



УДК 547.953

ФОСФОЛИПИДЫ ПУРПУРНЫХ МЕМБРАН ГАЛОБАКТЕРИЙ

Ушаков А. Н., Циренина М. Л., Симонова Т. Н.,
Волков С. К., Колтовая Н. А., Чекулаева Л. Н.,
Вавер В. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;

Институт биологической физики Академии наук СССР,
Пушкино-на-Оке

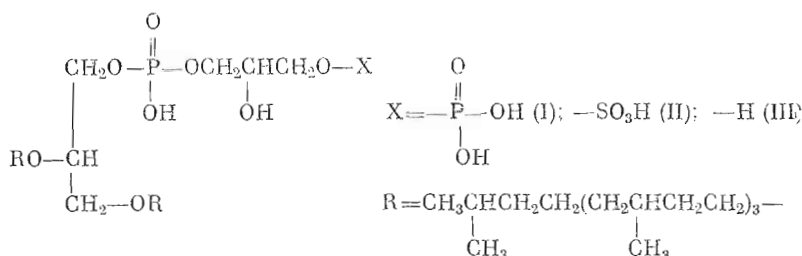
Изучен качественный и количественный состав фосфолипидов, содержащихся в пурпурных мембранах *Halobacterium halobium*. Показано, что в пурпурных мембранах наряду с известными ранее фосфолипидами присутствует фитаниловый аналог кардиолипина — бис(2,3-ди-О-фитанил-*sn*-глицерил-1-фосфорил)-1',3'-*sn*-глицерин.

Пурпурные мембраны (ПМ) представляют собой специализированные участки цитоплазматической мембраны галобактерий — микроорганизмов, развивающихся только в насыщенных солевых растворах [1, 2].

Большой интерес к ПМ галобактерий, возникший в последние годы, связан с тем, что на свету они функционируют как протонный насос, перекачивая протоны с внутренней стороны мембраны наружу. Создаваемый за счет функционирования ПМ электрохимический градиент используется клеткой галобактерий для синтеза АТФ [1].

ПМ содержат единственный белок с молекулярным весом около 26 000, связанный с *транс*-ретиналом [3]. Ретиналиденпротеин, называемый обычно бактериородопсином, судя по данным электронной микроскопии, группируется в липидном бислое ПМ в узлах гексагональной решетки [4, 5]. Вся ПМ является своеобразным липопротеиновым кристаллом, его стабильность поддерживается липидным бислоем, в котором расположены молекулы белка. Липиды не только организуют структуру ПМ, но, вероятно, именно они стабилизируют ту конформацию ретиналиденпротеина, которая необходима для функционирования бактериородопсина в качестве протонного насоса. Поэтому детальное изучение липидов является необходимым этапом для понимания принципов функционирования бактериородопсина.

Известно, что фосфолипиды экстремальных галобактерий имеют необычное строение: все они представляют собой производные 2,3-ди-О-фитанил-*sn*-глицерина [6, 7]. Число индивидуальных фосфолипидов, выделенных из клеток галобактерий, на редкость невелико: их всего три. Это дифитаниловые аналоги фосфатидилглицерофосфата (I), фосфатидилглицеросульфата (II) и фосфатидилглицерина (III).



Впервые фосфолипидный состав ПМ определялся в 1975 г. [8]. Авторы, основываясь на результатах ТСХ, нашли, что в ПМ, выделенных из *Halobacterium cutirubrum*, как и в исходных клетках галобактерий, содержится 85 % фосфолипида (I) и приблизительно по 8 % липидов (II) и (III). В более поздней работе [9] показано, что ПМ, выделенные из двух разных видов галобактерий (*H. cutirubrum* и *H. halobium*), содержат один и тот же белок, одно и то же относительное количество ретиналя и одни и те же фосфолипиды (I—III).

Проведенное нами детальное изучение фосфолипидов ПМ, выделенных из *H. halobium*, показало, однако, что в них содержится не три, а четыре фосфолипида и что постоянство фосфолипидного состава ПМ соблюдается лишь при выделении мембран из клеток галобактерий, выращенных в стандартных условиях.

Настоящая работа посвящена количественному определению состава фосфолипидов ПМ, выделенных из *H. halobium*, штамм R₁, а также установлению строения неизвестного ранее фосфолипида, обнаруженного в ПМ. Работа проводилась в рамках проекта «Родопсин».

