

Часть третья

ПОТРЕБИТЕЛИ $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$

ГЛАВА СЕДЬМАЯ

ХИМИЧЕСКАЯ РАБОТА ЗА СЧЕТ $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$

Описано пять ферментных систем, которые можно рассматривать в качестве потребителей $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, совершающих химическую работу: H^+ -АТФ-синтаза; H^+ -пирофосфат-синтаза; H^+ -трансгидрогеназа; обратная NADH-CoQ-редуктаза; обратная CoQH₂-цитохром *c*-редуктаза.

В первых двух случаях энергия утилизируется для образования макроэргической фосфоангидридной связи (синтез АТФ из ADP и P_i или PP_i из P_i), в трех других — для переноса восстановительных эквивалентов против градиента редокс-потенциала. Среди всех этих систем особенно важной представляется H^+ -АТФ-синтаза, ответственная за взаимопревращение основных «конвертируемых валют» живой клетки — мембранной ($\Delta\bar{\mu}_{H^+}$) и водорастворимой (АТФ). Вот почему на сегодня H^+ -АТФ-синтаза относится к числу наиболее интенсивно изучаемых ферментов.

7.1. H^+ -АТФ-синтаза

H^+ -АТФ-синтаза — фермент, катализирующий обратимое фосфорилирование ADP неорганическим фосфатом за счет энергии $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. Обнаружен в митохондриях, хлоропластах, дышащих и фотосинтезирующих бактериях.

Как будет подробно описано в конце данной главы, во многих анаэробных бактериях, таких, как, например, *Lactococcus casei* или *Enterococcus hirae*, очень похожий фермент осуществляет обратный процесс ($ATP \rightarrow ADP + P_i + \Delta\bar{\mu}_{H^+}$). Эта функция рассматриваемой системы, единственная у *L. casei* и *E. hirae*, играет подчиненную роль у аэробных и фотосинтезирующих клеток или органелл.

7.1.1. Субъединичное строение H^+ -АТФ-синтазы

Несмотря на значительное разнообразие встречающихся в живых организмах первичных генераторов $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ (см. предыдущие главы), H^+ -АТФ-синтазные комплексы, выделенные из разных источников, имеют весьма сходное строение. Каждый из них может быть разделен на два субкомплекса,

один из которых отвечает за трансмембранный транспорт протонов (F_0), а другой — за синтез или гидролиз АТФ (F_1)*.

Для H^+ -АТФ-синтазы *E. coli* известен субъединичный состав, аминокислотная последовательность и структура оперона. У этой бактерии фактор F_1 состоит из пяти типов субъединиц (α – ϵ), а фактор F_0 — из трех (a – c) (табл. 7.1) в следующей стехиометрии: $3\alpha : 3\beta : \gamma : \delta : \epsilon : a : 2b : 10c^{**}$. Молекулярные массы F_1 , F_0 и комплекса F_0F_1 оказались для *E. coli* равными соответственно 381, ~145 и ~525 кДа.

Комплекс F_0F_1 *E. coli* кодируется одним опероном (*unc*, или *atp*). Его размер около 7 тыс. пар нуклеотидов. Порядок генов соответствует трансляции матричной РНК, кодирующей субъединицы I , a , b , c , δ , α , γ , β и ϵ , где символом I обозначен гипотетический белок с неизвестными функциями, который отсутствует в очищенном F_0F_1 .

Митохондриальная H^+ -АТФ-синтаза также состоит из субкомплекса F_1 (шесть типов основных субъединиц), субкомплекса F_0 (три типа основных субъединиц) и еще нескольких дополнительных субъединиц. При этом фактор F_1 содержит субъединицы 3α , 3β , γ , δ , ϵ и белок OSCP. Крупные субъединицы (α и β) очень напоминают таковые *E. coli*. Так, в β -субъединицах фактора F_1 из митохондрий сердца быка, дрожжей, *E. coli* и хлоропластов содержание консервативных последовательностей составляет около 70%. Подобная ситуация наблюдается и в случае α -субъединицы.

Таблица 7.1. Субъединичный состав H^+ -АТФ-синтазы *E. coli*

Комплекс <i>E. coli</i>	Субъединица <i>E. coli</i>	Аналог субъединицы в митохондриях	Молекулярная масса, кДа	Количество аминокислотных остатков	Количество субъединиц на один F_0F_1
F_1	α	α	55,0	513	3
	β	β	50,0	459	3
	γ	γ	31,5	287	1
	δ	OSCP	19,5	177	1
	ϵ	δ и ϵ	15,0	138	1
F_0	a	a	30,0	271	1
	b	b	17,0	156	2
	c	c	8,0	79	10

Сравнение остальных субъединиц факторов F_1 из *E. coli* и митохондрий животных показало, что субъединицы γ у этих организмов похожи, а δ и ϵ — отличны (см. также рис. 7.5). В первом приближении митохондриаль-

* Кроме АТФ-синтаз F_0F_1 -типа в живых организмах встречаются также весьма сходные с ними АТФ-синтазы (АТРазы) V_0V_1 - и A_0A_1 -типа, описанию которых мы посвятим последние разделы данной главы.

** Количество входящих в фактор F_0 субъединиц типа c будет подробно рассмотрено далее.

ные субъединицы δ и ϵ в сумме соответствуют ϵ -субъединице *E. coli*. Митохондриальный фактор F_1 содержит дополнительный полипептид, так называемый белок, обуславливающий чувствительность к олигомицину (*oligomycin sensitivity conferring protein*, или *OSCP*). Этот компонент в основном гомологичен δ -субъединице *E. coli*, но имеет несколько большую молекулярную массу (21 кДа по сравнению с 19,3 кДа δ -субъединицы *E. coli*), содержит гидрофобный участок вблизи N-концевой последовательности и несколько протяженных отрезков, гомологичных не δ -, а b -субъединице *E. coli*.

Фактор F_0 из митохондрий животных имеет строение, сходное с *E. coli*, и его основными субъединицами являются полипептиды a , b и c . Однако субъединица b из митохондрий животных несколько видоизменена по сравнению с бактериями, и в состав фактора F_0 животных входит, по-видимому, лишь один полипептид типа b , а не два. На сегодняшний день принята следующая стехиометрия основных субъединиц в АТФ-синтазе животных — $3\alpha : 3\beta : \gamma : \delta : \epsilon : OSCP : a : b : 8c$.

В H^+ -АТФ-синтазе митохондрий находят несколько дополнительных полипептидов, которые отсутствуют у бактерий. Это субъединица $A6L$ фактора F_0 ; фактор F_6 (9 кДа); белковый ингибитор фактора F_1 с массой 9,5 кДа, субъединица d с массой 18,5 кДа, которая наряду с F_6 и *OSCP* необходима для правильного связывания F_1 с F_0 , и некоторые другие субъединицы.

У животных и дрожжей все субъединицы фактора F_1 закодированы в ядерном геноме и синтезируются в цитоплазме. Среди компонентов фактора F_0 дрожжей митохондриальным геномом кодируются субъединицы a , c и $A6L$. Все прочие субъединицы имеют соответствующие гены в ядре. В гено-

ме митохондрий животных присутствуют два перекрывающихся гена, кодирующих субъединицы a и $A6L$ фактора F_0 ; все остальные субъединицы (в том числе и c) кодируются в ядре.

Субъединичный состав H^+ -АТФ-синтазы хлоропластов, обозначаемой CF_0CF_1 , в основном подобен таковому бактерий. Фактор F_1 имеет субъединичный состав $3\alpha : 3\beta : \gamma : \delta : \epsilon$. При этом ϵ -субъединица представляет собой полипептид бактериального типа. В то же время фактор CF_0 содержит не три, а четыре типа основных субъединиц — a , b , b' и c (субъединица b' является близким гомологом субъединицы b) в предполагаемой стехиометрии — $a : b : b' : 14c$. Отметим, что в состав CF_0 входит не гомодимер субъединиц b , а гетеродимер из двух разных (но довольно похожих) субъединиц b и b' .



