

М. И. МОЛЧАНОВ, В. С. ЧИГИРЕВ

К ИЗУЧЕНИЮ ФРАКЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ, ПРОЧНО СВЯЗАННЫХ С ЛАМЕЛЛЯРНЫМИ БЕЛКАМИ ПЛАСТИД

(Представлено академиком А. И. Опариным 28 VI 1971)

При изучении структурного белка внешних мембран митохондрий ⁽¹⁾ и липопротеидов ламеллярной фракции хлоропластов ⁽²⁾ в препаратах белков, тщательно очищенных от липидов, был обнаружен «остаточный» фосфор. По мнению исследователей, в первом случае он был не фосфолипидной природы (экстракция смесью хлороформа с метанолом не меняла его количества) ⁽¹⁾, во втором — фосфолипидной ⁽²⁾. Цель настоящей работы состояла в дальнейшем изучении свойств фосфолипидов, прочно связанных с ламеллярными белками пластид.

Объектом исследования служили дифференцирующиеся хлоропласты кукурузы сорта Элита. Условия экспонирования проростков в атмосфере C¹⁴O₂, выделение очищенных препаратов пластид и извлечение из них ламеллярных белков описаны ранее ⁽³⁻⁵⁾. Для получения белковой части ламеллярных белков их обрабатывали смесью хлороформ — метанол (2:1), добавляли 20% воды и центрифугировали при 3000g 10 мин. Белки образовывали плотный слой на границе раздела хлороформ — водный метанол. Экстракцию липидов повторяли, затем из белковой части липопротеидов (апобелок) выделяли прочно связанную с последними липидную фракцию. Для этого белковые препараты инкубировали в спиртовом растворе 0,01N КОН при 60° в течение 15 мин. К охлажденному раствору добавляли 6% HClO₄ до pH ~ 6. Нерастворимый KClO₄ и выпавший в осадок белок удаляли центрифугированием. Раствор упаривали в вакууме в роторном испарителе. Остаток экстрагировали последовательно хлороформом и 50% этанолом. Растворимые в 50% этаноле вещества количественно переносили на бумагу «Ватман» 3 мм (15 × 40 см) и подвергали электрофорезу в 2M уксусной кислоте при напряжении 700 в в течение 90 мин. И.-к. спектры снимали на приборе UR-10 в интервале 5000 — 400 см⁻¹. Исследуемые вещества запрессовывали в таблетки KBr. Пептиды гидролизovali 6N HCl при 105° в течение 24 час. Аминокислоты гидролизатов разделяли последовательно хроматографией на бумаге «Ватман» 3 мм в системе растворителей бутанол — уксусная кислота — вода (5:2:3) и электрофорезом в 0,2M NH₄OH (для разделения аргинина, лизина, гистидина, глутаминовой кислоты и треонина) или в 2M уксусной кислоте в течение 90 мин. при напряжении 700 в. Фосфор определяли по методу Герлаха и Дойтике ⁽⁶⁾, белок — по методу Лоури и др. ⁽⁷⁾. Радиоактивность измеряли на газопроточном счетчике СOT-30-БФЛ.

Анализ содержания фосфора, прочно связанного с белковым компонентом ламеллярных белков, показал, что количество фосфора в препаратах апобелков зависит от стадии дифференциации хлоропластов. В проростках, подвергнутых освещению в течение 1; 5; 24 и 144 час., содержание остаточного фосфора в препаратах составляло соответственно 11,6; 10,0; 7,9 и 5,3 мкг фосфора на 1 мг ламеллярного белка. В связи с тем, что в ламеллярной системе пластид были обнаружены РНК и рибосомы, связанные с тилакоидами ^(8, 9), прежде всего предстояло выяснить, не влияют ли эти компоненты внутренних мембран пластид на природу остаточного фосфора

апобелка липопротеидов. Для этого материал (от 11 до 23 мг белка) гидролизовали до нуклеотидов или оснований (¹⁰) и подвергали электрофорезу в 0,01M ацетатном буфере pH 3,8 в течение 120 мин. при напряжении 600 в. Положение метчиков нуклеотидов и оснований определяли по поглощению в ультрафиолете. Кроме того, электрофореграммы окрашивали на фосфор. Во всех случаях было выявлено несколько компонентов органических фосфорных соединений, имеющих значительно большую подвижность, чем нуклеотиды. Оснований и нуклеотидов не было обнаружено. Результаты получались иными, если исследуемые органические фосфорные соединения сравнивали в одинаковых условиях эксперимента с деацилированными производными фосфолипидов из липидной части липопротеидов. В этом случае вещества обнаруживали одинаковую электрофоретическую подвижность и имели близкий набор компонентов.

