

MOLECULAR TRANSFORMERS OF ENERGY IN LIVING CELLS

A. N. TIKHONOV

This work is a brief review of structural and functional properties of membrane H^+ ATP synthase operating as macromolecular energy-transducing machine of the living cell. H^+ ATP synthase is a key enzyme which provides coupling of energy donating reactions in biomembranes to ATP formation. The process takes place in energy-transducing membranes of plant, animal and bacterial cells.

Рассмотрены современные представления о строении и функционировании мембранных H^+ АТФсинтаз, которые являются уникальными энергопреобразующими макромолекулярными машинами, обеспечивающими сопряжение энергодонорных реакций электронного транспорта в биомембранах с энергоакцепторными процессами синтеза АТФ в клетках растений, животных и бактерий.

© Тихонов А.Н., 1997

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ ЭНЕРГИИ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

А. Н. ТИХОНОВ

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Источником энергии для большинства биологических процессов является Солнце. Фотосинтезирующие организмы используют энергию света для синтеза органических соединений, которые, в свою очередь, служат строительным материалом и источником энергии для животных и других организмов, неспособных самостоятельно усваивать энергию солнечного света. Энергия света, поглощаемого фотосинтезирующими организмами, не прямо используется для синтеза органических соединений, а сначала в ходе многочисленных световых и темновых стадий фотосинтеза преобразуется в химическую энергию **макроэргических** (богатых энергией) соединений, которые и являются непосредственным источником энергии для процессов биосинтеза.

К числу наиболее важных макроэргических соединений, которые служат универсальным источником химической энергии для всех организмов, относится молекула аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Молекула АТФ впервые выделена в 1929 году Фиске и Суббароу из кислых экстрактов мышц. Вскоре после этого было установлено, что АТФ является участником большинства процессов энергетического обмена в живой клетке. В 1931 году академик В.А. Энгельгардт обнаружил связь между синтезом АТФ и клеточным дыханием (явление окислительного фосфорилирования). Позднее он установил, что АТФ участвует в мышечном сокращении. В 1941 году Липман сформулировал основной закон биоэнергетики, согласно которому энергия внешнего источника сначала запасается в форме химической энергии молекул АТФ и лишь затем используется для совершения полезной работы. Представление об АТФ как универсальной “энергетической валюте” нашло многочисленные подтверждения и стало краеугольным камнем всей биоэнергетики (см. также: *Скулачев В.П. Законы биоэнергетики // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 1. С. 9–14*). Подавляющее большинство энергоемких биологических процессов, таких, как реакции биосинтеза, перенос ионов и различных веществ внутри клетки, мышечное сокращение, сопряжено с **энергодонорной** реакцией

гидролиза АТФ, в ходе которой происходит выделение энергии:

$\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{АДР}$ (аденозиндифосфорная кислота) + P_i (неорганический фосфат) + энергия.

Наряду с этими процессами в клетке происходят **энергоакцепторные** реакции синтеза АТФ, которые компенсируют убыль АТФ:

$\text{АДР} + \text{P}_i + \text{энергия} \longrightarrow \text{АТФ} + \text{H}_2\text{O}$.

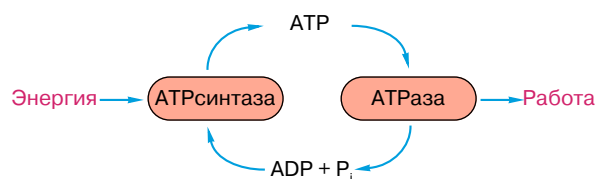


Рис. 1. Цикл энергозависимых превращений АТФ в клетке

Цикл энергозависимых превращений АТФ схематически показан на рис. 1.

Непосредственным источником энергии для синтеза АТФ в энергопреобразующих мембранах растений, животных и бактерий служит энергия, выделяемая в ходе окислительно-восстановительных процессов [1–6]. У растений образование АТФ связано с работой фотосинтетической цепи переноса электронов в хлоропластах — энергопреобразующих органеллах растительной клетки. В клетках животных подавляющее число молекул АТФ образуется в митохондриях. Значительная часть энергии, выделяемой в ходе окислительно-восстановительных реакций электронного транспорта в мембранах этих энергопреобразующих органелл, не пропадает, а запасается в форме макроэргических связей молекулы АТФ. Принято говорить, что энергодонорные процессы электронного транспорта сопряжены с энергоакцепторными реакциями синтеза АТФ. Ключевую роль в процессах энергетического сопряжения в биологических мембранах играет специальный макромолекулярный комплекс, называемый H^+ АТФсинтазой.

ЭНЕРГЕТИКА ПРОЦЕССОВ ГИДРОЛИЗА И СИНТЕЗА АТФ

Прежде чем приступить к обсуждению того, каким образом H^+ АТФсинтаза катализирует энергетически невыгодную реакцию образования АТФ из АДР и P_i , определим критерии, по которым химические процессы можно разделить на энергодонорные и энергоакцепторные. Попробуем также ответить на вопрос, почему нужна энергия для синтеза АТФ.

