

Ю. ВИИЛЬ

О ХАРАКТЕРЕ ДЕЙСТВИЯ СВЕТА НА БИОСИНТЕЗ ТРИПТОФАНА В ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

Образование триптофана в зеленых растениях протекает через цепь реакций метаболизма, которые связывают синтез этой аминокислоты с новообразованием органического вещества, т. е. с процессом ассимиляции CO_2 при использовании световой энергии. Катаболические и анаболические реакции, ведущие к биосинтезу триптофана, в основном одинаковые в растениях и микроорганизмах (Поляновский, 1959; Weinstein и др., 1961; Wightman и др., 1961; Gibson и др., 1962; Morgan и др., 1963). Большинство данных по биосинтезу триптофана в высших растениях относится к более поздним этапам этого процесса — образованию триптофана из антраниловой кислоты, индолил-пировиноградной кислоты и из индола и серина (Поляновский, Кретович, 1957; Mudd, Zalik, 1958; Greenberg, Galston, 1959; Кретович, Поляновский, 1959; Поляновский, 1960; Nair, Vaidyanathan, 1961). Реакции образования триптофана с использованием этих субстратов по существу — типичные вторичные синтезы, протекающие как на свету, так и в темноте. Тем не менее, при использовании названных предшественников для синтеза триптофана в зеленых листьях ячменя и гороха Поляновский и Кретович (1957) и Поляновский (1960) наблюдали интересный факт ускорения светом этого процесса. Действие света в таком случае не могло быть связано с пополнением запасов субстрата за счет фотосинтетически образованных углеродных соединений.

Нас заинтересовал вопрос, каким может быть механизм действия света при таких реакциях. Были проведены опыты по биосинтезу триптофана из индола и серина в различных условиях среды с целью получить данные, подробнее характеризующие действие света и указывающие либо на регуляторную, либо на энергетическую роль его при данной реакции. Варьировались продолжительность и температура экспозиции, интенсивность и качество света и газовая среда.

Методика

Для опытов были использованы 3-дневные зеленые растения ячменя (сорт 'Харьковский 22'), обладающие высокой активностью триптофансинтетазы, которые выращивались на белом свету. В отрезанные листья инфильтрировали раствор индола (0,005М) и серина (0,03М) с 0,1М содержанием аскорбиновой кислоты, доведенный до pH 7,0 при помощи 10%-ного раствора K_2CO_3 . Инфильтрированные листья экспонировались на свету и в темноте 2,5—7,5 часов. Опыты проводились при различных температурах (от -1 до 22°C). Листья освещали белым, красным (600—680 мк с максимумом на 660 мк), синим (400—600 мк с максимумом на 440 мк) или дальним красным све-

том (700–950 мк). Лампы и фильтры, использованные для получения света определенного спектрального состава, подробно описаны ранее (Воскресенская, Вийль, 1966). Экспозиции проводились в атмосфере воздуха и в азоте. Экспонированные листья фиксировали в кипящем 96%-ном этаноле и определяли в них содержание свободного триптофана (Вийль, Воскресенская, 1965). На основе полученных данных вычисляли скорость образования триптофана в различных условиях экспозиции. Скорость синтеза выражена в микромолях в час на 1 г сырого материала.

Результаты и обсуждение

Первая серия опытов была проведена с различной продолжительностью экспозиции. Инфильтрированные листья экспонировались на белом свете интенсивностью около $4 \times 10^4 \text{ эрг}/(\text{см}^2 \cdot \text{сек})$ и в темноте в течение 2,5, 5,0 и 7,5 часов при температуре 20° . На основе полученных данных рассчитаны скорости синтеза триптофана для трех последующих периодов опыта. Продолжительность каждого периода — 2,5 часа. На рис. 1, где столбиками изображены средние скорости синтеза в темноте и на свету для трех периодов опыта, можно наблюдать изменение скорости синтеза в течение всей экспозиции. В первый период скорости синтеза на свету и в темноте существенно не различаются; синтез в темноте даже в некоторой мере превышает синтез на свету. Однако при продолжении экспозиции скорость в темноте начинает падать и к концу ее составляет только 20% начальной скорости. В то же время скорость синтеза на свету в течение опыта изменяется незначительно и к концу его мало отличается от начальной скорости. Таким

