



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.23+577.153.35

## МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ В СИСТЕМЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ\*

Козлов И. А.

*Межфакультетская лаборатория биорганической химии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Обсуждается состав и структурная организация АТР-азного комплекса. Приводятся данные в пользу того, что гидрофобные белки АТР-азного комплекса не принимают непосредственного участия в механизме сопряженного с АТР-азной реакцией переноса ионов  $H^+$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны. Предполагается, что гидрофобные белки создают гидрофобный чехол для растворимой митохондриальной АТР-азы (фактора  $F_1$ ), облегчают правильную ее ориентацию в митохондриальной мембране и осуществляют транспорт ионов  $H^+$  между фактором  $F_1$  и внешней стороной митохондриальной мембраны. На основании данных ингибиторного анализа и субстратной специфичности АТР-азы предлагается механизм сопряжения АТР-азной (АТР-синтетазной) реакции и переноса ионов  $H^+$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны. В соответствии с предложенной схемой каталитический центр АТР-азы расположен в гидрофобной области митохондриальной мембраны и в непосредственной близости к протонофорному каналу, а второй, некаталитический центр связывания адениновых нуклеотидов находится в контакте с водной фазой внутри митохондрий. Транслокация АТР из каталитического центра фермента в некаталитический осуществляется по электрическому полю, т. е. является той стадией, на которой происходит трансформация энергии разности электрохимических потенциалов ионов водорода в энергию АТР. Обсуждается стереохимический механизм АТР-азной (АТР-синтетазной) реакции в каталитическом центре фермента.

Митохондриальная АТР-аза является ключевым ферментом окислительного фосфорилирования. АТР-азный комплекс митохондрий, или так называемая олигомицин-чувствительная АТР-аза, осуществляет синтез АТР из АДФ и  $P_i$  в системах, содержащих замкнутую фосфолипидную мембрану и источник энергии, создающий на фосфолипидной мембране разность электрохимических потенциалов ионов водорода —  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  [1—3]. Эффективность АТР-синтетазной реакции мало зависит от природы источника энергии, создающего разность электрохимических потенциалов на фосфолипидной мембране. В качестве источника энергии для синтеза АТР АТР-азным комплексом митохондрий на замкнутых фосфолипидных мембранах (липосомах) используется перенос электронов по отдельным участкам дыхательной цепи митохондрий [1, 2], трансмембранный перенос протонов бактериородопсиновыми бляшками в ответ на облучение светом [3].

В соответствии с теорией Митчелла [4—7] трансформация энергии  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  в энергию АТР осуществляется при трансмембранном переносе

\* Сокращения: СМЧ — субмитохондриальные частицы, ПХМБ — *n*-хлормеркурибензоат; АДФ-МК — смешанный ангидрид АДФ и мезитилекарбонной кислоты, ЦМКД — *N*-циклогексил-*N'*-β-(4-метилморфолиний)-этиларбодимид.

$2\text{H}^+$  на каждую синтезирующуюся молекулу АТФ. Гидролиз одной молекулы АТФ в системе окислительного фосфорилирования также сопровождается трансмембранным переносом  $2\text{H}^+$ , что приводит, в свою очередь, к генерации  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ . Трансмембранный перенос протонов митохондриальной АТФ-азой рассматривается Скулачевым [8] как транспорт ионов против электрохимического градиента. По аналогии с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азой или  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азой Скулачев вводит понятие транспортной  $\text{H}^+$ -АТФ-азы митохондрий. На основной вопрос — каким образом функционирование обратимой митохондриальной  $\text{H}^+$ -АТФ-азы сопряжено с переносом  $2\text{H}^+$  через митохондриальную мембрану? — до настоящего времени не получено ясного ответа. Решение проблемы окислительного фосфорилирования зависит от выяснения механизма трансмембранного переноса ионов  $\text{H}^+$  при участии обратимой  $\text{H}^+$ -АТФ-азы, механизма катализа АТФ-азной и АТФ-синтетазной реакций и механизма сопряжения обоих процессов. В настоящей работе обсуждаются данные, способствующие пониманию процессов, протекающих при участии митохондриальной АТФ-азы. При этом мы не стремились охватить широкий круг вопросов, имеющий отношение к структурной организации митохондриальной АТФ-азы. Подобной цели более полно служат появившиеся недавно в печати содержательные обзоры Бичи и Каттелла [9] и Сеньора [10]. При обсуждении литературных данных и результатов собственных экспериментальных исследований основное внимание мы уделяли проблемам, имеющим непосредственное отношение к сформулированным выше задачам.

В обзоре сознательно не обращается внимание на возможные различия в свойствах митохондриальных АТФ-аз из различных источников, поскольку мы глубоко убеждены в универсальности механизма функционирования всех митохондриальных АТФ-аз.

### Олигомицин-чувствительная АТФ-аза

АТФ-азный комплекс митохондрий, или олигомицин-чувствительная АТФ-аза, является наименьшей структурной единицей митохондриальной мембраны, способной осуществлять катализ всех связанных с превращением АТФ процессов, протекающих в системе окислительного фосфорилирования. К таким процессам относятся; а) синтез АТФ из АДФ и  $\text{P}_i$  на фосфолипидных мембранах при наличии трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов  $\text{H}^+$  [1—3]; б) гидролиз АТФ, сопряженный с переносом ионов  $\text{H}^+$  через фосфолипидную мембрану и генерацией, таким образом,  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  [11]. Последнее условие осуществимо, конечно, только в том случае, если в мембране нет свободной проницаемости для  $\text{H}^+$ , и в) катализ реакций изотопного обмена АТФ —  $^{32}\text{P}_i$  [12]. Все указанные реакции имеют чувствительность к специфическим ингибиторам окислительного фосфорилирования — олигомицину [13, 14] и дициклогексилкарбодимиду [15—17].

По данным различных авторов [18—23], в состав максимально очищенной олигомицин-чувствительной АТФ-азы входят фосфолипиды (4—10% по весу) и 5—6 индивидуальных белков с  $M$  от 11 000 до 380 000. Наиболее высокомолекулярный белковый компонент в составе АТФ-азного комплекса митохондрий — растворимая митохондриальная АТФ-аза (фактор  $F_1$  по терминологии Рэкера [24]). С этим ферментом связывают осуществление катализа АТФ-азной и АТФ-синтетазной реакций. Второй важный компонент олигомицин-чувствительной АТФ-азы — белок, обладающий чувствительностью АТФ-азному комплексу к олигомицину [25] и дициклогексилкарбодимиду [16] (так называемый OSCP). Помимо фактора  $F_1$  и OSCP (водорастворимых компонентов АТФ-азного комплекса) в состав олигомицин-чувствительной АТФ-азы входят 2 или 3 гидрофобных белка, необходимых, по-видимому, для осуществления специфических контактов фактора  $F_1$  с фосфолипидной мембраной. Один из этих гидро-

фобных белков является местом атаки АТР-азного комплекса дициклогексилкарбодимидом [9]. Некоторые препараты олигомицин-чувствительной АТР-азы содержат также белковый ингибитор митохондриальной АТР-азы [9, 26]. Более подробную характеристику белковых компонентов АТР-азного комплекса можно найти в обзоре Бичи и Каттелла [9].

Какова роль отдельных белков в составе олигомицин-чувствительной АТР-азы в реакциях гидролиза и синтеза АТР и сопряженной с этими процессами транслокации ионов  $H^+$  через митохондриальную мембрану? Способность фактора  $F_1$  гидролизовать в растворе АТР, а также наличие корреляции между эффективностью реакции АТР —  $^{32}P_i$  изотопного обмена в СМЧ и содержанием в них фактора  $F_1$  [24, 27] свидетельствуют о том, что этот фермент принимает непосредственное участие в катализе АТР-азной и АТР-синтетазной реакций.

Остальные белковые компоненты АТР-азного комплекса играют, по-видимому, существенную роль в процессе передачи протонов с внешней стороны митохондриальной мембраны к фактору  $F_1$  (рис. 4). Подобный вывод основывается главным образом на том, что удаление фактора  $F_1$  из СМЧ приводит к возникновению высокой протонной проводимости через митохондриальную мембрану. Олигомицин и дициклогексилкарбодимид в концентрациях, в которых эти соединения ингибируют окислительное фосфорилирование, подавляют протонную проводимость в СМЧ, лишенных фактора  $F_1$  [28—30]. Последнее наблюдение и явилось основанием для точки зрения, согласно которой ингибирующий эффект олигомицина и дициклогексилкарбодимида объясняется блокированием  $H^+$ -проводящего пути в АТР-азном комплексе между внешней стороной митохондриальной мембраны и фактором  $F_1$  [6, 31].

Для выяснения механизма функционирования АТР-азного комплекса представляется важным вопрос о роли гидрофобных белков в процессах, протекающих при участии фактора  $F_1$ . Создают ли гидрофобные белки необходимое гидрофобное окружение для фактора  $F_1$  и обеспечивают его контакт с фосфолипидной мембраной или они принимают также непосредственное участие в механизме сопряжения АТР-азной реакции с транслокацией ионов  $H^+$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны? Поиск ответа на поставленный вопрос привел многих исследователей к попытке реконструировать растворимую митохондриальную АТР-азу с искусственной фосфолипидной мембраной в отсутствие остальных компонентов АТР-азного комплекса. Однако, насколько нам известно, при этом не удалось даже частично восстановить свойства нативного АТР-азного комплекса митохондрий. Значительно больший успех сопутствовал опытам по изучению протонтранслоцирующей функции фактора  $F_1$  на границе раздела октан/вода [32—34]. Оказалось, что в отсутствие прочих компонентов АТР-азного комплекса фактор  $F_1$  способен осуществлять сопряженный с гидролизом АТР перенос ионов  $H^+$  из водной фазы в октан. Таким образом, была продемонстрирована принципиальная возможность сопряженного с гидролизом АТР переноса ионов  $H^+$  через границу раздела вода/октан при участии одного единственного белка — растворимой митохондриальной АТР-азы.

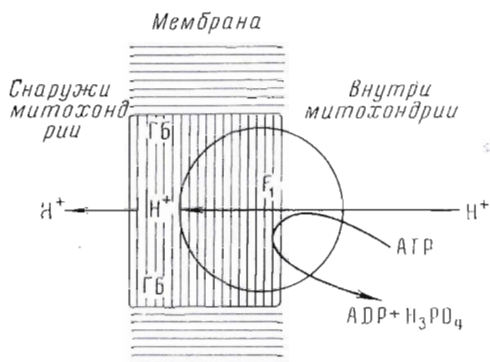


Рис. 4. Строение АТР-азного комплекса митохондрий (ГБ — гидрофобные белки олигомицин-чувствительной АТР-азы)

## Растворимая митохондриальная АТР-аза

Фактор  $F_1$  в качестве объекта исследования механизма окислительного фосфорилирования. Как уже отмечалось, растворимая митохондриальная АТР-аза является самым высокомолекулярным компонентом АТР-азного комплекса ( $M \approx 380\,000$  [35]). Фермент имеет сложную четвертичную структуру [36, 37] и отличается сравнительно высоким содержанием гидрофобных аминокислот [35, 38]. Несмотря на высокий молекулярный вес, сложное строение и большую склонность в агрегации, фактор  $F_1$  является намного более удобным объектом исследований по сравнению с гетерогенной и высоколабильной олигомицин-чувствительной АТР-азой. Однако возможности изучения механизма окислительного фосфорилирования с использованием в качестве объекта исследования растворимой АТР-азы ограничены тем, что этот фермент при его отделении от митохондриальной мембраны утрачивает способность катализировать наиболее важные для окислительного фосфорилирования процессы. Так, константа скорости АТР-синтезационной реакции в водном растворе в присутствии фактора  $F_1$  настолько мала, что ее не удается измерить даже в условиях, обеспечивающих выгодный сдвиг равновесия реакции (в присутствии системы гексокиназа — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа). Фактор  $F_1$  не катализирует реакций изотопного обмена АТР —  $^{32}\text{P}_i$  и АТР —  $^{14}\text{C}$  ADP.

