

И. И. ЧЕРНЯДЬЕВ, И. В. ТЕРЕХОВА, Ю. М. КОМАРОВА,
Н. Г. ДОМАН, О. И. ГОРОНКОВА, О. Н. АЛЬБИЦКАЯ

ОБ УЧАСТИИ КАРБОАНГИДРАЗЫ В ФОТОСИНТЕЗЕ

(Представлено академиком А. И. Опарным 28 III 1975)

Известно, что углекислый газ в процессе фотосинтеза поступает в листья почти с такой же скоростью, с какой он поглощается поверхностью крепкого раствора щелочи ⁽¹⁾. Не вызывает сомнений и то, что углекислота в фотосинтезирующей ткани может присутствовать в различных формах, связанных с ее свободным превращением в водных растворах по уравнению



Однако некатализируемая реакция по этому уравнению протекает в сотни раз медленнее, чем фактическое поглощение CO_2 при фотосинтезе ⁽²⁾. Естественно, что возникли предположения о причастности к указанным превращениям биологического катализатора — фермента карбоангидразы (карбонат-гидролазы, КФ 4.2.1.1).

Этот фермент (или ферментная система) был обнаружен в листьях высших растений ⁽³⁻⁷⁾, причем его присутствие было отмечено как в хлоропластах, так и в цитоплазме.

Но несмотря на целый ряд данных, свидетельствующих в пользу участия карбоангидразы в процессе фотосинтеза, прямых доказательств этого получено не было, и вопрос о ее физиологической роли в фотосинтезирующих организмах оставался невыясненным.

В самые последние годы проведены углубленные исследования карбоангидразы главным образом у высших растений ⁽⁸⁻¹¹⁾.

Объектом настоящей работы были сине-зеленые водоросли *Spirulina platensis* Gom. (Geither), требующие для своего роста и развития щелочных условий среды (рН 9,0–9,5). При таких условиях основная часть углекислоты в питательной среде присутствует в виде HCO_3^- , а концентрация CO_2 невелика. Но, как показали исследования ⁽¹²⁾, субстратом рибулозодифосфаткарбоксилазы — ключевого фермента восстановительного пентозофосфатного цикла, реакции которого обнаружены у спироулины ⁽¹³⁾, служит лишь одна форма углекислоты, а именно CO_2 . Из этого ясно, что для получения наиболее четкого ответа на вопрос об участии карбоангидразы в фотосинтезе необходимо использовать в экспериментах различные формы углекислоты. При этом необходимо отметить, что для экспериментов такого рода, пожалуй, наиболее подходящим объектом являются фотосинтезирующие микроорганизмы, однако именно у них, за исключением некоторых зеленых водорослей, карбоангидразу совершенно не исследовали. В связи с этим исследование карбоангидразы у спироулины в указанном плане представляет особый интерес.

Культивирование спироулины проводили накопительным методом при освещенности около 8000 лк и температуре около 30°. Использовали клетки в экспоненциальной фазе роста. Экспонирование с меченой углекислотой $^{14}\text{CO}_2$ производили на фильтрах в камере, плавающей над ртутью при стандартных условиях экспозиции (концентрация $^{14}\text{CO}_2$ 0,1%, освещенность 8000 лк, температура около 20°), а экспонирование с меченым бикарбонатом $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ — в жидкой фазе. Получение бесклеточных препаратов про-

водили, как описано ранее (¹³), но с использованием 0,05 *М* медиал-веронального буфера. Активность рибулозодифосфаткарбоксилазы (РиДФ-карбоксилазы) определяли радиометрическим методом (¹³, ¹⁴). Активность карбоангидразы — электрометрически (¹⁵), регистрируя сдвиг рН в процессе реакции гидратации СО₂. Эту реакцию проводили в термостатированной ячейке при температуре 2°. Контролем служила реакционная смесь с предварительно прокипяченным экстрактом клеток. Реакцию начинали введением насыщенного при 0° и давлении 1 атм раствора углекислоты. Вводи-

