

Т. Н. БЕЛЯКОВА, Ю. П. КАДЗЯУСКАС,
член-корреспондент АН СССР В. П. СКУЛАЧЕВ, И. А. СМЕРНОВА,
Л. Н. ЧЕКУЛАЕВА, А. А. ЯСАЙТИС

ГЕНЕРАЦИЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ИОНОВ H^+ И ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В КЛЕТКАХ *HALOBACTERIUM HALOBIVM*

Нами было показано (¹⁻⁵), что бактериородопсиновый комплекс, выделенный из галофильных бактерий *Halobacterium halobium* и встроенный в искусственную фосфолипидную мембрану, может функционировать в качестве молекулярного генератора тока, превращающего энергию света в электрическую форму. Исследования механизма фотоэлектрического эффекта показали, что он обусловлен светозависимым электрогенным переносом ионов H^+ , направленным поперек мембраны (см. также (⁶⁻⁹)).

В настоящем сообщении будут представлены результаты, свидетельствующие о функционировании светозависимых систем электрогенного транспорта протонов и синтеза АТФ в интактных клетках *H. halobium*. Будет показано также, что клетки *H. halobium* располагают темновыми механизмами откачки протонов из внутри- во внеклеточное пространство. Один из темновых механизмов, чувствительный к дициклогексилкарбодимиду (ДЦКД) и не требующий кислорода, представляет собой, по-видимому, H^+ -АТФазу (источник энергии — гликолитический АТФ). Другой темновой механизм действует только в присутствии O_2 и нечувствителен к ДЦКД. Можно полагать, что это — дыхательная цепь, включающая три пункта энергетического сопряжения (величина H^+/O достигает 5).

Опыты проводили на клетках *H. halobium* R₁ (питамм любезно предоставлен проф. У. Стокениусом) в основной солевой среде состава: 4,3 М NaCl, 0,167 М MgCl₂, 0,027 М KCl, 0,012 М цитрат натрия, pH 7,2. Клетки инкубировали в аэробной или продутой аргонем основной среде при 30°.

Концентрацию ионов H^+ в среде инкубации измеряли рН-метром, снабженным самописцем. Концентрацию ионов тетрафенилфосфония и фенилдикарбаундекаборана измеряли при помощи фосфолипидной мембраны, применяемой в качестве селективного электрода (¹⁰). Величину отношения H^+/O рассчитывали по методу Митчела и Мойл (¹¹), добавляя кислород в виде аэробного раствора 0,15 М KCl.

Для измерения фотофосфорилирования клетки инкубировали анаэробно в основной среде в темноте в течение 15 мин., после чего освещали в течение 15 мин. Температура инкубации 35°. Реакцию прекращали быстрым охлаждением в смеси лед — хлористый натрий, клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин. при —40°. Полученный осадок экстрагировали 0,5 М HClO₄, экстракт нейтрализовали 2 N KOH — 0,1 М трис-HCl и содержание АТФ в растворе определяли флуориметрически, используя ферментативные системы тексокиназа + глюкоза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа + НАДФ. Для определения АТФ люциферин-люциферазным методом инкубацию и экстракцию клеток проводили по методике (¹²). Концентрацию белка определяли биуретовым методом после предварительного удаления пигментов экстракцией смесью метанол : ацетон = 1 : 1.

Результаты, представленные на рис. 1, показывают, что добавление O_2 в анаэробную среду инкубации клеток *H. halobium* сопровождается подкислением среды, которое вскоре сменяется подщелачиванием. Возрастающие амплитуды ответа при увеличении концентрации O_2 свидетельствует о том, что подщелачивание обусловлено исчерпанием O_2 в среде. Величины отношения H^+/O , рассчитанные по методу Митчела и Мойл (¹¹), до-

стигают 5,1 при низкой концентрации O_2 и во всех случаях превышают 4. Это позволяет предполагать, что дыхательная цепь, ответственная за аэробное выделение ионов H^+ клетками *N. halobium*, содержит по крайней мере три пункта энергетического сопряжения. Обязательным компонентом реакционной среды, позволяющим получить стабильные и высокие значения H^+/O , оказались проникающие катионы, например тетрафенилфосфоний ($ТФФ^+$). Этот эффект хорошо объясняется превращением электрической составляющей мембранного потенциала $\Delta\psi$ в осмотическую $\Delta\pi$, что способствует аккумуляции катионов в митохондриях или бактериях (^{11, 13}).