Спектры поглощения ПМ, выделенных из клеток *H. halobium*, содержали лишь два пика при 280 и 560 нм [1]. Кроме того, ПМ были охарактеризованы соотношением белка и липидов. Это соотношение оказалось очень близким аналогичному соотношению в ПМ клеток *H. cutirubrum* [8] (см. табл. 1).

Таблица 1
Химический состав пурпурных мембран
(в % на вес сухих мембран)

Компоненты	<i>H. halobium</i> , штамм R ₁	<i>H. cutirubrum</i> [8]
Белок	78	77
Липиды	20	20
Суммарный липидный фосфор	0,84	0,81
Суммарный липидный сахар	2,08	2,76
Весовое соотношение липид/ белок	1:3,9	1:3,9

Таблица 2

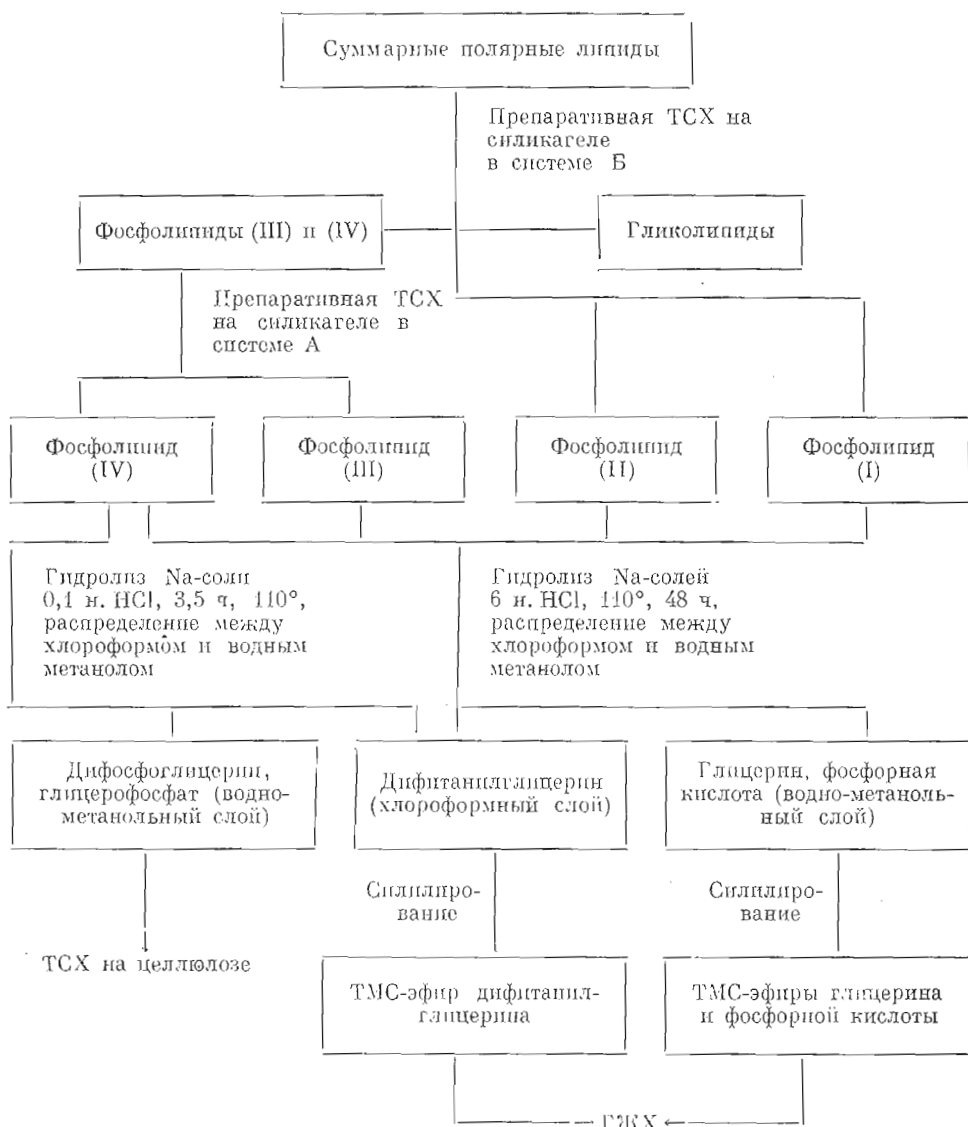
ТСХ и количественный состав фосфолипидов пурпурных мембран и клеток *H. halobium*

