

УДК 577.151

ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗА RjEAS (CYP74A88) ЛЮТИКА ЯПОНСКОГО (*Ranunculus japonicus*): КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 2019 Я.Ю. Топоркова*, В.С. Фатыхова, С.С. Горина,
Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный
исследовательский центр, Казанский научный центр РАН,
420111 Казань, Россия; электронная почта: kibmail@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 13.04.18

После доработки 07.10.18

Принята к публикации 07.10.18

Цитохромы P450 семейства CYP74 играют ключевую роль в липоксигеназном каскаде, обеспечивая разнообразие продуктов – оксипинов, окисленных производных жирных кислот. Семейство CYP74 включает алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы, дивинилэфирсинтазы и эпоксиалкогольсинтазы. В настоящей работе был клонирован ген *CYP74A88* лютика японского (*Ranunculus japonicus*) и изучены свойства рекомбинантного белка. Фермент CYP74A88 специфически превращает 9- и 13-гидроперекиси линолевой кислоты в оксиранил карбинолы, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую и 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовую кислоты соответственно, что подтверждается данными ГХ-МС анализа, а также исследованиями кинетических параметров фермента. Таким образом, фермент CYP74A88 является специфической эпоксиалкогольсинтазой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липоксигеназный каскад, цитохромы P450, семейство CYP74, эпоксиалкогольсинтаза, *Ranunculus japonicus*.

DOI: 10.1134/S0320972519020106

Оксипилены являются физиологически активными соединениями, образуемыми в результате окислительной трансформации полиненасыщенных жирных кислот. Эти биологически активные соединения могут функционировать либо в качестве сигнальных молекул, либо в качестве защитных веществ, часто проявляя сочетание тех и других свойств [1–4]. Разнообразие оксипинов обеспечивается липоксигеназами и цитохромами P450 семейства CYP74 [2, 5]. Семейство CYP74 включает только ферменты растений, разделяемых по каталитической активности на четыре типа: алленоксидсинтазы (EC 4.2.1.92), дивинилэфирсинтазы (EC 4.2.1.121), а также гидропероксидлиазы и эпоксиалкоголь-

синтазы (в EC не классифицированы) [3, 5, 6]. К настоящему времени охарактеризовано несколько десятков гидропероксидлиаз и алленоксидсинтаз, несколько дивинилэфирсинтаз разных видов растений, а также единственная эпоксиалкогольсинтаза плаунка *Selaginella moellendorffii*: SmEAS (CYP74M2, GenBank: XP_002972803) [6]. Кроме того, были обнаружены дуалистичные растительные ферменты, входящие в состав подсемейства CYP74C, катализирующие как гидропероксидлиазную, так и эпоксиалкогольсинтазную реакции [7].

Недавно в классификации ферментов CYP74 произошли значительные изменения. Ряд нерастительных цитохромов P450 различных семейств, наряду с растительными ферментами семейства CYP74, были объединены в клан CYP74 на основании данных филогенетического анализа [8]. В состав клана CYP74, помимо растительных ферментов семейства CYP74, включены также ферменты нерастительных организмов, в том числе ряд эпоксиалкогольсинтаз: BfEAS (CYP440A1, GenBank: ACD88492.1) ланцетника (*Branchiostoma floridae*) [9], EsEAS (CYP5164B1, GenBank: APG42673.1) бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* [10], NvEAS (CYP443D1, GenBank:

Принятые сокращения: 9-Г(П)ОД – (9S,10E,12Z)-9-гидро(перокси)-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-Г(П)ОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидро(перокси)-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-Г(П)ОД – (9Z,11E,13S)-13-гидро(перокси)-9,11-октадекадиеновая кислота; 13-Г(П)ОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидро(перокси)-9,11,15-октадекатриеновая кислота; Me – метил; ТМС – триметилсиллил; ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ОРС – открытая рамка считывания.

* Адресат для корреспонденции.

XP_001636360.1) актинии *Nematostella vectensis* [11]. Настоящая работа посвящена клонированию *de novo* гена *CYP74A88* лютика японского (*Ranunculus japonicus*) и исследованию соответствующего рекомбинантного фермента, который был идентифицирован, как эпоксиалкогильсинтаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: линолевая и α -линоленовая кислоты, соевая липоксигеназа V типа, а также метанол для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) («Sigma-Aldrich», США); боргидрид натрия, силилирующие реагенты, N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид (диазометан) и изопропанол («Fluka», Швейцария). Праймеры синтезировали в ЗАО «Евроген», (Россия). (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-Гидроперокси-10,12-октадекадиеновую (9-ГПОД) и (9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-9-гидроперокси-10,12,15-октадекатриеновую (9-ГПОТ) кислоты получали в результате инкубации соответствующих кислот («Sigma-Aldrich», США) с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 (GeneBank: AAG61118.1) кукурузы (*Z. mays*) [12] в 100 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,0) при 0 °С при постоянном кислородном барботаже. (9*Z*,11*E*, 13*S*)-Гидроперокси-9,11-октадекадиеновую (13-ГПОД) и (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновую (13-ГПОТ) кислоты получали в результате инкубации соответствующих кислот («Sigma-Aldrich», США) с соевой липоксигеназой V типа («Sigma-Aldrich», США) в 50 мМ Tris-HCl (рН 9,0) при 23 °С при постоянном кислородном барботаже. Экстрагированные гидроперекиси (в виде свободных карбоксильных кислот) дважды очищали методом ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм, 4,0–250 мм, «Elsico», Россия) в изократическом режиме (скорость потока 0,4 мл/мин),

используя смесь гексан : изопропанол : уксусная кислота = 98,1 : 1,8 : 0,1 (v/v). Гидроперекиси были хроматографически чистыми и, как минимум, на 98% оптически чистыми, как было определено с помощью хирально-фазовой ВЭЖХ [13].

Методы биоинформатики. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74 проводили в базах данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), а их сравнение проводили с помощью программы BLAST. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 9 («Invitrogen», США).

