

В. И. ГРИГОРОВИЧ, Н. И. ЗАХАРОВА, В. М. КУТЮРИН,
И. Н. АНИСИМОВА, М. П. САФОНОВА

МАРГАНЕЦ В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ ХЛОРОПЛАСТА

(Представлено академиком А. П. Виноградовым 3 II 1972)

Участие марганца в процессе выделения кислорода при фотосинтезе в настоящее время не вызывает сомнений⁽¹⁾, однако механизм его действия еще неизвестен. Считают, что марганец (в виде Mn^{2+} -иона) участвует в качестве кофактора, необходимого для осуществления определенной ферментативной реакции, связанной с выделением кислорода^(2, 3). Вместе с тем можно предположить, что марганец способствует созданию определенной конформации макромолекул для их унаковки в ламеллярную структуру хлоропласта, которая является одним из условий, необходимых для выделения кислорода фотосинтеза⁽⁴⁾.

Известно, что марганец в хлоропластах неоднороден^(2, 5). Большую часть его можно удалить из ламелл при разрушении хлоропластов (при помощи ультразвука, детергентов, экстракцией). Но нами было показано наличие прочносвязанного (не удаляющегося при диализе) марганца в мелких ламеллах хлоропластов (фракции 144 000 g).

В этой связи возник вопрос о возможности вхождения марганца в хлорофилл-белковые комплексы, которые можно рассматривать как дальнейший этап дробления ламелл хлоропластов и которые, по нашему мнению⁽⁶⁾, осуществляют окисление воды в процессе фотосинтеза. В пигмент-белковых комплексах, известных в литературе, присутствие марганца не было обнаружено^(7-9, 11).

Исследования проводили на хлоропластах гороха (сорт «Победитель»), который выращивали на среде Кнопа. В среду добавляли $Mn^{54}Cl_2$ (2,0—2,5 мС на 30 л питательного раствора).

Обычно удельная активность (у.а.) питательных растворов по марганцу была равна $0,1 \div 1,0 \cdot 10^6$ имп/мин·мг. Хлоропласты выделяли по известной методике⁽⁴⁾, хранили в сахарозо-фосфатном буфере при температуре сухого льда. Для опыта хлоропласты размораживали, отмывали водорастворимые белки хлоропластов один раз калий-фосфатным буфером 10^{-2} M, pH 7,1, содержавшим 10^{-3} мол/л ЭДТА, а затем дважды этим же буфером, но без ЭДТА.

К отмывтым хлоропластам добавляли 10% раствор тритона X-100 в 0,05 M трис-HCl-буфере pH 8,0 из расчета 10 мг детергента на 1 мг хлорофилла⁽⁹⁾. Смесь инкубировали в течение 1 часа при 4°, а затем центрифугировали 1 час при 144 000 g. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали для выделения пигмент-белковых комплексов.

Для этой цели был выбран метод электрофореза в полиакриламидном геле. Для удаления ионного Mn^{2+} и частично свободного хлорофилла тритоновый экстракт (надосадочная жидкость) перед электрофорезом пропускать через колонку с сефадексом Г-25. Электрофорез проводили в трубочках $d = 13$ мм, h столбика геля 50 мм, при температуре 4°. Концентрация акриламида 7,5%. При оптической плотности тритонового экстракта E_{670} 2,5—3,0 использование верхнего крупнопористого геля не является обязательным при условии нанесения на каждую трубочку

~ 0,3 мл раствора (500 мкг белка). При этом весь наносимый экстракт входил в гель, на старте не обнаруживали никаких белковых компонентов. Электрофорез проводился в течение 2,5—3 час. при приложении тока в 3 ма на трубочку.

Пигмент-белковые зоны вырезали и элюировали с геля 0,05 М трис-НСl-буфером рН 8,0, содержащим тритон X-100 (0,005%). В элюате определяли хлорофилл, марганец и белок. Хлорофилл определяли по Арнону⁽¹⁰⁾. Марганец в элюатах определяли аналогично описанному в⁽⁴⁾. Белок определяли по Лоури.

