

MOLECULAR GENETICS OF PHOTOSYNTHESIS

S. V. SHESTAKOV

The problems of genetic control of photosynthesis and chloroplast development are discussed in terms of molecular genetics. A general view on the regulation of expression of genes controlling photosynthesis is considered.

Рассмотрены проблемы генетического контроля аппарата фотосинтеза и развития хлоропластов с позиций молекулярной генетики. Даны общие представления о механизмах регуляции экспрессии генов, контролирующих процесс фотосинтеза.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ФОТОСИНТЕЗА

С. В. ШЕСТАКОВ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез является одним из главных биологических процессов, обеспечивающих жизнь на планете. В клетках фотосинтезирующих организмов происходит превращение световой энергии в химическую, образование органического вещества из воды и углекислого газа. Фотосинтезирующие бактерии осуществляют фотосинтез без выделения кислорода, а растения, водоросли и цианобактерии способны к оксигенному фотосинтезу, в процессе которого происходит фотолиз воды с выделением молекулярного кислорода, необходимого для дыхания большинства организмов. Оксигенный фотосинтез осуществляется у растений и водорослей в мембранных (тилакоидных) структурах хлоропласта — специализированной клеточной органеллы, о строении, развитии и функционировании которой можно прочитать в [1]. В трансформации световой энергии принимают участие четыре основных комплекса: фотосистема I (ФС1), фотосистема II (ФС2), цитохромный (b_6/f) и АТФ-синтетазный комплексы, встроенные в липидные мембраны тилакоидов. Помимо этих белковых комплексов процесс фотосинтеза обслуживается системами переноса электронов (пластохинон, пластоцианин и другие переносчики) и ассимиляции углекислоты, светособирающими белковыми комплексами, содержащими хлорофилл, а также большим количеством других белков, необходимых для сборки и функционирования аппарата фотосинтеза. Молекулярные механизмы процесса фотосинтеза рассмотрены в [2–4].

Клеточные системы, участвующие в фотосинтезе, работают согласованно и чутко реагируют на внешние воздействия — изменения в световом режиме, температуре, влажности и других факторах окружающей среды, включая радиацию, патогены и токсичные химические агенты. Эта координация обеспечивается регуляторными механизмами, с помощью которых происходят адаптация организмов и оптимизация работы аппарата фотосинтеза в изменившихся условиях. Регуляция процесса фотосинтеза и связанных с ним клеточных систем осуществляется как на уровне транскрипции генов, так и на последующих уровнях: информационной РНК, трансляции в рибосомах, сборки и функционирования белковых комплексов, активности отдельных белков или биохимических путей.

Таким образом, когда мы говорим о молекулярной генетике фотосинтеза, то имеем в виду не только проблемы идентификации и молекулярного анализа генов, кодирующих белки фотосинтетических комплексов, но и механизмы регуляции работы этих генов, механизмы взаимодействия генетических и биохимических систем хлоропласта с ядром и цитоплазмой клетки.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АППАРАТА ФОТОСИНТЕЗА

Главная особенность строения хлоропласта заключается в том, что в нем есть собственные ДНК и рибосомы, но аппарат фотосинтеза формируется из белков, только часть из которых синтезируется в пластиде, в то время как другие кодируются ядерными генами, синтезируются в цитоплазме и затем транспортируются в пластиду и там включаются в хлоропластные структуры [1]. Таким образом, формирование хлоропласта, сборка фотосистем и функционирование аппарата фотосинтеза находятся под двойным генетическим контролем. Из табл. 1 видно, что каждый из четырех основных комплексов аппарата фотосинтеза состоит из белков, кодируемых как хлоропластным, так и ядерным геномом. Белки светособирающих, хлорофиллсодержащих комплексов, которые служат для поглощения света и миграции энергии к фотореакционным центрам [3], кодируются только ядерными генами. Белки, участвующие в переносе электронов от фотосистемы II к фотосистеме I, также синтезируются в цитоплазме и доставляются в хлоропласт. Кроме систем, приведенных в табл. 1, есть немало других белков, которые не участвуют непосредственно в фотосинтетической цепи транспорта электронов, но играют важную роль в обслуживании аппарата фотосинтеза. Мутации в генах, кодирующих такие белки, могут снижать эффективность фотосинтеза или даже полностью блокировать его, как это наблюдается при инактивации многих генов, кодирующих белки фотосистем. К числу обслуживающих белков относятся ферменты биосинтеза хлорофилла и кароти-