Рисунок 7.1. Структура каталитической части H^+ -АТФ-синтазы: изолированный фактор F_1 из митохондрий сердца быка (негативный контраст); электронно-микроскопические фотографии 379 проекций пяти основных типов суммированы с использованием системы анализа изображений

7.1.2. Трехмерная структура и расположение в мембране

H^+ -АТР-синтазный комплекс так велик, что выдается в воду на довольно большое расстояние с одной стороны мембраны. Выступающая часть, которая представляет собой фактор F_1 , обращена в цитоплазму бактерий, матрикс митохондрии или строму хлоропласта.

Негативное окрашивание вывернутых субмитохондриальных пузырьков выявляет грибовидные выросты диаметром около 9 нм, располагающиеся по всей поверхности мембраны. Как показал Э. Ракер, выросты исчезают после сильного механического перемешивания суспензий пузырьков в растворе, содержащем этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) — комплексон на ионы Mg^{2+} . Этот процесс сопровождается потерей способности пузырьков синтезировать и расщеплять АТР, а также появлением в растворе сферических частиц диаметром 9 нм, обладающих АТРазной активностью. Реконструкция сферических частиц с мембраной пузырьков возвращает последним АТР-синтазную и АТРазную активности. Из этих наблюдений Э. Ракер заключил, что выступы представляют собой каталитическую часть H^+ -АТР-синтазы, т.е. фактор F_1 . После отщепления фактора F_1 в мембране остается часть H^+ -АТР-синтазы, ответственная за перенос ионов H^+ (фактор F_0), что приводит к значительному увеличению протонной проводимости этой мембраны. Результаты компьютерного анализа электронных микрофотографий фактора F_1 суммированы на рис. 7.1. Фронтальная проекция фактора F_1 имеет диаметр порядка 10 нм.

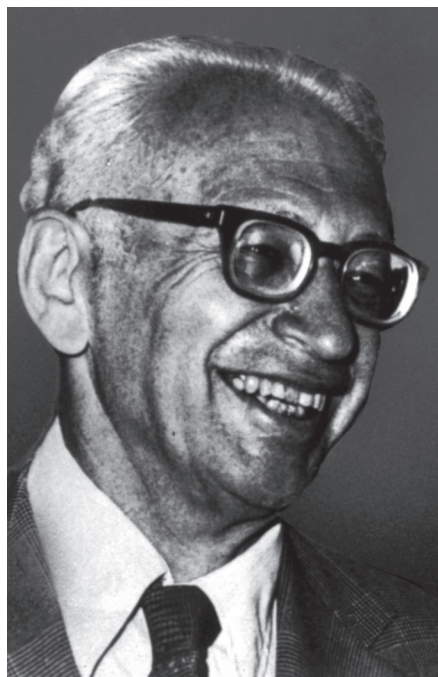


Рисунок 7.2. Э. Ракер

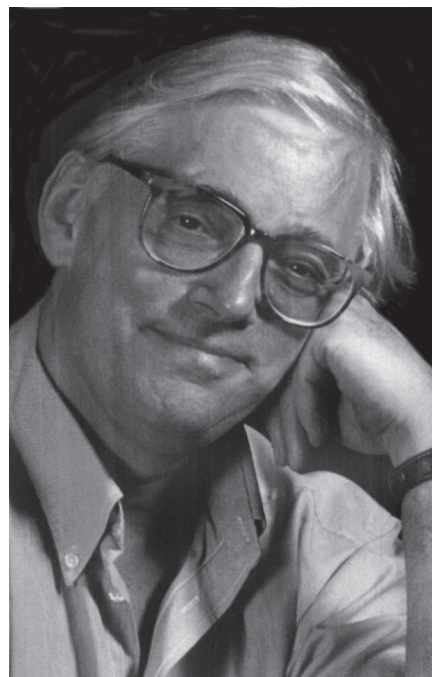


Рисунок 7.3. Дж. Уокер

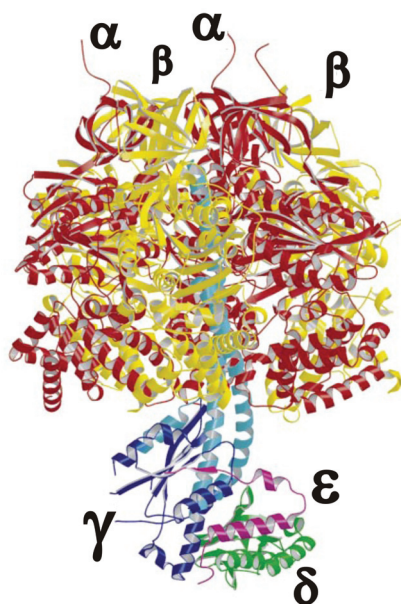


Рисунок 7.4. Структура основной части фактора F_1 митохондриальной H^+ -АТФ-синтазы. Различные субъединицы выделены следующими цветами: α — красный, β — желтый, γ — синий, δ — зеленый, ϵ — фиолетовый [Stock et al., 2000; Curr. Opin. Struct. Biol., 6: 672–679]

В настоящий момент трехмерная структура основной части митохондриального фактора F_1 определена с высоким разрешением (2,4 Å) методом рентгеноструктурного анализа. Эта работа была удостоена Нобелевской премии в 1997 г. (Дж. Уокер, рис. 7.3). Как видно на рис. 7.4, большая часть F_1 построена из субъединиц α , β и γ в стехиометрии 3:3:1. Эти субъединицы образуют сферическую глобулу. Центральная часть этой глобулы состоит из очень длинных α -спиральных участков γ -субъединицы, вокруг которой, попеременно чередуясь, расположены субъединицы α и β (это расположение часто сравнивают с положением долек в апельсине). Важно отметить, что γ -субъединица в центре глобулы занимает несколько асимметричное положение, по-разному взаимодействуя с различными субъединицами α и β . Субъединица γ значительно выступает за пределы $3\alpha:3\beta$ -глобулы с одной из ее сторон. Эта выступающая часть γ -субъединицы вместе с субъединицами δ и ϵ образует «стержень» фактора F_1 , связывающий его с фактором F_0 .

Интересно отметить: α - и β -субъединицы содержат в своем составе по одному центру для связывания нуклеотидов. Нуклеотид-связывающий домен обнаружен также и в составе γ -субъединицы. Однако при физиологических условиях этот домен, по-видимому, не способен к связыванию нуклеотидов и выполняет чисто структурную роль.

О трехмерной структуре остальной части АТФ-синтазы имеются лишь косвенные сведения, полученные с помощью дифракции электронов, ЯМР и за счет анализа первичных последовательностей субъединиц и различных возможностей их кросс-сшивок в составе F_0F_1 -комплекса. Комплекс F_0F_1 схематично изображен на рис. 7.5.

