



УДК 581.132; 577.151

КВЕРЦЕТИН-ГЛИКОЗИД-КУМАРАТ — ПРИРОДНЫЙ РАЗОБЩИТЕЛЬ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ *

*Акулова Е. А., Музафаров Е. Н., Иванов Б. Н.,
Рузиева Р. Х., Шмелева В. Л.*

Институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пушкино

Исследовано действие кверцетин-гликозид-кумарата (КвГК) — флавоноида гороха — на транспорте \bar{e} , фосфорилирование и параметры протонного градиента изолированных хлоропластов гороха с двумя акцепторами: феррицианидом и NADP⁺. Полученные экспериментальные результаты дают основание классифицировать КвГК как разобщитель фотофосфорилирования (ингибирование фосфорилирования, снижение количества протонов, аккумулируемых на свету в тилакоидах, увеличение протонной проводимости фотосинтетической мембраны). Различие эффекта КвГК на транспорт электронов (ускорение фотовосстановления феррицианида и снижение NADP⁺) объясняется особенностями конечных акцепторов и способностью КвГК переносить разное количество протонов в зависимости от pH среды.

Сопряженная ЭТЦ хлоропластов трансформирует электромагнитную энергию света в химическую энергию двух стабильных соединений — АТФ и NADPH. Продуктивность световой фазы фотосинтеза, по-видимому, определяет направленность темнового обмена веществ, особенно углеродного метаболизма. В частности, есть данные, указывающие, что варьирование отношения АТФ: NADPH изменяет течение темнового метаболизма [1—3].

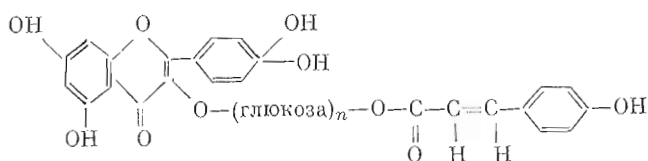
Исходя из представления о хлоропласте как о саморегулируемой системе, мы полагаем, что система располагает механизмами разной степени сложности, контролирующими сопряженную ЭТЦ. Одним из таких механизмов может являться управление специализированными веществами фенольной природы. Было высказано предположение, что фенольные ингибиторы влияют на рост растений через энергетический обмен [4]. В работах, выполненных в нашей лаборатории, показано, что фенольные соединения гороха, принадлежащие к группе флавоноидов, эффективно воздействуют на транспорт электрона и синтез АТФ в изолированных хлоропластах [5, 6].

В настоящем сообщении представлены результаты исследования действия одного из флавоноидов гороха — КвГК на транспорт электронов, протонов и синтез АТФ в изолированных хлоропластах гороха.

КвГК обнаружен нами в хлоропластах гороха, выделенных с помощью

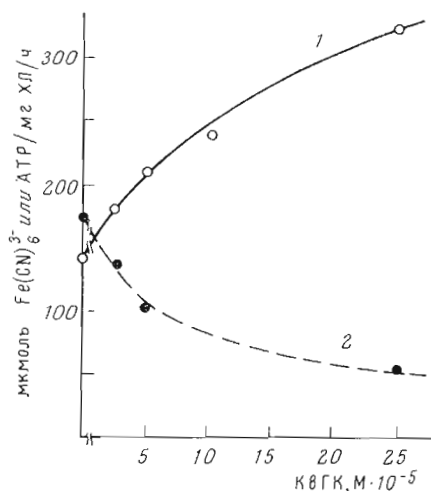
* Принятые сокращения: КвГК — кверцетин-гликозид-кумарат; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; МА — метиламин; ФЗ — флоридзин; ФС I и II — фотосистемы I и II; Хл — хлорофилл.

органических растворителей [7]. Структурная формула КвГК следующая:



КвГК имеет спектр поглощения, характерный для флавоноидов, с максимумами 270, 310 и 355 нм. Вещество хорошо растворимо в воде, метаноле и этаноле. Плохо растворимо в неполярных растворителях.

На рис. 1 представлены данные о действии КвГК в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М на базальный транспорт электронов (кривая 1) и фотофосфорилирование (кривая 2) с феррицианидом. При выборе концентраций руководствовались данными о содержании флавоноидов в хлоропластах гороха [7]. КвГК в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М ускоряет базальный перенос * электронов на 120%, а синтез АТР снижает до 33% от контроля.



