

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, А. В. МАЛАШЕВИЧ

УСКОРЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА b И ЛАБИЛИЗАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА a ПРИ ГИДРОЛИЗЕ БЕЛКА ХЛОРОПЛАСТОВ ТРИПСИНОМ

Обнаружение метаболической гетерогенности хлорофиллов, устанавливающей существование подфондов каждого пигмента с различным содержанием молекул разного времени возникновения (¹, ²), позволило по-новому рассмотреть биосинтетические отношения хлорофиллов a и b (³).

Показано избирательное образование хлорофилла b из лабильного подфонда хлорофилла a, обогащенного новыми молекулами (²⁻⁹). При помощи C¹⁴ реакцию наблюдали и при затемнении фрагментов хлоропластов (⁹). По мере перехода меченых молекул хлорофилла a в более стабильное состояние и, соответственно, утраты превышения его удельной радиоактивности (у.а.а) в извлекаемой петролейным эфиром фракции (²) скорость возрастания у.а. хлорофилла b (у.а.а) уменьшается (³, ⁴). Заманчиво было проверить, не увеличивается ли она при описанном О. П. Осиповой повышении содержания извлекаемого хлорофилла при гидролизе белка трипсином (¹⁰). Этому могла способствовать и возможная аналогия поведения образующего хлорофилл b фермента с хлорофиллазой, которая активируется трипсином (¹¹), а по развиваемым нами представлениям — входит в состав того же полиферментного комплекса хлорофилл-синтетазы, локализованного в центре биосинтеза хлорофиллов (⁹, ¹²).

20—25 г листьев 8-дневных проростков ячменя измельчали ножницами при 2—4° в 200 мл фосфатного буфера pH 7,6 в присутствии 0,35 M NaCl. Надавливая пестиком, осторожно разрушали клетки, способствуя выходу содержимого. Суспензию пропускали через 4 слоя капроновой ткани, центрифугировали 3 мин. при 650 g, а затем собирали осадок после 15 мин. при 6000 g. Его суспендировали в том же буфере до содержания 25 мг материала в 1 мл и инкубировали при 36° без или с 0,1 мг/мл трипсина. В опытах с C¹⁴ выделению хлоропластов непосредственно предшествовала ассимиляция C¹⁴O₂ листьями в течение 7—20 мин. У.а. пигментов определяли по (³), белок — по Лоури. Экстракции петролейным эфиром (т. кип. 40—60°) проводили из лиофильно высушенного хлоропластного материала при непрерывном встряхивании. Содержание хлорофиллов в пробе оценивали по спектрам поглощения экстрактов в 80% ацетоне.

Гидролиз белка проходил при 36° быстрее, чем при 27° (как описано ранее для эвглени (¹³)), и следовал кинетической кривой, стремящейся к насыщению на уровне около 30%. На рис. 1 первая и последняя точки являются средними для серии повторных опытов, разброс между которыми показан в виде квадратичной ошибки. Половина белка, гидролизуемого к исходу 3 часа, подвергалась расщеплению уже за первые 30 мин., что делает такой интервал времени особенно интересным. По-видимому,

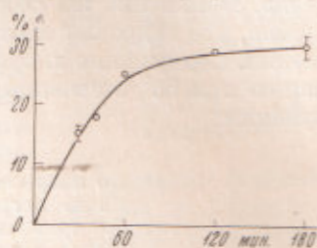


Рис. 1. Зависимость процента гидролиза белка от времени инкубации хлоропластного материала с трипсином

часть белка гидролизуется легче, тогда как остальная атакуется труднее и, возможно, в некоторой степени защищена, например, липидами. В пользу такого объяснения говорит отличие рис. 1 от почти линейного хода реакции, который можно видеть по данным работы (14), выполненной с изолированным хлорофилл-белковым комплексом. Менее вероятно, что эти наблюдения обусловлены лишь специфичностью действия трипсина. В наших условиях не отмечалось и заметной феофитинизации хлорофилла, которая в работе (14) наблюдалась в количественном соответствии с гидролизом

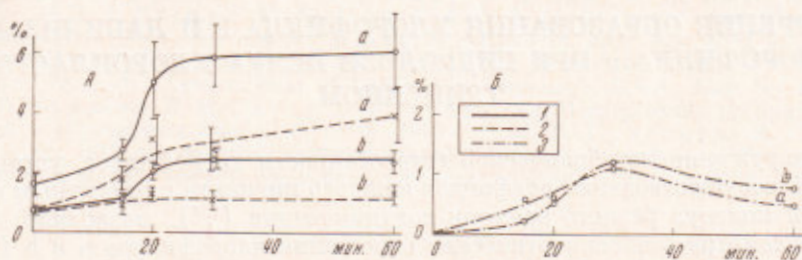


Рис. 2. Влияние времени инкубации на извлекаемость хлорофиллов а и в петролейным эфиром. 1 — инкубация с трипсином, 2 — инкубация без трипсина; 3 — отношение (1-2) / 2. Объяснение в тексте

