

М. И. МОЛЧАНОВ, В. М. ТРУСОВА, академик А. И. ОПАРИН

### АМИНОАЦИЛФОСФАТИДИЛГЛИЦЕРИНЫ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ ХЛОРОПЛАСТОВ

В препаратах ламеллярной системы, выделенных из хлоропластов различных растений, доля фосфолипидов невелика. Если сумму липидов и пигментов в пластидах принять за 100%, то содержание фосфолипидов в хлоропластах кукурузы составит 6,2%, а в пропластидах 7,9% (1). Аминоацилфосфатидилглицерины, которые являются наименее изученными веществами фосфолипидной фракции пластид, сосредоточены во фракции фосфатидилглицерина — основного компонента тилакоидов хлоропластов. Аминокислоты, связанные с фосфатидилглицеринами на разных стадиях формирования ламеллярной системы хлоропластов, изучались нами ранее как составная часть липидной фракции липопротеидов (2, 3). Так как в аминоацилфосфатидилглицеринах связь аминокислоты с молекулой фосфатидилглицерина является лабильной, предстояло изучить эти соединения после их выделения в более мягких условиях, т. е. непосредственно из препаратов мембранной системы пластид, минуя стадию извлечения липопротеидов.

В опыте использовали 5—6-дневные проростки кукурузы сорта Молдаванка оранжевая. Пластиды различных стадий зеленения выделяли по методу (4) из первично этнолированных растений, которые освещали лампами ЛДЦ-30 (4500 лк) в течение 1, 5, 24 и 144 час. при 12-часовом фотопериоде. При экспозиции в атмосфере 0,15% <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> их освещали лампами накаливания (4500 лк). Для получения препаратов мембран пластида разрушали осмотически в 0,02 M трис-HCl буфере pH 7,6 с 0,01 M MgCl<sub>2</sub>. Гомогенат однократно замораживали в жидком азоте и оттаивали, а затем встряхивали 30 мин. при 2°. Суспензию освобождали от неразрушенных структур двухкратным центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. Мембранные фракции осаждали из надосадочной жидкости центрифугированием при 40 000 g в течение 1 часа на центрифуге ЦВР-1. Для анализа фосфолипидов фракции мембран дважды экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1), экстракт центрифугировали, промывали водой и вновь центрифугировали (5), хлороформный слой упаривали в вакууме. Фосфолипиды отделяли от пигментов, нейтральных липидов, жирных кислот и гликолипидов на колонке с кремневой кислотой по методу (6) в модификации (7). Разделение фосфолипидов проводили с помощью одномерной хроматографии в тонком слое на пластинках с силикагелем (Kieselgel G по Шталью, фирма Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода (65:25:4). Аминокислотные эфиры фосфатидилглицерина обнаружили нингидрином. Аминокислоты отделяли от фосфатидилглицерина щелочным гидролизом в 0,1 N КОН при 37° в течение 15 мин. и освобождали их от продуктов гидролиза на колонках Дауэкс 50 H<sup>+</sup>. Методы разделения аминокислот и получения очищенных ламеллярных белков описаны ранее (8). <sup>14</sup>C-аминокислоты фракции аминоацилфосфатидилглицеринов объединяли в группы гидрофильных, неполярных и малых аминокислот по Хетчу и Брусу (9). Радиоактивность образцов измеряли на газопотоочном счетчике СОР-30-БФЛ.

Данные о наиболее характерных аминокислотах, связанных с фосфатидилглицеринами пластид на разных стадиях их дифференцировки, были

Таблица 1

Удельная радиоактивность  $^{14}\text{C}$ -аминокислот, связанных с фосфатидилглицеринами, и ламеллярного белка в дифференцирующихся хлоропластах кукурузы (при разном времени инкубации)

| Продолжительность освещения проростков, час. | Аминоацилфосфатидилглицерина ( $10^3$ имп/мин на 1 мг фосфора фосфолипидов) |         | Ламеллярный белок (имп/мин на 1 мг белка) |         |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------|---------|
|                                              | 5 мин.                                                                      | 45 мин. | 5 мин.                                    | 45 мин. |
| 1                                            | 634                                                                         | 759     | 15 866                                    | 36 212  |
| 5                                            | 1125                                                                        | 1756    | 18 091                                    | 48 700  |
| 24                                           | 1521                                                                        | 3276    | 22 996                                    | 75 542  |
| 144                                          | 2964                                                                        | 4685    | 41 425                                    | 99 460  |

