действие субтилизина Карлсберга приводило через 20 час к потере 70% тирозиназной активности. Добавление  $10^{-2}$  М ЭДТА частично предотвращало потерю активности фермента при действии субтилизина. В этом случае, очевидно, происходит избирательная блокировка протеолиза вблизи иона меди, что защищает пептиды, находящиеся в этом участке. Интерпретация данных, полученных из опытов такого типа, требует большой осторожности. На основании исследований действия протеазы на гемоцианин было высказано предположение о возможности миграции иона меди во время процесса протеолиза [10]. Защита участка локализации меди веществами, образующими комплекс с ионами меди (например, ЭДТА, 1,10-фенантролины), должна устранить это затруднение.

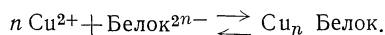
Специфическое связывание меди в медьсодержащих белках следует отличать от прочной, но подающейся диссоциации связи иона двухвалентной меди с различными другими белками, например с сывороточным альбумином. Связывание  $Cu(II)$  белками и аминокислотами было обнаружено уже давно, но здесь приводятся только более новые данные [6].  $Cu(II)$  представляет собой один из переходных металлов, образующих чрезвычайно прочные связи с белками за счет различных функциональных групп белка через ионы сульфгидрильной, имидазольной, индольной, свободной аминокислотной и свободной карбоксильной групп и через пептидный азот. Возможно, что интенсивность взаимодействия  $Cu(II)$  с некоторыми свободными аминокислотами несколько преувеличена, но интенсивность образования его комплексов с цистеином, гистидином, пептидами и белками очень велика. Для некоторых белков совершенно очевидно, что это взаимодействие осуществляют группы, отличные от сульфгидрильных. При высоких рН спектральные характеристики комплексов медь — белок говорят в пользу возможного наличия связей с  $Cu-N$ ; возможно, что в этом участвует пептидный азот. Клотц указал [6] на наличие параллелизма между константой связи и изоэлектрической точкой ряда белков (табл. 4). По-видимому, чем меньше значение рН в изоэлектрической точке по сравнению с рН 6,5,

Т а б л и ц а 4  
Корреляция между сродством иона двухвалентной меди к белкам и их изоэлектрическими значениями рН\*

Белок	$F^{\circ}$ , ккал/моль	Значение рН в изоэлектрической точке
$\alpha$ -Казеин	—7,30	4,0
$\beta$ -Казеин	—7,16	4,5
Сывороточный альбумин	—6,49	4,7
$\beta$ -Лактоглобулин	—5,81	5,2
Лизоцим	—4,39	11,0

\* Для удобства сравнения вес каждого белка принят равным 105. Измерения проводились при 0°, рН 6,5 в 0,2 М растворе ацетата.

тем больше отрицательный заряд на белке. Таким образом, электростатические силы будут благоприятствовать взаимодействию  $\text{Cu(II)}$  с белком по схеме:



Для сывороточного альбумина получены данные об участии в этой реакции карбоксильных групп, поскольку при метилировании белка его способность к связыванию меди уменьшалась, тогда как у ацетилированного белка не отмечалось утраты способности к взаимодействию с ионом двухвалентной меди [6]. Исследование спектров комплексов медь — белок при различных рН позволило сделать заключение [6], что при более высоких рН становится возможным образование таких же связей  $\text{Cu} \cdots \text{NH}_2$ , как и в простых моделях ион двухвалентной меди — пептид. В спектре иона двухвалентной меди с четырьмя координационными связями имеется максимум примерно при 600 мкм, даже если два лиганда представляют собой карбоксильные группы. Поскольку большинство природных и синтетических медьсодержащих белков поглощает в той же области, можно предположить наличие в белке аналогичной связи с участием двух связей аминогрупп.

Степень связывания иона меди любым лигандом в значительной мере зависит от степени окисления меди. Комплексы двухвалентной меди часто значительно стабильнее соответствующих комплексов одновалентной меди. Кроме того, при переходе меди из двухвалентного состояния в одновалентное происходят значительные изменения геометрии молекулы. Комплексы  $\text{Cu(II)}$  с четырьмя координационными связями обычно имеют вид плоских квадратов, а при использовании всех шести координационных связей — вид октаэдров. Комплексы  $\text{Cu(I)}$  с четырьмя координационными связями имеют вид тетраэдров и практически совсем не обладают тенденцией к переходу в гексакоординационную форму. При переходе из состояния  $\text{Cu(II)}$  в состояние  $\text{Cu(I)}$  должно выполняться это изменение геометрии. Совершенно ясно, что при этом облегчается как освобождение ионов меди, так и их обмен с ионами меди раствора. Так, Джозелу и Доусон обнаружили, что ион меди оксидазы аскорбиновой кислоты обменивается с  $\text{Cu}^{64}$  раствора только тогда, когда фермент активен, а сама медь при этом, по-видимому, переходит в состояние  $\text{Cu(I)}$ .

Наконец, постоянным затруднением при оценке взаимодействия  $\text{Cu(II)}$  и белков служит разнообразие реакций, в которых они могут участвовать. Ранее уже говорилось о восстановлении  $\text{Cu(II)}$  до  $\text{Cu(I)}$  некоторыми аминокислотами и целым рядом белков в присутствии неocupроина. Если одновременно присутствует и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , то, как обнаружили Фельпс, Путнем и др.,  $\text{Cu(II)}$  катализирует ряд реакций, в том числе модификацию гетероциклических и ароматических аминокислот, окисление серусодержащих аминокислот и, наконец, расщепление молекулы на несколько крупных фрагментов. Таким образом, нельзя пренебречь возможностью того, что  $\text{Cu(II)}$  вызывает значительные изменения в структуре какого-либо определенного белка.

### Активный центр медьсодержащих белков

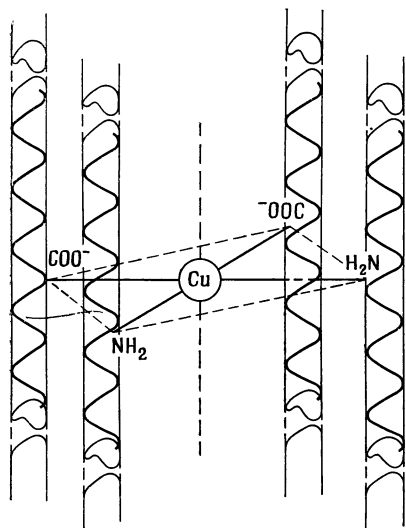
Выше отмечалось, что нам ничего не известно относительно локализации ионов меди в медьсодержащих белках. Имеющиеся косвенные данные позволяют сделать лишь некоторые предположения. Например, оптимальное значение рН для медьсодержащих ферментов обычно лежит в области 6—7, т. е. в предположительном диапазоне диссоциации гистидина. Тот факт, что ион меди освобождается при рН ниже 5, интерпретируется как

указание на существенное значение некоторых боковых карбоксильных групп в связывании иона меди. Для  $\beta$ -меркаптопируваттранссульфуразы Кун и Фансье [23] пришли к выводу, что в ферментативном катализе принимают участие как SH-группы, так и связанная с белком медь. Они предложили возможный механизм транссульфирования, в котором предполагается близость иона меди к двум смежным сульфидрильным группам. Возможная роль сульфидрильных групп в действии оксидазы аскорбиновой кислоты отмечалась также в другой работе автора [18]. Однако Доусон указывает, что не все препараты этого фермента отличаются чувствительностью к органическим ртутьсодержащим реагентам, например к *n*-хлормеркурийбензоату. Поскольку оксидаза аскорбиновой кислоты очень легко активируется многими соединениями, присутствующими в малых концентрациях (в том числе некоторыми серусодержащими соединениями), при реакции такого ртутьсодержащего органического соединения с активирующим веществом наблюдалось бы явное подавление этого фермента. Несколько лет назад автор настоящей статьи продемонстрировал взаимодействие ртутьхлорфенила с тироксином и рядом его аналогов. Интересно, что активность оксидазы аскорбиновой кислоты и  $\beta$ -меркаптопируваттранссульфуразы подавляется Cu(II) при его содержании, не превышающем  $10^{-4}$  M [18, 23]. Ниже приведена несколько более подробная сводка всех наших современных сведений об участках локализации меди в церулоплазмине и гемоцианине; последние были наиболее полно исследованы в этом отношении, главным образом потому, что их легче всего получить в чистом или кристаллическом виде.

а) *Участок локализации меди в церулоплазмине.* В недавно опубликованной статье [14] обсуждается вопрос о связывании меди в церулоплазмине. Различие связей Cu(II) в сывороточном альбумине и церулоплазмине совершенно очевидно. Ион меди Cu(II)-альбумина можно удалить путем диализа (хотя это довольно сложно) и отделить при помощи по крайней мере одного адсорбента; показано также, что этот ион образует комплекс желтого цвета с диэтилдитиокарбаматом натрия. Медь церулоплазмине при такой обработке удалить нельзя, однако ее можно выделить путем совместного воздействия аскорбата и диэтилдитиокарбамата натрия, а также после тепловой денатурации церулоплазмине. Последний факт подчеркивает значение конформации (особенно геометрических соотношений, обусловленных наличием межспиральных и внутриспиральных связей иона меди в молекуле белка). Исходя из данных, полученных при титровании кислоты основанием, и из данных по электрофорезу церулоплазмине и его апофермента, Шейнберг и Штернлиб [12] предположили, что ион Cu(II) в нативном белке связан с двумя отрицательно заряженными карбоксильными группами. На основании этих предположений, а также предположений, высказанных в другой работе [14], можно представить себе участок локализации меди в церулоплазмине так, как это изображено на фиг. 4. Не исключено также, что ион меди связан с глюкозой, маннозой или ксиллозой, обнаруженными в церулоплазмине [25], хотя известно, что Cu(II) легче образует комплексы с большинством аминокислот, чем с этими моносахаридами. Осаки [25] указывает также, что оба концевых аминокислотных остатка церулоплазмине представляли собой фенилаланин.

В церулоплазмине, по-видимому, имеется два типа атомов меди, что отличает его от всех других соединений такого рода. Как химические, так и кинетические данные говорят за то, что около половины атомов меди этого соединения отличаются от остальных. Шейнберг и Морелл обнаружили, что апоцерулоплазмин может служить акцептором только для четы-

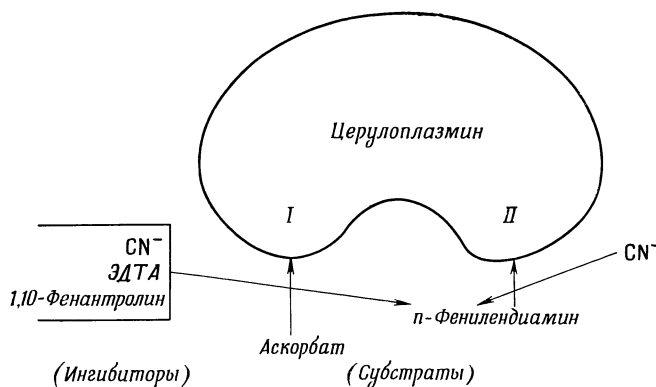
рех или пяти из его первоначальных восьми атомов меди. Они обнаружили также, что в присутствии аскорбата лишь около четырех ионов меди церулоплазмينا из восьми способны обмениваться с  $\text{Cu}^{64}$ . Установлено также



Фиг. 4. Возможная структура участков локализации меди в церулоплазмине.

Ион меди связан по крайней мере с четырьмя группами отдельных или смежных пептидных цепей. Два участка из возможных шести специально оставлены доступными для каталитической функции.

[14], что после длительного переваривания церулоплазмينا химотрипсином только около половины всех ионов меди становятся диализируемыми. Мы несколько расширили сделанное ранее Гумоллером и др. предположение о наличии в церулоплазмине по крайней мере двух различных актив-



Фиг. 5. Два активных центра церулоплазмينا, обладающие специфичностью по отношению к субстратам и ингибиторам.

Неокупроин и тироксин не подавляют ни окисления аскорбата в участке I, ни окисления *n*-фенилендиамина в обоих участках. Объяснения см. в тексте.

ных центров, каждый из которых, несомненно, содержит атомы меди. Участок I служит активным центром одновременно для *n*-фенилендиамина и для аскорбата (фиг. 5). Можно также показать, что его активность подавляется  $\text{CN}^-$ , ЭДТА и 1,10-фенантролином. Участок II вступает в реакцию лишь при катализе *n*-фенилендиамина и его активность подавляет только  $\text{CN}^-$ . Хотя совершенно очевидно, что участок I более доступен, чем участок II, он, однако недоступен другим лигандам, например неокупроину и тиро-

кисину, которые не влияют ни на одну из каталитических активностей церулоплазмينا.

*Участок локализации меди в гемоцианине.* Хотя уже с 1847 г. стало известно о наличии меди в гемоцианине, однако структура участка локализации меди в этом ферменте до сих пор совершенно неясна, несмотря на многочисленные попытки выяснить этот вопрос. Были подвергнуты сомнению выводы о значении связей  $\text{Cu} - \text{S}$  — белок, полученные на основании косвенных данных. Пользуясь неочищенной сывороткой *Limulus*, Фельзенфельд удалил ион меди из гемоцианина и получил для константы стабильности комплекса  $\text{Cu}^{2+}$ -апогемоцианин значение порядка  $10^{17} - 10^{19}$ , т. е. величину того же порядка, что и константа стабильности цистеината меди, равная  $1,5 \cdot 10^{19}$ . Клотц [6] обнаружил тесную связь между спектрами гемоцианина и комплекса альбумин бычьей сыворотки — медь, а также наличие  $\text{Cu(I)}$  в неокисленном гемоцианине. Исходя из этого, он предположил, что в каждом случае к меди присоединена только одна тиоловая группа. Однако Томсон, Хайнс и Мэзон определили амперометрическим титрованием число сульфгидрильных групп в гемоцианине до и после удаления меди и показали, что на каждые четыре удаленных атома меди освобождалась лишь одна сульфгидрильная группа. Лонти сообщает, что медь апогемоцианина можно количественно восстановить даже после блокировки его тиоловых групп типичными реагентами на тиол. Однако предположение Лонти, что имидазольные группы участвуют в связывании меди, основано на таких же косвенных данных, как и более ранние данные об участии в этом процессе тиоловых групп. Вероятно, единственные убедительные данные можно будет получить, выделив и идентифицировав структуру содержащего ион меди участка в условиях, исключающих миграцию иона меди.

#### ИОН МЕДИ В МОДЕЛЬНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Никакой ион металла и никакой другой небелковый катализатор не могут превзойти медные соли в их способности служить почти универсальным катализатором самых разнообразных реакций. Только соли железа, платины и, может быть, нескольких других металлов могут сравниться с ионами меди по их замечательному каталитическому действию. Признание и описание уникальных каталитических характеристик ионов меди и медных комплексов занимает сотни страниц в химической и биохимической литературе. Вопросы эти настолько широки и сложны, что до сих пор еще не удалось охватить их в исчерпывающем обзоре. Заключительные страницы настоящей публикации имеют своей целью лишь стимулировать интерес читателя к тайнам катализа ионами меди.

Пригодность иона меди в качестве катализатора для целого ряда разнообразных реакций иллюстрирует табл. 5. Хорошо известно, что ион меди катализирует окисление целого ряда соединений, в том числе фенолов, сульфгидрильных соединений, ароматических аминов и других веществ. Менее широко освещена в литературе каталитическая роль медных солей в переаминировании, гидролизе, декарбоксилировании, дезаминировании и образовании перекисей. Эти дополнительные данные о каталитической активности медных солей могут указать пути для направленных поисков новых и исключительных по своим свойствам медьсодержащих ферментов. Чаще всего сам ион меди может катализировать реакции, идентичные тем, которые катализируют медьсодержащие ферменты, хотя обычно такой катализ менее эффективен. Так, белковые апоферменты, вероятно, помо-



Реакции, катализируемые ионами  $\text{Cu(II)}$  или комплексами, содержащими  $\text{Cu(II)}$ 

Типы реакций	Реагенты	Продукты
Окисление до перекиси	Катехин + $\text{H}_2\text{O}_2$	<i>o</i> -Бензохинон
	3-Индолилуксусная кислота + $\text{H}_2\text{O}_2$	Неизвестны
	$\gamma$ -Глобулин человека + $\text{H}_2\text{O}_2$ Тирозин + $\text{H}_2\text{O}_2$ + Аскорбиновая кислота	Два фрагмента белка
Каталазная активность	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$
Переаминирование	$\alpha$ -Аминокислота + Пиридоксаль $\alpha$ -Аминокислота + $\alpha'$ -Кетокислота (в растворе пиридина)	$\alpha$ -Кетокислота $\alpha'$ -Аминокислота + $\alpha$ -Кетокислота
Декарбоксилирование	Щавелевоуксусная кислота Диметилщавелевоуксусная кислота	Пировиноградная кислота + $\text{CO}_2$ $\alpha$ -Кетоизовалериановая кислота + $\text{CO}_2$
Гидролиз	Сложные эфиры $\alpha$ -аминокислоты	$\alpha$ -Аминокислота + Спирт
	R-Амиды	R-Кислота + $\text{NH}_3$
	<i>бис</i> -Тиофенолэтилендиамин	$\text{Cu(II)}$ -Моноэтилендиамин + + Тиофенальдегид
Окисление	Диизопропилфторфосфат	$\text{HF} + \text{Дийодопротилфосфорная кислота}$
	Метилизопропилфосорофторидат	$\text{HF} + \text{Метилизопропилфосфорная кислота}$
	$\text{H}_2$ (раствор солей одновалентной меди в пиридине или хинолине)	$\text{H}_2\text{O}$
	Цистеин, глутатион	Цистин, окисленный глутатион
	Мочевая кислота	Дигидромочевая кислота
	Ацетонин	Биацетил
	Восстанавливающие сахара	Сахарные кислоты
	Гидразид изоникотиновой кислоты	Изоникотиновая кислота, изоникотинамид, диизоникотинилгидразин
	Первичные ариламины	Азосоединения
	2,6-Двузамещенные фенолы	Полимеры
Аскорбиновая кислота	Дегидроаскорбиновая кислота, перекись водорода	
<i>o</i> - или <i>n</i> -Фенилендиамин	<i>o</i> - или <i>n</i> -Бензохинон + $\text{NH}_3$	
Фенол + Морфолин	Диморфолин + <i>o</i> -Бензохинон	
Тирозин + следы ДОПА	Меланин	
3,4-Диксифенилаланин (ДОПА)	ДОПА-3,4-хинон, меланин	
Адреналин	Адренохром	
Катехин, гидрохинон	<i>o</i> -Бензохинон, <i>n</i> -бензохинон	
Гомокатехин	4-Метил- <i>o</i> -бензохинон	
Пирагаллол	Пурпурогаллин	

гают связывать субстрат и направлять его к участкам локализации меди и, может быть, повышают константу скорости реакции, однако, по-видимому, они редко сообщают исключительные каталитические свойства самому иону меди.

За последние годы автор исследовал действие многочисленных лигандов на одну из наиболее полезных модельных систем, содержащих ионы меди, а именно на систему  $\text{Cu(II)}$  — аскорбат — кислород. Большинство этих лигандов тормозит окисление аскорбата путем образования хелатов с  $\text{Cu(II)}$  или  $\text{Cu(I)}$ . Некоторые соединения образуют комплексы, обладающие известной каталитической активностью. О наличии активности у хелатов меди сообщают Бат и Халлоуей, а также Хан и Мартел. Данные о действии типичных лигандов приведены в табл. 6. Возможно, имеется простое объяснение описанных выше явлений. На фиг. 6 и 7 показана предполагае-

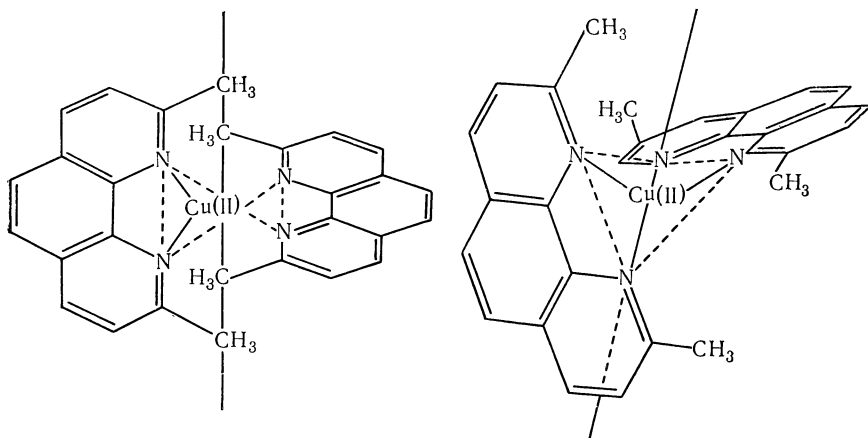
Таблица 6

Действие лигандов на катализируемое  $\text{Cu(II)}$  окисление аскорбата

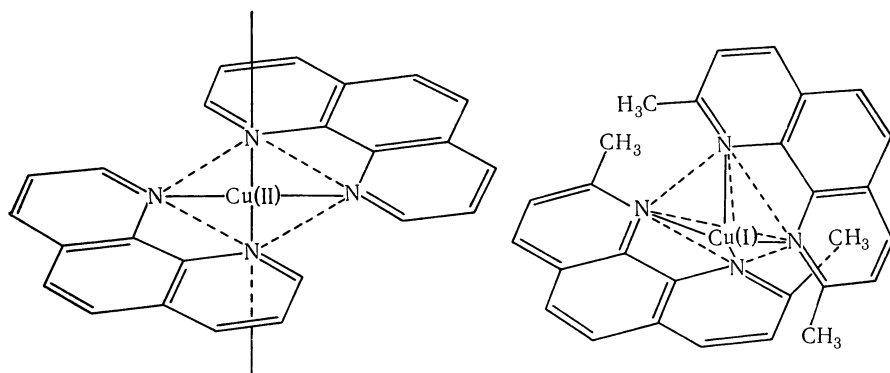
Обозначение	Название	Вероятное отношение лигандов	Подавление катализа*
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота	1	50% при $5 \times 10^{-7}$ M 100% при $6 \times 10^{-7}$ »
Тиоксин	3-[4-(4-Окси-3,5-дигидрофенокси)-3,5-дигидрофенил] аланин	2	50% при $2 \times 10^{-6}$ » 100% при $1 \times 10^{-5}$ »
Неокупроин	2,9-Диметил-1,10-фенантролин	2	50% при $1 \times 10^{-6}$ » 100% при $1,5 \times 10^{-6}$ »
Купризон	Бисциклогексанондиоксальдигидразон	2	50% при $1 \times 10^{-5}$ » 100% при $5 \times 10^{-5}$ »
Фенантролин	1,10-Фенантролин	2	50% при $1,5 \times 10^{-6}$ » 0% при $1 \times 10^{-5}$ » Большие скорости при концентрациях свыше $1 \times 10^{-5}$ »
2,2-Бипиридин	2,2-Бипиридин	2	30% при $1 \times 10^{-6}$ » 0% при $1 \times 10^{-5}$ » Большие скорости при концентрациях свыше $1 \times 10^{-5}$ »

\* Условия реакции:  $30^\circ \text{C}$ ,  $\text{Cu(II)}$   $6,0 \times 10^{-7}$  M, аскорбат 0,02 M,  $\text{PO}_4$ -буфер (pH 7,0) 0,01 M.

мая структура ряда важнейших хелатов, содержащих ионы меди. Два из них,  $\text{Cu(II)}$ -1,10-фенантролин и  $\text{Cu(II)}$ -2,2-бипиридин, обнаруживают каталитическую активность при окислении аскорбата. Все другие хелаты тормозят эту реакцию, образуя комплексы с ионом меди. Полученные хелаты каталитически неактивны. В обоих активных хелатах в образовании комплекса участвуют четыре из шести возможных участков локализации  $\text{Cu(II)}$  (см. фиг. 6). Возможно также, что 1,10-фенантролин и 2,2-бипиридин могут сами подвергаться обратимому окислению и восстановлению. В неактивных хелатах в образовании комплекса непосредственно участвуют либо все шесть доступных участков  $\text{Cu(II)}$ , либо структуры, которые могут стерически препятствовать подходу к остальным двум участкам. Возможно и другое объяснение, заключающееся в том, что некоторые из этих лигандов,



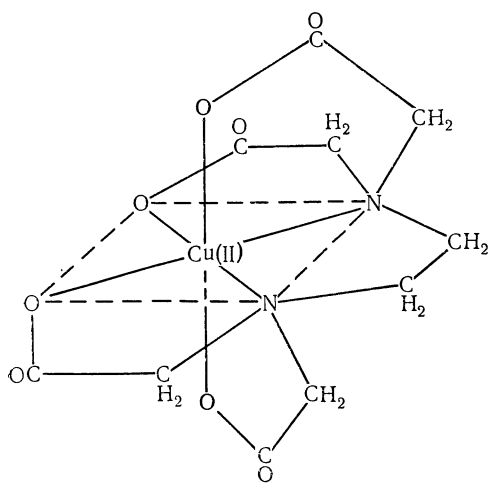
$\text{Cu(II)}-(\text{Неокупроин})_2$



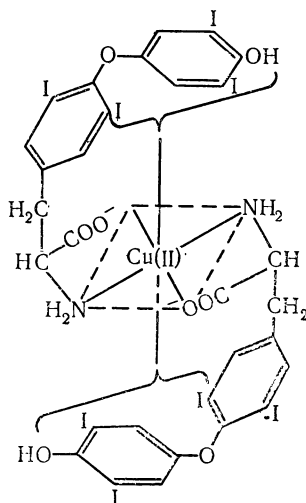
$\text{Cu(II)}-(1,10\text{-Фенантролин})_2$

$\text{Cu(I)}-(\text{Неокупроин})_2$

Фиг. 6. Предполагаемые структуры комплексов фенантролина с  $\text{Cu(I)}$  и  $\text{Cu(II)}$ .  
Вверху показаны два изображения одного и того же хелата.



$\text{Cu(II)}-\text{ЭДТА}$



$\text{Cu(II)}-[Тироксин]$

Фиг. 7. Предполагаемые структуры  $\text{Cu(II)}$ -хелатов с ЭДТА и тироксином.

например неокупроин, настолько эффективно связывают Cu(I), что повторное окисление Cu(I) кислородом становится невозможным. Эта гипотеза, объясняющая действие Cu(II) в такой модельной системе, может быть полезна для предсказания структуры белков в участке локализации меди. Следовало бы ожидать, что в окислительных ферментах ион меди будет иметь по крайней мере два свободных или смещаемых участка локализации, которые должны быть доступны для субстрата и для акцептора электронов (обычно кислорода).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Westerfeld W. W. et al., In «Biological Aspects of Metal Binding» (Symposium on Metal Chelation), Federation Proc., **20**, 1—263 (1961).
2. Tsuchida A. et al., Symposium on Copper Proteins and Copper Enzymes Biophysics, **1**, 42—53 (1961).
3. Adelstein S. J., V allee B. L., New Eng. J. Med., **265**, 892—897, 941—946 (1961).
4. Dawson C. R., M allette M. F., Advances in Protein Chem., **2**, 179—248 (1945).

#### Обзоры по метаболизму меди и медьсодержащим белкам

5. Dawson C. R., M allette M. F. and others, In «A Symposium on Copper Metabolism» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1950.
6. Klotz I. M., In «The Protein» (H. Neurath and K. Bailey, eds.), Vol. I, Part B, pp. 727—806, Academic Press, New York, 1955; Klotz I. M., Klotz T. A., Science, **121**, 477 (1955).
7. Laurell C. B., In «The Plasma Proteins» (F. W. Putnam, ed.), Vol. I, pp. 360—369, Academic Press, New York, 1960.
8. Lehninger A. L., Physiol. Revs., **30**, 393 (1950).
9. Mahler H. R., In «Mineral Metabolism» (C. L. Comar and F. Bronner eds.), Vol. I, Part B, pp. 743—879, Academic Press, New York, 1961.
10. Mason H. S., Nature, **177**, 79 (1956).
11. Orgel L. E., In «Metals and Enzyme Activity» (E. M. Crook, ed.), pp. 8—20, Cambridge Univ. Press, London and New York, 1958.
12. Scheinberg I. H., Sternlieb I., Pharmacol. Revs., **12**, 355 (1960).
13. Singer T. P., Kearney E. B., In «The Proteins» (H. Neurath and K. Bailey, eds.), Vol. II, Part A, pp. 135—160, Academic Press, New York, 1954.

#### Последние работы

14. Curzon G., Biochem. J. **77**, 66 (1960).
15. Dressler H., Dawson C. R., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 508, 515 (1960).
16. Frieden E., Biochim. et Biophys. Acta, **27**, 414 (1958).
17. Frieden E., Alles J., J. Biol. Chem., **230**, 797 (1958).
18. Frieden E., Maggiolo I. W., Biochim. et Biophys. Acta, **24**, 42 (1957).
19. Griffiths D. E., Wharton D. C., J. Biol. Chem., **236**, 1850, 1857 (1961).
20. James W. O., Biol. Revs., **28**, 245—260 (1953).
21. Kato S., Suga I., Shiratori I., Takamiya A., Arch. Biochem. Biophys., **94**, 136 (1961).
22. Kertész D., Nature, **180**, 506 (1957).
23. Kun E., Fanshier D. W., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 338 (1959).
24. Nakamura T., Biochim. et Biophys. Acta, **30**, 44, 538, 640 (1958).
25. Osaki S., J. Biochem., **50**, 29 (1961).
26. Szent-Györgyi A., Biochem. J., **22**, 1387 (1928).
27. Szent-Györgyi A., Science, **72**, 125 (1930).

# РАК И НЕКРОЗЫ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗБИРАТЕЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ УГЛЕВОДОРОДОВ

Ч. ХАГГИНС

## ВВЕДЕНИЕ

Я посвящаю эту статью Сцент-Дьёрдьи. В ней рассматриваются канцерогены, специфически действующие на молочные железы, т. е. вещества, которые после однократного скармливания животным очень часто быстро вызывают рак молочной железы. Такая индукция представляет собой одно из интереснейших явлений в биологии.

Биологическая реакция на ароматические углеводороды характеризуется высокой степенью избирательности. Однократное скармливание крысам больших, но переносимых количеств некоторых полициклических ароматических углеводородов приводит к катастрофическим последствиям и вызывает такие патологические изменения, как рак и некроз. Некоторые клетки малигнизируются, в ряде органов образуются обширные очаги некроза, тогда как большая часть клеток организма остается незатронутой и выходит без каких-либо повреждений из «схватки» со сверхсопряженными углеводородами.

Рассматриваемое явление сыграло важную роль в исследованиях по экспериментальной индукции рака молочной железы, так как при определенных условиях такие опухоли развиваются в течение нескольких недель у 100% подопытных животных. Однократное скармливание активного канцерогена оказалось более эффективным, чем применявшаяся ранее методика многократного введения [5].

Раскрытие природы рака молочной железы — одна из благороднейших задач медицины. В странах Запада рак молочной железы у женщин встречается чаще, чем любая другая форма злокачественных опухолей; в странах Востока эта форма рака встречается значительно реже<sup>1</sup>. Получается, будто женщины, которые едят палочками, менее подвержены этому заболеванию, однако вряд ли кому-нибудь придет в голову причислять палочки к защитным факторам.

Приемлемое решение проблемы рака должно удовлетворять двум требованиям. Во-первых, оно должно дать достаточно четкое представление о природе раковой клетки и, во-вторых, должно указать способы предупреждения и лечения рака у человека. Проблема рака молочной железы оказалась спорной и достаточно сложной, и разрешить ее удалось только частично. Однако известные успехи были достигнуты после того, как было

---

<sup>1</sup> В 1956—1957 гг. в США частота рака молочной железы у белых женщин составляла 27,08 на 100 000, а в Японии — всего 3,26 [14].

