

УДК 581(132+174)+541.144.7+58.1.0.35

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙЧлен-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, М. Т. ЧАЙКА,
Е. А. КЛЮЧАРЕВА**СОПРЯЖЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НОВЫХ МОЛЕКУЛ ХЛОРОФИЛЛОВ
И БЕЛКОВ В МЕМБРАННОЙ СИСТЕМЕ ХЛОРОПЛАСТОВ**

Согласно представлениям о локализации образования хлорофилла (Х) в особых структурных участках пластиды — центрах биосинтеза, эти центры обеспечены полиферментными комплексами, осуществляющими формирование X_a и его превращение в X_b , а также белками — носителями пигментов ⁽¹⁾. Работы по ингибированию и стимулированию синтеза РНК и белка (Б) выявили необходимость постоянного восполнения белковых компонентов системы центров биосинтеза Х для обеспечения ее непрерывной работы ⁽²⁾. Центры биосинтеза Х преимущественно локализованы в определенных мембранных фрагментах хлоропласта, особенно обогащающих легкие частицы после механической дезинтеграции и супернатант 144 000 g после обработки детергентами ⁽³⁾. Под действием хлорамфеникола уменьшается доля Х и Б пластид именно в этой фракции ⁽⁴⁾. Локализация в одних и тех же фрагментах новых молекул как Х, так и каротиноидов, а также другие соображения позволили предположить, что в этих же мембранных элементах происходит формирование и более сложных структур — новых единиц фотосинтетического аппарата ^(2, 5, 6). В этой связи представляло интерес сравнить распределение между фрагментами хлоропластов новых молекул не только Х, но и Б. Из работ с Б, относящихся к близкой области, отметим исследование ⁽⁷⁾ содержания ¹⁴C в разных полипептидах, выделенных электрофорезом из мембран тилакоидов стромы и гран, а также интересное сообщение ⁽⁸⁾ о преимущественной способности фракции гран к включению ¹⁴C-аминокислот в Б *in vitro*.

6-дневные проростки ячменя, выращенные при 2,9 мвт/см² в водной культуре (без азота), срезали над coleoptилем и помещали на 12 час. на раствор (¹⁵NH₄)₂SO₄ (0,3 г/л, 83,7 ат. % ¹⁵N) при 11,6 мвт/см². Для получения хлоропластов листья гомогенизировали при 4° в ¹/₁₅ M фосфатном буфере рН 8,0 с 0,4 M сахарозой и 0,01 M KCl. Гомогенат фильтровали через 3 слоя капрона и центрифугировали 15 мин. при 1000 g. Хлоропласты суспендировали в том же буфере, но без сахарозы, вновь осаждали 15 мин. при 6000 g, солибилизировали 0,4% раствором дезоксихолата Na в буфере с 0,15 M KCl (отношение детергент:Х=2) и центрифугировали 15 мин. при 1000 g, 30 мин. при 10 000 g, 30 мин. при 48 000 g и 60 мин. при 144 000 g. В варианте с выделением фотосинтетических мембран осадок после осмотического шока перед обработкой дезоксихолатом суспендировали в буфере с 0,01 M KCl в присутствии 1 мМ ЭДТА и 4 мМ меркаптоэтанолла, двукратно озвучивали на холоду по 15 сек. при 22 кгц и осаждали 60 мин. при 144 000 g. Содержание X_a и X_b определяли спектрофотометрически, белок — по Кьельдалю. Меченые X_a и X_b очищали по ⁽⁹⁾ одно- и двукратным хроматографированием на сахарозе. Пробы азота для масс-спектрометрии готовили по ⁽¹⁰⁾.

