



УДК 577.153.3.02

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ  $H^+$ -АТФ-АЗА  
НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ ОКТАН — ВОДА \**Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А.,  
Метельский С. Т., Скулачев В. П.**Институт электрохимии Академии наук СССР, Москва,  
Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского университета им. М. В. Ломоносова*

Исследована генерация скачка потенциала ( $\Delta\phi$ ) растворимой митохондриальной АТФ-азой на границе раздела фаз октан — вода. Показано, что изменение  $\Delta\phi$ , обусловленное переносом протонов из воды в октан при гидролизе АТФ ферментом, определяется концентрацией субстрата АТФ-азной реакции ( $Mg$ -АТФ) и конкурентного ингибитора реакции ( $Mg$  — АДФ). Определены кажущиеся величины  $K_m$  и величины  $\Delta\phi_{max}$  при различных значениях рН. Показано, что ПХМБ, а также АДФ-МК являются эффективными ингибиторами растворимой АТФ-азы на границе раздела октан — вода и не оказывают заметного влияния на скорость АТФ-азной реакции в водном растворе. Скорость инактивации АТФ-азы под действием ПХМБ и АДФ-МК на границе раздела октан — вода уменьшается в присутствии  $Mg$ -АТФ, а также ДСН. ЦМКД ингибирует активность растворимой митохондриальной АТФ-азы, но не оказывает влияния на скорость АТФ-азной реакции фермента, адсорбированного на границе октан — вода. Предполагается, что роль растворимой митохондриальной АТФ-азы (сопрягающего фактора  $F_1$ ) заключается в сопряженном с гидролизом АТФ переносе  $H^+$  из матрикса в гидрофобную область митохондриальной мембраны.

Исследования, проведенные нами ранее [1—3], показали, что граница раздела октан — вода может служить модельной системой для изучения протон-транслоцирующей функции обратимой  $H^+$ -АТФ-азы митохондрий. Было обнаружено, что гидролиз АТФ растворимой митохондриальной АТФ-азой (сопрягающим фактором  $F_1$  [4]) на границе раздела октан — вода сопровождается переносом  $H^+$  из воды в октан [1—3]. Возникающий в результате этого скачок потенциала ( $\Delta\phi$ ) на границе раздела фаз может быть зарегистрирован методом вибрирующего конденсатора [1—3, 5, 6]. В проведенных нами ранее исследованиях [1—3] было также показано, что величина  $\Delta\phi$  зависит от скорости АТФ-азной реакции и от концентрации растворимого в жирной фазе акцептора протонов. Полученные результаты хорошо согласуются с гипотезой Митчелла [7—9], по которой обратимый гидролиз АТФ сопряжен с переносом протонов через митохондриальную мембрану.

\* ДНФ — 2,4-динитрофенол, ЦМКД — N-циклогексил-N'- $\beta$ -(4-метилморфолиний)этилкарбодимид; ПХМБ — n-хлормеркурибензоат натрия, АДФ-МК — смешанный ангидрид АДФ и мезитиленкарбоновой кислоты, АМР-МК — смешанный ангидрид АМР и мезитиленкарбоновой кислоты, ЦТАБ — цетилтриметиламмоний бромид, ДСН — додецилсульфат натрия.

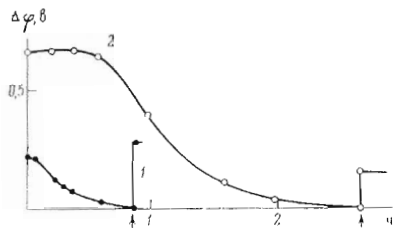


Рис. 1

Рис. 1. Изменение  $\Delta\varphi$ , обусловленное переносом  $H^+$  из воды в октан при гидролизе АТФ АТФ-азой на границе раздела фаз, в зависимости от времени инкубации смеси. Реакционная смесь в начальный момент времени содержала:  $10^{-3}$  М ДНФ,  $10^{-2}$  М трис-НСI, рН 7,0,  $10^{-8}$  М АТФ-азу, а также 1 —  $2 \cdot 10^{-4}$  М АТФ и  $2 \cdot 10^{-4}$  М  $MgSO_4$ ; 2 —  $6 \cdot 10^{-4}$  М АТФ и  $6 \cdot 10^{-4}$  М  $MgSO_4$ , стрелками указаны моменты добавления в реакционную среду новой порции АТФ ( $10^{-3}$  М — для 1 и  $6 \cdot 10^{-4}$  М — для 2)

