

ВИЛЬВЕ ЯАСКА

АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

Ферменты, гидролизующие АТФ с выделением свободной энергии, участвуют в выполнении ряда жизненно важных функций клетки. Хорошо известна роль белков с высокой АТФ-азной активностью в двигательных реакциях животных и растений (Поглазов, 1965), что дает основание предполагать некоторое сходство их энергетических механизмов движения.

В последние годы из митохондрий животных тканей удалось выделить белок с АТФ-азной активностью, стимулирующий окислительное фосфорилирование, сопряженное с аэробным дыханием (Andreoli и др., 1965; Penefsky и др., 1960). Предполагается участие подобного фактора сопряжения и в процессах фотосинтетического фосфорилирования хлоропластов (Авгон, 1962).

Важным достижением в области выявления функций АТФ-азы было установление ее участия в активном транспорте ионов K^+ и Na^+ через различные липопротеидные мембраны животного происхождения (Post и др., 1960; Skou, 1957 и др.).

Попытки выявить аналогичную роль АТФ-азы в ионном транспорте растений до сих пор безуспешны (Bonting, Caravaggio, 1966). Тем не менее имеются многочисленные указания на то, что поглощение и активный транспорт ионов в растениях зависят от энергии, получаемой в окислительных процессах. Давно установлена связь между дыханием и поглощательной способностью корней (Steward и др., 1940; Hoagland, Broyer, 1936). После открытия циклов окислительного и фотосинтетического фосфорилирования в растениях многие авторы показали зависимость активного транспорта ионов от функционирования процессов сопряженного окислительного фосфорилирования (Hodges, Hanson, 1965; Laties, 1957) или фотосинтетического фосфорилирования (Nobel, Packer, 1965; Weigl, 1964). Первостепенное значение высокоэнергетических фосфатных связей в поглощении ионов подтверждают и опыты с известным разобщителем окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом. Как известно, 2,4-динитрофенол в значительной степени подавляет поглощение различных ионов (Бойко, 1965; Robertson и др., 1951; Higinbotham, 1959) и даже воды (Hackett, Thimann, 1950), не изменяя при том или даже стимулируя чувствительное к цианиду дыхание.

Нынешний уровень знаний не дает ответа на вопрос, каким образом энергия макроэнергетических фосфатных связей используется в активном транспорте ионов. Однако наиболее вероятно участие в этом процессе фермента, высвобождающего аккумулированную в АТФ энергию. Это

указывает на необходимость тщательного изучения свойств ферментов с АТФ-азной активностью в корне — основном органе поглощения растения. Подробное изучение свойств фермента и распределения его в тканях может содействовать выяснению его физиологической роли.

В настоящей работе представлены данные об активности и некоторых свойствах ферментной системы, гидролизующей АТФ в корнях проростков кукурузы. Результаты сравниваются с полученными ранее (Яска, 1967) на корнях проростков пшеницы.

Методика

Опыты проводились на гомогенатах восьмидневных этиолированных проростков корней кукурузы (*Zea mays* L.) сорта 'Гибрид Днепровский 98' (Центральная Синельниковская селекционно-опытная станция). Проростки выращивали по методике Э. Эпштейна и К. Хагена (Erstein, Hagen, 1952) в темноте при $22 \pm 2^\circ \text{C}$ на растворе $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$ CaSO_4 при постоянном продувании стерильного воздуха.

Для приготовления гомогената навеску корней (5—7 г) растирали в предварительно охлажденной фарфоровой ступке в присутствии очищенного кварцевого песка с 5—7-кратным объемом среды, содержащей трис-НСI буфер (0,1M) при pH 7,2 и сахарозу (0,25M).

Полученный гомогенат продавливали через ткань из тонкого планктонового шелка и выделившийся сок центрифугировали при 900 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливали небольшими порциями по отдельным пробиркам. Оставшиеся осадки дважды промывали средой для гомогенизации путем повторного центрифугирования при 900 g в течение 15 мин. Промытые осадки суспендировали в небольшом объеме среды для гомогенизации.

Выделение фракций проводили при температуре от 0 до 5° . В двух выделенных фракциях определяли содержание рибонуклеиновых (РНК) и дезоксирибонуклеиновых (ДНК) кислот, а также белка. Нуклеиновые кислоты осаждали 10-кратным объемом 95%-ного спирта при $70\text{--}80^\circ$ в течение 5 мин и разделяли селективным щелочным гидролизом 0,3 н. раствором КОН в течение 18 ч (Guinn, 1966). Концентрации РНК и ДНК определяли спектрофотометрически методом А. Спирина (1958) по разности величин оптических плотностей при 270 и 290 мк. Содержание белка во фракциях определяли после осаждения горячим спиртом (или 5%-ной ТХУ на холоде) фотометрически по методике О. Лаури (Lowry и др., 1951) с некоторыми изменениями.

АТФ-азную активность определяли по количеству выделившегося неорганического фосфора (P_n) после 20-минутного (или 40-минутного) ферментативного гидролиза субстрата при $30 \pm 0,2^\circ$. В качестве субстрата применяли препараты динатриевой соли АТФ, выпускаемые фирмой «Reanal» и имеющие 95%-ное содержание АТФ.

Состав стандартной инкубационной среды был следующим: 0,002M АТФ; 0,003M MgCl_2 ; 0,2M ацетатный или трис-НСI буфера соответствующего pH. Реакцию начинали введением в термостатированную среду 0,1 или 0,2 мл гомогената. Общий объем среды 2 мл.

Гидролиз прекращали добавлением 0,2 мл холодной 55%-ной ТХУ и быстро охлаждали. Неорганический фосфор определяли по методике Лаури-Лопеса (Lowry, Lopez, 1946) в модификации В. Скулачева (Скулачев, 1962). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 850 мк.

