

М. И. МОЛЧАНОВ

О ЛИПОАМИНОКИСЛОТНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ ПЛАСТИД  
ПРИ ФОРМИРОВАНИИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ  
КУКУРУЗЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

(Представлено академиком А. И. Опариным 9 XI 1970)

В липидной части липопротеидов из лейкопластов свеклы были обнаружены аминокислоты (1). Они были найдены в липидах из листьев и хлоропластов ряда растений (2) и в составе липопептидного соединения из хлоропластов фасоли (3). Аминокислоты были идентифицированы. Во всех случаях обнаружены аспарагиновая и глутаминовая кислота, глицин, серин и аланин (2,3). В липидной части липопротеидов из хлоропластов фасоли липоаминокислотные соединения были сосредоточены во фракциях нейтральных липидов и фосфолипидов (4). Фракция фосфолипидов была исследована более подробно. В ней найдены фосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и дифосфатидилглицерин, а также ряд аминокислот, среди которых были идентифицированы вышеперечисленные аланин, глицин, серин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты (4,5). Аминокислоты связаны с фосфолипидами сложноэфирной связью (6). В хлоропластах фасоли установлено образование *in vivo* O-эфиров аминокислот с фосфатидилглицерином, а также O-эфиров аминокислот и пептидов с дифосфатидилглицерином (7). В этой связи было целесообразным изучить, являются ли названные выше липоаминокислотные соединения характерными компонентами только внутренних мембран сформированных хлоропластов или же подобные соединения могут быть обнаружены и на предшествующих стадиях онтогенетического развития хлоропластов. Наиболее подходящим объектом для этих экспериментов могли служить проростки кукурузы, выращенные в темноте и затем подвергнутые освещению.

Таблица 1

Включение  $C^{14}$  из  $C^{14}O_2$  в аминокислоты липоаминокислотных соединений и в ламеллярные белки пластид кукурузы под влиянием света

Продолжительность инкубации на свету, час.	В липоаминокислоты, имп/мин на 1 мг аминокислоты	В белки ламелл, имп/мин на 1 мг белка
1	29000	22769
4	38946	29681
24	83557	45300
48	85306	45184

Примечание. Инкубация проростков с  $C^{14}O_2$  60 мин., концентрация  $C^{14}O_2$  0,12%, интенсивность света при выращивании проростков составляла 7500 лк, во время экспозиции с  $C^{14}O_2$  17 500 лк.

являются ли названные выше липоаминокислотные соединения характерными компонентами только внутренних мембран сформированных хлоропластов или же подобные соединения могут быть обнаружены и на предшествующих стадиях онтогенетического развития хлоропластов. Наиболее подходящим объектом для этих экспериментов могли служить проростки кукурузы, выращенные в темноте и затем подвергнутые освещению.

Использовали 5—6-дневные проростки кукурузы сорта Элита и Букавицкий-3, выращенные в темноте. Проростки освещали лампой дневного света интенсивностью 4500 и 7500 лк в течение различного времени. В опытах с меткой  $C^{14}$  целые проростки экспонировали в атмосфере  $C^{14}O_2$ , а кусочки проростков длиной до 2 см инкубировали на поверхности растворов  $C^{14}$ -аланина (37 мС/ммоль),  $C^{14}$ -лизина (76 мС/ммоль),  $C^{14}$ -лейцина (103 мС/ммоль) и  $C^{14}$ -глутаминовой кислоты (102 мС/ммоль) в течение часа, как



это описано ранее (<sup>7, 8</sup>). В этот период времени объекты освещали лампами накаливания. В различных опытах интенсивность света составляла 4500 и 17500 лк. После инкубации проростки тщательно промывали водой и гомогенизировали в 0,5 М сахарозе с альбумином (100 мкг/мл). Пластиды осаждали в интервале центрифугирования от 150 до 3000 г в течение 15 мин. и очищали в ступенчатом градиенте 0,5—1,0—1,5—2,0 М сахарозы. Использовали пластиды, переходящие в интерфазу 1,5—2,0 М сахарозы. Липопротеиды (ламеллярные белки) извлекали из пластид 78% этанолом pH 3 по ранее описанной методике (<sup>9</sup>). Липоаминокислотные соединения выделяли по методике (<sup>7</sup>). Содержание аминокислот в липоаминокислотных соединениях определяли модифицированным нингидринным методом Мура и Штейна с использованием лейцина в качестве стандартной аминокислоты (<sup>10</sup>). Фосфор фосфолипидов в пробах определяли по методу (<sup>11</sup>).