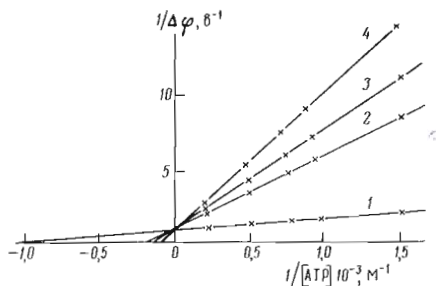


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость обратной величины  $\Delta\varphi$ , генерируемого АТФ-азой на границе раздела октан — вода, от обратной величины концентрации  $Mg$  — АТФ. Состав реакционной смеси:  $10^{-2}$  М трис-НСI рН 7,9,  $10^{-8}$  М АТФ-аза,  $10^{-3}$  М ДНФ (1), а также  $Mg$  — АДФ: 0,2 мМ (2) 0,4 мМ (3) и 1,0 мМ (4)

В настоящей работе продолжено изучение свойств растворимой митохондриальной АТФ-азы на границе раздела октан — вода. Применяя апробированный нами ранее [1—3, 5, 6] метод вибрирующего конденсатора, мы исследовали влияние концентрации АТФ, АДФ, рН, некоторых ингибиторов и поверхностно-активных веществ на способность растворимой митохондриальной АТФ-азы генерировать скачок потенциала на границе раздела октан — вода.

На рис. 1 изображена зависимость скачка потенциала, генерируемого АТФ-азой на границе раздела фаз, от времени инкубации реакционной смеси. По оси ординат отложена величина  $\Delta\varphi$ , отражающая положительный сдвиг потенциала октановой фазы относительно воды при гидролизе АТФ АТФ-азой в присутствии акцептора протонов в октане. Как видно из рис. 1, 1 (начальная концентрация АТФ равна  $2 \cdot 10^{-4}$  М), по мере уменьшения концентрации субстрата в системе и накопления продукта реакции АДФ, являющегося конкурентным ингибитором митохондриальной АТФ-азы, наблюдается уменьшение  $\Delta\varphi$ . При начальной концентрации АТФ  $6 \cdot 10^{-4}$  М (рис. 1, 2) отсутствие какого-либо снижения потенциала в первые 30 мин инкубации определяется, по-видимому, тем, что в данном случае концентрация  $Mg$ -АТФ является насыщающей для фермента. Добавление к реакционной смеси новой порции АТФ приводит в обоих случаях к увеличению значения  $\Delta\varphi$ .

На рис. 2, 1 обратная величина  $\Delta\varphi$  показана как функция от обратной концентрации субстрата. Интересно отметить, что концентрация  $Mg$  — АТФ, соответствующая точке пересечения экспериментальной кривой и оси абсцисс (рис. 2, 1), близка к  $K_m$ , полученной в тех же условиях в водном растворе для растворимой митохондриальной АТФ-азы [10, 11].

Проведенное нами исследование АТФ-азной реакции методами стационарной кинетики показало, что  $Mg$ -АДФ является конкурентным ингибитором растворимой митохондриальной АТФ-азы [10, 11].

На рис. 2, 2—4 изображена зависимость  $1/\Delta\varphi$  от обратной величины концентрации субстрата  $Mg$ -АТФ при различных концентрациях  $Mg$ -АДФ. Полученные кривые с общей точкой пересечения вблизи оси ординат напоминают картину конкурентного торможения АТФ-азной реакции [10, 11]. Если предположить, что величина  $\Delta\varphi$  на границе раздела фаз определяется скоростью сопряженного с гидролизом АТФ переноса  $H^+$  из воды в октан,

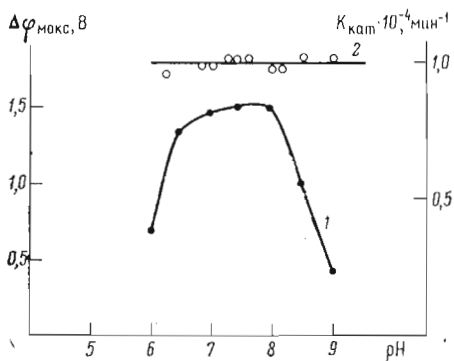


Рис. 3

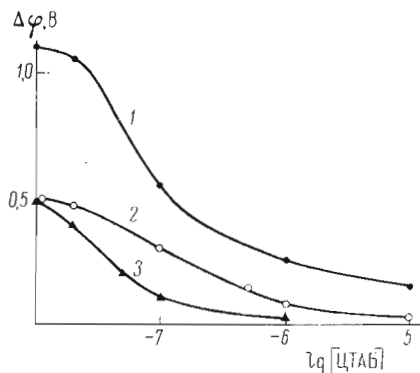


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$ , генерируемого АТФ-азой на границе раздела октан — вода (1), и  $k_{\text{кат}}$  АТФ-азы в растворе (2) от рН. Состав водной фазы при измерении  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$ :  $5 \cdot 10^{-3}$  М АТФ,  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{MgSO}_4$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  М ДНФ,  $1 \cdot 10^{-8}$  М АТФ-аза,  $2 \cdot 10^{-2}$  М трис-НСl. Концентрация  $\text{Mg} - \text{АТФ}$  ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) — насыщающая во всем интервале значений рН

