

MOLECULAR MOTORS
Part 1. Rotating motors of
a living cell

A. N. TIKHONOV

The structure and mechanisms of the functioning of proton ATP synthases and flagellar motors have been considered to illustrate the basic principles of the rotating molecular motors of a living cell.

Рассмотрены строение и механизмы действия протонной АТФсинтазы и флагеллярного мотора – молекулярных моторов живой клетки, выполняющих химическую и механическую работу, связанную с их вращательным движением.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОТОРЫ

Часть 1. Вращающиеся моторы живой клетки

А. Н. ТИХОНОВ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Все ферменты красивы, но АТФсинтаза является одним из самых красивых, а также самых необычных и важных.

All enzymes are beautiful, but the ATP synthase is one of the most beautiful as well as one of the most unusual and important.

Boyer P.D. The ATP synthase – a splendid molecular machine // Ann. Rev. Biochem. 1997. Vol. 66. P. 717–749.

ВВЕДЕНИЕ

Эпиграфом к статье взяты слова Поля Бойера, выдающегося американского биохимика, внесшего решающий вклад в выяснение ферментативных механизмов образования аденозинтрифосфата (АТФ) из аденозиндифосфата (АДП) и неорганического фосфата. Молекула АТФ является универсальным источником энергии для большинства многочисленных биохимических, механохимических и транспортных процессов, которые протекают внутри живой клетки. Неудивительно поэтому, что АТФсинтаза – основной фермент, катализирующий образование АТФ, – назван П. Бойером одним из самых важных ферментов. В чем заключаются красота и необычность этого фермента? АТФсинтаза представляет собой великолепную молекулярную машину, доведенную природой до высшей степени совершенства. Подобно тому как в каждой совершенной машине наивысшие технические показатели сочетаются с ее изящными формами, в АТФсинтазе – молекулярной машине живой клетки – высочайшая эффективность работы сочетается с поразительной красотой ее структурной организации. Необычность АТФсинтазы состоит в том, что она работает как вращающаяся машина, подобно электромотору, крутящемуся при пропускании электрического тока через его обмотку. Однако в отличие от электромоторов, используемых в технике, ротор АТФсинтазы приводится во вращение при прохождении через нее электрического тока, создаваемого не движением электронов, а потоком протонов.

Бактерии плавают за счет вращения жгутиков, которые приводятся в движение так называемым флагеллярным мотором (от лат. flagellum – жгутик). До недавнего времени считалось, что флагеллярные моторы являются самыми миниатюрными вращающимися моторами [1, 2]. Однако в последнее время было доказано, что самым маленьким из всех

известных в природе вращающихся моторов является протонная АТФсинтаза. Несмотря на различие в строении и назначении протонных АТФсинтаз и флагеллярных моторов (первые совершают химическую, а вторые выполняют механическую работу), они имеют два общих свойства. Эти моторы содержат вращающиеся детали, а в качестве топлива используют энергию, запасаемую в виде разности электрохимических потенциалов ионов водорода на мембране [1–4].

АТФсинтаза – САМЫЙ МАЛЕНЬКИЙ МОТОР В ПРИРОДЕ

Протонные АТФсинтазы (общая характеристика)

АТФсинтаза является макромолекулярным комплексом, катализирующим синтез и гидролиз молекул АТФ в энергопреобразующих мембранах клеток растений, животных и бактерий [1–4]. Расположение АТФсинтазы в мембранах хлоропластов и митохондрий схематически показано на рис. 1. Мембранная часть АТФсинтазы, называемая фактором сопряжения F_0 , представляет собой гидрофобный (нерастворимый в воде) белковый комплекс. Второй крупный фрагмент АТФсинтазы – фактор сопряжения F_1 – заметно выступает из мембраны в виде сферического образования. В хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки – АТФсинтаза встроена в мембраны тилакоидов (на рис. 1 они схематически изображены в виде замкнутых пузырьков), при этом фактор сопряжения F_1 ориентирован во внешнюю сторону. В митохондриях – энергетических “фабриках” животной клетки – АТФсинтаза встроена во внутреннюю мембрану, а комплекс F_1 обращен в сторону матрикса (внутренняя часть митохондрии). Образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P) происходит в каталитических центрах АТФсинтазы, расположенных в комплексе F_1 [3]. Белковый комплекс F_1 можно сравнительно легко отделить от мембраны, при этом он сохраняет способность катализировать гидролиз АТФ. Однако изолированный фактор сопряжения F_1 не способен синтезировать АТФ. Способность синтезировать АТФ – это свойство единого комплекса F_0F_1 , встроеного в энергопреобразующую мембрану. Связано это с тем, что работа АТФсинтазы в режиме синтеза АТФ сопряжена с переносом через нее протонов, путь которых пролегает через F_0 и направлен в сторону F_1 (рис. 1, а). Такой направленный перенос протонов возможен только в том случае, если АТФсинтаза встроена в мембрану замкнутых энергопреобразующих органелл (хлоропласты и митохондрии) или в плазматическую мембрану бактериальной клетки.

