

# H<sup>+</sup>-АТФаза ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ – ОСНОВНАЯ ЭЛЕКТРОГЕННАЯ СИСТЕМА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В. А. ОПРИТОВ

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского*

## PLASMA MEMBRANE H<sup>+</sup>-ATPase AS THE BASIC ELECTROGENIC SYSTEM OF HIGHER PLANTS

V. A. OPRITOV

*The role of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in different forms of electrical activity and some membrane-dependent processes of higher plants are considered.*

*Рассмотрена роль H<sup>+</sup>-АТФазы плазматической мембраны в различных формах электрической активности, а также в некоторых мембранозависимых процессах у высших растений.*

[www.issep.rssi.ru](http://www.issep.rssi.ru)

### ВВЕДЕНИЕ

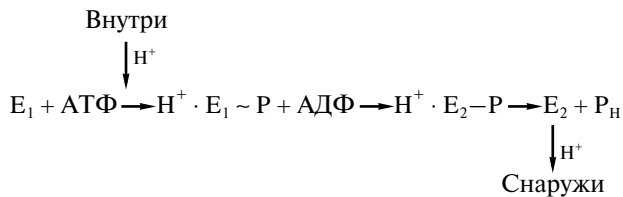
В клетках растений имеется большое число ферментов, которые катализируют разнообразные биохимические процессы. Среди этих ферментов особое место принадлежит H<sup>+</sup>-АТФазе поверхностной мембраны. Данная ферментная система выполняет, казалось бы, весьма непримечательную роль, гидролизуя молекулы АТФ. Но наряду с этим она осуществляет и необычную функцию. H<sup>+</sup>-АТФаза использует энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ для того, чтобы перенести через клеточную мембрану ионы водорода. Это обстоятельство позволило рассматривать H<sup>+</sup>-АТФазу как активную транспортную систему, то есть своеобразную молекулярную машину.

Особая роль H<sup>+</sup>-АТФазы заключается в том, что, выкачивая протоны из клетки наружу, она не только поддерживает рН цитоплазмы близкий к нейтральному (что очень важно для протекания многих ферментативных процессов), но и создает на мембране разность потенциалов ( $\Delta\psi$ ), во многом определяя электрические свойства высших растений. Об этих свойствах мы уже рассказывали в статьях [1, 2]. Здесь же покажем важную роль, которую H<sup>+</sup>-АТФаза играет в электрогенезе (то есть генерации биоэлектрических потенциалов) у высших растений, а также рассмотрим другие процессы, в которых работе H<sup>+</sup>-АТФазы принадлежит существенное место.

### НЕМНОГО О СВОЙСТВАХ H<sup>+</sup>-АТФазы

H<sup>+</sup>-АТФаза – это интегральный белок, полипептидная цепь которого десять раз пересекает поверхностную (плазматическую) мембрану. Молекулярная масса одной субъединицы фермента ~104 кД. Полагают, что в мембране H<sup>+</sup>-АТФаза функционирует в виде олигомера и состоит из двух субъединиц [3]. Хорошо изучены как первичная структура H<sup>+</sup>-АТФазы (то есть аминокислотная последовательность ее полипептидной цепи), так и структуры более высоких порядков (вторичная,

третичная). В молекуле  $H^+$ -АТФазы различают несколько участков (доменов), из которых основные — это домен, связывающий АТФ четырьмя местами связывания, и домен, имеющий отношение к переносу протона, включающий канал. Истинным субстратом  $H^+$ -АТФазы является не сама АТФ, а ее комплекс с магнием (Mg-АТФ). В процессе работы  $H^+$ -АТФаза подвергается фосфорилированию-дефосфорилированию и обратимо меняет свою конформацию:



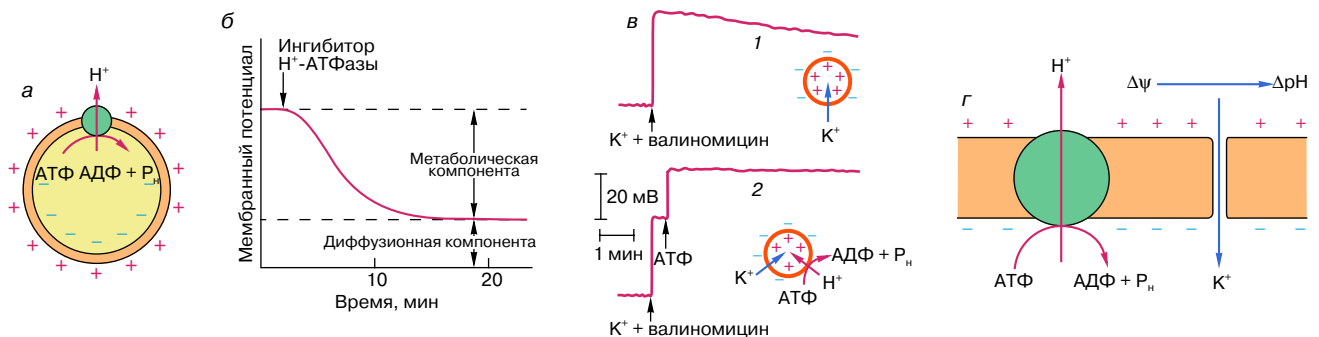
При этом она переходит из формы  $E_1$  в форму  $E_2$  и обратно. В форме  $E_1$  она связывает протон на внутренней стороне мембраны, а в форме  $E_2$  освобождает его на наружной стороне (рис. 1, а). На  $1 \text{ мкм}^2$  поверхности мембраны приходится  $10^4$  молекул  $H^+$ -АТФазы. Каждая молекула работает со скоростью от 20 до 100 оборотов в секунду и переносит от  $10^5$  до  $10^6$  протонов в секунду на  $1 \text{ мкм}^2$ . Как правило, отношение количества перенесенных протонов к количеству гидролизованых молекул АТФ равно единице. Для нормального

функционирования  $H^+$ -АТФазы в мембране необходимо присутствие некоторых фосфолипидов. Оптимум рН этой ферментной системы лежит в слабокислой среде (рН 6,3–6,5).

## Н<sup>+</sup>-АТФаза И МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Выкачивая протоны из клетки в среду (в примембранный слой),  $H^+$ -АТФаза участвует в создании трансмембранной разности потенциалов ( $\Delta\psi$ ) со знаком минус с цитоплазматической стороны мембраны. Вклад  $H^+$ -АТФазы в формирование  $\Delta\psi$  принято обозначать термином “метаболическая компонента”. Эта компонента является как бы надстройкой над пассивной частью  $\Delta\psi$ , возникающей диффузионным путем в результате неравномерного распределения ионов по обе стороны мембраны [4]. Выявить метаболическую компоненту просто. Для этого достаточно подействовать на клетку каким-либо агентом, угнетающим работу  $H^+$ -АТФазы. Оставшаяся после угнетения часть  $\Delta\psi$  является пассивной, а та его часть, которая подверглась угнетению, отражает метаболическую компоненту (рис. 1, б).

Генерация  $H^+$ -АТФазой метаболической компоненты  $\Delta\psi$  у высших растений имеет некоторые особенности.



**Рис. 1.** Генерация  $H^+$ -АТФазой метаболической компоненты мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ). а –  $H^+$ -АТФаза за счет энергии гидролиза АТФ выкачивает из клетки протоны и создает метаболическую компоненту  $\Delta\psi$  (то есть компоненту, генерация которой непосредственно связана с энергетическими затратами). При этом на мембране возникает разность потенциалов со знаком минус внутри; б – выявление метаболической компоненты  $\Delta\psi$ , создаваемой  $H^+$ -АТФазой. Ингибитор  $H^+$ -АТФазы подавляет ее работу и устраняет метаболическую компоненту  $\Delta\psi$ . Оставшаяся часть мембранного потенциала не зависит от метаболизма и является диффузионной компонентой; в – стабилизирующие свойства  $H^+$ -АТФазы: 1 – созданный на вывернутых везикулах плазматических мембран диффузионный калиевый потенциал (обусловленный входом калия внутрь с помощью его переносчика валиномицина) быстро уменьшается, диссипирует; 2 – подключение к диффузионному калиевому потенциалу метаболической компоненты, создаваемой  $H^+$ -АТФазой (путем добавления к везикулам Mg-АТФ), увеличивает мембранный потенциал и “в то же время” стабилизирует его во времени; г – размен создаваемого  $H^+$ -АТФазой  $\Delta\psi$  на  $\Delta\mu_{K^+}$ .  $H^+$ -АТФаза создает на плазматической мембране  $\Delta\psi$ . Его величина ограничена емкостью мембраны (~1 мкФ). Однако происходящая разрядка  $\Delta\psi$  (за счет входа ионов калия по градиенту потенциала) позволяет  $H^+$ -АТФазе вынести из клетки новую порцию протонов. В результате  $\Delta\psi$  постепенно конвертирует в  $\Delta\mu_{K^+}$

