

Н. М. СИСАКЯН и И. И. ФИЛИППОВИЧ

ЦИТОХРОМОКСИДАЗА ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЛАСТИД

(Представлено академиком А. И. Опариным 10 V 1949)

В современных схемах дыхания животных и дрожжевых организмов цитохромоксидазе, которая катализирует окисление цитохрома молекулярным кислородом, отводится весьма важное место (1). Факты свидетельствуют, что цитохромоксидаза с ее специфическим субстратом цитохромом С имеется в высших растениях. Однако на основании этих данных все же трудно вынести окончательное суждение о степени распространности цитохромоксидазной системы в растениях.

Поэтому нам казалось важным, помимо выяснения вопроса о нахождении цитохромоксидазной системы в отдельных клеточных элементах, получить некоторые данные о распространении этой окислительной системы в высших растениях.

Пластиды изолировались по методу Вечера (3) и Нейша (4) из различных растений. Действие цитохромпероксидазы производилось спектроскопически (5). Активность цитохромоксидазы определялась в аппарате Варбурга путем измерения количества кислорода, потребляемого системой цитохром С — гидрохинон — ферментная суспензия при ингибировании полифенолоксидазы натрий-диэтил-дитиокарбоматом. Цитохром С был получен из бычьих сердец по методу Кейлина (6).

Чтобы удостовериться в цитохромоксидазной природе исследованных нами ферментных суспензий, мы испытали влияние специфических ингибиторов на ферментативную активность тканевых суспензий. В табл. 1 приведена часть результатов из этой серии опытов.

Таблица 1

Действие специфических ингибиторов на активность цитохромоксидазы

Объекты исследования	Активность в $\mu\text{л O}_2$ за 30 мин. на 0,5 мл препарата								
	До ингибирования	При ингибировании						Нагревание при 56°	Без цитохрома С
		KCN M/100	NaN ₃ M/300	CO		SH ₂			
				в темноте	на свету				
Хромoplastы винограда	32,51	2,39	2,76	5,81	31,17	—	4,15	1,1	
Лейкопласты картофеля	39,86	5,79	1,18	4,39	30,20	10,41	0,39	0,0	
Хромoplastы моркови	74,71	5,79	3,38	—	—	12,18	7,02	0,0	

Данные табл. 1 с убедительностью показывают, что в испытанных нами пластидах действительно функционирует цитохромоксидаза, так как ее активность сильно подавляется под влиянием специфических ингибиторов.

Результаты исследования активности цитохромоксидазы в клеточных элементах различных растений представлены в табл. 2.

Таблица 2

Активность цитохромоксидазы в клеточных элементах различных растений

Объекты исследования	В $\mu\text{л O}_2$ за 30 мин. при 33° на 100 мг сух. веса			
	Тканевая кашлица	Мязга после отжатия сока при давлении 3,0-3,50 атм.	Сок после удаления пластид	Пластиды
Листья томатов в возрасте 1 мес.	116,1	15,65	0,0	517,0
Листья винограда	34,2	7,58	1,48	275,9
Листья герани	—	31,41	0,0	228,1
Клубни картофеля 3,5-месячного хранения	392,1	68,5	5,4	782,9
Клубни картофеля 5-мес. хранения, Эпикур	248,3	117,8	0,0	382,5
Клубни картофеля 5-мес. хранения, Берлихсен	110,2	75,7	3,0	421,5
Листья капусты	32,0	40,7	0,0	193,5
Свекла красная свеже-убранная	103,5	—	4,4	448,7
Корень моркови	101,1	75,6	0,0	209,0

Эти данные показывают, что как в листьях, так и в корне и клубне-плодах исследованных нами растений обнаруживается активная цитохромоксидаза. Цифры табл. 2 с наглядностью показывают, что на единицу сухого вещества на долю пластид приходится во много раз большая цитохромоксидазная активность, чем на долю всех других элементов вместе взятых.