Зависимость скорости фотовосстановления феррицианида (1) и фосфорилирования (2) от концентрации КвГК (состав смеси — см. табл. 1)

Чтобы понять принцип действия КвГК на фотохимические реакции хлоропластов провели сравнение КвГК с МА, разбавителем фосфорилирования, и ФЗ, ингибитором переноса энергии. В наших опытах МА и ФЗ в концентрациях, аналогичных концентрациям КвГК, не оказывали действия на исследуемые реакции. Концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М (для МА) и $1 \cdot 10^{-3}$ М (для ФЗ) были выбраны на основании данных работы [9].

Как видно из табл. 1, все три вещества усиливали фотовосстановление феррицианида в условиях базального переноса электрона (в отсутствие АДФ и P_i), МА — в 2,8 раза от контроля, а КвГК и ФЗ в одинаковой степени, но слабо — в 1,3 раза. Принято считать, что ингибиторы переноса энергии не действуют на транспорт \bar{e} в отсутствие АДФ и P_i , однако, по видимому, это верно не для всех случаев. Полученные нами данные об ускорении нефосфорилирующего переноса электрона ФЗ согласуются с результатами недавно вышедшей работы Уэст и Холла [14].

Фосфорилирующие компоненты (АДФ + P_i) стимулировали восстановление феррицианида в 2,4 раза. МА в этих условиях оказывал значительно меньше разбавляющее действие: он ускорял перенос электрона всего на 33%, а КвГК — лишь на 15%. ФЗ подавлял транспорт \bar{e} на 30%. Все три вещества ингибировали фотофосфорилирование. Наиболее эффективен как ингибитор ФЗ. КвГК в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ М подавлял синтез АТР только на 20%

Отношение $P/2\bar{e}$ в контроле равно 1,05, т. е. фосфорилирующая эффективность транспорта электронов равна 1 молекуле АТР на каждую пару перенесенных электронов. КвГК снижает эту величину до 0,71, а МА и ФЗ еще сильнее — до 0,18

* Представление о двух путях переноса электрона в хлоропластах: базальном, не сопряженном с фосфорилированием, и фосфорилирующем — было выдвинуто Гудом в 1960 г. и поддерживается рядом авторов [8—13].

Таблица 1

Действие КвГК, МА и ФЗ на восстановление феррицианида
и фотофосфорилирование

Состав реакционной смеси контроля в 2 мл пробы, мкмоль: трис-НСI буфер (рН 7,8) — 100, MgCl₂ — 10, K₂HPO₄ — 10, ADP — 1, феррицианид — 1; Хл — 15—20 мкг; время освещения — 5 мин

Вариант	Феррицианид				АТФ		P/2ē
	— ADP, P _i		+ ADP, P _i				
	мкмоль·мг· ·Хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	%	мкмоль·мг· ·Хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	%	мкмоль·мг· ·Хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	%	
Контроль	140	100	327	100	172	100	1,05
+2,5·10 ⁻⁵ М КвГК	183	130	375	115	134	78	0,71
+5·10 ⁻³ М МА	390	278	435	133	40	23	0,18
+1·10 ⁻³ М ФЗ	184	130	226	69	24	12	0,18

Таблица 2

Действие КвГК, МА и ФЗ на восстановление NADP⁺ и фотофосфорилирование

Состав реакционной смеси контроля в 2 мл пробы: те же компоненты, что в табл. 1, но без феррицианида. Кроме того, NADP⁺ — 1 мкмоль, ферредоксин — насыщающее количество (~100 мкг)

Вариант	NADP ⁺				АТФ		P/2ē
	— ADP, P _i		+ ADP, P _i				
	мкмоль·мг· ·Хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	%	мкмоль·мг· ·Хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	%	мкмоль·мг· ·Хл ⁻¹ ·ч ⁻¹	%	
Контроль	63	100	89	100	104	100	1,16
+2,5·10 ⁻⁵ М КвГК	60	95	71	80	76	73	1,07
+5·10 ⁻³ М МА	77	123	95	107	46	44	0,48
+1·10 ⁻³ ФЗ	58	92	59	66	24	23	0,40

