

УДК 581.174.1

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Ю. Г. МОЛОТКОВСКИЙ, В. С. ДЗЮБЕНКО

ИНГИБИРОВАНИЕ ВАЛИНОМИЦИНОМ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 9 IX 1971)

Антибиотик валиномицин широко применяется в исследованиях транспорта ионов в хлоропластах и митохондриях как агент, специфически повышающий проницаемость мембран для K^+ , в меньшей степени для Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ , но неэффективный для Na^+ , Li^+ . Предполагается, что валиномицин образует в мембранах канал транспорта K^+ по электрическому полю мембранного потенциала ⁽¹⁾. На свету через мембрану хлоропластов генерируется потенциал, минус которого расположен на внешней стороне ⁽²⁾, поэтому валиномицин при освещении ускоряет выделение из хлоропластов в среду K^+ и поглощение H^+ ⁽³⁾. По характеру своего действия валиномицин не может влиять на величину градиента pH (ΔpH) через мембрану хлоропластов, как основного энергопотенциала для последующего синтеза АТФ. Во всех проведенных до последнего времени исследованиях неизменно подчеркивалось, что валиномицин не оказывает заметного действия на фотофосфорилирование или оказывает незначительное разобщающее действие ^(3, 4).

Вместе с тем мы обнаружили, что валиномицин в концентрации 2—5 μ мол/л на 40-60% подавляет фотофосфорилирование у изолированных хлоропластов бобов и по способу своего действия может быть отнесен к эффективным ингибиторам переноса энергии. Когда наши исследования заканчивались, в печати появилась статья Кейстер и Минтон ⁽⁵⁾, в которой авторы пришли к такому же заключению, исследуя действие валиномицина на хлоропласты шпината, салата и хроматофоры *Rhodospirillum rubrum*.

Наши эксперименты были проведены на хлоропластах бобов. Методы выделения хлоропластов, определения фотофосфорилирования ⁽⁶⁾ и регистрации поглощения хлоропластами на свету протонов ⁽⁷⁾ описаны ранее. Состав инкубационных сред приведен в подписях к рисункам.

На рис. 1 показано изменение скорости фотофосфорилирования изолированных хлоропластов бобов на KCl-среде в зависимости от концентрации валиномицина. Относительно линейное подавление фосфорилирования происходит при увеличении концентрации антибиотика до 4,5 μ мол/л, после чего устанавливается плато на уровне 60% ингибирования. Выше 25 μ мол/л происходит дальнейшее подавление и при концентрации 45 μ мол/л фосфорилирование полностью останавливается. Кейстер и Минтон ⁽⁵⁾ обнаружили различия в чувствительности циклического и нециклического типов фосфорилирования к валиномицину. В их опытах валиномицин в концентрации 30 μ мол/л (предельная испробованная концентрация) подавлял в KCl-среде нециклическое фосфорилирование на 96%, а циклическое — на 69%. В хлоропластах бобов феназинметасульфат катализирует псевдоциклическое фосфорилирование ⁽⁷⁾, и, очевидно, этим объясняется полное подавление фосфорилирования при концентрации валиномицина выше 25 μ мол/л.

Согласно последним исследованиям, в хлоропластах основной, если не единственный, вклад в энергопотенциал, генерируемый на свету, вно-

сит электронейтральный градиент рН через мембрану (^{3, 8}). Диссипация Δ рН и соответствующее подавление фотофосфорилирования в хлоропластах достигается при воздействиях, облегчающих циклический обмен катион — протон через мембрану. — внесении нигерицина (⁹) либо валиномицина и 2,4-динитрофенола (⁹), когда повышается проницаемость мембран для катионов и протонов одновременно. Альтернативный путь подавления фотофосфорилирования может состоять в блокировании этапов сопряжения, что достигается при воздействии ингибиторов переноса энергии (¹).

