



УДК 577.23

ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ПЕРЕНОС ПРОТОНОВ ИЗ ВОДЫ  
В ОКТАН, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ БАКТЕРИОРОДОПСИНОМ*Богуславский Л. Ш., Бойцов В. Г., Волков А. Г.,  
Козлов И. А., Метельский С. Т.**Институт электрохимии Академии наук СССР,  
Межфакультетская лаборатория биоорганической химии МГУ*

Предпринято исследование бактериородопсиновых бляшек из мембран *Halo-bacterium halobium* на границе раздела октан/вода. Показано, что в присутствии жирорастворимого акцептора протонов 2,4-динитрофенола освещение белым светом бактериородопсиновых бляшек, адсорбированных на границе раздела фаз, сопровождается дополнительным скачком потенциала ( $\Delta\varphi$ ) на межфазной границе. Величина  $\Delta\varphi$  зависела от интенсивности и длины волны падающего света, а также от рН и концентрации 2,4-динитрофенола. Показано, что додецилсульфат натрия, додецилфосфат натрия, бромистый тетрагептиламмоний и тетрафенилборат натрия не влияют на способность бактериородопсиновых бляшек к фотоиндуцированному переносу протонов через границу раздела октан/вода. Бромистый цетилтриметиламмоний (цетавлон), добавленный до бактериородопсина, предотвращал фотоперенос при очень низких концентрациях детергента ( $10^{-7}$  М). Добавление такого же количества цетавлона после бактериородопсиновых бляшек не влияло на величину наблюдаемого фотоэффекта.  $\text{La}^{3+}$  ингибировал эффект, если добавлялся до или после бляшек.

В соответствии с теорией Митчела энергия, необходимая для синтеза АТФ в системах фото- или окислительного фосфорилирования, заключена в виде разности электрохимических потенциалов иона водорода ( $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ ) на сопрягающих мембранах [1—3]. Можно выделить две независимые ферментативные системы, результатом действия которых является образование АТФ на сопрягающих мембранах. Функция первой ферментативной системы заключается в генерации  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  на мембране. Подобной цели служат, например, дыхательная цепь митохондрий и аэробных бактерий, фотосистемы I и II хлоропластов, редокс-цепь фотосинтезирующих бактерий (см. обзор [3]). Вторая ферментативная система, обратимая АТФ-аза, использует энергию  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  для синтеза АТФ и осуществляет собственно катализ АТФ-синтезной реакции [3],  $\text{H}^+$ -АТФ-азы митохондрий и некоторых бактерий способны в свою очередь осуществлять сопряженный с реакцией гидролиза АТФ перенос протонов через мембрану и генерировать при этом  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ . Оба типа молекулярных электрических генераторов  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  на сопрягающих мембранах (редокс-цепь и  $\text{H}^+$ -АТФ-аза) представляют собой полибелковые гетерогенные системы с высоким молекулярным весом, что и определяет сложность изучения механизма функционирования этих ферментных систем. Значительно более простой по своей структуре (и поэтому более перспективный с точки зрения исследования механизма функционирования) тип генератора  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  был открыт недавно Остерхельдом и

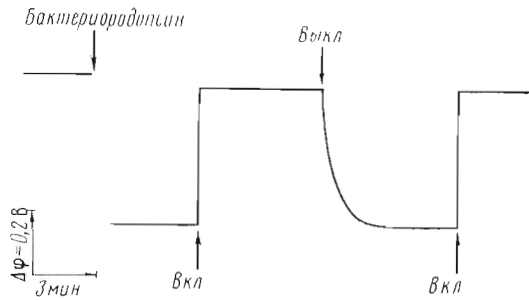


Рис. 1. Фотоиндуцированный скачок потенциала на границе раздела октан/вода при облучении светом бактериородопсиновых бляшек