В аналогичных опытах выяснялось действие этих же веществ на фото-восстановление NADP⁺ и сопряженное фосфорилирование (табл. 2). МА слабо ускорял базальный перенос ē — на 20%, в то время как КвГК и ФЗ незначительно подавляли. Восстановление NADP⁺, сопряженное с фосфорилированием, МА увеличивает очень незначительно — всего на 10%, а КвГК и флоридзин подавляют соответственно на 20 и 30%. Синтез АТФ исследуемые вещества снижают, наиболее сильно его ингибирует ФЗ, слабее — КвГК. КвГК практически не изменяет отношение P/2ē. В случае МА и ФЗ оно составляет соответственно 0,48 и 0,40.

Анализ представленных выше результатов показывает, что эффективность и характер действия КвГК на исследуемые реакции зависит от типа конечного акцептора. В случае феррицианида КвГК ведет себя сходно с МА, т. е. как разобщитель, так как увеличивает скорость переноса ē и подавляет фосфорилирование. Если акцептором является NADP⁺, то поведение КвГК больше похоже на поведение ФЗ, чем МА.

Наряду со спектрофотометрическим мы применили потенциометрический метод, позволивший проверить действие указанных соединений одновременно на скорость восстановления акцепторов и параметры протонного градиента [20].

Данные о стимулировании восстановления феррицианида КвГК хорошо согласуются для обоих методов (ср. рис. 1 и табл. 3). В то же время с увеличением концентрации КвГК происходит значительное уменьшение количества протонов, аккумулируемых в тилакоидах Н_{ст}, и увеличение константы, характеризующей скорость разложения протонного градиента K_T.

Таблица 3

Зависимость скорости восстановления феррицианида $d\bar{e}/dt$ и параметров протонного градиента от концентрации КвГК и МА, в процентах
 Состав смеси контроля: 0,4 М сахара, 50 мМ КСl, 5 мМ трис-НСl буфер (рН 7,3), 150—200 мкг Хл в 2 мл смеси, 0,5 мМ $K_3Fe(CN)_6$

Вариант	$d\bar{e}/dt$	$H_{ст}$	K_T	Вариант	$d\bar{e}/dt$	$H_{ст}$	K_T
—	100	100	100	$4,6 \cdot 10^{-5}$ М КвГК	175	80	172
$2,3 \cdot 10^{-6}$ М КвГК	104	97	110	$2,3 \cdot 10^{-4}$ »	275	67	215
$2,3 \cdot 10^{-5}$ »	150	88	158	$5,0 \cdot 10^{-4}$ М МА	190	80	300

Таблица 4

Скорости переноса электрона и параметры протонного градиента при восстановлении феррицианида и $NADP^+$ хлоропластами в присутствии КвГК

Состав смеси — см. табл. 3, кроме того, 0,5 мМ $NADP^+$, 150—200 мкг ферредоксина, 10^{-6} М валиномицина (контроль приют за 100%)

Условия проведения опыта	Акцептор	КвГК, М	$d\bar{e}/dt$, %	$H_{ст}$, %	K_T , %
Время реакции, мин					
0,5	$[Fe(CN)_6]^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	150	88	159
3,0	»	$2,5 \cdot 10^{-5}$	125	67	260
	$NADP^+$	—	100	100	100
0,5	»	$5 \cdot 10^{-5}$	143	64	130
3,0	»	$5 \cdot 10^{-5}$	93	43	250
Инкубация с КвГК на свету, 2 мин	$[Fe(CN)_6]^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	115	67	210
	$NADP^+$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	96	75	120
Предынкубация валиномицина + КвГК	$[Fe(CN)_6]^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	244	115	230
То же	$NADP^+$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	212	100	212

МА в концентрации на порядок большей, чем КвГК, почти в такой же степени, как и КвГК, увеличивает перенос электронов и понижает $H_{ст}$. Однако величина K_T сильно отличается для этих веществ: МА увеличивает протонную проводимость на 200, а КвГК — на 100%.

