Доклады Академии Наук СССР
1949. Том LXVII, № 4

БИОХИМИЯ

Н. М. СИСАКЯН и А. М. КОБЯКОВА

О ФОСФОГЛЮКОМУТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАСТИД

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

При исследовании фосфорилазной активности изолированных пластид ([1]) оказалось, что убыль неорганического фосфора в процессе фосфоролиза крахмала обычно сопровождается образованием преимущественно трудно гидролизуемого органически связанного фосфора. В ряде случаев происходит также накопление легко гидролизуемого фосфорного эфира типа глюкозо-1-фосфата. При попытке выделить органически связанный фосфор было получено органическое вещество, не содержавшее легко гидролизуемого фосфора и содержавшее трудно гидролизуемый фосфор. Указанный факт навел на мысль, что соединение, содержавшее трудно гидролизуемый фосфор, повидимому, представляет собой вещество типа глюкозо-6-фосфата. Это казалось нам тем более вероятным, что в процессе фосфорилирования гликогена и крахмала происходит переход глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат. Для экспериментальной проверки указанного предположения мы поставили ряд опытов с целью выделения трудно гидролизуемого фосфорного эфира из смеси после фосфоролиза крахмала фосфорилазой хлоропластов, изолированных из листьев сахарной свеклы.

Для этой цели определенное количество крахмала было подвергнуто фосфоролизу. Затем реакционная смесь кипятилась в течение 3 мин. и к охлажденной смеси прибавлялся ацетат бария из расчета 100 г на 1 л. После осаждения неорганического фосфора раствор центрифугировался и в центрифугате производилось осаждение бариевой соли фосфорного эфира при pH = 8,5 95% этиловым спиртом. В выпавшем осадке после удаления бария и крахмала не было обнаружено глюкозо-6-фосфата.

Тогда центрифугат, полученный после осаждения спиртом предполагавшихся эфиров фосфорной кислоты, был подвергнут следующей обработке. К спиртовому раствору прибавлялся 10% уксуснокислый свинец из расчета 100 мл на 1 л. Затем он центрифугировался при 2000 об/мин. в течение 20 мин. Осадок растворялся в 50 мл 0,1 *N* HCl (pH = = 5,2 ÷ 5,4) и через этот раствор пропускался ток сероводорода в течение 1 часа. Раствор фильтровался, осадок промывался несколько раз 0,1 *N* HCl, а затем к раствору прибавлялась смесь этилового и бутилового спиртов в количестве 2 мл. Раствор фильтровался через плотный фильтр. Фильтрат освобождался от сероводорода пропусканием тока воздуха и в нем определялся фосфор. Результаты этих опытов приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 показывают, что при фосфорилазе крахмала отдиализованным ферментным препаратом хлоропластов, изолированных из листьев сахарной свеклы, образуется трудно гидролизуемый фосфорный эфир, обладающий редуцирующей способностью. Найденное соотно-

Таблица 1

Содержание трудно гидролизуемого фосфора и глюкозы (в 10 мл)

№ опытов	Фосфор глюкозо-6-фосфата в μг	Глюкоза в μг	Отношение фосфор/глюкоза	
			найдено	вычислено
I	104,0	1000	1 : 9,6	1 : 11,3
II	185,7	2200	1 : 11,84	1 : 11,3

шение между фосфором и глюкозой близко к теоретическому соотношению.

Следовательно, в результате фосфоролиза крахмала ферментным препаратом хлоропластов реакционной смеси в заметных количествах накапливается органическое вещество, содержащее трудно гидролизуемый фосфор. Соединение это обладает редуцирующей способностью.

Таким образом, уже эти результаты дали основание связывать образование эфира типа глюкозо-6-фосфата с наличием активной фосфоглюкомутазы в изолированных хлоропластах. Это тем более вероятно, что в современных схемах ферментативного образования и распада углеводов вместе с другими ферментами участвует также и фосфоглюкомутаза. Как известно, под действием этого фермента глюкозо-1-фосфат переходит в глюкозо-6-фосфат по схеме

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} \rightleftarrows \text{глюкозо-6-фосфат}$$

Состояние равновесия в этой реакции, по наблюдениям ряда авторов ([2], [3]), наступает, когда примерно 95% глюкозо-1-фосфата переходит в глюкозо-6-фосфат.

