

**ДОКЛАДЫ
АКАДЕМИИ НАУК СССР**

1980

ТОМ 255 № 1

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

А.А. БУЛЫЧЕВ, Н.П. ГРИШАНОВА, А.А. КОНОНЕНКО, Г.А. КУРЕЛЛА

ПОГЛОЩЕНИЕ ЭКЗОГЕННОГО КОФАКТОРА В ХЛОРОПЛАСТАХ РАСТЕНИЙ И ХРОМАТОФОРАХ БАКТЕРИЙ ПРИ ЦИКЛИЧЕСКОМ ТРАНСПОРТЕ ЭЛЕКТРОНОВ

(Представлено академиком А.Л. Курсановым 29 V 1980)

Окислительно-восстановительные реакции в мембранных системах могут быть сопряжены с трансмембранным переносом ионов (¹). Установлена связь между фотосинтетическим транспортом электронов и поглощением H^+ в изолированных хлоропластах и хроматофорах пурпурных бактерий (^{2, 3}). В настоящей работе показано, что феназинметасульфат (ФМС) — кофактор циклического транспорта электронов и фосфорилирования, существующий в водном растворе в виде одновалентного катиона метилфеназина (MF^+), транспортируется на свету из среды во внутренний объем тилакоидов и хроматофоров. Накопление опосредовано механизмом хемиосмотического типа и связано предположительно с фотовосстановлением катионной формы ФМС (MF^+) на наружной поверхности фотосинтетической мембраны и окислением полностью восстановленной или семахионной формы ФМС до катиона MF^+ на внутренней ее поверхности.

Объектом исследований служили хлоропласты гороха и хроматофоры фотосинтезирующих бактерий *Rhodospirillum rubrum*, выделенные по ранее описанным методикам (^{4, 5}). Использовали суспензии хлоропластов в среде, включающей 0,25 M сахарозу, 3 mM $MgCl_2$, 25 mM трис-HCl буфер, pH 7,7 (содержание хлорофилла 1–2 мг/мл) и препараты хроматофоров с содержанием бактериохлорофилла 1 мг/мл в 50 mM фосфатном буфере, pH 6,8. Концентрацию хлорофилла и бактериохлорофилла определяли соответственно по методу Арнона и по оптической плотности ацетонметаноловых экстрактов хроматофоров (⁶). Перед измерениями препараты хлоропластов и хроматофоров разбавляли буферным 0,25 M раствором сахарозы или дистиллированной водой до концентрации, соответствующей 30–100 мкг хлорофилла на 1 мл среды, затем вводили ФМС до концентрации 5–10 мкM

