

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Н. И. АХРАМОВИЧ

**ФРАКЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕНТРОВ БИОСИНТЕЗА
ХЛОРОФИЛЛОВ а И b И ЛЮТЕИНА С ПОМОЩЬЮ
ДЕЗОКСИХОЛАТА**

После работ Бордмана и Андерсон (1) обработка хлоропластов детергентами и дифференциальное центрифугирование получили широкое применение для разделения систем I и II фотосинтеза. Фракция легких частиц оказалась (см. (2)) оптически и функционально соответствующей системе I и по сравнению с фракцией системы II обнаружила повышенное отношение количеств хлорофиллов а:b, обогащение β-каротином и обеднение лютеином (данные о распределении виолаксантина не однотипны). С другой стороны, изотопным и иными методами показано обогащение легких частиц свежееобразованными молекулами хлорофиллов а и b (3-5), протохлорофиллидом (6), хлорофиллидом (7), а также хлорофиллазой (7) и ферментом, превращающим хлорофилл а в хлорофилл b (8). Наряду с обнаружением раннего переноса энергии от хлорофилла b к хлорофиллу а у постэтиолированных листьев (8), эти данные привели к представлению о локализации биосинтеза хлорофилла в особых структурных элементах — центрах биосинтеза, снабженных соответствующим полиферментным комплексом хлорофилл-синтетазы (8-9). Сделано заключение об участии этих центров в формировании прежде всего системы I (3, 7, 9). Фрагментирование хлоропластов в этой серии исследований проводилось механически, без детергентов, что нашло затем применение и в других лабораториях (2). Для сопоставления с литературными сведениями о частицах двух систем было использовано также фрагментирование дигитонином. Оказалось (9), что и в этом случае легкие частицы (144 000 g) обогащены протохлорофиллидом, хлорофиллидом, хлорофиллазой, а также новыми молекулами хлорофилла b, о чем свидетельствовала более высокая удельная радиоактивность (у.а.) пигментов этой фракции из ассимилировавших C¹⁴O₂ листьев. Подобные различия у.а. хлорофилла а не были установлены, возможно, ввиду лабилизации пигментных фондов детергентом (10).

Сообщение (11) об особенно мягком разделении систем I и II дезокси-хололатом сделало целесообразным исследование локализации центров биосинтеза хлорофилла во фракциях, получаемых по такой методике. Поскольку обработкой малополярными растворителями показано наличие в листе не только метаболически гетерогенных фондов хлорофиллов (12), но и сопряженных с ними фондов каротиноидов (13, 14) ((2), стр. 681), было решено включить в исследование и эти пигменты, у.а. которых у разных частиц ранее не измерялась.

Листья 7-8-дневных проростков ячменя, ассимилировавших C¹⁴O₂ в течение 10-30 мин., растирали при 0-2° в трис-буфере pH 8,0 с песком и CaCO₃. Массу фильтровали через три слоя капрона и центрифугировали 3 мин. при 400 g. Содержание хлорофиллов (а + b) в оставшемся гомогенате доводили до 200 μg/ml и аликвот фиксировали 4-кратным объемом ацетона. Все эти операции занимали 30 мин. после ассимиляции C¹⁴O₂. Затем к гомогенату приливали раствор дезоксихолата натрия и KCl в том же буфере до конечной концентрации детергента 0,4% и KCl 0,15 M и центрифугировали последовательно 15 мин. при 1000 g, 30 мин. при 10 000 g и 50 мин. при 48 000 g. Осадки и последний супернатант фиксиро-

Таблица 1

Распределение хлорофиллов а и в по фракциям и изменение удельной радиоактивности пигментов при их фракционировании

