

Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ, Л. И. БОГУСЛАВСКИЙ, А. Г. ВОЛКОВ,
А. Б. РАХМАНИНОВА

**СИНТЕЗ АТФ, СОПРЯЖЕННЫЙ С ФУНКЦИОНИРОВАНИЕМ
МЕМБРАННЫХ ПРОТОННЫХ ПОМП НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА
ОКТАН/ВОДА**

(Представлено академиком А. Н. Фрумкиным 20 XII 1974)

В настоящей работе осуществлен синтез АТФ при работе очищенной АТФазы, адсорбированного на границе раздела октан/вода. Поток протонов через АТФсинтетазный комплекс из октана в воду обеспечивался созданием избыточной (относительно равновесной) концентрации недиссоциированной или льюисовой формы кислоты в фазе октана. Это достигалось тремя способами: прямым добавлением кислоты — пентахлорфенола (ПХФ) в октан, за счет работы НАД-Н-феррицианидредуктазы дыхательной цепи субмитохондриальных частиц (с.м.ч.), полученных из митохондрий сердца быка, а также за счет бактериородопсиновых бляшек из *Halobacterium Halobium* (1). Во всех случаях эффективными оказались только частицы, прилипшие к границе раздела октан/вода. Количество образовавшегося АТФ определяли флюориметрически глюкозо-6-фосфатдегидрогеназным методом (2). Среда содержала 2 мл фосфатного буфера (20 м KH_2PO_4 , рН 7,5), 20 мМ глюкозы, 2 мМ MgSO_4 , 40 мкг гексакиназы, 1 мл октана. Площадь поверхности раздела фаз 3 см². Через 1 мин. после добавления белка в водную фазу добавляли АДФ, через 5—10 сек. после АДФ в октан вводили 0,02 мл $5 \cdot 10^{-3}$ М раствора ПХФ в октане. Через 1 мин. после до-

Таблица 1

Результаты опытов по синтезу АТФ на границе раздела фаз октан/вода за счет создания избыточной концентрации пентахлорфенола в октане

АТФаза	Условия опыта	Количество АТФ в пробе, 10^{-9} мол/мл	Количество синтезированного АТФ, 10^{-9} мол/мл
Олигомицинчувствительная АТФаза (2), 100 мкг/мл + АДФ 10^{-4} М	—ПХФ	3,1	1,2
	+ПХФ	4,2	
	+ПХФ+	2,8	
	+олигомицин		
Растворимая митохондриальная АТФаза (3), до тепловой обработки 130 мкг/мл + АДФ $3 \cdot 10^{-5}$ М	—ПХФ	2,5	1,1
	+ПХФ	3,7	
Очищенная растворимая митохондриальная АТФаза (F ₁) 50 мкг/мл + АДФ $2 \cdot 10^{-5}$ М	—ПХФ	0,2 *	0,1
	+ПХФ	0,1 *	
	—ПХФ	0,2 **	
	+ПХФ	0,3 **	

* В присутствии ПХФ происходит активация АТФазной активности F₁, что приводит к уменьшению количества АТФ в пробе.

** Для увеличения выхода АТФ после добавления АТФазы водный слой в количестве 1,8 мл отсасывали пипеткой для удаления избытка белка, который мог бы гидролизировать образовавшуюся АТФ. Затем добавляли свежую среду и проводили синтез.

бавления АДФ реакцию останавливали хлорной кислотой. В контрольных опытах из системы были исключены ПХФ и октан. Результаты этих опытов приведены в табл. 1, из которой видно, что в контрольных опытах присутствует АТФ как примесь в использованных препаратах, а также происходит образование АТФ согласно уравнению



в результате присутствия миокиназ в использованных ферментах. В полной системе количество образовавшегося АТФ на 30—50% больше, чем в контрольных опытах, где не был добавлен ПХФ или октан. Ошибка экс-