Фосфо- липиды	Пурпурные мембраны			Клетки		
	R _f ^A	R _f ^B	Моляр- ные %	R _f ^A	R _f ^B	Моляр- ные %
(I)	0,45	0,20	80,5	0,45	0,20	72,5
(II)	0,40	0,35	9,3	0,40	0,35	15,5
(III)	0,65	0,70	7,5	0,65	0,70	12,0
(IV)	0,90	0,65	2,8	—	—	—

Исследование липидов ПМ *H. halobium* методом двумерной ТСХ показало, что в них содержится четыре фосфорсодержащих вещества (см. рис. 16 и табл. 2). По подвижности в двух системах три из них совпадают с фосфолипидами (I) — (III) клеток галобактерий. Как и в бактериальной клетке, основным фосфорсодержащим веществом ПМ, судя по данным ТСХ, является фосфолипид (I), в качестве минорных компонентов ему сопутствуют липиды (II) и (III). Фосфолипид (IV) в ПМ обнаружен нами впервые; в липидном экстракте, полученном из целых клеток галобактерий, заметить его не удастся. Количественное определение фосфолипидов (I) — (IV), произведенное по методу [11], показало, что ПМ по сравнению с исходной клеткой галобактерий обогащены фосфолипидом (I) и фосфолипидом (IV) (см. табл. 2).

Для подтверждения идентичности фосфолипидов (I), (II) и (III) ПМ соответствующим фосфолипидам клетки и установления строения фосфолипида (IV) все фосфорсодержащие вещества ПМ были выделены в чистом виде препаративной ТСХ.

В предложенной нами схеме исследования фосфолипидов (см. схему) о составе каждого из них судили по соотношению структурных фрагментов



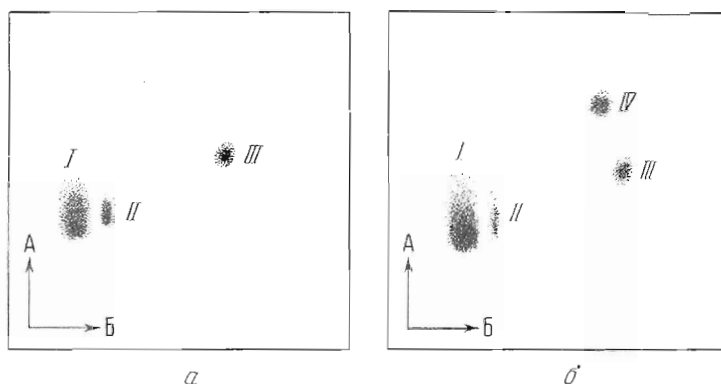


Рис. 1. Двумерная ТСХ фосфолипидов, экстрагированных из клеток *H. halobium* (а) и выделенных из пурпурных мембран этих же клеток (б), в системах растворителей А и Б (см. «Экспер. часть»). Специфическое обнаружение фосфолипидов производилось реагентом Васьева [10]

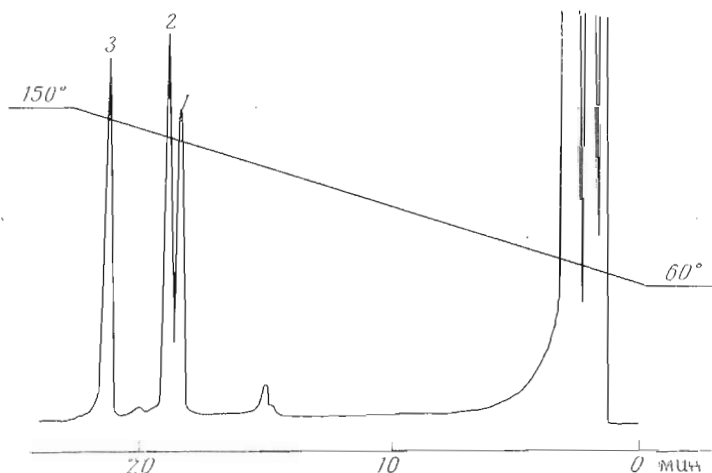


Рис. 2. Типичная газожидкостная хроматограмма ТМС-производных водорастворимых продуктов исчерпывающего гидролиза фосфолипидов ПМ: 1 — ортофосфорная кислота, 2 — глицерин, 3 — гексантиол-1,6 (внутренний стандарт). Условия ГЖХ см. в «Экспер. части»