Интересно, что после фильтрования сока действие цитохромоксидазы почти нацело исчезает. Так, активность фермента в соке из листьев томатов после удаления пластид до фильтрования выражалась в 14,2 $\mu\text{л O}_2$ на 0,5 мл сока, а после фильтрования 0,42, соответственно для листьев винограда до фильтрования активность выражалась в 5,8, а после фильтрования никакой активности не было обнаружено. Эти данные показывают, что при более полном удалении из сока структурных элементов клетки активность цитохромоксидазы либо заметно снижается, либо вовсе исчезает. Таким образом, результаты наших исследований показывают, что цитохромоксидазное действие обнаруживается только в структурных образованиях клетки и главным образом в пластидах. Если активность цитохромоксидазы преимущественно связана со структурными образованиями клетки, то разрыв адсорбционных связей фермента с липопротеидным комплексом пластид естественно должен привести к изменению ферментной активности.

Для проверки этого положения и исходя из ранее установленных данных (7-11) мы, в целях нарушения адсорбционных связей, подвергли пластиды продолжительному центрифугированию в фосфатном буфере, автолизу и осмотическому воздействию. Центрифугирование в фосфатном буфере не привело к изменению активности цитохромоксидазы. Так, до центрифугирования активность выражалась 66,2, после центрифугирования при 1000 об/мин. в течение 30, 45, 60 и 120 мин. активность фермента, соответственно, выражалась 64,1; 67,2; 65,2 и 64,3.

Нам казалось, что отсутствие заметного влияния центрифугирования на активность фермента свидетельствует о том, что цитохромоксидаза связана с липопротеидным комплексом пластид значительно прочнее, чем, например, инвертаза, фосфорилаза, полифенолоксидаза и перокси-

даза (11). Поэтому, исходя из возможности не только поверхностной, но и глубинной адсорбции цитохромоксидазы на пластидах, мы подвергли их продолжительному автолизу, поскольку (9) автолиз вызывает деструкцию пластид.

Опыты показали, что автолиз, вызывая деструкцию пластид, одновременно обуславливает полную потерю цитохромоксидазной активности. Этот факт навел на мысль рассматривать причину инактивации цитохромоксидазы десорбцией фермента из поверхностей липопротеидного комплекса пластид. Это казалось тем более вероятным, что создание повышенного осмотического давления в окружающем пластиды растворе обуславливает выход ферментов из пластид (11).

Опыты показали, что по мере увеличения осмотической концентрации происходит сначала резкое падение, а затем и полная потеря каталитической активности цитохромоксидазы.

Таким образом, наши данные приводят к выводу, что цитохромоксидаза, в отличие от гидролаз, которые обнаруживают свою активность в элюированном состоянии, проявляет свое оксидазное действие лишь в адсорбированном на клеточных структурах состоянии.

При исследовании цитохромоксидазы нам удалось подметить факт, который с нашей точки зрения представляет значительный интерес (табл. 3).

Таблица 3

Активность цитохромоксидазы в листьях растений семенного потомства вегетативных гибридов

Объекты исследования	Фазы	Активность фермента в мл O ₂ за 30 мин. при 30° на 100 мг сух. вещ.			
		Тканевая каша	Мякоть после отжатия сока при давлении 30—35 атм.	Сок после удаления хлоропластов	Хлоропласты
Альбино рассеченнолистный (привой)	20-дневные проростки	19,4	31,1	0,0	39,0
Альбино картофельнолист. (подвой)	То же	—	70,0	0,0	282,6
Семенное потомство Альбино картоф. лист./Альбино рассеч. лист., F ₃ *	»	107,0	85,0	0,0	448,2
Семенное потомство Альбино рассеч. лист./Альбино картоф. лист., F ₃	»	10,4	25,9	1,5	24,8
Мексиканский 353 (привой)	Плодоношение	13,4	12,3	10,0	15,0
Гольден (подвой)	»	0,0	0,4	0,0	0,0
Семенное потомство Гольден/Мексиканский, F ₇	»	25,4	33,7	5,1	35,0

* Вегетативные гибриды обозначены через косую линейку. На первом месте поставлен прививочный компонент, из которого брались семена для выращивания. Независимо от того, был ли данный компонент привоем или подвоем.

