БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 11, с. 1733 – 1742

УДК 577.151

Na^+-ТРАНСЛОЦИРУЮЩАЯ ФЕРРЕДОКСИН:NAD^+-ОКСИДОРЕДУКТАЗА ЯВЛЯЕТСЯ КОМПОНЕНТОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ЗЕЛЕНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2019 Ю.В. Берцова*, М.Д. Мамедов, А.В. Богачев*,**

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bogachev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019
После доработки 05.07.2019
Принята к публикации 07.07.2019

Проведен поиск *rnf*-генов, кодирующих Na^+-транслоцирующую ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктазу (RNF), у фотоавтотрофных организмов с фотосинтетическими реакционными центрами типа I. Показано, что эти гены отсутствуют у гелиобактерий, цианобактерий и растений, но присутствуют в геномах многих, прежде всего морских, зеленых серных бактерий. Анализ экспрессии *rnf*-генов выявил относительно высокий уровень содержания транскриптов этих генов в препаратах РНК, выделенных из морской зеленой серной бактерии *Chlorobium phaeovibrioides*. Установлено, что в мембранной фракции из этой бактерии детектируется Na^+-зависимая флаводоксин:NAD^+-оксидоредуктазная активность, отсутствующая в мембранной фракции близкородственной *Chl. phaeovibrioides* пресноводной зеленой серной бактерии *Chlorobaculum limnaeum*, чей геном не содержит *rnf*-генов. Также показано, что освещение мембран *Chl. phaeovibrioides*, но не *Cba. limnaeum*, приводит к свето-индуцированному восстановлению NAD^+. Полученные данные позволяют заключить, что RNF может принимать участие в процессе восстановления NAD^+ у некоторых зеленых серных бактерий, что должно повышать эффективность преобразования энергии света у этих микроорганизмов, и является первым примером использования Na^+-энергетики в фотосинтетических электрон-транспортных цепях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Na^+-транслоцирующая ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктаза, трансмембранный транспорт натрия, зеленые серные бактерии, нециклический фотосинтетический транспорт электронов.

DOI: 10.1134/S0320972519110149

Каталитическая активность многих комплексов дыхательных и фотосинтетических цепей, а также некоторых других энергопреобразующих мембранных ферментов сопряжена с трансмембранной транслокацией ионов H^+. Образованный таким образом трансмембранный протонный потенциал используется в качестве энергетической валюты для совершения различных видов работы [1]. Однако активность бактериальных мембранных декарбоксилаз [2], NADH:хинон-оксидоредуктазы [3, 4], метилтрансферазного комплекса [5], некоторых АТРаз/АТР-синтаз [6, 7], терминальных оксидаз [8], мембранных пирофосфатаз [9] и родопсинов [10] сопряжена с трансмембранным переносом Na^+, а не протона. Образованный с помощью этих ферментов трансмембранный натриевый потенциал может затем использоваться для совершения основных видов работы – химической, осмотической и механической, образуя натриевый цикл преобразования энергии [11]. Использование натриевого цикла может давать преимущества при росте бактерий в условиях, сопровождающихся пониженным уровнем трансмембранного протонного потенциала, например, при щелочных значениях pH [11]. Другим объяснением широкого распростране-

Принятые сокращения: РВ-ПЦР – количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени; Fd, Fd^{ox}, Fd^{red} – ферредоксин, его окисленная и восстановленная форма соответственно; Fld, Fld^{ox}, Fld^{sq}, Fld^{red} – флаводоксин, его окисленная, семихинонная и полностью восстановленная (хинольная) форма соответственно; FNO – Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктаза; FNR – водорастворимая несопряженная ферредоксин-$NAD(P)^+$ редуктаза; PFOR – пируват:ферредоксин(флаводоксин)-оксидоредуктаза; RNF – Na^+-транслоцирующая ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктаза.

* Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

** Адресат для корреспонденции.

ния Na^+-транслоцирующих ферментов может быть представление о первичности использования натриевого цикла в ходе эволюции мембранных энергопреобразующих белков [12].

На сегодняшний день фотосинтез хлорофилл-содержащих живых организмов является единственным мембран-ассоциированным путем преобразования энергии, для которого не показана возможность использования Na^+ в качестве первичного сопрягающего иона. Фотосинтетические электрон-транспортные цепи фотоавтотрофных организмов состоят из различных комбинаций реакционных центров I-го и II-го типа, а также $b_6f(bc_1)$-комплекса. Все эти энергопреобразующие ферментативные комплексы генерируют трансмембранный протонный потенциал с использованием механизма редокс-петли (Митчеловой петли) [1], где замена H^+ на Na^+ является невозможной. Тем не менее в нециклических фотосинтетических электрон-транспортных цепях перепад значений окислительно-восстановительного потенциала между ферредоксином (Fd) и $NAD(P)^+$ теоретически позволяет организовать еще один пункт сопряжения, и, таким образом, повысить эффективность преобразования энергии света. Однако во всех исследованных фотосинтетических организмах с фотосинтетическими реакционными центрами типа I перенос электронов от Fd на $NAD(P)^+$ осуществляется несопряженной водорастворимой ферредоксин-$NAD(P)^+$ редуктазой (FNR) [13, 14], что приводит к рассеиванию этой энергии в виде тепла.

В то же время у многих гетеротрофных прокариот присутствует Na^+-транслоцирующая ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктаза (RNF), катализирующая перенос электронов между ферредоксином (флаводоксином (Fld)) и NAD^+, и, в зависимости от направления катализируемой реакции, выступающая в качестве генератора (прямая реакция) или потребителя (обратная реакция) трансмембранного натриевого потенциала [15, 16]. RNF-комплекс является мембрансвязанным ферментом и состоит из шести субъединиц (RnfABCDEG), кодируемых шестью генами *rnf*-оперона [17]. RNF широко распространена среди гетеротрофных микроорганизмов, где ее активность позволяет осуществлять запасание энергии при различных типах анаэробного брожения [18, 19] либо (за счет обратной реакции) участвовать в энергозависимом восстановлении низкопотенциального ферредоксина (флаводоксина), необходимого для фиксации N_2, синтеза FeS кластеров и других процессов [15, 20, 21]. В ходе данной работы был проведен поиск RNF у фотоавтотрофных организмов с фотосинтетическими реакционными центрами типа I и показано, что этот белок принимает участие в процессе восстановления NAD^+ у морской зеленой серной бактерии *Chlorobium phaeovibrioides*, а также, по-видимому, и у некоторых других представителей семейства Chlorobiaceae.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: глюкозооксидаза, каталаза, тиаминпирофосфат, CoA, Tris («Sigma», США); MOPS («Amresco», США). Использованные в работе праймеры получали из компании «Евроген» (Россия).

