



УДК 577.158;578.087.87

ПРЯМЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО
ТОКА ЛИПОПРОТЕИДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ *

*Барский Е. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д.,
Кондрашин А. А., Либерман Е. А., Остроумов С. А.,
Самуилов В. Д., Семенов А. Ю., Скулачев В. П.,
Ясыйтис А. А.*

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии,
Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова,
Институт проблем передачи информации Академии наук СССР, Москва*

Прямым методом зарегистрирована генерация электрического тока следующими четырьмя типами липопротеидных комплексов, выделенных из сопрягающих мембран: бактериородопсином из *Halobacterium halobium*, комплексом бактериохлорофильных реакционных центров из *Rhodospirillum rubrum*, цитохромоксидазой и H^+ -АТФазой из митохондрий сердца быка. Показано, что введение соответствующего энергетического ресурса (света соответствующей длины волны для бактериородопсиновых или бактериохлорофильных протеолипосом, аскорбата для цитохромоксидазных протеолипосом и АТФ для АТФ-азных протеолипосом) вызывает генерацию тока и разности потенциалов в исследуемой системе. В опытах с бактериородопсином получены наибольшие величины разности потенциалов между двумя отсеками, разделенными плоской мембраной (~ 150 мВ при токе порядка $1 \cdot 10^{-11}$ А). Э.д.с. бактериородопсинового генератора составляла около 300 мВ, бактериохлорофильного и цитохромоксидазного генераторов — 200 мВ. Направление электрического поля в случаях бактериородопсина и АТФ-азы (минус в отсеке с протеолипосомами) было противоположным таковому в случае бактериохлорофильного комплекса. В опытах с цитохромоксидазой направление поля зависело от того, какой цитохром с, внешний или заключенный внутри протеолипосом, принимал участие в переносе электронов. Методом пропикающих синтетических ионов определено направление электрического поля в мембранах протеолипосом. Показано, что знак заряда внутри протеолипосом, определенный по движению пропикающих ионов, всегда совпадает с таковым в отсеке без протеолипосом в опытах с плоской мембраной. Обсуждаются механизмы генерации электрического тока белками сопрягающих мембран.

Митчелл постулировал [1], что некоторые энзиматические системы, участвующие в энергетических превращениях при дыхании и фотосинтезе, действуют как электрические генераторы, заряжающие мембрану посредством трансмембранного переноса электронов или протонов. Попытки проверить эту гипотезу микроэлектродной техникой в опытах с митохондриями [2, 3] не дали положительных результатов [4]. Микроэлектродные измерения на более крупном объекте, хлоропласте [5, 6], позволили обнаружить некоторые индуцируемые светом электрические ответы довольно сложного характера.

* Сокращения: ХКФ — трихлоркарбонилцианидфенилгидразон; ТБ⁻ — тетрафенилборат; ТМФД — N,N,N',N' -тетраметилпарафенилендиамин; ТФФ⁺ — тетрафенилфосфоний; ФКВ⁻ — фенилдикарбаундекаборан; ФМС — феназинметосульфат.

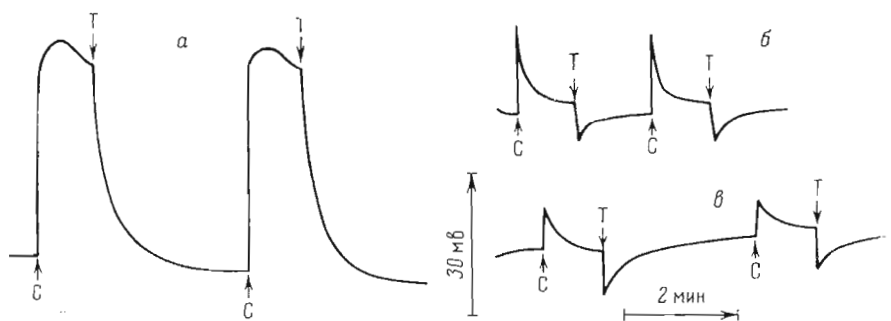


Рис. 1. Фотоэлектрические ответы плоской азолектиновой мембраны с включенным в нее бактериородопсиновым комплексом. Плоская мембрана разделяла два отсека, содержащих раствор 0,15 М КСl, 10мМ трис-НСl (рН 7,2); для в — добавка ХРФ $3 \cdot 10^{-7}$ М. Внешнее сопротивление 10^{11} (а, в) и 10^9 (б) Ом. Сопротивление плоской мембраны $2 \cdot 10^{10}$ (а, б) и 10^9 (в) Ом

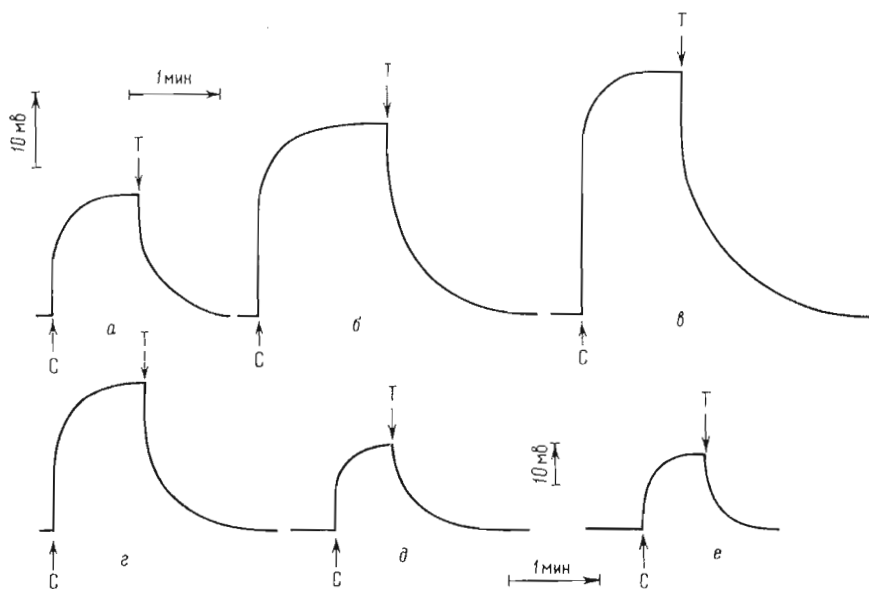


Рис. 2. Действие трансмембранного электрического потенциала и трансмембранной разности рН на фотоэлектрические ответы плоской бактериородопсин-азолектиновой мембраны. Раствор по обе стороны мембраны содержал 0,2 М сахарозу, 0,02 М КСl и 0,2 мМ цитрат-фосфат-боратный буфер. рН 7 против 7 (а, б, г, д) или рН 7 против 9 (в), рН 9 против 7 (е). $U_{\text{вн}} = -60$ (б) и $+60$ (д) мВ

Электрические параметры сопрягающих мембран были исследованы в опытах с проникающими ионами [7—12], а также путем измерения «электрохромного» сдвига спектров каротиноидов и хлорофилла [13—16]. При использовании этих и некоторых других подходов оказалось возможным обнаружить возникновение мембранного потенциала в митохондриях, хлоропластах, бактериях и их мембранных фрагментах (см. [4, 17—20]).

