

Н. М. СИСАҚЯН, Э. Н. БЕЗИНГЕР и Н. А. ГУМИЛЕВСКАЯ

ОБ ИЗМЕНЕНИИ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКА ПЛАСТИД В ПРОЦЕССЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМА

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 VI 1953)

Как указывалось ранее (1), нами был выделен из лейкопластов корневой сахарной свеклы протеид. Протеид извлекался из пластид, после их обработки соляной кислотой, 75% этиловым спиртом, и осаждался при рН 5,5—6.

Электрофоретическое изучение выделенного белкового соединения показало, что оно является однородным в спиртово-гликоловом буфере при рН 3,3. В тех же условиях опыта в спиртовом извлечении из лейкопластов обнаружено по меньшей мере три белковых компонента (2). Дальнейшее изучение выделенного протеида показало, что в состав его небелковой части входят липоиды. Липоиды переходили в раствор после обработки препарата горячим этиловым спиртом и серным эфиром. В составе одного из полученных препаратов обнаружено (в %): белка 86,3; липоидов 12,1; золы 2,27. При элементарном анализе найдено (в %): С 51,50; Н 7,52; N 12,72; S 1,53; Р 0,30.

В люминесцентном микроскопе после обработки препарата флуорохромом акридином оранжевым в протеиде не было обнаружено нуклеиновых кислот.

Кроме указанных ранее 17 аминокислот (1), в составе белка на хроматограмме в бутиловом спирте показана 18-я аминокислота путем разделения «лейцинов» на лейцин и изолейцин. Выделенное белковое соединение, которое мы в дальнейшем будем обозначать как белок I, было изолировано из лейкопластов сахарной свеклы различных сортов (Верхняячка, Уладовка) и в различные сроки вегетации и хранения корней. Содержание азота в препаратах колебалось обычно от 9,3 до 10,3% на сухой вес, что зависело от количества липоидов и золы в них. Дальнейшая очистка белкового соединения приводила к потере растворимости в спирте, очевидно вследствие частичного отщепления липоидной части.

Тем же методом, что и белок I, было получено белковое соединение из хлоропластов листьев свеклы с содержанием в нем 11,9% азота на сухой вес. Белок хлоропластов подробнее не исследовался, но уже возможность его получения одним и тем же способом из лейко- и хлоропластов может служить основанием для предположения о присутствии аналогичных белков в пластидах обоих типов. Количество белка I в лейкопластах оказалось непостоянным. Оно резко менялось в зависимости от физиологического состояния корня.

Такая подвижность белка привлекла наше внимание к вопросу о том, остается ли постоянным его аминокислотный состав при развитии растения и при хранении корней.

Для решения вопроса о том, отличается ли белок I по своей природе от других белков лейкопластов, мы выделили препарат белка из спиртового извлечения другим способом, а именно, осаждением 10-кратным объемом ацетона. Полученный препарат, обозначаемый в дальнейшем как белок II, содержал 10,3% N. Белковое соединение не было исследовано электрофоретически. Однако по способу его получения можно полагать, что оно представляло собой смесь белков, переходящих в спиртовую вытяжку из пластид.

Для определения аминокислот в белках был применен количественный хроматографический метод Перейра и Серра (3) с некоторыми видоизменениями. Метод этот не может считаться точным, однако для сравнительных определений он оказался пригодным.

Гидролиз препаратов производился 6 N HCl 24 часа при слабом кипении. Очищенный от соляной кислоты и от гуминов гидролизат служил для разделения аминокислот методом хроматографии распределения на бумаге (4). В системах фенол — вода были разделены аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, гликоколл, треонин и аланин. Валин, лейцин, изолейцин и тирозин разделялись в системе *n*-бутанол — вода. Лизин и аргинин — в смеси коллидин — α -пиколин — вода (5) (см. рис. 1).

Следы растворителя после сушки бумаги при комнатной температуре удалялись промыванием ацетоном. Интенсивность окраски с нингидрином при pH 7 определялась в фото-электроколориметре (ФЭК-М1).