1. Метаболическая компонента  $\Delta\psi$  значительна по своей величине. По нашим измерениям, она составляет до 60–70% общей величины  $\Delta\psi$ , которая обычно у растений равна 140–160 мВ. Ранее мы видели [1], что величина  $\Delta\psi$  характеризует степень энергизации биомембраны, то есть степени запаса энергии в виде трансмембранной разности потенциалов, являющейся по современным представлениям одной из форм конвертируемой (то есть легко переходящей в другие формы) энергии в клетке. Поэтому значительное участие метаболической компоненты в формировании  $\Delta\psi$  у растений способствует поддержанию энергизации плазматических мембран растений на достаточно высоком уровне. В условиях довольно часто возникающих экстремальных воздействий это представляется весьма важным, поскольку способствует большей устойчивости растительных клеток.

2. Метаболическая компонента  $\Delta\psi$  играет существенную роль в стабилизации  $\Delta\psi$  в целом. Это особенно наглядно видно в условиях модельной системы, какой являются изолированные с помощью ультрацентрифугирования плазматические мембраны. Такие мембраны в растворе замкнуты в пузырьки – везикулы. В наших опытах они были вывернуты внутренней стороной мембраны наружу. Если снаружи таких пузырьков поместить ионы калия в присутствии переносчика этого иона валиномицина, то калий начинает проникать внутрь везикул. При этом на мембране везикул будет создаваться разность потенциалов со знаком плюс внутри. Возникает калиевый диффузионный потенциал (рис. 1, в). Как видно из рисунка, этот потенциал, возникнув, постепенно уменьшается или, как говорят, диссипирует за счет проникновения через мембрану других ионов. Если же заставить работать в мембранах  $H^+$ -АТФазу, добавив к везикулам Mg-АТФ, то генерируется метаболическая компонента  $\Delta\psi$  (см. рис. 1, в). Общий суммарный потенциал (диффузионная + метаболическая компонента) оказывается стабильным и во времени почти не уменьшается. Таким образом, метаболическая компонента  $\Delta\psi$ , генерируемая  $H^+$ -АТФазой, берет на себя функцию поддержания стабильности  $\Delta\psi$ , что связано со способностью этой ферментной системы в условиях мембраны к авторегулированию. Данное свойство представляется чрезвычайно важным в изменяющихся условиях внешней среды.

3. Метаболическая компонента трансмембранной разности потенциалов может подвергаться конверсии. Суть этого явления состоит в следующем. Как мы видели выше,  $H^+$ -АТФаза за счет энергии АТФ выкачивает из клетки протоны. Вследствие этого возникает  $\Delta\psi$  со знаком минус на внутренней стороне мембраны. Этот процесс идет лишь до того предела, который ограничен

электроемкостью мембраны (~1 мкФ). При этом изначально наружу выносятся лишь небольшое количество ионов водорода, достаточное для зарядки мембранной емкости и создания  $\Delta\psi$ , но мало отражающееся на величине трансмембранной разности рН. Однако, как видно из рис. 1, з, пассивное движение какого-либо катиона (обычно калия) по каналам внутрь клетки в соответствии с возникшим градиентом электрического потенциала разряжает мембрану и  $H^+$ -АТФаза получает возможность произвести ее подзарядку, выкачав наружу дополнительное количество протонов. Поскольку проницаемость плазматических мембран растений для  $H^+$ -ионов по существующим представлениям невелика, обратное их поступление в клетку ограничено. Поэтому происходит увеличение (в определенных пределах) количества  $H^+$ -ионов у наружной стороны мембраны. Таким образом, в ходе рассмотренных явлений наблюдается трансформация разности потенциалов на мембране в трансмембранную разность рН ( $\Delta pH$ ) или, как говорят, размен  $\Delta\psi$  на  $\Delta pH$ . Это имеет большое значение для функционирования клетки, поскольку удаление протонов из протоплазмы способствует поддержанию ее рН, близкого к нейтральному, и “в то же время” возникающая на мембране  $\Delta pH$  важна для протекания мембранозависимых процессов, в частности процессов вторичного активного транспорта.