установлено, что некоторые опухоли молочной железы характеризуются зависимостью от гормонов яичников и надпочечников [3]. Даже обширные раковые опухоли такого типа, будучи лишены необходимых им гормонов, подвергаются обратному развитию. Гормональная терапия некоторых опухолей нашла широкое применение.

Прекращение поступления гормонов по-разному влияет на «гормонально-независимые» нормальные и раковые клетки. Нормальные клетки атрофируются, т. е. просто уменьшаются в объеме и утрачивают активность. Реакция раковых клеток совершенно иная — в отсутствие необходимых стероидных гормонов раковые клетки погибают. Очевидно, стероиды не только ускоряют размножение раковых клеток, они необходимы для их существования.

Развитию работ по изучению рака молочных желез препятствовало отсутствие подходящей методики. Наука зависит от развития техники, и теория, не проверенная в эксперименте, остается спекулятивной и беспредметной. До разработки описываемого ниже метода исследование рака молочной железы страдало двумя недостатками. Во-первых, индукция опухолей происходила очень медленно, и для их возникновения у грызунов требовались многие месяцы (вплоть до двух лет). Эти опыты давали весьма скудные результаты, и можно лишь удивляться, как при таких темпах вообще удавалось что-нибудь выяснить. Во-вторых, частота возникновения рака молочной железы всегда была ниже 100%, и поэтому экспериментальные данные нуждались в статистической обработке. После испытания углеводов на крысах эти методические трудности были устранены. При смазывании кожи мышей 3-метилхолантеном, кроме рака кожи, у значительной части (18%) подопытных животных возникали также (примерно в течение 1 года) опухоли молочных желез [9]. Так впервые было обнаружено избирательное действие углеводов на молочные железы. На этом избирательном действии основан описываемый метод.

#### МЕТОДИКА

В опытах по индукции рака молочной железы у грызунов наибольшая канцерогенная активность была выявлена у 7,12-диметилбензантрацена (7,12-ДМБА). Самкам крыс линии Спрэйг-Доули в возрасте 50—65 дней вводили через желудочный зонд раствор 7,12-ДМБА (20 мг) в кунжутном масле (1 мл). Уже через несколько дней после однократного введения дозы у всех крыс развивался рак; в этих опытах возраст и пол животных имели решающее значение; существенное значение имела и их принадлежность к той или иной линии.

После однократного скармливания ароматических углеводов обычно развивались злокачественные опухоли трех видов; другие опухоли возникали реже (табл. 1).

1. Рак молочной железы возникал у всех крыс.

2. Рак околоушных слюнных желез наблюдали у крыс, проживших не менее 6 месяцев после введения канцерогена.

3. Саркомы на месте введения гормонов возникали после повторных инъекций стероидов в кунжутном масле или гонадотропина в физиологическом растворе [6]. Действие растворителей без гормонов не испытывали.

Интересно, что введение канцерогена в желудок, прохождение его через кишечник и частичное попадание в печень (выявляемое по сильной флуоресценции) не сопровождалось появлением рака в этих органах. Рак возникал только в определенных отдаленных участках.

Таблица 1

**Новообразования, вызванные скормливанием полициклических углеводов**

Новообразование	Вещество*	Число случаев	Сроки возникновения, дни		
			интервал	среднее арифметическое	среднее статистическое
Рак молочной железы	7,12-ДМБА	90	28—92	41	42,8±11
Рак околоушных желез	7,12-ДМБА	21	101—171	140	136,6±22
Саркома на месте инъекции гормонов	3-Метилхолантрен	39	88—289	175	180,6±46
Лейкоз	3-Метилхолантрен	6	105—171	127	139
Рак почки	7,12-ДМБА	2	168—196		
Рак мочевого пузыря	3-Метилхолантрен	1	339		

\* Вещества, растворенные в кунжутном масле, вводили через желудочный зонд: 7,12-ДМБА (20 мг) — однократное скормливание; 3-метилхолантрен (10 мг) — 6 раз в неделю; возраст животных 50—100 дней.

Для того чтобы произошло всасывание эффективного количества углеводов, совсем не обязательно, чтобы они пределали весь путь по желудочно-кишечному тракту: введение раствора 7,12-ДМБА (20 мг) в просвет слепой кишки вызывало развитие раковой опухоли у 6 крыс из 12 [8]. Вообще для индукции отдаленной опухоли не обязательно прохождение углеводорода через какую бы то ни было часть кишечника. Однократное внутривенное введение 1 мг эмульсии 7,12-ДМБА вызывает рак молочной железы у всех крыс. Более того, имплантация в селезенку 7,12-ДМБА в виде спрессованной пилюли вызывает рак молочной железы у определенной доли подопытных крыс, хотя из имплантированной пилюли всасывались лишь следы углеводорода [7]. Для индукции рака при парентеральном введении углеводорода необходимо значительно меньшее его количество, чем при введении через рот, и все же мы считаем, что однократное скормливание 7,12-ДМБА — удобный и чрезвычайно простой метод индукции рака молочной железы<sup>1</sup>.

Раковые опухоли, индуцированные однократным скормливанием или однократным внутривенным введением 7,12-ДМБА, возникают в два различных срока: рак молочной железы появляется в период от 3 недель до 3 месяцев, а раковые опухоли другой локализации — спустя 3, а чаще 6 месяцев.

<sup>1</sup> Следует напомнить, что однократное облучение самок крыс линии Спрэйг-Дуули в возрасте 40 дней сублетальной дозой  $\gamma$ -излучения (400 г) также сопровождается избирательным возникновением опухолей молочных желез у значительной части животных. Рак возникает не случайно, не в разных тканях, а именно в молочных железах [21].

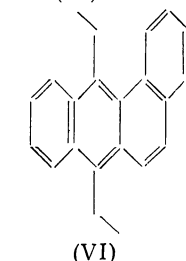
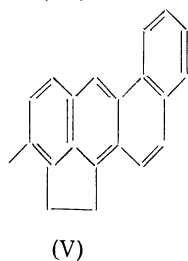
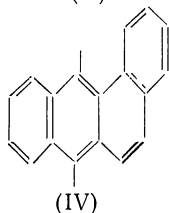
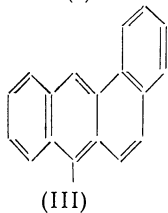
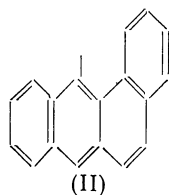
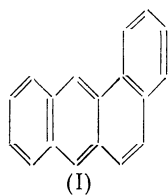
При скармливании эффективной дозы канцерогена становится злокачественной лишь часть клеток молочных желез, число которых исчисляется миллионами. Существует стехиометрическая зависимость между дозой канцерогена, с одной стороны, и частотой и числом опухолей — с другой. Минимальная эффективная доза индуцирует только одну раковую опухоль; при однократном скармливании углеводов число раковых опухолей молочной железы у одной крысы не превышало 21.

При однократном воздействии канцерогена малигнизация клеток молочной железы осуществляется только в строго определенных условиях. Введение углеводов крысам, лишенным гипофиза, не вызывало рака, так как у таких животных имела место атрофия клеток молочных желез. Не возникал рак молочной железы и в случае их гиперплазии. Эндокринный статус молодых половозрелых крыс-самок, о котором мы судим по строению молочных желез, как нельзя лучше подходит для развития рака этих желез.

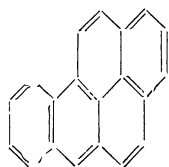
У крыс той линии, с которой работали в нашей лаборатории, эстрадиол-17β не вызывал рака молочной железы, но легко вызывал опухоли гипофиза. Эстрадиол-17β вводили парентерально (по 50 мкг в день) в течение 1 года 11 самкам в возрасте от 65 дней до 1 года; предварительно животным удаляли яичники и матку. Рак молочной железы возник только у одной крысы (в возрасте 358 дней), а обширные опухоли гипофиза — у 5 крыс.

#### МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА КАНЦЕРОГЕНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ СПЕЦИФИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ НА МОЛОЧНЫЕ ЖЕЛЕЗЫ

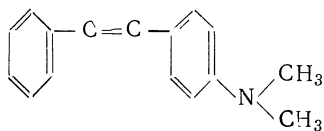
По определению, канцерогены, обладающие специфическим действием на молочные железы, вызывают рак этих желез (и реже — опухоли некоторых других органов) после однократного скармливания самкам линии Спрэйг-Доули в возрасте 50—65 дней. Сейчас известно уже 10 таких канцерогенов.



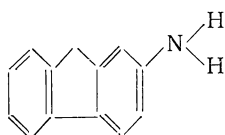




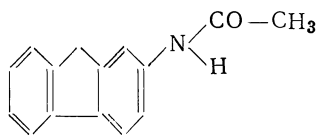
(VI)



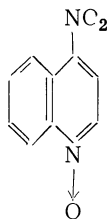
(VIII)



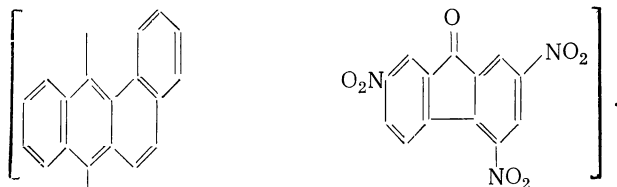
(IX)



(X)



(XI)



(XII)

Как было установлено ранее, все перечисленные соединения, за исключением соединения XII, вызывают у мышей при местном применении рак кожи или саркому [2, 10, 15, 18]. Их канцерогенная специфичность в отношении молочных желез была открыта недавно. Частота спонтанного рака молочной железы в нашей колонии молодых крыс составляла 3 случая на 200.

Сам по себе бензантрацен (I) неканцерогенен, но введение в мезо-положение метильной группы наделяет его канцерогенными свойствами. Так, 12-метилбензантрацен (II) и в несколько большей степени 7-метилбензантрацен (III) — слабые канцерогены. В наших опытах наиболее мощным канцерогеном оказался 7,12-ДМБА (IV). Способность метильных групп, введенных в определенные участки молекулы бензантрацена, усиливать его канцерогенность не свойственна этильным группам: 7,12-диэтилбензантрацен (VI) не вызывает рака молочной железы (табл. 2). Присоединение добавочного кольца к бензантрацену (I) приводит к образованию бензпире-

на (VII), обладающего очень высокой канцерогенной активностью, близкой к активности 3-метилхолантраена (V).

Т а б л и ц а 2

Индукция рака молочной железы при однократном скармливании полициклических углеводов

№	Вещество*	Доза, мг	Число крыс	Рак молочных желез	%
I	Бензантрацен . . . . .	200	18	0	0
II	12-Метилбензантрацен . . . . .	100	12	2	16,7
III	7-Метилбензантрацен . . . . .	100	13	4	30,8
IV	7,12-Диметилбензантрацен (7,12-ДМБА) . . . . .	15	19	100	100
V	3-Метилхолантраен . . . . .	100	46	43	93,4
VI	7,12-Диэтилбензантрацен . . . . .	100	20	0	0
VII	Бензпирен . . . . .	100	9	8	88,9
VIII	4-Диметиламиностильбен . . . . .	7,5	18	5	27,8
IX	2-Аминофлуорен . . . . .	100	10	2	20
X	2-Ацетиламинофлуорен . . . . .	100	28	5	17,9
XI	4-Нитрохинолин-N-оксид (НХО)	20	10	2	20
XII	Комплекс (7,12-ДМБА·ТНФ)**	40	8	3	37,5

\* Вещества, растворенные в кунжутном масле, вводили через желудочный зонд самкам Спрэйг-Доули в возрасте 50 дней.

\*\* Комплекс из равных количеств 7,12-ДМБА и 2,4,7-тринитро-9-флуорена.

Молекулы канцерогена, специфичного в отношении молочных желез, не обязательно должны иметь структуру фенантрена; достаточно наличия этиленового мостика между ароматическими кольцами. Так, умеренная канцерогенность обнаружена у 4-диметиламиностильбена (VIII) [1].

Два производных флуорена при однократном скармливании индуцировали рак. Присоединение к неактивному флуорену amino-(IX) или ацетиламино-(X) групп придает ему специфическую активность.

Индукцию рака молочных желез наблюдали при однократном скармливании крысам НХО — 4-нитрохинолин-N-оксида (XI); по-видимому, это соединение служит хорошим акцептором электронов. Было исследовано образование комплексов НХО (конечная концентрация 0,013 M) с ароматическими соединениями (0,06 M) в хлористом метиле [19]. Соединяясь с различными донорами электронов (при  $-196^{\circ}$ ), в том числе с соединениями IV, V и IX, НХО дает сильно окрашенные растворы. Такие комплексы являются, по-видимому, комплексами с переносом заряда (в том смысле, как их определяет Малликен).

Был получен комплекс 7,12-ДМБА с 2,4,7-тринитро-9-флуореном (1 : 1) в горячем этиловом спирте. Эмульсией этого соединения (XII) в кунжутном масле скармливали крысам; однократная доза 40 мг вызвала рак у 3 крыс из 8 (см. табл. 2). Можно предположить, что этот нерастворимый комплекс диссоциировал в кишечнике и продукты его диссоциации после всасывания вызвали рак молочной железы.

### ВЛИЯНИЕ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ НА ХИМИЧЕСКИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ У КРЫС

Влияние наследственности на возникновение опухолей молочных желез изучали на крысах-самках двух линий, отличающихся друг от друга по своей чувствительности к канцерогенному действию полициклических ароматических углеводородов. Подопытные линии были выведены преимущественно путем гетерозиготного скрещивания, а не путем инбридинга. Всем крысам в возрасте 50 дней вводили по 20 мг 7,12-ДМБА через желудочный зонд.

Крысы линии Спрэйг-Доули — альбиносы и в принятых условиях опыта обнаруживают выраженное предрасположение к развитию опухолей молочных желез; 90 самок этой линии получили однократную дозу 7,12-ДМБА, и в течение 100 дней у всех крыс развились раковые опухоли молочных желез; ни в одном случае не наблюдалось появления доброкачественных опухолей (фиброаденом) (табл. 3).

Таблица 3

Доброкачественные и злокачественные опухоли у самок  
линий Спрэйг-Доули (СД) и Лонг-Эванс (ЛЭ) и у  
реципрокных гибридов после скормливания  
7,12-ДМБА [16]

	Общее число	Доброка- чественная фиброаде- нома	Рак молоч- ной желе- зы
СД ♀ × СД ♂	90	0	90
ЛЭ ♀ × ЛЭ ♂	22	18	4
СД ♀ × ЛЭ ♂ (F <sub>1</sub> )	24	3	21
ЛЭ ♀ × СД ♂ (F <sub>1</sub> )	27	6	21

Крысы линии Лонг-Эванс отличаются слабым предрасположением к развитию злокачественных опухолей при скормливания ароматических углеводородов. 22 самки этой линии получили однократную дозу 7,12-ДМБА, и у всех развились опухоли молочных желез, но только у 4 крыс это оказались раковые опухоли, а у 18 — фиброаденомы [16].

Производили реципрокное скрещивание крыс линий Спрэйг-Доули (СД) и Лонг-Эванс (ЛЭ), гибридным самкам в возрасте 50 дней однократно вводили в желудок по 20 мг 7,12-ДМБА. При таком скрещивании различия в предрасположении к развитию рака молочных желез у потомства сглаживаются.

Из 24 самок F<sub>1</sub> (СД ♀ × ЛЭ ♂) раковые опухоли молочных желез развились у 21; у остальных 3 возникли доброкачественные опухоли. Из 27 самок F<sub>1</sub> (ЛЭ ♀ × СД ♂) раковые опухоли молочных желез возникли у 21; у остальных 6 появились доброкачественные опухоли.

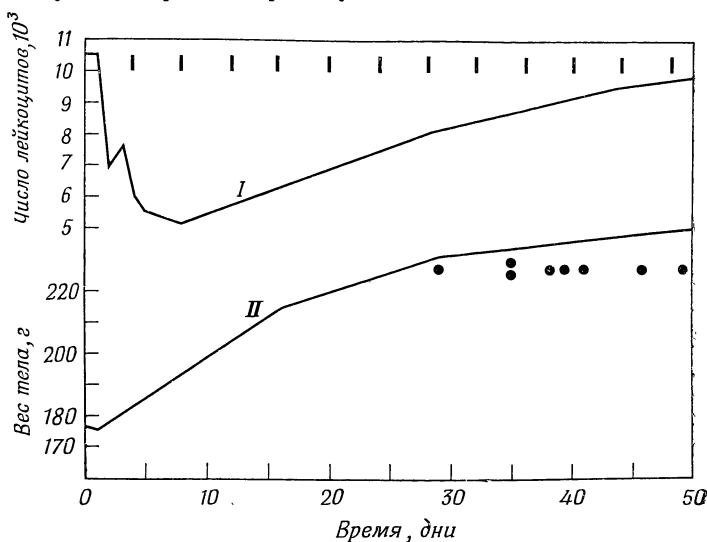
Из этих опытов видно, что предрасположение к развитию индуцированных злокачественных опухолей молочных желез наследуется как доминантный признак, причем этот доминантный признак передается в равной степени отцом и матерью.

Предрасположение (или резистентность) этих линий обусловлено исключительно функцией гипофиза. Половая зрелость у крыс линии Спрэйг-

Доули наступает рано, у крыс Лонг-Эванс — значительно позже. Однократного воздействия 7,12-ДМБА на самок линии Спрэйг-Доули в возрасте 50 дней достаточно для возникновения раковой опухоли у каждой из них. Когда самкам линии Лонг-Эванс через 50 дней после установления у них ритмической функции гипофиза (периодический эструс) вводили внутривенно 7,12-ДМБА (4 раза с перерывами в 3 недели), их резистентность исчезала и у всех крыс также развивался рак молочной железы.

### ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ 7,12-ДМБА

Известно, что некоторые ароматические углеводороды не только обуславливают малигнизацию, но и обладают общим действием. При введении мышам эмульсии бензпирена наблюдались атрофические изменения в селезенке и костном мозге [11]; отсюда и был сделан вывод об избирательном повреждении углеводородами ретикуло-эндотелиальных клеток.



Фиг. 1. Зависимость веса тела (I) и числа лейкоцитов (II) в крови 8 крыс, получивших однократную дозу 7,12-ДМБА, от времени. Точками обозначено появление опухолей молочных желез, вертикальными штрихами — эструс.

У крыс в возрасте 50 дней через два дня после однократного скармливания 7,12-ДМБА возникала лейкопения; на 7-й день число лейкоцитов в крови снижалось до минимума (около 50% нормы), после чего вскоре начиналось увеличение их числа с возвращением к нормальному уровню через 3 недели. Лейкопения сопровождалась массовой гибелью клеток селезенки и тимуса; одновременно в костном мозге наблюдалась дегенерация и гибель миелоцитов, а также кровоизлияния.

Чрезвычайно интересное явление избирательного некроза в коре надпочечников отмечено у всех крыс после введения однократной дозы 7,12-ДМБА (30 мг внутрь или 5 мг внутривенно) [4]. Некрозы наблюдались только в пучковой и сетчатой зонах; ни в клубочковой зоне, ни в мозговом слое изменений не возникало. Гибель клеток в указанных зонах коры выявлялась в течение первых 24 час, кровоизлияния в надпочечники происходили в период между 2-м и 7-м днями и были особенно выражены на 3-й

день. Позже наступала регенерация коры надпочечников, начинавшаяся с клубочковой зоны, и обызвествление очагов некроза. Некрозы в надпочечниках возникают и в отсутствие гипофиза: 7,12-ДМБА вводили крысам (внутривенно) сразу же после удаления гипофиза и на 3-й день наблюдали кровоизлияния в надпочечники.

7,12-ДМБА повреждает те зоны надпочечников, в которых вырабатывается гидрокортизон; между гидрокортизоном и 7,12-ДМБА существует заметное структурное сходство.

Необходимо отметить, что, несмотря на введение 7,12-ДМБА в количестве, достаточном для избирательного некроза клеток коры надпочечников и костного мозга, у крыс сохранялся регулярный 4-дневный эстральный цикл (о чем свидетельствует исследование мазков слизи из влагалища) (фиг. 1). Обширные и избирательные повреждения, наблюдаемые в коре надпочечников и в костном мозге, не возникают ни в других зонах надпочечника, ни в гипофизе, ни в яичниках.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Описанные выше методы позволяют просто и быстро вызывать определенные опухоли. Возникновение этих опухолей осуществляется при строго определенных, но легко воспроизводимых условиях.

Крысы одной из изученных линий (Спрэйг-Доули) характеризовались высокой чувствительностью к канцерогенному действию 7,12-ДМБА на молочные железы, крысы второй линии (Лонг-Эванс) оказались менее чувствительными. Эта чувствительность передается как доминантный признак в равной степени отцом и матерью. Чувствительность (или резистентность) обусловлена исключительно функцией гипофиза, осуществляющего свое влияние через контролируемые им органы — яичники и молочные железы.

Токсическое действие рассматриваемых канцерогенов сходно с радиомиметическим. Как облучение, так и углеводороды вызывают повреждения костного мозга; однако  $\gamma$ -излучение повреждает также и половые железы, на которые углеводороды не влияют. Вместе с тем 7,12-ДМБА вызывает кровоизлияния в надпочечниках, тогда как облучение такого действия не оказывает.

Следует отметить, что излучение и полициклические ароматические углеводороды удивительно сходны по своей бластомогенной активности: однократное воздействие  $\gamma$ -излучения или специфических полициклических углеводородов приводит к одинаковым результатам — к избирательному возникновению (при определенных условиях опыта) опухолей молочных желез у значительной части подопытных животных.

Избирательная локализация поражений — это наиболее интересный результат описанных здесь опытов. Многие ткани совершенно не повреждались углеводородами, вызывавшими тяжелые поражения некоторых других органов. После применения достаточно большой дозы 7,12-ДМБА некрозы и гибель клеток наблюдали в костном мозге и в 2 (из 4) слоях коры надпочечников; у тех же животных яичники и гипофиз оставались неповрежденными. Больше того, однократное введение углеводородов вызывало у каждой крысы возникновение только относительно небольшого числа опухолей. У крыс, обладавших высокой чувствительностью, далеко не все из многих миллионов клеток молочных желез подвергались малигнизации после однократного введения ароматических углеводородов; наибольшее число раковых опухолей, возникавших у одной крысы после однократного воздействия, не превышало 21; число индуцированных опухолей молочных желез

находилось в прямой зависимости от дозы углеводорода [7]. Очевидно, чувствительность соматических клеток неодинакова. Уязвимость молочных желез в известной мере зависит от их специфического биохимического статуса в момент введения углеводорода [6].

В чувствительных зонах надпочечников 7,12-ДМБА вызывает тяжелые поражения, приводящие к гибели клеток; в меньшей степени повреждаются клетки в тех органах, где позже возникнет раковая опухоль, — мертвая клетка не может стать злокачественной. Таким образом, раковые опухоли не возникают в пораженных надпочечниках, а в специфически чувствительных молочных железах отсутствуют некрозы.

Повреждение, нанесенное уязвимой клетке и приводящее к раку, не носит случайного характера. Возникает мутация, проявляющаяся в превращении клетки в злокачественную; мутировавшая клетка, ставшая злокачественной, характеризуется высоким содержанием лактатдегидрогеназы [13]. Комплекс нуклеиновых кислот, управляющий внутриклеточным синтезом лактатдегидрогеназы, не разрушается и не ослабляется под действием углеводородов. Возможно, происходит выраженное подавление других генов, но не гена, контролирующего синтез этого фермента. Сохранение клеткой способности к синтезу значительных количеств лактатдегидрогеназы — основное условие развития рака.

Все канцерогены, специфически действующие на молочные железы, — это плоскостные молекулы с системой сопряженных двойных связей: молекула содержит определенные замещающие группы или — что равнозначно — добавочное кольцо, присоединенное к боковой цепи. Углеводороды, из которых они получены, — бензантрацен, флуорен, стильбен — лишены канцерогенной активности: способность углеводородов индуцировать рак связана с присутствием замещающих групп или добавочного кольца. Такими активирующими свойствами обладают метильные группы (две группы  $\text{CH}_3$  в определенных участках молекулы значительно эффективнее, чем одна группа  $\text{CH}_3$  в любом участке), амино- и ацетиламиногруппы; этильные группы не обладают этим свойством. Присоединение к бензантрацену дополнительного кольца (в мезо-положении) приводит к образованию бензпирена или холантрена — соединений, обладающих почти такой же канцерогенной активностью, как и 7,12-ДМБА. Группы —  $\text{CH}_3$ , — $\text{NH}_2$ , — $\text{NHCOCH}_3$ , а также добавочные кольца обладают одним общим свойством — способностью отдавать электроны сопряженной системе  $\pi$ -электронов основных колец канцерогенов.

Сент-Дьердьи [17] нашел, что канцерогенная активность углеводородов связана с их способностью, отдавая электрон, образовывать с локальным акцептором комплексы с переносом заряда. Так как бензпирен лишен полярных функциональных групп, таких, как  $\text{OH}^-$  или  $\text{NH}_2^-$ , он может связываться с биологической системой только путем образования комплексов с переносом зарядов [20]. Но одного переноса зарядов недостаточно для индукции рака; здесь участвуют также и стерические факторы. Так, комплексы с сильным переносом зарядов образуют с тринитро-9-флуореном 9, 10-диметилантрацен и 7, 12-ДМБА, но только последний канцерогенен.

Стерический фактор играет важную роль в индукции рака канцерогенами, специфически действующими на молочные железы. Янг [20] указывал, что по мере приближения структуры ароматических углеводородов к структуре стероидов происходит усиление их канцерогенной активности. «Полициклические ароматические углеводороды только тогда канцерогенны, когда они стерически сходны с активным стероидом. У полициклических ароматических углеводородов с близкими электронными свойствами кан-

церогенная активность тем выше, чем больше их стерическое сходство со стероидами» [20]. Наука многим обязана А. Пюльману и Б. Пюльман за их прекрасные исследования по связи электронной конфигурации углеводов с их канцерогенностью. Как известно, полициклические ароматические углеводороды индуцируют рак в результате наличия у них определенных стерических и электронных свойств, обуславливающих избирательное поражение клеток; отсюда ясно, что не существует единственного химического канцерогена; эти соображения распространяются и на вирусы. Известно, что повреждение излучением высокой энергии (например,  $\gamma$ -лучами) может вызвать избирательную малигнизацию. Связанное с возникновением рака специфическое и локализованное повреждение нуклеиновых кислот в хромосомах (его механизм еще не выяснен полностью) может быть вызвано различными методами.

Хотя различные аспекты канцерогенеза при однократном воздействии полициклических ароматических углеводов как будто уже достаточно выяснены, один важный вопрос остается неразрешенным: почему всегда возникает рак молочной железы и никогда не возникает рак матки?

### ВЫВОДЫ

Однократная сублетальная доза  $\gamma$ -излучения или однократное воздействие особым видом полициклических углеводов дают одинаковый бластомогенный эффект: оба фактора индуцируют преимущественно и избирательно рак молочной железы.

В процессе индукции рака полициклическими ароматическими углеводородами играют роль следующие факторы: растворимость, всасывание и перенос канцерогенов, стерические факторы, перенос зарядов, ДНК, наличие избирательного специфического повреждения. Слишком сильное повреждение клетки приводит к ее гибели.

Если все необходимые условия соблюдены, то происходит специфическая для рака клеточная мутация, которая наследуется в поколениях соматических клеток.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Haddow A., Harris R. C. J., Kon G. A. R., Ree E. M. F., Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. A 241, 147 (1948).
2. Hartwell J. L., «Survey of Compounds Which Have Been Tested for Carcinogenic Activity», 2nd ed. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, 1951.
3. Huggins C., Bergental D. M., Cancer Research, 12, 134 (1952).
4. Huggins C., Morii S., J. Exptl. Med., 114, 741 (1961).
5. Huggins C., Briziarelli G., Sutton H., Jr., J. Exptl. Med., 109, 25 (1959).
6. Huggins C., Grand L. C., Brillantes F. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 45, 1294 (1959).
7. Huggins C., Grand L. C., Brillantes F. P., Nature, 189, 204 (1961).
8. Huggins C., Morii S., Grand L. C., Ann. Surg., 154, No. 6 Supplement, 315 (1961).
9. Maisin J., Coolen M. L., Compt. rend. soc. biol., 123, 159 (1936).
10. Nakahara W., Fukuoka F., Sugimura T., Gann. 48, 129 (1957).
11. Picard E., Laduron H., Compt. rend. soc. biol., 115, 1739 (1934).
12. Pullman A., Pullman B., Advances in Cancer Research, 3, 117 (1955).
13. Rees E. D., Huggins C., Cancer Research, 20, 963 (1960).

14. Segi M., «Cancer Mortality for Selected Sites in 24 Countries (1950—1957)», Tôhoku University, Sendai, 1960.
15. Shubik P., Hartwell J. L., «Survey of Compounds Which Have Been Tested for Carcinogenic Activity», Supplement I. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, 1957.
16. Sydnor K. L., Huggins C. (1962).
17. Szent-Györgyi A., Isenberg I., Baird S. L., Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 1444 (1960).
18. Takayama S., Gann, 51, 139 (1960).
19. Williams-Ashman H. G. (1960) (личное сообщение).
20. Yang N. C., Castro A. J., Lewis M., Wong T. W., Science, 134, 386 (1961).



# НЕКОТОРЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКИХ ДАВЛЕНИЙ В БИОЛОГИИ

Г. К А Л Ь К А Р

## ВВЕДЕНИЕ

Биологическим проблемам, связанным с изучением космического пространства на больших высотах, можно противопоставить исследования физико-химических и биохимических реакций в условиях больших давлений, своего рода исследования «антикосмоса». Это вполне достойная тема для статьи, посвященной юбилею Сцент-Дьёрдьи.

Гомер пел об Аиде, подземном царстве мертвых, населенном великими героями прошлого. Абиссальные глубины моря можно назвать Аидом Посейдона. Температура здесь отличается однообразием: она всегда равна приблизительно 4°. Лучше характеризуют подводные пропасти очень высокие гидростатические давления — от нескольких сот атмосфер до тысячи и выше. Однако и при таких огромных давлениях возможна настоящая жизнь. Многие экспедиции, начиная с экспедиции Александра Агассица в 1888 г., изучали глубоководную фауну. Датская экспедиция на «Галатее» и советская экспедиция, руководимая Л. А. Зенкевичем, исследовали недавно глубоководные впадины (глубиной 9000 м) вблизи Филиппинских островов и в зоне Курильские острова — Камчатка. Даже в таких глубинах обитают разнообразные живые существа: голотурии, эхиуриды, бокоплавцы и морские анемоны [4]. На меньших глубинах, но также в глубоководных зонах (глубина около 4500 м) встречаются угри с вполне сформированными органами зрения [4]. Пониманию биохимических механизмов, лежащих в основе биологической приспособляемости к высоким гидростатическим давлениям, могут способствовать исследования более простых организмов, например барофильных бактерий [35].

Начало лабораторным исследованиям влияния гидростатических давлений на живые организмы было положено Реньяром [27]; он первый понял возможное значение этого физического фактора для биологии. Реньяр нашел, что сбраживание сахара дрожжами еще продолжается при 400 атм, но прекращается при 600 атм [27]. Эти опыты дополняет работа об устойчивости различных процессов, идущих в клетках барофильных бактерий, к атмосферному давлению [35].

Экспериментальное изучение зависимости биологических реакций от величины давления шло по двум основным направлениям — исследование влияния давления и волюметрические исследования. Классическую трактовку этой проблемы можно найти в монографии Джонсона, Эйринга и Полиссара [15]. Особый интерес, надо думать, представит попытка оце-

нить значение подобных исследований для современной молекулярной биологии.

