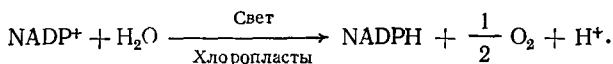


том электрона и сопровождается выделением O_2 из H_2O и образованием $NADPH$ из $NADP^+$. При циклическом фосфорилировании электроны переносятся циклически через пункты фосфорилирования по «замкнутому» участку электрон-транспортной цепи, и в качестве единственного продукта образуется АТФ. Обе системы показаны на рис. 5.2, А.

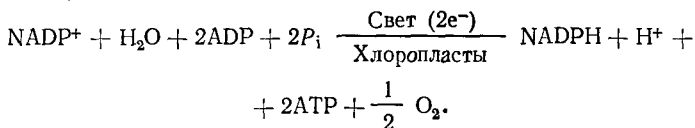
5.3. Нециклический транспорт электронов

Нециклический транспорт электронов — это осуществляемое за счет энергии света удаление электронов с низкой энергией из молекулы воды (при этом в качестве побочного продукта выделяется кислород; см. описание реакции Хилла в гл. 2) и транспорт этих электронов по цепи переносчиков со все более низким потенциалом, завершающийся образованием сильного восстановителя $NADPH$ с потенциалом $-0,34$ В. Процесс этот можно описать в виде простого уравнения:



Из переносчиков электронов идентифицированы хлорофилл *a*, хиноны, цитохромы *b* и *f*, Fe-S-белки, пластоцианин, ферредоксин, различные редуктазы.

Образование АТФ происходит в результате реакций фосфорилирования, обязательно сопряженных с переносом электронов от хинонов к цитохрому *f*. Иными словами, $NADPH$ и АТФ образуются в ходе нециклического фосфорилирования, при котором перенос электронов от молекулы воды на $NADP^+$ сопряжен с синтезом АТФ. Суммарную реакцию можно записать так:



Как явствует из этого уравнения, в мембране хлоропласта молекула H_2O под действием света расщепляется с выделением атома кислорода ($1/2$ молекулы O_2), а высвобождающиеся при этом два электрона переносятся на $NADP^+$ вместе с двумя протонами (H^+) от молекулы во-

ды, что приводит к образованию сильного восстановителя NADPH. Одновременно из двух молекул ADP и двух остатков неорганического фосфата ($2 P_i$) синтезируются две молекулы АТР, и происходит запасание энергии в виде АТР.

Молекулы NADPH и АТР используются в качестве «ассимиляционной силы», необходимой до восстановления CO_2 до углеводов в темновых реакциях, которым посвящена следующая глава. Итак, на первой стадии превращений световой энергии в химическую запасается «ассимиляционная сила».

Процесс переноса электронов при нециклическом фосфорилировании схематически показан на рис. 5.2, А. В основе этой схемы лежит остроумная гипотеза Хилла и Бендалла (Bendall), выдвинутая ими в 1960 г. На шкале слева отложены потенциалы всех переносчиков — компонентов электрон-транспортной цепи; при этом подразумевается, что последовательность переноса электрона во многом зависит от потенциала переносчиков. Приведенная схема довольно точно отражает путь переноса электронов. О ее справедливости с высокой степенью вероятности свидетельствуют и все имеющиеся в настоящее время данные. Современные представления о расположении переносчиков электронов в мембране проиллюстрированы на рис. 5.2, Б.