Таблица 1

Содержание аминокислот в белке I и в белке II (в % на сухой вес)

Аминокислоты	Белок I	Белок II
Аспарагиновая	1,8	1,4
Глутаминовая	4,3	6,2
Гликоколл	11,9	8,0
Серин		
Треонин	7,3	5,6
Тирозин	4,4	4,5
Валин		
Аланин	5,8	5,6
Лейцин	5,7	4,3
Изолейцин		
Аргинин	18,1	14,9
Лизин	8,2	11,1
Цистин	+++	+

В табл. 1 представлены данные по количественному определению аминокислот в белке I и II. Все расчеты произведены в процентах на сухой вес и уравнены по азоту. Как видно из этих данных, белок I отличается от белка II по своему аминокислотному составу. Так, в белке II меньше аргинина и больше лизина, меньше лейцинов, а из оксиаминокислот меньше треонина и серина в сумме с гликоколом; значительно больше глутаминовой кислоты. Белки также отличаются по содержанию цистина. Цистин показан на рис. 2, где представлены хроматограммы гидролизатов двух белков: I — в центре и слева и II — справа. Мы видим отчетливое пятно цистина в белке I, полученном из корней в декабре, и отсутствие его в белке II, хотя концентрации белков в опытах с цистином брались совершенно одинаковые.

Выше уже отмечалось, что белок I при электрофорезе вел себя как индивидуальное соединение, белок же II является, очевидно, смесью белков. Как показало сравнительное изучение содержания аминокислот в нем, в его состав входят белки и другой природы, чем белок I.

В хроматограмме, показанной на рис. 2 налево, также отсутствует пятно цистина. Эта хроматограмма принадлежит гидролизату белка I, выделенному на ранних стадиях развития корня — в августе. В табл. 2 представлено количество аминокислот в белке I в зависимости от возраста растения. Пересчеты произведены в процентах на сухой вес и уравнены по азоту.

Мы видим, что на фоне постоянства в содержании некоторых аминокислот, таких, как аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин и аргинин, количество других аминокислот меняется.

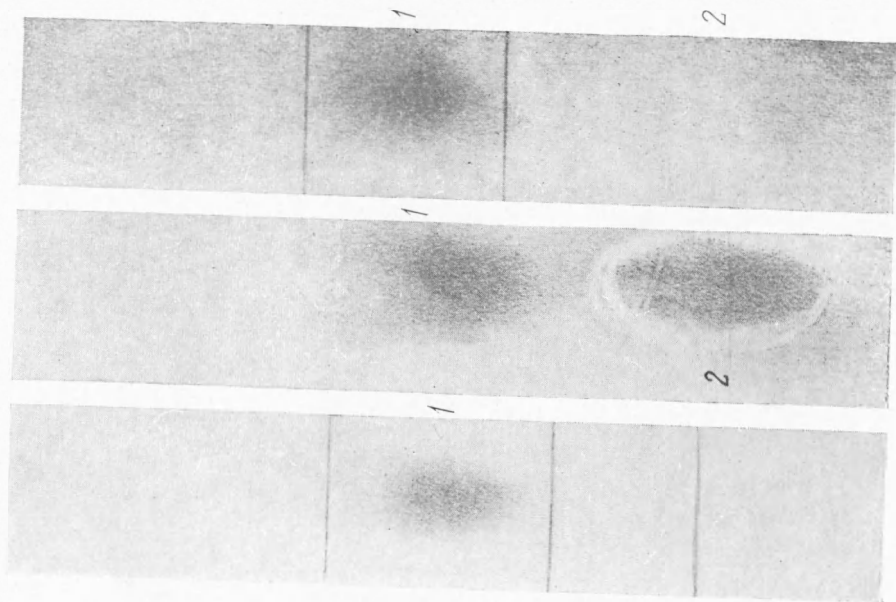


Рис. 2. *a* — белок I (получ. в августе), *б* — белок I (получ. в декабре), *в* — белок II (получ. в ноябре).
1 — глутаминовая кислота, 2 — цистин