Прежде всего следует указать, что в описываемых опытах всегда использовалось гидростатическое давление. Все клетки или все молекулы белка полностью окружены жидкой средой, которая передает давление равномерно во всех направлениях. Любое локальное сжатие, возникающее между сталкивающимися твердыми поверхностями, может повести к повреждениям и нарушениям даже при сравнительно низких давлениях. Другой существенный момент — это отсутствие в системе газовой фазы. Давление, приложенное к системе через воздушную среду, вводит в раствор дополнительное количество атмосферных газов. При этом как реакционноспособные, так и инертные газы могут обусловить возникновение множества физико-химических процессов. Чисто гидростатическое давление не оказывает какого-либо влияния на равновесие или скорость реакции, если только эти реакции не связаны с изменениями объема, которые могут вызываться либо прямым изменением объема растворенного вещества, либо непрямым влиянием на растворитель (например, электрострикция молекул воды в результате образования заряженных групп).

Изобретенные еще в 1890 г. Реньяром барокамеры были усовершенствованы и приспособлены для очень высоких давлений в 1914 г. [2]; барокамеры с окнами для наблюдения и измерения биологической реакции на давление были сконструированы в 1936 г. [25]. Недавно был создан стеклянный электрод для измерения изменений констант ионизации при высоком гидростатическом давлении; этим методом были измерены константы ионизации простых электролитов как в барокамере, так и в глубинах океана [7].

Для того чтобы под действием гидростатического давления возникли изменения в ходе биохимической реакции (изменение константы скорости или константы равновесия), необходимо, чтобы эта реакция сопровождалась изменением объема. Если в процессе реакции объем увеличивается, то с повышением давления скорость реакции уменьшается; если же объем уменьшается, то повышение давления сопровождается увеличением скорости реакции. Аналогичным образом ведут себя и константы равновесия. Это только другой аспект представлений, сформулированных Эйрингом и Стирном в их теории абсолютных скоростей реакций [8].

Следует отметить, что изменения объема могут обуславливаться перегруппировками различного типа. Так, если речь идет о полимерах, то необходимо принимать во внимание возможные изменения объема не только самого полимера, но и растворителя. Это положение становится ясным, когда обсуждение касается белков. Методы наблюдения над изменениями объема, вызванными химическими реакциями, разрабатывались Рона и Фишголом [28] и Сринивазая и др. [29]; эти методы получили дальнейшее развитие в классических работах [6, 34], проложивших дорогу исследованиям Линдерстрем-Ланга [20, 21]. Хотя Линдерстрем-Ланг подчеркивал, что классический метод Вебера применим для измерения абсолютных величин, тогда как его методы позволяют определять только относительные изменения, эти изящные и простые микровольтометрические методы послужили мощным стимулом для развития исследований указанной выше проблемы.

#### ВЛИЯНИЕ ДАВЛЕНИЙ НА АРХИТЕКТУРУ БЕЛКОВ

Первые исследования по влиянию гидростатических давлений на белки были выполнены Бриджменом [2] почти 50 лет назад. Он установил, что

в растворе яичного альбумина под давлением 5000—6000 *атм* возникает «прессорная коагуляция». Позднее Бриджмен с сотр. [3] описали аналогичное явление для гемоглобина при давлении 9000 *атм*. Подобного рода денатурация и флоккуляция в дальнейшем были изучены более подробно [15—17, 24]. В большей части этих работ определялась растворимость после снятия давления. Применение барокамер с окнами позволило изучать состояние специфических белков под давлением. Так, непосредственно под давлением были проведены количественные исследования люминесценции микроорганизмов [15] и зарегистрированы изменения спектра поглощения гемоглобина [30].

Изучение светящихся микроорганизмов показало, что высокое гидростатическое давление подавляет биолюминесценцию. Однако при температуре, равной примерно 30°, которая при обычном атмосферном давлении заметно подавляет свечение, одно воздействие высоким гидростатическим давлением предохраняет свечение от тепловой инактивации [15]. Это хорошо согласуется с данными, показывающими, что высокое гидростатическое давление замедляет скорость необратимой денатурации различных белков, наступающей при температурах, близких к точке коагуляции [17, 30]. Все приведенные выше результаты согласуются с данными Линдерстрем-Ланга об изменениях объема, связанных с денатурацией [20].

#### ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА И ДЕНАТУРАЦИЯ

Как известно, при исследовании  $\beta$ -лактоглобулина вначале не было обнаружено изменений объема при денатурации [20], однако более поздние опыты показали, что отсутствие этих изменений обусловлено частичной ренатурацией этого белка [19]. В присутствии 38% мочевины происходят значительные изменения объема. Денатурация вызывает уменьшение объема на 6  $\mu\text{л}/\text{г}$ , что приблизительно соответствует 250  $\text{мл}/\text{моль}$  белка. Уменьшение объема при денатурации  $\beta$ -лактоглобулина мочевиной облегчает понимание неожиданно большого сокращения объема, наблюдаемого при переваривании этого белка трипсином. Эти данные привели Линдерстрем-Ланга к предположению, что необходимой предпосылкой для расщепления пептидных связей некоторых белков является нарушение вторичной структуры.

#### ДЕЙСТВИЕ ДАВЛЕНИЯ НА СИНТЕЗ И РАСПАД ПЕПТИДОВ

Многих исследователей привлекала возможность осуществить синтез белка, используя систему, содержащую протеолитические ферменты и большие концентрации аминокислот (или низкомолекулярных пептидов), и подвергая эту систему воздействию высоких гидростатических давлений. Такие исследования осуществили Бреслер и его сотрудники в Ленинградском Институте высокомолекулярных соединений [1]. Они сообщили, что под давлением 6000 *атм* из глицина при больших его концентрациях и в присутствии сока поджелудочной железы образуются трипептиды. В дальнейшем Бреслер продолжил свои исследования на кристаллическом сывороточном альбумине. Этот альбумин гидролизовали трипсином в течение 18 *час* до установления среднего молекулярного веса ниже 1000 (что соответствует пептидам из 6—7 аминокислот). Воздействие на такой гидролизат давления 6000 *атм* при 38° в течение 18 *час* приводило к образованию высокомолекулярных альбуминов, очень близких к исходному. Под давлением

восстанавливались не только характерные физико-химические свойства альбумина, но и его антигенные свойства. До сих пор успешный синтез полипептидных цепей путем применения высоких давлений был достигнут только в этих работах.

К исследованиям такого же рода относится исследование миогена [1] — фермента, наделенного альдолазной активностью в отношении фруктозодифосфата. Было установлено, что при высоком давлении фермент утрачивает альдолазную активность, однако в присутствии больших концентраций глюкозы эта активность частично сохраняется.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ОБЪЕМА, СВЯЗАННЫХ С РАСЩЕПЛЕНИЕМ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

На основании работ Бреслера можно было ожидать, что процессы, подобные расщеплению пептидов, должны сопровождаться увеличением объема; однако еще в 1930 г. Вебер показал, что расщепление пептидов в водном растворе в действительности приводит к сокращению объема. Это вызвано появлением дополнительных зарядов (например, один дипептид, несущий один положительный заряд, расщепляется на две аминокислоты, в результате чего образуются два диполя), которые окружаются «сжатыми» молекулами воды. Как отмечалось в литературе [20], в свободных аминокислотах противоположные заряды находятся так близко друг от друга, что их результирующее действие на окружающие молекулы воды несколько слабее действия ионной пары. Пептиды, состоящие более чем из 3—4 аминокислот, обладают действием, близким к действию ионной пары. Было установлено, что ферментативный разрыв концевой пептидной связи приводит к уменьшению объема приблизительно на 13 мл на 1 моль расщепленного вещества, тогда как при разрыве посередине длинной пептидной цепочки объем должен уменьшиться еще на 30—40% приведенной выше величины. Найдено, однако, что при расщеплении  $\beta$ -лактоглобулина уменьшение объема достигает 50 мл/моль (т. е. почти 400% величины, наблюдаемой при отщеплении одной аминокислоты). Было высказано предположение, что в этом случае происходит также изменение вторичной структуры.

#### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование макромолекул — это одна из тех областей биологии, где применение высоких давлений, вероятно, окажется плодотворным. Будут созданы или уже существуют барокамеры с иллюминаторами для спектрофотометрии, спектрополяриметрии и флуорометрии.

Значительный интерес представляют работы, показавшие возможность изучения действия градиентов давлений на структуру ДНК и полинуклеотидов [22]. Установлено, что воздействие высоким гидростатическим давлением снижает частоту мутаций у *Neurospora*. Давление около 600 атм, приложенное к взвеси конидий в среде, содержащей азотные аналоги иприта, снижает число морфологических мутантов приблизительно на 45—50%. Эти наблюдения, естественно, трудно согласовать с представлениями современной молекулярной биологии, хотя в дальнейшем они, возможно, смогут подсказать какие-то простые эксперименты для исследования биосинтеза ДНК или полинуклеотидов. Следует отметить, что гидростатическое давление может оказывать сильное влияние на равновесие между одноцепочечной и двухцепочечной ДНК. Известно, что одноцепочечная ДНК обладает

более высокой флотационной плотностью, чем двухцепочная. Возможно, что переход двухцепочечной ДНК в одноцепочечную сопровождается соответствующими изменениями объема (предположительно сокращением объема в определенном направлении). Это в свою очередь делает равновесие чувствительным к изменениям давления. В зависимости от изменений молекулярного объема можно даже допустить, что давление, которому подвергается ДНК при ультрацентрифугировании в градиенте хлористого цезия, нарушает соотношение этих двух молекулярных форм со значительным увеличением содержания одноцепочечной формы. В настоящее время изучаются некоторые изменения в жидкости, вызываемые действием давления, возникающего при ультрацентрифугировании [12].

Сложный механизм *белкового синтеза* сосредоточен в субмикроскопических частицах — рибосомах. На один или даже на несколько этапов этого процесса может в значительной степени влиять высокое давление. Это в равной мере относится и к регуляторным механизмам белкового синтеза (репрессия и дерепрессия). Недавно были описаны мутанты, репрессорная система которых оказалась чувствительной к температуре [13].

Изучению действия давления на биолюминесценцию предшествовали исследования, проведенные на очищенных ферментах [15]. Основные данные о свойствах и функциях кристаллической люциферазы светляка мы почерпнули из работ Мак-Элроя и его сотрудников [22, 23]. Изучение действия давлений на этот фермент, а также на очищенную люциферазу бактерий может углубить понимание этих систем. Существует ряд других ферментных систем, вполне пригодных для исследования в барокамерах с окнами. Большой интерес представляет изучение комплексов перекись водорода — каталаза, обуславливающих весьма характерные изменения спектров [5]. Концентрации комплексов фермент — субстрат, характерные для стационарного состояния, могут заметным образом изменяться при увеличении давления в сотни раз. Другим ферментом, весьма удобным для исследования оптических свойств при высоких давлениях, является кристаллическая глутаматдегидрогеназа. При действии различных нуклеотидов этот фермент, катализирующий восстановление дифосфопиридиннуклеотида (ДПН) глутаматом, претерпевает обратимые изменения своего молекулярного веса [11]. Так, аденозиндифосфат (АДФ) способствует стабилизации крупных активных молекул фермента, тогда как восстановленный ДПН (ДПН-Н) облегчает их расщепление на более мелкие неактивные фрагменты. Интерес к этой системе еще усилился после недавних работ Томкинса с сотр. [32], в которых показано, что некоторые биологически активные стероиды также могут привести к расщеплению молекулы глутаматдегидрогеназы, очень сходному с расщеплением, вызываемым ДПН-Н, но совершенно от него независимому. В этом случае АДФ также оказывает защитный эффект. Дополнительный интерес представляют данные о том, что активная глутаматдегидрогеназа, имеющая низкий молекулярный вес, становится очень эффективным катализатором реакции дегидрирования аланина. Способность гидрофобной кольцевой структуры стероидов изменять специфичность фермента, очевидно, представляет огромный интерес. Возникает вопрос, как эта обратимая система будет вести себя при высоких давлениях. Механизм описанного расщепления молекулы глутаматдегидрогеназы в настоящее время еще неизвестен.

Интересны также наблюдения над мутантами *Neurospora*, содержащими чувствительную к температуре глутаматдегидрогеназу [9, 10]. У некоторых мутантов *Neurospora* в глутаматдегидрогеназе иногда возникают изменения, в результате которых она приобретает большую чувствительность

к температуре. Однако в отличие от большинства других чувствительных к температуре ферментов, которые активны при температурах ниже 25—30° и инактивируются при 37°, мутировавший фермент ведет себя иначе — он неактивен при 20—23° и становится активным в интервале 35—50°.

Из сказанного выше очевидно, что гидростатическое давление, примененное в качестве добавочного фактора, может оказывать влияние на любой фермент с аномальной чувствительностью к температуре. Так, например, ферменты, теряющие активность при температурах выше 25—30°, могут под действием высоких гидростатических давлений приобрести большую стабильность. Было бы интересно выяснить для ферментов этого второго типа, сможет ли увеличение давления «пробить лед» при температурах более низких, чем температура активации.

Исследования вызываемых давлением изменений *вторичной и третичной структуры* белков представляются особенно перспективными в отношении рибонуклеазы. Использование оптического вращения как критерия формирования спирали представляется здесь особенно перспективным, так как дает возможность произвести количественные определения изменений, вызванных давлением. Это относится также к исследованиям синтетических полипептидов, спирали полипролина, актомиозина, а также гемоглобина и родственных гемопротеидов.

Недавно был открыт исключительно интересный белок [26], обладающий аденозинтрифосфатазной активностью (АТФ-аза) и необходимый для окислительного фосфорилирования в митохондриях. Обнаружено, что он в высшей степени чувствителен к охлаждению, вызывающему его инактивацию, которая, по-видимому, необратима. Эта система может оказаться пригодной для исследования влияния изменений температуры и давления. Возможно, что она как-то участвует в сокращении и расслаблении миозина. Установлено, например, что АТФ вызывает сокращение митохондрий [18].

Белок опсин образует хромогенные комплексы с альдегидом витамина А. Оказалось [33], что родопсин после поглощения одного кванта света переходит в лумиродопсин, у которого альдегидная структура витамина А превратилась в полностью *транс*-форму. Полностью *транс*-хромопротеид — лумиродопсин — образует другой полностью *транс*-хромопротеид — метародопсин — у которого активные группы опсина (две сульфгидрильные и одна, связывающая протон) не защищены. Метародопсин позвоночных неустойчив и при гидролизе распадается на опсин и полностью *транс*-рети-нен. Образование метародопсина, который, вероятно, ответствен за возникновение зрительного возбуждения, вполне может быть связано с изменением объема. Следовательно, давление может влиять на стационарный уровень этого промежуточного соединения.

У морских рыб найдена интересная зависимость между положением максимума поглощения в спектре родопсина и глубиной их обитания [33]. Так, алепидозаурус и другие виды, живущие на глубинах более 400 м и подвергающиеся в силу этого гидростатическому давлению по крайней мере 50 атм, содержат желтый зрительный пигмент, названный *хризопсином*. Поскольку такие пигменты содержат обычную альдегидную группу — нео-(11-*цис*)-рети-нен, — но другой опсин, Уолд [33] предпочел называть их *глубоководными родопсинами*. Такая адаптация, вероятно, вызвана не высоким гидростатическим давлением, а тем обстоятельством, что только синий свет достигает больших глубин, и поэтому желто-оранжевый пигмент должен быть наиболее выгодным в этих условиях. Однако различия в структуре опсина все же могут благоприятствовать быстрому возникновению зрительного возбуждения на глубине «Семи морей».

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bresler S. E., *Advances in Protein Chem.*, **13**, 478 (1958).
2. Bridgman P. W., *Proc. Am. Acad.*, **49**, 11 (1914).
3. Bridgman P. W., Conant J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **15**, 680 (1929).
4. Bruun A. F., *Geol. Soc. Am., Mem.*, **67**, 641—672 (1957).
5. Chance B., *Advances in Enzymol.*, **12**, 153 (1950).
6. Cohn E. J., McMeekin T. L., Edsall J. T., Blanchard M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 784 (1934).
7. Distèche A., *Rev. Sci. Instr.*, **30**, 474 (1959).
8. Eyring H., Stearn A. E., *Chem. Revs.*, **24**, 253 (1939).
9. Fincham J. R. S., *Biochem. J.*, **65**, 721 (1957).
10. Fincham J. R. S., *Ann. Rev. Biochem.*, **28**, 343 (1959).
11. Frieden C., *J. Biol. Chem.*, **234**, 809 and 815 (1959).
12. Hearst J. E., Ift J. B., Vinograd J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 999 (1961).
13. Horiuchi T., Horiuchi S., Novick A., *J. Mol. Biol.*, **3**, 703 (1961).
14. Jacobsen C. F., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **24**, 281 (1941).
15. Johnson F. H., Eyring H., Polissar M., «*The Kinetic Basis of Molecular Biology*», p. 297, Wiley, New York, 1954.
16. Laidler K. J., «*Chemical Kinetics of Enzyme Action*», p. 210, Oxford Univ. Press (Clarendon Press), London and New York, 1958.
17. Lauffer M. B., Dow R. B., *J. Biol. Chem.*, **140**, 509 (1941).
18. Lehninger A. L., *Federation Proc.*, **19**, 952 (1960).
19. Linderstrøm-Lang K., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **14**, 117 (1949).
20. Linderstrøm-Lang K., Jacobsen C. F., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.*, **24**, 1 (1941).
21. Linderstrøm-Lang K., Lanz H., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **21**, 315 (1938).
22. McElroy W. D., de la Haba G., *Science*, **110**, 640 (1949).
23. McElroy W. D., Seliger H., In «*Symposium on Light and Life*» (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 219, Johns Hopkins Press, Baltimore Maryland, 1961.
24. Macheboeuf M. A., Basset J., *Ergeb. Enzforsch.*, **3**, 303 (1934).
25. Marsland D., Brown D. E. S., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **8**, 167 (1936).
26. Racker E., *Symposium on Regulation of Metabolism*, 45th Ann. Meeting, Fed. Am. Soc. Exptl. Biol. (1961).
27. Regnard P., «*Recherches experimentales sur les conditions physiques de la vie dans les eaux*», 501 pp., Masson, Paris, 1891.
28. Rona P., Fischgold H., *Biochem. Z.*, **261**, 66 and 366 (1933).
29. Sreenivasaya M., Sastri B. N., Sreerangachar H. B., *Biochem. J.*, **28**, 351 (1934).
30. Suzuki K., *Rev. Phys. Chem. Japan*, **28**, 24 (1958).
31. Suzuki K., Kitamura K., *Rev. Phys. Chem. Japan*, **29**, 81 (1960).
32. Tomkins G. M., Yielding K. L., Curran J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 270 (1961).
33. Wald G., Brown P. K., Brown P. S., *Nature*, **180**, 969 (1957).
34. Weber H. H., *Biochem. Z.*, **218**, 1 (1930).
35. Zobell C. E., *Science*, **115**, 507 (1952).

# ВОДА

И. КЛОТЦ

## ВВЕДЕНИЕ

Название данной статьи, вообще говоря, позволяет охватить очень широкую область человеческих знаний, но это не входит в мои намерения. Я хочу проводить рассмотрение на молекулярном, или даже атомном, уровне и коснуться лишь нескольких явлений, которые, вероятно, играют существенную роль в физиологических процессах. Я намереваюсь начать с описания некоторых молекулярных свойств воды и водных растворов, содержащих ионные или неполярные молекулы. На основании известных фактов и вытекающих из них понятий я попытаюсь, исходя из представлений о гидратации, дать объяснение некоторым особенностям поведения белковых макромолекул. И, наконец, в заключение я выскажу ряд предположений о возможности использования этих идей и представлений для интерпретации некоторых физиологических свойств тканей.

## ЧИСТОЕ ВЕЩЕСТВО

### Некоторые физические свойства

Рассмотрим сначала некоторые свойства самой воды.

Вода может находиться в трех агрегатных состояниях, но одно из них, а именно газообразное, имеет очень малое значение с точки зрения рассматриваемых в данной статье вопросов. Поэтому в табл. 1 сопоставляются некоторые свойства воды только в ее жидком и твердом состояниях. В первой строке табл. 1 приведены концентрации водородных ионов, которые образуются в результате диссоциации воды. Известно, что в жидком состоянии значение концентрации водородных ионов в воде составляет приблизительно  $1 \cdot 10^{-7}$  М. Однако, возможно, не все знают, что эта величина была также измерена для льда [9] и оказалась равной  $1 \cdot 10^{-10}$  М (см. табл. 1).

Во второй строке табл. 1 приведены значения электрической проводимости. В отличие от концентрации ионов  $H^+$ , которая при переходе от жидкого состояния к твердому изменяется примерно в тысячу раз, значения удельной проводимости (при  $0^\circ$ ) почти не меняются [9]. Тот факт, что проводимость изменяется очень незначительно, тогда как концентрация ионов водорода может отличаться в 1000 раз, является достаточно неожиданным. Значение этого бросающегося в глаза различия в поведении жидкой и твердой фаз можно понять, исходя из рассмотрения молекулярных основ электролитической проводимости. Сравнивая величины про-



Таблица 1

## Некоторые свойства воды

Свойство	Жидкость	Лед
Концентрация ионов $H^+ : C_{H^+}$	$1 \cdot 10^{-7} M$	$\sim 1 \cdot 10^{-10} M$
Электрическая удельная проводимость	$1 \cdot 10^{-8} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$	$0,3 \cdot 10^{-8} \text{ ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$
Подвижность ионов $H^{+*}$	$0,0036 \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$\sim 0,3 \text{ см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$
Скорость реакции $H^+ +$ $+ OH^- \rightarrow H_2O$	$10^{11} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$10^{13} - 10^{14} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1}$ $\text{сек}^{-1}$
Подвижность ионов $Li^+$	0,0004	$< 10^{-8}$
Коэффициент диффузии молекул воды	$2,4 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ сек}^{-1}$	$8 \cdot 10^{-11} \text{ см}^2 \text{ сек}^{-1}$

\* В случаях электролитической проводимости скорость ионов пропорциональна напряженности электрического поля. Подвижностью иона называют коэффициент пропорциональности между этими величинами. Иначе говоря, подвижность иона равна скорости, которую этот ион приобрел бы в поле единичной напряженности. Если скорость измеряют в  $\text{см}/\text{сек}$ , а напряженность в  $\text{в}/\text{см}$ , то, очевидно, единицей напряженности будет  $\frac{\text{см}}{\text{сек}} : \frac{\text{в}}{\text{см}} = \text{см}^2 \text{ в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ . — Прим. ред.

водимости, мы, по существу, сравниваем значения силы электрического тока, или, другими словами, перенос зарядов через поперечное сечение проводника за единицу времени. Перенос зарядов через поперечное сечение проводника в свою очередь зависит от двух факторов — числа зарядов или ионов, которые присутствуют в растворе (на единицу объема), и скорости их движения (подвижности зарядов). Если в растворе имеется всего несколько ионов, но они движутся с большой скоростью, то проводимость будет велика, так как будет велико число зарядов, проходящих в единицу времени через некоторое поперечное сечение. Как мы увидим позднее, подвижность ионов водорода в жидкой воде равна  $0,0036 \text{ см}^2 \cdot \text{в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$  и вообще величина подвижности малых ионов в растворе весьма мала. Так как величины проводимости для льда и воды очень мало отличаются друг от друга, а число ионов водорода в твердой фазе значительно меньше, чем в жидкой, то, очевидно, подвижность ионов  $H^+$  в твердом состоянии должна значительно превышать подвижность этих ионов в жидкости. Следовательно, подвижность ионов водорода во льду имеет значение около 0,3 [9], что почти в 100 раз превышает значение подвижности для воды (см. табл. 1). Таким образом, измерения проводимости приводят нас к очень важному заключению о том, что подвижность водородных ионов во льду чрезвычайно велика. Подвижность иона равна той скорости, с которой он будет двигаться в электрическом поле, имеющем градиент потенциала (напряженность) 1 в на 1 см. Практически те значения напряженности поля, с которыми приходится встречаться при изучении физиологии клетки, значительно выше, чем 1 в на 1 см. Соответственно и скорости движения ионов водорода во льду при таких больших напряженностях электрического поля будут значительно выше.

Большие различия величин подвижности ионов водорода во льду и в воде обуславливают различия между константами скорости реакции

образования  $\text{H}_2\text{O}$  из ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  в жидкой и твердой фазах. В жидком состоянии, как видно из табл. 1, константа скорости реакции равна примерно  $1 \cdot 10^{11}$  [9]. Это означает, что время, необходимое для образования молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  в результате соединения ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ , равно приблизительно  $10^{-11}$  сек. Такое значение константы скорости реакции соответствует, по существу, случаю свободной диффузии ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ . Для твердого состояния скорость реакции между ионами  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  примерно в 100—1000 раз больше, чем скорость той же реакции в жидком состоянии [9]. Таким образом, во льду подвижность ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  значительно выше, чем в жидкости, т. е. в твердой фазе эти ионы движутся навстречу друг другу со скоростями, значительно превышающими скорость их диффузии в жидкости.

Отметим теперь другое свойство ионов в воде, играющее важную роль в связи с нашим обсуждением аномальной подвижности ионов водорода. В табл. 1 приведены также значения подвижности ионов лития. Для жидкого состояния эта величина имеет значение  $0,0004 \text{ см}^2 \cdot \text{в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ , т. е. примерно в 10 раз меньше, чем подвижность ионов водорода, однако это значение не является чрезмерно малым. В противоположность этому во льду подвижность ионов лития чрезвычайно мала, гораздо меньше  $10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{в}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ . Сравнивая далее поведение ионов водорода и лития, мы видим, что при переходе из жидкого состояния в твердое подвижность иона лития резко падает, тогда как подвижность иона водорода при таком переходе не только не уменьшается, а существенно возрастает.

Наконец, в последней строке табл. 1 приведены значения коэффициентов диффузии для молекул воды в жидком [29] и твердом [13] состояниях. Значение коэффициента диффузии для льда почти в  $10^6$  раз ниже, чем для жидкой воды.

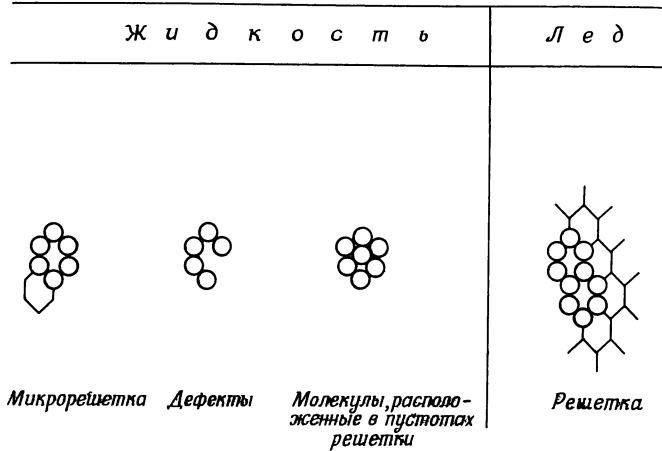
### Молекулярная структура и поведение

Как объяснить некоторые из этих необычных свойств воды?

Обратимся к фиг. 1, на которой схематически изображены структура льда и структура жидкой воды. Как это показано на двумерной схеме, молекулы воды в твердом состоянии образуют протяженную по всему кристаллу льда решетку, обладающую гексагональной структурой [4, 21]. Каждая молекула связана с соседними молекулами водородными связями. Из этого схематического изображения структуры видно, что решетка имеет большое число дырок или пустот (по одной внутри каждого шестиугольника) и является, таким образом, достаточно открытой структурой. Если бы все пустоты были полностью заняты молекулами, то плотность льда имела бы величину, близкую к 1,6 [13], тогда как в действительности она меньше единицы.

Рассмотрим теперь структуру воды в жидком состоянии. Между структурами воды в жидком и твердом состояниях имеются три важных различия. Истинная структура воды в жидкой фазе еще не установлена; она может быть либо гексагональной [22], либо пентагональной [25]. При составлении схем фиг. 1 мы предположили, что эта структура гексагональна, как и в случае льда. При этом сразу бросается в глаза одна важная отличительная черта, заключающаяся в том, что если в твердом состоянии протяженность кристаллической решетки определяется размерами куска льда (т. е. мы имеем дело с решеткой, охватывающей весь этот кусок), то в жидком состоянии существуют только микрокристаллы или микро-решетки, размеры которых не превышают 10 Å. Второе отличие состоит

в том, что в жидкости имеются, как это показано на фиг. 1, многочисленные дефекты кристаллической структуры. И, наконец, третье и последнее отличие заключается в том, что в жидком состоянии большое число молекул воды располагается в пустотах шестиугольников. Наличие таких молекул обуславливает более высокую плотность воды при температуре  $4^{\circ}$ , чем при более низких температурах. В жидком состоянии, так же как и в твердом, молекулы воды соединены между собой водородными связями. Однако в случае жидкости водородные связи более мобильны, т. е. разрываются и восстанавливаются значительно быстрее, чем в твердом состоянии. Такое поведение совершенно естественно, и его можно было бы



Фиг. 1. Схематическое изображение структуры воды в жидком и твердом состояниях.

ожидать, исходя, скажем, из значений величины коэффициента диффузии. Величина коэффициента диффузии соответствует фактически тому расстоянию, которое может при определенных концентрационных условиях пройти молекула воды под влиянием теплового движения. Как видно из табл. 1, коэффициент диффузии молекул воды в жидком состоянии в миллион раз больше, чем в твердом, или, что то же самое, во льду коэффициент диффузии в миллион раз меньше, чем в воде. Следовательно, время, необходимое для разрыва связи в жидком состоянии, значительно меньше и сам процесс значительно более эффективен, чем в твердом состоянии.

Рассмотрим подвижность ионов водорода и других заряженных частиц в воде в ее жидком и твердом состояниях (фиг. 2), учитывая то обстоятельство, что молекулы воды связаны друг с другом водородными связями.

На верхней полосе фиг. 2 показан механизм переноса протонов. Если протон подходит к молекуле воды с левой стороны цепи, то может произойти его присоединение к этой молекуле. После того как это произошло и образовалась ковалентная связь, один из атомов водорода, который ранее был связан с кислородом данной молекулы ковалентно, а с кислородом соседней — посредством водородной связи, должен оторваться с правой стороны и, подойдя к тому атому кислорода, с которым он ранее был связан водородной связью, образовать с ним новую ковалентную связь. Таким образом, по мере того как слева будут подходить атомы водорода, от кислорода или молекул воды, расположенных в центре цепи, будут отрываться атомы водорода, расположенные справа. Идя далее по этому пути, изобраа-



из своих свободных водородных радикалов. Этот перенос может идти вдоль всей цепи, состоящей из молекул воды, до тех пор, пока свободный радикал  $\text{H}\cdot$  не достигнет группы  $\text{OH}^-$ , связанной с трехвалентным ионом железа. Когда свободный радикал  $\text{H}\cdot$  подходит к группе  $\text{OH}^-$ , один из электронов атомов кислорода, присоединенный к трехвалентному иону железа, переходит к  $^*\text{Fe}^{3+}$ , превращая его в  $^*\text{Fe}^{2+}$ . Этот процесс переноса ионов изображен в средней части фиг. 2. Конечные продукты реакции показаны справа от стрелки. Таким образом, в конечном счете процесс сводится к превращению исходного иона  $^*\text{Fe}^{3+}$  в ион  $^*\text{Fe}^{2+}$  и исходного иона  $\text{Fe}^{2+}$  в ион  $\text{Fe}^{3+}$ . При этом перенос электрона осуществляется за счет постепенного переноса свободного водородного радикала по цепи, построенной из молекул воды.