ноидов, белки – транспортеры металлов, ионов, кофакторов (необходимых для процесса фотосинтеза), белки-транслоказы, доставляющие нужные белки из цитоплазмы в хлоропласт [1], различные протеазы, протеинкиназы, фосфатазы и другие вспомогательные белки, участвующие в сборке, активации и обновлении фотосинтетических комплексов, в уборке деградированных белков.

Еще далеко не все известно о том, какую роль выполняет каждый из белков, входящих в аппарат фотосинтеза, как взаимодействуют эти белки между собой, какие участки белков функционально важны для полноценного фотосинтеза. Центральная роль в решении этих задач принадлежит в последние годы молекулярной генетике, методы которой позволяют выделять отдельные гены и выяснять их функции с помощью мутационного и молекулярного анализа. Здесь применимы два основных подхода, широко используемых в генетике и молекулярной биологии. Один заключается в том, чтобы, зная аминокислотную последовательность белка (выделенного из хлоропластов биохимическими методами), синтезировать кодирующий его ген, а затем внести в ген мутацию в строго определенном месте (сайте) или инактивировать ген путем инсерционного мутагенеза, введением внутрь гена чужеродного фрагмента ДНК, блокирующего образование нормального генного продукта. Мутантный ген можно внедрить в геном вместо нормального гена и в итоге получить мутантный организм с изменениями в аппарате фотосинтеза. Изучение характеристик созданных таким способом мутантов дает ценную информацию о функциях генов и конкретных участках кодируемых ими белков. Этот подход имеет, однако, немало ограничений, связанных с трудностями замещения генов в хлоропластной ДНК, сложностями генноинженерных операций с высшими растениями. Во многих случаях фотосинтетические мутанты растений просто не могут выживать. В этом отношении для экспериментальной работы более удобны зеленые водоросли (например, хламидомонада) и цианобактерии, способные к оксигенному фотосинтезу. Важным достоинством одного из штаммов цианобактерий (*Synechocystis* sp. PCC 6803) является то, что он может расти не только на свету за счет фотосинтеза, но и в темноте с глюкозой в качестве источника энергии. Поэтому у данного штамма можно легко получить мутанты, дефектные почти по любому гену фотосинтеза, поскольку такие мутанты будут расти гетеротрофно без фотосинтеза. Для этой цианобактерии в нашей лаборатории были разработаны методы переноса и клонирования генов, а японские ученые в 1996 году определили полную нуклеотидную последовательность генома, то есть выявили все гены (около 3200), более трети которых еще не идентифицированы. Это самый модный сейчас модельный объект изучения генов, кодирующих белки аппарата фотосинтеза.

Таблица 1. Генетический контроль аппарата фотосинтеза

Система	Локализация генов		Ген
	в хлоропласте	в ядре	
Фотосистема II	10	5	<i>psb</i>
Фотосистема I	5	8	<i>psa</i>
Комплекс <i>cyt b₆/f</i>	4	1	<i>pet</i>
Транспорт электронов (пластоцианин и др.)	0	8	<i>pet</i>
АТФ-синтетаза	6	3	<i>atp</i>
Светособирающие комплексы I и II	0	(>)10	<i>cab</i>

Другой стратегический подход базируется на получении случайных спонтанных или индуцированных мутантов с нарушениями в процессе фотосинтеза. Из них можно выделить мутантные гены, определить молекулярную природу мутации и соответственно понять, почему нарушение в продукте этого гена изменяет способность к фотосинтезу. Данный подход хорош тем, что позволяет открыть ранее неизвестные гены, продукты которых не были функционально идентифицированы (в отношении фотосинтеза) традиционными биохимическими методами.