Клонирование гена *CYP74A88*. Листья (100 мг) дикорастущего лютика японского (*R. japonicus*) собирали, замораживали и гомогенизировали, растирая в жидком азоте. Тотальную РНК из листьев выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США), после чего препарат подвергали обработке ДНКазой («Qiagen», США). Определение концентрации РНК проводили с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen», США) и коммерческого набора Quant-iT TM RNA HS Assay Kit («Invitrogen», США). Для постановки реакции обратной транскрипции и получения двуцепочечной кДНК использовали коммерческий набор MINT («Евроген», Россия). Для получения фрагментов гена *CYP74A88* использовали вырожденные праймеры deg_F и deg_R (табл. 1), комплементарные последовательностям генов представителей семейства *CYP74*. Полученные фрагменты ожидаемого размера очищали и клонировали в векторе pGemT («Promega», США), после чего определяли их последовательности с помощью ДНК-анализатора ga3130 («Applied Biosystems», США). Расшифрованные последовательности анализировали с помощью программы BLAST. Полученную последовательность центральной области гипотетического гена семейства *CYP74* исполь-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для клонирования гена фермента *CYP74A88*

Название праймера	5'-3' последовательность	T _m , °С
deg_F	ССААСАТgCC(T/A)CC(T/g/C)ggCCC(C/T/A)TTC	64-67
deg_R	gTCTC(A/C)(C/g)gC(T/C)C(A/g)TT(T/C)gACC	64-67
Rj3F1	GCGTGGTTGGGTTCTGATGG	57,4
Rj3F2	GTTTGGCGTGGTTGGGTTCTG	58,8
Rj5R1	CCTGTTTCAATGCCTACGGTGG	58,1
Rj5R2	CCCTCCAGCTСТААТСАААТССАG	57,2
RjcF	CАТАТGGCTACTTCAACATCTCTAGTC	52
RjcR	CTCGAGCCCGTTТААGAGACGTCAAAG	63,2

зовали для определения 5'- и 3'-концевых участков методом RACE (Rapid Amplification of cDNA End) с помощью коммерческого набора SMART™ RACE cDNA amplification kit («Clontech Laboratories Inc.», США). Полноразмерную двуцепочечную кДНК использовали для двух раундов ПЦР с 5'- и 3'-концевыми адапторами и ген-специфичными праймерами (табл. 1). Для амплификации 5'-концевой области целевого гена в двух последовательных реакциях использовали праймеры Rj5R1 и Rj5R2; для амплификации 3'-концевой области – Rj3F1 и Rj3F2 (табл. 1). Полученные 5'- и 3'-концевые фрагменты клонировали в векторе pGem-T Easy («Promega», США); их последовательности определяли с помощью ДНК-анализатора ga3130. Перекрывающиеся 5'- и 3'-концевые, а также центральная область целевого гена позволили реконструировать его полную последовательность. Полученную последовательность 1548 п.н., кодирующую белок, 516 аминокислотных остатков, амплифицировали с помощью Q5 полимеразы («New Biolabs», Великобритания), ген-специфичных праймеров RjcF и RjcR (табл. 1) и двуцепочечной кДНК в качестве матрицы, после чего клонировали в векторе pET-23a («Novagen», США) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI.

Получение рекомбинантного фермента СУР74А88.

Для наработки рекомбинантного фермента СУР74А88 использовали вектор pET-23a системы pET («Novagen», США), реципиентом которого служили клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS («Novagen», США). Клетки бактериального продуцента засеивали в 2 мл среды Luria-Bertani [14], разведенной одним объемом М9 [15] (LB : М9) и содержащей 500 мг/л ампициллина и 35 мг/л хлорамфеникола. Культуру клеток выращивали в шейкере-инкубаторе («Сапуо», Япония) в течение 14 ч при 37 °С, после чего суспендировали в 1 л свежей среды (LB : М9) с ампициллином и хлорамфениколом. Культуру клеток продуцента выращивали при интенсивной аэрации (250 об/мин) и умеренной температуре (32 °С) до достижения оптической плотности OD_{600} 0,6 – 0,8. Клеточную суспензию быстро охлаждали до 20 °С на ледяной бане, немедленно добавляли индуктор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 0,1 мМ и предшественник гема – δ -аминолевулиновую кислоту – из расчета 50 мг/л. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 14 часов при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре (20 °С) после чего собирали с помощью центрифуги Z36НК («Hermle», Германия) (8000 об/мин, 5 мин, 4 °С).

Клеточные лизаты получали путем механического разрушения с помощью системы French

Press Cell Disrupter («Thermo Scientific», США). Очистку рекомбинантного белка проводили металлоаффинной хроматографией на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP («Bio-Rad», США). Целевой белок элюировали Na-фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим 30 мМ гистидина. Нарботку белка, а также степень очистки оценивали по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза в системе PowerPac Universal MiniProtean («Bio-Rad», США). Гели окрашивали Coomassie R250 («Sigma-Aldrich», США). Концентрацию фермента измеряли по содержанию гема [16].

Кинетические исследования рекомбинантного фермента СУР74А88. Ферментативную активность очищенного рекомбинантного белка СУР74А88 определяли по снижению оптической плотности реакционной среды в мин при 234 нм. Коэффициент молярной экстинкции 9- и 13-гидроперекисей линолевой и α -линоленовой кислот при 234 нм составляет $25\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Измерения проводили с использованием спектрофотометра РВ 2201 В («Солар», Беларусь). Концентрация субстрата составляла 7–300 мкМ. Анализ рН зависимости ферментативной активности проводили при 25 °С в 0,6 мл 50 мМ Na-фосфатном буфера при рН 6,0–8,0. Для расчета скорости реакций использовали начальные линейные участки кинетических кривых. Кинетические параметры рассчитывали, используя данные для насыщающей модели с одним сайтом связывания простого лиганда с помощью программного обеспечения SigmaPlot 11 («Systat Software Inc.», США). Для каждого варианта было поставлено пять независимых экспериментов; для расчетов использовали усредненные значения.

Условия инкубаций и анализ продуктов СУР74А88.

Рекомбинантный фермент (10 мкг) инкубировали с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ в течение 15 мин при 4 °С в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,0), после чего рН смеси снижали до 6,0, и продукты экстрагировали смесью (гексан : этилацетат) = (1 : 1) (v/v), метилировали диазометаном и силилировали смесью (пиридин : гексаметилдисилазан : триметилхлорсилан) = (1 : 1 : 1) (v/v), в течение 30 мин при 23 °С. Затем силилирующие реагенты удаляли в вакууме. Сухой остаток растворяли в 100 мкл гексана и подвергали анализу методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) в виде метиловых эфиров (Me) триметилсиллил-производных (Me/ТМС) с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A («Shimadzu», Япония). В некоторых случаях продукты восстанавливали NaNH_4 , после чего метилировали и триметилсилилировали. Кроме того, в отдельных случаях

перед метилированием и триметилсилилированием продукты восстановления NaBH_4 гидрировали над PtO_2 . Продукты (с/без восстановления NaBH_4) анализировали в виде Me либо Me/TMC методом ГХ-МС, как описано ранее [17].

