

М. И. МОЛЧАНОВ, В. М. ТРУСОВА

О БИОСИНТЕЗЕ БЕЛКОВ МЕМБРАННОЙ СИСТЕМЫ ПЛАСТИД ПРИ БИОГЕНЕЗЕ ХЛОРОПЛАСТОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 V 1975)

Вопрос о биосинтезе белковых компонентов мембранной системы пластид и его локализации в растительной клетке — важнейший вопрос проблемы биогенеза хлоропластов. В опытах *in vivo* нами было установлено, что на ранних этапах дифференциации хлоропластов при перестройке пропластидных элементов в ламеллы хлоропластов происходит усиленный синтез основной массы белков мембранной системы пластид — липопротеидов (¹). В настоящей работе было выяснено, какие изменения происходят при этом в их суммарном аминокислотном составе, а также в наборах липопротеидов, входящих в структуру проламеллярной и ламеллярной систем пластид.

Использовали 5–6-дневные проростки кукурузы сортов Молдаванска-оранжевая и Буковинская-3. Условия экспонирования проростков в атмосфере ¹⁴CO₂, выделения пропластид и хлоропластов, а также препаратов проламеллярной и ламеллярной систем пластид описаны в работе (²). Водорастворимые белки выделяли из надосадочной жидкости, остающейся после удаления фракции мембран из «лизатов» пластид. Для этого раствор центрифугировали при 100 000 g в течение 2,5 час. Затем к надосадочной жидкости добавляли 5% ТХУ и пробы оставляли на холоде в течение 1 часа. Осадки освобождали от крахмала и нуклеиновых кислот (³). Белки растворяли в 1 M NaOH, осаждали их из раствора 5% ТХУ и определяли по Лоури и др. (⁴).

В ряде опытов проростки выращивали на минеральной среде, содержащей радиоактивные изотопы ¹⁴C и ³⁵S. При работе с ³⁵S учитывалось, что белки проламеллярной и ламеллярной систем пластид имеют близкие количества серусодержащих аминокислот (⁵). В опытах с ¹⁴C проростки выращивали в течение 144 час. на среде Кроне в модификации Тевини (⁶), в опытах с ³⁵S — в течение 72 час. на видоизмененной среде Кроне, содержащей в 1 л раствора 1 г KNO₃, 250 мг Ca₃(PO₄)₂, 500 мг MgCl₂·12H₂O, 250 мг FeCl₃, 65 мг MnCl₂·4H₂O, 75 мг H₃BO₃ и 38 мг Na₂MoO₄. В 200 мл среды вносили 5 мС NaH¹⁴CO₃ (22 мС/ммоль) или 4 мС K₂³⁵SO₄ (63 мС/ммоль). Гель-электрофорез мембранных белков пластид проводили по методу (⁵). Гелевые столбики, содержащие ¹⁴C- или ³⁵S-белки мембран, делили на части по схеме, представленной на рис. 1. Гелевые диски с ³⁵S-белками разрушали концентрированной H₂O₂ в течение 2 час при 135° непосредственно во флаконах для определения радиоактивности, а диски с ¹⁴C-белками предварительно гидролизовали 6N HCl при 105° в течение 24 час. и обрабатывали по методике (⁷). Методы разделения ¹⁴C-аминокислот, полученных после кислотного гидролиза суммарных белков мембран и белков, разделенных в полиакриламидном геле, представлены в работах (⁷, ⁸). Радиоактивность образцов измеряли в газопоточном счетчике СОР-30БФЛ (табл. 1,3) и в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Интертехник СЛ-30» (табл. 2).

Характерно, что на ранних этапах биогенеза хлоропластов в пластидах наблюдается несбалансированный по сравнению с хлоропластами синтез

Таблица 1

Радиоактивность ^{14}C -аминокислот в белках мембран и в водорастворимых белках дифференцирующих хлоропластов (имп/мин на 1 мг белка)

Продол- житель- ность освеще- ния про- ростков, час	Белки мембран		Водорастворимые белки		K ₁		K ₂	
	продолжительность экспозиции проростков с ¹⁴ CO ₂ , мин.							
	5	45	5	45	5	45	5	45
1	15 866	36 212	16 621	60 269	0,80	0,78	0,95	0,60
5	18 091	48 700	17 088	64 933	0,84	0,83	1,05	0,75
24	22 996	75 542	18 026	68 674	0,81	0,80	1,27	1,10
144	41 425	99 460	18 860	71 058	0,87	0,88	2,18	1,39

Примечание. K_1 — отношение содержания белков мембран к водорастворимым белкам; K_2 — отношение удельных радиоактивностей белков мембран к водорастворимым белкам.