Данные, изложенные в этой работе, показывают, что белковые комплексы, выделенные из сопрягающих мембран, могут действовать как молекулярные генераторы электрического тока, который удается прямо измерить обычной электрометрической техникой. Чтобы выполнить такие изме-

рения, был разработан следующий метод включения белковых систем в искусственную плоскую фосфолипидную мембрану [21]. На первом этапе проводили реконструкцию везикул (протеолипосом) из белков и фосфолипидов по методу Кагавы и Ракера [22]. Затем протеолипосомы добавляли в один из отсеков ячейки, разделенной пополам тефлоновой перегородкой с отверстием, затянутым плоской фосфолипидной мембраной. Добавка ионов Ca^{2+} в отсек с протеолипосомами вызывала слияние протеолипосом с плоской мембраной. Разность электрических потенциалов между

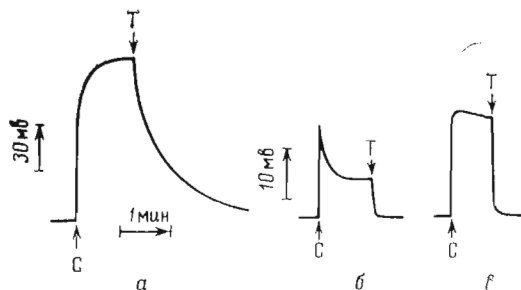


Рис. 3. Сравнение эффекта ХКФ и внешнего сопротивления на фотоэлектрический ответ бактериородопсиновых протеолипосом, связанных с плоской мембраной. Среда инкубации: 0,2 М сахараза 0,05 М трис-НСI (рН 7,2), 0,03 М CaCl_2 , в одном из отсеков ячейки бактериородопсиновые протеолипосомы (0,05 мг белка в 1 мл). Внешнее сопротивление 10^{11} (а, в) и 10^9 (б) Ом; сопротивление мембраны $1,5 \cdot 10^{10}$ (а, б) и 10^9 (в) Ом, добавка ХКФ (в) $3 \cdot 10^{-7}$ М

двумя отсеками измеряли электродами, погруженными в растворы электролитов по обе стороны плоской мембраны. В опытах с одним из мембранных белков (бактериородопсиновым комплексом галофильных бактерий) плоскую мембрану образовывали непосредственно из смеси, содержащей этот липопротидный комплекс, соевый фосфолипид (азолектин) и декан [23, 24].

На рис. 1 приведены результаты измерения разности электрических потенциалов между двумя растворами в тефлоновых ячейках, сообщавшихся через отверстие диаметром 1 мм. Отверстие закрывали плоской фосфолипидной мембраной путем нанесения из пипетки смеси раствора азолектина в декане и изолированного бактериородопсинового комплекса («фиолетовых бляшек»). Видно, что включение света (С) вызывает генерацию разности электрических потенциалов между двумя отсеками, разделенными мембраной (рис. 1, а). Выключение света (Т) приводит к исчезновению разности потенциалов. Шунтирование мембраны внешним сопротивлением резко уменьшает амплитуду и меняет форму фотоэлектрического эффекта, вызывая его дифференцирование (рис. 1, б). Такое же изменение в характере фотоэффекта обнаружено при понижении сопротивления мембраны добавкой разобщителя-протопофора, ХКФ (рис. 1, в). Амплитуда, форма и направление вызванных светом электрических ответов варьировали от мембраны к мембране.

Как видно из рис. 2, трансмембранная разность электрических потенциалов, генерируемая посредством внешней батареи $U_{\text{вн}}$, влияет на величину фотоответа, который уменьшается, когда внешнее электрическое поле оказывается того же направления (рис. 2, д), что и поле, генерируемое бактериородопсином, и увеличивается, когда оно имеет противоположное направление (рис. 2, б). Трансмембранная разность рН оказалась другим фактором, воздействующим на величину фотоответа. Он снижался при подкислении объема, положительно заряжающегося на свету (рис. 2, е),

и возрастал при подкислении объема, заряжающегося отрицательно (рис. 2, в). Фотоэффект оказался постоянным в пределах рН 6—9, если величины рН справа и слева от плоской мембраны были одинаковыми

На рис. 3 представлены результаты опыта с протеолипосомами, полученными из бактериородопсиновых комплексов и азолектина. Протеолипосомы соединяли с плоской мембраной, сделанной из азолектина. С этой целью в отсек с протеолипосомами добавляли ионы Ca^{2+} . В такой системе оказалось возможным получить более высокие величины фотоиндуцированной разности электрических потенциалов, достигавшей в лучших опытах 150 мВ при токе $\sim 10^{-11}$ А. Направление поля всегда было одним и тем же — отсек с протеолипосомами заряжался отрицательно. Шунтирование плоской мембраны внешним сопротивлением приводило к уменьшению потенциала и дифференцированию фототока (рис. 3, б), в то время как добавление ХКФ снижало величину фотоэффекта без существенного изменения его формы (рис. 3, в). В опытах с протеолипосомами фотоэффект не удавалось обнаружить в отсутствие Ca^{2+} или некоторых других катионов в среде инкубации. Анализ скорости нарастания величины фотоэффекта, вызванной добавкой соответствующих катионов, выявил следующий ряд эффективностей различных катионов как активаторов процесса ассоциации протеолипосом с плоской мембраной: $\text{La}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{NH}_4^+$. Испытание K^+ оказалось совершенно неэффективными. Подобный ряд эффективностей был найден ранее для процесса слияния двух плоских фосфолипидных мембран [25, 26]. Анализ влияния спектрального состава света показал, что спектр действия фотоэлектрического ответа совпадает со спектром поглощения бактериородопсинового комплекса: в обоих случаях наблюдался широкий максимум между 500 и 600 нм. Как и в опытах с плоской мембраной, включающей бактериородопсин, в опытах с протеолипосомами величина измеренного фотоэффекта изменялась в зависимости от направленности и величины $U_{\text{вн}}$. Эта зависимость имела линейный характер. В условиях, когда фотоэффект был полностью скомпенсирован $U_{\text{вн}}$, последнее было равно фотоиндуцируемой э.д.с. Измеренная таким способом фото-э.д.с. в общем случае не является э.д.с. самого молекулярного генератора, а отличается от нее на коэффициент $(R_2 + R_3)/R_3$ (см. рис. 5). Поскольку в опытах с бактериородопсиновыми липосомами эта величина компенсирующего напряжения варьировала от опыта к опыту не более чем на 15% и не зависела от величины исходного ответа, она является характеристическим параметром системы плоская мембрана — протеолипосомы и может быть названа фото-э.д.с. системы. Измеренная таким образом фото-э.д.с. оказалась ~ 300 мВ.

