

УДК 582.282.23.095

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА АМИНОКИСЛОТНОГО ПУЛА МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ

Е. Г. ДАВИДОВА, А. П. БЕЛОВ, В. В. РАЧИНСКИЙ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

В митохондриальном матриксе возможно накопление низкомолекулярных органических соединений, в том числе и аминокислот [8]. Поскольку митохондрии играют большую роль в метаболизме дрожжевой клетки, их аминокислотный пул должен быть связан не только с автономным синтезом белка органеллы, но и с рядом других метаболических процессов [5]. Данная работа проведена с целью установить само наличие аминокислотного пула, локализованного в митохондриях дрожжей *Candida tropicalis*, а также определить его компонентный состав.

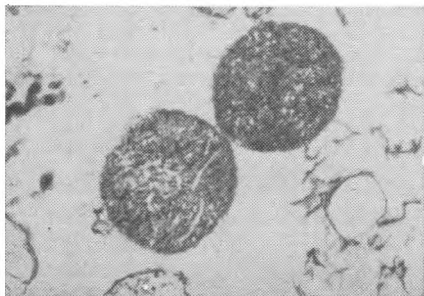
Методика исследований

Дрожжи *C. tropicalis* выращивали в статических условиях в жидкой питательной среде, содержащей 1 мас. % 1—6-¹⁴С-глюкозы в качестве единственного источника углерода, что позволило получить totally меченные ¹⁴С дрожжевые клетки и благодаря этому оценить массу общего углерода их индивидуальных компонентов [6].

Митохондрии выделяли из гомогената протопластов методом дифференциального центрифугирования, который в наибольшей степени удовлетворял требованиям нашего исследования, т. е. был достаточно простым и быстрым и в то же время обеспечивал максимальное сохранение низкомолекулярных органических соединений, локали-

зованных в матриксе митохондрий. Протопласты получали по методике, описанной в работе [4]. Условия выделения митохондрий были подобраны исходя из [1, 11, 18]. Протопласты дрожжей промывали и центрифугировали в течение 10 мин при 1500g. Осадок после центрифугирования смешивали со стеклянными бусами в соотношении 2:3,5. Разрушение производили в гомогенизаторе «Биомикс» при высоких скоростях вращения в течение 1 мин при 0°. Гомогенат суспендировали в среде с 0,7 М раствором маннита и 0,01 М трис-фосфатным буфером (рН 6,9), содержащей также 0,001 М ЭДТА и 0,05 % бычьего сывороточного альбумина. Суспензию 3-кратно центрифуги-

гировали при 2000g в течение 10 мин для отделения неразрушенных протопластов и фрагментов клеток. После этого гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 8500g на центрифуге Бекман L-3-40 с ротором SW-27. Супернатант отбрасывали, а осадок суспендировали в 0,6 M растворе сахарозы с 0,01 M трис-фосфатным буфером (рН 6,8), центрифугировали при 8500g в течение 20 мин. Супернатант отбрасывали, а полученный осадок представлял собой препарат митохондрий. Выход митохондрий оценивали по количеству белка, определяемого методом Лоури, и по содержанию углерода, определяемого радиометрическим способом. В первом случае он колебался от 5,9 до 10,2 %, в последнем — от 4,8 до 11,4 %. Сходимость значений выхода по



Микрофотография препарата митохондрий, выделенных из протопластов дрожжей.

биологическим повторностям была удовлетворительной (соответственно 6,0÷5,9 или 7,4÷9,1 %), что свидетельствует о надежности используемой методики.

Степень очистки препарата митохондрий определяли с помощью метода маркерных ферментов и электронной микроскопии. Для электронной микроскопии препарат фиксировали OsO_4 , заливали в ЭПОН-812 согласно методике, предложенной фирмой ЛКВ [14]. Срезы докрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали на электронном микроскопе АЕ1. Микрофотография митохондрий представлена на рисунке.

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что получаемые препараты митохондрий загрязнены мембранами. Примеси

в виде целых клеток и протопластов отсутствовали.