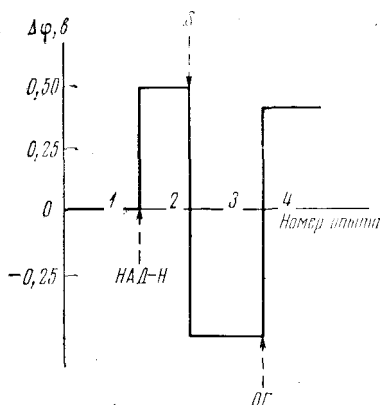


Рис. 1

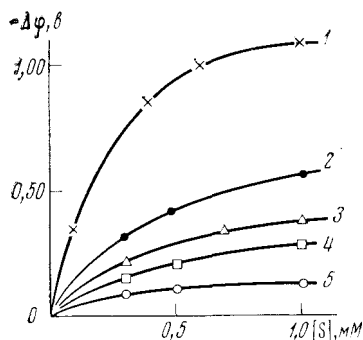
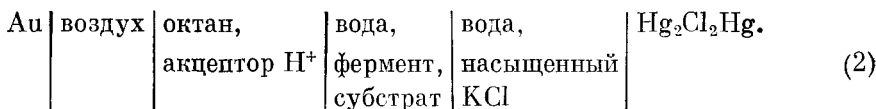


Рис. 2

Рис. 1. Изменение вольта-потенциала, измеренного в цепи (2), при добавлении следующих веществ: НАДН; ОГ — олигомицин, S—АДФ+Фн. 1—4 — номера опытов

Рис. 2. Зависимость вольта-потенциала, измеренного в цепи (2) от концентрации субстрата S(АДФ+Фн). Состав инкубационной среды: 50 мМ трис-НСl, рН 7,9+1 мМ ДНФ. 1—0,1 мг/мл с.м.ч. (2) + 2,5 мг/мл ротенона + 0,1 мМ НАД-Н + +1 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ + 1 мМ MgSO_4 + 0,1 мг/мл олигомицинчувствительной АТФазы. 2—0,05 мг/мл бактериородопсиновых бляшек + 0,01 мг/мл растворимой АТФазы. 3—5—0,1 мг/мл с.м.ч. (8) + 0,1 мг/мл олигомицинчувствительной АТФазы + 2,5 мг/мл ротенона + 1 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ + 1 мМ MgSO_4 . Концентрация НАД-Н: 3—0,1 мМ; 4—0,05 мМ; 5—0,01 мМ

перимента составляла не более 10%. В опытах с олигомицинчувствительной АТФазой ингибитор АТФсинтазы — олигомицин снижает уровень АТФ до контрольной величины. Во второй серии опытов мы использовали результаты работ (4—7), в которых было показано, что ряд ферментных систем, помещенных на границу раздела октан/вода и функционирующих за счёт работы химических реакций, способен создавать избыточную концентрацию зарядов (протонов, электронов) в октане при наличии в нем акцепторов этих частиц. Возникновение избытка положительных или отрицательных частиц в неводной фазе приводило к появлению дополнительного скачка потенциала соответствующего знака, регистрируемого в цепи измерения вольта-потенциала



Избыточная концентрация кислоты в этом случае создавалась при работе на границе раздела фаз ферментов начального участка дыхательной цепи митохондрий при протекании реакции окисления НАД-(Н) феррицианидом. Для этого с.м.ч., выделенные по методикам (2, 7), вносили в систему октан/вода. Туда же добавлялась одна из исследуемых АТФаз и ротенон — ингибитор НАД-Н-оксидазы, прекращающей дыхание и, соответственно, синтез АТФ в с.м.ч.

Представлялось интересным использовать вместо с.м.ч. другую протонную помпу, например, бактериородопсиновые бляшки. Как показано нами ранее (⁴), бактериородопсиновые бляшки, выделенные из *Halobacterium Halobium* также способны к переносу H^+ из воды в октан под действием света. Синтез АТФ на межфазной границе обнаруживали по уменьшению величины вольта-потенциала, измеренного в цепи (2), при добавлении в систему АДФ+ Φ_n . Для опытов использовали равновесные системы октан/вода, содержащие 50 мМ трис-НСl, 1 мМ 2,4-динитрофенола (ДНФ). Подробно методика измерения вольта-потенциала методом вибрирующего конденсатора описана ранее в работах (⁴, ⁷, ¹⁰).

