

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.162;577.121

**СЬСУР716А261 – НОВАЯ β-АМИРИН-28-ГИДРОКСИЛАЗА,
ВОВЛЕЧЕННАЯ В БИОСИНТЕЗ КОНИЗАСАПОНИНОВ В *Conyza blinii*¹**

© 2020 г. R. Sun^{a, b}, J. L. Gao^b, H. Chen^{a, *}, S. Liu^b, Z. Z. Tang^a

^aCollege of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, 625014 China

^bCollege of Biological and Chemical Engineering, Panzhuhua University, Panzhuhua, Sichuan, 617000 China

*e-mail: chenhuai@163.com

Поступила в редакцию 08.02.2020 г.

После доработки 08.02.2020 г.

Принята к публикации 13.03.2020 г.

Конизасапонины, продуцируемые лекарственным растением *Conyza blinii*, используемым в традиционной китайской медицине, относятся к сапонидам олеананового типа с широким спектром биологической активности. Из последовательностей транскриптов *Conyza blinii* были отобраны 10 предполагаемых полноразмерных последовательностей генов цитохромов P450 (CYP). Продукт гена *CbCYP716A261* идентифицировали как предполагаемую β-амирин-28-гидроксилазу, исходя из результатов филогенетического анализа и исследования транскрипционной активности в листьях растения *Conyza blinii*, обработанного метилжасмонатом. Исследование ферментативной активности продукта гена *CbCYP716A261* проведено в системах *in vitro* и *in vivo*. Результаты ВЭЖХ подтвердили, что белок СЬСУР716А261 катализирует гидроксилирование β-амирина по атому углерода С-28 с образованием олеаноловой кислоты. Таким образом, идентифицирован ген *CbCYP716A261*, кодирующий β-амирин-28-гидроксилазу при биосинтезе конизасапонинов в растении *Conyza blinii*. В рамках проведенного исследования получена новая информация о пути биосинтеза конизасапонинов и расширен список известных β-амирин-28-гидроксилаз.

Ключевые слова: цитохром P450, *CbCYP716A261*, β-амирин, конизасапонин, олеаноловая кислота

DOI: 10.31857/S0026898420050092

ВВЕДЕНИЕ

Сапонины представляют собой группу гликозидных соединений растений. В зависимости от сапогенина сапонины делятся на стероидные и тритерпеновые. Стероидные сапонины в основном представлены в семействах Scrophulariaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae и др. Тритерпеновые сапонины можно найти у представителей семейств Leguminosae, Agaliaceae, Polygalaceae, Compositae и др. У разных видов растений сапонины отличаются по структуре и спектру биологической активности [1, 2]. Сапонины состоят из 30 атомов углерода, сгруппированных в кольца по 4–5 атомов и обранных функциональными группами, от которых зависит разнообразие структур. Разнообразная биологическая активность сапонинов включает в себя антибактериальную, противоопухолевую, инсектицидную, моллюскоцидную и антифидадную; кроме того, они проявляют иммуностимулирующие и гепатопротекторные свойства [3–5]. Таким образом, сапонины представляют

коммерческую ценность и используются в фармацевтике [6–8].

Растение *Conyza blinii* используется в традиционной китайской медицине, как самостоятельно, так и в комбинации с другими ингредиентами, для лечения бронхита и других воспалительных состояний [9]. Конизасапонины, принадлежащие к классу тритерпеновых сапонинов, представляют собой основной фармакологически активный компонент растения и составляют около 3% сухого веса всего растения [10–12]. К настоящему времени все 17 конизасапонинов, выделенных из спиртовых экстрактов *C. blinii*, относятся к олеанановым пентациклическим тритерпенам [13–15].

Первый этап в биосинтезе тритерпеновых сапонинов – это циклизация 2,3-оксидосквалена, которую катализируют оксидоскваленциклазы, приводящая к образованию множества типов углеродных скелетов, включая олеанановый, лупановый, урсановый и даммарановый. Из них

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

Сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; βAS – β-амиринсинтаза; CPR – NADPH-СУР-редуктаза; СУР – цитохром P450.

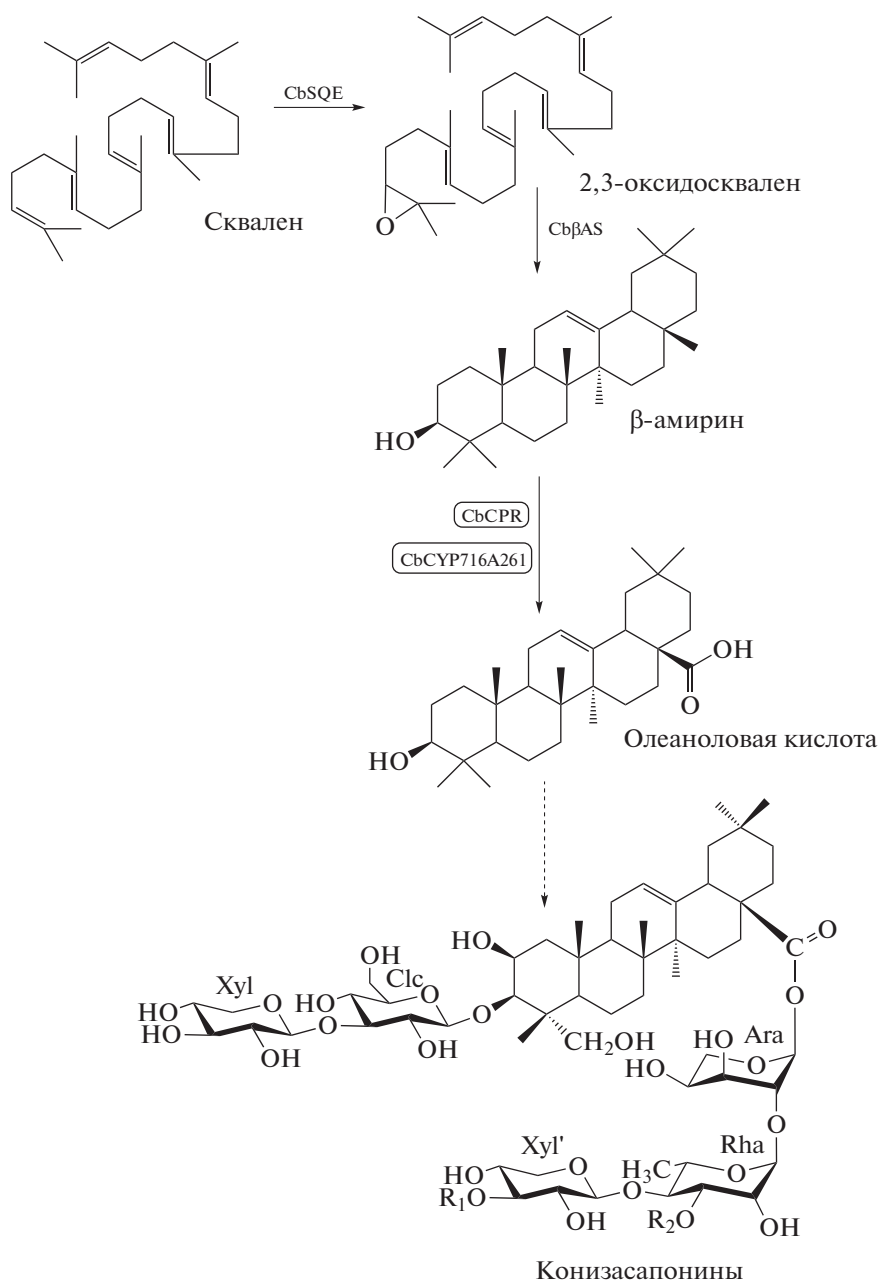


Рис. 1. Предполагаемый путь биосинтеза конизасапонинов в *Conyza blinii*. Скваленэпоксидаза превращает сквален в 2,3-оксидосквален. Затем β-амиринсинтаза циклизует предшественник 2,3-оксидосквален с образованием скелета конизасапонины (β-амирин). β-амирин последовательно претерпевает окисление с образованием олеаноловой кислоты. На последних стадиях олеаноловая кислота превращается в конизасапонины путем окисления и гликозилирования.

