

Л. А. ДРАЧЕВ, А. Д. КАУЛЕН, А. А. КОНДРАШИН,
Е. А. ЛИБЕРМАН, И. Б. НЕМЕЧЕК, С. А. ОСТРОУМОВ,
А. Ю. СЕМЕНОВ, В. П. СКУЛАЧЕВ, А. А. ЯСАИТИС

ГЕНЕРАЦИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА ЦИТОХРОМОКСИДАЗОЙ, H⁺-АТФАЗОЙ И БАКТЕРИОРОДОПСИНОМ *

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 27 V 1974)

Митчелом было высказано предположение о том, что мембраны митохондрий, хлоропластов и бактерий содержат молекулярные электрические генераторы (¹). Для обнаружения разности электрических потенциалов на мембранах органелл и бактерий были разработаны косвенные методы, основанные на измерении электрофоретического транспорта проникающих ионов, электрохромных сдвигов в спектрах каротиноидов и хлорофилла и т. п. (см. обзоры (²⁻⁶)). Генерация электрического тока биологическим генератором белковой природы впервые была измерена нами с помощью вольтметра в опытах с бактериородопсином галофильных бактерий *Halobacterium halobium*, который в смеси с раствором фосфолипидов в декане использовали для образования плоской искусственной мембраны (^{6, 7}). Попытки применить этот методический подход для получения плоской мембраны, содержащей цитохромоксидазу или митохондриальную АТФазу, транспортирующую протоны (H⁺-АТФазу), не дали положительных результатов.

В ходе дальнейших поисков был разработан более универсальный метод прямых измерений генерации мембранного потенциала мембранными белками. Прежде всего белки включали в мембрану липосом по методу Ракера и соавторов (⁸⁻¹⁰). С этой целью белки и фосфолипиды смешивали в присутствии детергента (холата), после чего холат удаляли путем диализа на холоду. Протеолипосомы, образующиеся при такой процедуре, добавляли в один из двух отсеков, разделенных плоской фосфолипидной мембраной. Добавка 30 мкг-ионов Ca²⁺, нейтрализующих отрицательные поверхностные заряды фосфолипидов, вызывала слипание плоской и протеолипосомальной мембран. Вольтметрические измерения показали, что цитохромоксидаза, H⁺-АТФаза и бактериородопсин, взаимодействующие таким образом с плоской мембраной, могут генерировать трансмембранную разность электрических потенциалов за счет использования соответствующих энергетических ресурсов.

Цитохромоксидазу выделяли по методу Йонетани (¹¹), сопрягающий фактор F₁ — по Хорстману и Ракеру (¹²), гидрофобные белки АТФазного комплекса — по Кагава и Ракеру (⁹), фрагменты мембраны, содержащие бактериородопсин — по Остерхельту и Стокениусу (¹³). Методы приготовления цитохромоксидазных и АТФазных протеолипосом (¹⁴) и бактериородопсиновых протеолипосом (¹⁵) были описаны ранее.

Разность электрических потенциалов на плоской мембране измеряли при помощи хлор-серебряных электродов, соединенных с вибраторным емкостным электрометром RFT VA-J-51 и самописцем КСП-4. Плоскую фосфолипидную мембрану готовили из раствора соевых фосфолипидов

* Эта работа была проведена в рамках проекта «Родопсин», организованного АН СССР и Московским университетом под руководством академика Ю. А. Овчинникова.

(азолектина) в декане (70 мг азолектина в 1 мл декана). Раствор азолектина наносили на отверстие диаметром 1 мм в тефлоновой перегородке, разделяющей экспериментальную ячейку на два отсека, содержащие инкубационную смесь. После образования плоской мембраны в один из отсеков добавлялись протеолипосомы. Через 15–30 мин., в течение которых достигалось соединение протеолипосом с плоской мембраной, вводился источник энергии и замерялся мембранный потенциал.

Результаты типичного опыта с цитохромоксидазными протеолипосомами представлены на рис. 1 (среда инкубации: 0,3 М сахараза, 5 мМ

