

М. И. МОЛЧАНОВ

**АМИНОАЦИЛФОСФАТИДИЛГЛИЦЕРИНЫ ХЛОРОПЛАСТОВ
КАК ДОНОРЫ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ
АМИНОАЦИЛ-тРНК И БИОСИНТЕЗА ЛАМЕЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ
ПЛАСТИД *IN VITRO***

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 III 1973)

Среди фосфолипидов мембран хлоропластов нами были обнаружены фосфатидо-аминокислотные соединения, которые могли служить источником аминокислот для биосинтеза ламеллярных белков хлоропластов *in vitro* ⁽¹⁾. Затем во фракции кислых фосфолипидов пластид найдены аминоксилфосфатидилглицерины. При этом было установлено, что в их образовании на всех стадиях дифференцировки хлоропластов принимают участие различные аминоксил-тРНК ⁽²⁾. В настоящей работе аминоксилфосфатидилглицерины изучались как доноры аминокислот для биосинтеза ламеллярных белков хлоропластов *in vitro* и образования аминоксил-тРНК.

Объектом исследования служили хлоропласты 3-дневных проростков фасоли сорта Сакса и дифференцирующиеся хлоропласты 5–6-дневных проростков кукурузы сорта Молдаванка оранжевая. Условия экспонирования проростков в атмосфере $C^{14}O_2$, выделения очищенных препаратов пластид и извлечения из них ламеллярных белков, фракционирования липидов пластид и выделения из них липоаминокислотных соединений, а также отделения аминокислот от фосфолипидной части липоаминокислотных соединений описаны ранее ^(2–6). Инкубацию хлоропластов с C^{14} -аминоксилфосфатидилглицеринами проводили в 0,06 M К-фосфатном буфере pH 7,8 с понами магния (10^{-2} M) при 20°. Источник радиоактивности вносили в инкубационную среду в 0,2 мл оливкового масла, освобожденного от фосфатидов. Контролем служили пробы нулевого времени. После инкубации в пробы вносили по 0,5 мл 10% HCl и центрифугировали их на холоду 3–5 мин. при 20 000 g. Слой оливкового масла удаляли из пробирок, и из хлоропластов выделяли ламеллярные белки. Условия промывания ламеллярных белков описаны в ⁽⁶⁾. Выделение фосфолипидной фракции, прочно связанной с ламеллярными белками пластид и обогащенной пептидами, а также разделение аминокислот электрофорезом и хроматографией на бумаге проводили по методу ⁽⁷⁾. Фосфор фосфолипидов определяли по методу ⁽⁸⁾, белок — по методу ⁽⁹⁾. Препараты тРНК из пекарских дрожжей выделяли по методу ⁽¹⁰⁾, «активирующих» ферментов — по методу ⁽¹¹⁾. Фракционирование тРНК на МАК-колонках проводили по методу ⁽¹²⁾. Выделение тРНК в этих опытах проводилось стандартными методами фенольной депротенинизации с детергентом (0,5% додецилсульфатом натрия). Радиоактивность в пробах определяли на газопоточном счетчике СОР-30-БФЛ.

В данной работе в качестве «доноров» аминокислот, связанных с фосфатидилглицеринами, были использованы C^{14} -аминоксилфосфатидилглицерины из сформированных хлоропластов. Они служили надежным источником аминокислот для синтеза ламеллярных белков хлоропластов *in vitro* по крайней мере в течение 20 мин. инкубации. К этому периоду времени в ламеллярных белках обнаруживалось около 30% C^{14} -аминокислот, внесенных в пробу в виде липоаминокислотных соединений. Внесенные в пробы C^{14} -аминоксилфосфатидилглицерины имели активность, равную со-

ответственно 1920 и 3840 имп/мин. Радиоактивность аминокислот, включенных в ламеллярные белки в этих опытах, составила соответственно 236 и 540 имп/мин на 1 мг белка. При этом C^{14} -аминокислота липоаминокислотного соединения не испытывала конкуренции со стороны избытка (2 μ моля) аналогичной холодной аминокислоты при их совместной инкубации с хлоропластами (244 и 556 имп/мин на 1 мг белка).