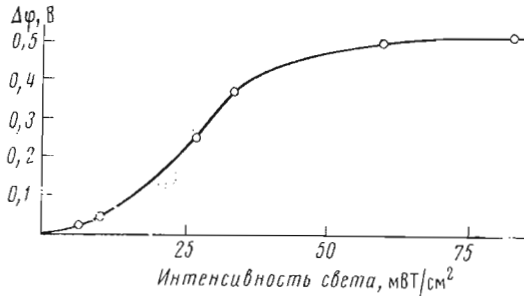


Рис. 2. Зависимость  $\Delta\phi$ , генерируемого бактериородопсиновыми бляшками на границе раздела октан/вода, от интенсивности падающего света

Стокениусом [4] в мембранах галофильных бактерий *Halobacterium halobium*. Обнаруженный этими авторами белок (названный бактериородопсином из-за своего структурного сходства с животным родопсином) переносит протоны через мембрану *H. halobium* в ответ на освещение, в результате чего на мембране генерируется  $\Delta\phi_{H^+}$ . Бактериородопсин состоит из одной-единственной полипептидной цепочки ( $M$  20 000), связанной ковалентно с ретиналем, и образует в мембране *H. halobium* прочный комплекс с фосфолипидами. Этот белково-липидный комплекс получил название «бактериородопсиновые бляшки» [5].

В настоящей работе мы исследовали поведение бактериородопсиновых бляшек на границе раздела октан/вода, которая применялась нами ранее в качестве модельной системы для исследования зарядтранслоцирующей функции мембранных систем и фотосинтетических пигментов [6—14]. В случае бактериородопсиновых бляшек на свету в присутствии 2,4-динитрофенола наблюдался транспорт положительных зарядов из воды в октан, который был обусловлен, по нашему мнению, фотоиндуцированным переносом протонов через границу раздела фаз двух несмешивающихся жидкостей [7]. Возникающий в результате переноса протонов скачок потенциала ( $\Delta\phi$ ) на границе раздела фаз октан/вода регистрировался методом вибрирующего электрода, причем величина эффекта зависела от концентрации 2,4-динитрофенола. В настоящей работе мы продолжили изучение поведения бактериородопсиновых бляшек на границе раздела фаз октан/вода.

Добавление бляшек к системе в темноте, приводит к сдвигу  $\Delta\phi$  в отрицательную сторону на 0,6 В (рис. 1). Это изменение  $\Delta\phi$  указывает, по-видимому, на прилипание бактериородопсиновых бляшек к границе раздела фаз, причем этот процесс происходит быстрее чем за 20 с. В дальнейшем величина  $\Delta\phi$  не изменяется в течение длительного промежутка времени

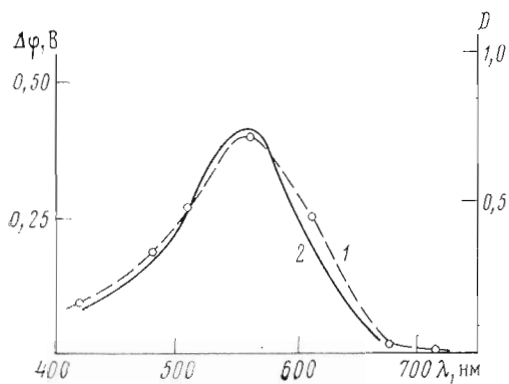


Рис. 3

Рис. 3. Спектр поглощения бактериородопсина (2) и его спектр действия в ответ на облучение светом границы раздела октан/вода (1). Спектр поглощения бактериородопсиновых бляшек в воде взят из работы [4]. Мощность падающего света  $33 \text{ мВт/см}^2$

