

УДК 577.3

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

А. А. ЯСНИКОВ, Б. И. БЕРШТЕЙН, Н. В. ВОЛКОВА, Л. И. ВАСИЛЕНКО,
О. И. ВОЛОВИК, А. А. ДУБРОВСКАЯ, Н. А. ЗАЙЦЕВА, Н. П. КАНИВЕЦ,
Л. С. МУШКЕТИК, А. С. ОКАНЕНКО, Л. К. ОСТРОВСКАЯ,
А. И. ПОЛИЩУК, Т. А. РЕЙНГАРД

ДВА МЕХАНИЗМА СВЕТОЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНА В ХЛОРОПЛАСТАХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 16 VI 1975)

Светозависимый транспорт протона в хлоропластах является одним из важных этапов в процессе фотофосфорилирования у растений. Для хлоропластов, выделенных из ряда растений (горох, шпинат и др.), характерно поглощение протона из среды при освещении и выделение его в среду в темноте. Следствием этого является образование трансмембранного градиента, свободная энергия которого, согласно известной гипотезе Митчела, утилизируются в системе макроэргической фосфатной связи АТФ. Мы обнаружили, что светозависимый транспорт протона в хлоропластах растений и их фрагментах может также протекать с переносом протона из хлоропласта в среду. Представленные ниже данные демонстрируют различные типы транспорта протона в хлоропластах гороха, кукурузы и препаратах дигитониновых фрагментов хлоропластов гороха.

Хлоропласты гороха ⁽¹⁾, хлоропласты кукурузы ⁽²⁾ и дигитониновые фрагменты хлоропластов гороха ⁽³⁾ выделяли, как было описано ранее. Определение рН проводили в сосуде, снабженном чувствительным стеклянным электродом, с помощью прецизионного рН-метра марки ОП-205 (Венгрия), снабженного потенциометром ЭПП-09 по методике ⁽⁴⁾. Значение исходного рН 7,0—7,5. Реакционная смесь объемом 9 мл содержала 7,5 мкмоль $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,09 мкмоль феназинметасульфата (ФМС) или флавинмоноклеотида (ФМН) и суспензию хлоропластов (1 мг хлорофилла). Освещение белым светом интенсивностью 40 000 лк. Хлорофилл в суспензии определяли по Арнону ⁽⁶⁾.

При освещении реакционных смесей с хлоропластами гороха мы постоянно наблюдали светозависимое подщелачивание окружающей среды, т. е. поступление протонов внутрь хлоропластов (рис. 1). Вместе с тем, в препаратах хлоропластов кукурузы и дигитониновых фрагментов хлоропластов гороха (особенно легких фракций) наблюдалось противоположное направление протонного транспорта при чередовании света и темноты: выделение протонов на свету и поглощение их в темноте (рис. 2, 3). Величина ΔpH у хлоропластов кукурузы зависела от срока хранения хлоропластов. Для свежевыделенных хлоропластов при начальном значении рН растворов 7,0—7,5 она равна 1,0—1,2 единицы рН, а после стояния в темноте на льду через 3—4 часа эта величина падала до 0,1—0,05 единицы рН.

Введенная в реакционные смеси пируваткиназа (рис. 1, 2) полностью блокировала светозависимый транспорт протона в хлоропласты гороха, но не влияла на выход протонов при освещении хлоропластов кукурузы. Напротив, кислая фосфатаза (рис. 1, 2) не блокировала функционирование протонного насоса у гороха, но полностью подавляла поглощение протонов в темноте у кукурузы. Добавка сырого препарата сопрягающего фактора, выделенного из хлоропластов гороха по методу ⁽⁵⁾, к суспензии хлоропластов, протонный транспорт у которых был подавлен пируваткиназой, сни-