Спектральные исследования. Продукты инкубаций (с/без предварительного гидрирования и восстановления) анализировали в виде метиловых эфиров либо Me/TMC методом ГХ-МС путем полного спектрального сканирования ионов в диапазоне отношений массы к заряду 50–650 [17]. Анализ ГХ-МС проводили с помощью масс-спектрометра QP5050A («Shimadzu», Япония), соединенного с газовым хроматографом GC-17A («Shimadzu», Япония). Исследуемый образец в режиме деления вводили в кварцевую колонку MDN-5S (5 % фенил, 95 % метилполисилоксан) 30 000 × 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм при программировании температуры 120–240 °C по 10 °C/мин, подавая в систему в качестве газ-носителя гелий с линейной скоростью 30 см/с. Полное сканирование или мониторинг селективных ионов проводили, используя электронную ионизацию (70 eV) [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование гена и получение рекомбинантного фермента CYP74A88. Отсутствие геномных данных лютика японского (*R. japonicus*) ограничивает возможности выявления в транскриптом мРНК неизвестных генов. В настоящее время достаточно эффективным подходом для поиска целевых последовательностей ДНК и РНК является использование вырожденных олигонуклеотидных праймеров, частично или полностью комплементарных искомым последовательности, в сочетании с различными вариантами полимеразной цепной реакции. Система вырожденных праймеров для выявления генов ферментов CYP74 была разработана нами ранее для клонирования гена *LuDES* (*CYP74B16*) льна-долгунца [18]. Для конструирования этих праймеров были использованы аминокислотные последовательности консервативных мотивов В'-спираль (ANMPPGP) и ERR-триады (WSNGPE). При использовании одной пары вырожденных праймеров deg_F и deg_R (табл. 1) происходило образование продуктов реакции ~1000 п.н., что соответствует расчетной протяженности центральных областей генов CYP74 при их амплификации с используемыми праймерами. В качестве матрицы для этой реакции использовали двуцепочечную кДНК, полученную в результате реакции обратной транскрипции тотальной РНК, выделенной из листьев лютика японского.

Сопоставление полученных последовательностей с базой данных NCBI показало, что один из фрагментов, полученный при использовании комбинации этих праймеров, имел высокую степень сходства с последовательностями генов ферментов подсемейства CYP74A многих видов растений. Это подсемейство включает в себя 13-гидропероксид-специфичные алленоксидсинтазы.

Для определения 5'- и 3'-концевых участков гена сконструировали по два прямых и обратных праймера Rj3F1, Rj3F2, Rj5R1, Rj5R2 (табл. 1), tandemно расположенных на расшифрованной части кДНК, и использовали их в качестве ген-специфичных праймеров. Для обеспечения амплификации с ними 5'- и 3'-концевых участков гена, в соответствии с методом RACE, к 5'- и 3'-концам матрицы присоединили неспецифические адаптерные последовательности, комплементарными которым является универсальный праймер M1. В результате 5'- и 3'-концевые фрагменты кДНК транскриптов гена (или нескольких генов) неизвестного фермента амплифицировали и клонировали в векторе pGem-T. Следующим этапом стало определение нуклеотидных последовательностей нескольких клонов полученной клонотеки. Поскольку клонированные нами 5'- и 3'-фрагменты могли соответствовать генам разных изоформ, для получения полной последовательности открытой рамки считывания (ОРС) проводили дополнительный раунд амплификации полноразмерных кДНК, соответствующих транскриптам генов подсемейства CYP74A лютика японского. Для этого использовали праймеры RjcF и RjcR (табл. 1), комплементарные 5'- и 3'-концевым участкам. Полученные ампликоны также клонировали с использованием вектора pGem-T, после чего определили их последовательности. Кроме того, праймеры RjcF и RjcR содержали последовательности сайтов рестрикции NdeI и XhoI, позволяющие амплифицированную ОРС клонировать в векторе pET-23a. На рис. 1 представлена полная последовательность гена CYP74A88. Трансляция полученной нуклеотидной последовательности выявила наличие консервативных мотивов, характерных для ферментов семейства CYP74, а именно – гидропероксид-связывающего мотива, ERR-триады, PPV-мотива и консервативного остатка цистеина.

Для получения рекомбинантного белка CYP74A88 ОРС соответствующего гена клонировали в экспрессирующем векторе pET-23a по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Целевой белок получали в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS; очистку проводили металлоаффинной хроматографией (рис. 2). Очищенный фермент использовали для изучения каталитических свойств.

atggctacttcaacatctctagtcacccctcttgcagtttcacagaggttccaagagaagaggttcaatctcagcctccatatca
 gaaactagttaccaatacaccttcgattccctctataaacattcacacctacaacaaaaccaccatcatttcccattcaaaaaatccca
 gagaatccaacttccattcatcaccctgtgaaagatcgtcttgattctctatctttcaaggaagggaagacttttcaagtca
 agaattcaaaactcacaggctgactgtattccgagctaatatgccccaggctctttcatttcacaagacccaaatgtcatcgttctc
 cttgatgcgaaaagcttccctgttcttttcgacacttcaaaagtgcgaaaagaaagatgttttactgggtacttacacacctctctt
 gaactcactgggtggctacagaactctttcttattcttgatccatcagaacccaaccacgccaactcaaaagtctcctctttttccaa
 ctcaaatccgctgcatgaaagtcacccagagtttcgacagcactttcgctaccttctttgacgagatggaaactgaattgggtgtt
 aacggtaaaagctaaagtccaacgatccttgcggtactacatgctttaaatttcttagcttagatcattatacaacacaaaccagctgat
 acaaaattcgacaaaagaagctcccgggataataaagaagtggtactgtttcagctcagttccagttctcacacttgggtttaccatgg
 ctaatcgaagatcttcttattccaccaagctcgtctccctccagctctaaacaaatccagttatgctaagctttacgatttctctctac
 caaagttcagggtccaattcttgatgagggcgaaaagattggtatttcgagagatgaaagcttgcataatctcattttcagtacctgt
 tcaatgcctacgggtggtatgaaaatcctcttccccaacatggtcaaaacaaatcggtcgggcagggtgcgaaaactccatagaaaatta
 gcggaagagatccgatctgtcgttagatccaacgggtgggaaaaatacaaatggctgggtatggagcaaaatgcccgttgatgaaatcgggt
 gtttatgaaatcatttcggattgaaaccgctgaccggttacaatcaggaagagcgaaaaaagatttcggtattgaaagtcatgttggc
 gcggttgaaagttaaaggaaggtgaggtattgtttgggtaccagccatttgctacaagagatccgaaaaatctttgagaaaagtgaagat
 ttcggtgacggaccgatattatgggtgaaagaagggcgaagaagttgttgaataatgtgttttgggtcaaaatggaagggagacagaaagtccg
 tcggtggataataaacaatgtgcgggaaaagatttcggtggttttgggtatcacgacttttggtagtcgagttatttctccgatcagat
 acggttgatattgaaagtgaagaaaatcggcgcttaggagctgcggttaactttgacgctctctaaacgggtga

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность ОРС гена *CYP74A88*. Старт и стоп-кодоны отмечены серым цветом

Характеристика каталитических свойств фермента *CYP74A88*. Для характеристики каталитических свойств рекомбинантного фермента *CYP74A88* использовали 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ в качестве субстратов. Оптимальным значением pH для каталитической активности рекомбинантного фермента *CYP74A88* являлось значение 7,0 (рис. 3). Дальнейшие эксперименты проводили при этом значении pH. Максимальное сродство и скорость реакции фермент *CYP74A88* проявлял в отношении 13-ГПОД (табл. 2). Как видно из соотношения значений k_{cat}/K_m , гидроперекиси линолевой кислоты являются более предпочтительными субстратами для рекомбинантного фермента *CYP74A88* (табл. 2). Фермент *CYP74A88* не проявлял активности в отношении 9-ГПОТ; в то же время 13-ГПОТ являлся неэффективным субстратом (табл. 2).