Аналогичный механизм показан в нижней части фиг. 2 для переноса гидридного иона  $\text{H}^-$ , несущего два электрона [20]. В этом случае перенос осуществляется от восстановительного агента, содержащего SH-группу, к окислительному агенту, содержащему SS-группу. Здесь снова предполагается, что молекулы воды образуют мостик между SH- и SS-группами (слева от стрелки в нижней части фиг. 2). Если гидридный ион, т. е. атом водорода с двумя электронами, переходит от SH-группы к смежной с ней молекуле воды, то у оставшейся слева S-группы будет недоставать двух электронов и она сможет образовать SS-связь с соседними  $\text{S}^-$  или SH-группами. Гидридный ион  $\text{H}^-$  может в свою очередь переходить к молекуле воды, но лишь в том случае, если атом кислорода этой молекулы в состоянии отдать два своих электрона, так как иначе электронная оболочка кислорода оказалась бы уже заполненной. Атом кислорода воды может отдать два электрона лишь при том условии, что атом водорода, присоединенный ранее к этому кислороду, перейдет к соседней молекуле воды, унося с собой два электрона, принадлежавших кислороду, или, другими словами, если гидридный ион вновь перейдет к следующей соседней молекуле воды. Наконец, если примыкающие к SS-группе молекулы могут передать гидридный ион другой SS-группе, то образуется (см. фиг. 2, справа от стрелки)  $\text{S}^-$  (или SH), так как SS-группа получит два электрона. Таким образом, и здесь мы видим, что основной механизм для идущих при значительном расстоянии между молекулами окислительно-восстановительных реакций (в данном случае требующих переноса двух электронов) сводится к миграции гидридного иона, несущего два электрона, по цепи, состоящей из молекул воды.

На основе этих механизмов легко понять, почему ионы водорода во льду имеют такую необычайно высокую подвижность по сравнению с подвижностью в жидкости. Совершенно очевидно, что подвижность иона  $\text{H}^+$  определяется условиями переноса  $\text{H}^+$  от одной молекулы воды к другой. Следовательно, скорость полного переноса  $\text{H}^+$  будет зависеть от того, насколько протяженной является система водородных связей и насколько быстро может переходить ион водорода от одного атома кислорода к другому. В жидком состоянии, как было показано, образуются только микрокристаллы или микрорешетки, размеры которых незначительны. Кроме того, из-за легкости разрыва водородных связей эти микроструктуры непрерывно изменяются. Поэтому, хотя подвижность ионов водорода благодаря наличию отдельных «водных мостиков» выше, чем подвижность ионов лития, это расхождение не слишком велико. Вместе с тем в твердом состоянии система водородных связей охватывает практически весь кристалл льда и скорость переноса  $\text{H}^+$  лимитируется лишь скоростью перехода иона водорода посредством туннельного эффекта от одной молекулы воды

к другой. Благодаря наличию в твердом состоянии протяженной по всему кристаллу упорядоченной структуры подвижность ионов водорода во льду необычайно велика и приближается по своей величине к значениям подвижности в полупроводниках.

Подобным же образом можно легко объяснить, почему так велика скорость реакции соединения водородного и гидроксильного ионов в кристаллах льда. Здесь  $H^+$ -ион и, следовательно,  $OH^-$ -ион также могут перемещаться по структуре, образованной молекулами воды, с очень большой скоростью. Это обусловлено наличием так называемого бригадного механизма.

## ГИДРАТАЦИЯ

### Ионные растворы

Перейдем от чистой воды к растворам различных веществ в воде, или, точнее, рассмотрим явление гидратации.

Начнем с рассмотрения гидратации ионных растворенных веществ. Отметим для начала несколько свойств ионов в растворе. В табл. 2 собраны некоторые наиболее характерные значения энергии гидратации [7, 9]. Как видно из этой таблицы, значение энергии гидратации иона водорода очень велико и составляет  $276\ 000\ \text{кал/моль}$ . Тот факт, что для других одновалентных катионов, таких, как литий, натрий, калий, значение энергии гидратации меньше, чем для водородного иона, и, кроме того, различно для каждого из них, показывает, что энергия гидратации зависит не только от заряда, но и от природы иона. Вместе с тем энергия гидратации очень сильно зависит и от величины заряда. Значения энергии гидратации для двухвалентного иона кальция и трехвалентного иона алюминия иллюстрируют эту зависимость (см. табл. 2). Большие значения энергий гидратации у  $Ca^{2+}$  и  $Al^{3+}$  говорят о том, что должно иметь место чрезвычайно сильное взаимодействие между каждым из этих ионов и молекулами воды.

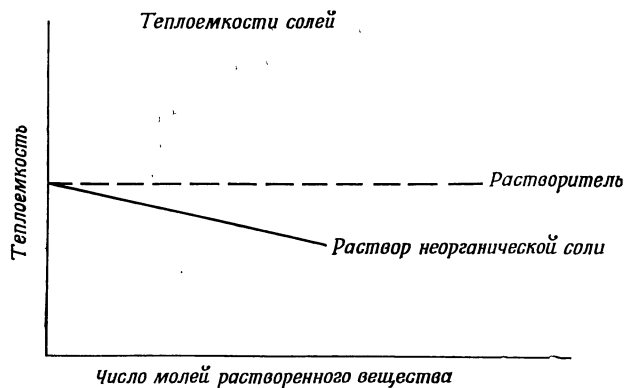
Рассмотрим далее значения теплоемкостей нескольких ионных соединений в растворе [14]. Обратимся с этой целью к экспериментальным результатам, изображенным графически на фиг. 3. График выражает зависимость теплоемкости от числа молей растворенного вещества. Горизонтальная пунктирная линия отсекает по оси ординат отрезок, соответствующий теплоемкости чистого растворителя. Поразительно, что теплоемкость раствора солей всегда меньше теплоемкости чистого растворителя (фиг. 3). Некоторые численные примеры приведены в табл. 3. Теплоемкость хлористого натрия в твердом состоянии положительна, т. е. для повышения температуры веществу должно быть сообщено некоторое количество теплоты. Однако эффективная величина теплоемкости в растворе, обозначаемая  $\bar{C}_{p_2}$ , имеет отрицательное значение, соответствующее нисходящей ветви графика на фиг. 3, т. е. ветви, наклон которой по отношению к горизонтальной пунктирной прямой отрицателен. Это значит, что добавление хлористого натрия в раствор приводит к уменьшению количества теплоты, необходимого для повышения температуры раствора на  $1^\circ$ , по сравнению с тем количеством теплоты, которое нужно для увеличения температуры чистого растворителя также на  $1^\circ$ .

Т а б л и ц а 2

Энергии гидратации ионов

Ион	$-\Delta H,$ ккал·моль <sup>-1</sup>
$H^+$	276
$Li^+$	131
$Na^+$	116
$K^+$	92
$Ca^{2+}$	410
$Al^{3+}$	1149

Столь же интересные сведения о свойствах солей можно найти во многих монографиях, посвященных электролитам [7, 14]. В табл. 4 представлены значения молярных объемов некоторых ионных соединений. Как видно



Фиг. 3. Уменьшение теплоемкости при добавлении к водному раствору неорганических солей.

из этой таблицы, для таких солей, как хлористый литий или хлористый натрий, объем одного моля растворимого вещества имеет величину порядка

Таблица 3

Значения теплоемкости некоторых ионных соединений

Вещество	Теплоемкость, кал·моль <sup>-1</sup> град <sup>-1</sup>	$C_{p2}$ в водных растворах
	$C_p$ для твердого состояния	
LiCl	12	—15,63
NaCl	11,9	—23,8

20 см<sup>3</sup>. Эффективный же объем моля растворимого вещества в водном растворе меньше этой величины. Иначе говоря, сумма объема 1 моля чистого

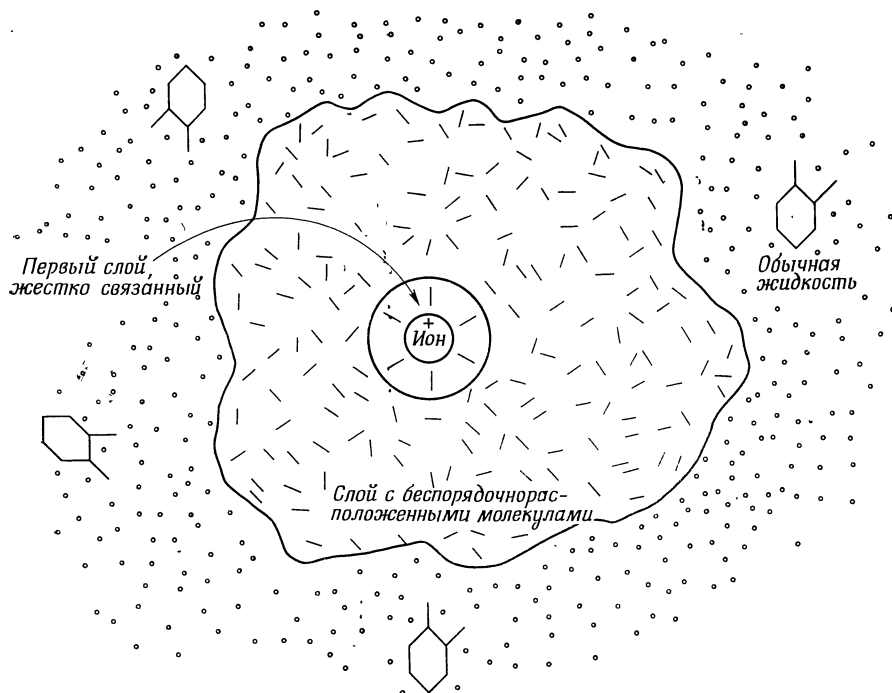
Таблица 4

Молярные объемы ионных соединений в твердом виде и в растворе

Вещество	$V$ (в твердом виде), см <sup>3</sup>	$\bar{V}_2$ (в водном растворе), см <sup>3</sup>
LiCl	20,5	17,00
NaCl	27	16,40
NaOH	18,8	—6,70
Глицин	46,7	43,199

растворителя и объема 1 моля чистого растворенного вещества в твердом состоянии больше, чем объем этих веществ в растворе. Таким образом,

При растворении наблюдается уменьшение общего объема. В связи с данными, приведенными в табл. 4, интересно отметить, что для некоторых веществ, в частности для едкого натра, объем раствора, составленного из 1 моля едкого натра в твердом виде, растворенного в 1 л воды, меньше объема, который занимает 1 л чистой воды. Объем 1 моля чистого растворителя при добавлении к нему неорганических солей в табл. 4 обозначен символом  $\bar{V}_2$ . Значение величины  $\bar{V}_2$  для едкого натра равно  $-6,7 \text{ см}^3 \text{ моль}^{-1}$ . Кроме



Фиг. 4. Модель структуры воды в областях, прилегающих к неорганическому иону.

того, из табл. 4 видно, что поведение такого биполярного иона, как глицин, более или менее сходно с поведением полностью диссоциированного хлористого натрия, а эффективный объем 1 моля NaCl в водном растворе, т. е.  $\bar{V}_2$ , меньше, чем объем 1 моля чистого кристаллического соединения.

Эти свойства наряду с другими характерными особенностями поведения ионных водных растворов позволили создать достаточно общую модель, на основании которой можно описать процессы гидратации ионов в воде. Такая модель изображена на фиг. 4 [12]. Вокруг центрального иона, знак заряда которого в данном случае положителен, расположено 4—6 очень прочно и жестко удерживаемых молекул воды, которые иногда называют «жестко связанными». Предполагают, что именно наличие этих прочно закрепленных молекул воды и определяет высокое значение величины энергии гидратации. В наружном слое находится обычная жидкая вода, содержащая гексагональные неустойчивые кристаллы, которые имеют тенденцию захватывать все новые и новые молекулы воды для дальнейшего образования гексагональной микрокристаллической структуры. Между этими двумя областями имеется промежуточная область, молекулы которой, как это показано на фигуре, расположены неупорядоченно в силу того, что они



находятся под влиянием двух конкурирующих воздействий: центрально-симметричное поле иона стремится выстроить их в определенном порядке вокруг катиона, расположенного в центре, а наружный слой жидкой воды стремится включить эти молекулы в свою гексагональную структуру. Результирующее действие таких конкурирующих влияний приводит к тому, что расположение молекул воды в промежуточной области ближе к хаотичному, чем к упорядоченному.

Исходя из этой модели, можно понять основные свойства ионных водных растворов. Вернемся к данным по теплоемкости, приведенным в табл. 3. Существует ряд факторов, которые могут влиять на величину теплоемкости раствора. В этой статье я остановлюсь только на одном из них. Теплоемкость — это количество теплоты, необходимое для повышения температуры раствора на  $1^\circ$ . В случае чистой воды это тепло используется в основном для плавления отдельных микрокристаллов. Если же какой-либо ион уже вызвал изменение структуры воды в определенном участке раствора, то вполне естественно ожидать уменьшения количества тепла, необходимого для повышения температуры воды на  $1^\circ$ . Существование промежуточных областей, в которых отсутствует упорядоченность, позволяет объяснить различные свойства теплоемкости и, в частности, зависимость теплоемкости от размера ионов [12].

Мне хочется затронуть здесь и ряд иных данных; правда, эти данные не будут нам непосредственно нужны впоследствии, однако они представляют известный интерес в связи с обсуждением вопроса о гидратации ионов. Хотя некоторые ионы в состоянии очень прочно удерживать молекулы воды в первом слое, о чем свидетельствуют высокие значения величины энергии гидратации, необходимо иметь в виду, что с точки зрения наших обычных представлений вовсе не обязательно, чтобы время, в течение которого молекулы воды находятся в связанном состоянии, было очень большим, хотя на молекулярном уровне оно велико. Приведем некоторые характерные значения времени пребывания молекул воды в связанном состоянии:

Вода в жидком состоянии	$10^{-10}$ сек
Первый гидратный слой ионов	
$Mn^{2+}$	$10^{-7}$ сек
$Cu^{2+}$	$10^{-6}$ сек
$Ni^{2+}$	$10^{-4}$ сек
$Al^{3+}$	$>10^{-4}$ сек

Для сравнения укажем, что значения периодов молекулярных колебаний равны примерно  $10^{-13}$  сек. Длительность же существования упорядоченных областей в жидкой воде равна примерно  $10^{-10}$  сек [11], т. е. в тысячу раз больше, чем период молекулярных колебаний. Конечно, с точки зрения обыденных человеческих представлений это время вряд ли можно назвать большим.

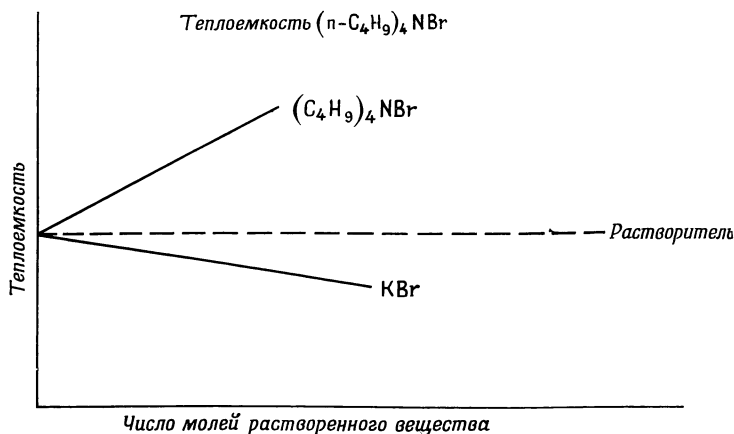
Молекулы воды, находящиеся в первом слое и связанные с ионом, удерживаются в этом состоянии в течение более длительного времени, предшествующего обмену молекулами с окружающей водой. Насколько мне известно, длительность существования для одновалентных ионов пока не определена, но соответствующие данные для некоторых двух- и трехвалентных ионов в литературе есть [6, 16], и эти значения дают представление о порядке величины. Как было указано выше, длительность существования молекул воды, связанных с ионом марганца, составляет  $10^{-7}$  сек. Двухвалентные ионы могут оказывать специфическое действие: ион меди удержи-

вает воду в течение  $10^{-6}$  сек, а ион никеля — примерно  $10^{-4}$  сек. Как и можно было ожидать, исходя из возрастания значения энергии гидратации, величина заряда является важным фактором. Ион алюминия удерживает воду в связанном состоянии еще дольше, чем ионы меди и никеля ( $10^{-4}$  сек). Промежуток времени  $10^{-4}$  сек может показаться очень коротким, однако в масштабе молекулярных событий это время очень велико, оно в миллиард раз больше, чем период колебаний или вращений нормальной молекулы.

### Растворы неполярных веществ

Рассмотрим некоторые свойства растворов неполярных веществ и характер влияния этих свойств на гидратацию неполярных молекул.

На фиг. 5 приведены данные по теплоемкости для больших неполярных молекул тетрабутиламмонийбромида. Теплоемкость чистого растворителя соответствует горизонтальной пунктирной линии. Добавление к раствору неорганической соли КВг приводит к уменьшению теплоемкости. Напротив, добавление в раствор органических неполярных групп вызывает весьма



Фиг. 5. Влияние введения неполярных заместителей в  $(n-C_4H_9)_4NBr$  на теплоемкость водных растворов.

значительное возрастание теплоемкости. Это увеличение теплоемкости отчасти можно приписать тому вкладу, который вносит движение неполярных бутильных групп, однако этот вклад можно оценить с помощью стандартных термодинамических методов, и, как показывает расчет, в лучшем случае только около половины наблюдаемого возрастания теплоемкости можно отнести за счет движения бутильных групп. Отметим, что если уменьшение теплоемкости раствора при добавлении неорганической соли КВг мы отнесли за счет нарушения упорядоченной структуры воды под действием ионов, то увеличение теплоемкости при добавлении к раствору неполярных бутильных групп следует приписать их способности выстраивать молекулы воды в определенном порядке.

Имеется довольно много независимых данных, свидетельствующих о том, что эти неполярные молекулы могут приводить к увеличению степени структурной организации воды. В частности, упомянутые выше тетрабутильные соединения образуют кристаллогидраты, которые плавятся при существенно более высоких значениях температуры, чем точка плавления

обычного льда, несмотря на то что такие гидраты содержат по молекулярному составу более 90% воды (обычно 1 молекула тетрабутиламмония приходится на 32 молекулы воды). Например, точка плавления гидрата окиси тетрабутиламмония лежит около 30°, а гидрата фторида тетрабутиламмония — около 25°. Кристаллическая структура этих гидратов в настоящее время еще изучается, но относительно некоторых других простейших гидратов имеются уже более точные сведения, на которых мы кратко остановимся.

Таблица 5

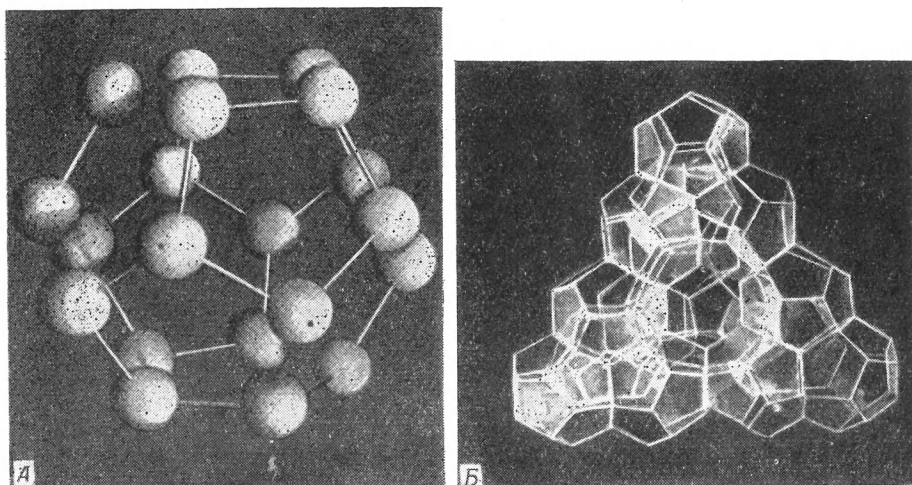
## Значения теплоты гидратации для некоторых неполярных гидратов

Неполярные молекулы	$-\Delta H^\circ$ ккал·моль <sup>-1</sup>	Неполярные молекулы	$-\Delta H^\circ$ ккал·моль <sup>-1</sup>
Ar	16,6	CH <sub>4</sub>	14,5—17
Kr	13,9—16,5	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	15
Cl <sub>2</sub>	16,0—17,7	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	15
H <sub>2</sub> S	16,5	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	15
PH <sub>3</sub>	15,0	CH <sub>3</sub> Cl	15—18,1
SO <sub>2</sub>	16,6—19,0	CH <sub>3</sub> SH	16,6

Как видно из табл. 5, кристаллогидраты могут образовывать самые разнообразные молекулы, имеющие различные химические свойства. В качестве примера можно привести неорганические инертные газы аргон и криптон, неорганический газ хлор, обладающий высокой реакционной способностью, а также органическое соединение метан (CH<sub>4</sub>). Кроме того, мы приводим значения теплоты гидратации для ацетилен и этана. Отметим, что при рассмотрении этого вопроса мы не обязаны ограничиваться только чистыми углеводородными соединениями; можно также рассматривать молекулы такого типа, как, например, метилмеркаптан. Существует множество других соединений, молекулы которых также в состоянии образовывать неполярные гидраты. Некоторые из них мы упомянем далее. Теперь же подчеркнем, что кристаллогидраты могут образовывать молекулы, обладающие самыми различными химическими свойствами.

Еще более поразительным представляется тот факт, что значения энергии гидратации для всех этих соединений практически одинаковы. Все значения, приведенные в табл. 5, отличаются на 1 или 2 ккал от 16 ккал, причем ошибка опыта составляет 1—2 ккал. Таким образом, можно прийти к заключению, что стабильность этих гидратов обусловлена не каким-либо специфическим взаимодействием неполярной молекулы с водой, а устойчивостью самой воды в присутствии этих молекул. Кристаллическая структура таких гидратов в настоящее время уже установлена [28]. На фиг. 6 схематически представлены основные результаты. Эти кристаллогидраты имеют пентагональную структуру, а не гексагональную, как в обычных кристаллах льда. Из фиг. 6 видно, что пять молекул воды, соединяясь, образуют плоский пятиугольник. Эти пятиугольники в свою очередь могут быть соединены как грани очень большого многогранника, часто додекаэдра (фиг. 6, А), а иногда и многогранника с большим числом граней (фиг. 6, Б). Такие многогранники образуют ячейки, имеющие очень много пустот. Эти кристаллогидраты были бы очень неустойчивы, если бы все ячейки были совершенно пустыми. В действительности же, когда некоторые (не обязательно все) дырки заполнены молекулами какого-либо из соединений, приведенных в табл. 5, образующиеся гидраты очень устойчивы. Практически они

настолько устойчивы, что плавления многих из них не происходит до тех пор, пока температура не достигнет примерно  $30^{\circ}$ , т. е. будет значительно выше, чем точка плавления обычного льда.



Фиг. 6.

А — модель пентагонального додекаэдра, образованного в гидратах неполярных молекул. Каждый шар представляет собой молекулу воды; Б — сложный многогранник, образующий протяженную решетку в гидратах неполярных молекул.

Таким образом, мы видим, что наличие неполярных молекул в воде приводит к упорядоченному расположению вокруг них молекул воды с образованием пентагональной полукристаллической структуры. Исходя из этих данных, рассмотрим теперь процессы гидратации белковых макромолекул.

### Белки

Начнем со сравнения (табл. 6) некоторых гидратобразующих молекул, в состав которых входят группы, встречающиеся в белковых молекулах в качестве боковых цепей. Как показано в табл. 7, молекула  $\text{CH}_4$  образует кристаллогидрат; ей соответствует боковая цепь с  $\text{CH}_3$ -группой в аланиновом остатке белка. Такое же соответствие наблюдается между молекулами пропана и боковыми цепями валина и молекулами изобутана и боковыми цепями лейцина. Для того чтобы не создавалось впечатления, что проводимое нами рассмотрение справедливо только для углеводородных остатков, отметим, что гидратобразующим молекулам  $\text{CH}_3\text{—SH}$  или  $\text{CH}_3\text{—S—CH}_3$  соответствуют цистеиновые и метиониновые боковые цепи белков.

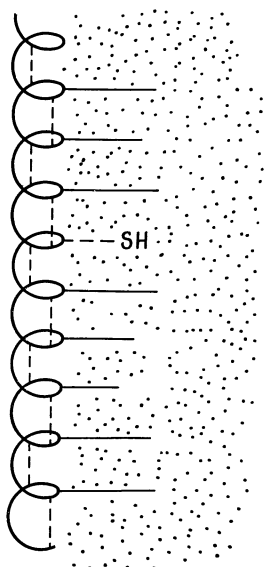
Имея в виду, что в молекулах белков имеются такие боковые цепи и что они расположены бок о бок, покажем схематически (фиг. 7), чего можно ожидать, если каждая из этих боковых цепей способствует образованию стабильной кристаллической структуры воды. На фиг. 7 изображена белковая спираль с несколькими внутримолекулярными водородными связями и с выступающими вправо боковыми цепями. Если все эти цепи неполярны, то наши предыдущие рассуждения позволяют ожидать, что в строении окружающего гидратного слоя удастся обнаружить определенную упо-

Т а б л и ц а 6

## Сравнение моделей гидратов с аминокислотными остатками

Некоторые молекулы, образующие кристаллогидраты	Некоторые боковые группы аминокислот
$  \begin{array}{c}  \text{CH}_4 \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3-\text{CH} \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3-\text{SH} \\    \\  \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_3 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_5  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  -\text{CH}_3 \text{ (Аланин)} \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{CH} \text{ (Валин)} \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{CH}_2-\text{CH} \text{ (Лейцин)} \\    \\  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{CH}_2-\text{SH} \text{ (Цистеин)} \\    \\  -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \text{ (Метионин)} \\    \\  -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \text{ (Фенилаланин)}  \end{array}  $

рядочность. Более того, в растворах белковых молекул будет, по-видимому, происходить кооперативное взаимодействие прилегающих друг к другу



Фиг. 7. Схема образования гидротактоидов вокруг неполярных групп макромолекул белка.

и, следовательно, уменьшать стабилизирующее действие, обусловленное присутствием неполярных групп.

Такое представление дает возможность объяснить различного рода «маскирующие» эффекты, обнаруженные в белках. Предположим, что одна из боковых цепей содержит (как это показано на фиг. 7) неполярную

боковых цепей, так что граница упорядоченного гидратного слоя будет распространяться на некоторое расстояние от поверхности белковой молекулы. Во всяком случае, можно ожидать усиления кристалличности гидратных слоев. Исходя из этих соображений [17, 18], можно, по-видимому, считать, что это стабилизирующее действие белков в какой-то степени обусловлено стабилизирующим действием неполярных гидратов, т. е. обязано своим происхождением просто «кристаллизации» воды. Мы связываем наличие стабилизации неполярных связей в этих макромолекулах с образованием кристаллогидратов на боковых цепях белка (*гидротактоидов*), подобных тем неполярным гидратам, которые обнаружены для обычных молекул.

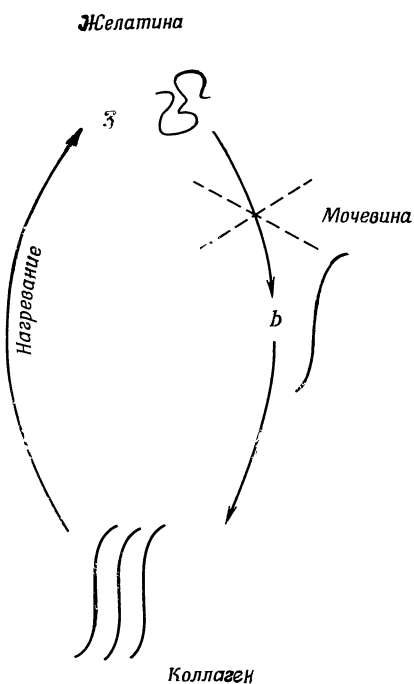
На основе вышесказанного можно объяснить обычный эффект тепловой денатурации белков. Мы считаем, что повышение температуры вызывает нарушение структуры, или плавление *гидротактоидов*. Равным образом денатурирующее действие мочевины можно объяснить ее способностью разрушать решетку гидратов. Независимо от того, может ли мочевина разрывать водородные связи внутри спирали, она всегда способна образовывать водородные связи с молекулами воды. Именно поэтому она будет разрушать решетки гидратов

SH-группу, расположенную между другими неполярными группами. Все эти группы могут образовывать гидраты, т. е. кристаллические структуры из молекул воды вокруг этого участка молекулы белка. Говоря о «маскировке» мы, по существу, имеем в виду в данном случае, например, то, что SH-группа не может быстро вступить в реакцию с обычным применяющимся для определения меркаптана агентом, например серебром. Очевидно, иону серебра значительно труднее проникнуть к SH-группе, если гидратный слой вокруг этой группы имеет упорядоченную структуру, чем если бы SH-группа входила просто в состав меркаптана, не присоединенного к белковой молекуле. Подобным же образом можно объяснить, почему присутствие мочевины снимает такие маскирующие эффекты. Мочевина разрушает структуру гидратов, и это приводит к возрастанию подвижности иона серебра. Как отмечалось ранее, подвижность одновалентных ионов, например иона лития, в кристаллах льда значительно меньше, чем в воде. Поэтому можно предположить, что подвижность иона серебра в жидкой воде гораздо больше его подвижности во льду. Тогда маскирующее действие сведется к тому, что ион серебра практически не может пройти через структуру гидротактоида.

Аналогичные явления маскировки были обнаружены на искусственно введенных боковых цепях. Например, кислотно-основные свойства  $N(CH_3)_2$ -группы в неполярной молекуле, присоединенной к белку, существенно отличаются от свойств этой молекулы, не присоединенной к молекуле белка [18], причем сдвиг в величине рК будет указывать на маскировку этой группы. В этом случае

очень трудно применить обычную интерпретацию явления маскировки групп в нативных белках, основанную на представлении о такой деформации белка, при которой стерически блокируется подход к этим группам, ибо боковая цепь с искусственно введенной группой присоединяется к белку значительно позже того момента, когда биосинтез уже завершен.

В поведении и свойствах белков имеется много особенностей, которые дают основания полагать, что вода играет весьма существенную роль в поддержании белковых структур [17]. Я хочу кратко остановиться лишь на экспериментальных результатах [15], касающихся превращений коллагена в желатину и обратно. Этот процесс изображен схематически на фиг. 8. Известно, что молекула коллагена состоит из трех спиральных нитей, имеющих структуру сильно вытянутых полипролиновых спиралей (а не  $\alpha$ -спиралей). Общая структура коллагена благодаря наличию трех таких нитей является очень жесткой. При нагревании до температуры порядка  $45^\circ$  эти три нити разделяются и, как показано на фиг. 8, коллаген превращается в желатину. После разделения каждая из спиральных нитей превращается по существу в статистический клубок. Желатина в свою очередь



Фиг. 8. Схема превращения коллаген  $\rightleftharpoons$  желатина.

может быть превращена снова в коллаген, причем такой переход происходит через ряд стадий, которые мы здесь рассматривать не будем. Остановимся лишь на одной стадии этого превращения, отмеченной на схеме буквой *b*. Есть основания полагать, что на этой стадии происходит восстановление полипролиновой спирали. Однако если концентрация желатины достаточно мала, то спирали не соединяются между собой, и, следовательно, макромолекула коллагена не образуется. Как уже говорилось, спирали этого типа вытянуты, т. е. имеют структуру, не допускающую образования водородных связей внутри молекулы. Иначе говоря, в такой спирали нет стабилизирующих внутримолекулярных водородных связей. Частично это обусловлено геометрической конфигурацией спирали, а частично тем, что молекула коллагена и желатины содержит большое число пролиновых остатков, лишенных NH-групп, которые способны образовывать водородную связь. Несмотря на отсутствие водородных связей внутри макромолекулы, структура которой соответствует жесткой спирали полипролинового типа, было обнаружено [15], что образование спирали на стадии *b* может быть заторможено или предотвращено добавлением мочевины. Действие мочевины нельзя объяснить разрывом водородных связей NH...O=C внутри единичной спиральной нити, потому что таких связей не существует. Тем не менее мочевина должна каким-то образом влиять на этот процесс. Наиболее резонно предположить, что она нарушает структуру гидратного слоя, стабилизирующего структуру этих нитей. Было показано [15], что молекула воды создает мостик между двумя C=O группами внутри макромолекулы, т. е. между смежными карбонильными группами в спирали. Мне кажется, что стабилизация спирали обусловлена способностью некоторых неполярных групп вызывать образование сходных с кристаллами льда решеток в окружающем гидратном слое. Во всяком случае, совершенно очевидно, что вода участвует в образовании специфической структуры, характерной для макромолекулы коллагена; другими словами, вода играет существенную роль в стабилизации структуры молекул белков.