Одной из важнейших характеристик системы, которая позволяет определить направление химической реакции и ответить на вопрос о том, какую полезную работу можно совершить за счет этой реак-

ции, является свободная энергия. Если химическая реакция проводится при постоянной температуре T и давлении p , то для ее описания обычно используют свободную энергию Гиббса: $G = U + pV - TS$, где U — внутренняя энергия, V — объем и S — энтропия системы. Энтропия S является количественной мерой неупорядоченности (хаотичности) системы. Согласно второму началу термодинамики, каждая изолированная система стремится самопроизвольно перейти из упорядоченного в разупорядоченное состояние, характеризующееся максимальной энтропией. В состоянии термодинамического равновесия свободная энергия системы минимальна. Это означает, что если система находится в неравновесном состоянии, то по мере движения к равновесию свободная энергия системы G будет уменьшаться ($\Delta G < 0$).

Допустим, что в системе могут происходить две химические реакции. Если в ходе одной из них свободная энергия уменьшается ($\Delta G_1 < 0$), то такую реакцию мы будем называть энергодонорной (такие процессы также называют экзоэргическими). Эта реакция может протекать самопроизвольно, без притока энергии от внешнего источника. Изменение свободной энергии системы ΔG_1 в ходе энергодонорного процесса показывает, какую максимальную полезную работу ΔW можно совершить при реализации такого процесса, $\Delta W \leq |\Delta G_1|$. Если другая химическая реакция сопровождается повышением свободной энергии ($\Delta G_2 > 0$), то она не может протекать самопроизвольно, такую реакцию мы будем называть энергоакцепторной (другое название — эндоэргическая реакция). Энергоакцепторная реакция не может протекать самопроизвольно. Однако выделение свободной энергии ΔG_1 в ходе энергодонорного процесса можно использовать для проведения сопряженного с ним энергоакцепторного процесса, если выполняется условие $\Delta G_1 + \Delta G_2 < 0$. Можно привести множество примеров таких энергетически сопряженных процессов в биологических системах. Так, например, энергия, выделяющаяся при гидролизе АТФ мышечным белком миозином, обеспечивает конформационные перестройки этого белка, в результате которых в конечном итоге происходит сокращение мышцы. Другой пример — работа ионного насоса, поддерживающего неравновесное распределение ионов Na^+ и K^+ в клетке (Na^+, K^+ АТРаза). Этот фермент, используя энергию гидролиза АТФ, производит концентрирование ионов K^+ в цитоплазме и удаление ионов Na^+ из клетки.

В водных растворах равновесие в реакции $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \longleftrightarrow \text{АДР} + \text{P}_i$ практически всегда сдвинуто в сторону расщепления АТФ. Это означает, что гидролиз АТФ является энергетически выгодным процессом. В так называемых стандартных условиях, когда концентрации всех реагентов равны 1 моль/л, изменение свободной энергии в ходе гидролиза АТФ составляет величину $\Delta G_0 \cong -7,3$ ккал/моль. Знание ΔG_0 позволяет легко вычислить константу

равновесия K реакции $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i$, которая, как известно из физической химии, связана с величиной ΔG_0 уравнением $\Delta G_0 = -RT \ln K$, где R – универсальная газовая постоянная, T – температура. Отсюда нетрудно показать (см. подробнее гл. 7 книги [2]), что после достижения термодинамического равновесия отношение концентраций $[\text{ATP}]$ и $[\text{ADP}]$ должно удовлетворять условию $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] \ll 1$. Это, однако, еще не означает, что в растворе всегда устанавливается равновесное соотношение между концентрациями ATP и ADP. Хотя гидролиз ATP и является энергетически выгодным процессом, самопроизвольно акты гидролиза ATP происходят очень редко. При отсутствии фермента, катализирующего гидролиз ATP (такие ферменты называются АТРазами), достижение истинного термодинамического равновесия происходит медленно. Иными словами, при отсутствии фермента, катализирующего гидролиз ATP, запасенная в ней потенциальная энергия может оставаться не востребованной очень долго. Это связано с тем, что для разрыва ковалентной химической связи в молекуле ATP необходимо совершить работу по преодолению сравнительно высокого активационного барьера E_a (рис. 2). Находящиеся в клетке АТРазы ускоряют гидролиз ATP и обеспечивают использование выделяющейся в ходе гидролиза ATP свободной энергии ΔG для совершения полезной работы.

