

УДК 541.144.7 + 581(132 + 174)

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Н. Д. СЕМЕНОВИЧ

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА

Метаболическая гетерогенность хлорофиллов в зеленых растениях, определяющая связь между состоянием и временем жизни молекул в составе разных пигментных форм, была обнаружена (¹⁻³) в нашей лаборатории и затем исследована у высших зеленых растений, а также у хлореллы и эвглены (см. обзоры (⁴⁻⁶)). Установлено, что свежееобразованные молекулы хлорофиллов легче экстрагируются малополярными растворителями, легче атакуются хлорофиллазой, легче феофитинизируются, легче разрушаются ультразвуком, интенсивным освещением или при длительном затенении и т. д. Важное значение имело установление разного содержания таких молекул во фрагментах хлоропластов, выделяемых методом дифференциального центрифугирования (см. обзор (⁵)). Обнаружилась и особая липофильность окружения свежееобразованных молекул. В частности, при работе с синхронной культурой хлореллы было установлено, что петролейный эфир извлекает из клеток преимущественно те формы пигментов (как хлорофилла а, так и хлорофилла b), в которые свежееобразованные молекулы поступают в первую очередь, а при частичной экстракции ацетоном именно эти формы оказываются труднее извлекаемыми (⁷). В эксперименте это приводило к соответствию большей или меньшей удельной радиоактивности (у.а.) тщательно очищенных хлорофиллов из первого экстракта по сравнению с оставшимися фондами.

В настоящей работе впервые был поставлен вопрос о существовании метаболической гетерогенности и бактериохлорофилла, т. е. об универсальности этого явления и для растений, и для бактерий. Кроме того, наличие хорошо разработанных методов фракционирования бактериохлорофилл-липопротеидных комплексов (⁸), которые мы, благодаря любезности авторов, могли легко заимствовать, позволило подойти к установлению относительных скоростей включения новых молекул пигмента в состав антенны и реакционного центра фотосинтетического аппарата.

В опытах использовали культуру *Chromatium*, выращенную по (⁹) на среде Ларсена с 0,2% CH_3COONa в анаэробных условиях при 30° и непрерывном освещении 2000 лк в течение 4 суток. Клетки осаждали центрифугированием 20 мин. при 5000 g, промывали дистиллированной водой, снова осаждали и суспендировали по (¹⁰) в $1/15$ M натрий-калий-фосфатном буфере, pH 6,8 (13—17 мг сырых клеток на 1 мл буфера), с добавлением 0,4% CH_3COONa , 0,05% Na_2S и 100 мC $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ на 100 мл суспензии. Пробы инкубировали в условиях, при которых выращивали культуру, но с перемешиванием магнитной мешалкой. Количество бактериохлорофилла в 1 мл суспензии, определенное до и после инкубирования, оставалось неизменным, указывая на то, что включение C^{14} в состав бактериохлорофилла происходило при постоянном количестве последнего, что означает наличие процесса его обновления, подобного доказанному для хлорофилла зеленых растений (⁴).

После инкубирования клетки собирали центрифугированием, промывали дистиллированной водой, ресуспендировали в 0,05 M трис-HCl-буфере, pH 8 и подвергали лиофильной сушке. Сухие клетки обрабатывали петролейным эфиром, содержащим 0,6% метанола, в течение 20 мин., производя

частичную экстракцию бактериохлорофилла. Осадок собирали на стеклянном фильтре и оставшуюся часть пигмента извлекали метанолом. После спектрофотометрического определения количества бактериохлорофилла полученные экстракты хроматографировали на бумаге в смеси петролейного эфира с 5% ацетона. Выделенный бактериохлорофилл феофитинизировали добавлением HCl к ацетоновому раствору до концентрации 0,5% и далее очищали 4-кратным хроматографированием в меняющихся смесях растворителей. Специальная проверка показала, что постоянство у.а., свидетельствующее о полной радиохимической чистоте бактериофеофитина, достигается уже после 2-кратного хроматографирования, и дальнейшая обработка имела целью дополнительно гарантировать полное отсутствие примесей. Измерение у.а. проводили после приготовления бесконечно тонких препаратов пигмента по (4).

Табл. 1 показывает, что, как и в опытах с зелеными растениями, доля пигмента, извлекаемая петролейным эфиром, несколько колеблется от опыта к опыту, отражая физиологическую и методическую вариабильность. Абсолютный уровень у.а. зависит от степени включения C^{14} и мало

Таблица 1
Удельная радиоактивность (имп/мин·μгC)
фракций бактериохлорофилла,
последовательно извлеченных из
лиофилизированных клеток *Chromatium*
петролейным эфиром, содержащим 0,6%
метанола (I), и затем метанолом (II)

№ опыта	Доля пигмента, извлеченного петролейным эфиром, %	I	II	I/II
1	17,6	14,4	7,4	2,0
2	26,1	11,3	6,5	1,8
3	27,2	12,9	7,5	1,7
4	32,0	8,8	6,3	1,4

существен для наших целей. Основной же результат состоит в неизменно наблюдаемом превышении у.а. первой фракции бактериохлорофилла над у.а. второй. Это означает, что бактериохлорофилл *Chromatium* является метаболически гетерогенным и его свежееобразующиеся молекулы поступают прежде всего в пигментный фонд, отличающийся особой липофильностью. Обращает на себя внимание корреляция между степенью извлечения пигмента в первую фракцию и превышением его у.а. Подобная связь наблюдалась и у зеленых растений (4, 6) и отража-

ет наибольшую избирательность разделения метаболически гетерогенных фондов при малой степени извлечения.