### Ткани

Рассмотрим некоторые вопросы, связанные с явлением гидратации в тканях. Имеющиеся в этой области данные не слишком многочисленны. Взяв в качестве примера сухожилие хвоста крысы, состоящее в основном из коллагена, мы можем указать на некоторые результаты, полученные недавно Берендсеном [3] методом ядерного магнитного резонанса. Нам нет необходимости подробно останавливаться на теории этого метода; отметим здесь лишь его основной принцип. Ядра водорода обладают магнитным моментом. Поэтому молекулы, содержащие в своем составе водород, будут взаимодействовать с магнитным полем и, следовательно, поглощать электромагнитное излучение определенной частоты. С помощью обычной стандартной аппаратуры было найдено, что частота равна примерно 40 мГц. Отметим, что природа наблюдаемого сигнала весьма сильно зависит от наличия у атома водорода вращательных степеней свободы. Если атом водорода входит в состав достаточно подвижной молекулы, то полоса поглощения будет очень узкой. Если же атом водорода связан с молекулой, частично или полностью закрепленной, то полоса значительно расширяется, а в ряде случаев удастся обнаружить в ней отчетливую тонкую структуру. Именно такую структуру Берендсен [3] обнаружил, исследуя определенным образом ориентированные образцы коллагена. Возникновение и особенности такой структуры он объяснил в основном образованием пентагональных кристаллов из молекул воды в цепях, окружающих макромолекулу коллагена. Появление

сигналов ядерного магнитного резонанса в этом случае, несомненно, связано с присутствием молекул воды, возможности вращения которых ограничены. И хотя на основании этих сигналов нельзя считать абсолютно доказанным пентагональный характер строения кристаллов, тем не менее существование определенной кристаллической структуры несомненно. Рентгенографические исследования сухожилия хвоста крысы [10] также показали, что молекулы воды в цепях, окружающих коллаген, имеют упорядоченную структуру.

Что касается других тканей, то есть уже основания полагать, что и в них также имеются закрепленные, лишенные возможности перемещаться молекулы воды. Особый интерес представляют результаты последних работ Одеблада [23, 24], в которых также использовался метод ядерного магнитного резонанса, а в качестве объектов исследования были взяты ткани глаза и слизь из влагалища. Было совершенно определенно показано, что вода в этих, а также в других тканях имеет специфическую упорядоченную структуру, хотя характер этой структуры еще не выяснен.

### НЕКОТОРЫЕ ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ И ЗАРЯДОВ

Рассмотрим вопрос о том, в какой мере все эти данные способствуют пониманию природы физиологических процессов.

Остановимся в качестве примера на последней очень интересной работе Полинга [26], в которой автор выдвигает новые идеи относительно общей теории наркоза. Полинг составил перечень некоторых анестезирующих веществ, таких, как хлороформ,  $N_2O$ ,  $CO_2$ , этилен, циклопропан, азот, аргон и ксенон, и показал, что эти вещества не могут образовывать ни прочных ковалентных, ни водородных связей и по существу (особенно аргон и ксенон) инертны с химической точки зрения. В то же время если все они являются анестезирующими средствами, то каков же механизм их действия? Единственное взаимодействие, на которое способны аргон и ксенон,— это, как уже отмечалось ранее, способность образовывать кристаллогидраты. Полинг считает, что механизм действия этих веществ в качестве общих анестезирующих агентов должен состоять в том, что они увеличивают жесткость гидратов, которые обычно образуются вокруг боковых цепей молекул белков. Взаимодействие этих агентов с боковыми цепями белков приводит к расширению областей, в которых вода находится в упорядоченном состоянии. Другими словами, он приписывает анестезирующее действие этих веществ образованию микрокристаллов гидратов в жидкостях мозга. Далее, Полинг предполагает, что боковые белковые цепи и ионы «захватываются» такими кристаллами, благодаря чему увеличивается импеданс нервной системы; это и является основой их анестезирующего действия. Исходя из приведенных в этой статье данных о механизмах переноса ионов водорода в кристаллах льда, можно предложить и другое объяснение механизма действия таких наркотических веществ. Можно думать, что это действие обусловлено образованием местных короткозамкнутых цепей, а не возрастанием импеданса системы. Однако экспериментальные и теоретические сведения, необходимые для решения этого вопроса, который является дальнейшим этапом развития теории наркоза, в настоящее время еще далеко не достаточны. Наиболее существенным в этой теории является предположение о том, что действие общих анестезирующих агентов сводится к образованию микрокристаллов в окружающих их молекулы слоях воды. Интересно, что, исходя из этой концепции, как отмечает Полинг, можно предсказать, что простое охлаждение мозга также должно приводить к наркозу, и это, по-видимому,



верно. Эта теория также позволяет предполагать, что повышение давления должно снимать анестезирующее действие, так как объем кристаллогидратов обычно больше, чем сумма объемов отдельных компонентов, составляющих кристаллогидрат. Этот эффект также широко известен в физиологии.

Я воспользовался предложенной Полингом теорией наркоза как одним из возможных примеров того, что, исходя из явления гидратации с образованием *гидротактоидов*, можно понять природу физиологических процессов. Аналогичные идеи были использованы при рассмотрении других комбинаций субстратов с биологическими макромолекулами [19]. Мне хотелось бы также набросать в общих чертах картину, необходимую для дальнейшего развития некоторых наших представлений о клеточных и субклеточных процессах и сопоставления имеющихся данных со свойствами воды. Начнем с того, что в клетках имеются достаточно обширные области, содержащие большие количества воды. Предположим далее, что гидратационная вода вокруг неполярных групп, связанных с макромолекулами, образует микрокристаллические решетки или цепи, размеры и направление которых зависят от пространственного расположения неполярных групп. Исходя из молекулярных представлений о некоторых фундаментальных биохимических и физиологических явлениях, можно предположить существование трех типов процессов проводимости, или переноса.

К первому типу относится проводимость, осуществляемая переносом  $H^+$ -иона. Как мы указывали в начале этой статьи, перенос  $H^+$ -иона в воде может осуществляться посредством «бригадного механизма» (см. фиг. 2). При этом скорость передвижения носителей заряда может достигать значительной величины и ток может распространяться по определенным направлениям в кристаллической решетке гидратов, подобной структуре кристаллов льда. Скорость движения  $H^+$ -ионов при тех разностях потенциалов, которые имеются в тканях, имеет величину порядка многих метров в секунду.

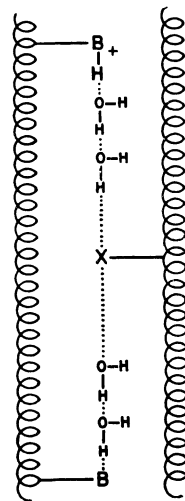
Протонная проводимость может также играть определенную роль во многих процессах, катализируемых макромолекулами ферментов. Огромное множество ферментативных превращений имеет гидролитическую природу, и сам катализ может протекать по обобщенной схеме кислотного или щелочного гидролиза [2]. Обычно предполагают, что боковые группы в белках, обладающие основными или кислотными свойствами, расположены в непосредственном соседстве с «активным центром» (X), к которому присоединяются молекулы субстрата. Как показано на фиг. 9, основные (B) и кислые (B — H) группы могут быть, вообще говоря, сильно удалены от активного центра X, что не мешает им выполнять свои функции путем передачи протона по цепи, составленной из молекул воды. Такая картина дает возможность объяснить влияние на ферментативную активность большого числа реагентов, которые могут видоизменять боковые цепи макромолекулы, причем не все из этих цепей расположены вблизи места присоединения субстрата к ферменту. Видоизменение специфических боковых групп, обладающих основными или кислотными свойствами, может привести к тому, что они не будут участвовать в процессе катализа. К таким же результатам могут привести и изменения в неполярных боковых цепях, так как именно эти цепи и определяют возможность возникновения водных мостиков между группами B или BH и активным центром X. Аналогично общее ингибирующее действие на ферментативную активность таких веществ, как мочевины, может быть следствием нарушения кристаллической структуры гидратов.

Процессы переноса в воде свободных водородных радикалов  $H\cdot$  или гидридных ионов  $H^-$  (см. фиг. 2) относятся ко второму типу явлений про-

видимости, который обеспечивает возможность протекания окислительно-восстановительных реакций в тех случаях, когда окислительный и восстановительный агенты разделены значительными расстояниями. Направление процессов окисления или восстановления зависит от общего расположения неполярных групп, вокруг которых образуются кристаллические гидраты, определяющие специфические пути переноса электронов посредством передачи свободных водородных радикалов или гидридных ионов вдоль цепей, составленных из молекул воды. Окислительно-восстановительные реакции могут протекать между группами, находящимися на довольно большом расстоянии друг от друга. Пример, приведенный на фиг. 2, представляет собой

Фиг. 9. Схематическое изображение основного или кислотного катализа реакции, идущей в активном центре фермента (X), при большом расстоянии между окислительным и восстановительным агентами.

*B* — основной остаток, *B* —  $H^+$  — кислотный остаток. Предполагается, что размеры и направление решетки кристаллогидрата определяются неполярными боковыми цепями, которые здесь не изображены.



широко распространенный случай присутствия железосодержащих пигментов в окислительном ферменте. Напомним, что окислительные ферменты (оксидазы), имеющие в своем составе медь, могут действовать подобным же образом. Атомы металлов в обоих случаях могут быть встроены внутрь структуры макромолекулы и не иметь непосредственного контакта с субстратом. Перенос электронов в этом случае будет осуществляться свободными водородными радикалами или гидридными ионами через структурированную воду. Такой механизм переноса энергии может иметь место между различными субстратами, между ферментами и субстратами или между разными ферментами в полиферментных системах, особенно в системах с фиксированными матрицами, таких, как митохондрии или хлоропласты. Аналогичный перенос энергии может иметь место и в твердой среде, в которой тепловое движение молекул ограничено. Сульфгидрильные и дисульфидные группы (фиг. 2) также могут принимать участие в подобном механизме переноса электронов, причем совершенно не обязательно, чтобы они были расположены непосредственно в тех участках, где образуется связь фермента с субстратом.

Процессы переноса второго типа дают возможность интерпретировать многие явления, протекающие в белках под действием света, при которых, по-видимому, имеет место перенос энергии на значительные расстояния. Например, в случае комплекса, образуемого между CO и железом миоглобина, спектр действия для выделения группы CO показывает, что электромагнитная энергия, поглощенная аминокислотными остатками в молекуле белка, может оказывать воздействие на пространственно удаленную от них

группу гема [5]. Поглощение энергии может приводить к образованию свободного радикала (в молекулах, отличных от миоглобина) путем симметричного разрыва связи S—S. В частности, возможно выделение свободного водородного радикала из тирозина или ароматических соединений. В соответствии с этим действительно удается наблюдать, что окисление железосодержащего гема происходит за счет переноса электрона, который осуществляется посредством передачи H· через молекулу воды, связанную с атомом Fe, к удаленному свободному радикалу, образующему в свою очередь прочную связь со свободным водородным радикалом. В связи с изложенным важно отметить, что соединения, имеющие связи S—S, так же как и ароматические аминокислотные остатки, поглощают в ультрафиолетовой области спектра при длине волны около 250 мк [11], и, кроме того, энергия, соответствующая этой спектральной области, может приводить к диссоциации дисульфидов и к образованию свободных радикалов — S· [27].

Можно, наконец, представить себе и третий механизм проводимости, посредством которого гидротактоиды могут влиять на движение заряженных частиц и, стало быть, на ряд важных физиологических явлений. Как было показано в табл. 1, подвижность одновалентного катиона, например лития, очень сильно зависит от того, в каком состоянии находится вода. В жидкой воде  $Li^+$  движется быстро, а во льду — очень медленно. Хотя экспериментальных данных относительно подвижности иона  $Na^+$  еще нет, однако вполне резонно предположить, что он ведет себя аналогично иону  $Li^+$ . Естественно возникает вопрос о том, не связаны ли поразительные изменения проницаемости нервной мембраны по отношению к иону  $Na^+$  с переходами гидратной воды из твердого состояния в жидкое. Если в нерве, находящемся в состоянии покоя, вода в мембране имеет структуру, подобную структуре кристаллов льда, то проницаемость мембраны для иона  $Na^+$  будет очень низкой. Когда же гидратная вода переходит в жидкое состояние, то подвижность иона  $Na^+$  возрастает в  $10^5$ — $10^6$  раз. После прохождения нервного импульса первоначальное состояние восстанавливается за время порядка микросекунд, на что указывают значения длительности существования этих состояний, приведенные в табл. 5.

Соображения, приведенные в этом разделе, являются главным образом гипотетическими, и я совершенно не собираюсь выяснять, какие из этих догадок реальны и какие — нет. Мне только хотелось отметить, особенно в связи с обсуждением вопроса о гидратации тканей, что мы имеем модель, на основе которой открываются широкие возможности для объяснения различных физиологических явлений и процессов.

Основная цель данной работы заключалась в попытке подчеркнуть тот факт, что вода обладает на молекулярном уровне рядом очень интересных и уникальных свойств. На эти свойства существенно влияют растворенные в воде вещества. И если мы вспомним, что биологические ткани содержат в своем составе примерно 80—90% воды, то кажется вполне правдоподобным, что физиологическое поведение может отражать молекулярные особенности не только растворенного вещества, но в равной степени и молекул растворителя.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Barltrop J. A., Hayes P. M., Calvin M., J. Am. Chem. Soc., 76 4348 (1954).
2. Bender M., Chem. Revs., 60, 53 (1960).
3. Berendsen H. J. C., Biol. Bull., 119, 237 (1960).

4. Bernal J. D., Fowler R. H., *J. Chem. Phys.*, **1**, 515 (1933).
5. Bücher T., Kaspers J., *Biochim. et Biophys. Acta*, **1**, 21 (1947).
6. Connick R. E., Poulson R. E., *J. Chem. Phys.*, **30**, 759 (1959).
7. Conway B. E., «*Electrochemical Data*», p. 132, Elsevier, Houston, Texas, 1952.
8. Dodson R. W., *J. Phys. Chem.*, **56**, 852 (1952).
9. Eigen M., De Maeyer L., *Proc. Roy. Soc.*, **A247**, 505 (1958).
10. Есипова Н. Г., Андреева Н. С., Гатовская Т. В., *Биофизика (СССР)*, **3**, 505 (1958).
11. Frank H. S., *Proc. Roy. Soc.*, **A247**, 481 (1958).
12. Frank H. S., Wen W. Y., *Discussions Faraday Soc.*, **24**, 133 (1957).
13. Gränicher H., *Proc. Roy. Soc.*, **A247**, 453 (1958).
14. Harned H. S., Owen B. B., «*The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions*», 3rd ed. Reinhold New York, 1958.
15. Harrington W. F., von Hippel P. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 100 (1961).
16. Jackson J. A., Lemons J. F., Taube H., *J. Chem. Phys.*, **32**, 553 (1960).
17. Klotz I. M., *Science*, **128**, 815 (1958).
18. Klotz I. M., *Brookhaven Symposia in Biol.*, **13**, 25 (1960).
19. Klotz I. M., Luborsky S. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5119 (1959).
20. Klotz I. M., Ayers J., Ho J. Y. C., Horowitz M. G., Heiney R. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2132 (1958).
21. Lonsdale K., *Proc. Roy. Soc.*, **A247**, 424 (1958).
22. Morgan J., Warren B. E., *J. Chem. Phys.*, **6**, 666 (1938).
23. Odeblad E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **83**, 189 (1959).
24. Odeblad E., *Nature*, **188**, 579 (1960).
25. Pauling L., In «*Hydrogen Bonding*» (D. Hadzi, ed.), p. I, Pergamon Press, New York, 1959.
26. Pauling L., *Science*, **134**, 15 (1961).
27. Russell K. E., Tobolsky A. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 395 (1954).
28. Stackelberg M. V., Müller H. R., *Z. Electrochem.*, **58**, 25 (1954).
29. Wäng J. H., Robinson C. V., Edelman I. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 466 (1953).

# ОТ КВАНТОВОЙ ХИМИИ К КВАНТОВОЙ БИОХИМИИ

А. ПЮЛЬМАН, Б. ПЮЛЬМАН

«Я не сомневаюсь, что наступившее столетие будет свидетелем глубокой революции, развития биологии и становления квантово-механической биохимии» (Сцент-Дьёрдьи [55]).

## ПЕРСПЕКТИВЫ КВАНТОВОЙ БИОХИМИИ

Если с точки зрения истории квантовая химия является очень молодой наукой, то с общечеловеческой точки зрения эта наука вполне установившаяся и созревшая. Развитие квантовой химии имело огромное, а часто и решающее значение для понимания природы химических связей, электронной структуры молекул и зависимости молекулярных свойств от характерных особенностей этой структуры.

В последние годы значительно расширилась сфера применения квантовой химии, и в настоящее время наблюдается глубокое проникновение идей и методов этой науки в биохимию. Действительно, квантовая биохимия быстро развивается и формируется как очень важное и самостоятельное направление в одной из существеннейших областей современной науки — в молекулярной биологии.

Квантовая биохимия! Простое сочетание этих двух слов, из которых одно выражает связь со сложнейшими принципами абстрактной математики, а другое — со сложнейшими явлениями жизни, кажется смелым, а для некоторых людей даже слишком смелым. Квантовая биохимия, как и любая новая отрасль науки, неизбежно встречает противодействие, и это вполне закономерно. В сущности, многие возражения, высказываемые в настоящее время против применения идей и методов квантовой механики для решения биологических проблем, это те самые возражения, которые приводились в свое время против применения этих идей и методов для решения химических проблем. Справедливо следующее высказывание, несмотря на его двадцатипятилетнюю давность: «Чтобы испытывать удовлетворение, нужно быть в значительно большей мере оптимистом, чем пессимистом. Пессимист требует последовательно развивающейся из строгих постулатов теории и расчетов, сделанных без всяких приближений и не опирающихся на эмпирически установленные факты. Оптимист же удовлетворяется приближенным решением волнового уравнения... Он свободно прибегает к эксперименту для определения констант, непосредственный расчет которых был бы слишком сложен. Пессимист, напротив, вечно предается сомнениям по поводу допущенных при расчете приближений, исключающих возможность претендовать на строгость результатов. Оптимист утверждает, что приближенные расчеты дают все же правильный «курс» и позволяют составить правильное представление о том, «как это происходит». Кроме того, по мнению оптимиста, такие расчеты позволяют систематизировать и понять огромный экспериментальный материал, который иначе оставался бы нагромо-

ждением экспериментальных данных и систематизировался бы только на основании эмпирических правил валентности» [59]. Успешное развитие квантовой химии показывает, что оптимисты были правы. В науке оптимисты, по-видимому, всегда оказываются правы и прогресс в конечном счете превосходит все ожидания.

Быть оптимистом — это, конечно, не значит недооценивать трудности, возникающие при становлении квантовой биохимии, особенно в начале ее становления. Эти трудности, разумеется, существуют, и в первую очередь они имеют чисто технический характер, что связано с применением слишком упрощенных методов квантовой химии для изучения очень сложных биологических объектов. Есть также трудности общего характера, состоящие в том, что квантовая биохимия требует знания разнообразных сведений из целого ряда других сложных областей науки, и, естественно, совсем не просто найти человека, который обладал бы всеми этими знаниями. Ответом на эти проблемы, по всей вероятности, может служить следующее высказывание:

«Наблюдается проникновение методов квантовой химии в область биологических проблем... Можно сказать достаточно определенно только одно: идеи и методы волновой механики будут все больше и больше применяться в этой волнующей области человеческих знаний... Однако сама работа почти неизбежно будет неточной, или, как теперь принято говорить, полуэмпирической. Пессимисты будут в ужасе воздевать руки при попытках, например, оценить электростатические силы в макроэргических фосфатных связях; даже оптимисты будут с недоверием относиться к полному пренебрежению многими членами и интегралами, которые заведомо велики. Но при установлении корреляции и создании простейших моделей, на основе которых может быть достигнуто понимание тех или иных явлений, нельзя быть чрезмерно поспешными. Тернистый путь через джунгли предшествует строительству первоклассной дороги. Имеется очень большой экспериментальный материал, накопленный самими биологами, который можно связать с теми глубокими интерпретациями биологических явлений, которые дает квантовая теория. При этом в выигрыше окажутся обе стороны: и биология и квантовая механика. Однако на самом деле все это не так просто. Биологические системы несравненно сложнее и многообразнее химических систем, создаваемых в лабораторных условиях. Перспективы в этой области безграничны, вплоть до понимания и регулирования самой жизни. Но, как было впервые сказано при нескольких иных обстоятельствах, «труден только первый шаг»; и вряд ли удастся найти разумного человека, который стал бы утверждать, что в этой области человеческих знаний квантовая химия не может внести ничего ценного» [8].

«Передовой фронт науки в настоящее время находится на стыке многих «старых» наук и исследователь, который хочет с успехом работать, должен изучить много различных областей науки, овладеть многими смежными специальностями и смело применять знания, накопленные в результате изучения многих отраслей науки, для решения конкретной проблемы в данной области. Тот человек, который «прикован к своему прошлому» и все более и более специализируется в очень узкой области, потерян для науки. Глубочайшие проблемы жизни и света раскроются только перед тем, кто изучает их во взаимосвязи» [16].

«Неизвестное дает лишь очень ненадежные точки опоры. Я совершенно не сомневаюсь в том, что Творец должен был блестяще знать волновую механику и физику твердого тела и не менее умело применять их. Совершенно очевидно, что, создавая жизнь, он не ограничивал себя молекуляр-

ным уровнем для того лишь, чтобы сделать ее восприятие более простым для биохимиков.

...В настоящее время очень мало специалистов, которые одинаково хорошо знают и биологию и квантовую механику. Может быть, их никогда и не будет очень много, так как и человеческая жизнь и возможности человеческого мозга ограничены. Каждая из этих областей науки требует полной отдачи всех умственных способностей и всего времени ученого, поэтому, по крайней мере в настоящее время, для развития сочетания этих наук, т. е. квантовой биохимии, необходима своего рода гибридизация [56].

Можно также привести и иной ответ Сцент-Дьёрдьи [57]: «Что касается меня лично, то я люблю только фундаментальные проблемы и могу охарактеризовать свою собственную исследовательскую деятельность следующим образом: когда я обосновался в Вудс-Холе и начал заниматься рыбной ловлей, я всегда использовал самый большой крючок. Я вовсе не был убежден, что непременно что-нибудь поймаю, но, во всяком случае, гораздо менее обидно не поймать большую рыбу, чем не поймать маленькую». Те, кто видел Сцент-Дьёрдьи за «рыбной ловлей» в Вудс-Холе, знают, что на самом деле он выудил немало крупных рыбин.

Применение методов квантовой механики к решению биохимических проблем выдвигает прежде всего два основных вопроса: 1) какой метод квантовой химии окажется наилучшим для решения биохимических задач и 2) каковы основные проблемы биохимии, которые а priori могут быть лучше всего решены с позиций квантовой механики?

## МЕТОД КВАНТОВОЙ БИОХИМИИ

### Выбор метода

Квантовая химия дает нам два фундаментальных метода, с помощью которых могут быть изучены электронные структуры молекул: *метод валентных связей*, упрощенный качественный вариант которого обычно называют теорией резонанса, и *метод молекулярных орбит*. Оба эти метода представляют собой приближенные процедуры получения приближенных решений уравнения Шредингера для молекул. Это уравнение является основным в квантовой теории, и его решение дает нам значения энергии электронных уровней и распределение электронного облака в химических системах. При этом необходимы определенные приближения, так как мы в настоящее время не в состоянии найти строгое решение уравнения Шредингера для любой атомной или молекулярной системы, за исключением самых простых случаев.

Оба эти метода дали блестящие результаты в области органической химии. В частности, теория резонанса оказала огромное влияние на развитие наших представлений об электронной структуре молекул и на распространение среди химиков-органиков этих идей благодаря своей доступной нематематической форме и постоянному использованию понятий, хорошо знакомых химикам. Чисто качественное толкование этой теории несколько не снижает ее ценности и значения, хотя иной раз является серьезной помехой и приводит к серьезным ошибкам.

На первый взгляд может показаться, что метод валентных связей является более перспективным с точки зрения использования принципов квантовой механики для решения биохимических проблем. Однако более тщательное рассмотрение основных принципов этого метода, даже без детального исследования его математических вкладок, довольно быстро

приводит к заключению, что в действительности он слишком сложен для того, чтобы его можно было реально использовать для изучения структуры биохимических соединений. Рассмотрим, например, случай сопряженных (резонирующих) молекул, которые, как известно, являются наилучшим объектом для изучения с помощью этого метода и исследование которых с позиций классической химии оказалось совершенно невозможным. В молекулах такого типа, классическим примером которых служит бензол, нас особенно интересует поведение и свойства подвижных  $\pi$ -электронов, образующих двойные связи в химических соединениях. Это объясняется тем, что эти электроны играют исключительно важную роль, так как именно с ними связано большое число основных химических, физико-химических и биохимических свойств молекул. Электроны так называемых одинарных связей ( $\sigma$ -электроны) образуют жесткий молекулярный скелет, относительно которого движутся  $\pi$ -электроны. В настоящее время хорошо известно, что обычные химические формулы не позволяют построить полную картину действительного распределения  $\pi$ -электронов. Основу метода валентных связей составляет тот принцип, что более или менее удовлетворительное описание этого распределения требует одновременного учета ряда структур, связанных с молекулами данного типа и отличающихся друг от друга только распределением подвижных  $\pi$ -электронов (например, в случае молекулы бензола — одновременного учета двух известных структур Кекуле и трех структур Дьюара). Ни одна из этих формул в отдельности не имеет физического смысла; только их мысленная суперпозиция может дать правильную картину истинной молекулярной структуры.

В квантовой механике при описании подобных ситуаций исходят из представления, что истинная волновая функция системы (т. е. математическая функция, дающая истинное распределение электронов в системе) есть линейная комбинация волновых функций, соответствующих различным возможным классическим структурам данного соединения (т. е. комбинация математических функций, которые переводят на язык квантовой механики распределение  $\pi$ -электронов в каждой отдельной структуре). В методе валентных связей используется обычный квантовомеханический расчет сложной истинной волновой функции<sup>1</sup> при помощи волновых функций, соответствующих отдельным фрагментам данной химической формулы. Этот расчет сводится к решению определителя, порядок которого равен числу структур в каноническом наборе, соответствующем данному соединению. В случае бензола таких компонентов пять и определитель пятого порядка может быть легко решен. *К несчастью, порядок определителя очень сильно возрастает по мере увеличения размера молекулы.* Так, канонический набор для нафталина содержит уже 42 структуры, а для антрацена — 429!

Таким образом, для решения задачи для нафталина необходимо раскрыть определитель 42-го порядка, а для антрацена — определитель 429-го порядка. Даже в тех случаях, когда расчеты упрощаются благодаря наличию в молекуле высокой симметрии, задача все еще остается необычайно сложной. Даже молекулы простейших биохимических соединений часто имеют тот же размер, что и молекулы этих углеводов; кроме того, дело осложняется тем, что биохимические молекулы, как правило, несимметричны. Поэтому совершенно очевидно, что исследование таких соединений с помощью метода валентных связей практически невозможно.

<sup>1</sup> Эта «истинная» волновая функция фактически будет ближе или дальше от «истинной» в зависимости от точности тех приближений, которые были сделаны при расчете. За исключением нескольких редких случаев, она практически никогда не будет истинной.



В действительности дело обстоит еще хуже, так как имеется ряд *ионных* структур, которые также должны быть учтены при расчете. К несчастью, уже само число ионных структур (170 для бензола!) делает невозможным их учет. Более того, при учете ионных структур возникают очень большие математические трудности. Это создает большие трудности при использовании метода валентных связей для исследования электронных структур биохимических соединений. Так, хотя ионные формы, несмотря на их огромное число, по-видимому, не оказывают существенного влияния на структуру *основного состояния* сопряженных углеводородов и могут поэтому быть исключены из расчета структур этих молекул, совершенно очевидно, что ситуация в корне изменяется для гетероциклических или замещенных производных углеводородов или, в более широком смысле слова, для любых гетероциклических соединений. В таких молекулах вклад ионных структур в общую волновую функцию системы может быть очень велик, а значение этих структур в определении свойств системы — доминирующим. Далее, если не учитывать некоторые каротиноиды, которые являются типичными представителями углеводородных сопряженных систем (хотя даже эти системы содержат метильные группы, которые либо вообще не учитываются при расчете, либо учитываются так же, как и у любых других заместителей), все основные биохимические соединения с сопряженными связями представляют собой гетеросоединения, содержащие ряд различных атомов, и, следовательно, ионные структуры играют в них очень важную роль. Таким образом, если исходить только из упомянутых математических трудностей (хотя, вообще говоря, имеется и ряд других), то метод валентных связей оказывается совершенно неприемлемым для количественного исследования электронных структур биохимических соединений. Можно также показать (вероятно, многие читатели знают это по собственному опыту), что качественный вариант метода — теория резонанса — слишком грубый и слишком сомнительный метод, чтобы его можно было практически использовать для решения биохимических задач.

Следовательно, мы должны обратиться ко второму фундаментальному методу квантовой химии — методу молекулярных орбит. И основной вопрос заключается в том, может ли этот метод оказаться более пригодным для решения биохимических проблем. На первый взгляд метод молекулярных орбит очень сложен для биохимиков, так как по существу он представляет собой чисто математический метод, в котором нельзя получить никаких данных без расчетов. При этом нельзя даже применять классические структурные формулы, которыми мы обычно пользуемся. Обескураживающие перспективы для метода, претендующего на успех в исследовании молекулярных структур!

Однако известно, что те же возражения возникали во многих областях органической химии, где этот метод дал тем не менее блестящие результаты, и очень нетрудно понять, что такие же успехи могут быть достигнуты с его помощью в решении биохимических проблем. Этот метод имеет некоторые специфические особенности, позволяющие использовать его при исследовании биохимических структур. Прежде всего это возможность его количественного применения для расчета очень больших молекул без каких-либо дополнительных трудностей и простота его математического аппарата, что дает возможность любому биохимику, обладающему средними математическими познаниями, легко понять его принципы, метод расчета и значение его результатов, а после небольшой тренировки *самостоятельно использовать его для исследования многих проблем.*

В чем заключается основной принцип метода? Рассмотрим снова молекулы с сопряженными связями. Как и теория валентных связей, метод молекулярных орбит стремится дать правильное описание распределения  $\pi$ -электронов в таких молекулах. Однако в первом методе делается попытка получить эти данные, исходя из суперпозиции волновых функций воображаемых структур, тогда как метод молекулярных орбит пытается достигнуть тех же результатов путем изучения каждого  $\pi$ -электрона в отдельности в поле остальных электронов и ядра. После того как имеется надлежащее описание каждого  $\pi$ -электрона молекулы (его молекулярная волновая функция, или *молекулярная орбита*), получают описание полной молекулярной системы, «суммируя»<sup>1</sup> волновые функции всех электронов.

Такой подход к решению проблем обуславливает возможности широкого применения этого метода и его сравнительную простоту. Окончательный расчет состоит в решении соответствующего определителя, но порядок этого определителя ниже, чем в методе валентных связей. В методе молекулярных орбит порядок матрицы, которая должна быть решена для системы сопряженных связей, равен числу  $\pi$ -электронов системы (а в случае соединений, содержащих атомы с неспаренными электронами, — числу атомов, несущих  $\pi$ -электроны). Таким образом, для бензола порядок определителя равен 6, для нафталина — 10, а для антрацена — 14. Эти матрицы гораздо проще тех громадных определителей, с которыми приходится работать в методе валентных связей; более того, в методе молекулярных орбит сами матричные элементы значительно менее сложны, чем в методе валентных связей. Это вполне естественно, так как в первом методе каждый матричный элемент соответствует одноэлектронной волновой функции, тогда как во втором — многоэлектронной волновой функции, характеризующей некоторую химическую структуру. Благодаря низкому порядку получающихся определителей метод молекулярных орбит позволяет рассчитать в одном и том же приближении широкий круг разнообразных соединений.