Таблица 2

Распределение в полиакриламидном геле радиоактивности ^{14}C - и ^{35}S -белков проламеллярной и ламеллярной систем пластид (% от суммарной радиоактивности ^{14}C - и ^{35}S -белков в гелевых столбиках)

№ белковых компонентов (от старта)	Включение ^{14}C		Включение ^{35}S	
	пропластиды	хлоропласты	пропластиды	хлоропласты
1, 2, 3, 4	17,2	21,3	14,3	18,2
5, 6, 7	23,6	34,2	28,1	27,9
8, 9, 10	18,3	16,6	23,4	23,3
11, 12	27,9	18,5	21,3	18,2
13	12,9	9,3	12,7	12,2

Таблица 3

Радиоактивность ^{14}C -аминокислот в белках мембран при дифференцировке хлоропластов (% от суммарной радиоактивности ^{14}C -аминокислот в пробах)

Аминокислота	Продолжительность экспозиции проростков с ¹⁴ CO ₂ ; мин.							
	5				45			
	продолжительность освещения этилированных проростков, часы							
	1	5	24	144	1	5	24	144
Полярные								
Аспарагиновая кислота	10,2	10,9	10,9	11,3	12,4	12,0	10,7	12,4
Глутаминовая кислота	6,7	5,5	4,6	4,4	6,0	5,3	4,9	3,0
Лизин	7,3	6,1	4,9	4,7	5,6	4,2	4,4	3,8
Аргинин	7,8	5,0	4,0	4,2	3,4	3,5	3,7	4,0
Гистидин	5,2	5,8	5,1	5,3	5,8	5,5	5,9	5,6
Серин	4,8	5,2	5,2	4,7	7,7	6,4	5,4	4,4
Треонин	5,7	5,3	5,0	5,0	8,6	8,2	4,5	4,1
Сумма	47,7	43,9	39,7	39,6	49,5	45,1	39,5	37,3
Неполярные								
Глицин	4,6	5,9	6,2	6,1	5,3	5,5	5,9	5,8
Аланин	6,5	7,3	8,3	9,7	9,4	10,2	10,2	10,0
Валин	6,3	6,3	5,7	6,0	5,6	5,2	5,2	5,5
Лейцины	4,6	5,6	5,7	5,9	5,4	7,9	10,1	10,6
Пролин	10,2	10,3	11,2	11,3	11,9	12,6	14,0	15,6
Метионин	5,5	6,0	6,6	5,4	5,6	5,2	5,2	5,5
Тирозин	8,9	8,9	9,7	9,0	3,1	3,8	4,2	4,0
Фенилаланин	5,2	5,8	6,9	7,0	4,1	4,2	4,7	5,7
Сумма	51,8	56,1	60,3	60,4	50,4	54,6	59,5	62,7
Полярные/неполярные	0,92	0,78	0,66	0,66	0,98	0,83	0,66	0,59

белков мембран и водорастворимых белков (табл. 1). В период от одного до 24 час. освещения этиолированных проростков светом при перестройке пропластных элементов в систему ламеллярных мембран в пластидах происходит интенсивный синтез мембранных белков. На этом этапе биогенеза хлоропластов удельная радиоактивность белков мембран увеличивается в два раза, а водорастворимых белков — незначительно. Через 24 часа освещения этиолированных проростков в хлоропластах происходит плотная упаковка ламелл и образование системы гран (¹).