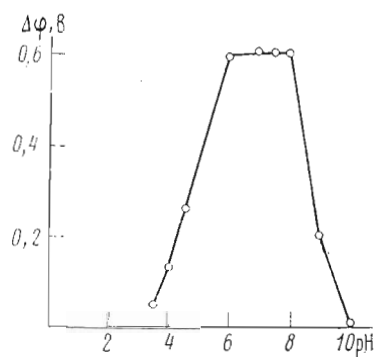


Рис. 4

Рис. 4. Скачок потенциала  $\Delta\phi$  на границе октан/вода, генерируемый бактериородопсином при облучении видимым светом, как функция рН среды. Бактериородопсиновые бляшки добавляли непосредственно перед измерением

(в темноте). Включение света вызывает быстрое заряджение октановой фазы, при этом  $\Delta\phi$  сдвигается в положительную сторону на 0,5 В. Новый уровень  $\Delta\phi$  поддерживается постоянным в течение всего времени освещения (в некоторых опытах больше 1 ч). Выключение света приводит к полному обращению эффекта, однако рассеивание потенциала происходит с меньшей скоростью, чем его возникновение, и время возвращения  $\Delta\phi$  на исходный уровень занимает 2—3 мин.

Столь медленное исчезновение фотоиндуцированного потенциала характерно только для бактериородопсиновых бляшек, поскольку наблюдаемые нами в работе [10] фотоответы в присутствии хлорофилла исчезали после выключения света быстрее чем за 1 с. Циклическое изменение  $\Delta\phi$  на межфазной границе, связанное с включением и выключением в системе источника света, может быть количественно воспроизведено в одном опыте не менее 10 раз. Как и в случае с митохондриальной АТР-азой [7, 8], величина наблюдаемых эффектов  $\Delta\phi$  не зависит от буферной емкости водной фазы в пределах 5—100 мМ трис-НСI. Это позволяет исключить из рассмотрения эффекты закисления приграничной фазы и связать наблюдаемые эффекты непосредственно с процессом переноса протонов из воды в октан.

Величина эффекта фотоиндуцированного переноса протонов из воды в октан зависела от мощности падающего света (рис. 2). В условиях эксперимента максимальный скачок потенциала  $\Delta\phi$  достигался при мощности падающего света  $70 \text{ мВт/см}^2$ .

Наличие у бактериородопсиновых бляшек хромофорных групп (ретиная) и специфического фосфолипидного окружения определяет характерный спектр поглощения этим белком видимого света (рис. 3, 1). В соответствии с полученными нами результатами спектр поглощения бактериородопсина хорошо согласуется со спектром действия, определенным из зависимости  $\Delta\phi$  от длины волны падающего света (рис. 3).

Как известно, облучение суспензии бактериородопсиновых бляшек видимым светом сопровождается изменением рН среды. Весьма вероятно, что процесс этот имеет непосредственное отношение к механизму фотоиндуцированного переноса протонов бактериородопсином через фосфолипидную мембрану. Сам механизм транслокации протонов, как и химическая природа групп, осуществляющих эту транслокацию, остается до

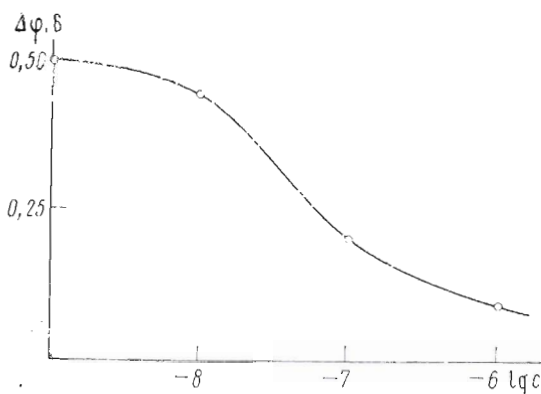


Рис. 5

Рис. 5. Скачок потенциала, генерируемый бактериородопсином при облучении светом на границе раздела октан/вода, как функция концентрации цетавлона ( $c$ ), М