Для определения продуктов реакций гидроперекиси (100 мкг) инкубировали в течение 15 мин при 25 °C в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,0) в присутствии фермента *CYP74A88*. Продукты инкубаций в виде Me/TMC подвергли анализу методом ГХ-МС.

Инкубация рекомбинантного фермента *CYP74A88* с 9-ГПОД приводила к образованию основного продукта **1** (рис. 4, а). Электронный масс-спектр продукта **1** (Me/TMC) содержал M^+ при m/z 398 (1,16%); $[M - Me]^+$ при m/z 383 (1,84%); $[M - C1/C8]^+$ при m/z 241 (3,86%); $[M - C1/C9]^+$ при m/z 212 (6,57%); $[M - C1/C10]^+$ при m/z 199 (84,64%); $[TMC]^+$ при m/z 73 (94,98%) (рис. 4, б). Большой пик при m/z 199 в спектре указывал на присутствие оксиранил-карбинольной группы с оксираном при C9/C10 и боковым

спиртом (ТМС) при С11. Каталитическое гидрирование продукта **1** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводили к образованию соединения, масс-спектр

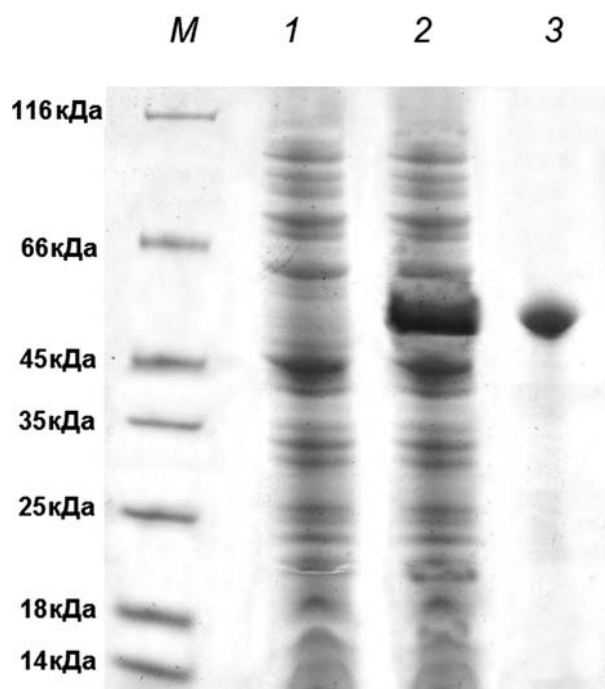


Рис. 2. Электрофореграмма получения и очистки фермента *CYP74A88*: *M* – маркер молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range («Bio-Rad», США); *1* – лизат клеток BL21(DE3)pLysS до добавления ИПТГ; *2* – лизат клеток BL21(DE3)pLysS, содержащих рекомбинантный фермент *CYP74A88*, через 14 час после добавления ИПТГ; *3* – очищенный препарат рекомбинантного фермента *CYP74A88*

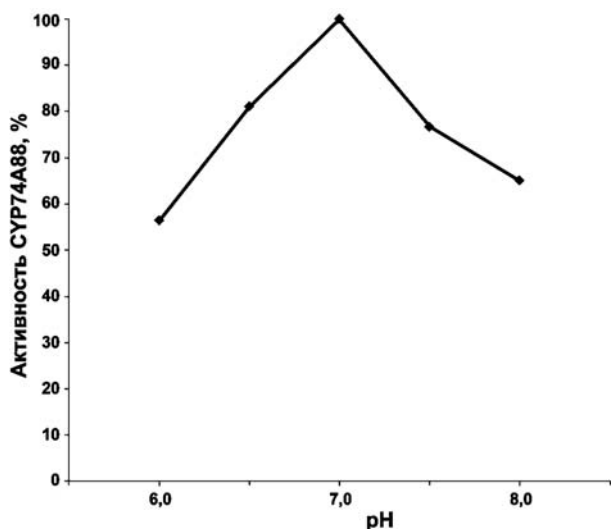


Рис. 3. Зависимость каталитической активности рекомбинантного фермента СУР74А88 от значения pH реакционной смеси

которого соответствовал таковому 9,10-эпокси-11-гидроксиоктадекановой кислоты (Me/TMC) [10]. Таким образом, данные масс-спектра подтвердили, что соединение **1** является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислотой. Дополнительным продуктом превращения 9-ГПОД при участии фермента СУР74А88 являлось соединение, масс-спектр которого содержал $[M - CO]^+$ при m/z 158 (12,67%), $[M - OMe]^+$ при m/z 155 (15,51%), $[M - C8/C9]^+$ при m/z 143 (38,66%), 87 (63,16%), а также ион метилового эфира перегруппировки Маклафферти при m/z 74 (100%) (рис. 4, в). Спектр соответствовал таковому 9-оксоноановой кислоты (Me) [19].

Инкубация фермента СУР74А88 с 13-ГПОД приводила к образованию основного продукта **2**, а также трех дополнительных продуктов, имеющих незначительно большее время удерживания, чем соединение **2** (рис. 5, а). Электронный масс-спектр продукта **2** содержал M^+ при m/z 398 (1,19 %); $[M - Me]^+$ при m/z 383 (1,82%); $[M -$

n-пентил] $^+$ при m/z 327 (2,54%); $[M - MeOH]^+$ at m/z 367 (1,17%); m/z 163 (17,02%); $[M - C12/C18]^+$ при m/z 285 (47,58%); $[TMC]^+$ при m/z 73 (80,89%) (рис. 5, б). Профили фрагментации подтвердили, что соединение **2** является 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислотой (Me/TMC). Каталитическое гидрирование продукта **2** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию соединения, спектр которого соответствовал таковому 11-гидрокси-12,13-эпоксиоктадекановой кислоты (Me/TMC) [10], подтверждая идентификацию продукта **2**. Минорные пики, элюируемые после продукта **2**, имели идентичные профили масс-спектров, таким образом, являясь стереоизомерами соединения **2**, различаясь преимущественно стереоконфигурацией при C11 или C12. Дополнительным продуктом инкубации фермента СУР74А88 с 13-ГПОД с большим временем элюции являлось соединение **3** (рис. 5, а), электронный масс-спектр которого содержал M^+ при m/z 398 (1,17%); $[M - Me]^+$ при m/z 383 (1,36%); $[M - MeOH]^+$ при m/z 367 (1,19%); $[M - C1/C8]^+$ при m/z 241 (8,38%); $[M - C1/C12 + TMC]^+$ при m/z 173 (2,64%); $CH_2 = O^+ - TMC$ при m/z 103 (6,96%); $[M - C1/C12 - H]^+$ при m/z 99 (14,05%); $[TMC]^+$ at m/z 73 (16,87%) (рис. 5, в). Данный спектр соответствовал таковому (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценной кислоты (Me/TMC) [20].