АТФ-азная активность выражается в микро-атомах (мкА) отщепленного P_n за единицу времени на 1 мг белка или объем гомогената.

Относительная ошибка определения АТФ-азной активности на одном и том же гомогенате в большинстве случаев составляла 2—5% и не превышала 10%. В таблицах приведены средние данные по двум параллельным инкубациям.

Результаты исследований

Характеристика выделенных функций. Путем дифференциального центрифугирования при 900 *g* в течение 20 мин гомогенат корней этиолированных проростков кукурузы разделили на две фракции. При микроскопическом рассмотрении первой фракции не было обнаружено цельных неразрушенных клеток, которые, следовательно, полностью задерживались тканью из тонкого планктонового шелка. Этой тканью, несомненно, удерживались также различные микрофибриллярные структуры и часть клеточных стенок.

Таблица 1

Распределение нуклеиновых кислот и белка по фракциям

Компонент	Содержание в мкг/г сырого веса		% первой фракции от общего
	1-я фракция	2-я фракция	
Белок	710	5950	10,6
РНК	33	346	8,7
ДНК	3	32	8,6

Как показало определение нуклеиновых кислот (табл. 1), в первой фракции содержится около 8% общего количества ДНК и РНК гомогената. Значительная часть ДНК гомогената приходится на долю второй фракции. Учитывая, что цельные ядра содержат обычно 90—96% ДНК растительных клеток (Ts'o, Sato, 1959), следует говорить о повреждении или разрушении значительного количества ядер при гомогенизации и переходе их нуклеиновых кислот во вторую фракцию. Не исключено, однако, что «теневые оболочки» ядер и наиболее крупные пластиды при центрифугировании все же оставались в первой фракции.

Имеются данные о том, что из всех клеточных структур растений при гомогенизации наиболее легко разрушаются ядра, образуя нередко длинные вытянутые нити (Wier, Stocking, 1952). В представленных результатах обращает на себя внимание небольшое количество нуклеиновых кислот и сравнительно высокое содержание белка в первой фракции.

Уже указывалось на наличие некоторого количества неотделимого белка в чистых препаратах клеточных стенок (Kivilaan и др., 1959; Setterfield, Bayley, 1961; Northcote, 1963). С другой стороны, примеси нуклеиновых кислот и белка могут быть обусловлены присутствием ядерных мембран и абсорбцией цитоплазматических белков второй фракции. Поэтому, несмотря на значительное преобладание клеточных стенок в первой фракции, ее нельзя считать вполне чистой и гомогенной, а предлагаемое нами название «фракция клеточных стенок» условно. Вторую фракцию можно соответственно называть цитоплазматической фракцией.

Зависимость от pH. Фосфатазы животных и растительных тканей в зависимости от того, при каком значении pH обнаруживается их максимальная активность, подразделяются на две весьма обширные группы: «кислые» и «щелочные» фосфатазы. Выявление максимальной ферментативной активности в кислой или щелочной области служит первой необходимой характеристикой ферментной системы.

В данной работе зависимость АТФ-азной активности от pH изучалась на двух фракциях из корней проростков кукурузы в присутствии натрий-ацетатного, трис-малеатного и трис-НСI буферов. Кривые этой зависимости приведены на рис. 1.

Следует отметить, что для первой фракции из корней кукурузы не удалось выявить максимума АТФ-азной активности в кислой среде, как это характерно для большинства растительных фосфатаз. Гидролиз АТФ

при рН 3,6—7,3 происходит сравнительно медленно и время инкубации было повышено с 20 до 40 мин. Замена ионов магния (3 мМ) ионами марганца или кобальта не привела к увеличению активности. АТФ-азная активность возрастает в щелочной среде с повышением рН до 9.

Наибольшая скорость расщепления АТФ второй фракцией наблюдается при рН 5,1. Активность падает по мере перехода в более кислую и более щелочную среду. Небольшая АТФ-азная активность, несмотря на отсутствие максимума, наблюдалась и в щелочной среде.

В последующих опытах ферментативный гидролиз АТФ в кислой среде проводился при рН 5,1 с натрий-ацетатным буфером (0,2М). В щелочной среде использовался трис-НСI буфер (0,2М).

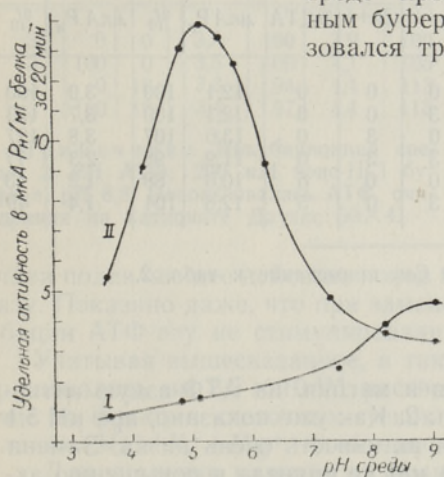


Рис. 1. Зависимость АТФ-азной активности двух фракций от рН; I — первая фракция, II — вторая фракция.

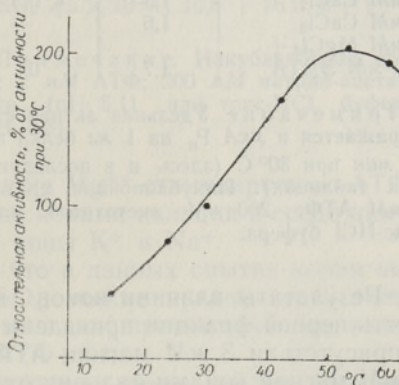


Рис. 2. Зависимость АТФ-азной активности второй фракции от температуры.

Влияние температуры. Зависимость АТФ-азной активности от температуры изучалась на гомогенате второй фракции в пределах от 14,8 до 59,9° при рН 5,1 (рис. 2). Активность при 30° принята за 100%. Как видно, скорость реакции возрастает с повышением температуры, достигает максимума около 53°, а затем начинает понижаться к 60°.