Трехмерная структура c -субъединицы *E. coli* в гидрофобном растворителе была определена методом ЯМР. Эта субъединица состоит из двух трансмембранных α -спиральных колонн, соединенных между собой с цитоплазматической стороны мембраны петлей из полярных аминокислотных остатков (см. рис. 7.6). С-концевая α -спиральная колонна содержит в своем составе (где-то на уровне середины гидрофобного слоя мембраны) консервативный остаток аспартата (Asp-61), играющий ключевую роль в процессе трансмембранного транспорта протонов. В составе фактора F_0 присутствует олигомер, состоящий из 8–14 субъединиц типа c . Совсем недавно строение этого

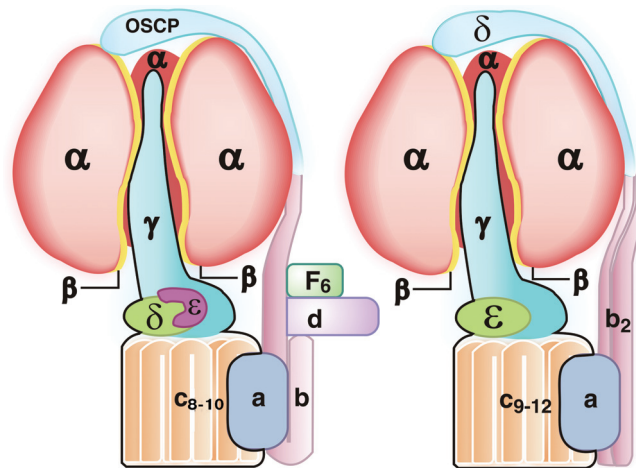


Рисунок 7.5. Схематическое изображение современных представлений о структуре F_0F_1 -АТФ-синтазы из митохондрий эукариот (слева) и бактерий (справа) [Stock et al., 2000; Curr. Opin. Struct. Biol., 6: 672–679]. Две β -субъединицы (желтый цвет) в основном прикрыты α -субъединицами, третья β -субъединица не показана. Не показаны также субъединица A6L и другие мелкие субъединицы митохондриального фактора F_0 , отсутствующие у бактерий [Stock et al., 2000; Curr. Opin. Struct. Biol., 6: 672–679]

c -олигомера Na^+ -АТФ-синтазы бактерии *Pyobacter tartaricus* было изучено с помощью рентгеноструктурного анализа. Как видно на рис. 7.7, c -субъединицы образуют в мембране «хоровод», как бы состоящий из двух вложенных колец. Внешнее кольцо состоит из С-концевых α -спиральных колонн c -субъединиц, а внутреннее кольцо — из их N-концевых α -спиральных колонн. Предполагается, что количество c -субъединиц может варьировать в АТФ-синтазах из различных организмов, а возможно, даже и в одном организме при различных условиях его функционирования. Так, считается, что в состав АТФ-синтазы митохондрий животных входит 8 c -субъединиц, митохондрий дрожжей — 10 c -субъединиц, в состав АТФ-синтазы хлоропластов — 14 c -субъединиц, а в состав натриевой АТФ-синтазы *I. tartaricus* — 11. Как мы увидим далее, переменная стехиометрия c -субъединиц может иметь существенное физиологическое значение, приводя к переменному соотношению H^+/ATP .

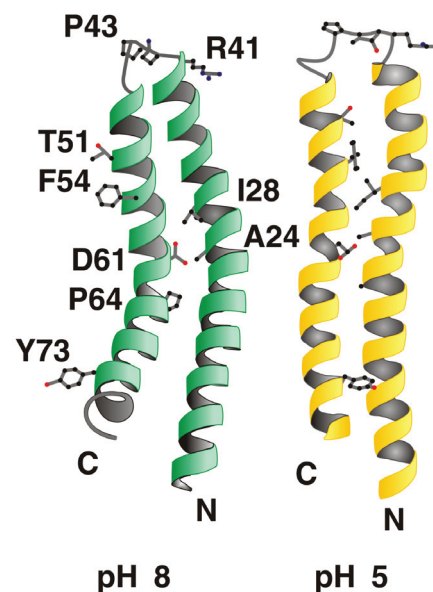


Рисунок 7.6. Структура c -субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы *E. coli* в гидрофобном растворителе, определенная методом ЯМР, для депротонированной (зеленый цвет, pH 8) и протонированной (желтый цвет, pH 5) форм [Rastogi & Girvin 1999, Nature, 402: 263–268]

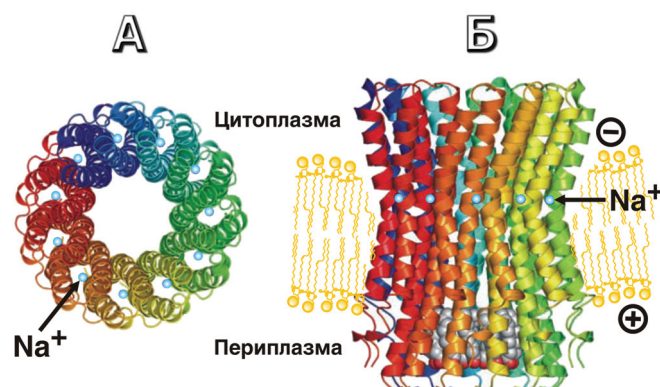


Рисунок 7.7. Структура c -олигомера натриевой АТФ-синтазы *I. tartaricus*. (А) вид перпендикулярно мембране, (Б) вид параллельно плоскости мембраны. Разные c -субъединицы указаны разным цветом. Синие сферы — связанные ионы натрия [Meier et al., 2005; Science, 308: 659–662]

Как видно на рис. 7.8, в составе F_0F_1 -комплекса олигомер c -субъединиц соединен с фактором F_1 посредством стержня АТФ-синтазы. Важно отметить, что стержень занимает асимметричное положение относительно c -олигомера, взаимодействуя с полярными петлями лишь шести из его субъединиц.

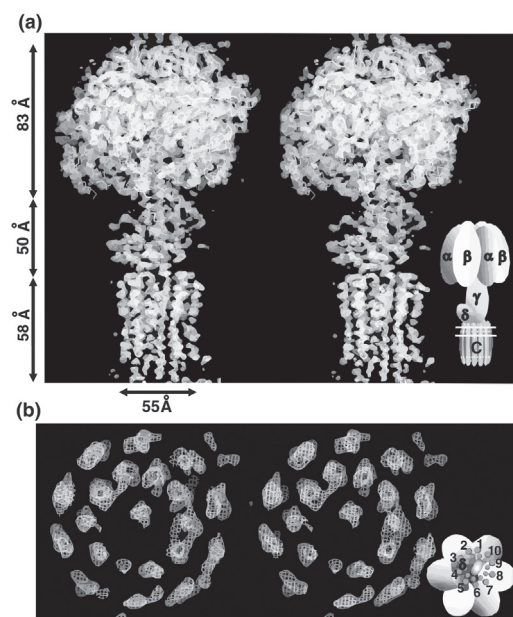


Рисунок 7.8. Стереонизображение F_1 - c_{10} комплекса из митохондрий *S. cerevisiae*. Вид сбоку (а) и вид снизу (б). Справа внизу изображены схемы с указанием расположения субъединиц [Stock et al., 2000; Curr. Opin. Struct. Biol., 6: 672–679]

О структуре остальных субъединиц фактора F_0 сегодня известно крайне мало. Исходя из анализа первичных последовательностей, предполагают, что a -субъединица гидрофобна и образует пять α -спиральных трансмембранных столбов, в которых имеется несколько консервативных остатков заряженных аминокислот (в случае с *E. coli* это Arg-210, His-245, Glu-196 и Glu-219). Не исключено, что эти остатки участвуют в формировании трансмембранного протонпереносящего пути, образуемого за счет взаимодействия субъединиц a и c .

Субъединица b более гидрофильна и в случае с *E. coli* пересекает мембрану, по-видимому, только один раз. Основная функция этой субъединицы,

скорее всего, заключается в формировании так называемой *периферической ножки*, также связывающей факторы F_0 и F_1 (см. рис. 7.5). Предполагается, что у *E. coli* в состав *периферической ножки* наряду с двумя b -субъединицами входит также δ -субъединица. В митохондриальной АТР-синтазе *периферическая ножка* сформирована, по-видимому, из субъединиц b , OSCP, d и F_6 в стехиометрии 1:1:1:1.

7.1.3. Гидролиз АТР изолированным фактором F_1

Фактор F_1 , будучи отделен от мембранного сектора H^+ -АТР-синтазы, сохраняет способность гидролизовать АТР до АДФ и фосфата. Реакция протекает с очень большой скоростью и утрачивает чувствительность к олигомицину, диэтилстильбестролу и низким концентрациям ДЦКД, отличаясь в этом отношении от АТР-азной активности нативного комплекса F_0F_1 .