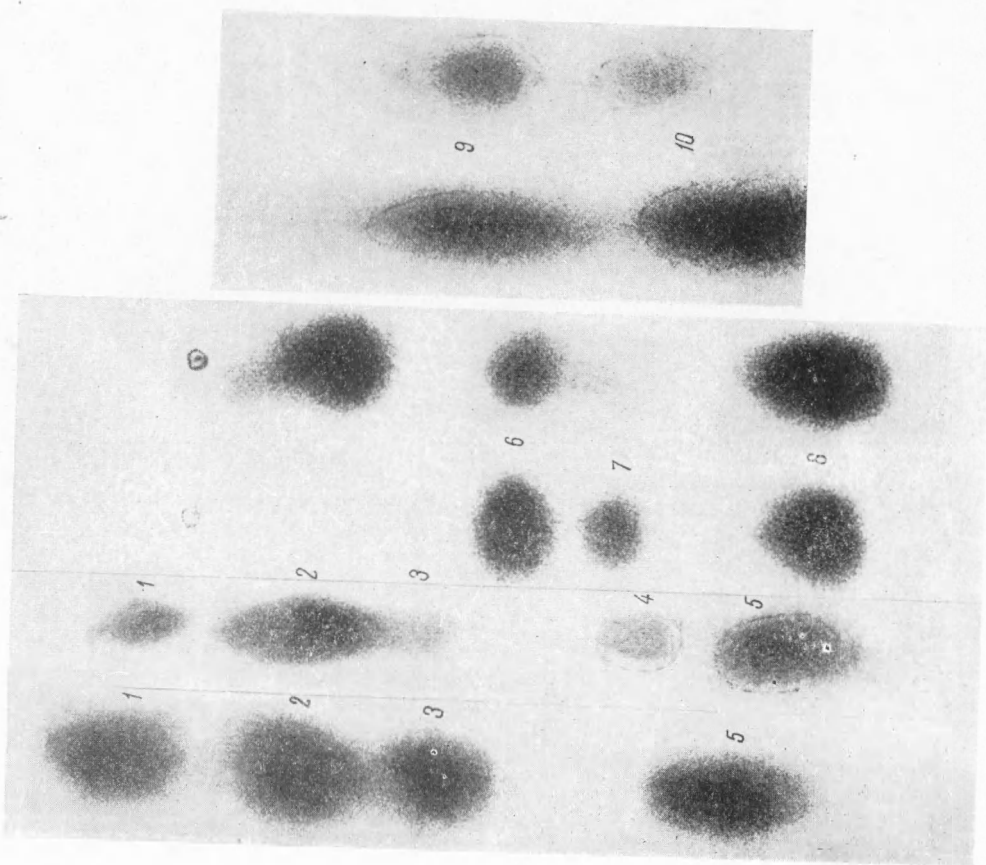


Рис. 1. 1 — глутаминовая кислота, 2 — серин, 3 — гликоколл, 4 — треонин, 5 — аланин (в феноле), 6 — валин, 7 — тирозин, 8 — лейцин (в бензильном спирте), 9 — лизин, 10 — аргинин (в коллидине — α -пикколине)

Небольшие колебания замечены для гликоколл, лизина, суммы тирозина и валина. Очень резко изменяется серин. Количество серина убывает с возрастом больше, чем в 2 раза. Надо отметить, что одновременно сильно возрастает цистин, как это следовало уже из рис. 2. Количество оксиаминокислоты треонина в декабрьском препарате увеличивается больше чем в 2 раза. Количество лейцинов в белке, напротив, вдвое уменьшается с возрастом.

