

М. И. МОЛЧАНОВ, В. М. ТРУСОВА

**К ИЗУЧЕНИЮ СВОЙСТВ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ
МЕМБРАННОЙ СИСТЕМЫ ПЛАСТИД ПРИ БИОГЕНЕЗЕ
ХЛОРОПЛАСТОВ**

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

Белки, из которых почти наполовину состоит мембрана тилакоидов ⁽¹⁾, имеют, как и другие мембранные белки, некоторые характерные свойства, которыми они отличаются от растворимых белков клетки. Только небольшую часть мембранных белков можно экстрагировать из тилакоидов водными растворами. После удаления липидов белки мембран большей частью нерастворимы не только в солевых, но даже в концентрированных растворах мочевины или гуанидинхлорида ⁽²⁾. Препарат, освобожденный от экстрагируемых составных частей, был охарактеризован Менке и Йордан в 1959 г. как ламеллярный структурный протеид ⁽³⁾. Определив в нем концевые аминные и карбоксильные группы, эти авторы показали, что структурный протеид ламеллярной системы хлоропластов — не отдельный белок, а их смесь, содержащая 9—11 полипептидов. Позже Менке и Шольцель разделили белки тилакоидов из хлоропластов львиного зева в полиакриламидном геле по методу Вебера и Осборна на 16 компонентов и определили их молекулярный вес ^(4, 5). Белки стартовой зоны рассматривались авторами как агрегаты этих полипептидов. Доля агрегатов значительно возрастала, если белки мембран экстрагировали не из ламеллярной системы хлоропластов, а из обезжиренных препаратов мембран ⁽²⁾. Используя принципиально иной метод разделения мембранных белков пластид в полиакриламидном геле, мы также показали, что не только в хлоропластах, но и на разных стадиях их дифференцировки в состав мембранной системы пластид входят не менее 13—14 белковых компонентов ^(6, 7). В настоящей работе установлено, что в построении мембранной системы пластид, помимо указанных выше белковых компонентов, принимает участие большая группа наиболее гидрофобных белков мембран, остающаяся на старте при их электрофорезе в полиакриламидном геле.

Объектом исследования служили 5—6-дневные проростки кукурузы сорта Буковинская-3. Проростки выращивали на минеральной среде Кроне, содержащей радиоактивные изотопы ¹⁴C и ³⁵S ⁽⁸⁾. Условия выделения из них пропластид и хлоропластов, а также препаратов проламеллярной и ламеллярной систем пластид описаны в работе ⁽⁸⁾. В опытах с актидином D — ингибитором белкового синтеза на рибосомах типа 80 S — срезы проростки кукурузы экспонировали в темноте (этиолированные растения) или на свету при освещении 4500 лк в течение 4 час. в стерильной смеси ¹⁴C-аминокислот, содержащей в 1 мл раствора по 4,67 мкС аргинина (210 мС/ммоль), лизина (180 мС/ммоль), гистидина (47 мС/ммоль), аспарагиновой кислоты (140 мС/ммоль), глутаминовой кислоты (175 мС/ммоль), серина (114 мС/ммоль), глицина (70 мС/ммоль), аланина (105 мС/ммоль), пролина (125 мС/ммоль), валина (175 мС/ммоль), метионина (52 мС/ммоль), фенилаланина (315 мС/ммоль), изолейцина (210 мС/ммоль) и лейцина (185 мС/ммоль). Кроме того, в пробы вносили по 0,07 мг немеченных тирозина и треонина. Концентрация актидиона D в опытах с ¹⁴C-аминокислотами составляла 100 мкг/мл. Гель-электрофорез мембранных белков проводили в сильно диссоциированной системе му-

равьиная кислота — мочеви́на (⁷). Гелевые столбики, содержащие ¹⁴C-белки мембран, делили на части в соответствии с нумерацией белковых компонентов, представленной в табл. 1, 2. Одновременно обрабатывали семнадцать (табл. 1) или четыре (табл. 2) гелевых колонки. Диски с ¹⁴C-белками гидролизовали 6N HCl в течение 24 час. при 105° (использовали соотношение белок — 6N HCl, 1:10 000). ¹⁴C-аминокислоты гидролизатов

Таблица 1

Радиоактивность ¹⁴C-аминокислот в суммарном белке, в белке стартовой зоны и в группах белковых компонентов проламеллярной системы пропластид и ламеллярной системы хлоропластов (% от суммарной радиоактивности ¹⁴C-аминокислот в белках)

