

БИОСИНТЕЗ НАФТОХИНОНОВЫХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА *Boraginaceae* В ПРИРОДЕ И В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

О. А. ПОРОННИК, В. А. КУНАХ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Проанализовано дані літератури щодо продукування нафтохінонових пігментів, зокрема шиконіну, рослинами та клітинними культурами представників родини *Boraginaceae*. Наведено результати досліджень поширення та застосування нафтохінонових пігментів, особливостей і ферментної регуляції їхнього синтезу, локалізації і транспорту пігментів у клітинах рослин у природі та в культурі *in vitro*. Наведено результати власних досліджень з одержання високопродуктивних клітинних ліній *Arnebia eichroma*, здатних накопичувати до 20% шиконіну в сухій біомасі.

К л ю ч о в і с л о в а: біосинтез нафтохінонових пігментів, етапи біосинтезу шиконіну, родина рослин *Boraginaceae* та рід *Arnebia eichroma*, культура клітин рослин, клітинні лінії — продуценти шиконіну.

Представители семейства бурачниковых *Boraginaceae* привлекают внимание как лекарственные, красильные, алкалоидоносные, гликозидоносные, витаминные, эфиромасличные, кормовые, пищевые и декоративные растения [1]. Они распространены на всех континентах, однако наиболее широко в тропической, субтропической и, частично, в северных умеренных областях Земли. Особенно многочисленны бурачниковые в Средиземноморье, в Западной и Средней Азии и в тихоокеанской области Северной Америки. Среди них есть древесные и кустарниковые формы, а также многолетние и однолетние травы. Семейство объединяет около 115 родов и до 2500 видов [2].

Корни некоторых видов растений семейства *Boraginaceae* содержат красные нафтохиноновые пигменты — шиконин, алканнин и их производные. Эти пигменты выявлены более чем в 140 видах из 20 родов этого семейства, таких как *Alkanna*, *Arnebia*, *Echium*, *Lithospermum*, *Onosma* и др. [3]. Шиконин на Востоке, а алканнин в странах Европы издавна использовались как ценнейшие красные красители, обладающие еще и лекарственными свойствами. К их терапевтическим свойствам относят ранозаживляющее, противовоспалительное, антисептическое, противоопухолевое, противогрибковое, антигонадотропное, противовирусное и инсектицидное действие [4–12]. Шиконин, кроме того, является косметическим средством [13].

Шиконин — 5-8-дигидрокси-2(1-гидрокси-4-метил-пент-3-энил)-1,4-нафтохинон и его эфиры (1, R-ацильные радикалы) относят к феноль-

ным соединениям нафтохиноновой природы, формулы которых приведены на рис. 1.

Шиконин является оптическим изомером алканнина, выделенного из европейского вида *Alkanna tinctoria*. Абсолютная конфигурация шиконина имеет R-форму, тогда как алканнина — S-форму, т.е. они являются энантиомерами (рис. 2). Стереохимические исследования показали, что каждое производное шиконина, выделенное как из корней, так и из каллуса *Lithospermum erythrorhizon* — это смесь R-формы (84–93%) и S-формы (7–16%) [14]. Энантиомеры существенно не отличаются по противовоспалительному действию в эксперименте на животных [15].

Основные этапы биосинтеза шиконина

В биосинтезе шиконина участвуют два ключевых предшественника — 4-гидроксibenзойная кислота (4ГБ) и геранилдифосфат (ГФФ) [16–19]. Первый из них (ароматическая основа) образуется в результате шикиматного (фенилпропаноидного) пути биосинтеза фенольных соединений, второй (изопреноидная боковая цепь) — ацетатно-мевалонатного (изопреноидного). Соединение этих двух предшественников и последующее образование кольца между ними формируют нафтохиноновый остов. Рассмотрим этапы формирования шиконина подробнее.

Шикиматная ветвь биосинтеза

Исходными веществами в биосинтезе ароматических предшественников шиконина по шикиматному пути являются фосфоэнолпировиноградная кислота и эритрозо-4-фосфат, образу-

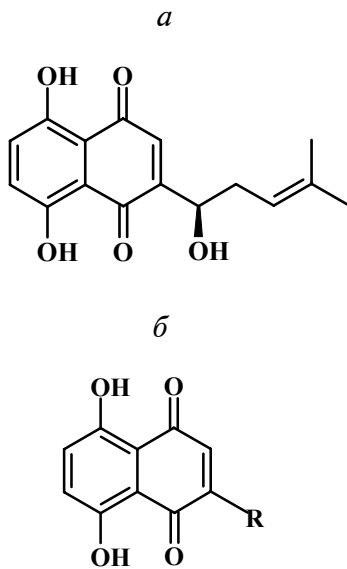


Рис. 1. Структурная формула шиконина (а) и его производных (б).