Таким образом, метод молекулярных орбит уже в принципе обладает огромными преимуществами, что создает предпосылку его широкого использования для решения биохимических задач. Вместе с тем этот метод, как и все приближенные методы, допускает ряд последовательных уточнений. Это, в частности, полуэмпирическое допущение о линейной комбинации атомных орбит (ЛКАО), приближение, связанное с принятием самосогласованного поля молекулярных орбит, приближение, связанное с наложением различных конфигураций, и т. п. Хотя в основе всех этих приближений лежит один и тот же принцип, тем не менее они существенно отличаются друг от друга как с точки зрения техники проведения математических расчетов, так и в отношении влияния на точность окончательных результатов. Вполне естественно, что они не в одинаковой степени усложняют проведение расчетов. Использование высоких степеней приближения приводит к сложным математическим расчетам, которые могут быть выполнены только высококвалифицированным специалистом в области квантовой механики. В противоположность этому при простом принятии линейной комбинации атомных орбит расчеты могут быть проведены химиком, обладающим только общей математической подготовкой. К счастью, оказалось, что подавляющее большинство основных биохимических структур и задач можно вполне удовлетворительно решить с помощью простого полуэмпирического допущения о линейной комбинации атомных орбит. Дальнейшие

<sup>1</sup> Выражение «суммирование» взято в кавычки, так как во многих случаях математическая процедура значительно сложнее, чем простое суммирование.

приближения, конечно, всегда полезны и желательны, однако при решении многих проблем основные результаты можно получить, используя простое приближение, и лишь в некоторых частных случаях для получения необходимых результатов уже на первых этапах расчета нужно использовать более высокие приближения. Таким образом, можно сказать, что *метод молекулярных орбит, и в частности его полуэмпирическое приближение допущения линейной комбинации атомных орбит, является в настоящее время вполне доступным и в то же время достаточно корректным для предварительного исследования электронных аспектов биохимии*. Его можно рассматривать как специфический квантовомеханический метод для биохимии.

### Возможности метода

После того как выбор метода уже сделан, необходимо оценить его возможности. Какую информацию дает этот метод и какие выводы можно сделать на основании результатов, полученных с его помощью? Подробный ответ на этот вопрос должен быть либо слишком длинным, либо содержащий описание всей области квантовой химии (см. [7, 23, 39]). Здесь достаточно сказать, что метод позволяет рассчитать величины энергии и плотность электронного распределения в молекуле, а также в содержащихся в ней атомах или группах атомов. Это дает возможность определить расположение тех мест в молекуле, в которых та или иная молекулярная характеристика наиболее существенна. Показатели плотности электронного распределения определяют основные химические, физико-химические и биохимические свойства молекул и, таким образом, обеспечивают возможность глубокого понимания и детального объяснения их структуры, поведения и функции.

Различные возможности метода и корреляции между рассчитанными показателями и наблюдаемыми характеристиками молекул представлены более подробно, хотя и весьма схематично, в табл. 1.

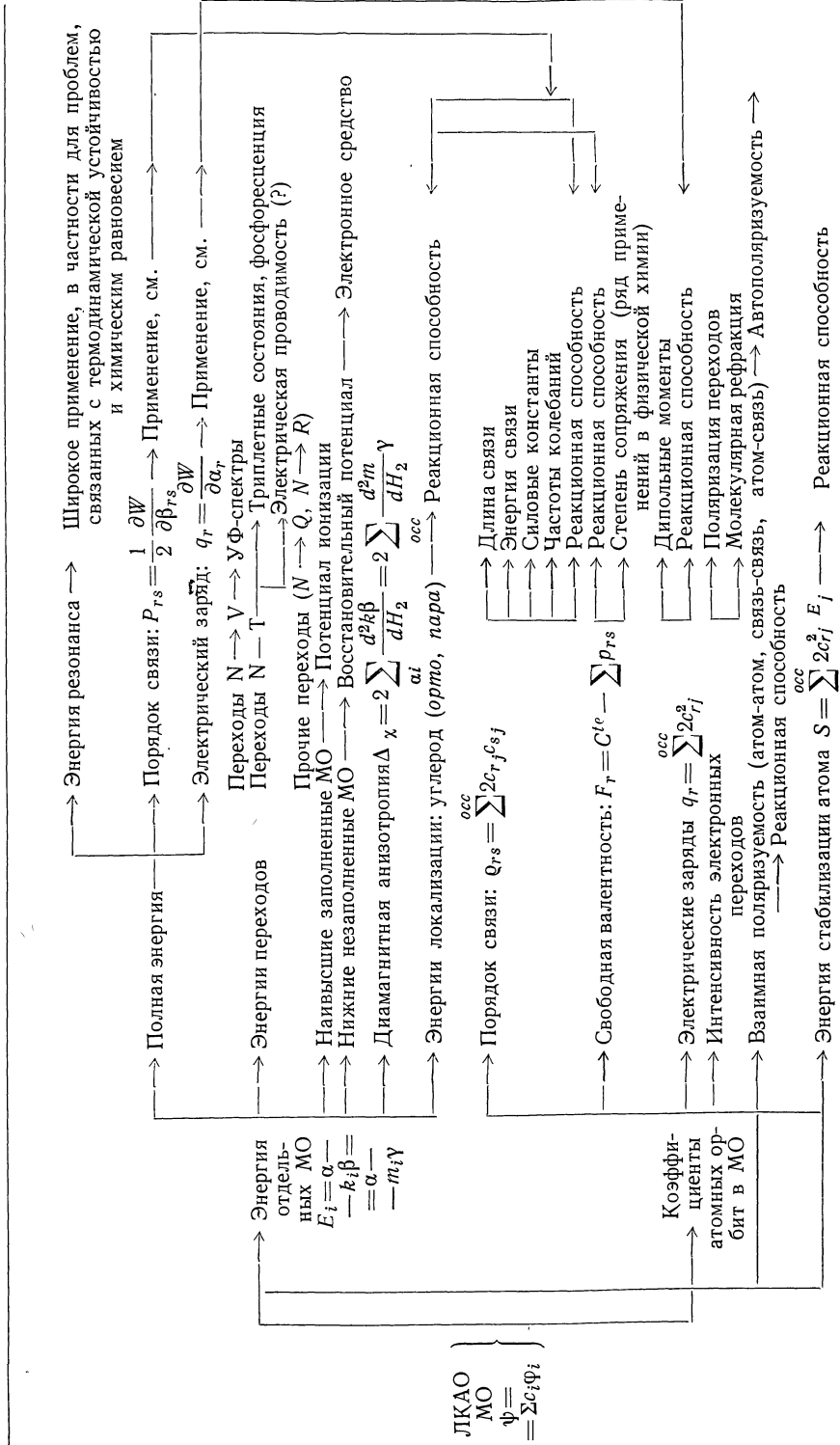
По поводу табл. 1 можно сделать несколько замечаний. Две основные величины, полученные в результате расчетов,— это значения энергии отдельных молекулярных орбит (МО) и коэффициенты атомных орбит, входящих в различные молекулярные орбиты.

Знание энергий отдельных молекулярных орбит дает возможность определить полную энергию подвижных электронов, а эта величина приводит непосредственно к хорошо известной *энергии резонанса*, характеризующей увеличение стабильности молекулы, обусловленное делокализацией  $\pi$ -электронов. Возможности использования энергии резонанса безграничны, особенно в тех проблемах, которые затрагивают вопросы химического равновесия (т. е. таутомерия, окислительно-восстановительные потенциалы обратимых систем, кислотные и основные свойства). Другие важные структурные характеристики молекул с сопряженными связями, такие, как *порядок связи* или *электрический заряд*, также непосредственно связаны с величиной полной энергии. Знание энергии отдельных молекулярных орбит дает нам также возможность определить матричные элементы различных электронных переходов, имеющих место при переходе возбужденного электрона со связывающей орбиты на разрыхляющую.

Энергии *отдельных* молекулярных орбит также представляют интерес с точки зрения их связи с потенциалом ионизации и потенциалом восстановления углеводов, причем наибольшего внимания в этом отношении заслуживают наивысшие заполненные и самые нижние незанятые орбиты.

Таблица 1

Электронные характеристики, полученные с помощью метода молекулярных орбит, и возможности их применения



Мы уже указывали, как, исходя из энергий молекулярных орбит, можно определить так называемые *энергии локализации*. Знание этих энергий очень существенно для теории химических реакций и при измерении существенно различных энергий активации заместителей и примесей, встречающихся в системах с высоким содержанием сопряженных связей. Значения энергий локализации нельзя получить непосредственно из решения тех же уравнений, из которых вычисляют энергии молекулярных орбит в молекулах. Их рассчитывают из достаточно близких вековых определителей, в которых вычеркнуты определенные столбцы и строки.

Такие величины, связанные с коэффициентами атомных орбит, входящих в молекулярные орбиты, как, например, порядок связи, число свободных валентностей, электрические заряды и т. п., становятся в настоящее время классическими и широко применяемыми характеристиками электронных структур с большим числом возможных применений. Другой величиной, определяемой этими коэффициентами, является интенсивность электронных переходов, или дипольный момент перехода, представляющий собой основную характеристику интенсивности значения этих величин и зависящий от коэффициентов атомных орбит, содержащихся в тех молекулярных орбитах, между которыми осуществляется переход.

Наконец, существует ряд определенных характеристик, например взаимная поляризуемость, которая зависит от коэффициентов и от величин энергии.

## ПРОБЛЕМЫ

### Делокализация электронов в биохимии

Теперь возникает вопрос о том, какие именно биохимические проблемы могут быть *prigoi* наиболее пригодными для изучения с помощью метода молекулярных орбит.

Определенная группа проблем, которая в этом отношении, бесспорно, является наиболее перспективной, связана со значением и ролью делокализации электронов в биохимии. Как уже было показано, метод молекулярных орбит, особенно его упрощенное допущение ЛКАО, является наиболее подходящим для изучения электронной структуры с сопряженными связями, а следовательно, и для объяснения явления делокализации электронов, характерного для этих соединений. Возможности применения этого метода никоим образом, конечно, не ограничиваются только упомянутым классом молекул; его можно также использовать и для расчета насыщенных нерезонирующих соединений. Однако, для того чтобы получить необходимые данные относительно структуры таких молекул, нужно использовать более высокие приближения, что значительно сложнее с точки зрения обработки и последующей трактовки результатов.

Если взглянуть на биохимию в свете рассматриваемых здесь вопросов, то обращает на себя внимание один важный факт, не отмечавшийся ранее: *все основные биохимические соединения, связанные с важнейшими функциями или выполняющие эти функции, состоят полностью, или по крайней мере частично, из систем с сопряженными связями*. В качестве примера можно привести три основные структурные и функциональные единицы клетки, какими, несомненно, являются нуклеиновые кислоты, белки и богатые энергией фосфатные группы. Наиболее существенными компонентами нуклеиновых кислот служат сопряженные гетероциклические пуриновые и пиримидиновые основания. В очень важных с биологической точки зрения

богатых энергией фосфатных группах подвижные электроны фосфорильных групп всегда взаимодействуют либо с электронами других подобных фосфорильных групп, либо с электронами резонирующих органических радикалов. В бедных энергией фосфатных группах взаимодействия такого рода не происходит. Что касается белков, то, хотя на первый взгляд они и представляют собой нерезонирующие структуры, содержащие только отдельные участки с сопряженными связями (каждая пептидная связь есть такой участок) [28, 42], имеется ряд данных, говорящих в пользу того, что их общая супрамолекулярная структура обладает (как это предвидел Сцент-Дьёрдьи [54]) до некоторой степени общей делокализацией электронов.

Важнейшие компоненты клетки — нуклеиновые кислоты, белки и богатые энергией фосфатные группы — не являются единственными системами с сопряженными связями, входящими в состав клеток. Птеридины, порфирины, хиноны, каротиноиды и так далее, представляющие собой важные структурные компоненты биохимических соединений, принадлежат к этому же типу систем.

Другим крайне интересным вопросом в этой области является поведение ферментов. Существуют сотни различных ферментов, причем эти соединения представляют собой главным образом белки. Однако большинство ферментов, за исключением гидролитических, проявляет свою каталитическую активность при соединении с коферментами. Имеется весьма ограниченное число необходимых коферментов (около 12), и *практически все эти коферменты — соединения с сопряженными связями*. Так, можно выделить группу коферментов, ведущих окислительно-восстановительные реакции; это — ДПН, ТПН, ФАД, ФМН, цитохромы и хиноны. Существует группа коферментов, участвующих в реакциях переноса: коферменты фолиевой кислоты, пиридоксальфосфат, тиаминпирофосфат и так далее.

По существу, среди основных органических компонентов живой клетки лишь молекулы углеводов, жиров и стероидов не содержат сопряженных связей. Углеводы и жиры являются просто топливом, необходимым для приведения в движение системы, и не выполняют никаких других функций. В молекулах стероидов, вообще говоря, имеются  $\pi$ -электроны, и есть основания полагать, что эти соединения принимают некоторое участие в процессах переноса электронов [19, 20, 58].

Наконец, если принять, что лекарственные вещества, оказывающие сильное действие на живую клетку, в большинстве случаев являются соединениями с сопряженными связями, то становится совершенно очевидным, что *основные проявления жизни непосредственно связаны с существованием соединений с высокой степенью сопряжения*. Поскольку, с одной стороны, эти соединения имеют сравнительно сложную структуру, а с другой — «природа не прощает излишеств» [56], совершенно очевидно, что некоторые основные особенности соединений этих типов делают их максимально пригодными для участия в процессах жизнедеятельности. Этой особенностью не может быть ничто иное, кроме делокализации электронов, которая позволяет этим молекулам, с одной стороны, выступать в роли дополнительных элементов стабилизации (что может, в частности, играть важную роль в определении их устойчивости к радиационному поражению [43]), а с другой — обеспечивает возможность реакций, которые не идут с молекулами другого типа (ярко выраженная резонансная стабилизация активированных комплексов, передача электронных возмущений на большие расстояния, возможность миграции энергии и т. п.). По существу, течение жизненных процессов соответствует движению электронных облаков в сопряженных молекулах.

**Основные электронные характеристики и основные химические  
и физико-химические свойства нуклеиновых кислот**

Электронные характеристики	Их проявления
<p><i>Энергия резонанса.</i> Наибольшей энергией резонанса на один <math>\pi</math>-электрон обладает адениновое кольцо. Далее идет гуанин. Резонансная стабилизация через водородные связи у пары гуанин — цитозин больше, чем у пары аденин — тимин.</p>	<p>Резистентность пуринов, и в частности аденина, к ионизирующему и ультрафиолетовому облучению [43]. Более высокая температура денатурации нуклеиновых кислот, в молекулах которых содержится большое число пар гуанин — цитозин, чем нуклеиновых кислот, в молекулах которых содержится много пар аденин — тимин [26].</p>
<p><i>Высшая заполненная молекулярная орбита.</i> Наиболее высокая — у гуанина, далее следует аденин.</p>	<p>Электронодонорные свойства пуринов, проявляющиеся в их тенденции к образованию комплексов с переносом заряда с различными акцепторами электронов [40, 44].</p>
<p><i>Нижняя незаполненная молекулярная орбита.</i> Самая низкая незапятанная — у цитозина, за ним следует аденин.</p>	<p>Электроноакцепторные свойства этих двух оснований, проявляющиеся в их тенденции захватывать электроны [17, 38].</p>
<p><i>Основность атомов азота в кольце.</i> В нуклеиновых кислотах наиболее основным должен быть, по расчетам, атом азота, находящийся в положении 7 гуанина (<math>N_{(7)}</math>). В аденине главный основной центр должен быть расположен на <math>N_{(1)}</math> (в молекуле нуклеиновой кислоты аденин может иметь этот центр и на <math>N_{(7)}</math>).</p>	<p>Протонизация и алкилирование под действием алкилирующих агентов идут у атомов <math>N_{(7)}</math> в гуанине и <math>N_{(1)}</math> — в аденине [5, 21]. <math>N</math>-окисление происходит в положении <math>N_{(1)}</math> аденина [52]. Алкилирование нуклеиновых кислот под действием алкилирующих агентов происходит главным образом в положении <math>N_{(7)}</math> гуанина [2, 24, 49]. Комплексы с металлами образуются главным образом по <math>N_{(7)}</math> и <math>O</math> гуанина [14].</p>
<p><i>Заряд первичного азота аминогруппы.</i> Из-за делокализации их неспаренных электронов атомы азота <math>NH_2</math>-групп формально заряжены положительно. Наибольший заряд сосредоточен на атомах азота аденина (наименее положительные атомы), а затем — цитозина.</p>	<p>Прямое алкилирование аминогруппы и реакция с формальдегидом осуществляются главным образом по <math>NH_2</math>-группам аденина, а затем — цитозина [13, 51, 60].</p>
<p><i>Заряд атомов углерода, несущих аминогруппы.</i> Эти углеродные атомы формально заряжены положительно. Наиболее положительными среди них являются атомы гуанина, а затем — цитозина.</p>	<p>Дезаминирование ДНК под действием <math>HNO_2</math> осуществляется главным образом по гуанину; на втором месте стоит цитозин [50].</p>

## Продолжение табл. 2

Электронные характеристики	Их проявления
<i>Заряд атомов кислорода.</i> Наиболее отрицательным является кислород цитозина.	Кислород цитозина может играть решающую роль в процессе протонизации недегидрированной ДНК [9].
<i>Порядок связи углерод — углерод.</i> Наибольший порядок С — С-связи у связи 5—6 тимина, далее у связи 5—6 цитозина.	Образование гидроперекисей под действием ионизирующего облучения и гидратация при фотолизе происходят главным образом по С — С-связи тимина [43]. Окисление перманганатом осуществляется в основном по связи $C_{(5)} - C_{(6)}$ цитозина; на втором месте стоит эта связь у тимина [3].
<i>Незамещенные атомы углерода.</i> Атом $C_{(8)}$ гуанина имеет максимальную свободную валентность, атом $C_{(5)}$ цитозина формально несет максимальный отрицательный заряд.	Электрофильное замещение происходит по обоим атомам углерода [1].
<i>Биположительность С — N-гликозидной связи.</i> Формальный положительный заряд атома азота, связанного с сахаром, и биположительность гликозидной связи больше у пуринов, чем у пиримидинов.	Преимущественная реакционная способность гликозидных связей пуринов при ферментативном или кислотном гидролизе [41, 42] и при реакциях с меркаптоуксусной кислотой и дифениламино [22, 32].

В какой мере расчеты по методу молекулярных орбит помогают понять роль делокализации электронов для определения структуры и функции биохимических соединений? Частичный ответ на этот вопрос дает рассмотрение результатов, уже полученных для некоторых групп таких молекул.

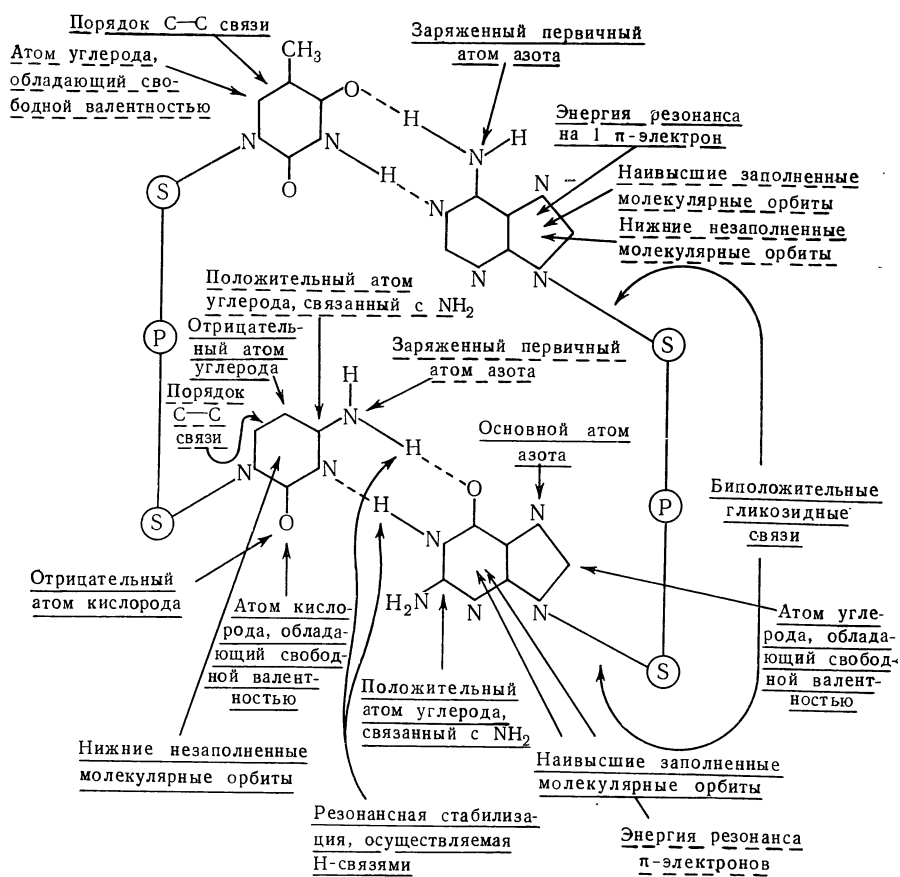
### Нуклеиновые кислоты

Как было показано выше, определение электронных характеристик молекул с сопряженными связями дает нам возможность понять их химические и физико-химические свойства. Такое исследование было тщательно проведено для пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот [41, 46]. Основные результаты, суммированные в табл. 2, иллюстрируют возможности и аспекты таких исследований.

В общем виде эти результаты представлены на фиг. 1 и 2. Главные пары оснований изображены здесь таким образом, как они располагаются в молекулах нуклеиновых кислот (С — сахар, Ф — фосфат). На фиг. 1 показаны те участки, в которых основные теоретические характеристики электронной структуры наиболее значительны. Эти характеристики подчеркнуты сплошной линией там, где они имеют наибольшие значения, и пунктирной линией — на тех участках, где они играют следующую по важности



роль. На фиг. 2 приведены различные химические и физико-химические свойства азотистых оснований нуклеиновых кислот, определяемые этими характеристиками. В некоторых случаях электронные характеристики или свойства, приведенные на фиг. 1 и 2, не подчеркнуты. Это значит, что, хотя

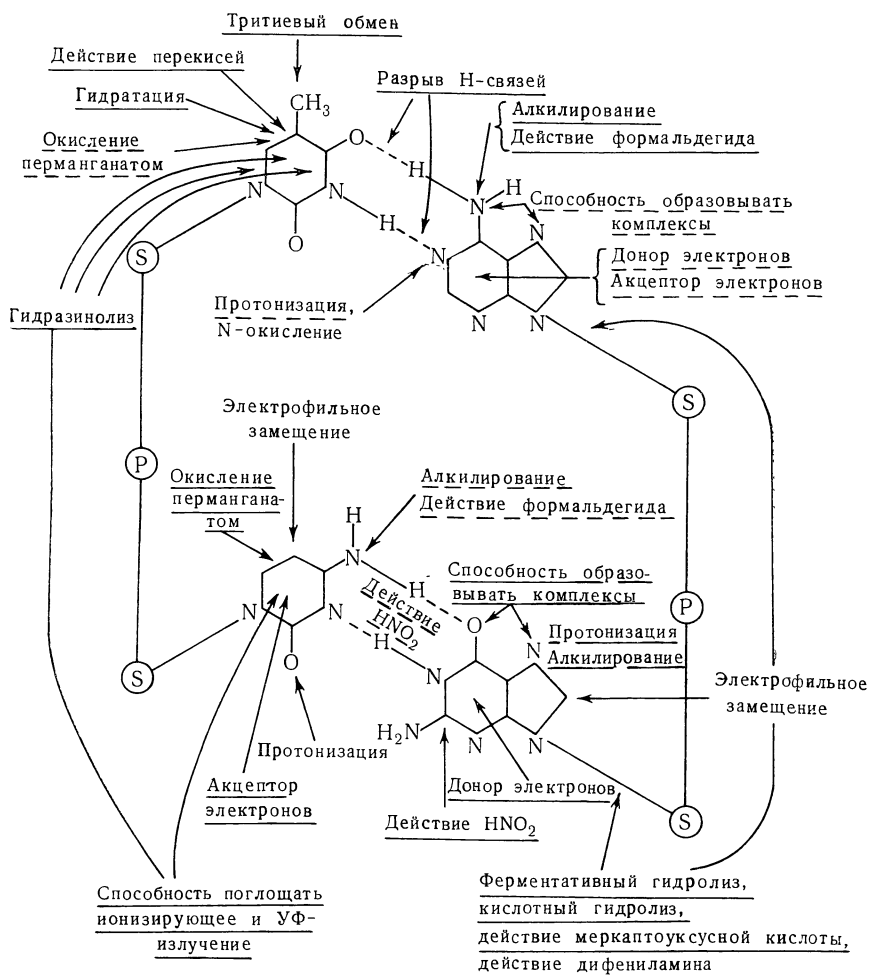


Фиг. 1. Основные электронные характеристики азотистых оснований нуклеиновых кислот.

эти свойства и являются важными характеристиками соответствующих оснований, установить и сравнить их относительные величины для различных случаев невозможно.

Такое представление дает возможность очень быстро определить местоположение основных реакционноспособных центров нуклеиновых кислот по отношению к тем или иным типам реагентов. При этом, как показано на фиг. 2, ни одна из известных реакций, подчеркнутых сплошной линией, не идет с аденином. (Легко осуществляются лишь превращения, связанные с  $\text{NH}_2$ -группой, находящейся у кольца.) Таким образом, рассматривая фиг. 2, сразу можно заметить, что молекулы аденина должны обладать сравнительно высокой устойчивостью по отношению к внешним агентам различных типов. Это обстоятельство становится еще более ясным при рассмотрении фиг. 1, где показано, что единственной электронной характеристикой молекулы аденина (сплошная линия) является ее относительно высо-

кая энергия резонанса. Специфическая роль аденина в биохимических процессах, по-видимому, связана с его ярко выраженной термодинамической и кинетической устойчивостью. Добавим также, что данные об электронной структуре пуриновых и пиримидиновых оснований могут



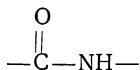
Фиг. 2. Основные химические и физико-химические свойства азотистых оснований нуклеиновых кислот.

быть использованы (наряду с другими областями) для установления корреляции между структурой и противоопухолевой активностью пуриновых антиметаболитов [44].

### Белки

При исследовании нуклеиновых кислот метод молекулярных орбит может быть использован главным образом для изучения их *субмолекулярной* структуры. В случае же белков квантовомеханические исследования в основном связаны с некоторыми аспектами их *супрамолекулярной* структуры.

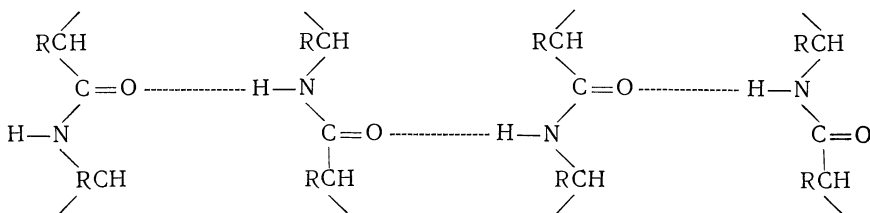
Известно, что пептидные цепи белков составлены из периодически повторяющихся малых резонирующих единиц:



Эти участки в молекуле белка отделены друг от друга насыщенными атомами углерода. Следовательно, делокализация электронов не может осуществляться вдоль такой цепи. В то же время пептидные цепи соединены друг с другом водородными связями. Эти связи могут принимать участие в делокализации электронов и передавать эффекты сопряжения; поэтому существование такой сети связей дает возможность распространить делокализацию электронов на всю молекулярную структуру белка. Вопрос, конечно, заключается в том, в какой мере эффекты сопряжения могут передаваться по системе водородных связей. Если такая передача осуществляется достаточно эффективно, то пептидные цепи нельзя рассматривать как изолированные друг от друга системы, имеющие по четыре  $\pi$ -электрона каждая. Эти цепи должны быть более или менее (в соответствии со степенью передачи) связаны друг с другом в гигантскую структуру с сопряженными связями. Даже если исходить из предположения о слабом взаимодействии, осуществляемом через водородные «мостики», то и тогда, исходя из кооперативного взаимодействия огромного, практически неограниченного числа резонирующих единиц, можно ожидать возникновения совершенно новых эффектов. В качестве примера можно привести уже рассмотренный возможный эффект полного сопряжения, создаваемый водородными связями между отдельными звеньями белковой цепи.

Гипотеза об *общей делокализации электронов по всей молекуле белка* была четко сформулирована в 1941 г. Сцент-Джёрджи, который выдвинул предположение, что перенос энергии в биологических системах аналогичен явлению проводимости в кристаллах и что, в частности, регулярное расположение пептидных звеньев в белках может приводить к образованию *энергетических зон*, подобных тем, которые существуют в полупроводниках. Эта смелая гипотеза вызвала большое число экспериментальных исследований полупроводниковых свойств белков [6, 10, 11], а также привела к многочисленным обсуждениям этого вопроса и дискуссиям.

Первыми попытались проверить гипотезу Сцент-Джёрджи с теоретической точки зрения Эванс и Гергели [12], рассчитавшие энергетические уров-



Фиг. 3. Сопряжение в белках, обусловленное водородными связями.

ни молекул белков. Авторы рассмотрели простую молекулярную модель, предположив, что пептидные звенья содержат по четыре  $\pi$ -электрона каждое и могут взаимодействовать через связывающие их водородные связи. В результате такого взаимодействия могут образовываться безграничные сопряженные слои (фиг. 3), в которых делокализация электронов приведет к появлению энергетических зон.

Эванс и Гергели рассчитали энергетические уровни, соответствующие такому безграничному слою, используя для этого ЛКАО-допущение метода молекулярных орбит. Позднее эти данные были уточнены в нашей лаборатории с помощью расчета по методу молекулярных орбит; при этом мы использовали приближение, заключающееся в принятии самосогласованного поля [53]. Наши результаты указывают на возможность существования в белках четырех энергетических зон, три из которых целиком заполнены электронами, а одна — совершенно пустая. Рассчитанное значение энергии перехода из верхней заполненной зоны на нижнюю незаполненную превышает 5 эв. На этом основании можно сделать следующий вывод: если структура полипептидов соответствует предложенной модели, то чистые белки должны быть довольно хорошими изоляторами. Наблюдаемые же эффекты полупроводимости (работа Элея с сотрудниками), в которых значение разности энергий перехода составляет 2—3 эв, обусловлены внешними добавочными энергетическими уровнями, связанными с наличием дефектов или примесей.

Это, однако, только один возможный вывод из результатов, полученных при расчете с помощью приближения о наличии самосогласованного поля; этот метод может быть использован с еще большим успехом для выяснения каталитической роли белков в ферментативных реакциях. Расчеты показывают, что потенциал ионизации молекулы белка должен быть примерно на 0,9 эв меньше, а его электронное сродство примерно на 0,6 эв больше, чем у мономерного звена полипептидной цепи. Такие различия, хотя они и невелики, могут тем не менее давать ряд определенных преимуществ, которыми нельзя пренебречь при рассмотрении катализа под действием ферментных белков. Важно отметить, что очень существенным параметром процесса катализа химических реакций полупроводниками является возможность переноса электрона от катализатора к субстрату или в обратном направлении. Такой перенос электрона приводит к образованию комплексов с переносом заряда [15, 25]. Следовательно, возможность переноса заряда очень существенна для образования связей между катализатором и субстратом. При этих условиях уменьшение потенциала ионизации и увеличение электронного сродства, т. е. увеличение электронодонорных и электроноакцепторных свойств полипептидной цепи по сравнению с аналогичными свойствами изолированных пептидных звеньев, означают общее усиление каталитической активности этих веществ.