Движущей силой для работы большинства АТФсинтаз является протонный потенциал, создаваемый на мембране в результате работы цепи электронного транспорта [1–4]. Реакции фотосинтеза

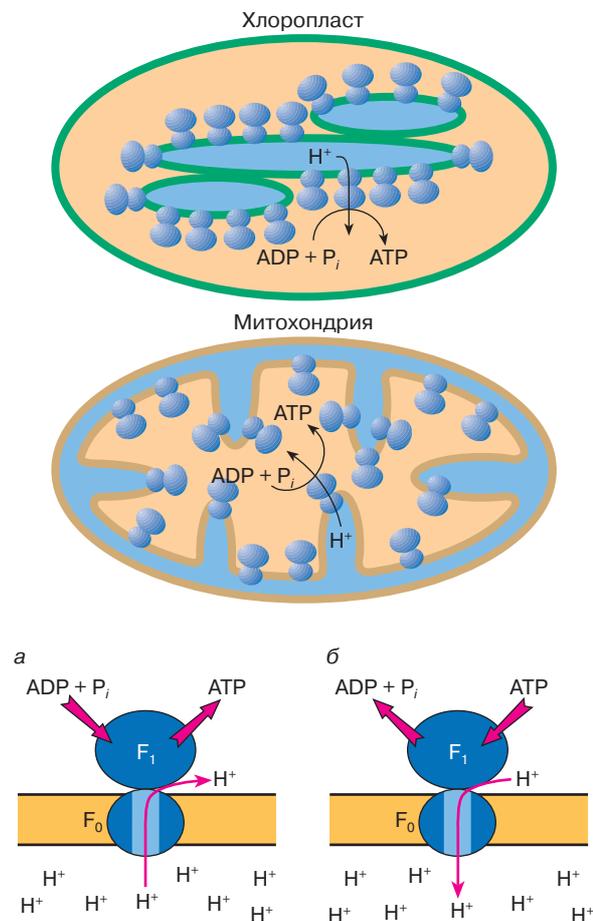


Рис. 1. Расположение протонных АТФсинтаз в мембранах хлоропластов и митохондрий. Голубые участки соответствуют областям с повышенным протонным потенциалом (кислотные резервуары), участки песочного цвета – области с пониженным протонным потенциалом (щелочные резервуары). Внизу показано направление переноса ионов водорода через мембрану в режимах синтеза (а) и гидролиза (б) молекул АТФ

тического переноса электронов в хлоропластах сопровождаются транспортом протонов внутрь тилакоидов, в результате чего концентрация ионов водорода внутри тилакоидов становится существенно выше, чем снаружи. В митохондриях работа дыхательной цепи сопровождается переносом ионов водорода в противоположном направлении: протоны выходят из матрикса наружу, в результате этого электрический потенциал со стороны матрикса понижается. За счет разности протонных потенциалов по обе стороны мембраны возникает поток ионов водорода через АТФсинтазу (рис. 1, а), который и обеспечивает ее работу по синтезу АТФ. В хлоропластах синтез АТФ сопряжен с переносом ионов водорода из кислотного внутритилакоидного

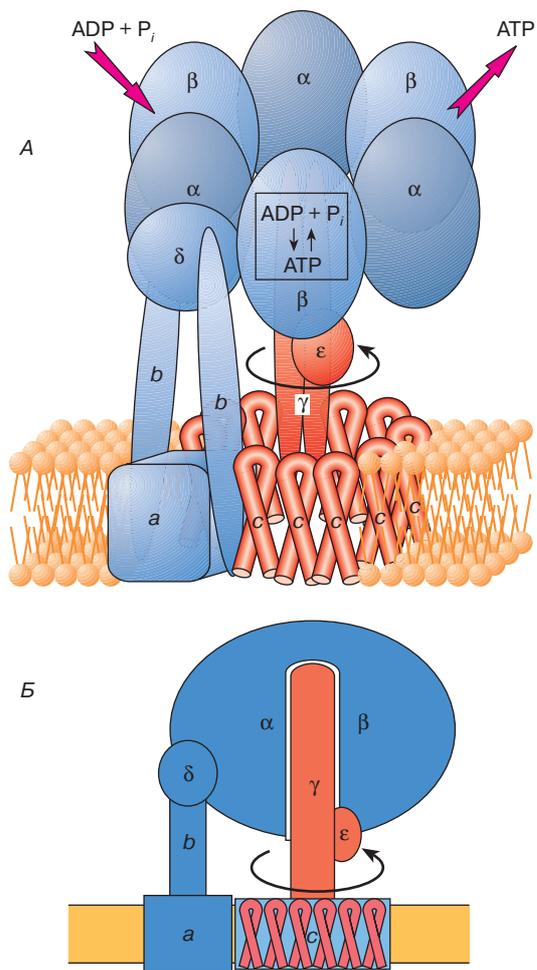


Рис. 2. Схема строения АТФсинтазы. Комплексы F_1 и F_0 всех изученных протонных АТФсинтаз бактерий, цианобактерий и хлоропластов высших растений имеют одинаковый состав белковых субъединиц $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\epsilon$ и abc_{9-12} соответственно. У АТФсинтазы митохондрий животных мембранный комплекс F_0 наряду субъединицами a , b и c содержит шесть дополнительных белковых субъединиц (d , e , f , g , F_6 и $A6L$), а F_1 дополнительно включает в себя два небольших белка (OSCP и специальный регуляторный белок-ингибитор). Внизу показан контурный профиль F_0F_1 комплекса, в котором синим цветом выделены субъединицы статора, а красным цветом – субъединицы ротора

объема в щелочной внешней объем (в строму — пространство между тилакоидами и оболочкой хлоропласта); в митохондриях работа АТФсинтазы связана с потоком протонов, направленным внутрь матрикса (рис. 1). Протонпроводящий канал, по которому ионы водорода из области с высоким протонным потенциалом подводятся к определенным функциональным группам АТФсинтазы, а затем выходят в область с низким протонным потенциалом, расположен в мембранном фрагменте АТФсинтазы (комплекс F_0).

