



УДК 577.352.4

**Mg<sup>2+</sup>-ЗАВИСИМАЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА  
ИЗ МЕМБРАН БАКТЕРИИ *STREPTOCOCCUS FAECALIS*****I. ОЧИСТКА И СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ****Бабаков А. В., Василев Р. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Из мембран бактерии *Streptococcus faecalis* выделена дициклогексилкарбодимид-чувствительная АТР-аза, гомогенная по данным иммунохимического анализа. Фермент состоит из 7 видов субъединиц:  $\alpha$  — 55 000,  $\beta$  — 51 000,  $\gamma$  — 35 000,  $\delta$  — 20 000,  $h_1$  — 16 000,  $\varepsilon$  — 13 500,  $h_2$  — 9 500. Методом реконструкции получены липосомы, в мембраны которых встроена очищенная АТР-аза. Измерения <sup>32</sup>P — АТР-обмена и потенциала, возникающего на мембранах липосом в ответ на добавление АТР, показали, что выделенный комплекс имеет в своем составе полный набор субъединиц, необходимый для работы этой АТР-азы в качестве протонного насоса. Величина <sup>32</sup>P — АТР-обмена (170 нМ/мг·мин) указывает на то, что мембранная АТР-аза *S. faecalis*, катализирующая в клетках гидролиз АТР, сопряженный с активным транспортом протонов, способна также осуществлять и синтез АТР.

H<sup>+</sup>-АТР-азы бактерий, митохондрий и хлоропластов играют центральную роль в трансформации энергии в биомембранах. Как установлено [1], H<sup>+</sup>-АТР-азы состоят из трех частей: легко диссоциирующей водорастворимой каталитической части (названной фактором F<sub>1</sub> для митохондрий, CF<sub>1</sub> для хлоропластов и BF<sub>1</sub> для бактерий), гидрофобной некаталитической (F<sub>0</sub>, CF<sub>0</sub> и BF<sub>0</sub> соответственно) и связующего звена между ними. Каталитическая часть бактериальных H<sup>+</sup>-АТР-аз расположена с внутренней стороны цитоплазматической мембраны и принимает непосредственное участие в превращении энергии АТР в энергию протонов. Гидрофобная часть обеспечивает доступ протонов к каталитической части H<sup>+</sup>-АТР-азы с наружной стороны мембраны, что достигается путем создания протонпроводящего канала гидрофобной частью в неполярной области мембраны. Все известные H<sup>+</sup>-АТР-азы, как правило, ингибируются N, N'-дициклогексилкарбодимидом (DCCD) вследствие его взаимодействия с одним из белков гидрофобной части.

H<sup>+</sup>-АТР-аза гликолизующих бактерий в отличие от многих других H<sup>+</sup>-АТР-аз осуществляет в клетке только сопряженную с гидролизом АТР генерацию градиента электрохимического потенциала протонов, но реально не функционирует в качестве АТР-синтетазы. Имеются также косвенные данные о том, что АТР-аза из мембран *Streptococcus faecalis* участвует в транспорте ионов металлов через мембрану, причем это участие не ограничивается созданием мембранного потенциала [2]. Структура и функция данной ферментной системы до сих пор недостаточно изучены.

В данной работе описывается очистка и субъединичный состав АТР-азы из мембран бактерии *S. faecalis*.

Таблица 1

## Очистка DCCD-чувствительного АТР-азного комплекса

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, ед.	Удельная активность, ед/мг	Ингибирование DCCD 0,1 мМ
Суббактериальные частицы	360	480	1,4	80%
Солюбилизованный АТР-азный комплекс	140	520	3,7	78%
Высаливание 30–50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40	280	7,0	85%
Зональное центрифугирование	8	160	20,0	90%

Таблица 2

 $^{32}\text{P}$  – АТР-обмен препаратов АТР-азы *S. faecalis*

Препарат	$^{32}\text{P}$ —АТР-обмен, нМ/мг·мин		
	без добавок	+грамцидин А, 10 мкМ	+DCCD, 0,1 мМ
Суббактериальные частицы	40	2	5
Протеолипосомы с частично очищенной DCCD-АТР-азой (фракция 30–50%)	90	3	6
Протеолипосомы с очищенной DCCD-АТР-азой	170	3	9

Для солюбилизации DCCD-чувствительной мембранной АТР-азы *S. faecalis* ( $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$ ) были проверены следующие детергенты: холат, дезоксихолат и додецилсульфат натрия, тритон X-100, тритон X-35, твин 80, луброл РХ, бридж 58. Из них наиболее пригодными (судя по выходу фермента при солюбилизации и сохранению DCCD-чувствительности) оказались дезоксихолат натрия и тритон X-100. Однако АТР-азный комплекс  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$ , солюбилизованный тритоном X-100, необратимо терял чувствительность к DCCD при дальнейшей очистке. Поэтому для выделения был использован дезоксихолат натрия.