Решения каких проблем можно ожидать при использовании в качестве объекта исследований растворимой митохондриальной АТР-азы? В водном растворе фактор  $F_1$  участвует, по крайней мере, в двух процессах, имеющих, по-видимому, отношение к механизму окислительного фосфорилирования. Фермент с высокой эффективностью осуществляет гидролиз АТР ( $k_{\text{кат}} = 10^4 \text{ мин}^{-1}$  при  $25^\circ$  [39]) и проявляет высокую специфичность в связывании ADP — субстрата окислительного фосфорилирования.

*Каталитические свойства растворимой митохондриальной АТР-азы.* Несмотря на наличие большого интереса к механизму действия растворимой митохондриальной АТР-азы, в литературе имеется крайне мало достоверных сведений о структуре активного центра фермента, а также о числе и последовательности стадий АТР-азной реакции. Первый вопрос, по которому различные авторы не смогли прийти к единому мнению, — это роль  $\text{Mg}^{2+}$  (или, вернее, двухвалентных ионов металлов) в механизме АТР-азной реакции. Изучая зависимость скорости АТР-азной реакции от свободной концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и свободной концентрации АТР, Селвин [40] пришел к выводу, что истинным субстратом митохондриальной АТР-азы является  $\text{Mg} - \text{АТР}$ . Это мнение разделяет Акименко и соавт. [41]. С другой стороны, Хилборн и Хаммес [42] считают, что АТР и  $\text{Mg} - \text{АТР}$  связываются в активном центре фактора  $F_1$  приблизительно с одинаковой эффективностью. По мнению Адольфсена и Модрианакиса [43], при низких концентрациях АТР сродство  $\text{Mg}^{2+}$  к фактору  $F_1$  выше, чем к АТР. Проведенный в нашей лаборатории анализ системы фермент — металл — субстрат по методу Лондона и Стока [44] подтвердил точку зрения, что  $\text{Mg} - \text{АТР}$  является истинным субстратом АТР-азной реакции ( $K_m$  0,4 мМ), а свободные  $\text{Mg}^{2+}$  и АТР выступают в качестве конкурентных ингибиторов процесса ( $K_{i(\text{Mg}^{2+})}$  1 мМ и  $K_{i(\text{АТР})}$  8 мМ) [45]. Было показано также, что  $\text{Mg} - \text{ADP}$  является более эффективным ингибитором АТР-азной реакции, чем ADP, причем ингибирование осуществляется по конкурентному механизму ( $K_{i(\text{Mg-ADP})}$  0,5 мМ) [45].

Основной подход, который используется для выяснения природы аминокислотных остатков в активном центре АТР-азы, заключается в применении специфических модифицирующих агентов. Сеньор [46], Фергюсон и соавт. [47, 48] показали, что модификация одного — двух остатков тирозина в молекуле фактора  $F_1$  приводит к полной потере АТР-азной активности. Скорость инактивации уменьшается, если реакцию с модифицирующими агентами проводят в присутствии АТР. Полученные резуль-

таты позволяют предположить наличие остатков тирозина в активном центре фермента. Однако остается открытым вопрос: в чем именно состоит роль тирозина в АТФ-азной реакции?

Полученные нами данные по зависимости  $K_m$  растворимой АТФ-азы от рН позволили предположить наличие в активном центре, по крайней мере, одной карбоксильной группы, участвующей в связывании магневых комплексов нуклеотидов [39]. Этому предположению удовлетворяют также и некоторые результаты, полученные другими авторами. Так, Педерсен и соавт. [49], Адольфсен и Модрианакис [43] показали, что эффективность связывания комплекса  $Mg^{2+} - АТФ$  с ферментом зависит от величины ионного радиуса двухвалентного металла и мало зависит от поляризуемости его электронных оболочек. Этот результат четко согласуется с предположением, что лигандом  $Mg^{2+}$  в активном центре АТФ-азы является карбоксильная группа. Участие карбоксильной группы в активном центре фактора  $F_1$  подтверждается также нашими данными по связыванию свободного  $Mg^{2+}$  АТФ-азой [45]. Наконец, недавно Богуславский и соавт. [34] провели модификацию растворимой АТФ-азы реагентом на карбоксильные группы белков — ЦМКД. Последний инактивировал растворимую АТФ-азу, причем скорость инактивации уменьшалась в присутствии  $Mg-ADP$  и  $Mg-ATP$ .

Известно, что гидролиз эфиров и ангидридов фосфорной кислоты включает стадию протонирования фосфорильного кислорода. К сожалению, в настоящий момент нельзя сказать ничего определенного о природе аминокислотных остатков, осуществляющих такое протонирование в активном центре митохондриальной АТФ-азы. Тем не менее можно предположить, что процессы, протекающие в активном центре фактора  $F_1$ , в основных чертах должны подчиняться общим закономерностям, установленным для неферментативного гидролиза эфиров и ангидридов фосфорной кислоты. В соответствии со стандартным механизмом реакций нуклеофильного замещения у пятивалентного атома фосфора предполагается образование пентаковалентного промежуточного соединения, имеющего форму тригональной бипирамиды [50, 51]. Три ковалентные связи фосфора находятся при этом в одной плоскости (экваториальные заместители), а две оставшиеся — направлены к вершинам бипирамиды (аксиальные заместители). Было постулировано, что превращение тригональной бипирамиды в продукты реакции или исходные соединения осуществляется при высвобождении одного из двух аксиальных заместителей [50, 51]. С другой стороны, в аксиальном положении тригональной бипирамиды могут находиться только те заместители, связь которых с атомом фосфора легко разрывается в результате химических реакций. Если из пяти заместителей у атома фосфора в пентаковалентном промежуточном соединении четыре способны занять аксиальное положение, возникает явление, называемое псевдотворением. Суть этого явления заключается в том, что два заместителя в экваториальном положении обмениваются местами с двумя заместителями в аксиальном положении. Вероятность псевдотворения зависит от стабильности новой, образовавшейся в результате псевдотворения тригональной бипирамиды. Как правило, стабильность заместителя в аксиальном положении коррелирует с его электроноакцепторными свойствами.

Эти фундаментальные представления о стереохимии реакций нуклеофильного замещения у атома фосфора Корман и Мак-Лик [52—54], Янг и Корман [55] использовали для объяснения механизма гидролиза АТФ митохондриальной АТФ-азой. В соответствии со схемой, предложенной указанными авторами, на первой стадии реакции происходит атака молекулой воды протонированного  $\gamma$ -фосфатного остатка АТФ с образованием соответствующей тригональной бипирамиды  $I$  (рис. 2). Возникшее пентаковалентное промежуточное соединение имеет три возможности последующих превращений. Во-первых, в результате обратной реакции



из аксиального положения может освободиться вода. В этом случае образуются исходные АТР и  $H_2O$ , и вся система возвращается, таким образом, в исходное состояние. Вторая возможность заключается в высвобождении из аксиального положения тригональной бипирамиды дифосфоаденозинового остатка ( $-O-ADP$ ) с образованием продуктов АТР-азной реакции (АДР и  $P_i$ ). Наконец, третий вариант превращения пентавалентного промежуточного соединения заключается в псевдовращении, в результате которого образуется новая тригональная бипирамида с двумя новыми молекулами воды в аксиальных положениях. Высвобождение  $H_2O$  из новой тригональной бипирамиды 2 (рис. 2) сопровождается также образованием свободного АТР, и результатом всего процесса в целом будет реакция АТР— $H_2O$  обмена. По мнению Кормана и соавт. [52—55],

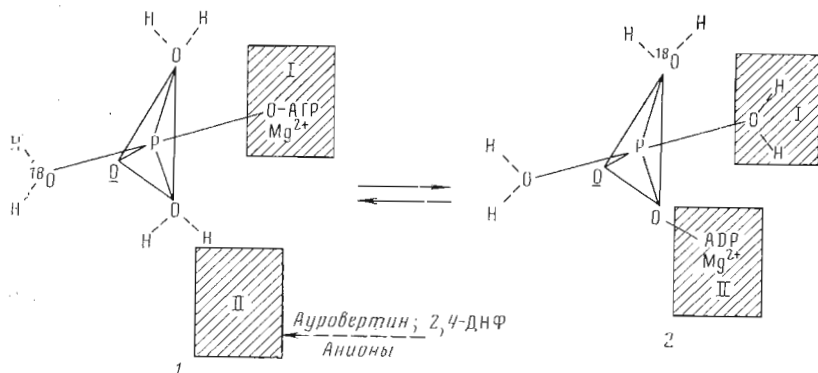


Рис. 2. Стереохимия реакций гидролиза и синтеза АТР в каталитическом центре митохондриальной АТР-азы. Пентавалентное промежуточное соединение 1 АТР-азной (АТР-синтетазной) реакции превращается в результате псевдовращения в пентавалентное промежуточное соединение 2. Заштрихованы области I и II активного центра фермента, ответственные за связывание дифосфоаденозинового остатка— $O-ADP$  в аксиальном и экваториальном положениях. Пунктирной стрелкой показано место атаки активного центра АТР-азы ауровертином, 2,4-динитрофенолом (2,4-ДНФ) и анионами

которое мы полностью разделяем, скорость процесса псевдовращения в активном центре митохондриальной АТР-азы намного больше скорости высвобождения воды из тригональной бипирамиды 1 (рис. 2). Иными словами, наиболее вероятными путями превращения пентавалентного промежуточного соединения 1, образовавшегося в результате атаки молекулой воды  $\gamma$ -фосфатного остатка АТР или в результате атаки неорганическим фосфатом ADP, будет высвобождение из аксиального положения  $-O-ADP$  или псевдовращение. В этом случае механизм псевдовращения в активном центре фактора  $F_1$  может быть использован для понижения энергии активации АТР-синтетазной реакции.

Очевидно, что псевдовращение в активном центре фермента должно сопровождаться изменением пространственного расположения заместителей у атома фосфора. Поскольку ферментативная реакция предполагает наличие хорошего стерического соответствия между аминокислотными остатками, принимающими участие в катализе процесса, и функциональными группами субстрата, Янг и Корман [55] предположили, что изменение пространственного расположения заместителей у атома фосфора в результате псевдовращения сопровождается конформационными изменениями в активном центре АТР-азы. Такие конформационные изменения, по мнению авторов, могут играть существенную роль в механизме энергетического сопряжения.

Разделяя в целом точку зрения о реальности стадии псевдовращения при синтезе АТР в активном центре митохондриальной АТР-азы, мы, однако, считаем недостаточно обоснованным вывод о сопровождающих

псевдобрашение значительных конформационных изменениях в активном центре фермента. По нашим представлениям активный центр митохондриальной АТР-азы имеет такое строение, что способен без существенного изменения конформации специфически связать оба пентаковалентные промежуточные соединения АТР-азной (АТР-синтетазной) реакции. При этом постулируется, что в активном центре фактора  $F_1$  имеются две площадки, ответственные за связывание дифосфоаденозинового остатка ( $-O-ADP$ ), а результатом псевдобрашения является перемещение  $-O-ADP$  с одной площадки на другую (рис. 2). В предлагаемой нами концепции важное место занимает также утверждение, что две области связывания  $-O-ADP$  в активном центре АТР-азы различаются как по своей эффективности, так и по специфичности к гетероциклическому основанию, причем более эффективной и специфичной является площадка, ответственная за связывание  $-O-ADP$  в экваториальном положении (рис. 2, площадка II). В пользу справедливости вышесказанных предположений свидетельствуют следующие литературные данные и результаты собственных экспериментов.