белка. Изменение же состояния хлорофилла (см. ниже) исключает допущение, что гидролиз охватывал лишь белок, несущественный в этом отношении. Содержание хлорофиллов а и в в препаратах, подвергнутому нагреванию при 36° в течение 30 мин. ($\mu\text{г}$ на 1 г сырого веса), оказалось следующим:

	Хлорофилл а	Хлорофилл в
До нагревания	178,1 \pm 1,5	64,9 \pm 0,8
После нагревания без трипсина	170,6 \pm 1,3	61,1 \pm 1,4
После нагревания с трипсином*	167,4 \pm 1,4	64,0 \pm 0,9

Таким образом, в присутствии трипсина лишь несколько ускорилась, достигая 6% за 30 мин., происходящая при инкубации убыль хлорофилла а и почти на 15% снижалось его отношение количеству хлорофилла в, не обнаружившему достоверных изменений. Уменьшение интеграла красной полосы поглощения хлоропластов шпината на 5% после 30 мин. инкубации с проназой сообщалось Бамбергером и Парком (15).

В спектре флуоресценции исходного материала при -196° наблюдались максимумы при 683; 697 и 731 м μ . Инкубация без трипсина в течение 30 мин. не меняла вид спектра, а в присутствии трипсина исчезал максимум 697 м μ и в среднем на 15% возрастало отношение высот длинноволнового и коротковолнового максимумов. Подобные эффекты наблюдались при действии протеазы на хлоропласты шпината (16). Особая чувствительность второго максимума к трипсину была поставлена в связь с его избирательным действием на фотосистему II (17). Отметим вместе с тем сообщение о том, что в спектре поглощения убыль разрушающегося хлорофилла проявлялась как потеря, прежде всего, формы с поглощением при 681 м μ (18); по другим же данным, протеолиз ведет к увеличению дихроизма, обусловленного формой 680 м μ (18). Эти изменения состояния хлорофилла происходят вместе с изменениями электронномикроскопической структуры тилакоидов (13, 15).

Наиболее важным показателем влияния трипсина на состояние пигментов в аспекте данной работы является увеличение размера их лабиль-

* Вероятность случайного происхождения найденного отличия содержания хлорофилла а этого варианта от исходного равна 0,01.

ных подфондов. На рис. 2А показан процент хлорофиллов а и в, извлеченный петролевым эфиром за 10 мин. Дополнительные определения показали, что его изменения отражают характер и тех различий, которые наблюдались бы после многократной обработки растворителем до достижения предела экстракции. Показанный разброс точек соответствует наблюдаемому в серии опытов. Он отражает большую зависимость извлекаемости от состояния исходного хлоропластного материала. Основной вид кривых неизменно повторялся в каждом отдельном опыте. Из рисунка видно, что содержание экстрагируемых петролевым эфиром пигментов повышается в результате прогрева и без трипсина, что может быть связано с набуханием хлоропластов и изменениями в их липидной фазе (16). Анализ осадков после центрифугирования нагревавшихся и исходных препаратов не обнаружил убыли белка в отсутствие трипсина. Действие трипсина приводит к весьма значительному увеличению количества экстрагируемых хлорофиллов. Особенно заметно это различие при не очень длительной инкубации (рис. 2Б). Кинетика нарастания эффекта обнаруживает характерное опережение начального подъема кривой в присутствии трипсина. Замедление этого нарастания в дальнейшем в общем коррелирует с замедлением гидролиза (рис. 1). Вместе с тем, несколько более ранний переход кривой экстрагируемости к насыщению позволяет думать, что изменение состояния хлорофиллов отражает не столько собственно гидролиз белка, сколько, вероятно, предваряющие его протекание конформационные перестройки мембран. Смещение же периода ускоренного увеличения экстрагируемости по отношению к гидролизу указывает на то, что лабильные молекулы не сразу переходят в экстрагируемый подфонд. В этой связи интересно проследить ход гидролиза специально белков — носителей пигментов.

