

Г. И. ЛИХТЕНШТЕЙН, А. Е. ШИЛОВ

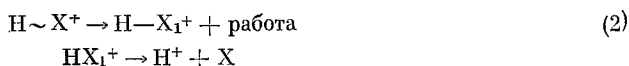
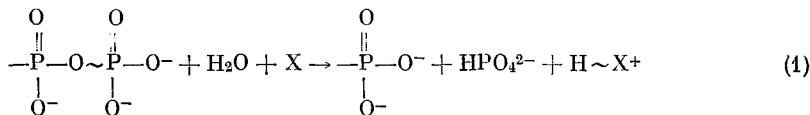
О ХИМИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ СОПРЯЖЕНИЯ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ И ОБРАЗОВАНИИ МАКРОЭРГИЧЕСКОЙ СВЯЗИ АТФ

(Представлено академиком Н. Н. Семеновым 7 I 1976)

Реакция гидролиза АТФ с образованием АДФ — фундаментальный биохимический процесс, обеспечивающий энергией синтез целого ряда соединений, обратный перенос электрона в дыхательных путях, перенос электрона против потенциала, перенос веществ против градиента концентрации, механические перемещения, создание электрического потенциала, восстановление молекулярного азота и т. д. Универсальность использования АТФ в самых разнообразных процессах позволяет предположить наличие однотипных стадий, обеспечивающих дальнейшие пути использования энергии макроэргических связей АТФ без существенного рассеивания энергии, характерного для спонтанного гидролиза.

Анализ возможных механизмов различных реакций с участием АТФ приводит к заключению о том, что в качестве общей универсальной стадии может служить реакция протонирования некоторой функциональной группы X с рК на несколько единиц ниже нейтрального рН, при котором протекает реакция с участием АТФ.

Реакция протонирования может протекать при ферментативном гидролизе АТФ при подходящем пространственном расположении по АТФ



Образование сверхравновесных (при рН 7) концентраций $\text{H} \sim \text{X}^+$ за счет свободной энергии гидролиза АТФ можно рассматривать как промежуточное протонирование X, что фактически означает появление промежуточного макроэрга, энергия которого может быть далее использована для: 1) изменения конформации белка; 2) образования новых (например, электростатических) связей; 3) усиления акцепторных свойств X, что облегчает взаимодействие с донорами электронов; 4) неравновесной локализации зарядов для создания электрического потенциала.

После проведения химической, электрической или механической работы (стадия (2)) центр X регенерируется, причем происходит депротонирование соединения HX_1^+ в условиях, близких к равновесным.

Важной предпосылкой рассматриваемого механизма является достаточное время жизни промежуточных макроэргов типа для осуществления стадии (2), что может быть обеспечено только в условиях неводного окружения протонированных групп. Эта величина, по-видимому, лежит в диапазоне $10^{-2} - 10^{-3}$ сек., что соответствует времени осуществления суммарной реакции для большинства АТФаз.

Система, осуществляющая реакцию (1), могла появиться на ранних стадиях биохимической эволюции и затем использоваться в качестве своеобразного стандартного блока для организации различных процессов.

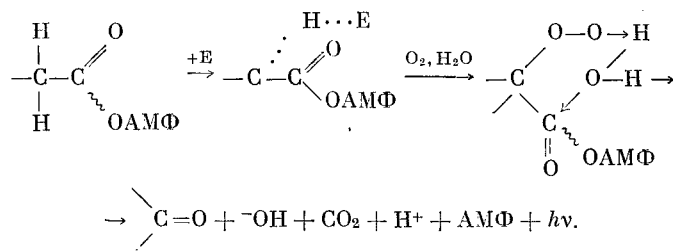
Рассмотрим конкретные примеры приложения постулированного механизма.

Фиксация молекулярного азота. Восстановление азота в аммиак и сопряженная ей реакция гидролиза АТФ катализируется ферментом нитрогеназой, состоящей из двух белковых компонентов: железосодержащего компонента (Fe-белок) и железомолибденосодержащего компонента (MoFe-белок) ⁽⁴⁾.