Первый факт, свидетельствующий в пользу предложенной схемы строения активного центра митохондриальной АТР-азы, — различная специфичность фермента к типу гетероциклического основания нуклеозид ди- и трифосфатов. Фактор  $F_1$  гидролизует с близкими скоростями АТР, ИТР и ГТР [43, 24]. Однако из всех природных нуклеозиддифосфатов лишь АТР является эффективным ингибитором АТР-азной реакции [24], причем константа ингибирования соответствует 0,5 мМ ( $K_m$  0,4 мМ) [45]. Как уже отмечалось, область II активного центра АТР-азы (рис. 2, II) обладает высоким сродством к  $-O-ADP$  и большой специфичностью к типу гетероциклического основания. Этими свойствами площадки II определяется эффективность связывания в активном центре АТР и АТР. Однако если результатом связывания АТР (при участии любой из областей активного центра АТР-азы) является образование фермент-ингибиторного комплекса, то сорбция АТР с участием площадки II приводит лишь к образованию непродуктивного фермент-субстратного комплекса. Действительно, связывание дифосфоаденозинового остатка АТР в области II определяет в дальнейшем образование пентаковалентного соединения 2, неспособного отщеплять АТР (рис. 2). Способность субстрата связываться в продуктивный комплекс с митохондриальной АТР-азой определяется лишь специфичностью и сродством к нуклеотидам площадки I активного центра (рис. 2). В то же время ингибирующая способность нуклеозиддифосфатов определяется специфичностью площадки II, имеющей большее сродство к нуклеотидам. Подобное рассмотрение вопроса предполагает возможность связывания АТР, ИТР и ГТР с фактором  $F_1$  с образованием продуктивного фермент-субстратного комплекса и незначительный ингибирующий эффект ИТР и ГТР по сравнению с АТР. Если высказанные соображения верны, то можно ожидать, что структурные аналоги АТР, не способные к гидролизу, будут ингибировать АТР-азную реакцию, причем константа ингибирования для этих соединений окажется величиной, значительно более эффективной, чем  $K_m$  для АТР. Так в действительности и оказалось. Было показано, что  $K_i$  для 5'-аденилилимидодифосфата, аналога АТР, у которого последний «мостиковый» кислород заменен на азот, приблизительно на 2 порядка ниже  $K_m$  для АТР [49]. Этот результат позволяет также оценить различие в эффективности площадок I и II в активном центре фактора  $F_1$ .

В опубликованной недавно работе Фило и Селвина\* изучался ингибирующий эффект 5'-аденилилимидодифосфата на АТР-азную и ГТР-азную активность фактора  $F_1$  в растворе. Как показали авторы, 80%-ное ингибирование ГТР-азной активности достигается при концентрации 5'-

\* Phyllo R. D., Selwyn M. (1974) *Biochem. J.*, 143, 745—749.

аденилилимидодифосфата, равной  $3 \cdot 10^{-7}$  М. С другой стороны, для снижения АТР-азной активности фермента на 80% требуется  $5 \cdot 10^{-6}$  М 5'-аденилилимидодифосфата. Поскольку фактор  $F_1$  имеет близкие значения  $K_m$  для АТР и ГТР, Фило и Селвин предполагают, что либо механизмы АТР-азной и ГТР-азной реакций различны, либо препарат фермента представляет собою смесь двух различающихся по свойствам фракций АТР-азы. Однако полученные Фило и Селвиным результаты можно объяснить иначе. АТР, способный связываться как с площадкой I, так и с площадкой II активного центра АТР-азы, более эффективно конкурирует с 5'-аденилилимидодифосфатом за активный центр, чем ГТР, сорбирующийся только на площадке I активного центра.

Вторая группа фактов, подтверждающая нашу концепцию строения активного центра митохондриальной АТР-азы,— стимулирующее действие некоторых ароматических соединений на скорость АТР-азной реакции, измеренной в присутствии АДФ. Так, 2,4-динитрофенол понижает у фермента сродство к конкурентному ингибитору АТР-азной реакции  $Mg-ADP$ , не изменяя при этом величину  $K_m$  для  $Mg-ATP$  [56]. Этот результат легко объяснить, если предположить, что 2,4-динитрофенол преимущественно блокирует площадку II в активном центре АТР-азы. Возможно, аналогичный механизм реализуется при ингибировании окислительного фосфорилирования ауовертином. Последний, связываясь с площадкой II активного центра фактора  $F_1$ , может блокировать псевдовращение, повышая тем самым энергию активации АТР-синтетазной реакции. Как и 2,4-динитрофенол, ауовертин понижает сродство фермента к АДФ и не изменяет при этом  $K_m$  АТР-азной реакции [57—59].

Кантлей и Хаммес [60] скептически относятся к возможности конкуренции между АДФ и 2,4-динитрофенолом за место связывания на факторе  $F_1$ . Авторы показали, что эффективность связывания 1—40 мкМ АДФ не изменяется в присутствии 0,3 мМ 2,4-динитрофенола. Следует, однако, отметить, что применяемые авторами концентрации АДФ лежат значительно ниже определенной нами  $K_1$  (0,5 мМ [45]). Так как при концентрации АДФ 40 мкМ Кантлей и Хаммес получили насыщение фермента нуклеотидом, представляется весьма вероятным, что авторы изучали связывание АДФ, не имеющее отношение к ингибированию АТР-азной реакции.

Интересно отметить, что повышение концентрации 2,4-динитрофенола или ауовертина приводит к ингибированию АТР-азной реакции. Вероятно, в более высоких концентрациях эти соединения связываются и с площадкой I активного центра митохондриальной АТР-азы.

Предложенная схема строения активного центра фактора  $F_1$  объясняет причину увеличения скорости АТР-азной реакции в присутствии различных анионов (бикарбоната, бората, малеата, фосфата, пиродифосфата и т. д.). В соответствии с данными Ламбета и Ларди [61] скорость АТР-азной реакции фактора  $F_1$  увеличивается приблизительно в 2 раза в присутствии анионов, причем активирующий эффект анионов не наблюдается в присутствии ауовертина. Механизм стимуляции АТР-азной реакции анионами становится понятным, если предположить, что анионы (как и 2,4-динитрофенол или ауовертин) блокируют площадку II связывания  $-O-ADP$  в активном центре фактора  $F_1$ . В результате связывания анионов с площадкой II активного центра АТР-азы (рис. 2) становится невозможным образование непродуктивного комплекса АТР с ферментом, что должно в итоге приводить к увеличению скорости АТР-азной реакции [62]. Интересно отметить, что скорость гидролиза ГТР фактором  $F_1$  не изменяется в присутствии анионов [63]. Этот результат также находит обоснованное объяснение в рамках предложенной схемы. Действительно, как уже отмечалось, площадка II связывания  $-O-ADP$  в активном центре проявляет высокую специфичность к типу гетероциклического основания нуклеотидов. По этой причине ГТР образует с фактором  $F_1$



только продуктивный фермент-субстратный комплекс ( $-O-GDP$  связывается с площадкой I) и, следовательно, блокирование анионами площадки II не должно оказывать влияния на скорость ГТФ-азной реакции.

При изучении реакции растворимой митохондриальной АТФ-азы с бифункциональным алкилирующим агентом — *n*-N-ди(2-хлорэтил)-аминофенилуксусной кислотой — мы исследовали возможность необратимо блокировать площадку II активного центра фактора  $F_1$  [64]. Инкубация фактора  $F_1$  с этим соединением, являющимся эффективным ингибитором окислительного фосфорилирования [65], в присутствии  $MgSO_4$  приводит к образованию модифицированного фермента, который не отличается от исходного по сродству к  $Mg-ATP$ , но утрачивает способность связывать  $Mg-ADP$  [64]. Фенилуксусная кислота — неалкилирующий аналог *n*-N-(2-дихлорэтил)-аминофенилуксусной кислоты, как и 2,4-динитрофенол, стимулирует АТФ-азную реакцию в присутствии  $Mg-ADP$ . Таким образом, на первой стадии реакции фактора  $F_1$  с алкилирующим агентом происходит, по-видимому, сорбция ингибитора в площадке II активного центра с последующим алкилированием нуклеофильных аминокислотных остатков. Результатом этой реакции алкилирования является необратимое блокирование области наивысшего сродства к  $Mg-ADP$ .

Таким образом, вся сумма приведенных доказательств свидетельствует о существовании в активном центре митохондриальной АТФ-азы двух площадок, ответственных за взаимодействие с дифосфоаденозиновым остатком ( $-O-ADP$ ). Адсорбция в активном центре АТФ приводит либо к образованию продуктивного фермент-субстратного комплекса с участием площадки I, либо к образованию непродуктивного комплекса с участием площадки II. Связывание ADP протекает с участием площадки II и приводит к образованию фермент-ингибиторного комплекса. В активном центре фермента имеется также полярная область, ответственная за связывание  $\beta$ -остатка фосфорной кислоты ADP и  $\gamma$ -фосфата нуклеозидтрифосфата, обуславливающая конкуренцию между ADP и нуклеозидтрифосфатами. Конкуренция между АТФ и ADP обусловлена, по-видимому, тем, что ADP имеет один лишний отрицательный заряд на  $\beta$ -остатке фосфорной кислоты по сравнению с  $-O-ADP$ . Можно также считать весьма вероятным, что в результате псевдообращения в активном центре фермента осуществляется перенос дифосфоаденозина с одной площадки на другую.

*Связывание ADP растворимой митохондриальной АТФ-азой.* Как уже отмечалось выше, фактор  $F_1$  связывает в активном центре одну молекулу  $Mg-ADP$ , причем  $Mg-ADP$  выступает в этом случае в качестве конкурентного ингибитора АТФ-азной реакции [45]. Хаммес и Хилборн [42], а также Каттералл и Педерсен [66] обнаружили у фермента еще один ADP-связывающий центр. Этот некаталитический центр связывания ADP отличается высокой эффективностью и специфичностью, причем сорбция в нем ADP не приводила к изменению свойств каталитического центра АТФ-азы [67]. В соответствии с данными Хаммеса и Хилборна [42] ADP может сорбироваться в некаталитическом центре связывания нуклеотидов как в свободном виде, так и в виде магниевой соли. Следует, однако, указать, что обнаруженный Хаммесом и Хилборном [42] некаталитический центр связывания ADP не имеет ничего общего с двумя площадками, ответственными за связывание  $-O-ADP$  в активном центре АТФ-азы. Этот некаталитический центр удален от активного центра. В то же время две площадки в активном центре фермента находятся на незначительном расстоянии друг от друга, и связывание нуклеотида на одной из них препятствует сорбции второй молекулы нуклеотида в активном центре.

Специфическое связывание ADP в некаталитическом центре Хаммес и Хилборн [42], а позже Тондр и Хаммес [67] интерпретировали как возможный путь аллостерического регулирования активности митохон-

дриальной АТР-азы. Предположение этих авторов не нашло, однако, до сих пор экспериментального подтверждения. По мнению Пенефского [68], а также Педерсена и соавт. [49], из двух независимых центров связывания нуклеотидов в митохондриальной АТР-азе один служит для катализа АТР-азной реакции, а второй катализирует реакцию фосфорилирования. Представление о существовании в ферменте двух независимых активных центров для катализа прямой и обратной реакции довольно трудно, по нашему мнению, согласовать с принципом обратимости всех стадий в ферментативном катализе. Единственный довод, который Педерсен и соавт. [49] приводят в пользу своего предположения, — близкие значения константы диссоциации АDР в некаталитическом центре и  $K_m$  окислительного фосфорилирования для АDР. Этот факт, однако, можно интерпретировать, по нашему мнению, иначе: сорбция АDР в некаталитическом центре АТР-азы является лишь первой стадией АТР-синтезной реакции в окислительном фосфорилировании. В дальнейшем осуществляется перенос АDР и  $P_i$  из некаталитического центра АТР-азы в каталитический (см. ниже).