АТР-азный комплекс  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  (табл. 1) по удельной АТР-азной активности удалось очистить в 15 раз по сравнению с исходным препаратом (табл. 1). Выход по АТР-азной активности составляет 33%, по белку — 2,5%. Анализ показал, что выделенный комплекс  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  содержит 20% липидов и в отличие от аналогичных комплексов из *E. coli* [3] и термофильной бактерии PS-3 [4] не требует добавочных фосфолипидов для активации и проявления DCCD-чувствительности. Однако при повторной солюбилизации очищенного комплекса  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  тритоном X-100 чувствительность к DCCD исчезает и может быть восстановлена до 50% добавлением общей фракции липидов мембран *S. faecalis* и до 30% — фосфатидилхолином и фосфатидилэтаноламинном.

Из результатов гель-электрофореза выделенного комплекса  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 1а) видно, что в состав выделенного комплекса  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  входят 7 видов субъединиц, обозначенных

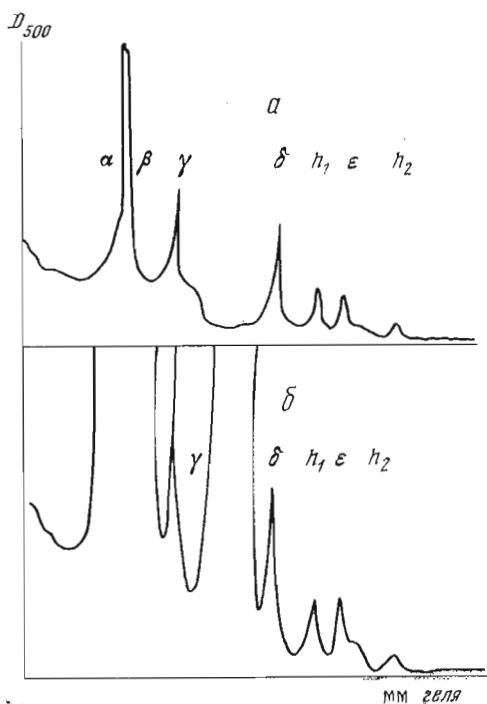


Рис. 1

Рис. 1. Аналитический электрофорез в 10% полиакриламидном геле: а — DCCD — АТР-аза, б — иммунопреципитат DCCD — АТР-азы

Рис. 2. Ингибирование DCCD мембранной АТР-азы (1) и выделенного АТР-азного комплекса (2)

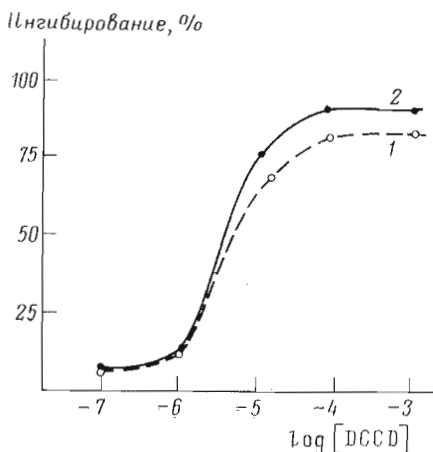


Рис. 2

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $h_1$ ,  $\delta$ ,  $h_2$ ,  $\epsilon$ . При анализе чистоты белков, нерастворимых в воде и имеющих сложную субъединичную структуру, необходимо показать, что ни одна из субъединиц, обнаруженных нами в выделенном АТР-азном комплексе, не является примесным белком, солюбилизированным вместе с комплексом  $SfF_0 \cdot F_1$ . Для проверки чистоты выделенного комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$  нами применен иммунохимический метод. С этой целью была получена антисыворотка к каталитической части  $SfF_1$  и с ее помощью проведено осаждение всего комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$ . В этом случае для солюбилизации DCCD-чувствительной АТР-азы использовали тритон X-100. Выбор тритона X-100 основан на том, что, во-первых, этот детергент не оказывает ингибирующего действия на антитела и, во-вторых, можно ожидать, что в препарате DCCD-чувствительной АТР-азы, солюбилизированной тритоном X-100, состав и содержание примесных белков будут отличаться от их состава в препарате комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$ , солюбилизированного дезоксихолатом натрия, поскольку эти детергенты имеют принципиально разные механизмы действия.