При внесении бактериальных клеток в аэробную среду инкубации наблюдается довольно длительное и значительное по амплитуде подкисление среды (рис. 2а). Этот процесс полностью обращается низкими концентрациями разбавителя — протонофора 2,4-дихлорметоксикарбонилцианидфенилгидрозола (ХКФ). Последующее освещение суспензии сопровождается подкислением среды, обратимым в темноте и чувствительным к более вы-

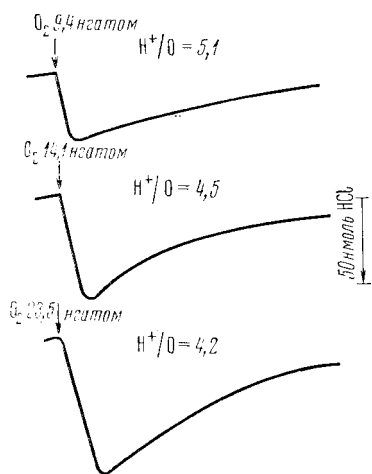


Рис. 1

Рис. 1. Выделение ионов H^+ клетками *N. halobium* в анаэробную среду инкубации в ответ на пульс O_2 . До пульса O_2 клетки (1,5 мг белка в 1 мл), выращенные в темноте, инкубировались 30 мин. в деаэрированной основной среде, дополненной $7,5 \cdot 10^{-5}$ М $ТФФ^+$ и $3 \cdot 10^{-4}$ М ДЦКД

Рис. 2. Светозависимое выделение ионов H^+ клетками *N. halobium* в аэробных условиях. Клетки, выращенные в темноте, добавлены в основную среду инкубации, дополненную $5 \cdot 10^{-5}$ М (а) и 10^{-4} М (б) $ТФФ^+$. Содержание белка 2 мг (а) и 1 мг (б) в 1 мл

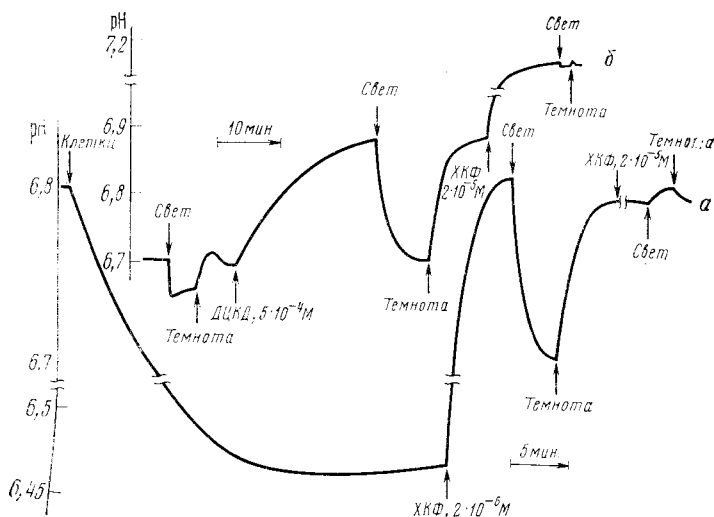


Рис. 2

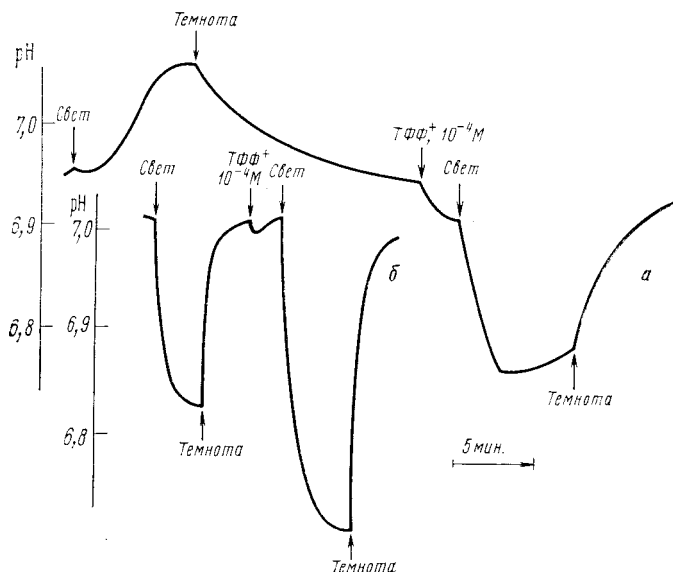


Рис. 3

Рис. 3. Светозависимые изменения рН в анаэробной среде инкубации клеток *H. halobium*. Клетки (2,3 мг белка в 1 мл), выращенные в темноте, инкубировали 30 мин. в деаэрированной среде в отсутствие (а) или в присутствии (б) $6 \cdot 10^{-4}$ М ДЦКД

Рис. 4. Светозависимый транспорт ионов ФКБ^- и ТФФ^- клетками *H. halobium*. Клетки (1,7 (а) и 2,6 (б) мг белка в 1 мл, выращенные на свету, инкубировали аэробно в основной среде инкубации, дополненной 10^{-6} М ФКБ^- (а) или 10^{-4} ТФФ+ (б). Изменения концентрации ионов — в относительных единицах