Рис. 4. Зависимость  $\Delta\varphi$ , генерируемого на границе раздела октан — вода, от концентрации ЦТАБ. Состав реакционной смеси: трис-НСl —  $1 \cdot 10^{-2}$  М;  $\text{Mg} - \text{АТФ}$  —  $2 \cdot 10^{-3}$  М; ДНФ —  $1 \cdot 10^{-3}$  М; АТФ-аза: 1 и 2 —  $1 \cdot 10^{-8}$  М; 3 —  $2,5 \cdot 10^{-9}$  М. 1 и 3 были получены при рН 8,4; 2 — при рН 6,4. Во всех случаях ЦТАБ добавляли к реакционной смеси до внесения фермента

то полученные результаты (рис. 2) можно использовать для расчета константы ингибирования  $\text{Mg-ADP}$  ( $K_i$ ) АТФ-азной реакции на границе раздела фаз. Проведенные расчеты с использованием стандартной программы счетной машины «Seiko» (Япония) дали величину  $K_i$  для  $\text{Mg-ADP}$ , равную  $3 \pm 1 \cdot 10^5$  М. Таким образом, эффективность ингибирования АТФ-азы комплексом  $\text{Mg-ADP}$  на границе раздела октан — вода оказалась приблизительно на порядок выше, чем в растворе.

Ранее [11] мы исследовали зависимость  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  растворимой митохондриальной АТФ-азы от рН. Было показано, что характер зависимости параметров АТФ-азной реакции от рН различен для АТФ-азы в растворе и в составе субмитохондриальных частиц [11, 12]. В настоящей работе было проведено сравнительное изучение параметров АТФ-азной реакции в растворе и на границе раздела фаз октан — вода. Величины максимального скачка потенциала ( $\Delta\varphi_{\text{макс}}$ ) и кажущиеся величины  $K_m$  были получены экстраполяцией экспериментальных кривых при изучении зависимости  $1/\Delta\varphi$  от  $1/[\text{Mg} - \text{АТФ}]$ . Ясно, что экспериментально определенные параметры  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$  и  $K_m$  отражают каталитические свойства АТФ-азы на границе раздела фаз только в том случае, если во всем интервале концентраций субстрата и значений рН имеет место пропорциональная зависимость величины  $\Delta\varphi$  от скорости АТФ-азной реакции. Следует отметить, что во всем применяемом нами интервале значений рН был получен характер зависимости  $\Delta\varphi$  от  $\text{Mg} - \text{АТФ}$ , соответствующий уравнению Михаэлиса — Мэнтена. На рис. 3, 1 представлена зависимость  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$ , генерируемого АТФ-азой, от рН. Для сравнения на том же рисунке приведены полученные нами ранее данные [11] по зависимости  $k_{\text{кат}}$  АТФ-азной реакции в растворе от рН (кривая 2). Следовало выяснить, связаны ли наблюдаемые различия в характере зависимости  $k_{\text{кат}}$  и  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$  от рН (рис. 3) со спецификой свойств фермента на границе раздела фаз или полученная картина отражает зависящее от рН изменение концентрации фермента на границе октан — вода. В специальных опытах было показано, что измеряемая величина  $\Delta\varphi$  не зависит от того, устанавливается ли рН в водной фазе до или после добавления в систему фермента. Поскольку за время эксперимента не про-

исходит заметного обмена молекул АТР-азы между границей раздела октан — вода и водным раствором (см. далее), полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемая на рис. 3, 1 картина не связана с рН-зависимым изменением концентрации фермента на межфазной границе. Следует заметить также, что наблюдаемая зависимость  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$  от рН не связана, по-видимому, с изменением концентрации ДНФ в октане. Обнаруженные нами ранее [1] небольшие изменения  $\Delta\varphi$  на границе раздела октан — вода при введении в систему ДНФ оставались постоянными при рН 6,0—9,0.

Таким образом, полученную зависимость  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$  от рН (рис. 3) можно интерпретировать как зависимость максимальной скорости АТР-азной реакции на границе раздела октан — вода от концентрации  $\text{H}^+$ -ионов в водной фазе. Наличие двух перегибов на кривой 1 (рис. 3) свидетельствует, по-видимому, об участии двух групп с  $pK \approx 6,0$  и  $8,5$  в катализе АТР-азной реакции на границе раздела октан — вода или в процессе переноса протонов из воды в октан, сопряженном с гидролизом АТР.

Как уже отмечалось выше, кажущиеся величины  $K_m$ , полученные при рН 7,9 для фермента в водном растворе и на границе раздела октан — вода, оказались близкими по порядку величинами. Это совпадение следует, по-видимому, считать случайным, поскольку характер зависимости  $K_m$  от рН для АТР-азы в растворе и на границе раздела фаз резко различается. В соответствии с полученными нами ранее результатами [11],  $K_m$  АТР-азы в растворе возрастает в интервале значений рН 7,5—6,25. Величина  $K_m$  фермента на границе раздела октан — вода, вычисленная нами из зависимости  $\Delta\varphi$  от концентрации Mg-АТР, не изменяется в интервале значений рН 6,0—9,0. Постоянство величины  $K_m$  в том же интервале рН наблюдал Митчелл [12] при изучении АТР-азы субмитохондриальных частиц. Этот результат свидетельствует о наличии общих закономерностей в механизме гидролиза АТР АТР-азой в составе митохондриальной мембраны и на границе раздела октан — вода.

