Доклады Академии наук СССР
1955. Том 103, № 2

БИОХИМИЯ

А. А. КРАСНОВСКИЙ

О ФОТОХИМИЧЕСКОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ХЛОРОФИЛЛА С ЦИТОХРОМАМИ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 22 III 1955)

В работах нашей лаборатории была показана способность хлорофилла и его аналогов к реакции обратимого фотохимического восстановления, идущей с «запасанием» энергии квантов света в нестойких фотопродуктах (1). Эта реакция может быть сопряжена с переносом водорода (электрона) от молекул-доноров (обычно аскорбиновой кислоты) к пиридин-нуклеотидам, рибофлавину, ряду красителей (2).

Таким образом, в модельных условиях удалось осуществить систему реакций фотохимического переноса водорода (электрона), следующих «против» условий темнового равновесия, с образованием восстановленных форм соединений, потенциально способных участвовать в ступенчатых реакциях ферментативного восстановления углекислоты. Эти опыты дали возможность обосновать вероятную модель сопряжения фотохимических реакций хлорофилла с темновыми реакциями восстановления углекислоты через посредство пиридин-нуклеотидов (2, 3), нашедшую подтверждение в ряде последующих работ с хлоропластами и гомогенатами листьев (4).

Однако остается неясным вопрос о пути вхождения воды в систему фотохимических реакций. Если реакции хлорофилла сопряжены с восстановлением углекислоты посредством систем с высоким восстановительным потенциалом ($E_0' = -0{,}32$ в), то можно ожидать, что реакции окисления исходных доноров водорода (воды) идут с участием железо-порфириновых соединений, обычно обладающих положительной величиной E_0' (3, 6, 14). Здесь наиболее вероятно участие цитохромов, являющихся универсальными переносчиками электронов при биохимических процессах. В хлоропластах обнаружены цитохромоксидаза (5) и ряд цитохромов (6). В клетках фотосинтезирующих бактерий также обнаружены цитохромы (7); показана возможность их фотоокисления в гомогенатах бактерий (8), а также в живых клетках бактерий и водорослей (9)* и при освещении зеленых листьев (10). Наблюдалось возрастание количества окисленных форм железа в хлоропластах после фотосинтеза (11). С другой стороны, описаны опыты, в которых наблюдалось фотохимическое восстановление цитохрома *c* при реакции Хилла; в темноте хлоропласты катализировали окисление цитохрома (12). На основании этих работ пока трудно решить, является ли окисление цитохромов на свету стадией фотосинтеза или вторичной реакцией, следствием образования при фотосинтезе кислорода или иных окислителей.

* В заметке Дюйзенса (9) описано обратимое появление максимума при 515 мμ после освещения суспензии хлореллы; обращает на себя внимание близость этой величины к максимуму поглощения фотовосстановленной формы хлорофилла (1), промежуточное образование которой вероятно и в живых организмах.

В связи с работами нашей лаборатории возникает вопрос о возможных путях сопряжения окислительно-восстановительных превращений цитохромов с реакцией фотовосстановления хлорофилла. Значения окислительно-восстановительных потенциалов указывают на то, что окисленный цитохром способен легко воспринять электрон фотовосстановленной формы хлорофилла (ХН). В работах нашей лаборатории было показано окисление ХН гематином и многими другими соединениями ([13]). Существенно также выяснить возможность использования восстановленного цитохрома (цит. Fe^{++}) как донора электрона при фотовосстановлении хлорофилла. В этой реакции в качестве донора мы обычно используем аскорбиновую кислоту, обладающую $E_0' = +0{,}05$ в. В связи с этим важно, что в хлоропластах, наряду с цитохромом *f* ($E_0' = +0{,}26$ в), обнаружен цитохром *b* ($E_0' = -0{,}05$ в), превосходящий по своей восстанавливающей способности аскорбиновую кислоту ([6]). Таким образом, трудно сомневаться в возможности легкого фотохимического восстановления хлорофилла цитохромом *b*; нужно исследовать, однако, реакции хлорофилла со всеми цитохромами, в том числе с цитохромами *c* и *f*, обладающими близкими значениями окислительно-восстановительного потенциала.