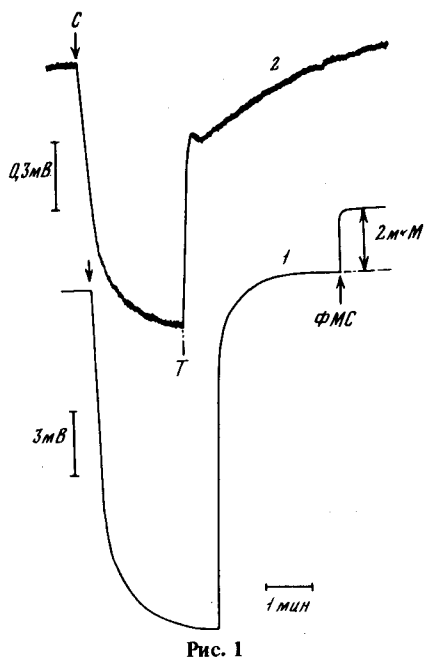


Рис. 1

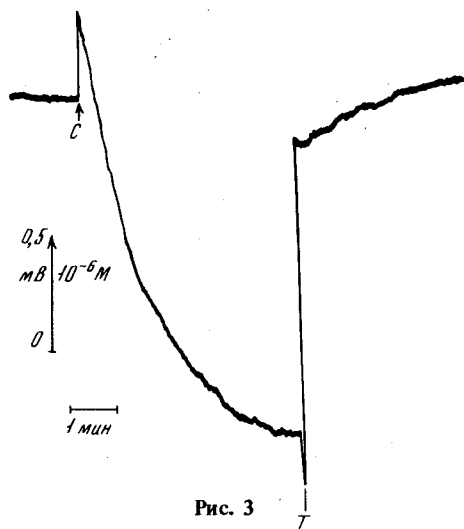


Рис. 3

Рис. 1. Фотоиндуцированные изменения концентрации метилфеназина (MФ^+) в суспензии хлоропластов, измеренные ионспецифическим электродом при pH 6,8 (1) и pH 5,2 (2); стрелками показаны моменты включения (C) и выключения (T) света, а также момент добавления в среду известного количества ФМС

Рис. 2. Предполагаемый механизм переноса ФМС через мембрану хлоропластов растений и хромофоров бактерий; MФ^+ — катионная форма ФМС (водорастворимая), MФН — полностью восстановленная форма ФМС (липофильная), $\text{MФ}^\bullet$ — семихинонная форма ФМС (липофильная); P — пигмент реакционного центра, X — акцептор; индексами m, o, i обозначены мембрана, наружная среда и внутренний объем везикул соответственно

Рис. 3. Фотоиндуцированные изменения концентрации MФ^+ в суспензии хромофоров пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum*; смещение электродного потенциала вниз соответствует уменьшению концентрации MФ^+ в среде

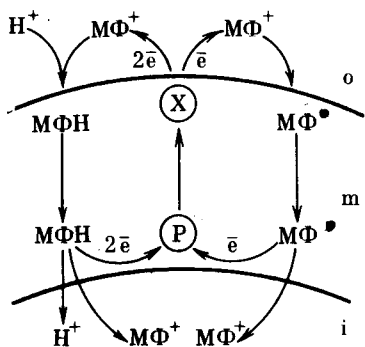


Рис. 2

и 20–50 мкМ для суспензий хлоропластов и хромофоров соответственно. Концентрацию MФ^+ в суспензии измеряли MФ^+ -специфическим электродом мембранного типа, позволяющим регистрировать динамику содержания MФ^+ в водных растворах в области концентраций свыше 10^{-7} М с временным разрешением 1–3 с (⁴). Объект освещали красным светом, не поглощаемым ФМС ($\lambda > 600$ нм, освещенность 20 000 лк).

Предварительно были выявлены особенности темнового взаимодействия ФМС с хлоропластами и хромофорами. Добавка хлоропластов к среде, содержащей 5–10 мкМ ФМС, вызывает медленное и небольшое по величине уменьшение концентрации MФ^+ , вероятно, вследствие пассивного перераспределения MФ^+ между средой и тилакоидами. При добавлении эквивалентного количества хромофоров к среде с 20 мкМ ФМС наблюдается резкое (в течение секунд) снижение наружной концентрации MФ^+ до 10 мкМ, отражающее, по-видимому, восстановление значительной части MФ^+ до незаряженной липофильной формы 5-метил-10-гидрофеназина

(МФН) и накопление ее в мембране. Учитывая отсутствие восстановителей в среде выделения и тщательную промывку хромофоров при их получении, представляется вероятным, что частичное восстановление ФМС в темновых условиях обусловлено электронно-донорными компонентами хромофоров, а не примесными компонентами среды.

