

УДК 581.132

БИОХИМИЯ

П. А. КОЛЕСНИКОВ, Е. И. ПЕТРОЧЕНКО, С. В. ЗОРЭ,
А. А. МУТУСКИН, К. В. ПШЕНОВА

ПОГЛОЩЕНИЕ КИСЛОРОДА ХЛОРОПЛАСТАМИ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА В ПРИСУТСТВИИ РИБОЗО-5-ФОСФАТА НА СВЕТУ

(Представлено академиком А. И. Опариным 20 X 1975)

Согласно современным представлениям о фотосинтезе, рибозо-5-фосфат (Р5Ф) в хлоропластах ферментативно через рибулез-5-фосфат и рибулез-1,5-дифосфат превращается в фосфоглицериновую кислоту, которая восстанавливается НАДФ-Н₂, генерируемым фотосинтетической электрон-транспортной системой. В результате этих реакций имеет место поглощение СО₂ и выделение О₂.

Таблица 1

Влияние Р5Ф на поглощение О₂ хлоропластами и ламеллами

	Условия опыта	Хлоро- пласты	Ламеллы		Условия опыта	Хлоро- пласты	Ламеллы
	нмол. О ₂ /мин. на 1 мг хлорофилла				нмол. О ₂ /мин. на 1 мг белка		
-Р5Ф	Темнота	23	20	-Р5Ф	Темнота	2,0	7,7
+Р5Ф	»	46	20	+Р5Ф	»	4,0	7,7
-Р5Ф	Свет	161	110	-Р5Ф	Свет	14,6	42,3
+Р5Ф	»	215	210	+Р5Ф	»	19,5	86,7
				Белок/хло- рофилл		11,0	2,6

В хлоропластах обнаружены соответствующие ферменты, а также наблюдалось, что Р5Ф стимулирует образование фосфоглицериновой кислоты, фиксацию СО₂ и выделение О₂ ⁽¹⁾. Нами обнаружено ⁽²⁾, что Р5Ф стимулирует поглощение О₂ на свету хлоропластами, которые по известной классификации относятся к типу С ⁽³⁾. В настоящей работе сообщаются результаты наших дальнейших исследований.

Хлоропласты выделяли из листьев 14–21-дневных проростков гороха сорта Победитель или Жегаловский по ранее описанному методу ⁽⁴⁾. Ламеллы получали после десятиминутного выдерживания хлоропластов в среде выделения без сорбита и центрифугирования при 18000g в течение 20 мин. Поглощение О₂ измеряли полярографическим методом ⁽⁵⁾. Белок определяли по методу ⁽¹³⁾, хлорофилл — по методу ⁽¹⁴⁾.

3 мл реакционной смеси в соответствующих опытах содержали: хлоропласты (200 мкг хлорофилла); ферредоксин (Фд), выделенный из листьев гороха ⁽⁶⁾, 0,013 мкмоль; метилвиологен-хлорид 3·10⁻⁸ M; аскорбат натрия 2·10⁻³ M; дихлорфенолиндифенол (ДХФИФ) 5·10⁻⁵ M; диурон 5,2·10⁻⁴ M; каталазу 60 мкг; фосфатный буфер 10 mM, pH 7,2; Р5Ф («Реанал») 18 мкмоль в виде соли натрия, полученной из бариевой соли путем обработки Дауэксом 50. Освещенность в ячейке 15000 лк.

В табл. 1 приведены данные опытов по влиянию Р5Ф на поглощение О₂ хлоропластами и ламеллами. Из табл. 1 видно, что свет увеличил поглощение О₂ хлоропластами и ламеллами, Р5Ф увеличил поглощение О₂ хлоропластами в темноте и на свету, а ламеллами — только на свету. По отношению к хлорофиллу ламеллы значительно беднее белками, чем хлоропласты. Шоком из хлоропластов удаляются белки стромы, среди кото-