АТФсинтаза — это обратимая молекулярная машина, которая способна катализировать как синтез, так и гидролиз АТФ. В режиме синтеза АТФ работа АТФсинтазы обеспечивается за счет энергии ионов водорода, переносимых через нее под действием трансмембранной разности протонных потенциалов (рис. 1, а). В то же время АТФсинтаза может работать как протонная помпа — за счет энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ, она может перекачивать ионы водорода в противоположном направлении, из области с низким протонным потенциалом в область с высоким протонным потенциалом (рис. 1, б).

Строение АТФсинтазы

Состав и пространственное строение комплекса F_1 хорошо изучены. Методом рентгеноструктурного анализа получена картина пространственного расположения атомов (с разрешением 2,8 Å) в комплексе F_1 , выделенном из митохондрий сердца быка. Ориентированный в водную фазу комплекс F_1 (рис. 2) состоит из девяти субъединиц пяти типов (3α , 3β , γ , δ и ϵ). Полипептидные цепи субъединиц α и β уложены в похожие по строению белковые глобулы, которые все вместе образуют гексамер — ансамбль, состоящий из шести субъединиц (три одинаковые субъединицы α и три одинаковые субъединицы β). Этот ансамбль имеет вид слегка приплюснутого шара высотой 8 нм и шириной 10 нм. В центре шара находится субъединица γ , которая образована двумя протяженными полипептидными цепями и напоминает слегка деформированный изогнутый стержень длиной около 9 нм. Нижняя часть субъединицы γ выступает из шара на 3 нм в сторону мембранного комплекса F_0 . Субъединица δ расположена на внешней стороне F_1 . Внутри ансамбля ($\alpha\beta$)₃ находится минорная субъединица ϵ , которая связана с субъединицей γ . Обе эти субъединицы (γ и ϵ) подвижны — они входят в состав своеобразного ротора, который вращается внутри неподвижного комплекса ($\alpha\beta$)₃.

За решающий вклад в расшифровку пространственной структуры белкового комплекса F_1 английский исследователь Джеймс Уокер в 1997 году был удостоен Нобелевской премии по химии. Свою часть премии он разделил с американским биохимиком Полем Бойером, который в течение последних 45 лет плодотворно занимался выяснением биохимических механизмов образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата.

Мембранный комплекс F_0 служит основанием, которое удерживает АТФсинтазу в мембране. Этот комплекс включает в себя протонный канал, по которому ионы водорода переносятся через АТФсинтазу. Пространственная структура F_0 расшифрована не столь детально, как строение водорастворимого комплекса F_1 . Среди изученных мембранных комплексов F_0 различного происхождения наиболее простой

состав имеет F_0 из бактерии *Escherichia coli*, который состоит из полипептидных субъединиц трех типов (рис. 2). У *E. coli* в комплекс F_0 входят одна белковая субъединица типа *a*, две копии субъединицы *b*, имеющие молекулярные массы 20 и 30 кДа соответственно, а также сравнительно большое количество ($n = 9-12$) идентичных копий более мелкой субъединицы *c* (молекулярная масса 6–11 кДа).

Субъединица *a* гидрофобна, она почти полностью погружена в мембрану. Ее полипептидная цепь образует шесть α -спиральных участков, которые пересекают мембрану. Субъединица *b* содержит лишь один сравнительно короткий α -спиральный участок, погруженный в мембрану. Остальная часть субъединицы *b* заметно выступает из мембраны в сторону комплекса F_1 и закрепляется за расположенную на его поверхности субъединицу δ (рис. 2). Каждая из 9–12 копий субъединицы *c* (точное число их пока неизвестно) представляет собой сравнительно небольшой белок, состоящий из двух гидрофобных α -спиралей, соединенных друг с другом короткой гидрофильной петлей, ориентированной в сторону F_1 . Субъединицы *c* образуют единый ансамбль, имеющий форму цилиндра, погруженного в мембрану. Выступающая из комплекса F_1 в сторону F_0 субъединица γ , по-видимому, погружена внутрь этого цилиндра и достаточно прочно зацеплена за него. На снимках АТРСинтазы, полученных недавно Уилкенсом и Капальди с помощью электронного микроскопа, видно, что два крупных белковых фрагмента АТРСинтазы (F_0 и F_1) соединены друг с другом двумя сравнительно тонкими перемычками. Одна из них расположена сбоку и представляет собой неподвижный “кронштейн” (субъединицы *b*), соединяющий F_0 и F_1 ; другая “ножка”, расположенная в центре АТРСинтазы, является подвижной субъединицей γ ротора.

Ротор и статор АТРСинтазы

Представления об АТРСинтазе как молекулярной машине, работа которой связана с ее вращением, хорошо согласуются со структурными особенностями АТРСинтазы, в которой можно выделить две группы белковых субъединиц. Одна из них образует статор мотора, который неподвижен относительно мембраны, а другая соответствует подвижному ротору, вращающемуся внутри статора (рис. 2, Б).

Статор включает в себя шарообразный гексамер, образованный тремя субъединицами α и тремя субъединицами β , находящуюся на его поверхности субъединицу δ , а также субъединицы *a* и *b* мембранного комплекса F_0 . В этой макромолекулярной конструкции субъединицы *b* выполняют роль своеобразного кронштейна, связывающего неподвижные субъединицы комплексов F_0 и F_1 . К находящейся в мембране субъединице *a* примыкает гидрофобное кольцо, образованное субъединицами *c* мембранного комплекса F_0 .

Ротор состоит из субъединиц γ и ϵ комплекса F_1 . Субъединица γ , расположенная внутри комплекса $(\alpha\beta)_3$, заметно выступает из него и соединяется с погруженным в мембрану кольцом из субъединиц *c*. Имеются все основания считать, что субъединица γ , входящая в состав ротора, действительно вращается при работе фермента.