*Свойства растворимой митохондриальной АТР-азы на границе раздела октан/вода.* Растворимая митохондриальная АТР-аза осуществляет перенос ионов  $H^+$  из воды в октан при гидролизе АТР на границе раздела фаз [32—34]. Процесс протекает только в присутствии всех компонентов АТР-азной реакции ( $Mg^{2+}$ , АТР и фактор  $F_1$ ) и липофильного акцептора протонов, в качестве которого в большинстве опытов был использован 2,4-динитрофенол [32—34]. Перенос ионов  $H^+$  из воды в октан сопровождается изменением скачка потенциала на межфазной границе, которое регистрируется методом вибрирующего конденсатора [32—34, 69]. Модельная система октан/вода была использована нами также для изучения  $H^+$ -транслоцирующей функции АТР-азы из мембран *Micrococcus lysodeikticus*, бактериородопсина [33] и некоторых ферментов дыхательной цепи [33].

Факт переноса ионов  $H^+$  из водной фазы в октановую при гидролизе АТР растворимой митохондриальной АТР-азой на границе раздела фаз уже свидетельствует о том, что в транслокации ионов  $H^+$  из матрикса в гидрофобную область митохондриальной мембраны не принимают участия гидрофобные белки АТР-азного комплекса. Полученные результаты хорошо согласуются с высказанным выше предположением о функциональной роли гидрофобных белков АТР-азного комплекса, в соответствии с которым OSCP и протеолипиды создают гидрофобный чехол для фактора  $F_1$  и облегчают его правильную ориентацию в фосфолипидной мембране. Гидрофобные белки АТР-азного комплекса осуществляют также транспорт ионов  $H^+$  между фактором  $F_1$  и внешней поверхностью митохондриальной мембраны (рис. 1).

В рамках предложенной схемы (рис. 1) проблема сопряжения АТР-азной (АТР-синтезной) реакции с транслокацией ионов  $H^+$  через митохондриальную мембрану сводится к проблеме выяснения механизма функционирования фактора  $F_1$  в составе АТР-азного комплекса или на границе раздела октан/вода.

### Механизм сопряжения АТР-азной (АТР-синтезной) реакции с трансмембранным переносом ионов $H^+$

Гросс и Бойер [70], Бойер и соавт. [71] показали, что даже в присутствии разобщителей окислительного фосфорилирования, обеспечивающих полную дезэнергизацию системы (т. е. снятие  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ ), образуется небольшое количество АТР, прочно связанного с белками митохондриальной мембраны. Обнаружить образовавшийся в отсутствие внешнего источника энергии АТР удастся в результате экстракции СМЧ кислотой, причем оказалось, что количество молекул образовавшегося в этих условиях

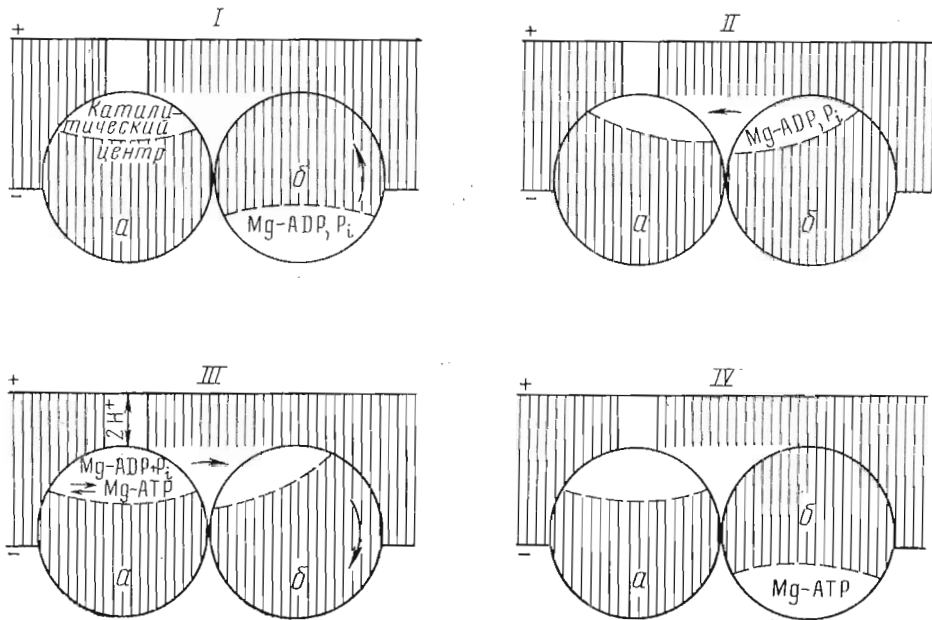


Рис. 3. Механизм функционирования АТР-азного комплекса митохондрий: *a* и *b* — субъединицы фактора  $F_1$ , I — IV — стадии реакции. Заштрихован гидрофобный барьер митохондриальной мембраны. Конформационные изменения фактора  $F_1$ , сопровождающие транслокацию нуклеотидов и  $P_i$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны, условно изображены как вращение субъединицы *b*, несущей некаталитический центр. Между каталитическим центром и внешней стороной митохондриальной мембраны имеется свободная протонная проводимость

АТР соответствует (по порядку величины) числу молекул фактора  $F_1$  в системе. Эти результаты можно рассматривать как доказательство того, что образование прочно связанного АТР из АДФ и  $P_i$  в системе окислительного фосфорилирования является изоэнергетическим процессом\*. Энергия  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  на митохондриальной мембране в этом случае необходима для освобождения прочно связанного АТР в матрикс. Обсуждаемые результаты и основанные на них выводы существенно сужают круг возможных вариантов механизма трансформации энергии  $\Delta\bar{\mu}_{H^+} \rightleftharpoons$  АТР в системе окислительного фосфорилирования.

Исходным пунктом предлагаемого нами механизма функционирования митохондриальной АТР-азы является утверждение, что активный (каталитический) центр АТР-азы расположен в гидрофобной области митохондриальной мембраны в непосредственной близости от протонофорного канала, а второй (некаталитический) центр связывания адениновых нуклеотидов находится в контакте с водной фазой внутри митохондрий (рис. 3).

Первая стадия реакции синтеза АТР заключается в изоэнергетическом связывании  $Mg-ADP$  и  $P_i^{**}$  (или соответствующих комплексов  $Mg^{2+}$

\* Резкое изменение энергетического баланса реакции  $ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$  в гидрофобной фазе хорошо согласуется с точкой зрения, по которой основной выигрыш энергии при гидролизе так называемых макроэргов приходится на гидратацию образовавшихся в результате гидролиза ионов.

\*\* Здесь и далее термин «изоэнергетический процесс» означает только независимость этой стадии реакции от внешнего источника энергии. В действительности равновесие каждой из рассматриваемых стадий реакции может быть сильно сдвинуто в ту или иную сторону. Подобная ситуация может привести, в частности, к тому, что в условиях деэнергизации мембраны система будет находиться в каком-нибудь одном предпочтительном состоянии (например, фактор  $F_1$  примет определенную конформацию). Нетрудно, однако, убедиться в том, что требование обратимости окислительного фосфорилирования предполагает равенство нулю суммы  $\Delta G$  всех стадий реакции, на равновесие которых не оказывает влияния энергизация системы.

с  $P_i$  и свободного ADP) во внешнем (некаталитическом) центре связывания нуклеотидов фактора  $F_1$ . Связывание  $Mg-ADP$  и  $P_i$  в некаталитическом центре сопровождается образованием комплекса субстратов с заряженными лигандами (ионизированными группами аминокислотных остатков), причем постулируется, что суммарный заряд такого комплекса равен нулю.

Вторая, также изоэнергетическая, стадия процесса представляет собой транслокацию этого незаряженного комплекса через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны, причем результатом транслокации служит появление ADP и  $P_i$  в каталитическом центре фактора  $F_1$  (рис. 3). Строение АТР-азного комплекса таково, что имеются пространственные (или иные) препятствия для освобождения нуклеотидов и  $P_i$  из каталитического центра АТР-азы в воду снаружи митохондрий.

На следующем этапе реакции в каталитическом центре фермента образуется  $Mg-ATP$  из  $Mg-ADP$  и  $P_i$ . Реакция эта протекает, в соответствии с данными Бойера и соавт. [70, 71], изоэнергетически. Постулируется, что она сопровождается присоединением к активному центру  $2H^+$ . Требование о присоединении именно  $2H^+$  вытекает из теории и экспериментальных данных Митчелла [4, 5] (интересно отметить, что в ходе АТР-азной реакции  $ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP-O^- + ^-O-P_i + 2H^+$  образуется именно  $2H^+$ , если ADP и  $P_i$  полностью ионизированы). Образовавшийся комплекс  $Mg-ATP$  с лигандами, участвовавшими в транслокации  $Mg-ADP$  и  $P_i$ , имеет, таким образом, суммарный заряд  $+2$ . Положительно заряженный комплекс  $Mg-ATP$  с соответствующими лигандами движется по полю (против сродства) к внутренней поверхности митохондриальной мембраны. Эта транслокация  $Mg-ATP$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны и является стадией, на которой  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  на митохондриальной мембране трансформируется в энергию АТР. В отсутствие поля на митохондриальной мембране образуется АТР, прочно связанный с каталитическим центром митохондриальной АТР-азы.

В результате транслокации комплекса  $Mg-ATP$  с лигандами через гидрофобный барьер к внутренней поверхности митохондриальной мембраны комплекс этот приходит в соприкосновение с водой (матриксом). Последняя стадия процесса заключается в диссоциации  $Mg-ATP$  в матрикс и освобождении белковых лигандов. Таким образом, весь цикл завершается, и его результатом является образование АТР и перенос  $2H^+$  с внешней стороны митохондриальной мембраны на внутреннюю.

Гидролиз АТР АТР-азным комплексом митохондрий и сопряженный с ним перенос  $2H^+$  с внутренней стороны митохондриальной мембраны на внешнюю осуществляется при обращении всех стадий АТР-синтезной реакции. Трансформация энергии АТР в  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  происходит на стадии транслокации комплекса  $Mg-ATP$  с соответствующими лигандами с внутренней стороны митохондриальной мембраны в каталитический центр АТР-азы. Источником энергии для этого процесса служит высокое сродство каталитического центра АТР-азы к комплексу  $Mg-ATP$  с лигандами с суммарным зарядом  $+2$ . Изоэнергетический гидролиз АТР в каталитическом центре приводит к освобождению через протонофорный канал  $2H^+$  и генерации таким способом  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ . Последующая стадия АТР-азной реакции заключается в транслокации незаряженного комплекса  $Mg-ADP$  и  $P_i$  с лигандами из каталитического центра фактора  $F_1$  в некаталитический центр на внутренней стороне митохондриальной мембраны и т. д.

Предложенный механизм функционирования митохондриальной АТР-азы идейно близок к концепции Митчелла [72], в соответствии с которой трансформация энергии  $\Delta\bar{\mu}_{H^+} \rightleftharpoons ATP$  может осуществляться при транслокации протонированных форм нуклеотидов и  $P_i$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны.

Как уже отмечалось, предложенный механизм требует наличия протонной проводимости между каталитическим центром фактора  $F_1$  и внешней стороной митохондриальной мембраны. Второе необходимое условие реализации предложенной схемы — отсутствие возможности выхода АТР, АДФ и  $P_i$  из каталитического центра на внешнюю сторону митохондриальной мембраны. Обе функции — протонная проводимость и создание барьера для АТР, АДФ и  $P_i$  — выполняются, по всей вероятности, гидрофобными белками АТР-азного комплекса.

