

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

С. М. Мартirosos

О механизме натриевого насоса

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР В. О. Казаряном 20/IV 1971)

Перенос ионов натрия из клетки в обмен на ионы калия наружной среды происходит против градиентов электрохимических потенциалов. Такую работу выполняет «натриевый насос», который локализован в клеточной мембране (1) и использует для этой цели энергию гидролиза АТФ (2).

В настоящее время накопилось большое количество экспериментальных фактов, отражающих различные аспекты работы натриевого насоса. Построены многочисленные модели, в которых и схематизирована феноменология активного транспорта катионов (3). Но так как неизвестны конкретные молекулы или их активные центры, участвующие в переносе катионов, никогда не обсуждается вопрос о том, как происходит сопряжение между химическим циклом, ведущим к гидролизу АТФ, и процессом ионного обмена и почему стехиометрия транспорта выражается отношением $АТФ:Na:K = 1:3:2$ (4).

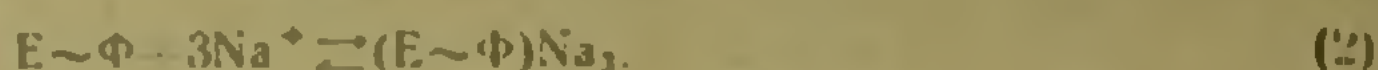
Открытие явления синтеза АТФ с помощью обратимо работающего натриевого насоса (5), а также попытки определить место фосфорилирования и формы промежуточных соединений, принимающих участие в переносе катионов (6), создали необходимую предпосылку для детального химического анализа процесса.

В данной статье предлагается для обсуждения гипотетический механизм сопряжения между гидролизом АТФ и переносом ионов.

Активный транспорт катионов, по-видимому, начинается с фосфокиназной реакции. Рядом авторов было показано, что терминальный фосфат АТФ обратимо включается в фосфопротенины мембраны.

Обязательным условием является присутствие ионов магния в инкубационной среде, при этом добавление ионов натрия в среду значительно увеличивает фосфорилирование мембраны (7). Если в мембране присутствуют две аденозинтрифосфотазы ($Mg-ATP-аза$ и $Mg + Na + K-ATP-аза$), то возрастание фосфорилирования мембраны в присутствии Na^+ следует объяснить наличием двух параллельных реакций. Другое

возможное объяснение заключается в том, что работа транспортной АТФ-азы представляет собой две последовательные реакции:

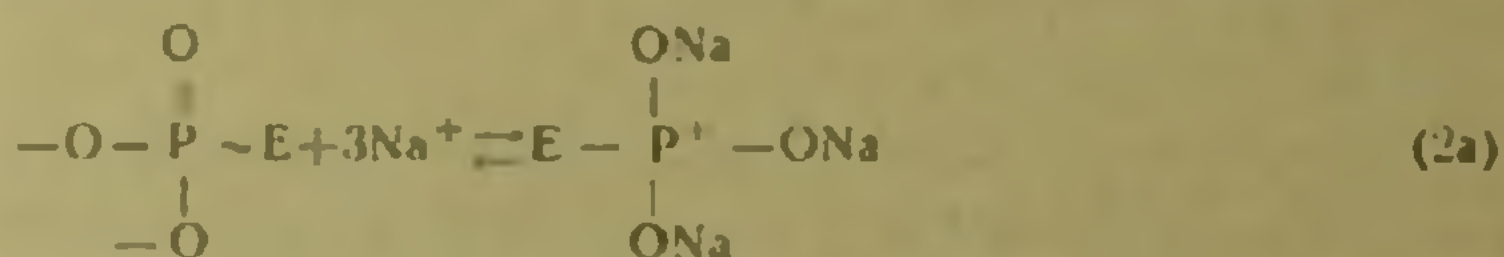


где Е — некоторая макромолекула (возможно, сама транспортная АТФ-аза), расположенная на внутренней границе мембраны. Для удобства изложения дальнейшего материала назовем ее переносчиком.