представлены нами ранее ( $^2, ^3$ ). Речь шла об идентификации таких аминокислот, как аспарагиновая и глютаминовая кислоты, глицин, серин и аланин. Остальные аминокислоты были идентифицированы в настоящей работе. Это — лизин, аргинин, гистидин, тирозин, треонин, пролин, валин, метионин, лейцин и фенилаланин. Необходимо отметить, что те же аминокислоты обнаружены нами во фракции фосфатидилглицеринов из фрагментов хлоропластов зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa*.

В опытах по биосинтезу аминоацилфосфатидилглицеринов в пластидах *in vivo* были обнаружены все перечисленные выше аминокислоты. Биосинтез аминоацилфосфатидилглицеринов в пластидах усиливался по мере формирования ламеллярной системы хлоропластов под воздействием света, протекал наиболее интенсивно в проростках, пластиды которых содержали сформированную или завершающую формирование (24 часа освещения) систему гран и коррелировал с биосинтезом ламеллярных белков пластид на всех изученных стадиях дифференциации хлоропластов (табл. 1).

В процессе дифференциации хлоропластов во фракции аминоацилфосфатидилглицеринов отчетливо снижалось содержание неполярных аминокислот (табл. 2). Это наблюдалось как через 5 мин., так и через 45 мин. экспозиции проростков в атмосфере  $^{14}\text{CO}_2$ . Изменения в группе гидрофильных аминокислот были не так заметны, как это имело место в группе гидрофобных аминокислот. Однако в пределах самой группы полярных аминокислот по мере дифференциации хлоропластов уменьшалось содержание основных аминокислот и увеличивалось содержание аспарагиновой и глютаминовой кислот, серина и треонина. Особенно четко это проявлялось через 5 мин. инкубации. На всех этапах дифференциации хлоропластов во фракции аминоацилфосфатидилглицеринов увеличивалось содержание глицина и аланина, а также пролина.

Результаты, приведенные в этой работе, согласуются с данными, полученными нами ранее ( $^2, ^3$ ). Изучение аминокислот, связанных с фосфатидилглицеринами на разных этапах дифференциации хлоропластов, показало, что при формировании ламеллярной системы пластид в мембранах увеличивается доля аминоацилфосфатидилглицеринов, содержащих в своем составе «ключевые» аминокислоты фотосинтеза. Очевидно, что аминоацилфосфатидилглицерины высших растений по составу аминокислот отличаются от *O*-эфиров аминокислот и фосфатидилглицерина, найденных в ряде бактерий. В последних доминирует, как правило, одна или две аминокислоты ( $^{10-12}$ ). Является ли набор аминокислот в липоаминокислотных соединениях пластид особенностью, присущей лишь фотосинтезирующим организмам, или же усложнение мембранного аппарата эука-

Таблица 2

Радиоактивность  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в аминокцилфосфатидилглицеринах дифференцирующихся хлоропластов (% от суммарной радиоактивности  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в пробах)