Таблица 1

Влияние «Диамокса» на ассимиляцию углекислоты у спироулины

Процесс	Форма углерода	Экспозиция, сек.	Действие «Диамокса» (среднее, % к контролю)	
			уменьшение	увеличение
Фотосинтез у целых клеток	¹⁴ СО ₂	10	—	240,9
		60	—	116,6
	Н ¹⁴ СО ₃ —	10	31,1	—
		60	77,7	—
Поглощение углекислоты экстрактом с участием РиДФ-карбоксилазы	¹⁴ СО ₂	10	—	273,7
		60	1,1	—
	Н ¹⁴ СО ₃ —	10	68,4	—
		60	72,4	—

мое количество СО₂ составляло 4 мкмоль. Активность карбоангидразы при этой концентрации субстрата рассчитывали по разности скоростей ферментативной и неферментативной реакции. Для ингибирования карбоангидразы был использован «Диамокс» (5-ацетамид-1,3,4-тиодиазол-2-сульфонамид) — специфический ингибитор этого фермента (⁸). Время предынкубации составляло для целых клеток 20, для бесклеточного препарата 15 мин.

Как показали результаты опытов, полное ингибирование карбоангидразы наблюдалось при концентрации «Диамокса» в бесклеточных препаратах 0,1 *мМ* (в этом случае 50-процентное ингибирование достигалось 3 *мМ* препаратом). Интересно, что в бесклеточных препаратах из клеток спироулины, инкубированных ранее в течение 20 мин. с 5 *мМ* «Диамоксом», активность карбоангидразы оказалась ингибированной на 80%, что говорит о стойком и длительном его действии.

Результаты влияния «Диамокса» на ассимиляцию различных форм углерода, полученные при полном ингибировании карбоангидразы, представлены в табл. 1. Из табл. 1 отчетливо видно, что при ассимиляции иона бикарбоната целыми клетками спироулины ингибирование карбоангидразы ведет к значительному уменьшению скорости фотосинтеза. То же при использовании иона бикарбоната наблюдается и в отношении бесклеточного экстракта, в котором скорость карбоксилирования РиДФ уменьшается на 70%.

Наоборот, при применении двуокиси углерода ингибирование карбоангидразы не только не ведет к уменьшению скорости фотосинтеза у целых клеток или фиксации ¹⁴СО₂ на РиДФ в бесклеточном препарате, но в начальный период времени вызывает весьма значительное увеличение этих показателей (10-секундные экспозиции). Указанный эффект можно объяснить тем, что, поскольку реакционной формой карбоксилирования является двуокись углерода, выключение «Диамоксом» карбоангидразы, осуществляющей в этих условиях перевод ¹⁴СО₂ в форму бикарбонатного иона, способствует повышению концентрации реагирующей двуокиси углерода и соответствующему ускорению реакции. С течением времени наступает равновесие неферментативной обратимой реакции гидратации СО₂ и указанный эффект быстро снижается (60-секундные экспозиции).

Полученные данные являются прямым доказательством участия карбоангидразы в фотосинтезе и указывают на ее весьма важную роль в этом процессе.

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

Поступило
28 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. П. Костычев, Физиология растений, 1937. ² G. O. Burr, Proc. Roy. Soc., Ser. B, v. 120, 42 (1936). ³ A. C. Neisch, Biochem. J., v. 33, 300 (1939). ⁴ I. B. G. Bredfield, Nature, v. 159, 467, (1947). ⁵ И. И. Гунар, Е. Е. Красина, ДАН, т. 83, 161 (1959). ⁶ А. В. Спроукинте, А. П. Шпокене, Тр. АН ЛитССР, сер. В, т. 3 (47), 161 (1968). ⁷ R. G. Everson, C. R. Slack, Phytochemistry, v. 7, 581 (1968). ⁸ R. G. Everson, Phytochemistry, v. 9, 25 (1970). ⁹ R. P. Poincelot, Plant Physiol., v. 50, 336 (1972). ¹⁰ Y. Pocher, S. Y. Ng Joan, Biochemistry, v. 12, 5127 (1973). ¹¹ C. A. Atkins, Phytochemistry, v. 13, 93 (1974). ¹² T. G. Cooper, D. Filmer et al., J. Biol. Chem., v. 244, 1081 (1969). ¹³ И. И. Чернядьев, И. В. Терехова и др., ДАН, т. 219, 249 (1974). ¹⁴ А. К. Романова, И. Я. Веденина и др., Биохимия, т. 36, 408 (1971). ¹⁵ R. P. Davis, In: Methods Biochem. Anal., v. 2, 307 (1963).