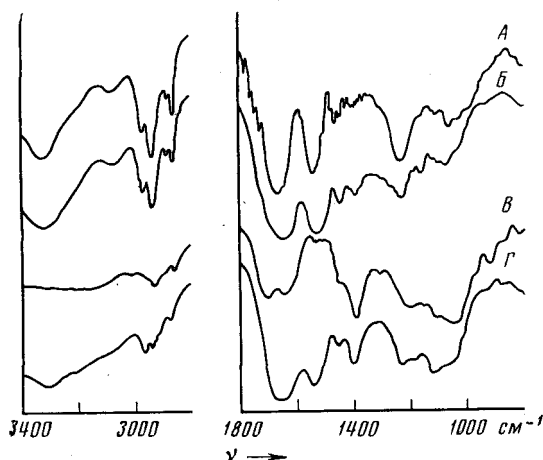


Рис. 1. И.-к. спектры различных компонентов апобелка липопротеидов из хлоропластов кукурузы. А — исходный препарат апобелка; Б — после гидролиза 0,1 M NH₄OH; В — деацилированные производные фосфолипидного компонента апобелка, очищенные от жирных кислот и пептидов; Г — пептидная часть фосфолипидного компонента апобелка

исходного препарата апобелка липопротеидов из хлоропластов, содержащего остаточный фосфор. О белковой природе вещества говорят частоты основных и комбинационных колебаний главной цепи валентной связи белков и полипептидов: 1250 и 1550 см⁻¹ (деформационное колебание NH и валентное колебание CN), 1650 см⁻¹ (валентное колебание CO). Вместе с тем спектр свидетельствует о наличии в препарате эфирных групп и фосфоглицериновой структуры: 1050—1062 см⁻¹ (P—O—C), 1250 см⁻¹ (P=O), 1145 и 1762 см⁻¹ (C=O сложных эфиров аминокислот и пептидов), 3300 см⁻¹ (OH). Кроме того, обращают на себя внимание колебания алифатических частей белков и жирных кислот: серия 1412—1465 и 1385 см⁻¹ (CH: CH₂; CH₃), 2862—2960 см⁻¹, а также симметричное и антисимметричное колебания COO⁻ и COOH: 1410, 1570 и 1720 см⁻¹. После обработки препарата апобелка в 0,1M NH₄OH при 37° в течение 15 мин.

после удаления аммиака и.-к. спектр вещества изменился мало (рис. 1Б); исчезли лишь колебания в зоне 1762 см⁻¹. По-видимому, в результате гидролиза были разрушены сложноэфирные связи жирных кислот и фосфолипидов, а также фосфолипидов и пептидов. Необходимо отметить, что после гидролиза апобелков в указанных выше условиях нам удавалось вы-

Таблица 1

Включение C¹⁴ (имп/мин) из C¹⁴O₂ в пептиды фосфолипидной фракции, прочно связанной с ламеллярными белками пластид в разные сроки инкубации

Продолж. освещения проростков, час.	Пептиды		Белковый компонент	
	5 мин.	45 мин.	5 мин.	45 мин.
1	8814	17041	4766	9055
5	3306	6775	3980	7305
24	2192	4138	5749	9065
144	990	2837	8285	14919

делить жирные кислоты как таковые и исследовать их и.к. спектры. Были получены характерные спектры жирных кислот: серия 2850—2960 см⁻¹, 1412—1465 и 1385 см⁻¹ (CH; CH₂; CH₃), 1186 см⁻¹, 1720 см⁻¹. После очистки электрофорезом фосфорсодержащей части препарата апобелка были получены спектры, представленные на рис. 1В. О фосфоглицериновой структуре вещества свидетельствуют колебания 1050—1070 см⁻¹ (P—O—C), 1145 и 1250 см⁻¹ (P=O). Де-

Таблица 2

Включение C¹⁴ в аминокислоты пептидов фосфолипидной фракции, прочно связанной с ламеллярными белками пластид в разные сроки инкубации (в процентах от суммарной радиоактивности C¹⁴-аминокислот в пробах)