Убыль ATP в клетке компенсируется в основном за счет H^+ АТРсинтаз, входящих в состав энергопреобразующих биологических мембран. Для работы этого фермента требуется энергия. Одна из причин того, что синтез ATP из ADP и P_i является энергетически невыгодным процессом, заключается в том, что в водных растворах фосфатные группы этих молекул ионизованы и несут отрицательные заряды, локализованные на атомах кислорода (рис. 2). Для образования ковалентной химической связи между ADP и P_i эти отрицательно заряженные группы необходимо сблизить на достаточно близкое расстояние, для чего требуется совершить сравнительно большую работу по преодолению силы электростатического отталкивания. Одна из главных задач биоэнергетики заключается в том, чтобы понять, каким образом эту работу выполняют H^+ АТРсинтазы.

СОСТАВ И СТРОЕНИЕ H^+ АТРСИНТАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Со времени открытия H^+ АТРсинтазы Рэкером с сотрудниками прошло более 36 лет. Однако вопрос о ее функционировании в качестве энергопреобразующей молекулярной машины по-прежнему остается в центре внимания биоэнергетики. Важнейшее значение для понимания молекулярных механизмов работы H^+ АТРсинтазы имеет детальное знание пространственной структуры фермента. Схематическое изображение АТРСинтазного комплекса и его расположение в энергопреобразующих мембранах

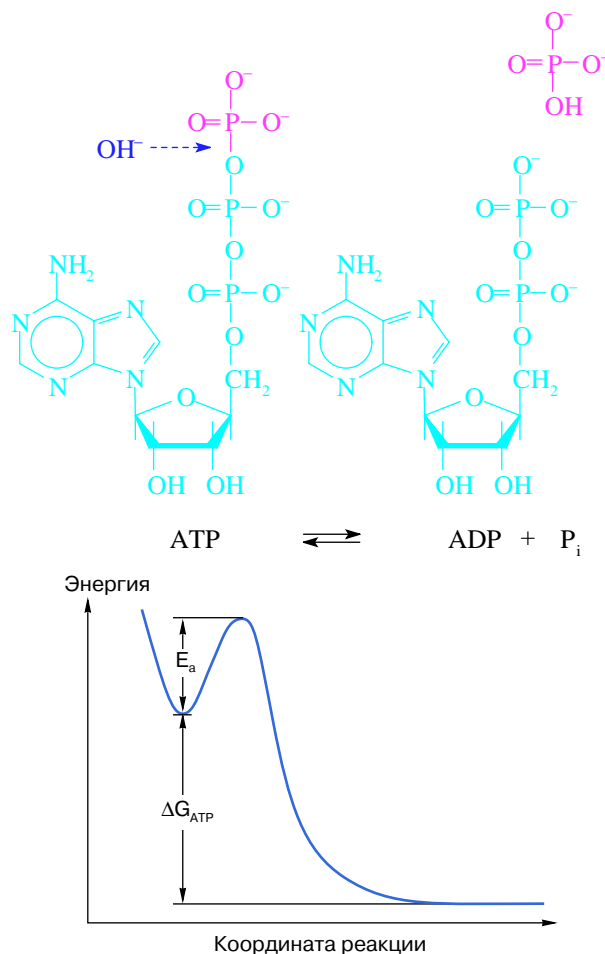


Рис. 2. Схематическое изображение изменения профиля потенциальной системы в ходе реакций гидролиза и синтеза ATP

хлоропластов и митохондрий показаны на рис. 3 и 4. Этот комплекс по форме напоминает гриб, ножка которого погружена в мембрану, а круглая шляпка выступает наружу (рис. 3). Мембранная часть H^+ АТРсинтазы, называемая фактором сопряжения F_0 , представляет собой гидрофобный (нерастворимый в воде) белковый комплекс. Второй фрагмент H^+ АТРсинтазного комплекса – фактор сопряжения F_1 – выступает из мембраны в водную фазу в виде сферы. В хлоропластах (рис. 4, а) фактор сопряжения F_1 ориентирован во внешнюю сторону, а в митохондриях (рис. 4, б) фактор сопряжения F_1 обращен в сторону матрикса (внутренняя часть митохондрии).

Известно, что работа H^+ АТРсинтазы сопряжена с переносом через нее протонов. По этой причине F_0F_1 -комплексы, входящие в состав энергопреобразующих мембран, получили название протонных или H^+ АТРсинтаз. В хлоропластах протоны (ионы H^+) переносятся из внутритилакоидного объема в строуму, в митохондриях – из внешнего межмембранного