щиеся соответственно в реакциях гликолиза и пентозофосфатного цикла (рис. 3). При их конденсации образуется семиуглеродное соединение 3-деокси-7-гептулонат синтаза (ДГФ). Эта реакция катализуется ДГФ синтазой (2.5.1.54) [20] — одним из ключевых ферментов в биосинтезе шиконина, который управляет потоком углерода в шикиматный путь [21]. ДГФ синтаза является металлоферментом, который выявлен у бактерий и у высших растений. Обнаружено две формы этого фермента у *Vigna radiata* и ряда других растений — Mn^{2+} -стимулируемая и Co^{2+} -зависимая [22]. Первая форма локализована в хлоропластах, вторая — в цитозоле [23].

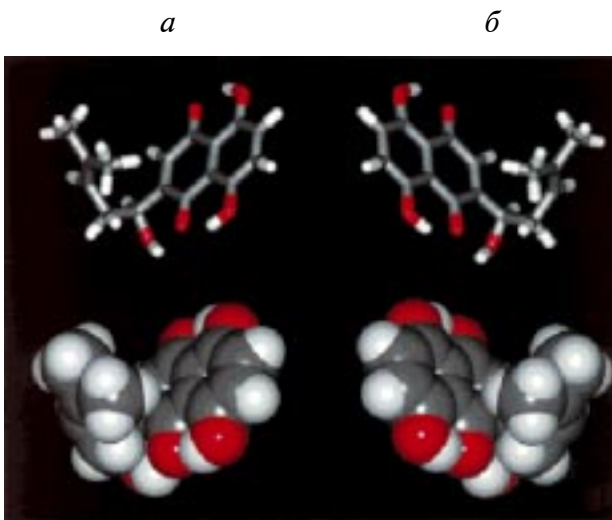


Рис. 2. Молекулярная модель алканнина (а) и шиконина (б), смоделированная компьютером [16].

3-Дегидрохинат синтаза (4.2.3.4) осуществляет циклизацию ДГФ в 3-дегидрохинную кислоту. Кофакторами этой синтазы являются NAD и Co^{2+} . 3-Дегидрохинная кислота претерпевает дегидратацию с образованием 3-дегидрошикимовой кислоты под действием 3-дегидрохинат дегидротазы (4.2.1.10). Шикимат дегидрогеназа (1.1.1.25) — кофактор $NADP \cdot H_2$ — осуществляет последующее превращение 3-дегидрошикимовой кислоты в шикимовую [20].

Следующим этапом идет образование 3-фосфошикимовой кислоты из шикимовой кислоты и АТФ при участии шикимат киназы (2.7.1.71). 3-Фосфошикимовая кислота с молекулой фосфоэнолпирувата образует 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат (ЭПШФ) с помощью фермента ЭПШФ синтазы (2.5.1.19). Этот фермент является мономером без кофактора, его молекулярная масса 46 кДа [24]. Далее ЭПШФ под действием хоризмат синтазы (4.2.3.5) претерпевает дефосфорилирование и дегидратацию, что приводит к образованию нестойкой хоризмовой кислоты. Последующее соединение — префеновая кислота — образуется из хоризмовой с участием изохоризмат синтазы (5.4.4.2). Префеновая кислота подвергается действию хоризмат мутазы (5.4.99.5) с образованием фенилпировиноградной кислоты. Затем при участии фенилаланин транс-аминазы (2.6.1.58), кодируемой генами *LEPAL-1* и *LEPAL-2* [25], происходит образование L-фенилаланина. Из него под действием L-фенилаланинаммиак-лиазы (4.3.1.5.) образуется коричневая (циннамовая) кислота. Транс-циннамат 4-монооксигеназа (1.14.13.11), кодируемая генами *LEC4H-1* и *LEC4H-2*, превращает коричневую (циннамовую) кислоту в *p*-кумаровую (*p*-окси-коричневую) [26].

В экспериментах с мечеными атомами на клетках каллусной культуры *Lithospermum erythrorhizon* было показано, что биосинтез шиконина проходит через 4-гидроксibenзойную кислоту, полученную из L-фенилаланина с двумя молекулами мевалоновой кислоты [14], подобно биосинтезу алканнина — энантиомера шиконина из *Plagiobotris arizonicus* [26]. Однако существует ряд разногласий по поводу дальнейшего превращения *p*-кумаровой (оксикоричневой) кислоты в 4-гидроксibenзойную.

Синтез гидроксibenзойной кислоты

Точный механизм биосинтеза бензойных кислот в растениях оставался длительное время невыясненным. С использованием ауксотрофных мутантов было установлено, что оксibenзойные кислоты образуются из фенилпропаноидных предшественников удалением ацетата или аце-