Взглянув на схему, нетрудно увидеть, что для поднятия электрона от уровня окислительно-восстановительного потенциала, соответствующего окислению воды (+0,82 В), до уровня NADPH (—0,34 В) используются две разные световые реакции, обозначенные на рис. 5.2, Б как фотосистема I (ФС I) и фотосистема II (ФС II). Различаются эти системы по типу хлорофилла, поглощающего большую часть световой энергии. Фотосистема I использует энергию света, поглощенного хлорофиллом *a*, голубовато-зеленым пигментом с максимумом поглощения в растворе при 660 нм. Фотосистема II получает энергию как от хлорофилла *a*, так и от хлорофилла *b*, родственного ему пигмента, имеющего желтовато-зеленый цвет и максимум поглощения при 643 нм (см. гл. 3). Хлорофилл *a* содержится во всех высших растениях и водорослях, тогда как хлорофилл *b*, пигмент вспомогательный, обнаруживается только у высших рас-

тений и зеленых водорослей. Сине-зеленые водоросли в качестве вспомогательных пигментов в фотосистеме II могут содержать фикоцианин и аллофикоцианин, а красные водоросли — фикоэритрин.

Первые данные о возможном участии двух световых реакций в процессе фотосинтеза были получены в работах Эмерсона (Emerson) и сотрудников, проведенных в

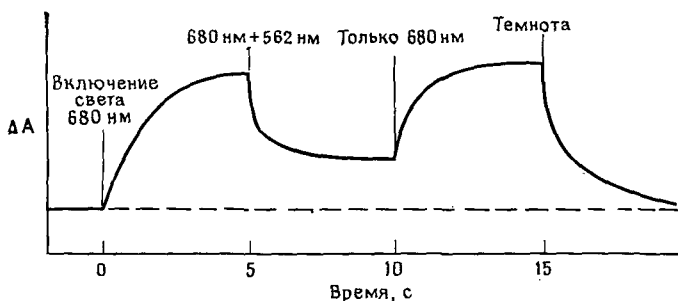


Рис. 5.3. Окисление и восстановление цитохрома f у красной водоросли *Porphyridium*. ΔA — изменения оптической плотности при 420 нм, обусловленные изменением окислительно-восстановительного состояния цитохрома f . Увеличение оптической плотности происходит при окислении цитохрома f , уменьшение — при восстановлении цитохрома f . Свет с длиной волны 680 нм поглощается фотосистемой I (хлорофиллом a), свет с длиной волны 562 нм поглощается фотосистемой II (фикоэритрином). (Duysens, Amerz, Biochim. Biophys. Acta, 64, 243, 1962.)

1943 и последующие годы (см. также гл. 4). Они показали, что для восстановления CO_2 до углеводов требуется освещение лучами двух длин волн в тех случаях, когда один из лучей поглощается *только* хлорофиллом a , т. е. имеет длину волны, например, больше чем 680 нм. Оказалось, что для эффективного фотосинтеза нужно, чтобы длина волны второго луча соответствовала поглощению хлорофилла b у высших растений и зеленых водорослей и поглощению других вспомогательных пигментов у сине-зеленых, красных и бурых водорослей.

Дальнейшие свидетельства в пользу того, что для нециклического переноса электронов от H_2O к NADP^+ нужен свет двух разных длин волн, были получены в опытах, посвященных определению изменения окислительно-

восстановительного состояния цитохромов в хлоропластах водорослей. Как видно из схемы, показанной на рис. 5.2, цитохром f служит промежуточным переносчиком электронов между фотосистемой I и фотосистемой II. Применяя высокочувствительные методы спектрофотометрии (см. гл. 4), можно определить окислительно-восстановительное состояние цитохрома f . Определение количественных изменений поглощения проводят в характерных полосах поглощения цитохрома f с максимумами при 422 и 550 нм; длины волн действующего света подбирают так, чтобы они соответствовали поглощению разных фотосистем. Результаты измерений приведены на рис. 5.3. В темноте цитохром f в хлоропластах обычно находится в восстановленном состоянии. Если освещать водоросли светом с длиной волны 680 нм, который поглощается преимущественно фотосистемой I (т. е. хлорофиллом a), то у красной водоросли (*Porphyridium*) электроны переходят от цитохрома f на ферредоксин и далее на NADP^+ — цитохром f в результате окисляется. Если затем включить второй источник света с длиной волны 562 нм (этот свет преимущественно поглощается фотосистемой II, т. е. фикоэритрином в случае красной водоросли (*Porphyridium*), использованной в описываемом опыте; частично свет поглощается и фотосистемой I), то цитохром f восстанавливается, получая электроны от фотосистемы II. Отметим, однако, что полного восстановления при этом не достигается, поскольку, как уже упоминалось, при 562 нм фотосистема I также в некоторой степени возбуждается и поэтому отнимает электроны от цитохрома f , снова окисляя его. В темноте цитохром f возвращается в свое исходное, восстановленное состояние, которое наблюдалось и в начале опыта. Эксперименты такого рода были начаты Дюйзенсом (Duysens) в 1961 г.

