

Е. А. АКУЛОВА, Е. Н. МУХИН

О ВЕЩЕСТВАХ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ — ВОЗМОЖНЫХ РЕГУЛЯТОРАХ СВЕТОВЫХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИНТЕЗА

(Представлено академиком М. Х. Чайлазном 1 VII 1970)

Потребность хлоропласта в восстановленной форме никотин-амидаденидинуклеотидфосфата (НАДФ-Н₂) и аденинозинтрифосфата (АТФ) не ограничивается их использованием в цикле Кальвина. НАДФ-Н₂ и АТФ расходуются и в других биосинтезах, таких как синтез аминокислот, жирных кислот и т. д. К тому же в связи с изменениями общего метаболизма клетки, в частности под влиянием непрерывно меняющихся факторов внешней среды, потребность в этих веществах не может оставаться постоянной. Следовательно, должны существовать механизмы, контролирующие накопление НАДФ-Н₂ и АТФ в хлоропласте. Одним из возможных путей регуляции образования восстановленной формы НАДФ и АТФ может быть воздействие природных веществ — регуляторов на соответствующие системы. Обнаружение физиологических веществ с регуляторными функциями позволило бы не только получить более полные сведения о составе фотосинтезирующего аппарата, но и приблизиться к пониманию механизмов, осуществляющих авторегуляцию процесса фотосинтеза.

Таблица 1

Влияние компонентов, элюированных из зон 1, 2 и 3 электрофореграммы, на фотовосстановление хлоропластами ДХФИФ и НАДФ

Добавки зон в среду инкубации	Восстановление ДХФИФ		Восстановление НАДФ	
	ΔE_{420}	%	ΔE_{340}	%
Контроль	-0,147	100	+0,30	100
1	-0,132	90	+0,21	70
2	-0,088	60	+0,06	20
3	-0,145	100	+0,15	50
Контроль	-0,140	100	+0,30	100
1+2+3	-0,110	80	+0,02	10
1+3	-0,170	120	+0,09	30
1+2	-0,125	90	+0,03	10
2+3	-0,125	90	+0,08	30

Примечание. Восстановление ДХФИФ. Состав смеси: суспензия хлоропластов, соответствующая 20 мкг хлорофилла, буфер трис-НСl pH 7,4. Время реакции 90 сек., освещенность 10 000 лк, $t = 22^\circ$. Восстановление НАДФ. Состав смеси: НАДФ 0,67 ммоля, MgCl₂ 10 ммоля, ферредоксин 0,1 мл, суспензия хлоропластов, соответствующая 50 мкг хлорофилла. Вещества зоны 1, 2 и 3 вводились в смесь в объеме 0,2 мл. Оптическая плотность растворов при 280 мμ равнялась 0,220. Буфер трис-НСl pH 7,4. Время реакции 10 мин., освещенность 15 000 лк, $t = 21^\circ$.

Ранее нами было выделено (1) из листьев гороха вещество, которое ингибировало фотовосстановление дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и НАДФ изолированными хлоропластами и было обозначено как голубой ингибитор. Изучение элюата с ДЭАЭ-целлюлозной колонки показало, что наряду с голубым ингибитором он содержит два других вещества.

В настоящем сообщении излагаются результаты дальнейшего изучения голубого ингибитора и двух новых компонентов. Эти два вещества удается получить одновременно с голубым ингибитором при электрофорезе элюата в 0,8 M трис-буфере. Все три компонента отличаются между собой по электрофоретической подвижности, спектрам флуоресценции и поглощения. В дальнейшем условимся их обозначать как вещества зоны 1, 2 и 3 в соответствии с их расположением на электрофореграмме. Голубой ингибитор в этом случае идентичен зоне 2.

В табл. 1 представлены результаты испытания полученных фракций в реакции Хилла с ДХФИФ и НАДФ как окислителями. В тех concentra-

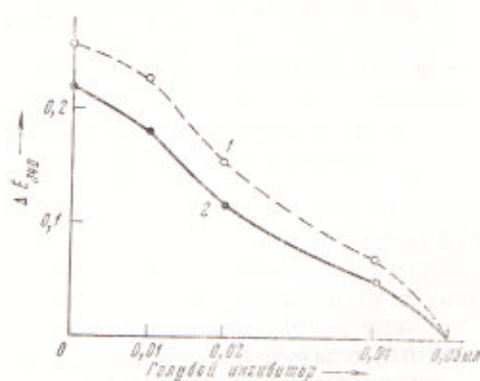


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость фотовосстановления НАДФ от концентрации голубого ингибитора. Состав смеси: суспензия хлоропластов соответствующая 45 μg хлорофилла, НАДФ 0,67 $\mu\text{моль}$, MgCl_2 10 $\mu\text{моль}$, АДФ 1 $\mu\text{моль}$, F_n 100 $\mu\text{моль}$. Время реакции 10 мин., освещенность 15 000 лк, $t = 21-22^\circ$. 1 — с добавлением ф.а.с., 2 — без добавления ф.а.с.

Рис. 2. Зависимость восстановления НАДФ хлоропластами от концентрации вещества зоны 3. Условия опыта и состав смеси, как на рис. 1. 1 — с добавлением ф.а.с., 2 — без добавления ф.а.с.

Рис. 3. Зависимость фотовосстановления НАДФ от концентрации ДХММ. Условия опыта и состав смеси как на рис. 1. 1 — с добавлением ф.а.с., 2 — без добавления ф.а.с.