Последовательная цепь реакций (1) — (2) означает, что фосфорилирование молекулы Е катализируется ионами магния. При добавлении ионов натрия в инкубационную среду Е ~ Ф переходит в (Е ~ Ф)Na₃, т. е. в мембране появляются две фосфорилированные формы молекулы. Это ведет к тому, что нарушится равновесие реакции (1), что приведет к дополнительному включению ~Ф в мембрану.

В записанной последовательности реакций (1) и (2) подразумевается также, что до фосфорилирования молекулы Е невозможно включение ионов Na⁺ в транспортный цикл (8). Либо для запуска транспортного цикла нужна энергия ~Ф, либо фосфат приносит не только энергию, но и играет некоторую дополнительную роль в переносе катионов.

Фосфорилированный переносчик Е ~ Ф находится на границе мембрана — внутриклеточная среда. Допустим, что на частичный разрыв связи P=O для фосфата, находящегося в этом положении, требуется энергия, не превышающая таковой гидролиза АТФ до АДФ. Кроме того, предположим, что реакция, идущая с разрывом связи P=O, промотируется ионами Na⁺, которые присоединяются к фосфату через три кислородных атома:



Процесс идет с изменением конформации молекулы. При этом фосфатный конец молекулы с ионами натрия перебрасывается в фазу мембраны (фосфат написан справа от Е). Реакция (2a) полностью обратима, так как кинетика процесса контролируется стремлением молекулы восстановить связь P=O.

Таким образом, предполагается, что фосфат играет двойную роль в активном выведении ионов натрия из клетки. С одной стороны, с помощью фосфата, взятого от АТФ, происходит снабжение энергией переносчика для совершения работы, с другой — обеспечиваются места ионы натрия, которые необходимо транспортировать через внутреннюю границу мембраны.

«Внутренняя энергия» молекулы в натриевой форме находится в активированном состоянии. Если восстановление двойной связи теперь направить по другому пути, то энергия будет утилизována.

Реакции, подобные (2а), по-видимому, могут обеспечить достаточную точность и экономичность в сопряжении химического и транспортного циклов при активном переносе катионов.

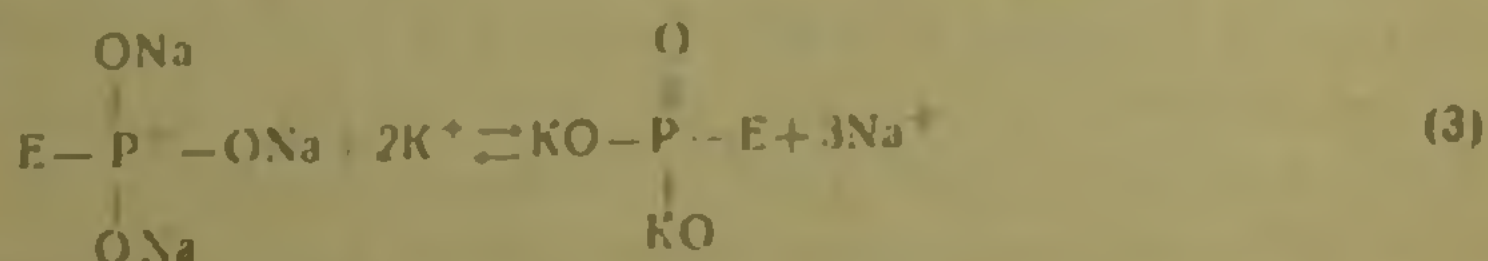
Классическая схема активного переноса катионов предполагает существование некоего подвижного переносчика в мембране, который захватывает ионы натрия из внутриклеточной среды и диффундирует через всю мембрану к наружной ее границе. Там переносчик обменивает ионы натрия на ионы калия наружной среды и возвращается обратно.

