



УДК 577.153.35.92

**H<sup>+</sup>-АТФ-аза *MICROCOCCLUS LYSODEIKTICUS* В РАСТВОРЕ  
И НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ОКТАН/ВОДА****Богуславский Л. И., Волков А. Г., Карганов А. В.,  
Мишайковская Е. И., Козлов Н. А.**

*Институт электрохимии Академии наук СССР  
и Отдел биоэнергетики Межфакультетской лаборатории биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

В препарате растворимой АТФ-азы *M. lysodeikticus* (КФ 3.6.1.3) обнаружено аномально высокое содержание фосфатидилэтиламина. Изучалось поведение АТФ-азы (*M. lysodeikticus*) в растворе и на границе раздела фаз октан/вода. Определены параметры АТФ-азной реакции при различных значениях рН. Показано, что смешанный ангидрид АДФ и мезитиленкарбонической кислоты является эффективным ингибитором АТФ-азы *M. lysodeikticus* на границе раздела октан/вода и не оказывает заметного влияния на активность фермента в водном растворе. N-Циклогексил-N'-β-(4-метилморфолинил)этилкарбодимид ингибирует активность АТФ-азы в растворе, но не влияет на скорость АТФ-азной реакции фермента, адсорбированного на границе раздела фаз октан/вода. Обсуждается механизм АТФ-азной реакции, объясняющий различную доступность фермента для действия ингибиторов в растворе и на границе раздела фаз октан/вода.

В соответствии с теорией Митчела [1] синтез (или гидролиз) одной молекулы АТФ в системе окислительного фосфорилирования сопровождается переносом 2H<sup>+</sup> через сопрягающую мембрану. Сопряженный с реакцией гидролиза АТФ трансмембранный перенос протонов рассматривается Скулачевым [2] как частный случай транспорта ионов против электрохимического градиента. По аналогии с Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-АТФ-азой или Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азой Скулачев вводит понятие транспортной H<sup>+</sup>-АТФ-азы [2]. H<sup>+</sup>-АТФ-аза *M. lysodeikticus*, как и митохондриальная АТФ-аза, катализирует реакцию образования АТФ из АДФ и P<sub>i</sub>, используя в качестве источника энергии разность электрохимических потенциалов ионов водорода на сопрягающей мембране. Оба фермента имеют близкий аминокислотный состав, молекулярный вес и идентичный набор субъединиц [3—5]. Очищенная АТФ-аза *M. lysodeikticus* способна, как и митохондриальная АТФ-аза, переносить протоны из воды в липид при гидролизе АТФ на границе раздела фаз [6, 7]. Однако в свойствах митохондриальной АТФ-азы и фермента из *M. lysodeikticus* наблюдаются также некоторые различия. Так, фермент из *M. lysodeikticus* не проявляет заметной АТФ-азной активности в связанном с мембраной состоянии даже в присутствии разобщителей окислительного фосфорилирования [8, 9]. Эти ферменты различаются также по своей субстратной специфичности (предпочтительным субстратом АТФ-азы

Принятые сокращения: ЦМКД — N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолинил) этилкарбодимид; АДФ-СОМес — смешанный ангидрид АДФ и мезитиленкарбонической кислоты.

*M. lysodeikticus* является Са—АТР, а митохондриальной АТР-азы — Mg—АТР), по устойчивости к воздействию низкой температуры, высокой ионной силы [9, 10].

В наших предшествующих работах [7, 11, 12] исследовалась реакция митохондриальной АТР-азы с тремя модифицирующими агентами: N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолинил)этилкарбодимидом (ЦМКД), *n*-хлормеркурибензоатом и смешанным ангидридом АDP и мезитилепкарбоновой кислоты (ADP-COMes). Полученные нами результаты ингибиторного анализа, а также литературные данные по структуре и субстратной специфичности митохондриальной АТР-азы позволили нам сформулировать гипотетический механизм действия митохондриальной АТР-азы в системе окислительного фосфорилирования [11]. Предполагается, что каталитический центр митохондриальной АТР-азы обращен в гидрофобную фазу митохондриальной мембраны (или в фазу октана) и не доступен непосредственно воздействию гидрофильных соединений (АТР, АDP, ЦМКД). Согласно предложенному механизму, первая стадия АТР-азной реакции фермента, ассоциированного с митохондриальной мембраной или адсорбированного на границе раздела фаз октан/вода, заключается в связывании субстрата (Mg—АТР) в некаталитическом центре АТР-азы. Далее происходит транслокация субстрата из некаталитического центра в каталитический с последующим гидролизом Mg—АТР и обратным переносом продуктов реакции (Mg—АDP и  $P_i$ ) из каталитического центра в некаталитический. В рамках предложенной схемы ингибирующий эффект ADP-COMes и *n*-хлормеркурибензоата объясняется воздействием этих соединений на некаталитический центр АТР-азы или на механизм транслокации субстрата [11]. При отделении фермента от митохондриальной мембраны его каталитический центр становится доступным действию гидрофильного агента — ЦМКД. С другой стороны, Mg—АТР также получает непосредственный доступ в каталитический центр фермента, т. е. стадия транслокации субстрата становится негужной. Этим объясняется отсутствие ингибирующего эффекта ADP-COMes и *n*-хлормеркурибензоата на растворимый фермент.