В предложенной схеме имеется одно допущение, которое, как это будет видно из дальнейшего изложения, не имеет достаточно строгого экспериментального обоснования. Предлагаемый нами механизм реакции содержит всего одну электрогенную стадию — транслокацию комплекса  $Mg$ —АТР с лигандами с суммарным зарядом  $+2$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны. Предположение о наличии одной электрогенной стадии позволяет связать с процессом транслокации  $Mg$ —АТР все превращения энергии в системе. Последнее, хотя и объясняет наиболее простым и непротиворечивым способом данные Бойера и соавт. [70, 71], но не является прямым следствием полученных этими авторами результатов \*. Так, комплекс  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  с лигандами мог бы иметь суммарный заряд, равный не нулю, а  $+1$ , и тогда транслокация этого комплекса в каталитический центр фактора  $F_1$  осуществлялась бы против поля (по сродству). Предположение о равенстве суммарного заряда комплекса  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  с лигандами  $+1$  не противоречит результатам Бойера и соавт. [70, 71], поскольку и в этом случае для освобождения АТР в раствор требуется транслокация по полю положительно заряженного ( $+3$ ) комплекса  $Mg$ —АТР с лигандами. Результаты Бойера и соавт. [70, 71] и Митчелла [4, 5] вносят только два ограничения при выборе знака и величины зарядов транслоцируемых комплексов нуклеотидов с лигандами: 1) комплекс  $Mg$ —АТР с лигандами должен иметь положительный заряд; 2) заряд комплекса  $Mg$ —АТР с лигандами отличается на 2 ед. в положительную сторону от заряда соответствующего комплекса  $Mg$ —АДФ и  $P_i$ . Итак, имеющиеся данные не позволяют сделать окончательный выбор между несколькими потенциально возможными вариантами реализации предложенной схемы, а выбранные величины зарядов транслоцируемых комплексов, хотя и представляются нам наиболее вероятными, являются лишь гипотетической конкретизацией общего механизма.

В настоящее время механизм транслокации нуклеотидов также не известен. Перенос  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  из некаталитического центра АТР-азы в каталитический в результате вращения одной субъединицы фермента (рис. 3) может в действительности сопровождаться поворотом нескольких белковых глобул (см. далее рис. 4) или какой-либо иной перестройкой четвертичной структуры фактора  $F_1$ . Наличие у фактора  $F_1$  6 субъединиц с близким молекулярным весом [37] представляет широкие возможности

---

\* Поскольку связывание  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  в некаталитическом центре АТР-азы определяется свободной диффузией этих соединений и протекает с высокой скоростью, то и диссоциация соответствующих фермент-субстратных комплексов происходит, по-видимому, достаточно быстро (быстрее, чем транслокация  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  из некаталитического центра фактора  $F_1$  в каталитический). При таком соотношении скоростей отдельных стадий процесса было бы выгодно для понижения энергии активации всей реакции в целом переносить  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  из некаталитического центра АТР-азы в каталитический одновременно и иметь механизм, запрещающий транслокацию АДФ или  $P_i$  в отдельности. Если суммарный заряд  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  отрицателен, а суммарный заряд лигандов в некаталитическом центре положителен и численно равен заряду  $Mg$ —АДФ и  $P_i$ , то требование одновременной транслокации  $Mg$ —АДФ и  $P_i$  будет выполняться автоматически, поскольку комплекс лигандов с одним из компонентов реакции будет заряжен положительно, и его транслокация через мембрану будет тормозиться полем.



для предположений об изменениях конформации фермента, затрагивающих его четвертичную структуру. Возможно, при этом реализуется один из вариантов структурного перехода в АТР-азе, предложенный Гринном [73] и Микельсааром [36, 37].

### Экспериментальные доказательства предложенного механизма сопряжения АТР-азной реакции с процессом транслокации ионов $H^+$ через митохондриальную мембрану

В соответствии с предложенным механизмом функционирования АТР-азного комплекса митохондрий субстраты АТР-азной и АТР-синтазной реакций не могут попасть в активный центр фактора  $F_1$ , минуя стадию связывания в некаталитическом центре фермента и стадию транслокации. Аналогичные соображения применимы к механизму функционирования фактора  $F_1$  на границе раздела октан/вода, когда фермент «прилипает», по-видимому, своим каталитическим центром к органической (липидной) фазе. Иная ситуация возникает в водном растворе. В этом случае активный центр фермента уже не защищен гидрофобной фазой от молекул воды и растворенных в ней низкомолекулярных соединений. Последнее обстоятельство и определяет различия в механизме АТР-азной реакции, катализируемой фактором  $F_1$  в составе АТР-азного комплекса или на границе раздела октан/вода и в водном растворе, в котором субстрат имеет доступ в активный центр АТР-азы. Подобные соображения, вытекающие непосредственно из предложенного механизма реакции и схемы строения АТР-азного комплекса (см. рис. 3), определили экспериментальные подходы к изучению механизма АТР-азной реакции.

*Действие ингибиторов на АТР-азу в растворе, на границе раздела октан/вода и в составе митохондриальной мембраны.* В соответствии с предложенной схемой (см. рис. 3) ингибиторы, блокирующие некаталитический центр фактора  $F_1$  (или стадию транслокации субстрата), должны ингибировать АТР-азу на границе раздела октан/вода или в составе митохондриальной мембраны и не должны оказывать влияния на АТР-азную активность фермента в водном растворе. Согласно полученным нами результатам, а также литературным данным, ПХМБ ингибирует, хотя и в сравнительно высоких концентрациях, олигомицин-чувствительную АТР-азу и АТР-азу в составе СМЧ, но не влияет на АТР-азную активность фактора  $F_1$  в водном растворе [13, 34]. Как показали опыты, ПХМБ является эффективным ингибитором фактора  $F_1$  на границе раздела октан/вода. Ингибирующий эффект не зависел от того, добавляли ли ПХМБ непосредственно к ферменту, адсорбированному на границе раздела фаз, или проводили предынкубацию фактора  $F_1$  с ПХМБ ( $5 \cdot 10^{-5}M$ , 30 мин) в водном растворе, а затем белок, переосажденный сульфатом аммония, помещали на границу раздела фаз [34]. Ингибирующий эффект ПХМБ снимался 0,1 мМ дигиотреитолом, а  $Mg-ATP$  защищал фермент от действия ПХМБ (скорость ингибирования в присутствии субстрата замедлялась).

Аналогичные результаты были получены нами при использовании в качестве ингибитора митохондриальной АТР-азы ADP-MK [34]. Смешанные ангидриды нуклеотидов и мезитиленкарбоновой кислоты являются фосфорилирующими агентами и вступают в водном растворе в реакцию с  $NH_2$ - и  $SH$ -группами аминокислот [74]. ADP-MK представляет собою активированный аналог субстрата окислительного фосфорилирования, что и определило его использование при изучении механизма функционирования митохондриальной АТР-азы. Это соединение оказалось эффективным ингибитором АТР-азной активности СМЧ и фактора  $F_1$  на границе раздела октан/вода [34]. С другой стороны, ADP-MK не оказывал влияния на активность фактора  $F_1$  в растворе.  $Mg-ATP$ , как

и в случае с ПХМБ, обладал защитным эффектом при действии ингибитора на АТР-азу СМЧ или фактор  $F_1$  на границе раздела октан/вода.

Результаты иного характера были получены нами при использовании в качестве ингибитора митохондриальной АТР-азы водорастворимого карбодимида (ЦМКД) [34]. Водорастворимый карбодимид, широко известный реагент на карбоксильные группы белков [75], с высокой эффективностью ингибирует активность растворимой митохондриальной АТР-азы и не оказывает влияния на АТР-азную активность СМЧ или фактора  $F_1$  на границе раздела октан/вода.

Олигомицин-чувствительная АТР-азная активность СМЧ не ингибируется ЦМКД. Поскольку 100%-ная чувствительность АТР-азы СМЧ к олигомицину не наблюдается, ЦМКД приводит, как правило, к некоторому снижению АТР-азной активности. Однако оставшаяся олигомицин-чувствительная АТР-азная активность СМЧ не меняется при длительной инкубации с ЦМКД.

Полученные различия в действии ЦМКД на фактор  $F_1$  в растворе и на границе раздела октан/вода или в СМЧ легко объяснить, если учесть низкую растворимость ЦМКД в органической фазе. В соответствии с предложенной схемой строения АТР-азного комплекса (рис. 3) каталитический центр фермента, имеющий в своем составе карбоксильную группу, расположен в гидрофобном окружении и не доступен для атаки ЦМКД. То же самое можно сказать и про каталитический центр фактора  $F_1$ , адсорбированного на границе раздела октан/вода.

Таким образом, полученные нами результаты о различной чувствительности АТР-азной активности фермента в растворе и на границе раздела октан/вода или в составе митохондриальной мембраны к действию ингибиторов свидетельствуют об изменении механизма реакции фермента при его высвобождении из митохондриальной мембраны. Наиболее простым способом полученные результаты могут быть объяснены в рамках предложенной схемы строения АТР-азного комплекса и механизма АТР-азной реакции.

*Субстратная специфичность и параметры АТР-азной реакции.* Как уже отмечалось выше, растворимая митохондриальная АТР-аза не проявляет высокой специфичности к типу гетероциклического основания в нуклеозид-5'-трифосфатах и гидролизует с почти одинаковой эффективностью АТР, ИТР и ГТР [13, 24]. В случае АТР-азы СМЧ эффективность гидролиза нуклеозид-5'-трифосфатов, напротив, зависит от типа гетероциклического основания, причем скорость гидролиза АТР значительно выше, чем ГТР [76]. Эти известные из литературы факты находятся в хорошем соответствии с предложенным механизмом АТР-азной реакции. Действительно, как указывает Хилборн и Хаммес [42], некаталитический центр связывания нуклеотидов имеет высокую специфичность к типу гетероциклического основания, и, следовательно, такую же специфичность должна иметь АТР-аза СМЧ (рис. 3).

Другое наблюдение, подтверждающее нашу концепцию, принадлежит Педерсену и соавт. [49], а также Пенефскому [68], которые обратили внимание на близость константы диссоциации ADP в некаталитическом центре АТР-азы и  $K_m$  (для ADP) окислительного фосфорилирования. Данные Хилборна и Хаммеса [42] о более высоком сродстве к ADP некаталитического центра связывания нуклеотидов по сравнению с каталитическим центром фермента в совокупности с нашими результатами по ингибированию активности фактора  $F_1$  в растворе ADP ( $K_1$  500 мкМ) и на границе раздела октан/вода ( $K_1$  30 мкМ) [34] также находятся в хорошем соответствии с предложенным механизмом реакции.

Наконец, полученные нами данные о pH-зависимости  $K_m$  фермента на границе раздела октан/вода [34] совпадают с результатами Митчелла [72], который изучал зависимость от pH величины  $K_m$  АТР-азной реакции СМЧ. Такое совпадение результатов для АТР-азы СМЧ и фактора  $F_1$

на границе раздела октан/вода согласуется с предложенной схемой АТР-азной реакции (в обоих случаях первая стадия реакции — связывание Mg—АТР в некаталитическом центре АТР-азы). С другой стороны,  $K_m$  фактора  $F_1$  в растворе имеет совершенно иной характер зависимости от рН [39]. Этот результат также просто объяснить: в растворе Mg—АТР имеет доступ в каталитический центр фактора  $F_1$  и, следовательно, в этом случае  $K_m$  характеризует связывание субстрата непосредственно в каталитическом центре. Некоторые свойства каталитического и некаталитического центров АТР-азы суммированы в таблице.

