



12-Й МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ ПО ЛИПИДАМ РАСТЕНИЙ (7–12 ИЮЛЯ 1996 г., ТОРОНТО, КАНАДА)

На очередном, 12-м симпозиуме по липидам растений, созданном Торонтским университетом, присутствовали около 220 исследователей из 23 стран Америки, Европы, Азии, Африки и Австралии. Главным организатором этой встречи ученых был известный липидолог растений *J. Williams*.

Основное внимание на симпозиуме было уделено биосинтезу и метаболизму липидов растений. Так, 16 представленных сообщений были посвящены исходному ферменту биосинтеза ЖК – CoASAc-карбоксилазе, которая катализирует АТФ-зависимое образование малонил-CoA из ацетил-CoA и карбоната и играет основную регуляторную роль в определении скорости этого биосинтеза. Было показано, что растения содержат два типа этого фермента. CoASAc-карбоксилаза эукариотного типа в виде изозимов присутствует только в цитозоле двудольных и во всех компартментах клеток однодольных (в особенности в эпидермисе злаков) и представляет собой единый биотинилированный многофункциональный полипептид (210–220 кДа, тип I), кодируемый двумя ядерными генами, а продуцируемый ею малонил-CoA используется в основном для удлинения ЖК, образования флавоноидов или малонирования различных соединений. Растительная CoASAc-карбоксилаза прокариотного типа (тип II), сходная по строению с CoASAc-карбоксилазой бактерий, содержится только в пластидах двудольных и представляет собой мультисубъединичный комплекс. Для активности фермента необходима согласованная активность трех компонентов: биотинкарбоксилазы, биотинкарбоксилпереносящего белка (35 кДа) и карбоксилтрансферазы.

При изучении последующего фермента биосинтеза ЖК – конденсирующей 3-кетоацил-АПБ-синтетазы – было показано, что у различных сортов масличной пальмы пониженная активность этого фермента в мезокарпе коррелировала с повышенным содержанием пальмитата, поскольку его удлинение было при этом затруднено. *G. Wagner* (США) сообщил об открытии нового механизма биосинтеза ЖК, названного “пу-

тем α -кетокислотного удлинения”. По этому пути идет синтез остатков C_3 – C_{14} -ЖК (нормальных, разветвленных, с четным и нечетным числом атомов С) в сложных эфирах сахаров, которые образуются в трихомных железах пасленовых (томат, табак, петуния). Эти ЖК образовывались из α -кетокислот, возникавших при дезаминировании различных аминокислот, причем за каждый шаг удлинения их цепь увеличивалась только на один атом С. У других исследованных до сих пор растительных объектов (куфея, соя, кокосовая пальма, арабидопсис) этот механизм отсутствовал.

Рентгеноструктурный анализ предпоследнего фермента цикла синтеза ЖК – еноил-АПБ-редуктазы из семян рапса – позволил определить его трехмерное строение и специфическую роль отдельных аминокислот в каталитической реакции (*A. Slabas*, Англия; *A. Smitje*, Голландия). У арабидопсиса эта реакция кодировалась единственным геном, экспрессия которого в растении табака позволила идентифицировать участок кДНК, ответственный за активность редуктазы. При изучении терминального фермента образования ЖК – ацил-АПБ-тиоэстеразы – было показано, что в семенах ильма белого или мускатного ореха, содержащих почти исключительно остатки $C_{10:0}$ - и $C_{14:0}$ -ЖК соответственно, данный фермент был относительно специфичен именно к этим ЖК. Фермент из ильма обладал двойной специфичностью: он гидролизовал $C_{10:0}$ -ацил-АПБ и длинноцепочечные насыщенные ацил-АПБ с малой активностью по отношению к $C_{12:0}$ -ацил-АПБ (*T.A. Voelker*, США).