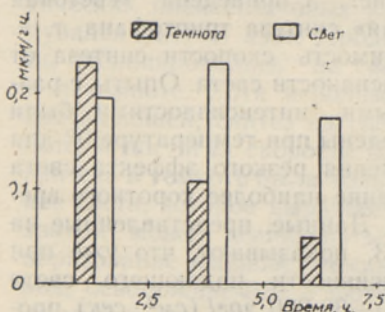


Рис. 1. Изменение скорости биосинтеза триптофана в течение 7,5-часовой экспозиции при комнатной температуре на свету и в темноте.

образом, при 20° положительный эффект света на биосинтез триптофана выявляется только при относительно длинных экспозициях. Это вполне согласуется с результатами, полученными Поляновским (1960), который обнаружил различия в скорости биосинтеза триптофана на свету и в темноте при 6-часовых и более длительных экспозициях. С более короткими экспозициями он не работал.

Особенно резко положительное действие света на биосинтез триптофана выявляется при пониженных температурах. В целом ряде опытов, проведенных при температурах около 0° , в темноте синтеза триптофана практически не наблюдалось, на свету же биосинтез проходит достаточно интенсивно.

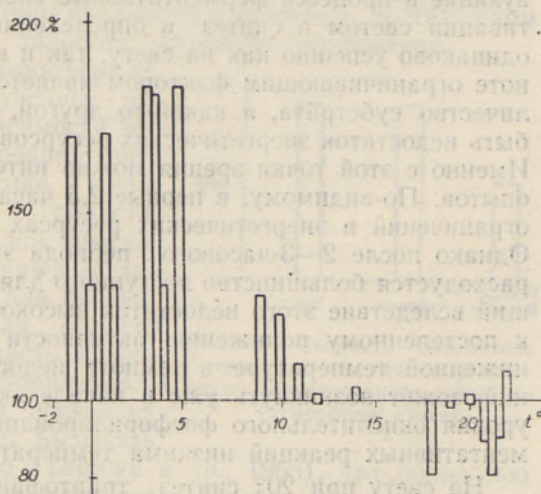


Рис. 2. Зависимость эффекта света от температуры (100% — содержание триптофана в темновом варианте).

но, достигая скорости 0,09 мкм/ч на 1 г сырого материала. В отличие от комнатной эффект света при пониженных температурах выявляется уже при 3-часовой экспозиции. На рис. 2 изображена зависимость величины эффекта света от температуры. За 100% принято содержание триптофана в условиях темноты. Наиболее резко эффект света выражен при температурах около 0°, он достигает иногда 80%. При повышении температуры до 10° эффект уменьшается, а выше 10° становится несущественным. Опыты при температурах около 20° не дали четкой картины. Как было указано выше, при 3-часовой экспозиции эффект вообще не выявляется или иногда становится даже отрицательным. Однако на основе полученных данных невозможно делать заключение о существенном эффекте света при таких температурах и продолжительности экспозиции ни в положительном, ни в отрицательном смысле.

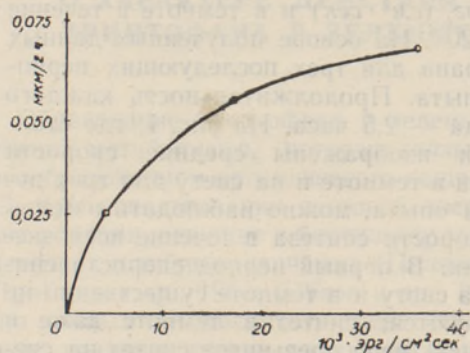


Рис. 3. Зависимость скорости биосинтеза триптофана от интенсивности света.

Для получения эффекта света при биосинтезе триптофана не требуется большой освещенности. На рис. 3 приведена «световая кривая» синтеза триптофана, т. е. зависимость скорости синтеза от интенсивности света. Опыты с различными интенсивностями были проведены при температуре 0° для получения резкого эффекта света в течение наиболее короткого времени. Данные, представленные на рис. 3, показывают, что уже при интенсивности падающего света 20 000—30 000 эрг/(см²·сек) процесс выходит на плато.