Аминокислоты	5 мин.	45 мин.	Аминокислоты	5 мин.	45 мин.
Аргинин	20,4 4,5	3,4 4,2	Аланин	5,3 6,5	16,7 12,1
Лизин	5,3 6,6	2,7 3,7	Пролин	7,9 8,8	8,1 11,4
Гистидин	5,3 7,8	2,7 4,8	Тирозин	3,1 6,4	1,9 4,3
Аспарагиновая кислота	6,4 9,1	14,7 12,6	Валин	9,2 7,0	4,5 6,2
Серин	4,1 6,6	6,1 6,4	Метионин	4,8 7,4	3,8 4,4
Глицин	8,7 7,7	14,5 9,1	Фенилаланин	3,3 5,1	2,3 5,5
Глютаминовая кислота	5,4 6,2	6,5 7,8	Лейцины	2,5 4,0	1,6 1,9
Треонин	8,3 6,4	10,6 5,6			

Примечание. Числа над чертой — при освещении 1 час., под чертой — 24 часа.

свидетельствует об очистке деацилированных производных изучаемой фракции фосфолипидов от пептидов или аминокислот. Эти вещества, являясь составной частью изучаемой фракции фосфолипидов, при электрофорезе хорошо отделяются от деацилированных производных фосфолипидов. Их и.к. спектр приведен на рис. 1Г. В нем четко проявлены амидные колебания (1250, 1550, 1650 см⁻¹), но отсутствуют колебания P—O—C группировки (1050—1070 см⁻¹).

Наличие пептидов в изучаемой фракции фосфолипидов представляет для нас большой интерес в связи с их высокой метаболической активностью. При экспозиции проростков в атмосфере C¹⁴O₂ на всех изученных стадиях дифференциации хлоропластов в пептидах были сосредоточены значительные количества радиоактивных аминокислот (табл. 1). Оно было максимальным в хлоропластах со слабо развитой системой ламелл (1 час освещения), составляя около 65% от суммарной радиоактивности C¹⁴-аминокислот в препаратах апобелка, и снижалось по мере дифференциации хлоропластов. При этом возрастало содержание C¹⁴-аминокислот в белковых компонентах липопротеидов.

В процессе дифференциации хлоропластов аминокислотный состав пептидов заметно изменялся. С увеличением экспозиции проростков в атмосфере C¹⁴O₂ возрастало содержание тех аминокислот, которые образуются в хлоропластах при фотосинтезе. Это явление наблюдалось на всех изученных стадиях дифференциации хлоропластов. Типичные данные для некоторых из этих стадий представлены в табл. 2.

Таким образом, на различных стадиях дифференциации хлоропластов определенная часть фосфолипидов пластид прочно связана с белковым компонентом липопротеидных комплексов. В составе фосфолипидных фракций обнаружены пептиды, имеющие высокую метаболическую активность. Характер включения аминокислот в пептиды и их взаимоотношения с белковым компонентом липопротеидных комплексов пластид позволяют предполагать их важную роль как в биосинтезе, так и в структурной организации липопротеидов ламеллярной системы хлоропластов.

Авторы благодарят академика А. И. Опарина за интерес, проявленный к работе, и обсуждение ее результатов.

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

Поступило
18 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. H. Richardson, H. O. Hultin, S. Fleischer, Arch. Biochem. and Biophys., **105**, 254 (1964). ² Э. Н. Безингер, М. И. Молчанов, Н. М. Сисакян, ДАН, **159**, 446 (1964). ³ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер и др., Биохимия, **28**, 326 (1963). ⁴ В. С. Чигирев, М. И. Молчанов, Э. Н. Безингер, ДАН, **195**, 743 (1970). ⁵ М. И. Молчанов, ДАН, **199**, № 5 (1971). ⁶ E. Gerlach, B. Deuticke, Biochem. Zs., **337**, 477 (1963). ⁷ O. H. Lowry, N. J. Rosebrougn et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ⁸ Э. Н. Безингер, М. И. Молчанов, Н. М. Сисакян, ДАН, **166**, 738 (1966). ⁹ И. И. Филиппович, А. М. Тонгур и др., Биохимия, **35**, 247 (1970). ¹⁰ Y. N. Davidson, R. M. S. Smellie, Biochem. J., **52**, 599 (1952). ¹¹ В. С. Чигирев, В. И. Швец, Э. Н. Безингер, ДАН, **181**, 747 (1968).