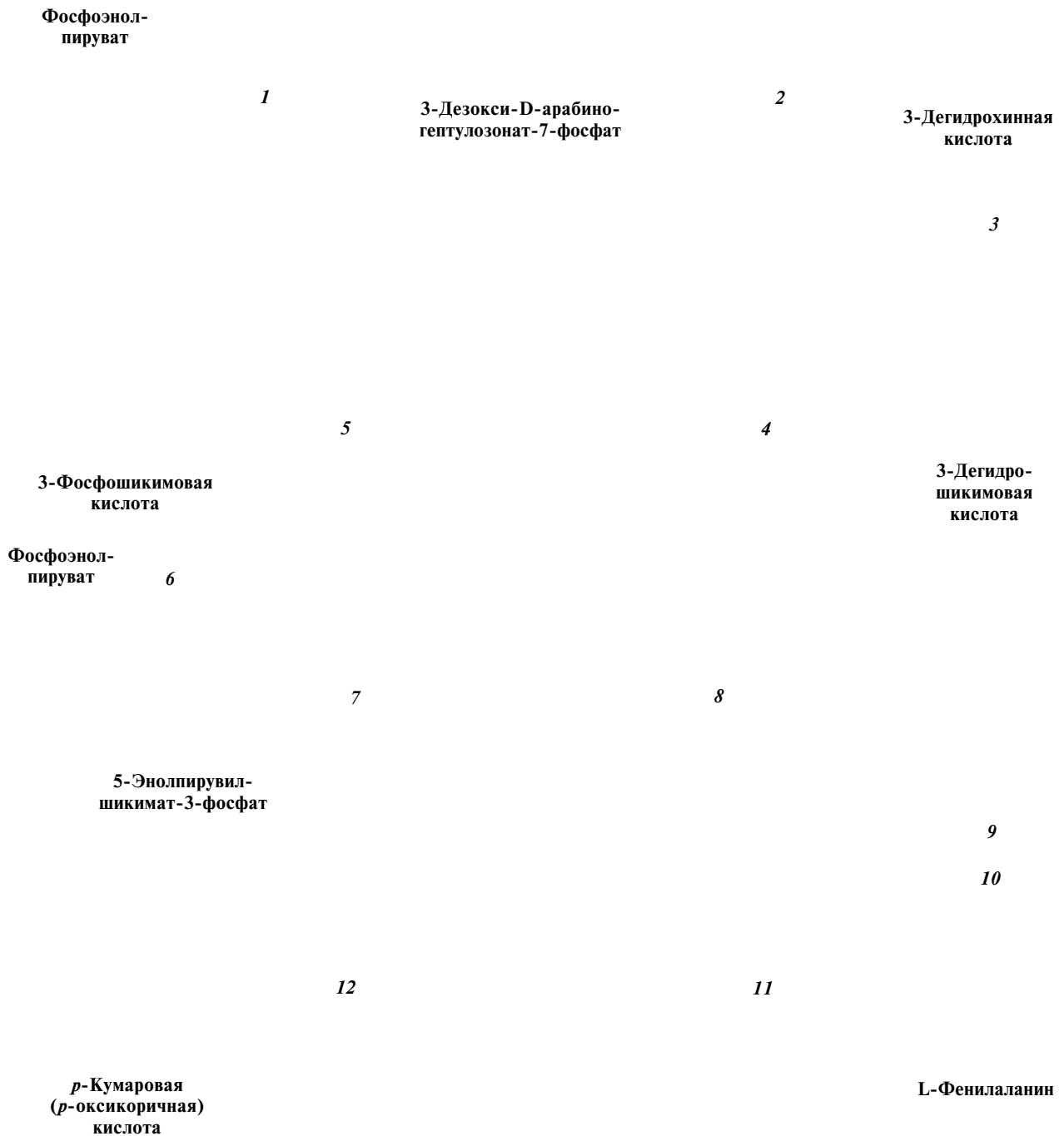


Рис. 3. Схема образования p-кумаровой (оксикоричной) кислоты – промежуточного звена в биосинтезе шиконины (шикиматный путь) [25,26]. Обозначения ферментов: 1 – 3-деокси-7-гептулонат синтаза (2.5.1.54); 2 – 3-дегидрохинат синтаза (4.2.3.4); 3 – 3-дегидрохинат дегидрогеназа (4.2.1.10); 4 – шикимат дегидрогеназа (1.1.1.25); 5 – шикимат киназа (2.7.1.71); 6 – 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (2.5.1.19); 7 – хоризмат синтаза (4.2.3.5); 8 – изохоризмат синтаза (5.4.4.2); 9 – хоризмат мутаза (5.4.99.5); 10 – L-фенилаланин(гистидин) трансминаза (2.6.1.58); 11 – L-фенилаланин-аммиак лиаза (4.3.1.5.); 12 – транс-циннамат 4-монооксигеназа (1.14.13.11).

тил-СоА от боковой цепи предположительно путем реакции, аналогичной β-окислению жирных кислот, т. е. через сложные СоА-эфиры [27]. Однако этому не было достаточных биохимических доказательств. Не было выявлено никаких сложных СоА-эфиров как промежуточных звеньев. Не установлена зависимость этих реакций от добавления АТФ или СоА. Поэтому была предложена альтернативная гипотеза для объяснения биосинтеза бензойных кислот возвратно-альдольным путем на основе экспериментов с бесклеточными экстрактами клубней картофеля [28], культурами клеток моркови [29] и *L. erythrorhizon* [30] (рис. 4).