В опыте 1 (рис. 1) система содержала 0,1 мг/мл олигомицинчувствительной АТФазы+0,1 мг/мл с.м.ч.+2,5 мкг/мл ротенона+1 мМ ДНФ+50 мМ трис-НСl+1 мМ $K_3Fe(CN)_6$ +1 мМ $MgSO_4$, рН 7,9. Вольта-потенциал в этом состоянии принят за 0. При добавлении 0,2 мМ НАД-Н (опыт 2) в цепи (2) наблюдалось положительное заряджение фазы октана. Последующее добавление 1 мМ АДФ и 1 мМ фосфата (Φ_n) приводило к сдвигу вольта-потенциала в отрицательную сторону (опыт 3 рис. 1). Добавление олигомицина (опыт 4 рис. 1) практически полностью обращает действие АДФ и фосфата при наличии в системе олигомицинчувствительной АТФазы и не влияет при использовании растворимой митохондриальной АТФазы. В качестве контрольных были поставлены следующие опыты. 1. Из полной системы исключена олигомицинчувствительная АТФаза. В этих условиях добавление АДФ и Φ_n не меняет величины вольта-потенциала. 2. Из полной системы исключены с.м.ч. При этом добавление АДФ и Φ_n также не изменяет вольта-потенциала в цепи (2). 3. Из полной системы исключен НАД-Н. Наблюдается очень небольшое (не более 25 мВ) изменение потенциала при добавлении 1 мМ АДФ и 1 мМ Φ_n . 4. Из полной системы исключен Φ_n . Наблюдается очень небольшое (30 мВ) уменьшение потенциала от добавления АДФ. На рис. 2 представлена зависимость величины вольта-потенциала от концентрации субстрата АДФ+ Φ_n . Опыты проводились на с.м.ч., выделенных по методу (⁸) (кривая 1) и на с.м.ч., полученных по (²) (кривые 3—5) при разном содержании НАД-Н, а также на бактериородопсиновых бляшках (кривая 2). При добавлении АДФ+ Φ_n происходит сброс потенциала в системе с функционирующими протонными помпами. На рис. 1 это соответствует переходу от опыта 2 к опыту 3. За 0 приняты значения потенциалов в опыте 2. Как следует из рис. 2, величина сброса потенциала возрастает при увеличении концентрации НАД-Н.

Очевидно, что положительное заряджение фазы октана при добавлении НАД-Н в опыте 2 на рис. 1 объясняется тем, что растворенный в октане ДНФ выступает в роли основания Льюиса. Наблюдаемый сдвиг вольта-потенциала в отрицательную сторону после добавления АДФ и Φ_n может быть обусловлен только переносом протонов из октана в воду. Если бы в этом процессе принимала участие только льюисовская заряженная форма кислоты, потенциал был бы равен или больше, чем исходное значение, полученное в опыте 1 (рис. 1).

В качестве протоннонов в октан поступают наряду с протонами анионы ДНФ⁻. В октане, где диэлектрическая проницаемость равна 2, это равносильно созданию избытка кислоты нейтральной формы. Наблюдаемое в эксперименте изменение знака потенциала в отрицательную сторону должно означать, что синтез АТФ осуществляется также за счет отрыва протона от нейтральной формы ДНФ. В этом случае избыточное количество анионов ДНФ⁻ остается в неводной фазе, приводя к дополнительному отрицательному заряджению октана. Для проверки последнего предположения вместо ДНФ в качестве акцептора протонов в неводной фазе был использован *o*-диметоксибензол, который неспособен давать анионную форму при отщеплении захваченного протона. В этом случае при добавлении НАД-Н к системе, содержащей растворимую митохондриальную АТФазу и с.м.ч., потенциал сдвигается в положительную сторону на 0,2 в, однако при добав-

лении 2 мМ АДФ и Φ_n потенциал возвращается к фоновому значению, но не наблюдается сдвига скачка потенциала в отрицательную сторону даже при больших концентрациях АДФ и Φ_n .