Аналогичные измерения были проведены сравнительно недавно с целью изучения процессов окисления и восстановления цитохрома b в хлоропластах. Такие опыты имеют очень важное значение, поскольку позволяют установить последовательность переносчиков электронов в электрон-транспортной цепи. Проведение таких опытов сопряжено с большими техническими трудностями, обусловленными необходимостью создать такие условия,

в которых можно регистрировать изменения состояния лишь одного переносчика. Однако важность результатов оправдывает усилия исследователей.

Из хлоропластов уже выделено много различных компонентов (см. гл. 3). Однако на приведенной схеме (рис. 5.2) показаны лишь те из них, роль которых в цепи переноса электронов определена на сегодняшний день достаточно точно. Эти переносчики были выделены и охарактеризованы химически. В настоящее время уже довольно хорошо изучены, например, ферредоксин и пластоцианин и в меньшей степени — цитохромы b_6 и f . Приводились многочисленные опыты по избирательному удалению из хлоропластов того или иного переносчика электронов. Для этого хлоропласты отмывали водой или разбавленными растворами детергентов. Использовали также экстрагирование органическими растворителями, действие ультразвука малой интенсивности и т. д. В результате такой обработки можно наблюдать подавление той или иной реакции переноса электронов, а последующее добавление очищенного экстрагированного компонента приводит к восстановлению процесса электронного транспорта в мембранах хлоропластов. Опыты такого рода были успешно проведены с пластохиноном, пластоцианином, ферредоксином, а также с ферментом (флавопротеидом), переносящим электроны от ферредоксина к NADP^+ . Результаты этих опытов дают дополнительные сведения о взаимном расположении переносчиков электрона.

Измерения электронного парамагнитного резонанса при низких температурах (от 4 до 78 К), проведенные в последнее десятилетие, позволили выяснить роль многих парамагнитных центров в хлоропластах как компонентов электрон-транспортной цепи. Использование такого подхода вместе с измерениями окислительно-восстановительного потенциала в анаэробных условиях позволило установить расположение в электрон-транспортной цепи хлоропластов таких переносчиков электронов, как железо-серный центр Риске (Rieske), обозначаемый Fe-S_R , железо-серные центры Fe-S_A и Fe-S_B , а также центр X, точная природа которого пока еще не установлена, хотя есть основания думать, что он представляет собой Fe-содержащий хинон. Ни один из этих переносчиков еще

не удалось пока выделить из мембран в чистом виде. Точная последовательность переносчиков на участке от X до ферредоксина пока еще не известна. Возможно, что между P_{700} и X имеется еще один переносчик электронов.

В изящных опытах, проведенных Левином (Levine), Бишопом (Bishop) и другими исследователями с использованием мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas*, также были получены данные, свидетельствующие о последовательности переносчиков электронов, показанной на рис. 5.2. Были получены мутанты этой водоросли, дефектные по разным участкам электрон-транспортной цепи, например мутанты с подавленным переносом электрона между пластохиноном и цитохромом *b* или между пластоцианином и цитохромом *f*. Точное знание участка, в котором блокирован перенос электронов, дает возможность добавлять электроны в электрон-транспортную цепь или удалять их из нее в разных участках. Этого сравнительно легко добиться, пользуясь различными красителями; такой подход успешно применяется в упомянутых выше спектрофотометрических исследованиях. Перечисленные генетические и биохимические эксперименты по идее своей подобны тем опытам, которые проводились на плесневом грибе *Neurospora* и на бактерии *Escherichia coli*. Результаты проведенных опытов подтвердили последовательность расположения переносчиков электронов в нециклической цепи. Кроме того, они имеют большое значение для анализа данных по фотофосфорилированию и фиксации CO_2 , к которому мы перейдем ниже.