Применение ионных детергентов в системе октан — вода приводит к повышению концентрации заряженных групп на границе раздела. Возникающий в результате использования ионных детергентов двойной электрический слой на границе раздела октан — вода моделирует в известной мере структуру границы раздела фосфолипидная мембрана — вода. Представляло интерес выяснить, какое влияние оказывает структура двойного электрического слоя на границе раздела фаз на способность АТР-азы осуществлять сопряженный с гидролизом АТР перенос ионов  $\text{H}^+$  из воды в октан.

На рис. 4 показана зависимость  $\Delta\varphi$ , генерируемого при гидролизе АТР, от концентрации ЦТАБ. Кривые 1 и 2 получены при насыщающих ( $10^{-8}$  М), а кривая 3 — при далеко не насыщающих ( $2,5 \cdot 10^{-9}$  М) концентрациях фермента [1]. В последнем случае используемая концентрация АТР-азы обеспечивала только половину максимально возможного при данном значении рН (8,1) скачка потенциала. Из представленных на рис. 4 результатов видно, что добавление в систему ЦТАБ, вызывающее повышение концентрации положительно заряженных групп в водной фазе вблизи границы раздела, претодвращает образование  $\Delta\varphi$  АТР-азой.

Следует отметить, что ингибирующее действие ЦТАБ проявляется уже в концентрации  $3 \cdot 10^{-8}$  М. Добавление  $10^{-6}$  М ЦТАБ в систему после АТР-азы не оказывало влияния на генерацию  $\Delta\varphi$  АТР-азой.

Как уже отмечалось выше, концентрация АТР-азы на границе раздела октан — вода не изменяется в интервале значений рН 6,0—9,0 и, следовательно, по сравнению с кривой 3, кривая 2 (рис. 4) отражает результаты, полученные при более высокой поверхностной концентрации фермента. Таким образом, эффективность ингибирующего действия ЦТАБ зависит от поверхностной концентрации фермента, причем создается впечатление, что АТР-аза и ЦТАБ конкурируют за поверхность раздела.

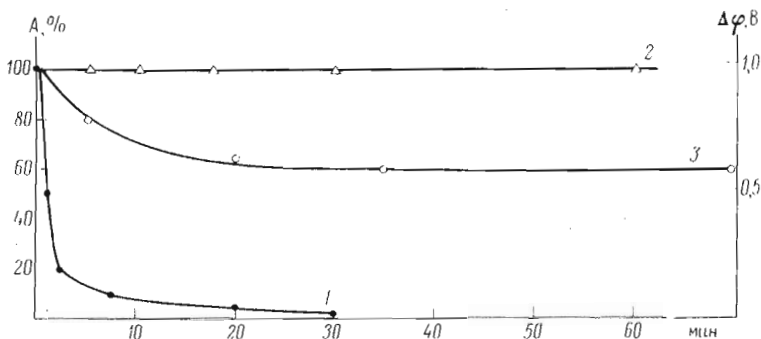


Рис. 5. Ингибирование митохондриальной АТР-азы при взаимодействии с ЦМКД. Реакцию АТР-азы (1) и субмитохондриальных частиц (3) с ЦМКД проводили в смеси, содержащей:  $1 \cdot 10^{-2}$  М морфолиновозтансульфоуксидную кислоту, рН 6,3,  $1 \cdot 10^{-3}$  М ЦМКД и 0,5 мг/мл фермента (1) или 0,5 мг/мл субмитохондриальных частиц (3). АТР-азную активность (А) измеряли по методу [10]. При изучении влияния ЦМКД на величину  $\Delta\phi$  (2) водная фаза содержала:  $1 \cdot 10^{-2}$  М морфолиновозтансульфоуксидную кислоту, рН 6,3,  $10^{-8}$  М АТР-азу,  $1 \cdot 10^{-3}$  М ДНФ и  $1 \cdot 10^{-3}$  М ЦМКД. ЦМКД добавляли к системе через несколько минут после фермента. Каждая точка на кривой 2 представляет собой отдельный опыт; измерение  $\Delta\phi$  проводили после добавления к системе  $2 \cdot 10^{-3}$  М Mg — АТР

Анионные детергенты, такие как цетилфосфат натрия ( $5 \cdot 10^{-5}$  М), дидодецилфосфат натрия ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) и ДСН ( $1 \cdot 10^{-4}$  М), а также жирорастворимые катионы ( $1 \cdot 10^{-5}$  М тетрагептиламмоний бромид) и анионы ( $1 \cdot 10^{-4}$  М тетрафенилборат натрия) не обладали ингибирующим действием на генерацию скачка потенциала АТР-азой на границе раздела октан — вода.