| Аминокислоты       | Время экспозиции проростков в атмосфере $^{14}\text{CO}_2$      |      |      |      |         |      |      |      |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|---------|------|------|------|
|                    | 5 мин.                                                          |      |      |      | 45 мин. |      |      |      |
|                    | время предварительного освещения этиолированных проростков, час |      |      |      |         |      |      |      |
|                    | 1                                                               | 5    | 24   | 144  | 1       | 5    | 24   | 144  |
| Гидрофильные       |                                                                 |      |      |      |         |      |      |      |
| сумма              | 47,7                                                            | 51,6 | 52,3 | 52,7 | 44,2    | 43,6 | 43,4 | 42,8 |
| серин              | 5,2                                                             | 8,7  | 8,9  | 10,7 | 4,6     | 4,5  | 5,7  | 6,3  |
| треонин            | 6,5                                                             | 7,2  | 8,1  | 8,3  | 6,0     | 6,8  | 7,6  | 7,9  |
| аспарагиновая к-та | 8,3                                                             | 10,5 | 12,5 | 10,3 | 7,0     | 7,6  | 7,8  | 8,1  |
| глутаминовая к-та  | 6,3                                                             | 8,7  | 9,2  | 10,8 | 5,4     | 5,2  | 5,8  | 6,0  |
| аргинин            | 8,6                                                             | 6,0  | 4,8  | 4,6  | 7,6     | 6,4  | 5,7  | 4,4  |
| лизин              | 8,2                                                             | 5,1  | 4,6  | 4,0  | 6,2     | 6,1  | 5,7  | 5,8  |
| гистидин           | 4,6                                                             | 4,4  | 4,2  | 4,0  | 7,4     | 7,0  | 5,1  | 4,3  |
| Нешолярные         |                                                                 |      |      |      |         |      |      |      |
| сумма              | 25,1                                                            | 22,2 | 18,6 | 14,0 | 24,5    | 23,6 | 18,0 | 17,4 |
| валин              | 8,3                                                             | 7,5  | 6,1  | 4,7  | 7,4     | 7,6  | 6,0  | 5,9  |
| метионин           | 5,2                                                             | 4,9  | 3,7  | 2,9  | 5,2     | 5,0  | 3,1  | 2,8  |
| фенилаланин        | 4,3                                                             | 4,3  | 4,0  | 2,6  | 5,4     | 5,1  | 3,9  | 3,6  |
| лейцин             | 7,3                                                             | 5,5  | 4,8  | 3,8  | 6,5     | 5,9  | 5,0  | 5,1  |
| Малые              |                                                                 |      |      |      |         |      |      |      |
| глицин             | 7,9                                                             | 8,9  | 9,4  | 10,3 | 9,2     | 11,3 | 15,2 | 16,0 |
| аланин             | 4,5                                                             | 5,5  | 6,0  | 7,3  | 8,5     | 8,7  | 9,6  | 10,2 |
| Прочие             |                                                                 |      |      |      |         |      |      |      |
| пролин             | 6,3                                                             | 6,8  | 8,5  | 9,2  | 5,5     | 6,2  | 7,3  | 7,6  |
| тирозин            | 8,5                                                             | 6,0  | 5,2  | 6,5  | 8,1     | 6,6  | 6,5  | 6,0  |

риотической клетки в процессе эволюции привело к появлению липоаминокислотных соединений с разнообразным набором аминокислот, покажут дальнейшие исследования. Необходимо лишь отметить, что в мембранах животной клетки, которые, как и внутренние мембраны хлоропластов, отличаются сложностью своей структурной организации, в составе фосфатидааминокислотных соединений встречаются самые различные аминокислоты (<sup>13</sup>, <sup>14</sup>).

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

Поступило  
5 XI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> K. Lürssen, Zs. Naturforsch., B. 25, 1113 (1970). <sup>2</sup> М. И. Молчанов, ДАН, т. 199, 1196 (1972). <sup>3</sup> М. И. Молчанов, Биохимия, т. 37, 775 (1972). <sup>4</sup> А. В. Jacobson, J. Cell Biol., v. 38, 233 (1968). <sup>5</sup> E. G. Bligh, W. J. Dyer, Canad. J. Biochem. and Physiol., v. 37, 911 (1959). <sup>6</sup> M. L. Vorbeck, G. V. Marinetti, J. Lipid Res., v. 6, 3 (1965). <sup>7</sup> O. Renkonen, K. Bloch, J. Biol. Chem., v. 224, 4899 (1969). <sup>8</sup> М. И. Молчанов, В. С. Чигурев, ДАН, т. 204, 1485 (1972). <sup>9</sup> F. Hatch, A. Bruce, Nature, v. 218, 1166 (1968). <sup>10</sup> M. Macfarlane, Nature, v. 196, 136 (1962). <sup>11</sup> М. Ikawa, J. Bacteriol., v. 85, 733 (1963). <sup>12</sup> F. Kocur, Biochim. et biophys. acta, v. 202, 277 (1970). <sup>13</sup> E. Tria, O. Barnabei, Protoplasma, v. 63, 30 (1967). <sup>14</sup> R. Prasad, N. K. Garg, C. R. Krishna Murti, Indian J. Biochem., v. 9, 185 (1972).