

Н. М. СИСАКЯН, А. М. ЗОЛКОВЕР и В. И. БИРЮЗОВА

СТРУКТУРА ПЛАСТИД И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 10 IV 1948)

Одним из нас ⁽¹⁾ было установлено, что главная масса ферментов пластид находится в прочно адсорбированном, гидролитически неактивном состоянии. Активность ферментов обнаруживается после перевода их в раствор путем длительного автолиза. Было показано также, что способность пластид адсорбировать ферменты из окружающего раствора находится в обратной зависимости от их начальной ферментативной активности. Чем выше была эта способность, тем ниже была активность ферментов до автолиза пластид. Исходя из этих данных и основываясь на представлениях А. И. Опарина ⁽²⁾, было высказано предположение, что адсорбция значительной части клеточных ферментов происходит в липопротеидных структурах пластид. Однако оставался неясным и экспериментально недоказанным вопрос о характере изменения структуры пластид в результате их автолиза и взаимоотношения измененного состояния структур с активностью заключенных в пластидах ферментов.

Настоящее исследование было предпринято нами для выяснения отмеченных выше вопросов.

Изолированные из корней сахарной свеклы лейкопласты подвергались по ранее описанному способу ⁽¹⁾ автолизу в течение различного времени. Автолиз производился с толуолом в присутствии ацетатного буфера при $pH=5,0$, при температуре $38-40^{\circ}C$. Лейкопласты как до, так и после автолиза брались для наблюдения в электронном микроскопе, и одновременно с этим в параллельных пробах учитывалась активность ферментов. Для первой серии опытов лейкопласты изолировались из корней сахарной свеклы несколько подвяленных. Для второй серии опытов пластиды изолировались из хорошо хранившихся, тургесцентных корней сахарной свеклы.

На рис. 1, а, б представлены сделанные в электронном микроскопе фотоснимки лейкопластов сахарной свеклы с предварительным диализом и без автолиза. Диализ препаратов производится по методу, разработанному в лаборатории электронной микроскопии Отделения биологических наук АН СССР. В указанных снимках наблюдается разрыхленная, разветвленная структура с хорошо видимыми зернами. Разветвленность не является постоянным свойством данной структуры. Очень часто, как это представлено на рис. 1, в, мы наблюдаем более компактную структуру с зернистыми включениями.

Однако в данном случае нас прежде всего интересовал характер тех перемен, которые совершаются в структуре пластид после их автолиза. Как это видно из рис. 2, после продолжительного автолиза в структуре пластид происходят весьма глубокие изменения.

В первый период автолиза (рис. 2, *а*) мы наблюдаем распад, нарушение компактности, отчленение отдельных нитеобразных, иногда зернистых фрагментов от основной массы пластид. Во второй период (рис. 2, *б*) эти хорошо видимые на рис. 2, *а* фрагменты едва различимы. Вследствие продолжающегося распада остаток от основной массы пластид принимает округленную форму. Пластиды после глубокого автолиза резко отличались от пластид, изображенных на двух предыдущих рисунках. От видимой структуры здесь остались лишь отдельные зерна, друг от друга разобщенные. Отчетливо был виден прозрачный остов от прежней массы пластид.

На рис. 2, *в* представлены те же пластиды после значительно более глубокого автолиза. При этом почти полностью исчезает картина видимой структуры. Остаются едва заметные следы отдельных зерен.

В описанных условиях коренным образом изменяется и ферментативная активность пластид. Вначале, в лейкопластах, не подвергнутых автолизу, активность инвертазы выражалась 50 мг глюкозы в пересчете на 1 г сухого вещества. После полной деструкции пластид активность фермента достигает 171,7 мг глюкозы в пересчете на 1 г сухого вещества.

Для другой серии опытов лейкопласты были изолированы из хорошо хранившихся тургесцентных корней сахарной свеклы сорта „Верхнячка“. При этом нами были получены следующие результаты. На рис. 3, *а* представлены лейкопласты после диализа без автолиза (контроль). На рис. 3, *б, в, г, д* — те же лейкопласты с диализом после автолиза 48, 72, 160 и 234 часа, соответственно.