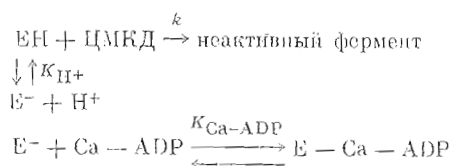
В настоящей работе мы использовали аналогичные подходы к изучению механизма действия АТР-азы *M. lysodeikticus* (КФ 3.6.1.3). Целью работы явилось исследование параметров АТР-азной реакции фермента из *M. lysodeikticus* в растворе и на границе раздела октан/вода, а также изучение доступности фермента действию специфических ингибиторов митохондриальной АТР-азы.

Все исследования проводились с препаратом АТР-азы *M. lysodeikticus*, выделенной по методике, предложенной нами ранее [13]. По данным электрофореза в полиакриламидном геле, препарат АТР-азы *M. lysodeikticus* не содержит заметных примесей посторонних белков [13]. Было обнаружено, что фосфолипиды в препарате АТР-азы составляют  $3,5 \pm 0,3\%$  по весу от содержания белка. При более детальном изучении фосфолипидного состава препарата АТР-азы нам удалось идентифицировать фосфатидилэтаноламин и полиглицерофосфатиды. Содержание этих фосфолипидов от общего их количества составляло соответственно  $58 \pm 6$  и  $42 \pm 5\%$ . Следует отметить неожиданно высокое содержание фосфатидилэтаноламина в препарате изучаемой АТР-азы. Так, по данным Макфарлайн, в мембране *M. lysodeikticus* в целом найдено лишь незначительное количество этого фосфолипида, в то время как фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин составляют основную массу фосфолипидов мембран [14]. Высокое содержание фосфатидилэтаноламина в препарате АТР-азы *M. lysodeikticus* может свидетельствовать о его особой роли в структурной организации АТР-азного комплекса. Не исключено, что, образуя прочный комплекс с растворимой АТР-азой *M. lysodeikticus*, фосфатидилэтаноламин увеличивает число положительных зарядов на поверхности фермента, что в свою очередь обеспечивает взаимодействие АТР-азы с бактериальной мембраной, содержащей преимущественно кислые фосфолипиды.

Мы изучили рН-зависимость  $K_m$  растворимой АТР-азы *M. lysodeikticus*. Как показали эксперименты,  $K_m$  не изменяется в интервале значений рН 6,5—9,5. Низкая активность фермента при кислых значениях рН не позволила нам определить  $K_m$  при рН < 6,5. Полученные результаты свидетельствуют об определенных различиях в структуре активного центра бактериальной и митохондриальной АТР-азы —  $K_m$  растворимой митохондриальной АТР-азы при рН 6,5 в 3 раза превышает соответствующую величину, полученную при рН 9,0 [15].

Оставался невыясненным вопрос о природе функциональных групп, участвующих в связывании Са—АТР в активном центре АТР-азы *M. lysodeikticus*. Это могла быть либо карбоксильная группа с рК более низким, чем у карбоксильной группы в активном центре митохондриальной АТР-азы, либо какой-то остаток аминокислоты (например, гистидина), способный за счет координационных связей вступать во взаимодействие с комплексом металл — АТР.

С целью выяснения возможности участия карбоксильной группы в активном центре АТР-азы *M. lysodeikticus* мы изучали ингибирующее действие ЦМКД на фермент (рис. 1). Представляется весьма вероятным, что наблюдаемая картина обусловлена модификацией водорастворимым производным карбодиазида карбоксильной группы, контролирующей активность АТР-азы. Возрастание скорости инактивации фермента с понижением рН отражает, по-видимому, увеличение эффективной концентрации недиссоциированной формы этой карбоксильной группы. Наклон экспериментальной кривой в координатах —  $\lg k_i = f(\text{pH})$ , равный единице (рис. 2), свидетельствует о том, что падение АТР-азной активности под воздействием этого реагента связано с модификацией одной карбоксильной группы фермента. Согласно полученным результатам (рис. 2), исследуемая карбоксильная группа имеет рК < 5,8. Если эта карбоксильная группа участвует в связывании нуклеотидов в активном центре АТР-азы *M. lysodeikticus*, можно ожидать, что скорость инактивации фермента под воздействием ЦМКД уменьшится в присутствии Са—АДР, конкурентного ингибитора АТР-азной реакции [13]. Это и наблюдается в действительности (рис. 3). Реакцию взаимодействия фермента (Е) с ЦМКД в присутствии Са—АДР можно изобразить следующим образом:



Предполагается, что лишь депротонированная карбоксильная группа фермента связывает Са—АДР. В случае митохондриальной АТР-азы участие именно депротонированной формы фермента в связывании магниевых комплексов нуклеотидов вытекает из характера зависимостей  $K_m$  и  $K_i$  для Mg—АДР от рН [15].

Достоверные различия в скоростях инактивации АТР-азы под воздействием ЦМКД в присутствии и в отсутствие Са—АДР (рис. 3) могли бы в принципе быть использованы для экспериментального определения  $K_{\text{H}^+}$ . В этом случае необходимо было бы из независимого эксперимента определить  $K_{\text{Ca-ADP}}$ . К сожалению, последнее оказывается невозможным из-за сложного характера ингибирования АТР-азы *M. lysodeikticus* посредством Са—АДР (см. далее). Таким образом, вопрос о точном значении рК карбоксильной группы в активном центре АТР-азы *M. lysodeikticus* остается в настоящий момент открытым. Интересно отметить, что в условиях полной диссоциации карбоксильной группы, участвующей в связывании субстрата в активном центре (рН 8,0), АТР-аза *M. lysodeikticus* и митохондриальная АТР-аза имеют близкие значения  $K_m$  [13, 15].

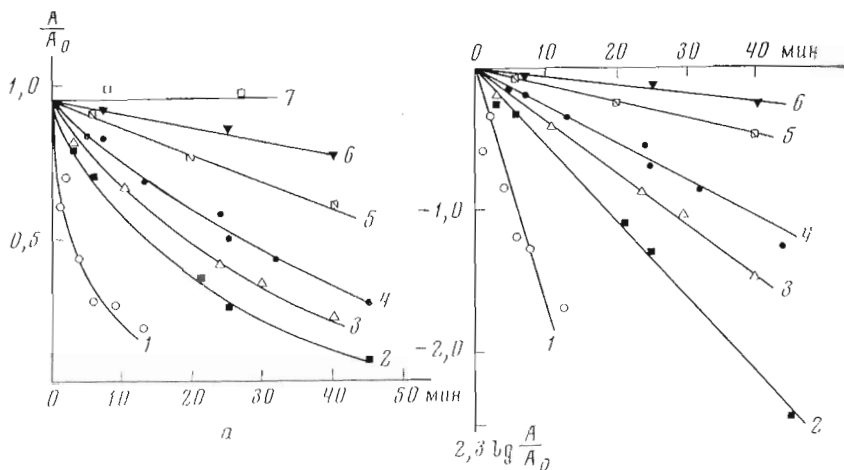


Рис. 1. а — зависимость активности фермента ( $A$ ) от времени инкубации с 1 мМ ЦМКД при рН 5,8 (1); 6,1 (2); 6,4 (3); 6,6 (4); 7,0 (5); 7,6 (6); 8,0 (7). б — та же зависимость в полулогарифмических координатах

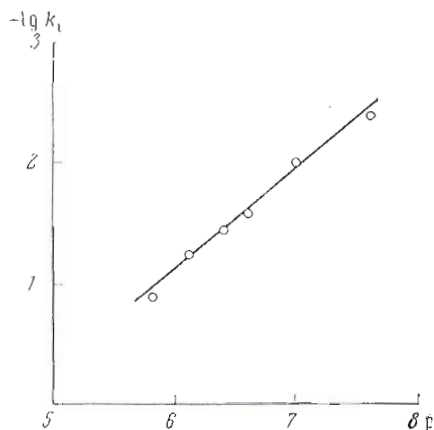


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость от рН отрицательного логарифма псевдомомолекулярной константы скорости инактивации АТР-азы *M. lysodeikticus* под воздействием ЦМКД

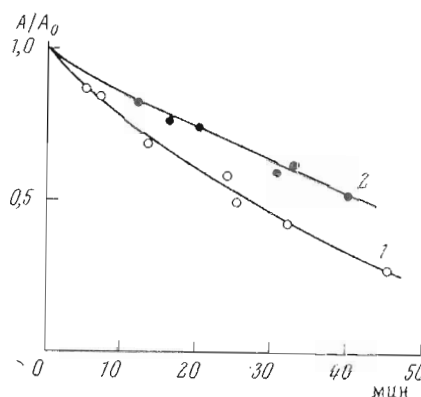


Рис. 3

Рис. 3. Инактивация АТР-азы *M. lysodeikticus* при инкубации с 1 мМ ЦМКД (рН 6,6) в отсутствие (1) и в присутствии (2) Са-АДР (3 мМ)