Освещение хлоропластов сопровождается снижением концентрации MF^+ в среде без заметного латентного периода в течение 10–20 с, а выключение света — возрастанием концентрации до исходного уровня (рис. 1). При использовании в качестве среды суспендирования 0,25 М раствора сахарозы фотоиндуцированные изменения потенциала MF^+ -электрода составляют 10–20 мВ, что, примерно, соответствует 2-кратному уменьшению концентрации MF^+ в среде или же поглощению 100–200 нмоль MF^+ в расчете на 1 мг хлорофилла. При помещении хлоропластов в разбавленные растворы (20 мМ сахарозы, 4 мМ трис-НСl буфер, pH 7,7) фотоиндуцированные изменения потенциала MF^+ -электрода достигают 50–60 мВ, что соответствует примерно 10-кратному уменьшению наружной концентрации MF^+ . Сильная зависимость наблюдаемого эффекта от осмотического давления среды указывает, что уменьшение наружной концентрации MF^+ при действии света отражает поступление катионов MF^+ во внутренний объем тилакоида, а не обусловлено фотовосстановлением MF^+ до нейтральной формы МФН. О накоплении MF^+ в тилакоидах свидетельствует также фотовыцветание ФМС (максимум поглощения при 388 нм), не связанное с накоплением семихинонной или полностью восстановленной форм ФМС (⁷).

Учитывая данные об объеме внутритилакоидного пространства (3,3 мкл на 1 мг хлорофилла (⁸)), можно найти, что стационарная концентрация MF^+ внутри тилакоидов на свету достигает 10–20 мМ, а отношение внутренней и наружной концентраций MF^+ составляет примерно 10^4 . Поскольку накопление MF^+ происходит против градиента концентрации, то осмотическое набухание тилакоидов в разбавленных растворах облегчает поступление MF^+ внутрь и стимулирует поглощение MF^+ . Начальная скорость поглощения MF^+ из среды (4 мкмоль/мин на 1 мг хлорофилла) согласуется с предположением о связи трансмембранного переноса MF^+ с циклическим транспортом электронов, если считать, что характерное время наиболее медленной стадии в катализируемом ФМС циклическом транспорте электронов составляет 10 мс.

Механизм аккумуляции MF^+ в хлоропластах может быть представлен в виде упрощенной схемы (рис. 2), основанной на данных о функционировании пары $\text{MF}^+/\text{МФН}$ в качестве переносчика электронов и протонов (²). Согласно схеме на свету на наружной поверхности тилакоидной мембраны происходит восстановление MF^+ акцептором первой фотосистемы до полностью восстановленной (МФН) или же семихинонной ($\text{MF}^\cdot$) форм, отличающихся высокой липофильностью. Растворяясь в мембране, МФН и $\text{MF}^\cdot$ диффундируют к ее внутренней стороне и донируют электроны в реакционный центр или же ближайшим переносчикам; при этом катион MF^+ высвобождается внутрь тилакоида.

На хлоропластах, обработанных диуроном, при изменении pH среды не обнаружено корреляции между фотоиндуцированным поглощением H^+ и MF^+ . Повышение pH среды в пределах 6,6–8,0 сопровождается подавлением фотоиндуцированного поглощения H^+ и стимуляцией фотоиндуцированного поглощения MF^+ . Не исключено, что в зависимости от pH меняется вклад форм МФН и $\text{MF}^\cdot$ в трансмембранный перенос кофактора и соответственно стехиометрия переноса MF^+ и H^+ через мембрану. Предполагаемое стехиометрическое отношение MF^+/e лежит в пределах 0,5–1 (см. рис. 2).

Кинетические кривые фотоиндуцированных изменений концентрации MF^+ в суспензиях хромофоров *R. rubrum* (рис. 3) отличаются тем, что помимо от-

носителем медленной стадии, соответствующей снижению концентрации MF^+ в среде, имеется быстрая стадия повышения концентрации MF^+ в начальные моменты освещения. Стадия снижения концентрации MF^+ заметно стимулируется при разбавлении среды, подобно тому, что наблюдается в опытах с хлоропластами, а амплитуда быстрой стадии слабо зависит от осмотического давления. Быстрая стадия (увеличение концентрации MF^+) значительно усиливается в присутствии аскорбата, который переводит значительную часть MF^+ в восстановленную форму и повышает общее содержание МФН в мембранах хроматофоров. Эти данные позволяют считать, что быстрое увеличение концентрации MF^+ в суспензии при освещении отражает окисление восстановленного ФМС при его взаимодействии с реакционными центрами ⁽³⁾ и выход образующихся при этом катионов MF^+ в среду под действием возникающего на свету трансмембранного электрического потенциала.