Влияние сульфгидрильных реагентов. Как известно, многие ферменты содержат сульфгидрильные группы, играющие нередко важную роль в проявлении ферментативной активности (Massart, 1950). В наших опытах изучалось влияние цистеина на предполагаемые SH-группы АТФ-азы. Кроме того, испытывалось действие меркаптидообразующего соединения *n*-хлормеркурибензоата на АТФ-азную активность второй фракции. Введение в стандартную инкубационную среду цистеина в конечной концентрации 5×10^{-4} М не оказывало существенного влияния на АТФ-азные активности первой (при рН 9,0) и второй (при рН 5,1) фракций. *n*-Хлормеркурибензоат в концентрации 1×10^{-5} М не подавлял АТФ-азную активность второй фракции.

Влияние некоторых катионов и анионов. Ионы многих металлов играют разнообразную роль в проявлении ферментативной активности белков. В случае фосфогидролаз это в первую очередь относится к двухвалентным ионам магния и кальция, действие которых весьма характерно для этих ферментов (Roche, 1950). В связи с открытием $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$ -стимулируемой АТФ-азы в различных животных тканях особый

интерес приобрело изучение влияния этих катионов на АТФ-азную активность.

Таблица 2

Влияние ионов кальция, магния и ЭДТА на АТФ-азную активность первой фракции из корней проростков кукурузы

Добавлено в мМ	Активность мКА Р _n	
	pH 5,1	pH 8,8
Контроль без добавок	1,6	≤ 0,3
3 мМ MgCl ₂	1,7	3,9
3 мМ CaCl ₂	1,5	≤ 0,3
9 мМ CaCl ₂	1,6	—
3 мМ MgCl ₂ + 5 мМ ЭДТА	1,7	0

Примечание. Удельная активность выражается в мКА Р_n на 1 мг белка за 20 мин при 30° С (здесь и в последующих таблицах). Инкубационная среда: 2 мМ АТФ; 200 мМ ацетатного или трис-НСI буфера.

Таблица 3

Влияние ионов кальция, магния и ЭДТА на АТФ-азную активность второй фракции в кислой и щелочной среде*

Концентрация, мМ			pH 5,1		pH 8,8	
Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	ЭДТА	мКА Р _n	%	мКА Р _n	%
0	0	0	12,1	100	3,0	100
3	0	0	12,1	100	3,7	123
0	3	0	13,0	107	3,8	127
3	3	0	11,9	98	2,3	77
0	0	5	10,6	88	1,3	43
3	0	5	12,6	104	1,4	49

* См. примечание к табл. 2.

Результаты влияния ионов кальция и магния на АТФ-азную активность первой фракции приведены в табл. 2. Как уже показано, при pH 5,1 в присутствии 3 мМ магния АТФ-азная активность очень низка. Замена 3 мМ магния ионами кальция от 3 до 9 мМ не привела к повышению активности. В щелочной среде ионы магния необходимы для проявления активности. При введении в среду вместо магния 3 мМ кальция АТФ практически не расщепляется. Комплексообразователь ЭДТА, связывающий двухвалентные ионы магния, полностью подавляет активность в щелочной среде и не влияет на нее в кислой среде.

В табл. 3 приведены данные о влиянии ионов кальция, магния и ЭДТА на АТФ-азную активность второй фракции. Как видно, в кислой среде АТФ-азная активность ее существенно не зависит от присутствия кальция или магния. ЭДТА при наличии в среде магния действия не оказывает, без ионов магния подавляет активность лишь в небольшой степени. Повышение концентрации ионов магния или кальция от 3 до 9 мМ не привело к заметному изменению активности (данные в таблице не представлены). При более высоких концентрациях (15—27 мМ) наблюдалось уменьшение активности на 6—15%.

В щелочной среде при pH 8,8 ионы кальция и магния оказывали небольшое стимулирующее действие, а их совместное присутствие вызывало подавление АТФ-азной активности. Под влиянием ЭДТА (5 мМ) происходит уменьшение активности как в присутствии 3 мМ магния, так и без них.

Данные о влиянии ионов натрия и калия на АТФ-азную активность обеих фракций приведены в табл. 4. Несмотря на значительное стимулирование АТФ-азы первой фракции в щелочной среде ионами магния, дальнейшего повышения активности под влиянием натрия и калия не отмечалось. Введение натрия и калия в среду инкубации второй фракции как совместно, так и в отдельности, лишь несколько повышало скорость гидролиза АТФ.

Многие авторы (Auditore, Murray, 1962; Rendi, Uhr, 1964 и др.), изучающие свойства транспортной АТФ-азы в животных тканях, отме-

Таблица 4

Влияние ионов калия и натрия на АТФ-азную активность первой и второй фракций из корней проростков кукурузы

Концентрация, мМ			1-я фракция		2-я фракция	
Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	мкАР _н	%	мкАР _н	%
3	0	0	3,5	100	3,9	100
3	100	0	3,5	100	4,1	105
3	0	10	3,3	94	4,4	113
3	100	10	3,4	97	4,4	113

Примечание. Инкубационная среда: 2 мМ АТФ; 200 мМ трис-НСl буфера, рН 8,8. Использовалась АТФ, очищенная на катионите Дауэкс 50×4.

чали подавляющее действие ионов кальция на Mg⁺⁺-стимулируемую АТФ-азу. Показано даже, что при замене магния ионами кальция в среде инкубации АТФ-азу не стимулировали более ионы K⁺ и Na⁺.

Учитывая вышесказанное, а также то, что в данных опытах корни выращивались на 2,5 × 10⁻⁴М растворе CaSO₄, можно предполагать наличие во фракции клеточных стенок ионов кальция, препятствующих выявлению Na⁺+K⁺+Mg⁺⁺-стимулируемой АТФ-азы.