Отсутствие указаний о нахождении фосфоглюкомутазы в тканях высших растений, как нам представляется, объясняется не столько различиями путей углеводного обмена в животных и растительных организмах, сколько трудностями изолирования этого фермента из тканей растения. Наряду с этим, исходя из ранее установленных нами положений ([4–8]) о преимущественной локализации ферментов на протоплазменных структурах, нам казалось вероятным, что причины неудач в обнаружении фосфоглюкомутазы в высших растениях следует искать в локализации этого препарата на клеточных структурах.

Наше внимание прежде всего было сосредоточено на исследовании пластид. Это оправдывалось и тем, что в высших растениях обратимые превращения углеводов прежде всего осуществляются на структурах пластид. Для исследования фосфоглюкомутазы в хлоропластах последние изолировались из листьев томата сорта Микадо флоккулацией $CaCl_2$ (0,1%). Активность фосфоглюкомутазы измерялась по остаточному количеству глюкозо-1-фосфата. После гидролиза фосфата в реакционной смеси 1 *N* серной кислотой в течение 5 мин. при 100° определялся неорганический фосфат. В указанных условиях фосфорная кислота глюкозо-1-фосфата отщепляется, а фосфор глюкозо-6-фосфата не отщепляется. Фосфор определялся при помощи ступенчатого фотометра.

Реакционная смесь состояла из 0,1 мл глюкозо-1-фосфата в 0,06 *M* растворе $MgSO_4$ (pH = 7,5) + 0,2 мл 0,05 *M* раствора цистеина (pH = 7,5) + 0,1 мл суспензии пластид. До внесения суспензии пластид смесь нагревалась до 30° и после их внесения опыт производился при 30°. Угнетение фосфатазы и фосфорилазы производилось внесением в реакционную смесь NaF и флоридзина. Результаты измерения фосфоглюкомутазной активности хлоропластов представлены в табл. 2.

Во всех опытах нам удалось обнаружить фосфоглюкомутазную активность. При этом в опытах I и II, где было взято небольшое коли-

Таблица 2

Активность фосфоглюкомутазы в хлоропластах

Время действия фермента в мин.	Опыт I					Опыт II					Опыт III					Опыт IV				
	Фосфор в 0,4 мл реакционной смеси				Активность фермента в мг фосфора на 1 г сухих пластид	Время действия фермента в мин.	Фосфор в 0,4 мл реакционной смеси				Активность фермента в мг фосфора на 1 г сухих пластид	Время действия фермента в мин.	Фосфор в 0,4 мл реакционной смеси				Активность фермента в мг фосфора на 1 г сухих пластид	Время действия фермента в мин.	Фосфор в 0,4 мл реакционной смеси				Активность фермента в мг фосфора на 1 г сухих пластид
	глюкозо-1-фосфата		глюкозо-6-фосфата				глюкозо-1-фосфата		глюкозо-6-фосфата				глюкозо-1-фосфата		глюкозо-6-фосфата				глюкозо-1-фосфата		глюкозо-6-фосфата		
	в мг	в %	в мг	в %			в мг	в %	в мг	в %			в мг	в %	в мг	в %			в мг	в %	в мг	в %	
0	16,5	100	0	0	0	0	20,0	100	0	0	0	0	17,5	100	0	0	0	0	21,5	100	0	0	0
15	11,5	69,7	5	30,3	41,67	15	7,5	37,5	12,5	62,5	104,16	15	1,5	8,57	16	91,43	177,7	10	5,0	23,2	16,5	76,8	183,9
45	11,5	69,7	5	30,3	41,67	60	7,0	35,0	13,0	65,0	108,33	45	1,5	8,57	16	91,43	177,7	30	3,5	16,28	18,0	83,72	200,0
120	5,0	30,3	11,5	69,7	95,83	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45	2,5	11,63	19,0	88,37	211,1
																		60	2,5	11,63	19,0	88,37	211,1

чество хлоропластов, равновесие реакции в процессе превращения глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат наступает при значительно большей продолжительности действия фермента и не достигает того уровня, который наступает при работе с животной фосфоглюкомутазой ([2], [3]). В опытах III и IV, где было взято примерно вдвое большее количество пластид, чем в первых двух опытах, при значительно меньшей продолжительности опыта, переход глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат достигает значительных размеров и практически приближается к уровню, установленному для мышечной фосфоглюкомутазы ([3]).