## **$H^+$ -АТФаза И ВТОРИЧНЫЙ АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ**

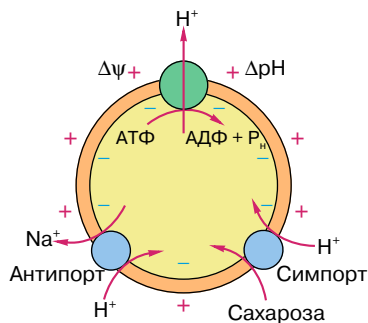
Вторичный активный транспорт – чрезвычайно важный для растительной клетки процесс. Благодаря ему клетка активно поглощает (или удаляет) многие вещества (ионы, углеводы, аминокислоты и др.). Суть этого процесса состоит в том, что в мембране имеются особые вещества – переносчики белковой природы. Они могут образовывать комплекс с протоном на наружной стороне мембраны. Такой комплекс приобретает сродство (в зависимости от типа переносчика) к определенному веществу (например, иону  $Na^+$ , сахарозе) на одной из сторон мембраны и образуется заряженное соединение типа протон–переносчик–вещество. Перенос протон внутрь клетки как по электрическому ( $\Delta\psi$ ), так и по концентрационному ( $\Delta pH$ ) градиентам, переносчик за счет энергии этих двух составляющих протонного потенциала переносит вещество внутрь (симпорт) или наружу (антипорт) (рис. 2).

Нетрудно видеть, что работа вторичных систем активного транспорта связана с работой  $H^+$ -АТФазы. Это можно наблюдать непосредственно в опытах. Активация работы вторичной транспортной системы (например, в наших опытах переносчика сахарозы) добавлением переносимого вещества (сахарозы), вызывая разрядку  $\Delta\psi$

и  $\Delta pH$  на мембране, одновременно стимулировала работу  $H^+$ -АТФазы. Таким образом,  $H^+$ -АТФаза путем генерации электрического ( $\Delta\psi$ ) и концентрационного ( $\Delta pH$ ) градиентов обеспечивает энергией работу самых разнообразных систем вторичного активного транспорта, находящихся в мембране.

## **$H^+$ -АТФаза И АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К ОХЛАЖДЕНИЮ**

Известно, что адаптация растений к неблагоприятным условиям, в частности к охлаждению, является сложным, комплексным процессом и протекает на разных уровнях организации (молекулярном, мембранном, клеточном, тканевом, организменном), затрагивая при этом различные жизненные системы. Как показано в исследованиях нашей лаборатории [5], существенное место в развитии синдрома адаптации у высших растений принадлежит изменениям в биоэлектrogenезе, то есть в генерации электрических потенциалов на поверхностной плазматической мембране. При этом важно, что эти изменения наступают быстро и являются, по-видимому, одним из наиболее ранних звеньев в развитии синдрома адаптации. Сразу после наступления



**Рис. 2.** Роль  $H^+$ -АТФазы во вторичном активном транспорте.  $H^+$ -АТФаза создает на мембране градиенты  $\psi$  и  $pH$ . Вторичные системы активного транспорта используют их для переноса внутрь клетки протона и веществ (симпорт) или протона внутрь и веществ наружу (антипорт)