Использование химических ингибиторов, избирательно подавляющих биохимические реакции, — это классический и плодотворный подход к изучению биохимических механизмов. Ингибиторы успешно применялись и при исследовании нециклического фотофосфорилирования. Были найдены различные ингибиторы, блокирующие отдельные участки этой цепи; например ДХММ [3-(3,4-дихлорфенил)-1, 1-диметилмочевина]¹ — гербицид, блокирующий выделение кислорода; антимицин А — ан-

¹ Используется также сокращенное название *диурон*. — Прим. перев.

тибиотик, подавляющий восстановление цитохрома f_2 ; ДСПД (дисалицилидинпропандиамин), блокирующий перенос электронов, катализируемый ферредоксином.

Наконец, следует рассмотреть образование АТФ, сопряженное с нециклическим переносом электронов. В 1958 г. Арнон, Уотли и Аллен показали, что синтез АТФ должен обязательно быть сопряжен с восстановлением NADP^+ , и обнаружили, что скорость переноса электронов на NADP^+ зависит от присутствия ADP и P_i (необходимых компонентов для синтеза АТФ). В связи с фиксацией CO_2 в темновых реакциях важное значение приобретает вопрос о том, сколько молекул АТФ синтезируется в расчете на 1 молекулу образовавшегося NADPH . Дело в том, что для восстановления 1 молекулы CO_2 до уровня углеводов в темновых реакциях нужны 2 молекулы NADPH и 3 молекулы АТФ. Получается, что число молекул АТФ, приходящихся на 1 молекулу NADPH , должно лежать в интервале между 1 и 2. Согласно современным представлениям, механизм сопряжения электронного транспорта с образованием АТФ должен использовать состояния с высокой энергией и так называемые «сопрягающие факторы», т. е. особые белки, связанные с мембраной хлоропласта.

Митчелл (Mitchell) выдвинул «хемиосмотическую» гипотезу для объяснения синтеза АТФ на мембранах. Согласно Митчеллу, образование АТФ происходит в результате рекомбинации положительных и отрицательных зарядов, которые накапливаются по разные стороны мембраны гран при переносе электронов по электрон-транспортной цепи. Для этого нужно, чтобы мембраны имели определенную ориентацию, т. е. были бы способны разделять заряды (рис. 5.2, Б). Гипотеза Митчелла привлекательна своей общностью, поскольку она предложена для описания любых биологических мембран, а мембраны хлоропластов действительно подобны другим мембранам, участвующим в синтезе и гидролизе АТФ, например мембранам митохондрий (см. Tribe, Whittaker, 1981).

При выделении хлоропластов из целых листьев очень легко нарушить те условия, которые необходимы для синтеза АТФ. Поэтому в опытах по фотофосфорилированию требуется большая осторожность, чем в тех экспе-

риментах, в которых измеряют только электронный транспорт. На рис. 5.4 показана последовательность действий, необходимых для получения хлоропластов и для измерения выделившегося кислорода и синтезированных при нециклическом фотофосфорилировании АТФ и NADPH (см. также гл. 3).

5.4. Циклический транспорт электронов и фосфорилирование

В результате данного процесса, происходящего в хлоропластах под действием света, образуется один-единственный продукт — АТФ. Циклическое фотофосфорилирование было открыто в 1954 г. Арноном, Алленом и Уотли на изолированных хлоропластах шпината и Френкелем (Frenkel) на хроматофорах, выделенных из фотосинте-