Представленные рисунки весьма наглядно показывают характер тех изменений, которые возникают в структуре пластид после той или иной продолжительности автолиза. В контрольных, не подвергнутых автолизу пластидах (рис. 3, *а*) мы видим четко выраженную компактную структуру. По краям видны очертания гранул. После 48 час. автолиза (рис. 3, *б*) компактность нарушается, масса разрывается на две части, между ними возникает пространство, свободное от каких-либо включений. При удлинении автолиза, а именно через 72 часа (рис. 3, *в*), разрыв этот расширяется, но компактность отдельных частей все еще сохраняется. Видны нитевидные структуры, отделяющиеся от массы гранулы. После 160 час. автолиза происходит значительная деформация прежней структуры, свойственной интактным лейкопластам. Разрозненная половина утончается, образуются пустые пространства между гранулами, сохранившими еще нитевидную связь с нераспавшейся массой пластид (рис. 3, *г*). Наконец, после 234 час. автолиза в структуре пластид происходят еще более глубокие перемены (рис. 3, *д*). Здесь от прежней компактной структуры остаются волокна, дающие сетчатые образования.

При описанных условиях существенно меняется и баланс ферментативной активности пластид (табл. 1).

Таблица 1

Активность инвертазы в мг глюкозы в пересчете на 1 г сухого вещества пластид

Продолжительность автолиза в часах	0	48	72	160	234
Активность фермента	75,0	118,2	131,8	213,0	236,4

Таким образом, из сопоставления характера изменения структурного состояния пластид с балансом ферментативной активности

с очевидностью вытекает, что деструкция лейкопластов при автолизе сопровождается резким нарастанием энзиматической активности. Это обстоятельство свидетельствует, что ферменты связаны на структурах пластид, разрушение которых обуславливает их десорбцию.

Возникает вопрос о природе тех веществ, которые создают структуру пластид. На основании анализа химического состава пластид⁽³⁻⁵⁾ мы теперь хорошо знаем, что главная масса пластидного вещества состоит из белков, липоидов и пигментов. Исходя из этих данных, некоторые исследователи^(6,7) предложили даже гипотетическую структуру пластид, согласно которой молекулы липоидов и пигментов определенным образом ориентированы к образованиям, состоящим из белковых веществ. Таким образом, белковые вещества являются тем фундаментом, на котором воздвигается структура пластид.

Если это предположение достоверно, то при удалении тем или иным способом липоидов и других небелковых компонентов пластид мы должны обнаружить нечто, напоминающее тот остов, на котором возрастает структура пластидного вещества. До удаления липоидного компонента пластидного вещества мы их фиксировали по методу Чиаччио. При этом, как это видно на рис. 4, а, б, мы получаем картину с резко очерченными гранулами, связанными между собою сетчатыми образованиями. Эта картина коренным образом изменяется, если подвергнуть пластиды обработке спиртом с целью удаления липоидов.

Как это видно на рис. 4, в, после обработки пластид 96° этиловым спиртом в течение 160 час. прежняя компактность нарушается, и в поле зрения сохраняется сетчатая структура, состоящая из волокон, которые связываются отдельными зернами. После значительно более продолжительной обработки пластид спиртом (в течение 264 час.) остается слабо очерченная сетчатая структура с едва заметными остатками зерен.

Таким образом, после удаления липоидов сохраняется только лишь строма, состоящая, по видимому, из белковых веществ. Компактность создается в результате наслаивания липоидных и иных небелковых компонентов на видимом остове, состоящем из белков. Как нам представляется, адсорбция ферментов происходит именно на тех поверхностях структур, которые состоят из липоидов.

В ряде случаев, после обработки лейкопластов спиртом нами были обнаружены образования, напоминающие белковые кристаллы. В частности, после 4-суточной обработки наблюдалась картина, изображенная на рис. 4, г. Природа этого вещества и условия его воспроизводства нам еще неизвестны. Естественно, что этот вопрос может быть решен только экспериментальным путем.

Институт биохимии им. А. Н. Баха и
Лаборатория электронной микроскопии
Отделения биологических наук
Академии Наук СССР

Поступило
30 III 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, Биохимия, 13, 88 (1948).
² А. И. Опарин, Биохимия, 2, 13 (1937). ³ W. Menke, Z. wiss. Bot., 32, 273 (1938). ⁴ A. C. Neish, Biochem. J., 33, 293, 300 (1939). ⁵ A. C. Веcher, Биохимия, 12, 196 (1947). ⁶ B. Hubert, Rec. trav. bot. néerland., 32, 323 (1936).
⁷ A. Frey-Wissling, Protoplasma, 29, 279 (1937); Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas, Berlin, 1938.