На основе этих подходов (а также использования к-ДНК-геномных библиотек растений) в последние годы достигнут значительный прогресс в генетике фотосинтеза, в понимании структурно-функциональной организации аппарата фотосинтеза. В качестве примера рассмотрим современные представления о фотосистеме II, базирующиеся на молекулярно-генетическом анализе, биохимическом и биофизическом изучении мутантов. На рис. 1 представлена схема комплекса ФС2 и ассоциированного с ним комплекса фотолиза воды, расположенного на внутренней стороне тилакоидной мембраны. Как видно из табл. 2, в работе ФС2 участвуют почти 20 белков (и список, очевидно, еще не закрыт), большинство из которых кодируется хлоропластными генами.

Роль продуктов некоторых генов еще неизвестна, но функции многих генов в целом понятны. Более того, с помощью молекулярно-генетических методов определения природы мутаций и методов геннаправленного мутагенеза удалось выяснить функциональное значение конкретных участков в белках. Получены сведения о том, какие участки белков отвечают за связывание хлорофилла, металлов (железа, марганца), хиноновых и других кофак-

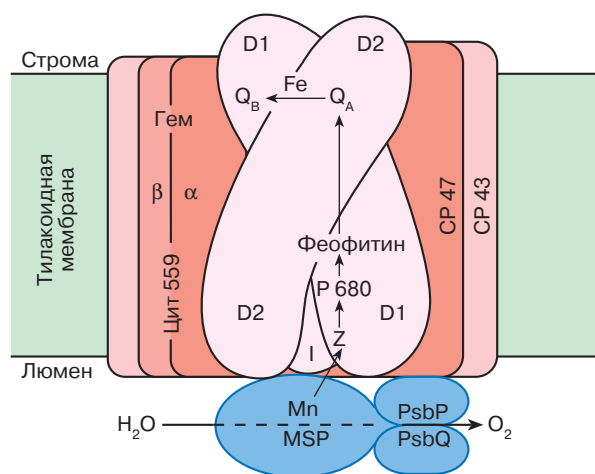


Рис. 1. Схема организации комплекса фотосистемы II. Обозначения см. в табл. 2

Таблица 2. Белки, входящие в комплекс фотосистемы II и ассоциированные с ним

Ген	Локализация*	Белок размер, кД	Функция
<i>psbA</i>	ХЛ	D1 (32)	Реакционный центр, Q _B
<i>psbD</i>	ХЛ	D2 (32)	Реакционный центр, Q _A
<i>psbB</i>	ХЛ	CP47 (47)	Связывание хлорофилла
<i>psbC</i>	ХЛ	CP43 (43)	Связывание хлорофилла
<i>psbE</i>	ХЛ	Цит. b559 (9)	Связывание гема
<i>psbF</i>	ХЛ	Цит. b559 (5)	Связывание гема
<i>psbI</i>	ХЛ	PI (4,5)	Неизвестна
<i>psbH</i>	ХЛ	PPH (10)	Фосфопротеин, стабилизация Q _B
<i>psbJ</i>	ХЛ	PJ (4)	Сборка ФС2
<i>psbK</i>	ХЛ	PK (3,5)	Неизвестна
<i>psbL</i>	ХЛ	PL (4)	Стабилизация Q _A
<i>psbO</i>	Я	MSP (33)	Стабилизация Мп-кластера
<i>psbP</i>	Я	PP (23)	Связывание ионов кальция и хлора
<i>psbQ</i>	Я	PQ (16)	Связывание ионов кальция и хлора
<i>psbS</i>	Я	PS (10)	Связывание хлорофилла
<i>psbW</i>	Я	PW (6)	Неизвестна
<i>psbT</i>	ХЛ	PT (4)	Защита от фотоинактивации

* ХЛ – хлоропластная ДНК, Я – ядерная ДНК.