Вопрос о том, в состав какого функционального узла АТРСинтазы, статора или ротора, входят субъединицы *c*, является спорным. Некоторые исследователи полагают, что субъединица γ жестко сцеплена с кольцом из субъединиц *c* и во время работы АТРСинтазы кольцо из субъединиц *c* вращается, подобно маховому колесу, вместе с субъединицами γ и ϵ . Однако прямые экспериментальные доказательства этой гипотезы пока отсутствуют.

В последнее время появились убедительные данные о том, что каталитическая активность АТРСинтазы непосредственно связана с вращением ее ротора. Считается, что поворот субъединицы γ вызывает одновременное изменение конформации всех трех каталитических субъединиц β , что в конечном итоге обеспечивает работу фермента [4]. Вращение субъединицы γ облегчается наличием своеобразной смазки в местах ее контакта с субъединицами α и β . Это обусловлено тем, что центральная часть субъединицы γ , находящаяся внутри ансамбля $(\alpha\beta)_3$, гидрофобна — она не содержит заряженных групп, взаимодействие которых с зарядами субъединиц α и β могло бы создавать дополнительное трение, препятствующее вращению субъединицы γ . Однако сама по себе субъединица γ не может свободно вращаться внутри комплекса $\alpha_3\beta_3$ (за счет энергии тепловых движений). Свободному вращению ротора препятствуют стерические ограничения — субъединица γ , вращающаяся вместе с субъединицей ϵ , зацепляется за неровности внутри полости, образованной субъединицами α и β . Поэтому для того, чтобы повернуть ротор внутри статора, и тем самым заставить АТРСинтазу сделать молекулу АТФ, необходим внешний источник энергии. Как уже было сказано выше, когда АТРСинтаза работает в режиме синтеза АТФ (рис. 1, а), движущей силой для ее работы является энергия ионов водорода, переносимых через сопрягающую мембрану за счет протонного потенциала. При работе АТРСинтазы в режиме гидролиза АТФ (рис. 1, б) источником энергии для вращающегося ротора служит энергия, запасенная в молекуле АТФ.

Как доказали, что молекулярный мотор может вращаться

Существуют ли экспериментальные доказательства того, что работа протонных АТРСинтаз действительно связана с направленным вращением ее отдельных частей? Можно ли непосредственно увидеть вращение ротора молекулярной машины столь малого размера, какой является АТРСинтаза? Многие годы эти вопросы были предметом оживленных

дискуссий среди биоэнергетиков, и лишь в последнее время на них получены утвердительные ответы. Наглядно показано, что гидролиз АТР комплексом F_1 действительно сопровождается вращением субъединицы γ относительно гексамера $(\alpha\beta)_3$. Это значит, что АТРсинтаза является молекулярной машиной, про которую можно с уверенностью сказать: “Все-таки она вертится!” Рассмотрим, как это было доказано.

В работах американских биохимиков Капальди, Кросса и их сотрудников для доказательства вращения субъединицы γ был использован оригинальный подход, основанный на применении искусственных химических сшивок между субъединицами β и γ с помощью дисульфидных (S—S) мостиков (рис. 3, А). Методами молекулярной генетики субъединицы β и γ удалось модифицировать так, что в нужные участки полипептидных цепей этих белков были вставлены аминокислоты (цистеины), которые содержат сульфгидрильные группы (—SH). Между этими группами может образоваться ковалентная связь (—SH + —SH → —S—S—). Таким способом удалось пришить субъединицу γ к субъединице β и тем самым заблокировать возможное вращение субъединицы γ внутри комплекса F_1 . Как показали опыты, ферментативная активность комплекса F_1 (его способность гидролизовать АТР) при этом была полностью подавлена. Представим теперь, что после того, как сшивка между субъединицами β и γ была сделана, S—S-мостик разрывают, а затем спустя некоторое время делают новую сшивку. За положением старых и новых мостиков в молекуле F_1 можно следить с помощью меченых (радиоактивных) атомов. Понятно, что в случае покоящейся субъединицы γ

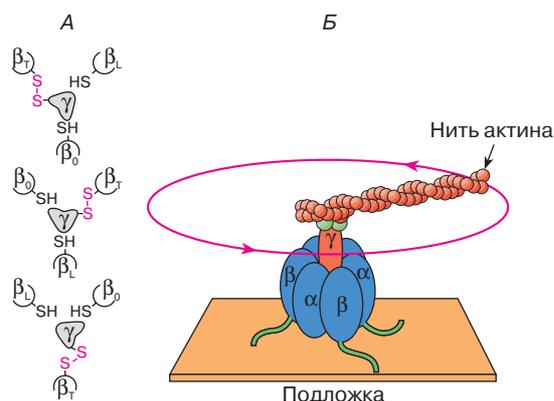


Рис. 3. Схемы, иллюстрирующие способы доказательства того, что субъединица γ АТРсинтазы вращается: А – изменение положения дисульфидного мостика (S—S) в результате поворотов субъединицы γ внутри центральной полости комплекса F_1 ; Б – вращение актинового хвоста, прикрепленного к концу субъединицы γ молекулы F_1 , которая отделена от мембраны и зафиксирована на подложке с помощью специальных хвостиков

после повторной сшивки S—S-мостик останется в исходном положении. Однако в том случае, если после разрыва S—S-мостика в ходе работы фермента произойдет поворот субъединицы γ , то может образоваться новый S—S-мостик между субъединицей γ и другой субъединицей β . Именно такую картину и наблюдали исследователи, когда фермент работал, то есть гидролизовал АТР. Оказалось, что новые S—S-мостики образовывались между субъединицей γ и всеми тремя субъединицами β фактора сопряжения F_1 (рис. 3, А); этот факт свидетельствует о вращении субъединицы γ во время работы F_1 . Показано также, что вращение ротора АТРсинтазы происходит не только при гидролизе АТР изолированным фактором F_1 , но и в условиях синтеза АТР мембранной АТРсинтазой в нативных системах.