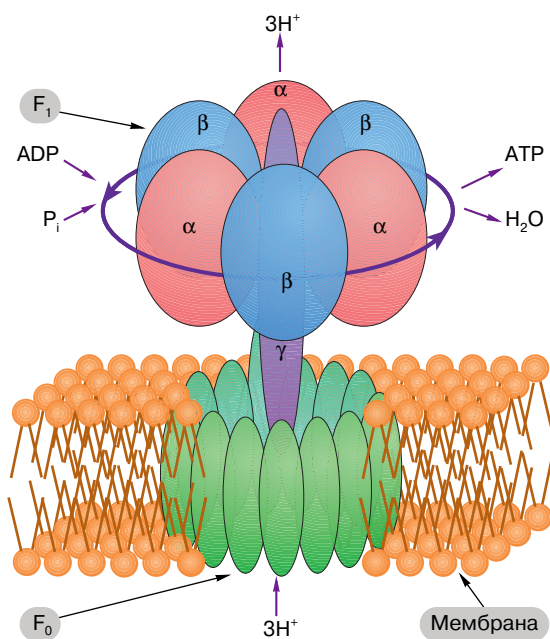


Рис. 3. Пространственное строение H^+ АТФсинтазного комплекса

объема в матрикс (рис. 4). Для нормального функционирования F_0F_1 -комплекса необходимо, чтобы сопрягающая мембрана была замкнутой. Это связано с тем, что направленный поток протонов через F_0F_1 -комплекс может возникать, лишь когда концентрации ионов водорода по обе стороны сопрягающей мембраны различаются либо когда на мембране существует разность электрических потенциалов $\Delta\phi$, под действием которой протоны переносятся через F_0F_1 -комплекс. Все это возможно только при наличии замкнутых мембран, которые изолируют внутреннее пространство органеллы от внешней среды. Лишь в этом случае на сопрягающей мембране за счет работы цепи электронного транспорта образуется протонный потенциал (разность электрохимических потенциалов ионов водорода), необходимый для работы H^+ АТФсинтазы.

В нормальных условиях F_1 связан с мембранным фрагментом F_0 . Важную роль в удержании водорастворимого белка F_1 на мембране играют электростатические взаимодействия. В хлоропластах своеобразным клеем, способствующим прочному взаимодействию F_1 и F_0 , являются ионы Mg^{2+} . Фактор сопряжения F_1 можно сравнительно легко отделить от мембранного фрагмента F_0 . Удаление F_1 не препятствует переносу электронов по цепи электронного транспорта, но мембраны энергопреобразующих органелл при этом становятся разобщенными — электронный транспорт не приводит к синтезу АТФ. Отставшие в мембране фрагменты F_0 сами по себе не обладают способностью ни синтезировать, ни гидролизовать АТФ. В то же время изоли-

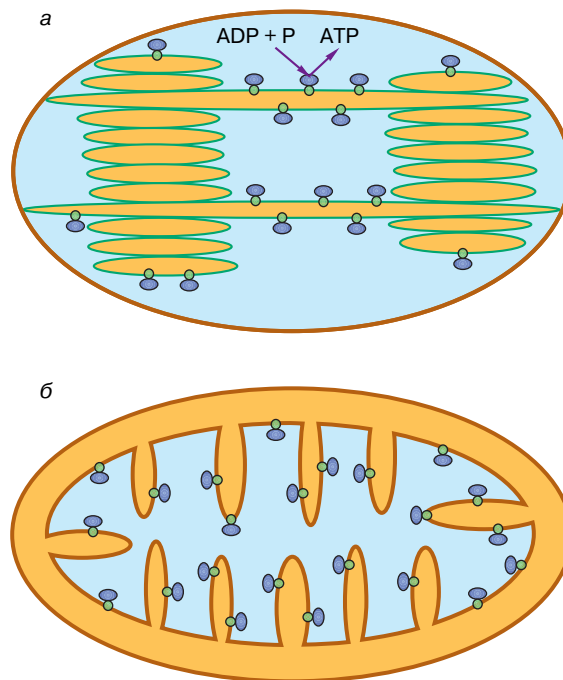


Рис. 4. Схема расположения H^+ АТФсинтазных комплексов в мембранах хлоропластов (а) и митохондрий (б). Затемненные области (песочного цвета) соответствуют тем областям хлоропласта и митохондрии, которые характеризуются высоким протонным потенциалом

рованный белок F_1 , который хорошо растворим в воде, сохраняет АТФазную активность — катализирует гидролиз АТФ. Однако отделенный от мембраны фактор сопряжения F_1 неспособен синтезировать АТФ. Таким образом, способность синтезировать АТФ — это свойство единого F_0F_1 -комплекса, встроеного в сопрягающую мембрану.

Мембранный фрагмент H^+ АТФсинтазного комплекса F_0 выполняет роль специфического протонного канала, по которому ионы водорода попадают к F_1 . При отсутствии субстратов фосфорилирования (АДР и P_i) утечка протонов через F_0F_1 -комплекс сравнительно невелика. В этом случае нефункционирующий фрагмент F_1 закрывает путь протоном, которые при отсутствии F_1 могли бы свободно проходить через протонпроводящий канал F_0 . При отделении от мембраны водорастворимого белка F_1 сопрягающая мембрана становится как бы дырявой для ионов водорода. В этом случае ионы водорода сравнительно легко проходят через протонный канал, образуемый мембранным фрагментом F_0 , в результате чего выравниваются концентрации ионов водорода по обе стороны сопрягающей мембраны (см. рис. 3).