торов, участвующих в транспорте электронов. Стало понятнее, как белки взаимодействуют между собой и собираются в единые комплексы. Кроме того, из фотосинтетических мутантов клонированы гены, об участии которых в контроле фотосинтеза ранее не было известно. В частности, нами совместно с партнерами из США был открыт и клонирован новый ген – *strA*, кодирующий протеазу, необходимую для превращения белка D1 (см. рис. 1) комплекса ФС2 в активную форму. Без созревания белка D1 в результате протеолитического отщепления небольшого пептида на С-конце белка не происходит присоединения атомов марганца к комплексу ФС2 и он не может функционировать: не работает реакционный центр и нет выделения кислорода. Таким образом, нарушается цикл обновления белка D1 (рис. 2), который быстро инактивируется в процессе фотосинтеза. Интересно, что СтрА-протеаза синтезируется только в тех клетках, в которых идет фотосинтез, но не в тканях корня, что указывает на функциональную сопряженность генетического контроля образования этой протеазы и компонентов аппарата фотосинтеза. Данный пример демонстрирует важность обслуживающих белков и показывает, как молекулярная генетика помогает их идентифицировать. Многие теперь известно и о строении комплексов ФС1, цитохромов b₆/f, АТФ-

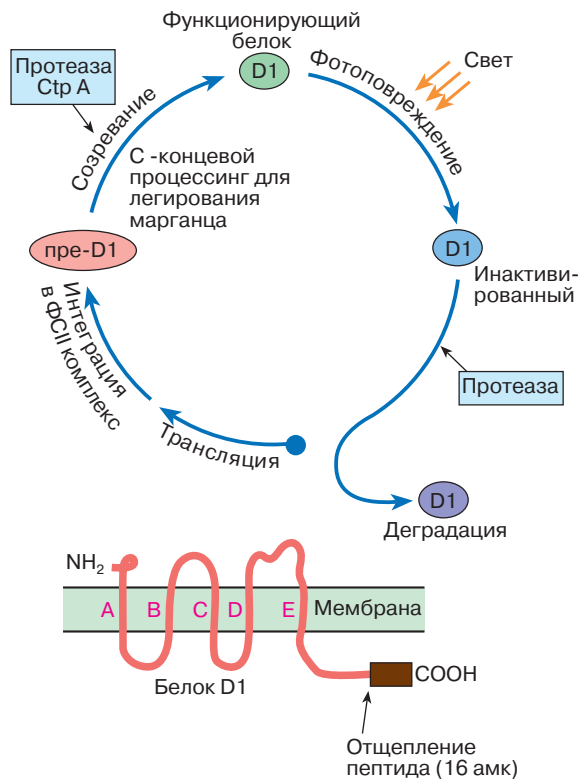


Рис. 2. Цикл обновления белка D1 фотосистемы II

синтетазы. Изучение процесса фотосинтеза развивается сейчас очень успешно, и есть основания полагать, что главные загадки строения и функционирования фотосинтезирующей машины в недалеком будущем удастся расшифровать.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА ФОРМИРОВАНИЯ АППАРАТА ФОТОСИНТЕЗА

Каким же образом синхронизируется сборка аппарата фотосинтеза, состоящего из белков, часть из которых синтезируется в пластиде, а другая доставляется из цитоплазмы? Как разворачивается генетическая программа в процессе созревания хлоропласта и координируется работа хлоропластных и ядерных генов? В ответах на эти вопросы и лежит суть проблемы формирования аппарата фотосинтеза и регулирования его функций. На рис. 3 приведена схема основных событий, связанных с развитием хлоропласта и становлением фотосинтезирующего аппарата. На первом этапе в пропластидах клеток меристемы осуществляется синтез (репликация) хлоропластной ДНК. Этот процесс обеспечивается целиком за счет белков, которые кодируются ядерными генами и транспортируются в предшественник хлоропласта. Хлоропластные гены в этот период молчат, не транскрибируются.