Полученные по описанной методике электрофореграммы пигмент-белковых комплексов представлены на рис. 1. На электрофореграмме видны 4 пигментные зоны, которые по порядку от финиша были названы 1, 2,3 и 4 зоной и все прокрашивались амидо-черным на белки. 2,3 зона — основная и состоит из двух узких полос (рис. 1).

В табл. 1 приведены характеристики отдельных пигмент-белковых зон по содержанию хлорофилла и марганца. Соотношение отдельных зон по содержанию белка носит следующий характер. 1:2,3:4=2:3,5:1. По содержанию хлорофилла эти зоны относятся между собой как 1,5:2:1. Таким образом, основным пигмент-белковым комплексом является 2,3 зона.

При недостаточно тщательной очистке до электрофореза Mn^{4+} обнаруживается в бесцветных и безбелковых зонах геля, приготовленного со сле-

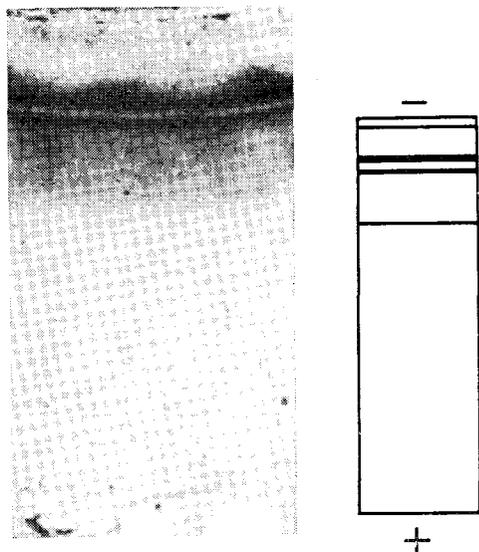


Рис. 1. Электрофореграмма и схема пигмент-белковых зон, 3,5 X. Зоны по порядку от финиша: 1; 2,3; 4. Видно, что 2,3 зона состоит из двух близко расположенных пигмент-белковых зон

Т а б л и ц а 1

Содержание марганца и хлорофилла в отдельных пигмент-белковых зонах

Фракция	Содержание на 1 мг белка		Хл (г-мол.) Mn (г-ат.)	Хл. а Хл. в
	Mn, (г-ат)·10 ⁹	Хл, (г-мол.)· ·10 ⁹		
Исходные хлоропласты	17,20	400	23	—
Тритоновый экстракт	4,72	48	10	1,74
Тритоновый экстракт после очистки на се- фадексе Г-25	0,43	12	100	2,45
1 зона	0,063	42	660	1,75
2,3 зона	0,28	72	260	3,49
4 зона	0,28	125	450	7,53

дами тритона X-100. Поэтому отсутствие марганца в таких зонах является критерием наличия марганца в пигмент-белковой зоне

Все зоны давали очень сходные спектры поглощения в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 8,0, содержавшем 0,25% тритона X-100 (рис. 2). По спектрам поглощения можно предположить сходство полученных комплексов, известных в литературе, по составу пигментов и по характеру их связи с белками⁽¹¹⁾.

Как видно из табл. 1, каждая зона содержала определенное количество марганца, которое, однако, не превышало порядка 10^{-9} г-ат. на 1 мг белка. Последующие исследования комплексов показали, что марганец, содержащийся в пигмент-белковых комплексах, достаточно прочно с ними связан. Так, он не обменивается с избытком нерадиоактивного $MnCl_2$ при pH 8,0 в 0,05 M трис-HCl-буфере, содержащем 1% тритон X-100 при температуре 15–16° в течение 48 час. Кроме того, марганец сохраняется в