Природу и степень мембранного загрязнения определяли при помощи метода маркерных ферментов. В качестве маркерного фермента митохондрии служила сукцинатдегидрогеназа, активность которой находили по методу Элес [12]. Активность α -маннозидазы необходимо было знать для оценки загрязнения препарата вакуолярными мембранами [20]. Присутствие примесей белков растворимой фракции устанавливали по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [9]. Степень загрязнения перекиссомами оценивали по активностям каталазы [15], оксидазы мочевой кислоты [17] и оксидазы D-аминокислот [16]. Из табл. 1 видно, что в получаемом препарате загрязнения в виде перекиссом отсутствуют. Обнаруженная активность каталазы не может свидетельствовать о наличии перекиссом. Имеются работы, в которых показано [19], что в самих митохондриях дрожжей присутствуют два изофермента каталазы А- и Т-формы. В наших исследованиях в препарате содержались незначительные количества растворимой фракции белка и мембран вакуолей: активность маркерных ферментов соответственно составляла 4,1 и 1,7 % от активности в гомогенате протопластов.

Основным параметром, позволяющим судить об интактности митохондрий, является дыхательный контроль. При его определении по Чансу [13] для препаратов митохондрий были получены значения 1,8÷2,0 (для α -кетоглутарата), что свидетельствует об интактности выделяемых митохондрий.

Для оценки содержания углерода основных групп органических компонентов митохондрий использовали принятую нами ранее методику фракционирования биомассы дрожжей и определения массы углерода методом радиоактивных индикаторов [6].

Фракционирование аминокислот производили методом тонкослойной ионообменной хроматографии [10]. Сочетание его с методом радиоактивных индикаторов позволило произвести не только качественный анализ смеси, но и дать количественную оценку содержания индивидуальных компонентов. Массу углерода индивидуальных аминокислот определяли путем измерения активности ^{14}C в хроматографических зонах с помощью жидкостно-сцинтилляционного радиометра. Для этой цели аминокислоты

Т а б л и ц а 1

Активность ферментов в препаратах митохондрий, выделенных из протопластов дрожжей

Ферменты	Гомогенат протопластов, усл. ед/мг белка	Препарат митохондрий, % к гомогенату
Каталаза (50 % $\text{H}_2\text{O}_2/100$ с)	47,1±2,8	74
Оксидаза мочевой кислоты ($\Delta E_{292}/100$ мин)	242±13	Не обнаруж.
Оксидаза D-аминокислоты ($\Delta E_{600}/\text{мин}$)	219±20	»
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа ($\Delta E_{340}/\text{мин}$)	111±7	4,1
α -Маннозидаза ($\Delta E_{400}/10$ мин)	73±3	1,7
Сукцинатдегидрогеназа ($\Delta E_{600}/\text{мин}$)	3,7±0,8	139

элюировали с пластинок 1 н. HCl и определенные аликвоты элюата помещали в стандартную сцинтилляционную смесь, приготовленную на основе диоксана. Измерения активности ^{14}C производили на радио-

метре «Марк II». Абсолютную активность рассчитывали при помощи компьютера ПДС-3 по программе, составленной на основе предварительно полученных кривых гашения.

Результаты исследования

Относительное содержание углерода в основных группах органических компонентов митохондрий дрожжей *S. tropicalis*, выращенных на 1—6- ^{14}C -глюкозе, составляло: в высокомолекулярных веществах, осаждаемых 5 % ТХУ, — $48,8 \pm 0,2$; липидах — $45,7 \pm 2,4$; аминокислотах — $3,7 \pm 0,7$; углеводах вместе с органическими кислотами — $1,8 \pm 0,4$ % общей массы углерода в органелле (повторность 4-кратная, доверительная вероятность 95 %).

Следовательно, в низкомолекулярных веществах содержалось не больше 6 % общего углерода органеллы, из них 3,7 % приходилось на углерод аминокислотного пула митохондрий. Исходя из того, что масса белка митохондрий составляет 20 % массы белка клеток [2], а относительное содержание белка в клетках и митохондриях почти одинаковое, можно принять, что и масса углерода митохондрий тоже составляет 20 % массы общего углерода клетки. В таком случае на углерод аминокислотного пула митохондрий будет приходиться 0,74 % массы общего углерода клетки, или около 8 % массы углерода общего пула аминокислот клетки.

Основная часть аминокислотного пула дрожжевой клетки локализована в вакуолях — до 60 % общего пула аминокислот [21]. Учитывая, что значительная часть аминокислотного пула должна быть локализована в цитоплазме, полученные 8 % для митохондриального пула вполне реальны.

