Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 1

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Т. Ф. АНДРЕЕВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКА В ПРОЦЕССЕ ФОТОСИНТЕЗА

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 9 II 1955)

Продолжая изучение вопроса об образовании белка хлоропластами в процессе фотосинтеза, мы проследили участие в синтезе белка не только азота ([1]), но и углерода, усваиваемого в процессе фотосинтеза. Для этой цели были использованы два изотопа: азот N^{15} и углерод C^{14}. Опыты проводились с листьями махорки. В качестве источника N^{15} употреблялся раствор 0,05 *М* сернокислого аммония, содержащий 5,5 избытка ат. % N^{15}. Последний вводился в лист через черешок, путем погружения его в раствор $(N^{15}H_4)_2SO_4$ на 15—20 час. в темноте.

Таблица 1

Увеличение содержания N^{15} и C^{14} в белках хлоропластов за время опыта (N^{15} — избыток ат. % N^{15}; C^{14} — удельная активность в имп/мг/мин)

№ опыта		Хлоропласты	
		Свет + $C^{14}O_2$	Темнота + + $C^{14}O_2$
1	C^{14}	345	1
	N^{15}	0,4218	—
2	C^{14}	414	0
	N^{15}	0,3648	0

Высечки из листьев, обогащенные таким образом N^{15}, экспонировались на свету или в темноте в присутствии радиоактивной углекислоты в течение 1—1½ час. Общая концентрация углекислоты в камере — 3% (0,01 доля всей углекислоты содержала радиоактивный углерод C^{14}). После опыта листья растирались и листовая масса разделялась на хлоропласты и плазму ([1]). Во фракции хлоропластов и плазмы выделялся белок. Белок плазмы выделялся при помощи нагревания. Белки стромы хлоропластов не извлекались тем или иным растворителем, а получались при помощи постепенной очистки фракции хлоропластов от всех веществ небелкового характера ([2]). Для этого хлоропласты последовательно обрабатывались холодным спиртом и эфиром для удаления пигментов и липоидов, затем удалялся крахмал при помощи диастаза. Белок тщательно промывался водой. Полученный белок содержал 10—11% азота. В белках хлоропластов и плазмы определялось содержание N^{15} на масс-спектрометре * и C^{14} на счетчике Гейгера — Мюллера. Результаты I серии опытов приведены в табл. 1.

Из полученных результатов видно, что радиоактивный углерод углекислоты входит в состав белков при экспозиции листьев на свету. В темноте белок хлоропластов не содержит радиоактивного углерода. Одновременно с усвоением углерода наблюдается и поступление азота N^{15} в белки хлоропластов, что указывает на новообразование белка в этих опытах. Изотоп азота N^{15} и радиоактивный углерод входят в состав белков хлоропластов в одних и тех же условиях, а именно, на свету в присутствии углекислоты, т. е. в условиях фотосинтеза.

Последующие опыты подтверждают зависимость образования белка от процесса фотосинтеза.

* Определения изотопа N^{15} проведены в Биофизическом институте Академии наук СССР Е. Г. Плышевской.

Уменьшая действием паров фенилуретана интенсивность фотосинтеза в два раза (дыхание не изменялось), мы наблюдали уменьшение синтеза белка в хлоропластах, что обнаруживалось по уменьшению поступления N^{15} и C^{14} в белок (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фенилуретана на поступление N^{15} и C^{14} в белки хлоропластов и плазмы листа (обозначения — как в табл. 1)

	Хлоропласты		Плазма	
	контроль	фенилуретан	контроль	фенилуретан
C^{14}	471	275	221	287
N^{15}	0,0407	0,0074	0,0962	0,0148

В другой серии опытов введение в лист, голодающий по азоту (табл. 3, опыты №№ 12 и 13), азотистых соединений, вызывая усиленный синтез белка, приводило и к резкому увеличению поступления C^{14} в белки хлоропластов во время фотосинтеза.

Введение азотистых соединений в лист, обеспеченный азотом, не изменяя скорости синтеза белка, также не оказывало влияния на поступление C^{14} в белок (табл. 3, опыт № 11).

Таблица 3

Содержание C^{14} (удельная активность) в белках хлоропластов и плазмы табака при введении в лист раствора $(NH_4)_2SO_4$

№ опыта	Объект	Хлоропласты		Плазма	
		контроль вода	опыт $(NH_4)_2SO_4$	контроль вода	опыт $(NH_4)_2SO_4$
11	Листья, обеспеченные азотом	173	182	161	168
12	Листья, выращенные при $^1/_2$ норме азота	212	466	253	223
13	То же	284	408	192	183

Все приведенные опыты показывают, что углерод, усвоенный в процессе фотосинтеза, обнаруживается в белке листа. Однако осталось невыясненным, вошел ли этот углерод в состав белковой молекулы, в состав ее аминокислот, или он адсорбировался на уже имевшемся белке.

Для выяснения этого вопроса, а также для того, чтобы подойти к вопросу о путях синтеза белка при фотосинтезе, было определено содержание радиоактивного углерода в аминокислотах, входящих в состав белков хлоропластов, полученных при фотосинтезе.