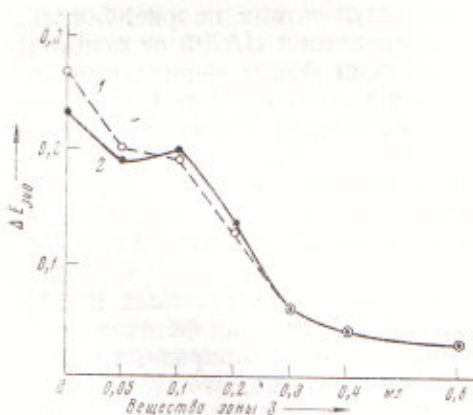


Рис. 2

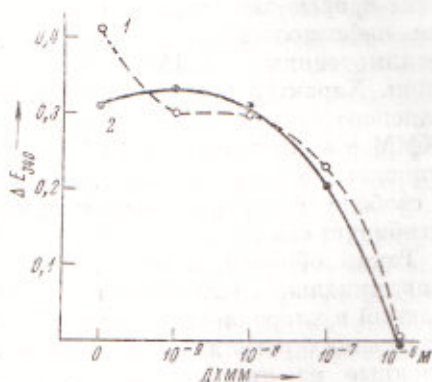


Рис. 3

циях, которые использовались в данном эксперименте (концентрации уравнивались по поглощению растворов при 280 м μ), вещества (за исключением зоны 3 в случае восстановления ДХФИФ) ингибируют обе реакции. Наибольшим эффектом обладает зона 2. Все три вещества подавляют в большей степени восстановление НАДФ, чем ДХФИФ.

Представляют интерес данные о воздействии на указанные реакции разных сочетаний трех выделенных веществ. В реакции Хилла с ДХФИФ ни одно из сочетаний не дает такого сильного ингибирования как вещество зоны 2. При воздействии зон 1 и 3 вместе наблюдается не снижение скорости реакции, а ее активация. В случае восстановления НАДФ различные комбинации компонентов сильнее подавляют реакцию, чем отдельные вещества, но в меньшей степени, чем можно было бы ожидать, если исходить из аддитивности действия. Ни одно из сочетаний не уско-

рлет восстановление НАДФ. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что одновременное присутствие *in vivo* этих веществ в разных сочетаниях и количественных соотношениях, по-видимому, открывает возможности более тонкой и разнообразной регуляции фотохимической активности, чем каждое из веществ в отдельности.

Мы исследовали влияние полученных веществ на связанный с фосфорилированием и свободный (нефосфорилирующий) транспорт электронов в хлоропластах. На рис. 1 изображена зависимость скорости восстановления НАДФ хлоропластами от концентрации голубого ингибитора в присутствии или отсутствии в инкубационной смеси фосфатакцептирующей системы (ф.а.с.) — АДФ + Фн (аденозиндифосфат + неорганический фосфат). Как видно из графика, голубое вещество подавляет восстановление НАДФ, связанное со свободным переносом электронов. Прирост скорости реакции за счет фосфорилирующего пути переноса электрона при концентрации ингибитора в среде инкубации 0,01—0,03 мл практически не изменяется, а при концентрации 0,05 мл полностью подавляются оба пути транспорта электрона. Отметим, что реакция ингибируется весьма низкими концентрациями голубого вещества, что говорит в пользу его регуляторной функции.

Результаты аналогичного эксперимента с веществом зоны 3 приведены на рис. 2. Характер воздействия этой зоны отличается от голубого вещества, а именно: компонент 3 ингибирует при низких концентрациях фосфорилирующий транспорт электрона, а при более высоких (0,2—0,3 мл) и свободный транспорт (концентрации голубого ингибитора и вещества зоны 3, используемые в обсуждаемых опытах, сопоставимы). Разница с голубым ингибитором состоит также в том, что вещество 3 в пределах испытанных концентраций не подавляет полностью накопление НАДФ-Н₂, а сохраняет его на довольно низком уровне.

Для сравнения с вышеизложенными результатами на рис. 3 изображены кривые зависимости скорости восстановления НАДФ от концентрации нефизиологического ингибитора реакции Хилла — дихлорфенилдиметилмочевин (ДХММ) в случае внесения ф.а.с. в среду и при ее исключении. Характер воздействия ДХММ на свободный и фосфорилирующий транспорт электронов до некоторой степени аналогичен веществу зоны 3. ДХММ в концентрациях 10^{-9} и 10^{-8} M подавляет восстановление НАДФ, сопряженное с фосфорилирующим транспортом электронов, и не влияет на свободный перенос электрона. Концентрация ДХММ 10^{-6} M полностью ингибирует оба пути образования НАДФ-Н₂.

Таким образом, можно считать, что в модельных реакциях показана принципиальная возможность одного из путей регуляции фотохимических реакций в хлоропластах *in vivo*, а именно с помощью природных веществ, обладающих регуляторными свойствами. Обнаружено, что вещества, выделенные из листьев гороха, по-разному воздействуют на накопление НАДФ-Н₂, связанное с фосфорилирующим и свободным транспортом электронов в хлоропластах. Два пути транспорта электронов, один из которых сопряжен с процессом образования АТФ, а другой не связан с фосфорилированием, представляют о которых применительно к хлоропластам только начинают развиваться (^{2, 3}), видимо, являются определенной аналогией таковых в митохондриях (^{4, 5}).

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
23 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. А. Акулова, Е. Н. Мухин, ДАН, 185, 702 (1969). ² S. Izawa, Y. D. Winget, N. E. Good, Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 223 (1966). ³ S. Izawa, N. E. Good, Biochim. et biophys. acta, 162, 380 (1968). ⁴ В. П. Скулачев, Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, Изд. АН СССР, 1962. ⁵ В. П. Скулачев, Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969.