Для удаления кальция из фракции клеточных стенок осадок, полученный после отделения цитоплазматической фракции, дважды промывался буферным раствором, содержащим 0,005М ЭДТА. Промытая фракция суспендировалась в растворе 0,25М сахарозы и трис-НСl буфера (0,1М) как обычно.

АТФ-азная активность полученной промытой фракции, однако, также не стимулировалась ни ионами K⁺, ни Na⁺. Таким образом, выявить присутствие Na⁺+K⁺+Mg⁺⁺-стимулируемой АТФ-азы в исследованных фракциях не удалось.

Кроме вышеупомянутых, исследовалось действие ионов меди, кобальта, марганца и цинка на АТФ-азную активность второй фракции. Как видно из табл. 5, при рН 5,1 ионы марганца, и особенно кобальта, меди и цинка вызывали понижение активности. В щелочной среде при замене ионов магния ионами марганца и кобальта наблюдалось некоторое уменьшение активности. Ионы меди при рН 8,8 подавляющего действия больше не оказывали, а наблюдалось даже небольшое стимулирование. Гидролиз АТФ в щелочной среде полностью подавлялся ионами цинка.

В табл. 6 приведены результаты опытов по изучению влияния некоторых анионов на АТФ-азную активность второй фракции. Анионы фторида и молибдата в кислой среде представляют собой сильные ингибиторы. Тетраборат, часто встречаю-

Таблица 5

Действие некоторых катионов на АТФ-азную активность второй фракции из корней проростков кукурузы

Добавляемая соль	Концентрация, М	рН 5,1		рН 8,8	
		мкАР _н	%	мкАР _н	%
0	0	14,2	100	2,7	100
CuSO ₄	2 × 10 ⁻³	7,5	53	3,1	115
MnSO ₄	5 × 10 ⁻³	12,4	87	2,1	78
CoCl ₂	5 × 10 ⁻³	12,8	90	2,1	78
ZnSO ₄	5 × 10 ⁻³	10,8	76	0	0

Примечание. Инкубационная среда: 2 мМ АТФ; 200 мМ натрий-ацетатного (рН 5,1) или трис-НСl буфера (рН 8,8).

Таблица 6

Влияние некоторых анионов на АТФ-азную активность второй фракции из корней проростков кукурузы

Добавляемая соль	Концентрация, М	рН 5,1		рН 8,8	
		мкАР _н	%	мкАР _н	%
—	—	12,9	100	3,8	100
NaF	5 × 10 ⁻³	3,4	26	2,2	58
Na ₂ MoO ₄	5 × 10 ⁻³	3,7	29	3,7	97
Na ₂ B ₄ O ₇	5 × 10 ⁻³	12,8	99	3,8	100
KCN	1 × 10 ⁻³	10,1	78	—	—

Примечание. Инкубационная среда: 2 мМ АТФ; 3 мМ Mg⁺⁺; 200 мМ натрий-ацетатного (рН 5,1) или трис-НСl буфера (рН 8,8).

щийся в составе буферных смесей, ни в кислой, ни в щелочной среде на АТФ-азную активность практически не влияет. Некоторое подавление активности отмечалось под влиянием роданида. В щелочной среде наблюдалось сильное ингибирующее действие фторида.

Таблица 7

Действие 2,4-динитрофенола (ДНФ) и флоридзина на АТФ-азную активность второй фракции из корней проростков кукурузы*

Добавленное соединение	Концентрация, М	рН 5,1		рН 8,8	
		мкА Р _н	%	мкА Р _н	%
ДНФ	0	13,7	100	2,9	100
	$7,5 \times 10^{-6}$	13,7	100	2,8	96
	$7,5 \times 10^{-5}$	12,6	92	2,8	96
	$7,5 \times 10^{-4}$	11,7	85	2,8	96
Флоридзин	0	13,1	100	2,9	100
	$7,5 \times 10^{-6}$	13,1	100	2,9	100
	$7,5 \times 10^{-5}$	12,5	95	2,6	90
	$7,5 \times 10^{-4}$	11,9	91	2,6	90

* См. примечание к табл. 6.

Таблица 8

Субстратная специфичность двух фракций из корней проростков кукурузы

рН	Субстрат	1-я фракция		2-я фракция	
		мкА Р _н	%	мкА Р _н	%
5,1	АТФ	1,9	100	11,5	100
	АДФ	1,9	100	10,2	89
	АМФ	—	—	2,7	23
	Na ₄ P ₂ O ₇	≤ 1,1	≤ 58	14,9	130
	Г-1-Ф	0	0	0	0
	β-ГФ	0	0	4,1	36
8,8	АТФ	3,4	100	3,7	100
	АДФ	≤ 0,7	≤ 20	3,3	89
	АМФ	0	0	1,0	27
	Na ₄ P ₂ O ₇	3,5	103	2,3	62
	Г-1-Ф	0	0	0	0
	β-ГФ	0	0	следы	

Примечание. Инкубационная среда: 2 мМ субстрата; 3 мМ Mg⁺⁺; 200 мМ ацетатного или трис-НСI буфера.

Влияние 2,4-динитрофенола и флоридзина. Данные о влиянии 2,4-динитрофенола и флоридзина на АТФ-азную активность второй фракции приведены в табл. 7. При рН 5,1 2,4-динитрофенол и флоридзин в наиболее высоких изученных концентрациях $7,5 \times 10^{-4}$ — $7,5 \times 10^{-5}$ М вызывают небольшое понижение активности. Более низкие концентрации эффекта не имели. При рН 9,0 динитрофенол и флоридзин практически не влияли или оказывали незначительное ингибирующее действие.