В опытах на культуре клеток *L. erythrorhizon* показано образование 4-гидроксибензойной кислоты из *p*-кумаровой (*p*-оксикоричной) через бензальдегид. Реакция субстратспецифична по отношению к *p*-кумаровой кислоте, поскольку ни *орто*-, ни *м*-кумарат, ни циннамат не были использованы в реакции как субстрат. Этот факт, а также превращение в реакции 25%-го *p*-кумарата в течение 5 мин, указывают на то, что клетки обладают специфичными ферментами для синтеза 4-гидроксибензоата. Кроме того, в отсут-

ствии NAD в результате реакции вместо 4-гидроксибензоата формируется *p*-гидроксибензальдегид. Этот продукт может быть промежуточным звеном только на возвратно-альдольном пути. Кроме того, в грубых экстрактах клеток была обнаружена активность 4-гидроксибензальдегид дегидрогеназы (1.2.1.64) [30].

Получены доказательства в пользу реакции, аналогичной β-окислению жирных кислот. Для более точного исследования разработана улучшенная система пробирного анализа, что позволило избежать декомпозиции субстрата, которая наблюдалась ранее [31]. Авторы также синтезировали *p*-[¹⁴C]-кумарат и *p*-[¹⁴C]-кумарил-СоА как субстраты и разработали системы ВЭЖХ для обнаружения сложных СоА-эфиров – промежуточных продуктов в синтезе 4-гидроксибензойной кислоты. В результате удалось четко показать, что промежуточным звеном между *p*-кумаратом и 4-гидроксибензоатом является *p*-кумарил-СоА, образованный при участии *p*-кумарил-СоА лигазы, кодируемой генами *LE4CL-1* и *LE4CL-2* [32]. Более того, с помощью ВЭЖХ удалось зафиксировать ранее неуловимые сложные СоА-эфиры – ацетил-СоА и *p*-гидроксибензоил-СоА [30]. Во

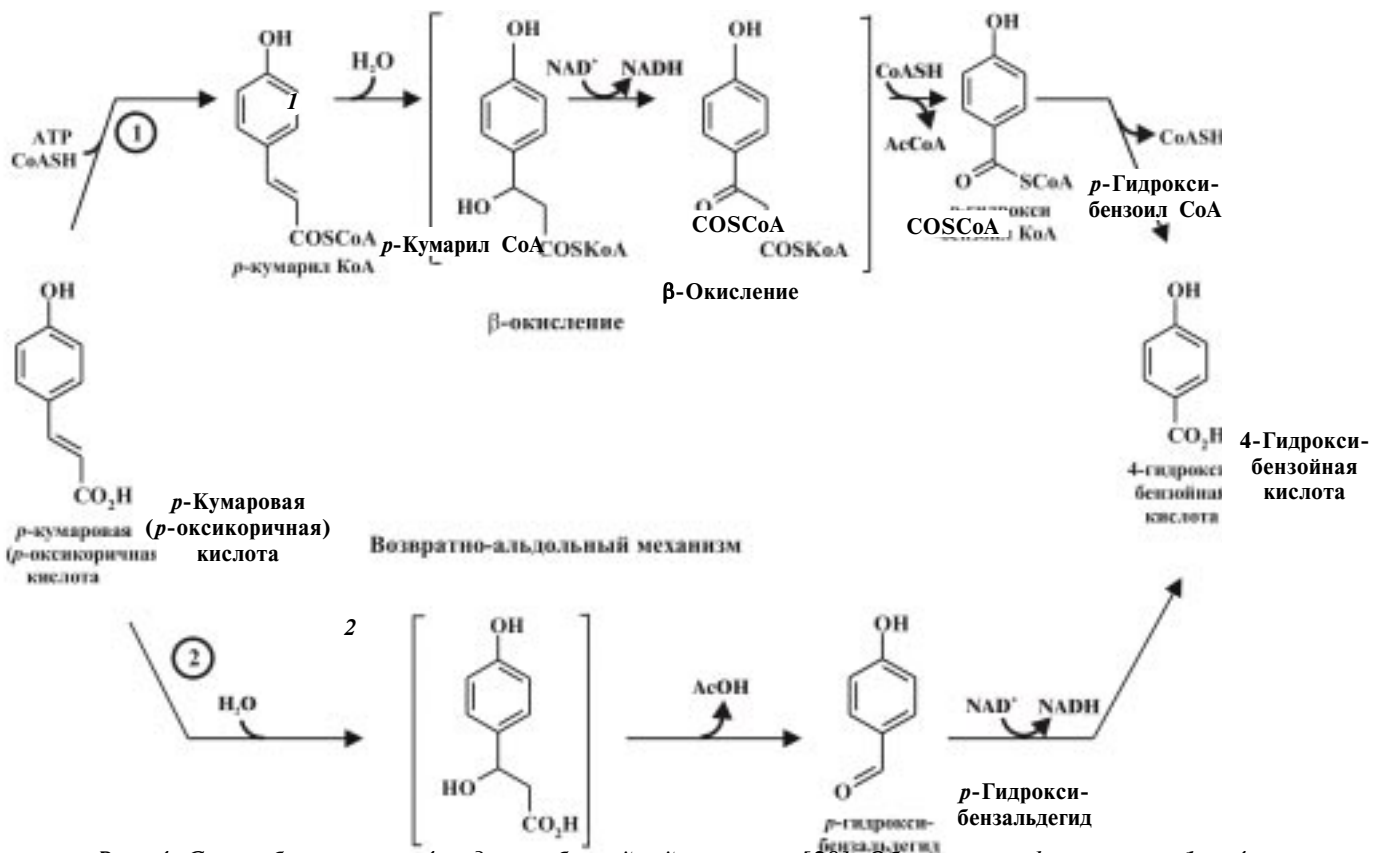


Рис. 4. Схема биосинтеза 4-гидроксибензойной кислоты [29]. Обозначение ферментов: 1 – 4-кумарат-СоА-лигаза (6.2.1.12); 2 – 4-гидроксибензальдегид дегидрогеназа (1.2.1.64).