Представленные выше данные не дают основания предполагать, что действие света на биосинтез триптофана сводится к его регуляторной роли, например, активации ферментов, участвующих в этом биосинтезе. На это указывает отсутствие различий между светом и темнотой в скорости биосинтеза при 20° в начале экспозиции. Следовательно, участвующие в процессе ферментативные системы не требуют постоянной активации светом и синтез в определенных условиях может протекать одинаково успешно как на свету, так и в темноте. Следовательно, в темноте ограничивающим фактором является не активность фермента и количество субстрата, а какой-то другой, устраняемый светом. Им может быть недостаток энергетических ресурсов, недоступных для данного синтеза. Именно с этой точки зрения можно интерпретировать результаты наших опытов. По-видимому, в первые 2,5 часа биосинтез триптофана не имеет ограничений в энергетических ресурсах как на свету, так и в темноте. Однако после 2—3-часового периода экспозиции, очевидно, в темноте расходится большинство доступного для окисления субстрата. Возникающий вследствие этого недостаток высокоэнергетических соединений ведет к постепенному понижению активности биосинтеза в темноте. При пониженной температуре в темноте недостаток макроэнергетических соединений может возникнуть уже в начале экспозиции как следствие низкого уровня окислительного фосфорилирования в условиях торможения ферментативных реакций низкими температурами.

На свету при 20° синтез триптофана устойчив в течение 7,5 часов экспозиции. В этих условиях имеются возможности для новообразования органического вещества и, следовательно, для постоянного пополнения субстрата окисления. Однако активное образование триптофана на

свету происходит и при низкой температуре, которая сводит до минимума ассимиляцию CO_2 и процессы окисления, этим ограничивая окислительное фосфорилирование. В то же время, по данным Хола и Арнона (Hall, Arnon, 1962), низкие температуры практически не тормозят процесс запасания световой энергии в виде макроэргических соединений фосфора, в первую очередь АТФ, образующегося при фотофосфорилировании. По-видимому, именно такие макроэргические соединения поддерживают синтез триптофана на свету.

Этой интерпретации соответствуют данные экспозиции листьев в азоте. Мы предполагали, что если фактором, ограничивающим синтез триптофана в темноте, является недостаток энергии, то анаэробноз должен действовать на этот синтез таким же образом, как и понижение температуры. В таком случае в азоте образование триптофана должно подавляться в темноте при нормальной температуре уже в начале опыта. Освещение должно снимать такое подавление. Опыты были проведены при температуре 17° . Инфильтрированные листья экспонировались в герметических плексигласовых камерах, через которые в течение опыта продувался чистый азот. Продолжительность экспозиции была 3 часа. Пробы экспонировались на свету с интенсивностью $1,6 \times 10^4 \text{ эрг}/(\text{см}^2 \cdot \text{сек})$ и в темноте. Хотя использованную интенсивность света нельзя считать насыщающей, синтез на свету оказался в 4 раза интенсивнее, чем в темноте, и достигал скорости $0,22 \text{ мкм}/\text{ч}$ на 1 г сырого материала. Скорость синтеза в темноте была только $0,05 \text{ мкм}/\text{ч}$ на 1 г сырого материала. Действие света, которое выражается в снятии торможения синтеза, вызванного азотом, может реализоваться двумя путями: или непосредственно через образование макроэргических соединений фосфора, или же через кислород, освобождаемый в фотохимических реакциях фотосинтеза и используемый затем в окислительных процессах, в результате которых также могут образоваться соединения с макроэргическими связями. Литературные данные свидетельствуют о большей вероятности первого пути. Окислительное фосфорилирование на свету, по-видимому, сильно подавляется повышенным соотношением АТФ/АДФ, возникающим в клетке как следствие фотофосфорилирования (Klingenberg, Schollmeyer, 1961; Nebeq и др., 1964). Поэтому ход окислительного фосфорилирования на свету ограничен даже в присутствии кислорода и основным поставщиком энергии для синтеза, очевидно, является фотофосфорилирование.