Дальнейшее развитие хлоропластов сопровождается менее значительным возрастанием интенсивности биосинтеза белков ламелл. Несмотря на то, что пропластиды имеют близкое к хлоропластам соотношение белков мембран и водорастворимых белков (табл. 1.), морфологические различия в организации проламеллярной системы пропластид и ламеллярной системы хлоропластов говорят о том, что лишь под воздействием света в мембранной системе пластид появляются белки мембран, синтез которых необходим для формирования ламелл гран и стромы, образующих характерную структуру хлоропласта. Не исключено, что эти белки находятся в весьма ограниченном количестве или вообще отсутствуют в проламеллярной системе пластид, хотя по данным аналитического гель-электрофореза последняя имеет за небольшим исключением практически тот же набор белковых компонентов, что и ламеллярная система хлоропластов (⁵, ⁹). Уместно отметить, что не обнаруженный в этиопластах белок фотосистемы 1 не включается в состав ламеллярной системы хлоропластов, пока рибосомы хлоропластов не синтезируют необходимые для этого структурные белки (⁹).

Чтобы знать, в каких зонах гелевых колонок могут находиться белки мембран, появляющиеся в мембранной системе пластид по мере формирования ламеллярной системы хлоропластов, были проведены опыты по включению ¹⁴C и ³⁵S в белки мембран пропластид и хлоропластов. Результаты этих опытов показали, что при биогенезе хлоропластов в ламеллярной системе пластид увеличивается доля белков, находящихся в верхней и средней частях геля (белковые компоненты 1—4 и 5—7 соответственно), и уменьшается доля низкомолекулярных белков мембран (табл. 2). По литературным данным в указанных зонах геля находятся протеиды, синтез которых зависит от функции рибосом хлоропластов. Исключение составляет белок фотосистемы 1, который синтезируется на рибосомах цитоплазмы (⁹).

При формировании ламеллярной системы хлоропластов наблюдаются химические изменения в составе суммарного ¹⁴C-белка мембран. В нем закономерно уменьшается доля полярных и увеличивается доля неполярных ¹⁴C-аминокислот (табл. 3). Эти различия отчетливо проявляются уже с первых минут экспозиции проростков с ¹⁴CO₂. Особенно заметно изменяется содержание заряженных аминокислот, а также пролина, серина, треонина, глицина, аланина, фенилаланина и лейцинов. Следует отметить, что шесть из названных аминокислот, а именно: аспарагиновая кислота, лизин, глицин, аланин, серин и треонин синтезируются в изолированных хлоропластах при фотосинтетической фиксации ¹⁴CO₂ (¹⁰).

Представленные различия в аминокислотном составе мембранных белков пластид, синтезированных *in vivo* на разных этапах дифференциации хлоропластов, а также результаты разделения этих белков в полиакриламидном геле в настоящей и других работах (⁹) позволяют заключить, что при формировании ламеллярной системы хлоропластов под воздействием

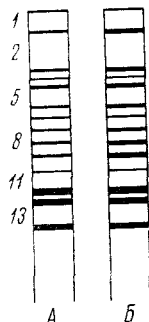


Рис. 1. Распределение белковых компонентов проламеллярной (А) и ламеллярной (В) систем пластид кукурузы в полиакриламидном геле и порядок их отделения от гелевого столбика. Цифры — номер белкового компонента

света в ее составе увеличивается доля липофильных белков, основная масса которых синтезируется рибосомальной системой хлоропластов.

Авторы приносят благодарность академику А. И. Опарину за интерес, проявленный к работе, и обсуждение ее результатов.

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

Поступило
7 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. И. Молчанов, Н. С. Балаур, Э. Н. Безингер, ДАН, т. 187, 935 (1969). ² М. И. Молчанов, В. М. Трусова, А. И. Опарин, ДАН, т. 220, 975 (1975). ³ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер и др., Биохимия, т. 28, 326 (1963). ⁴ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁵ М. И. Молчанов, В. М. Трусова, А. П. Котовская, А. И. Опарин, ДАН, т. 224, № 1 (1975). ⁶ M. Tevini, Zs. Pflanzenphysiol., B. 66, 459 (1972). ⁷ М. И. Молчанов, И. Г. Жукова и др., ДАН, т. 206, 490 (1972). ⁸ М. И. Молчанов, В. С. Чигирев, ДАН, т. 204, 1485 (1972). ⁹ R. J. Ellis, Phytochem., v. 14, 88 (1975). ¹⁰ P. R. Kirk, R. M. Leech, Plant Physiol., v. 50, 228 (1972).