время реакции была отмечена активность 4-кумарат-СоА лигазы (6.2.1.12) в присутствии АТР, СоА и Mg^{2+} [18]. Этот фермент катализирует превращение *p*-кумаровой кислоты в *p*-кумарил-СоА. Однако при описанных улучшенных условиях пробирного анализа (использование радиоактивных субстратов, более коротких инкубационных периодов и добавлении аскорбата) не наблюдалось формирования *p*-гидроксибензальдегида и скорость формирования 4-гидроксибензоата из *p*-кумарил-СоА сильно превысила АТР- и СоА-независимое формирование 4-гидроксибензоата из *p*-кумарата, сообщенного в предыдущем исследовании [30]. Р. Лошеру и Л. Хейде удалось повторить опыт К. Язаки и получить *p*-гидроксибензальдегид. Отличия в условиях эксперимен-

тов не дают ответ на вопрос является ли путь образования его через *p*-гидроксибензальдегид альтернативой, частичным путем или артефактом, полученным только *in vitro* [18].

Ацетатно-мевалонатная (изопреноидная) ветвь биосинтеза

Конечным продуктом ацетатно-мевалонатного пути в биосинтезе шиконины является геранилдифосфат (рис. 5). Этот путь начинается у всех групп организмов одинаково – из ацетил-СоА [28]. Две его молекулы путем последовательной конденсации дают ацетоацетил-СоА, из которого после присоединения еще одной молекулы ацетил-СоА с участием фермента гидросиметилглутарил-СоА (ГМГ-СоА) синтазы