В нашей работе взаимодействие между хлорофиллом и цитохромом исследовалось посредством спектрофотометрических измерений на фотоэлектрическом приборе Бекмана. Измерение превращений цитохрома в присутствии хлорофилла облегчается тем обстоятельством, что максимум поглощения цит. Fe^{++} лежит в минимуме поглощения хлорофилла.

В описанных ниже опытах использовались препараты цитохрома *c*, выделенные из сердечной мышцы быка по Кейлину и Хартри*. Опыты велись в вакуумных трубках с диаметром около 1,2 см, приспособленных для спектрофотометрических измерений. Хлорофилл a и b выделяли обычными методами из листьев крапивы.

Обычно к 5 мл исходного раствора цитохрома (главным образом цит. Fe^{+++}) в фосфатном буфере ($^1/_{15}$ *M*, pH 7,48) приливали 0,3 мл раствора хлорофила $a + b$ в этиловом спирте, концентрация которого подбиралась с таким расчетом, чтобы оптическая плотность *K* смеси при 670 мμ, т. е. в максимуме поглощения хлорофилла, лежала в пределах 0,8—1,0. При этом хлорофилл осаждается на белках цитохрома, обладая в этом состоянии максимумом поглощения при 670 мμ. Флуоресценцию раствора наблюдать не удается. Концентрация цитохрома в растворе соответствовала величине *K* при 550 мμ около 1,2 в условиях полного восстановления гидросульфитом. Описанные ниже фотореакции происходили несколько быстрее при добавлении к раствору пиридина, оказывающего, согласно нашим наблюдениям, активирующее действие на реакции хлорофилла ([1, 2]). Однако введение уже 20% пиридина приводит к медленному темновому окислению цит. Fe^{++} на воздухе.

Из раствора удаляли воздух путем 3-минутного откачивания масляным насосом при взбалтывании содержимого трубки. За ходом дальнейших реакций следили путем измерений *K* при 670 мμ (хлорофилл) и 548 мμ (цит. Fe^{++}) (см. рис. 1 и 2). При стоянии 10 мин. в темноте не наблюдалось явных превращений компонентов. При освещении раствора на термостатируемой установке лампой накаливания 500 вт через красный светофильтр RG-2 (в фокусе конденсора, около 10^6 эрг/см^2·сек) наблюдалось повышение *K* при 548 мμ с появлением соответствующего максимума цит. Fe^{++}; таким образом, про-

* Часть препаратов была любезно предоставлена нам лабораториями Д. М. Михлина и Л. А. Блюменфельда.

исходило сенсибилизированное хлорофиллом восстановление цит. Fe^{+++} за счет имеющихся в среде доноров водорода (вероятно, белки, спирт, вода). При этом наблюдалось небольшое падение K при 670 мμ за счет необратимого фотохимического разрушения хлорофилла. Молярный коэффициент погашения цит. Fe^{++} при 550 мμ приблизительно втрое меньше, чем у хлорофилла при 670 мμ; поэтому количество изменившегося хлорофилла было гораздо меньше, чем количество образовавшегося цит. Fe^{++}. После пуска воздуха в трубку и освещения наблюдалось падение K при 548 мμ, свидетельствующее о сенсибилизированном окислении цит. Fe^{++}.