Бактериальные штаммы и условия выращивания. Культура *Chl. phaeovibrioides* DSM 265 была получена из коллекции микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница (DSMZ). Клетки *Chlorobaculum limnaeum* были получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Зеленые серные бактерии выращивали анаэробно при 28 °C и освещенности 1000 люкс, как было описано ранее [22]. Среда роста для *Chl. phaeovibrioides* содержала 10 г/л NaCl, по 0,5 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4Cl, KH_2PO_4 и ацетата аммония, 0,05 г/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 г/л $NaHCO_3$, 2 г/л $Na_2S_2O_3$, 1 г/л Na_2S, 3 мкМ цитрата железа, смесь микроэлементов SL-6 [22] (1 : 500), 20 мкг/л цианокобаламина, 5 мг/л резазурина и 20 мМ MOPS (pH 6,9). В среде роста для *Cba. limnaeum* концентрацию NaCl уменьшали до 1 г/л.

Количественная полимеразная цепная реакция (РВ-ПЦР). Экстракцию РНК из клеток *Chl. phaeovibrioides* и синтез кДНК проводили как описано ранее [23]. РВ-ПЦР проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR kit («Евроген», Россия), полученной кДНК в качестве матрицы и пары праймеров rnfC_F/rnfC_R или rnfG_F/rnfG_R для *Chl. phaeovibrioides rnf*C и *rnf*G соответственно (табл. 1). Для нормализации использовали 16S рРНК (пара праймеров Cp16S_F/Cp16S_R (табл. 1)). Для калибровки РВ-ПЦР применяли серию разведений геномной ДНК из *Chl. phaeovibrioides*, содержащей гены для RnfC, RnfG и 16S рРНК в соотношении 1 : 1 : 1.

Фракционирование клеток *Chl. phaeovibrioides* и *Cba. limnaeum*. Выращенные клетки осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин для *Chl. phaeovibrioides*; 14 000 g, 30 мин для *Cba. limnaeum*) и промывали анаэробным буфером А (170 мМ KCl, 5 мМ $MgSO_4$, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 30 мМ MOPS–Tris, pH 7,0). Клеточный осадок суспендировали в буфере А и пропускали

2× через пресс Френча (16 000 psi) («Aminco», США). Неразрушенные клетки отделяли центрифугированием при 22 500 g (5 мин), полученный супернатант далее центрифугировали при 150 000 g в течение 75 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере А и далее использовали в качестве тотальной мембранной фракции, а супернатант использовали в качестве цитоплазматической фракции.

Обедненные по хлоросомам мембранные фракции *Chl. phaeovibrioides* и *Cba. limnaeum* получали согласно описанному ранее протоколу [24] с небольшими изменениями. Промытые клетки *Chl. phaeovibrioides* или *Cba. limnaeum* суспендировали в анаэробном буфере, содержащем 20 мМ MOPS-Tris (pH 7,0) и 10 мМ β-меркаптоэтанол, пропускали 2× через пресс Френча (16 000 psi) и центрифугировали при 120 000 g в течение 30 мин. Полученный осадок состоял из плотной фракции, содержащей основное количество хлоросом, и верхней рыхлой фракции. Рыхлую фракцию отбирали, разводили анаэробным буфером А и центрифугировали при 150 000 g в течение 75 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере А и использовали далее в качестве обедненной по хлоросомам мембранной фракции.

Определение ферментативных активностей. Пируват:Fld^{sq}-оксидоредуктазную (PFOR) активность определяли, как описано ранее [23]. Среда для определения активности содержала 50 мкМ Fld^{sq}, 0,1 мМ тиаминпирофосфат, 0,2 мМ CoA, 5 U/мл глюкозооксидазы, 5 U/мл каталазы, 10 мМ глюкозу, 2 мМ $MgSO_4$, цитоплазматическую фракцию *Chl. phaeovibrioides* или *Cba. limnaeum* (100 мкг/мл белка) и 100 мМ MOPS-Tris (pH 7,0). Реакцию инициировали добавлением 5 мМ пирувата. Скорость реакции определяли при 25 °C с помощью спектрофотометра Hitachi-557 («Hitachi», Япония) по изменению концентрации Fld^{sq} (ε_{577} = 4,4 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$ [23]).

При определении Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктазной (FNO) активности среда измерения содержала 50 мкМ Fld^{sq}, 0,1 мМ тиаминпирофосфат, 5 мМ пируват-Tris, 0,2 мМ CoA, 5 U/мл глюкозооксидазы, 5 U/мл каталазы, 10 мМ глюкозу, 2 мМ $MgSO_4$, цитоплазматическую фракцию *Chl. phaeovibrioides* или *Cba. limnaeum* (100 мкг/мл белка) и 100 мМ MOPS-Tris (pH 7,0). Эту смесь инкубировали в течение 20 мин, после чего реакцию инициировали добавлением 1 мМ Tris-NAD^+. Скорость реакции определяли спектрофотометрически (ε_{340} = 6,22 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$) при 25 °C. Примесная концентрация Na^+ в конечной реакционной смеси составляла ~90 мкМ. Концентрацию Na^+ определяли с помощью пламенного фотометра ПФМ-4 (СССР).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность
rnfC_F	5'-ACTTCCGGCATTCTCTTCA-3'
rnfC_R	5'-CTCCCGCATTCAGTACAGTT-3'
rnfG_F	5'-TCTGGCACTGGTTGACGAC-3'
rnfG_R	5'-CCTTTCAGTCTGCCTTCATT-3'
Cp16S_F	5'-CAGCCACATTGGAACTGAGA-3'
Cp16S_R	5'-GCTTATTCGCAGAGTACCGT-3'

Для определения фотовосстановления NAD^+ среда измерения содержала 50 мкМ Fld, обедненную по хлоросомам мембранную фракцию из *Chl. phaeovibrioides* или *Cba. limnaeum* (110 мкг/мл белка), 5 U/мл глюкозооксидазы, 5 U/мл каталазы, 10 мМ глюкозу, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ Tris-NAD^+, 10 мМ NaCl и 100 мМ MOPS-Tris (pH 7,0). Реакцию инициировали светом галогенной лампы мощностью 100 Вт, пропущенным через инфракрасный фильтр.