Строение фактора сопряжения F_0 . У большинства известных H^+ АТФсинтаз растительного, животного и бактериального происхождения мембранный

фрагмент F_0 состоит из полипептидных субъединиц трех типов, ab_2c_n . В его состав входят одна-две копии субъединиц типа a и b , имеющих молекулярные массы 20–30 кДа, а также довольно большое число ($n = 9–12$) одинаковых копий более мелкой субъединицы c (молекулярная масса 6–11 кДа). Ансамбль этих субъединиц формирует в мембране протонпроводящий канал, по которому ионы водорода попадают к фактору сопряжения F_1 .

Строение фактора сопряжения F_1 . Водорастворимый фрагмент H^+ АТРсинтазы представляет собой белковый комплекс, который состоит из девяти субъединиц пяти типов, получивших название субъединиц α , β , γ , δ и ϵ . Одна молекула фермента содержит три одинаковые α - и три одинаковые β -субъединицы, а также по одной субъединице γ , δ и ϵ (сокращенное обозначение $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$). У фактора сопряжения F_1 , выделенного из митохондрий сердца крупного рогатого скота, полипептидные цепи субъединиц α , β , γ , δ и ϵ образованы из 510, 482, 272, 146 и 50 аминокислот соответственно. Субъединицы α и β являются гомологичными – они очень похожи друг на друга по составу аминокислот и пространственному строению. Приблизительно 20% участков полипептидных цепей этих субъединиц, включая участки связывания ADP и АТР, совпадают полностью.

Полипептидные цепи субъединиц α и β уложены в похожие по своему пространственному строению белковые глобулы, которые вместе образуют единый ансамбль. Недавно группе ученых из Кембриджского университета, возглавляемой Дж. Уокером, удалось методом рентгеноструктурного анализа расшифровать трехмерную картину пространственного строения F_1 с разрешением 2,8 Å [7]. Данные рентгеноструктурного анализа и результаты электронно-микроскопических исследований показали, что молекула F_1 имеет вид приплюснутого шара высотой 80 Å и шириной 100 Å. Подобно плотно уложенным долькам апельсина, образующим шар, все субъединицы α и β расположены попеременно вокруг протяженной субъединицы γ , расположенной в центре молекулы F_1 (рис. 3). Благодаря этому молекула F_1 образует структуру, характеризующуюся осью симметрии третьего порядка. Если повернуть ее на 120° вокруг оси, совпадающей по направлению с субъединицей γ , то каждая из субъединиц α и β переместится соответственно на место другой аналогичной субъединицы, в результате поворота на 60° субъединицы α и β поменяются местами.

Субъединица γ имеет вид слегка изогнутого стержня длиной около 90 Å, образованного двумя протяженными полипептидными цепями. Ее нижняя часть выступает приблизительно на 30 Å из шара, образованного субъединицами α и β (рис. 3). В центре всего ансамбля находятся минорные субъединицы δ и ϵ . Субъединицы γ и δ играют роль связующего звена между мембранным (F_0) и водо-

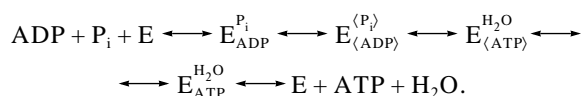
растворимым (F_1) фрагментами АТРсинтазы. Субъединица ϵ выполняет функции регулятора активности фермента.

Взаимодействие фермента с АТР и АDP. Центры связывания АТР и АDP ферментом находятся на субъединицах α и β , каждая из которых может удерживать по одной молекуле АТР или АDP. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, участки связывания молекул АDP и АТР находятся на стыках между α - и β -субъединицами. Известно, что лишь β -субъединицы выполняют каталитические функции синтеза и гидролиза АТР. За счет некоторого различия в составе и способе укладки полипептидных цепей субъединиц α и β они по-разному взаимодействуют с молекулами АТР, АDP и P_i . Связываемые каталитическими центрами β -субъединиц молекулы АТР и АDP могут обмениваться с другими молекулами АDP и АТР. Напротив, молекулы АТР и АDP, связываемые α -субъединицами, удерживаются настолько прочно, что в ходе функционирования фермента они практически не обмениваются с молекулами АТР и АDP, находящимися во внешней среде. Эти прочно связанные α -субъединицами молекулы АТР и АDP, по-видимому, не имеют прямого отношения к образованию АТР из АDP и P_i , а выполняют лишь определенные регуляторные функции.