В соответствии с наблюдением Ракера и Стокениуса [27] было показано, что освещение бактериородопсиновых протеолипосом вызывает защелачивание инкубационной смеси, которое может быть зарегистрировано рН-метром. Эффект усиливался проникающим анионом NO_3^- и резко снижался добавкой ХКФ. Как показало измерение рН внутри протеолипосом с помощью атбрина, освещение вызывает подкисление внутрипротеолипосомального объема, которое развивается параллельно защелачиванию инкубационной смеси.

Результаты, представленные на рис. 4, показывают, что освещение суспензии бактериородопсиновых протеолипосом, преинкубированных с анионами ФКБ⁻ в темноте, приводит к поглощению ФКБ⁻. Подобные данные были получены в опытах также и с другим проникающим анионом, ТБ⁻.

Данные, рассмотренные выше, представляются достаточными для заключения о том, что бактериородопсин функционирует как светозависимая электрогенная протонная помпа. На рис. 5 приведена схема, согласно которой молекулы бактериородопсина в протеолипосомальной мембране функционируют как фотобатарея (В), создающая разность электрических потенциалов на этой мембране. Зарядка плоской мембраны происходит че-

рез переходное сопротивление R_2 в области слияния плоской и протеолипосомальной мембран. Этот последний эффект измеряется вольтметром V , соединенным с электродами E . Включение внешнего сопротивления R_4 , шунтирующего плоскую мембрану, уменьшает постоянную времени цепи C_1R_1 , не влияя на C_2R_2 и C_3R_3 , что выражается в искажении формы светового ответа. Разобщитель ХКФ шунтирует все участки плоской мембраны, а также мембрану протеолипосом, пропорционально уменьшая постоянную времени в цепях C_1R_1 , C_2R_2 и C_3R_3 . Такой эффект должен иметь следствием снижение амплитуды светового ответа без существенного изменения его прямоугольной формы. Именно такие соотношения и наблюдались в эксперименте (см. рис. 3).

В дальнейших опытах нами были использованы протеолипосомы, включающие липопротеидные комплексы фотореакционных центров, изолированных из хромофоров *Rhodospirillum rubrum*.

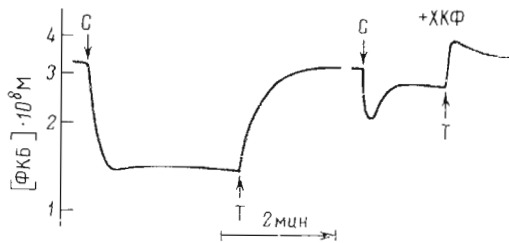
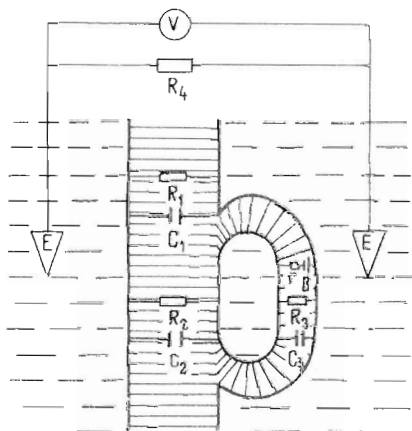


Рис. 4. Светозависимое поглощение анионных ФКБ- бактериородопсинами протеолипосомами. Среда инкубации: 0,3 М сахараза, 5 мМ трис-НСI (рН 6,25) и бактериородопсиновые протеолипосомы (0,08 мг белка/мл). Концентрация ХКФ 10^{-6} М

Рис. 5. Эквивалентная электрическая схема для протеолипосом, связанных с плоской мембраной: B — биоэлектрический генератор (бактериородопсин), r — внутреннее сопротивление генератора B ; R_1 — сопротивление плоской мембраны; R_2 — сопротивление в области слияния плоской мембраны с протеолипосомой; R_3 — сопротивление мембраны протеолипосомы; C_1 , C_2 и C_3 — соответствующие емкости; R_4 — внешнее сопротивление, шунтирующее плоскую мембрану; V — вольтметр, E — электрод



Известно [28—32], что каждый комплекс фотореакционных центров ($M \sim 70\,000$) содержит три различные по весу полипептидные цепи, две молекулы бактериохлорофилла P800, две молекулы P870, две молекулы бактериофетина, а также убихинон и негемовое железо. Комплекс лишен цитохромов, флавинов, в нем резко снижено количество каротиноидов по сравнению с хромофорами.

Результаты опытов на системе плоская мембрана — протеолипосомы с бактериохлорофильными центрами представлены на рис. 6. Видно, что освещение плоской мембраны с прикрепленными к ней протеолипосомами в присутствии ионов Ca^{2+} приводит к генерации разности электрических потенциалов между двумя отсеками (плюс в отсеке с протеолипосомами). Шунтирование плоской мембраны внешним сопротивлением уменьшает фотоэффект и вызывает его дифференцирование (рис. 6, б). Добавка разобщителя — протонифора ХКФ также снижает величину ответа, но не изменяет его форму (рис. 6, в).