Проведенный анализ показал, что в митохондриальном пуле содержатся все индивидуальные аминокислоты, обнаруживаемые в пуле протопластов (табл. 2).

Основными компонентами митохондриального пула аминокислот являются аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Довольно

Т а б л и ц а 2

Содержание углерода индивидуальных аминокислот в протопластах и митохондриях дрожжей

Аминокислоты	Содержание С аминокислот, мг/мг С органеллх100		Содержание С аминокислот, % от общего С аминокислот протопластов или митохондрий		
	протопласты	митохондрии	протопласты	митохондрии	критерий достоверности
Аргинин	$1,61 \pm 0,20$	$0,70 \pm 0,01$	$13,8 \pm 1,6$	$18,6 \pm 0,2$	3,0
Гистидин	$0,62 \pm 0,20$	$0,215 \pm 0,002$	$5,4 \pm 1,4$	$5,8 \pm 0,1$	0,3*
Лизин	$0,83 \pm 0,24$	$0,360 \pm 0,005$	$7,2 \pm 2,1$	$9,70 \pm 0,10$	1,2*
Фенилаланин	$0,06 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,09$	$3,6 \pm 0,2$	15,9
Тирозин	$0,12 \pm 0,03$	$0,091 \pm 0,002$	$1,06 \pm 0,22$	$2,45 \pm 0,05$	6,1
Лейцин + изолейцин	$0,38 \pm 0,07$	$0,187 \pm 0,002$	$3,37 \pm 0,60$	$5,06 \pm 0,09$	2,8
Метионин	$0,20 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,01$	$1,71 \pm 0,48$	$2,80 \pm 0,30$	2,0*
Валин	$0,21 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,38$	$4,7 \pm 0,30$	5,8
Аланин + глицин	$0,81 \pm 0,09$	$0,387 \pm 0,007$	$14,1 \pm 1,6$	$10,50 \pm 0,20$	3,6
Глутаминовая кислота + + треонин + серин	$4,75 \pm 0,30$	$0,78 \pm 0,01$	$41,3 \pm 2,6$	$21,2 \pm 0,2$	7,8
Аспарагиновая кислота	$0,77 \pm 0,09$	$0,70 \pm 0,03$	$6,67 \pm 0,80$	$18,9 \pm 0,70$	11,3
x-фракция	$0,84 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	$7,30 \pm 0,10$	$3,70 \pm 0,40$	9,5

Пр и м е ч а н и е. Повторность 6-кратная, доверительная вероятность 95 %, звездочкой обозначена недостоверность разности.

значительны количества лизина, гистидина и аланина. Меньше всего содержится тирозина и метионина. Содержание аспарагиновой кислоты в митохондриях приблизительно такое же, что и в протопластах, тогда как содержание всех остальных аминокислот на порядок меньше.

Расчетные значения относительного содержания углерода индивидуальных компонентов пулов митохондрий и протопластов дрожжей, приведенные в табл. 2, достоверно различались. Так, содержание глутаминовой кислоты в митохондриальном пуле было в 2 раза меньше, чем в общем пуле аминокислот, а относительное содержание аспарагиновой кислоты — в 3 раза больше. Относительное содержание углерода остальных аминокислот, кроме аланина и глицина, в митохондриальном пуле было также больше, чем в пуле протопластов.

Таким образом, митохондриальный пул аминокислот существенно отличается от общего пула аминокислот дрожжевой клетки по количественному составу индивидуальных аминокислот. Сравнение полученных данных с данными о вакуолярном пуле аминокислот дрожжей *S. tropicalis* [3] показывает также, что митохондриальный пул отличается по этим показателям и от вакуолярного пула. Основное различие состоит в том, что относительное содержание аспарагиновой кислоты в первом выше, чем в последнем, в 5 раз, хотя содержание глутаминовой кислоты в них практически одинаковое. Имеются существенные различия и в содержании остальных аминокислот.

Аминокислоты в митохондриальном матриксе, очевидно, можно рассматривать как один из компартментов аминокислот дрожжевой клетки с характерным компонентным составом и обменом. Наличие такого компартмента, возможно, обусловлено тем, что митохондриальные мембраны препятствуют свободному обмену аминокислот между митохондриальным матриксом и цитоплазмой. Известно, что эти мембраны обладают избирательной пропускной способностью для органических кислот и других низкомолекулярных соединений [7].