Медленная стадия уменьшения концентрации MF^+ , по-видимому, аналогична фотоиндуцированным изменениям концентрации MF^+ в суспензии хлоропластов и отражает транспорт MF^+ внутрь хроматофоров по сходному механизму (см. рис. 2). Поскольку снижение концентрации MF^+ в среде обусловлено предположительно транспортом MF^+ против градиента концентрации и электрического потенциала, очевидно, что факторы, влияющие на величину мембранного потенциала хроматофоров должны существенно модифицировать кинетику поглощения MF^+ . В соответствии с этим было установлено, что введение в среду валиномицина (0,2 мкМ), снижающего в присутствии K^+ мембранный потенциал в хроматофорах ⁽³⁾, оказывает значительное стимулирующее действие на фотоиндуцированное поглощение MF^+ . Введение в среду NH_4Cl (5 мМ), который, как известно, снижает градиент pH на мембране хроматофоров, но повышает величину мембранного потенциала ⁽³⁾, приводит, напротив, к торможению фотоиндуцированного поглощения MF^+ . На хлоропластах, у которых по сравнению с хроматофорами стационарный уровень мембранного потенциала на свету невелик ⁽²⁾, добавление в среду валиномицина или же NH_4Cl не оказывает существенного влияния на фотоиндуцированное поглощение MF^+ .

Результаты указывают, что наблюдаемые различия в форме и амплитуде кинетических кривых фотоиндуцированных изменений концентрации MF^+ в хлоропластах и хроматофорах обусловлены, по крайней мере частично, значительным превышением мембранного потенциала хроматофоров 100–200 мВ ⁽³⁾ над уровнем мембранного потенциала хлоропластов (10–20 мВ в стационарном состоянии ⁽⁹⁾).

Не исключено, что образование градиента концентрации экзогенного кофактора на фотосинтетической мембране не является спецификой функционирования ФМС. Вполне вероятно, что аналогичные концентрационные градиенты образуются при циклическом транспорте в присутствии других кофакторов. Образование градиента концентрации MF^+ на мембране хлоропластов и хроматофоров необходимо учитывать при интерпретации многих фотобиологических эффектов, наблюдаемых в присутствии этого кофактора. Градиент концентрации MF^+ может служить движущей силой обратного переноса электронов после выключения света. Накопление высоких концентраций MF^+ внутри хроматофоров, возможно, служит причиной ФМС-зависимой фотоинактивации фосфорилирования ^(10, 11). Необходимость затраты энергии на образование трансмембранного градиента MF^+ может объяснять относительно низкий квантовый выход ФМС-зависимого фотофосфорилирования в хроматофорах бактерий ⁽¹⁾.

- ¹ P. Mitchell, Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation, Bodmin, 1966.
- ² G. Hauska, A. Trebst, In: Current Topics in Bioenergetics, v. 6, N.Y., 1977, p. 151.
- ³ Z. Gromet-Elhanan, In: Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation, Berlin, 1977, p. 637.
- ⁴ А.А. Булычев, Г.А. Курелла и др., Физиол., раст., т. 26, № 1, 20 (1979).
- ⁵ В.Д. Самуилов, Е.Н. Кондратьева, Биол. науки, № 5, 97 (1969).
- ⁶ R.K. Clayton, In: Bacterial Photosynthesis, 1963, p. 498.
- ⁷ P.H. Homann, Biochim. et biophys. acta, v. 460, № 1, 1 (1977).
- ⁸ H.W. Heldt, K. Werdan et al., ibid., v. 314, № 2, 224 (1973).
- ⁹ А.А. Булычев, В.К. Андрианов et al., ibid., v. 430, № 2, 336 (1976).
- ¹⁰ L. Slooten, C. Sybesma, ibid., v. 449, № 3, 565 (1976).
- ¹¹ N.L. Kerber, N.L. Pucheu, A.F. Garcia, FEBS Lett., v. 94, № 2, 265 (1978).