рых находятся ферменты метаболизма Р5Ф. По-видимому, они и участвуют в стимулировании Р5Ф поглощения O_2 в темноте (⁷). Это подтверждается и данными табл. 2. Без Р5Ф фракция белков стромы O_2 не поглощала. Как видно из табл. 2, фракция белков стромы стимулировала поглощение O_2 хлоропластами в темноте и снижала поглощение O_2 на свету. Эффект был тем больше, чем больше прибавлялось белков. Эти данные также свидетельствуют о том, что имеются два механизма стимулирования поглощения O_2 , зависящие от Р5Ф: темновое — ферментативное и зависящее от света и хлорофилла. Можно предположить, что на свету имеет место прямое сенсibilизированное пигментами хлоропластов фотоокисление Р5Ф или образовавшихся из него продуктов. Ранее нами обнаружено, что на свету различные вещества могут быть донорами электронов для O_2 в водных растворах рибофлавина (⁸). Оказалось, что и Р5Ф в этих условиях также окисляется с участием O_2 . Так, например, 2 мкмоль рибофлавина с 18 мкмоль Р5Ф в 3,0 мл воды поглощали 60 нмоль O_2 в 1 мин. В темноте кислород не поглощался. Он не поглощался на свету в присутствии одного рибофлавина или Р5Ф. Однако нами обнаружено, что поглощение O_2 раствором рибофлавина с Р5Ф не ингибируется, а поглощение O_2 хлоропластами с Р5Ф ингибируется диуроном. Так, например, если хлоропласты с Р5Ф поглощали 90 нмоль O_2 на 1 мг хлорофилла в 1 мин., то в присутствии диурона (5,2·10⁻⁴ M) — только 6 нмоль. Как известно, диурон является ингибитором фотосинтетической электронтранспортной цепи (ф.э.т.ц.). Следовательно, поглощение O_2 хлоропластами, стимулированное Р5Ф, связано с функционированием ф.э.т.ц., которая, как известно, локализована в ламеллах хлоропластов.

Согласно современной гипотезе о фотосинтезе, электроны воды по ф.э.т.ц. переносятся на НАДФ. В отсутствие НАДФ электроны через ферредоксин переносятся на O_2 и в результате этого образуется перекись водорода. In vitro в суспензии хлоропластов вода, как донор электронов, может быть заменена другими веществами, например аскорбиновой кислотой, производными фенола и др. (¹, ²). В этом случае имеет место поглощение O_2 . Доноры электронов могут включаться, по крайней мере, в трех

Таблица 2
Действие белков стромы на кислородный обмен хлоропластов в присутствии рибозо-5-фосфата

Белки, мг	Хлоропласты	Поглощение O_2 , нмоль/мин	
		темнота	свет
0	+	6	25,3
0,5	+	7,4	14,5
1,5	+	13,1	9,4
2,52	—	18,2	16,4
2,52	+	14,5	4,5
5,05	+	28,1	11,9

Примечание. Трис-буфер 0,005 M, pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM. Знак «плюс» означает присутствие хлоропластов, знак «минус» — отсутствие их.

Таблица 3
Влияние различных веществ на поглощение O_2 хлоропластами (Хл.) на свету

Опытная смесь	нмоль O_2 на 1 мг хлорофилла в 1 мин.
Хл.	75
Хл., $NaNO_3$	189
Хл., Р5Ф	126
Хл., $NaNO_3$, Р5Ф	291
Хл.	55
Хл., Р5Ф	136
Хл., MB	75
Хл., MB, Р5Ф	125
Хл.	28 (43)
Хл., Р5Ф	33 (60)
Хл., АК	33 (59)
Хл., ДХФИФ	142 * (172) *
Хл., ДХФИФ, диурон	— (2) *
Хл., ДХФИФ, АК	230 (—)
Хл., ДХФИФ, Р5Ф	130 * (21) *
Хл.	55
Хл., Р5Ф	145
Хл., Фд	100
Хл., Фд, Р5Ф	195
Хл., Фд, К	15
Хл., Фд, К, Р5Ф	45

Примечание. MB — метилвиологен-хлорид, А — аскорбат натрия, К — каталаза. В скобках приведены результаты другого опыта. Отмеченное звездочкой означает, что реакция идет с выделением кислорода.

точках (см. схему). Как видно из схемы, конечным продуктом переноса электронов является H_2O_2 . Для обнаружения H_2O_2 , образующейся в системах, реагирующих с O_2 , используется каталаза или ингибиторы каталазы, например азид натрия. Если система образует H_2O_2 и в системе имеется каталаза, то наблюдаемое количество поглощенного O_2 будет меньше, чем количество поглощенного O_2 в отсутствие каталазы. В наших объектах каталаза присутствовала. Как видно из табл. 3, азид натрия повысил количество поглощенного O_2 . Это может служить доказательством стимулирования Р5Ф образования H_2O_2 хлоропластами.