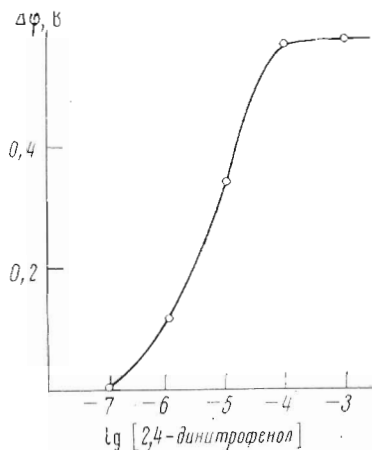


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость вольта-потенциала, измеренного в цепи (I) от концентрации акцептора протонов — 2,4-динитрофенола

сих пор неизвестным. Полезную информацию об  $H^+$ -транслоцирующей функции бактериородопсина могут содержать данные по зависимости эффективности переноса протонов через мембрану от рН. К сожалению, использование для этой цели реконструированных систем «бактериородопсин + плоские фосфолипидные мембраны» не дает желаемых результатов. Стабильность искусственных фосфолипидных мембран резко падает с изменением рН. Подобного недостатка лишена система октан/вода. В соответствии с полученными результатами (рис. 4) эффективность переноса протонов из воды в октан при участии бактериородопсина не изменяется в интервале рН 6,0—8,0. Падение  $\Delta\varphi$  при щелочных значениях рН отражает, по-видимому, изменение степени протонирования группы, участвующей в процессе переноса протонов из воды в октан.

При изучении поведения растворимой митохондриальной АТР-азы на границе раздела октан/вода было показано, что величина  $\Delta\varphi$ , сопряженная с гидролизом АТР, зависит от структуры двойного электрического слоя на границе раздела фаз [6]. Цетавлон в концентрации  $10^{-7}$  М эффективно предотвращал возникновение скачка потенциала, сопряженного с гидролизом АТР. Необходимым условием ингибирующего действия цетавлона было добавление этого детергента в систему до митохондриальной АТР-азы. Зависимость эффекта от порядка добавления реагентов служит доказательством того, что молекулы фермента не обмениваются между раствором и границей раздела фаз в пределах времени опыта.

Близкие по характеру результаты были получены нами при изучении ингибирующего действия цетавлона на фотоиндуцированный перенос протонов из воды в октан при облучении светом бактериородопсина. Цетавлон, добавленный в концентрации  $10^{-7}$  М в измерительную ячейку до бактериородопсиновых бляшек, приводит к снижению измеряемой величины  $\Delta\varphi$  приблизительно в 3 раза (рис. 5).

Как и в случае с митохондриальной АТР-азой [6], поверхностно-активные соединения других классов (додецилсульфат натрия, бромистый тетрагептиламмоний и тетрафенилборат натрия) в концентрации  $10^{-5}$  М не оказывали влияния на эффективность переноса протонов из воды в октан при облучении светом бактериородопсиновых бляшек. Все использованные в настоящей работе поверхностно-активные соединения, добав-

ленные в систему до бактериородопсиновых бляшек, приводили к изменению скачка потенциала на границе раздела фаз октан/вода. Это изменение  $\Delta\phi$  вызвано, по-видимому, адсорбцией поверхностно-активных веществ на межфазной границе. Однако ни одно из используемых веществ не влияло на величину скачка потенциала  $\Delta\phi$ , вызванного адсорбцией бактериородопсиновых бляшек на границе раздела фаз октан/вода. В связи с этим ингибирующий эффект цетавлона можно объяснить не только изменением поверхностной концентрации бактериородопсиновых бляшек, но и изменением свойств самой поверхности раздела под влиянием этого детергента.

Максимальное значение  $\Delta\phi$ , генерируемого бактериородопсином на границе раздела фаз, достигается при концентрации 2,4-динитрофенола выше  $10^{-4}\text{M}$  (рис. 6). Близкий характер зависимости скачка потенциала, генерируемого на границе раздела фаз, от концентрации 2,4-динитрофенола был получен для АТФ-азы *Micrococcus lysodeikticus* [8] и митохондриальной АТР-азы [7]. Как и в случае растворимой митохондриальной АТР-азы, эффективными акцепторами протонов при работе бактериородопсина кроме 2,4-динитрофенола оказались виратол, анизидин [13] и пентахлорфенол.