Потенциометрическим методом было обнаружено, что в присутствии КвГК есть отличия восстановления феррицианида и $NADP^+$ в первые 0,5 мин и последующие 3 мин (табл. 4). В первый период скорость транспорта \bar{e} возрастала и с тем, что с другим акцептором, а в последующий снижалась, причем с феррицианидом она оставалась выше контроля, а с $NADP^+$ — несколько ниже. Проверено, что замедление переноса электрона к $NADP^+$ не было следствием исчерпания акцептора в пробе. Быстрая стадия не обнаруживалась спектрофотометрическим методом. Это связано с условиями регистрации, в частности с наличием шумов в первый момент после включения света.

Из приведенных результатов видно, что КвГК действует в одном направлении на $H_{ст}$ и K_T с обоими акцепторами — снижает $H_{ст}$ и увеличивает K_T . На скорость переноса электрона эффект противоположный и аналогичный установленному спектрофотометрическим методом: ускорение восстановления феррицианида и ингибирование — $NADP^+$. Исключение составляет короткая стадия в начале реакции. При освещении суспензии без КвГК в течение 5—7 мин исследуемые параметры практически не изменялись при восстановлении феррицианида и $NADP^+$. Несмотря на отмеченное различие, мы предполагаем, что механизм действия КвГК одинаков в обоих случаях. Отличие же в скорости переноса электронов, по-видимому, объясняется особенностями конечных акцепторов.

После предварительной обработки хлоропластов КвГК ($2,5 \cdot 10^{-5}$ М) на свету в течение 2 мин без акцептора быстрая стадия восстановления акцептора не обнаруживается (табл. 4), а изменение параметров протонного градиента аналогично наблюдаемому с КвГК, но без предынкубации.

Обнаруженная стадийность ответа хлоропластов на добавку КвГК представляет интерес, так как, по-видимому, имеет отношение к механизму действия этого вещества. Полагаем, что быстрая фаза связана с воздействием КвГК непосредственно на АТР-синтетазу (то же, что и сопрягающий фактор — СФ). Вероятно, при предынкубации даже в отсутствие акцептора КвГК производит соответствующую подготовку АТР-синтетазы, следствием чего является частичная утрата ею синтетазной активности, выражающаяся в снижении фосфорилирования хлоропластов и, с другой стороны, в увеличении протонной проводимости мембраны.

Представляло интерес выяснить, как меняются исследуемые параметры хлоропластов при одновременном внесении в реакционную смесь КвГК и валиномицина. Известно, что антибиотик валиномицин повышает проницаемость митохондрий для K^+ и является для них эффективным разобщителем [15]. В хлоропластах валиномицин малоэффективен [16] и действует, скорее, как ингибитор переноса энергии [17]. В то же время совместное внесение валиномицина и слабых разобщителей, например динитрофенола и хлористого аммония, увеличивает степень их разобщающего действия на хлоропласты [17, 18]. Наши опыты с предынкубацией хлоропластов с валиномицином и КвГК показали, что скорость переноса \bar{e} возрастала более чем на 100%, причем скорость восстановления $NADP^+$ активировалась примерно в такой же степени, как и феррицианида (табл. 4). Следует отметить, что величины $d\bar{e}/dt$ и K_T с обоими акцепторами изменялись одинаково, в то время как $H_{ст}$ почти не изменялась по сравнению с контролем. Этот факт установлен впервые, и в дальнейшем мы предполагаем исследовать его более подробно.

Обнаруженное потенциометрическим методом увеличение протонной проводимости мембраны под действием КвГК, по-видимому, является одной из причин его разобщающего эффекта на фотофосфорилирование. Заслуживает внимания отмеченный выше факт, что действие КвГК на перенос электронов к $NADP^+$ отличается от действия принятого разобщителя МА. Полагаем, что такой эффект достигается вследствие двух причин: особых свойств КвГК как разобщителя и различий в свойствах акцепторов, которые не выявляются в присутствии МА.

КвГК — слабая кислота, может служить индикатором pH: из бесцветного в кислой среде становится ярко-желтым в щелочной. Оказалось, что область перехода для КвГК лежит в границах pH 7—10. Вещество имеет четыре ступени диссоциации, характеризующиеся pK 7,4; 8,24; 9,2 и 9,8. Поскольку наши опыты выполнялись при pH 7,8, то можно считать, что КвГК ведет себя в этих условиях как двухосновное соединение и переносит два протона, в то время как МА, по-видимому, переносит только один протон.