Действие ингибиторов на АТР-азную активность фактора  $F_1$  в растворе на границе раздела октан/вода и в составе СМЧ [34, 49, 68]

(—) — нет эффекта, (+) — торможение

Ингибитор	Концентрация, М	Фактор $F_1$			Предполагаемое место атаки
		в растворе	на границе раздела октан/вода	в СМЧ	
ПХМБ	$5 \cdot 10^{-5}$	—	+	+	Некаталитический центр
ADP-МК	$2 \cdot 10^{-4}$	—	+	+	То же
ЦМКД	$1 \cdot 10^{-3}$	+	—	—	Каталитический центр
ADP	$3 \cdot 10^{-5}$	—	+	+	Некаталитический центр
	$5 \cdot 10^{-4}$	+	+	+	Каталитический и некаталитический центры
5'-аденилилимидодифосфат	$2 \cdot 10^{-6}$	+	Не исследовали	АТР-аза (+) АТР-синтетазы (—)	Каталитический центр
	$1 \cdot 10^{-2}$	+	Не исследовали	+	Каталитический и некаталитический центры

*Реакции изотопного обмена.* Предложенный механизм функционирования АТР-азного комплекса митохондрий позволяет также объяснить результаты, полученные Бойером и соавт. [27, 77—79], а также другими авторами [80, 81] при исследовании реакций изотопного обмена в митохондриях и СМЧ\*.

Обязательное, но далеко недостаточное условие реакций изотопного обмена, катализируемых ферментами, — доступность активного центра одновременно двум обменивающимся молекулам. Это требование не находится в противоречии с предложенным механизмом АТР-азной реакции. Действительно, в соответствии со схемой, представленной на рис. 3, одновременный перенос Mg—ADP и  $P_i$  между каталитическим и некаталитическим центрами есть процесс неэлектрогенный и изоэнергетический, а следовательно, легко обратимый в различных условиях функционирования АТР-азного комплекса. На эффективность процесса транслокации ADP и  $P_i$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны не оказывает, по-видимому, решающего влияния присутствие субстратов в активном центре фермента. Иными словами, комплекс Mg—ADP и  $P_i$  с соответствующими лигандами может находиться в непосредственной близости от активного центра фермента (см. ниже), что и обеспечивает возможность протекания обмена АТР —  $^{32}P_i$ .

\* Следует с большой осторожностью относиться к количественной интерпретации скоростей изотопного обмена в митохондриях и СМЧ. Так, изменение концентрации любого из компонентов АТР-синтетазной (АТР-азной) реакции может, по крайней мере, тремя различными путями привести к изменению скоростей реакций изотопного обмена. Во-первых, при различных соотношениях концентраций АТР, ADP и  $P_i$  мембрана митохондрий может быть в различной степени энергизована. Во-вторых, АТР, ADP и  $P_i$  могут вступать в конкурентные отношения за места связывания на ферменте. И, наконец, в третьих, от концентрации АТР, ADP и  $P_i$  зависит эффективность ингибирующего действия белкового ингибитора митохондриальной АТР-азы [86, 90]. Все три фактора могут оказывать влияние одновременно, причем каждый из них на несколько стадий ферментативной реакции.

Рассматривая любой механизм, описывающий функционирование АТР-азного комплекса в системе окислительного фосфорилирования, необходимо ответить на важный вопрос: почему растворимая АТР-аза, в отличие от АТР-азы СМЧ, не способна катализировать изоэнергетические реакции обмена АТР —  $^{32}\text{P}_i$ . В соответствии с предложенным нами механизмом скорость изоэнергетической реакции изотопного обмена АТР —  $^{32}\text{P}_i$  при участии растворимой митохондриальной АТР-азы должна лимитироваться стадией фосфорилирования АDP в активном центре фермента. Скорость этой лимитирующей стадии не зависит от внешнего источника энергии (АТР) и, исходя из данных о величине константы равновесия и скорости АТР-азной реакции, она должна быть в условиях эксперимента неизмеримо мала. С другой стороны, когда активный центр АТР-азы находится в гидрофобном окружении митохондриальной мембраны, реакция  $\text{АТР} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} \text{АDP} + \text{P}_i$  становится изоэнергетической,

что является, по-видимому, следствием резкого возрастания  $k_{-1}$ . В этом случае скорость реакций АТР —  $^{32}\text{P}_i$  обмена может лимитировать стадия транслокации Mg—АТР из каталитического центра реакции в водную фазу. Введение в систему внешнего источника энергии (АТР) приведет к увеличению скорости этой лимитирующей стадии процесса, например, путем генерации  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  при гидролизе АТР или благодаря замещению одной молекулы АТР на другую в каталитическом центре фермента.

В рамках предложенной схемы хорошо объясняется наблюдаемое увеличение скорости обмена  $\text{P}_i - \text{H}_2^{18}\text{O}$  в присутствии АDP [27, 79, 80]. Действительно, для того чтобы транслокация  $\text{P}_i$  в обоих направлениях оставалась процессом изоэнергетическим и неэлектрогенным, необходимо присутствие второго компонента АТР-синтетазной реакции — Mg—АDP.

Ингибирующий эффект разобщителей окислительного фосфорилирования на скорость реакций АТР —  $^{32}\text{P}_i$  и АТР —  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  изотопного обмена \* связан, по-видимому, с невозможностью выхода АТР из каталитического центра митохондриальной АТР-азы в отсутствие  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ . Интересно отметить, что реакция  $\text{P}_i - \text{H}_2^{18}\text{O}$  обмена существенно менее чувствительна к действию разобщителей, чем реакции АТР —  $^{32}\text{P}_i$  и АТР —  $\text{H}_2\text{O}$  обмена, связанные с транслокацией АТР из каталитического центра в некаталитический.

Наконец, чувствительность реакций обмена к олигомицину определяется необходимостью протонирования (или депротонирования) каталитического центра АТР-азы через протон-проводящий канал в процессе гидролиза или синтеза АТР.

#### Механизм функционирования митохондриальной АТР-азы, учитывающий изменения четвертичной структуры фактора $F_1$

Как отмечалось выше, фактор  $F_1$  имеет сложную четвертичную структуру [36, 37]. Каждая молекула фермента содержит 5 типов субъединиц. По данным Ноэлса и Пенефского [35] молекулярный вес этих субъединиц равен соответственно 54 000 ( $\alpha$ ), 51 000 ( $\beta$ ), 33 000 ( $\gamma$ ), 16 000 ( $\delta$ ) и 11 000 ( $\epsilon$ ). Предполагается, что субъединичный состав молекулы АТР-азы соответствует формуле  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Существует целый ряд указаний на изменение четвертичной структуры фактора  $F_1$  при его работе \*\*.

Слейтером и соавт.\*\*\* было показано, что фактор  $F_1$  содержит три молекулы АТР и две АDP, прочно связанные с ферментом и не обменива-

\* Cross R. L., Boyer P. D. (1975) *Biochemistry*, 14, 392—398.

\*\* McCarty R. E., Fagan J. (1973) *Biochemistry* 12, 1503—1507; Ryrle I. J., Jagendorf A. T. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 4453—4460.

\*\*\* Harris D. A., Rosing J., Van de Stadt R. J., Slater E. S. (1973) *Biochim. et Biophys. acta*, 314, 149—153; Rosing J., Harris D. A., Komp A., Slater E. S. (1975) *Biochim. et Biophys. acta*, 376, 13—26.

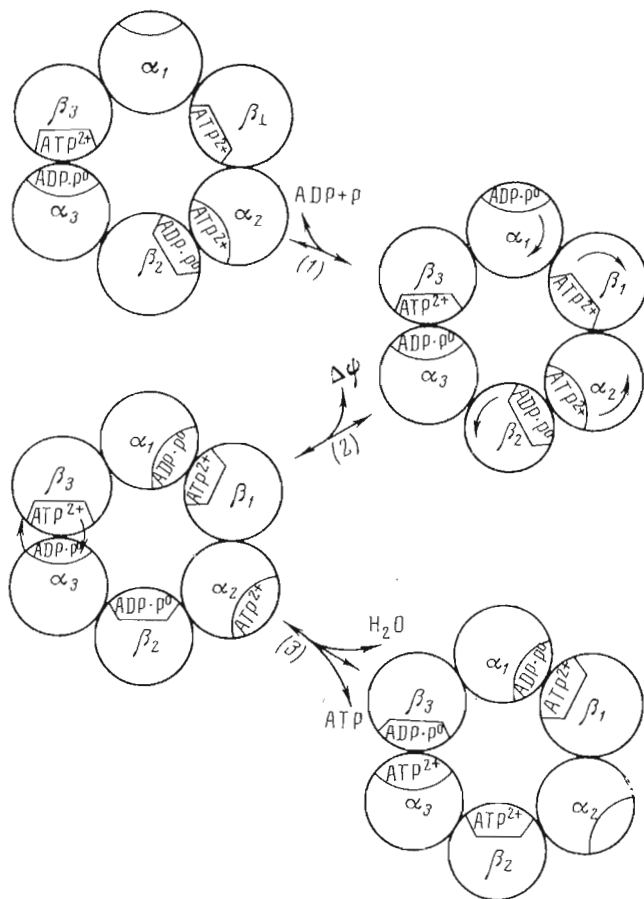


Рис. 4. Перестройка четвертичной структуры фактора F<sub>1</sub>, сопровождающая работу митохондриальной АТФ-азы: α и β — субъединицы фактора F<sub>1</sub>; 1, 2, 3 — стадии реакции

ющиеся с добавленными нуклеотидами. По данным авторов, холодовая инактивация фактора F<sub>1</sub> и распад его на субъединицы проходит через стадию измененной конформации, характеризующейся несколько меньшим коэффициентом седиментации (9S), чем нативный фермент (12S). В этой конформации происходит обмен связанных нуклеотидов на добавленные. Дальнейшая необратимая деструкция фактора F<sub>1</sub> на холоду ведет к потере связанных нуклеотидов и появлению 3,5S субъединиц.

Суммируя различные сведения о свойствах и строении фактора F<sub>1</sub>, приведенные выше, можно предложить схему функционирования митохондриальной H<sup>+</sup>-АТФ-азы, показанную на рис. 4. Два типа субъединиц фактора F<sub>1</sub> (α и β), на которые приходится около 90% массы молекулы фермента, расположены в виде планарного гексагона [37]. Постулируется, что α-субъединица несет некаталитический центр, а β-субъединица — каталитический. Таким образом, в каждой молекуле АТФ-азы имеется три некаталитических центра и три каталитических. Субъединицы α<sub>2</sub> и β<sub>2</sub>, а также α<sub>3</sub> и β<sub>3</sub> расположены так, что между каталитическим и некаталитическим центрами может происходить обмен нуклеотидами и P<sub>i</sub> (рис. 4), причем каталитический и некаталитический центры α<sub>2</sub>, β<sub>2</sub>, α<sub>3</sub> и β<sub>3</sub>-субъединиц находятся на небольшом расстоянии от внешней поверхности митохондриальной мембраны. Строение субъединиц (или АТФ-азного комплекса в целом) обеспечивает высокий кинетический барьер,



препятствующий непосредственному выходу нуклеотидов и  $P_i$  из каталитического и некаталитического центра наружу митохондрий.

Каталитический центр  $\beta_1$ -субъединицы находится в контакте с протон-проводящим каналом и содержит 1 молекулу АТФ. Некаталитический центр  $\alpha_1$ -субъединицы свободен и обращен в матрикс. Процесс начинается со связывания АДФ и  $P_i$  в некаталитическом центре  $\alpha_1$ -субъединицы. Связывание индуцирует конформационный переход, условно показанный на схеме вращением  $\alpha_1$ - и  $\beta_1$ -субъединиц в противоположном направлении. Вращение  $\alpha_1$ - и  $\beta_1$ -субъединиц сопровождается поворотом  $\alpha_2$ - и  $\beta_2$ -субъединиц, в результате которого положительно заряженный комплекс связанного АТФ с лигандами перемещается в направлении митохондриального матрикса, заряженного отрицательно. Существенно, что движение некаталитического центра  $\alpha_2$ -субъединицы с АТФ осуществляется по градиенту электрического поля, и в результате этого движения АТФ пересекает гидрофобный барьер митохондриальной мембраны. Последняя стадия реакции заключается в изоэнергетическом синтезе новой молекулы АТФ в каталитическом центре  $\beta_2$ -субъединицы и одновременном освобождении другой молекулы АТФ из некаталитического центра  $\alpha_2$ -субъединицы в матрикс. При этом вся система возвращается в исходное состояние, но уже со свободным некаталитическим центром на  $\alpha_2$ -субъединице и т. д.