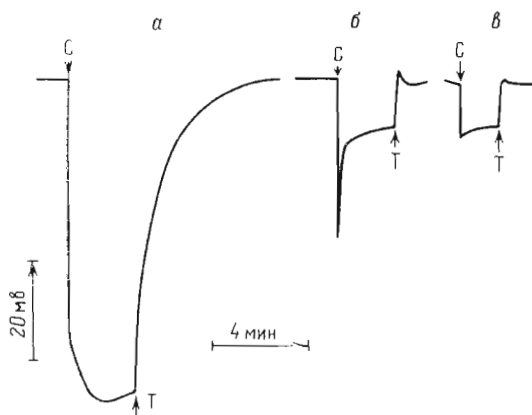


Рис. 6. Фотоэлектрические ответы бактериохлорофильных протеолипосом, связанных с плоской азолектиновой мембраной. Среда инкубации: 0,2 М сахараза, 0,05 М трис-НСl (рН 7,4); 5 мМ MgSO₄; 30 мМ СаСl₂ и протеолипосомы ($1,2 \cdot 10^{-7}$ М бактериохлорофилла). Внешнее сопротивление 10^{11} (а, в) и $2,4 \cdot 10^9$ (б) Ом; сопротивление мембраны $2,5 \cdot 10^{10}$ (а, б) и $2,5 \cdot 10^9$ (в) Ом. Обозначения и концентрация ХКФ (а) как в подписи к рис. 1

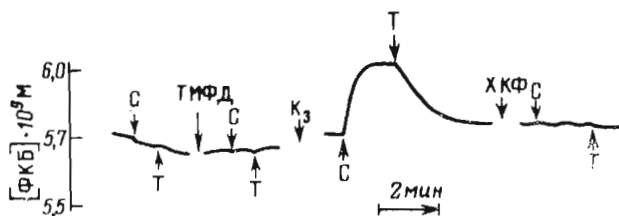


Рис. 7. Светоиндуцированный выход анионов ФКБ⁻ в суспензии бактериохлорофильных протеолипосом. Среда инкубации: 0,2 М сахараза, 0,05 трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgSO₄ и протеолипосомы (0,2 мг белка/мл). Добавки: $5 \cdot 10^{-4}$ М ТМФД; 1,2 мМ витамина К₃ и $1,3 \cdot 10^{-7}$ М ХКФ

Фотондуцированная разность электрических потенциалов резко возрастала при включении ТМФД и КоQ₆ (или витамина К₃) в состав инкубационной смеси. Спектр действия фотоэлектрического эффекта хорошо соответствовал спектру поглощения бактериохлорофильных центров. Величина фото-э.д.с., измеренная путем уравнивания фотоэффекта внешним полем, составляла ~ 200 мВ.

На рис. 7 приведены данные опыта, в котором генерация мембранного потенциала реакционными центрами бактериохлорофилла регистрировалась по изменению уровня ФКБ⁻ в суспензии протеолипосом. Как видно из рисунка, включение света вызывает выход анионов ФКБ⁻ из протеолипосом, что свидетельствует о генерации разности потенциалов на протеолипосомальной мембране со знаком минус внутри пузырьков. Фотоответ, измеренный в системе плоская мембрана — протеолипосомы, а также светозависимый выброс анионов ФКБ⁻ из протеолипосом подавлялись *о*-фенантролином.

В дальнейших опытах предпринята попытка применить метод прямой регистрации образования мембранного потенциала к двум митохондриальным ферментным комплексам: цитохромоксидазе и АТР-азе.

Согласно хемиосмотической теории энергетического сопряжения, цитохромоксидаза катализирует транспорт электронов через внутреннюю мембрану митохондрий, что приводит к зарядке мембраны [1]. В настоящей

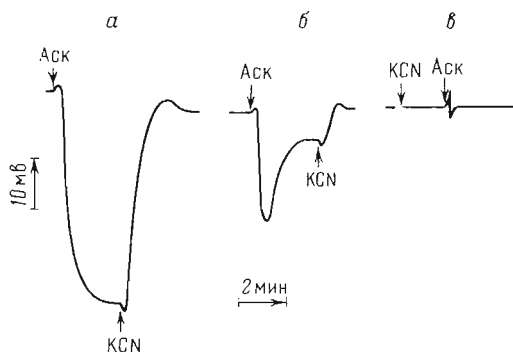


Рис. 8. Прямое измерение генерации мембранного потенциала цитохромоксидазными протеолипосомами, связанными с плоской азолектиновой мембраной. Среда инкубации: 0,3 М сахараза, 0,05 трис-НСI (рН 7,5), 30 мМ СаСI₂, 5 мМ MgSO₄, 10⁻⁴ М цитохрома с, в одном из отсеков цитохромоксидазные протеолипосомы (0,3 мг белка/мл). Добавки: 5 мМ аскорбата (Аск) и 3 мМ KCN. Внешнее сопротивление 10¹¹ (а, в) и 3·10⁹ (б) Ом; сопротивление мембраны 2·10¹⁰ Ом

работе это предположение было подвергнуто прямой экспериментальной проверке с применением протеолипосом, реконструированных из соевых фосфолипидов, цитохромоксидазы и цитохрома с. Как и в предыдущих опытах, взаимодействия цитохромоксидазных протеолипосом с плоской фосфолипидной мембраной достигали добавлением ионов Ca²⁺ в отсек ячейки, содержащий протеолипосомы.

Как показали эксперименты, аскорбат, добавленный через 20—30 мин после протеолипосом в тот же отсек, вызывал регистрируемую вольтметром генерацию разности электрических потенциалов на плоской мембране (рис. 8, а). Последующая добавка цианида снимала эту разность потенциалов. Аскорбат не влиял, если был добавлен после цианида (рис. 8, в).

Электрическое поле, генерируемое цитохромоксидазными протеолипосомами с цитохромом с снаружи, было всегда направлено таким образом, что отсек с протеолипосомами оказывался заряженным положительно. В лучших экспериментах были получены разности электрических потенциалов, превышающие 100 мВ. Электрическое поле, создаваемое на плоской мембране внешней батареей, влияло на индуцируемый аскорбатом ответ. Определение э.д.с. цитохромоксидазного генератора описанным выше методом дало величину порядка 200 мВ.

Добавление разобщителя-протонофора или шунтирование плоской мембраны внешним сопротивлением приводило к уменьшению электрического потенциала. На рис. 8, б показано дифференцирование ответа на аскорбат в условиях, когда сопротивление плоской мембраны было выше, чем шунтирующее сопротивление. Добавка аскорбата в отсек без протеолипосом не вызывала генерации разности потенциалов, если не добавляли проникающий переносчик атомов водорода, ФМС или ТМФД (в этих опытах цитохром с добавляли в оба отсека ячейки).

Чтобы приготовить протеолипосомы с цитохромом с внутри, мы включили цитохром с в состав смеси для реконструкции протеолипосом, а после завершения процесса реконструкции отмывали хлористым натрием тот цитохром с, который связался с внешней поверхностью протеолипосомальной мембраны. Как показали эксперименты, цитохром с в протеолипосомах, обработанных NaCl, локализован внутри пузырьков и взаимодействует примерно с половиной общего количества цитохромоксидазы в протеолипосомах.