Выделение рекомбинантного 6×His-Fld из *Chl. phaeovibrioides* проводили, как описано ранее [23]. Концентрацию белка определяли бицинхониновым методом [25], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ распространенности *rnf*-оперонов среди различных фотоавтотрофных организмов. BLAST-анализ геномов фотоавтотрофных организмов с фотосинтетическими реакционными центрами I-го типа показывает, что гелиобактерии, цианобактерии и растения не содержат в своих геномах генов *rnf*-оперона. В то же время геномы таких зеленых серных бактерий как *Chl. phaeovibrioides*, *Chlorobium limicola*, *Chlorobium phaeobacteroides* BS1, *Chlorobium* sp. N1, *Pelodictyon luteolum*, *Chloroherpeton thalassium* и различные виды рода *Prosthecochloris* (CIB 2401, ZM_2, V1, GSB1 и HL-130-GSB) содержат полный *rnf*-оперон. Продукты генов *rnf*-оперона зеленых серных бактерий демонстрируют высокое сходство с субъединицами RNF-комплекса из *Acetobacterium woodii* (GenBank: ACR23742–ACR23747), варьирующее (46–81%) в зависимости от субъединицы. Оперон *rnf* зеленых серных бактерий (рис. 1, *а*) в основном характеризуется последовательностью генов *rnf*BCDGEA

[17]. В непосредственной близости от этого оперона обычно находится ген *apb*E, продукт которого осуществляет ковалентное присоединение FMN к субъединицам RNF [26, 27], т.е. созревание этого ферментативного комплекса [28]. Однако далеко не все представители семейства Chlorobiaceae содержат *rnf*-гены. Так, *rnf*-оперон отсутствует у *Chlorobaculum tepidum*, *Cba. limnaeum*, *Chlorobium chlorochromatii* и многих других зеленых серных бактерий. Интересно отметить, что *rnf*-гены в основном присутствуют у морских и отсутствуют у пресноводных зеленых серных бактерий.

Транскрипция *rnf*-генов в клетках зеленой серной бактерии. Для проверки возможности участия RNF-комплекса в нециклической фотосинтетической электрон-транспортной цепи в качестве объекта исследования нами была выбрана морская зеленая серная бактерия *Chl. phaeovibrioides* DSM 265. Из активно растущих клеток этой бактерии были выделены препараты РНК, на основе которых с помощью обратной транскрипции и случайных декануклеотидных праймеров были синтезированы препараты кДНК. Как видно на рис. 1, *б*, ПЦР анализ препаратов с использованием специфичных к *rnf*C и *rnf*G праймеров показал наличие транскриптов этих генов в кДНК *Chl. phaeovibrioides*. Использование контрольных образцов, не содержащих ревертазы на этапе синтеза кДНК, не приводило к наработке ПЦР-продуктов (рис. 1, *б*, дорожки *2* и *4*). Таким образом, наличие ПЦР-продуктов на дорожках *1* и *3* не может быть объяснено амплификацией примесной геномной ДНК и доказывает транскрипцию *rnf*-генов в клетках *Chl. phaeovibrioides*.

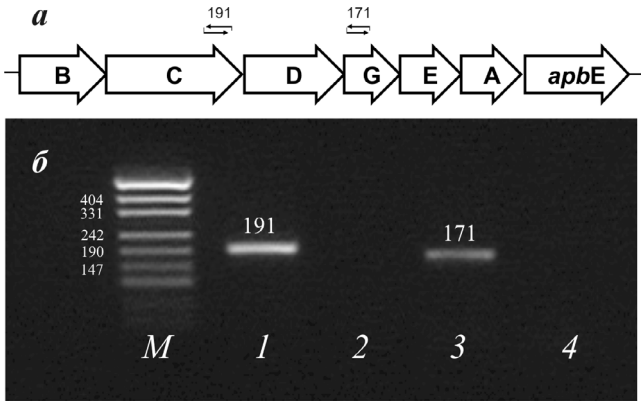

Рис. 1. Расположение *rnf*-генов на хромосоме *Chl. phaeovibrioides* DSM 265 (*а*). Показаны гены *rnf*BCDGEA (GenBank: ABP36813–ABP36808) и *apb*E (ABP36807). *б* – Агарозный гель, показывающий амплификацию с кДНК *Chl. phaeovibrioides* фрагмента гена *rnf*C (теоретическая длина 191 п.н., дорожка *1*) и *rnf*G (171 п.н., дорожка *3*). Дорожки *2* и *4* – амплификация фрагментов *rnf*C и *rnf*G соответственно с контрольных образцов, не содержащих ревертазы на этапе синтеза кДНК. Дорожка *M* – ДНК маркер (pUC19/*Msp*I; СибЭнзим, Россия). Расположение использованных праймеров для амплификации *rnf*C и *rnf*G показано на рис. 1, *а* стрелками

Для количественной оценки уровня транскрипции *rnf*-генов была проведена РВ-ПЦР с использованием 16S рРНК в качестве стандарта. Показано, что в полученных препаратах кДНК *Chl. phaeovibrioides* соотношение мРНК *rnf*C/16S рРНК составляет $(0{,}9 \pm 0{,}1) \times 10^{-4}$. Это значение по порядку величины сходно с таковым, полученным ранее при исследовании транскрипции гена флаводоксина этой бактерии [23]. Таким образом, полученные данные указывают на довольно высокий уровень транскрипции *rnf*-генов в клетках *Chl. phaeovibrioides*, достаточный для детекции активности RNF-комплекса биохимическими методами.