В опытах с  $C^{14}O_2$  было показано, что липоаминокислотные соединения присутствуют в липидной части липопротеидов внутренних мембран пластид на всех изученных стадиях формирования ламеллярной системы хлоропластов. При этом образование липоаминокислот коррелировало с биосинтезом ламеллярных белков пластид (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что наиболее интенсивное включение метки в липоаминокислотные соединения (а также в ламеллярные белки) происходило в пластидах проростков, выдержанных на свету в течение 24 час. Именно в этот и последующий периоды времени в хлоропластах наблюдалась плотная упаковка ламелл и происходило образование системы гран (<sup>8</sup>).

В табл. 1 представлено включение  $C^{14}$  в аминокислоты суммы фосфатидаминнокислотных соединений, связанных с фосфолипидами сложноэфирной связью. В дальнейших опытах все фосфолипиды липидной части липопротеидов были отделены на колонке кремневой кислоты от неполярных липидов и главной массы пигментов, а затем подвергнуты хроматографии на пластинах силикагеля КСК-2 (<sup>7</sup>). Хроматографию фосфолипидов проводили в системе растворителей хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Одна из хроматограмм представлена на рис. 1. Из рис. 1 можно видеть, что фракции фосфолипидов из пропластид (а) и хлоропластов (б) качественно обнаруживают сходную картину распределения веществ. Каждое из веществ, содержащихся в пятнах 1—8, было элюировано с пластинок метанолом, подкисленным соляной кислотой. Элюаты фильтровали через стеклянные фильтры № 3 для удаления следов сорбента, растворители удаляли, а в пробах определяли содержание фосфора и наличие аминокислот. Последние определялись в пробах после их отделения от фосфолипидов мягким щелочным гидролизом и очистки их от продуктов гидролиза на колонках Дауэкс 50 × 8Н<sup>+</sup> (<sup>7</sup>). Фосфор фосфолипидов был найден в пятнах 1—4 и 6. На основании величин  $R_f$  обнаруженных фосфолипидов можно предполагать, что в липидной части липопротеидов из пропластид и хлоропластов содержатся фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, фосфатидилэтанолламин, а также фосфатидная кислота и дифос-



Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма фракции фосфолипидов, выделенных из липопротеидов пропластид (а) и хлоропластов (б) кукурузы. А — номера пятен липидов



Таблица 2

Включение  $C^{14}$  аминокислот в различные фракции фосфолипидов из пропластид и хлоропластов кукурузы (имп/мин)

Проростки	Фосфолипиды	$C^{14}O_2$	$C^{14}$ -аминокислоты
Этиолированные	ДФГ* + ФГ	—	3707 (64%)
	Остальные	—	2072
Освещали 1 час	ДФГ + ФГ	539 (72%)	—
	Остальные	210	—
Освещали 24 час	ДФГ + ФГ	1178 (61%)	7932 (86%)
	Остальные	753	1313
Зеленые	ДФГ + ФГ	2312 (78%)	10119 (79%)
	Остальные	667	2678

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 интенсивность света при выращивании проростков и их инкубации с меткой  $C^{14}$  составляла 4500 лк.

\* ДФГ — дифосфатидилглицерин, ФГ — фосфатидилглицерин.

Таблица 3

Включение  $C^{14}$ -аминокислот в фосфатидилглицерины из пропластид и хлоропластов кукурузы

Проростки	Фосфолипиды	Имп/мин		Имп/мин на 1 мг фосфора фосфолипидов	
		опыт 1	опыт 2	опыт 1	опыт 2
Этиолированные	ДФГ	—	801	—	31 200
	ФГ	—	2906	—	270 000
Освещали 1 час	ДФГ	52	—	5100	—
	ФГ	487	—	108 220	—
Освещали 24 часа	ДФГ	101	2724	16 032	128 500
	ФГ	1077	4208	130 000	390 000
Зеленые	ДФГ	693	3200	102 000	260 000
	ФГ	1619	6919	205 132	501 400

Примечание. В опыте 1 источником радиоактивности служила  $C^{14}O_2$ , в опыте 2 — смесь  $C^{14}$ -аминокислот.

Таблица 4

Содержание  $C^{14}$ -аминокислот в О-эфирах аминокислот и фосфатидилглицерина, выделенных из пропластид и хлоропластов кукурузы (% от суммарной радиоактивности\*  $C^{14}$ -аминокислот в пробах)

Аминокислоты	Освещение 1 час	Освещение 24 часа	Освещение 144 часа
Аспарагиновая к-та	8,4	15,8	20,7
Глутаминовая к-та	12,7	16,0	16,5
Серин	5,6	9,2	13,1
Глицин	8,4	10,7	11,1
Аланин	14,1	18,1	21,5
Остальные аминокислоты	50,7	30,0	17,0
Радиоактивность в пробах, имп/мин	284	617	1235

\* Источник радиоактивности  $C^{14}O_2$ .