Ферментативный гидролиз АТР протекает, по-видимому, по механизму кислотно-основного катализа. В этом случае механизм реакции должен включать в себя стадию протонирования (депротонирования) некоторых функциональных групп в активном центре фермента, а характер зависимости скорости АТР-азной реакции от рН должен определяться значением рК этих групп. Скорость АТР-азной реакции фермента, сопряженной с переносом протонов через сопрягающую мембрану, может также контролироваться уровнем протонирования функциональных групп, осуществляющих транслокацию протонов. В соответствии с полученными ранее результатами [6] изменение максимального скачка потенциала ( $\Delta\phi_{\text{макс}}$ ), генерируемого АТР-азой на границе раздела октан/вода, при гидролизе АТР в условиях насыщающей концентрации субстрата определяется сопряженным с АТР-азной реакцией переносом протонов из воды в октан.

Как видно из данных рис. 4, максимальная эффективность АТР-азной реакции в растворе и на границе раздела октан/вода достигается в интер-

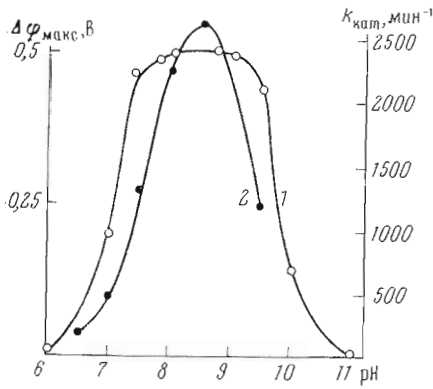


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость от pH максимального скачка потенциала  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$ , генерируемого АТР-азой *M. lysodeikticus* на границе раздела октан/вода (1), и  $k_{\text{кат}}$  АТР-азной реакции растворимого фермента (2)

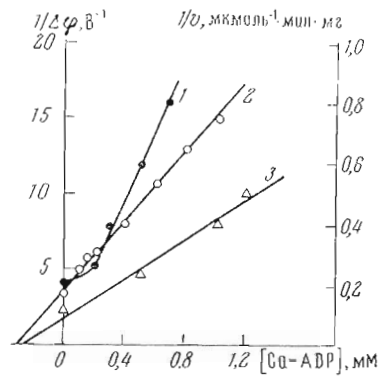


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость обратной скорости АТР-азной реакции (1, 2) и обратной величины скачка потенциала ( $\Delta\varphi$ ), генерируемого АТР-азой на границе раздела октан/вода (3), от концентрации Са-АДР. Кривые 2 и 3 получены в присутствии 1 мМ 2,4-динитрофенола; кривая 1 — без 2,4-динитрофенола

вале pH 8,0—9,0. Из полученных результатов следует, что в активном центре АТР-азы *M. lysodeikticus* имеется протоноакцепторная группа с рК 7,0—8,0. При переводе фермента из раствора на границу раздела октан/вода, возможно, происходит небольшой сдвиг рК этой группы в область кислых значений pH (рис. 4). С другой стороны, не исключено, что скорость АТР-азной реакции на границе раздела октан/вода определяется значением рК группы, принимающей участие в сопряженном с гидролизом АТР переносе протонов из воды в октан. Интересно в связи с этим отметить, что зависимость  $k_{\text{кат}}$  растворимой митохондриальной АТР-азы от pH имеет совершенно иной характер, нежели pH-зависимость величины  $\Delta\varphi_{\text{макс}}$ , генерируемого ферментом на границе раздела октан/вода [12, 15].

В соответствии с данными рис. 4 (кривая 2) скорость реакции растворимой АТР-азы *M. lysodeikticus* уменьшается в 2 раза при изменении pH от 8,5 до 9,5. Падение  $k_{\text{кат}}$  в щелочной области значений pH отражает, по-видимому, понижение концентрации протонированной формы протонодонорной группы в активном центре фермента. Одним из вероятных кандидатов на участие в кислотно-основном катализе АТР-азной реакции фермента в растворе следует признать тирозин. Участие тирозина в активном центре митохондриальной АТР-азы и АТР-азы *Micrococcus denitrificans* подтверждается данными по ингибированию АТР-азной активности соединениями, модифицирующими один-два остатка тирозина на молекулу фермента [17, 18]. Не исключено, конечно, что помимо тирозина в активном центре АТР-азы *M. lysodeikticus* присутствует другой аминокислотный остаток с рК 9,0—10,0, контролирующей активность фермента в водном растворе.