Исследование компартментализации Fld^{red}: NAD^+-оксидоредуктазной активности в клетках *Chl. phaeovibrioides*. Ранее нами было показано, что Fld из *Chl. phaeovibrioides* может быть гетерологически продуцирован в *Escherichia coli* и выделен в больших количествах из клеток этого микроорганизма [23]. Поэтому мы использовали именно Fld в качестве субстрата для определения активности RNF-комплекса и других ферредоксин(флаводоксин):NAD^+-оксидоредуктаз:

$$2Fld^{red-} + NAD^+ + H^+ \rightarrow 2Fld^{sq} + NADH.$$

Fld выделяется из клеток *E. coli* в одноэлектронно-восстановленной (семихинонной) форме (Fld^{sq}) [23], однако мы ранее показали, что Fld^{sq} может быть частично восстановлен до хинольной формы (Fld^{red}) при протекании пируват:ферредоксин(флаводоксин)-оксидоредуктазной (PFOR) реакции:

$$\text{пируват} + CoA + 2Fld^{sq} \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow \text{ацетил-}CoA + CO_2 + 2Fld^{red},$$

катализируемой цитоплазматической фракцией, выделенной из клеток *Chl. phaeovibrioides* [23]. Как видно из данных, представленных в табл. 2, значение специфической PFOR активности в этой фракции составляло 5 нмоль потребленного пирувата × $мин^{-1}$ × мг $белка^{-1}$, и это значение практически не изменялось при добавлении в среду измерения 10 мМ KCl или NaCl.

Добавление 1 мМ NAD^+ в реакционную среду для измерения PFOR активности цитоплазматической фракции *Chl. phaeovibrioides* приводило к его восстановлению до NADH с величи-

Таблица 2. Значения пируват:Fld^{sq}-оксидоредуктазной (PFOR) и Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктазной (FNO) активностей в различных препаратах из клеток *Chl. phaeovibrioides* и *Cba. limnaeum*[1]

Препарат	Активность (нмоль × $мин^{-1}$ × мг $белка^{-1}$)					
	PFOR			FNO		
	без добавок	+ 10 мМ KCl	+ 10 мМ NaCl	без добавок	+ 10 мМ KCl	+ 10 мМ NaCl
Цитоплазматическая фракция *Chl. phaeovibrioides*	5,0	4,8	4,8	0,75	0,6	0,6
Обедненная мембранная фракция *Chl. phaeovibrioides*	ND[2]	ND	ND	0,69	0,70	1,7
Цитоплазматическая фракция *Cba. limnaeum*	2,1	2,0	2,0	0,35	0,27	0,27
Обедненная мембранная фракция *Cba. limnaeum*	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[1] Представлены результаты типичного эксперимента из трех независимых измерений.
[2] Активность не детектировалась.

ной удельной активности 0,75 нмоль образованного NADH × $мин^{-1}$ × мг $белка^{-1}$ (табл. 2). Эта активность не наблюдалась при исключении из реакционной среды пирувата, цитоплазматической фракции *Chl. phaeovibrioides*, NAD^+ или Fld. Таким образом, можно заключить, что наблюдаемое восстановление NAD^+ осуществлялось за счет Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктазной активности. Эта активность слегка ингибировалась в присутствии 10 мМ NaCl. Данный эффект не был специфичен к Na^+, так как наблюдался и при добавлении такой же концентрации KCl. Таким образом, наблюдаемое ингибирование FNO активности в цитоплазматической фракции можно приписать к неспецифическому ослаблению электростатического взаимодействия FNR с Fld при увеличении ионной силы в среде измерения.

Исследование FNO активности в тотальной мембранной фракции *Chl. phaeovibrioides* спектральными методами оказалось затруднено из-за наличия в этой фракции хлоросом, содержащих гигантское количество бактериохлорофилла [29], закрывающего весь оптический диапазон (рис. 2, *а*). Поэтому с помощью дифференциального центрифугирования из клеток *Chl. phaeovibrioides* была выделена обедненная по содержанию хлоросом мембранная фракция (рис. 2, *б*), которая и была использована для определения FNO активности в мембранах этого микроорганизма.

Добавление обедненной по хлоросомам мембранной фракции из *Chl. phaeovibrioides* к среде измерения PFOR активности, содержащей цитоплазматическую фракцию *Chl. phaeovibrioides* и 1 мМ NAD^+, приводило к ускорению образования NADH. Также, как и в случае с цитоплазматической фракцией, не наблюдалось образования NADH в отсутствии пирувата, NAD^+ или Fld. Таким образом, разницу между скоростями образования NADH в присутствии и при отсутствии мембран принимали как FNO активность мембранной фракции. Как видно из табл. 2, в отличие от цитоплазматической фракции, добавление 10 мМ NaCl приводило к существенному (~2,5×) увеличению активности мембранной фракции. Эта активация была специфичной по отношению к Na^+, так как она не наблюдалась в присутствии 10 мМ KCl. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемая FNO активность в мембранной фракции *Chl. phaeovibrioides* осуществляется за счет Na^+-зависимой активности RNF-комплекса. Важно отметить, что величина FNO активности в мембранной фракции была сопоставима с таковой в цитоплазматической фракции, что позволяет заключить, что активность RNF составляет сущест-

венную часть тотальной FNO активности в клетках *Chl. phaeovibrioides*.

Исследование Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктазной активности в клетках *Cba. limnaeum*. Утверждение о том, что восстановление NAD^+ в мембранах *Chl. phaeovibrioides* осуществляется за счет активности RNF-комплекса, было бы важно проверить с помощью сайт-направленного мутагенеза. Однако для *Chl. phaeovibrioides* еще не разработаны методики генных манипуляций. Поэтому для проверки участия RNF в восстановлении NAD^+ мы в качестве контроля использовали близкородственную *Chl. phaeovibrioides* зеленую серную бактерию *Cba. limnaeum*, геном которой не содержит *rnf*-генов (см. выше). Как видно из табл. 2, цитоплазматическая фракция *Cba. limnaeum* демонстрировала способность к катализу FNO реакции, что подтверждает вывод о том, что эта активность осуществляется за счет отличной от RNF водорастворимой ферредоксин-$NAD(P)^+$ редуктазы. В то же время, обедненная по хлоросомам мембранная фракция *Cba. limnaeum* не демонстрировала FNO активности, что, хоть и косвенно, указывает на участие RNF в катализе этой реакции в случае мембранной фракции *Chl. phaeovibrioides*.