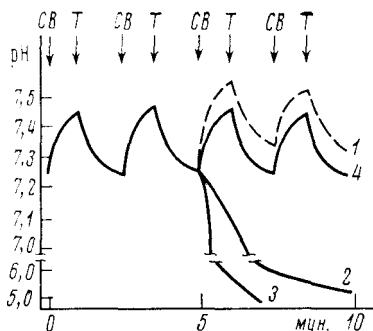


Рис. 1

Рис. 1. Влияние кислой фосфатазы, пируваткиназы и NH_4Cl на транспорт протонов в хлоропластах гороха. 1 — фосфатаза 0,9 ед.; 2 — пируваткиназа 0,026 ед.; 3 — NH_4Cl 30 мкмол.; 4 — контроль; здесь и на рис. 2—4 — СВ — свет; Т — темнота

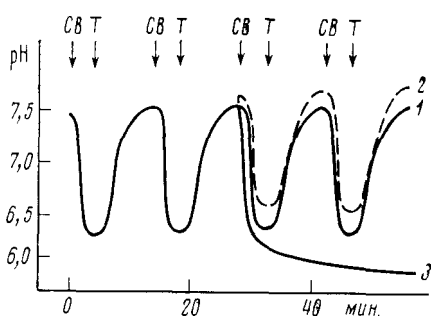


Рис. 2

Рис. 2. Влияние кислой фосфатазы и пируваткиназы на транспорт протона в хлоропластах кукурузы. 1 — контроль; 2 — пируваткиназа 0,026 ед.; 3 — кислая фосфатаза 0,9 ед

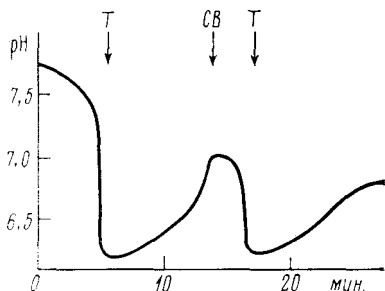


Рис. 3

Рис. 3. Светозависимый транспорт протона дигитониновых фрагментов хлоропластов гороха

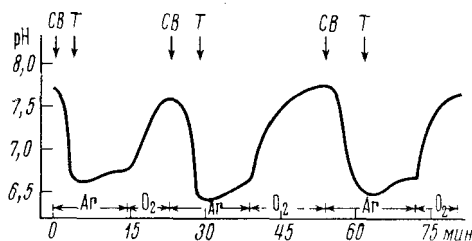


Рис. 4

Рис. 4. Светозависимый транспорт протона у хлоропластов кукурузы при попеременном продувании через суспензию хлоропластов кислорода и аргона

жала ингибиторное действие пируваткиназы и восстанавливала обычный тип транспорта протонов у хлоропластов гороха. Вместе с тем, этот белок не влиял на светозависимое выделение протонов в среду у хлоропластов кукурузы и дигитониновых фрагментов хлоропластов гороха.

Как было показано ⁽⁶⁾, ФМС в концентрации 0,1 мМ и исходном pH 8 вызывал изменение направления протонного транспорта в хлоропластах шпината. В наших опытах с хлоропластами гороха внесение ФМС в концентрации 0,1 мМ тоже приводило к светозависимому выделению протонов в среду. Вместе с тем транспорт протона в хлоропластах кукурузы при смене режимов освещения не зависел от добавки ФМС.

Существенное влияние оказывало на транспорт протона в хлоропластах кукурузы присутствие кислорода в реакционной среде. Продувание через среду аргона не влияло на ход понижения pH среды при освещении. Однако при этом не наблюдалось обратного подщелачивания среды в темноте. Прекращение продувания через среду аргона и соприкосновение суспензии хлоропластов с воздухом снова приводило систему в исходное положение (рис. 4).