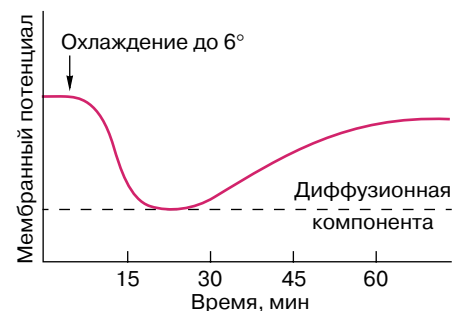
охлаждения до  $6^\circ C$  происходит резкое уменьшение разности электрических потенциалов на плазматической мембране (рис. 3). При этом, как показано в нашей лаборатории,  $\Delta\psi$  снижается практически до уровня диффузионной (пассивной) компоненты, что говорит о почти полном подавлении работы  $H^+$ -АТФазы. Это в первую очередь связано с загустением мембранных липидов и ограничением подвижности данной ферментной системы. Однако в дальнейшем в условиях постоянной пониженной температуры ( $6^\circ C$ ) мембранный потенциал начинает спонтанно возрастать (см. рис. 3),

хотя и не достигает исходного уровня. Специальными приемами, в частности путем действия специфических ингибиторов, было показано, что это связано с активацией  $H^+$ -АТФазы. Такая активация вызывается ионами калия, выделяющимися на начальном этапе охлаждения, и в особенности наступающим приспособительным разжижением липидного матрикса. Значение такой активации  $H^+$ -АТФазы при охлаждении очень велико. В результате активации в неблагоприятных условиях  $\Delta\psi$  поддерживается на уровне, близком к нормальному, и сохраняют активность те мембранные системы, работа которых зависит от разности потенциалов на мембране (вторичный активный транспорт, работа рецепторов, каналов).

Следует отметить, что аналогичная роль  $H^+$ -АТФазы обнаружена нами не только при действии охлаждения, но и некоторых других неблагоприятных внешних факторов.

## **РОЛЬ $H^+$ -АТФазы В ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ**

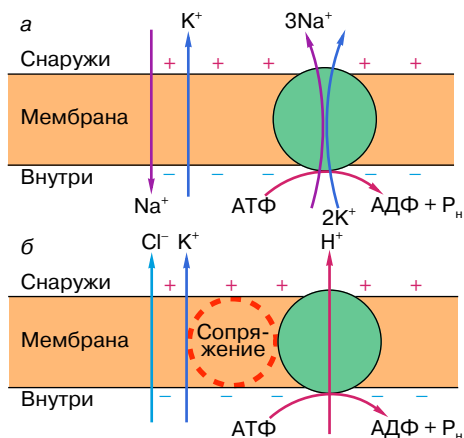
Ранее мы подробно рассмотрели генерацию потенциалов действия (ПД) у высших растений и ту роль, которую они могут выполнять в осуществлении быстрых функциональных связей между органами [2]. Принципиально важным оказалось то, что механизм возникновения ПД в проводящих пучках высших растений имеет большее сходство с таковым в нервах животных. Он является ионным по природе, только в возникновении ПД у высших растений принимают участие не  $Na^+$  и  $K^+$ , как у животных, а  $Cl^-$  и  $K^+$  (рис. 4). При нанесении раздражения открываются хлорные каналы. Этот процесс активируется ионами кальция. Ионы хлора (и



**Рис. 3.** Адаптивные изменения работы  $H^+$ -АТФазы при охлаждении. При охлаждении тканей растений до  $6^\circ C$   $H^+$ -АТФаза угнетается и мембранный потенциал снижается до диффузионной компоненты. Но затем в условиях продолжающегося охлаждения происходят спонтанная активация  $H^+$ -АТФазы (ионами калия, выходящими на фазе угнетения, и путем разжижения липидного матрикса) и приспособительное возрастание мембранного потенциала

отчасти, вероятно, другие анионы) выходят из клеток по электрическому и концентрационному градиентам и формируют фазу деполяризации ПД. При определенной степени деполяризации мембраны открываются калиевые каналы, и из клеток начинают выходить ионы калия, что вызывает реполяризацию мембраны. Однако отличительной особенностью высших растений является то, что ПД у них обладают значительно большей длительностью, чем у животных (несколько секунд или даже десятков секунд). Поэтому примерно при той же интенсивности ионных потоков (моль · см<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>) общее количество ионов, которое выходит из возбудимых клеток растений на единицу их поверхности за время генерации одного ПД (моль · см<sup>-2</sup> · импульс<sup>-1</sup>), оказывается велико. Как было нами показано, для ионов хлора это величина порядка  $(0,1-0,2) \cdot 10^{-8}$  моль · см<sup>-2</sup> · импульс<sup>-1</sup>, а для ионов калия —  $(0,5-1,2) \cdot 10^{-8}$  моль · см<sup>-2</sup> × импульс<sup>-1</sup>. В то же время в ходе нервного импульса, длительность которого около 1 мс, потоки входящих в нервное волокно ионов натрия и выходящих из него ионов калия составляют величину порядка  $(3-4) \times 10^{-12}$  моль · см<sup>-2</sup> · импульс<sup>-1</sup>.