Как уже было указано, равновесие в реакции перехода глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат наступает, когда примерно 95% глюкозо-1-фосфата превращается в глюкозо-6-фосфат. В опыте I через 120 мин. 70% глюкозо-1-фосфата превращается в глюкозо-6-фосфат. В опыте II через 15 мин. 63% легко гидролизуемого эфира переходит в трудно гидролизуемый эфир. В опытах III и IV, где мы брали примерно вдвое большее количество хлоропластов, уже через 15—45 мин. 89—92% глюкозо-1-фосфата превращается в глюкозо-6-фосфат. Однако, как это видно из данных табл. 2, в опыте IV через 60 мин. равновесие в реакции

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} \rightleftarrows \text{глюкозо-6-фосфат}$$

остается на прежнем уровне.

Следовательно, если в опытах Сазерлэнда ([2]) и Наяр ([3]) удалось показать, что в присутствии мышечной фосфоглюкомутазы при pH = 7 и температуре 25° устанавливается равновесие между глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом, когда реакционная смесь содержит примерно 6% глюкозо-1-фосфата и 94% глюкозо-

6-фосфата, то в наших опытах с растительной фосфоглюкомутазой это равновесие наступает при остаточном содержании глюкозо-1-фосфата в смеси в пределах 8—11%. Это, повидимому, объясняется тем, что в изолированных хлоропластах не всегда удается полностью подавить действие фосфатазы и фосфорилазы, присутствие которых естественно сказывается на фосфорном балансе реакционной смеси.

Таким образом, в изолированных хлоропластах мы обнаруживаем весьма активную фосфоглюкомутазу. Активность фосфоглюкомутазы мы выражаем здесь условными единицами в μг фосфора на 1 г свежих пластид при заданной экспозиции опыта. При этом, как видно из данных табл. 2, в пересчете на 1 г свежих пластид активность фосфоглюкомутазы колеблется в пределах от 40 до 200 μг фосфата.

В качестве активатора фосфоглюкомутазы мы брали соли магния. Для того чтобы удостовериться в том, что обнаруженные нами различия в изменении количества фосфора обусловлены действием фосфоглюкомутазы, мы исключили из опыта магний, сохранив все прочие условия. При этом, как показали наши опыты, активность фермента сильно подавляется. Весьма сбивчивые показатели получаются, если активность фосфоглюкомутазы определяется без подавления фосфорилазы и фосфатазы.

Таким образом, при фосфоролизе крахмала препаратами фосфорилазы из хлоропластов в заметных количествах накапливается органическое вещество, содержащее трудно гидролизуемый фосфор и обладающее редуцирующей способностью. Вещество это обладает свойствами глюкозо-6-фосфата. Наличие в изолированных хлоропластах активной фосфоглюкомутазы дает основание считать, что образующийся глюкозо-1-фосфат при фосфоролизе крахмала переходит в глюкозо-6-фосфат под действием фосфоглюкомутазы, которая присутствует в хлоропластах в значительных количествах.

В наших опытах состояние равновесия

Глюкозо-1-фосфат ⇄ глюкозо-6-фосфат

наступало при переходе 88—92% глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат.

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

Поступило
10 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, ДАН, **61**, № 6 (1948). [2] G. P. Colowick and E. W. Sutherland, J. Biol. Chem., **144**, 423 (1942). [3] V. A. Najjar, ibid., **175**, 281 (1948). [4] Н. Сисакян и А. Кобякова, Биохимия, **13**, 88 (1948). [5] Н. Сисакян, А. Золковер и В. Бирюзова, ДАН, **60**, № 7 (1948). [6] Н. Сисакян и Е. Куваева, ДАН, **63**, № 1 (1948). [7] Н. Сисакян и К. Чамова, ДАН, **67**, № 2 (1949). [8] Н. Сисакян и И. Филиппович, ДАН, **67**, № 3 (1949).