фатидилглицер и н. Изучение деацелированных производных названных фосфолипидов однозначно подтвердило наличие среди них первых четырех фосфолипидов. Для окончательного доказательства присутствия в пропластидах и хлоропластах кукурузы фосфатидной кислоты и дифосфатидилглицерина необходимы дальнейшие исследования. В пятнах 5 и 7 найдены моно- и дигалактозилдиглицериды. Пятно 8 содержало остатки каротиноидов и хлорофилла. В пятне 2 наряду с фосфатидилхолином находился сульфоллипид. Аминокислоты были обнаружены главным образом в пятнах кислых фосфолипидов, содержащих фосфатидилглицерин ( $R_f$  0,44) и дифосфатидилглицерин ( $R_f$  0,83). Из них были идентифицированы аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глицин, серин и аланин. Те же пятна фосфолипидов содержали основную радиоактивность аминокислот, обнаруженных в составе липоаминокислотных соединений во фракции фосфолипидов как в пропластидах, так и в хлоропластах. С кислыми фосфолипидами было связано до 86% радиоактивности  $C^{14}$ -аминокислот, включенных во фракцию фосфолипидов пластид (табл. 2).

Необходимо отметить, что процесс дифференциации хлоропластов заметно влиял на интенсивность образования липоаминокислотных соединений, причем максимальный уровень включения  $C^{14}$ -аминокислот в «аминокислотную часть» липоаминокислотных соединений наблюдался в проростках, содержащих хлоропласты с развитой ламеллярной системой. Это видно из результатов, представленных в табл. 3.

В дальнейших опытах была выявлена связь между уровнем развития ламеллярной системы хлоропластов и интенсивностью образования в них О-эфиров аминокислот и фосфатидилглицерина. Оказалось, что по мере дифференциации хлоропластов в их ламеллярной системе закономерно усиливается образование аминокцилфосфотидилглицеринов, содержащих аланин, глицин, серин, аспарагиновую и глютаминовую кислоту, тогда как содержание прочих аминокислот в названных фосфолипидах заметно снижалось (табл. 4). Этот факт, по нашему мнению, имеет принципиальное значение, так как он указывает на образование в хлоропластах в процессе их дифференциации липоаминокислотных соединений, содержащих в своем составе «ключевые» аминокислоты пластид. Как известно, последние образуются главным образом в хлоропластах в процессе фотосинтеза. Следует отметить, что на связь процесса фотосинтеза с содержанием определенных аминокислот в липоаминокислотных соединениях указывалось и ранее (2).

Таким образом, начиная с ранних стадий развития хлоропластов (пропластида с проламеллярным телом (8)), в системе внутренних мембран этих органелл найдены фосфатидилглицерины, содержащие связанные с ними различные аминокислоты. Образование этих липидных соединений коррелировало с развитием ламеллярной системы хлоропластов и биосинтезом ламеллярных белков.

Автор благодарит акад. А. И. Опарина и Э. Н. Безингер за проявленный интерес к работе и обсуждение результатов работы.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
27 X 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Э. Н. Безингер, II Всесоюз. конфер. по фотосинтезу, тез. докл., М., 1957, стр. 47. <sup>2</sup> T. Kauffmann, R. Ködding, Zs. Naturforsch., 12, 735 (1957); T. Kauffmann, Zs. Naturforsch., 12, 736 (1957). <sup>3</sup> Э. Н. Безингер, Н. М. Сисакян, И. М. Симанова, Биохимия, 24, 876 (1959). <sup>4</sup> Э. Н. Безингер, В. С. Чигирев, Н. М. Сисакян, ДАН, 158, 1424 (1964). <sup>5</sup> В. С. Чигирев, Э. Н. Безингер, Н. М. Сисакян, ДАН, 169, 235 (1966). <sup>6</sup> В. С. Чигирев, В. И. Швец, Э. Н. Безингер, ДАН, 181, 747 (1968). <sup>7</sup> В. С. Чигирев, М. И. Молчанов, Э. Н. Безингер, ДАН, 195, № 3 (1970). <sup>8</sup> М. И. Молчанов, Н. С. Балаур, Э. Н. Безингер, ДАН, 187, 935 (1969). <sup>9</sup> Э. Н. Безингер, М. И. Молчанов и др., ДАН, 151, 722 (1963). <sup>10</sup> J. R. Spies, Methods in Enzymology, N. Y., 1957, p. 467. <sup>11</sup> E. Gerlach, B. Deuticke, Biochem. Zs., 337, 477 (1963).