Как известно, движение ионов при генерации ПД происходит пассивно по существующим через мембрану концентрационным и электрическим градиентам.



**Рис. 4.** Непосредственное сопряжение генерации потенциала действия с работой H<sup>+</sup>-АТФазы.

Генерация потенциала действия в нервных волокнах связана с перемещением небольших количеств ионов натрия и калия —  $(3-4) \cdot 10^{-12}$  моль · см<sup>-2</sup> · импульс<sup>-1</sup>. Поэтому существующих концентрационных градиентов достаточно для генерации многих потенциалов действия (а). У высших растений во время одиночного импульса из клетки выходит большое количество ионов хлора и особенно ионов калия —  $(0,5-1,2) \cdot 10^{-8}$  моль · см<sup>-2</sup> · импульс<sup>-1</sup>. Поэтому существующий градиент по калию между клеткой и средой оказывается недостаточным для того, чтобы восстановить потенциал мембраны во время фазы реполяризации, и требуется непосредственное подключение H<sup>+</sup>-АТФазы (б)

Поскольку при генерации одного импульса через мембрану нервного волокна переносится очень небольшое количество ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, этих градиентов хватает на генерацию многих ПД и нет необходимости непосредственного сопряжения работы ионной помпы (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы), постепенно восстанавливающей эти градиенты, с генерацией каждого ПД (см. рис. 4). Иная ситуация у высших растений. Большой выход ионов калия во время ПД резко нарушает существующие градиенты этого иона, поэтому во время фазы реполяризации мембранный потенциал не может восстановиться до исходного уровня. Как нами было показано [4], его “вытягивание” до этой величины осуществляется непосредственным подключением протонной помпы (H<sup>+</sup>-АТФазы) (см. рис. 4). Этот факт, впервые установленный в нашей лаборатории, особенно наглядно проявляется при действии низкой температуры. Если при нормальной температуре фаза реполяризации ПД полностью восстанавливает Δψ, то в условиях пониженной температуры, когда H<sup>+</sup>-АТФаза подавлена, этого не происходит и мембранный потенциал исходного уровня не достигает.

Мы рассмотрели только некоторые аспекты той роли, которую электрогенная (то есть связанная с генерацией биоэлектрических потенциалов) функция H<sup>+</sup>-АТФазы плазматических мембран играет в жизнедеятельности высших растений. Но материала, который здесь изложен, достаточно, чтобы составить представление о большой важности H<sup>+</sup>-АТФазы в жизнедеятельности высших растений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Оприлов В.А.* Электричество в жизни животных и растений // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 9. С. 40–46.
2. *Оприлов В.А.* Электрические сигналы у высших растений // Там же. 1996. № 10. С. 22–27.
3. *Briskin D.P.* The Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase of Higher Plant Cells // *Biochim. et biophys. acta.* 1990. № 2. P. 95–109.
4. *Оприлов В.А., Пятыгин С.С., Ретивин В.Г.* Биоэлектрогенез у высших растений. М.: Наука, 1991. 214 с.
5. *Оприлов В.А., Пятыгин С.С., Крауз В.О.* Анализ роли электрической активности клеток высшего растения в развитии адаптационного синдрома при охлаждении // *Физиология растений.* 1993. Т. 40, вып. 4. С. 619–626.

Рецензент статьи Ю.А. Владимиров

\* \* \*

Владимир Александрович Оприлов, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заслуженный деятель науки РФ. Область научных интересов – биоэлектрогенез и мембранный транспорт у высших растений. Автор более 250 научных статей и двух монографий.