Показано, что гидролиз АТР фактором F_1 происходит путем прямой атаки молекулой воды ангидридной связи АТР. Этот процесс протекает без образования ковалентных интермедиатов. Об этом свидетельствуют как данные опытов по изотопному обмену, так и тот факт, что гидролиз АТР фактором F_1 устойчив к ванадату, гидроксиламину и другим реагентам на ацилфосфат.

Как было отмечено в предыдущем разделе, установлено, что в факторе F_1 присутствуют шесть потенциальных нуклеотид-связывающих центров: по одному на каждую α - и β -субъединицу*. Из биохимических экспериментов известно, что F_1 может связывать шесть молекул адениннуклеотидов. Однако лишь центры на β -субъединицах обменивают связанные и свободные нуклеотиды со скоростями, сопоставимыми со временем оборота данного фермента. Исходя из этого, считается, что в факторе F_1 лишь три центра на β -субъединицах выполняют каталитические функции, в то время как нуклеотидные центры на α -субъединицах выполняют структурную роль (связывают между собой α - и β -субъединицы), а также, возможно, участвуют в регуляции активности АТР-синтазы.

Удивительной особенностью фактора F_1 является то, что три каталитических центра этого фермента обладают различной аффинностью к нуклеотидам. Один из центров («Т-центр», от английского *tight*) обладает исключительно высоким сродством к АТР или к $ADP + P_i$ с константой связывания для них в диапазоне от 10^{-12} до 10^{-8} М. Два других центра («L-» и «O-» центры, от *loose* и *open* соответственно) связывают нуклеотиды лишь при высокой их концентрации ($K_s = 10^{-6}$ – 10^{-3} М) и, по-видимому, обладают различной избирательностью по отношению к АТР и АДФ (см. рис. 7.9). Различие каталитических центров фактора F_1 связано с разными конформационными состояниями, в которых находятся различные α - и β -субъединицы этого белка. По-видимому, это обусловлено асимметрич-

* Необходимо отметить, что на самом деле все нуклеотид-связывающие центры расположены в области контактов α - и β -субъединиц. Однако для простоты изложения мы будем полностью приписывать эти центры тем субъединицам, большее число аминокислотных остатков которых вовлечено в формирование соответствующих центров.

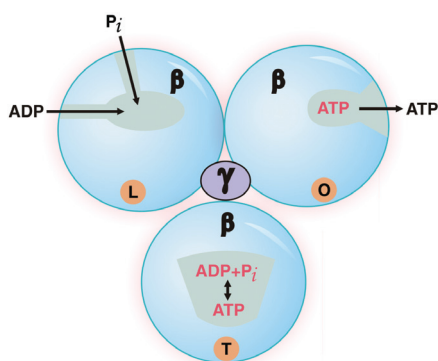


Рисунок 7.9. Схема каталитических сайтов F_0F_1 -АТР-синтазы. Сайт L связывает субстраты АТР-синтазной реакции ($ADP + P_i$). Сайт T обладает очень высоким сродством к АТФ или $ADP + P_i$ и катализирует их энерго-независимое взаимопревращение. В сайте O происходит высвобождение синтезированного АТФ (или связывается АТФ при его гидролизе)



Рисунок 7.10. А.Д. Виноградов

ным расположением γ -субъединицы внутри $3\alpha:3\beta$ -глобулы.

При низкой концентрации меченого АТФ, т.е. в условиях, когда заполняется только один центр связывания нуклеотидов (Т-центр), гидролиз АТФ³² фактором F_1 идет очень медленно (так называемый *одноцентровый катализ*). При добавлении к этой смеси избытка немеченого АТФ происходит связывание «холодного» АТФ в L-центре, что вызывает многократное ускорение реакции гидролиза АТФ³², обусловленного увеличением скорости высвобождения продуктов АТР-синтазной реакции (ADP и P_i ³²) из Т-центра. Таким образом, при связывании второй молекулы АТФ в L-центре Т-центр меняет сродство к нуклеотидам и переходит в состояние О (другими словами, между различными центрами фактора F_1 наблюдается отрицательная кооперативность в связывании нуклеотидов, но положительная кооперативность в осуществлении катализа). По-видимому, гидролиз АТФ сопровождается последовательным изменением конформации нуклеотид-связывающих центров: $O \rightarrow T \rightarrow L \dots$ Так, в ходе катализа все три центра проходят через идентичные конформационные состояния, но в любое фиксированное время все три центра находятся в разных конформациях. Было выдвинуто предположение, что подобный механизм гидролиза АТФ фактором F_1 может быть достигнут при последовательном изменении положения γ -субъединицы относительно разных α - и β -субъединиц; например, при ее вращении внутри $3\alpha:3\beta$ -глобулы.

Гидролиз АТФ F_0F_1 -комплексом находится под регуляторным контролем различных параметров энергетического статуса клетки. Как показали А. Д. Виноградов и сотрудники, гидролиз АТФ изолированным митохондриальным

фактором F_1 сильно тормозится одним из продуктов реакции — ADP. Этот эффект значительно усиливается в присутствии азида и предотвращается в присутствии сульфита. Установлено, что для удаления ADP из ингибированного фактора F_1 , находящегося в составе мембранного F_0F_1 -комплекса, требуется $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. Это означает, что торможение посредством ADP может развиваться только в том случае, если $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ снижен, т.е. именно тогда, когда есть опасность истощения фонда АТР в клетке за счет обращения H^+ -АТР-синтазной реакции. В митохондриях ту же функцию, что и ADP, может выполнять особый полипептид — *белковый ингибитор*. Подобно ADP, белковый ингибитор подавляет АТРазную активность изолированного фактора F_1 , а также комплекса F_0F_1 в мембране в условиях, когда $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ снижен.

7.1.4. Синтез связанного АТР изолированным фактором F_1

В 1982 г. Р. Фелдмэн и Д. Сигмэн показали, что *очищенный фактор CF_1 , полученный из хлоропластов, может синтезировать АТР из прочно связанного ADP в ответ на добавление в раствор неорганического фосфата*. Синтезированный АТР оставался связанным с CF_1 и мог быть переведен в раствор только путем денатурации фермента. Позднее появились данные о синтезе связанного АТР из ADP и P_i , добавленных к раствору митохондриального фактора F_1 .

Теоретический расчет, сделанный в лаборатории одного из авторов, показывает, что константа равновесия гидролиза АТР в Т-центре фактора F_1 не превышает 100 и по всей вероятности близка к единице. Это означает, что синтез *связанного АТР* в Т-центре требует гораздо меньше энергии, чем синтез *свободного АТР* в растворе (или, другими словами, сродство Т-центра к АТР значительно выше, чем к ADP + P_i). Дело в том, что электронная структура ангидридной связи в связанном АТР сильно отличается от свободного АТР из-за взаимодействия с группами белка (см. рис. 7.12). Можно предположить, что (как это было впервые отмечено П.Д. Бойером в 1973 г.) при синтезе АТР энергия $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ тратится не на стадии синтеза фосфоангидридной связи, а на стадии высвобождения АТР из каталитического центра. Соответственно при гидролизе АТР энергия выделяется не при разрыве фосфоангидридной связи, а при связывании АТР с Т-центром.