Интересно сопоставить кинетические параметры митохондриальной АТР-азы и фермента из *M. lysodeikticus*.  $k_{\text{кат}}$  АТР-азы *M. lysodeikticus* составляет  $600 \text{ мин}^{-1}$  при  $25^\circ$  в pH-оптимуме фермента [6], т. е. в 35 раз меньше  $k_{\text{кат}}$  растворимой митохондриальной АТР-азы [45]. Бактериальный и митохондриальный ферменты имеют близкие значения  $K_{\text{м(кат)}}$  как в растворе, так и на границе раздела октан/вода (0,3—0,6 мМ при pH 8,0) [6, 7, 13, 15]. В то же время максимальный скачок потенциала, наблюдавшийся в опытах с митохондриальной АТР-азой на границе раздела октан/вода (1,4 В), в 3 раза превышает таковой в опытах с АТР-азой *M. lysodeikticus*.

Митохондриальная АТФ-аза и фермент из *M. lysodeikticus* ингибируются комплексом двухвалентного металла с АДФ, причем ингибирование осуществляется по конкурентному механизму [13, 19]. Однако если в случае митохондриальной АТФ-азы в каталитическом центре связывается одна молекула АДФ ( $K_i = (5 \pm 2) \cdot 10^{-4}$  М) [19], то бактериальный фермент связывает конкурентно с субстратом более одной (по-видимому, две) молекулы АДФ [13]. В соответствии с предложенной нами моделью строения каталитического центра митохондриальной АТФ-азы [11] в каталитическом центре фермента имеются две площадки, ответственные за связывание дифосфоаденозинового остатка ( $-O-ADP$ ) в аксиальном и экваториальном положении пентаковалентного промежуточного продукта АТФ-азной реакции. Различие в эффективности двух площадок в каталитическом центре АТФ-азы приводит к тому, что в применяемом нами интервале концентраций ( $10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$  М) в активном центре связывается только одна молекула ингибитора, на что указывает линейный характер зависимости  $1/v$  от  $[Mg-ADP]$  [19]. Способность АТФ-азы *M. lysodeikticus* адсорбировать одновременно в каталитическом центре две молекулы  $Ca-ADP$  (рис. 5, I) может свидетельствовать о том, что в отличие от митохондриального фермента в АТФ-азе *M. lysodeikticus* обе площадки активного центра связывают  $-O-ADP$  с близкой эффективностью. 2,4-Динитрофенол конкурирует с  $Mg-ADP$  при связывании последнего в каталитическом центре митохондриальной АТФ-азы и снимает эффект торможения  $Mg-ADP$  АТФ-азной реакции. Результаты, полученные в настоящей работе (рис. 5, I, 2), свидетельствуют о том, что 2,4-динитрофенол препятствует связыванию одной из двух молекул АДФ в активном центре АТФ-азы *M. lysodeikticus*, и позволяют оценить сродство к  $Ca-ADP$  одной из двух площадок в активном центре АТФ-азы *M. lysodeikticus*. Соответствующий расчет  $K_i$  в присутствии 2,4-динитрофенола дает величину, равную  $(5 \pm 3) \cdot 10^{-5}$  М.  $K_i$  для  $Mg-ADP$  у растворимой митохондриальной АТФ-азы составляет  $(5 \pm 2) \cdot 10^{-4}$  М [19], т. е. связывание  $Mg-ADP$ , как уже отмечалось, осуществляется с меньшей эффективностью.

Из полученных результатов также видно, что АТФ-аза *M. lysodeikticus* ингибируется с равной эффективностью кальциевым комплексом АДФ в растворе и на границе октан/вода (рис. 5, 2 и 3). У митохондриальной АТФ-азы ингибирование  $Mg-ADP$  на границе раздела октан/вода было в 30 раз эффективнее, чем в растворе [12]. В соответствии с предложенной нами гипотезой высокая эффективность ингибирования митохондриальной АТФ-азы на границе раздела октан/вода  $Mg-ADP$  определяется высоким сродством к  $Mg-ADP$  некаталитического центра связывания адениловых нуклеотидов [11, 12]. Таким образом, создается впечатление, что в отличие от митохондриальной АТФ-азы у фермента из *M. lysodeikticus* каталитический и некаталитический центры имеют близкое сродство к АДФ.