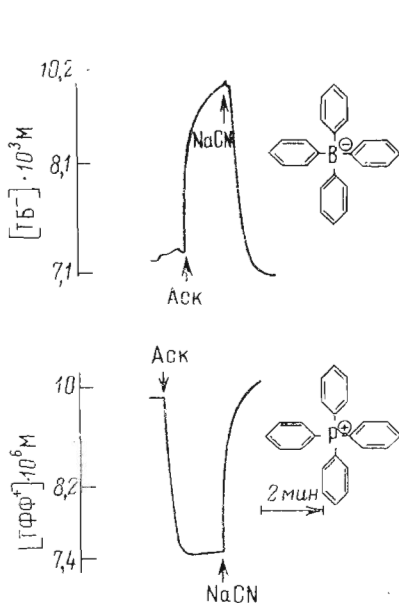


Рис. 9

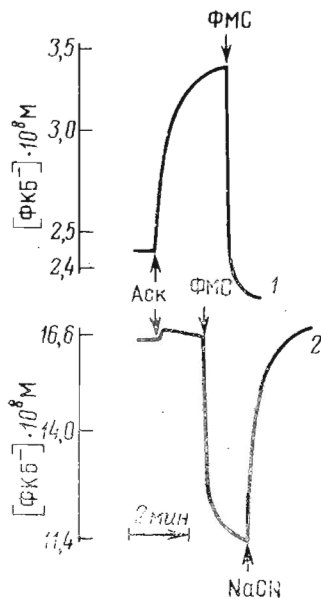


Рис. 10

Рис. 9. Изменения концентрации анионов тетрафенилбората и катионов тетрафенилфосфония в среде инкубации цитохромоксидазных протеолипосом, сопряженные с окислением аскорбата. Среда инкубации: 0,25 М сахарозы, 0,05 М трис-НСI (рН 7,5), mM MgSO₄, $2 \cdot 10^{-5}$ М (верхняя кривая) или $2 \cdot 10^{-4}$ М (нижняя кривая) цитохрома с и цитохромоксидазные протеолипосомы с цитохромом с внутри (0,7 мг белка/мл, верхняя кривая и 0,5 мг белка в 1 мл, нижняя кривая). Добавка 7мМ аскорбата и 4,5 мМ NaCN

Рис. 10. Энергозависимые изменения концентрации анионов ФКБ⁻ в среде инкубации цитохромоксидазных протеолипосом. Среда инкубации: 0,25 М сахарозы, 0,05 М трис-НСI, рН 7,5, цитохромоксидазные протеолипосомы с цитохромом с внутри (кривая 1 — 0,5 мг, 2 — 0,6 мг белка/мл); в опыте 1 среда дополнена $2 \cdot 10^{-4}$ М цитохрома с. Добавки: 10^{-6} М ФМС, 5 мМ аскорбата, 4 мМ NaCN

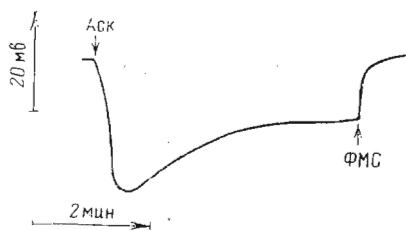


Рис. 11. Генерация мембранного потенциала цитохромоксидажными протеолипосомами, связанными с плоской мембраной. Среда инкубации: 0,2 М сахарозы, 30 мМ СаСI₂, 0,05 М трис-НСI (рН 7,4), 10^{-4} цитохрома с и цитохромоксидазные протеолипосомы с цитохромом с внутри (0,6 мг белка/мл). Добавки: 5 мМ аскорбата и $4 \cdot 10^{-6}$ М ФМС

Результаты опыта, представленные на рис. 9, показывают, что включение транспорта электронов через внешний цитохром с вызывает перемещение проникающих катионов и анионов сходной структуры в противоположных направлениях: ТФФ⁺ поглощается протеолипосомами, ТБ⁻ выделяется из протеолипосом. На рис. 10 представлены данные, характеризующие транспорт проникающих ионов в цитохромоксидазные протеолипосомы, со-

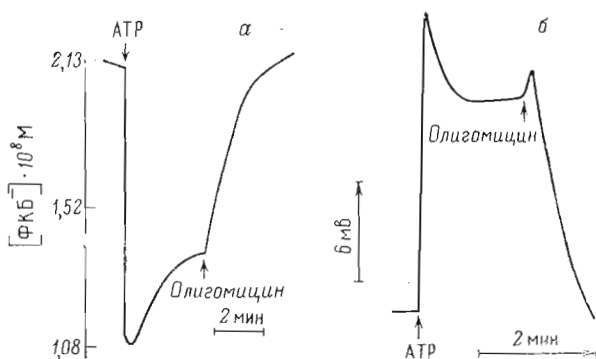


Рис. 12. Генерация разности электрических потенциалов АТР-азными протеолипосомами: *a* — ответ анионов ФКБ⁻ (среда инкубации: 0,25 М сахаразы, 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgSO₄, протеолипосомы (0,5 мг белка/мл), добавки: 1 мМ АТФ, 4 мкг олигомицина/мл); *б* — прямое измерение вольтметром (среда инкубации, 0,2 М сахаразы, 0,05 М трис-НСl (рН 7,3), 5 мМ MgSO₄, 0,03 М СаСl₂, протеолипосомы (0,5 мг белка/мл); добавки: 1 мМ АТР, 25 мкг олигомицина/мл)

держащие цитохром с во внутреннем объеме. Можно видеть, что добавка ФМС, включающего транспорт электронов через внутренний цитохром с, приводит к поглощению ФКБ⁻. В тех же условиях включение переноса электронов через внешний цитохром с индуцирует движение проникающих ионов в обратном направлении. Эти ответы были чувствительны к цианиду и ХКФ.

На рис. 11 показан электрический ответ протеолипосом, содержащих цитохром с. Добавка аскорбата в этом случае вызывает генерацию разности потенциалов со знаком плюс в отсеке с протеолипосомами. Последующая добавка ФМС приводит к генерации потенциала противоположного направления (в отсеке с протеолипосомами — знак минус).

Данные, изложенные выше, показывают, что цитохромоксидаза может действовать как электрический генератор. Направление образованного электрического поля зависит от положения цитохрома с (плюс образуется всегда с той стороны мембраны, с которой находится цитохром с).