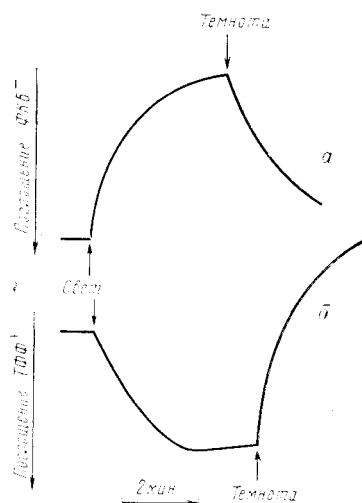


Рис. 4

соким концентрациям ХКФ. Существенно, что начальное (темновое) подкисление среды частично обращается также ингибитором мембранных H^+ -АТФаз ДЦКД (рис. 2б), который в этой концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ М) не влияет на интенсивность потребления кислорода клетками. Светозависимая протонная помпа оказывается устойчивой к действию ДЦКД. Эти наблюдения позволяют предполагать, что аэробное темновое подкисление среды инкубации есть результат функционирования протонных помп двух типов: дыхательной цепи и чувствительной к ДЦКД мембранной H^+ -АТФазы, использующей гликолитический АТФ. Тот факт, что низкие концентрации разобщителя ХКФ предотвращают образование градиента рН, генерируемого в темноте за счет дыхания и гликолиза, но не способны полностью снять ΔpH на свету, свидетельствует о большей мощности светозависимого генератора по сравнению с дыхательной цепью и мембранной АТФазой, вместе взятыми.

Освещение суспензии клеток, преинкубированных в анаэробных условиях, вызывает после небольшой задержки подщелачивание среды инку-

Таблица 1
Светозависимый синтез АТФ клетками
H. halobium

№ опыта	Свет	Свет, ХКФ	Свет, ДЦКД
1	+80	-40	-40
2	+20	-23	-10

Примечание. Приведены изменения уровня АТФ в клетках в процентах относительно содержания АТФ в темноте в присутствии 5 мМ NaCN. Темновой уровень АТФ в опыте № 1—0,5 ммоль на 1 г белка (глюкозо-6-фосфогидрогеназный метод), в опыте № 2—8,8 ммоль на 1 мг белка (люциферин-люциферазный метод).

обнаруженном в работе Стокениуса⁽¹¹⁾. Из данных табл. 1 видно, что освещение анаэробной суспензии бактериальных клеток сопровождается повышением уровня эндогенного АТФ.

Чувствительность процесса к ДЦКД и ХКФ указывает на то, что фотофосфорилирование обеспечивается действием H^+ -АТФазы, использующей электрохимический потенциал H^+ .

В заключительной серии опытов было показано, что освещение сопровождается поглощением клетками катионов ТФФ⁺ и выделением из клеток анионов фенилдикарбаундекаборана (ФКБ⁻) в среду инкубации (рис. 4). Именно таких соотношений следовало ожидать, если предположить, что светозависимое подкисление среды инкубации обусловлено электрогенным переносом протонов из внутри- во внеклеточное пространство, в результате чего внутренний объем клетки заряжается отрицательно. Тот факт, что светозависимые ответы проникающих ионов обнаруживаются в аэробных условиях, указывает на более высокую эффективность светозависимого генератора мембранного потенциала по сравнению с генераторами дыхательной цепи и мембранной АТФазной системы.

Результаты, представленные в настоящем сообщении, свидетельствуют о функционировании бактериородопсинового комплекса в клетках *H. halobium* как генератора, трансформирующего энергию света в энергию трансмембранного электрохимического градиента ионов H^+ , который, в свою очередь, может служить источником энергии для транспорта ионов и фосфорилирования эндогенного фонда адениннуклеотидов. Следовательно, светозависимая электрогенная функция бактериородопсинового комплекса, обнаруженная в модельных экспериментах⁽¹⁻⁵⁾, реализуется в интактных бактериальных клетках как функциональная основа аккумуляции солнечной энергии в процессе «бесхлорофильного» фотосинтеза.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
17 IV 1975

Вильнюсский государственный университет

Институт биофизики Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. П. Скулачев, Усп. совр. биол., т. 77, 125 (1974).
- ² В. П. Скулачев, Вестн. АН СССР, т. 3, 47 (1974).
- ³ L. A. Drachev, A. D. Kaulen et al., FEBS Letters, v. 39, 43 (1974).
- ⁴ Л. А. Драчев, А. Д. Каулен и др., ДАН, т. 218, 481 (1974).
- ⁵ Е. Л. Барский, Л. А. Драчев и др., Биоорг. химия, т. 1, 120 (1975).
- ⁶ D. Osterhelt, W. Stoerkenius, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 70, 2853 (1973).
- ⁷ D. Osterhelt, B. Hess, Europ. J. Biochem., v. 37, 316 (1973).
- ⁸ E. Racker, W. Stoerkenius, J. Biol. Chem., v. 249, 662 (1974).
- ⁹ L. P. Kayushin, V. P. Skulachev, FEBS Letters, v. 39, 39 (1974).
- ¹⁰ L. L. Grinius, A. A. Jasaitis et al., Biochim. et biophys. acta, v. 216, 1 (1970).
- ¹¹ P. Mitchell, J. Moyle, Europ. J. Biochem., v. 7, 471 (1969).
- ¹² A. Danon, W. Stoerkenius, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 71, 1234 (1974).
- ¹³ P. B. Scholes, P. Mitchell, J. Bioenergetics, v. 1, 61 (1970).