Обратный перенос протона на свету наблюдался ⁽⁷⁾ в суспензиях хлоропластов шпината, у которых экстракцией был предварительно удален сопрягающий фактор. Обработанные ЭДТА хлоропласты, как было показано

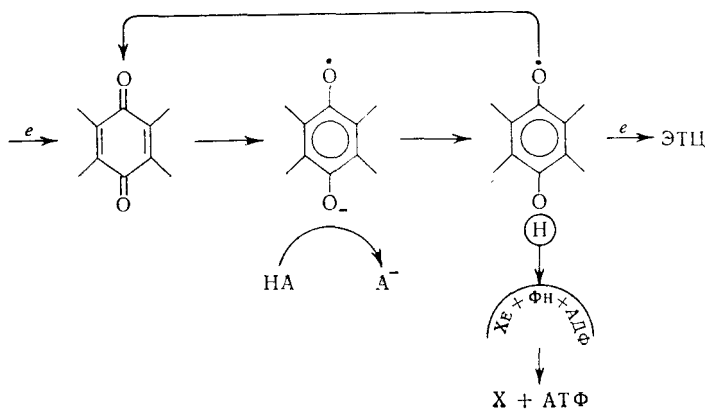


Схема 1. Механизм транспорта протона с участием пластохинона

авторами потенциметрически, теряли также способность к образованию АТФ. Можно, однако, полагать, что светозависимый выход протонов из хлоропластов кукурузы сопряжен с одним из этапов фотофосфорилирования. Доводом в пользу этого положения служит совпадение времени одного цикла переноса протонов в среду со временем окончания фосфорилирования в суспензии хлоропластов кукурузы (около 10 мин.) (8). При внесении пируваткиназы в реакционные смеси с хлоропластами гороха на свету (как и в случае экстракции раствором ЭДТА) наблюдается выделение протонов в среду. В то же время, как было показано ранее с использованием радиоизотопного метода (9), в хлоропластах гороха продолжает функционировать система фотофосфорилирования, не угнетаемая этим ферментом. Фрагменты хлоропластов гороха, особенно легкие фракции, также обладают способностью к циклическому фотофосфорилированию с ФМС, хотя на свету выделяют протоны в среду, а не поглощают их.

Существование двух типов светозависимого транспорта протона в хлоропластах может быть истолковано на основе гипотезы (9), согласно которой светозависимый транспорт протонов и ионов металлов необходим для сопряжения быстрых стадий переноса электрона и относительно медленных процессов превращения промежуточных нефосфорилированных и фосфорилированных продуктов при фотофосфорилировании. Существенным этапом в этом сопряжении является образование промежуточных ион-радикалов. Идею о радикальном механизме фосфорилирования впервые выдвинул и обосновал Н. М. Эмануэль (10). Известны два механизма светозависимого транспорта протона: при превращении пластохинона в пластогидрохинон (11) и в виолаксантиновом цикле при деэпоксидации виолаксантина (12).

Механизмы этих двух типов представлены нами схемами 1 и 2. В схеме 1 ион-радикал пластохинона, являющийся основанием ($pK_a \sim 6,5$ (13)), переносит протон из гидрофильной фазы внутрь мембраны, превращаясь в радикал гидрохинона. Последний дисмутирует в гидрохинон и хинон или передает электрон в электрон-транспортную цепь, а протон — в систему сопряжения, где происходит превращение макроэргических интермедиатов сопряжения. Перенос протона внутрь хлоропласта протекает при участии сопрягающего фактора (7). Пируваткиназа блокирует действие этого белка по принципу белок-белкового взаимодействия, общая теория которого дана в обзорной статье (14). Превращения и перенос протона в виолаксантиновом цикле даны на схеме 2. Первым этапом деэпоксидирования, как показано в (15), является перенос электрона из электронтранспортной цепи на эпоксикаротиноид, что сопровождается одновременным перемещением протона на эпоксигруппу. В следующих стадиях радикал присоединяет атом водо-