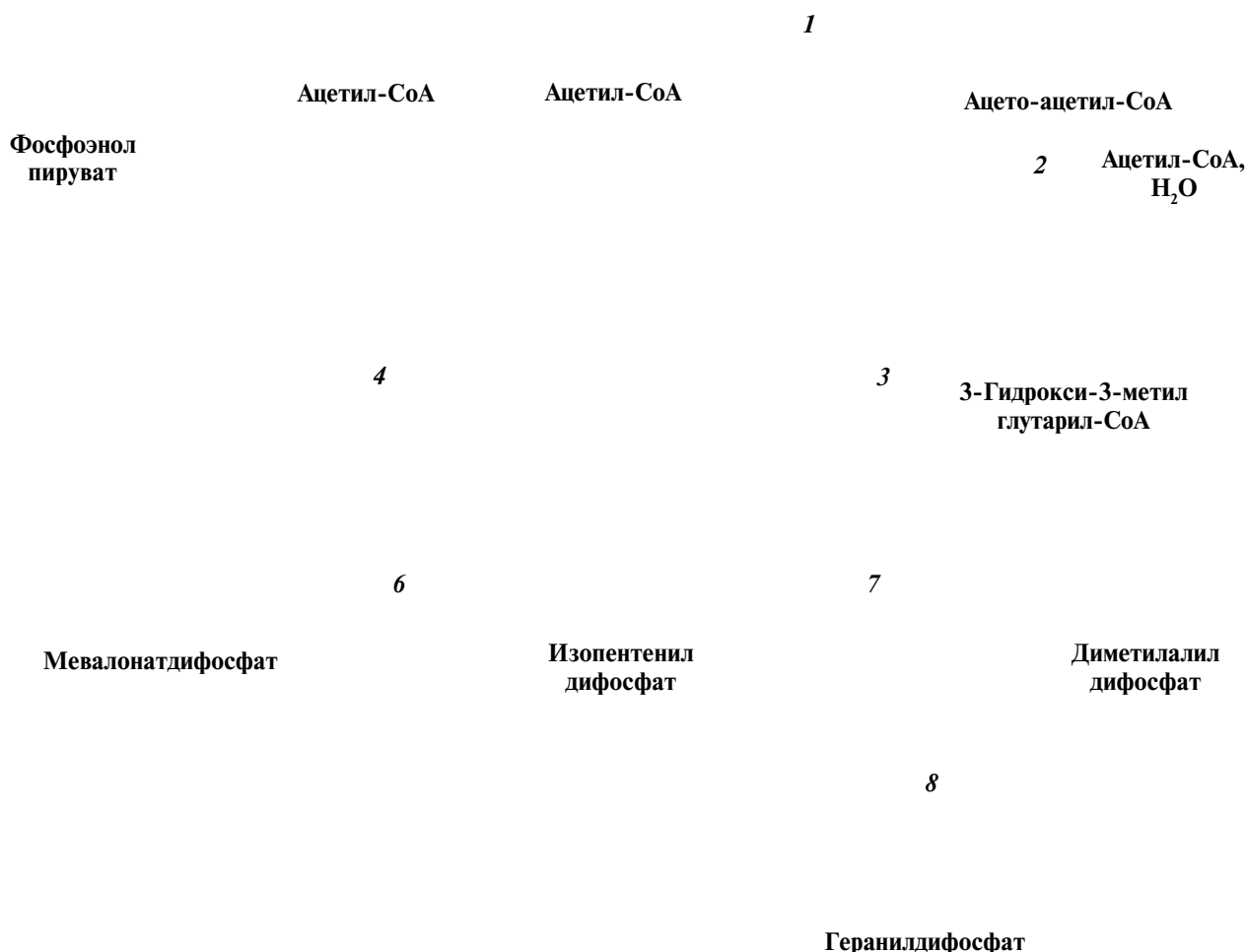


Рис. 5. Схема образования геранилдифосфата – промежуточного звена в биосинтезе шиконины (ацетатно-мевалонатный путь) [31, 32, 35]. Обозначение ферментов: 1 – ацетил СоА С-ацетилтрансфераза (2.3.1.9); 2 – гидросиметилглутарил-СоА синтаза (2.3.3.10); 3 – гидросиметилглутарил-СоА редуктаза (1.1.1.34); 4 – мевалонат киназа (2.7.1.36); 5 – фосфомевалонат киназа (2.7.4.2); 6 – дифосфомевалонат декарбоксилаза (4.1.1.33); 7 – изопентенилдифосфат Δ -изомераза (5.3.3.2); 8 – диметилаллилtransтрансфераза (2.5.1.1).

(2.3.3.10) [33] образуется гидроксиметилглутарил-CoA. Восстановление последнего с участием двух молекул NADPH посредством ГМГ-CoA редуктазы (1.1.1.34), кодируемой геном *HMGR* [31], приводит к образованию мевалоновой кислоты (МК) [33]. Это восстановление проходит необратимо и мевалоновую кислоту можно рассматривать в качестве предшественника изопреноидных соединений [28]. Из МК после двукратного фосфорилирования у С-5-атома и последующего декарбоксилирования образуется изопентенилдифосфат (ИПФФ) [33]. Реакция требует присутствия АТФ и приводит к образованию ADP и неорганического фосфата. ИПФФ, известный также как “активный изопрен”, изомеризуется в диметилалдифосфат (ДМАФФ) путем перемещения двойной связи, катализируемого изопентенилдифосфат Δ -изомеразой (5.3.3.2). ДМАФФ служит “затравкой” для последующей полимеризации [28]. Одна молекула ДМАФФ служит акцептором для одной молекулы ИПФФ. Дифосфатная группа отщепляется от молекулы-затравки или от головной части цепи, которая подвергается удлинению с образованием геранилдифосфата (ГФФ) под действием фермента диметилаллилтрансферазы (ДМА трансфераза, 2.5.1.1) (молекулярная масса 73 кДа) в присутствии Mg^{2+} и Mn^{2+} [28, 34, 35]. ДМА трансфераза является одним из ключевых ферментов биосинтеза шиконина. Выделенный из суспензионной культуры клеток *L. erythrorhizon* фермент имеет высокую специфичность к ИПФФ и ДМАФФ [27]. ДМА трансфераза обнаружена в цитозоле клеток [19].

Завершающая стадия образования шиконина

Два ключевых предшественника – 4-гидроксibenзойная кислота (ГБ-кислота) и ГФФ, полученные как продукты описанных выше соответствующих путей биосинтеза, объединяются в реакции, катализируемой ферментом 4-ГБ:геранилтрансферазой (4-ГБГТ) и образуют 3-геранил-4-гидроксibenзоат (рис. 6). Активность 4-ГБГТ была впервые выявлена Л. Хейде и М. Таботой в бесклеточных экстрактах суспензионной культуры клеток *L. erythrorhizon* [36–38]. Фермент был активен в присутствии Mg^{2+} при рН от 7,1 до 9,3 и высоко специфичен к субстратам 4-ГБ и ГФФ, а его активность в производящих шиконин клетках в 35 раз выше, чем в непродуктивных. Этот фермент был обнаружен только в микросомальной фракции. Разделение микросомальных компонентов непрерывным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы подтвердило, что фермент локализован в мем-

бране, имеющей плотность $\rho = 1,09–1,10$ г/см³, отчетливо отличающейся по плотности от мембран пластид, плазматической мембраны и тонопласта, но подобной таковой эндоплазматического ретикулума [39]. Определены две последовательности ДНК – *LePGT-1* и *LePGT-2*, кодирующие ГБГТ, состоящие из 680 и 756 п.н., кодирующие соответственно 307 и 306 аминокислот [39].