Субстратная специфичность. Как показано в табл. 8, в кислой среде обе фракции, кроме АТФ, расщепляли и АДФ. Во второй фракции выявлена также небольшая 5'-нуклеотидазная активность. Пирофосфатазная активность первой фракции ниже АТФ-азной, тогда как во второй фракции пирофосфат гидролизуеться со значительной скоростью. Следует, однако, принять во внимание, что расщепление одной молекулы пирофосфата ведет к образованию двух остатков фосфорной кислоты. Таким образом, действительная пирофосфатазная активность вдвое ниже приведенной в таблице, и следовательно, наибольшая фосфатазная активность второй фракции приходится на долю АТФ-азы. β-Глицерофосфат (β-ГФ) расщеплялся лишь второй фракцией.

В щелочной среде наиболее быстрому расщеплению подвергался АТФ. В первой фракции отмечено также наличие сравнительно высокой пирофосфатазной активности. АДФ гидролизовался в значительной степени лишь второй фракцией. β-ГФ в щелочной среде практически не расщеплялся. Глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф) не гидролизовался ни в кислой, ни в щелочной среде.

Обсуждение результатов

Согласно классификации Дж. Роше (Roche, 1950), все фосфатазы (фосфогидролазы) по ферментативным свойствам подразделяются на четыре типа. В высших и низших растениях наиболее распространены фосфатазы второго и третьего типов, проявляющие оптимальную активность при рН 5,0—5,5 или при рН 3,4—4,2; они не активизируются и даже ингибируются ионами магния. До недавнего времени многим авторам (Booth, 1944; Frey, 1954; Оно, Kongomitsu, 1957) не удавалось выявить присутствие щелочной фосфатазы в растениях, что привело к мнению об отсутствии или очень низкой активности этого типа ферментов в растительных клетках. Однако в митохондриях цветной капусты была выявлена щелочная АТФ-аза с оптимумом рН при 8 (Reid и др., 1964). Добавление магния активировало во многих органеллах клетки щелочную пиррофосфатазу с оптимальной активностью при рН 8,5—9,6 (Naganna и др., 1955; Wessels, Baltscheffsky, 1960).

Рассматривая в свете вышесказанного полученные для двух фракций кукурузы данные, можно заключить, что АТФ-азная система второй (цитоплазматической) фракции с оптимумом рН при 5,1 и отсутствием активирующего влияния ионов магния входит в группу фосфатаз второго типа. Найденный рН оптимум цитоплазматической фракции весьма близок по значению к полученному ранее (Яска, 1967) для аналогичной фракции пшеницы, где максимальная скорость расщепления АТФ наблюдалась при рН 5,4—5,7. По Ф. Хаскинсу (Haskins, 1955), наибольшая скорость ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилфосфата гомогенатом из проростков кукурузы отмечалась при рН 5,8. Фосфомоноэстеразы в гомогенате семян кукурузы, по Г. Фрею (Frey, 1954), обладали наибольшей активностью при рН 5,0.

Следует, однако, отметить, что несмотря на отсутствие максимума в щелочной среде, во второй фракции обнаружена некоторая АТФ-азная активность и при рН 8—9. Ионы магния и кальция обусловили небольшое повышение активности. Комплексообразователь ЭДТА действовал подавляюще, что могло быть вызвано связыванием присутствующих в цитоплазматической фракции двухвалентных катионов, необходимых для проявления активности в щелочной среде. Напомним, что АТФ-азная активность второй фракции пшеницы при рН 8,8 в значительной мере повышалась ионами магния или кальция (Яска, 1967).

Во фракции клеточных стенок в кислой среде была найдена лишь низкая АТФ-азная активность и наибольшая скорость гидролиза АТФ отмечалась около рН 9. АТФ-аза этой фракции при рН 8,8 стимулировалась ионами магния (но не кальция). Это указывает на присутствие во фракции клеточных стенок фосфатаз первого типа, наличие которых до сих пор приписывалось главным образом клеткам животного происхождения. Сопоставление данных АТФ-азной активности первой фракции кукурузы и изученной ранее пшеницы указывает на существование определенных различий в свойствах. Первая фракция пшеницы обладала наибольшей АТФ-азной активностью в кислой среде при рН 5,4—5,7 и значительно активировалась ионами как магния, так и кальция. Активность первой фракции кукурузы имела максимум в щелочной среде и в кислой среде не стимулировалась ионами магния и кальция.

Во многих мембранах животного происхождения установлено присутствие специфической $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$ -стимулируемой щелочной АТФ-азы, непосредственно участвующей в регулировании транспорта одновалентных катионов через мембраны (Post и др., 1960; Skou, 1957 и

др.). Несмотря на стимулирующее действие ионов магния в обеих фракциях кукурузы при pH 8,8, существенное повышение АТФ-азной активности под влиянием ионов K^+ и Na^+ осуществить не удалось.

Рассматривая субстратную специфичность фосфатаз двух изучаемых фракций кукурузы, приходим к выводу, что обе фракции гидролизуют наряду с АТФ и некоторые другие фосфатные субстраты. О весьма широком диапазоне субстратной специфичности растительных фосфогидролаз сообщают и другие авторы (Ikawa и др., 1964; Nagai, Funahashi, 1962 и др.). Как показали наши опыты, в кислой среде обе фракции расщепляют АТФ и АДФ с почти одинаковой скоростью, что свидетельствует о существовании выраженной апиразной активности. Апиразное действие может быть следствием функционирования одного неспецифического фермента, способного расщеплять как АТФ, так и АДФ. Наличие подобного фермента было выявлено (Nagai, Funahashi, 1962) в 1500-кратном очищенном препарате из отрубей пшеницы. С другой стороны, апиразная активность может проявляться в результате совместного действия двух отдельных специфических ферментов — АТФ-азы и АДФ-азы, как это было показано М. Любимовой и сотр. (Любимова и др., 1966) на листьях *Mimosa pudica*. Теоретически возможно также расщепление АТФ на аденозин-5'-фосфат (АМФ) и пирофосфат путем действия АТФ-пирофосфогидролазы (3.6.1.8), наличие которой в растениях, однако, до сих пор не было установлено (Klein, Wunster, 1957). Полученные нами данные не позволяют высказаться в пользу какого-либо конкретного механизма гидролиза АТФ фосфатазами кукурузы.

