Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Н. М. СИСАКЯН и И. И. ФИЛИППОВИЧ

О СИНТЕЗЕ БЕЛКА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТАХ

Исследования последних лет показывают, что на протоплазменных структурах животных и растительных клеток осуществляется ряд биохимических синтезов. Установлено, что митохондрии высших растений способны катализировать синтез амидной связи глютамина ([1]), синтез пептидной связи глютатиона ([2]), а также включение в белки свободных аминокислот ([3]).

Роль хлоропластов в осуществлении синтеза пептидной связи остается еще невыясненной. Хлоропласты существенно отличаются по своим функциям и свойствам от пластид этиолированных растений. У разных типов пластид найдены весьма важные различия в структуре, составе белков и состоянии ферментов ([4–7]).

Вероятность участия хлоропластов в белковом синтезе обусловлена тем, что, по имеющимся экспериментальным данным, в них сосредоточена основная масса ферментов и значительная часть нуклеиновых кислот ([4, 8, 9]). Косвенным доказательством участия хлоропластов в белковом синтезе клетки являются результаты исследования ([10]), свидетельствующие о возможности первичного синтеза белка при фотосинтезе, а также установленный в последнее время ([5]) факт увеличения белкового азота пластид в процессе превращения лейкопластов в хлоропласты.

Настоящее исследование посвящено изучению синтеза белка в изолированных хлоропластах.

Пластиды изолировались двумя различными способами из листьев фасоли и сахарной свеклы:

а) Свежие тургесцентные листья пропускались через мясорубку в смесь 0,3 *М* раствора сахарозы и *М*/15 фосфатного буфера pH 5,39. Из полученной таким образом массы отжимался сок через плотное льняное полотно при давлении 200 атм. Сок центрифугировался сначала при 440 g для удаления крахмала и фрагментов клеток, а затем на суперцентрифуге Шарплесс при 30 000 об/мин. и скорости протекания жидкости 120 мл/мин, как это описано у А. С. Вечера ([11]).

б) Для опытов с использованием меченых соединений выделение пластид производилось следующим образом. Листья растирались в фарфоровой ступке в сахарозо-фосфатной среде. Суспензия отжималась через льняное полотно. Полученный сок центрифугировался при 220 g для удаления фрагментов клеток и крахмала. Надосадочная жидкость центрифугировалась вторично при 2400 g. В результате получалась гомогенная масса пластидного вещества. Все операции производились на холоду.

Белковый и небелковый азот определялись по микрокьельдалю. Во всех случаях одновременно ставилось два параллельных опыта. Азот каждой пробы определялся в трех повторностях.

Навеска хлоропластов фасоли (сорт «Латвия») суспендировалась в

0,3 *М* растворе сахарозы и *М*/15 фосфатном буфере pH 5,39. Среда во всех опытах содержала также сернокислый магний 0,0024 *М*, янтарную $1 \cdot 10^{-2}$ *М* и фумаровую $1 \cdot 10^{-2}$ *М* кислоты. Конечное pH суспензии было 5,1. В качестве антисептика при инкубации использовался тимол. Опыт сопровождался микробиологическим контролем *. После соответствующей экспозиции белки опытной смеси осаждались 20% трихлоруксусной кислотой, суспензия фильтровалась, и осадки промывались на фильтре 5% трихлоруксусной кислотой. Содержание азота определялось в осадке и фильтрате.

Таблица 1

Изменения содержания белкового и небелкового азота при инкубации пластид фасоли с лейцил-глицил-глицином (в мг азота)

Время инкубации (в сутк.)	лейцил-глицил-глицин + АТФ			
	Опыт		Контроль	
	небелк. азот	белк. азот	небелк. азот	белк. азот
0	1,98	3,14	1,45	3,21
3	1,57	3,47	1,48	3,15