Таким образом, особенность КвГК как разобщителя заключается в его полипротонофорности и расширяет его возможности как вещества с регуляторной функцией. Знаменательно, что область pH, при которой это вещество активно как разобщитель, совпадает со значениями pH, оптимальными для фотофосфорилирования.

$NADP^+$ и феррицианид по классификации, предложенной в работе [13], относятся к акцепторам 1 класса. Известно, что феррицианид при восстановлении принимает один электрон, а $NADP^+$ — два электрона и один протон. Факт, что с феррицианидом КвГК действует аналогично МА, можно объяснить отсутствием конкуренции за протон между акцептором и разобщителем. В системе, восстанавливающей $NADP^+$, КвГК конкурирует с акцептором за протон, причем конкуренция сильнее проявляется в фосфорилирующих условиях, чем при базальном переносе электрона.

Можно думать, что та часть электрон-транспортных фосфорилирующих цепей, на АТР-синтетазу которых подействовал КвГК, не способна ни восстанавливать NADP^+ , ни фосфорилировать, т. е. внешне эффект аналогичен действию ингибитора переноса энергии. По существу же это не так, о чем свидетельствует уменьшение $\text{H}_{\text{ст}}$ и увеличение K_T , т. е. разобщающий эффект. Усиление восстановления NADP^+ при одновременном внесении КвГК и валиномицина можно, по-видимому, объяснить тем, что H^+ в КвГК обменивается на K^+ , после чего H^+ используется на восстановление NADP^+ .

Подводя итог вышеизложенному, можно сказать, что открыт новый природный разобщитель фотофосфорилирования — КвГК. Физиологические концентрации этого вещества довольно мягко действуют на механизм сопряжения хлоропластов, снижая в определенной степени накопление NADPH и АТР.

Экспериментальная часть

Хлоропласты выделяли из листьев 12—14-дневных проростков гороха (*Pisum sativum*) сорт Неистоцкий. 5 г охлажденных листьев с 20 мл среды выделения (0,03 М трис- HCl буфер, рН 7,4; 0,4 М сахараза; 0,01 М MgCl_2 и 0,5%-ный сывороточный альбумин) измельчали в гомогенизаторе Т-302 в течение 30 с при 12 000 об/мин. Гомогенат фильтровали через 2 слоя плотной капроновой ткани и центрифугировали 5 мин при 300 g, осадок отбрасывали, гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g. Осадок хлоропластов ресуспендировали в растворе 0,4 М сахаразы и 0,5%-ного альбумина, доведенном до рН 7,2.

Восстановление феррицианида и NADP^+ регистрировали спектрофотометрически при 420 и 340 нм соответственно на спектрофотометре «Spectord» UV VIS (ГДР), снабженном специальной световой приставкой и самописцем 1G1B. Фотофосфорилирование определяли биолюминесцентным методом [19]. $\text{H}_{\text{ст}}$, K_T , а также скорость восстановления феррицианида и NADP^+ измеряли потенциометрически с помощью стеклянного электрода [20]. Скорость электронного транспорта de/dt находили из наклона кривой подкисления среды $d\text{H}^+/dt$, причем для феррицианида принимали $de/dt = d\text{H}^+/dt$, а в случае NADP^+ — $de/dt = 2d\text{H}^+/dt$ (подробнее см. [20]). Использовали стеклянный электрод типа ЭСЛ-41-04, усилитель потенциометрический ЛПУ-01, запись проводили на самопишущем потенциометре EZ-7. Реакционную смесь объемом 2 мл, помещенную в термостатированную ячейку, интенсивно перемешивали с помощью магнитной мешалки. Константа скорости ответа измерительной системы, рассчитанная согласно работе [22], равнялась $0,9 \text{ с}^{-1}$. В случае необходимости полученные кривые перестраивались для получения истинных значений рН [20, 21]. Подкисление среды при восстановлении акцепторов не превышало 0,1 ед. рН. Это достигалось небольшим забуфериванием среды. $\text{H}_{\text{ст}}$ в стационарных условиях восстановления феррицианида и NADP^+ определяли как количество протонов, выделенных в среду после включения света. Образец освещали диапроектором ЛЭТИ-60 400 Вт лампой накаливания через водный фильтр и светофильтр КС-11 светом интенсивностью $100 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$.