На следующем этапе, когда происходит увеличение размера клеток и количества копий хлоропластной ДНК, начинается декодирование хлоропластного генома, и прежде всего генов, отвечающих за синтез рибосомальных и транспортных РНК, то есть за образование рибосом и процесс трансляции. Часть рибосомальных белков поступает из цитоплазмы, так же как и аминоксил-тРНК-синтетазы, необходимые для трансляции в хлоропласте. Следует подчеркнуть, что хлоропластные гены и рибосомы похожи по строению на гены и аппарат трансляции в клетках бактерий, что еще раз свидетельствует в пользу эндосимбиотической теории происхождения хлоропластов из далеких предшественников прокариотических цианобактерий. Тем не менее на втором этапе развития хлоропласта гены хлоропластной ДНК считаются с помощью ДНК-полимеразы, которая, по-видимому, кодируется ядерными генами. Вместе с тем сборка хлоропластных рибосом обеспечивает возможность синтеза другой РНК-полимеразы, основные субъединицы которой кодируются уже хлоропластными генами. Только субъединица σ РНК-полимеразы, участвующая в узнавании промоторов, кодируется ядерным геном. Именно эта специфическая хлоропластная РНК-полимераза и транскрибирует большинство хлоропластных генов, продукты которых участвуют в формировании тилакоидных мембран и образовании аппарата фотосинтеза. При этом начинают

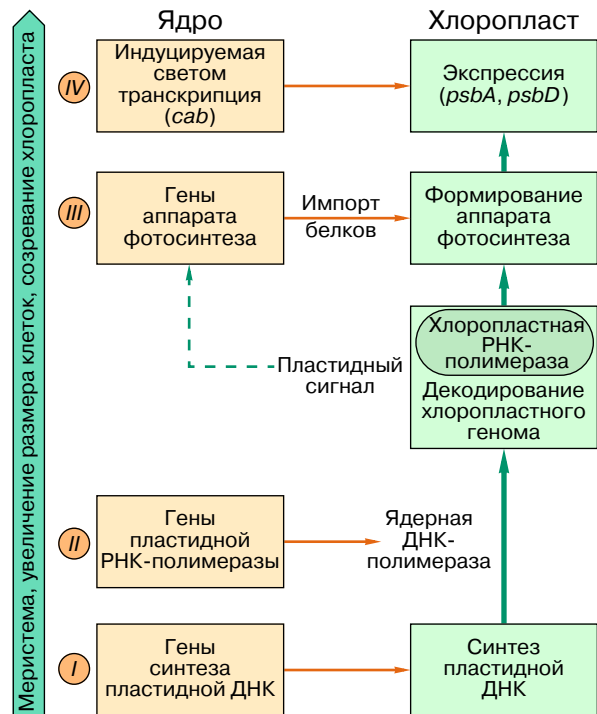


Рис. 3. Развитие хлоропласта и взаимодействие ядерных и хлоропластных генов

действовать и ядерные гены, ответственные за синтез белков, поступающих в хлоропласт из цитоплазмы. В ядро передаются какие-то сигналы из хлоропласта, активирующие работу ядерных генов, достигается координация работы хлоропластных и ядерных генов, продукты которых необходимы для образования аппарата фотосинтеза.

На третьем этапе развития хлоропласта и происходит синтез белков аппарата фотосинтеза и сборка всех комплексов. Активность генов фотосинтеза достигает в этот период максимума, в то время как экспрессия (уровень активности) генов, ответственных за образование и работу рибосом, резко снижается. В хлоропласте уже накоплен достаточный запас всех компонентов, необходимых для трансляции хлоропластных информационных РНК (иРНК). На этом этапе из цитоплазмы активно импортируются белки, нужные для сборки аппарата фотосинтеза. С завершением его формирования в зрелом хлоропласте замолкает и большинство хлоропластных генов, кодирующих белки фотосинтеза, за исключением некоторых белков ФС2, и прежде всего белка D1. Этот белок обновляется в тилакоидных мембранах значительно быстрее других, что достигается отчасти за счет высокой активности генов *psbA*, кодирующих D1 белок. В то же время уровень экспрессии многих ядерных генов остается достаточно высоким. В частности, в световых условиях активно работают *cab*-гены, ответственные за синтез белков светособирающих антенн. Эти белки, связанные с хлорофиллом, довольно быстро разрушаются под действием света и нуждаются в постоянном обновлении. Механизмы регуляции экспрессии генов фотосинтеза разнообразны и различны в хлоропласте и ядре. В координации работы генов фотосинтеза задействовано большое число регуляторных белков, многие из которых изучены очень слабо или даже не идентифицированы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ ФОТОСИНТЕЗА