Опыты показали, что при внесении в суспензию пластид лейцил-глицил-глицина (0,01 *М*) равновесие смещается в сторону гидролиза пептидной связи, что определяется увеличением небелкового и уменьшением белкового азота. При внесении одной лишь АТФ ($5 \cdot 10^{-4}$ *М*) наблюдается гидролиз собственных белков. Однако, как видно из табл. 1, при совместном добавлении в опытную смесь трипептида и АТФ в тех же концентрациях обнаруживается увеличение белкового азота с соответствующим уменьшением растворимого азота. Прирост азота белка составляет примерно 5% от общего азота. Такой же результат был получен в опытах с дипептидом глицил-глицином. Опыт был поставлен с хлоропластами листьев сахарной свеклы Уладовка второго года вегетации. Из графика (рис. 1) видно, что взятый в качестве субстрата дипептид глицил-глицин (0,01 *М*) приводит к снижению растворимого азота и увеличению азота осадка причем и в этом случае эффект наблюдается только в присутствии АТФ. Увеличение белкового азота составляет 12% от общего азота.

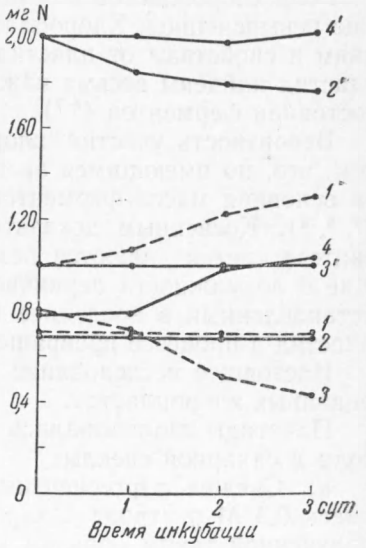


Рис. 1. Изменения содержания белкового и небелкового азота при инкубации хлоропластов (*1*—*4*) и лейкопластов (*1'*—*4'*) листьев сахарной свеклы с глицил-глицином. В присутствии глицил-глицина: *1,1'* — небелковый азот; *2,2'* — белковый азот; в присутствии глицил-глицина + АТФ: *3,3'* — небелковый азот, *4,4'* — белковый азот

При инкубации в тех же условиях лейкопластов, выделенных из этиолированных листьев сахарной свеклы, прироста белкового азота не происходит. Содержание белкового и небелкового азота лейкопластов на протяжении всей инкубации остается постоянным, так же как и в контрольных пробах с кипяченой суспензией пластид.

Наряду с определнием форм азота были поставлены опыты с изотопными индикаторами. Пластиды, выделенные из листьев фасоли 2-недельного (в первом опыте) и 3-недельного (во втором опыте) возраста, растирались в фарфоровой ступке в среде такого же состава, как и в описанных выше опытах. Полученная суспензия пластид инкубировалась с меченым глицином C^{14} (0,1 μ *М*, 315 000 имп/мин.) или глицил-глицином C^{14} (74 м*М*, 47 500 имп/мин.).

* Пользуемся случаем выразить благодарность Н. А. Помощниковой, осуществившей микробиологический контроль.

Меченый глицил-глицин был синтезирован из глицина C^{14} по методу, описанному Мороу и Сандсром [12].

После 5-часовой инкубации пластид в присутствии меченого глицина или глицил-глицина белки осаждались 20% трихлоруксусной кислотой. Суспензия центрифугировалась. Осадки промывались 25 раз 5% трихлоруксусной кислотой. Радиоактивность центрифугата исчезала после 10 промываний. Для очистки белка осадки заливались 10-кратным объемом этилового спирта и оставлялись на ночь; на следующий день промывались дважды равными объемами спирта и эфира и дважды эфиром. Обработанные таким образом белки растворялись в 2% NaOH и осаждались

Таблица 2

Включение глицил-глицина C^{14} в белки хлоропластов фасоли (в μг на 1 мг белка)

Возраст фасоли	2 недели			3 недели		
№ опыта	1	2	3	1	2	3
Радиоактивность белковых осадков после инкубации хлоропластов фасоли с глицил-глицином C^{14} + АТФ . . .	2,19	2,35	2,03	1,17	1,17	0,75

20% трихлоруксусной кислотой. После такого 3-кратного переосаждения белковый раствор наносился на диски, и последние высушивались при комнатной температуре. Определение радиоактивности производилось при помощи торцового счетчика.

Опыты показали, что после инкубации пластид фасоли с меченым глицином, а также с глицином и АТФ в белке пластид обнаруживаются лишь следы глицина, включение которого имеет явно неферментативную природу. Другие результаты получаются при внесении в суспензию пластид глицил-глицина и АТФ.