ЭНЕРГЕТИКА СИНТЕЗА АТР В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ФЕРМЕНТА

Работа H^+ АТРсинтазы в качестве молекулярной машины по синтезу АТР связана с ее структурными перестройками, в ходе которых изменяются состояния каталитических центров фермента. Каждая из трех каталитических β -субъединиц может поочередно находиться в одном из трех конформационных состояний, различающихся по степени сродства молекул АТР, АDP и P_i к каталитическому центру. Эти состояния схематически показаны на рис. 5: 1 – состояние “открытого” центра, с которым могут связаться молекулы АDP и P_i ; 2 – состояние с “закрытым” каталитическим центром, который прочно удерживает молекулы АТР, АDP и P_i ; 3 – состояние, в котором ослабляется связь молекулы АТР с каталитическим центром и происходит ее диссоциация в раствор.

Рассмотрим последовательность событий, приводящих к образованию АТР из АDP и P_i . Схему реакций ферментативного синтеза АТР можно записать следующим образом:



Здесь символом E обозначена каталитическая β -субъединица фермента, свободная от субстратов (АDP и P_i) и продуктов (АТР) реакции. Символы

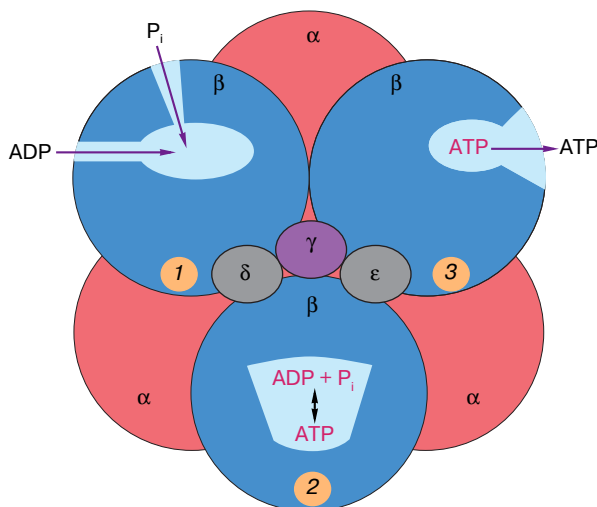


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая энергетически зависимые изменения состояний каталитических центров.

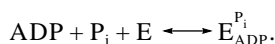
Состояние 1 – каталитический центр субъединицы β открыт; в этом состоянии молекулы ADP и P_i связываются и сравнительно слабо удерживаются активным центром субъединицы β.

Состояние 2 – каталитический центр закрыт; молекулы ADP и P_i прочно удерживаются каталитическим центром. В этом состоянии из связанных молекул ADP и P_i может образоваться молекула ATP, прочно удерживаемая каталитическим центром фермента.

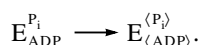
Состояние 3 – связь молекулы ATP с каталитическим центром ослаблена, образовавшаяся из ADP и P_i молекула ATP диссоциирует в раствор. Результатом последовательных конформационных перестроек (состояние 1 → состояние 2 → состояние 3) является образование ATP из ADP и P_i.

$E_{ADP}^{P_i}$ и $E_{(ADP)}^{(P_i)}$ обозначают β-субъединицы, содержащие соответственно слабо- и прочносвязанные молекулы ADP и P_i. Символами $E_{(ATP)}^{H_2O}$ и $E_{ATP}^{H_2O}$ обозначены β-субъединицы, содержащие прочно- и слабосвязанные молекулы ATP.

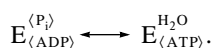
Самым первым актом в цепи событий, приводящих к образованию ATP, является связывание молекул ADP и P_i активным центром свободной β-субъединицы, находящейся в состоянии 1,



За счет энергии внешнего источника в молекуле F₁ происходят конформационные изменения, в результате которых ADP и P_i становятся прочно связанными с каталитическим центром (состояние 2),



В этом состоянии в каталитическом центре фермента становится возможным образование ATP:



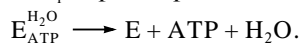
Следует особо отметить, что на данной стадии работы АТФсинтазы, когда происходит образование ковалентной связи между фосфатными группами молекул ADP и P_i, ферменту практически не требуется энергии. Этот факт был впервые установлен Бойером с сотрудниками, которые с помощью радиоактивных изотопов O¹⁸ и P³² показали, что реакции синтеза и гидролиза АТФ в каталитическом центре фермента активно идут при отсутствии внешнего источника энергии, поскольку они наблюдаются даже в разобренных хлоропластах и митохондриях. Очевидно, что условия, в которых находятся молекулы ADP и P_i в каталитическом центре, существенно отличаются от условий протекания реакции в водной среде, благодаря чему образование молекулы АТФ в активном центре фермента может происходить энергетически “бесплатно”. Установлено, что константа равновесия *K* реакции $E_{(ADP)}^{(P_i)} \longleftrightarrow E_{(ATP)}^{H_2O}$ близка к единице, $K \approx 1$. Это означает, что с приблизительно равной вероятностью в каталитическом центре можно обнаружить молекулу ADP или молекулу АТФ. Равновесие $E_{(ADP)}^{(P_i)} \longleftrightarrow E_{(ATP)}^{H_2O}$ имеет динамический характер: в каталитическом центре фермента самопроизвольно идут многочисленные акты образования и разрыва ковалентной связи между фосфатными группами ADP и P_i.