всех β-амиринсинтаза (βAS) контролирует формирование производных олеанана. Олеанановый углеродный скелет модифицируется с образованием конизасапонины в основном путем гидроксильирования цитохром P450-зависимыми (СУР) монооксигеназами и гликозилирования гликозилтрансферазами [1] (рис. 1).

Как гены СУР, так и гликозилтрансфераз обнаружены в геномах суперсемейств растений, при этом первые вносят модификации перед гликози-

лированием [16]. К настоящему времени идентифицированы тритерпенмодифицирующие СУР, которые могут использовать в качестве субстрата β-амирин, α-амирин, лупеол и даммарандиол-II. Seki и соавт. [17] и Sudo и др. [18] идентифицировали цитохром СУР88D6 как β-амирин-11-оксидазу, вовлеченную в биосинтез глицирризина в *Glycyrrhiza uralensis*. Цитохромы СУР93Е1, СУР93Е2 и СУР93Е3 проявляют β-амирин-24-гидроксилазную активность соответственно в сое [19], *Medica-*

go truncatula [20] и *G. uralensis* [17]. Carelli и соавт. [21] охарактеризовали цитохром СУР716А12 как многофункциональный фермент, проявляющий активность в качестве β -амирин-28-гидроксилазы, α -амирин-28-гидроксилазы и лупеол-28-гидроксилазы. Идентифицированы цитохромы СУР716А53v2 [22] и СУР716А47 [23] из *Panax ginseng*, способные окислять остов даммарандиола-II по атомам углерода С-6 и С-12 соответственно. Обнаружена лупеол-20-гидроксилаза из *Lotus japonicus* [24]. Но до сих пор не охарактеризованы СУРы, участвующие в биосинтезе конизасапонинов в *C. blinii*.

По результатам биоинформатического анализа транскриптов *C. blinii* и транскрипционных активностей в клетках *C. blinii*, обработанных метилжасмонатом, ген *CbCYP716A261 C. blinii* был исследован как возможный ген СУР, участвующего в биосинтезе конизасапонинов. Эктопическая экспрессия *CbCYP716A261* и коэкспрессия *Cb β AS* и *CbCYP716A261* в дрожжах в обоих случаях приводила к образованию олеаноловой кислоты. Эти результаты подтверждают, что *CbCYP716A261* кодирует β -амирин-28-гидроксилазу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительный материал и реактивы. Растения *Conyza blinii* выращены в лаборатории. Суммарную РНК выделяли из листьев с использованием набора TaKaRa MiniBEST Plant RNA extraction kit (“TaKaRa Bio”, Япония) согласно инструкции производителя. Одноцепочечную кДНК синтезировали, используя набор PrimeScript 1st Strand cDNA synthesis kit (“TaKaRa Bio”). Обработку растений *C. blinii* метилжасмонатом проводили, как описано ранее [25].

В качестве штамма для клонирования использовали *Escherichia coli* DH5 α (лабораторный штамм), в качестве вектора для клонирования использовали рMD19-T Simple (“TaKaRa Bio”). Штамм *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (предоставлен Meng-gen Ma, Sichuan Agricultural University, Китай) использовали в качестве экспрессионного штамма в паре с экспрессионным вектором рESC-URA (“Agilent Technologies”, США) для одновременного синтеза двух генов. β -Амирин и олеаноловая кислота – производства “Sigma-Aldrich” (США), NADPH – производства “Roche” (Швейцария).

Филогенетический анализ. Поиск кандидатных генов СУР проводили на основании текстового поиска названий генов и функциональных аннотаций уникальных аннотированных генов в библиотеке аннотаций транскриптома *C. blinii* [26]. Повторяющиеся записи из разных баз данных удаляли вручную. Для анализа филогенетического родства кандидатных СУРы соответствующие аминокислотные последовательности брали из

базы данных NCBI. Для множественного выравнивания последовательностей использовали программу CLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>). Филогенетическое древо построено в программе MEGA 5.05 с использованием метода объединения ближайших соседей и бутстреп-индекса в 1000 репликаций [27].

Количественная ПЦР в реальном времени. Анализ транскрипции генов обработанного метилжасмонатом растения *C. blinii* проводили, как ранее описано Sun и др. [25]. В качестве внутреннего контроля использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) *C. blinii* (GenBank No: KF027475). Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Клонирование гена и биоинформационный анализ. Для выбранной последовательности подбирали специфичные праймеры (табл. 1). Для амплификации полноразмерной последовательности с кДНК использовали PrimeSTAR Max DNA Polymerase (“TaKaRa Bio”). После секвенирования молекулярные характеристики последовательности анализировали при помощи инструментов биоинформатики на сайте NCBI и с использованием программ DNAMAN, ProtParam, TMHMM и SOPMA.

Экспрессия гена *CbCYP716A261* в дрожжах и анализ ферментативной активности *in vitro*. Каталитическая реакция с участием СУР требует участия NADPH-СУР-редуктазы (CPR) для обеспечения реакции электронами. Таким образом, для проверки активности фермента *CbCYP716A261* необходимо было использовать редуктазу. Кодированный фрагмент CPR *C. blinii* (*CbCPR*) амплифицировали и клонировали по сайтам NotI и BglII в вектор рESC-URA. Также фрагмент кодирующей области *CbCYP716A261* последовательно клонировали по сайтам SalI и BamHI в вектор рESC-URA с геном *CbCPR*. Полученную плазмиду *CbCPR-рESC_{URA}-CbCYP716A261* и контрольный пустой вектор рESC_{URA} трансформировали в дрожжевой штамм INVSc1 с использованием набора Frozen-EZ Yeast Transformation II (“Zymo Research”, США). На 2–4 сутки после трансформации положительные колонии отбирали по результатам ПЦР с колоний. Отдельные положительные клоны инокулировали в 15 мл синтетической ростовой среды без урацила – SC-U, содержащей 2% глюкозы, – и выращивали при 30°C в течение ночи при покачивании, после чего определяли оптическую плотность культуры при 600 нм (OD₆₀₀). Клетки отмывали и пересевали в 50 мл среды SC-U с 2% галактозы таким образом, чтобы начальная плотность культуры составляла 0.4 OD₆₀₀.