Опыты с ферментом ⁽²⁻⁵⁾ показали, что АТФазный участок центра непосредственно примыкает к системе переноса электронов, представляющей собой многоядерный железосодержащий кластер (Fe_m^{n+}). Локализация протона на одном из лигандов, окружающих кластер, способствует усилению его акцепторных свойств, что обеспечивает перенос электрона от Fe-белка и переход железа в кластере в состояние более низкой степени окисления. После отщепления протона (например, в равновесной реакции с водой) образующийся комплекс должен обладать и повышенной восстановительной способностью в реакции восстановления X.

Отдельные стадии этой схемы были смоделированы на примере неферментативного восстановления азота в гидразин (и затем аммиак) молекулярным водородом ⁽⁶⁾. Непосредственное восстановление азота водородом до гидразина термодинамически невозможно. Однако реакция осуществима, если ее проводить в две стадии. Вначале в кислотной среде водород каталитически (на Pt) восстанавливает присутствующие в системе Ti^{IV} и Mo^V до Ti^{III} и Mo^{III} , затем среда подщелачивается и образующаяся гидроокись Ti^{III} в присутствии $Mo(III)$ приобретает способность восстанавливать азот до гидразина.

Ферментативное окисление люциферина. Известно, что биolumинесценция при ферментативном окислении люциферина в светлячках *Photinus pyralis* идет с участием АТФ (II). Можно предположить следующий механизм окисления на ферменте E (в схеме приводится только окисляемый участок люциферина)



Действие молекулы H_2O на карбонильный атом углерода в непосредственной близости от присоединяющейся молекулы O_2 позволяет предположить, что протонирование O_2 в шестичленном активированном комплексе за счет энергии гидролиза макроэргической связи ацил — АМФ облегчает перенос электронов на молекулу O_2 и таким образом способствует реакции.

Мышечное сокращение. Согласно современным представлениям ⁽⁷⁾, основным результатом действия АТФ при сокращении мышцы является перевод системы из основного α -состояния в так называемое β -состояние, характеризующееся расположением миофибрилл относительно активных и миофибриллярных фибрилл. Этому изменению предшествует контакт миофибриллярных головок с активным участком, который сопровождается так называемой вспышкой — выбросом фосфата и АТФ. Анализ данной работы ⁽⁸⁾, в которой измерялась кинетика изменения концентрации протонов при гидролизе АТФ в системе, содержащей миозин и его комплексы, показывает, что во время и после вспышки имеет место локализация протона на ферменте с задержкой его выхода в раствор, что обусловлено принудительным протонированием одной из функциональных групп миозина. По-видимому, такое протонирование является основной причи-

ной перехода миозиновой головки в новую конформацию, что выводит систему в целом из макроэргического состояния. Переход миозина из α - в β -состояние и обратно (при расслаблении после отщепления H^+) может быть следствием динамической структуры белка и связано с быстрыми спонтанными конформационными переходами между несколькими состояниями. Такого рода переходы были недавно зарегистрированы методами спиновых и гамма-резонансных меток в целом ряде белков (⁹). Образование протонированной формы фактически означает временную стабилизацию одной из конформаций, вес которой был незначителен в исходных условиях. Локальные изменения конформации в миозиновой головке в присутствии АТФ были отчетливо продемонстрированы методом спиновых меток (⁹). Изменение заряда при протонировании может способствовать образованию новых связей в определенных участках контакта миозиновых и актиновых нитей.

Окислительное фосфорилирование и перенос протонов через мембрану. Согласно гипотезе Митчела (¹⁰), синтез АТФ в реакции окислительного фосфорилирования обусловлен появлением градиента концентрации протонов по разным сторонам мембран за счет переноса электронов от донора ($НАД-H$) к акцептору (O_2). В последнее время эта гипотеза нашла свое развитие в работах ряда авторов и была распространена на процессы фотофосфорилирования (^{11, 12}).