Как уже указывалось, доноры электронов в ф.э.т.ц. могут быть включены, по крайней мере, в трех точках (схема 1). Известно, что поглоще-

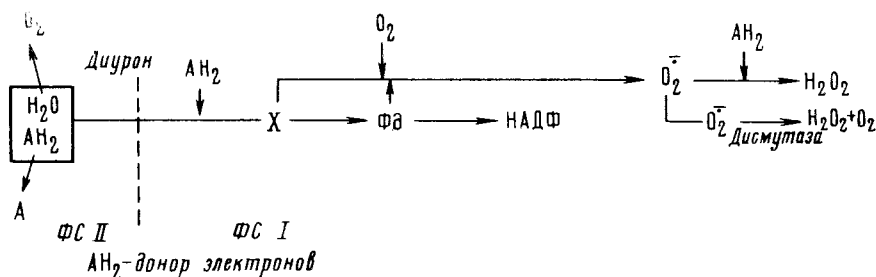


Схема 1. Переноса электронов на O_2 фотосинтетической электрон-транспортной цепи

ние O_2 хлоропластами, когда донором электронов служит аскорбиновая кислота, стимулируется ДХФИФ и поглощение O_2 в этом случае не ингибируется диураном. Предполагается, что эта реакция осуществляется только фотосистемой I (схема 1). Действительно, ДХФИФ значительно повышал поглощение O_2 хлоропластами в присутствии аскорбиновой кислоты и диурон не ингибировал это поглощение. Однако с Р5Ф подобных результатов не получилось. Как видно из табл. 3, ДХФИФ инициировал выделение O_2 и Р5Ф или не повлиял, или заингибировал это выделение, т. е. не имело место стимулирование поглощения O_2 , как это наблюдалось с аскорбиновой кислотой. Следовательно, Р5Ф не является однопотенциальным с аскорбиновой кислотой донором электронов.

Известно предположение, что аскорбиновая кислота может служить донором электронов для O_2^- , генерируемого фотосистемой I (см. схему). В опытах, на основании которых сделано это предположение, вместо ферредоксина использовался метилвиологен. Последний повышал поглощение O_2 , происходящее в присутствии аскорбиновой кислоты и ДХФИФ (¹²). Как видно из табл. 3, МВ не только не стимулировал поглощение O_2 в присутствии Р5Ф, но поглощение с ним было меньше суммы поглощений с каждым из этих веществ в отдельности. Следовательно, Р5Ф или образовавшиеся из него продукты не являлись донорами электронов для O_2^- , как это предполагалось для аскорбиновой кислоты (¹²).

Как видно из схемы 1, непосредственным переносчиком электронов на O_2 должен быть ферредоксин, который, как известно, в восстановленной форме автооксидируется; в результате его реакции с O_2 образуется супероксид-анион-радикал кислорода (O_2^-) и последний восстанавливается в H_2O_2 (^{9, 10}). Ламеллы и поврежденные хлоропласты почти не содержат растворимый ферредоксин, который вымывается в процессе выделения этих структур. Для того чтобы в этих структурах имело место восстановление НАДФ водой, необходим экзогенный ферредоксин. Используемые нами ламеллы и хлоропласты не восстанавливали НАДФ водой и не выделяли при этом O_2 , если к ним не добавлялся ферредоксин. Мы исследовали действие экзогенного ферредоксина и искусственного переносчика электронов метилвиологена на поглощение O_2 ламеллами и хлоропласта-