Фракция	Количество хлорофиллов а + в, %	Содержание хлорофиллов а : в	Изменение у.а. после их разделения по отношению к исходной		
			хлорофилл а	хлорофилл в	лютеин
Исходный гомогенат	100,0	3,04 ± 0,08	1,0	1,0	1,0
Осадок 1000 g	18,4 ± 2,5	2,75 ± 0,04	0,78 ± 0,07	0,85 ± 0,06	0,77 ± 0,04
Осадок 10 000 g	36,5 ± 2,5	2,58 ± 0,1	0,93 ± 0,04	1,02 ± 0,06	0,78 ± 0,03
Осадок 48 000 g	30,4 ± 2,2	3,06 ± 0,1	0,98 ± 0,03	1,03 ± 0,06	—
Супернатант 48 000 g	14,5 ± 1,6	5,01 ± 0,2	1,08 ± 0,03	2,47 ± 0,47	1,90 ± 0,35

вали ацетоном. Пигменты гомогената и фракций переводили из ацетона в серный эфир и спектрофотометрировали на СФ-5, определяя количества хлорофиллов а и в по ⁽¹³⁾. Для анализа каротиноидов пигменты хроматографировали в смеси бензол — петролейный эфир (3:1), оставляющей на старте хлорофиллы и дающей четкие полосы каротина, лютеина и виолак-сантина. Пигмент каждой полосы до ее высыхания элюировали ацетоном и спектрофотометрировали.

У.а. хлорофиллов а и в определяли после 5-кратной хроматографической очистки на бумаге по ⁽¹²⁾. У.а. лютеина определяли по ⁽¹⁶⁾. После хроматографии на бумаге в смеси бензин — ацетон (5:1) его элюировали ацетоном, переводили в серный эфир и обрабатывали насыщенным раствором КОН в метаноле. После омыления и промывания водой до нейтральной реакции по фенолфталеину пигмент переводили в петролейный эфир и хроматографировали на MgO для отделения зеаксантина. Лютеин элюировали этанолом, переводили в серный эфир и хроматографировали на бумаге в двух направлениях в смесях: бензол — петролейный эфир (1,5:1) и бензол — петролейный эфир — этанол (1,5:1 + 1%). После элюции серным эфиром пигмент спектрофотометрировали, концентрировали и наносили капилляром на слюдяные подложки для определения радиоактивности.

Использовавшийся режим позволял получать во всех фракциях достаточные для определения у.а. количества пигментов. Осадок 10 000 g, типичный для системы II, содержал 1/3 суммы хлорофиллов (табл. 1). Он обладал самым низким отношением количеств хлорофиллов а : в, минимальное значение которого при повторении опытов составило 1,9. Вдвое меньшее количество хлорофиллов, оставшееся в супернатанте после 48 000 g, на 80% было связано с частицами, осаждаемыми в течение 2 час. при 144 000 g. Отношение высоты длинноволновой полосы флуоресценции при -196° к коротковолновой было у этих частиц в 3,5 раза выше, чем у осадка 10 000 g. Соответствие супернатанта 48 000 g главным образом в системе I подтверждается также высоким отношением количеств хлорофиллов а : в, доходившим в единичных определениях до 6,3. Отношение а : в в супернатанте превышало отношение в осадке 10 000 g в 2,0 ± 0,1 раза (в 1,6 ÷ 2,7 в разных опытах). Эти результаты соответствуют опубликованным ⁽¹¹⁾. Мы также можем подтвердить хорошую воспроизводимость опытов с дезоксихолатом.

Распределение суммы каротиноидов по фракциям в общем повторяло распределение суммы хлорофиллов. Вместе с тем, рис. 1 показывает, что частицы, получаемые после фрагментирования дезоксихолатом, обнаруживают обогащение β-каротином или лютеином, описанное в литературе для систем I и II при действии иных агентов. Содержание и β-каротина, и виолак-сантина в супернатанте в 1,4—1,5 раза выше, а лютеина в 1,4 раза ниже, чем в осадке 10 000 g. Эти различия даже количественно совпадают с найденными Бордманом и Андерсон для осадков 10 000 g и 144 000 g в опытах с дигитонином ⁽¹⁾.