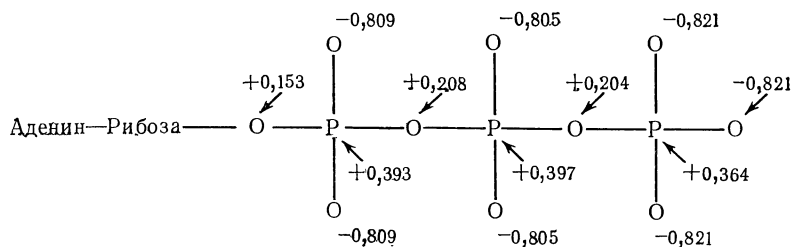
### Богатые энергией фосфаты

Почему богатые энергией фосфаты богаты энергией? Иначе говоря, почему свободная энергия, выделяемая в процессе гидролиза, у фосфатов определенного типа на несколько килокалорий больше, чем у обычных фосфатов?

На основании экспериментальных и теоретических данных можно сделать вывод, что полная энергия фосфатов складывается из целого ряда отдельных вкладов, наиболее важными из которых являются:

1) *«Разностный» резонанс*, представляющий собой разность между энергией резонанса богатых энергией фосфатов и энергией резонанса составляющих их фрагментов. Он состоит из *первичного* «разностного» резонанса, возникающего в результате простого смещения фрагментов, и из *добавочного* «разностного» резонанса, обязанного своим происхождением глубоким структурным изменениям, которые имеют место при таком смещении.

2) *Энергия электростатического взаимодействия.* Богатые энергией фосфаты характеризуются довольно необычным распределением электрического заряда. Основная цепь, которая состоит по крайней мере из трех



Фиг. 4. Распределение  $\pi$ -электронов в пирофосфатной цепи АТФ.

смежных атомов, заряжена положительно и окружена облаком отрицательно заряженных атомов. В качестве иллюстрации мы приводим здесь распределение суммарного заряда в АТФ (фиг. 4). Такое распределение приводит иногда к сильному электростатическому отталкиванию.

3) *Кето-енольная таутомерия* продуктов гидролиза.

4) *Свободная энергия ионизации* продуктов гидролиза.

Количественные оценки этих вкладов, из которых составляется полная энергия богатых энергией фосфатов, представлены в табл. 3 [45].

Таблица 3

«Запас энергии» в фосфатах (вклады в свободную энергию гидролиза),  
ккал на 1 моль

Соединения	Значения энергии, полученные экспериментально	Рассчитанные значения энергии						
		основная энергия гидролиза *	«разностный» резонанс		энергия электростатического отталкивания **	кетоенольная таутомерия	свободная энергия ионизации	полная энергия
			первичный	дополнительный				
АТФ . . . . .	7—8	3	2	0,6	2			7,6
АДФ . . . . .	7—8	3	2	0,6	1,4			7
Карбоксилфосфат	10—12	3	1,6	3	-0,7		3,2	10,1
Фосфоенолпируват	11,5—12,5	3	0,2	0,8	-0,5	9		12,5
Гуанидинфосфат	9—10	3	0,4	0,8	-0,7			

\* Свободная энергия гидролиза бедных энергией фосфатов принята равной 3 ккал/моль.

\*\* Знак плюс означает отталкивание, а знак минус — притяжение.

Наиболее важные значения энергий подчеркнуты. В каждом случае эти величины различны. Экспериментальные и рассчитанные данные хорошо согласуются.

### Коферменты

Применение метода молекулярных орбит для решения проблем, относящихся к этому разделу биохимии, дало наиболее плодотворные результаты. Основные коферменты представляют собой сопряженные органические

молекулы, и квантовомеханическое исследование их функционального действия с очевидностью показало важность делокализации электронов для определения их способности действовать в качестве коферментов в реакциях специфического типа. Было проведено теоретическое исследование коферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции пиридиннуклеотидов и флавинов [42], а также цитохромов [48], коферментов фолиевой кислоты [29], пиридоксальфосфата [31], тиминпирофосфата [47], ретиненов [37] и т. д. Экспериментальные и теоретические данные о коферментах столь многочисленны, что их нельзя даже перечислить в пределах одной статьи; заинтересованный читатель должен обратиться к оригинальным работам. В этой статье мы хотели просто подчеркнуть наиболее существенный и общий результат всех этих исследований, заключающийся в том, что именно наличие делокализованных подвижных электронов дает этим соединениям возможность выступать в роли коферментов. Было, например, показано, что у дыхательных коферментов процессы окисления и восстановления сопровождаются немедленным перераспределением энергии между молекулярными орбитами, особенно между нижними незаполненными и высшими заполненными; в результате в каждом случае самые нижние незаполненные орбиты характеризовали окисленную форму, а самые верхние заполненные орбиты — восстановленную. Окисленная форма будет обладать естественной тенденцией к приему электронов, а восстановленная — к их отдаче. Это дает возможность таким соединениям выступать в роли носителей электронов. Таким образом, перераспределение энергии между молекулярными орбитами может осуществляться только в молекулах с сопряженными связями, а практически только в некоторых очень специфических сопряженных гетероциклах.

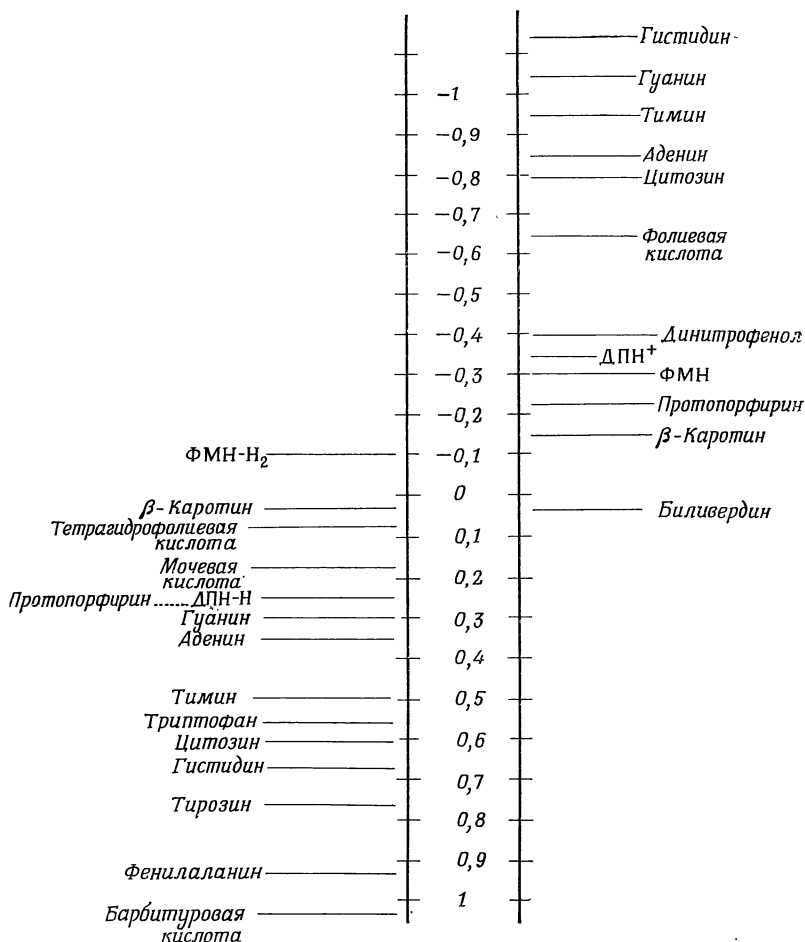
Изучение коферментов, катализирующих реакции, протекающие с переносом групп, также показало важность явления сопряжения для осуществления функций коферментов. Кроме того, удалось выяснить некоторые общие особенности механизма их действия. Таким образом, было показано, что практически в каждом случае в основе механизма реакций, катализируемых упомянутыми ферментами, лежит преобразование первичного продукта взаимодействия кофермента с субстратом в некий промежуточный продукт, обладающий следующими наиболее существенными свойствами: высокой энергетической стабильностью, обусловленной высокой энергией резонанса, и ярко выраженной реакционной способностью благодаря значительной локальной аккумуляции суммарных  $\pi$ -электронных зарядов, положительных или отрицательных, как и в случае свободных валентностей.

Следовательно, с одной стороны, очень велика вероятность образования таких продуктов, а с другой — эти продукты обладают повышенной способностью продолжать реакцию. Или, иначе говоря, как в процессе синтеза промежуточных продуктов, так и в процессе их дальнейших преобразований значение энергии активации мало. Эти факты должны играть определяющую роль в механизме ферментативных реакций; кроме того, они дают нам возможность понять, почему большинство коферментов обладает сопряженными связями. Только такие системы могут давать промежуточные соединения, обладающие одновременно и высокой стабильностью и повышенной реакционной способностью.

Можно добавить, что недавно проведенные исследования коферментов, содержащих фолиевую кислоту, привели к рассмотрению вопроса о механизме действия антагонистов фолиевой кислоты, в частности при химиотерапии рака [30].

### Электронодонорные и электроноакцепторные свойства биохимических соединений

Необходимо отметить и некоторые другие возможные пути использования метода молекулярных орбит для решения биохимических проблем. Одна из таких возможностей относится к тем случаям, в которых недостаток количественных экспериментальных данных значительно увеличивает



Фиг. 5. Шкала доноров и акцепторов электронов.

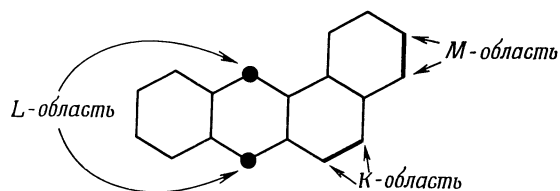
важность теоретического рассмотрения. Так, например, обстоит дело с фундаментальной проблемой электронодонорных и электроноакцепторных свойств биохимических соединений. Эта проблема является, по существу, одной из центральных в биохимии, так как с ней связано решение практически всех возможных задач. С точки зрения физиков, эти свойства могут быть связаны соответственно с потенциалом ионизации и электронным сродством соединений. Трудность заключается в том, что практически ни одна из этих величин не может быть легко измерена для таких сложных молекул, какими являются биохимические соединения. Таким образом, количествен-

ные экспериментальные данные, касающиеся электронодонорных и электроноакцепторных свойств этих молекул, практически отсутствуют. Этот факт, если учесть важность получения таких данных, парадоксален.

Использование метода молекулярных орбит для решения этого вопроса может очень легко заполнить этот пробел. В самом деле, стандартные расчеты дают непосредственную количественную информацию относительно электронодонорных и электроноакцепторных свойств биохимических соединений. Обе эти величины связаны с энергетическими коэффициентами самых верхних заполненных и самых нижних незаполненных молекулярных орбит соответственно. Не вдаваясь в подробности расчетов (см. [40, 44]), можно просто сказать, что они дали возможность построить шкалу, в которой около 300 биохимических соединений расположены в соответствии с их электронодонорными и электроноакцепторными свойствами. Упрощенный вариант такой шкалы для некоторых избранных соединений представлен на фиг. 5. Электронодонорная способность молекул отложена по левой стороне шкалы. Соединения, расположенные в верхней части этой стороны шкалы, являются лучшими донорами электронов. Электроноакцепторная способность молекул измеряется по правой стороне шкалы. Соединения, расположенные в нижней части этой стороны шкалы, являются лучшими акцепторами электронов. Эти данные нашли большое практическое применение для решения ряда биохимических проблем [40, 42, 44, 56], в которых они заменили отсутствующие экспериментальные результаты.

### Химический канцерогенез

Вряд ли можно закончить этот краткий обзор, не затронув работ, связанных с установлением корреляций между электронной структурой и канцерогенной активностью молекул. Помимо их непосредственной ценности, эти исследования показывают возможность использования метода



Фиг. 6. Наиболее важные области в канцерогенных молекулах.

молекулярных орбит для понимания механизма действия на организм различных химических веществ, как вредных, так и применяемых в медицине. Круг вопросов, связанных с этой проблемой, настолько широк, что (как и в случае коферментов) не может быть даже кратко рассмотрен в рамках одной статьи (см. [34, 35]). Теория дала возможность связать канцерогенную активность ароматических углеводородов с характеристиками различных специфических областей в этих молекулах, известных как К-, L- и M-области (фиг. 6). Это непосредственно привело к некоторым выводам и дало возможность высказать целый ряд предположений относительно природы взаимодействий, приводящих к канцерогенезу (табл. 4). Наиболее поразительным является тот факт, что практически все основные предсказания теории подтвердились экспериментально.

Весьма вероятно, что развитие квантовой биохимии позволит получить ряд принципиальных результатов, необходимых для понимания механизма действия лекарственных веществ.



## Экспериментальные и теоретические данные, касающиеся канцерогенеза

Экспериментальные данные	Теоретические соображения
<p>1. «Необходимым условием начала рака является образование связей между химическими канцерогенами и белковыми тканями» [18].</p>	<p>...Основная мысль... заключается... в необходимости избирательной фиксации молекулы на определенном компоненте клетки... Проблема, по всей вероятности, сводится к вопросу о реакционной способности [35].</p>
<p>2. «Для осуществления взаимодействия необходимо наличие неповрежденной циклической системы» [18]. «Совершенно очевидно, что для этого необходима полностью ароматическая система» [27].</p>	<p>Проблема канцерогенной активности связана, по-видимому, как с канцерогенной частью молекулы, так и со всей молекулой в целом [35].</p>
<p>3. «Связь осуществляется главным образом через К-область. Выделение ФДК (2-фенилфенантрен-3,2-дикарбоновая кислота)... было первым экспериментальным подтверждением концепции Б. Пюльмана и А. Пюльман относительно взаимодействия канцерогенов с компонентами клетки через К-область» [27].</p>	<p>Идея о том, что К-область (обладающая способностью образовывать связи) является активным центром канцерогена, через который происходит связывание с клеточными компонентами, составляет основу теории, постулированной одним из нас в 1945 г. [33].</p>
<p>4. «Образование связи через К-область включает дополнительную реакцию и зависит от пространственных факторов. Если одна К-область заблокирована, то имеется возможность образования связи через вторую К-область» [27].</p>	<p>Имеется очень хорошее подтверждение созданной теории. «Механизм действия канцерогенных молекул включает... химическую реакцию между канцерогеном и реципиентом клетки... Реакция состоит, по-видимому, в образовании дополнительного продукта или комплекса... Реципиент клетки, реагирующий с канцерогеном, обладает, по всей вероятности, электрофильной природой...» [34].</p>
<p>5. «В данной работе показано, что ФДК связывается с молекулами белка через свои карбонильные группы с образованием имидных связей» [4].</p>	<p>«Наша схема находится в соответствии с теоретическими положениями Пюльмана относительно образования хиноидной связи между углеводородом и тканью» [4].</p>

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы попытались рассмотреть некоторые аспекты квантовой биохимии, которые имеют наиболее существенное значение в настоящее время. Так, обсуждался вопрос о выборе наиболее подходящего для исследования биохимических проблем метода. Таким методом оказался метод молекулярных орбит, а проблемой, которую можно наиболее успешно решить с помощью этого метода,—делокализация электронов в биохимических соединениях. В качестве примеров был приведен ряд случаев, для которых уже были сделаны расчеты и получены конкретные результаты.

Необходимо учитывать, что эти указания и расчеты основаны на современных возможностях и на личном опыте авторов. Весьма вероятно, что другие исследователи смогут достичь больших успехов в других направлениях. Во всяком случае, несомненно, что настанет день, когда проблемы биохимии будут строго сформулированы на языке квантовой механики. И совершенно очевидно, что изучение структуры биохимических соединений и их электронных уровней приведет к более глубокому пониманию их функций, а в конце концов и к пониманию процессов жизнедеятельности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Albert A., In «The Chemistry and Biology of Purines», A Ciba Foundation Symposium, p. 97, Churchill, London, 1957.
2. Bantz E., Freese E., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **46**, 1585 (1960).
3. Bayley C. R., Jones R. S., Trans. Faraday Soc., **55**, 492 (1959).
4. Bhargava P. M., Heidelberger C., J. Am. Chem. Soc., **78**, 3671 (1956).
5. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., p. 539 (1960).
6. Cardew H. H., Eley D. D., Discussions Faraday Soc., **27**, 115 (1959).
7. Caulson C. A., «Valence», Oxford Univ. Press, London and New York, 1952.
8. Coulson C. A., Rev. Modern Phys., **32**, 3 (1960).
9. Dove W. F., Wallace F. A., Davidson N., Biochim. Biophys. Research Commun., **1**, 312 (1959).
10. Eley D. D., Research, **12**, 293 (1959).
11. Eley D. D., Spirey D. I., Trans. Faraday Soc., **49**, 79 (1960).
12. Evans M. G., Gergely J., Biochim. et Biophys. Acta, **3**, 188 (1949).
13. Fraenkel-Conrat H., Biochim. et Biophys. Acta, **15**, 307 (1954).
14. Frieden E., Alles J., J. Biol. Chem., **230**, 797 (1958).
15. Garner W. E., Advances in Catalysis, **9**, 169 (1957).
16. Glass B., In «Light and Life» (M. D. McElroy and B. Glass, eds.), p. 1911, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961.
17. Gordy W., Radiation Research, Suppl. 1, 491 (1959).
18. Heidelberger C., In «Carcinogenes: Mechanisms of Action», Ciba Foundations Symposium, p. 179, Churchill, London, 1959.
19. Hurlock B., Talalay P., J. Biol. Chem., **234**, 886 (1958).
20. Hurlock B., Talalay P., Arch. Biochem. Biophys., **80**, 468 (1959).
21. Jardetzky C. D., Jardetzky O., J. Am. Chem. Soc., **82**, 222 (1960).
22. Jones A. S., Letham D. S., Biochim. et Biophys. Acta, **14**, 438 (1958).
23. Kautzmann W., «Quantum Chemistry», Academic Press, New York, 1957.
24. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 450 (1957).
25. Leach J. S., Advances in Enzymol., **15**, 1 (1954).
26. Marmur J., Doty P., Nature, **183**, 1427 (1959).

27. Oliverio V. T., Heidelberger C., *Cancer Research*, **18**, 1904 (1958).
28. Pauling L., In «Symposium on Protein Structure» (A. Neuberger, ed.), p. 17, Mathuen, London, 1958.
29. Perault A. M., Pullman B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **44**, 251 (1960).
30. Perault A. M., Pullman B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **52**, 266 (1961).
31. Perault A. M., Pullman B., Valdemoro C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **46**, 555 (1960).
32. Peterson G. B., Burton K., *Trans. Faraday Soc.*, **55**, 492 (1959).
33. Pullman A., *Compt. rend. acad. sci.*, **221**, 140 (1945).
34. Pullman A., Pullman B., *Advances in Cancer Research*, **3**, 117 (1955)
35. Pullman A., Pullman B., «Cancérisation par les Substances Chimiques et Structure Moléculaire», Masson, Paris, 1955.
36. Pullman A., Pullman B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 1572 (1959).
37. Pullman A., Pullman B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 7 (1961).
38. Pullman B., *Acad. Roy. Belg., Classe Sci.*, **33**, 174 (1961).
39. Pullman B., Pullman A., «Les Théories Electroniques de la Chimie Organique», Masson, Paris, 1962.
40. Pullman B., Pullman A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 1197 (1958).
41. Pullman B., Pullman A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **36**, 343 (1959).
42. Pullman B., Pullman A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 136 (1959).
43. Pullman B., Pullman A., In «Comparative Effects of Radiation» (M. Burton, J. S., Kirby-Smith, and J. L. Magee, eds.), p. 105, Wiley, New York, 1960.
44. Pullman B., Pullman A., *Rev. Modern Phys.*, **32**, 428 (1960).
45. Pullman B., Pullman A., *Radiation Research, Suppl. 2*, 160 (1960).
46. Pullman B., Pullman A., *Nature*, **189**, 725 (1961).
47. Pullman B., Spanjaard C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **46**, 576 (1960).
48. Pullman B., Spanjaard C., Berthier G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 1011 (1960).
49. Reiner B., Zamenhof S., *J. Biol. Chem.*, **228**, 475 (1957).
50. Schuster H., *Biochim. Biophys. Research Commun.*, **2**, 320 (1960).
51. Staehelin M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **29**, 410 (1958).
52. Stevens M. A., Brown G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2759 (1958).
53. Suard M., Berthier G., Pullman B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **52**, 254 (1961).
54. Szent-Györgyi A., *Nature*, **148**, 157 (1941).
55. Szent-Györgyi A., «Bioenergetics», Academic Press, New York, 1957.
56. Szent-Györgyi A., «Introduction to a Submolecular Biology», Academic Press, New York, 1960.
57. Szent-Györgyi A., *The New York Times Magazine*, Section 6, p. 16, July 30, 1961.
58. Talalay P., Williams-Ashman H. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 15 (1958).
59. Van Vleck J. H., Sherman A., *Rev. Modern Phys.*, **7**, 167 (1935).
60. Whitehead C. W., Traverso J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3971 (1960).

# КВАНТОВАЯ ХИМИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

М. КАША

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВОЙ ХИМИИ

Молекулярная биология — наука, стремящаяся интерпретировать биологические явления на молекулярном уровне, — использует для изучения различных свойств молекул самые разнообразные методы, начиная с применения принципов чистой абстрактной математики в топологических вопросах молекулярной генетики и использования экспериментальных методов рентгеноструктурного анализа для подробного изучения атомно-молекулярных структур и кончая квантовохимическими расчетами молекулярных электронных, а также межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий.

Квантовая химия может дать качественное объяснение очень обширного круга молекулярных свойств и явлений. Именно это разнообразие проблем, к которым могут быть применены методы квантовой химии, обуславливает особую ценность этой науки для химиков и биологов, заинтересованных в получении детальных объяснений изучаемых явлений на уровне электронных взаимодействий. Биохимикам очень полезно и важно знать, какие существуют молекулярные теории, какой круг проблем может быть рассмотрен в рамках этих теорий и, наконец, в какой мере эти теории могут дать ответ на интересующие их вопросы.

Очень часто квантовохимические расчеты приводят к полуколичественным результатам, основанным на определенных приближениях и полуэмпирических схемах. Такие результаты могут не удовлетворять физика-теоретика, заинтересованного в строгом неэмпирическом расчете свойств двухатомных и других простых молекул. Однако если эти результаты подсказывают новые экспериментальные подходы к изучаемым явлениям или дают новую качественную их интерпретацию, то вряд ли кто-нибудь станет сомневаться в пользе и плодотворности применения методов квантовой химии.

Одна из целей данной статьи заключается в попытке внести некоторые поправки к двум широко распространенным мнениям относительно квантовомеханических расчетов молекул. Так, некоторые исследователи считают, что со сколько-нибудь удовлетворительной точностью можно рассчитать только энергетические уровни и электронную структуру молекулы водорода. Другая точка зрения заключается в том, что квантовая химия как некая общая дисциплина исчерпывается простыми расчетами по методу молекулярных орбит. Хотя несомненно, что метод молекулярных орбит действительно дает наиболее простой путь расчета электронных энергий и функций

распределения в больших молекулах, тем не менее целый ряд явлений, связанных с межмолекулярными электронными взаимодействиями и представляющих первостепенный интерес для биохимиков и специалистов в области молекулярной биологии, нельзя считать, пользуясь только этим методом. Межмолекулярные взаимодействия, обусловленные водородными связями, ван-дер-ваальсовыми и дисперсионными силами, переносом заряда, а также электронные взаимодействия и возникновение полос проводимости представляют для молекулярной биологии особый интерес. Большая часть этих явлений будет в какой-то мере рассмотрена в данной статье.

Биологи и биохимики должны, с одной стороны, представлять себе уровень сложности тех молекулярных проблем, которые могут быть решены методами современной квантовой химии (сюда можно отнести расчеты молекул, начиная от аминокислот, хлорофилла и каротиноидов до полипептидов, белков и нуклеиновых кислот); с другой стороны, важно также отчетливо представлять себе и предел возможностей методов квантовой химии. Ввиду сложности проблем, стоящих перед биохимиками и биологами, работающими на молекулярном уровне, в настоящее время правильное сочетание умозрительных предположений и точных данных важнее, чем переоценка того или другого. В этом смысле использование методов квантовой химии может быть очень полезно для развития молекулярной биологии.

#### ПОИСКИ НОВЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ

В 1941 г. Альберт Сцент-Дьёрдьи закончил свое выступление [32] следующими словами: «Биохимия в настоящее время находится в весьма своеобразном состоянии. Мы можем воспроизвести целый ряд поразительных биологических реакций, используя имеющиеся у нас активные вещества, но мы терпим неудачу при всех попытках дать реальное объяснение тех молекулярных механизмов, по которым протекают реакции. По-видимому, нам все еще не хватает каких-то фундаментальных сведений о процессах жизнедеятельности, без которых подлинное понимание этих процессов невозможно. Весьма вероятно, что изучение обобщенных энергетических уровней послужит началом нового периода в развитии биохимии и эта наука войдет в рамки квантовой механики».

С тех пор Сцент-Дьёрдьи сам неустанно ищет новые физические подходы и возможно более короткие пути к пониманию молекулярных механизмов. Дилемма заключается в следующем. Чувствуя себя вполне уверенно на берегах экспериментальной биохимии, исследователь-биохимик в то же время стремится достичь берегов строгой физической теории (хотя эти берега все еще скрыты густым туманом). Парадокс состоит в том, что пути, ведущие к абсолютной истине, устремлены прямо вверх, а параллельные прямые пересекаются только в бесконечности. Неустршимый Сцент-Дьёрдьи перебрасывает канат прямо через пропасть и чувствует себя как дома при проведении смелых экспериментов, указывающих наиболее короткие пути к желаемому контакту между физическими теориями и экспериментальной биохимией. И его меньше, чем кого бы то ни было, беспокоит возможность случайно свалиться в пропасть.

• В одной из своих ранних попыток [32] найти физические механизмы биохимических процессов он рассмотрел заимствованную из физики твердого тела модель, основанную на существовании зон проводимости (или полос пропускания). В своей монографии «Химия мышечного сокращения» [33] он высказал предположение о том, что в белках может происходить перенос

электронов вследствие того, что они обладают полупроводниковыми свойствами. Это предположение вызвало целую серию исследований в многочисленных лабораториях. Несмотря на то что мы и сейчас еще не располагаем достаточными физическими основаниями для обнаружения таких свойств у молекулярных систем, эти исследования, несомненно, оказали очень глубокое влияние на дальнейшее развитие науки, дали возможность открыть новые явления и ввести в рассмотрение новые системы.

Позднее внимание Сцент-Дьёрдьи [34] привлекли *триплетные состояния* молекул. В своей монографии «Биоэнергетика» [35] он придает особое значение этим состояниям в связи с ролью структурной воды в биологических системах. Значение метастабильных возбужденных состояний в биохимических реакциях еще далеко не установлено. Тем не менее, например, интереснейшее открытие фотодимеризации тимина [1] основывалось на идеях Сцент-Дьёрдьи относительно перехода возбужденных молекул в триплетные состояния в замороженных водных растворах<sup>1</sup>. Хотя с современной точки зрения детальное объяснение механизмов, определяющих вероятность синглет — триплетных переходов, связано скорее с явлениями агрегации молекул, чем со структурной водой [24], значение поднятой Сцент-Дьёрдьи дискуссии о роли триплетных состояний в биохимии далеко еще не исчерпано и, несомненно, будет сказываться в дальнейшем.

В явлениях, связанных с образованием комплексов с переносом заряда, Сцент-Дьёрдьи нашел, несомненно, свой наиболее плодотворный подход к пониманию молекулярных механизмов биохимических процессов. Физическая интерпретация и определение электронных донорно-акцепторных комплексов, предложенные Р. Мулликеном [25—28], указывают на то, что в химических системах подобного рода внутримолекулярные взаимодействия должны быть почти универсальными. Сцент-Дьёрдьи начал интенсивно исследовать возможности использования этих идей для понимания биохимических процессов и суммировал результаты этих изысканий в своей последней монографии «Введение в субмолекулярную биологию» [36]. Можно надеяться, что тщательная проверка этих предположений приведет к целому ряду плодотворных открытий.

Во всех этих исследованиях Сцент-Дьёрдьи значительно больше интересовался нахождением новых отправных точек для дальнейших биохимических исследований, чем окончательными доказательствами того или иного механизма. Поэтому в ряде случаев его экспериментам не хватало физико-химической точности, а предлагаемым интерпретациям — строгости. Однако можно сказать, что его результаты имеют очень большую ценность, так как они стимулировали много новых исследований.

Обратимся теперь к рассмотрению некоторых разделов квантовой химии, выводы и результаты которых могут быть использованы для решения проблем молекулярной биологии.

---

<sup>1</sup> В работе нашей лаборатории [38] было показано, что своеобразные явления исчезновения флуоресценции водных растворов красителей при замораживании их и последующего разгорания «красной» полосы люминесценции при дальнейшем охлаждении, которые Сцент-Дьёрдьи рассматривал как экспериментальную основу своей концепции о роли триплетных состояний, фактически обусловлены не синглет — триплетными переходами, а явлениями димеризации молекул красителя при замораживании. В личном сообщении Сцент-Дьёрдьи полностью согласился с данной нами интерпретацией этих явлений и сообщил мне, что он сам и проф. Каша еще раньше пришли к такому же заключению. Ряд других факторов, в частности связанных с флуоресценцией хлорофилла *in vivo*, также говорит против предположения о важной роли триплетных состояний в биологических процессах. По-видимому, весь этот комплекс вопросов еще нуждается в очень детальном исследовании. — *Прим. ред.*

ОСНОВЫ ТЕОРИЙ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ И ПЕРЕНОСА  
ЭЛЕКТРОНОВ [13]**Миграция энергии (перенос возбуждения) — экситонная теория**

В этой теории, выдвинутой впервые Я. Френкелем, рассматривается резонансное взаимодействие возбужденных состояний слабосвязанных сложных систем. Экситонная теория в различных своих вариантах представляет собой фундаментальную теорию миграции энергии (возбуждения). Энергетическое взаимодействие молекул в возбужденном состоянии, рассматриваемых как электрические диполи, представляет собой диполь — дипольное взаимодействие и потому обратно пропорционально кубу расстояния ( $1/r^3$ ); следовательно, этот межмолекулярный эффект обладает довольно большим радиусом действия (например, 10—50 Å). При этом перекрытие электронных орбит и перенос электронов не являются обязательными. Энергетические состояния соответствуют всей системе в целом, а не отдельным локально возбужденным молекулярным центрам.

Теория *свободных*, или *быстрых*, *экситонов* включает коллективное возбуждение молекулярных центров, потому что скорость переноса энергии ( $> 10^{12} \text{ сек}^{-1}$ ) значительно больше, чем скорость смещения молекул из их равновесных положений. В этом случае экситонное взаимодействие можно обнаружить экспериментально по характерным сдвигам в спектрах агрегированных молекул по сравнению со спектрами их мономерных форм, по характерным изменениям интенсивности и по миграции энергии по всему молекулярному агрегату.

Теория *медленных*, или *локализованных*, *экситонов* учитывает постепенный перенос энергии от молекулы к молекуле, потому что в этом случае скорость такого переноса может быть гораздо меньше ( $< 10^{12} \text{ сек}^{-1}$ ) скорости смещения молекул из их равновесных положений в молекулярной решетке. И в этом случае удастся непосредственно обнаружить миграцию энергии, хотя при этом изменяется только интенсивность поглощения, а спектральные сдвиги отсутствуют.

Эти два предельных случая можно рассматривать в экситонной теории как случаи *сильных* и *слабых* взаимодействий. Симпсон и Петерсон [30] показали, что критерием для разграничения этих предельных случаев может служить соотношение между силой взаимодействия и шириной полосы поглощения для индивидуальной или изолированной молекулы. Этот критерий позволяет выделить те крайние случаи, в которых применимость той или иной предельной экситонной модели в основном определяется относительной силой межмолекулярного электронного взаимодействия и внутримолекулярного электронно-колебательного взаимодействия. В общем случае экситонная модель позволяет рассматривать и промежуточные взаимодействия.