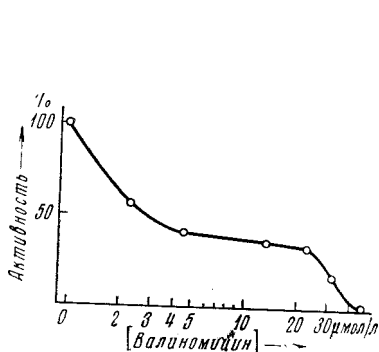


Рис. 1

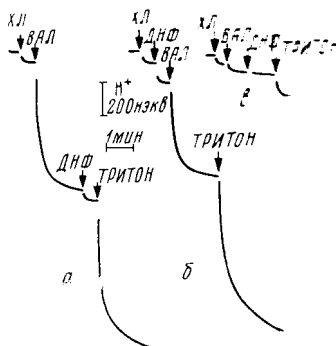


Рис. 2

Рис. 1. Влияние валиномицина на фотофосфорилирование хлоропластов бобов. Хлоропласты (23 μ г хлорофилла в мл) преинкубировали 3 мин. в темноте в среде, содержащей 100 мМ КСl, 100 мМ сахарозу и указанные концентрации валиномицина. Скорость фотофосфорилирования без валиномицина 240 μ мол АТФ на 1 мг хлорофилла в час

Рис. 2. Выделение в темноте H^+ хлоропластами в среду под действием валиномицина. Среда содержит 100 мМ КСl и 0,5 мМ трис-НСl, рН 7,8 (а, б) и рН 6,0 (в). Внесение хлоропластов (200 μ г хлорофилла), валиномицина 0,9 μ мол, 2,4-ДНФ 100 μ мол и детергента тритон X-100 0,03% указано стрелками

Установлено, что в определенных условиях валиномицин может индуцировать темновой $K^+ - H^+$ -обмен в хлоропластах (⁹). Действительно, нами было обнаружено, что добавление валиномицина в темноте к суспензии хлоропластов в КСl-среде при рН 7,8 вызывает подкисление среды в результате выделения H^+ (рис. 2, а, б). По существу никакого влияния на этот процесс не оказывало присутствие переносчика протонов 2,4-ДНФ. На NaCl-среде валиномицин не вызывал выделения H^+ из хлоропластов при том же значении рН. Возможны два варианта объяснения этого явления: валиномицин стимулирует $K^+ - H^+$ -обмен через мембрану либо обеспечивает понообменное связывание K^+ кислотными группами мембран. В пользу второго предположения свидетельствует эффект от добавления неионного детергента тритон X-100. В условиях, когда проницаемость мембран для K^+ и H^+ максимально повышена в результате обработки валиномицином и 2,4-ДНФ и весь трансмембранный обмен должен был совершиться, последующее добавление детергента вызывало дополнительный массивный пульс выделения H^+ в среду (рис. 2, а, б). Выделение H^+ в этом случае, очевидно, связано с разрыхлением мембран под действием детергента и освобождением кислотных групп, способных к ионообменному связыванию катионов. Это предположение подкрепляется и тем, что с понижением рН среды и переводом кислотных групп в недиссоциированное состояние снижается количество выделяемых в среду протонов при добавлении валиномицина и детергента (рис. 2, в). Следует отметить, что катионообменные свойства присущи мембранам самого различного типа и процессы ионообменного связывания моно- и двухвалентных катионов достаточно подробно исследованы в ряде работ (^{11, 12}).

То, что валиномицин не индуцирует циклический трансмембранный $K^+ - H^+$ -обмен на свету, подтверждается и результатами измерения параметров светозависимого протонного насоса в хлоропластах при различных концентрациях антибиотика. В широких пределах концентрации валиномицина не влияет на количество поглощаемых на свету хлоропластами протонов и на отношение скорости поглощения на свету к скорости выделения поглощенных протонов в темноте (V_n/V_v) (рис. 3). При тех же концентрациях валиномицина фотофосфорилирование подавляется на 60%.