Цитоплазматическая фракция расщепляет, кроме нуклеотидов, неорганический пирофосфат и β -глицерофосфат. Последнее указывает на наличие некоторой фосфомоноэстеразной активности. Во фракции клеточных стенок пирофосфат гидролизировался в значительно меньшей степени. На аналогичной фракции пшеницы в кислой среде вообще не было обнаружено пирофосфатазной активности (Яска, 1967).

В щелочной среде фракция клеточных стенок наиболее быстро расщепляет АТФ и неорганический пирофосфат. В цитоплазматической фракции, кроме того, проявляется весьма значительная АДФ-азная активность. Обе фракции не гидролизуют Г-1-Ф ни в кислой, ни в щелочной среде.

Несмотря на несколько различную степень субстратной специфичности двух исследованных фракций, полученные данные не позволяют сделать определенного вывода относительно того, присутствуют ли в гомогенате несколько специфических ферментов или функционируют неспецифические фосфогидролазы, атакующие в зависимости от условий инкубации в большей мере те или иные субстраты.

Наконец, в связи с изучением фосфогидролазной активности фракции клеточных стенок корней проростков кукурузы следует напомнить о работе А. Кивилаана с сотр. (Kivilaan и др., 1959), выделившего очищенный препарат клеточных стенок из колеоптилей кукурузы. Клеточные стенки, изолированные по специальной методике, обладали при pH 7,5 весьма значительной АТФ-азной и пирофосфатазной активностью (Kivilaan и др., 1961). Кроме названных, гидролизу подвергался в небольшой степени и α -глицерофосфат. Сопоставление результатов показывает, что изучаемая нами фракция клеточных стенок корней кукурузы и соответствующая фракция из колеоптилей кукурузы, выделенная А. Кивилааном с сотр. (Kivilaan и др., 1959), обладают некоторыми сходными свойствами; более подробное сравнение этих двух фракций не представляется возможным.

Присутствие некоторого количества нуклеиновых кислот в выделенной нами первой фракции показывает, что она не является полностью единой фракцией клеточных стенок. Поэтому полученные нами результаты не позволяют высказаться более обобщенно об АТФ-азной активности клеточных стенок кукурузы.

Выводы

Путем дифференциального центрифугирования гомогената из корней этиолированных проростков кукурузы были выделены две фракции, условно названные фракцией клеточных стенок (первая фракция) и цитоплазматической фракцией (вторая фракция).

1. Фракция клеточных стенок характеризуется низким содержанием ДНК. Максимальная АТФ-азная активность ее наблюдается в щелочной среде около рН 9. В кислой среде скорость расщепления АТФ очень низкая.

2. Цитоплазматическая фракция проявляет максимальную АТФ-азную активность при рН 5,1. Температурный оптимум наблюдается около 53° С.

3. Для проявления АТФ-азной активности фракции клеточных стенок при рН 8,8 необходимы ионы магния. При замене их ионами кальция гидролиз АТФ практически не наблюдается.

4. АТФ-азная активность цитоплазматической фракции в кислой среде существенно не зависит от присутствия ионов магния или кальция. В щелочной среде имеет место небольшое стимулирование под влиянием этих ионов.

5. Ионы калия и натрия на АТФ-азную активность фракции клеточных стенок влияния не оказывают. АТФ-азная активность цитоплазматической фракции под влиянием ионов калия повышается лишь в небольшой степени.

6. В кислой среде ионы цинка и меди оказывают на АТФ-азную активность второй фракции подавляющий эффект. Кобальт и марганец ингибирует незначительно. В щелочной среде наблюдается их небольшое подавляющее действие. Цинк подавляет АТФ-азную активность полностью, а медь даже немного стимулирует.

7. АТФ-азная активность цитоплазматической фракции в кислой среде сильно подавляется ионами молибдата и фторида, в меньшей мере роданида. В щелочной среде молибдат подавляющего эффекта не имеет.

8. 2,4-Динитрофенол и флоридзин на АТФ-азную активность цитоплазматической фракции существенного влияния не оказывают. В повышенных концентрациях ($7,5 \times 10^{-5}$ — $7,5 \times 10^{-4}$ М) наблюдается небольшое ингибирование.

9. Обе выделенные фракции способны гидролизовать наряду с АТФ и другие фосфоангидриды и фосфомоноэфиры. В кислой среде первой фракцией расщепляются АТФ, АДФ и в небольшой степени пиродифосфат. Во второй фракции гидролизу подвергаются, кроме того, β -ГФ и АМФ. При рН 8,8 первая фракция проявляет значительную активность относительно АТФ и пиродифосфата. Цитоплазматическая фракция гидролизует с убывающей скоростью АТФ > АДФ > $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ > АМФ. Г-1-Ф не расщепляется.