В другого типа модели предполагается, что липопротеиновый комплекс, захватив ионы Na^+ на внутренней границе мембраны, совершает поворот через ее толщу, так что его ионообменные центры оказываются обращенными в наружную среду, где и происходит обмен Na^+ на K^+ (2). Таким образом, считается обязательным всегда постулировать, что ионообменная реакция имеет место только на границе мембрана—наружная среда. Кратко остановимся на основных положениях нашей модели. Допустим, что участок мембраны, внутри которой совершает поворот

фосфатный конец соединения $\text{E}-\text{P}-\text{O}_3\text{Na}_3$, представляет собой «ионообменный канал» с очень высокой избирательностью по калию. Такой «ионообменный канал» с внутренней стороны мембраны закрыт макромолекулой E и не имеет возможности обменивать ионы с внутриклеточной средой. Со стороны наружной границы мембраны в него могут поступать как ионы натрия, так и ионы калия. Степень заполнения канала тем или иным ионом будет зависеть как от констант специфичности мембраны на этом участке, так и от концентрации катионов в наружной среде. Если константа специфичности $K_{\text{Na},\text{K}} \ll 1$, канал будет заполнен ионами калия уже при физиологических концентрациях ионов в наружной среде. Такое положение может наблюдаться, в частности, для нервных и мышечных волокон, где относительная проницаемость $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ около 0,01 (20).

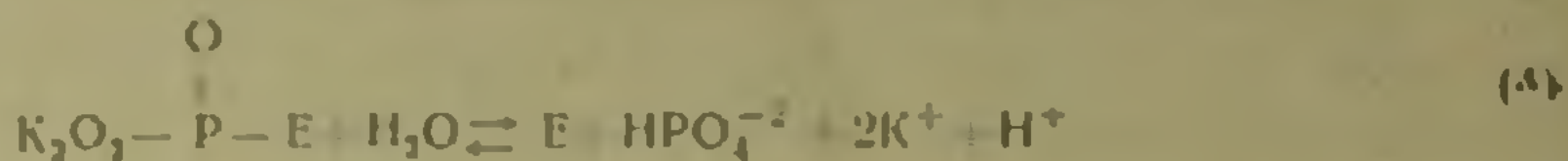
Основываясь на вышеизложенных представлениях о свойствах участка мембраны, в которую совершает поворот фосфатный конец молекулы $\text{E}-\text{P}-\text{O}_3\text{Na}_3$, рассмотрим теперь, как происходит обмен ионов Na^+ клетки на ионы K^+ наружной среды.

Ионы калия среды сперва поступают в ионообменник и только после этого внутри мембраны вблизи внутренней границы участвуют в реакции:



Восстановление связи $\text{P}=\text{O}$ ведет к потере высокоэнергетического состояния молекулы и возвращению к исходной структуре, при этом фосфатный конец обращен в водную среду клетки. В этом положении вода

подвергает атаке фосфатный конец молекулы и завершается как гидролиз АТФ, так и цикл ионного обмена:



Из реакции (2a) — (4) следует, что стадии гидролиза АТФ и обмен Na^+ клетки на K^+ среды идут одновременно. Из реакций (3) и (4) видно, что именно при обмене трех ионов натрия на два иона калия происходит утилизация энергии. Идея о том, что энергия расходуется на ионообменной стадии, была ранее высказана П. Колдуэллом (11). В цикле реакций (1) — (4) это предположение приобретает конкретное содержание. В состоянии $\text{E} \sim \text{Ф}$ энергия в молекуле законсервирована, стадия

$\text{E} - \text{P} - \text{O}_3\text{Na}_2$ говорит о том, что молекула переведена в активированное состояние за счет этой энергии и перераспределилась для изменения конформации молекулы. На стадии ионного обмена реакция смещается в другую сторону и восстанавливается связь $\text{P} - \text{O}$, тем самым молекула возвращается в исходное состояние с минимумом энергии, где она подвергается гидролизу.