Для определения ферментативной активности *CbCYP716A261 in vitro* из клеток экстрагировали микросомальную белковую фракцию по прото-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность (5' → 3')	Праймер	Последовательность (5' → 3')
Праймеры для количественной ПЦР в реальном времени			
GAPDHqF	CGGGATGGCTTCCGTGTA	GAPDHqR	TTGCCCTCTGATTCCTCCTTGA
HMGRqF	TCCCCGCCAGAAATGTTGAG	HMGRqR	TGCTTGCACCTTTTGACACSTAA
FPPSqF	CAAGGTTGGTATGATTCGTGCA	FPPSqR	TGAACAGGTCCACATAAATCCA
SQsqF	GTTGGGGGACTTGTGGATTA	SQsqR	AACATGCGTGTACTTGGGTATCT
SQEqF	TCAGGACGATGCCCAATAGAA	SQEqR	ACAGTCAATTCCTCCACCAAGTCCAG
βASqF	TTGGCAGTCAAGAGTGGGATG	βASqR	GGAAGGATGTCTTTGACSTGTGA
CYP13793qF	GAGCAGGTTGGGATGGAGTTC	CYP13793qR	GCAGGACCCACAAAGCACACAGC
CYP81240qF	TCSTTGGATTGTTGATTTGGTGGC	CYP81240qR	GACAAATCCTCCAGTTCAGCA
Праймеры для клонирования			
CYP716A261F	ATGGATATGTTTTATGTTATCTC	CYP716A261R	TCACCTGCTAGAGACATGATGAG
Праймеры для эксперимента по определению ферментативной активности <i>in vitro</i>			
CPRseF	<u>GCGGCCGCAATGCAATCAAACTCAATAAAA</u>	CPRseR	<u>AGATCTTTACCAAACATCGCGAAGATA</u>
CYP716A261eF	<u>GTCGACATGGATATGTTTTATGTTTATCTC</u>	CYP716A261eR	<u>GGTACCTCACTTGCTAGAGACATGATGAG</u>
Праймеры для эксперимента по коэкспрессии			
βASVaZF	AACCCCTCACTAAAGGgcggccgcAATGTGGAG AATGAATATAGCAAAAGG	βASVaZR	GTTAATTAAGAGCTCagatctCTAGATGCCGTTTG AGCTTTGGC
βCpA	ATTCCGGAAGAAGACcctegagATGCAATCAAA CTCAATAAAAATATCG	βCpB	GAAATTAGGCTCCATACCACCCGGAGCCACC <u>GAGCCACCCGCTCCAAAACATCGCGAAG</u>
βCpC	CTTCGGCATGTTTGGAGCGGTTGGCTCTGGT <u>GGCTCCGGTGGTATGGAGCCCTAATTC</u>	βCpD	ATCTTAGCTAGCCCGcgatccTTAAGCTTTTGTGT GGATAAAGGGCAA

колу, описанному Olsen и др. [28]. Реакционная смесь объемом 500 мкл содержала 50 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.4), 50 мкл 1 мМ NADPH, 20 мкг β -амирина и 1 мг микросомальной белковой фракции, а также бидистиллированную воду (ddH₂O). После инкубации в течение 2 ч при 30°C продукты реакции экстрагировали двукратным объемом этилацетата. Органическую фазу отбирали, испаряли и перерастворяли в метаноле для ВЭЖХ-анализа.

ВЭЖХ проводили на колонке (150 мм × 4.5 мм × 5 мкм) с сорбентом C18 (“Agilent Technologies”). Элюцию проводили по программе: 50% воды и 50% ацетонитрила в точке 0 мин, 0% воды и 100% ацетонитрила в точке 8 мин и 0% воды и 100% ацетонитрила в точке 10 мин; время прогона составляло 15 мин; скорость подачи элюента – 1 мл/мин; объем нанесения – 20 мкл; температура колонки была 30°C; детектор был настроен на длину волны 210 нм.

Коэкспрессия генов *CbβAS*, *CbCPR* и *CbCYP716A261* в дрожжах. Праймеры для амплификации генов *CbβAS* (GenBank No: KJ155788), *CbCPR* (GenBank No: MF276991) и *CbCYP716A261* подбирали так, чтобы полученные продукты имели перекрывающиеся области для двухстадийной ПЦР (табл. 1). Праймер β CPa состоял из 27 нуклеотидов и содержал часть, комплементарную началу гена *CbCPR*, сайт XhoI из вектора pESC-URA и 15 нуклеотидов выше этого сайта. Праймер β CPb содержал 15 нуклеотидов после стартового кодона гена *CbCYP716A261*, последовательность, кодирующую линкер (SerGlyGlySerGlyGlySerGlyGly), и 15 нуклеотидов, комплементарных концу гена *CbCPR* без стоп-кодона. Праймер β CPc представлял последовательность, обратную комплементарную праймеру β CPb. Праймер β CPd состоял из 27 н. и содержал последовательность, комплементарную концу гена *CbCYP716A261*, сайт KpnI вектора pESC-URA и 15 н. после этого сайта.

На первой стадии ген *CbCPR* амплифицировали с праймерами β CPa и β CPb, а ген *CbCYP716A261* – с праймерами β CPc и β CPd. Затем оба ПЦР-продукта очищали, смешивали и использовали в качестве матрицы во втором раунде ПЦР с праймерами β CPa и β CPd для того, чтобы амплифицировать гибридный ген *CbCPR-linker-CbCYP716A261*. Полученный продукт вставляли по сайтам XhoI и KpnI в вектор pESC-URA под контроль промотора GAL1 с использованием набора ClonExpress II One Step cloning kit (“Vazyme”, Китай). Параллельно ген *CbβAS* клонировали по сайтам NotI и BglII в вектор pESC-URA под контроль промотора GAL10. Финальную плазмиду CbβAS-pESC-URA-CbCPR-linker-CbCYP716A261 трансформировали в дрожжевой штамм INVSc1 и индуцировали экспрессию генов. После галактозной индукции в течение 60 ч 10 мл дрожжевой культуры встряхи-

вали 5 мин с 1 мл метанола и 100 мг кварцевого песка и затем проводили 30-минутную обработку ультразвуком. Клеточный экстракт центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и органическую фазу переносили в новую пробирку. Процедуру повторяли дважды. Экстракты объединяли и анализировали методом ВЭЖХ. В качестве контролей использовали штаммы TS1 (содержащий пустой вектор pESC-URA), TS2 (экспрессирующий *CbCPR* и *CbCYP716A261*), TS3 (экспрессирующий *CbβAS* и *CbCYP716A261*) и TS4 (экспрессирующий *CbβAS* и *CbCPR*). Соответствующие плазмиды для попарной экспрессии были получены рестрикцией первой плазмиды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор кандидатных генов CYP

С развитием методов секвенирования последнего поколения технология секвенирования транскриптомов зарекомендовала себя как эффективный инструмент для поиска новых генов (в частности их суперсемейств) в немодельных растениях [29–31]. Согласно предыдущим исследованиям, цитохромы P450, принадлежащие кланам CYP71, CYP72 или CYP85, участвуют в модификациях тритерпенового углеродного скелета в процессе биосинтеза тритерпеновых сапонинов [32]. Основываясь на этих сведениях, из последовательностей транскриптов *S. blinii* мы выбрали 10 полногеномных последовательностей кандидатных генов CYP (табл. 2).

С целью сузить список кандидатных генов мы провели филогенетический анализ между выбранными записями и белками CYP, участвующими в биосинтезе тритерпеновых сапонинов. Согласно предшествующим исследованиям, цитохромы клана CYP71 в основном участвуют в модификациях атомов углерода C-15, C-16, C-20 и C-24 [19, 24, 33], цитохромы клана CYP72 участвуют в модификациях атомов углерода C-22, C-23 и C-30 [34], наконец, цитохромы клана CYP85 участвуют в модификациях атомов углерода C-6, C-7, C-11, C-12, C-16 α и C-28 [17, 22, 23, 35, 36]. Результаты филогенетического анализа показали, что пять последовательностей (с30927, с32744, с40756, с44164 и с84658) принадлежат к клану CYP71, три последовательности (с22011, с28536 и с39514) – к клану CYP72 и две последовательности (с13793 и с81240) – к клану CYP85. Олеаноловая кислота принадлежит к группе конизасапонинов с тритерпеновым скелетом; ее синтез осуществляется путем модификации β -амирина в позиции C-28. Таким образом, в списке кандидатов мы оставили последовательности с13793 и с81240 (рис. 2).