Аминокислота	Проламеллярная система пропластид						Ламеллярная система хлоропластов							
	суммарный белок мембран	белок стартовой зоны	№№ белковых компонентов от старта				суммарный белок мембран	белок стартовой зоны	№№ белковых компонентов от старта					
			1—13	1—7	11, 12	13			1—13	1—7	8—10	11, 12	13	
Аспарагиновая кислота	14,0	16,1	10,8	14,6	11,5	9,2	20,3	21,7	17,2	12,4	22,0	15,1	17,5	
Глутаминовая кислота	17,3	17,0	18,0	13,8	14,2	27,0	20,7	20,6	20,9	26,7	24,1	16,8	5,5	
Аргинин	15,5	14,7	16,8	14,3	10,7	6,9	11,6	8,4	19,0	16,1	13,5	23,8	33,0	
Лизин	2,4	2,2	2,6	2,3	4,0	3,4	2,3	2,0	3,1	5,0	2,5	1,9	3,1	
Гистидин	5,7	4,3	7,7	2,8	7,5	7,1	1,8	1,4	2,6	1,5	1,5	5,4	2,6	
Серин	7,9	7,4	8,5	7,4	12,4	10,5	7,9	8,2	7,1	5,5	7,2	7,9	7,1	
Треонин	0,5	0,1	1,1	2,2	0,7	1,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	
Полярные (сумма)	63,3	61,8	65,5	57,4	61,0	65,3	64,7	62,4	70,1	67,4	71,0	71,0	71,2	
Глицин	28,4	31,0	24,5	34,3	23,9	25,4	25,9	28,0	21,5	22,0	19,9	21,6	24,6	
Аланин	2,8	2,6	3,2	2,3	3,1	2,8	4,4	4,6	3,9	4,9	4,5	3,5	1,0	
Валин	0,9	0,7	1,1	1,2	1,1	1,0	0,9	0,9	0,8	1,3	0,7	0,6	0,6	
Лейцины	0,8	0,7	1,1	0,7	0,9	1,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,9	0,7	0,3	
Пролин	1,7	1,6	1,8	1,2	1,4	1,6	1,5	1,7	1,1	0,6	1,4	1,2	0,9	
Метионин	0,5	0,4	0,6	0,6	0,7	0,3	0,5	0,4	0,6	1,0	0,4	0,5	0,5	
Тирозин	0,6	0,4	1,0	1,2	1,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,3	0,4	
Фенилаланин	1,0	0,8	1,2	1,1	1,4	1,2	0,9	0,9	0,8	1,5	0,7	0,6	0,5	
Неполярные (сумма)	36,7	38,2	34,5	42,6	39,0	34,7	35,3	37,6	29,9	32,6	29,0	29,0	23,8	
Полярные/ неполярные	1,72	1,62	1,90	1,35	1,56	1,88	1,83	1,66	2,34	2,07	2,45	2,45	2,47	
Кислые, основные	1,33	1,56	1,06	1,46	1,16	2,08	2,61	3,58	1,54	1,73	2,63	1,03	0,60	

Таблица 2

Распределение радиоактивности ¹⁴C-белков проламеллярной и ламеллярной систем пластид в ПАГ (% от общей радиоактивности белков в гелевых столбиках)

№ белкового компонента (от старта)	Молекулярный вес белка	Пропластиды		Хлоропласты	
		без антибиотика	добавлен антибиотик	без антибиотика	добавлен антибиотик
1—4	112 200—72 500	14,2	14,6	6,3	4,9
5	46 800	43,0	19,2	44,1	12,8
6, 7	36 300, 28 900	10,9	19,9	13,6	14,9
8, 9	20 700, 16 200	9,4	4,8	12,2	16,7
10	14 100	6,5	11,8	10,8	10,2
11, 12	12 900, 12 500	11,3	26,5	10,8	31,6
13	11 800	4,7	3,2	2,2	8,9

отделяли от примесей углеводной природы и от продуктов гидролиза полиакриламида на ионообменной смоле Дауэкс 50×8 в H⁺-форме. Методы разделения ¹⁴C-аминокислот представлены в работах (⁹, ¹⁰). В опытах, представленных в табл. 2, гелевые диски с ¹⁴C-белками разрушали концентрированной H₂O₂ в течение 2 час. при 135° непосредственно во флаконах для определения радиоактивности. Предварительно было установлено, что 86,1% радиоактивности исходного препарата ¹⁴C-белка приходится на аминокислоты белка. Остальная радиоактивность была найдена в продуктах распада аминокислот, образующихся при жестком кислотном гидролизе белков с 6N HCl, а также в веществах небелковой природы. Радио-

активность образцов измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Интертехник СЛ-30».