Отсутствие конкуренции между C^{14} -аминокислотой, связанной с фосфатидилглицерином, и избытком аналогичной, по немеченой аминокислоты,

Т а б л и ц а 1

Включение C^{14} -аминокислот C^{14} -аминоацилфосфатидилглицеринов в различные компоненты липопротеидных комплексов хлоропластов, имп/мин на 1 мг фосфора фосфолипидов или белка

Фракция	Время инкубации, мин.		
	1	15	30
Дифосфатидилглицерин, фосфатидная кислота	151 177	201 143	220 000
Фосфатидилглицерин	55 714	158 113	165 262
Фосфатидопептиды	46 602	241 836	298 846
Белок	140	643	778

по-видимому, подтверждает предположение о том, что миграция аминокислот, связанных с фосфатидилглицеринами, и их использование в хлоропластах происходит в пределах мембранной системы последних. При этом по крайней мере процесс отщепления аминокислоты от фосфолипидного компонента протекает в связи с липидной фазой системы и находится под строгим контролем самой мембраны.

Принципиальный интерес представляет тот факт, что зависимый от фосфолипидов транспорт аминокислот во внутренних мембранах хлоропластов осуществляется системой липидных компонентов мембран, составными частями которой являются кислые фосфолипиды, а также фракция так называемых фосфатидопептидов (табл. 1). В этих опытах активность C^{14} -аминоацилфосфатидилглицеринов, добавленных в пробы, составила 21 840 имп/мин. Проба содержала 57 μ г фосфора фосфолипидов. Интенсивность включения аминокислот во фракцию фосфатидопептидов, большая чувствительность процесса к пурамицину, а также сравнительная прочность связи фосфатидопептидов с белковым компонентом липопротеидных комплексов пластид позволили высказать предположение о их важной роли как в биосинтезе, так и в структурной организации липопротеидов ламеллярной системы хлоропластов (⁷, ¹³). Не исключена возможность, что именно фракцией фосфатидопептидов представлены те компоненты мембранной системы хлоропластов, синтез которых находится в прямой зависимости от ее белоксинтезирующего аппарата.

C^{14} -аминоацилфосфатидилглицерины могут передавать аминокислоту на тРНК в присутствии энзиматической системы из хлоропластов или из печени крысы. Ферментативная система из печени крысы была выбрана не случайно, так как именно на животных клетках неоднократно изучались различные вопросы активного переноса аминокислот через мембраны с участием в этих процессах фосфатидоаминокислотных соединений (¹⁴). В опыте 1 в 1,2 мл пробы содержались хлоропласты (2,8 мг ламеллярного белка) в 0,05 *M* трис-НСl-буфере рН 7,8 с Mg^{2+} (10^{-2} *M*), 0,5 μ моля АТФ, C^{14} -аминоацилфосфатидилглицерины в 0,2 мл оливкового масла, 300 μ г тРНК. Чтобы максимально снизить интенсивность распада образующейся в системе C^{14} -аминоацил-тРНК, в пробы вносили за 20 мин. до начала инкубации по 200 μ г хлорамфеникола. В опытах 2 и 3 реакцию проводили в 0,05 *M* трис-НСl-буфере рН 7,6 с $MgCl_2$ (10^{-2} *M*) и KCl (10^{-2} *M*). 1 мл среды содержал 0,5 μ моля АТФ, 100 μ г тРНК, C^{14} -аминоацилфосфатидил-

глицерина в 0,5 мл оливкового масла и 0,2 мл фракции активирующих ферментов печени крысы (0,5 мг белка). В опыте 1 инкубацию проводили при 20°, в опытах 2 и 3 — при 37°. В опытах 1 и 2 C¹⁴-аминоацилфосфатидилглицерина выделяли из проростков, экспонированных в атмосфере C¹⁴O₂, в опыте 2 и 3 — из проростков, инкубированных *in vivo* с аминокислотами гидролизата C¹⁴-белка. Активность C¹⁴-аминоацилфосфатидилглицеринов, добавленных в пробы, составила в опыте 1 21 189 имп/мин, в опыте 2 11 000 и в опыте 3 6040 имп/мин. Содержание фосфора фосфолипидов составило в опыте 1 42 мкг, в опыте 2 14 и в опыте 3 15 мкг. В опытах 2 и 3 одновременно с C¹⁴ в пробы добавляли 30-кратные количества аналогичных немеченых аминокислот.