В результате работы H⁺АТФсинтазы в цитоплазме клетки появляются новые молекулы АТФ. В водных растворах синтез АТФ является энергетически невыгодным процессом. К тому же, как мы только что отметили, непосредственно в активном центре фермента образование молекулы АТФ происходит энергетически бесплатно. Возникает вопрос: на каких стадиях работы H⁺АТФсинтаза использует энергию внешнего источника? Исследования Бойера, Слейтера и других ученых показали, что в цикле ферментативного синтеза АТФ энергия необходима в первую очередь для освобождения прочно связанной молекулы АТФ из каталитического центра. Действительно, пока молекула АТФ, образовавшаяся энергетически бесплатно, прочно удерживается ферментом, она никак не может быть использована другими ферментами, для работы которых требуется энергия гидролиза АТФ. Иными словами, прочно связанная молекула АТФ может стать источником свободной энергии только после ее диссоциации в раствор.

Поэтому следующий этап работы фермента заключается в том, что в результате энергетически зависимого структурного изменения молекулы F₁ каталитическая субъединица β, содержащая прочно связанную молекулу АТФ, переходит в новое состояние, в котором связь АТФ с каталитическим центром ослаблена:



В результате этого молекула АТФ покидает фермент, уступая место в каталитическом центре другим молекулам АDР и P_i из раствора:



Оказавшись свободной, субъединица β возвращается в исходное конформационное состояние 1, благодаря чему и обеспечивается цикличность работы фермента.

Описанные выше переходы между состояниями 1 → 2 → 3 (рис. 5) происходят в результате энергозависимых структурных перестроек H⁺АТФсинтазы, которые осуществляются за счет энергии внешнего источника. Эти перестройки имеют кооперативный характер — они одновременно затрагивают состояния всех трех каталитических субъединиц β, входящих в состав H⁺АТФсинтазы. В результате трех последовательных структурных переходов одной β-субъединицы в растворе появится одна новая молекула АТФ и станет меньше на одну молекулу АDР и одну молекулу P_i. Однако, учитывая, что молекула F₁ содержит три β-субъединицы, то после каждого энергозависимого структурного перехода H⁺АТФсинтазы в растворе будет появляться одна новая молекула АТФ.

Структурные особенности строения молекулы F₁ давно делали весьма привлекательной гипотезу о том, работа H⁺АТФсинтазы связана с механическими движениями ее отдельных частей. Можно было предположить, что за счет энергии внешнего источника происходит вращение ансамбля субъединиц α₃β₃ вокруг расположенной в его центре субъединицы γ (либо поворот субъединицы γ внутри всего комплекса F₀F₁). Такому вращению может способствовать наличие своеобразной смазки в местах контакта субъединицы γ с остальными субъединицами молекулы F₁. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, центральная часть субъединицы γ гидрофобна, то есть не содержит заряженных групп, которые могли бы создавать трение, препятствующее вращению ансамбля субъединиц α₃β₃ относительно субъединицы γ. Учитывая некоторую асимметрию в строении субъединицы γ (субъединица γ имеет форму слегка изогнутого стержня), нетрудно представить, что после поворота всего ансамбля α₃β₃ одновременно изменятся структурные состояния всех трех каталитических субъединиц β (переходы 1 → 2, 2 → 3, 3 → 1). Таким образом, в результате поворота ансамбля α₃β₃ вокруг субъединицы γ на 120° в растворе станет меньше на одну молекулу АDР и одну молекулу P_i, но вместо них появится одна новая молекула АТФ.

В самое последнее время появились прямые доказательства того, что субъединица γ действительно может вращаться относительно фактора сопряжения F₁. Это удалось сделать группе японских исследователей [8], которые с помощью флуоресцентного микроскопа впервые непосредственно наблюдали за движением субъединицы γ при работе