Об относительном содержании возникших после ассимиляции C^{14} молекул в разных фракциях можно судить, сопоставляя у.а. каждого пигмента во фракции с его у.а. в исходном гомогенате. Средние данные такого рода представлены в табл. 2. Величины, меньшие единицы, соответствуют пигментным фракциям с повышенной по сравнению с гомогенатом до-

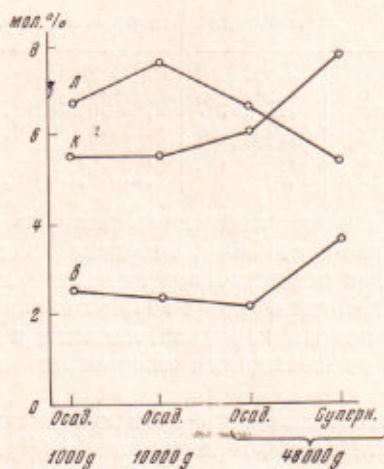


Рис. 1

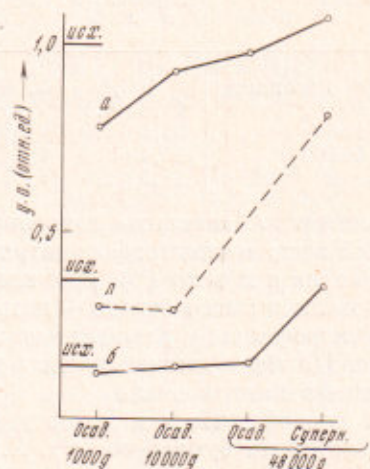


Рис. 2

Рис. 1. Содержание β-каротина (κ), лютеина (λ) и виолаксантина (ε) во фракциях. Рис. 2. Удельная радиоактивность хлорофилла а (а), хлорофилла б (б) и лютеина (λ) в исходном гомогенате и во фракциях по отношению к у.а. хлорофилла а в гомогенате

лей ранее существовавших молекул, а бóльшие единицы — с обогащением новыми молекулами. Для рис. 2 данные серии опытов усредняли после отнесения у.а. всех пигментов каждой фракции к у.а. хлорофилла а в гомогенате. Штриховая линия отражает отсутствие точки для лютеина, легкая изменчивость которого вынуждала ограничиваться анализом только трех фракций, осуществимым в пределах одного дня.

Отношение у.а. крайних фракций составляет 1,4 у хлорофилла а, 2,9 у хлорофилла б и 2,5 у лютеина. Ранее показано, что оно зависит от

Таблица 2

Относительное содержание хлорофиллида а в пигментных фондах разных фракций (в процентах от его суммы с хлорофиллом а той же фракции)

Фракция	Сразу после фракционирования	После 20 час. инкубации в 55%-ном ацетоне
Исходный гомогенат	0,20	1,11
Осадок 1000 g	0,13	0,45
Осадок 10 000 g	0,13	0,28
Осадок 48 000 g	0,25	0,33
Супернатант 48 000 g	0,67	4,20

степени разбавления меченых молекул уже имевшимися в ткани, и у фракций, разделяемых экстракцией малополярным растворителем, уменьшается по мере замещения немеченых молекул мечеными (12). Аналогичная картина наблюдалась у фракций, получаемых после механического фрагментирования хлоропластов (3). Характерно, что и в данном случае снижение этого отношения коррелирует с ростом у.а. по мере перехода от хлорофилла б к лютеину и хлорофиллу а. Меньшая у.а. хлорофилла б соответствует его последовательному биосинтезу из хлорофилла а (12), а соизмеримая с хлорофиллами у.а. лютеина говорит о близкой по порядку величине скорости обновления всех пигментов (13).

В опытах с механическим фрагментированием установлена более высокая скорость превращения хлорофилла а в хлорофилл б во фракции мелких частиц (3). По непосредственно измененным параметрам мелкие час-

тицы в опытах с дезоксихолоатом воспроизводят характеристики изученных ранее, и, по-видимому, это касается и скорости превращения хлорофилла а в хлорофилл b. Действительно, если по мере перехода от фракции с меньшей у.а. хлорофилла а к фракциям со все более высокой у.а. этого пигмента нарастает и скорость его превращения в хлорофилл b, то различия у.а. последнего между фракциями должны быть особенно велики, что и наблюдается.

