

М. И. МОЛЧАНОВ, В. М. ТРУСОВА, Г. Л. ШАПОШНИКОВ,
А. П. КОТОВСКАЯ

О БИОСИНТЕЗЕ И АМИНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ ПРОТЕОЛИПИДОВ ЛАМЕЛЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ ХЛОРОПЛАСТОВ

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

Ранее мы сообщали о выделении протеолипидов из мембран ряда эволюционно различных фотосинтезирующих организмов, как-то: одноклеточной синезеленой водоросли *Anacystis nidulans*, питчатой синезеленой водоросли *Arhanizomenon flos-aque*, пропластид кукурузы, а также хлоропластов кукурузы и фасоли (¹). Были получены первые данные о биосинтезе этих мембранных белков *in vivo* в процессе биогенеза хлоропластов кукурузы и изучены их аминокислотный состав и электрофоретические свойства в полиакриламидном геле.

В настоящей работе изучен аминокислотный состав индивидуальных протеолипидов ламеллярной системы хлоропластов фасоли, определен их молекулярный вес и получены данные о биосинтезе этих белков в изолированных хлоропластах.

В опытах использовали 2—4-дневные проростки фасоли сорта Северная звезда 690. Условия получения препаратов ламеллярной системы хлоропластов, выделения из них протеолипидов, разделение протеолипидов электрофорезом в полиакриламидном геле и дальнейшее изучение их аминокислотного состава описаны в работе (¹). В опытах с ¹⁴C-аминокислотами хлоропласты выделяли в среде Хонда pH 7,8, содержащей в 100 мл раствора 8,5 г сахарозы, 6 г декстрана Т-20 (Ferak, Berlin), 2,5 г фиколла (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Швеция), 0,1 г бычьего сывороточного альбумина, 0,214 г ацетата магния, 0,3 г трис- и 0,1 мл концентрированной HCl (²). Реакционная среда для включения ¹⁴C-аминокислот в изолированные хлоропласты содержала в 0,5 мл раствора 0,4 мкмол. АТФ, 0,02 мкмол. ГТФ, 0,5 мкмол. фосфоэнолпирувата, 20 мкг пируваткиназы (все производства фирмы «Reanal», Венгрия), полный набор немеченных аминокислот (по 0,025 мкмол каждой) за исключением лизина и лейцина, 0,125 мкС ¹⁴C-лизина и 0,125 мкС ¹⁴C-лейцина (³).

В указанную смесь вносили 0,5 мл суспензии хлоропластов в среде Хонда (0,4—0,6 мг белка мембран) и пробы инкубировали при 20° в течение различного времени. Инкубацию прекращали, добавляя в пробы 0,1 мл охлажденной смеси, содержащей 20 мкмол. ЭДТА, 1 мкмол. лизина и 1 мкмол. лейцина. Контролем служили пробы нулевого времени. Для удаления невключенных ¹⁴C-аминокислот препараты мембран промывали на холоду шесть раз большими объемами 0,02 М трис-HCl буфера (pH 7,6) с 0,001 М ЭДТА, содержащего по 10 мкмол/мл немеченных лизина и лейцина, центрифугируя их каждый раз в течение 15 мин. при 40 000 g. После извлечения протеолипидов осадки мембран освобождали от крахмала и нуклеиновых кислот (⁴). Белки растворяли в 1 М NaOH, осаждали их из раствора 5% ТХУ и определяли по Лоури (⁵). Для получения ¹⁴C-препаратов протеолипидов и остальных белков мембран срезанные проростки фасоли экспонировали в течение 4 час. при освещении 4500 лк в стерильной смеси ¹⁴C-аминокислот, содержащей в 1 мл раствора по 4,67 мкС аргинина (210 мС/ммоль), лизина (180), гистидина (47), аспарагиновой кис-

лоты (140), глутаминовой кислоты (175), серина (114), глицина (70), аланина (105), пролина (125), валина (175), метионина (52), фенилаланина (315), изолейцина (210) и лейцина (185). Кроме того, в пробы вносили по 0,07 мг немеченных тирозина и треонина.

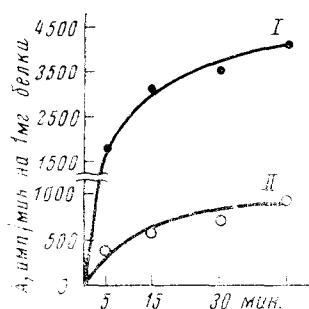


Рис. 1. Включение ^{14}C -аминокислот в протеолипиды и остальные белки ламеллярной системы хлоропластов фасоли (А). I — протеолипиды. II — остальные белки мембран

Радиоактивность проб измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Интертехник СЛ-30». Для определения молекулярных весов мембранных белков использовали препараты дрожжевой алкогольдегидрогеназы (молекулярный вес 37 000), лизоцима (молекулярный вес 14 300, Gee Lawson Chemicals LTD, London), рибонуклеазы (молекулярный вес 13 200, Reanal) и цитохрома с (молекулярный вес 13 000, 13 000, Reanal).