В дальнейших опытах было изучено действие ЦМКД — реагента на карбоксильные группы белков [13] — на активность фермента в растворе и на границе раздела октан — вода. Полученные результаты показали, что инкубация АТР-азы в растворе с ЦМКД в течение 20 мин приводит к 20-кратному снижению АТР-азной активности, в то же время ЦМКД не влияет на генерацию потенциала АТР-азой на границе раздела октан — вода (рис. 5). Следует отметить, что в последнем случае ЦМКД добавляли к реакционной смеси через несколько минут после фермента. Если же АТР-азу предварительно обрабатывали ЦМКД, а затем модифицированный фермент помещали в измерительную ячейку, то зависимость от АТР скачка потенциала не наблюдалось. Этот результат становится понятным, если предположить, что активный центр фермента на границе раздела фаз находится в существенно более гидрофобном окружении по сравнению с водным раствором и, таким образом, менее доступен заряженным молекулам водорастворимого ЦМКД. Аналогичную природу имеет, по-видимому, явление частичной десенсибилизации к действию ЦМКД АТР-азы, входящей в состав митохондриальной мембраны (рис. 5, 3).

Итак, использование ЦМКД в опытах с АТР-азой, адсорбированной на границе раздела октан — вода, позволяет избирательно инактивировать фермент, находящийся в растворе, не изменяя при этом активности фермента, функционирующего на границе раздела фаз. Из полученных результатов (рис. 5, 2) следует еще один важный, на наш взгляд, вывод: в течение 1 ч не происходит заметного обмена молекул АТР-азы, адсорбированных на границе раздела октан — вода, с молекулами фермента в водном растворе.

Другие черты сходства в свойствах АТР-азы на границе раздела октан — вода и в составе митохондриальной мембраны выявились в опытах с ПХМБ — ингибитором олигомицин-чувствительной АТР-азы [14]. Оказа-

лось, что ПХМБ тормозит АТР-азную активность субмитохондриальных частиц и резко понижает способность АТР-азы к генерации сопряженного с гидролизом АТР скачка потенциала на границе раздела октан — вода. Обработка растворимой митохондриальной АТР-азы  $5 \cdot 10^{-5}$  М ПХМБ в течение 2 мин приводила к снижению измеряемой величины с 1,0 В до 20 мВ. В аналогичных условиях ПХМБ не оказывал сколько-нибудь заметного влияния на АТР-азную активность фактора  $F_1$  в растворе. Ингибирующий эффект ПХМБ на активность АТР-азы, адсорбированной на границе раздела фаз октан — вода, не зависел от того, добавляли ли ингибитор непосредственно в измерительную ячейку или проводили предынкубацию фермента с ПХМБ, а затем фермент, дважды пересаживаемый сульфатом аммония, помещали в систему октан — вода. Таким образом, ингибирующий эффект ПХМБ не связан, по-видимому, ни со снижением

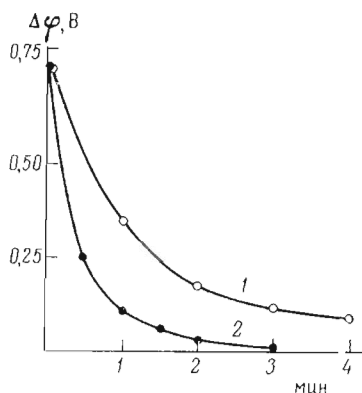


Рис. 6. Ингибирующий эффект ПХМБ и ADP-MK на величину  $\Delta\varphi$ , генерируемого АТР-азой на границе раздела октан — вода. Состав водной фазы:  $1 \cdot 10^{-2}$  М трис-НСl, рН 7,0;  $1 \cdot 10^{-3}$  М ДНФ;  $1 \cdot 10^{-3}$  М Mg---АТР;  $1 \cdot 10^{-8}$  М АТР-аза, а также  $2 \cdot 10^{-5}$  М ПХМБ (1) или  $2 \cdot 10^{-4}$  М ADP — МК (2). ПХМБ или ADP — МК добавляли к реакционной смеси последними. В отсутствие ингибиторов  $\Delta\varphi$  оставался неизменным в течение 20 мин

способности АТР-азы адсорбироваться на границе раздела октан — вода, ни с приобретением ферментом на границе раздела более чувствительной к действию ингибитора конформации.