В работах немецкого биофизика В. Юнге и его сотрудников для регистрации вращательного движения субъединицы γ был использован оптический метод, который позволяет изучать подвижность специальной химической метки, присоединенной к субъединице γ . В качестве молекулярного зонда, сигнализирующего экспериментатору о вращении субъединицы γ , был использован краситель эозин. Молекулу красителя химическим способом пришивали к субъединице γ , в то время как саму глобулу $(\alpha\beta)_3$ обездвиживали, прикрепляя ее к ионообменной смоле. За изменением ориентации молекул красителя наблюдали с помощью зондирующего луча поляризованного лазерного света. Обнаружено, что характерное время изменения ориентации молекулы зонда, жестко пришитой к субъединице γ , составляет ~100 мс, что практически совпадает со временем гидролиза одной молекулы АТР изолированным ферментом. Важно отметить, что вращение субъединицы γ наблюдается только в случае работающего фермента, то есть когда белковый комплекс F_1 гидролизует АТР. В присутствии ингибитора, препятствующего гидролизу АТР, вращения не происходит.

Однако самым впечатляющим доказательством того, что субъединица γ действительно крутится в ходе работы фермента, стала замечательная работа, выполненная недавно группой японских исследователей [5, 6]. Киношите, Йошиде и их соавторам впервые удалось непосредственно увидеть вращение субъединицы γ с помощью флуоресцентного микроскопа. Как можно разглядеть вращение ротора, диаметр которого составляет всего лишь 1 нм?

Чтобы наблюдать за вращением субъединицы γ , к ее основанию, выступающему из комплекса F_1 , японские ученые прикрепили специальный макромолекулярный маркер – фрагмент нити актина (белок, входящий в состав мышц) длиной около одного микрона, который, в свою очередь, был помечен молекулами флуоресцирующего красителя. Остальную часть отделенной от мембраны молекулы F_1 обездвижили, пришив к субъединицам β специальные

хвостики, с помощью которых F_1 прикрепили к неподвижной подложке (рис. 3, Б). Наблюдая с помощью микроскопа за изменением положения флуоресцирующей нити актина, жестко связанной субъединицей γ , удалось непосредственно увидеть ее вращение! Оказалось, что в ходе работы фермента, гидролизующего АТР, актиновый хвост крутится против часовой стрелки!! Крутится именно в том направлении, которое было предсказано на основании структурных данных, полученных группой Дж. Уокера!!! Так впервые было наглядно продемонстрировано вращение самого маленького из всех известных в природе моторов. Вместе с этим в науке окончательно утвердилось новое понятие – вращательный катализ (англ. – rotary catalysis). Вращение актинового хвоста молекулой F_1 было снято на пленку и произвело сильнейшее впечатление на всех, кому посчастливилось увидеть видеофильм о работе этого удивительно красивого, необычного и очень важного молекулярного мотора.

В дальнейшем было показано, что молекула F_1 вращает актиновый хвост дискретными скачками с шагом, равным 120° [6]. Один скачок на 120° сопровождается гидролизом одной молекулы АТР. При этом средняя скорость вращения мотора зависит от нагрузки: чем длиннее актиновый хвост, тем больше гидродинамическое сопротивление и соответственно тем реже происходят скачкообразные повороты. Иными словами, чем выше нагрузка, тем медленнее крутится мотор. При отсутствии источника энергии (когда система не содержала молекул АТР) регулярного направленного вращения субъединицы не происходило, а наблюдались лишь очень редкие случайные повороты в обоих направлениях, обусловленные тепловыми движениями.

Замечательным качеством вращающегося мотора АТРсинтазы является его исключительно высокий коэффициент полезного действия (КПД). Показано, что работа, которую совершает мотор при повороте актинового хвоста на 120° , почти в точности равна энергии, запасенной в молекуле АТР. Это означает, что КПД работы мотора близок к 100%.

В табл. 1 приведены сравнительные характеристики различных молекулярных моторов, встречающихся в живой клетке. Видно, что АТРсинтаза является своего рода рекордсменом среди молекулярных моторов своей “весовой категории”. По эффективности работы и развиваемой ею силе она существенно превосходит все известные в природе моле-

кулярные моторы. Так, например, максимальная сила, создаваемая при работе одного миозинового мостика актомиозинового комплекса мышечных волокон, составляет $f_{\text{макс}} \cong 3\text{--}5$ пН (1 пН = 10^{-12} Н). Вращательный момент, создаваемый молекулой F_1 за счет гидролиза АТР, достигает величины $M \cong 40$ пН · нм. Если учесть, что радиус r вращающейся субъединицы составляет $r \approx 1$ нм, то сила f , развиваемая молекулой F_1 , будет равна $f = M/r \approx 40$ пН. Оказывается, что молекула F_1 приблизительно в 10 раз сильнее актомиозинового комплекса – молекулярной машины, специализирующейся в клетках и различных органах на “профессиональном” выполнении механической работы. Таким образом, за сотни миллионов лет до того, как появился человек, который изобрел колесо, преимущества вращательного характера движения были успешно реализованы Природой на молекулярном уровне.