Каталитическая активность фермента СУР74А88 в отношении 13-гидроперекиси α -линоленовой кислоты была гораздо ниже, чем в отношении гидроперекисей линолевой кислоты. Инкубация фермента СУР74А88 с 13-ГПОТ приводила к образованию соединения, масс-спектр которого содержал $[M - Me]^+$ при m/z 383 (1,71%); $[M -$ пентенил] $^+$ при m/z 327 (1,97%); $[M - C12/C18]^+$ при m/z 285 (13,3%); m/z 155 (8,39%); m/z 129 (19,71%); $[TMC]^+$ при m/z 73 (23,98%) (данные не показаны). Масс-спектр соответствовал таковому 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекади-

Таблица 2. Кинетические параметры и субстратная специфичность рекомбинантного фермента СУР74А88

Параметр	Субстрат			
	13(S)-ГПОД	13(S)-ГПОТ	9(S)-ГПОД	9(S)-ГПОТ
K_m , мкМ	59,8 ± 5,8	199,2 ± 21,5	139,2 ± 15,3	н.в.*
k_{cat} , с ⁻¹	161,2 ± 14,1	17,4 ± 3,4	93,0 ± 10,0	н.в.*
k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ с ⁻¹	2,7	0,1	0,7	0
Специфичность, %	100	3,4	24,9	0

* Не выявлено.

еновой кислоты (Me/TMS). Каталитическое гидрирование этого соединения над PtO₂ с последующими метилированием и триметилсилилированием приводили к образованию соединения, спектр которого соответствовал таковому 11-гидрокси-12,13-эпокси-октадекановой кислоты (Me/TMS). Эти результаты позволили идентифицировать продукт превращения 13-ГПОТ при участии фермента СУР74А88 как 11-гидрокси-

12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновую кислоту (Me/TMS).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные ГХ-МС анализа, а также кинетические параметры фермента СУР74А88 лютика японского свидетельствуют, что специ-

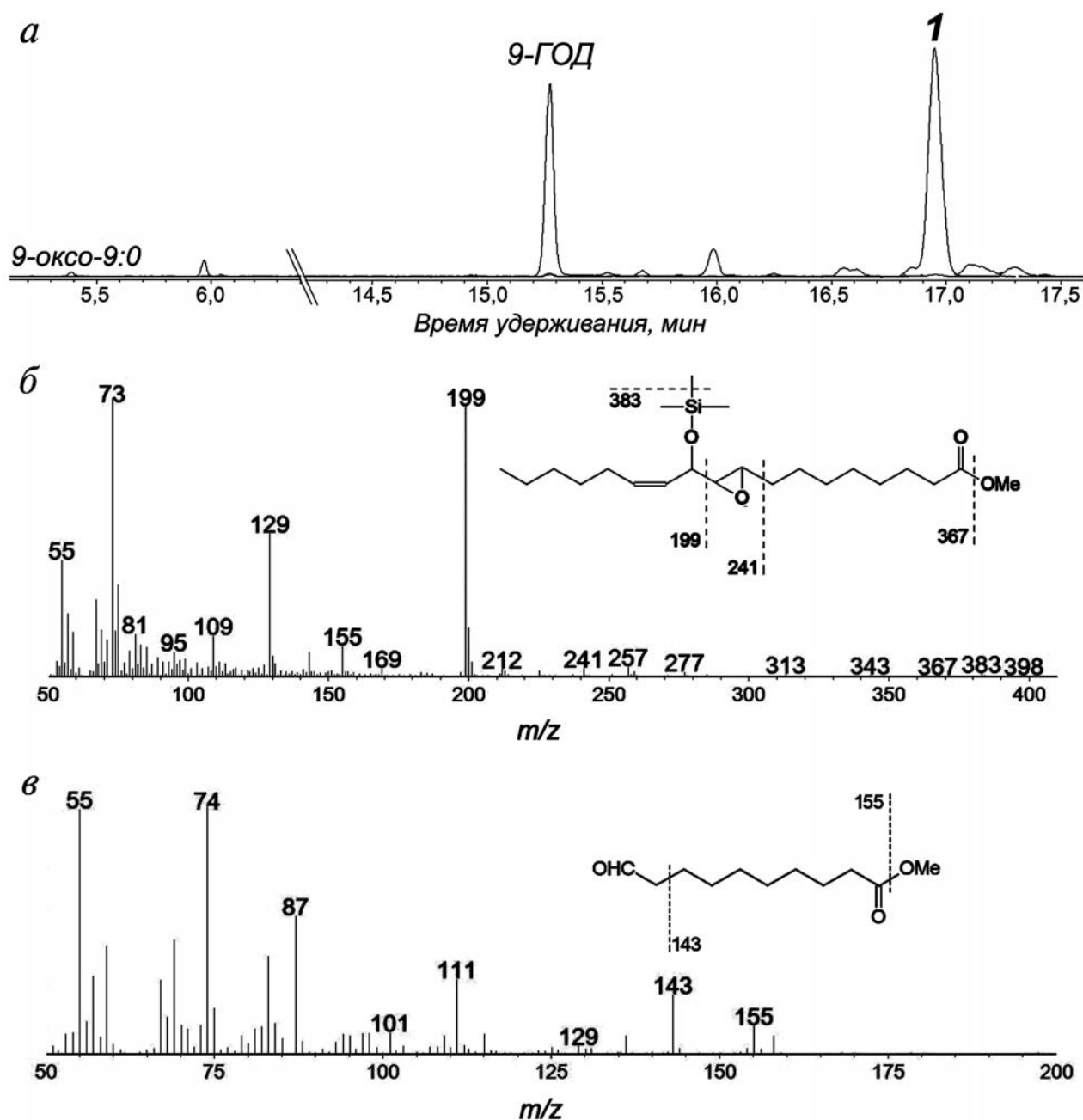


Рис. 4. Результат ГХ-МС анализа продуктов (Me/TMS) инкубации фермента СУР74А88 с 9-ГПОД. *а* – Хромограмма полного ионного тока продуктов (Me/TMS) инкубации фермента СУР74А88 с 9-ГПОД. Продукт **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценонная кислота (Me/TMS). *б* – Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1**. *в* – Масс-спектр и схема фрагментации 9-оксононановой кислоты (Me). 9-ГОД – (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота

фическими продуктами каталитического действия этого фермента являются оксиранил карбинолы. Продукты алленоксидсинтазной, гидропероксилиазной и дивинилэфирсинтазной реакций обнаружены не были. Таким образом, фер-

мент СУР74А88 является специфической эпоксиалкогольсинтазой (ЕС 5.3.99.-). В соответствии с принятой номенклатурой ферментов семейства СУР74, ферменту присвоено тривиальное название RjEAS (эпоксиалкогольсинтаза