Различную чувствительность АТР-азы в растворе и на границе раздела октан — вода к действию ЦМКД и ПХМБ, как и различный характер зависимости величины  $K_m$  от рН, можно объяснить изменением механизма АТР-азной реакции фермента при переводе его из раствора на границу раздела фаз. Механизм АТР-азной реакции на границе раздела фаз включает, по нашему мнению, стадию транслокации субстрата с внешнего некаталитического нуклеотид-связывающего центра АТР-азы, обнаруженного Хаммесом и Хилборном [15], в собственно каталитический центр, изолированный от водной фазы и находящийся в непосредственном контакте с октаном. Если фактор  $F_1$  находится в растворе, субстрат имеет непосредственный доступ из водной фазы в каталитический центр реакции и, таким образом, минуя стадию адсорбции во втором нуклеотидсвязывающем центре, а также стадию транслокации. В рамках предложенной гипотезы ингибирование ПХМБ активности АТР-азы на границе раздела октан — вода можно объяснить воздействием этого реагента на внешний нуклеотидсвязывающий центр АТР-азы или на механизм транслокации субстрата.

Интересно отметить, что в присутствии Mg — АТР скорость инактивации АТР-азы на границе раздела октан — вода под действием ПХМБ повышается. Как это следует из данных, представленных на рис. 6, инкубация АТР-азы с  $2 \cdot 10^{-5}$  М ПХМБ и  $10^{-3}$  М Mg — АТР в течение 1 мин приводит лишь к 2-кратному снижению  $\Delta\varphi$ . Инкубация фермента на границе раздела октан — вода с ПХМБ в отсутствие субстрата АТР-азной реакции приводит к понижению  $\Delta\varphi$  в течение 1 мин более чем на порядок (на рис. 6 не показано).

В соответствии с данными работы [14] ПХМБ ингибирует олигомицин-чувствительную АТР-азу, однако скорость инактивации фермента в этом

случае существенно ниже, чем на границе раздела октан — вода. Полученные различия в скоростях инактивации фермента могут быть объяснены различной электроотрицательностью границы раздела митохондриальная мембрана — вода и октан — вода. Действительно, ПХМБ при нейтральных значениях pH существует в виде аниона, и, следовательно, эффективная концентрация этого реагента вблизи раздела фаз должна зависеть от заряда и структуры двойного электрического слоя. Для проверки высказанного предположения были проведены опыты по ингибированию АТР-азы на границе раздела октан — вода ПХМБ в присутствии  $10^{-4}$  М ДСН, который заряжает границу раздела фаз аналогично кислым фосфолипидам и не препятствует возникновению сопряженного с гидролизом АТР скачка потенциала. Было показано, что скорость ингибирования фермента под действием ПХМБ существенно понижается в присутствии ДСН. Инкубация фермента на границе раздела октан — вода с  $2 \cdot 10^{-5}$  М ПХМБ в присутствии  $10^{-4}$  М ДСН в течение 2 мин приводит к снижению величины  $\Delta\phi$  с 1 В до 500 мВ (без ДСН — до 70 мВ). Таким образом, различия в структуре двойного электрического слоя на границе октан — вода и митохондриальная мембрана — вода действительно могут определять различия в скоростях ингибирования АТР-азы анионами ПХМБ.

Результаты, полученные нами при изучении ингибирующего эффекта ПХМБ, в основных чертах воспроизводятся в опытах с использованием другого модифицирующего агента — ADP-МК, синтезированного Соколовой и соавт. [16]. ADP-МК способен к фосфорилированию нуклеофильных групп аминокислот в сравнительно мягких условиях с образованием соответствующих S-, O- или N-нуклеотидиламинокислот и свободной мезитиленкарбоновой кислоты. Поскольку ADP-МК является структурным аналогом ADP (конкурентного ингибитора АТР-азной реакции [10] и субстрата окислительного фосфорилирования), можно было предположить, что этот модифицирующий агент адсорбируется в активном центре АТР-азы с последующим фосфорилированием фермента и его необратимой инактивацией. Действительно, инкубация АТР-азы в течение 2 мин с  $2 \cdot 10^{-4}$  М ADP-МК приводит практически к полной утрате способности фермента генерировать  $\Delta\phi$  на границе раздела октан — вода. Ингибирующий эффект ADP-МК не зависит от того, добавляли ли этот ингибитор непосредственно в измерительную ячейку или предварительно инкубировали с АТР-азой, а затем дважды пероосажденный фермент добавляли в систему октан — вода. Как и при использовании ПХМБ, длительная инкубация АТР-азы в водном растворе с ингибитором (1 мМ ADP-МК, 1 ч) не приводила к сколько-нибудь заметному изменению АТР-азной активности.

Как и в случае с ПХМБ, субстрат АТР-азной реакции (Mg-АТР) предохраняет фермент от действия ADP-МК. На рис. 6, 2 изображена зависимость величины скачка потенциала, генерируемого АТР-азой на границе раздела октан — вода, от времени инкубации смеси, содержащей помимо фермента ADP-МК ( $2 \cdot 10^{-4}$  М) и субстрат АТР-азной реакции Mg-АТР ( $10^{-3}$  М). Как видно из рис. 6, в этих условиях время контакта АТР-азы с ADP-МК, необходимое для снижения  $\Delta\phi$  в 6 раз, составляет 1 мин. Параллельные измерения показали, что это время в отсутствие Mg-АТР сокращается приблизительно в 3 раза (на рис. не показано).