Паттерны экспрессии генов, участвующих в одних и тех же биологических процессах, строго

коррелируют друг с другом [37]. Метилжасмонат используется в качестве внешнего стимулятора, который может увеличивать как содержание вторичных метаболитов, таких как сапонины [38, 39], так и уровни транскрипции генов, участвующих в биосинтезе сапонинов [23, 35]. Для дальнейшей идентификации CYP, вовлеченных в биосинтез конизасапонинов, мы провели анализ геной экспрессии в листьях обработанного метилжасмонатом растения *C. blinii*. Исследовали транскрипционную активность двух кандидатных последовательностей CYP, а также генов, участвующих в

ранних стадиях синтеза, кодирующих фарнезилпирофосфатсинтазу, скваленсинтазу и β -амиринсинтазу. В результате показано, что ген, соответствующий записи c81240, регулируется совместно с этими генами. Таким образом, последовательность c81240 была выбрана для дальнейшего исследования (рис. 3).

Генетические характеристики *CbCYP716A261*

Мы клонировали кДНК, соответствующую последовательности c81240, и согласно номенклатуре

Таблица 2. Метки, соответствующие генам CYP, и их аннотации

Gene ID	Аннотация Swissprot	№г-аннотация
c32744	Cytochrome P450 71A9 GN = CYP71A9 OS = <i>Glycine max</i> (Soybean) PE = 2 SV = 1	Цитохром P450-зависимая монооксигеназа [<i>Artemisia annua</i>]
c22011	Cytochrome P450 716B2 GN = CYP716B2 OS = <i>Picea sitchensis</i> (Sitka spruce) PE = 2 SV = 1	Предполагаемая цитохром P450-зависимая таксан-13-альфа-гидроксилаза [Artemisia annua]
c28536	Cytochrome P450 CYP72A219 OS = <i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng) PE = 2 SV = 1	RecName: Full = Цитохром P450 CYP72A219; AltName: Full = Цитохром P450 CYP72A129 [<i>Panax ginseng</i>]
c30927	Cytochrome P450 71A1 GN = CYP71A1 OS = <i>Persea americana</i> (Avocado) PE = 1 SV = 2	Партенолидсинтаза [<i>Tanacetum parthenium</i>]
c40756	Cytochrome P450 71A1 GN = CYP71A1 OS = <i>Persea americana</i> (Avocado) PE = 1 SV = 2	Цитохром P450-зависимая монооксигеназа [<i>Artemisia annua</i>]
c39514	Cytochrome P450 CYP72A219 OS = <i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng) PE = 2 SV = 1	Цитохром P450-зависимая монооксигеназа [<i>Artemisia annua</i>]
c44164	Cytochrome P450 71A8 GN = CYP71A8 OS = <i>Mentha piperita</i> (Peppermint) PE = 3 SV = 1	PREDICTED: цитохром P450 71A25 [<i>Vitis vinifera</i>]
c13793	Beta-amyrin 28-oxidase OS = <i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng) PE = 2 SV = 1	CYP716D22 [<i>Artemisia annua</i>]
c81240	Beta-amyrin 28-oxidase OS = <i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng) PE = 2 SV = 1	Подобен бета-амирин 28-оксидазе [<i>Helianthus annuus</i>]
c84658	Cytochrome P450 716B1 GN = CYP716B1 OS = <i>Picea sitchensis</i> (Sitka spruce) PE = 2 SV = 1	Предполагаемый цитохром P450, частичная последовательность [<i>Aralia elata</i>]

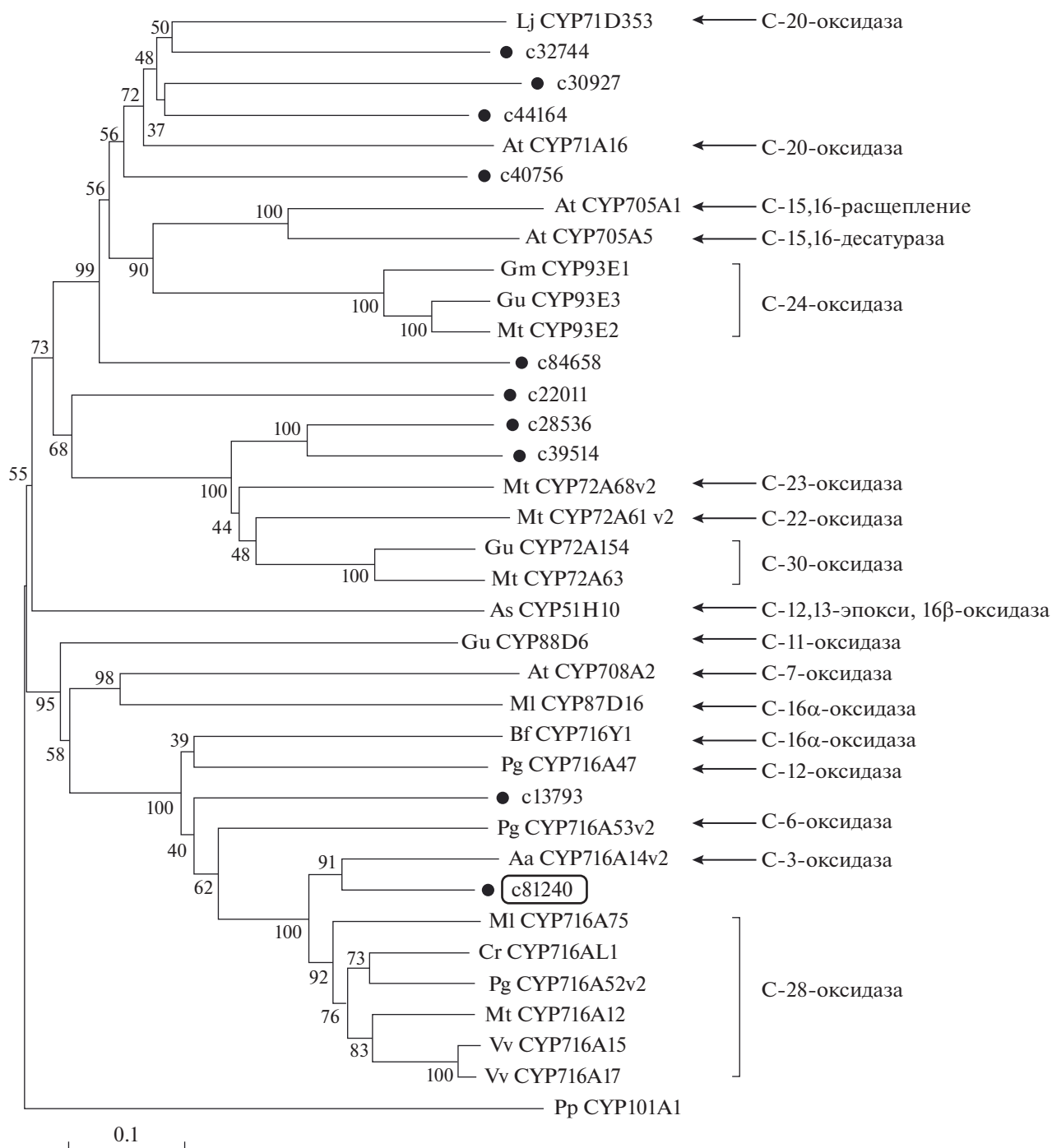


Рис. 2. Филогенетические взаимосвязи генов *CYP C. blinii* и генов *CYP* из других растений. Гены *CYP C. blinii* помечены кружком. Последовательность c81240 (ген *CbCYP716A261*) взята в рамку. Дерево построено методом объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining). Шкала соответствует 0.1 аминокислотной замене/сайт. Ферментативная активность *CYP* показана справа. Бактериальный цитохром *CYP101A1* включен в качестве внешней группы. Обозначения: Lj – *Lotus japonicas*, At – *Arabidopsis thaliana*, Gm – *Glycine max*, Gu – *Glycyrrhiza uralensis*, Mt – *Medicago truncatula*, As – *Avena strigose*, Ml – *Maesa lanceolate*, Bf – *Bupleurum falcatum*, Pg – *Panax ginseng*, Aa – *Artemisia annua*, Cr – *Catharanthus roseus*, Vv – *Vitis vinifera*, Pp – *Pseudomonas putida*.