Таким образом, в соответствии с предложенной схемой (рис. 4) мы можем получить АТФ всего в три стадии. Подобный эффект достигается тем, что отдельные стадии процесса могут протекать параллельно. Таким способом удастся преодолеть сложную хронологическую последовательность отдельных стадий процесса, которой мы вынуждены были придерживаться в схеме с двумя субъединицами (адсорбция АДФ и  $P_i$  в некаталитическом центре, транслокация АДФ и  $P_i$  через гидрофобный барьер, перенос АДФ и  $P_i$  из некаталитического центра в каталитический, синтез АТФ в каталитическом центре, перенос АТФ в некаталитический центр с последующей транслокацией через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны, рис. 3).

Схема на рис. 4 находится в соответствии с основными наблюдениями, полученными при исследовании фактора  $F_1$ , такими, как наличие 6 главных субъединиц, количество прочно связанных нуклеотидов (на единицу меньше, чем количество  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц), взаимное расположение субъединиц фактора  $F_1$  (планарный гексагон с чередующимися  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами), изменение четвертичной структуры фактора  $F_1$  при его функционировании, необходимость каталитического и некаталитического центров связывания нуклеотидов и их расположение относительно гидрофобной фазы и т. д. Эта схема предполагает также ряд новых свойств фактора  $F_1$ , среди которых мы отметим следующие.

1. Функционирование фактора  $F_1$  в составе  $H^+$ -АТФ-азного комплекса, чувствительного к олигомицину, или на поверхности раздела октан/вода должно сопровождаться обменом прочно связанных нуклеотидов с нуклеотидами инкубационной смеси\*.

2. Каталитический центр, чувствительный к ЦМКД, и некаталитический центр, блокируемый ПХМБ (или АДФ-МК), должны быть расположены на двух разных типах основных субъединиц фактора  $F_1$ .

3. Каталитический и некаталитический центры периодически находятся в прямом контакте, причем некаталитический центр пересекает гидрофобный барьер митохондриальной мембраны при работе АТФ-азы.

Предложенная схема также предусматривает возможность периодических контактов каталитических центров на трех  $\beta$ -субъединицах с про-

\* Во время подготовки этой рукописи к печати появилась публикация Харриса и Слейтера (*Biochim. et biophys. acta*, 387, 335—348, 1975) о том, что энергизация мембраны хлоропластов светом индуцирует обмен связанных с фактором  $F_1$  нуклеотидов на добавленные. Эффект света предотвращался разобщителями — протонофорами.

тон-проводящим каналом. Последнее реализуется либо за счет трех протон-проводящих путей, направленных к каждой из  $\beta$ -субъединиц, либо благодаря дополнительному вращению всей молекулы фактора  $F_1$  в плоскости митохондриальной мембраны.

### Некоторые частные вопросы и заключение

Итак, в результате анализа данных литературы и наших исследований можно постулировать наличие в каталитическом центре митохондриальной АТР-азы двух областей, ответственных за связывание дифосфоаденозина, а также специальный механизм транслокации нуклеотидов и  $P_i$  между каталитическим и некаталитическим центром фермента. В процессе такой транслокации осуществляется перенос нуклеотидов и  $P_i$  через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны, что и является основой механизма сопряжения реакций гидролиза и синтеза АТР с генерацией или утилизацией  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  на митохондриальной мембране. Возникает вопрос: какая связь существует между механизмом псевдовращения в активном центре АТР-азы, сопровождающимся переносом  $O-ADP$  с одной площадки в каталитическом центре на другую, и предполагаемым механизмом сопряжения АТР-азной (АТР-синтезной) реакции с трансмембранным переносом ионов  $H^+$ ? К сожалению, на данном этапе развития наших представлений о механизме функционирования митохондриальной АТР-азы оба эти процесса мы вынуждены обсуждать изолированно один от другого. Псевдовращение имеет непосредственное отношение к механизму катализа АТР-азной (АТР-синтезной) реакции в активном центре фермента и не является, по нашему мнению, стадией, на которой осуществляется трансформация энергии  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  в энергию АТР. Два центра связывания нуклеотидов (каталитический и некаталитический), по данным Хилборна и Хаммеса [42], Тондра и Хаммеса [67], взаимонезависимы и, следовательно, расстояние между ними должно быть существенно большим, чем расстояние между двумя площадками каталитического центра, участвующими в механизме псевдовращения.

Между тем для объяснения механизма действия некоторых ингибиторов митохондриальной АТР-азы и окислительного фосфорилирования уже сейчас целесообразно привлечь как данные по строению каталитического центра фермента (две площадки связывания  $O-ADP$  и псевдовращение), так и предложенный механизм трансформации  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  в энергию АТР, включающий стадию транслокации субстратов через гидрофобный барьер митохондриальной мембраны. Высказанные в настоящем обзоре соображения могут быть, в частности, использованы для объяснения механизма ингибирующего действия ауровертина — специфического ингибитора окислительного фосфорилирования.

Как уже отмечалось, роль псевдовращения и двух площадок в каталитическом центре АТР-азы может заключаться в снижении энергии активации катализируемых реакций. Особенно большое значение имеет, по видимому, процесс псевдовращения для снижения энергии активации реакции фосфорилирования в активном центре. Увеличение скорости реакции фосфорилирования достигается за счет быстрого высвобождения воды из аксиального положения тригональной бипирамиды 2 (рис. 2). Для того чтобы такой механизм снижения энергии активации был достаточно эффективен, скорость псевдовращения должна быть сравнима со скоростью выхода  $O-ADP$  из пентавалентного промежуточного соединения 1 (рис. 2). Если ауровертин действительно блокирует возможность псевдовращения в активном центре АТР-азы, взаимодействуя с площадкой II каталитического центра, то тогда можно объяснить интригующий термодинамический парадокс; ингибирование низкими концентрациями ауровертина окислительного фосфорилирования при отсутствии ингибирования теми же концентрациями антибиотика АТР-

азной реакции и зависимо от АТР обратного переноса электронов по окислительно-восстановительной цепи [57, 82—85]. Действительно, если скорость выхода  $H_2O$  из аксиального положения тригональной бипирамиды 1 мала (значительно меньше скорости псевдотворения и выхода  $H_2O$  из аксиального положения бипирамиды 2, рис. 2), то эта стадия в присутствии аувертина может стать лимитирующей для скорости реакции синтеза АТР. С другой стороны, лимитировать скорость гидролиза АТР может по-прежнему стадия транслокации  $Mg$ —АТР из некаталитического центра фермента в каталитический. Поскольку измерение скоростей реакций проводится в неравновесных условиях (если одна из стадий процесса является очень медленной, как, например, при образовании АТР в присутствии аувертина, то равновесие в системе не достигается за время эксперимента), изменение лимитирующей стадии для АТР-синтезной реакции без изменения таковой для АТР-азной реакции может привести к избирательному ингибированию одного из этих процессов. Предложенный механизм ингибирующего действия аувертина не претендует, конечно, на исчерпывающее объяснение всех эффектов, сопровождающих взаимодействие этого антибиотика с митохондриальной АТР-азой. Остается, в частности, открытым вопрос о том, какое влияние на фермент оказывает связывание второй молекулы аувертина [86—88].

Предложенный механизм функционирования митохондриальной АТР-азы объясняет результаты, полученные Пенефским [68], при использовании 5'-аденилилимидодифосфата в качестве ингибитора АТР-азной реакции. Как уже отмечалось выше, этот негидролизующийся аналог АТР является высокоэффективным ингибитором растворимой митохондриальной АТР-азы [49]. Высокий ингибирующий эффект этого соединения объясняется его способностью блокировать каталитический центр фермента в результате адсорбции на площадке II активного центра. В соответствии с данными Пенефского [68] 5'-аденилилимидодифосфат является эффективным ингибитором АТР-азной реакции СМЧ и не обладает заметным ингибирующим действием на реакцию фосфорилирования. Различную чувствительность АТР-азной и АТР-синтезной реакций к действию ингибитора можно объяснить различным уровнем энергизации митохондриальной мембраны СМЧ в условиях гидролиза и синтеза АТР. Действительно, в соответствии с предложенной схемой транслокации  $Mg$ —АТР и, следовательно, соответствующих аналогов в каталитический центр АТР-азы возможна только в том случае, когда на мембране нет большой разности электростатических потенциалов ионов  $H^+$ . При энергизации мембраны благодаря окислению дыхательных субстратов 5'-аденилилимидодифосфат не может попасть в каталитический центр, следствием чего и является отсутствие ингибирующего эффекта 5'-аденилилимидодифосфата на АТР-синтезную реакцию. В условиях, когда источником энергии служит не дыхание, а гидролиз АТР, 5'-аденилилимидодифосфат способен понижать мембранный потенциал, конкурируя с АТР. Торможение АТР-азы может иметь автокаталитический характер: чем сильнее будет ингибироваться АТР-аза, тем меньше будет мембранный потенциал и тем легче будет развиваться дальнейшее торможение АТР-азы. Если высказанные соображения верны, то ингибирующий эффект негидролизующихся аналогов АТР должен возрастать в присутствии разобщителей окислительного фосфорилирования, что и наблюдается в действительности. В соответствии с опубликованными недавно данными Мельника с соавт.\* ингибирующее действие 5'-аденилилимидодифосфата на АТР-азную активность СМЧ возрастает в присутствии разобщителей.

\* Melnick R. L., De Sousa J. T., Maguire J., Packer L. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 166, 139—144.

Труднее объяснить результаты Голланда и соавт. [89], которые использовали негидролизующиеся аналоги АТР в качестве ингибиторов различных реакций изотопного обмена в СМЧ и митохондриях. Как уже отмечалось выше, количественная интерпретация скоростей изотопного обмена в митохондриях и СМЧ сопряжена с серьезными трудностями. Наличие большого числа гипотетических возможностей влияния аналогов АТР на скорость реакций изотопного обмена не позволяет связать наблюдаемые эффекты с каким-либо конкретным механизмом. Однако и в этом случае основной результат, полученный Голландом и соавт. [89], — отсутствие реакции обмена 5'-аденилилимидодифосфат —  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в СМЧ и митохондриях — может быть объяснен в рамках предложенного механизма функционирования митохондриальной АТР-азы. Необходимым условием протекания реакций обмена АТР —  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  является наличие на мембране  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ , обеспечивающей транслокацию  $\text{Mg-ATP}$  из каталитического центра в матрикс. Этим и объясняется, по-видимому, ингибирующий эффект разобщителей окислительного фосфорилирования на обмен АТР —  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в СМЧ. Голланд и соавт. [89] изучали реакции  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -изотопного обмена в условиях низкой эффективности  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ -генерирующей системы. Так, авторы наблюдали включение  $^{18}\text{O}$  из воды в АТР в течение 60 мин, причем добавляли в начальный момент времени в реакционную среду только 5 мМ сукцинат. Когда в качестве субстрата реакций обмена использовали АТР, частичная энергизация митохондриальной мембраны осуществлялась за счет АТР-азной реакции, сопровождающей обмен АТР —  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . При использовании негидролизующегося аналога АТР величина  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  на митохондриальной мембране была, по-видимому, недостаточной для того, чтобы обеспечить эффективный перенос субстрата из каталитического центра АТР-азы в воду.

Таким образом, в опытах Голланда и соавт. [89] наблюдалась ситуация, сходная с той, которая была описана авторами [71, 72]: 5'-аденилилимидодифосфат в условиях эксперимента остается прочно связанным с каталитическим центром митохондриальной АТР-азы. Если высказанные нами соображения по интерпретации результатов Голланда и соавт. [89] справедливы, то можно ожидать, что фактор  $F_1$  в растворе будет катализировать реакцию обмена 5'-аденилилимидодифосфат —  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ .

Механизм действия другого специфического ингибитора митохондриальной АТР-азы, так называемого белкового ингибитора [26, 86, 90], остается до настоящего времени малопонятным. Возможно, существенную информацию по этому вопросу удастся получить при изучении механизма транслокации нуклеотидов.

Решающий прогресс в понимании механизма окислительного фосфорилирования связан с выяснением природы химических групп, осуществляющих катализ всех стадий реакции.

Автор благодарит Л. И. Богуславского, А. Г. Волкова, Л. А. Драчева, Е. А. Либермана, Х. Н. Микельсаара, А. Н. Глаголева, А. А. Константинова и Л. С. Ягужинского за обсуждение работы. Автор благодарен В. П. Скулачеву за ценные советы и критические замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Racker E., Kandrach A. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 7069—7071.
2. Ragan C. I., Racker E. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2563—2569.
3. Racker E., Stoeckenius W. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 662—663.
4. Mitchell P. (1966) *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation* (Bodmin, Glynn Research).
5. Mitchell P., Moyle J. (1968) *Eur. J. Biochem.*, **4**, 530—539.
6. Скулачев В. П. (1972) Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», М.
7. Ясайтис А. А. (1973) Превращение энергии в митохондриях, *Итоги науки и техники, Биофизика*, т. 3. ВИНТИ АН СССР, М.
8. Skulachev V. P. (1974) *Biochem. Soc. Spec. Suppl. (Great Britain)*, **4**, 175—184.



9. Beechey R. B., Cattell K. J. (1973) In *Current Topics Bioenerg.*, 5, pp. 305—357, Acad. Press, N. Y.—London.
10. Senior A. E. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 301, 249—277.
11. Jasaitis A. A., Nemecek J. B., Severina I. I., Skulachev V. P., Smirnova S. M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 275, 485—490.
12. Kagawa Y., Racker E. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5477—5487.
13. Tzagoloff A., MacLennan D. H., Byington K. H. (1968) *Biochemistry*, 7, 1596—1602.
14. Kagawa Y. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 265, 297—338.
15. Beechey R. B., Robertson A. M., Holloway C. L., Knight I. G. (1967) *Biochemistry*, 6, 3867—3879.
16. Фатеева Л. А. (1973) В сб. *Биофизика мембран*, стр. 612, Каунас.
17. Bulos B., Racker E. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 3891—3900.
18. Tzagoloff A., Meager P. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 7328—7336.
19. Pitotti A., Contessa A. R., Dabbeni-Sala F., Bruni A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 274, 528—535.
20. Kagawa Y., Kandrach A., Racker E. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 676—684.
21. Capaldi R. A. (1973) *Biochem and Biophys. Res. Commun.*, 53, 1331—1337.
22. Swanlung P., Frigeri L., Ohlson K., Ernster L. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 305, 519—533.
23. Каргополов А. В., Карцова С. В., Микельсаар Х. Н. (1975) *Биологические науки*, № 2, 50—55.
24. Racker E. (1965) *Mechanism in Bioenerg.*, Acad. Press, N. Y.—London.
25. MacLennan D. H., Tzagoloff A. (1968) *Biochemistry*, 7, 1603—1610.
26. Pullman M. E., Monroy G. C. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3762—3769.
27. Boyer P. D. (1967) In *Current Topics in Bioenerg.* (D. R. Sanadi, ed.), vol. 2, pp. 99—149, Acad. Press, N. Y.
28. House D., Packer L. (1970), *J. Bioenerg.*, 1, 273—285.
29. Dontsov A. E., Grinius L. L., Jasaitis A. A., Severina I. I., Skulachev V. P. (1972) *J. Bioenerg.*, 3, 277—303.
30. Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauscas J. P., Liberman E. A., Skulachev V. P., Topali V. P., Tsofina L. M., Vladimirova M. A. (1970) *Biochem. et biophys. acta*, 216, 1—12.
31. Scholes P., Mitchell P., Moyle J. (1969) *Eur. J. Biochem.*, 8, 450—454.
32. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1974) *Докл. АН СССР*, 218, 963—967.
33. Boguslavsky L. I., Kondrashin A. A., Kozlov I. A., Metelsky S. T., Skulachev V. P., Volkov A. G. (1975) *FEBS Lett.*, 50, 223—226.
34. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 1369—1379.
35. Knowles A. F., Penefsky H. S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6624—6630.
36. Микельсаар Х. Н. (1972) *Докл. АН СССР*, 203, 704—706.
37. Kozlov I. A., Mikelsaar H. N. (1974) *FEBS Lett.*, 43, 212—214.
38. Catterall W. A., Pedersen P. L. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 4987—4994.
39. Метельский С. Т., Козлов И. А. (1974) *Докл. АН СССР*, 219, 1010—1013.
40. Selwyn M. J. (1967) *Biochem. J.*, 105, 279—288.
41. Акименко В. К., Минков И. Б., Виноградов А. Д. (1972) *Биохимия*, 37, 348—352.
42. Hilborn D. A., Hammes G. G. (1973) *Biochemistry*, 12, 983—990.
43. Adolfsen R., Moudrianakis E. N. (1973) *Biochemistry*, 12, 2926—2933.
44. London W. P., Stock T. L. (1969) *Biochemistry*, 8, 1767—1779.
45. Козлов И. А., Кононенко В. А. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 489—493.
46. Senior A. E. (1973) *Biochemistry*, 12, 3622—3627.
47. Ferguson S. J., Lloyd W. J., Radda G. K. (1974) *FEBS Lett.*, 38, 234—236.
48. Ferguson S. J., John P., Lloyd W. J., Radda G. K., Whatley F. R. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 357, 457—461.
49. Pedersen P. L., Le Vine H. III, Cintron N. (1974) In *Membrane proteins in transport and phosphorylation*, pp. 43—54. North — Holland Publ. Co., Amer. Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
50. Berry R. S. (1960) *J. Chem. Phys.*, 37, 601—610.
51. Hudon R. F. (1965) *Structure and Mechanism in Organophosphorus Chemistry*, Acad. Press, N. Y.—London.
52. Korman E. F., McLick J. (1972) *J. Bioenerg.*, 3, 147—158.
53. Korman E. F., McLick J. (1973) *Bioorg. Chem.*, 2, 179—190.
54. Korman E. F., McLick J. (1971) In *Biomembranes*, vol. 2, pp. 139—146, Acad. Press, N. Y.—London.
55. Young J. H., Korman E. F. (1974) *Bioorg. Chem.* 3, 1—15.
56. Акименко В. К., Минков И. Б., Виноградов А. Д. (1971) *Биохимия*, 36, 655—658.
57. Mitchell P., Moyle J. (1970) *FEBS Lett.*, 6, 309—311.
58. Mitchell P., Moyle J. (1970) *FEBS Lett.*, 9, 305—303.
59. Mitchell P., Moyle J. (1971) *J. Bioenerg.*, 2, 1—11.



60. Cantley L. C., Hammes G. G. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4900—4904.
61. Lambeth D. O., Lardy H. A. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 355—363.
62. Уэбб Л. (1966) Ингибиторы ферментов и метаболизма, «Мир», М.
63. Ebel R. E. (1974) *Fed. Proc. Abs.*, **33**, 1399.
64. Козлов И. А., Проханов О. А., Ягужинский Л. С. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 539—545.
65. Ягужинский Л. С. (1973) В сб. Структура и функция ферментов, вып. 2, стр. 106—132, МГУ, М.
66. Catterall W. A., Pedersen P. L. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7969—7976.
67. Tondre C., Hammes G. G. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **314**, 245—249.
68. Penefsky H. S. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 3579—3585.
69. Фрумкин А. Н., Гугешашили М. И., Богуславский Л. И. (1971) Докл. АН СССР, **198**, 1452—1457.
70. Cross R. L., Boyer P. D. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **51**, 59—66.
71. Boyer P. D., Cross R. L., Momsen W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2837—2839.
72. Mithell P., Moyle J. (1974) *Biochem. Soc. Spec. Suppl. (Great Britain)*, **4**, 91—112.
73. Green D. E. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **346**, 27—78.
74. Соколова Н. И., Носова В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, **206**, 129—133.
75. Means G. E., Feeny R. E. (1971) *Chemical modification of proteins*, Holden-Day, Inc., San Francisco.
76. Chan T. L., Greenawalt J. W., Pedersen P. L. (1970) *J. Cell. Biol.*, **45**, 291—305.
77. Boyer P. D. (1968) In *Biological Oxidation* (T. P. Singer, ed.), pp. 193—210, Wiley, N. Y.
78. Mitchell R. A., Hill R. D., Boyer P. D. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1793—1801.
79. Jones D. H., Boyer P. D. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 5767—5772.
80. Hinkle P. C., Penefsky H. S., Racker E. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1788—1801.
81. Lardy H. A., Connelly J. L., Johnson D. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1969—1975.
82. Lardy H. A., Connelly J. L., Johnson D. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1961—1968.
83. Robertson A. M., Holloway C. T., Knight I. G., Beechey N. B. (1968) *Biochem. J.*, **108**, 445—456.
84. Lee C. P., Ernster L. (1968) *Eur. J. Biochem.*, **3**, 391—400.
85. Slater E. C., Ter Welle H. F. (1969) In *Inhibitors-Tools in Cell Research* (Bucher Th. and Sies H., eds.), pp. 258—278, Springer Verlag, Berlin.
86. Slater E. S., Rosing J., Harris D. A., Van de Stadt R. J., Kemp A. (1974) In *Membrane proteins in transport and phosphorylation*, pp. 137—147, North-Holland Publ. Co. Amer. Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
87. Bertina R. M. (1974) In *Membrane proteins in transport and phosphorylation*, pp. 211—216, North-Holland Publ. Co., Amer. Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
88. Chang T., Penefsky H. S. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1090—1098.
89. Holland P. C., La Belle W. C., Lardy H. A. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4549—4553.
90. Минков И. Б., Горюна З. С. (1974) В сб. Митохондрии, стр. 167, «Наука», М.
91. Harris D. A., Rosing J., Van de Stadt R. J., Slater E. C. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **314**, 149—153.

Поступила в редакцию  
10.III.1975

## THE MECHANISM FOR THE FUNCTIONING OF MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE IN THE SYSTEM OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

KOZLOV I. A

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State  
University, Moscow*

The review is devoted to mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase. The composition and structural organization of the oligomycin-sensitive ATPase complex are discussed. Data are given showing that the hydrophobic proteins (HP) of the ATPase complex do not participate directly in the transport, coupled with the ATPase reaction, of the H<sup>+</sup> through the hydrophobic barrier of the mitochondrial membrane. It is suggested that the functional role of the HP is to create a hydrophobic cover for the soluble mitochondrial ATPase (factor F<sub>1</sub>), to facilitate the correct orientation of factor F<sub>1</sub> in the phospholipid membrane and to bring about the transport of H<sup>+</sup> between factor F<sub>1</sub> and the external site of the mitochondrial membrane. On the basis of data on an inhibitor analysis and on the

substrate specificity of ATPase, a mechanism is suggested for the coupling of the ATPase (ATP-synthesis) reaction and the transport of  $2H^+$  across the hydrophobic barrier of the mitochondrial membrane. In accordance with the scheme suggested, the catalytic site of ATPase is located in the hydrophobic region of the mitochondrial membrane right next to the protonophore canal; and the second non-catalytic binding site is in contact with the water phase inside the mitochondria. The translocation of ATP from the catalytic site of the enzyme to the non-catalytic site is caused by the electric field, i. e. it is the stage at which the transformation of the energy of the differences in the electrochemical potentials of the  $H^+$  ions into the energy of ATP, occurs. The stereochemical mechanism of the ATPase (ATP-synthesis) reaction in the catalytic site of the enzyme is discussed.

---