Адсорбированная на границе раздела октан/вода АТФ-аза *M. lysodeikticus*, как и митохондриальный фермент, устойчива к действию ЦМКД. Инкубация фермента в присутствии 1 мМ ЦМКД в системе октан/вода (1 ч, рН 6,0) не оказывала никакого влияния на его способность генерировать скачок потенциала на границе раздела фаз. Как уже отмечалось, в тех же условиях в растворе АТФ-аза *M. lysodeikticus* полностью инактивируется (см. рис. 1, a). Как и в случае с митохондриальной АТФ-азой, *n*-хлормеркурибензоат и АДФ-СОМес не оказывают никакого влияния на активность АТФ-азы *M. lysodeikticus* в растворе. Так, не было заметно изменения АТФ-азной активности фермента в растворе при его инкубации с 0,05 мМ *n*-хлормеркурибензоатом (при рН 7,0) в течение 1 часа и 0,06 мМ АДФ-СОМес в течение 10 мин. Однако в отличие от митохондриального фермента АТФ-аза *M. lysodeikticus* не чувствительна к действию *n*-хлормеркурибензоата в ее способности генерировать сопряженный с реакцией гидролиза АТФ скачок потенциала на границе раздела октан/вода (0,05 мМ *n*-хлормеркурибензоат, 15 мин).

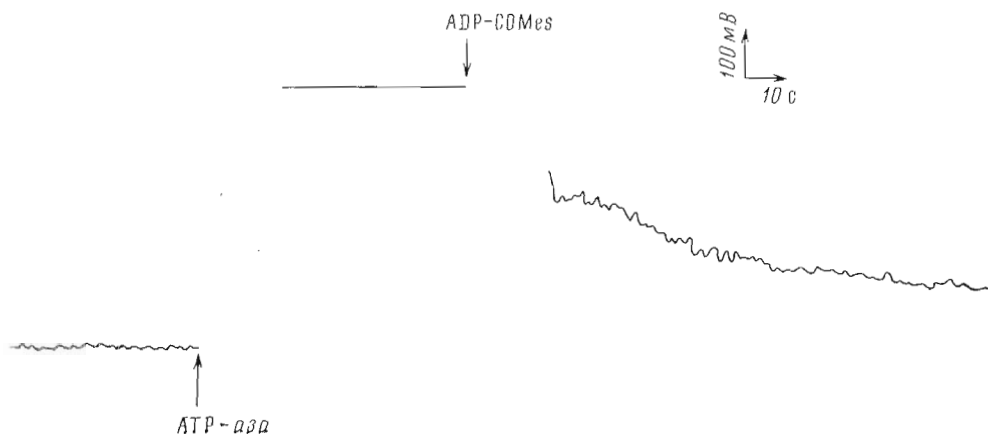


Рис. 6. Ингибирующий эффект ADP-COMes на генерацию скачка потенциала  $\Delta\phi$  АТР-азой *M. lysodeikticus* на границе раздела октан/вода

Другой ингибитор митохондриальной АТР-азы на границе раздела октан/вода, ADP-COMes, с высокой эффективностью подавлял способность АТР-азы *M. lysodeikticus* генерировать скачок потенциала на границе раздела фаз (см. рис. 6). К двухфазной системе, содержащей Са—АТР, добавляли 5 мкг/мл АТР-азы *M. lysodeikticus*, а затем (через 50 с) — 0,06 мМ ADP-COMes. Видно резкое снижение  $\Delta\phi$  в ответ на добавку ингибитора. В отсутствие любого из компонентов АТР-азной реакции добавление АТР-азы или ADP-COMes к системе не приводило к сдвигу исходного скачка потенциала на границе раздела октан/вода.

Судя по результатам исследований по сравнительному изучению свойств АТР-азы *M. lysodeikticus* и митохондриальной АТР-азы, специфичность и эффективность каталитического и некаталитического центров в этих ферментах различна. Не исключено, что это обусловлено участием разных функциональных групп, осуществляющих катализ в митохондриальной АТР-азе и ферменте из *M. lysodeikticus*. Подобная точка зрения подтверждается данными по различному характеру рН-зависимости  $k_{кат}$  у митохондриального и бактериального фермента, различной чувствительностью к действию *n*-хлормеркурибензоата на границе раздела фаз и, наконец, различающимися значениями большинства параметров АТР-азной реакции. С другой стороны, очевидно, что по меньшей мере некоторые функциональные группы в митохондриальной и бактериальной АТР-азе идентичны или близки по своим свойствам. Это относится прежде всего к карбоксильной группе в каталитическом центре АТР-аз, ответственной за связывание субстрата АТР-азной реакции. Мало различаются по своему поведению неидентифицированные в настоящий момент нуклеофильные группы в АТР-азах, реагирующие с ADP-COMes.

Существенным для понимания механизма функционирования митохондриальной и бактериальной АТР-азы является тот факт, что оба фермента меняют свою чувствительность к действию ингибиторов при переводе их из раствора на границу раздела фаз. Этот результат, позволивший нам ранее сформулировать гипотетический механизм действия митохондриальной АТР-азы в системе окислительного фосфорилирования [11], может рассматриваться как указание на то, что основной принцип работы митохондриальной АТР-азы реализуется бактериальной АТР-азой *M. lysodeikticus*.