Нельсона дали гену название *CbCYP716A261* (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>). Полноразмерная ДНК *CbCYP716A261* состоит из 1446 п.н. (GenBank No: MF996505) и кодирует бе-

лок размером 55.0 кДа. Результаты анализа в BlastP показали, что аминокислотная последовательность *CbCYP716A261* на 82% идентична β-амирин-28-гидроксилазе из *Helianthus annuus*.

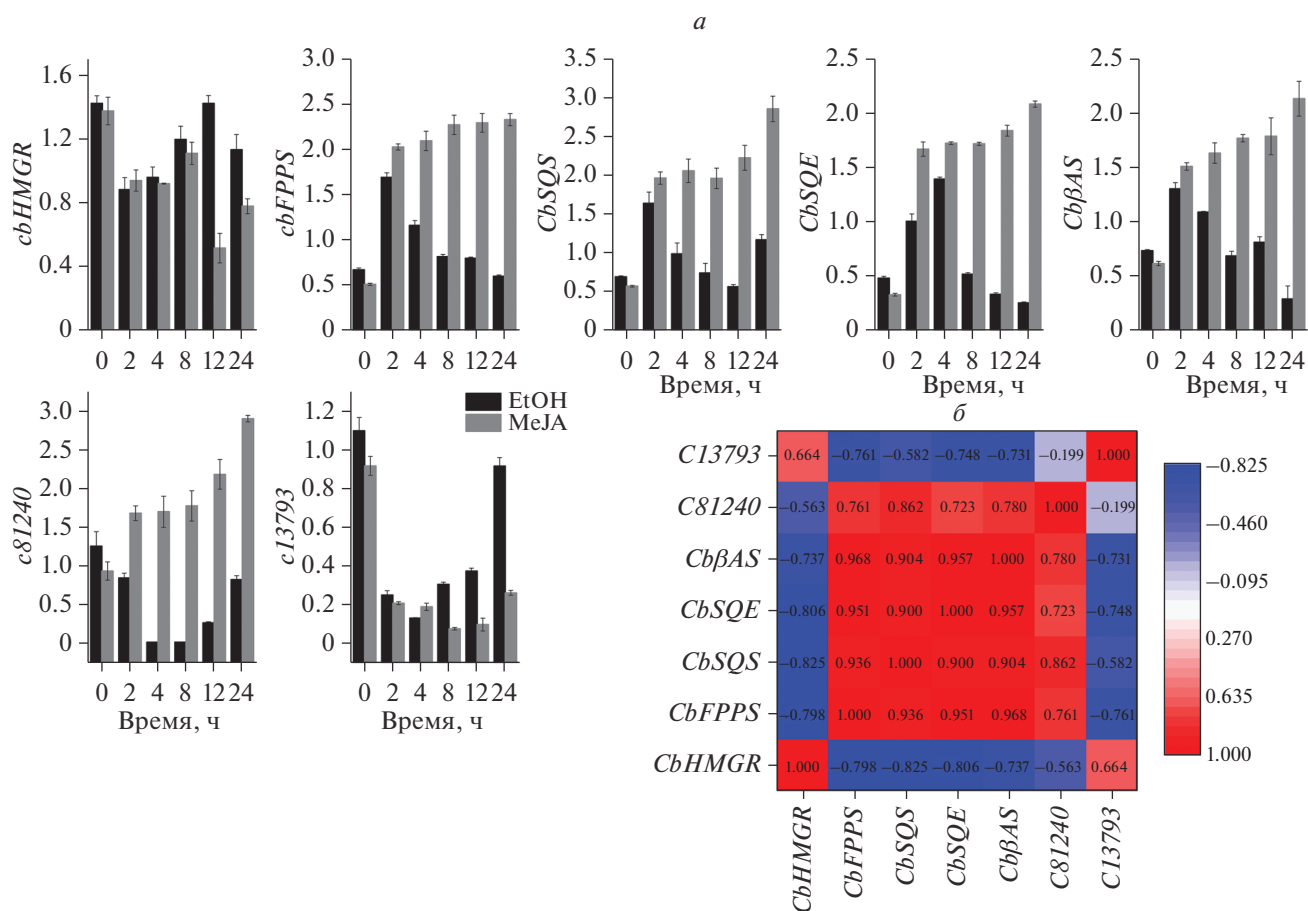


Рис. 3. Экспрессионный анализ генов *CYP* и других ферментов биосинтеза тритерпеновых сапонинов в листьях *S. blinii*, обработанных этанолом и метилжасмонатом. *а* – Относительные уровни транскриптов в точках 0, 2, 4, 8, 12 и 24 ч, определенные при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Разброс данных рассчитан для трех измерений. *б* – Корреляция между экспрессией генов *CYP* и других ферментов биосинтеза тритерпеновых сапонинов. Красный – положительная корреляция; синий – отрицательная корреляция.

Зрелый белок содержит консервативные мотивы, характерные для цитохромов P450, например, гемсвязывающий мотив (FGGGPRMCPG), пролинбогатый домен (PPGRKGGWP) и другие консервативные домены (FDPSRF, EVLR и GGHDTA). Вторичную структуру белка предсказали при помощи метода SOPMA и обнаружили, что белок обогащен α -спиралями (40.12%), содержит 33.89% неупорядоченных последовательностей, 17.46% протяженных участков и 8.52% β -слоев. Результат анализа в ТМНМ предсказал в аминокислотной последовательности СбСYP716A261 один трансмембранный домен – между аминокислотными остатками 5–27.

Ферментативная активность белка *CbCYP716A261 in vitro*

Для оценки активности β -амирин-28-оксидазы СбСYP716A261 в продукции конизасапонинов микросомальную фракцию дрожжевой культуры

штамма INVSc1, экспрессирующего *CbCYP716A261* и *CbCPR*, инкубировали с β -амирином в течение 2 ч при 30°C. Продукты реакции экстрагировали двукратным объемом этилацетата и анализировали ВЭЖХ. На хроматограммах в точке 11.30 мин детектировали уникальный пик для дрожжей, экспрессирующих *CbCPR-CbCYP716A261*, но не для контрольного штамма, трансформированного пустым вектором. Время удержания совпало с таковым для олеаноловой кислоты, которую использовали в качестве стандарта. На основании полученных результатов можно говорить о том, что фермент СбСYP716A261 катализирует конверсию β -амирина в олеаноловую кислоту (рис. 4).