В дальнейших опытах нами была изучена генерация мембранного потенциала Н⁺-АТР-азой из митохондрий сердца быка описанными выше методами.

Как было показано в предыдущих экспериментах [34], АТР-азные протеолипосомы поглощают проникающий анион ФКБ⁻ в ответ на добавку АТР. Олигомицин и разобщитель обращают этот эффект. Иногда ответы на ФКБ⁻ были двухфазными: за начальным поглощением аниона следовало спонтанное выделение той порции ФКБ⁻, которая была поглощена в первые секунды (рис. 12, *a*).

На рис. 12, *б* приведены данные измерения генерации электрических потенциалов препаратами АТР-азных протеолипосом, использованных в опыте с ФКБ⁻ (рис. 12, *a*). Видно, что добавка АТР вызывает генерацию разности электрических потенциалов, которая исчезает после добавки олигомицина. Форма электрического ответа, измеренного вольтметром, аналогична форме ответа, полученной методом проникающих ионов (ФКБ⁻).

Другие измерения показали, что электрический ответ, индуцируемый АТР-азой, чувствителен к олигомицину. Эти результаты прямо подтверждением плоской мембраны внешним сопротивлением.

Рассмотренные выше результаты показали, что электрический ток генерируется светозависимыми липопротеидными системами, такими, как бактериохлорофильные реакционные центры из хроматофоров *R. rubrum*

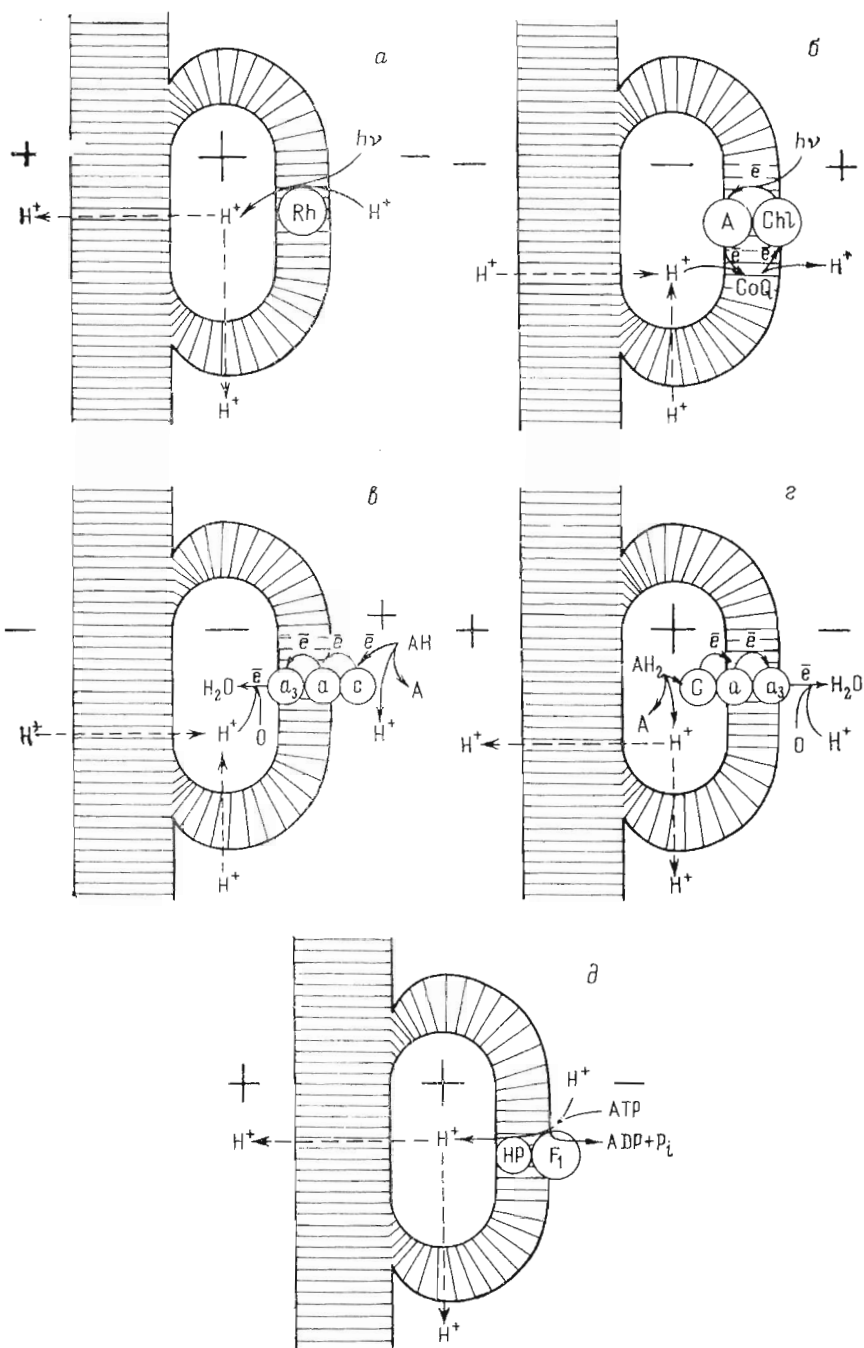


Рис. 13. Схема генерации электрического тока в системе протеолипосома — плоская мембрана: *a* — бактериородопсиновые протеолипосомы; *б* — бактериохлорофильные протеолипосомы; *в* — цитохромоксидазные протеолипосомы с цитохромом с снаружи; *г* — цитохромоксидазные протеолипосомы с цитохромом с внутри; *д* — H^+ -АТФ-азные протеолипосомы (обозначения: Rh — бактериородопсин; А — первичный акцептор электронов комплекса бактериального фотореакционного центра; Chl — хлорофилл; с, a_{a_3} — цитохромы, AH_2 — донор водорода, восстанавливающий цитохром с; F_1 — сопрягающий фактор; HP — гидрофобные белки H^+ -АТФ-азы, чувствительной к олигомицину)

и бактериородопсин из *Halobacterium halobium*; комплексом, образующим один из участков энергетического сопряжения в митохондриальной дыхательной цепи (цитохром с — цитохромоксидаза) и митохондриальной H^+ -АТФ-азой, чувствительной к олигомицину. Эти результаты прямо подтверждают постулат Митчелла [1] о генерации электрического потенциала как о процессе, присущем дыхательным и фотосинтетическим системам энергетического сопряжения.