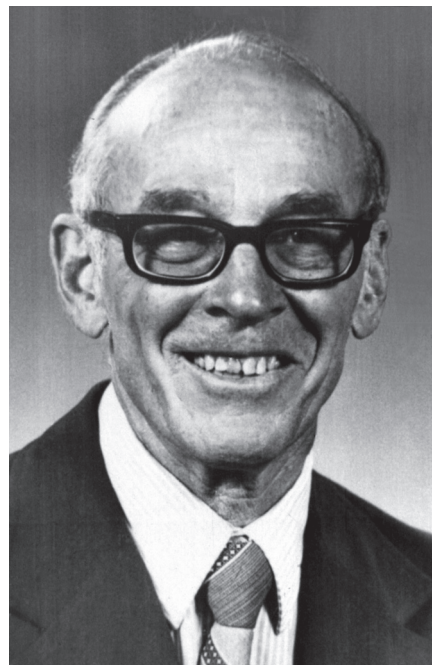


Рисунок 7.11. П. Бойер

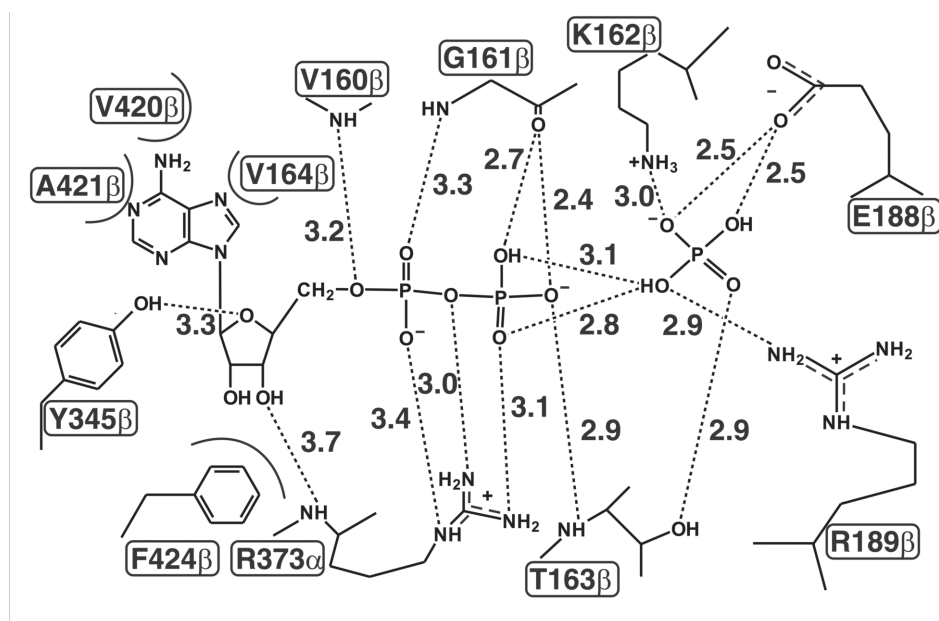


Рисунок 7.12. Структура ADP и P_i в активном центре фактора F_1 . Цифры у пунктирных прямых — расстояние в Å

7.1.5. Проведение протонов через фактор F_0

Удаление фактора F_1 из тилакоидов, хромофоров, суббактериальных или субмитохондриальных пузырьков приводит к появлению *протонной проводимости через фактор F_0* . Протеолипосомы с фактором F_0 также характеризуются высокой проводимостью для протонов. Эффект снимается добавлением специфического блокатора F_0 дициклогексилкарбодиимида (ДЦКД). Реконструкция фактора F_0 с фактором F_1 также подавляет утечку протонов.

В опытах с бактериями показано, что мутация по любой из трех субъединиц фактора F_0 приводит к потере его способности проводить протоны. По-видимому, основную роль в транспорте протонов играют субъединицы a и c , и трансмембранный протон-переносящий путь формируется в месте контакта этих субъединиц. В c -субъединицах фактора F_0 из различных организмов содержится остаток аспартата или глутамата, абсолютно необходимый для переноса протонов (для *E. coli* это Asp-61). Он располагается на расстоянии 1,8 нм от поверхности мембраны, т.е. примерно в середине гидрофобного барьера. Его замена на Asn или Gln полностью прекращает как транспорт H^+ , так и синтез АТФ за счет $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. Трансмембранные α -спиральные колонны субъединицы a также содержат несколько консервативных остатков заряженных аминокислот (Arg-210, His-245, Glu-196 и Glu-219). Предполагается, что эти остатки участвуют в формировании протон-проводящего пути.

Характерной чертой фактора F_0 является его чувствительность к ДЦКД. ДЦКД является ковалентным модификатором карбоксильных групп в их протонированной форме, и при низких его концентрациях он избирательно присоединяется к *Asp-61* c -субъединиц АТРсинтазы. Данная модификация *Asp-61* полностью ингибирует H^+ -проводящую функцию F_0 . Интересно отметить, что для полной инактивации фермента, по-видимому, достаточно модифицировать лишь один c -полипептид из олигомера этих субъединиц.

Митохондриальный фактор F_0 наряду с ДЦКД также ингибируется *олигомицином*. Выделены мутанты дрожжей, у которых H^+ -проводимость через F_0 резистентна к этому антибиотику. Ответственными за резистентность оказались два локуса в субъединице a . Оба они консервативны у человека и мыши. В то же время в a -субъединице *E. coli* обнаружен только один из консервативных локусов, что согласуется с наблюдением о слабом эффекте олигомицина на АТР-синтазу этой бактерии.

Фактор F_0 вряд ли представляет собой просто пору, так как зависимость скорости переноса H^+ через F_0 имеет сложную форму с оптимумом при pH 7–9. Эти данные указывают на наличие нескольких мест связывания иона H^+ . Таких мест в факторе F_0 , по-видимому, два, и они расположены с разных сторон мембраны. Наибольшие значения H^+ -проводимости были получены для фактора F_0 хлоропластов и фотосинтезирующих бактерий: $\sim 6000 H^+$ в секунду на один F_0 при $\Delta\Psi = 100$ мВ. Однако даже эта величина, вероятно, слишком низка для H^+ -проводящего механизма типа канала.

Для объяснения перечисленных выше структурных особенностей F_0 , кинетических характеристик транспорта протонов этим фактором, а также его инактивации под действием ДЦКД была предложена модель функционирования фактора F_0 , представленная на рис. 7.13. Данная модель основана на постулировании существования в факторе F_0 двух протонных полуканалов с разных сторон мембраны. Перенос протонов между этими полуканалами происходит параллельно поверхности мембраны за счет переноса протонированного остатка аспартата (глутамата) субъединицы c . Такое движение карбоксильной группы может быть достигнуто за счет вращения c -олигомера относительно субъединицы a . При этом данная карбоксильная группа должна депротонироваться при взаимодействии с субъединицей a и протонироваться при выходе из этого контакта. Таким образом, при функционировании рассматриваемого механизма транспорт протонов через фактор F_0 должен быть сопряжен с вращением c -олигомера.

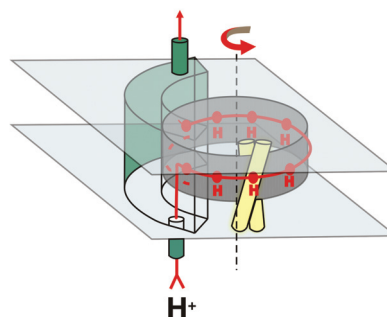


Рисунок 7.13. Схема возможного механизма транспорта протонов фактором F_0 . Субъединицы a и c показаны соответственно зеленым и желтым цветом [Junge et al., 2001; FEBS Lett., 504: 152–160]

7.1.6. Возможный механизм преобразования энергии F_0F_1 -АТРсинтазой

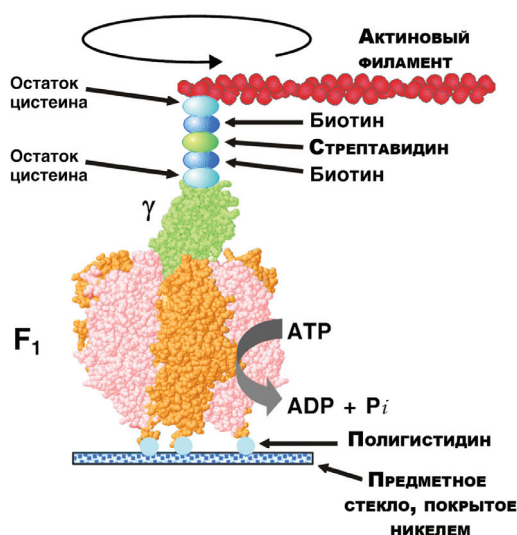
Основные принципы функционирования АТРсинтазы уже были нами вкратце описаны в предыдущих разделах этой главы. Прежде всего, по-видимому, *ADP и фосфат, связанные с фактором F_1 , могут образовать связанный АТР без какого-либо притока энергии извне, а энергия требуется для освобождения связанного АТР из активного центра фактора F_1 в воду.*

То, что освобождение АТР, связанного фактором F_1 , действительно поддерживается энергией $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, показано в опытах, когда изучали торможение АТРАЗы субмитохондриальных пузырьков негидролизующим аналогом АТР — 5-аденилилимидодифосфатом (AMPPNP). Короткая предынкубация пузырьков с AMPPNP в среде с сукцинатом в аэробных условиях полностью снимала торможение АТРАЗной активности, если ее измеряли в присутствии разобщителя, добавленного *после* сукцината. Если же разобщитель был добавлен в среду с субмитохондриальными пузырьками *до* сукцината, то в этом случае торможение сохранялось. Именно такого эффекта можно было ожидать, если $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, генерируемая при окислении сукцината, удаляет AMPPNP из каталитического центра.