В препаратах ламеллярной системы хлоропластов фасоли на долю протеолипидов приходится от 2,1 до 2,9% белка мембран. При электрофорезе протеолипидов в полиакриламидном геле в сильно диссоциированной системе муравьиная кислота — мочевины было обнаружено три белковых компонента. Белковый компонент, расположенный на старте, имел молекулярный вес выше 160 000, два других компонента, локализованных в разных зонах геля, имели молекулярный вес 93 000 и 38 000.

В экспериментах с ^{14}C -протеолипидами, выделенными из ламеллярной системы хлоропластов фасоли, меченной ^{14}C -аминокислотами *in vivo*, были получены аналогичные результаты. В этих опытах гель-электрофорезу подвергали смесь мембранных белков, составленную из немеченных белков тилакоидов и ^{14}C -протеолипидов. Параллельно исследовали препарат ^{14}C -белков тилакоидов. Было установлено, что в пробах с ^{14}C -протеолипидами основная радиоактивность была сосредоточена в зонах белковых компонентов с молекулярным весом 93 000 и 38 000, а также на старте. Других компонентов во фракции протеолипидов выявить не удалось (табл. 1).

Характерно, что в сравнении с белками тилакоидов и водорастворимыми белками хлоропластов протеолипиды значительно обогащены гидрофобными аминокислотами и обеднены заряженными аминокислотами. Наиболее гидрофобным компонентом протеолипидов являются протеолипиды стартовой зоны (табл. 2). Если допустить, что протеолипиды стартовой зоны представлены не одним белком с молекулярным весом выше 160 000, а смесью белков меньшего молекулярного веса, то можно утверждать, что протеолипиды ламеллярной системы хлоропластов, очевидно,

Таблица 1

Распределение радиоактивности ^{14}C -протеолипидов и суммарных ^{14}C -белков тилакоидов в полиакриламидном геле (% от общей радиоактивности белков в гелевых столбиках)

Номера белков тилакоидов (от старта)	Молекулярный вес белков	Протеолипиды	Белки тилакоидов	Номера белков тилакоидов (от старта)	Молекулярный вес белков	Протеолипиды	Белки тилакоидов
Старт	>160 000	64,4	16,7	7	38 000	9,5	11,3
1,2	>130 000	}	}	8	27 500	0	6,2
3	130 000			9	21 000	0	8,8
4	100 000			10	14 600	0	26,5
5	93 000	23,3	6,9	11	13 500	0	
6	54 000	2,8	4,6	12	12 500	0	9,2

Таблица 2

Аминокислотный состав протеолипидов, суммарных белков мембран тилакоидов и водорастворимых белков хлоропластов (молярные проценты)

Аминокислоты	Протеолипиды				Суммарные белки мембран тилакоидов	Водорастворимые белки
	общая фракция	мол. вес >150 000	мол. вес 93 000	мол. вес <38 000		
Лизин	3.8	3.3	7.7	4.3	5.3	6.5
Гистидин	0.1	Сл.	0.9	Сл.	3.3	3.3
Аргинин		Не определяли			3.9	5.8
Аспарагиновая кислота	0.7	0.6	0.3	1.6	9.5	10.2
Треонин	5.6	5.6	5.5	4.5	5.2	6.3
Серин	7.2	6.9	7.0	8.6	4.2	3.5
Глутаминовая кислота	3.8	3.9	5.0	8.4	10.7	12.6
молярные (сумма)	21.2	20.3	26.4	27.4	42.1	48.2
Пролин	4.9	4.1	3.7	2.1	3.4	2.4
Глицин	13.5	13.3	13.8	11.4	9.1	8.4
Аланин	13.5	14.0	11.2	6.6	8.0	8.2
Валин	9.9	10.8	4.1	3.3	8.2	8.9
Метионин	1.7	1.9	Сл.	Сл.	1.9	1.3
Изолейцин	8.4	8.5	8.4	5.2	5.7	4.5
Лейцин	15.7	18.2	14.2	7.6	12.5	10.2
Тирозин	0.6	0.4	Сл.	4.1	3.1	3.4
Фенилаланин	11.4	8.5	18.2	32.3	6.0	4.5
Неполярные (сумма)	78.8	79.7	73.6	72.6	57.9	51.8
Заряженные	8.3	7.8	13.9	14.3	29.4	35.1
Полярные/неполярные	0.27	0.25	0.36	0.38	0.73	0.93