Ряд авторов успешно осуществили фракционирование хромофоров фотосинтезирующих бактерий с помощью обработки детергентами и применения различных методов фракционирования. При этом получались две фракции, одна из которых обогащена бактериохлорофиллом реакционного центра и отличается повышенной фотохимической активностью, а вторая включает формы бактериохлорофилла антенны, участвующие в сборе и передаче энергии (11-15). Ерохин и Москаленко (8) методом электрофореза в полиакриламидном геле получили из обработанных тритоном X-100 хромофоров *Chromatium* два пигмент-белковых комплекса, различающихся по спектрам поглощения и содержанию белка и липидов. Основная масса бактериохлорофилла находилась в более подвижной широкой зоне содержащей коротковолновые формы пигмента. Медленная же узкая зона содержала преимущественно форму B890 и немного B800 и была богата белком. Именно этот метод фракционирования был использован и в настоящей работе.

Промытые клетки *Chromatium* ресуспендировали в 0,05 M трис-HCl-буфере, pH 8, и разрушали обработкой ультразвуком (1 мин., 22 кгц, 70 вт/см²). Неразрушенные клетки и крупные частицы отделяли центрифугированием 7 мин. при 13 000 g, а надосадочную жидкость, содержащую хромофоры подвергали лиофильной сушке. Сухие хромофоры суспендировали в 5% растворе тритона X-100 так, чтобы на 1 мг хромофоров приходилось 2,5 мг детергента, и через 30 мин. подвергали электрофорезу по (16). Посл

разделения зон соответствующие участки геля измельчали продавливанием через капроновую ткань и заливали 0,05 М трис-HCl-буфером, рН 8. Через 12—14 час. пигмент-белковые комплексы из мелких частичек геля переходили в буфер. Смесь фильтровали через бумажный фильтр. Гель медленной зоны практически полностью освобождается от пигмент-белкового комплекса. Гель быстрой зоны остается немного окрашенным. Спектры поглощения прозрачных буферных растворов хромофоров и комплексов из быстрой и медленной зон записывали на спектрофотометре СФ-10, несколько перестроенном для регистрации в ближней инфракрасной области. На рис. 1 спектры приведены после нормирования в максимуме поглощения при 590 мμ. Бактериохлорофилл каждой зоны извлекали метанолом, переводили в этиловый эфир, спектрофотометрировали, а затем очищали для определения у.а., как описано выше.

Табл. 2 показывает, что пигмент быстрой зоны оказался более меченым, чем медленной, т. е. наибольшее количество молодых молекул, возникающих в результате обновления, находится в пигмент-белковом комплексе, содержащем основную массу бактериохлорофилла с нативными формами В850 и В800. Среднее для всей табл. 2 превышение у.а. бактериохлорофилла этого комплекса над у.а. второго составляет 2,2 раза при в 2,3 раза большем содержании пигмента. Это означает, что абсолютное количество включенных в него свежееобразованных молекул в пять раз больше, чем включенных в состав комплекса с меньшей электрофоретической подвижностью.

Итак, свежееобразованные молекулы бактериохлорофилла поступают главным образом в пигментный комплекс антенны. Именно отсюда происходит, по-видимому, и преимущественная экстракция малополярными растворителями типа петролейного эфира. Повышенная роль липидов в организации этого комплекса ⁽¹⁷⁾ соответствует особой липофильности окружения свежееобразованных молекул хлорофилла у зеленых растений ⁽⁷⁾. По-видимому, этот параллелизм отражает общие характеристики соотношения центров биосинтеза хлорофиллов (см. обзор ⁽⁵⁾) с гидрофобностью определенных структурных элементов фотосинтетических мембран. Необходимо подчеркнуть, что указанные наблюдения относятся к поведению свежееобразованных молекул, возникающих при обновлении бактериохлорофилла в сформировавшихся мембранах. Очевидно, пигмент их антенных участков легче вовлекается в процесс обновления, чем упакованный в реакционных центрах. Это, однако, еще само по себе не означает, что и при формировании новых единиц фотосинтетического аппарата в условиях накопления пигментов образование антенны обязательно опережает образование реакционного центра. В таких условиях не исключена и обратная последовательность с первичным возникновением реакционного центра, но с большей стабилизацией его компонентов и потому более медленным обновлением. Эта возможность требует специального исследования. Вместе с тем, в пользу общего значения обнаруженной выше последовательности говорит ее соответствие картине зеленения этиолированных растений с возникновением длинноволновых форм хлорофилла после коротковолновых ⁽¹⁸⁾.