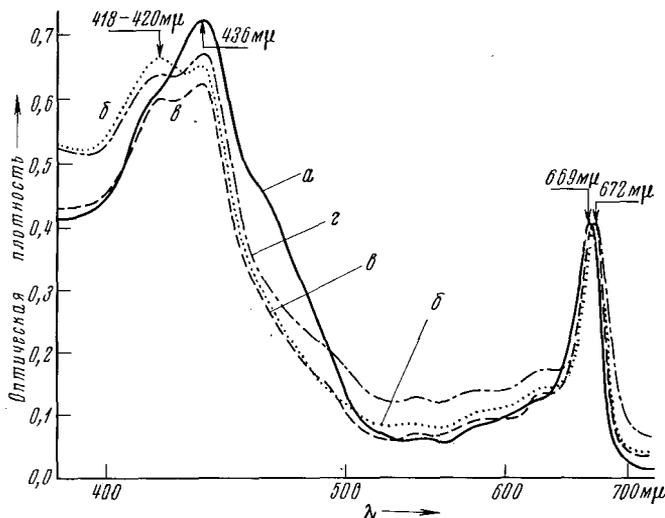


Рис. 2. Спектры исходной надосадочной жидкости (а) и отдельных пигмент-белковых комплексов в 0,05 M трис-HCl-буфере pH 8 с 0,25% тритона X-100. б — 1 зона, в — 2,3 зона, г — 4 зона

пигмент-белковых комплексах и при трехкратном высаливании комплексов сульфатом аммония 30% насыщения. Количество марганца в этом случае составляло $0,3 \cdot 10^{-9}$ г-ат. на 1 мг белка, а отношение X_{Mn} (г-мол.) / Mn (г-ат.) = 700. Интересно, что надосадочная жидкость после отделения осажденных пигмент-белковых комплексов содержала только ионный марганец, который удалялся путем диализа против фосфатного буфера 10^{-3} мол/л pH 7,1. Таким образом, марганец, находящийся в пигмент-белковых комплексах, не удаляется при диализе, электрофорезе и при осаждении сульфатом аммония.

Сопоставление количества марганца в мельчайших частицах хлоропластов (фракция 144 000 g), выделенных с помощью ультразвука (⁴), и в пигмент-белковых комплексах дало следующую картину. Если количество марганца в этих частицах после диализа составляло $3,1 \cdot 10^{-9}$ г-ат. на 1 мг белка, то в пигмент-белковых комплексах оно снизилось уже до $0,3 \cdot 10^{-9}$ г-ат. на 1 мг белка.

Полученные данные указывают на то, что большая часть марганца в ламеллах хлоропластов находится в слабосвязанном состоянии и при разного рода воздействиях на ламеллы хлоропластов (⁴), при нарушении нативного расположения компонентов фотосинтетического аппарата, а возможно, и их конформации этот марганец можно удалить в виде иона.

Однако небольшая доля Mn остается прочно связанной с пигмент-белковыми комплексами. Этот марганец может быть довольно прочно адсорбирован белковым компонентом пигментного комплекса.

Вместе с тем допустима и другая возможность, а именно, что в получаемых пигмент-белковых комплексах, по всей вероятности многокомпонентных, может находиться в очень небольших количествах какое-то сое-

линение, пока неизвестной природы, содержащее марганец. Вопрос о природе прочно связанного марганца в пигмент-белковых комплексах требует дальнейших исследований.

Поступило
17 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Кок, G. M. Cheniae, In: Current Topics in Bioenergetics, 1, N. Y., 1966, p. 1. ² J. V. Possingham, D. Spencer, Aust. J. Biol. Sci., 15, 58 (1962). ³ G. M. Cheniae, I. E. Martin, Biochim. et biophys. acta, 197, 219 (1970). ⁴ В. И. Григорович, Н. И. Захарова и др. Биофизика, 16, 260 (1971). ⁵ Н. И. Захарова, Ж. И. Немцова, В. М. Кутюрин, Физиол. раст., 14, 742 (1967). ⁶ В. М. Кутюрин, Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 569 (1970). ⁷ J. P. Thornber, R. P. P. Gregory et al., Biochemistry, 6, 391 (1967). ⁸ T. Ogawa, P. Obata, K. Shibata, Biochim. et biophys. acta, 112, 223 (1966). ⁹ J. S. Kahn, Biochim. et biophys. acta, 79, 234 (1964). ¹⁰ D. I. Arnon, Plant Physiology, 24, 1 (1949). ¹¹ J. Z. Bailey, W. Kreutz, In: Progress in Photosynthesis Research, 1, 1969, p. 149.