Результаты гель-электрофореза иммунопреципитата комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$  (рис. 1б) показали, что наиболее интенсивные полосы на электрофореграмме соответствуют тяжелым и легким цепям иммуноглобулинов, причем тяжелая цепь движется вместе с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами, а легкая цепь — отдельно от всех субъединиц комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$ .

Сопоставление данных гель-электрофореза комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$  (рис. 1а) и его иммунопреципитата (рис. 1б) показывает, что независимо от способа солюбилизации и выделения АТР-азный комплекс  $SfF_0 \cdot F_1$  состоит из 7 видов субъединиц. На основании полученного результата можно заключить, что выделенная DCCD-чувствительная АТР-аза гомогенна и все наблюдаемые нами при гель-электрофорезе белковые полосы связаны с субъединицами комплекса  $SfF_0 \cdot F_1$ , а не с примесными белками.

Как уже было отмечено, мембранная  $H^+$ -АТР-аза *S. faecalis* ингибируется DCCD и генерирует электрический потенциал [5]. Эти свойства

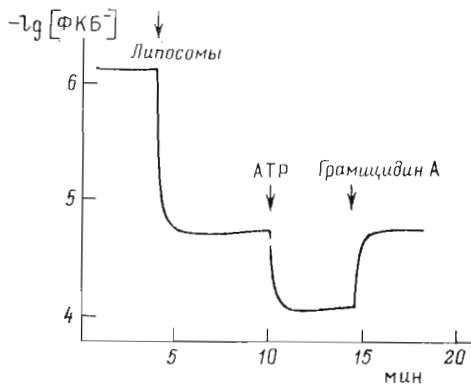


Рис. 3. Энергизованное поглощение фенилдикарбаундекаборана (ФКБ<sup>-</sup>) протеолипосомами

фракцию липидов из мембран бактерий *S. faecalis*, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Такое отсутствие специфичности к фосфолипидам, по-видимому, может быть объяснено большим содержанием собственных липидов (20%) в выделенном нами АТФ-азном комплексе.

Как следует из рис. 3, на мембранах протеолипосом с АТФ-азным комплексом  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  при добавлении АТФ возникает электрический потенциал, причем ингибитор АТФ-азы, DCCD, и ионофор, грамицидин А, блокировали этот эффект.

С целью проверки обратимости работы DCCD-чувствительной АТФ-азы *S. faecalis* было проведено измерение <sup>32</sup>P — АТФ-обмена. Оказалось (табл. 2), что такой обмен существует, причем, как и следовало ожидать, протеолипосомы с очищенным комплексом  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  проявляют наибольший удельный <sup>32</sup>P — АТФ-обмен. DCCD, ингибирующий АТФ-азную активность, и грамицидин А, снимающий мембранный потенциал, полностью подавляют эту реакцию.

Совпадение зависимости ингибирования АТФ-азной активности комплекса  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  и суббактериальных частиц от концентрации DCCD (рис. 2), а также способность очищенного АТФ-азного комплекса генерировать электрический потенциал на мембранах протеолипосом, полученных методом реконструкции, указывают на то, что в процессе выделения и очистки DCCD-чувствительного АТФ-азного комплекса не произошло потерь каких-либо субъединиц, существенных для работы этого фермента в качестве протонного насоса.

Нами показано \*, что каталитическая часть АТФ-азы — фактор  $\text{SfF}_1$  состоит из 4 видов субъединиц:  $\alpha$  — 55 000,  $\beta$  — 51 000,  $\gamma$  — 35 000 и  $\epsilon$  — 13 500. В выделенном комплексе помимо 4 субъединиц каталитической части АТФ-азы есть 3 дополнительные субъединицы. Используя субъединицы фактора  $\text{SfF}_1$  в качестве маркеров молекулярного веса, мы оценили молекулярные веса остальных субъединиц: 20 000, 16 000 и 9 500.