Таким образом, в настоящей работе двумя независимыми методами обнаружена метаболическая гетерогенность бактериохлорофилла. Свежееобразованные молекулы пигмента распределены неравномерно и отличаются

Таблица 2

Количество и удельная радиоактивность бактериохлорофилла пигментных комплексов из быстрой (I) и медленной (II) электрофоретических зон

№ опыта	I	II	I/II
1	0,95 6,4	0,30 2,6	3,2 2,3
2	0,39 7,2	0,14 5,0	2,8 1,4
3	0,17 17,0	0,16 6,9	1,0 2,5
4	0,58 12,8	0,26 4,9	2,2 2,6
5	0,56 15,0	0,27 6,4	2,1 2,3

Примечание. Над чертой — количество (мг в пробе), под чертой — у. а. (имп/мин·мгС)

локализацией в определенном пигментном комплексе и липофильностью окружения. Вероятно, дальнейшие испытания обнаружат ряд других особенностей. По-видимому, метод дифференциального экстрагирования обладает меньшей избирательностью, чем метод электрофореза комплексов и если, увеличив добавку полярного компонента к петролейному эфиру перевести в первый экстракт столько же пигмента, сколько выделяется первым комплексом, превышение его у.а. над остальным пигментом сни-

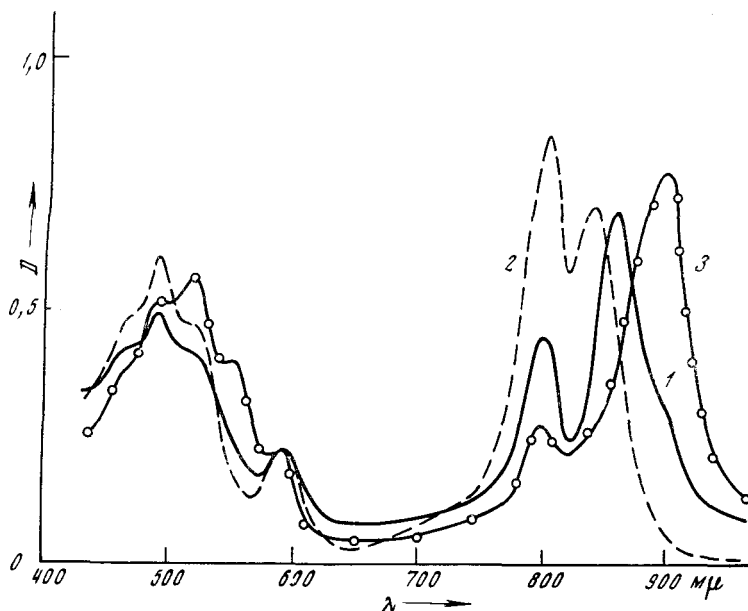


Рис. 1. Спектры поглощения хромофоров (1), а также комплексов из быстрой (2) и медленной (3) зон

зится. Вместе с тем, вполне вероятно, что и электрофоретические комплексы внутренне гетерогенны и могут быть подвергнуты дальнейшему фракционированию.

Настоящая работа выполнена благодаря очень ценной помощи Е. Н. Кондратьевой в получении и отработке условий культивирования *Chromatium* и Ю. Е. Ерохина и А. А. Москаленко в освоении методики фракционирования пигментных комплексов хромофоров, которым авторы выражают искреннюю благодарность.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
25 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Шлык, И. В. Прудникова, Вестн АН БССР, сер. биол. наук, № 4 129 (1961). ² А. А. Шлык, Г. Н. Николаева, ДАН, 143, 460 (1962). ³ А. А. Shlyk, G. N. Nikolaeva, In: La photosynthèse, Paris, 1963, p. 301. ⁴ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965. ⁵ А. А. Shlyk I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, 2, Tübingen, 1969 p. 572. ⁶ М. Е. Deroche, Physiol. Vég., 7, 335 (1969). ⁷ А. А. Шлык, С. А. Михайлова, ДАН, 177, 236 (1967). ⁸ Ю. Е. Ерохин, А. А. Москаленко, II Всесоюз. биохим. съезд. Тез., 19 секция. Проблемы фотосинтеза, Ташкент, 1969, стр. 29. ⁹ Е. Н. Кондратьева, Фотосинтезирующие бактерии, Изд. АН СССР, 1963. ¹⁰ И. И. Чернядьев, Е. Н. Кондратьева, Н. Г. Доман, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 670 (1969). ¹¹ A. Garcia, L. P. Vernon, H. H. Mollenhauer Biochemistry, 5, 2399 (1966). ¹² B. Ke, L. P. Vernon et al., Biochemistry, 7, 31 (1968). ¹³ J. P. Thornber, Biochemistry, 9, 2688 (1970). ¹⁴ D. V. Reed, R. K. Clayton, Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 471 (1968). ¹⁵ B. Ke, T. H. Chapeu, Biochim. et biophys. acta, 226, 341 (1971). ¹⁶ C. F. Matson, Anal. Biochem., 13 294 (1965). ¹⁷ Ю. Е. Ерохин, О. А. Синегуб, Молек. биол., 4, 401, 541 (1970). ¹⁸ А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177 (1952).