Митохондриальный компартмент аминокислот должен обеспечивать определенные функции митохондрий, связанные с автономным синтезом белка в них, а также с синтезом органических кислот, в том числе и аминокислот.

Для познания роли митохондриального пула в метаболизме углерода в клетке требуются дальнейшие исследования.

Выводы

1. Подобраны условия выделения митохондрий дрожжей *Candida tropicalis*, позволяющие сохранить пул низкомолекулярных органических веществ.

2. Установлено, что масса углерода, локализованного в аминокислотном пуле митохондрий, составляет $3,7 \pm 0,7$ % массы общего углерода органеллы, что приблизительно равно 0,74 % массы общего углерода клетки.

3. Показано, что в аминокислотном пуле митохондрий содержатся все обнаруживаемые в общем пуле клетки индивидуальные аминокислоты, однако их относительное содержание значительно отличается от содержания аминокислот в общем и вакуолярном пулах дрожжевой клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акименко В. К., Меденцев А. Г., Головченко Н. П. Выделение и некоторые свойства митохондрий дрожжей *Candida lipolytica*. — Биохимия, 1964, т. 40, № 2, с. 395—402. — 2. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975. — 3. Белов А. П., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Изучение фондов аминокислот и липидов в вакуолях *Candida tropicalis*. — Изв. ТСХА, 1976, вып. 5, с. 21. — 4. Заикина А. И., Лапотышкина А. И. Получение протопластов дрожжей рода *Candida*. — Микробиология, 1970, т. 39, № 6, с. 1082—1084. —

5. Измайлов С. Ф., Смирнов А. М. Функциональная компартментализация дикарбоновых аминокислот в растительной клетке. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1977, вып. 5, с. 733—740. — 6. Кретова Л. Г., Давидова Е. Г. Радиометрический контроль баланса углерода при фракционировании биомассы дрожжей. — Изв. ТСХА, 1976, вып. 6, с. 22—27. — 7. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. — 8. Поликар А. Молекулярная цитология мембран живой клетки и её микроокружение. Новосибирск: Наука, 1975. — 9. Biochemia Boeringer - glucose - 6- phosphat - Dehydrogenase (UV-test) Mannheim. — 10. Devenyi T., Gregogy J. — Amino acids, peptides and proteins. Budapesht, 1974. — 11. Duell E. A., Itone S., Utter M. F. — J. Bact., 1964, vol. 88, p. 1972—1765. — 12. Eles A. H. — Arch. Biochem., Biophys., 1959, vol. 85, p. 561—565. — 13. Hall M. J., Flowers F. J., Roberts R. M. — L.: Longman, 1974. — 14. LKB-application notes 1969. — 15. Lüch H. — Methods of Enzymatic analysis, Acad. Press, N.-Y., 1963, p. 885. — 16. Marchall V. P., Scotcf J. R. — J. Bact., 1968, vol. 95, p. 1419—1422. — 17. Miller M., Moller K. M. — J. Biochem., 1969, vol. 9, p. 421—428. — 18. Ohnishi T., Kawaguchi K., Hagiira B. — J. Biol. Chem., 1966, vol. 241, p. 1797—1802. — 19. Susani M., Zamniak P., Fessl F., Ruis H. — Z. Physiol. Chem., 1976, Bd 354, S. 961—966. — 20. Van der Wilden W., Matile Ph., Schellenberg M., Mayer S., Wiemken A. — Z. Naturforsch., 1973, Bd 28, S. 416—420. — 21. Wiemken A., Nourse P. — Planta, 1973, vol. 109, p. 293—299.

Статья поступила 11 ноября 1979 г.

SUMMARY

The conditions of isolating native mitochondrions from the protoplast of *Candida tropicalis* yeasts which allow to keep the pool of low-molecular organic compounds are selected. The relative content of free mitochondrial amino acids is estimated by means of radioactive indicators technique. It is found that carbon of amino acid pool makes $3,7 \pm 0,7\%$ of the mass of total organelle carbon or $0,74\%$ of the mass of total cell carbon. The component composition of mitochondrial amino acid pool which is essentially different from that of vacuolar and general amino acid pool of the yeast cell is determined.