

А. Д. МАКАРОВ, А. Н. МАЛЬЯН, А. И. ЛЕБЕДЕВА, В. П. КУЗНЕЦОВ  
**О СВЯЗИ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ХЛОРОПЛАСТОВ  
С МЕХАНИЗМОМ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 XII 1969)

Одной из наиболее интересных особенностей хлоропластов является изменение их структуры под действием света (<sup>1-3</sup>).

Пакер и Марчант нашли качественную связь между увеличением светорассеяния суспензией хлоропластов и изменением скорости реакции фотофосфорилирования под влиянием некоторых кофакторов и разобщителей (<sup>4</sup>). Существование такой корреляции позволяет предполагать, что структурные изменения хлоропластов играют определенную роль в реакции фотофосфорилирования.

Изучение механизма этих изменений привело Пакера с соавторами к заключению, что они имеют осмотическую природу (<sup>5</sup>). Следует отметить, что в упомянутых работах в основном использовались кратковременные периоды освещения хлоропластов (около 60 сек.). Поведение хлоропластов при длительных периодах освещения в процессе синтеза АТФ исследовано недостаточно.

В связи с этим представлялось интересным провести более детальное исследование вызываемых светом изменений структуры хлоропластов и особенностей протекания реакции фотофосфорилирования в сопоставимых условиях при помощи метода, позволяющего, в отличие от метода (<sup>3, 4</sup>), получать непосредственные данные об изменении размеров хлоропластов.

В экспериментах использовали суспензию фрагментированных хлоропластов, приготовляемую из листьев гороха по методу Арнона (<sup>6</sup>). Количество суспензии, получаемой при разовом приготовлении, обеспечивало проведение серии экспериментов по исследованию морфологических изменений хлоропластов и скорости реакции фотофосфорилирования.

Подсчет количества фрагментов хлоропластов, превышающих заданный размер (4,7  $\mu$ ), проводили при помощи автоматического скоростного целлюскопа шведской фирмы АВ Lars Lyungberg. Степень набухания или сокращения хлоропластов оценивали по изменению количества фиксируемых частиц по сравнению с исходным количеством, принимаемым за 100%.

Параллельно с экспериментом на целлюскопе в аналогичных условиях проводили реакцию фотофосфорилирования. Кинетику этой реакции исследовали на установке, описанной ранее (<sup>6</sup>). Скорость реакции оценивали по снижению концентрации неорганического фосфора в реакционной смеси.

Изменения размеров хлоропластов под влиянием света в реакционной смеси можно представить тремя последовательными стадиями (рис. 1). Включение освещения первоначально приводит к набуханию хлоропластов (I стадия). Продолжительность этой стадии в различных сериях опытов ко-

Таблица 1

№№ п.п.	Добавки	Концентрации, $\mu\text{M}/\text{мл}$	$\alpha$ , %	$r$ , $\mu\text{мол } P_i$ за 10 мин.
1	ФМС	—	0	0
		0,02	32	0,48
2	АТФ	0,06	25	0,31
		—	41	0,33
		1,0	30	0,27
3		3,0	7,9	0
		—	31	0,45
		1,0	12	0,22



леблется между 1,5 и 5 мин. и зависит, по-видимому, от состояния листьев гороха, используемых для приготовления суспензии. Следующей стадией является сокращение хлоропластов (II стадия). Продолжительность этой стадии варьирует от 7 до 60 мин., однако во всех опытах близка к продолжительности фосфорилирования. Изменения размеров хлоропластов, наблюдаемые на этой стадии при включении и выключении света, по-видимому, соответствуют изменениям в светорассеянии, описанным Пакером (3, 4).

Последующее набухание хлоропластов (III стадия) совпадает по времени с гидролизом образовавшегося при фосфорилировании АТФ.

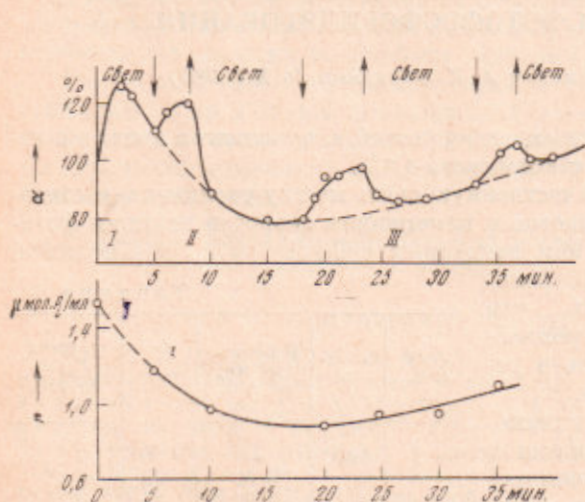


Рис. 1

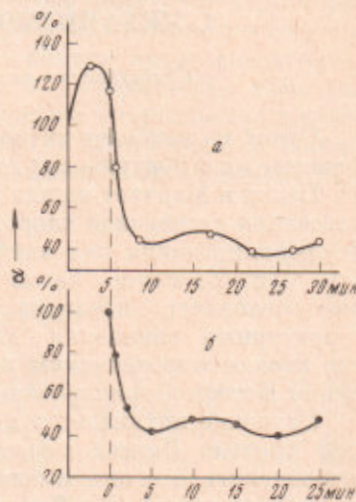


Рис. 2

Рис. 1. Сопоставление изменений размеров хлоропластов под влиянием освещения с кинетикой реакции фотофосфорилирования. I — набухание, II — сокращение, III — вторичное набухание хлоропластов. Состав реакционной смеси: NaCl 8,4, MgCl<sub>2</sub> 1,6, трис-ацетат 33,0, ФМС<sub>0</sub> 0,024, АДФ 4,2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8 μмол/мл. Концентрация хлорофилла в реакционной смеси 6 μг, в целлюлозической ячейке 0,06 μг. Освещенность реактора и ячейки 20 000 лк. Температура 20°