При обобщении данных об изменении у.а. во время инкубации величины вариантов без трипсина и с ним относили к исходной у.а. того же пигмента, и полученные в разных опытах значения усредняли. В этой серии опытов исходная у.а._а превышала исходную у.а._в в среднем в 7 раз, и поэтому нормированные у.а._а затем умножили на это отношение. Таким образом, рис. 3 отражает типичные соотношения всех величин. Показан также разброс данных разных опытов. Ускоренное снижение у.а._а и возрастание у.а._в в присутствии трипсина статистически подтверждены по критерию знаков. Следовательно, обработка трипсином стимулирует избирательную убыль свежесозданных молекул хлорофилла а (ибо только избирательность приводит к снижению у.а.) и образование новых молекул хлорофилла в.

Рис. 3 содержит результаты опытов продолжительностью до 30 мин. Трудоемкость определений не позволяла в одном опыте иметь много экспозиций. Поэтому было решено сосредоточить внимание именно на таком периоде, считая главной целью принципиальное обнаружение этого нового эффекта. Заметим, однако, что предварительные опыты с большими экспозициями указывают на ускорение реакции в дальнейшем и в варианте с нагреванием без трипсина, подобно тому как на рис. 2А нарастает количество экстрагируемых пигментов. При этом различие у.а._в в вариантах с трипсином и без него в дальнейшем сглаживалось.

Сопоставляя рис. 3 и 2, легко заключить, что обнаруженная стимуляция образования хлорофилла в есть результат увеличения количества лабильного хлорофилла а, являющегося специфическим предшественником хлорофилла в (3-9). В дальнейшем следует оценить также возмож-

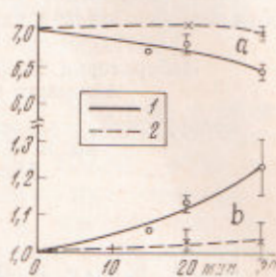


Рис. 3. Изменение удельных радиоактивностей хлорофиллов а и в при инкубации меченого C^{14} хлоропластного материала с трипсином (1) и без него (2)

ность ускорения реакции путем активирования осуществляющего ее фермента.

Обнаружение агента, положительно влияющего на протекание реакции превращения хлорофилла а в хлорофилл b, представляется существенным и само по себе, и потому, что оно поможет выяснению ее механизма, который из-за длительной дискуссии о правильности схемы последовательного биосинтеза пигментов остался почти не изученным. Использование же в качестве такого агента протеазы облегчает путь к установлению пространственной локализации процесса в структуре фотосинтетического аппарата. Наконец, полученные данные ведут к развитию представлений о том, какое состояние молекул хлорофилла а благоприятствует образованию из них хлорофилла b.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР

Белорусский государственный университет
им. В. И. Ленина
Минск

Поступило
27 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Шлык, И. В. Прудникова, Весті АН БССР, сер. біял. н., № 4, 129 (1961). ² А. А. Шлык, Г. Н. Николаева, ДАН, 143, 460 (1962); Биофизика, 8, 201 (1963); In: La photosynthese, Paris, 1963, p. 301. ³ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965. ⁴ А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин, Биофизика, 6, 424 (1961); 7, 281 (1962). ⁵ А. А. Шлык, Е. М. Станишевская, ДАН, 144, 226 (1962). ⁶ А. А. Шлык, Г. А. Ветехина, ДАН, 150, 924 (1963). ⁷ A. A. Shlyk, V. L. Kaler et al., Photochem. Photobiol., 2, 129 (1963). ⁸ C. Sironval, M.-R. Michel-Wolwertz, In: La photosynthese, Paris, 1963, p. 342. ⁹ А. А. Шлык, И. В. Прудникова, ДАН, 160, 720 (1965); Photosynthetica, 1, 157 (1967). ¹⁰ О. П. Осипова, Физиол. раст., 4, 28 (1957). ¹¹ P. Böger, Phytochemistry, 4, 435 (1965). ¹² A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, 2, Tübingen, 1969, p. 572. ¹³ C. L. Greenblatt, R. A. Olson, E. K. Engel, J. Biophys. and Biochem. Cytol., 7, 235 (1960). ¹⁴ R. Hotta, N. Haraguchi, S. Shimizu, Bot. Mag., 81, 347 (1968). ¹⁵ E. S. Bamberger, R. B. Park, Plant Physiol., 41, 1591 (1966). ¹⁶ C. Bril, J. F. Hobbelen et al., Acta bot. neerl., 18, 339 (1969). ¹⁷ Л. К. Эстровская, С. М. Кочубей, С. В. Мануильская, Сборн. Физиология и биохимия культурных растений. 1, в. 1, Киев, 1969, стр. 27. ¹⁸ J. V. Thomas, C. Van Hardeveld, Acta bot. neerl., 17, 199 (1968). ¹⁹ Ю. Г. Молотковский, И. М. Жесткова, ДАН, 166, 488 (1966).