Из работ [6—8], посвященных исследованию взаимодействия бактериальных факторов  $\text{F}_1$  с гидрофобной частью АТФ-азного комплекса  $\text{F}_0$ , следует, что субъединица  $\delta$  с молекулярным весом 20 000 выполняет функцию связующего звена между  $\text{SfF}_1$  и  $\text{SfF}_0$ . Это дает нам основание полагать, что гидрофобная часть АТФ-азного комплекса *S. faecalis* образована субъединицами двух типов с молекулярными весами 16 000 и 9 500, названных нами  $h_1$  и  $h_2$  (hydrophobic). Этот вывод носит предварительный характер, поскольку вопрос о субъединичном составе гидрофобной части АТФ-азного комплекса может быть решен окончательно только после выделения всех

были использованы нами в качестве критериев сохранения функциональной активности выделенного АТФ-азного комплекса. Из рис. 2 видно, что АТФ-азный комплекс ингибируется DCCD, причем кривая ингибирования совпадает с аналогичной кривой для мембраносвязанного фермента. Для того чтобы убедиться, способен ли АТФ-азный комплекс *S. faecalis* генерировать мембранный потенциал, методом реконструкции были получены липосомы с встроенным очищенным комплексом  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$ . Для реконструкции с равной эффективностью использовали различные фосфолипиды: общую

\* См. сообщение II в одном из ближайших номеров журнала.

ее индивидуальных субъединиц в гомогенном виде. Полученный нами АТР-азный комплекс из цитоплазматических мембран бактерий *S. faecalis*, по видимому, может быть использован в качестве исходного материала для такой работы.

Сравнение субъединичных составов АТР-азного комплекса бактерии *S. faecalis* с аналогичными ферментами из *E. coli* [3], термофильной бактерии PS-3 [4], митохондрий [9] и хлоропластов [10] показывает, что каталитические части всех этих ферментов имеют сходный субъединичный состав. Что касается гидрофобной части различных АТР-азных комплексов, то здесь не наблюдается такого однозначного соответствия, хотя по количеству типов субъединиц (2 у *S. faecalis* и *E. coli* и 3 у термофильной бактерии) они незначительно различаются между собой.

Постоянство субъединичных составов у  $H^+$ -АТР-аз, выделенных из объектов с различной энергетикой, вероятно, частично связано с тем, что эти ферменты с равным успехом в зависимости от внешних условий способны катализировать как реакцию синтеза АТР, так и реакцию гидролиза АТР, сопряженную с активным транспортом протонов. Подтверждением этому служат результаты, полученные нами при измерении энергетически-связанного  $^{32}P$  — АТР-обмена, осуществляемого АТР-азным комплексом *S. faecalis* в протеолипосомах. Эта реакция указывает на способность  $H^+$ -АТР-азы вести синтез АТР. Измеренная величина (170 нМ/мг · мин) практически совпадает с аналогичной величиной, измеренной для АТР-азного комплекса термофильной бактерии [11], в которой этот фермент катализирует синтез АТР.

Проведенная нами очистка АТР-азного комплекса цитоплазматических мембран бактерии *S. faecalis*, сохранившего при выделении основные функциональные свойства, дает возможность непосредственно перейти к исследованию функций каталитической и гидрофобной частей, равно как и роли их отдельных субъединиц в молекулярном механизме работы этого фермента.

#### Экспериментальная часть

Культуры клеток *Streptococcus faecalis* (ВКМ 6, коллекция микроорганизмов Института микробиологии АН СССР, Москва) выращивали в ферментерах в анаэробных условиях при 38° на питательной среде следующего состава: 1% пептон, 1%  $K_2HPO_4$ , 1% глюкоза, 0,5% дрожжевой аутолизат, рН 7,5. Клетки собирали центрифугированием после достижения стационарной фазы роста через 18 ч, замораживали и хранили в холодильнике при -70°.