Ферментативная активность белка *CbCYP716A261 in vivo*

Для определения ферментативной активности СбСYP716A261 *in vivo* получили штамм *Saccharomyces cerevisiae*, который одновременно экспрес-

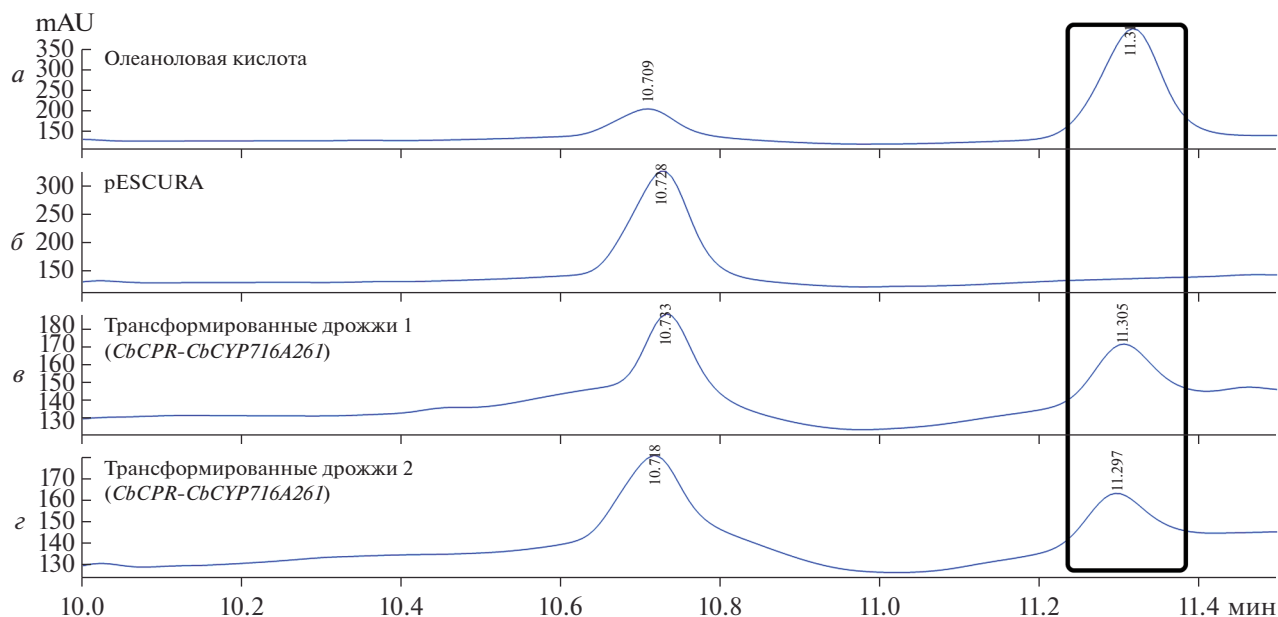


Рис. 4. Активность СьСУР716А261 *Conyza blinii* по отношению к β -амирину *in vitro*. Представлены результаты ВЭЖХ стандарта – олеаноловой кислоты (а), продуктов реакции микросомальной фракции контрольных дрожжей с β -амирином (б), продуктов реакции микросомальной фракции дрожжей, трансформированных СьСР-рЕСС_{УРА}-СьС-УР716А261 с β -амирином (в, г). Пик олеаноловой кислоты в точке 11.30 мин выделен рамкой.

сировал гены *Cb β AS*, *CbCPR* и *CbCYP716A261*, и проанализировали в нем продукцию олеаноловой кислоты. На первом этапе, используя двухстадийную ПЦР с перекрывающимися праймерами, мы получили гибридный ген *CbCPR-linker-CbCYP716A261*, который затем клонировали в дрожжевой вектор рЕСС-УРА в один из двух участков для множественного клонирования (MCS2), а ген *Cb β AS* клонировали в участок рЕСС-УРА MCS1. Метанольные экстракты клеток анализировали ВЭЖХ. Согласно результатам хроматографии, в точке 11.21 мин экстракт дрожжей, трансформированных *Cb β AS-рЕСС_{УРА}-CbCPR-linker-CbCYP716A261* (TS5), и стандарт олеаноловой кислоты дают сходные пики, в то время как в экстрактах контрольных штаммов (TS1, TS2, TS3 и TS4) таких пиков нет (рис. 5).

По результатам исследования фермент СьСУР716А261 был охарактеризован как β -амирин-28-гидроксилаза, которая модифицирует β -амирин с образованием олеаноловой кислоты и участвует в пути биосинтеза конизасапонинов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Конизасапонины составляют большую часть вторичных метаболитов *C. blinii* и проявляют разную биологическую активность, включая противовоспалительную, противоязвенную, антибактериальную и противоопухолевую [12, 40]. Предшественником конизасапонинов служит олеаноловая кислота, которая образуется путем окисления

β -амирина по положению С-28. Оксидазы, которые осуществляют эту реакцию, по большей части относятся к СУР. К примеру, ферменты СУР716А12 [21] и СУР716А15 [36] из *M. truncatula* катализируют синтез олеаноловой кислоты, используя β -амирин в качестве субстрата. СУР716А75 катализирует окисление по атому углерода С-28 β -амирина в пути биосинтеза сапонина в кустарнике *Maesa lanceolata* [41]. В проведенном нами исследовании белок СьСУР716А261 идентифицирован как фермент, принадлежащий к подсемейству СУР716А, который транскрипционно корегулируется с известными генами биосинтеза тритерпеновых сапонинов и катализирует гидроксилирование атома С-28 β -амирина с образованием олеаноловой кислоты.

Метилжасмонат – важный гормон и сигнальная молекула растений. Он играет существенную роль в защите растений от биотического и абиотического стрессов. Во многих исследованиях показано, что метилжасмонат может индуцировать биосинтез многих вторичных метаболитов, в том числе сапонинов [42, 43], и повышать уровни транскрипции генов, вовлеченных в биосинтез сапонинов [38, 44]. По этой причине исследователи часто ищут новые гены, относящиеся к биосинтезу сапонинов в экспериментах, включающих обработку растительного материала метилжасмонатом. Путем транскриптомного профайлинга обработанных метилжасмонатом корней *Vupleurum falcatum* Moses и соавт. [35] идентифицировали С-16 α -гидроксилазу (СУР716У1), которая тран-