Включение C¹⁴-аминокислот C¹⁴-аминоацилфосфатидилглицеринов в аминоацил-тРНК в опыте 1 составило 10 633, в опыте 2 3580 и в опыте 3 2560 имп/мин на 1 мг РНК. В условиях приведенных опытов происходило нормальное образование C¹⁴-аминоацил-тРНК. Более того, C¹⁴-аминокислота липоаминокислотного соединения вступала в реакцию с тРНК более эффективно, чем та же аминокислота, но отщепленная предварительно от липидного компонента (соответственно 10 633 и 6466 имп/мин на 1 мг РНК). Тот факт, что избыток свободных аминокислот не повлиял в указанных условиях опыта на передачу аминокислоты из липидной фазы на тРНК (величины включения C¹⁴ в этом случае составили 3370 и 2760 имп/мин на 1 мг РНК), заставляет нас обратить внимание на роль липидной фазы в реакциях аминоацилирования тРНК. При этом следует напомнить, что ранее была показана четкая зависимость между состоянием липидной части ферментов, активирующих аминокислоты, и их способностью осуществлять реакцию аминоацилирования тРНК^(15, 16).

Продукт реакции, образованный в обоих вариантах опыта 1, пропускали через МАК-колонки. После элюции нуклеиновых кислот с колонок различными концентрациями NaCl (от 0,3 *M* до 0,7 *M*) были получены величины удельной радиоактивности, равные 8369 и 5331 имп/мин на 1 мг РНК, т. е. в описанных условиях эксперимента действительно происходило образование аминоацил-тРНК.

Таким образом, аминоацилфосфатидилглицерина, по-видимому, представляют собой транспортную форму или подвижный фонд аминокислот, локализованных в пределах ламеллярной системы хлоропластов. Способность этих соединений передавать свою аминокислоту на тРНК, а также то, что в их собственном синтезе существенную роль играют аминоацил-тРНК⁽²⁾, позволяя предполагать, что функция аминоацилфосфатидилглицеринов в хлоропластах высших растений тесно связана с деятельностью белоксинтезирующей системы, ассоциированной с мембранной системой хлоропластов.

Автор благодарит академика А. И. Опарина за интерес, проявленный к работе, и обсуждение ее результатов.

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

Поступило
13 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. И. Молчанов, Э. Н. Безингер, Н. М. Сисакян, ДАН, 159, 202 (1964).
² М. И. Молчанов, Биохимия, 37, 775 (1972). ³ Э. Н. Безингер, В. С. Чигирев, Н. М. Сисакян, ДАН, 158, 1424 (1964). ⁴ М. И. Молчанов, ДАН, 199, 1196 (1971). ⁵ В. С. Чигирев, М. И. Молчанов, Э. Н. Безингер, ДАН, 195, 743 (1970). ⁶ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер и др., Биохимия, 28, 326 (1963).
⁷ М. И. Молчанов, В. С. Чигирев, ДАН, 204, 205 (1972). ⁸ E. Gerlach, V. Deuticke, Biochem. Zs., 337, 477 (1963). ⁹ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ¹⁰ Л. Ю. Фролова, Л. Л. Киселев, Биохимия, 28, 723 (1963). ¹¹ В. А. Гвоздев, Биохимия, 24, 920 (1960). ¹² N. Sueoka, T. Y. Cheng, J. Mol. Biol., 4, 161 (1962). ¹³ Э. Н. Безингер, М. И. Молчанов, Н. М. Сисакян, ДАН, 159, 446 (1964). ¹⁴ E. Tria, O. Barnabei, Bull. chim. farm., 104, 551 (1965); Protoplasma, 63, 30 (1967). ¹⁵ J. Hradec, J. Kruml, Nature, 185, 55 (1960). ¹⁶ J. Hradec, Biochim. et biophys. acta, 47, 149 (1961); Nature, 207, 982 (1965).