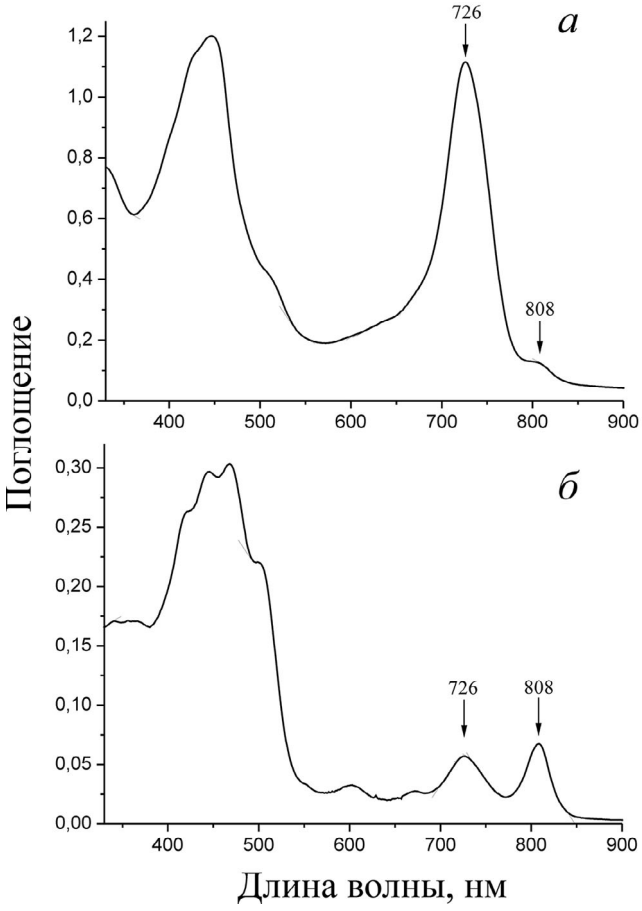

Рис. 2. Оптические спектры тотальной (*а*) и обедненной по хлоросомам (*б*) мембранных фракций *Chl. phaeovibrioides* при концентрации белка 0,19 и 0,25 мг/мл соответственно. Цифрами указаны максимумы поглощения бактериохлорофилла хлоросом (726 нм), а также белка Фенна–Мэтьюс–Олсона (FMO-белка) и антенны реакционного комплекса (808 нм)

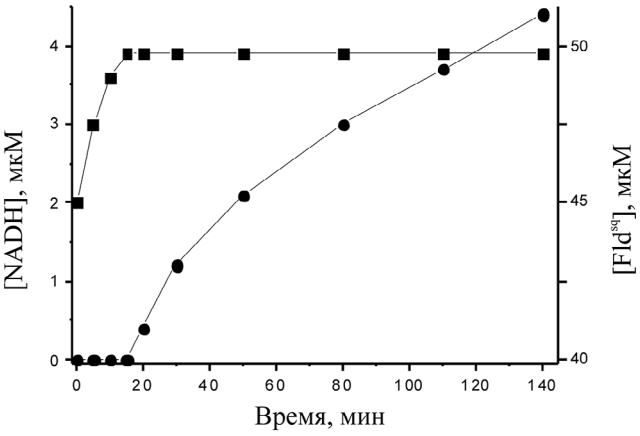

Рис. 3. Фотовосстановление NAD^+ (кружки, левая ось) и флаводоксина (квадраты, правая ось) обедненной по хлоросомам мембранной фракцией из *Chl. phaeovibrioides*

Фотовосстановление NAD^+ мембранной фракцией клеток *Chl. phaeovibrioides*. Основной функцией RNF в клетках *Chl. phaeovibrioides*, по-видимому, является восстановление NAD^+ при функционировании фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Для проверки этого предположения была исследована возможность светозависимого восстановления NAD^+ обедненной по хлоросомам мембранной фракцией из этой бактерии в присутствии Fld. Как показано ранее [23], выделенный из клеток *E. coli* Fld находится в основном в семихинонной форме (Fld^{sq}) с небольшой примесью (8–10%) окисленной формы (Fld^{ox}). Освещение анаэробной суспензии мембранной фракции *Chl. phaeovibrioides* в присутствии Fld, NAD^+ и высокопотенциального донора электронов (β-меркаптоэтанола) в течение первых 15 мин приводило к фотовосстановлению примесного Fld^{ox} до Fld^{sq} (рис. 3). Эта реакция не сопровождалась восстановлением NAD^+. После полного восстановления Fld до Fld^{sq} дальнейшего восстановления Fld ($Fld^{sq} \rightarrow Fld^{red}$) не наблюдалось. Однако последующее освещение приводило к восстановлению NAD^+ с начальной скоростью ~0,7 нмоль образованного NADH × $мин^{-1}$ × мг $белка^{-1}$. Образования NADH не наблюдали в контрольных опытах при отсутствии света или Fld. Также светозависимого восстановления NAD^+ не наблюдали в случае использования обедненной по хлоросомам мембранной фракции из клеток не

содержащей RNF бактерии *Cba. limnaeum* (данные не представлены). Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что RNF может участвовать в образовании NADH при функционировании фотосинтетической электрон-транспортной цепи *Chl. phaeovibrioides*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данной работы проведен поиск генов *rnf*-оперона, кодирующего Na^+-транслоцирующую ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктазу, среди фотоавтотрофных организмов с фотосинтетическими реакционными центрами типа I. Проведенный поиск показал, что *rnf*-гены отсутствуют у гелиобактерий, цианобактерий и растений. В то же время *rnf*-оперон присутствует в геномах многих, но не всех, зеленых серных бактерий. Присутствие *rnf*-оперона наблюдается, прежде всего, у морских представителей Chlorobiaceae, то есть коррелирует с повышенной концентрацией Na^+ в среде обитания. Анализ экспрессии выявил относительно высокий уровень содержания транскриптов этих генов в препаратах РНК, выделенных из морской зеленой серной бактерии *Chl. phaeovibrioides*, что указывает на то, что *rnf*-гены у этого микроорганизма не являются «молчащими» или псевдогенами.

Исследование FNO-активности в различных фракциях клеток *Chl. phaeovibrioides* показало, что у этой бактерии детектируются по крайней мере две различные Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктазы. Одна из них обнаруживается в цитоплазматической фракции, и ее активность не стимулируется при увеличении концентрации Na^+. Вторая Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктаза ассоциирована с мембранами, и ее активность специфически активируется под действием Na^+. В клетках близкородственной *Chl. phaeovibrioides* пресноводной зеленой серной бактерии *Cba. limnaeum*, чей геном не содержит *rnf*-оперона, обнаруживается лишь Na^+-независимая цитоплазматическая Fld^{red}:NAD^+-оксидоредуктаза.