Хлоропластные гены имеют много общего с прокариотическими генами. У большинства хлоропластных генов нет интронов, характерных для эукариотических генов. Многие хлоропластные гены сгруппированы в кластеры, которые являются единицами транскрипции. Им свойственны промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой прокариотического типа. В промоторной области некоторых генов фотосинтеза обнаружены регуляторные участки, которые могут выполнять функции усилителей или глушителей транскрипции. Таким образом, в принципе имеются условия для реализации прокариотических механизмов регуляции работы хлоропластных генов на уровне транскрипции. Однако в конце 80-х годов стало ясно, что экспрессия большинства хлоропластных генов контролируется не на уровне транскрипции, а уже после образования иРНК. На

рис. 4 изображена схема возможных путей регулирования синтеза белков, участвующих в фотосинтезе. Дифференциальная регуляция синтеза белков в хлоропласте связана с различной судьбой иРНК, которые считываются с различных генов примерно с одинаковой эффективностью, но затем подвергаются процессингу или деградации по-разному, в зависимости от потребности в конкретных белках. Существенную роль в регуляции играют время жизни иРНК, их стабильность. Одни иРНК довольно быстро подвергаются деградации, другие сохраняются долго, чем обеспечивается возможность их длительной эксплуатации для синтеза нужных белков. Поддержание стабильности иРНК определяется посадкой на нетранслируемые участки в начале молекулы иРНК специфических белков, синтезируемых в цитоплазме и кодируемых ядерными генами. Самое удивительное состоит в том, что для каждого типа иРНК, по-видимому, имеются специфические регуляторные белки, определяющие время жизни данной иРНК, картину ее процессинга и скорость трансляции. О существовании таких белков свидетельствует изучение некоторых мутантов водорослей и растений. Известны мутации в ядерных генах, приводящие к дестабилизации хлоропластных иРНК и соответственно к нарушению фотосистем из-за дисбаланса в количестве белков, участвующих в сборке комплексов. Обнаружены и мутации в

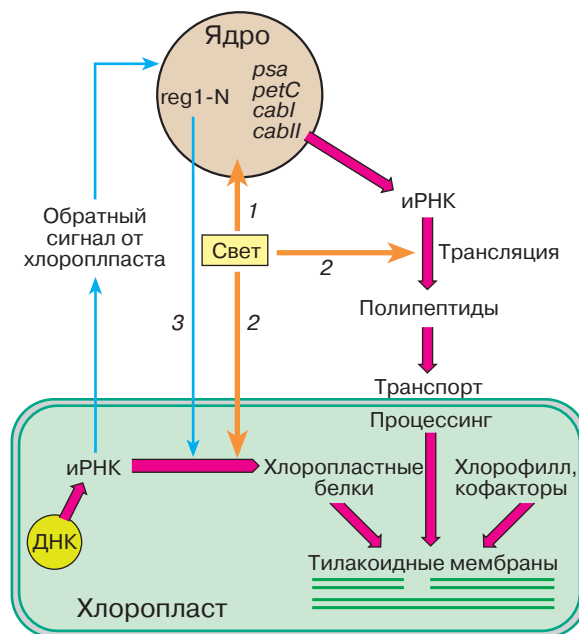


Рис. 4. Регуляция формирования аппарата фотосинтеза: 1 – индукция светом ядерных генов, 2 – регуляция светом трансляции хлоропластных и цитоплазматических иРНК, 3 – регуляция стабильности и трансляции хлоропластных иРНК продуктами ядерных генов

нетранслируемых участках некоторых иРНК, влияющие на их стабильность и скорость трансляции.

Важную роль в регуляции на уровне трансляции в хлоропластах играет свет. Его действие, очевидно, опосредовано через функции ядерных генов, но зависит и от сигналов, возникающих в самом хлоропласте. Предполагается, что эти сигналы могут отражать изменения в окислительно-восстановительном статусе клеток и тилакоидных мембран, происходящие в процессе фотосинтеза и под действием различных факторов окружающей среды. Интригующим является вопрос о том, каким образом координируются светозависимые механизмы регуляции синтеза белков в хлоропласте и цитоплазме. Так или иначе, можно считать, что возможности тонкой регуляции синтеза белков в хлоропласте на посттранскрипционном уровне позволяют аппарату фотосинтеза более оперативно адаптироваться к изменяющимся условиям среды.