Определение цистина нельзя считать правильным из-за жесткого гидролиза, которому подвергался белок. Однако и косвенные данные о количестве цистина в белке I по содержанию серы в белке, так же как и сравнительное хроматографическое определение, указывают, что в декабрьском препарате цистин возрастает примерно в 3 раза по сравнению с августовским. S в препарате, выделенном в августе, составляет 0,26% на сухой вес, в сентябре 1,53%, а в декабре 0,76%.

Таким образом, мы видим, что белок в онтогенезе растения не остается постоянным. Его молекула перестраивается. В процессе развития некоторые аминокислоты заменяются другими, а возможно, даже превращаются друг в друга. Особенно привлекает к себе внимание серин, аминокислота, несомненно, очень лабильная, стоящая в центре аминокислотного обмена. Так, доказано ее превращение в цистин и гликоколл, а возможно, и в другие аминокислоты (6). Серин найден и в липоидах как их азотистая составная часть (7). Известно, что в липоидах мозга серин претерпевает быстрые превращения (8). Изменение аминокислотного состава протоплазмальных белков с возрастом растения отмечалось рядом исследователей (9, 10). Однако определение аминокислот производилось не в индивидуальных белках, а в смеси белков, что затрудняет суждение о степени изменения белков в процессе развития организма.

Если мы обратимся к нашим данным, то обращает на себя внимание то обстоятельство, что одновременно с резким падением количества серина в белковой молекуле сильно возрастает содержание цистина и в незначительной степени гликоколл, т. е. аминокислот, в которые, как установлено, превращается серин.

Изменение в составе белков пластид представляет особый интерес в связи с исследованием их ферментативной активности. Ранее указывалось, что в связи с изменением физиологического состояния растения изменяется прочность связи ферментов с пластидами (11).

То, что изменению в молекуле белка подвергаются аминокислоты, обладающие функциональными группами (серин, треонин, цистин, возможно, и тирозин), а также аминокислоты, имеющие разветвленный углеродный скелет: лейцин, изолейцин, — еще раз заставляет обратить самое серьезное внимание на исследование белков пластид в процессе развития организма.

В связи с этим большой интерес представляет белок I как соединение, оказавшееся в высшей степени лабильным.

Все это свидетельствует о том, что в процессе развития и в связи с изменением физиологического состояния организма аминокислотный со-

Таблица 2

Содержание аминокислот в белке I в зависимости от возраста растения (в % на сухой вес)

Аминокислоты	Препарат, получ. в августе	Препарат, получ. в декабре
Аспарагиновая . . .	1,4	1,7
Глутаминовая . . .	4,1	4,1
Гликоколл	4,8	5,8
Серин	12,0	5,5
Треонин	3,0	7,0
Тирозин	6,0	3,2
Валин		1,1
Аланин	5,5	5,5
Лейцин	10,7	3,2
Изолейцин		2,2
Аргинин	17,4	17,2
Лизин	9,9	7,8
Цистин	+	+++

став белка подвергается существенным изменениям, обуславливая тем самым перестройку его функциональных свойств.

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

Поступило
28 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, Е. Б. Куваева, ДАН, **86**, 117 (1952).
² Н. М. Сисакян, С. С. Мелик-Саркисян, Э. Н. Безингер, Биохимия, **17**, 626 (1952). ³ A. Pereira, J. A. Serra, Science, **113**, 387 (1951). ⁴ R. Con-
den, A. H. Gordon, A. J. P. Martin, Bioch. J., **38**, 224 (1944). ⁵ Н. М. Си-
сакян, Э. Н. Безингер, Е. Б. Куваева, Биохимия, **16**, 358 (1951).
⁶ А. Е. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949, стр. 167,
169—172. ⁷ J. Folch, J. Biol. Chem., **139**, 973 (1941). ⁸ W. de Stetten, J.
Biol. Chem., **144**, 501 (1952). ⁹ О. П. Осипова, И. В. Тимофеева, ДАН,
67, 105 (1949). ¹⁰ L. Fowden, Bioch. J., **52**, 310 (1952). ¹¹ Н. М. Сисакян,
А. М. Кобякова, Биохимия, **17**, 368 (1952).