Изложенные ранее уравнения (1) — (4) были приняты как обратимые реакции. Такое допущение непосредственно исходит из экспериментов, выполненных в течение ряда лет на эритроцитах (5, 12, 13).

Было показано, что выведение ионов калия клетки в обмен на ионы натрия наружной среды с помощью натриевого насоса ведет к сопряженному синтезу АТФ из АДФ и внутриклеточного ортофосфата (14, 15).

Таким образом, обмен натрия клетки на калий среды сопровождается гидролизом АТФ, а обмен калия клетки на натрий среды сопряжен с синтезом АТФ. Иными словами, обратимость транспортного цикла ведет к обратимости химического цикла при активном транспорте катионов. Как уже отмечали П. Гаррахан и И. Глини (5), реверсия натриевого насоса заключается в том, чтобы использовать градиенты электрохимических потенциалов для синтеза макроэргического соединения.

Рассмотрим в чем смысл реверсии натриевого насоса для схемы, излагаемой в данной статье, в которой весь процесс должен пойти по пути обратимых реакций (4) — (1).

Вследствие высокой избирательности мембраны для калия, на наружной границе идет избирательная аккумуляция этих ионов. Первое необходимое предельное условие для реверсии натриевого насоса заключается в удалении ионов калия из наружной среды. Тогда мембрана будет заполнена ионами натрия. В этих условиях создается предпосылка для транспорта ионов натрия из среды в клетку.

Реверсия натриевого насоса начинается с обратной реакции (4). Поэтому необходима высокая концентрация ионов калия и ортофосфата в клетке. Кроме этого необходимо также в предельном случае удалить АТФ и ионы натрия из клетки. Если АТФ и Na^+ будут в клетке в достаточном количестве, возникнет конкуренция за места на E между прямы-

ми реакциями (1) и (2) и обратной реакцией (4). Другими словами, необходимо создать высокие градиенты химических потенциалов для ионов калия и натрия, направленных из среды в клетку и в обратном направлении соответственно для каждого из этих катионов. Приблизительно такие условия были созданы в вышецитированных работах на эритроцитах.

Основной изложенной гипотезы является постулат о двойной роли терминального фосфата АТФ в активном транспорте катионов. Цель же работы заключалась в том, чтобы показать какую роль в механизме натриевого насоса и в неэквивалентном переносе катионов могут играть разрыв и образование двойных связей, а также селективность самой мембраны.

В основном допущении работы о роли фосфата в транспорте катионов через клеточные мембраны утверждается, что ионы натрия и калия присоединяются к переносчику не в разных точках по всей молекуле, а к одной функциональной единице. Наиболее удобным местом для этого является либо район многовалентного атома (P, S, N), либо участок, содержащий лабильные двойные связи. Тогда разрыв двойной связи при присоединении трех ионов натрия и восстановление этой связи при обмене на два иона калия позволили бы осуществить неэквивалентный перенос катионов.

Так как, по-видимому, АТФ является обязательной компонентой активного транспорта катионов, то из допущения о двойной роли макроэргического фосфата в переносе катионов вытекает следствие: стехиометрическое соотношение $АТФ Na:K = 1:3:2$ является универсальной величиной.

Из допущения об «ионообменном канале», обладающем катионной специфичностью, следует, что переносчику-макромолекуле, работающему на внутренней границе мембраны, нет необходимости производить отбор ионов калия из среды, содержащей несомненно большее количество натрия. Переносчик обменивает ионы натрия клетки на ионы калия внутри ионообменного канала. Но так как ионообменный канал обладает родством к ионам калия, то обязательным условием для обменной стадии процесса является, по крайней мере, потеря переносчиком специфичности по натрию при изменении его первоначальной конформации (реакция (3)). Таким образом, основное различие предполагаемой схемы транспорта от классической модели подвижных переносчиков заключается в том, что весь обменный процесс идет у внутренней границы мембраны и катионспецифические свойства мембраны играют уже решающую роль.

