

А. Д. МАКАРОВ, Л. Ф. СТАХОВ

О ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ КОФАКТОРА ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ — ФОСФОДОКСИНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 27 VI 1969)

О химической природе обнаруженного в 1963 г. физиологического кофактора фотофосфорилирования — фосфодокина сведений мало (1). В связи с тем, что его каталитическое действие в реакции фотофосфорилирования подобно действию птеринов, высказывается предположение о его птериновой природе (2).

В настоящей работе приведены результаты по изучению химической природы фосфодокина с использованием некоторых физических и химических методов.

Препарат фосфодокина выделял из листьев гороха Жегаловский посредством бумажной хроматографии по способу, описанному в работе (1), или при помощи разработанной в нашей лаборатории методики с применением колоночной хроматографии. Использование метода колоночного разделения, вместо хроматографирования на бумаге, позволяет получить из исходного растительного материала необходимое для исследования количество фосфодокина с меньшими затратами времени. В этом случае в качестве наполнителя применялась окись алюминия (II степень активности), а также целлюлоза-эктола (6). Эти наполнители дают возможность отделить полисахара и нуклеотиды и получить (после этанольной очистки) фосфодокин, имеющих одинаковые и.к. спектры с фосфодоксином, выделяемом при использовании метода хроматографии на бумаге.

В качестве растворителя для промывания колонки употреблялась смесь: пропиловый спирт, вода и NH_4OH в отношении 3:1:2.

При медленной кристаллизации на холоду из концентрированных растворов фосфодокина выпадают кристаллы.

Согласно имеющимся сведениям, фосфодокин, выделенный из листьев различных растений, обладает близкими каталитическими свойствами.

Как видно из рис. 1, фосфодокин, полученный из листьев гороха, крапивы и из изолированной культуры фотосинтезирующей ткани табака, имеет близкие и.к. спектры. Спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции фосфодокина, выделенного из листьев различных растений, одинаковы.

И.к. спектры, приведенные в данной работе, были записаны на приборе UR-20. Образец приготавливался в виде пленок на стекле KRS-5 высушиванием водного раствора под вакуумом при 20°.

Полученные данные позволяют сделать предположение, что фосфодокин, выделенный из различных растений, имеет одинаковую химическую природу.

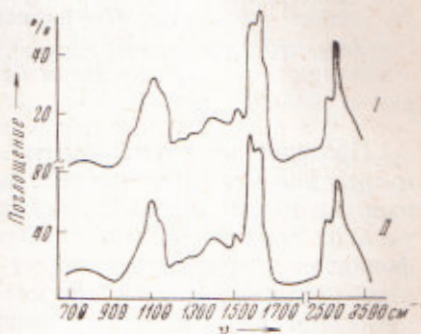


Рис. 1. И.к. спектры фосфодокина, выделенного из листьев гороха (I) и из культуры ткани табака (II)

В связи с трудностью количественного выделения фосфодоксина из исходной смеси, подлежащей хроматографическому разделению, нами был проведен качественный анализ этой смеси и выяснение каталитических свойств ее отдельных компонентов. В результате проведенного анализа было установлено присутствие в смеси полисахаров, нуклеотидов, органических солей кальция, а также веществ группы фолиевой кислоты, основную часть которых составляет сама фолиевая кислота.

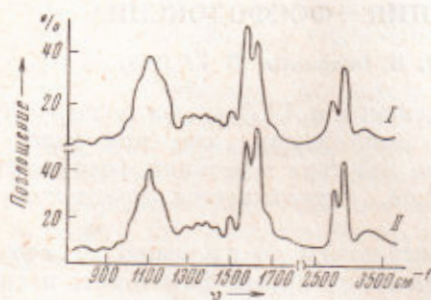


Рис. 2

Рис. 2. И.-к. спектры. I — фосфодоксин, выделенный по методике Сан-Пьетро; II — фракция фолиевой кислоты с R_f 0,56

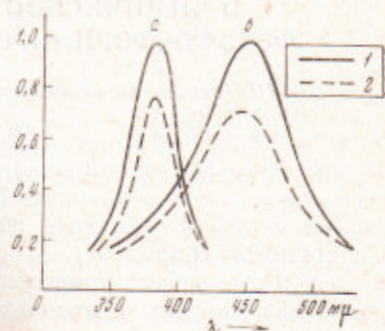


Рис. 3

Рис. 3. Спектры возбуждения (а) и флуоресценции (б) фосфодоксина (I) и фракции фолиевой кислоты с R_f 0,56 (2)

Проведенные эксперименты показали, что полисахара, нуклеотиды и органические соли кальция, выделенные из исходной смеси, ни в аэробных, ни в анаэробных условиях не активируют процесс фотофосфорилирования на хлоропластах. Фракция, содержащая соединения группы фолиевой кислоты, активирует процесс фотофосфорилирования в аэробных условиях. Каталитические свойства фолиевой кислоты в качестве кофактора фотофосфорилирования изучались в работах (2, 3), при этом было обнаружено, что реакция слабо ускоряется кофактором, однако скорость реакции существенно возрастает при добавлении в смесь восстанавливающих агентов.