Протонный канал АТРсинтазы

Вращение ротора АТРсинтазы происходит как при гидролизе АТР, так и в условиях синтеза АТР. Сила, приводящая в движение ротор АТРсинтазы, работающей в режиме синтеза АТР, возникает за счет потока протонов, протекающих через специальный канал. Блокирование протонного канала с помощью ингибитора (дициклокарбодимид), действующего на одну из субъединиц c мембранного комплекса F_0 , одновременно подавляет вращение ротора и синтез АТР.

Протонный канал АТРсинтазы расположен на границе между субъединицами a и c . Путь переноса протонов включает следующие структурные элементы (рис. 4, А).

1. Два протонных “полуканала”, расположенных в мембранной части АТРсинтазы. Один из них находится ближе к той стороне мембраны, которая обращена в область с повышенной концентрацией ионов водорода (будем называть эту область кислотным резервуаром). Этот полуканал обеспечивает поступление протонов к определенным функциональным группам F_0 , расположенным внутри мотора. Другой полуканал, обращенный в противоположную сторону мембраны, обеспечивает выход протонов в область с пониженной концентрацией ионов водорода (щелочной резервуар). Считается, что полуканалы не связаны друг с другом непосредственно, поскольку они расположены несоосно, то есть смещены друг относительно друга.

Таблица 1. Сравнительные характеристики молекулярных моторов (по данным [6])

Мотор/Путь	Шаг	Макс. сила	Макс. КПД	Способ движения
Миозин/Актин	Переменный	3–5 пН	~20 %	Шаги, прыжки (бег)
Кинезин/Микротрубочка	Смещение на 8 нм	5 пН	~50 %	Шаги
РНКполимераза/ДНК	Смещение на 0,34 нм	14 пН	~20 %	Ползание (?)
α -, β - и γ -субъединицы F_1	Поворот на 120°	40 пН · нм	~100%	Вращение

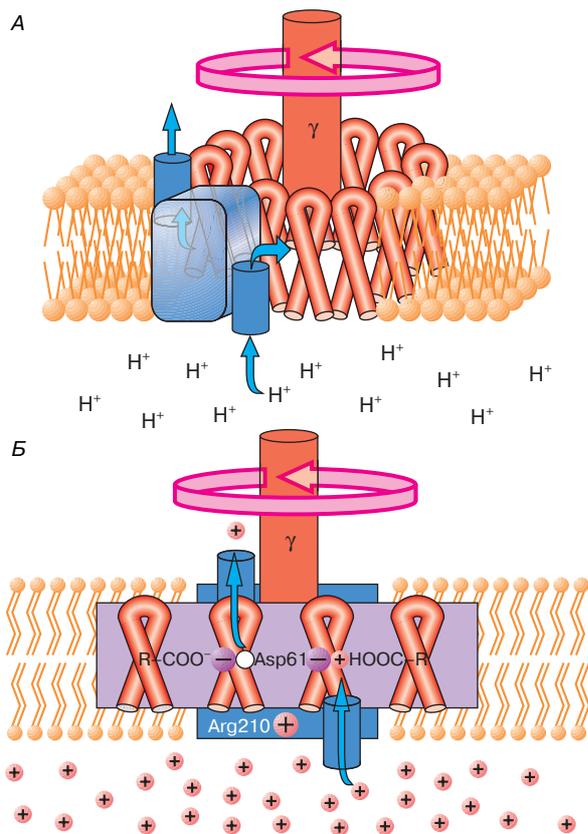


Рис. 4. Путь переноса протонов через АТФсинтазу. Вверху – цилиндрические структуры символизируют протонные каналы, через которые ионы водорода подводятся к субъединицам *c* со стороны кислотного резервуара и отводятся от них в сторону щелочного резервуара. Внизу показана схема возможного расположения протонируемых групп на субъединице *a* (Arg 210) и субъединицах с ротора (Asp 61). Аминокислотный остаток Arg 210 заряжен положительно. Карбоксильная группа аминокислотного остатка Asp 61 может находиться в двух состояниях: протонированном (R–COOH) и депротонированном (R–COO⁻). Заряд карбоксильной группы зависит от ее положения относительно верхнего и нижнего протонпроводящих каналов. При контакте этой группы через нижний канал с кислотным резервуаром, где концентрация ионов водорода повышена, карбоксильная группа протонируется (R–COO⁻ + H⁺ → R–COOH). Карбоксильная группа, расположенная вблизи от верхнего канала, обращенного в сторону щелочного резервуара, депротонируется – протон диссоциирует и уходит наружу, в результате чего карбоксильная группа становится заряженной отрицательно. За счет взаимодействия заряженных групп субъединиц *c* и *a* происходит смещение белковых субъединиц АТФсинтазы друг относительно друга. В результате периодических смещений субъединиц *c*, обусловленных потоком протонов через протонный канал, происходит поворот субъединицы γ , погруженной в кольцо из субъединиц *c*

2. Кольцо из субъединиц *c*. Каждая из этих субъединиц в своей центральной части содержит протонируемую карбоксильную группу (R–COOH), которая способна присоединять протон из кислотной области (R–COO⁻ + H⁺ → R–COOH) и отдавать его в щелочную область (R–COOH → R–COO⁻ + H⁺) через соответствующие протонные каналы.