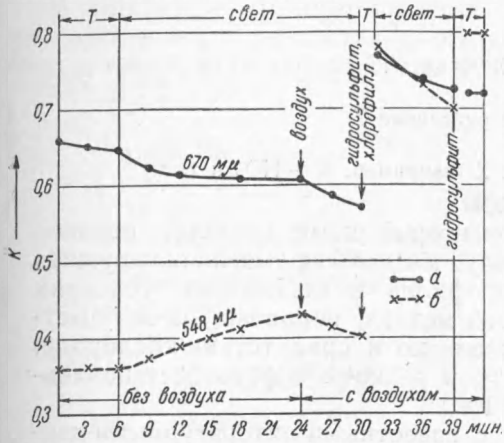


Рис. 1. Фотохимическое восстановление и окисление цитохрома, сенсибилизированное хлорофиллом. Температура 20°. 0,7 мл исходного раствора цитохрома; 4 мл фосфатного буфера ($^1/_{15}$ M, pH 7,48); 0,3 мл раствора хлорофилла в спирте. Удаление воздуха. Освещение красным светом (>620 мμ). $а$ — K в максимуме хлорофилла (670 мμ); $б$ — K цит. Fe^{++} при 548 мμ.

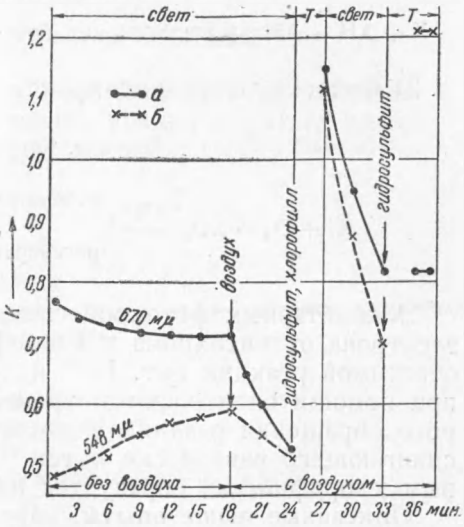


Рис. 2. Фотохимическое восстановление и окисление цитохрома, сенсибилизированное хлорофиллом в присутствии пиридина. Температура 20°. 1,0 мл исходного раствора цитохрома; 4 мл фосфатного буфера ($^1/_{15}$ M, pH 7,48); 0,3 мл раствора хлорофилла в спирте; 0,6 мл пиридина. Удаление воздуха. Освещение красным светом. $а$ — K в максимуме хлорофилла (670 мμ); $б$ — K цит. Fe^{++} при 548 мμ

Для того чтобы наблюдать эту реакцию фотоокисления цит. Fe^{++} кислородом воздуха в более явной форме, ее можно вести с предварительно восстановленным раствором цитохрома. Для этого к исходному раствору цитохрома добавляли по каплям раствор гидросульфита в буфере (pH 7,48), наблюдая при помощи спектрофотометра за ростом величины K при 548 мμ. «Спектрофотометрическое титрование» проводили, восстанавливая до 90% цитохрома, избегая, таким образом, избытка восстановителя. К раствору цитохрома добавляли спиртовый раствор хлорофилла и, в случае нужды, пиридин.

При освещении раствора через красный светофильтр в присутствии воздуха наблюдалось падение K при 548 мμ, свидетельствующее о сенсибилизированном окислении цит. Fe^{++}; введение гидросульфита после фотореакции приводило к повышению величины K при 548 мμ вследствие обратимого восстановления окисленного на свету цитохрома. Существенно, что при освещении падает также K при 670 мμ из-за сопутствующего реакции окисления хлорофилла. В тех же условиях хлорофилл без цитохрома окисляется медленнее. Следует отметить, что освещение раствора цит. Fe^{++} белым светом (без светофильтра) ведет к его медленному фотоокислению.

В работах нашей лаборатории было показано, что механизм сенсибилизированных хлорофиллом окислительно-восстановительных реакций состоит из световой стадии — восприятия молекулой хлорофилла электрона (водорода) молекулы-донора и темновой стадии — передачи электрона (водорода) от фотовосстановленной формы хлорофилла к молекуле-акцептору ([2], [3], [15]). В соответствии с этим можно предположить следующий элементарный механизм исследованных реакций, при которых цит. Fe^{++} и цит. Fe^{+++} могут играть роль донора и акцептора электрона (обозначения: X — хлорофилл, AH — донор электрона).