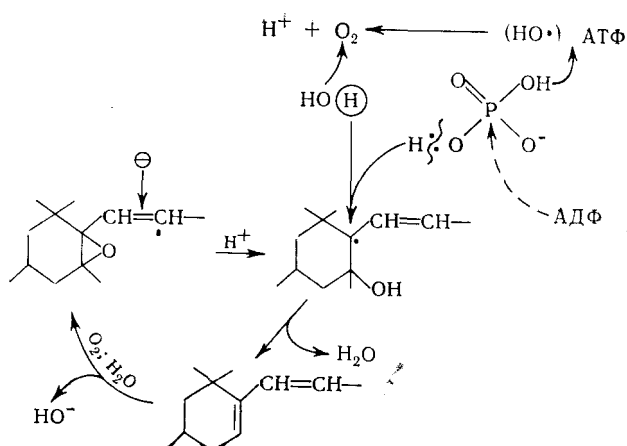


Схема 2. Механизм транспорта протона с участием вио-
лаксантина

рода от фосфат-иона. Возникающий при этом радикал взаимодействует с АДФ и теряет ОН-радикал, который, возможно, и превращается в молекулярный кислород, выделяющийся обычно при превращении на свету эпоксикаротиноидов. В отсутствие фосфорилирующей системы донорами водорода могут быть молекулы воды.

Механизмы переноса протона с участием пластохинона или эпоксикаротиноидов локализованы, возможно, в разных участках мембран хлоропластов и обеспечивают подачу протона в мембрану хлоропласта либо из внешней среды, либо из внутренней фазы тилакоида. При участии пластохинона на свету происходит перенос протона внутрь хлоропласта, как было показано в ⁽¹¹⁾. Можно предполагать, что светозависимое выделение протона из хлоропласта связано с превращением каротиноидов. Последний механизм действует, по-видимому, в дигитониновых фрагментах хлоропластов гороха.

В хлоропластах кукурузы функционирует виолаксантиновый тип переноса протона, а перенос протона через пластохинон, возможно, блокирован ингибитором, присутствующим в выделенных хлоропластах кукурузы ⁽⁸⁾. На основании приведенных данных можно предполагать, что ферменты пируваткиназы и кислая фосфатаза осуществляют регуляторные функции в двух типах транспорта протона в хлоропластах растений.

Институт органической химии
Академии наук УССР

Поступило
11 VI 1975

Институт физиологии растений
Академии наук УССР
Киев

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. И. Берштейн, Н. В. Волкова и др., Физиол. биохим. культ. раст., т. 1, 1, 21 (1969).
- ² С. J. Arntzen, K. A. Dilley, J. Neumann, Biochim. et biophys. acta, v. 245, 2, 409 (1971).
- ³ Т. А. Рейнгард, О. И. Воловик и др., Биохимия и биофизика фотосинтеза, Иркутск, 1971, стр. 170.
- ⁴ А. Т. Jagendorf, E. Uribe, Energy Conservation by the Photosynthetic Apparatus. Brookhaven Symp. in Biology, N. Y., 1966, p. 215.
- ⁵ H. Strohmann, H. Hesse, K. Edelmann, Biochim. et biophys. acta, v. 314, 2, 202 (1973).
- ⁶ S. Izawa, ibid., v. 223, 1, 165 (1970).
- ⁷ W. S. Lynn, K. D. Straub, Biochemistry, v. 8, 12, 4789 (1970).
- ⁸ Н. А. Зайцев, Н. В. Волкова и др., Физиол. биохим. культурн. раст., т. 6, 6, 590 (1974).
- ⁹ А. Yasnikov, B. Berstein et al., Proc. of the II Intern. Congr. on Photosynthesis Res., v. 2, Haque, 1974, p. 1075.
- ¹⁰ Н. М. Эмануэль, Тр. V Международн. биохим. конгресса, М., 1962, стр. 81.
- ¹¹ H. T. Witt, B. Rumberg et al., Progr. in Photosynthesis Res., v. 3, Tubingen, 1969, p. 1361.
- ¹² A. Hager, Planta, v. 89, 224 (1969).
- ¹³ E. J. Land, A. J. Swallow, J. Biol. Chem., v. 245, 8, 1890 (1970).
- ¹⁴ C. Frieden, Ann. Rev. Biochem., v. 40, 653 (1971).
- ¹⁵ H. Y. Yamamoto, C. A. Takeguchi, Proc. of the II Intern. Congr. on Photosynthesis Res., v. 1, Haque, 1972, p. 621.