Для этого белок был подвергнут кислотному гидролизу, после чего аминокислоты разделялись при помощи бумажной хроматографии и определялась их радиоактивность. Радиоактивность аминокислот определялась как непосредственно на счетчике, так и при помощи получения автографов с хроматограмм (экспонирование хроматограмм с фотопленкой велось в течение 2—$2^1/_2$ мес.).

Для разделения аминокислот при одномерной хроматограмме применялась смесь бутилового спирта, уксусной кислоты и воды; при двухмерной хроматограмме вторым растворителем была смесь пиридина, изоамилового спирта и воды. Одномерные хроматограммы показали, что вся радиоактивность сосредотачивается в группе аминокислот с небольшим значением *Rf*. Кислоты с большим *Rf*, такие, как триптофан, валин, лейцин, тирозин, не обладали радиоактивностью.

Для лучшего разделения аминокислот с небольшим *Rf* были сделаны

двухмерные хроматограммы. На рис. 1 *А* дается рисунок такой двухмерной хроматограммы белка хлоропластов табака после 50-минутного фотосинтеза и на рис. 1 *Б* — отпечаток полученного с нее автографа. Как видно из последнего, радиоактивный углерод вошел в состав некоторых аминокислот белка. Наибольшая активность радиоактивного углерода сосредоточилась в аланине, серине и гликоколе.

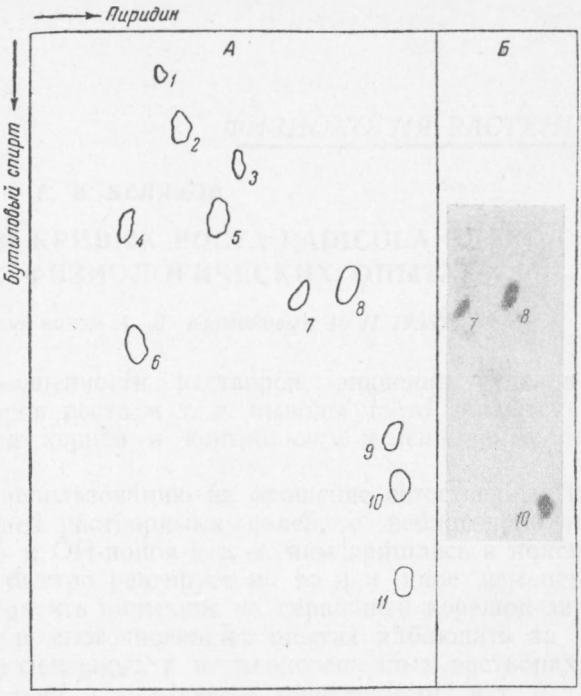


Рис. 1. *А* — двухмерная хроматограмма гидролизата белка хлоропластов табака после 50-минутного фотосинтеза; *1* — цистеин, *2* — лизин, *3* — гистидин, *4* — аргинин, *5* — аспарагиновая кислота, *6* — глютаминовая кислота, *7*—гликокол, *8*—серин, *9*—треонин, *10* — аланин, *11* — пролин; *Б* — автограф той же хроматограммы.

Полученные результаты устраняют возможные объяснения попадания радиоактивного углерода в белок в результате адсорбции на уже имевшемся белке или поступления его в белок путем простого карбоксилирования, происходящего и в темноте. Обнаружение радиоактивного углерода в аминокислотах белка указывает на безусловное участие углерода, усвоенного в процессе фотосинтеза, в образовании белковой молекулы.

Наличие радиоактивного углерода прежде всего в таких аминокислотах, как аланин, серин и гликокол, указывает на возможность прямого пути образования белка при фотосинтезе, через нестойкие промежуточные продукты — α-кетокислоты — путем непосредственного их аминирования.

Можно думать, что такой прямой путь образования белка имеет место в зеленом листе во время фотосинтеза, наряду с независимым от света путем образования белка за счет повторного использования конечного продукта фотосинтеза — углевода. На наличие такого прямого пути образования белка при фотосинтезе указывают многочисленные литературные данные ([3–11]).

В заключение выражаю глубокую благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за ценные указания при выполнении данной работы и Е. Г. Плышевской за проведение определений азота N^{15}.

Поступило
16 IX 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Т. Ф. Андреева, ДАН, 87, № 2 (1952). [2] О. П. Осипова, Изв. АН СССР, сер. биол., № 1 (1953). [3] Kabos, Extr. du Recueil des travaux bot néerland., 33 (1936). [4] В. О. Таусон, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3 (1947). [5] А. М. Печеницына, ДАН, 73, № 6 (1950). [6] Н. П. Воскресенская, ДАН, 72, № 1 (1950). [7] Т. Ф. Андреева, ДАН, 78, № 5 (1951). [8] M. Calvin, J. A. Bassham, A. A. Benson, Feder. Proceed., 9, 2 (1950). [9] Л. А. Незговорова, ДАН, 79, № 3 (1951); 85, № 6 (1952). [10] А. А. Ничипорович, Тр. Инст. физиол. раст. им. К. А. Тимирязева, 8, 1 (1953). [11] Н. П. Воскресенская, Тр. Инст. физиол. раст. им. К. А. Тимирязева, 8, 1 (1953).