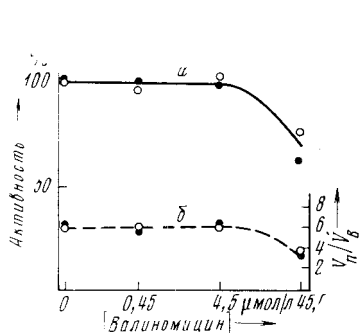


Рис. 3

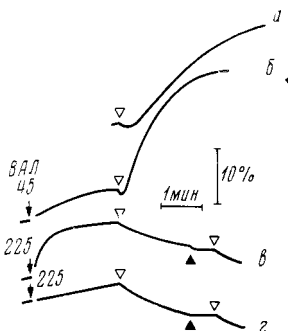


Рис. 4

Рис. 3. Влияние валиномицина на светозависимое поглощение H^+ хлоропластами. а — количество H^+ , поглощенного хлоропластами при освещении, б — V_n/V_v на KCl- (белые кружки) и NaCl- (черные кружки) средах. В отсутствие валиномицина хлоропласты поглощали 0,68 мэкв H^+ на 1 мг хлорофилла с первоначальной скоростью 7,7 мэкв H^+ на 1 мг хлорофилла в 1 мин.

Рис. 4. Влияние валиномицина на светондуцируемое набухание хлоропластов. Состав инкубационных сред: 100 мМ KCl (а, б, в) или NaCl (г), 5 мМ трис-HCl, pH 7,8, 0,02 мМ феназimetасульфат. Стрелки — добавление валиномицина до конечной концентрации в мкмоль/л, включение и выключение света. Кривые набухания представлены по изменению светопропускания суспензии хлоропластов при 546 мμ (T_{546}),

Лишь при концентрации, полностью подавляющей фосфорилирование (45 мкмоль/л), происходит уменьшение количества поглощаемых протонов, очевидно в результате повышения скорости пассивного выхода поглощенных протонов в среду, что сказывается на отношении V_n/V_v . Но эти изменения параметров протонного насоса не могут быть сопоставлены с полным подавлением фосфорилирования при тех же концентрациях валиномицина. Идентичные результаты получены на NaCl-среде (рис. 3), что подчеркивает отсутствие полной специфичности во влиянии высоких концентраций валиномицина на протонный насос.

Сопоставляя приведенные данные, можно заключить, что подавление валиномицином фотофосфорилирования не связано с диссипацией протонного градиента на свету. Индуцируемое валиномицином в темноте выделение H^+ хлоропластами на KCl-среде вызывается не трансмембранным обменом, а ионообменным связыванием ионов калия кислотными группировками мембран. Очевидно, что по способу своего влияния на фотофосфорилирование валиномицин может быть ингибитором переноса энергии, поскольку, не влияя на величину протонного градиента, блокирует возможность утилизации его химического потенциала на синтез АТФ. По существу валиномицин равноценен по эффективности своего действия таким ингибиторам переноса энергии, как синталин и препарат ДИО-9, которые в концентрации, подавляющей фосфорилирование, не оказывают действия на величину ΔpH (¹⁰). Очевидно, существует этап трансформации энергии, чувствительный к валиномицину, природа которого не зависит от формы первичного энергopotенциала, создаваемого на свету. Это подтверждается тем, что валиномицин аналогичным образом подавляет фотофосфо-

пилирование в хроматофорах *Rhodospirillum rubrum* ⁽⁵⁾, в которых, в отличие от хлоропластов, синтез АТФ на свету обеспечивается не электро-нейтральным протонным градиентом, а мембранным потенциалом ⁽¹⁾.