#### Экспериментальная часть

Растворимую АТР-азу *M. lysodeikticus* выделяли по методу, описанному ранее [13], без стадии очистки на DEAE-целлюлозе. Фермент хранили в 5 мМ трис-НСI-буфере (рН 8,5) при  $-10^\circ$ . В опытах по ингибированию

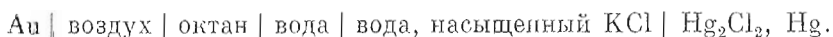
АТР-азы ЦМКД проводили диализ ферментативного препарата против 0,05 М  $\beta$ -(N-морфолинил)-этансульфоната с соответствующим значением рН (рис. 4).

Начальную скорость АТР-азной реакции, соответствующую активности фермента ( $A$ ), измеряли по методу, подробно описанному в работе [13]. При изучении зависимости  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  от рН начальную скорость АТР-азной реакции определяли по накоплению в среде неорганического фосфата методом Беремблума и Чейга в модификации Вайл-Малхерба [22].  $K_m$  и  $k_{\text{кат}}$  определяли при каждом значении рН в координатах Лайнуивера — Берка. Среда для измерения скорости АТР-азной реакции содержала 5 мМ трис-НСI-буфер (рН 6,5—9,5), 1—5 мМ Са—АТР, 10—200 мкг фермента в общем объеме 0,5 мл. Во всем интервале применяемых концентраций субстрата поддерживали постоянное отношение  $[\text{Са—АТР}]/[\text{Са}_{\text{своб}}^{2+}] = 1,5$ . Реакцию проводили в течение 8—10 мин при 30° и останавливали добавкой трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%).

При изучении ингибирующего эффекта ЦМКД на активность АТР-азы проводили преинкубацию фермента (1,3 мг/мл) с 1 мМ ЦМКД при 20° в течение 2—45 мин в среде, содержащей 0,05 М  $\beta$ -(N-морфолинил)-этансульфонат; рН 5,8; 6,1; 6,4; 6,6; 7,0; 7,6; 8,0. Затем отбирали небольшие аликваты инкубационной смеси, содержащие 20—100 мкг фермента, и немедленно добавляли их в кювету с заранее приготовленной стандартной реакционной смесью для измерения АТР-азной активности: 5 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,9), 3 мМ Са—АТР, 1,5 мМ СаCl<sub>2</sub>, в общем объеме 5 мл при температуре 30°. Активность фермента, не обработанного ЦМКД,  $A_0$ , составляла 5,2 мкмоль Са—АТР/мг белка в 1 мин. Псевдомомолекулярную константу скорости инактивации АТР-азы под действием ЦМКД определяли из графика, приведенного на рис. 1, б, как тангенс угла наклона прямой, представляющей зависимость  $2,3 \lg A/A_0$  от времени, где  $A_0$  — исходная активность фермента, а  $A$  — активность фермента, предобработанного ЦМКД в течение определенного времени.

При изучении ингибирующего эффекта АDP на АТР-азную реакцию в растворе (рис. 5, 1, 2) реакционная смесь содержала 5 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,9), 3 мМ Са—АТР, 1,5 мМ СаCl<sub>2</sub>, 0—1 мМ Са—АDP, 4—10 мкг/мл АТР-азы. В эксперименте, представленном на рис. 5, 2, смесь была дополнена 1 мМ 2,4-динитрофенолом.

Изменение скачка потенциала  $\Delta\phi$  на границе раздела октан/вода, сопряженное с гидролизом АТР АТР-азой *M. lysodeikticus*, измеряли методом вибрирующего конденсатора в цепи:



Метод подробно описан в работах [7, 6].

В экспериментах по измерению  $\Delta\phi_{\text{макс}}$  реакционная смесь содержала 0,02 М трис-НСI-буфер (рН 6—11), 1 мМ 2,4-динитрофенол, 7 мМ Са—АТР, 10 мкг/мл АТР-азы. Концентрация субстрата (7 мМ Са—АТР) обеспечивала максимальную величину  $\Delta\phi$  при каждом данном значении рН. В экспериментах по изучению ингибирующего эффекта АDP на генерацию  $\Delta\phi$  АТР-азой *M. lysodeikticus* (рис. 5, 3) реакционная среда содержала 0,02 М трис-НСI-буфер (рН 7,9), 1 мМ 2,4-динитрофенол, 3 мМ Са—АТР, 0—1,2 мМ Са—АDP, 4—10 мкг/мл АТР-азы.