Встает вопрос, каким же образом энергия $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ может быть потрачена для изменения сродства каталитических центров АТР-синтазы к нуклеотидам? Напомним, что транспорт протонов осуществляется в факторе F_0 , в то время как нуклеотид-связывающие центры расположены в факторе F_1 . Таким образом, для совершения химической работы энергия протонного потенциала должна передаться в белке на большое расстояние. Для осуществления данного сопряжения природой был изобретен очень необычный механизм, напоминающий функционирование электромотора. Энергия протонного потенциала вначале преобразуется в механическую энергию (во вращение ротора F_0F_1 -АТР-синтазы), которая затем тратится на совершение химической работы (изменения сродства каталитических центров АТР-синтазы к нуклеотидам), что в итоге приводит к $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ -зависимому синтезу АТР. Рассмотрим более подробно, как устроено подобное сопряжение.

Как было отмечено выше, γ -субъединица в центре $3\alpha:3\beta$ -глобулы занимает асимметричное положение, по-разному взаимодействуя с различными субъединицами α и β . Это, по-видимому, приводит к различию свойств трех (Т, О и L) каталитических центров АТР-синтазы. Так как гидролиз АТР сопровождается последовательным изменением конформации нуклеотид-связывающих центров, было бы логично предположить, что гидролиз АТР может быть сопряжен с вращением γ -субъединицы внутри $3\alpha:3\beta$ -глобулы. Эта гипотеза (выдвинута впервые П.Д. Бойером, за что он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1997 г.) была впоследствии подтверждена серией очень изящных прямых экспериментов. Так, например, японским исследователем М. Йошидой был выделен упрощенный вариант бактериального фактора F_1 , состоящий лишь из трех субъединиц (α , β и γ) в стехиометрии $3\alpha:3\beta:\gamma$. Предварительно молекулярно-генетическими методами из этих субъединиц были удалены все остатки цистеина, а один остаток этой аминокислоты был искусственно внесен в домен γ -субъединицы, образуя-

Рисунок 7.14. Схема эксперимента по визуализации вращения γ -субъединицы фактора F_1 при катализе им гидролиза АТР. Субъединицы фактора F_1 выделены следующими цветами: α — розовый, β — оранжевый, γ — зеленый (по М. Йошида)



щий стержень АТР-синтазы. Кроме того, к N-концу β -субъединицы была добавлена последовательность из шести остатков гистидина, связывающая с высоким сродством ионы никеля. Далее, как показано на рис. 7.14, данный белок был прикреплен за эту полигистидиновую «ручку» к предметному стеклу, покрытому ионами никеля, а к единственному остатку цистеина на γ -субъединице с использованием биотин-связывающего белка стрептавидина был пришит очень длинный актиновый филамент, несущий флуоресцентную метку (остатки флуоресцеина). При добавлении к такому препарату субстратов АТРазной реакции можно было наблюдать под микроскопом вращение флуоресцирующего актинового филамента в направлении против часовой стрелки. Полный поворот на 360° складывался из трех шаговых движений с поворотом на 120° . Вращение наблюдалось только в присутствии АТР и Mg^{2+} и было чувствительно к ингибиторам АТРазной реакции. Так было прямо показано, что при функционировании фактора F_1 энергия гидролиза АТР может быть преобразована в механическую энергию вращения γ -субъединицы.

В то же время в составе полного F_0F_1 -комплекса γ -субъединица взаимодействует не только с $3\alpha:3\beta$ -глобулой, но и с олигомером c -субъединиц. При этом стержень занимает, как уже отмечалось, асимметричное положение относительно c -олигомера, взаимодействуя с полярными петлями лишь шести из этих субъединиц. Есть указания на то, что транспорт протонов через фактор F_0 сопряжен с вращением c -олигомера, а значит, и с вращением связанного с ним стержня. Таким образом, посредством вращательного механизма транспорт протонов может быть сопряжен с синтезом (или гидролизом) АТР этим ферментом. При этом олигомер c -субъединиц фактора F_0 вместе с субъединицами γ и ϵ^* , образующими стержень фактора

* В случае с ферментом бактериального типа, в митохондриальном ферменте в состав стержня входят субъединицы γ , δ и ϵ .

F_1 , формируют ротор этого мотора, в то время как остальные субъединицы служат статором (см. рис. 7.5). Если исходить из этой гипотезы, станет понятна роль *периферической ножки*, связывающей также факторы F_0 и F_1 . По-видимому, эта дополнительная связь между двумя факторами необходима для прикрепления $3\alpha:3\beta$ -глобулы к мембранной части фермента и предотвращения вращения $3\alpha:3\beta$ -глобулы вместе со стержнем.

Следует подчеркнуть, что многие вопросы функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазы еще очень далеки от разрешения. Прежде всего, неизвестно, каким образом транспорт протонов в факторе F_0 сопряжен с вращением олигомера c -субъединиц. Предполагается, что в данном процессе ключевую роль может играть электростатическое притяжение депротонированного аниона *Asp-61* на субъединице c (т.е. роторе) и катиона одного из положительно заряженных остатков аминокислот субъединицы a (т.е. статора).

7.1.7. Стехиометрия H^+/ATP

Твердо установлено, что для синтеза одной молекулы АТФ необходимо перенести через мембрану более одного протона. Такое заключение базируется на данных по измерению $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ и концентраций АТФ, АДФ и фосфата. Общепринято, что при физиологических концентрациях субстратов и продуктов АТФ-синтазы образование АТФ «стоит» не менее $44 \text{ кДж} \times \text{моль}^{-1}$ ($10,5 \text{ ккал} \times \text{моль}^{-1}$). Эта величина соответствует $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, равной 455 мВ при условии, что стехиометрия $H^+/ATP = 1$. Указанное значение $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ как минимум вдвое больше измеренного экспериментально, и если предположить, что рассматриваемое соотношение выражается целым числом, то *минимальная стехиометрия H^+/ATP может быть равна двум*.

Экспериментальное определение стехиометрии H^+/ATP в основном ба-

зируется на измерении так называемого *отношения Р/О* на митохондриях при окислении ими различных дыхательных субстратов. Это отношение представляет собой количество синтезированного АТФ (или эстерифицированного фосфата), нормированное на количество потребленного кислорода (АТФ/О или Р/О). Критерий Р/О был предложен в 1939 г. В.А. Белицером и Е.Т. Цыбаковой. Для митохондрий животных, окисляющих NAD^+ -зависимые субстраты или сукцинат, экспериментально измеренные величины Р/О, как правило, оказываются соответственно около 2,7 и 1,6. Так как при окислении $NADH$ и сукцината ферменты дыхательной цепи переносят через мембрану соответственно 10 и 6 H^+ (см. главу IV), то, исходя из измеренных величин Р/О, можно определить количество протонов, потребляемых АТФ-синтазой для синтеза одной молекулы АТФ. Легко подсчи-



Рисунок 7.15. В.А. Белицер

тать, что стехиометрия H^+/ATP в этом случае будет приблизительно равна 4. Однако необходимо учесть, что в митохондриях, фосфорилирующих *внешний* (внемитохондриальный) ADP *внешним* фосфатом, $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ потребляется не только АТФ-синтазой, но также и ATP^{4-}/ADP^{3-} -антипортером и $H_2PO_4^-, H^+$ -симпортером. В результате обмен внешних ADP и фосфата на внутренний АТФ сопровождается импортом в митохондрию одного иона H^+ . Таким образом, стехиометрия H^+/ATP собственно комплекса F_0F_1 должна составлять $4-1=3$.