(дифитанилглицерина, глицерина и ортофосфата), освобождающихся в результате исчерпывающего кислотного гидролиза. Контрольными экспериментами было показано, что полный гидролиз глицерофосфорных эфиров (I) — (III) проходит при нагревании натриевых солей последних с 6 н. HCl при 110° в течение 48 ч. Гидролиз магниевых или кальциевых солей фосфолипидов (I) — (II) затрудняется их малой растворимостью в соляной кислоте. В более мягких условиях (разбавленная HCl , менее продолжительное нагревание) количество освобождающегося глицерина было неполным из-за присутствия в продуктах гидролиза нерасщепленного глицерофосфата. Продукты гидролиза распределяли между хлороформом и водным метанолом. Гидрофобные вещества, содержащиеся в хлороформном слое, как и водорастворимые продукты гидролиза, превращенные в ТМС-эфиры, анализировали ГЖХ. Результаты анализов показали, что в хлороформном слое во всех случаях содержится одно вещество, идентичное по относительному объему удерживания 2,3-ди-О-фитанил-*sn*-глицерину. В водно-метанольном слое были идентифицированы глицерин и фосфорная кислота (рис. 2). Молярные соотношения дифи-

Состав продуктов исчерпывающего кислотного гидролиза фосфолипидов пурпурных мембран (мг-экв на 100 мкг Р*)

Фосфолипид	Глицерин **	Дифитанилглицерин **	Р:глицерин:дифитанил-глицерин, моль/моль/моль
(I)	1,53	1,55	2:1:1
(II)	3,18	2,80	1:1:1
(III)	3,05	3,25	1:1:1
(IV)	1,60	3,25	2:1:2

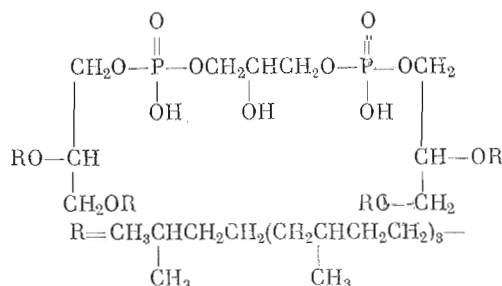
* Найдено методом ГЖХ ТМС-эфиров и колориметрией [12].

** Найдено методом ГЖХ ТМС-эфиров.

танилглицерина, глицерина и ортофосфорной кислоты, полученных в результате гидролиза всех четырех фосфолипидов пурпурных мембран, приведены в табл. 3. Найденные соотношения структурных фрагментов в комбинации с данными ТСХ (см. табл. 2) являются достаточными для подтверждения строения фосфолипидов (I), (II) и (III) ПМ как дифитаниловых аналогов фосфатидилглицерофосфата, фосфатидилглицеросульфата и фосфатидилглицерина. Строение фосфосульфолипида (II) было дополнительно подтверждено превращением его в фосфолипид (III), которое происходит при комнатной температуре под действием 0,005 н. HCl в абс. тетрагидрофуране [7].

Фосфолипид (IV) дает в результате исчерпывающего кислотного гидролиза дифитанилглицерин, глицерин и фосфорную кислоту в соотношении 2 : 1 : 2. Этот липид подвергали также мягкому кислотному гидролизу. Продукты гидролиза распределяли между хлороформом и водным метанолом. Анализ хлороформного слоя методом ГЖХ показал, что в нем содержится дифитанилглицерин. В водно-метанольной фазе ТСХ на пластинках с целлюлозой были идентифицированы α -глицерофосфат и α, α' -глицеродифосфат.