В целом ряде сообщений рассматривался биосинтез характерных для растений ЖК необычного состава. Продолжая свои исследования по образованию ацетиленовых ЖК у мха цератодона, *P. Beutelmann* (Германия) показал, что его клетки интенсивно включали ацетат и ЖК в триацилглицерины, которые более чем на 80% состояли из ацетиленовых ЖК и откладывались в виде шарообразных жировых тел (0.1–0.3 мкм). Триацилглицерины масла семян *Crepis alpina* содержали более 60% ацетиленовой крепениновой (9-октадецен-12-иновой) ЖК, которая, как было показано, образовывалась из линолеата путем отщепления двух H-атомов от $\Delta 12$ -двойной связи под действием микросомного фермента ацетиленазы,

Сокращения: АПБ – ацилпереносящий белок, ЖК – жирные кислоты, ПНЖК – полинасыщенные ЖК, GроЗР – *sn*-глицеро-3-фосфат.

требующей присутствия кислорода и NAD(P)H (*S. Stymne*, Швеция). Биосинтез гидрокси-ЖК исследовали в семенах растений рода *Lesquerella*, где имели место $\Delta 12$ -гидроксилирование кислоты $C_{18:1}$ до гидроксикислоты $C_{18:1}$, удлинение и десатурация последней с образованием соответственно гидроксикислот $C_{20:1}$ и $C_{18:2}$, а также десатурация гидроксикислоты $C_{20:1}$ до кислоты $C_{20:2}$ (*P. Covello*, Канада). Клонированием геномного фермента $\Delta 12$ -гидроксилазы ЖК из *L. fendleri* с последующей экспрессией в арабидопсисе было показано, что эта гидроксилаза является также гомологичной десатуразой (*P. Broun*, США).

Доклад *J. Harwood* (Уэльс) был посвящен открытому недавно новому пути образования сульфохинозил-диацилглицеринов (сульфолипидов) фотосинтетических мембран, состоявшему в присоединении сульфита к UDP-глюкоз-5-ену. Лабораторией *C. Benning* (Германия) были получены мутанты фотосинтезирующих бактерий *Rhodobacter* и *Synechococcus*, а также арабидопсиса, которые были лишены сульфолипидов. Было показано, что в клетках этих мутантов накапливалась UDP-сульфохинозола как промежуточный продукт биосинтеза сульфолипидов и что последние не были необходимы для осуществления фотосинтеза с выделением O_2 . Высказано предположение, что сульфолипид может действовать в качестве заменителя анионных фосфолипидов при отсутствии фосфата в среде (*E. Seltam*, Швеция).

Доклады, посвященные биосинтезу главных мембранных липидов – фосфатидилхолинов, – включали клонирование трех кДНК, кодирующих холинкиназу, из арабидопсиса и их экспрессию в дрожжах (*D. Monks*, США), а также клонирование кДНК, кодирующей СТР:фосфохолинцитидилтрансферазу, из рапса, арабидопсиса и гороха; по аминокислотной последовательности ферменты из этих растений были сходны с соответствующими ферментами из печени крысы и из дрожжей (*J. Kim*, Корея; *I. Nishida*, Япония; *J. Harwood*, Уэльс). Образование холина в тканях шпината при засолении осуществлялось путем последовательного N-метилирования фосфоэтаноламина за счет метильных групп L-метионина и расщепления полученного таким образом фосфохолина (*E. Weretilnyk*, Канада).

Наряду с биосинтезом фосфатидилхолинов изучалось образование и других фосфолипидов мембран. По данным *T. Moore* (США), скорость синтеза фосфатидилэтаноламинов в эндосперме прорастающих семян клецшевины ограничивалась активностью этаноламинфосфат-цитидилтрансферазы, служившей, таким образом, регулятором этого процесса. Из микросом семян хлопчатника была выделена и охарактеризована N-ацилфосфатидилэтаноламин-синтетаза, осуществляющая в мембранах независимое от CoA и

АТФ N-ацилирование фосфатидилэтаноламинов свободными ЖК (*K.D. Chapman*, США). Предполагается, что этот фермент может служить для удаления свободных ЖК в мембранах растительных клеток.