Экспрессия многих ядерных генов (в отличие от хлоропластных) эффективно регулируется на уровне транскрипции при участии специфических регуляторных белков — фоторецепторов. К ним относятся фитохромы, реагирующие на красный и далекий красный свет, а также белки, осуществляющие рецепцию голубого света и ультрафиолетовых лучей. При поглощении света определенной длины волны хромофорной группой фитохромы меняют свою конформацию, переходя из неактивного состояния в активную форму, необходимую для включения светоиндуцируемых генов. Различные фитохромы осуществляют специфическую регуляцию разных групп генов на разных этапах жизни фотосинтезирующих организмов.

Перечень ядерных генов, экспрессия которых регулируется светом при участии фитохромов, довольно велик, в него входят и *cab*-гены, кодирующие белки светособирающих комплексов. Гены *cab* слабо экспрессируются в клетках меристемы каллуса, где нет зрелых хлоропластов. Это и понятно, поскольку в этих условиях светособирающие комплексы не нужны. В процессе созревания хлоропластов на свету *cab*-гены активируются, участвуя в образовании аппарата фотосинтеза. Их действие регулируется и в клетках со зрелыми хлоропластами, причем не только фитохромами, но и фитогормонами, а также системами, зависимыми от окислительно-восстановительного потенциала клеток. В промоторной области *cab*-генов найдены участки, мутации в которых нарушают светозависимую регуляцию работы этих генов. Мутации в фитохромных генах также могут блокировать индукцию *cab*-генов светом. Однако фитохромы сами, по-видимому, не взаимодействуют с промоторами *cab*-генов, а действуют опосредованно через другие регуляторные белки и промежуточные медиаторы (проводники) светового сигнала. Это следует из опытов на линиях томатов с мутациями в фитохромных генах. Использо-

вывая такие мутанты, американские ученые разработали изящную систему изучения путей передачи светового сигнала до уровня транскрипции генов, активируемых светом. Фитохром, введенный с помощью инъекций в мутантные клетки, восстанавливал способность к светорегуляции генов. Выяснилось, однако, что индукция генов светом восстанавливается в фитохромных мутантах не только фитохромом, но и при введении некоторых других белков, циклической ГМФ, ионов кальция. Кроме того, у разных растений были получены мутации, фенотипическое проявление которых было таким же, как и у фитохромных мутантов, хотя эти мутации находились в генах, кодирующих совершенно другие белки. Из этого был сделан важный вывод о том, что между фитохромом и геном — мишенью светозависимой регуляции имеются какие-то промежуточные звенья. Помимо фитохромов и других фоторецепторов имеется немало иных белков и факторов, которые участвуют в передаче светового сигнала к генам, контролирующим процессы фотоморфогенеза и адаптивные изменения в аппарате фотосинтеза.

На пути исследования структурно-функциональной организации аппарата фотосинтеза и механизмов регуляции данного процесса биологов ожидает много открытий. Успехи в этой области генетики продвигают не только к более глубокому пониманию самого фотосинтеза, но и вносят большой вклад в изучение сложнейших механизмов цитоплазматической наследственности, в разработку молекулярных основ процессов развития растений.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаева О.Н. Хлоропласт и его полуавтономность в клетке // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 7. С. 2–9.
2. Климов В.В. Фотосинтез и биосфера // Там же. 1996. № 8. С. 6–13.
3. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах — энергообразующих органеллах растительной клетки // Там же. № 4. С. 24–32.
4. Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии в живой клетке // Там же. 1997. № 7. С. 10–17.

* * *

Сергей Васильевич Шестаков, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой генетики и селекции Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, член-корреспондент РАН, председатель Научного совета РАН по проблемам генетики, лауреат Государственной премии СССР, премии им. М.В. Ломоносова (МГУ), удостоен золотой медали им. Н.И. Вавилова РАН, заслуженный деятель науки РФ. Автор более 250 научных публикаций в области молекулярной генетики микроорганизмов и растений, радиационной генетики.