Рис. 2. Сокращение хлоропластов на свету (а) и под влиянием добавки АТФ в темноте (б). Условия опытов — как указано в подписи к рис. 1, но в случае б — вместо K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и АДФ введен АТФ в концентрации 4,0 μмол/мл

Для выяснения связи структурных изменений хлоропластов с процессом фосфорилирования представлялось интересным сопоставить влияние концентрации некоторых компонентов реакционной смеси (ФМС, АТФ) и ингибиторов (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) на кинетику указанных процессов.

Как видно из табл. 1, при исключении ФМС из реакционной смеси фотофосфорилирование не имеет места. Практически отсутствует также сокращение хлоропластов во II стадии. При увеличении концентрации ФМС до 0,02 μмол/мл возрастает степень сокращения хлоропластов (α) и увеличивается скорость фотофосфорилирования (r). Дальнейшее увеличение концентрации ФМС приводит к симбатному снижению α и r. При введении в реакционную смесь иона AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (1,0 μмол/мл), как и в опытах с высокой концентрацией ФМС, снижение способности к фосфорилированию сопровождается уменьшением степени сокращения во II стадии.

Аналогичная корреляция наблюдается при варьировании содержания АТФ в реакционной смеси. Увеличение концентрации АТФ приводит к частичному, а при более высоких концентрациях — к почти полному ингибированию обоих зависящих от света процессов.

Специфической особенностью АТФ является способность вызывать сокращение хлоропластов в темноте (1). Почти полная аналогия (за исклю-



чением I стадии) кривых, описывающих изменение размеров хлоропластов в процессе синтеза АТФ и при введении АТФ в суспензию хлоропластов в темноте, позволяет предположить, что указанные изменения вызываются АТФазой хлоропластов (рис. 2). Стадия вторичного набухания хлоропластов по времени совпадает с гидролизом АТФ и сопровождается потерей способности хлоропластов сокращаться под действием света (степень сокращения хлоропластов резко уменьшается) (рис. 1).

Ранее нами было показано, что примерно в том же интервале времени происходит десорбция АТФазы из хлоропластов в раствор (6). При этом хлоропласты теряют способность как к гидролизу, так и к фотофосфорилированию, а освобожденный от хлоропластов раствор приобретает АТФазную активность. Эти данные дают основание интерпретировать стадию вторичного набухания хлоропластов как результат десорбции АТФазы в раствор. Эти данные могут также указывать, что обе реакции катализируются одним и тем же ферментом. Это предположение подкрепляется фактом зависимости активности десорбированной АТФазы от концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , являющихся необходимым компонентом при осуществлении реакции фотофосфорилирования.

Следует отметить, что для достижения в темноте той же степени сокращения хлоропластов, что и в условиях фосфорилирования, необходима во много раз большая концентрация АТФ в реакционной смеси (легко рассчитать, что при концентрации хлорофилла в растворе около 0,06  $\mu g$  количества получающегося при фосфорилировании АТФ весьма мало). Результаты могут быть объяснены в предположении, что сокращение хлоропластов непосредственно связано с образованием промежуточного соединения, которое может получаться при взаимодействии фермента как с АТФ, так и с АДФ и Р (на свету). Можно предполагать, что при низкой концентрации этого соединения в темноте или в начальной стадии фосфорилирования хлоропласты имеют более «рыхлую» структуру (набухание), которая обеспечивает высокую проницаемость мембраны по отношению к реагентам. Сокращение хлоропластов, по-видимому, приводит к снижению проницаемости мембраны (7) и уменьшению интенсивности фотосинтетического процесса. Таким образом, изменения структуры хлоропластов позволяют регулировать скорость этого процесса и могут выполнять функции обратной связи.

Институт фотосинтеза  
Академии наук СССР  
г. Пущино-на-Оке

Поступило  
9 XII 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. Hoh, S. Izawa, K. Shibata, *Biochim. et biophys. acta*, 66, 349 (1963).  
<sup>2</sup> L. Packer, R. H. Marchant, I. Mukohata, *ibid.*, 75, 23 (1963). <sup>3</sup> J. Packer, D. W. Deamer, A. R. Crofts, *Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus*, Rep. Symp., June, 1966, p. 281. <sup>4</sup> L. Packer, R. H. Marchant, *J. Biol. Chem.*, 239, 6, 2061 (1964). <sup>5</sup> F. R. Whatley, D. I. Arnon, *Methods in Enzymology*, 6, 308 (1963). <sup>6</sup> А. И. Лебедева, А. Н. Мальян, А. Д. Макаров, *Биофизика*, № 6, 1069 (1969).