фермента (гидролиз АТФ молекулой F₁). Чтобы сделать видимым это движение, они воспользовались хитроумными приемами молекулярной биологии. К выступающему вниз основанию подвижной субъединицы γ (со стороны F₀) им удалось химически “пришить” молекулу специального маркера — флуоресцирующий фрагмент нити актина (белок, входящий в состав мышц) длиной около одного микрона, за движением которого можно наблюдать с помощью микроскопа. Остальную часть молекулы F₁ они обездвигили, прочно “пришив” все три субъединицы β к неподвижной подложке. В ходе работы фермента (гидролиз АТФ) наблюдалось направленное против часовой стрелки вращение молекулы нити актина, химически связанной с субъединицей γ. При отсутствии источника энергии (когда система не содержала молекул АТФ) регулярного вращения субъединицы γ не происходило, а наблюдались лишь случайные флуктуации, обусловленные тепловыми движениями. Таким образом впервые была наглядно продемонстрирована работа самого маленького из всех известных моторов! Размеры этой молекулярной машины (субъединица γ — ротор, а ансамбль субъединиц α₃β₃ — статор), как мы отмечали выше, составляют всего лишь 80 × 100 Å. Максимальная скорость вращения такого макромолекулярного мотора достигала четырех оборотов в секунду. Это, конечно, ниже скорости вращения ротора (17 оборотов в секунду), которую можно было бы ожидать исходя из того, что в нормальных условиях (без нагрузки) одна молекула фермента гидролизует 52 молекулы АТФ в секунду. Однако не следует забывать, что вращение длинного хвоста, пришитого к субъединице γ для того, чтобы можно было наблюдать ее вращение, представляет собой большую гидродинамическую нагрузку для мотора макромолекулярных размеров. Вращательный момент, развиваемый этим мотором, превышает величину 4,5 · 10⁻²⁰ Н · м.

Обычно считается, что производство АТФ молекулой H⁺АТФсинтазы представляет собой реакцию, обратную реакции ферментативного гидролиза АТФ. Поэтому можно предположить, что направление работы H⁺АТФсинтазы — синтез или гидролиз АТФ — непосредственно связано с направлением механического вращения этого макромолекулярного мотора.

Под действием каких сил происходят структурные перестройки фермента, вызывающие изменение сродства молекул АТФ, АDР и P_i к каталитическим субъединицам в ходе функционирования H⁺АТФсинтазы? Имеются все основания думать, что это может происходить в результате электростатических взаимодействий, инициированных процессами протонирования и ионизации кислотных групп А аминокислотных остатков, входящих в состав фактора сопряжения F₁,



Протонирование этих групп может происходить за счет достаточно высокой концентрации ионов водорода со стороны сопрягающей мембраны, где находится протонпроводящий канал F_0 , подводящий ионы водорода к F_1 . Если с противоположной стороны мембраны, куда обращена молекула F_1 , концентрация ионов водорода ниже, чем со стороны F_0 , то в эту область может диссоциировать протон группы АН. В результате этого ионы водорода из области с высоким протонным потенциалом (со стороны F_0) будут проходить через F_0F_1 -комплекс на другую сторону сопрягающей мембраны, обеспечивая тем самым попеременное протонирование и депротонирование функционально важных групп фермента. Перенос ионов протонов через F_0F_1 -комплекс может происходить также под действием электрического поля при наличии разности потенциалов на сопрягающей мембране. До тех пор, пока за счет работы цепи электронного транспорта на мембране будет поддерживаться поток протонов через H^+ АТРсинтазу, циклический процесс протонирования и депротонирования функциональных кислотных групп фермента будет повторяться многократно, обеспечивая тем самым синтез новых молекул АТР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере работы H^+ АТРсинтазы мы попытались проиллюстрировать некоторые основные принципы работы молекулярных преобразователей энергии в клетке. Функционирование этого самого главного фермента мембранной биоэнергетики можно уподобить работе электромеханической машины, содержащей вращающиеся «детали». Подобно тому как электрический ток в обмотке электродвигателя приводит во вращение ротор относительно статора, направленный перенос протонов через H^+ АТРсинтазу может вызывать вращение отдельных субъединиц фактора сопряжения F_1 относительно других субъединиц ферментного ком-

плекса. Поэтому до тех пор, пока через H^+ АТРсинтазу течет электрический ток (в отличие от обычного электродвигателя его носителями являются протоны), это уникальное макромолекулярное энергопреобразующее устройство будет способно совершать химическую работу — синтезировать молекулы АТР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976.
2. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. 2-е изд. М.: Мир, 1994. Т. 1.
3. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. М.: Мир, 1967.
4. Николс Д.Д. Биоэнергетика: Введение в хемиосмотическую теорию. М.: Мир, 1985.
5. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989.
6. Тихонов А.Н. Трансформации энергии в хлоропластах — энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 24–32.
7. Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Luter R., Walker J.E. Structure at 2,8 Å Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria // Nature. 1994. Vol. 370. P. 621–628.
8. Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K., jr. Direct Observation of the Rotation of F1-ATPase // Ibid. 1997. Vol. 386. P. 299–302.

* * *

Александр Николаевич Тихонов, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник кафедры биофизики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизика фотосинтеза, биоэнергетика, магнитная радиоспектроскопия. Автор трех книг (совместно с Л.А. Блюменфельдом, А.К. Кукушкиным, В.А. Твердисловым и Л.В. Яковенко) и более 130 статей в отечественных и зарубежных научных журналах.