Приписывая структуре мембраны свойства, от которых зависит работа натриевого насоса, следует тем самым отметить, что без мембраны транспортная система и связанная с ней ферментативная активность не будут проявляться, т. е. свойства транспортной АТФ-азы зависят от того, связан ли белок с мембраной или находится просто в водной среде?

Принцип регуляции некоторого процесса, зависящий от местонахождения хотя бы одного из реагентов, можно назвать аллотопической регуляцией. Понятие аллотопии было введено в мембранологию при изучении реконструкции функционального аппарата, митохондрий, когда выяснилось, что свойства фермента зависят от его места на мембране (16).

В рассмотренной схеме активного переноса катионов натриевый насос осуществляет и контролирует фазовые переходы ионов Na^+ и K^+ , либо затрачивая энергию, либо аккумулируя ее в зависимости от условий в клетке и в наружной среде. Но так как основная функция натриевого насоса заключается в поддержании внутриклеточной концентрации ионов натрия на низком уровне, то вся регуляция смещена в сторону гидролиза АТФ и выведению избыточного количества натрия из клетки.

Автор выражает благодарность А. М. Шкробу и А. П. Шинкову за критические замечания, В. С. Маркину и Ю. А. Чизмаджеву за ценные советы.

Ботанический институт
Академии наук Армянской ССР

II. II. ՄԱՐՏԻՐՈՍՈՎ

Նաւորիումային պոմպի մեխանիզմի մասին

Աշխատանքում փորձ է արվում պարզարանելու փոխադրիչի մեջ կրկնակի կապերի առաջացման և վերջիններիս խղման նշանակությունը ոչ համարժեքային Na և K կատիոնների տեղափոխման պրոցեսում, ինչպես և վերջիններիս մեջ մեմբրանի ընտրողականության դերը: Արված են երկու ենթադրություններ՝ ա) ֆոսֆատների վրա իրականացվում է կատիոնի միացումը փոխադրիչի հետ, բ) կատիոնային փոխանակությունը փոխադրիչի վրա տեղի է ունենում մեմբրանի որոշակի տեղամասերում: Քննարկվում են անդրադարձիչ նաւորիումային պոմպի և ալոտոպային կանոնավորման սկզբունքի հարցերը:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ J. C. Scou, *Biochim et biophys. acta*, 23:394, 1957. ² P. C. Caldwell, A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, T. I. Show, *J. Physiol*, 152:561 (1960). ³ H. H. Жучовская, *Успехи биол. химии*, 8: 93 (1967). ⁴ A. K. Sen, R. L. Post, *J. Biol. Chem.*, 239, 345 (1964). ⁵ P. J. Garrahan, I. M. Glinn, *J. Physiol*, 192, 237 (1967). ⁶ R. L. Post, S. Kume, Tobin, B. Orcutt, A. K. Sen, *J. Gen. Physiol*, 54, 306s (1969). ⁷ K. Ahmed, J. D. Judah, *Biochem. et biophys. acta*, 104, 112 (1965). ⁸ J. S. Charnock, A. S. Rosental, R. L. Post, *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 41, 675 (1963). ⁹ L. J. Opit, J. S. Charnock, *Nature*, 208, 471 (1965). ¹⁰ A. L. Hodgkin, P. Horowicz, *J. Physiol*, 148, 127 (1959). ¹¹ P. C. Caldwell, *Physiol. Revs.*, 48, 1 (1968). ¹² I. M. Glinn, V. L. Lew, I. Luthi, *J. Physiol*, 207, 371 (1970). ¹³ I. M. Glinn, V. L. Lew, *J. Physiol*, 207, 393 (1970). ¹⁴ I. M. Glinn, V. L. Lew, *J. Gen. Physiol.*, 51, 289s (1968). ¹⁵ A. F. Lant, R. N. Preestland, R. Whittam, *J. Physiol*, 207, 291 (1970). ¹⁶ Э. Рэкер, *Молекулы и клетки*. Вып. 4, стр. 150, 1969.