Как показали опыты, при включении света, бактериородопсиновые бляшки генерируют на границе раздела фаз октан/вода скачок потенциала, равный 0,52 в, но при включении АТФсинтетазной реакции потенциал возвращается к фоновому значению. Предлагаемая нами трактовка экспериментальных данных по измерению вольта-потенциала в цепи (2) подтверждается прямыми опытами по определению количества синтезированного АТФ за счет создания избытка нейтральной формы кислоты в фазе октана (табл. 1). Ниже предложены схемы действия АТФсинтетазы на границе раздела фаз на основании изложенных выше экспериментальных данных.

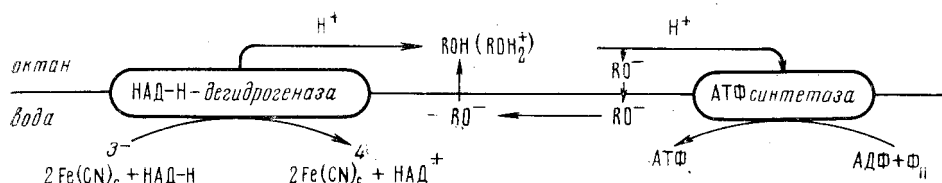


Схема синтеза АТФ на границе раздела фаз октан/вода за счет работы окислительно-восстановительной реакции

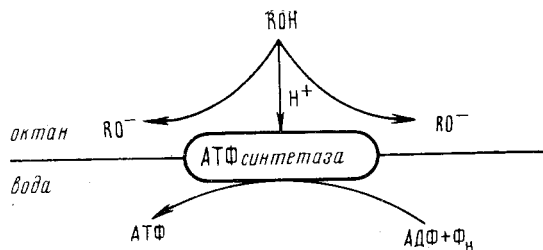


Схема синтеза АТФ на границе раздела фаз октан/вода за счет избытка (сверх равновесного) нейтральной формы кислоты в фазе октана

Полученные данные показывают, что для синтеза АТФ достаточно создать повышенную по сравнению с равновесной концентрацию кислоты в неводной фазе гетерогенной системы. Наличие трансмембранного потенциала не является необходимым условием для протекания реакции синтеза АТФ, которая осуществляется АТФ-синтетазным комплексом митохондрий.

Авторы выражают благодарность академику А. Н. Фрумкину, чл.-корр. АН СССР В. П. Скулачеву, И. А. Козлову за обсуждение работы.

Институт электрохимии
Академии наук СССР

Поступило
16 XII 1974

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ O. Oesterhelt, W. Stoerkenius. *Nature New Biol.*, v. 233, 149 (1971).
- ² J. Kagawa, E. Racker. *J. Biol. Chem.*, v. 246, 5477 (1973).
- ³ K. Maitra, K. Estabrook. *Arch. Biochem.*, v. 7, 472 (1964).
- ⁴ Л. И. Богуславский, А. Г. Волков и др., *ДАН*, т. 218, 963 (1974).
- ⁵ Ю. И. Харкац, А. Г. Волков, Л. И. Богуславский. *ДАН*, т. 220, 1441 (1975).
- ⁶ А. Г. Волков, В. Т. Ложкин, Л. И. Богуславский, *ДАН*, т. 220, 1207 (1975).
- ⁷ L. J. Boguslavsky, A. A. Kondrashin et al., *FEBS Letters*, in press.
- ⁸ M. Hausen, A. L. Smith, *Biochim. et biophys. acta*, v. 81, 214 (1964).
- ⁹ L. L. Horstman, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, v. 245, 1336 (1970).
- ¹⁰ В. Г. Бойцов, Л. И. Богуславский, *Электрохимия*, т. 3, 377 (1966).