В соответствии с полученными ранее данными [14, 30] можно предположить, что Na^+-независимая цитоплазматическая FNO активность осуществляется FNR, ген которой присутствует в геномах *Chl. phaeovibrioides* (GenBank: ABP37348.1) и *Cba. limnaeum* (AOS83202.1). Так как вторая FNO активность, обнаруживаемая в мембранной фракции *Chl. phaeovibrioides*, (i) специфически стимулируется ионами Na^+, (ii) осуществляется мембрансвязанным ферментом и (iii) отсутствует у *Cba. limnaeum*, можно заключить, что эта активность осуществляется за счет функционирования Na^+-транслоцирующей ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктазы.

У зеленых серных бактерий функционирование нециклической фотосинтетической электрон-транспортной цепи приводит к свето-индуцируемому переносу электронов от восстановленных соединений серы к Fd (Fld) [31]. Ассимиляция CO_2 у этих микроорганизмов осуществляется посредством восстановительного цикла трикарбоновых кислот, где низкопотенциальный Fd (Fld) непосредственно выступает в качестве восстановителя в пируват синтазной и α-кетоглутарат синтазной реакциях [32]. Однако в малатдегидрогеназной и изоцитратдегидрогеназной реакциях этого цикла в качестве восстановителя используется NADH. Поэтому в клетках зеленых серных бактерий часть Fd^{red} (Fld^{red}) должна быть направлена на восстановление NAD^+, что может быть осуществлено, по крайней мере частично, за счет активности RNF (рис. 4). В соответствии с этим показано, что освещение мембран *Chl. phaeovibrioides* приводит к свето-индуцированному образованию NADH (рис. 3).

Таким образом, в условиях *in vivo* поток электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи зеленых серных бактерий должен частично проходить через RNF, что будет приводить к дополнительному запасанию энергии в форме трансмембранного Na^+ потенциала (рис. 4). Fd и Fld зеленых серных бактерий характеризуются очень низкими значения-

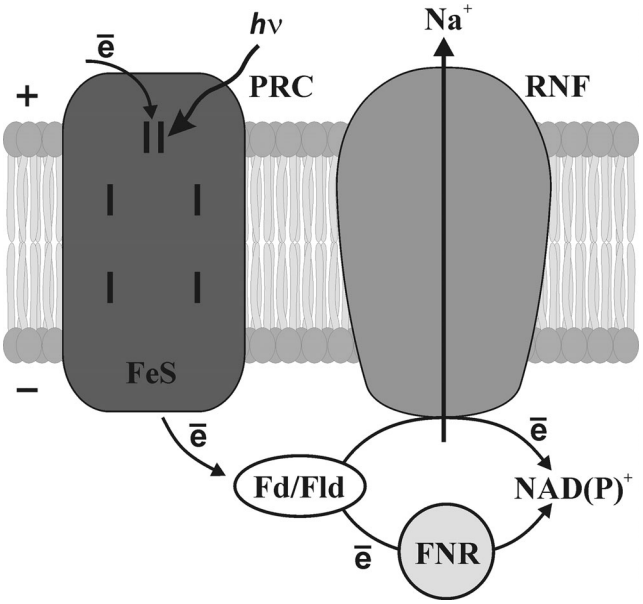

Рис. 4. Схема фотовосстановления $NAD(P)^+$. PRC – фотосинтетический реакционный центр, RNF – Na^+-транслоцирующая ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктаза, FNR – водорастворимая ферредоксин-$NAD(P)^+$ редуктаза

ми их среднеточечных окислительно-восстановительных потенциалов (–514 и –584 мВ для ферредоксинов I и II из *Cba. tepidum* соответственно [33]; –530 мВ для перехода Fld^{sq}/Fld^{red} в Fld из *Chl. phaeovibrioides* [23]). Таким образом, перепад окислительно-восстановительного потенциала при катализируемом RNF переносе электронов от этих низкопотенциальных переносчиков к паре $NAD^+/NADH$ (–320 мВ) достаточен для трансмембранной транслокации Na^+ со стехиометрией 1 Na^+/e^-. Стехиометрия трансмембранного переноса Na^+ для RNF неизвестна, однако сходная по строению с RNF Na^+-транслоцирующая NADH:хинон-оксидоредуктаза [4] обладает именно такой эффективностью сопряжения (1 Na^+/e^-) [34].

Интересно отметить, что RNF, по-видимому, не является единственным Na^+-транслоцирующим ферментом в цитоплазматической мембране *Chl. phaeovibrioides*. Анализ генома этого микроорганизма показывает, что он содержит гены еще трех Na^+-помп: Na^+-транслоцирующей оксалоацетат декарбоксилазы (GenBank: ABP37031–ABP37033), Na^+-транслоцирующей метилмалонил-CoA(глютаконил-CoA) декарбоксилазы (ABP37260–ABP37263) и Na^+-пирофосфатазы (ABP36773). Однако ATP-синтаза *Chl. phaeovibrioides*, исходя из аминокислотной последовательности ее c-субъединицы, по-видимому, является потребителем протонного, а не натриевого потенциала. Поэтому трансмембранный натриевый потенциал, сформированный RNF и другими Na^+-помпами *Chl. phaeovibrioides*, скорее всего, используется не для синтеза ATP, а для совершения осмотической работы, т.е. для трансмембранного транспорта веществ против градиента их концентрации. В соответствии с этим геном *Chl. phaeovibrioides* содержит большое количество Na^+:субстрат-симпортеров (например, GenBank: ABP37286, ABP37377, ABP36564, ABP36752, ABP36793, ABP36820 и ABP37661). Возможно, образованный RNF натриевый потенциал может быть опосредованно использован и для синтеза ATP, так как геном *Chl. phaeovibrioides* содержит гены Na^+/H^+-антипортера (ABP37269–ABP37275), позволяющего преобразовывать натриевый трансмембранный потенциал в протонный.