Из данных табл. 2 видно, что при инкубации хлоропластов с меченым глицил-глицином и АТФ ($5 \cdot 10^{-4}$ *M*) белки пластид обладают значительной радиоактивностью. Радиоактивность белковых осадков в зависимости от возраста фасоли соответствует включению 0,75—2,35 μг глицил-глицина C^{14} на 1 мг белка.

Таблица 3

Включение глицина C^{14} в белки фракций листьев фасоли* (радиоактивность в имп/мин. на 1 мг белка)

№ опыта	Гомогенат	Пластиды	Центрифугат после осаждения пластид	Пластиды, промытые 3 раза сахарофосфатным раствором	Пластиды, промытые + центрифугат
1	2,5	10,5	1,2	141,6	2,5
2	3,8	13,4	2,9	192,7	2,6
3	3,0	10,6	2,6	175,8	3,2

* В отличие от предыдущих опытов, данный опыт производился при pH 7,0 и инкубации 3 часа.

На основании увеличения белкового азота пластид при их инкубации с ди- и трипептидами, а также избирательного использования в качестве субстрата для синтеза белка глицил-глицина C^{14}, можно допустить, что одним из возможных путей синтеза белка является реакция транспептидазного типа, подобно открытой в животных тканях реакции переноса γ-глютамил- и глицил-остатков с различных глютамил- и глицил-пептидов на аминокислоты, пептиды и продукты гидролиза белка [13, 14].

Последующие опыты показали, что транспептидация не является единственно возможным путем синтеза белков в хлоропластах. Оказалось, что после 3-кратного промывания изолированных хлоропластов на холоду сахарозо-фосфатным раствором у пластид появляется способность включать в собственные белки свободный глицин C^{14} (табл. 3). При добавле-

нии к промытым хлоропластам центрифугата включения свободного глицина в белки пластид не происходит.

Очевидно, в клеточном соке содержатся специфические ингибиторы, препятствующие энзиматическому включению глицина C^{14} в белки хлоропластов.

В естественных условиях белковый синтез клетки обеспечивается, повидимому, благодаря сильно выраженной структурной гетерогенности протоплазмы и возникающей на этой основе разобщенности отдельных ингредиентов клеточного содержимого.

Таким образом, на основании полученных данных можно установить увеличение белкового азота при инкубации изолированных хлоропластов с ди- и трипептидами и энзиматическое включение меченого глицина в белки хлоропластов при их инкубации с меченым глицил-глицином, которое происходит в присутствии АТФ. Найдены условия для энзиматического включения в белки пластид свободного глицина.

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

Поступило
19 III 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] G. C. Webster, Plant Physiol., **28**, 724 (1953). [2] G. C. Webster, Arch. Biochem. and Biophys., **47**, 241 (1953). [3] G. C. Webster, Plant Physiol., **2**, 349 (1954). [4] Н. М. Сисакян, Ферментативная активность протоплазменных структур, Баховские чтения V, Изд. АН СССР, 1951. [5] M. De Deken-Grenson, Biochim. et Biophys. Acta, **14**, No. 2, 203 (1954). [6] Н. М. Сисакян, С. С. Мелик-Саркисян, Э. Н. Безингер, Биохимия, **17**, 5, 629 (1952). [7] Н. М. Сисакян, А. М. Кобякова, Биохимия, **17**, 3, 368 (1952). [8] Н. М. Сисакян, М. С. Одинцова, ДАН, **97**, № 1, 119 (1954). [9] Н. М. Сисакян, Усп. совр. биол., **36** (6), 332 (1953). [10] Т. Ф. Андреева, Е. Г. Плышевская, ДАН, **88**, № 2 (1952). [11] А. С. Вечер, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 271 (1949). [12] C. A. Morrow, W. M. Sandsroom, Biochem. Laboratory methods for students of the biological Science, London, 1935. [13] C. S. Hanes, J. J. Hird, F. A. Ischerwood, Nature, **166**, 288 (1950). [14] C. S. Hanes, J. J. Hird, F. A. Ischerwood, Biochem. J., **51**, 25 (1952).