Если верна гипотеза о вращательном механизме функционирования этого фермента, то поворот ротора F_0F_1 на 360° должен сопровождаться синтезом трех молекул АТФ (так как в данном ферменте присутствуют *три* каталитических нуклеотид-связывающих центра). С другой стороны, поворот ротора митохондриального F_0F_1 на 360° должен приводить к трансмембранному переносу восьми протонов (так как в случае с митохондриями животных в состав c -олигомера входят 8 c -субъединиц). Таким образом, структурные данные указывают на то, что стехиометрия H^+/ATP для АТФ-синтазы из митондрий животных должна быть равна $8/3 = 2,7$, что довольно хорошо согласуется с экспериментальными данными. Этот пример иллюстрирует и важность такого параметра, как количество субъединиц, входящих в состав c -олигомера. Действительно, стехиометрия c -субъединиц должна иметь исключительно важное физиологическое значение, так как она определяет такой существенный параметр клетки, как отношение H^+/ATP . Как было указано ранее, в состав АТФ-синтазы хлоропластов входят, по-видимому, 14 c -субъединиц*, а в состав натриевой АТФ-синтазы *I. tartaricus* — 11. Таким образом, различные организмы, исходя из особенностей своего метаболизма, могут варьировать такой исключительно важный параметр, как «обменный курс» двух энергетических валют клетки — $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ и АТФ.

Интересно отметить, что, если исходить из механистических представлений о стехиометрии H^+/ATP (признать, что она должна выражаться целым числом), можно ожидать, что количество c -субъединиц в ферменте должно быть кратно трем. Однако практически во всех исследованных случаях наблюдается нарушение 1:3-симметрии, что должно приводить к дробным величинам отношения H^+/ATP .

7.2. H^+ -АТФазы — вторичные $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ -генераторы

В данном разделе мы рассмотрим функционирование различных АТФаз в качестве генераторов протонного потенциала. Наиболее распространенные $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ -генераторы используют энергию света или дыхания, чтобы об-

* Эти данные хорошо согласуются с экспериментально измеренной стехиометрией H^+/ATP для АТФсинтазы хлоропластов. У растений фотофосфорилирование ADP происходит на внешней стороне мембраны тилакоидов. Полученный АТФ используется преимущественно в строме хлоропласта при синтезе глюкозы. В этом процессе портеры не участвуют, а соотношение H^+/ATP приблизительно равно четырем протонам на одну молекулу АТФ.

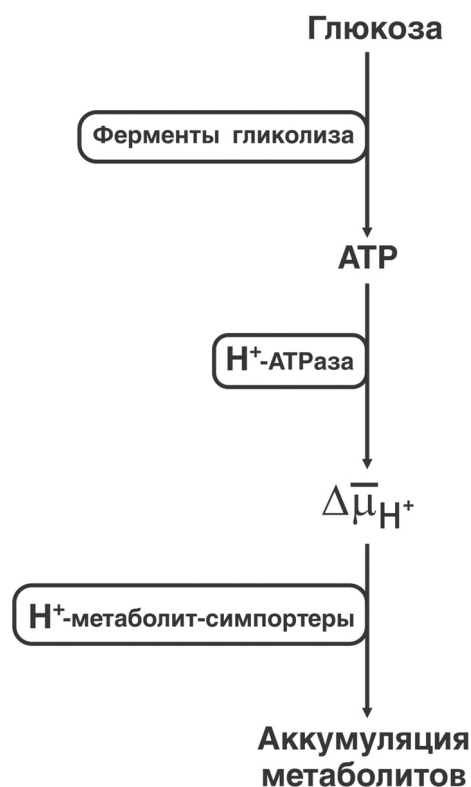


Рисунок 7.16. Схема одного из путей преобразования энергии у анаэробных бактерий, синтезирующих АТР исключительно с помощью субстратного фосфорилирования

разовать протонный потенциал. АТР не участвует в этом процессе. Однако иногда путь от использования энергетических ресурсов к $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ оказывается более сложным: энергия сначала превращается в АТР, и лишь затем используется для генерации $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ посредством H^+ -АТРаза. Последние могут быть объединены термином «вторичные $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ -генераторы».

Как правило, H^+ -АТРазаы оказываются необходимыми, когда ни свет, ни энергия дыхания не доступны для мембраны, совершающей некоторую работу, связанную с расходом $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. Примером такой системы могут быть анаэробные бактерии, получающие энергию исключительно с помощью *субстратного фосфорилирования* (брожения). У таких бактерий АТР, образованный ферментами гликолиза, может утилизироваться H^+ -АТРазой, находящейся в цитоплазматической мембране. $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, генерируемая H^+ -АТРазой, используется для совершения *осмотической* (аккумуляции метаболитов при участии H^+ , метаболит-симпортеров, рис. 7.16) и

механической (вращение жгутика) *работы*.

Кроме роли H^+ -АТРаз в совершении осмотической или механической работы, следует отметить еще одну их функцию, а именно *регуляцию внутриклеточного pH*.

Формально любой фермент, способный генерировать $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ за счет энергии АТР, может рассматриваться как H^+ -АТРаза. Выше мы уже отмечали, что H^+ -АТР-синтаза, обычно используемая для образования АТР за счет энергии $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, обладает H^+ -АТРазной активностью, т.е. может гидролизовать АТР и создавать $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. По этой причине данный фермент часто называют H^+ -АТРазой. Однако, по нашему мнению, *более уместно употреблять название «H⁺-АТРаза» только в тех случаях, когда основной биологической функцией фермента служит гидролиз, а не синтез АТР*. Введя такое ограничение, к H^+ -АТРазам можно будет отнести несколько типов ферментов (относящихся к классам F_0F_1 , V_0V_1 и E_1E_2), отличающихся по структуре и механизму действия, но имеющих общую функцию (см. табл. 7.2). Рассмотрим эти типы ферментов более подробно.

Таблица 7.2. Вторичные $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ -генераторы

Фермент	Локализация	Механизм	Функции, поддерживаемые образованной $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$
H^+ -АТРаза	Цитоплазматическая мембрана облигатно-анаэробных бактерий	F_0F_1 и V_0V_1	Накопление веществ и регуляция pH в клетке
- х -	Внешняя мембрана растений и грибов	E_1E_2	То же
- х -	Тонопласт растений и грибов	V_0V_1	Накопление веществ и регуляция pH в вакуоли
- х -	Внешняя мембрана клеток некоторых животных	E_1E_2 и V_0V_1	Секреция H^+ ; накопление веществ в клетке
- х -	Мембраны секреторных пузырьков, эндосом, лизосом, аппарата Гольджи; мембрана эндоплазматического ретикулума	V_0V_1	Накопление веществ и регуляция pH во внутриклеточных пузырьках
H^+ -АТР-синтаза (обращенная)	Цитоплазматическая мембрана дышащих или фотосинтезирующих бактерий	F_0F_1	Накопление веществ и регуляция pH в клетке, вращение флагелл при отсутствии O_2 и света
- х -	Внутренняя мембрана митохондрий	F_0F_1	Транспорт веществ в митохондрии при отсутствии O_2
H^+/K^+ -АТРаза	Внешняя мембрана клеток эпителия желудка	E_1E_2	Секреция H^+

7.2.1. H^+ -АТРАЗЫ F_0F_1 -ТИПА

Данные H^+ -АТРАЗЫ функционируют в цитоплазматической мембране большинства анаэробных бактерий. Как по набору входящих в их состав субъединиц, так и по своим структурным и функциональным свойствам они очень близки к описанным выше H^+ -АТР-синтазам F_0F_1 -типа. Более того, в мембранах, содержащих H^+ -АТР-синтазу, возможна генерация $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ за счет гидролиза АТР вследствие обращения реакции, катализируемой этим ферментом. Такой эффект наблюдается, например, у некоторых бактерий, использующих как энергию дыхания или света, так и энергию гликолиза.