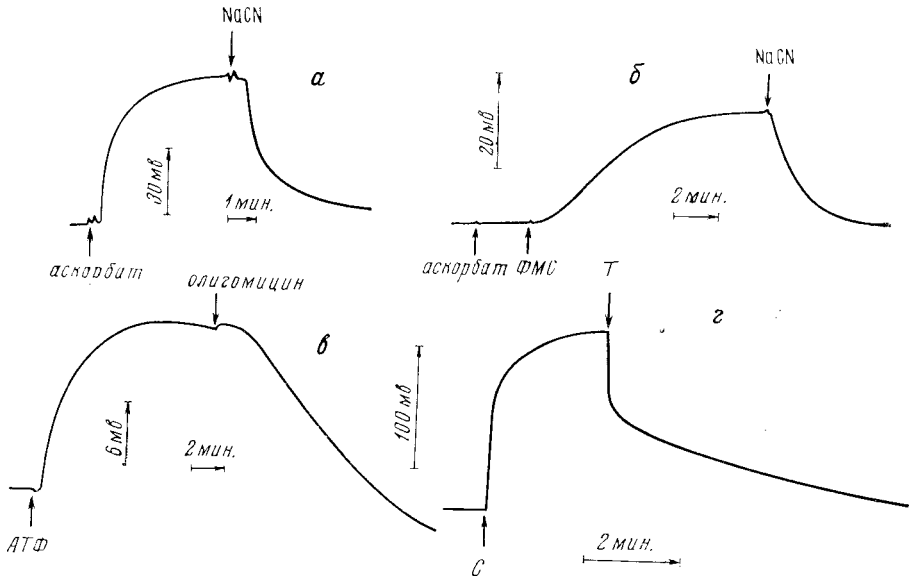


Рис. 1. Генерация трансмембранной разности электрических потенциалов цитохромоксидазой (а, б), H^+ -АТФазой (с) и бактериородопсином (д). Добавки: а – 10 мМ аскорбат (в отсек, содержащий протеолипосомы), 1 мМ NaCN (в оба отсека); б – в отсек, не содержащий протеолипосомы, 5 мМ аскорбат, 1,5 мкМ ФМС, в оба отсека 1,5 мМ NaCN; в – 2,5 мМ АТФ, 30 мкг/мл олигомицина; д – Т – темнота, С – свет. Сопротивление плоской мембраны (ом): $1,5 \cdot 10^{10}$ (а), 10^{10} (б, в), $2 \cdot 10^{10}$ (д). Ток при достижении стационарного состояния (а): $5 \cdot 10^{-12}$ (а), $2 \cdot 10^{-12}$ (б), $1,8 \cdot 10^{-12}$ (в), $7,5 \cdot 10^{-12}$ (д)

$MgSO_4$, 5 мМ трис-цитрат, рН 7,2). Как видно из рис. 1а, добавление аскорбата в отсек ячейки, содержащий цитохромоксидазные протеолипосомы (0,3 мг белка на 1 мл) и 0,1 мМ цитохром с, приводит к появлению разности электрических потенциалов на плоской мембране (положительный заряд в отсеке с протеолипосомами). Добавка цианида после аскорбата снимает этот эффект. В опыте, представленном на рис. 1б, аскорбат ($+7 \cdot 10^{-5}$ М цитохром с) и протеолипосомы (0,25 мг белка в 1 мл) добавлялись в различные отсеки ячейки (среда инкубации: 0,2 М сахараза, 0,05 М трис-НСI, рН 7,2). В этом случае появление мембранного потенциала достигалось лишь после включения в реакционную среду проникающего переносчика атомов водорода – феназинметасульфата (ФМС), причем направленность электрического поля оказалась такой же, как и в предыдущем опыте. Электрический потенциал обратной направленности (отрицательный заряд на стороне протеолипосом) появлялся в опытах с цитохромоксидазными протеолипосомами, содержащими внутри цитохром с. В этом случае также оказалось необходимым наличие ФМС в системе.

На рис. 1в представлены результаты опыта с АТФазными протеолипосомами (среда инкубации, как в опыте, представленном на рис. 1а). До-

бавление АТФ в отсек ячейки с протеолипосомами (0,3 мг белка на 1 мл) сопровождается появлением разности электрических потенциалов (отрицательный заряд на стороне протеолипосом). Эффект АТФ снимается олигомицином. Данные, представленные на рис. 1г, характеризуют генерацию электрического поля бактериородопсиновыми протеолипосомами, индуцируемую светом (среда инкубации: 0,2 M сахараза, 5 мМ трис-НСI, рН 7,2, 0,2 мг белка на 1 мл). В этом случае отрицательный заряд также оказался на стороне протеолипосом, причем мембранный потенциал исчезал в темноте.

Во всех рассмотренных случаях добавление разбавителя — протонофора трихлоркарбонилцианидфенилгидразона или шунтирование плоской мембраны посредством параллельного включения сопротвления резко понижало электрические ответы и ускоряло падение мембранного потенциала после прекращения подачи энергетического ресурса.

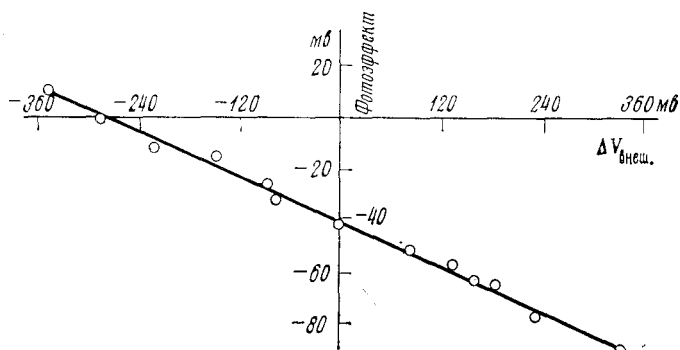


Рис. 2. Зависимость между бактериородопсиновым фотоэффектом и внешним ΔV . Среда инкубации: 0,3 M сахараза, 0,09 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 мМ трис-НСI, рН 7,2. В один из отсеков добавлены бактериородопсиновые протеолипосомы (0,1 мг белка на 1 мл).