На действие света через фотофосфорилирование указывают также полученные нами данные по спектральной зависимости эффекта света (рис. 4). Для образования триптофана эффективны синяя, красная и дальняя красная части спектра. Это — области, активные для нециклического и циклического фотофосфорилирования (Tagawa и др., 1963). Нужно подчеркнуть, что для биосинтеза активна дальняя красная область спектра ($\lambda > 700 \text{ мкм}$), т. е. область, активная для циклического фотофосфорилирования, но не для фотолиза воды, поскольку свет этих длин волн не может вызывать вторую фотохимическую реакцию (Tagawa и др., 1963), что полностью исключает возможность действия света через освобождение кислорода. Спектральная зависимость, изображенная на рис. 4, еще раз подтверждает, что действие света на биосинтез триптофана реализуется через механизмы энергетического обмена.



Рис. 4. Скорость биосинтеза триптофана на свету различного спектрального состава (атмосфера азота).

Использование фотосинтетической АТФ в биосинтезе триптофана, протекающего главным образом в цитоплазме, возможно также с точки зрения локализации реакций в клетке. Фонды АТФ хлоропластов и цитоплазмы, по-видимому, не строго разделены: АТФ может проникать из цитоплазмы в хлоропласты и, наоборот, выходить из хлоропластов в цитоплазму (Santarius и др., 1964). Следовательно, при недостатке фотосинтетической АТФ нет ограничений для использования ее в синтезах, протекающих в цитоплазме.

Выводы

Изучалась скорость биосинтеза триптофана на свету и в темноте в зеленых проростках ячменя. Установлено, что в ряде случаев освещение ускоряет этот процесс. В темноте образование триптофана сильно подавляется пониженными температурами и отсутствием кислорода, скорость синтеза постепенно понижается и при длительном экспонировании отрезанных листьев в комнатной температуре. Подавление синтеза снижается освещением.

Для получения максимального положительного эффекта света требуются сравнительно низкие освещенности — около $30\,000 \text{ эрг}/(\text{см}^2 \cdot \text{сек})$.

Предполагается, что в темноте синтез триптофана подавляется недостатком макроэргических соединений, возникающим при торможении окислительного фосфорилирования. Действие света реализуется через пополнение запасов макроэргических соединений путем фотофосфорилирования. С данной интерпретацией согласуются результаты, полученные по спектральной зависимости эффекта света. Для биосинтеза триптофана оказались эффективными синий, красный и дальний красный свет, т. е. области спектра, активные для нециклического и циклического фотофосфорилирования.

ЛИТЕРАТУРА

- Вийль Ю. А., Воскресенская Н. П., 1965. Действие света на биосинтез триптофана в зеленых проростках ячменя. Физиол. растений **12** (6) : 990.
- Воскресенская Н. П., Вийль Ю. А., 1966. Спектральная зависимость биосинтеза триптофана в зеленых проростках ячменя. Физиол. растений **13** (5).
- Кретович В. Л., Поляновский О. Л., 1959. Синтез триптофана из индолпириновинной кислоты в растениях. Биохимия **24** (6) : 995.
- Поляновский О. Л., 1959. Современные представления о биосинтезе циклических аминокислот у микроорганизмов и растений. Успехи совр. биол. **47** (3) : 311.
- Поляновский О. Л., 1960. Биосинтез триптофана в растениях. Рукопись дисс. канд. биол. н. М.
- Поляновский О. Л., Кретович В. Л., 1957. О количественном определении триптофана в растениях. Докл. АН СССР **112** (6) : 1086.
- Gibson M. I., Gibson M., Doy C. H., Morgan P., 1962. The branch point in the biosynthesis of the aromatic amino-acids. Nature **195** (4847) : 1173.
- Greenberg J. R., Galston A. W., 1959. Tryptophan-synthetase activity in pea seedling extracts. Plant Physiol. **34** (5) : 489.
- Hall D. O., Arnon D. I., 1962. Photosynthetic phosphorylation above and below 0°. Proceed. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **48** (5) : 883.
- Heber U., Santarius K. A., Urbach W., Ullrich W., 1964. Photosynthese und Phosphathaushalt. Intrazellulärer Transport von ^{14}C - und ^{32}P -markierten Intermediärprodukten zwischen den Chloroplasten und dem Cytoplasma und seine Folgen für die Regulation des Stoffwechsels. Naturforsch. **19b** (7) : 576.
- Klingenberg M., Schollmeyer P., 1961. ATP controlled redox states of respiratory carriers under the influence of DPNH-hydrogen accepting substrates. Biochem. Biophys. Res. Communic. **4** (5) : 323.
- Morgan P. N., Gibson M. I., Gibson F., 1963. The conversion of shikimic acid into certain aromatic compounds by cell-free extracts of *Acetobacter aerogenes* and *Esherichia coli*. Biochem. J. **89** (2) : 229.