Ультразвуковые суббактериальные частицы готовили по методу [5]. Выделение фермента проводили следующим образом: ультразвуковые суббактериальные частицы (5 мг белка в 1 мл) инкубировали при перемешивании в течение 30 мин при 4° с 0,8% дезоксихолата натрия, 1 М КСl, 10 мМ трис-НСl (рН 7,5) и центрифугировали 1 ч (L 5-50, Beckman, Австралия, ротор SW-40, 35 000 об/мин, 4°). Полученный супернатант подвергали ступенчатому высаливанию (30—50%) с помощью насыщенного раствора сульфата аммония. Фракцию 30—50% суспендировали в 10 мл буфера [40 мМ трис- $SO_4$  (рН 7,5), 2,5 мМ  $MgSO_4$ , 10% сахарозы] и наносили на линейный градиент плотности сахарозы 20—40%, созданный в зональном роторе и содержащий 0,05% дезоксихолата натрия, 40 мМ трис- $SO_4$  (рН 7,5), 2,5 мМ  $MgSO_4$ , 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, и центрифугировали в течение 18 ч (L 5-50, ротор Ti14; 35 000 об/мин, 4°; объем градиента 500 мл). После окончания центрифугирования содержимое ротора собирали по фракциям 20 мл. Результаты зонального центрифугирования показаны на рис. 4.

Объединенные фракции, обладающие АТР-азной активностью, диализовали (Hollow fiber b/HFU) и центрифугировали (L5-50, ротор SW-40, 35 000 об/мин, 1 ч, 4°). Осадок, содержащий практически всю собранную

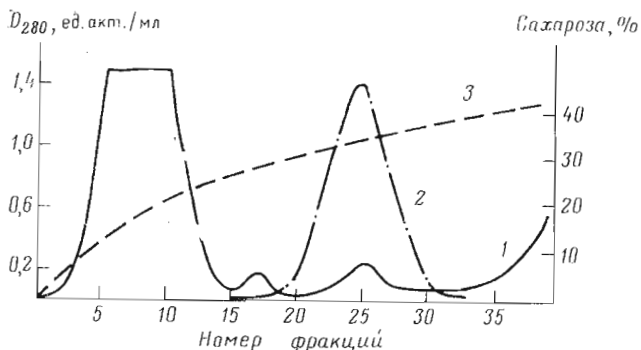


Рис. 4 Распределение белка (1) и АТР-азной активности (2) в зональном роторе; 3 — сахаразы (%)

АТР-азную активность, суспендировали (5 мг белка в 1 мл) в 40 мМ трис- $\text{SO}_4$  (рН 7,5), 2,5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10% глицерина. Препарат хранили без потери активности до 5 сут при 4°, для более длительного хранения подвергали лиофилизации.

Общую фракцию фосфолипидов из мембран бактерий *S. faecalis* выделяли по методу Фолча [12] и частично очищали ацетоном [13]. Хроматографически чистые фосфатидилэтаноламин из дрожжей и фосфатидилхолин из куриных яиц получали по методу [14]. Кроликов иммунизировали каталитической частью АТР-азного комплекса — фактором  $\text{SfF}_1$  в лимфоузлы, расположенные в подколенных чашечках [15].

В работе использовали: АТР (Reanal, Венгрия), дезоксихолат, холат, додецилсульфат натрия, тритон X-100, тритон X-35, луброл РХ, твин 80, бридж 58 (Serva, ФРГ), дитиотреит (Sigma, США), DCCD (Ferrak, Зап. Берлин), лизоцим и ДНКазу (Олайн),  $^{32}\text{P}$  (Всесоюзное объединение «Изотоп»). Грамицидин А был любезно предоставлен чл.-кор. АН СССР В. Т. Ивановым, фенилдикарбаундекаборан — канд. биол. наук Л. М. Цофиной.

АТР-азную активность измеряли путем определения количества неорганического фосфата. За единицу активности принимали 1 мкМ гидролизованной АТР в 1 мин. Среда для определения активности содержала 0,1 М трис- $\text{HCl}$  (рН 7,5), 2,5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 5 мМ АТР при 38°. Скорость ферментативной реакции определяли за 15 мин, предынкубацию с DCCD проводили в течение 10 мин.

Концентрацию белка определяли методом Лоури [16] в модификации [17] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Органический фосфор липидов измеряли по методу [18], а  $^{32}\text{P}$  — АТР-обмен — по методу [11]. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу Вебера и Осборн [19]. Мембранный потенциал протеолипосом измеряли методом проникающих анионов [20].