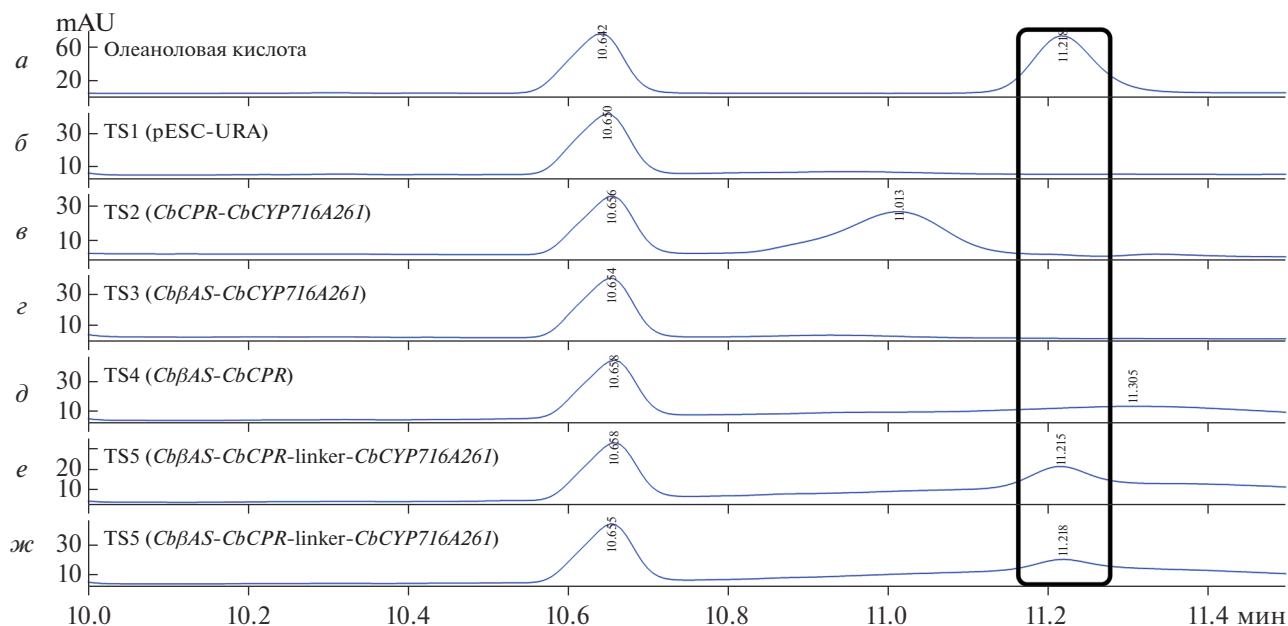


Рис. 5. Продукция олеаноловой кислоты *in vivo* трансгенным штаммом дрожжей, содержащим *CbβAS*, *CbCPR* и *CbCYP716A261*. Результаты ВЭЖХ стандарта — олеаноловой кислоты (а); контрольных дрожжевых экстрактов, содержащих пустой вектор (б); экстракта трансгенных дрожжей, экспрессирующих гены *CbCPR* и *CbCYP716A261* (в); экстракта трансгенных дрожжей, экспрессирующих гены *CbβAS* и *CbCYP716A261* (г); экстракта трансгенных дрожжей, экспрессирующих гены *CbβAS* и *CbCPR* (д); и экстракта трансгенных дрожжей, коэкспрессирующих гены *CbβAS*, *CbCPR* и *CbCYP716A261* (е, ж). Пик олеаноловой кислоты выделен рамкой.

скрипционнo корегулировалась с известными генами биосинтеза тритерпеновых сапонинов и проявляла каталитическую активность, которая до того не была выявлена ни для одного фермента из царства растений. Nan и др. [23] обнаружили кандидатные гены цитохромов, потенциально участвующих в биосинтезе гинзенозидов, в корнях обработанного метилжасмонатом *Panax ginseng*. Sui и соавт. [30] использовали обработанные метилжасмонатом придаточные корни *Vulpurum chinense* для изучения экспрессии βAS и поиска предполагаемых *CYP* и гликозилтрансфераз, вовлеченных в биосинтез сайкосапонинов. Мы также предположили, что гены *CYP*, участвующие в биосинтезе конизасапонинов, должны корегулироваться с известными генами биосинтеза тритерпеновых сапонинов под действием метилжасмоната. По результатам филогенетического анализа последовательности с13793 и с81240 были выбраны в качестве кандидатных генов *CYP*. Однако в транскриптомном профайлинге листьев обработанных метилжасмонатом растений *S. blinii* наличие корегуляции подтвердилось только для с81240. Таким образом, последовательность с81240 (*CbCYP716A261*) была отобрана в качестве самого перспективного кандидатного *CYP*, потенциально участвующего в биосинтезе конизасапонинов.

Для определения функциональной активности *CbCYP716A261* использована экспрессионная

система *Saccharomyces cerevisiae* (штамм INVSc1). INVSc1 представляет собой штамм аутокотрофных дрожжей, хорошо подходящий для экспрессионного анализа. Так, Yasumoto и соавт. [45] использовали экспрессионную систему INVSc1 для того, чтобы охарактеризовать функции генов *CYP716A1* и *CYP716A2 Arabidopsis thaliana* и шести генов *CYP716* томата. В данной работе культура штамма INVSc1, экспрессирующего *CbCPR-CbCYP716A261*, продуцировала олеаноловую кислоту из β -амирина после двухчасовой инкубации. Одновременная экспрессия генов *CbβAS*, *CbCPR* и *CbCYP716A261* в штамме INVSc1 приводила к образованию олеаноловой кислоты в отсутствие β -амирина, хотя выход олеаноловой кислоты был низким. Возможная причина низкого выхода заключается в том, что в дрожжевом штамме был реконструирован только исходный путь биосинтеза. Если рассматривать способы увеличения выхода олеаноловой кислоты в используемой системе, то можно применить технологии метаболической инженерии, например, путем сверхэкспрессии генов ферментов, вышестоящих в сигнальном каскаде биосинтеза олеаноловой кислоты, — для повышения уровня эндогенного предшественника 2,3-оксидосквалена. С биосинтезом олеаноловой кислоты в клетках дрожжей конкурирует путь биосинтеза стеролов, так что снижение оттока предшественников в этом направлении также может повысить

выход продукта. К альтернативным способам можно отнести замену собственного промотора на искусственный – для усиления транскрипционной активности.

Таким образом, в результате проведенного исследования клонирован и охарактеризован новый ген *CYP*, *СьСУР716А261*, кодирующий β-амирин-28-гидроксилазу, которая вовлечена в биосинтез конизасапонинов.

Исследование поддержано грантом Университета Паньчжихуа (The Panzihua University; 035200167) и Департаментом науки и технологии провинции Сычуань (Department of Science and Technology of Sichuan Province; 2018НН0074).

Данная статья не содержит экспериментов, включающих животных или людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. (2011) Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. **72**, 435–457.
2. Osbourn A., Goss R.J., Field R.A. (2004) The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 1261–1268.
3. Sparg S.G., Light M.E., Staden J.V. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **94**, 219–243.
4. Salvador J.A., Moreira V.M., Goncalves B.M., Leal A.S., Jing Y. (2012) Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1463–1479.
5. Wang Z.Y., Cheng Y., Wang N., Wang D.M., Li Y.W., Han F., Shen J.G., Yang D.P., Guan X.Y., Chen J.P. (2012) Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 138–147.
6. Hostettmann K.A. Marston A. (1995) *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge: Cambridge University.
7. Vogler B.K., Pittler M.H., Ernst E. (1999) The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 567–575.
8. Roberts S.C. (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 387–395.
9. Chinese Pharmacopoeia Commission. (2010) *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Jinglongdancao*. Beijing: People's Medical Publishing House Press.
10. Qi Y.Q., Xu X.C., He H.W., Wang S.K., Yang C.Y. (1983) Preliminary experimental study on total saponins of *Conyza blinii*. *Chin. Tradit. Pat. Med.* **6**, 36.
11. Li L.X. (1980) Comparison of *Conyza blinii* saponin tablets with doxycycline tablets in treating 310 cases of chronic tuberculosis. *J. Chengdu Univ. Tradit. Chin. Med.* **6**, 29–34.
12. Ma L., Liu H.Y., Qin P., Hu C.X., Man S.L., Li Y.Y., Liu Z., Liu Z.X., Diao A.P. (2017) Saponin fraction isolated from *Conyza blinii* H.Lév. demonstrates strong anti-cancer activity that is due to its NF-κB inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 779–785.
13. Su Y.F., Guo D.A., Guo H.Z., Liu J.S., Zheng J.H., Koike K., Nikaido T. (2001) Four new triterpenoid saponins from *Conyza blinii*. *J. Nat. Prod.* **64**, 32.
14. Su Y.F., Koike K., Guo D.A., Satou T., Liu J.S., Zheng J.H., Nikaido T. (2001) New apiose-containing triterpenoid saponins from *Conyza blinii*. *Tetrahedron*. **57**, 6721–6726.
15. Su Y.F., Koike K., Nikaido T., Liu J.S., Zheng J.H., Guo D.A. (2003) Conyzasaponins I–Q, nine new triterpenoid saponins from *Conyza blinii*. *J. Nat. Prod.* **66**, 1593–1599.
16. Buchanan B., Gruissem R., Jones J. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants: Natural products, secondary metabolites*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
17. Seki H., Ohyama K., Sawai S., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T. (2008) Licorice beta-amyirin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 14204–14209.
18. Sudo H., Seki H., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Toyoda A., Totoki Y., Sakaki Y., Iida O., Shibata T., Kojima M., Muranaka T., Saito K. (2009) Expressed sequence tags from rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Biotechnol.* **26**, 105–108.
19. Shibuya M., Hoshino M., Katsube Y., Hayashi H., Kushiro T., Ebizuka Y. (2006) Identification of beta-amyirin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay. *FEBS J.* **273**, 948–959.
20. Li L.Y., Cheng H., Gai J.Y., Yu D.Y. (2007) Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 genes in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*. **226**, 109–123.
21. Carelli M., Biazzi E., Panara F., Tava A., Scaramelli L., Porceddu A., Graham N., Odoardi M., Piano E., Arcioni S., May S., Scotti C., Calderini O. (2011) *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins. *Plant Cell*. **23**, 3070–3081.
22. Han J.Y., Hwang H.S., Choi S.W., Kim H.J., Choi Y.E. (2012) Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1535–1545.
23. Han J.Y., Kim H.J., Kwon Y.S., Choi Y.E. (2011) The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2062–2073.
24. Krokida A., Delis C., Geisler K., Garagounis C., Tsikou D., Peña-Rodríguez L.M., Katsarou D., Field B., Osbourn A.E., Papadopoulou K.K. (2013) A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol.* **200**, 675–690.
25. Sun R., Liu S., Tang Z.Z., Zheng T.R., Wang T., Chen H., Li C.L., Wu Q. (2017) β-Amyrin synthase from *Conyza blinii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio.* **7**, 1575–1585.