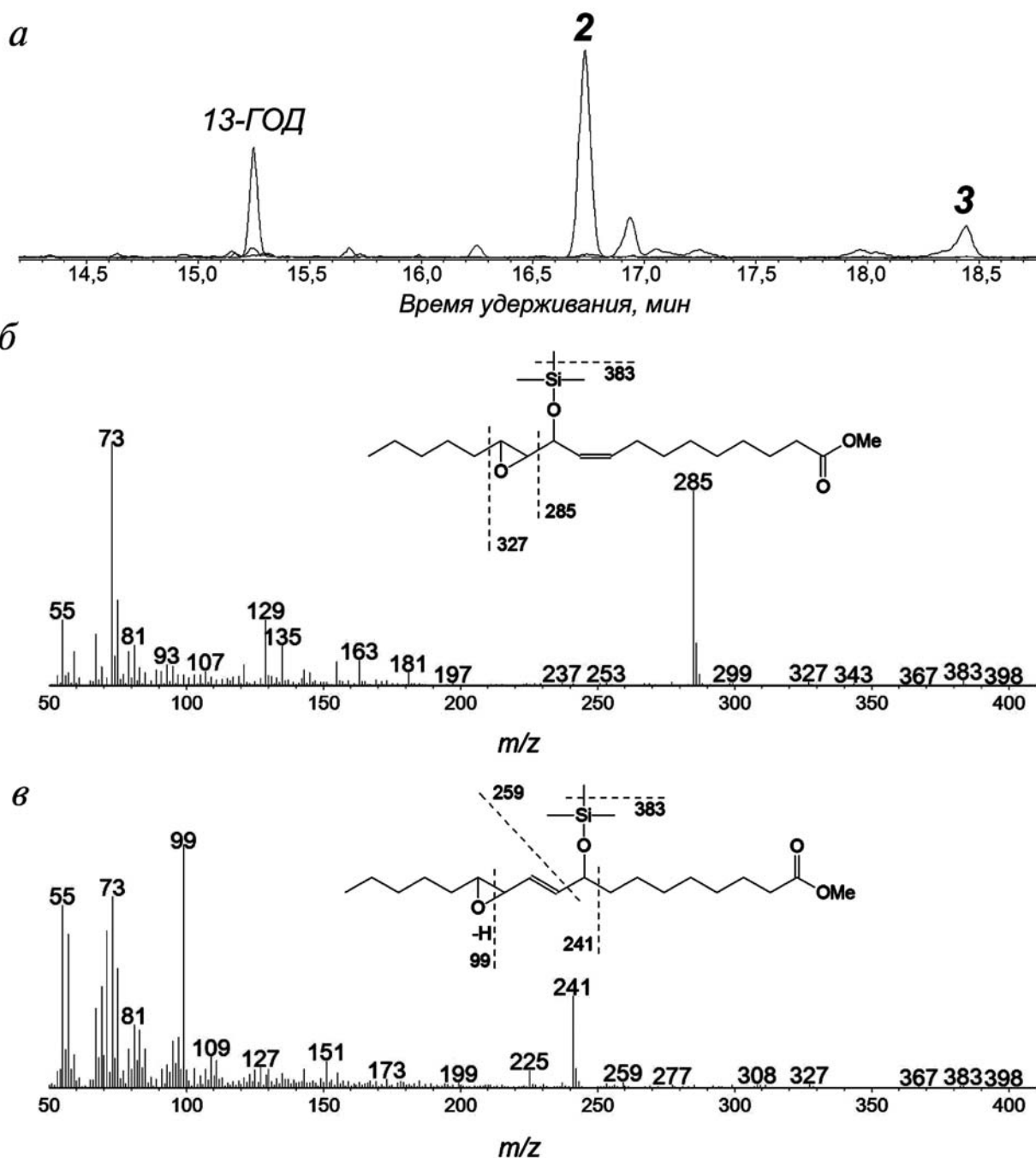


Рис. 5. Результат ГХ-МС анализа продуктов (Me/TMS) инкубации фермента СУР74А88 с 13-ГПОД. *а* – Хроматограмма полного ионного тока продуктов (Me/TMS) инкубации фермента СУР74А88 с 13-ГПОД. Продукт 2, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMS). Продукт 3, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (Me/TMS). *б* – Масс-спектр и схема фрагментации продукта 2. *в* – Масс-спектр и схема фрагментации продукта 3 (Me/TMS). 13-ГОД – (9*Z*,11*E*,13*S*)-13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая кислота

R. japonicus), так же, как и соответствующему гену — *RjEAS*. Однако в дальнейшем изложении мы сохраняем номенклатурное название CYP74A88.

К настоящему времени охарактеризованы три эпоксиалкогольсинтазы клана CYP74, а именно — ферменты CYP440A1 (*BfEAS*) ланцет-

ника (*B. floridae*) [9], CYP5164B1 (*EsEAS*) бурой водоросли *E. siliculosus* [10] и CYP443D1 (*NvEAS*) морского анемона (*N. vectensis*) [11]. Фермент CYP74A88 является второй истинной эпоксиалкогольсинтазой, входящей в состав семейства CYP74. Первой эпоксиалкогольсинтазой этого