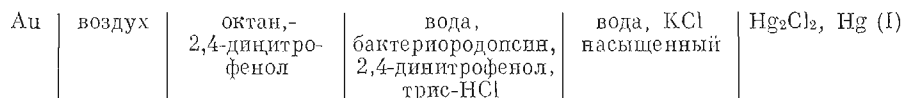
Представляло интерес исследовать возможное влияние растворимой митохондриальной АТР-азы (сопрягающий фактор  $F_1$  по терминологии Рэкера [15]) и бактериородопсина при их совместном присутствии в модельной системе октан/вода. Как показали опыты, на величину фотоиндуцированного эффекта, возникающего в результате функционирования бактериородопсина на границе раздела фаз октан/вода, присутствие 4 мкг/мл фактора  $F_1$  не оказывает никакого влияния. С другой стороны, сопряженный с реакцией гидролиза АТР перенос протонов из воды в октан при участии фактора  $F_1$  наблюдается только в том случае, если АТР-аза была введена в систему до бактериородопсиновых бляшек.

В другой серии опытов было показано, что добавление ионов  $\text{La}^{3+}$  в количестве 1 мМ до или после бактериородопсина полностью ингибирует фотоэффект, что согласуется с результатами, полученными в группе Л. А. Драчева в МГУ, который наблюдал ингибирование ионами  $\text{La}^{3+}$  образования трансмембранной разности электрических потенциалов модифицированной бактериородопсином плоской фосфолипидной мембраной.

Рассмотрение полученных в настоящей работе результатов приводит к выводу, что применение модельной системы октан/вода является удачным подходом для изучения  $\text{H}^+$ -транслоцирующей функции бактериородопсина. Две несмешивающиеся жидкости (октан и вода) представляют собой более стабильную систему, чем искусственная фосфолипидная мембрана, что и определяет в ряде случаев значительные преимущества использованных в настоящей работе подходов. Другая важная особенность экспериментов с двумя несмешивающимися жидкостями — наличие только одной границы раздела, в то время как в опытах с мембранами таких поверхностей оказывается две.

### Экспериментальная часть

Растворимую митохондриальную АТР-азу выделяли по методу Хорстмана и Рэкера [16], бактериородопсиновые бляшки — по Остерхельту и Стокеннусу [4]. Вольта-потенциал измерялся методом вибрирующего электрода в цепи:



Подробно методика измерений  $\Delta\phi$  описана ранее [6, 10]. Блок-схема экспериментальной установки приведена в работе [6]. В качестве источ-

ника света применяли осветитель ОИ-24. Поток света от ОИ-24 направлялся через нейтральные (а при изучении  $\Delta\phi$  как функции длины волны падающего света через интерференционные) светофильтры на зеркало, с помощью которого свет направлялся через октановую фазу на границу раздела. Мощность падающего света обычно составляла 70 мВт/см<sup>2</sup>. Ввиду того что фотоиндуцированный перенос протонов из воды в октан бактериородопсином носит осциллирующий характер, мы привели в настоящей работе значения  $\Delta\phi$ , являющиеся средними значениями пяти измерений. Все растворы готовились на дважды перегнанной воде, соли дважды перекристаллизованные. Наилучшие результаты получены на буфере трис-НСI фирмы «Sigma». Соляная кислота, применяемая для изменения рН раствора, — дважды перегнанная. Стандартная реакционная смесь содержала 20 мМ трис-НСI (рН 7,7), 1 мМ 2,4-динитрофенол. (При рН < 6,5 трис-НСI был заменен на буфер на основе морфолипозтановой сульфокислоты.) Эту смесь настаивали в колбе, содержащей равные объемы октана и водной фазы. Непосредственно перед опытом в экспериментальную ячейку вводили 50 мкг/мл бактериородопсиновых бляшек. Объем экспериментальной ячейки 10 мл. Площадь поверхности раздела фаз октан/вода 3 см<sup>2</sup>. Наблюдаемые с помощью высокочувствительного вольтметра изменения  $\Delta\phi$  регистрировались двухкоординатным самописцем.