ми в присутствии Р5Ф. Из табл. 3 видно, что Р5Ф стимулировал поглощение O_2 без экзогенного ферредоксина. Экзогенный ферредоксин стимулировал поглощение O_2 . При совместном присутствии Р5Ф и ферредоксина количество поглощенного O_2 меньше суммы количеств поглощенного O_2 с каждым из этих веществ в отдельности. Следовательно, ферредоксин не стимулировал зависимое от Р5Ф поглощение O_2 на свету. Аналогичное явление наблюдалось, когда вместо ферредоксина применялся метилвионоген. Это дает основание считать, что если электроны с Р5Ф или образовавшихся из него продуктов переносятся на O_2 с участием ф.э.т.ц., то этот процесс не нуждается в растворимом ферредоксине. Нами обнаружено, что и поглощение O_2 хлоропластами, стимулируемое аскорбиновой кислотой с ДХФИФ как в отсутствие, так и в присутствии диурана, не зависит от растворимого ферредоксина. Известно, что H_2O_2 , образующаяся на свету в суспензии хлоропластов, окисляет этанол в присутствии относительно большого количества экзогенной каталазы, которая в данном случае выполняет функции пероксидазы. Этанол с каталазой увеличивает количество поглощаемого хлоропластами кислорода на свету. Это поглощение связано с функционированием ф.э.т.ц. (¹¹). Можно предположить, что Р5Ф или образовавшиеся из него продукты в этой реакции заменяют этанол. Как видно из табл. 3, каталаза не только не стимулировала поглощение O_2 в присутствии Р5Ф, но в значительной мере ингибировала поглощение O_2 . Следовательно, Р5Ф или образовавшиеся из него продукты не окислялись подобно этанолу путем вышеуказанной реакции.

Таким образом, в результате исследований установлено, что Р5Ф стимулирует светозависимое поглощение O_2 и образование H_2O_2 хлоропластами типа С или выделенными из них ламеллами. Это стимулирование связано с фотосинтетической электронтранспортной цепью и в нем не участвуют ферменты стромы хлоропластов. Предполагается, что Р5Ф или образовавшиеся из него продукты являются донорами электронов для ф.э.т.ц., переносящей электроны на молекулярный кислород. Проведены исследования по включению Р5Ф в качестве донора электронов в ф.э.т.ц. Показано, что хотя Р5Ф и может быть донором электронов, но характер донорства здесь иной, чем у аскорбиновой кислоты в фотосистеме I, а также у супероксид-анион-радикала, генерируемого ф.э.т.ц., или у этанола в реакции Мелера.

Так как стимулирование Р5Ф поглощения O_2 ингибируется диураном, то можно предположить, что если Р5Ф или образовавшиеся из него продукты служат донорами электронов для ф.э.т.ц., то в этом случае необходима вся ф.э.т.ц. и местом включения Р5Ф должна быть фотосистема II. Так как растворимый ферредоксин не требуется для реакции, то в качестве непосредственного донора для O_2 может быть восстановленный нерастворимый ферредоксин или фактор X (схема 1). Для выяснения указанных предположений, а также для выяснения биологической роли обнаруженного явления, необходимы дальнейшие исследования.

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

Поступило
3 X 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Trebst, Ann. Rev. Plant. Physiol., v. 25, 423 (1974). ² П. А. Колесников, Е. И. Петроченко и др., Физиол. раст., т. 22, 33 (1975). ³ D. O. Hall, Nature, v. 235, 125 (1972). ⁴ П. А. Колесников, С. В. Зорэ и др., Физиол. раст., т. 20, 170 (1973). ⁵ П. А. Колесников, Е. И. Петроченко и др., Физиол. раст., т. 17, 496 (1970). ⁶ А. А. Мутускин, К. В. Пшенова и др., Биохимия, т. 34, 231 (1969). ⁷ T. Y. Andrews, G. H. Lorimer, N. E. Tolbert, Biochemistry, v. 12, № 1, 41, 48 (1973). ⁸ П. А. Колесников, Биохимия, т. 23, 434 (1958); ДАН, т. 138, 1462 (1960). ⁹ H. P. Misra, Y. Fridovich, J. Biol. Chem., v. 246, 6886 (1971). ¹⁰ A. Tefler, K. Cammack, M. C. W. Owens, FEBS Letters, v. 10, 21 (1970). ¹¹ B. Kok, H. Y. Rurainski, O. V. W. Owens, Biochim. et biophys. acta, v. 109, 347 (1965). ¹² E. F. Elstner, A. Neupel, Zs. Naturforsch., B. 29c, 559, 564 (1974). ¹³ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 242 (1951). ¹⁴ D. Arnon, Plant Physiol., v. 24, 1 (1949).