Величина мембранного потенциала в наших опытах колебалась в зависимости от условий опытов и типа протеолипосом. Максимальные значения в случае цитохромоксидазы достигали 110 мВ, в случае бактериородопсина 150 мВ. В опытах с АТФазными протеолипосомами величины мембранного потенциала были всегда ниже, а также требовалось больше времени для слипания протеолипосом и плоской мембраны. Последнее обстоятельство может быть следствием сложного профиля поверхности АТФазных протеолипосом, покрытых выступающими структурами фактора F_1 .

В силу наиболее высоких значений мембранного потенциала и простоты процедуры введения энергетического ресурса (света) бактериородопсиновая система была выбрана в качестве объекта дальнейших исследований. В частности, были проведены измерения зависимости фотоэффекта от величины трансмембранной разности электрических потенциалов, генерируемой внешним источником тока $\Delta V_{\text{внеш}}$. Оказалось (рис. 2), что величина фотоэффекта понижается при совпадении знаков $\Delta V_{\text{внеш}}$ и фото-э.д.с. и повышается в случае противоположной направленности $\Delta V_{\text{внеш}}$ и фото-э.д.с. При определенном значении $\Delta V_{\text{внеш}}$ фотоэффект оказывается равным нулю. При условии одинаковой ориентации всех бактериородопсиновых генераторов $\Delta V_{\text{внеш}}$ будет соответствовать величине фото-э.д.с. бактериородопсина. Величина фото-э.д.с. должна быть больше этого значения в случае обратной ориентации части бактериородопсиновых генераторов. Согласно данным рис. 2, фото-э.д.с. бактериородопсина ≥ 300 мВ.

Представляется вероятным, что описанные выше электрические ответы являются результатом функционирования протеолипосом, определен-

ным образом ассоциированных с поверхностью плоской фосфолипидной мембраны. Слипание протеолипосом с плоской мембраной оказывается необратимым. Так, опыты с бактериородопсиновой системой показали, что появившийся фотоэффект сохраняется после замены инкубационной смеси с протеолипосомами на раствор без протеолипосом.

Можно предположить, что протеолипосомы (например, цитохромоксидазные), прилипшие к плоской мембране, катализируют перенос электронов от наружного аскорбата к кислороду внутри протеолипосом. В результате этого внутренний отсек протеолипосом заряжается отрицательно. При этом ионы H^+ или другие катионы перемещаются по электрическому градиенту внутрь протеолипосом из того же отсека, в котором окисляется аскорбат, или из отсека, локализованного по другую сторону плоской мембраны. Последний эффект должен привести к появлению разности электрических потенциалов на плоской мембране.

Опыты, проведенные с протеолипосомами различных типов, показали, что в отсеке, не содержащем протеолипосомы, знак заряда всегда соответствует знаку заряда внутри протеолипосом. Так, цитохромоксидазные протеолипосомы, содержащие внутри цитохром с, АТФазные и бактериородопсиновые протеолипосомы, генерируют положительные заряды внутри протеолипосом, а цитохромоксидазные протеолипосомы с добавленным снаружи цитохромом с — отрицательные заряды (¹⁴, ¹⁵). Соответственно, протеолипосомы первых трех типов вызывают появление положительного заряда, а последние — отрицательного заряда в отсеке, не содержащем протеолипосомы.

Авторы выражают благодарность академикам Ю. А. Овчинникову, С. Е. Северину за полезные советы и обсуждение, проф. Л. П. Каюшину и Л. Н. Чекулаевой — за предоставление клеток *Halobacterium halobium*.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 IV 1974

Институт проблем информации
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Mitchell, *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*, Bodmin, Glynn Research, 1966. ² G. D. Greville, *Current Topics in Bioenergetics*, v. 3, 1 (1969). ³ В. П. Скулачев, Д. К. Ясайгуене, Научн. докл. высш. школы, Биол. науки, № 9, 27 (1971). ⁴ V. P. Skulachev, *Current Topics in Bioenergetics*, v. 4, 127 (1971). ⁵ В. П. Скулачев, Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», 1972. ⁶ В. П. Скулачев, Усп. совр. биол., т. 77, 125 (1974). ⁷ L. A. Drachev, A. D. Kaulen et al., *FEBS Letters*, v. 39, 43 (1974). ⁸ Y. Kagawa, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, v. 246, 5477 (1971). ⁹ E. Racker, *J. Membrane Biol.*, v. 10, 221 (1972). ¹⁰ Y. Kagawa, *Biochim. et biophys. acta*, v. 265, 297 (1972). ¹¹ T. Yonetani, In: *Methods in Enzymology*, v. 10, N. Y., 1967, p. 332. ¹² L. L. Horstman, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, v. 245, 1336 (1970). ¹³ D. Oesterhelt, W. Stoerkenius, *Nature, New Biol.*, v. 233, 149 (1971). ¹⁴ A. A. Jasaitis, I. B. Nemecek et al., *Biochim. et biophys. acta*, v. 275, 485 (1972). ¹⁵ L. P. Kayushin, V. P. Skulachev, *FEBS Letters*, v. 39, 39 (1974).