Известно, что свободные от шиконина культивируемые клетки *L. erythrorhizon* накапливают существенное количество 4-ГБ-О-гликозида [40] и немного 4-ГБ, т.е. большая часть 4-ГБ содержится в вакуолях клеток как его β -D-гликозид (4-ГБОГ) [40]. А. Бехтольд с сотрудниками [41] очистил уридин-5'-дифосфоглюкоза (УДФГ):глюкуронозилтрансфераза (2.4.1.17) (молекулярная масса 47 500 Да) из культуры клеток *L. erythrorhizon*. Фермент высокоспецифичен к УДФГ и 4-ГБ. При пересадке клеток на продукционную среду М9, которая стимулирует биосинтез шиконина, количество 4-ГБОГ быстро уменьшается и таким образом 4-ГБ или 4-ГБОГ включаются в синтез как промежуточные звенья [42].

Исследование фоторегуляции шиконина на ферментативном уровне показало, что белый или синий свет блокируют преобразование 4-ГБ, ингибируя de novo синтез 4-ГБГТ, и в то же время стимулируют активность 4-гидроксibenзоат-4-О- β -D-гликозилтрансферазы (4-ГБГлТ, 2.4.1.194) и накопление 4-ГБ-гликозида [17]. В результате 4-ГБ транспортируется в вакуоль, где сохраняется в форме нетоксичного растворимого в воде гликозида. Предполагают, что это является механизмом клеточной защиты. Однако вскоре, после возвращения клеток в темноту в них восстанавливается активность 4-ГБГлТ в преобразовании 4-ГБ через гидролиз 4-ГБ-О-гликозида 4-ГБ-О-гликозидазой, возобновляя биосинтез шиконина. Таким образом, вызванное светом резкое замещение в промежуточном обмене веществ 4-ГБ на накопление 4-ГБ-гликозид достигнуто одновременным регулированием этих двух ферментов.

Следующим шагом является превращение 3-геранил-4-гидроксibenзоата в *m*-геранилгидрохинон (*m*-ГГХ), который гидроксильруется с образованием 3''-геранилгидрохинона (3''-ГГХ) с участием геранилгидрохинон-3''-гидроксилазы. Ямамото с сотрудниками обнаружили активность геранилгидрохинон-3''-гидроксилазы (ГГХ-3''-Г) в грубом бесклеточном экстракте культуры *L. erythrorhizon*. В результате культивирования этого экстракта с *m*-ГГХ и NADPH удалось выделить продукт реакции – 3''-ГГХ – и определить его структуру, используя метод ВЭЖХ, со-