Наличие в продуктах мягкого гидролиза фосфолипида (IV) α, α' -глицеродифосфата при указанном выше соотношении продуктов исчерпывающего гидролиза позволяет предложить для него структуру бис-(2,3-ди-О-фитанил-*sn*-глицерил-1-фосфорил)-1',3'-*sn*-глицерина — фитанилового аналога кардиолипина:



Найденное нами соотношение фосфолипидов ПМ остается постоянным лишь для препаратов, выделенных из клеток культуры, выращенной в стандартных условиях. При изменении условий культивирования галобактерий (изменение состава питательной среды, освещенности, аэрации) соотношение липидов в клетках галобактерий меняется; в меньшей, но заметной степени меняется и состав фосфолипидов ПМ.

Таким образом, показано, что в ПМ клеток *H. halobium* содержится четыре фосфолипида, один из них — бис(2,3-ди-О-фитанил-*sn*-глицерил-1-фосфорил)-1',3'-*sn*-глицерин — выделен и охарактеризован впервые.

Галобактерии *H. halobium*, штамм R₁, без газовых вакуолей [13] культивировали на синтетической среде [14] в стеклянном ферментере емкостью 20 л, освещаемом 20 люминесцентными лампами марки «ЛР», или на установке, описанной в работе [15]. В конце 4-х сут ферментации клетки галобактерий отделяли центрифугированием и сохраняли на холоде.

Все растворители, использованные для экстракции и разделения липидов, очищали по стандартным методикам и перегоняли перед употреблением. Для аналитической ТСХ липидов использовали пластинки со специально приготовленным силикагелем марки КСК [11]. Препаративную ТСХ проводили на пластинках 20 × 20 см с силикагелем Н (Ferak, ГДР), импрегнированным борной кислотой и закрепленным 5 % гипса (толщина слоя адсорбента 0,5—0,6 мм). Для разделения фосфолипидов использовали системы растворителей хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4) (А) и хлороформ — метанол — 25 %-ный водный аммиак (65 : 35 : 5) (Б).

Выделение пурпурных мембран из клеток галобактерий. К 80—100 г пасты клеток *H. halobium* прибавляли раствор 8 мг ДНКазы (Sigma, США) в 20 мл воды. Смесь тщательно перемешивали 1 ч, постепенно добавляя 1000—1100 мл воды. Полученную суспензию центрифугировали на центрифуге «Spinco» (Beckman, США), снабженной ротором Type-19, при 10° (19 000 об/мин, 1,5 ч). Осадок, состоящий в основном из ПМ и «красных мембран» [8], последовательно ресуспендировали в 25 %-ном NaCl, 0,1 н. NaCl и два раза в воде, каждый раз осаждая мембраны центрифугированием в описанных выше условиях. Выделенные таким образом ПМ суспендировали в 35—40 мл 10 %-ного раствора сахарозы и центрифугировали 6 ч в линейном сахарозном градиенте (52—25 % сахарозы) на центрифуге «Spinco» (Beckman, США) в зональном роторе Ti-14 при скорости 38 000 об/мин.

Затем содержимое ротора на ходу разгружали на коллектор в виде фракций объемом ~10 мл. Оптическую плотность всех полученных фракций измеряли на спектрофотометре (Gilford, Англия, модель 240) при 280 и 560 нм. По данным этих измерений отбирали фракции чистых ПМ [1], которые объединяли и освобождали от сахарозы, пропуская через колонку размером 40 × 2,5 см с сефадексом G-75. Содержание ПМ в элюате определяли по весу остатка, полученного лиофилизацией аликвотной части суспензии. Выход ПМ из 100 г пасты клеток *H. halobium* составляет 250—300 мг. ПМ анализировали на содержание белка [16], суммарного липидного фосфора [12] и суммарного липидного сахара [17]. Средние результаты таких определений приведены в табл. 1.

Экстракция липидов из пурпурных мембран и клеток H. halobium. К 25 мл суспензии ПМ (содержащей 1,5 мг мембран в 1 мл) прибавляли 8,3 г NaCl, 50 мл метанола и 25 мл хлороформа. Смесь интенсивно встряхивали в течение 10 мин, добавляли 25 мл хлороформа и 25 мл 25 %-ного раствора NaCl. Хлороформный и водно-метанольный слои разделяли центрифугированием (10 мин, 5000 об/мин, центрифуга ЦУМ-1). Хлороформный слой упаривали. Остаток (суммарные липиды) растворяли в 5 мл хлороформа. Полярные липиды осаждали при 0° 50 мл ацетона, выделяли центрифугированием, сушили в вакууме. Выход суммарных полярных липидов — 9,5—10 мг. Для хранения полярные липиды ПМ растворяли в 10 мл абс. бензола.