Солюбилизацию комплекса  $\text{SfF}_0 \cdot \text{F}_1$  тритоном X-100 и иммунопреципитацию проводили следующим образом. Ультразвуковые фрагменты мембран бактерий суспендировали (5 мг белка/мл) в 0,4% растворе тритона X-100, инкубировали 10 мин при 37° и центрифугировали (L5-50, ротор SW-40; 35 000 об/мин, 1 ч, 4°). К полученному супернатанту добавляли антисыворотку, предварительно осветленную центрифугированием (J-21В, Векман, США, ротор JA-21; 15 000 об/мин, 30 мин, 4°) в объеме соотношении 1 : 2. Смесь инкубировали 30 мин при 37° и центрифугировали (L5-50, ротор SW-40, 35 000 об/мин, 20 мин, 4°). Иммунопреципитат промывали водой и суспендировали в минимальном объеме фосфатного буфера, используемого для гель-электрофореза.

Протеолипосомы готовили так же, как и в работе [11], с соотношением липид — белок, равным 50 : 1. После окончания диализа (48 ч) образо-

вавшуюся суспензию протеолипосом центрифугировали (L5-50, ротор SW 50.1; 38 000 об/мин, 30 мин, 4°) и для измерений использовали супернатант.

Выражаем искреннюю признательность акад. Ю. А. Овчинникову за интерес к работе и ценные замечания, сделанные при обсуждении результатов. Приносим благодарность Н. М. Гевондян за получение антисыворотки к каталитической части АТР-азного комплекса — фактору  $\text{SiF}_4$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kozlov I. A., Skulachev V. P. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **463**, 29—90.
2. Harold F. M., Papaneau O. (1972) *J. Membrane Biol.*, **8**, 45—62.
3. Hare J. F. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1329—1337.
4. Sone N., Yoshida M., Hirata H., Kagawa Y. (1975) *J. Biol. Chem.*, **19**, 7917—7923.
5. Горнева Г. А., Скопинская С. И., Демин В. В., Рябова И. Д. (1976) *Биохимия*, **41**, 1033—1037.
6. Abrams A., Jensen G., Morris E. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **69**, 804—811.
7. Vogel G., Steinhart R. (1976) *Biochemistry*, **15**, 208—216.
8. Smith J. B., Sternweis R. C. (1977) *Biochemistry*, **16**, 306—310.
9. Ryrie I. J. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **184**, 464—475.
10. Tzagoloff A., Meagher P. (1974) *J. Biol. Chem.*, **246**, 7328—7336.
11. Kagawa Y., Racker E. (1974) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477—5487.
12. Folch Y., Lees M., Sloan-Stanley J. U. (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497—509.
13. Kagawa Y., Kandrach A., Racker E. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 676—684.
14. Dawson R. M. C. (1963) *Biochem. J.*, **88**, 414—423.
15. Сидорова Е. В., Трудялובהва М. Г. (1977) в кн.: *Современные методы в биохимии*, «Медицина», М.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1954) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
17. Duley I. R., Grieve P. A. (1975) *Analyt. Biochem.*, **64**, 136—141.
18. Ames B. N. (1966) in: *Methods Enzymol.* (Nenfeld E. F., Ginsburg V., eds), **8**, 115—118.
19. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
20. Либерман Е. А., Цофина Л. М. (1969) *Биофизика*, **14**, 1017—1022.

Поступила в редакцию  
5.VII.1978

### $\text{Mg}^{2+}$ -DEPENDENT ADENOSINETRIPHOSPHATASE FROM *STREPTOCOCCUS FAECALIS* MEMBRANES. I. ISOLATION AND SUBUNIT COMPOSITION

БАВАКОВ А. В., ВАСИЛОВ Р. Г.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

N,N-Dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase has been isolated from *Streptococcus faecalis* and shown by immunochemical methods to be homogeneous. The isolated enzyme comprises the subunits of 7 types:  $\alpha$ —55000,  $\beta$ —51000,  $\gamma$ —35000,  $\delta$ —20000,  $h_1$ —16000,  $\epsilon$ —13000,  $h_2$ —9500. The purified ATPase was used in the preparation of liposomes with reconstituted membranes. The measurements of the membrane potential arising in response to ATP addition and  $^{32}\text{P}$ -ATP exchange indicated that the isolated enzyme contains the complete set of subunits necessary for the ATPase activity in the membrane both as a proton pump and ATP synthase.