Для рассмотрения механизма энергетического сопряжения весьма существенно, что как энергодающие системы (дыхательные и фотосинтетические), так и H^+ -АТФ-аза оказались способными генерировать трансмембранную разность электрических потенциалов. Это означает, что H^+ -АТФ-аза, если она обратима, может использовать энергию мембранного потенциала для образования АТФ. Обратимость H^+ -АТФ-азы, а также других АТФ-аз, транспортирующих ионы, продемонстрирована прямыми экспериментами [4]. Таким образом, можно признать, что поставляющие энергию реакции могут быть сопряжены с фосфорилированием через мембранный потенциал, как предполагал Митчелл [1].

На рис. 13 представлены схемы, иллюстрирующие механизм генерации электрического тока различными видами протеолипосом, соединенных с плоской мембраной. Показано, что электрогенный транспорт электронов или протонов через протеолипосомальную мембрану осуществляется особыми белковыми системами, использующими соответствующий энергетический источник: свет (бактериородопсин и хлорофильные комплексы), донор водорода и кислород (цитохромоксидаза) или АТФ (H^+ -АТФ-аза). Во всех изученных случаях имеет место образование градиента электрохимического потенциала H^+ ($\Delta\bar{\mu}_H$ между вне- и внутрипротеолипосомальными отсеками). Движение ионов H^+ по электрохимическому градиенту, $\Delta\bar{\mu}_H$, или любых других ионов по электрическому градиенту через плоскую мембрану приводит к генерации разности электрических потенциалов между двумя растворами, разделенными плоской мембраной. Фактически именно эта величина измеряется вольтметром.

Данная концепция предполагает, что знак заряда в отсеке без протеолипосом должен совпадать с таковым внутри протеолипосом. Сопоставление данных опытов с плоской мембраной и результатов, полученных в экспериментах с проникающими ионами, подтверждает это предположение. Бактериородопсиновые, цитохромоксидазные (с цитохромом с внутри) и АТФ-азные протеолипосомы, будучи ассоциированными с плоской мембраной, генерировали разность потенциалов со знаком плюс в отсеке без протеолипосом. Суспензии тех же протеолипосом демонстрировали поглощение анионов FKB^- в ответ на энергизацию, что свидетельствовало о появлении положительного заряда внутри протеолипосом. С другой стороны, бактериохлорофильные и цитохромоксидазные (с цитохромом с снаружи) протеолипосомы генерировали мембранный потенциал со знаком минус в отсеке без протеолипосом, а их энергизация сопровождалась выделением FKB^- (внутри протеолипосом — минус).

Экспериментальная часть

Препаративные методы. Источником бактериородопсинового комплекса (бактериородопсиновых бляшек) служили клетки *Halobacterium halobium*, причем использовали два близких штамма, лишённые газовых вакуолей [35]. Бляшки выделяли по методике Остерхельта и Стокениуса [36]. Электрофорез бляшек в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата выявил наличие одной полосы, соответствующей белку с $M \sim 25\,000 - 27\,000$.

Для выделения комплекса бактериохлорофильных реакционных центров использовали клетки дикого штамма *Rhodospirillum rubrum*, выращенные фотогетеротрофно в полуанаэробных условиях. Хроматофоры выделяли

после разрушения клеток ультразвуком по описанной ранее методике [10]. Комплекс реакционных центров выделяли из хромофоров в основном по методу Ноёл и соавт. [28].

Цитохромоксидазу выделяли из митохондрий сердца быка по методу Ионетани [37]. Митохондрии сердца быка служили также источником фракции гидрофобных белков H^+ -АТФ-азы, чувствительной к олигомицину (которую выделяли по методу Кагава и Ракера [22]), сопрягающих факторов F₁ [38], F_c [39] и фосфолипидов [40].

Реконструкция протеолипосом. Реконструкцию белково-фосфолипидных везикул (протеолипосом) проводили по методу, разработанному в лаборатории Ракера. Процедура включает следующие основные этапы: 1) смешивание соответствующих белковых компонентов с раствором соевых фосфолипидов (азолектина), обработанным ультразвуком, в холоде; 2) диализ полученной смеси в течение 18 ч при 0–2°С и 3) осаждение протеолипосом в течение 60 мин при 165 000 g. Бактериородонозные протеолипосомы реконструировали по методу Ракера и Стокениуса [27], цитохромоксидазные протеолипосомы — по Ракеру и др. [21, 23] с некоторыми модификациями [34], АТФ-азные протеолипосомы — по Кагава и Ракеру [22] с некоторыми модификациями [34].

Для реконструкции бактериохлорофильных протеолипосом была разработана следующая методика. 100 мг азолектина суспендировали в 1 мл смеси, содержащей 50 мМ фосфата калия (рН 7,5), 5 мМ MgSO₄, 5% холата натрия, и обрабатывали ультразвуком 30 с. Суспензию дополняли 1,5 мл раствора, содержащего 50 мМ фосфата калия (рН 7,5), 0,3% детергента ЛДАО и комплекс бактериохлорофильных реакционных центров (3 мг белка/мл). Смесь обрабатывали ультразвуком 5 раз по 30 с с 30-секундными перерывами. Детергент удаляли 16-часовым диализом при 2°С против 0,05 М фосфата калия и 0,5 мМ дитиотреитола. Протеолипосомы осаждали при 165 000 g в течение 50 мин и суспендировали в 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 2 мМ MgSO₄.

Методы измерения. Измерения концентрации анионов ФЖБ⁻, тетрафенилбората и катионов тетрафенилфосфония проводили по описанной ранее методике, применяя фосфолипидную мембрану в качестве селективного электрода [8].

Взаимодействие протеолипосом с плоской азолептиновой мембраной и измерение трансмембранной разности электрических потенциалов проводили, как было описано в работе [21].

Авторы искренне благодарны за участие в ряде опытов Х. Микельсаару, И. Б. Немечек, В. Г. Плакуновой, Э. Г. Семеновой, И. И. Севериной, за предоставление биомассы *Halobacterium halobium* Л. П. Каюшину и Л. Н. Чекулаевой, за обсуждение результатов работы П. Митчеллу, Ю. А. Овчинникову и С. Е. Северину. Настоящее исследование выполнено в рамках проекта «Родосин», организованного Академией наук СССР и Московским государственным университетом под руководством академика Ю. А. Овчинникова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Glynn Research, Bodmin.
2. Tupper J. T., Tedeschi H. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63, 370–377.
3. Tupper J. T., Tedeschi H. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63, 713–717.
4. Скулачев В. П. (1972) Трансформация энергии в биомембранах. М., «Наука».
5. Бульчев А. А., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. (1971) Физиология растений, 18, 248–256.
6. Bulyshev A. A., Andrianov V. K., Kurrella G. A., Litvin F. F. (1972) Nature, 236, 175–177.
7. Либерман Е. А., Топалы В. П., Цофина Л. М., Ясайтис А. А., Скулачев В. П. (1969) Биохимия, 34, 1083–1087.

8. Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauskas J. P., Liberman E. A., Skulachev V. P., Topali V. P., Tsofina L. M., Vladimirova M. A. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **216**, 1—12.
9. Bakeeva L. E., Grinius L. L., Jasaitis A. A., Severina I. I., Skulachev V. P. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **216**, 13—21.
10. Isaev P. I., Liberman E. A., Samuilov V. D., Skulachev V. P., Tsofina L. M. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **216**, 22—29.
11. Grinius L. L., Il'ina M. D., Mileykovskaya E. I., Skulachev V. P., Tikhonova G. V. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **283**, 442—455.
12. Mitchell P., Moyle J. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **7**, 471—484.
13. Junge W., Witt H. T. (1968) *Z. Naturforsch.*, **23b**, 244—254.
14. Witt H. T. (1972) *J. Bioenerg.*, **3**, 47—54.
15. Jackson J. B., Crofts A. R. (1969) *FEBS Lett.*, **4**, 185—189.
16. Barsky E. L., Samuilov V. D. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **325**, 454—462.
17. Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1971) *Научн. докл. высшей школы. Биол. науки*, № 9, 27—37.
18. Ясайтис А. А. (1973) *Превращение энергии в митохондриях*, М., ВИНТИ.
19. Скулачев В. П. (1974) *Успехи соврем. биологии*, **77**, 125—154.
20. Skulachev V. P. (1971) *Current Topics in Bioenergetics*, **4**, 127—190.
21. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., Liberman E. A., Nemeček I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. (1974) *Nature*, **249**, 321—324.
22. Kagawa Y., Racker E. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477—5487.
23. Kayushin L. P., Skulachev V. P. (1974) *FEBS Lett.*, **39**, 39—42.
24. Drachev L. A., Kaulen A. D., Ostroumov S. A., Skulachev V. P. (1974) *FEBS Lett.*, **39**, 43—45.
25. Либерман Е. А., Ненашев В. А. (1968) *Биофизика*, **13**, 193—196.
26. Blioch Z. L., Glagoleva I. M., Liberman E. A., Nenashev V. A. (1968) *J. Physiol.*, **199**, 11—35.
27. Racker E., Stoerkenius W. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 662—663.
28. Noël H., Van der Rest M., Gingras G. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **275**, 219—230.
29. Felher G. (1971) *Photochem. Photobiol.*, **14**, 373—387.
30. Clayton R. K., Haselkorn R. (1972) *J. Mol. Biol.*, **68**, 97—105.
31. Clayton R. K., Szuts E. L., Fleming H. (1972) *Biophys. J.*, **12**, 64—79.
32. Cogdell R. J., Prince R. C., Crofts A. R. (1973) *FEBS Lett.*, **35**, 204—208.
33. Racker E. (1972) *J. Membr. Biol.*, **10**, 221—235.
34. Jasaitis A. A., Nemeček I. B., Severina I. I., Skulachev V. P., Smirnova S. M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **275**, 485—490.
35. Kayushin L. P., Sibeldina L. A., Lasareva A. B., Kosticov A. C., Richireva G. T., Cherkulaeva L. N., Vsevolodov N. N. (1974) *Studia Biophys.*, **42**, 71—74.
36. Oesterheld D., Stoerkenius W. (1974) *Nature, New Biol.*, **233**, 149—152.
37. Yonetani T. (1967) In «*Methods in Enzymology*» (Estabrook R. W., Pullman M. E., eds.), vol. 10, p. 332. Academic Press, New York.
38. Horstman L. L., Racker E. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 1336—1344.
39. Bulos B., Racker E. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3891—3905.
40. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497—509.

Поступила в редакцию
19.VII.1974

DIRECT MEASUREMENT OF THE ELECTRIC CURRENT GENERATION BY LIPOPROTEIN COMPLEXES

E. L. BARSKY, L. A. DRACHEV, A. D. KAULEN, A. A. KONDRASHIN,
E. A. LIBERMAN, S. A. OSTROUMOV, V. D. SAMUILOV, A. Yu. SEMENOV,
V. P. SKULACHEV, A. A. JASAITIS

*Laboratory of Biorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State
University, Moscow, Institute of the Information Transmission,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Direct measurement of the electric current generation by different lipoprotein complexes has been carried out. Among lipoproteins studied were bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium*, bacteriochlorophyll reaction centers from *Rhodospirillum rubrum*, cytochrome oxidase and oligomycin-sensitive H⁺-ATPase from beef heart mitochondria. The above complexes were reconstituted with soya bean phospholipids to form spherical membranous particles (proteoliposomes). The proteoliposomes were associated with planar phospholipid membrane separating two electrolyte solutions of the

same composition. Electric potential difference and current between two solutions were measured by Ag/AgCl electrodes. It was shown that addition of corresponding energy sources (light for bacteriorhodopsin or bacteriochlorophyll proteoliposomes, ascorbate+cytochrome c for cytochrome oxidase proteoliposomes and ATP for ATPase proteoliposomes) gives rise to an electric generation across planar membrane. Values of potential difference between two compartments separated by bacteriorhodopsin — containing planar membrane were found to be as high as 150 mV at the current of 1×10^{-11} A. The determinations of E.M.F. of bacteriorhodopsin generator gave values about 300 mV. E.M.F. values of bacteriochlorophyll and cytochrome oxidase generators were found to be about 200 mV. The direction of the electric field in the experiments with bacteriorhodopsin and ATPase (minus in the compartment with proteoliposomes) proved to be opposite to that observed in the experiments with bacteriochlorophyll complex. In the case of cytochrome oxidase the field direction depended on whether cytochrome c was localized inside or outside proteoliposomes.

Estimation of sign of electric potential difference in proteoliposomes by means of synthetic ionic penetrants revealed that the proteoliposome interior charges positively in the case of bacteriorhodopsin, H^+ -ATPase and cytochrome oxidase with cytochrome c inside proteoliposomes, and negatively in the case of bacteriochlorophyll and cytochrome oxidase with cytochrome c outside proteoliposomes. Comparison of these data with those obtained in the planar membrane experiments shows that sign of potential difference in proteoliposome — free compartment coincides with that inside proteoliposomes.