Экстракцию липидов из клеток *H. halobium* производили смесью хлороформ — метанол (1 : 2), как описано в работе [18].

Количественное определение состава фосфолипидов пурпурных мембран и клеток. На пластинку для аналитической двумерной ТСХ наносили 1—2 мкл хлороформного раствора суммарных липидов ПМ и клеток (0,1—2 мкг липидного фосфора). Хроматограмму проявляли в системах хлоро-

форм — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (А) и хлороформ — метанол — 25 %-ный водный аммиак, 65 : 35 : 5 (Б). Пятна фосфолипидов обнаруживали реактивом Васьковского [10], вырезали и анализировали на содержание фосфора, как описано в работе [11]. Полученные результаты использовали для вычисления состава фосфолипидов ПМ и клеток в молярных процентах (см. табл. 2).

Выделение индивидуальных фосфолипидов пурпурных мембран. Полярные липиды, выделенные, как описано выше, из 100 мг ПМ, наносили на одну препаративную пластинку с силикагелем. Хроматограмму дважды проявляли в системе Б. Край хроматограммы обрабатывали реактивом Васьковского [10], зоны с R_f 0,18; 0,3 и 0,62 вырезали, вещества элюировали с силикагеля смесью хлороформ — метанол — серный эфир (1 : 1 : 1). Элюаты упаривали, чистоту фракций контролировали двумерной ТСХ в описанных выше условиях. Фракции с R_f 0,18 и 0,30 упаривали, растворяли в 1 мл бензола и анализировали на содержание липидного фосфора, а фракцию с R_f 0,62 наносили на препаративную пластинку размером 10×20 см и разделяли в системе А. В результате все четыре фосфолипида были выделены в хроматографически однородном состоянии.

Получение натриевых солей фосфолипидов пурпурных мембран. В колонку размером 1×8 см помещали катионит дауэкс-50. Ионообменную смолу промывали 1 н. HCl, водой, метанолом и в заключение смесью хлороформ — метанол — вода (1 : 4 : 2). Выделенные препаративной ТСХ фосфолипиды (I) — (IV) ПМ растворяли в небольшом количестве смеси хлороформ — метанол — вода (1 : 4 : 2), наносили на колонку и элюировали той же смесью; элюаты нейтрализовали 0,5 н. раствором NaOH в метаноле до pH 7,0 и упаривали досуха в вакууме. Натриевые соли фосфолипидов растворяли в минимальном количестве хлороформа, осаждали охлажденным до 0° ацетоном, центрифугировали и для хранения снова растворяли в хлороформе.

Исчерпывающий гидролиз натриевых солей фосфолипидов пурпурных мембран. Пробы натриевых солей фосфолипидов, содержащие 10—15 мкг-экв. липидного фосфора, нагревали 48 ч в ампулах с 1,5 мл 6 н. водного раствора HCl при 110°. Продукты гидролиза распределяли в системе хлороформ — метанол — вода (8 : 4 : 3), слои разделяли. Водно-метанольные слои анализировали на содержание фосфора [12], упаривали досуха в вакууме водоструйного насоса. Остатки стандартизовали 0,5 мкг-гександиола-1,6 и силилировали смесью пиридин — гексаметилдисилазан — триметилхлорсилан (5 : 5 : 1) при 60° в течение 30 мин [19]. Полученные ТМС-эфиры анализировали ГЖХ на колонке размером 2000×2 мм, заполненной 3% SE-30 на хромосорбе W. Температуру в ходе анализа повышали с 60 до 150° со скоростью 4°/мин.

Хлороформные слои упаривали, содержание 2,3-ди-О-фитанил-*sn*-глицерина определяли методом ГЖХ на колонке 1000×4 мм с 3% SE-30 на хромосорбе W, 80—100 меш в изотермических условиях при 290°. В качестве внутреннего стандарта использовали дипальмитат этиленгликоля.