Экстракцию липидов проводили по Фолчу [23]. Для фракционирования фосфолипидов использовался модифицированный метод проточной горизонтальной тонкослойной хроматографии [24]. Идентификацию отдельных фосфолипидов осуществляли с помощью свидетелей и цветных тестов [25]. Количественное содержание фосфолипидов определяли по фосфору [26].

Авторы благодарны В. П. Скулачеву за обсуждение результатов и общую помощь в работе, Д. Н. Островскому за поддержку при выполнении



работы, З. А. Шабаровой и Н. И. Соколовой за любезно предоставленный ими смешанный ангидрид ADP и мезитиленакарбоновой кислоты и обсуждение результатов, полученных в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Bodmin, Glynn Research.
2. Скулачев В. П. (1974) Успехи соврем. биологии, **77**, 125—154.
3. Andreu J., Albendea J., Muñoz E. (1973) Eur. J. Biochem., **37**, 505—515.
4. Catterall W., Pedersen P. (1971) J. Biol. Chem., **246**, 4987—4994.
5. Knowles A., Penefsky H. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 6624—6630.
6. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Милейковская Е. И. (1975) Докл. АН СССР, **222**, 726—729.
7. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1974) Докл. АН СССР, **218**, 963—966.
8. Ishikawa S. (1970) J. Biochem., **67**, 297—311.
9. Muñoz E., Salton M., Ng M., Schor M. (1969) Eur. J. Biochem., **7**, 490—501.
10. Senior A. (1973) Biochim. et biophys. acta, **301**, 249—277.
11. Козлов И. А. (1975) Биооргани. химия, **1**, 1545—1568.
12. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1975) Биооргани. химия, **1**, 1369—1377.
13. Милейковская Е. И., Козлов И. А., Тихонова Г. В. (1975) Биохимия, **40**, 993—998.
14. MacFarlane M. (1961) Biochem. J., **80**, 45 P.
15. Метельский С. Т., Козлов И. А. (1974) Докл. АН СССР, **219**, 1010—1013.
16. Boguslavsky L. I., Kondrashin A. A., Kozlov I. A., Metelsky S. T., Skulachev V. P., Volkov A. G. (1975) FEBS Lett., **50**, 223—226.
17. Ferguson S., John P., Lloyd W., Radda G., Whatley F. (1974) Biochim. et biophys. acta, **357**, 437—461.
18. Ferguson S., Lloyd W., Radda G. (1974) FEBS Lett., **38**, 234—236.
19. Козлов И. А., Конопенко В. А. (1975) Биооргани. химия, **1**, 489—493.
20. Акименко В. К., Минков И. Б., Вишegradов А. Д. (1971) Биохимия, **36**, 655—658.
21. Козлов И. А., Проханов О. А., Ягузинский Л. С. (1975) Биооргани. химия, **1**, 539—545.
22. Weil-Malherbe H., Green R. H. (1951) Biochem. J., **49**, 286—292.
23. Folch I., Less M., Stanley H. H. (1957) J. Biol. Chem., **226**, 497—504.
24. Каргаполов А. В., Карцова С. В., Семелова Э. Г., Микельсаар Х. Н. (1975) Научн. докл. высшей школы. Биол. науки, № 2, 50—55.
25. Новицкая Г. В. (1972) Методологическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов, с. 29—31, «Наука», М.
26. Baginski E. S., Foa P. P., Zak B. (1967) Clin. Chem., **13**, 326—332.

Поступила в редакцию

18.IX.1975

После переработки

4.I.1976

#### H<sup>+</sup>-ATPase FROM *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* IN AQUEOUS SOLUTION AND AT THE OCTANE/WATER INTERFACE

BOGUSLAVSKY L. I., VOLKOV A. G., KARGAPOLOV A. V.,  
MILEYKOVSKAYA E. I., KOZLOV I. A.

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

An analysis of the phospholipid composition of soluble ATPase from *M. lysodeikticus* showed the abnormally high content of phosphatidylethanolamine in the preparation of the enzyme. The behaviour of the ATPase from *M. lysodeikticus* in solution and at the octane/water interface was studied. The parameters of the ATPase reaction at different pH values were determined. It was shown that a mixed anhydride of ADP and mesitylene carboxylic acid is an effective inhibitor of ATPase from *M. lysodeikticus* at the octane/water interface and has no noticeable effect on the activity of the enzyme in aqueous solution. *N*-cyclohexyl-*N'*-β<sup>+</sup>-(4-methylmorpholine) ethylcarbodiimide inhibits the ATPase activity in solution, but has no effect on the ATPase adsorbed at the octane/water interface. A mechanism is proposed for the ATPase reaction which explains the different accessibility of the enzyme to the action of inhibitors in solution and at the octane/water interface.