Таблица 3

Влияние линкомицина и актидиона D на включение ^{14}C -аминокислот в протеолипиды и остальные белки мембран тилакоидов (нмг/мин на 1 мг белка)

Номер опыта	Вариант	Суммарный белок тилакоидов	Протеолипиды	Остальные белки мембран тилакоидов
1	Без антибиотиков	769	6000	613
	С добавлением 200 мкг линкомицина	366(52,4)	4500(25,0)	227(63,0)
2	Без антибиотиков	511	3055	435
	С добавлением 200 мкг линкомицина	296(42,1)	1140(62,6)	270(35,6)
	С добавлением 200 мкг актидиона	530	3636	433
3	Без антибиотиков	18 351	30 692	18 156
	С добавлением линкомицина (100 мкг/мл)	10 353(44,2)	25 572(16,7)	9858(45,7)
	С добавлением актидиона (100 мкг/мл)	7318(60,5)	29 689	6463(64,4)

Примечание. В скобках указан процент ингибирования. Время инкубации хлоропластов в опытах 1 и 2 составляло 45 мин. Продолжительность экспозиции проростков с ^{14}C -аминокислотами (опыт 3) составляла 4 часа.

в первую очередь из-за их аминокислотного состава, обладают ярко выраженным свойством образовывать белковые агрегаты высокого молекулярного веса. Весьма вероятно, что именно эти свойства протеолипидов прежде всего реализуются при формировании ламеллярной системы хлоропластов, причем протеолипиды играют основную роль в образовании белковых ансамблей, сосредоточенных в наиболее гидрофобных участках мембраны тилакоидов.

Необходимо подчеркнуть, что при инкубации изолированных хлоропластов с ^{14}C -аминокислотами удельная радиоактивность протеолипидов

в несколько раз превышала таковую для остальных белков тилакоидов, причем с первых минут инкубации хлоропластов с меткой интенсивность ее включения в протеолипиды была большей, чем в остальные белки мембран (рис. 1). Следует отметить, что за 45 мин. инкубации изолированных хлоропластов с ^{14}C -аминокислотами в протеолипидах было сосредоточено от 18,0% (табл. 3, опыт 2) до 22,7% (табл. 3, опыт 1) ^{14}C -аминокислот, включенных в суммарный белок тилакоидов. В опытах *in vivo* (табл. 3, опыт 3) в протеолипиды включалось 5,2% ^{14}C -аминокислот от их содержания в суммарном белке мембран. И в этом случае удельная радиоактивность протеолипидов значительно превышала удельную радиоактивность остальных белков ламеллярной системы хлоропластов. Помимо сказанного, в опытах, представленных в табл. 3, было установлено, что синтез протеолипидов ламеллярной системы хлоропластов осуществляется в самих хлоропластах при участии рибосом типа 70 S. Линкомицин — ингибитор белкового синтеза на рибосомах типа 70 S ⁽⁶⁾ тормозил биосинтез протеолипидов в изолированных хлоропластах и в опытах *in vitro*, тогда как актидион D (циклогексими́д) — ингибитор белкового синтеза на рибосомах типа 80 S — не оказывал воздействия на этот процесс как в опытах *in vitro*, так и в опытах *in vivo*.

Таким образом, протеолипиды мембран тилакоидов представляют собой особую группу наиболее гидрофобных белков мембранной системы пластид, имеющих высокую метаболическую активность как *in vivo*, так и *in vitro*. Местом синтеза протеолипидов тилакоидов в растительной клетке являются рибосомы хлоропластов типа 70 S.

В заключение считаем своим приятным долгом выразить благодарность проф. М. Г. Бражниковой за любезно предоставленный нам препарат линкомицина.

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

Поступило
9 IX 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. И. Молчанов, В. М. Трусова и др., ДАН, т. 224, № 1 (1975). ² D. Spencer, S. D. Wildman, Biochemistry, v. 3, 954 (1964). ³ B. J. Reger, R. M. Smillie, R. C. Fuller, Plant Physiol., v. 50, 19 (1972). ⁴ Н. М. Сисаян, Э. Н. Безингер и др., Биохимия, т. 28, 326 (1961). ⁵ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁶ Ф. Чанг, Б. Вейсблум, Механизм действия антибиотиков, М., «Мир», 1969, стр. 414.