Мягкий кислотный гидролиз натриевой соли фосфолипида (IV). Аликвотные части натриевой соли фосфолипида (IV), содержащие 10—15 мкг-экв. липидного фосфора, нагревали 3,5 ч при 110° в ампулах с 1 мл 0,1 н. HCl. Продукты гидролиза распределяли в системе хлороформ — метанол — вода (8 : 4 : 3), слои разделяли. В водно-метанольных слоях определяли содержание фосфора [12] и полярные продукты анализировали ТСХ на пластинках размером 9×12 см с целлюлозой TLC (Serva, ФРГ; толщина слоя 0,5 мм). Хроматограммы проявляли в системе изопропанол — вода — 25 %-ный аммиак (5 : 2 : 2). Пятна фосфорсодержащих компонентов анализируемой смеси обнаруживали молибдатным реагентом [20]. Идентификацию пятен на хроматограммах производили с использованием заведомых образцов α -глицерофосфата (R_f 0,56) и α,α' -глицеро-

дифосфата (R_f 0,32), полученных мягким кислотным гидролизом фосфолипида (I). Содержание 2,3-ди-О-фитанилглицерина в хлороформном слое определяли методом ГЖХ, как описано выше.

Десульфатирование фосфолипида (II). Раствор Na-соли фосфолипида (II), содержащий 100 мкг фосфора, упаривали досуха. К остатку добавляли 1 мл 0,005 н. HCl в абс. тетрагидрофуране и выдерживали 2 ч при комнатной температуре [7]. В продуктах реакции с помощью ТСХ обнаружено единственное фосфорсодержащее вещество, имеющее в системах А и Б ту же подвижность, что и фосфолипид (III).

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
2. Oesterhelt D. (1976) *Angew. Chem. int. ed.*, **15**, 17—24.
3. Bridgen J., Walker J. D. (1976) *Biochemistry*, **15**, 792—798.
4. Blaurock A. E. (1975) *J. Mol. Biol.*, **93**, 139—158.
5. Henderson R., Unwin R. N. T. (1975) *Nature*, **257**, 28—32.
6. Kates M. (1972) in *Ether Lipids, Chemistry and Biology* (Snyder F., ed.), pp. 351—399, Acad. Press, N. Y.
7. Hancock A. J., Kates M. (1973) *J. Lipid Res.*, **14**, 422—429.
8. Kushwaha S. C., Kates M., Martin W. G. (1975) *Can. J. Biochem.*, **53**, 284—292.
9. Kushwaha S. C., Kates M., Stoeckenius W. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **426**, 703—710.
10. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V. (1968) *J. Lip. Res.*, **9**, 396.
11. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. (1973) *J. Chromatogr.*, **67**, 376—378.
12. Gerlach E., Deuticke B. (1963) *Biochem. Z.*, **337**, 477—479.
13. Stoeckenius W., Kunau W. H. (1967) *J. Cell. Biol.*, **38**, 337—357.
14. Sehgal S. N., Kates M., Gibbons N. E. (1962) *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 69—81.
15. Чекулаева Л. Н., Каюшин Л. П., Перепелкина Н. И. (1975) *Микробиол. пром-сть*, **122—123**.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
17. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebeis P. A., Smith F. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350—356.
18. Kates M., Yengoyan L. S., Sastry P. S. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **98**, 252—268.
19. Ушаков А. Н., Циренина М. Л., Вавер В. А., Бергельсон Л. Д. (1976) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1850—1853.
20. Dawson R. M. (1960) *Biochem. J.*, **75**, 45—53.

Поступила в редакцию
15.VIII.1977

После доработки
25.XI.1977

PHOSPHOLIPIDS OF HALOBACTERIA PURPLE MEMBRANES

USHAKOV A. N., TSYRENINA M. L., SIMONOVA T. N.,
VOLKOV S. K., KOLTOVAYA N. A., CHEKULAYEVA L. N.,
VAVER V. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Biological Physics, Academy
of Sciences of the USSR, Pushchino*

The quantitative and qualitative phospholipid composition of *Halobacterium halobium* purple membranes has been investigated. Along with known phospholipids the membranes were shown to contain a new lipid — phytanyl ether analog of cardiolipin — bis-(2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glyceryl-1-phosphoryl)-1',3'-*sn*-glycerol.