При изучении распределения радиоактивности ^{14}C и ^{35}S белков проламеллярной и ламеллярной систем пластид в полиакриламидном геле установлено, что определенная часть радиоактивности образца, вносимого в гель, остается при электрофореze на старте. В опытах с ^{14}C на старте оставалось 42,8% белков ламеллярной системы хлоропластов, в опытах с ^{35}S 41,3% белков ламеллярной системы хлоропластов и 47,2% белков проламеллярной системы пропластид⁽⁸⁾. Так как вопрос о природе остающихся на старте белков имеет принципиальное значение, нами была предпринята попытка изучить их аминокислотный состав и сравнить его с составом белковых компонентов, локализованных в различных частях геля. В этих опытах использовали белки мембран из пропластид и хлоропластов кукурузы, меченные в опытах *in vivo* радиоактивным изотопом ^{14}C (табл. 1). В проламеллярной системе пластид общая радиоактивность ^{14}C -аминокислот в белковых компонентах №№ 1–7, 11, 12 и 13 составляла соответственно 14 875, 7915 и 14 329 имп/мин. В ламеллярной системе хлоропластов белковых компонентах №№ 1–7, 8–10, 11, 12 и 13 определено соответственно 14 987, 20 835, 12 976 и 6799 имп/мин.

Было установлено, что и в проламеллярной системе пропластид и в ламеллярной системе хлоропластов мембранные белки стартовой зоны заметно отличаются по своему аминокислотному составу от остальных белковых компонентов, локализованных в других частях гелевых столбиков. Анализ представленных результатов, особенно отношений полярных и неполярных, а также кислых и основных аминокислот, ясно указывает на то, что в них входят не столько агрегаты белковых компонентов мембран, находящихся в разных частях геля, сколько наиболее липофильные высокомолекулярные белки (молекулярный вес более 112 000) проламеллярной системы пропластид и ламеллярной системы хлоропластов. Весьма вероятно, что именно эти белки наряду с протеолипидами играют основную роль в структурной организации белковых ансамблей, сосредоточенных в наиболее гидрофобных участках мембраны тилакоидов.

Помимо сказанного, в настоящей работе установлено, что при биогенезе хлоропластов кукурузы в ламеллярной системе пластид увеличивается доля белков с молекулярным весом от 14 100 до 46 800 и уменьшается содержание белков с молекулярным весом 12 900, 12 500 и 11 800. Следует отметить, что в пропластидах и хлоропластах кукурузы среди мембранных белков с молекулярным весом выше 14 100 лишь один белковый компонент (молекулярный вес 46 800) синтезируется с участием рибосом цитоплазмы типа 80 S (табл. 2). Остальные из указанной группы белков, по-видимому, синтезируются рибосомами пластид типа 70 S. Необходимо, однако, отметить, что в тех зонах геля, где отделяли не один, а два или четыре белковых компонента, при изучении отдельных компонентов все же могут быть выявлены белки, синтез которых зависит от функции цитоплазматических рибосом. Помимо сказанного, при работе с ингибиторами белкового синтеза *in vivo* нельзя не учитывать, что их фактическая концентрация внутри растительной клетки, особенно в хлоропластах, содержащих множество внутренних мембранных барьеров, может быть крайне низкой. В этом случае также не всегда могут быть выявлены мембранные белки, синтез которых зависит от рибосом цитоплазмы листа. По литературным данным, синтез основной массы белков ламеллярной системы хлоропластов, имеющих молекулярный вес выше 20 000, зависит от функции рибосом хлоропластов. Исключение составляет белок фотосистемы I, который синтезируется на рибосомах цитоплазмы⁽¹¹⁾.

Таким образом, при биогенезе хлоропластов под воздействием света в построении мембраны тилакоидов принимают участие не только белковые компоненты с молекулярным весом от 11 800 до 112 000, но и гидрофобные белки мембран большего молекулярного веса. Изучение химиче-

ской природы этих белков является одной из задач дальнейших исследований.

В заключение авторы приносят благодарность акад. А. И. Опарину за интерес, проявленный к работе, и обсуждение ее результатов.

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

Поступило
11 IX 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Nickel, Flora, Abt. A, v. 159, 233 (1968). ² W. Menke, H.-G. Ruppel, Zs. Naturforsch., B. 26, 825 (1971). ³ W. Menke, E. Jordan, Zs. Naturforsch., B. 14, 393 (1959). ⁴ W. Menke, E. Schölzel, Zs. Naturforsch., B. 26, 378 (1971). ⁵ K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., v. 244, 4406 (1969). ⁶ М. И. Молчанов, В. М. Трусова, ДАН, т. 224, № 2 (1976). ⁷ М. И. Молчанов, В. М. Трусова и др., ДАН, т. 224, № 1 (1975). ⁸ М. И. Молчанов, В. М. Трусова, А. И. Опарин, ДАН, т. 220, 975 (1975). ⁹ М. И. Молчанов, И. Г. Жукова и др., ДАН, т. 206, 490 (1972). ¹⁰ М. И. Молчанов, В. С. Чигирев, ДАН, т. 204, 1485 (1972). ¹¹ R. J. Ellis, Phytochemistry, v. 14, 88 (1975).