Авторы выражают благодарность проф. В. Стокениусу за любезно предоставленную нам культуру *H. halobium* (штамм R<sub>1</sub>), Л. Н. Чекулаевой и В. Г. Плакуновой за помощь в получении биомассы клеток *H. halobium*, С. А. Остроумову за выделение бактериородопсиновых бляшек, чл.-кор. АН СССР В. П. Скулачеву, акад. А. Н. Фрумкину и Л. С. Ягужинскому за плодотворные дискуссии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mitchell P. (1961) Nature, 191, 144—145.
2. Mitchell P. (1972) J. Bioenergetics, 3, 5—24.
3. Mitchell P. (1966) Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation, Glynn. Research, Bodmin.
4. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) Nature New Biol., 233, 149—152.
5. Blaurock A. E., Stoeckenius W. (1971) Nature New Biol., 233, 152—155.
6. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1974) Докл. АН СССР, 218, 963—966; Биоорганич. химия, 1, 1368—1377.
7. Boguslavsky L. I., Kondrasbin A. A., Kozlov I. A., Metelsky S. T., Skulachev V. P., Volkov A. G. (1975) FEBS Lett., 50, 223—226.
8. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Милейковская Е. И. (1975) Докл. АН СССР, 222, 720—729.
9. Харкац Ю. И., Волков А. Г., Богуславский Л. И. (1975) Докл. АН СССР, 220, 1441—1444.
10. Богуславский Л. И., Волков А. Г. (1975) Докл. АН СССР, 224, 1201—1204.
11. Волков А. Г., Ложкин Б. Т., Богуславский Л. И. (1975) Докл. АН СССР, 220, 1207—1211.
12. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Кондрашин А. А., Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1975) Биоорганич. химия, 1, 1673—1681.
13. Ягужинский Л. С., Богуславский Л. И., Волков А. Г., Рахманинова А. Б. (1975) Докл. АН СССР, 221, 1465—1468; Nature (1976) 259, 494—496.
14. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т. (1974) III Всесоюзный биохимический съезд, т. 2, с. 64, Рига.
15. Рэкер Е. (1967) Биоэнергетические механизмы, с. 144—196, «Мир», М.
16. Horstman L. L., Racker E. (1970) J. Biol. Chem., 245, 1336—1340.

Поступила в редакцию  
24.XII.1975

# LIGHT-DEPENDENT TRANSLOCATION OF H<sup>+</sup> FROM WATER TO OCTANE BY BACTERIORHODOPSIN

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

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

Light-dependent translocation of the positive charges from the water to the octane phase has been found to be carried out by bacteriorhodopsin-phospholipid complexes (bacteriorhodopsin sheets) isolated from *Halobacterium halobium*. A lipid-soluble proton acceptor is needed to achieve this effect. The action spectrum of photoeffect in the visible region coincides with the absorption spectrum of bacteriorhodopsin. Cationic detergent cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), added before the bacteriorhodopsin sheets, prevents the photoeffect at very low concentrations ( $10^{-7}$  M). Addition of the same amounts of CTAB after the sheets has no influence on the photoeffect. La<sup>3+</sup> inhibits the photoeffect, if added either before or after the sheets. The photoeffect shows a broad pH optimum between 6 and 8. It is concluded that bacteriorhodopsin-mediated light-dependent H<sup>+</sup> translocation across the lipid/water interface can be studied in octane/water systems.