ЛИТЕРАТУРА

- Бойко Л. А., 1965. Поглощение ионов солей корнями томатов в связи с выключением отдельных этапов их аэробного дыхания. Физиол. растений **12** (1) : 45—52.
- Любимова М. Н., Файн Ф. С., Демьяновская Н. С., 1966. Разделение апиразы из листьев *Mimosa pudica* на АДФ-азу и АТФ-азу, активируемую ионами марганца. Биохимия **31** (4) : 805—813.
- Поглазов Б. Ф., 1965. Структура и функции сократительных белков : 184—190. М., Изд. «Наука».
- Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи : 152—154. М., Изд. АН СССР.
- Спирин А. С., 1958. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия **23** (5) : 656—662.
- Яаска В., 1967. Биохимическая характеристика аденозинтрифосфатазной активности в корнях проростков пшеницы. Изв. АН ЭССР, Биология **16** (2) : 175—188.
- Andreoli Th. E., Lam K. W., Sanadi D. P., 1965. Studies on oxidative phosphorylation. X. A coupling enzyme which activates reversed electron transfer. J. Biol. Chem. **240** (6) : 2644—2653.
- Auditore J. V., Murray L., 1962. Cardiac (microsomal) Na⁺ + K⁺ adenosine triphosphatase and its possible relationship to the active Na⁺ + K⁺ transport system. Arch. Biochem. Biophys. **99** (3) : 372—382.
- Аврон М., 1962. Light-dependent adenosine triphosphatase in chloroplasts. J. Biol. Chem. **237** (6) : 2011—2017.
- Bonting S. L., Caravaggio L. L., 1966. Studies on Na⁺ + K⁺-activated adenosine triphosphatase. XVI. Its absence from the cation transport system of *Ulva lactuca*. Biochim. et Biophys. Acta **112** (3) : 519—523.
- Booth R. G., 1944. Cereal phosphatases. I. The assay of free wheat phosphomonoesterase and characterization of free phosphatases of wheat. Biochem. J. **38** (5) : 355—362.
- Epstein E., Hagen C. E., 1952. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. Plant Physiol. **27** (3) : 457—474.
- Frey G., 1954. Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen. Ber. Schweiz. bot. Ges. **64** : 390—452.
- Guinn G., 1966. Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. Plant Physiol. **41** (4) : 689—695.
- Hackett D. P., Thimann K. V., 1950. The action of inhibitors on water uptake by potato tissue. Plant Physiol. **25** (4) : 648—652.
- Haskins F. A., 1955. Changes in the activities of several enzymes during germination. Plant Physiol. **30** (1) : 74—78.
- Higinbotham N., 1959. The possible role of adenosine triphosphate in rubidium absorption as revealed by the influence of external phosphate, dinitrophenol and arsenate. Plant Physiol. **34** (6) : 645—650.
- Hoagland D. R., Broyer T. C., 1936. General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods. Plant Physiol. **11** (3) : 471—507.
- Hodges T. K., Hanson J. B., 1965. Calcium accumulation by maize mitochondria. Plant Physiol. **40** (1) : 101—109.
- Ikawa T., Nisizawa K., Miwa T., 1964. Specificities of several acid phosphatases from plant sources. Nature **203** (4948) : 939—940.
- Kivilaan A., Beaman T. C., Bandurski R. S., 1959. A partial chemical characterization of maize coleoptile cell walls prepared with the aid of a continually renewable filter. Nature **184** (4688) : BA. 81—BA. 82.
- Kivilaan A., Beaman T. C., Bandurski R. S., 1961. Enzymatic activities associated with cell wall preparations from corn coleoptiles. Plant Physiol. **36** (5) : 605—610.
- Klein W., Wunster E. V., 1957. Ricerche sull'apirasi della patata. II. Prodotti di scissione dell' ATP. Arch. sci. biol. **41** (5) : 461—465.
- Laties G. G., 1957. Respiration and cellular work and the regulation of respiration rate in plants. Survey Biol. Progress **3** : 215—299.
- Lowry O. H., Lopez J. A., 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. J. Biol. Chem. **162** : 421—428.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193** (1) : 265—275.
- Massart L., 1950. Enzyme inhibition. In: The Enzymes (Eds J. B. Sumner and K. Myrbäck) **1** pt. I : 307—340. N. Y., Acad. Press.
- Nagai Y., Funahashi S., 1962. Phytase (myoinositolhexaphosphate phosphohydrolase) from wheat bran. I. Purification and substrate specificity. Agric. and Biol. Chem. **26** (12) : 794—803.

- Naganna B., Raman A., Venupogal B., Sripathi C. E., 1955. Potato pyrophosphatases. *Biochem. J.* **60** (2) : 215—223.
- Nobel P. S., Packer L., 1965. Light-dependent ion translocation in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **40** (4) : 633—640.
- Northcote D. H., 1963. The nature of plant cell surfaces. In: *The Structure and Function of the Membranes and Surfaces of Cells* : 105—125. Cambridge, Univ. Press.
- Ono H., Kongamitsu Y., 1957. On the apparent relationship between acid phosphatase activity and starch content in plant tissues. I. Studies with radish root. *Sieboldia* **1** : 1—7.
- Penefsky H. S., Pullman M. E., Datta A., Racker E., 1960. Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **235** : 3330—3336.
- Post R. L., Merritt C. R., Kinsolving C. R., Albright C. D., 1960. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **235** (6) : 1796—1802.
- Reid H. B., Gentile A. C., Klein R. M., 1964. Adenosine triphosphatase activity of cauliflower mitochondria. *Plant Physiol.* **39** (6) : 1020—1023.
- Rendi R., Uhr M. L., 1964. Sodium, potassium-requiring adenosinetriphosphatase activity. I. Purification and properties. *Biochim. et Biophys. Acta* **89** (3) : 520—531.
- Robertson R. N., Wilkins M., Weeks D. S., 1951. Studies in the metabolism of plant cells. 9. The effect of 2,4-dinitrophenol on salt accumulation and salt respiration. *Austral. J. Scient. Res.* **B4** (3) : 248—264.
- Roche J., 1950. Phosphatases. In: *The Enzymes* (Eds. J. B. Sumner and K. Myrback) **1** pt. 1 : 473—510. N. Y., Acad. Press.
- Setterfield G., Bayley S. T., 1961. Structure and physiology of cell walls. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12** : 35—62.
- Skou J. C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. Biophys. Acta* **23** : 394—401.
- Steward F. C., Stout P. R., Preston C., 1940. The balance sheet of metabolites for potato discs showing the effect of salts and dissolved oxygen on metabolism at 23° C. *Plant Physiol.* **15** (3) : 481—512.
- Ts'o P. O. P., Sato C. S., 1959. Synthesis of ribonucleic acid in plants. I. Distribution of ribonucleic acid and of protein among subcellular components of pea epicotyls. *Exptl. Cell. Res.* **17** (2) : 237—246.
- Weigl J., 1964. Über den Zusammenhang von Photophosphorylierung und aktiver Ionenaufnahme. *Z. Naturforsch.* **19B** (9) : 845—851.
- Wier T. E., Stocking C. R., 1952. A cytological analysis of leaf homogenates. I. Nuclear contamination and disorganized chloroplasts. *Amer. J. Bot.* **39** (10) : 720—726.
- Wessels J. S. C., Baltscheffsky H., 1960. Adenosine triphosphatase activity in chloroplasts. *Acta Chem. Scand.* **14** (2) : 233—246.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
11/I 1967