Фолиевая кислота устойчива только при низких температурах. При действии света и восстановителей она разлагается с образованием ряда продуктов. Например, при сульфитном расщеплении или при действии хлорноватистой кислоты первичным продуктом расщепления является 6-птеринальдегид, который затем претерпевает дисмутацию с образованием 6-птеринкарбоновой кислоты и 6-метилптерина (4).

Учитывая изложенное, мы предприняли попытку сопоставить физико-химические и каталитические свойства некоторых продуктов расщепления фолиевой кислоты и фосфодоксина. Фолиевая кислота разлагалась под действием света и хлорноватистой кислоты.

Проведенное исследование показало, что выделенная посредством хроматографии на бумаге (ватман 3 мм) фракция с R_f 0,56 имеет одинаковые с фосфодоксином и.-к. спектры, спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции (рис. 2 и 3). Измерение каталитической активности фосфодоксина и фракции фолиевой кислоты с R_f 0,56 проводилось на хлоропластах, выделенных по Арнону в аэробных условиях.

Концентрация кофактора определялась по оптической плотности при 255 м μ . Каталитическая активность определялась по убыли неорганического фосфора за 15 мин. В результате проведенных экспериментов было установлено, что фосфодоксин и фракция с R_f 0,56 имеют весьма близкую каталитическую активность.

Ниже приведены результаты измерения масс-спектров фосфодокина и фракции с R_f 0,56 (масс-спектры снимались на масс-спектрометре МИ-1305. Ионизирующее напряжение 50 эв. Испаряющее напряжение подбиралось с учетом термостабильности изучаемых веществ):

Наименование вещества	Молекулярный вес	Продукты расщепления
Фосфодокина по Сан-Пьетро	177	163; 150; 137; 120; 107
Фракция фолиевой кислоты R_f 0,56	177	163; 150; 137; 120; 107
Фолиевая кислота	441	295; 263; 176; 149; 137; 129; 120; 107

Видно, что для обоих препаратов молекулярный пик равен 177, продукты их расщепления также совпадают. Ранее отмечалось, что под действием света и восстановителей фолиевая кислота способна разлагаться. Один из первичных продуктов разложения фолиевой кислоты в этих условиях, 6-метилптерин, имеет молекулярный вес 177. Следует отметить, что многие из осколков фолиевой кислоты характерны и для фосфодокина.

Известно, что некоторые птерины (биоптерин, ксантоптерин и др.) (^{2, 3}) обладают определенной активностью в реакции фотофосфорилирования. Установлено, что необходимым условием каталитической активности птеринов является наличие замещения в 6-м или 7-м положении. Этому условию удовлетворяет 6-метилптерин. Кроме 6-метилптерина, при разложении фолиевой кислоты могут образовываться и другие простые птерины; некоторые из них, возможно, также способны влиять на скорость процесса фотофосфорилирования. По-видимому, этим следует объяснить изменение свойств фосфодокина при длительном хранении. В этом случае при помощи хроматографии на бумаге удастся выделить ряд фракций, химическая природа которых не выяснена.

Авторы приносят глубокую благодарность проф. В. Б. Евстигнееву за постоянное внимание к работе, а также В. К. Опанасенко за снятие и.к. спектров и Л. М. Шубину за снятие спектров флуоресценции и возбуждения.

Институт фотосинтеза
Академия наук СССР
г. Пущино-на-Оке Московской обл.

Поступило
19 VI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. C. Black, A. San Pietro et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 50, 1, 37 (1963). ² F. I. Maclean, G. Tujita, H. S. Forrest, Plant Physiol., 41, 774 (1966). ³ F. I. Maclean, G. Tujita, et al., Science, 149, 636 (1965). ⁴ В. М. Березанский, Химия витаминов, М., 1959, стр. 486. ⁵ Н. А. Андреева, Витамины группы фолиевой кислоты, Изд. АН СССР, 1963. ⁶ И. Губен, Ф. Вейль, Методы органической химии, изд. 4, 2, М., 1963.