26. Sun R., Liu S., Tang Z.Z., Jin H.J., Li C.L., Chen H. (2015) Study on transcriptome characteristic of genuine traditional Chinese medicine *Conyza blinii* H.Lév leaves of Sichuan. *Mol. Plant Breed.* **13**, 2754–2760.
27. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
28. Olsen K.M., Hehn A., Jugdé H., Slimestad R., Larbat R., Bourgaud F., Lillo C. (2010) Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol.* **10**, 21.
29. Luo H.M., Sun C., Sun Y.Z., Wu Q., Li Y., Song J.Y., Niu Y.Y., Cheng X.L., Xu H.X., Li C.Y., Liu J.Y., Steinmetz A., Chen S.L. (2011) Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers. *BMC Genomics.* **12**, S5.
30. Sui C., Zhang J., Wei J.H., Chen S.L., Li Y., Xu J.S., Jin J., Xie C.X., Gao Z.H., Chen H.J., Yang C.M., Zhang Z., Xu Y.H. (2011) Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins. *BMC Genomics.* **12**, 539.
31. Rai A., Yamazaki M., Takahashi H., Nakamura M., Kojoma M., Suzuki H., Saito K. (2016) RNA-seq transcriptome analysis of *Panax japonicus*, and its comparison with other *Panax* species to identify potential genes involved in the saponins biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **7**, 481.
32. Tanaka Y., Brugliera F. (2014) *Fifty Years of Cytochrome P450 Research: Plant Cytochrome P450s in triterpenoid biosynthesis, diversity and application to combinatorial biosynthesis*. Japan: Springer.
33. Zapata L., Ding J., Willing E.M., Hartwig B., Bezdán D., Jiao W.B., Patel V., James G.V., Koornneef M., Ossowski S., Schneeberger K. (2016) Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* Ler reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, E4052–E4060.
34. Seki H., Sawai S., Ohyama K., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Fukushima E.O., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T. (2011) Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell.* **23**, 4112–4123.
35. Moses T., Pollier J., Almagro L., Buyst D., Montagu M.V., Pedreño M.A., Martins J.C., Thevelein J.M., Goossens A. (2014) Combinatorial biosynthesis of saponins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 α hydroxylase from *Bupleurum falcatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 1634–1639.
36. Fukushima E.O., Seki H., Ohyama K., Ono E., Umemoto N., Mizutani M., Saito K., Muranaka T. (2011) CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2050–2061.
37. Naoumkina M.A., Modolo L.V., Huhman D.V., Urbanczyk-Wochniak, E., Tang Y.H., Sumner L.W., Dixon R.A. (2010) Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* **22**, 850–866.
38. Hayashi H., Huang P., Inoue K. (2003) Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 404–411.
39. Lee M.H., Jeong J.H., Seo J.W., Shin C.G., Kim Y.S., In J.G., Yang D.C., Yi J.S., Choi Y.E. (2004) Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiol.* **45**, 976–984.
40. Ma L., Liu J.G. (2014) The protective activity of *Conyza blinii* saponin against acute gastric ulcer induced by ethanol. *J. Ethnopharmacol.* **158**, 358–363.
41. Moses T., Pollier J., Faizal A., Apers S., Pieters L., Thevelein J.M., Geelen D. (2015) Unraveling the triterpenoid saponin biosynthesis of the African shrub *Maesia lanceolata*. *Mol. Plant.* **8**, 122–135.
42. Lu M.B., Wong H., Teng W.L. (2001) Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* **20**, 674–677.
43. Yu K.W., Gao W.Y., Hahn E.J., Paek K.Y. (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biochem. Eng. J.* **11**, 211–215.
44. Liu Y.L., Cai Y.F., Zhao Z.J., Wang J.F., Li J., Xin W., Xia G.G., Xiang F.N. (2009) Cloning and functional analysis of a β -amyrin synthase gene associated with oleanolic acid biosynthesis in *Gentiana straminea* MAXIM. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 818–824.
45. Yasumoto S., Fukushima E.O., Seki H., Muranaka T. (2016) Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes. *FEBS Lett.* **590**, 533–540.

CbCYP716A261, A NEW β -AMYRIN 28-HYDROXYLASE INVOLVED IN CONYZASAPONIN BIOSYNTHESIS FROM *Conyza blinii*

R. Sun^{1,2}, J. L. Gao², H. Chen^{1,*}, S. Liu², and Z. Z. Tang¹

¹College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, 625014 China

²College of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan, 617000 China

*e-mail: chenhuai@163.com

Conyzasaponins produced by the traditional Chinese herb *Conyza blinii* are oleanane-type saponins with a wide range of biological activities. Here, we identified a gene, designated *CbCYP716A261*, encoding a β -amyrin 28-hydroxylase in conyzasaponins biosynthesis. Ten full putative *CYP* sequences were isolated from *Conyza blinii* transcript tags. The *CbCYP716A261* gene product was selected as the putative β -amyrin 28-hy-

droxylase by phylogenetic analysis and transcriptional activity analysis of methyl jasmonate-treated *Conyza blinii*. To identify the enzymatic activity, we performed enzymatic activity experiments *in vitro* and *in vivo*. The HPLC revealed that CbCYP716A261 catalyzes the hydroxylation of β -amyirin at the C-28 position to yield oleanolic acid. Our findings provide new information about the conyzasaponin biosynthesis pathway and widen the list of isolated β -amyirin 28-hydroxylases.

Keywords: cytochrome P450, *CbCYP716A261*, β -amyirin, conyzasaponin, oleanolic acid