

Ю. В. ЕВТОДИЕНКО, Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АТФазы МИТОХОНДРИЙ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МИЦЕЛЛАМИ. ИНДУКЦИЯ ПРОВОДИМОСТИ ИОНОВ ВОДОРОДА

(Представлено академиком Г. М. Франком 8 IV 1975)

В настоящее время в области биоэнергетики проводятся исследования механизма окислительного фосфорилирования на модельных системах, реконструированных из отдельных компонентов АТФ-синтезирующей системы. Значительного успеха в этом направлении достиг Ракер, который в суспензии протеолипосом, содержащих цитохромоксидазу, АТФазу и сопрягающие факторы, впервые наблюдал синтез АТФ ⁽¹⁾. Согласно существующим представлениям о механизме окислительного фосфорилирования, существенным этапом синтеза АТФ в митохондриях является перенос иона водорода через мембрану и его взаимодействие с АТФ-синтетазой. Однако компонент, транспортирующий ионы водорода через мембрану, до сих пор не идентифицирован. В связи с этим в настоящей работе исследована возможность индукции водородной проницаемости липосомальных мембран при встраивании изолированной растворимой АТФазы митохондрий в липосомы.

Липосомы с высоким содержанием ионов K^+ получали путем диализа смеси азолектина и холата в растворе 0,1 М сульфата калия при рН 7,5. Диализ и очистку азолектина проводили по прописям, приведенным в работе Кагавы и Ракера ⁽²⁾. После окончания диализа липосомы преинкубировали в течение 10 мин. в присутствии 0,002 М АТФ с растворимой АТФазой, выделенной из митохондрий печени крысы по методу Шипакина и др. ⁽³⁾. Полученные протеолипосомы пропускали через колонку, заполненную сефадексом G-100 и насыщенную раствором 0,3 М сахарозы и 0,005 М трис-буфером при рН 7,5 и температуре 4°. Контрольный препарат липосом, не содержащий АТФазы, подвергали аналогичной обработке. Ионную проницаемость липосом определяли при 25° путем синхронного измерения активности ионов K^+ и H^+ во внешней среде ионселективными электродами.

Условия описываемых опытов были выбраны таким образом, что на мембране липосом существовал значительный градиент ионов K^+ . В этих условиях при добавлении валиномицина на мембране липосом возникал электрический потенциал, который мог индуцировать электрофорез ионов H^+ внутрь липосом при наличии водородной проницаемости мембраны.

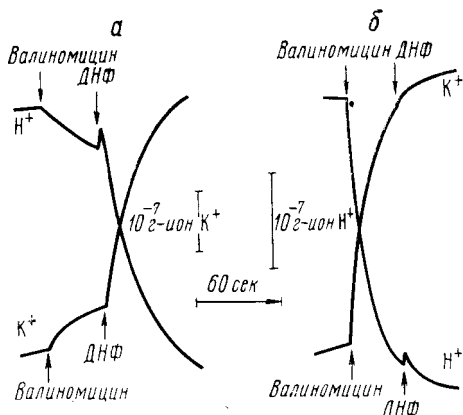


Рис. 1. Транспорт ионов K^+ и H^+ в суспензии липосом (а) и протеолипосом, содержащих АТФазу (б). Исследуемые пробы содержали 25 мг фосфолипидов в 2 мл. В моменты времени, отмеченные стрелками, были добавлены 1 мкг валиномицина или $2 \cdot 10^{-7}$ г-мол. ДНФ

В суспензии контрольных липосом (рис. 1а) после добавления валиномицина наблюдается незначительный вход ионов H^+ в липосомы и выход ионов K^+ во внешнюю среду. Добавление протонифера 2,4-динитрофенола (ДНФ) приводит к резкому увеличению скорости выхода ионов K^+ и входа ионов H^+ . Таким образом, мембрана контрольных липосом обладает относительно низкой проницаемостью по ионам H^+ , которая лимитирует скорость индуцированного валиномицином выхода ионов K^+ .

В отдельном опыте добавки ДНФ и валиномицина были сделаны в обратном порядке. Было показано, что добавление ДНФ к суспензии липосом не приводит к выходу ионов K^+ , несмотря на существование градиента ионов K^+ на мембране.

Исследование проницаемости липосом, инкрустированных АТФазой, показало, что протеолипосомы обладают высокой H^+ -проницаемостью. При добавлении валиномицина происходит быстрый выход ионов K^+ и сопряженный вход ионов H^+ в липосомы (рис. 1б). Последующее добавление ДНФ практически не изменяет концентрации ионов K^+ и H^+ в среде. При изменении порядка добавления ионоферов было установлено, что, так же как и в контрольных липосомах, ДНФ в отсутствие валиномицина не вызывает выхода ионов K^+ в среду. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что АТФаза при взаимодействии с мембраной липосом специфически увеличивает проводимость ионов H^+ .

Следует отметить, что в интактных митохондриях АТФаза связана с белковыми сопрягающими факторами, в то время как в вышеописанных опытах она непосредственно взаимодействует с фосфолипидным бислоем. Очевидно, вследствие этого различия в митохондриях протониферная функция АТФазы проявляется только в присутствии АТФ или АДФ и Ф, как это показано в работе Митчелла (⁴). Факт обнаружения протониферной функции АТФазы в модельных протеолипосомах дает основание для предположения о том, что в интактной системе в присутствии АТФ или АДФ и Ф появляется непосредственный контакт АТФазы с фосфолипидным бислоем и таким образом индуцируется проводимость ионов H^+ . Это предположение подтверждают данные, полученные методом электронной микроскопии (⁵), показывающие, что при добавлении АТФ к субмитохондриальным частицам происходят существенные изменения степени контакта АТФазы с фосфолипидным бислоем.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
9 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Racker, A. Kandrach, J. Biol. Chem., v. 246, 22, 7069 (1971). ² Y. Kagawa, E. Racker, J. Biol. Chem., v. 246, 7, 5477 (1971). ³ В. Н. Щупакин, Т. С. Азарашвили и др., В кн.: Биофизика живой клетки, 5, Пушкино, 1974, стр. 12. ⁴ P. Mitchell, I. Moyle, Biochem. J., v. 104, 2, 588 (1967). ⁵ O. Hatase, T. Wakabayashi et al., J. Bioenerg., v. 3, 6, 509 (1972).