Граница раздела октан — вода может быть использована как модельная система для изучения протон-транслоцирующей функции не только растворимой АТР-азы, но и олигомицин-чувствительного АТР-азного комплекса митохондрий. Добавление в систему, содержащую все необходимые компоненты АТР-азной реакции, 50 мкг/мл АТР-азного комплекса, выделенного по ранее описанному методу [14], приводило к генерации  $\Delta\phi$  порядка 1 В. Этот эффект полностью снимался олигомицином (1 мкг/мл).

Как показали опыты, проведенные нами с использованием плоской фосфолипидной мембраны [17], АТР-азный комплекс, чувствительный к олигомицину, способен генерировать трансмембранную разность потенциалов.

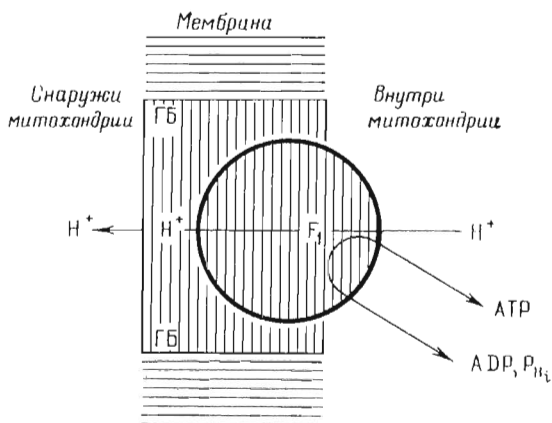


Рис. 7

Рис. 7. Предполагаемая структура АТР-азного комплекса митохондрий.  $F_1$  — сопрягающий фактор, ГБ — гидрофобные белки

Рис. 8. Блок-схема экспериментальной установки

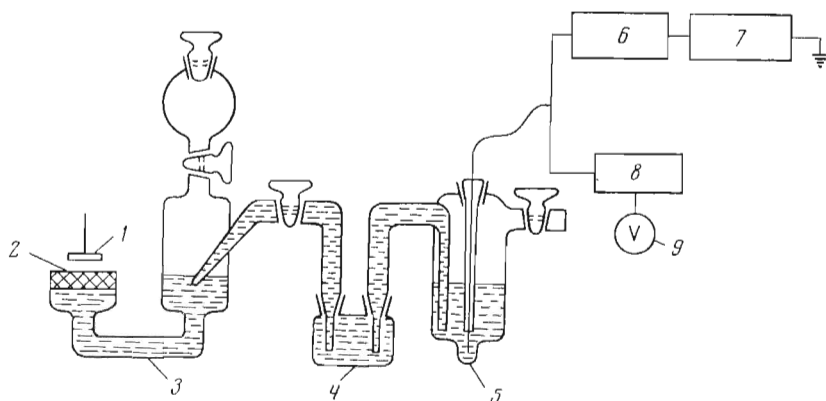


Рис. 8

Фактор  $F_1$  не проявлял такой способности даже в присутствии акцептора протонов, растворимого в масле (анизидина). При сопоставлении этих результатов с нашими данными создается впечатление, что *in vivo* роль АТР-азы — сопрягающего фактора  $F_1$  — состоит в переносе  $H^+$  через границу раздела фаз вода — мембрана в гидрофобную область митохондриальной мембраны. В этом случае роль других белков, входящих в состав АТР-азного комплекса, чувствительного к олигомицину, заключается в переносе протонов через границу раздела фаз мембрана — вода на противоположной стороне митохондриальной мембраны. Приведенные соображения схематически представлены на рис. 7.

### Экспериментальная часть

Субмитохондриальные частицы выделяли по методу Ханфена и Смита [18], а растворимую митохондриальную АТР-азу — по методу Хорстмана и Ракера [19]. Удельная активность препарата АТР-азы — 20—30 мкмоль/мг белка в 1 мин при 25°. Скорость АТР-азной реакции измеряли по методу Нишимура и соавт. [20]. Система для измерения скачка потенциала на границе раздела октан — вода содержала помимо воды и октана 1 мМ ДНФ, 10 мМ трис-НСI буфер (рН 7,8), 1 мМ  $MgSO_4$ , 1 мМ АТР и 3,2 мкг/мл АТР-азы. В отдельных экспериментах (рис. 5) вместо трис-НСI использовали в качестве буфера морфолиновоэтансульфонокислоту. В специальном опыте



было показано, что измеряемая величина  $\Delta\phi$  не зависит от природы буфера. Скачок потенциала на границе раздела фаз октан — вода измеряли в следующей цепи:

Au | воздух | октан | вода | солевой мостик |  $Hg_2Cl_2$ , Hg

На рис. 8 представлена блок-схема установки для измерения вольта-потенциала в цепи: 1 — вибрирующий электрод, приводимый в движение генератором механических колебаний (электрод колеблется на расстоянии 0,2—1,0 мм от поверхности октана), 2 — слой октана (3 мм), 3 — водный раствор, 4 — солевой мостик, насыщенный KCl, соединяющий водную фазу с каломельным электродом (5). Колебание золотого электрода приводит к периодическому изменению емкости конденсатора, образованного золотым электродом и поверхностью водного раствора. Возникающий ток смещения усиливается специальным усилителем (6) и регистрируется на осциллографе (7). Компенсирующее устройство (8) подает на вибрирующий электрод потенциал, равный по величине и противоположный по знаку измеряемому вольта-потенциалу цепи. Компенсирующий потенциал измеряется вольтметром (9) [1, 5, 6]. В опытах использовали равновесные системы октан — вода, содержащие перечисленные выше компоненты за исключением АТР,  $Mg^{2+}$  и АТР-азы, которые добавляли в ячейку непосредственно перед измерением. Равновесные системы готовили в отдельной посуде, в которой водные растворы в течение 24 ч уравнивались с октаном. Все приведенные на рисунках данные представляют собой изменение вольта-потенциала в цепи, измеренное методом вибрирующего конденсатора и отложенное относительно «фона», т. е. раствора, который не содержал одного из компонентов, необходимых для протекания АТР-азной реакции.

Авторы выражают благодарность А. Н. Фрумкину, а также Л. А. Драчеву, Е. А. Либерману, Л. С. Ягужинскому за обсуждение результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1974) Докл. АН СССР, **218**, 963—966.
2. Богуславский Л. И. (1974) Тезисы симпозиальных докладов, 3-й Всесоюзный биохимический съезд, стр. 213—214. Рига.
3. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т. (1974) 3-й Всесоюзный биохимический съезд, рефераты научных сообщений, т. 2, стр. 43, Рига.
4. Рэкер Э. (1967) Биоэнергетические механизмы, «Мир», М.
5. Бойцов В. Г., Богуславский Л. И. (1966) Электрохимия, **2**, 377—379.
6. Фрумкин А. Н., Гугешавили М. И., Богуславский Л. И. (1971) Докл. АН СССР, **198**, 1452—1456.
7. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation, Bodmin, Glynn Research.
8. Mitchell P. (1973) FEBS Lett., **33**, 267—324.
9. Скулачев В. П., (1974) Успехи современной биологии, **77**, 125—154.
10. Козлов И. А., Кононенко В. А. (1975) Биоорган. химия, **1**, 489—493.
11. Метельский С. Т., Козлов И. А. (1974) Докл. АН СССР, **219**, 1010—1013.
12. Mitchell P., Moyle J. (1974) Biochem. Soc. Spec. Suppl. (Great Britain), **4**, 91—112.
13. Means G. E., Seney R. E. (1971) Chemical Modification of Proteins, Holden-Day Inc., San-Francisco, pp. 144—148.
14. Tzagoloff A., Byington K. H., MacLennan D. H. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 2405—2412.
15. Hilborn D. A., Hammes G. G. (1973) Biochemistry, **12**, 983—990.
16. Соколова Н. И., Носова В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, **206**, 129—133.
17. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., Liberman E. A., Nemeček I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Y., Skulachev V. P. (1974) Nature, **249**, 321—324.
18. Hanfen M., Smith A. L. (1964) Biochim. et biophys. acta, **81**, 214—221.
19. Horstman L. L., Racker E. (1970) J. Biol. Chem., **245**, 1336—1344.
20. Nishimura M., Ito T., Chance B. (1962) Biochim. et biophys. acta, **52**, 177—186.

Поступила в редакцию  
3.XII.1974

A STUDY OF THE PROPERTIES OF SOLUBLE MITOCHONDRIAL  
ATPase ON THE OCTANE/WATER INTERPHASE

BOGUSLAVSKY L. I., VOLKOV A. G., KOZLOV I. A.,  
METELSKY S. T., SKULACHEV V. P.

*Institute of Electrochemistry, Academy of Science of the USSR,  
Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov  
State University, Moscow*

The behaviour of soluble mitochondrial ATPase on the octane/water interphase has been studied, using the vibrating capacitor method. It was shown that a change in volt potential resulting from the transfer of positive charges from water to octane during ATP hydrolysis by the enzyme on the octane/water interphase, is determined by the concentration of the substrate of the ATPase reaction (Mg-ATP) and by the competitive inhibitor of the ATPase reaction (Mg-ADP). N-cyclohexyl-N'- $\beta$ -(4-methylmorpholino)ethylcarbodiimide (I) inhibits soluble mitochondrial ATPase but has no effect on the rate of the ATPase reaction of the enzyme adsorbed on the octane/water interphase. The ATPase of the submitochondrial particles also has an enhanced resistance to the effect of the inhibitor (I). It is suggested that the role of mitochondrial ATPase consists of the H<sup>+</sup> transfer, linked with the hydrolysis of ATP, from the matrix to the hydrophobic region of the mitochondrial membrane.

---