На рис. 1 представлены результаты опытов с некоторым варьированием условий. Общая картина относительного содержания ¹⁵N в материале разных фракций остается сходной при выращивании растений как в описанных выше условиях, так и при освещенности 11,6 мвт/см² с самого начала или при исключении осмотического шока, а также при замене специальной очистки белковых препаратов по ⁽¹¹⁾ приготовлением ацетоновых по-

Таблица 1

Распределение хлорофиллов а+b и белка (% к исходному материалу) и отношение количеств хлорофиллов а:b и суммы хлорофиллов а+b к количеству белка во фракциях хлоропластов и их мембран

Фракции	X_{a+b}	Б	$X_a : X_b$	$X_{a+b} : Б$
---------	-----------	---	-------------	---------------

Хлоропласты

Исходный материал	100	100	2,96±0,03	0,19±0,01
Осадок 1000 g	16,29±1,07	13,29±1,29	2,69±0,03	0,23±0,01
Осадок 10 000 g	40,58±0,96	37,33±0,91	2,42±0,03	0,20±0,02
Осадок 48 000 g	14,71±0,59	12,28±0,83	2,88±0,06	0,22±0,02
Осадок 144 000 g	10,11±0,58	9,02±0,47	3,80±0,14	0,20±0,01
Супернатант 144 000 g	4,62±0,30	26,98±1,24	3,07±0,10	0,032±0,001

Мембраны хлоропластов

Исходный материал	100	100	2,84±0,07	0,23±0,01
Осадок 1000 g	16,21±0,98	15,04±1,00	2,35±0,06	0,24±0,01
Осадок 10 000 g	39,42±3,06	34,76±2,38	2,14±0,08	0,23±0,01
Осадок 48 000 g	14,77±1,34	11,30±1,32	2,90±0,08	0,30±0,01
Осадок 144 000 g	19,77±0,77	16,97±0,82	3,57±0,16	0,23±0,01
Супернатант 144 000 g	7,33±1,65	22,12±0,97	4,22±0,21	0,054±0,003

рошков. Это позволило использовать именно такие порошки в основной серии опытов.

Из табл. 1 видно, что около половины X и Б остается в осадках 1000 и 10 000 g, тогда как во фракциях легких частиц, обладающих характерным для фотосистемы I повышенным соотношением $X_a : X_b$, количества их сравнительно невелики. Как и в работе (4), фрагментирование изолированных мембран привело к большему выходу легких частиц, чем обработка материала хлоропластов. Это можно связать с повышенным по отношению к Б количеством детергента. Регистрация в супернатанте большей доли Б, чем X, соответствует поступлению в него непрочно связанных Б.

Типичная картина содержания ^{15}N в материале различных фракций представлена на рис. 2. Подобно рис. 1, он свидетельствует о выраженном параллелизме в ходе кривых для Б и X_a : переход от крупных фрагментов к осадкам более мелких ведет к снижению избытка атомного процента ^{15}N с минимумом у осадка 144 000 g и новым повышением у супернатанта. Сходный характер имеют и кривые для X_b , однако локализация минимума в этом случае менее четкая. Важно, что опыты с материалом хлоропластов и изолированными мембранами дают вполне сходные результаты.

Сопряженность хода всех кривых хорошо видна и в нижней части рис. 2, где представлено распределение общего фонда ^{15}N в Б, X_a или X_b между отдельными фракциями. При этом превышение начальных участков кривых для X_b над остальными соответствует обогащению им пигментных фондов крупных частиц, а особенно крутой подъем последних точек для Б — большей доле его, чем любого X, в супернатанте.

Поскольку содержание ^{15}N в Б определялось без выделения индивидуальных компонентов, следует иметь в виду неодинаковую степень включения в них изотопа. В подобной ситуации могло быть и так, что отдельные Б содержат почти весь ^{15}N препарата, а другие компоненты лишь неодинаково разбавляют меченый азот, создавая тем самым разницу между фракциями. Однако вероятность этого невелика, тем более что по данным специальных определений избыток ат. % ^{15}N в Б достигал почти 0,6 от найденного для смеси свободных аминокислот хлоропластов. При такой высокой степени включения нового азота можно заключить, что оно не ограничивалось лишь какими-то минорными компонентами и действительно затронуло основные Б. Поскольку известно, что в фотосинтетической мембране преобладают Б, входящие в состав пигмент-протеидных