Третьим типом механизма переноса энергии является колебательно-релаксационный механизм, предложенный Фёрстером. Этот механизм основан на квантовомеханическом взаимодействии колебательных континуумов и осуществляется практически при переносах энергии между неидентичными парами молекул. В отличие от экситонной модели в этом случае вероятность переноса энергии (для случая диполь — дипольного взаимодействия) пропорциональна  $r^{-6}$ . Взаимодействия такого рода удастся обнаружить на достаточно больших расстояниях, однако они выражены менее резко, чем в случаях экситонного взаимодействия. Перенос энергии по механизму, предложенному Фёрстером, представляет собой сравнительно медленный процесс, так как частота такого переноса имеет порядок  $10^9$ — $10^6 \text{ сек}^{-1}$ ,

т. е. является величиной того же порядка, что и вероятности спонтанных флуоресцентных переходов. Фёрстер [8] провел количественное сравнение трех различных механизмов миграции энергии и классифицировал их как случаи сильных, средних и слабых взаимодействий.

Экситонная теория может быть применена к рассмотрению: а) спектральных изменений и переноса энергии в агрегированных системах биологических пигментов (зрительный пурпур, хлорофилл); б) гипохромного эффекта и миграции энергии в молекулах дезоксирибонуклеиновой кислоты; в) явлений переноса энергии возбуждения в экспериментах с излучениями высокой энергии (сцинтилляционные счетчики и т. п.); г) эффектов дисперсии оптического вращения, обусловленных экситонным взаимодействием в спирализованных конфигурациях молекул белков.

Экситонная модель дает весьма общий квантовохимический подход к широкому кругу явлений, связанных по своей природе с резонансными взаимодействиями возбужденных электронных состояний. Мы рассмотрели эту модель в приложении к биологическим ламеллярным системам [12]. В классической монографии Давыдова [7] приводится подробная теория и основная литература в этой области.

### **Взаимодействия, обусловленные переносом заряда (донорно-акцепторные взаимодействия)**

Строгая квантовомеханическая теория, рассматривающая взаимодействия, связанные с переносом заряда, была разработана Р. Мулликеном [25—28] в 50-х годах этого столетия, хотя целый ряд эмпирических догадок и гипотез в этом направлении был высказан в химической литературе значительно раньше. Взаимодействие между двумя (или более) единицами молекулярной системы, существующими либо в одной сложной молекуле, либо в виде пары (или совокупности) молекул, можно приближенно рассматривать как резонансное взаимодействие между несвязанным состоянием изолированной молекулярной единицы и ионным возбужденным состоянием молекулярного ансамбля, возникшего благодаря переносу единичного заряда. Таким образом, в нулевом приближении можно считать, что электрон переносится от одной молекулярной единицы к другой. Если рассматривать данную систему в первом приближении, то в результате резонансного взаимодействия основное состояние будет стабилизировано некоторой примесью возбужденного состояния ионного характера, тогда как возбужденное состояние будет соответственно дестабилизировано или возмущено некоторой примесью основного несвязанного состояния.

Теория переноса заряда представляет собой приближение к валентным взаимодействиям двух или более единиц сложной системы. Такого рода взаимодействия проявляются лишь на очень малых расстояниях. Для осуществления такого рода взаимодействий необходимо, чтобы имело место достаточно сильное перекрывание орбит. Кроме того, теория налагает ряд дополнительных ограничений, связанных с наличием определенной симметрии перекрывающихся орбит, благоприятного энергетического соотношения между ними и подходящего диэлектрического окружения. Основная задача теории заключается в выяснении природы сил притяжения, в результате действия которых электронодонорная и электроноакцепторная молекулы, взаимодействуя друг с другом, образуют комплекс с переносом заряда.

Взаимодействие, обусловленное переносом заряда, удается обычно экспериментально обнаружить благодаря появлению новой интенсивной непрерывной полосы поглощения, характерной только для сложной системы и отсут-



ствующей у ее компонентов, взятых в отдельности. Появление такой полосы поглощения, свойственной комплексу с переносом заряда, было предсказано из теоретических соображений. По этому вопросу был опубликован целый ряд работ. Наряду с этим имеются данные о том, что у комплексов с переносом заряда в некоторых специфических случаях наблюдается явление электронного парамагнитного резонанса, но работы, ведущиеся в этом направлении, находятся еще в зачаточном состоянии.

Несмотря на то что название этой теории наводит на мысль о возможности электрической проводимости, наличие таковой вовсе не вытекает из данной теории. Однако, когда силы притяжения между молекулами возрастают и, следовательно, увеличивается перекрывание орбит при взаимодействиях, обусловленных переносом заряда, можно ожидать, что это косвенным образом приведет к увеличению электронной полупроводимости. И в самом деле в кристаллах, содержащих комплексы с переносом заряда, действительно удавалось наблюдать значительное увеличение полупроводимости по сравнению с кристаллами, состоящими из отдельных компонентов.

Обзоры теории комплексов с переносом заряда и возможности ее применения были даны рядом авторов [23, 29].

### **Электронная полупроводимость молекулярных агрегатов**

Строгой квантовомеханической теории, описывающей явление электронной полупроводимости в молекулярных кристаллах и агрегатах, пока еще не существует. Для возникновения электронной полупроводимости необходимо перекрывание орбит отдельных молекулярных единиц, а также взаимность переходов (термических) электронов, причем разность энергий между основным и возбужденным состояниями этих единиц должна быть достаточно мала. В случае полупроводника, электроны которого находятся в основных состояниях (соответствующих обычным состояниям большинства молекул), подвижность электронов в электрическом поле будет ничтожно мала. Однако если путем нагревания перевести часть электронов в возбужденную «полосу», возникшую в результате межмолекулярного перекрывания, то при наличии определенной разности потенциалов может происходить миграция электронов или дырок.

Одним из основных вопросов, на решении которого концентрирует внимание теория молекулярных систем, является вопрос о степени перекрывания отдельных молекулярных орбит. Обычно перекрывание орбит бывает очень незначительным, о чем свидетельствуют следующие факты: 1) в молекулярных агрегатах и кристаллах отдельные молекулы сохраняют свои индивидуальные свойства, 2) молекулярные кристаллы обладают низкой точкой плавления и, наконец, 3) при испарении молекулярный кристалл ведет себя как единое молекулярное целое. Фактически успешность применения экситонной теории для описания спектральных свойств молекулярных кристаллов зависит от малых перемещений электронов между молекулами. Молекулярное перекрывание орбит в молекулярном агрегате должно быть количественно связано с предэкспоненциальным множителем, входящим в эмпирическое соотношение, которое описывает полупроводниковые свойства. Таким образом, устанавливается теоретический предел для абсолютной величины полупроводимости.

Зависящий от температуры экспоненциальный множитель в выражении, описывающем полупроводниковые свойства, связан с разностью энергий основного и возбужденного состояний. В изолированной молекуле эта разность энергий должна соответствовать самому низшему электронному состо-

янию, с которого происходит переход в возбужденное состояние, хотя сейчас еще не ясно, является ли это состояние триплетным или синглетным. В молекулярном агрегате этот энергетический разрыв должен соответствовать полосе проводимости, возникающей в результате объединения отдельных молекулярных возбужденных состояний. Термин «полоса проводимости» употребляется намеренно, так как в случае слабых межмолекулярных взаимодействий все сводится к выяснению вопроса о том, сколько же в действительности образовалось таких полос. В современных стремлениях развивать идеи теории неорганических полупроводников и непосредственно применять их в случаях молекулярных полупроводников проявляется больше энтузиазма, чем осторожности. Значения величин, характеризующих полупроводниковые свойства этих двух весьма различных групп материалов, подчас отличаются на несколько порядков, и прогресс здесь является очень сомнительным, если мы будем обращать внимание только на черты сходства между ними, закрывая глаза на различия.

В большинстве экспериментальных работ производятся измерения электрической полупроводимости высушенных, большей частью кристаллических образцов в температурном интервале от 20 до нескольких сот градусов. В случае белков и других биологических материалов встает вопрос об ионной проводимости, возникающей благодаря включению в исследуемый объект солевых примесей. Так, в ряде последних работ была обнаружена ионная проводимость у полупроводников, которым до этого приписывали только электронную проводимость. В целом техника измерения полупроводимости, как нам кажется, дает сведения, весьма далекие от действительных проблем подвижности электронов в биологической макромолекуле и в системах молекулярных агрегатов.

Критическую оценку положения дел в этой области исследований можно найти в работе Гарретта [9].

### Молекулярные модели памяти

При изучении целого ряда биологических проблем возникает вопрос о природе молекулярного механизма стабилизации переходных промежуточных состояний. Фотоинактивация и фотореактивация, зрение, фотосинтез, радиобиологические эффекты и другие биологические явления должны получить определенное объяснение на молекулярной основе. В большинстве случаев подобная интерпретация должна даваться на основе уже известных свойств молекул, хотя не исключено, что для объяснения некоторых биологических явлений потребуются еще неизвестные науке данные. Механизм деятельности мозга в конечном счете, несомненно, также должен основываться на электронных явлениях, хотя общая сложность мозговой деятельности может в какой-то мере завуалировать это необходимое условие. Совершенно очевидно, что исследование природы переходных состояний и видов молекул, особенно их временных констант, очень важно, так как оно может дать основу для создания модели изучаемого биологического явления.

Принципы *электронного возбуждения молекул* изучены на примере фотовозбуждения настолько детально, что можно уже сформулировать их общие черты.

Наблюдаемые обычно электронные переходы в сопряженных многоатомных молекулах можно подразделить на два широких класса молекулярно-орбитальных переходов: переходы  $\pi \rightarrow \pi^*$ , осуществляющиеся между полностью делокализованными молекулярными орбитами, и переходы  $n \rightarrow \pi^*$ , при которых  $n$ -электрон неподеленной пары атома переходит на раз-

рыхляющую  $\pi$ -орбиту молекулы [15]. Как синглетные, так и триплетные возбужденные состояния обычно характеризуются высоким квантовым выходом, несмотря на кажущийся парадокс запрета синглет—триплетных переходов [18, 20]. Однако в связи с тем, что триплетные состояния молекул привлекли к себе пристальное внимание биохимиков как состояния, которые можно рассматривать в качестве промежуточных или которые могут служить своеобразными ловушками энергии, следует отметить, что в большинстве случаев эти состояния не могут существовать более 1—30 сек, а в ряде случаев средняя продолжительность существования триплетных состояний измеряется миллисекундами.

*Межмолекулярный перенос энергии* в фотовозбужденных хелатных соединениях металлов [4, 5, 6, 37] может привлекать внимание как молекулярный механизм тех процессов, которые осуществляются в некоторых металлорганических системах. Однако в тех случаях, когда удастся наблюдать это явление, возбужденные состояния иона металла, возникшие в результате ультрафиолетового облучения арилхелатных групп, имеют продолжительность существования лишь порядка миллисекунд.

*Молекулярное экситонное взаимодействие* в фотовозбужденных системах молекулярных агрегатов (полимеры, молекулярные слои) приводит к образованию полос возбуждения, которые при наличии определенного геометрического расположения молекул в молекулярном агрегате имеют запрещенные нижние уровни. Однако различные нарушения расположения молекул в агрегате и синглет—триплетное взаимодействие уменьшают запрет, накладываемый на переходы в нижние состояния [19, 24]. Трудно думать поэтому, чтобы метастабильные экситонные уровни могли играть роль своеобразного накопителя энергии электронного возбуждения.

Таким образом, из рассмотрения всех трех достаточно широких типов молекулярных взаимодействий можно сделать вывод, что, так как естественная средняя продолжительность существования описанных состояний слишком мала или может легко стать таковой благодаря воздействию внешних возмущающих факторов, вряд ли можно использовать эти явления для интерпретации механизма молекулярной памяти, даже если свет или радиация участвуют в процессах возбуждения.

Среди молекулярных механизмов, обеспечивающих создание долгоживущих промежуточных молекулярных состояний или возможность сравнительно длительного сохранения энергии электронного возбуждения, в первую очередь следует отметить *обратимые фотохимические процессы*. Эти процессы изучались весьма интенсивно [21, 22]. Предельная простота процесса, состоящего в выбросе фотоэлектрона из возбужденной молекулы и его захвате растворителем, обеспечивает эффективную обратимость процесса во многих жидких системах. В твердых же стеклообразных системах захваченный электрон и свободный ион могут существовать в течение очень длительного времени (дни, годы). Однако такие процессы удается наблюдать лишь при возбуждении под действием света или, как было обнаружено позднее, под действием излучения с высокой энергией [11].

*Фотообратимые фотохимические процессы* представляют еще больший интерес с биологической точки зрения, так как на их основе можно создать модели для различных биологических явлений, связанных с фотореактивацией. Такие процессы изучались главным образом на спиropиранах и биантронах [10], однако это явление, по-видимому, носит более общий характер, и есть все основания надеяться обнаружить его при изучении других систем. Несомненно, что дальнейшее изучение фотообратимых фотохимических процессов имеет первостепенное значение.

Все рассмотренные выше случаи включают фотовозбуждение или возбуждение облучением (которое на последних стадиях аналогично фотовозбуждению), и поэтому использование этих явлений для создания молекулярной модели общих биологических процессов представляется малореальным. Они интересны лишь с точки зрения ликвидации пробела в той области наших знаний, которая касается различных типов электронного возбуждения, в частности возникновения возбужденных электронных состояний молекул в ходе химических реакций.

В связи с этим заслуживает специального внимания широко известная *электролюминесценция* молекулярных паров (разряд Теслы). Если удастся обнаружить обратимые химические процессы (аналогичные рассмотренным ранее фотохимическим), которые возникают и становятся обратимыми в результате приложения электрического потенциала к системе, находящейся в твердом состоянии, то можно будет создать молекулярную модель, применимую для таких проблем, как процессы накопления и воспроизведения информации мозгом. Можно ожидать, что затухание памяти, вызванное облучением коротковолновым светом или изменением температуры, является следствием именно таких процессов.

В настоящей статье рассматриваются наиболее общие возможности сохранения энергии электронного возбуждения на основе известных молекулярных механизмов, а также приводится классификация этих молекулярных процессов. Если мозг функционирует, используя информацию, запасенную в нуклеиновой кислоте, то задача теоретиков, работающих в области квантовой химии, и физиков и химиков, изучающих физику или химию твердого тела, заключается в том, чтобы выяснить, какие именно молекулярно-электронные механизмы лежат в основе этих процессов; особенно увлекательной является проблема воспроизведения информации. Огромные трудности исследования функций мозга на молекулярном уровне стимулируют поиски молекулярных моделей памяти, которые, несомненно, откроют новые подходы к изучению деятельности мозга. В то же время можно надеяться, что дальнейшие изыскания приведут к уменьшению пробелов в наших современных представлениях о явлениях, происходящих в молекулах.

#### • НЕКОТОРЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ О МЕТОДЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРБИТ

Метод молекулярных орбит, разработанный Хундом и Мулликеном и развитый далее в более упрощенном виде Хюккелем, является в настоящее время наиболее доступным и широко применяется для расчета электронных свойств многоатомных молекул. Возможности применения этого метода весьма обширны; с его помощью удастся рассчитать сравнительно сложные молекулы, в частности большие плоские ароматические полициклические молекулы углеводородов, а также большие гетероциклические молекулы, имеющие важное биохимическое значение, например молекулы аминокислот, порфиринов, оснований ДНК, коферментов и т. п.

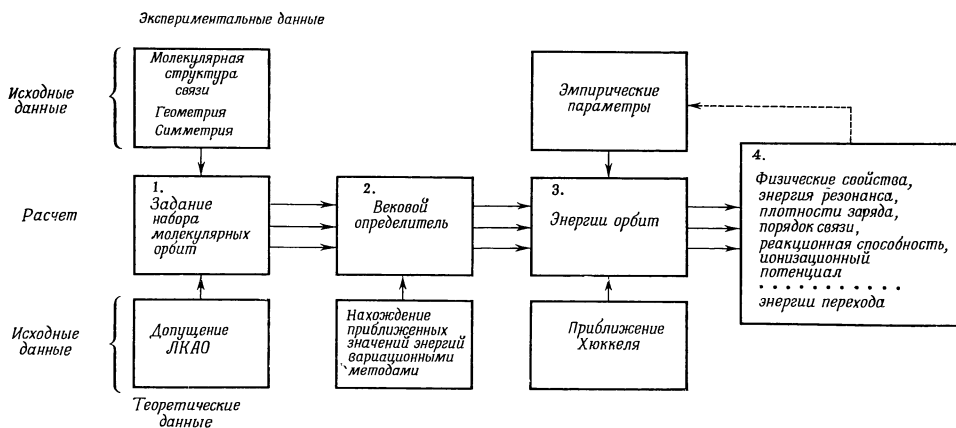
Биохимиков, не знакомых с этим методом, обычно удивляет возможность подобных расчетов (в то время как некоторые физики все еще «борются» с простыми двухатомными молекулами!). Они часто не могут себе представить также, где можно применить эти результаты, полученные с такой кажущейся легкостью (тогда как целый ряд химиков и биохимиков все еще тяготеет к старым методам постановки экспериментов!).

Развернутая схема (фиг. 1), характеризующая постановку задачи и математическую сторону ее решения по упрощенному полуэмпирическому методу молекулярных орбит, позволяет выяснить истинную сущность

отдельных этапов, входящих в процесс решения задачи. В центральной половине схемы, идущей слева направо, показаны отдельные этапы расчета. Стрелки, соединяющие отдельные части схемы, следует читать: «Действуйте в данном направлении».

Ниже основных этапов расчета указаны теоретические этапы и те приближения, которые используются при расчете. Выше же приведены главные эмпирические данные, без которых расчет не может быть выполнен.

Задачей метода молекулярных орбит для  $\pi$ -электронов является выяснение формы орбиты для каждого  $\pi$ -электрона и расчет ее энергии. Предполагается, что каждая орбита является независимой или одноэлектронной и проводится ее расчет в результирующем поле ядра и оставшихся



Фиг. 1. Развернутая схема расчета по упрощенному полуэмпирическому методу молекулярных орбит [16].

в молекуле электронов. Каждая орбита определяется как заданная в трехмерном пространстве функция, которая характеризует поверхность, охватывающую скелет сопряженных частей молекулы; такая орбита должна соответствовать симметрии молекулярного скелета. При подобной постановке задачи делается два приближения: во-первых, орбиты  $\pi$ -электронов рассматриваются независимо от  $\sigma$ -связей, которые являются основой молекулярного скелета; во-вторых, принятие одноэлектронных орбит приводит к тому, что не учитываются межэлектронные взаимодействия. Более того, принимается, что удовлетворительная форма молекулярных орбит может быть получена просто как определенная линейная комбинация атомных орбит (ЛКАО).

Коулсон [3] указал последовательные этапы вариационной процедуры; чем лучше будет принято приближение орбиты к истинной форме одноэлектронной орбиты в реальном атоме, тем ближе окажется вычисленное значение энергии этой орбиты к истинному. Хюккелевские приближения упрощают конечный определитель до такой степени, что могут быть найдены его корни, соответствующие значениям энергии данных орбит. Однако эти значения получаются в форме функции двух неизвестных параметров,  $\alpha$  и  $\beta$ ,

$$e = \alpha + k\beta.$$

Параметры  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой кулоновский и резонансный интегралы соответственно. В простейшем случае параметр  $\beta$  оценивается чисто эмпирически, а параметр  $\alpha$  не играет роли для сравнения относительных величин

энергий орбит. Значения  $\alpha$  и  $\beta$  для гетероатома должны быть оценены эмпирически, исходя из известных величин для атома углерода. Этот эмпирический подбор представляет собой циклический процесс, показанный на фиг. 1; он включает этапы 3, 4, а также этап, названный «эмпирические параметры». Некоторые физические свойства ряда известных молекул принимаются в качестве стандарта, а величины параметров для гетероатома выбираются таким образом, чтобы наиболее близко отражать физические свойства (параметр  $\beta$  для атома углерода определяется заранее). Конечно, идя по такому пути, нельзя получить никаких новых сведений о свойствах молекул. Однако при использовании наиболее хорошо установленных параметров мы можем в принципе определить или предсказать свойства других молекул. Недавно был опубликован детальный разбор отдельных этапов расчета и возможностей их усовершенствования [31].

Совершенно очевидно, что точное решение квантовомеханического уравнения Шредингера практически невозможно; следовательно, для решения задачи с помощью упрощенного метода молекулярных орбит мы вынуждены вводить целый ряд упрощающих допущений. Как указывалось ранее, к их числу относятся: предположение о существовании самих орбит, принятие одноэлектронных орбит, пренебрежение межэлектронными взаимодействиями внутри орбиты, а также взаимодействием между  $\sigma$ - и  $\pi$ -электронами. Кроме того, методу молекулярных орбит свойственна некоторая переоценка роли конфигураций ионных молекулярных орбит. Хотя и можно надеяться, что эмпирические параметры, вводимые в процессе расчета по методу молекулярных орбит, могут в какой-то мере скомпенсировать ошибки, появляющиеся при принятии перечисленных выше допущений, тем не менее трудно ожидать, чтобы столь многочисленные и качественно различные допущения могли быть скомпенсированы введением одного эмпирического параметра. Так, для целого ряда полуэмпирических параметров отличие молекулярных характеристик, полученных в результате расчета, может составлять 20% и более по сравнению с этими же характеристиками, определенными из экспериментальных данных. Наиболее близким такое совпадение может быть для специально отобранных молекул, и чем более ограничен круг физических свойств, которые мы хотим сравнивать, тем лучше будет совпадение между результатами расчета и эксперимента. Практически подобные расчеты будут наиболее достоверны для веществ, находящихся в паробразной форме, так как в этом случае не надо учитывать влияние окружающей среды.

Вообще говоря, значения, полученные в результате расчета по методу молекулярных орбит, позволяют *примерно оценить порядок* величины тех или иных молекулярных характеристик. Таким образом, хотя в ряде случаев численные значения рассчитанных величин имеют весьма низкую точность, тем не менее они могут служить для установления рационального соотношения со значениями, полученными из эксперимента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были рассмотрены возможные применения методов квантовой химии для расчета и выяснения природы тех молекулярно-электронных механизмов и процессов, которые могут иметь место в биологических явлениях. Такие важные вопросы, как теория поля лигандов, достаточно сложные и запутанные процессы внутримолекулярного электронного возбуждения и целый ряд других, не были рассмотрены в настоящей работе. Фактически размеры подобной статьи заставляют нас ограничиваться лишь самым

беглым рассмотрением вопроса. Тем не менее автор надеется, что и такое рассмотрение прольет некоторый свет на эту важную область.

Исследователю, ищущему подход к биологическим явлениям со стороны физической теории, хорошо известен некоторый пессимизм, проявленный биологами старой школы в отношении перспектив применения квантовой механики. Ясно, однако, что сейчас формируется новое поколение квантовых химиков, которые, с одной стороны, достаточно оптимистичны и обладают необходимыми знаниями и опытом для всестороннего развития приближенных квантовомеханических методов расчета больших молекул, а с другой — в достаточной мере отдают себе отчет в сложности явлений биологического мира.

Имеется ряд несомненных указаний на то, что физики будут активно участвовать в развитии биологии.

В заключение приведем ободряющее высказывание Коулсона [2]:

«Работа сама по себе будет, однако, почти неизбежно неточной или, как принято теперь говорить, полуэмпирической... Но при установлении корреляций и создании простейших моделей, на основе которых может быть достигнуто понимание тех или иных явлений, нельзя быть чрезмерно поспешными. Тернистый путь через джунгли предшествует строительству первоклассной дороги. Имеется очень большой экспериментальный материал, накопленный самими биологами, и его можно связать с теми глубокими интерпретациями биологических явлений, которые дает квантовая теория. При этом в выигрыше окажутся обе стороны: и биология и квантовая механика. Однако на самом деле все это не так просто. Биологические системы несравненно сложнее и многообразнее химических систем, создаваемых в лабораторных условиях. Награда на этом поприще безгранична — не менее, чем понимание и контроль жизненных процессов. Перспективы в этой области безграничны, вплоть до понимания и регулирования самой жизни. Но, как было сказано при нескольких иных обстоятельствах, «труден только первый шаг»; и вряд ли удастся найти разумного человека, который стал бы утверждать, что в этой области человеческих знаний квантовая химия не может внести ничего ценного».

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Beukers R., Ijlst J., Behrends W. *Rec. trav. chim.*, **77**, 729 (1958).
2. Coulson C. A., *Rev. Modern Phys.*, **32**, 170 (1960).
3. Coulson C. A., «Valence», 2nd ed. Oxford Univ. Press, London and New York, 1961.
4. Crosby G. A., Kasha M., *Spectrochim. Acta*, **10**, 377 (1958).
5. Crosby G. A., Whan R. E., *J. Chem. Phys.*, **32**, 614; *Naturwissenschaften*, **47**, 276 (1960).
6. Crosby G. A., Whan R. E., Alire R. M., *J. Chem. Phys.*, **34**, 743 (1961).
7. Davydov A. S., «Theory of Molecular Excitons» (translated by M. Kasha and M. Oppenheimer, Jr.), 175 pp. McGraw-Hill, New York, 1962.
8. Förster Th., In «Comparative Effects of Radiation» (M. Burton J. S., Kirby-Smith, and J. L. Magee, eds.), pp. 300—319, Wiley, New York, 1960.
9. Garrett C. G. B., In «Semiconductors» (N. B. Hannay, ed.) R. Reinhold, New York, 1959.
10. Hirshberg Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2304 (1956).
11. Hirshberg Y., *J. Chem. Phys.*, **27**, 758 (1957).
12. Kasha M., *Rev. Modern Phys.*, **31**, 162 (1959).

13. Kasha M., In «East Fundamental Transfer Processes in Aqueous Biomolecular Systems» (F. O. Schmitt, ed.), pp. 3—6, Mass. Inst. Tech., Cambridge, Massachusetts, 1960.
14. Kasha M., Radiation Research, Suppl., 2, 243 (1960).
15. Kasha M., In «Light and Life» (W. McElroy and B. Glass, eds.), pp. 31—64, The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1961.
16. Kasha M., J. chim. phys., 58, 914 (1961).
17. Kasha M., In «Molecular Specificity and Biological Memory» (F. O. Schmitt, ed.), Technology Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
18. Kasha M., McGlynn S. P., Ann. Rev. Phys. Chem., 7, 403 (1956).
19. Levinson G. S., Simpson W. T., Curtis W., J. Am. Chem. Soc., 79, 4314 (1957).
20. Lewis G. N., Kasha M., J. Am. Chem. Soc., 66, 2100 (1944).
21. Lewis G. N., Lipkin D., J. Am. Chem. Soc., 64, 2801 (1942).
22. Linschitz H. L., Rennert J., Korn T. M., J. Am. Chem. Soc., 76, 5839 (1954).
23. McGlynn S. P., Chem. Revs., 58, 1113 (1958).
24. McRae E. G., Kasha M., J. Chem. Phys., 28, 721 (1958).
25. Mulliken R. S., J. Am. Chem. Soc., 72, 600, 4493 (1950).
26. Mulliken R. S., J. Chem. Phys., 19, 514 (1951).
27. Mulliken R. S., J. Am. Chem. Soc., 74, 811 (1952).
28. Mulliken R. S., J. Phys. Chem., 56, 811 (1952).
29. Orgel L., Quart. Revs. (London), 8, 422 (1954).
30. Simpson W. T., Peterson D. L., J. Chem. Phys., 26, 588 (1957).
31. Streitwieser A., «Molecular Orbital Theory for Organic Chemists», 489 pp., Wiley, New York, 1961.
32. Szent-Györgyi A., Nature, 148, 157 (1941).
33. Szent-Györgyi A., «Chemistry of Muscular Contraction», 162 pp., Academic Press, New York, 1951.
34. Szent-Györgyi A., Science, 124, 873 (1956).
35. Szent-Györgyi A., «Bioenergetics», 143 pp., Academic Press, New York, 1956.
36. Szent-Györgyi A., «Introduction to a Submolecular Biology», 135 pp., Academic Press, New York, 1960.
37. Weissman S. I., J. Chem. Phys., 10, 214 (1942).
38. Тумерман Л. А., Морозов Ю. В., Ноберухин Ю. И., Биофизика, VI, 556 (1961).



## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к русскому изданию . . . . .	5
В ю р м с е р Р. Альберт Сцент-Дьёрдьи и современная биохимия . . . . .	9
Б е р н а л Дж. Биохимическая эволюция . . . . .	14
К а л ь в и н М. Возможные пути эволюции фотосинтеза и конверсии квантов . . . . .	24
Г а ф ф р о н Г. Определяющие этапы фотохимической эволюции . . . . .	49
М а к - Э л р о й У. Д., З е л и г е р Г. Г. Происхождение и эволюция билюминесценции . . . . .	74
Р и ч А. Передача биохимической информации и проблемы эволюции . . . . .	83
У о л д Дж. Почему живое вещество базируется на элементах второго и третьего периодов периодической системы? Почему фосфор и сера способны к образованию макроэргических связей? . . . . .	102
И н г р э м В. М. Биохимические аспекты генетики . . . . .	114
О ч о а С. Ферментативные механизмы передачи генетической информации . . . . .	120
П л а т т Дж. «Клетка-книга»— модель хранения и передачи генетической информации . . . . .	131
Ц у к е р к а н д л ь Э., П о л и н г Л. Молекулярные болезни, эволюция и генная разнородность . . . . .	148
Э й р и н г Г., Д ж о н с Л., С п а й к с Дж. Значение абсолютной конфигурации в оптическом вращении и катализе . . . . .	174
К о р н б е р г А. О роли фосфорилиза и пиродифосфорилиза в метаболизме . . . . .	191
К о ш л а н д Д. Катализ в живой природе и в пробирке . . . . .	202
К р е б с Х. Активность ферментов и клеточная структура . . . . .	218
Б р и л л ю э н Л. Гигантские молекулы и полупроводники . . . . .	225
К о м м о н е р Б. Является ли ДНК самовоспроизводящейся молекулой . . . . .	244
Д ю ш е н ь Ж. Некоторые физические свойства нуклеиновых кислот . . . . .	257
Э л и Д. Полупроводниковые свойства биологических молекул . . . . .	261
Г р и н Д., Ф л е й ш е р С. Молекулярная организация биологических преобразующих систем . . . . .	293
Л е н и н г е р А. Связанные с дыханием механохимические изменения в митохондриях . . . . .	326
Ш м и т т Ф. Психофизика на молекулярном и субмолекулярном уровнях . . . . .	338
Ф р и д е н Я. Роль соединений меди в природе . . . . .	354
Х а г г и н с Ч. Рак и некрозы, вызванные избирательным действием углеводов . . . . .	380
К а л ь к а р Г. Некоторые перспективы изучения действия высоких давлений в биологии . . . . .	392
К л о т ц И. Вода . . . . .	399
П ю л ь м а н А., П ю л ь м а н Б. От квантовой химии к квантовой биохимии . . . . .	420
К а ш а М. Квантовая химия в молекулярной биологии . . . . .	443

### Горизонты биохимии

Редакторы Е. П. Ребиндер и Е. Э. Казакевич  
Технический редактор В. П. Сизова

Художник Г. А. Кравцов  
Корректор Э. М. Кричевская

Сдано в производство 13/V-64 г. Подписано к печати 5/IX-64 г.  
Формат бумаги 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>=14,25 бум. л. 39,05 печ. л. Уч.-изд. л. 38,35. Изд. № 4/2308  
Цена 2 р. 89 к. Зак. 214 (Темплан 1964 г. из-ва ИЛ, пор. № 116)

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»  
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 16 «Главполиграфпрома» Государственного комитета  
Совета Министров СССР по печати. Москва, Трехпрудный пер., 9.