Сосредоточение новых молекул хлорофиллов а и b во фракции легких частиц соответствует ее обогащению центрами биосинтеза хлорофилла. О том же говорит обогащение этой фракции хлорофиллидом — предшественником постоянно синтезируемых ⁽¹²⁾ новых молекул хлорофилла (табл. 3). Определение хлорофиллида * проводили по ⁽¹³⁾. Если материал фракции встряхивать 20 час. в 55%-м ацетоне, то в дополнение к природному хлорофиллиду листа накапливается хлорофиллид, возникающий при гидролизе хлорофилла хлорофиллазой. Наибольшее количество этого же хлорофиллида в той же фракции соответствует локализации в центрах биосинтеза и ферментного комплекса, осуществляющего метаболизм хлорофилла.

Сопряжение метаболической гетерогенности хлорофиллов и ксантофиллов отмечено ранее на основании повышенной экстрагируемости свежесформированных молекул всех пигментов малополярным растворителем ^(13, 14). Теперь можно говорить о сопряжении и их пространственного расположения на определенных элементах субмикроструктуры. По-видимому, центрам биосинтеза хлорофиллов а и b соответствуют и центры биосинтеза лютеина, а возможно, и других каротиноидов. Такое заключение подчеркивает роль центров как создателей новых функциональных единиц фотосинтетической активности ^(7, 9). Существование центров биосинтеза пигментов отражает, вероятно, существование центров более высокого порядка организации, формирующих и другие компоненты фотосинтетического аппарата.

Как отмечено во вступлении к статье, ранее уже было развито представление о связи центров биосинтеза хлорофилла с формированием прежде всего единиц системы I. Поскольку в данной работе был использован именно тот способ фрагментирования хлоропластов, который хорошо разделяет две системы, это представление становится особенно обоснованным.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР

Поступило
28 IV 1970

Белорусский государственный университет
им. В. И. Ленина
Минск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. K. Boardman, J. M. Anderson, *Nature*, 203, 166 (1964); *Biochim. et biophys. acta*, 143, 187 (1967); *Adv. in Enzymol.*, 30, 1 (1968). ² *Progress in Photosynthesis Research*. Ed. by H. Metzner, Tubingen, 1969. ³ А. А. Шлык, И. В. Прудникова, *ДАН*, 160, 720 (1965); *Photosynthetica*, 1, 157 (1967). ⁴ А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин и др., *ДАН*, 167, 706 (1966). ⁵ А. А. Шлык, Л. К. Суховер, *ДАН*, 181, 1274 (1968). ⁶ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко, *ДАН*, 176, 1437 (1967). ⁷ А. А. Shlyk, L. I. Vlasenok et al., *Studia biophysica*, 5, 17 (1967). ⁸ Л. И. Фрадкин, А. А. Шлык, В. М. Коляго, *ДАН*, 171, 222 (1966); L. I. Fradkin, A. A. Shlyk et al., *Photosynthetica* 3, 326 (1969). ⁹ А. А. Shlyk, L. V. Prudnikova et al., In: *Progress in Photosynthesis Research*, Tübingen, 1969, p. 572. ¹⁰ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др., *ДАН*, 188, 1189 (1969). ¹¹ C. Brill, D. J. Van der Horst et al., *Biochim. et biophys. acta*, 172, 345 (1969). ¹² А. А. Шлык, *Метаболизм хлорофилла в зеленом растении*, Минск, 1965. ¹³ А. П. Лосев, А. А. Шлык, *Биохимия*, 29, 457 (1964); *ДАН*, 186, 971 (1969). ¹⁴ C. Costes, M. E. De-roche, *C. R.*, 261, 4893 (1965). ¹⁵ C. L. Comar, F. P. Zscheile, *Plant Physiol.*, 17, 198 (1942). ¹⁶ А. П. Лосев, *Физиол. раст.*, 11, 1098 (1964).

* Авторы признательны Е. С. Лосевой за определения содержания хлорофиллида.