Биосинтез триацилглицеринов в растениях рассматривался прежде всего на уровне отдельных ферментов этого процесса. Так, из генеративных органов куфеи выделили три различные кДНК, кодирующие Gro3P-дегидрогеназу, которая катализирует образование Gro3P (*L. Hausmann*, Германия). Из созревающих семян *Limnanthes douglasii* получили кДНК, кодирующую 1-ацил-Gro3P-ацилтрансферазу, которая в отличие от соответствующего фермента рапса была способна включать в *sn*-2-положение триацилглицеринов эруковую кислоту ($C_{22:1}$, $\Delta 13$); после экспрессии этой кДНК в трансгенных растениях рапса в их масле было обнаружено 2.8% триэруцина, и до 28.3% эруковой кислоты содержалось в *sn*-2-положении остальных триацилглицеринов (*W. Christie*, Шотландия). Аналогичной позиционной специфичностью характеризовался этот фермент и в созревающих семенах капусты, и потому в 63 из 300 исследованных линий капусты *sn*-2-положение триацилглицеринов включало от 10 до 40% эруковой кислоты при ее общем содержании 45–63% (*D.C. Taylor*, Канада).

Среди работ, посвященных биохимии изопреноидных липидов, наибольший интерес представили исследования *H. Lichtenthaler* (Германия), обнаружившие новый, независимый от классического ацетат-мевалонатного пути механизм биосинтеза стериннов и каротиноидов у зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus*. Оказалось, что мевинолин, высокоспецифичный ингибитор синтеза мевалоната, не влиял на накопление в клетках водоросли хондрилластерина, 22,23-дигидрохондрилластерина, эргост-7-енола, лутеина, β -каротина, фитола и пластохинона-9, а по данным ^{13}C -ЯМР характер распределения ^{13}C в этих соединениях после выращивания культуры на $[^{13}C]$ глюкозе и $[^{13}C]$ ацетате не соответствовал тому, который можно было бы ожидать в случае их образования из мевалоната и изопентенилпирофосфата. Последнее соединение, возможно, образуется в *Scenedesmus* путем соединения C_2 - и C_3 -фрагментов с образованием C_5 -интермедиата.

При изучении липоксигеназ наибольшее внимание было уделено “классической” липоксигеназе из семян сои. Было показано, что она способна окислять не только свободный линолеат, но и метиллинолеат, а также моно-, ди- и трилинолеин, однако для их эффективного окисления *in vitro* требовалось присутствие поверхностно-активного вещества (дезоксихолата). Липоксигеназа сои, иммобилизованная на альгинат-силикатном сорбенте, характеризовалась высокой активностью

образования гидроперекисей и значительной устойчивостью при обычной температуре. Эти разработки могут послужить основой для промышленного получения гидрокси-ЖК – дешевого заменителя дефицитного рицинолеата (*G. Piazza*, США). В проростках сои содержатся по крайней мере 6 изоформ 15-липоксигеназы (*D. Hildebrand*, США), а в проростках ячменя – изоферменты липоксигеназы 1 и 2, превращающие линолеат в его 9- и 13-гидроперекиси соответственно (*W. Holtman*, Голландия). Последний изомер в виде его сложных эфиров в большом количестве содержится в жировых телах проростков огурца, что свидетельствовало об активности специфической липоксигеназы, которая предположительно инициировала мобилизацию запасных липидов при прорастании (*I. Feussner*, Германия).