Очевидно, что течение процесса по предполагаемой нами реакции (1) в обратном направлении является реакцией фосфорилирования, причем кислота, необходимая для принудительного протонирования фосфата (или АТФ) при образовании АТФ с выделением H_2O , может появиться за счет окисления субстрата акцептором электронов. Связь предполагаемого механизма с гипотезой Митчела очевидна, так как разделение зарядов в реакции (1) может привести к появлению мембранного потенциала. В то же время элементарные акты сопряженного фосфорилирования и гидролиза АТФ, как мы видели, осуществляются на молекулярном уровне. Таким образом, предложенный механизм может объяснить протекание окислительного фосфорилирования вне мембраны, как это показано в работе (¹³).

Перенос протонов против градиента концентраций можно представить как результат принудительного протонирования белковых групп, лежащих на поверхности мембраны, и затем перенос протонированной группы $X-H^+$ по другую сторону мембраны путем спонтанного вращения или качательного движения, например, как это постулировано в работе (¹⁴). В частности, перенос через гидрофобные участки мембраны может быть облегчен, если образование $X-H$ сопровождается нейтрализацией заряда, ранее локализованного на X^- .

Детальный механизм, соответствующий предложенной гипотезе, нуждается еще в специальном исследовании. Как мы видели, одно из требований к группе, принимающей протон, состоит в том, чтобы ее pK было на несколько единиц меньше pH 7 и, исходя из величины энергии гидролиза АТФ, должно находиться в пределах $2 < pK < 7$. Такими свойствами обладают карбоксильные группы белковых остатков (pK 4) и, возможно, гистидиновые группы, находящиеся в частично гидрофобном окружении. Таким образом, они могут служить в качестве группы X или промежуточных групп, принимающих и передающих протон. Согласно гипотезе (¹⁵), причиной специфичности АТФ может быть протонирование на первой стадии аденинового остатка АТФ ($pK \sim 4$), который пространственно расположен в непосредственной близости к крайнему атому фосфора. Дальнейшая передача H^+ карбоксильной (или гистидиновой) группе будет обеспечиваться при подходящем конформационном изменении окружения.

Развиваемые представления о протонирующей способности АТФ (при ее гидролизе), дополненные представлениями о динамической структуре белков и мембран, позволяют объяснить с единой точки зрения широкий круг биохимических и биофизических явлений. Однако предлагаемый ме-

ханизм является гипотетическим, не доказанным пока однозначно ни для одного случая. Дальнейшая экспериментальная проверка должна показать, насколько правильной и общей является предложенная гипотеза.

Отделение Института химической физики
Академии наук СССР
Черноголовка Московской обл.

Поступило
7 I 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Шилов, Г. И. Лихтенштейн, Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 518 (1972).
² В. Е. Smith, D. E. Lowe, R. C. Bray, Biochem. J., v. 130, 641 (1972). ³ Р. И. Гвоздев, А. И. Котельников и др., ДАН, т. 220, 1453 (1975). ⁴ Е. Я. Алфимова, Л. А. Сырцова и др., Молек. биол., т. 8, 676 (1974). ⁵ Г. И. Лихтенштейн, Л. А. Левченко и др., ДАН, т. 213, 1492 (1974). ⁶ А. Е. Шилов, Усп. хим., т. 43, 863 (1974). ⁷ М. М. Заалишвили, Физико-химические основы мышечной деятельности, Тбилиси, «Мецниереба», 1971. ⁸ T. Tokiwa, Y. Tomotaga, J. Biochem. (Tokyo), v. 57, 616 (1965). ⁹ Г. И. Лихтенштейн, Метод спинных меток в молекулярной биологии, М., «Наука», 1974. ¹⁰ P. Mitchell, Biol. Rev., v. 41, 445 (1966). ¹¹ В. П. Скулачев, Трансформация энергии в биомембранах, М., «Наука», 1972. ¹² L. P. Kayushin, V. P. Sculatchew, FEBS Letters, v. 39, 39 (1974). ¹³ D. R. Hunter, H. Komai, R. A. Haworth, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 56, 647 (1974). ¹⁴ А. С. Каприльян, В. И. Бенюков и др., Биохимия, т. 39, 1103 (1974). ¹⁵ А. И. Котельников, Канд. дисс., ИХФ АН СССР, 1974.