Остается непонятным, почему возможностью повысить эффективность преобразования энергии света за счет функционирования RNF воспользовалась лишь небольшая часть фототрофных организмов с фотосинтетическими реакционными центрами I-го типа (некоторые представители зеленых серных бактерий), тогда как у подавляющего большинства из них (прежде всего – у цианобактерий и растений) перенос электронов с Fd (Fld) на $NADP^+$ осуществляется исключительно несопряженной FNR. По-видимому, это может быть связано с оксигенным характером фотосинтеза цианобактерий и растений, что приводит к насыщению кислородом цитоплазмы и стромы хлоропластов этих организмов соответственно. Функционирование RNF требует, чтобы существенная часть Fd (Fld) находилась в восстановленном состоянии (так как только в этом случае будет достаточный перепад окислительно-восстановительного потенциала для трансмембранной транслокации Na^+), что в условиях высокой концентрации O_2 должно приводить к интенсивной продукции активных форм кислорода и повреждению клетки. В то же время использование несопряженной FNR, по-видимому, позволяет цианобактериям и растениям поддерживать очень низкий стационарный уровень восстановленности Fd (Fld) и таким образом минимизировать образование активных форм кислорода [35]. Поэтому, возможно, именно облигатно анаэробный образ жизни зеленых серных бактерий позволяет им использовать RNF при функционировании фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Альтернативным объяснением применения RNF именно у зеленых серных бактерий может быть необычная для фотоавтотрофных организмов среда обитания этих бактерий, характеризующаяся очень низкой интенсивностью света [29, 36]. В связи с этим, т.е. с существенным лимитированием роста источником энергии, задача повышения эффективности преобразования энергии света стоит перед зелеными серными бактериями наиболее остро, что, возможно, и привело к использованию некоторыми из них Na^+-транслоцирующей ферредоксин:NAD^+-оксидоредуктазы. Отсутствие RNF у гелиобактерий, обладающих аноксигенным фотосинтезом, но способных к фототрофному росту лишь при высокой интенсивности света [37], может выступать в поддержку именно этого объяснения.

В ходе данной работы показано, что RNF может принимать участие в процессе синтеза NADH у некоторых зеленых серных бактерий, что должно повышать эффективность преобразования энергии света и является первым примером использования Na^+-энергетики в фотосинтетических электрон-транспортных цепях.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00063).

Благодарности. Авторы выражают признательность О.И. Кеппен и Р.Н. Ивановскому за

обсуждение и за предоставление культуры *Cba. limnaeum*. Мы также благодарны В.А. Костырко за ценные замечания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных или людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V.P., Bogachev, A.V., and Kasparinsky, F.O. (2013) *Principles of Bioenergetics*, Springer, doi: 10.1007/978-3-642-33430-6.
2. Dimroth, P., Jockel, P., and Schmid, M. (2001) Coupling mechanism of the oxaloacetate decarboxylase Na^+ pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 1–14, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00272-3.
3. Unemoto, T., and Hayashi, M. (1979) NADH:quinone oxidoreductase as a site of Na^+-dependent activation in the respiratory chain of marine *Vibrio alginolyticus*, *J. Biochem.*, **85**, 1461–1467.
4. Verkhovsky, M.I., and Bogachev, A.V. (2010) Sodium-translocating NADH:quinone oxidoreductase as a redox-driven ion pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 738–746, doi: 10.1016/j.bbabio.2009.12.020.
5. Gottschalk, G., and Thauer, R.K. (2001) The Na^+-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 28–36, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00274-7.
6. Heefner, D.L., and Harold, F.M. (1982) ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2798–2802, doi: 10.1073/pnas.79.9.2798.
7. Kluge, C., Laubinger, W., and Dimroth, P. (1992) The Na^+-translocating ATPase of *Propionigenium modestum*, *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 572–577, doi: 10.1042/bst0200572.
8. Muntyan, M.S., Cherepanov, D.A., Malinen, A.M., Bloch, D.A., Sorokin, D.Y., Severina, I.I., Ivashina, T.V., Lahti, R., Muyzer, G., and Skulachev, V.P. (2015) Cytochrome cbb_3 of *Thioalkalivibrio* is a Na^+-pumping cytochrome oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7695–7700, doi: 10.1073/pnas.1417071112.
9. Malinen, A.M., Belogurov, G.A., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2007) Na^+-pyrophosphatase: a novel primary sodium pump, *Biochemistry*, **46**, 8872–8878, doi: 10.1021/bi700564b.
10. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nat. Commun.*, **4**, 1678, doi: 10.1038/ncomms2689.
11. Skulachev, V.P. (1989) The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **21**, 635–647, doi: 10.1007/BF00762683.
12. Mulkidjanian, A.Y., Dibrov, P., and Galperin, M.Y. (2008) The past and present of the sodium energetics: May the sodium-motive force be with you, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 985–992, doi: 10.1016/j.bbabio.2008.04.028.
13. Carrillo, N., and Ceccarelli, E.A. (2003) Open questions in ferredoxin-$NADP^+$ reductase catalytic mechanism, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1900–1915, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03566.x.
14. Seo, D., and Sakurai, H. (2002) Purification and characterization of ferredoxin-$NAD(P)^+$ reductase from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1597**, 123–132, doi: 10.1016/S0167-4838(02)00269-8.
15. Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., Marxer, M., Oelze, J., and Klipp, W. (1993) Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase, *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 602–615, doi: 10.1007/BF00279903.
16. Westphal, L., Wiechmann, A., Baker, J., Minton, N.P., and Muller, V. (2018) The Rnf complex is an energy-coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen *Acetobacterium woodii*, *J. Bacteriol.*, **200**, e00357-18, doi: 10.1128/JB.00357-18.
17. Biegel, E., Schmidt, S., Gonzalez, J.M., and Muller, V. (2011) Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 613–634, doi: 10.1007/s00018-010-0555-8.
18. Muller, V., Imkamp, F., Biegel, E., Schmidt, S., and Dilling, S. (2008) Discovery of a ferredoxin:NAD^+-oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*. A novel potential coupling site in acetogens, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1125**, 137–146, doi: 10.1196/annals.1419.011.
19. Chowdhury, N.P., Klomann, K., Seubert, A., and Buckel, W. (2016) Reduction of flavodoxin by electron bifurcation and sodium ion-dependent reoxidation by NAD^+ catalyzed by ferredoxin-NAD^+ reductase (Rnf), *J. Biol. Chem.*, **291**, 11993–12002, doi: 10.1074/jbc.M116.726299.
20. Curatti, L., Brown, C.S., Ludden, P.W., and Rubio, L.M. (2005) Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6291–6296, doi: 10.1073/pnas.0501216102.
21. Koo, M.S., Lee, J.H., Rah, S.Y., Yeo, W.S., Lee, J.W., Lee, K.L., Koh, Y.S., Kang, S.O., and Roe, J.H. (2003) A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*, *EMBO J.*, **22**, 2614–2622, doi: 10.1093/emboj/cdg252.
22. Malik, K.A. (1983) A modified method for the cultivation of phototrophic bacteria, *J. Microbiol. Methods*, **1**, 343–352, doi: 10.1016/S0167-7012(96)00941-4.
23. Bertsova, Y.V., Kulik, L.V., Mamedov, M.D., Baykov, A.A., and Bogachev, A.V. (2019) Flavodoxin with an air-stable flavin semiquinone in a green sulfur bacterium, *Photosynth. Res.*, in press, doi: 10.1007/s11120-019-00658-1.
24. Klughammer, C., Hager, C., Padan, E., Schütz, M., Schreiber, U., Shahak, Y., and Hauska, G. (1995) Reduction of cytochromes with menaquinol and sulfide in membranes from green sulfur bacteria, *Photosynth. Res.*, **43**, 27–34, doi: 10.1007/BF00029459.
25. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76–85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
26. Bertsova, Y.V., Fadeeva, M.S., Kostyrko, V.A., Serebryakova, M.V., Baykov, A.A., and Bogachev, A.V. (2013) Alternative pyrimidine biosynthesis protein ApbE is a flavin transferase catalyzing covalent attachment of FMN to a threonine residue in bacterial flavoproteins, *J. Biol. Chem.*, **288**, 14276–14286, doi: 10.1074/jbc.M113.455402.
27. Deka, R.K., Brautigam, C.A., Liu, W.Z., Tomchick, D.R., and Norgard, M.V. (2016) Molecular insights into the