Главную роль в работе протонного канала АТФсинтазы играют аминокислоты субъединиц *a* и *c*, содержащие протонируемые группы. Протонируемые аминокислотные остатки способны удерживать протоны и передавать их друг другу. В АТФсинтазе такими группами являются аминокислотные остатки аспарагиновой кислоты (Asp), аргинина (Arg), гистидина (His) и глутаминовой кислоты (Glu). У *E. coli* ключевую роль в переносе протонов через АТФсинтазу играет карбоксильная группа аспарагиновой кислоты, расположенной на субъединице *c* (Asp 61, цифра 61 обозначает порядковый номер аминокислоты в полипептидной цепи субъединицы *c*, отсчитываемый с N-конца молекулы белка). Блокирование этой аминокислоты ингибитором (дициклокарбодиимид) или замена Asp 61 на другую аминокислоту путем сайт-специфического мутагенеза подавляет ферментативную активность. В то же время мутация, при которой происходит перемещение аспарагиновой кислоты с одной α -спирали субъединицы *c* на другую (каждая субъединица *c* имеет вид шпильки, состоящей из двух α -спиралей, погруженных в мембрану), практически не влияет на работу протонного канала. Второй важной аминокислотой, связанной с переносом протонов, является аргинин (Arg 210), входящий в состав субъединицы *a* (рис. 4, Б). В переносе протонов через АТФсинтазу, по-видимому, участвуют и другие аминокислотные остатки субъединицы *a*, однако их роль в создании вращательного момента, приводящего ротор во вращение, не столь существенна, как Asp 61 и Arg 210.

Схема возможного расположения функциональных групп на белковых субъединицах F_0 и последовательность процессов, в результате которых перенос протонов через F_0 показаны на рис. 4. Некоторые исследователи считают, что перенос протона от нижнего полуканала в верхнему связан с вращением всего кольца, образованного субъединицами *c* (на рис. 4 этому соответствует вращение кольца против часовой стрелки). Данная гипотеза, однако, еще не получена экспериментального подтверждения.

Движение протонов через АТФсинтазу может происходить не только за счет разности концентраций ионов водорода по обе стороны мембраны, но также под действием разности электрических потенциалов. Если электрический потенциал со стороны комплекса F_1 ниже, чем с противоположной стороны, то под действием электрического поля, направленного поперек мембраны в сторону F_1 , возникнет поток протонов через АТФсинтазу. Положительный

потенциал со стороны нижнего полуканала будет способствовать протонированию, а отрицательный потенциал со стороны верхнего полуканала — депротонированию карбоксильных групп субъединиц *c*. Поддерживая на мембране достаточно высокую разность электрических потенциалов ($\Delta\phi$) можно заставить мотор вращаться даже при одинаковых концентрациях ионов водорода по обе стороны мембраны. Как правило, для этого достаточно создать на мембране разность потенциалов $\Delta\phi \sim 180\text{--}200$ мВ. Интересно, что существуют бактерии, у которых АТФсинтазы используют энергию не протонного, а натриевого потенциала [1, 2].

Объем работы, которую производят АТФсинтазы, поражает грандиозными масштабами. Как заметил П. Бойер, общая масса молекул АТФ, синтезируемых в организме взрослого человека в течение суток, сопоставима с массой самого человека. В этом нет ничего странного. В организме идут многочисленные биохимические процессы, в ходе которых АТФ интенсивно расходуется. Поэтому, чтобы организм мог жить, его АТФсинтазы вынуждены крутиться, своевременно восполняя запасы молекул АТФ.

ВРАЩАЮЩИЕСЯ ЭЛЕКТРОМОТОРЫ БАКТЕРИЙ

Для того чтобы плавать, бактерии с помощью специальных электромоторов вращают свои жгутики [2]. Так, например, с поверхности бактерии *E. coli* наружу выступают приблизительно шесть жгутиков, каждый из которых представляет собой спиралевидную нить диаметром 15 нм и длиной 10 мкм. Когда жгутики начинают синхронно вращаться против часовой стрелки, они сплетаются в единый пучок, который образует своеобразный пропеллер (рис 5, А). Вращение пропеллера создает силу, заставляющую бактерию двигаться почти по прямой линии. После того как направление вращения жгутиков изменяется на противоположное, пучок расплетается и бактерия останавливается, вместо поступательного движения она начинает хаотически вращаться, ее ориентация изменяется. В тот момент, когда все жгутики бактерии снова начнут синхронно вращаться против часовой стрелки, образовав пропеллер, толкающий бактерию, направление ее поступательного движения будет отличаться от первоначального. Таким способом бактерия может изменять направление своего движения. Как и протонные АТФсинтазы, электромоторы бактерий являются ус-