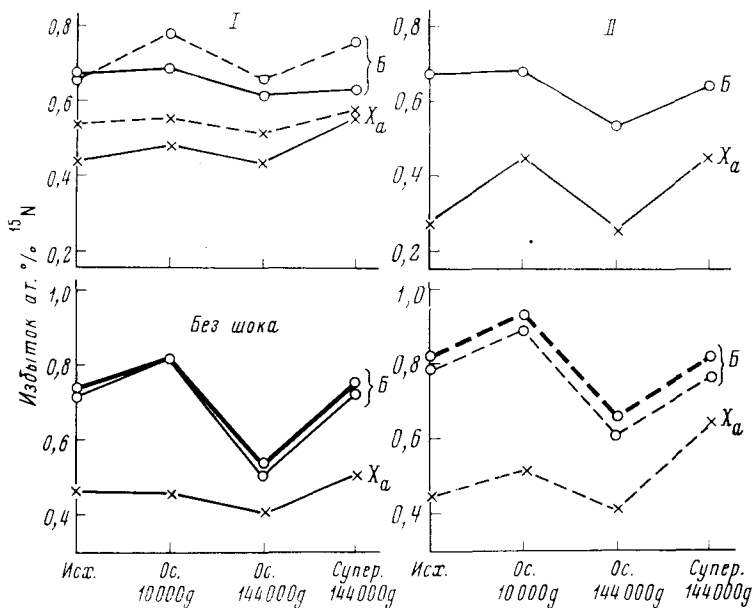


Рис. 1. Избыток атомного процента ^{15}N в белке и хлорофилле а разных фракций хлоропластов (I) и фотосинтетических мембран (II). Сплошные линии соответствуют описанным в тексте условиям выращивания растений, штриховые — выращиванию постоянно при 11,6 мвт/см². Тонкие линии для белка относятся к анализу порошков, полученных после обработки фракций 100% ацетоном при -10° , утолщенные — к препаратам белка, очищенным по (11)

комплексов (12), полученные данные могут рассматриваться в качестве некоторой характеристики именно последних.

Главным результатом данной работы является демонстрация четкого параллелизма в распределении свежееобразованных X и B в мембранной системе хлоропластов. Избирательность локализации обоих в отдельных ее участках носит одинаковый характер, и доля новых молекул каждого в материале разных фрагментов меняется сходным образом. По-видимому, можно различать особенно быстро развивающиеся и более зрелые участки мембранной системы, проявляющей в этом отношении отчетливую метаболическую неоднородность. Подобное заключение было подготовлено ранее данными об избирательном распределении меченых X_a и X_b и их предшественников в разных фракциях (1-6), оно стало более определенным после изучения этих характеристик у пигмент-белковых комплексов, разделенных электрофорезом (13-15), и сейчас приобретает особую выразительность в свете аналогичной локализации и свежееобразованного B.

Центры биосинтеза X легко представить себе более или менее прочно связанными с мембраной вплоть до включения в ее структуру. Вопрос же о нахождении и полирибосом внутри фотосинтетической мембраны (8) или в связи с ней извне (16), об участии в ее биогенезе рибосом стромы еще остается дискуссионным. Несомненно важное значение имеет и синтез белков в цитоплазме. Независимо от всех этих обстоятельств данная работа показывает, что многие вновь возникающие молекулы B инкорпорируются в те же участки мембранной системы, где локализуются новые молекулы X. Если бы оказалось, что туда же поступают и новые молекулы функционально важных липидов (даже если место их синтеза очень удалено (17)), то идея о центрах формирования новых целостных единиц фотосинтетического аппарата получила бы дальнейшее развитие.

Значительное содержание свежееобразованных молекул X в супернатанте 144 000 g уже являлось одним из обоснований вывода о связи центров биосинтеза X с особенно лабильными участками мембраны (3, 12-15).