enzymatic diversity of flavin-trafficking protein (Ftp; formerly ApbE) in flavoprotein biogenesis in the bacterial periplasm, *Microbiologyopen*, **5**, 21–38, doi: 10.1002/mbo3.306.
28. Bogachev, A.V., Baykov, A.A., and Bertsova, Y.V. (2018) Flavin transferase: the maturation factor of flavin-containing oxidoreductases, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1161–1169, doi: 10.1042/BST20180524.
29. Saer, R.G., and Blankenship, R.E. (2017) Light harvesting in phototrophic bacteria: structure and function, *Biochem. J.*, **474**, 2107–2131, doi: 10.1042/BCJ20160753.
30. Frigaard, N.U., Chew, A.G., Li, H., Maresca, J.A., and Bryant, D.A. (2003) *Chlorobium tepidum*: insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence, *Photosynth. Res.*, **78**, 93–117, doi: 10.1023/B:PRES.0000004310.96189.b4.
31. Hauska, G., Schoedl, T., Remigy, H., and Tsiotis, G. (2001) The reaction center of green sulfur bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 260–277, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00200-6.
32. Buchanan, B.B., and Arnon, D.I. (1990) A reverse KREBS cycle in photosynthesis: consensus at last, *Photosynth. Res.*, **24**, 47–53, doi: 10.1007/BF00032643.
33. Yoon, K.S., Bobst, C., Hemann, C.F., Hille, R., and Tabita, F.R. (2001) Spectroscopic and functional properties of novel 2[4Fe-4S] cluster-containing ferredoxins from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 44027–44036, doi: 10.1074/jbc.M107852200.
34. Bogachev, A.V., Murtasina, R.A., and Skulachev, V.P. (1997) The Na^+/e^- stoichiometry of the Na^+-motive NADH: quinone oxidoreductase in *Vibrio alginolyticus*, *FEBS Lett.*, **409**, 475–477, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00536-X.
35. Kozuleva, M.A., and Ivanov, B.N. (2016) The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1397–1404, doi: 10.1093/pcp/pcw035.
36. Manske, A.K., Glaeser, J., Kuypers, M.M., and Overmann, J. (2005) Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8049–8060, doi: 10.1128/AEM.71.12.8049-8060.2005.
37. Gest, H., and Favinger, J.L. (1983) *Heliobacterium chlorum*, an anoxygenic brownish-green photosynthetic bacterium containing a "new" form of bacteriochlorophyll, *Arch. Microbiol.*, **136**, 11–16, doi: 10.1007/BF00415602.

Na^+-TRANSLOCATING FERREDOXIN:NAD^+-OXIDOREDUCTASE IS A COMPONENT OF PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN GREEN SULFUR BACTERIA

Y. V. Bertsova*, M. D. Mamedov, and A. V. Bogachev*,**

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: bogachev@belozersky.msu.ru

Received May 20, 2019
Revised July 5, 2019
Accepted July 7, 2019

Photoautotrophic organisms containing type I photosynthetic reaction centers have been screened for the presence of the *rnf* genes encoding Na^+-translocating ferredoxin:NAD^+-oxidoreductase (RNF). Heliobacteria, cyanobacteria, algae, and plants were shown to lack these genes, but genomes of many, especially marine, green sulfur bacteria contain the full *rnf* operon. The analysis of RNA isolated from the marine green sulfur bacterium *Chlorobium phaeovibrioides* revealed rather high level of *rnf* expression. It has been found that Na^+-dependent flavodoxin:NAD^+-oxidoreductase activity detected in the membrane fraction from this bacterium is absent in the membrane fraction isolated from the closely related freshwater green sulfur bacterium *Chlorobaculum limnaeum*, which does not contain the *rnf* gene. Illumination of the *Chl. phaeovibrioides* (but not *Cba. limnaeum*) membrane fraction leads to the light-induced NAD^+ reduction. Based on the data obtained, we conclude that RNF can be involved in NAD^+ reduction in some green sulfur bacteria, thus promoting the efficiency of light energy conversion in these microorganisms. This is the first example of using Na^+ energetics in photosynthetic electron transport chains.

Keywords: Na^+-translocating ferredoxin:NAD^+-oxidoreductase, transmembrane sodium transport, green sulfur bacteria, non-cyclic photosynthetic electron transport