Возможно, что валиномицин оказывает влияние на фотофосфорилирование в результате аллостерического действия на специфические пункты мембран, ответственные за трансформацию энергии. Как аллостерические эффекторы рассматриваются и другие липофильные антибиотики, в частности антимицин А ⁽¹³⁾. В связи с этим предположением следует отметить особенности влияния валиномицина на процесс светоиндуцируемого набухания хлоропластов. Добавление валиномицина в низких концентрациях (45 нмол/л) к суспензии хлоропластов на КСl-среде в темноте вызывает ограниченное набухание (рис. 4, б). Включение света приводит к дальнейшему набуханию, скорость которого повышена по сравнению с контролем (рис. 4, а). Добавление валиномицина в более высоких концентрациях (225 нмол/л) вызывает равное по амплитуде темповое набухание, но последующее включение света приводит к необратимому медленному сокращению (рис. 4, в).

В специальных опытах было установлено, что максимальная проницаемость мембран хлоропластов для K^+ достигается при концентрации валиномицина в среде, равной 200 нмол/л (о степени проницаемости судили по диссипации ΔpH на свету валиномицином в присутствии 100 мкмол 2,4-ДНФ ⁽³⁾). Таким образом, подавление светоиндуцируемого набухания совпадает на концентрационной шкале валиномицина с максимальной проницаемостью для ионов калия. Но этим совпадением нельзя объяснить подавление светоиндуцируемого набухания по двум причинам: валиномицин в любой концентрации стимулирует выброс K^+ в среду при освещении ^(3, 14), тогда как подавление светоиндуцируемого набухания происходит лишь при концентрации 225 нмол/л и выше (более низкие концентрации стимулируют набухание на свету); валиномицин в той же концентрации подавляет светоиндуцируемое набухание на NaCl-среде (рис. 4 г). Полное отсутствие неспецифического действия валиномицина в этом случае показывает, что подавление светоиндуцируемого набухания не связано с транспортом ионов.

Подводя итог проведенным исследованиям, можно заключить, что действие валиномицина на мембраны хлоропластов отнюдь не ограничивается повышением проницаемости для K^+ , но включает неспецифические по отношению к катионам эффекты, возможно связанные с конформационными изменениями в мембранах. С повышением концентрации антибиотика в среде происходит подавление светоиндуцируемого набухания (0,225 мкмол/л), подавление фотофосфорилирования на 60% (4,5 мкмол/л), полное подавление фотофосфорилирования и частичное уменьшение градиента pH на свету (45 мкмол/л).

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
1 IX 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. B. Jackson, A. R. Crofts, *Europ. J. Biochem.*, **18**, 120 (1971). ² H. T. Witt, B. Rumberg, W. Junge, In: 19 Mosbach Colloquium, Berlin, 1968, p. 262. ³ S. J. D. Karlisch, N. Shavit, M. Avron, *Europ. J. Biochem.*, **9**, 291 (1969). ⁴ M. Avron, N. Shavit, *Biochim. et biophys. acta*, **109**, 317 (1965). ⁵ D. L. Keister, N. J. Minton, *J. Bioenergetics*, **1**, 367 (1970). ⁶ Ю. Г. Молотковский, В. С. Дзюбенко, *Физиол. раст.*, **17**, 280 (1970). ⁷ Ю. Г. Молотковский, В. С. Дзюбенко, *Молекул. биол.*, **4**, 383 (1970). ⁸ R. E. McCarty, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4292 (1969). ⁹ N. Shavit, R. A. Dille, A. San Pietro, *Biochemistry*, **7**, 2356 (1968). ¹⁰ C. D. Greville, In: *Current Topics in Bioenergetics*, **3**, 1969, p. 1. ¹¹ A. R. L. Gear, A. L. Lehninger, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3953 (1968). ¹² Ю. Д. Холодова, *Укр. биохим. журн.*, **43**, 149 (1971). ¹³ J. Bryla, Z. Kanjuga, E. C. Slater, *Biochim. et biophys. acta*, **189**, 317 (1969). ¹⁴ J. B. Jackson, A. R. Crofts, L.-V. von Stedingk, *Europ. J. Biochem.*, **6**, 41 (1968).