- Mudd J. B., Zalik S., 1958. The metabolism of indole by tomato-plant tissues and extracts. *Canad. J. Bot.* **36** (4) : 467.
- Nair P. M., Vaidyanathan C. S., 1961. Tryptophan synthetase in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **93** (2) : 262.
- Santarius K. A., Heber U., Ullrich W., Urbach W., 1964. Intracellular translocation of ATP, ADP and inorganic phosphate in leaf cells of *Elodea densa* in relation to photosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Communic.* **15** (2) : 139.
- Tagawa K., Tsujimoto N. Y., Arnon D. Y., 1963. Separation by monochromatic light of photophosphorylation from oxygen evolution. *Proceed. Natl. Acad. Sci. U.S.* **50** : 544.
- Weinstein L. H., Porter C. A., Laurencot H. J., 1961. Role of quinic acid in aromatic biosynthesis in higher plants. *Contrib. Boyce Thompson Institute* **21** : 201.
- Wightman F., Chisholm M. D., Neish A. C., 1961. Biosynthesis of tryptophan and gramine in young barley shoots. *Phytochemistry* **1** (1) : 30.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
16/II 1966

J. VIII

VALGUSE TOIMEST TRÜPTOFAANI BIOSÜNTEESILE ROHELISTES ODRATAIMEDES

Resüme

Mitmesugustes eksponeerimistingimustes, nagu ekspositsiooni erineva kestuse ja temperatuuri puhul, gaasilise keskkonna erineva hapnikusalduse puhul ning valguse erineva intensiivsuse ja spektraalse koostise puhul, uuriti valguse toimet trüptofaani biosünteesile indoolist ja seriinist.

Valgus kiirendas trüptofaani moodustumist neis tingimustes, mis pimeduses osutusid pidurdavaks, nagu madal temperatuur (-1 kuni 5°C), pikemaajaline (5 kuni 7,5 t.) eksponeerimine toatemperatuuril, lämmastikukeskkond. Maksimaalseks valgusefektiks oli vajalik valguse suhteliselt madal intensiivsus ($3 \cdot 10^4 \text{ erg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$). Aktiivseks osutusid nii sinine (400–600 m μ), punane (600–680 m μ) kui ka kaugpunane (700–950 m μ) valgus.

Oletatakse, et pimeduses on trüptofaani sünteesi pidurdavaks faktoriks makroergiliste ühendite vähesus, mis tekib sellistes katsetingimustes, kus oksüdatiivne fosforüleerumine pidurdub. Valguse toime realiseerub fotofosforüleerumise kaudu, milles moodustuvad makroergilised sidemed võivad olla energiaallikaks trüptofaani sünteesil.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse
16. II 1966

J. VIII

ON THE NATURE OF THE LIGHT EFFECT UPON THE BIOSYNTHESIS OF TRYPTOPHAN IN GREEN BARLEY PLANTS

Summary

The effect of light upon the biosynthesis of tryptophan from indole and serine in excised leaves of young barley plants was investigated under different experimental conditions. The duration and temperature of exposition, oxygen content of the atmosphere, intensity and quality of light were varied. Under conditions unfavourable for the dark formation of tryptophan (temperatures about 0°C , nitrogen atmosphere, long expositions at room temperature), a promotion of the synthesis by light was established. Relatively low light intensities — about $3 \cdot 10^4 \text{ erg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ — proved saturative. Blue light (400–600 m μ), red light (600–680 m μ) and far-red light (700–950 m μ) appeared to be effective.

The suggestion is made that in darkness the synthesis was hindered by the lack of macroergic substances, resulting from the inhibition of oxidative phosphorylation under the experimental conditions used. Illumination supplied photosynthetic ATP to the reaction, which served as the source of energy for the synthesis.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Feb. 16, 1966