1) Фотовосстановление цитохрома

$$X + AH \xrightarrow{h\nu} AH^+ + X^-;\ X^- + \text{цит. } Fe^{+++} \rightarrow X + \text{цит. } Fe^{++};\ AH^+ \rightleftarrows A + H^+ \text{ и т. д.}$$

2) Фотоокисление цитохрома

$$X + \text{цит. } Fe^{++} \xrightarrow{h\nu} X^- + \text{цит. } Fe^{+++};$$

$$X^- + O_2 \rightarrow NO_2^- \xrightarrow{+H^+} \begin{cases} \text{необратимое окисление X} \\ \text{регенерация X (например, } X + HO_2 \text{ и т. д.)} \end{cases}$$

Элементарным фотопроцессом при второй схеме является перенос электрона от цитохрома к хлорофиллу; мы пока не смогли обнаружить обратимой реакции цит. Fe^{++} и хлорофилла в анаэробных условиях при помощи спектрофотометрического метода, вероятно, из-за быстрого обращения реакции в темноте; однако в присутствии кислорода, сдвигающего равновесие путем быстрой реакции с фотовосстановленным хлорофиллом, образуется цит. Fe^{+++}.

Описанные выше опыты, наряду с известными литературными данными, позволяют высказать предположение, что и при фотосинтезе цитохромы могут включаться в систему реакций переноса электрона, сопряженных с реакциями фотохимического переноса электрона хлорофиллом.

Приношу глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за внимание и помощь в работе.

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

Поступило
11 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Красновский, ДАН, **60**, 421 (1948). [2] А. А. Красновский, ДАН, **61**, 91 (1948); А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **67**, 325 (1949); А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, **87**, 109 (1952); В. Б. Евстигнеев, В. К. Гаврилова, ДАН, **95**, 841 (1954); **98**, 1017 (1954). [3] А. А. Красновский, Усп. биол. хим., **1**, 493 (1950); Изв. АН СССР, сер. биол., № 2 (1955). [4] W. Vishniac, S. Ochoa, Nature, **167**, 768 (1951); L. Tolmach, Arch. Biochem, **33**, 120 (1951); D. I. Arnon, Nature, **167**, 1008 (1951). [5] Н. М. Сисакян, И. И. Филиппович, ДАН, **67**, 517 (1949). [6] H. Davenport, R. Hill, Proc. Roy. Soc., **139**, 326 (1952); R. Hill, Nature, **174**, 501 (1954). [7] S. R. Elsden, M. D. Kamen, L. P. Vernon, J. Am. Chem. Soc., **75**, 6347 (1953). [8] L. P. Vernon, M. D. Kamen, Arch. Biochem. Biophys., **44**, 298 (1953). [9] L. N. M. Duysens, Science, **120**, 353 (1954). [10] H. Lundegardh, Physiol. Plantarum, **7**, 375 (1954). [11] Е. А. Бойченко, Физиол. растений, **1**, 57 (1954). [12] A. I. Rosenberg, G. Ducet, C. R., **229**, 391 (1949); **233**, 1674 (1951). [13] А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **73**, 1239 (1950). [14] Е. Рабинович, Фотосинтез, 1, ИЛ., 1951. [15] Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности, Изд. АН СССР, 1955, стр. 92.

ПОПРАВКА

В статье А. А. Красновского «О фотохимическом взаимодействии хлорофилла с цитохромами» на стр. 286 пункт 2) следует читать

2) Фотоокисление цитохрома

$$X + \text{цит. } Fe^{++} \xrightarrow{h\nu} X^- + \text{цит. } Fe^{+++};$$

необратимое окисление X

$$X^- + O_2 \rightarrow XO_2^- \xrightarrow{+H^+}$$

регенерация X (например, $X + HO_2$ и т. д.)

ДАН, т. 103, № 2