V. JAASKA

ADENOSIINTRIFOSFATAASNE AKTIIVSUS MAISIIDANDITE JUURTES

Resümee

Uuriti mõningaid ATF-i hüdrolüüsivate fermentsüsteemide omadusi kaheksapäevaste etioleeritud maisiidandite juurtest valmistatud homogenaadis. Selleks jaotati juurte homogenaat diferentsiaaltsentrifuugimise teel kaheks fraktsiooniks, milles määrati valgus, desoksüribonukleiinhapete ja ribonukleiinhapete sisaldus. Artiklis esitatakse andmeid keskkonna pH, temperatuuri ning mitmesuguste katioonide ja anioonide mõju kohta eraldatud fraktsioonide ATF-aasele aktiivsusele. Uurimised näitasid, et mõlema fraktsiooni fermentsüsteemid hüdrolüüsisid peale ATF-i ka mõningaid teisi fosfoanhüdriide ja fosfomonoestereid.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
11. I 1967

V. JAASKA

ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY
IN CORN SEEDLINGS ROOTS*Summary*

The present paper describes some properties of the enzyme system hydrolyzing adenosine triphosphate in the roots of 8-day-old corn seedlings. The seedlings were grown in the dark in continuously aerated $2.5 \cdot 10^{-4}M$ $CaSO_4$, essentially according to Epstein and Hagen (1952). The homogenate was prepared by grinding small pieces of roots in a previously chilled mortar at about $0-5^{\circ}C$ together with Tris-HCl buffer (0.1M), pH 7.2, sucrose (0.25M) and pure white sand. The resulting mash was squeezed through a piece of thin planctonic silk and centrifuged for 20 min at $900 \cdot g$. The supernatant liquid of this centrifugation constituted the "cytoplasmic fraction" or the second fraction. The sediment obtained after two further washings will be called, conditionally, the "cell wall fraction" or the first fraction. This fraction proved to contain about 8% of the total DNA present in the whole homogenate. This apparently means that the nuclei might have been injured or broken during the homogenization, releasing most of their nucleic acids in the cytoplasmic fraction.

The adenosine triphosphatase activity was assayed by estimating spectrophotometrically the P_i liberated from ATP according to the method of Lowry and Lopez (1946). The standard reaction mixture contained: 2mM ATP, 3mM Mg, 200mM Na-acetate or Tris-HCl buffer and 0.1 or 0.2 ml enzyme preparation. The experiments were carried out usually at $30^{\circ}C$ during 20 (for the cytoplasmic fraction) or 40 (for the cell wall fraction) minutes.

The first fraction had very little ATP-ase activity in the acid range and showed the pH optimum at about 9. The optimum activity of the cytoplasmic fraction was at pH 5.1 (fig. 1).

The highest rate of ATP hydrolysis was observed at $53^{\circ}C$ (fig. 2).

Magnesium ion was required for the ATP-ase activity of the cell wall fraction at pH 8-9. The substitution of calcium for magnesium resulted in an abrupt decrease of enzymatic activity (table 2). At pH 5.1, the ATP-ase activity of cytoplasmic fraction was not markedly enhanced by magnesium or calcium (table 3). At pH 8.8, magnesium or calcium had but an inconsiderable stimulating effect.

No stimulation of Mg-activated ATP-ase activity at pH 8.8 was observed when 10mM K^+ and 100mM Na^+ were added to the first fraction separately or simultaneously. Only a very small stimulation of the ATP-ase activity was found at an addition of K^+ to the cytoplasmic fraction (table 4).

In the acid range, the ATP-ase activity of the second fraction was significantly inhibited by zinc and copper ions. Cobalt and manganese had a negligible effect. Molybdate and fluoride were strongly inhibitory. At pH 8.8, cobalt and manganese ions suppressed the activity, whereas molybdate had practically no effect. In the alkaline range the ATP-ase activity was strongly inhibited by zinc (tables 5 and 6).

2,4-dinitrophenol (DNP) and floridzin ($7.5 \cdot 10^{-5} - 7.5 \cdot 10^{-4}M$) were slightly inhibitory. DNP did not exert any stimulating effect on the ATP-ase activity (table 7).

Both the fractions studied were able to hydrolyze not only ATP, but also some other substrates (table 8). At pH 5.1 both fractions showed activity towards ATP, ADP and pyrophosphate. In addition, the second fraction exhibited some activity on β -glycerophosphate and AMP. At pH 8.8, the first fraction showed the highest activity towards ATP, whereas the second fraction hydrolyzed ATP and ADP at about the same rate. Both the fractions were able to hydrolyze pyrophosphate.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and Botany

Received
Jan. 11, 1967