КвГК получали из листьев гороха по методике, описанной в работе [22]. КвГК и МА растворяли в бидистиллированной воде, ФЗ — в этаноле.

Авторы благодарны Ю. Г. Молотковскому за предоставление флоридина и В. Т. Иванову (Институт биоорганической химии АН СССР) за предоставление валиномицина.

ЛИТЕРАТУРА

1. San Pietro A., Black C. C. (1965) Annual Rev. Plant. Physiol., 16, 165—174.
2. Тарчевский И. А., (1965) Биохимия и биофизика фотосинтеза (Красновский А. А., ред.), 305—319, «Наука», М.
3. Horvath I., Szasz K. (1956) Nature, 207, 546—547.
4. Кефели В. И., Турецкая Р. Х. (1964) Успехи соврем. биологии, 57, 99—114.
5. Акулова Е. А., Мухин Е. Н., (1971) Докл. АН СССР, 198, 956—958.
6. Акулова Е. А., Миронова Г. Д., Мухин Е. Н., Рузиева Р. Х., Мурзаева С. В., Сальникова С. П. (1972) Докл. АН СССР, 206, 988—991.
7. Рузиева Р. Х. (Депонир. от 26/X—1973 г. Регистр. № 7671—73) Фотосинтез. Проблемы и методы.
8. Cood N. E. (1960) Nature, 188, 661—662.
9. Izawa S., Good N. E. (1968) Biochim. et biophys. acta, 162, 380—391.
10. Gromet-Elhanan L. (1968) Arch. Biochem. and Biophys., 123, 447—456.
11. Horton A. A. Hall D. O. (1968) Nature, 218, 386—388.
12. Reeves S. G., Hall D. O. (1973) Biochim. et biophys. acta, 314, 66—78.
13. Saha S., Ouitrakul R., Izawa S., Good N. E. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3204—3209.
14. West J., Hall D. O. (1973) Biochem. Soc. Trans., 1 (4), 888—890.
15. Murray W. C., Begg R. W. (1959) Arch. Biochem. and Biophys., 84, 546—548.
16. Avron M., Shavit N. (1965) Biochim et biophys. acta, 109, 317—331.
17. McCarty R. E. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4292—4298.
18. Karlsh S. I. D., Avron M. (1968) FEBS Lett., 1, 21—25.
19. Акулова Е. А., Мурзаева С. В. (1973) Биохимия, 38, 901—905.
20. Иванов Б. Н., Музафаров Е. Н. (1974) Методы исследования фотосинтетического транспорта электрона (Е. А. Акулова, ред.), стр. 69—83, Пушкино.
21. Izawa S., Hind G. (1967) Biochim. et biophys. acta, 143, 377—390.
22. Кефели В. И., Турецкая Р. Х., Коф Э. М., Власов П. В. (1973). Методы определения природных регуляторов роста (Ракитин Ю. В., ред.), 7—24, «Наука», М.

Поступила в редакцию *
2.VIII.1974.

QUERCETIN-GLUCOSIDYL-P-COUMARATE NATURAL UNCOUPLER OF THE PHOTOPHOSPHORYLATION

AKULOVA E. A., MUZAFAROV E. N., IVANOV B. N.,
RUZIEVA R. Ch., SHMELEVA V. L.

*Institute of Photosynthesis, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

The effects of pea flavonoid, quercetin-glucosidyl-coumarate (QuGC), on the electron transport, photophosphorylation and parameters of proton gradient in isolated pea chloroplasts were investigated with two acceptors (NADP⁺ and ferricyanide). The experimental results allow to classify QuGC as an uncoupler of photophosphorylation: it inhibits photophosphorylation, reduces the amount of H⁺ ions accumulated by thylakoid in the light, and increases H⁺ permeability in photosynthetic membrane. The difference in QuGC effects on the electron transport (acceleration of photoreduction with ferricyanide and its decrease with NADP⁺) is closely related to the features of end acceptors and the QuGC capacity for transfer of different amounts of protons.

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия»: дата поступления — 2.V.1974 г.