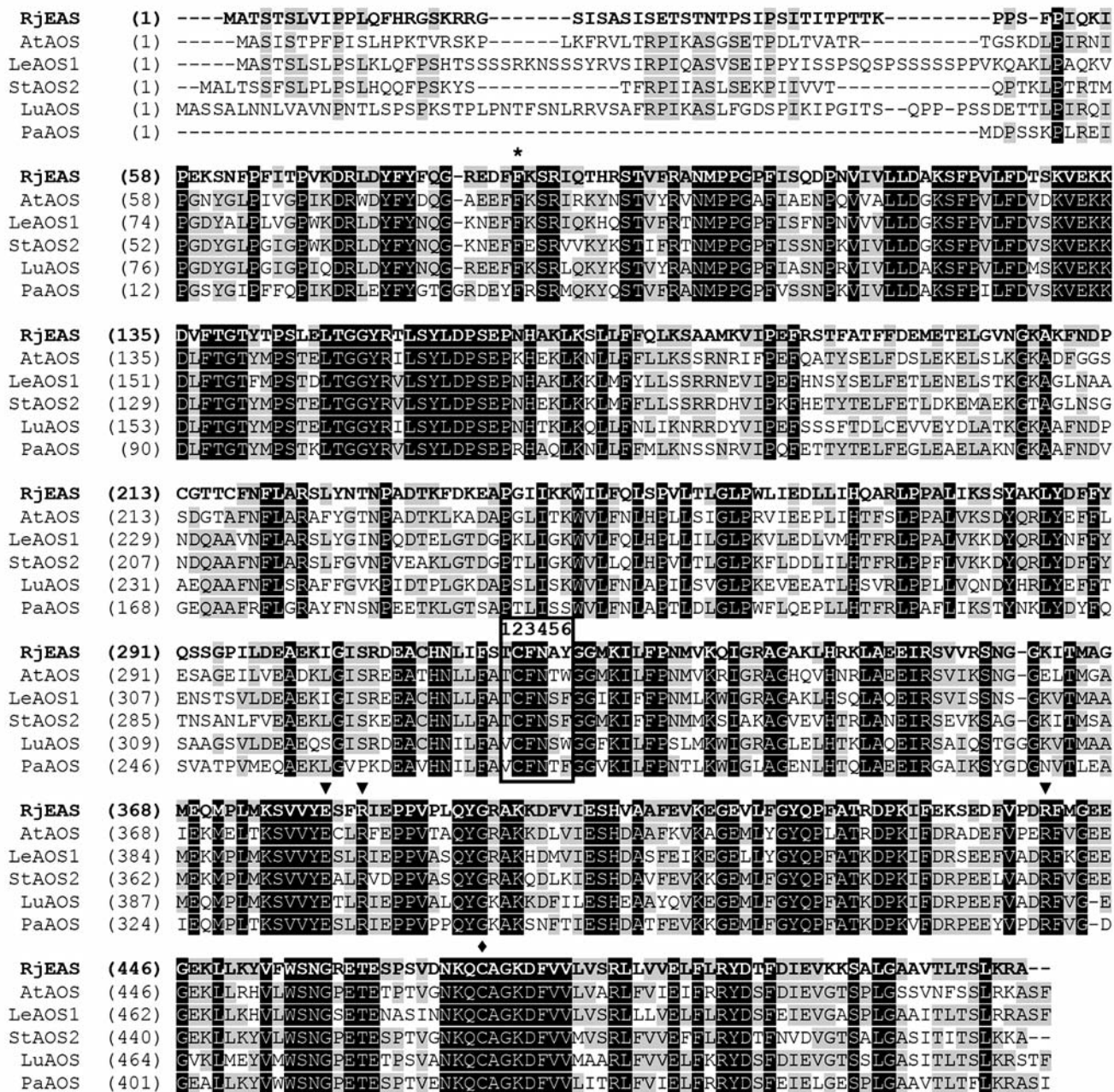


Рис. 6. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фермента CYP74A88 с алленоксидсинтазами подсемейства CYP74A: цифрами 1–6 пронумерован домен GCM, символами треугольник вниз и ромб отмечены ERR-триада и консервативный остаток цистеина в гем-связывающем домене, символом * отмечен F/L toggle. Для выравнивания были выбраны последовательности следующих ферментов CYP74: At, *Arabidopsis thaliana*, AtAOS, NP_199079.1; Le, *Solanum lycopersicum*, LeAOS1, CAB88032.1; St, *Solanum tuberosum*, StAOS2, ABD15175.1; Lu, *Linum usitatissimum*, LuAOS, P48417.1; Pa, *Parthenium argentatum*, PaAOS, Q40778.2

семейства является CYP74M2 (SmEAS) *S. moellendorffii* [6]. SmEAS (CYP74M2) является 13-гидропероксид специфичным ферментом, предпочтительным субстратом которого является 13-ГПОТ, тогда как фермент CYP74A88 метаболизирует гидроперекиси линолевой кислоты и предпочтительным субстратом является 13-ГПОД.

Растительные эпоксиалкогольсинтазы, а также EsEAS бурой водоросли *E. siliculosus*, синтезируют, в основном, (9*S*, 10*S*, 11*S*)-эпимеры эпокси спиртов (*транс*-эпоксиды), тогда как VfEAS и NvEAS – (*S*, *R*, *S*)-стереоизомеры с *цис*-эпоксидом. Эксперименты с использованием ¹⁸O показали, что эпоксиалкогольсинтазы представляют собой изомеразы, включающие оба атома кислорода из меченных ¹⁸O₂ субстратов [10, 11].

Описаны два пути биосинтеза эпокси спиртов из гидроперекисей жирных кислот. Первый путь протекает через эпоксидирование двойной связи гидроперекиси атомом кислорода. Такие превращения катализируются пероксигеназами [20–22] и другими менее изученными растительными ферментами, такими как фермент свеклы [23]. Второй путь включает гомолитическое расщепление ОО связи гидроперекиси, атаку алкоксирадикала и образование эпоксиаллильного радикала, который затем подвергается рекомбинации с гидроксильным радикалом, что приводит к образованию оксиранил карбинола. Эта перегруппировка происходит неферментативно под действием кислот [24, 25], металлов с переходной валентностью [26–30], гемопротейнов [31] и тепла [32]. Эта же реакция катализируется вышеупомянутыми ферментами CYP74, а также CYP74A88. Все эпоксиалкогольсинтазы, по-видимому, катализируют образование эпокси спиртов через внутримолекулярную перегруппировку гидроперекиси; этот механизм был экспериментально подтвержден для EsEAS [10] и NvEAS [11]. Эпоксиалкогольсинтазная реакция идет следующим образом: 1) гомолиз гидропероксидной группы; 2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; 3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокси спирт.

Последовательность фермента CYP74A88 обладает высокой степенью сходства с ферментами подсемейства CYP74A (рис. 6). Все охарактеризованные до сих пор ферменты подсемейства CYP74A являются 13-гидропероксид-спе-

цифичными алленоксидсинтазами. Фермент CYP74A88 является первой эпоксиалкогольсинтазой, которая по критериям номенклатуры также относится к этому подсемейству. Одним из каталитически важных мотивов является «гидропероксид-связывающий мотив» (ГСМ, ранее «центральная область I-спирали»), соответствующий «кислород-связывающему мотиву» классических монооксигеназ суперсемейства P450. Его последовательность практически полностью соответствует ферментам подсемейства CYP74A (рис. 6), за исключением остатка аланина в пятом положении, который характерен для гидропероксидлиаз подсемейства CYP74B и ферментов, проявляющих двойную активность гидропероксидлиаз/эпоксиалкогольсинтаз, подсемейства CYP74C [7].

Все подсемейства внутри семейства CYP74 включают несколько типов ферментов: подсемейство CYP74B включает 13-гидропероксид-специфичные гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы; подсемейство CYP74C – 9/13-гидропероксид-специфичные алленоксидсинтазы и ферменты, проявляющие двойную активность гидропероксидлиаз/эпоксиалкогольсинтаз; подсемейство CYP74M – 13-гидропероксид-специфичные дивинилэфирсинтазы и эпоксиалкогольсинтазы. Результаты настоящей работы свидетельствуют, что подсемейство CYP74A также включает два типа ферментов: 13-гидропероксид-специфичные алленоксидсинтазы и 9/13-гидропероксид-специфичные эпоксиалкогольсинтазы.