H^+ -АТРАЗЫ могут быть легко разделены на два субкомплекса: протон-проводящий фактор F_0 и каталитический фактор F_1 . Гидролиз АТР ферментами этого типа чувствителен к азиду, ДЦКД, аувертину и некоторым другим ингибиторам H^+ -АТР-синтаз. Катализируемая H^+ -АТРАзами реак-

ция обратима. Так, эти ферменты способны осуществлять синтез АТФ за счет энергии $\Delta\Psi$, искусственно созданной при выходе из бактерий ионов K^+ в присутствии валиномицина.

К наиболее изученным представителям этого класса ферментов можно отнести H^+ -АТФазы таких анаэробных бактерий, как *Lactobacillus casei* и *Enterococcus hirae*.

7.2.2. H^+ -АТФазы V_0V_1 -типа

H^+ -АТФазы V_0V_1 -типа очень близки к описанным выше H^+ -АТФсинтазам (H^+ -АТФазам) F_0F_1 -типа, однако отличаются от них целым рядом структурных и функциональных свойств, что позволяет выделить их в особый класс данных ферментов. Примером фермента V_0V_1 -типа может быть H^+ -АТФаза тонопласта — мембраны, ограничивающей вакуоли клеток растений и грибов. К этому же типу H^+ -АТФаз относятся ферменты, обнаруженные в различных мембранных органеллах эукариот, таких, как секреторные пузырьки, эндосомы, лизосомы и мембраны аппарата Гольджи. H^+ -АТФазы V_0V_1 -типа иногда также функционируют в плазмалемме некоторых эукариотических клеток, а также в цитоплазматической мембране небольшого количества облигатно анаэробных прокариот (например, у некоторых клостридий).

АТФазы V_0V_1 -типа состоят из двух субкомплексов, один из которых в составе полного фермента отвечает за трансмембранный транспорт протонов (V_0), а другой — за гидролиз АТФ (V_1). Однако, в отличие от АТФсинтаз F_0F_1 -типа, при диссоциации АТФаз V_0V_1 -типа субкомплексы V_0 и V_1 теряют способность к осуществлению своих частных активностей.

В случае вакуолярной V_0V_1 -АТФазы V_1 состоит из восьми субъединиц (А-Н). Субъединицы А и В несут в своем составе нуклеотид-связывающие центры* и образуют 3А:3В-глобулу наподобие 3 α :3 β -глобулы АТФ-синтаз F_0F_1 -типа. Субъединицы С, Е, F и Н (в стехиометрии 1D:2G) образуют, по-видимому, стержень фермента V_0V_1 -типа, тогда как субъединицы D и G (в стехиометрии 1D:2G) — периферическую** ножку (рис. 7.17)**.

Фактор V_0 состоит из пяти субъединиц a , d , c , c' и c'' . Субъединицы c , c' и c'' гомологичны друг другу. Они демонстрируют значительное сходство с субъединицей c АТФ-синтаз F_0F_1 -типа. Однако субъединицы c и c' фак-

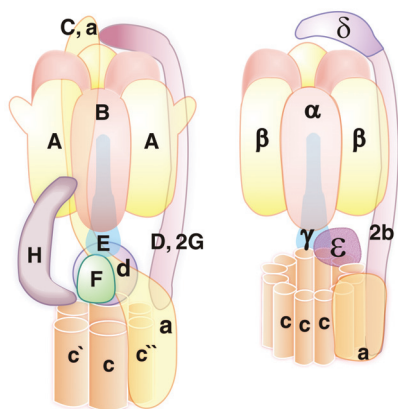


Рисунок 7.17. Сравнительное изображение структуры АТФаз V_0V_1 -типа (слева) и F_0F_1 -типа (справа) [Lolkema et al., 2003; J. Bioenerg. Biomembr., 35: 323–335]

* Каталитические центры находятся только в субъединицах А.

** По последним данным, таких ножек в V_0V_1 -АТФазе две.

тора V_0 в два раза больше субъединицы с фактора F_0 , представляя собой дублицированный вариант этой субъединицы. Они содержат в своем составе не 2, а 4 трансмембранные α -спирали. Что касается субъединицы c'' , то она приблизительно в 2,5 раза больше субъединицы с фактора F_0 и содержит в своем составе 5 трансмембранных колонн. Существенно, что во всех c -субъединицах фактора V_0 сохранилось лишь по одному консервативному остатку глутамата (аспартата). Ранее считалось, что c -олигомер фактора V_0 содержит приблизительно такое же количество трансмембранных α -спиралей, как и c -олигомер фактора F_0 . Если это так, то из-за уменьшенного в два раз количества активных карбоксильных групп V_0V_1 -АТРаза должна обладать в два раза более низкой стехиометрией H^+/ATP по сравнению с ферментом F_0F_1 -типа. Выдвигалось предположение, что за счет дубликаций и слияний c -субъединиц с потерей одного из остатков карбоксилата природой был получен фермент, характеризующийся пониженной стехиометрией H^+/ATP и потому более приспособленный для осуществления H^+ -АТР-синтазной реакции в обратном направлении, т.е. функционирующий *in vivo* исключительно в качестве H^+ -АТРаза. Однако совсем недавно с помощью рентгеноструктурного анализа было показано, что натриевая V_0V_1 -АТРаза из *Enterococcus hirae* содержит олигомер, состоящий из 10 c -субъединиц, т.е. соотношение Na^+/ATP для этого фермента должно быть таким же, как соотношение H^+/ATP у H^+ -АТР-синтазы *E. coli*.

Транспорт H^+ и АТРазная активность ферментов V_0V_1 -типа подавляются уникальным набором ингибиторов, включающим нитрат, N -этилмалеимид, триалкил-олово и высокие концентрации ДЦКД. Олигомицин и ДЦКД в низких концентрациях (ингибиторы H^+ -АТР-синтазы F_0F_1 -типа) не влияют на H^+ -АТРаза тонопласта.

7.2.3. H^+ -АТРаза E_1E_2 -типа

H^+ -АТРаза E_1E_2 -типа представляют собой очень длинный полипептид (порядка 100 кДа), которому может сопутствовать меньшая субъединица, имеющая скорее регулярные, чем каталитические функции. Реакция начинается с фосфорилирования одного из остатков аспартата большой субъединицы, что вызывает ее конформационный переход, обозначаемый $E_1 \rightarrow E_2$. Этот переход сопровождается снижением свободной энергии гидролиза фосфориласпартата. Последующее дефосфорилирование фермента регенерирует исходную форму E_1 . Описанный механизм подобен такому Na^+/K^+ -АТРаза и Ca^{2+} -АТРаза (см. разд. 12.5.2). E_1E_2 -АТРаза описаны для внешних клеточных мембран растений и грибов. Такая же структура обнаружена у H^+/K^+ -АТРаза эпителия желудка.

Активность E_1E_2 -АТРаза чувствительна к ванадату, гидроксиламину и диэтилстильбэстролю, но устойчива к основным ингибиторам АТРаза F_0F_1 - и V_0V_1 -типа (олигомицину, азиду, нитрату и т.д.).

7.2.3.1. H^+ -АТРаза внешней клеточной мембраны растений и грибов

Во внешней клеточной мембране растений и грибов (плазмалемме) находится фермент, откачивающий ионы H^+ из клетки за счет энергии АТР.