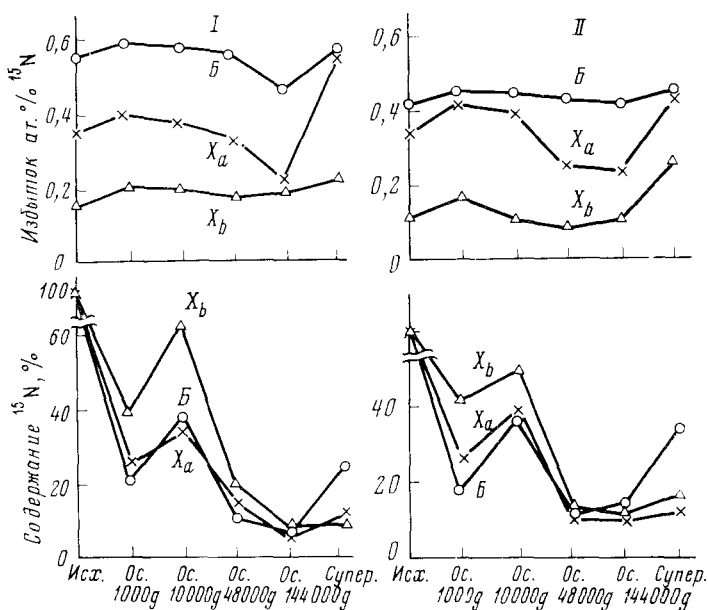


Рис. 2. Сопоставление содержания ^{15}N в белке и хлорофиллах а и б различных фракций хлоропластов (I) и фотосинтетических мембран (II). Внизу — доля ^{15}N во фракциях (общее содержание ^{15}N в исходной сумме белков или в каждом из хлорофиллов принято за 100%)

В настоящей работе оно дополняется аналогичными данными о содержании в этой фракции и новых молекул Б. Легко представить себе, что именно вновь формирующиеся участки мембраны еще обладают повышенной лабильностью. Определение же того, от каких именно более устойчивых фрагментов отщепились эти лабильные, требует дальнейших исследований. Нецелесообразно на данном этапе специально обсуждать и соотношение величин избытка атомного процента ^{15}N в материале разных осадков. На основании более подробных исследований с ^{14}C -Х это уже сделано в недавней работе (³). Следует также иметь в виду, что в иных условиях, которые благоприятствовали бы наиболее активному формированию каких-то иных частей мембранной системы хлоропласта, может наблюдаться и иное распределение новых молекул Х и Б по фракциям. Для данной работы важна прежде всего сопряженность распределения их обоих.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
26 IX 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, Tübingen, v. 2, 1969, p. 572. ² А. А. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Genetic Aspects of Photosynthesis, 1975, p. 119. ³ А. А. Шлык, В сб.: Биосинтез и состояние хлорофиллов в растениях, Минск, 1975, стр. 104. ⁴ А. А. Шлык, Т. К. Парамонова, Физиол. раст., т. 22, в. 2, 270 (1975). ⁵ А. А. Шлык, Н. И. Азрамович, ДАН, т. 194, № 2, 448 (1970). ⁶ А. А. Шлык, В сб.: Современные проблемы фотосинтеза, М., 1973, стр. 85; В сб.: Итоги исследований по Международн. биологической программе в Белорусской ССР, Минск, 1974, стр. 23. ⁷ F. Henriques, R. Park, Plant Physiol., v. 54, № 3, 386 (1974). ⁸ I. I. Philippovitch, I. N. Bessmertnaya, A. I. Oparin, Exp. Cell Res., v. 79, 159 (1973). ⁹ А. Б. Рудой, А. А. Шлык, А. И. Лобачев, Докл. АН БССР, т. 6, в. 14, 742 (1962). ¹⁰ Д. Риттенберг, В сб.: Получение и определение меченых атомов, М., 1948, стр. 45. ¹¹ L. P. Zill, E. Harmane, Biochim. et biophys. acta, v. 57, № 3, 563 (1962). ¹² J. P. Thornber, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 26, 127 (1975). ¹³ Л. И. Фрадкин, В. М. Коляго и др., В сб.: Формирование пигментного аппарата фотосинтеза, Минск, 1973, стр. 50. ¹⁴ L. I. Fradkin, A. A. Shlyk et al., Symp.: Pigment-protein Complexes in Photosynthesis, Poznan, 1974, p. 12. ¹⁵ М. Т. Чайка, Г. Е. Савченко, В сб.: Хлорофилл, Минск, 1974, стр. 269. ¹⁶ A. Michaels, M. M. Margulies, Biochim. et biophys. acta, v. 390, 352 (1975). ¹⁷ R. Douce, Science, v. 183, № 4127, 852 (1974).