Финансирование

Эксперименты по клонированию гена CYP74A88, получению и очистке рекомбинантного фермента проводили при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 16-34-60231). Эксперименты по характеристике каталитических свойств рекомбинантного фермента CYP74A88 проводили при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-10286).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blee, E. (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions, *Prog. Lipid Res.*, **37**, 33–72.
- Grechkin, A.N. (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway, *Prog. Lipid Res.*, **37**, 317–352.
- Grechkin, A.N. (2002) Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68–69**, 457–470.
- Stumpe, M., and Feussner, I. (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes, *Phytochem. Rev.*, **5**, 347–357.
- Brash, A.R. (2009) Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes, *Phytochemistry*, **70**, 1522–1531.
- Toporkova, Y.Y., Smirnova, E.O., Gorina, S.S., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2018) Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii*, *Phytochemistry*, **156**, 73–82.
- Toporkova, Y.Y., Gorina, S.S., Bessolitsyna, E.K., Smirnova, E.O., Fatykhova, V.S., Bruhlmann, F., Ilyina, T.M., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2018) Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 369–378.
- Nelson, D.R., Goldstone, J.V., and Stegeman J.J. (2013) The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **368**, 20120474.
- Lee, D.-S., Nioche, P., Hamberg, M., and Raman, C.S. (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthesis enzymes, *Nature*, **455**, 363–370.
- Toporkova, Y.Y., Fatykhova, V.S., Gogolev, Y.V., Khairutdinov, B.I., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2017) Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 167–175.
- Toporkova, Y.Y., Gorina, S.S., Mukhitova, F.K., Hamberg, M., Ilyina, T.M., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2017) Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 1099–1109.
- Wilson, R.A., Gardner, H.W., and Keller, N.P. (2001) Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 980–987.
- Chechetkin, I.R., Osipova, E.V., Tarasova, N.B., Mukhitova, F.K., Hamberg, M., Gogolev, Y.V., and Grechkin, A.N. (2009) Specificity of oxidation of linoleic acid homologs by plant lipoxygenases, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 855–861.
- Гловер Д. (1988) *Клонирование ДНК. Методы*, Мир, Москва, с. 538.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. (1984) *Молекулярное клонирование*, Мир, Москва, с. 480.
- Schenkman, J.B., and Jansson, I. (2006) Spectral analyses of cytochromes P450, *Meth. Mol. Biol.*, **320**, 11–18.
- Grechkin, A.N., Bruhlmann, F., Mukhtarova, L.S., Gogolev, Y.V., and Hamberg, M. (2006) Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the hemolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1419–1428.
- Gogolev, Y.V., Gorina, S.S., Gogoleva, N.E., Toporkova, Y.Y., Chechetkin, I.R., and Grechkin, A.N. (2012) Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member, *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 287–294.
- Mukhtarova, L.S., Mukhitova, F.K., Gogolev, Y.V., and Grechkin, A.N. (2011) Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations, *Phytochemistry*, **72**, 356–364.
- Hamberg, M., and Hamberg, G. (1996) Peroxygenase-catalyzed fatty acid epoxidation in cereal seeds (sequential oxidation of linoleic acid into 9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid), *Plant Physiol.*, **110**, 807–815.
- Hamberg, M., and Hamberg, G. (1990) Hydroperoxide-dependent epoxidation of unsaturated fatty acids in the broad bean (*Vicia faba* L.), *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 409–416.
- Blee, E., Wilcox, A.L., Marnett, L.J., and Schuber, F. (1993) Mechanism of reaction of fatty acid hydroperoxides with soybean peroxygenase, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1708–1715.
- Hamberg, M., and Olsson, U. (2011) Efficient and specific conversion of 9-lipoxygenase hydroperoxides in the beetroot, formation of pinellic acid, *Lipids*, **46**, 873–878.
- Gardner, H.W., Weisleder, D., and Nelson, E.C. (1984) Acid catalysis of a linoleic acid hydroperoxide: formation of epoxides by an intramolecular cyclization of the hydroperoxide group, *J. Org. Chem.*, **49**, 508–515.
- Gardner, H.W., Nelson, E.C., Tjarks, L.W., and England, R.E. (1984) Acid-catalyzed transformation of 13(*S*)-hydroperoxylinoleic acid into epoxyhydroxyoctadecenoic and trihydroxyoctadecenoic acids, *Chem. Phys. Lipids*, **35**, 87–101.
- Gardner, H.W., Kleiman, R., and Weisleder, D. (1974) Homolytic decomposition of linoleic acid hydroperoxide: identification of fatty acid products, *Lipids*, **9**, 696–706.
- Gardner, H.W. (1975) Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic, *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 129–136.
- Gardner, H.W., and Jursinic, P.A. (1981) Degradation of linoleic acid hydroperoxides by a cysteine FeCl₃ catalyst as a model for similar biochemical reactions: I. Study of oxygen requirement, catalyst and effect of pH, *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 100–112.
- Gardner, H.W., and Kleiman, R. (1981) Degradation of linoleic acid hydroperoxides by a cysteine FeCl₃ catalyst as a model for similar biochemical reactions: II. Specificity in formation of fatty acid epoxides, *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 113–125.
- Dix, T.A., and Marnett, L.J. (1985) Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and trihydroxy fatty acids by hematin, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5351–5357.
- Gardner, H.W. (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids, *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 65–86.
- Hamberg, M., and Gotthammar, B. (1973) A new reaction of unsaturated fatty acid hydroperoxides: formation of 11-hydroxy-12,13-epoxy-9-octadecenoic acid from 13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid, *Lipids*, **8**, 737–744.

**EPOXYALCOHOL SYNTHASE RjEAS (CYP74A88)
OF THE JAPANESE BUTTERCUP (*Ranunculus japonicus*):
CLONING AND CHARACTERIZATION
OF CATALYTIC PROPERTIES**

**Y. Y. Toporkova*, V. S. Fatykhova, S. S. Gorina,
L. S. Mukhtarova, and A. N. Grechkin**

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific
Center of the Russian Academy of Sciences, 420111 Kazan,
Russia; E-mail: kibmail@kibb.knc.ru*

Received April 13, 2018

Revision received October 7, 2018

Accepted October 7, 2018

Cytochromes P450 of the CYP74 family play a key role in lipoxygenase cascade, providing a variety of products – oxylipins, oxygenated derivatives of fatty acids. The CYP74 family includes allene oxide synthases, hydroperoxide lyases, divinyl ether synthases, and epoxyalcohol synthases. In the present work, the *CYP74A88* gene of the Japanese buttercup (*Ranunculus japonicus*) was cloned, and the properties of the recombinant protein were studied. The CYP74A88 enzyme specifically converts 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to oxiranyl carbinols, 9,10-epoxy-11-hydroxy-12-octadecenoic and 11-hydroxy-12,13-epoxy-9-octadecenoic acids, respectively, that is confirmed by GC-MS analysis, as well as by the enzyme kinetic analysis. Thus, the CYP74A88 is a specific epoxyalcohol synthase.

Keywords: lipoxygenase cascade, cytochromes P450, CYP74 family, epoxyalcohols, *Ranunculus japonicus*