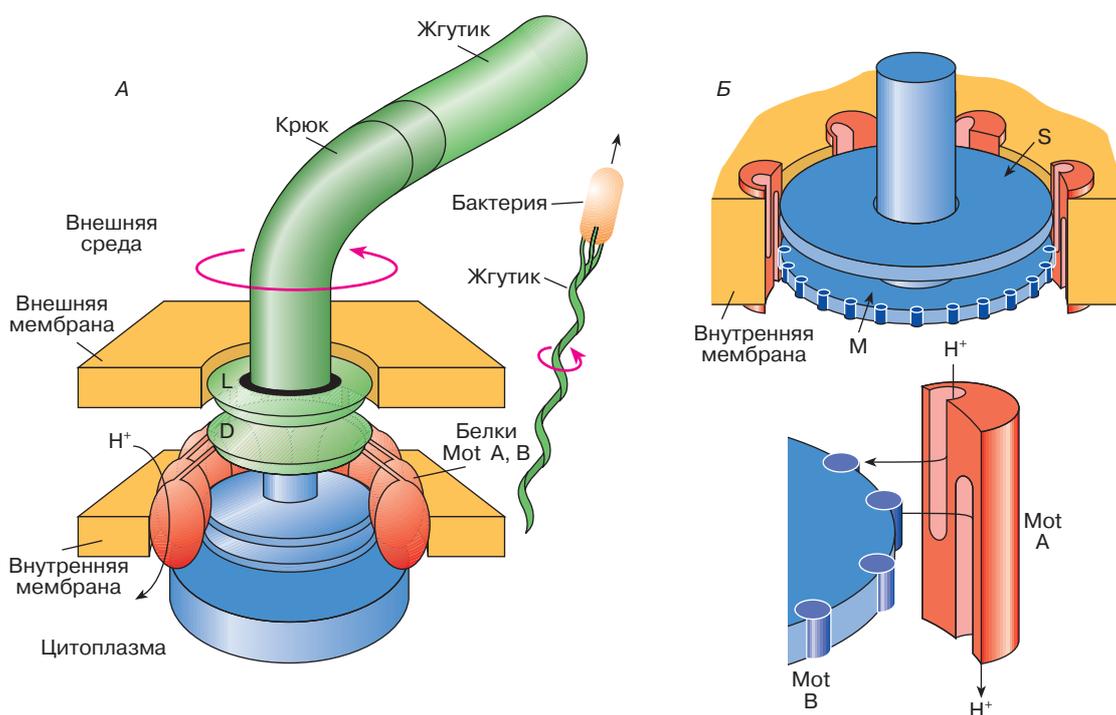


Рис. 5. А – схематическое изображение электромотора, вращающего жгутики бактерий. Центры двух соосных дисков (М и S) соединены с вращающимся стержнем, выступающим наружу. На периферии диска М находятся моторные белки Mot В. Белки Mot А встроены в мембрану и примыкают к краям дисков М и S; Б – схема возможного расположения субъединиц Mot А и Mot В, образующих каналы, через которые протоны из периплазматического пространства переносятся в цитоплазму бактериальной клетки (модификация рисунка из книги: Stryer L., Biochemistry. N.Y.: Freeman and K^o). Вращающий момент, вызывающий поворот ротора мотора, возникает за счет взаимодействия субъединиц Mot В с белковыми субъединицами Mot А, расположенными на статоре электромотора

тройствами, которые в качестве источника энергии используют разность протонных потенциалов на цитоплазматической мембране. Принципы работы АТРСинтазы и бактериального мотора одинаковы, хотя сами эти конструкции различаются по своим размерам и устройству. Схематическое изображение бактериального мотора показано на рис. 5. Мотор состоит из ротора, статора и некоторых вспомогательных белковых субъединиц, выполняющих роль подшипника, внутри которого вращается стержень ротора (об устройстве и механизмах работы бактериального электромотора см. подробнее [2]). Важными узлами бактериального электромотора являются два соосных диска (называемые М- и S-дисками), центры которых соединены с вращающимся стержнем, выступающим наружу. На периферии диска М находятся многочисленные копии белка, названного Mot В. Несколько копий белка Mot А, входящего в состав статора, встроены в мембрану и примыкают к краям дисков М и S. Механизм генерации силы, приводящей ротор во вращение, по-видимому, имеет ту же природу, что и в случае АТРСинтазы. Вращающий момент возникает за счет взаимодействия субъединиц Mot В с белковыми субъединицами Mot А, расположенными на статоре электромотора. Считается, что в состав субъединицы Mot А входят два несоосных протонных полуканала. Подобно протонному каналу АТРСинтазы, путь переноса протонов через мембрану проходит через протонные полуканалы субъединиц Mot А и Mot В [2]. В результате переноса протонов через белки Mot А и Mot В, направленного внутрь бактериальной клетки, происходит вращение ротора. Один полный оборот ротора связан с переносом через мембрану около 1000 протонов.

Электромоторы бактерий работают очень эффективно. Бактерии плавают со средней скоростью около 25 мкм/с, но некоторые виды могут двигаться поступательно со скоростью больше 100 мкм/с. Это означает, что за одну секунду бактерия перемещается на расстояние, которое в десять или большее число раз превышает ее собственную длину. Любопытно провести аналогию с движением систем макроскопических размеров. Например, если бы пловцы преодолевали за одну секунду расстояние, на порядок

превышающее их собственный рост, то стометровую дорожку плавательного бассейна они бы проплыли приблизительно за 5 с. Обычно электромотор бактерий вращается со скоростью, достигающей 50–100 оборотов в секунду, однако у некоторых видов бактерий скорость вращения превышает 1000 оборотов в секунду. Электромоторы, которые могут так быстро вращать жгутики бактерий, очень экономичны – они потребляют не более 1% энергетических ресурсов бактериальной клетки.

Рассмотренными примерами не ограничивается все разнообразие вращающихся моторов, которые встречаются в природе. Существуют бактерии, у которых АТРСинтазы используют энергию не протонного, а натриевого потенциала [1, 2]. Изучение молекулярных моторов продолжается; несомненно, что дальнейшие исследования помогут детальнее выяснить механизмы их работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скулачев В.П. Законы биоэнергетики // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 1. С. 9–14.
2. Скулачев В.П. Электродвигатель бактерий // Там же. 1998. № 9. С. 2–7.
3. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Там же. 1996. № 4. С. 24–32.
4. Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии в живой клетке // Там же. 1997. № 7. С. 10–17.
5. Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K., Jr. Direct Observation of the Rotation of F₁-ATPase // Nature. 1997. Vol. 386. P. 299–302.
6. Kinoshita K., Jr., Yasuda R., Noji H., Ishiwata S., Yoshida M. F₁-ATPase: A Rotary Motor Made of a Single Molecule // Cell. 1998. Vol. 93. P. 21–24.

* * *

Александр Николаевич Тихонов, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник кафедры биофизики физического факультета МГУ. Область научных интересов – биофизика фотосинтеза, биоэнергетика, магнитная радиоспектроскопия. Автор трех книг и более 140 статей в отечественных и зарубежных научных журналах.