В докладах, посвященных оксилипинам – продуктам дальнейшего ферментативного превращения гидроперекисей ЖК, – прежде всего рассматривалось выделение лиаз гидроперекисей линолеата и линолената из водоросли *Chlorella* (*G. Piazza*, США) и созревающих плодов перца соответственно; последний фермент был клонирован и идентифицирован как один из видов цитохрома P-450 (*K. Matsui*, Япония). Расщепление гидроперекисей ЖК в мембранах тилакоидов приводит к образованию 2-транс-гексенала и 3-цис-гексенала, которые обуславливают характерный запах растертых зеленых листьев (*A. Hatanaka*, Япония). Важнейшими и широко распространенными предшественниками фотооксипинов являются жасмоновая кислота и ее производные – продукты окисления и циклизации линолената, которые служат медиаторами при переносе сигнала, ингибируют рост и стимулируют старение. Было показано, что эта кислота образовывалась во внешней мембране хлоропластов шпината (*E. Blee*, Франция). Алленоксидциклаза, ключевой фермент биосинтеза жасмоновой кислоты, была очищена до гомогенности из семян кукурузы. Показано, что фермент имеет димерную структуру, широкий рН-оптимум (6–8) и ингибируется 12,13-эпоксиоктадеценовой кислотой (*M. Hamberg*, Швеция).

Ряд выступлений содержал данные по катаболизму липидов при участии гидролитических ферментов. Так, продолжая изучение фосфолипазы D из листьев клещевины, *X. Wang* и др. (США) осуществили экспрессию гена этого фермента в растениях арабидопсиса и табака, причем трансгенные растения табака с 20-кратной экспрессией нормально развивались вплоть до стадии созревания.

Ряд выступлений на симпозиуме был посвящен роли липидов в определении теплостойкости рас-

тений. Было обнаружено, что мутант арабидопсиса, хлоропластные липиды которого были лишены C_{18:3}- и C_{16:3}-ПНЖК, характеризовался повышенной по сравнению с диким типом термостабильностью отдельных реакций фотосинтеза – флуоресценции хлорофилла и выделения O₂ на свету. Таким образом, триеновые ЖК играют критическую роль в выживании растений при высокой температуре (*J. Browse*, США). Увеличение температуры выращивания красной водоросли *Porphyridium cruentum* с 20 до 30°C вызвало снижение отношения между уровнями эукариотных и прокариотных молекулярных видов моногалактозилдиацилглицеринов и дигалактозилдиацилглицеринов (*Z. Cohen*, Израиль), а выращивание психрофильной бактерии *Pseudomonas* при наивысшей допустимой для ее роста температуре привело к ферментативной цис,транс-изомеризации 9-цис-гексадеценовой кислоты, как свободной, так и в составе фосфатидилэтанол-аминов, с образованием более высокоплавкого 9-транс-изомера этой кислоты (*H. Okuyama*, Япония).

При исследовании влияния видимого света на обмен липидов было обнаружено, что в листьях мутанта арабидопсиса, лишённого триеновых ЖК, сильный белый свет вызывал более интенсивное фотоингибирование реакционного центра фотосистемы II, чем в листьях дикого типа с нормальным составом ЖК; следовательно, липиды, включающие триеновые ЖК, играют важную роль не только в термостойкости (см. выше), но и в функционировании фотосинтетических реакционных центров растений (*J. Browse*, США).

Обмен липидов в растениях изменяется не только под влиянием физических факторов, но и под действием экзогенных и эндогенных регуляторов роста. Так, салициловая и салицилгидроксамовая кислоты – антагонисты гербицида галоксифопа – ингибировали образование ПНЖК на уровне транскрипции олеат – фосфатидилхолин – десатуразы в микросомах корней пшеницы (*S. Stymne*, Швеция). Абсцизовая кислота индуцировала активность элонгазы ЖК и накопление зруковой кислоты в полученных из микроспор зародышах рапса (*J.A. Wilmer*, Голландия).

В целом симпозиум показал, что в изучении растительных липидов продолжают доминировать идеи и методы молекулярной биологии. Труды симпозиума публикуются издательством “Kluwer” (Нидерланды).

А.Г. Верещагин

Институт физиологии растений РАН