Результаты исследования цитохромоксидазы в томатных растениях (табл. 3) весьма четко выявляют характер тех изменений в активности этого фермента, которые возникают в клеточных элементах ассимиляционного аппарата растений в результате вегетативной гибридизации. Указанные изменения наиболее четко проявляются в хлоропластах. Так, в хлоропластах, изолированных из листьев F₃ семенного потомства вегетативного гибрида Альбино картофельнолистный/Альбино рассеченнолистный, мы обнаруживаем значительно большую цитохромоксидазную активность, чем в прививочных компонентах вместе взятых. Прививочный компонент Альбино картофельнолистный, откуда были взяты семена, по активности цитохромоксидазы резко отличается от Альбино

рассеченнолистного. В семенном потомстве изменения произошли в сторону значительного усиления свойств того гибридного компонента, откуда были взяты семена. В другом варианте, а именно в семенном потомстве F_3 вегетативного гибрида Альбино рассеченнолистный/Альбино картофельнолистный, мы обнаруживаем показатели, близкие к таковым у Альбино рассеченнолистного, т. е. прививочного компонента, откуда были взяты семена.

Весьма существенные изменения в активности цитохромоксидазы мы обнаруживаем в семенном потомстве F_7 вегетативного гибрида Гольден/Мексиканский 353. Так, в фазе плодоношения у Гольдена, несмотря на повторные исследования, нам не удалось обнаружить цитохромоксидазного действия в различных элементах листового аппарата. Повидимому, на такой поздней фазе развития, как плодообразование, цитохромная система у Гольден не принимает участия в снабжении растительного организма активированным кислородом. В этих листьях в период массового плодоношения активирование атмосферного кислорода осуществляется, по всей вероятности, другими оксидазными системами. Однако в этой же фазе у Мексиканского 353 мы находим заметную цитохромоксидазную активность. Существенно здесь, однако, то, что в листьях гибридного растения F_7 Гольден/Мексиканский в этой же фазе развития мы обнаруживаем активную цитохромоксидазу. Таким образом, свойство, которое исчезает у Гольден в фазе плодоношения, появляется в семенном потомстве Гольден/Мексиканский 353. Свойство это возрастает в результате вегетативной гибридизации и закрепляется в семенном потомстве, т. е. наследуется.

Здесь мы имеем новое доказательство правильности мичуринского принципа о возможности и необходимости наследования свойств, приобретенных организмами в ходе их развития (12).

Вместе с цитохромоксидазой мы исследовали также и цитохромпероксидазу. Однако все наши попытки обнаружить цитохромпероксидазное действие в лейкопластах, изолированных из листьев капусты и клубней картофеля четырех различных сортов, оказались безуспешными. Действие цитохромпероксидазы не удалось наблюдать также в кашеце, мязге и соке после удаления пластид и у других растений.

Таким образом, в результате наших исследований удалось показать, что в листьях винограда, капусты, томатов и герани, а также в клубнях картофеля и в корнях моркови и свеклы содержится цитохромоксидаза. Цитохромоксидазным действием обладают только структурные образования клетки. Из всех структур наиболее сильным цитохромоксидазным действием обладают пластиды. Цитохромоксидаза прочно связана с липопротеидным комплексом пластид и проявляет свое каталитическое действие только в адсорбированном состоянии. В результате вегетативной гибридизации происходят коренные изменения в активности цитохромоксидазы. Приобретенные таким образом свойства закрепляются в потомстве, т. е. наследуются.

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

Поступило
10 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. М. Михлин, Пероксиды и пероксидазы, изд. АН СССР, 1947. ² Д. М. Михлин и П. А. Колесников, Биохимия, **12**, 452 (1947). ³ А. С. Вечер, Биохимия, **12**, 196 (1947). ⁴ A. S. Neish, Biochem. Journ., **33**, 293 (1939). ⁵ Д. Сямнер и Г. Сомерс, Химия ферментов, 1948. ⁶ D. Keilin and E. Hartree, Proc. Roy. Soc. (London), **B**, **125**, 171 (1938). ⁷ Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, Биохимия, **13**, 88 (1948). ⁸ Н. М. Сисакян и Е. Куваева, ДАН, **63**, № 1 (1948). ⁹ Н. Сисакян и А. Кобякова, ДАН, **61**, № 6 (1948). ¹⁰ Н. Сисакян и А. Кобякова, Биохимия, **14**, 86 (1949). ¹¹ Н. Сисакян и А. Кобякова, Биохимия, **14**, 86 (1949). ¹² Т. Д. Лысенко, Агробиология, 1948, стр. 607.