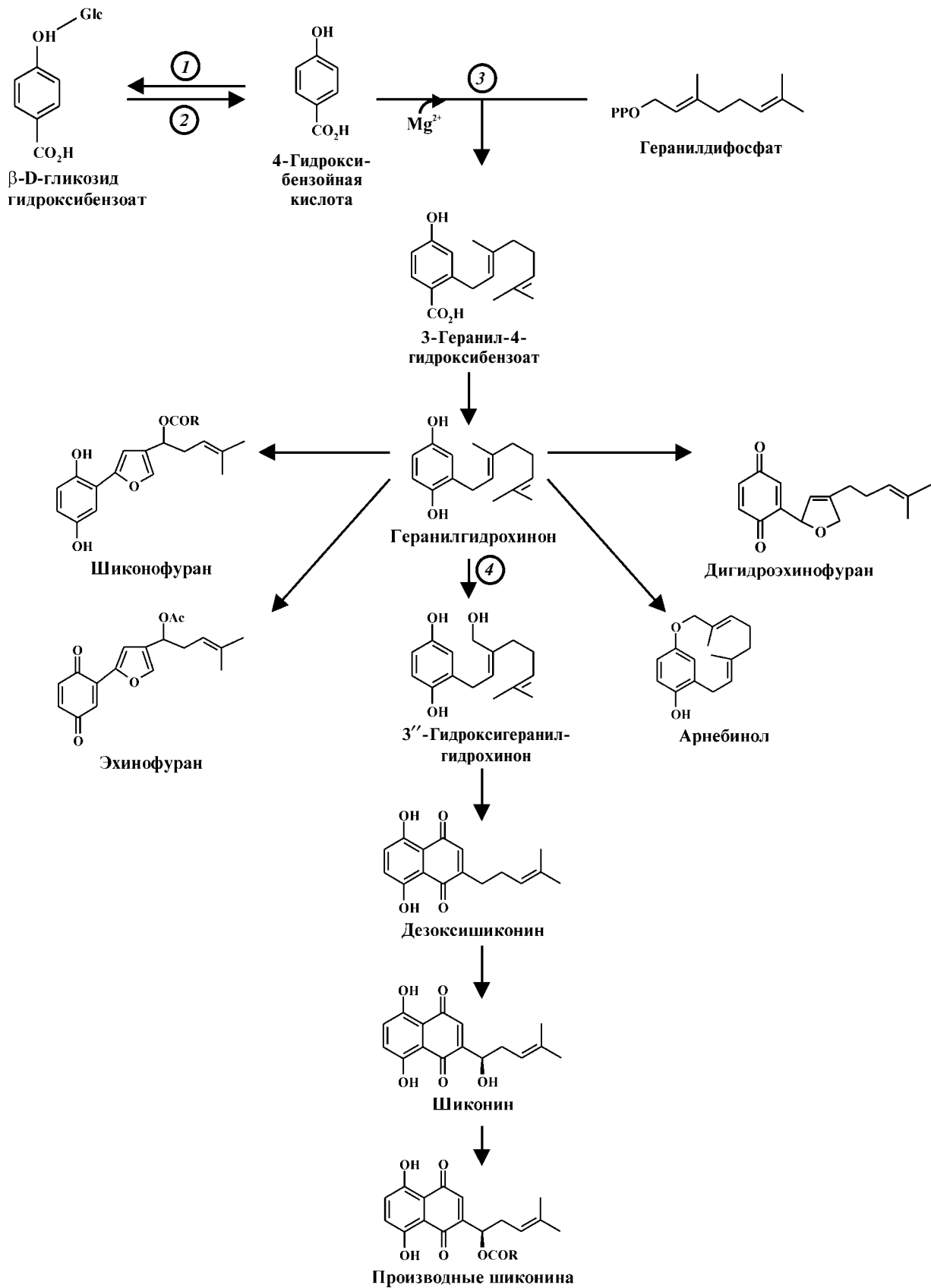


Рис. 6. Схема завершающей стадии образования шиконина [43, 44]. Обозначение ферментов: 1 – 4-гидроксибензоат-4-O-β-D-гликозил трансфераза (2.4.1.194); 2 – 4-гидроксибензоат-O-гликозидаза; 3 – 4-гидроксибензоат-геранил трансфераза; 4 – геранилгидрохинон-3''-гидроксилаза.

вмещенный с масс-спектральным анализом, а также ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопией. Авторы также доказали, что фермент ГГХ-3''-Г является микросомальным, его кофакторами являются O₂ и NADP, а ингибиторами – цитохором *c* и CO, оптимум pH 7,4 [43].

Механизм последующей реакции циклизации 3''-ГГХ до дезоксишиконина пока неизвестен [43]. Как было показано, дезоксишиконин фактически является предшественником в биосинтезе шиконина [44]. Последующие шаги образования производных шиконина – только предположение.

Локализация и транспорт шиконина

Методом электронной микроскопии было выявлено, что при переносе неокрашенных клеток суспензионной культуры воробейника *L. erythrorhizon* с ростовой среды в продукционную происходят изменения в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Наблюдали множественные сферические вздутия (диаметром 0,1–0,2 мкм) вдоль слоев гранулярного ЭР, которые возможно образовались за счет частых локальных растягиваний его мембран. Впоследствии эти вздутия уже в виде везикулярных пузырьков (d = 0,1–0,2 мкм) вышли в цитоплазму. Пузырьки далее перемещались к границе цитоплазмы, соединялись с

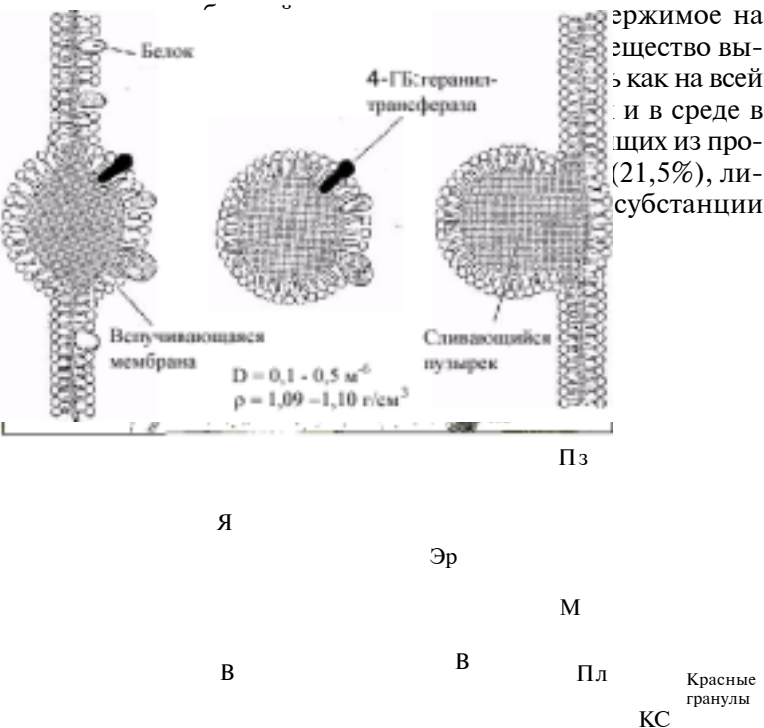


Рис. 7. Диаграмма образования шиконина в клетке растения. КС – клеточная стенка, ЭР – эндоплазматический ретикулум, М – митохондрия, Я – ядро, П – пластида, Пл – плазматическая мембрана, В – вакуоль, Пз – пузырек [14].

Белок	4-ГБ:геранил-трансфераза
Вспучивающаяся мембрана	Сливающийся пузырек
	$D = 0,1-0,5 \text{ м}^6$
	$\rho = 1,09-1,10 \text{ г/см}^3$

Рис. 8. Гипотетическая модель секреции шиконина с помощью мембранных пузырьков [14].

Согласно гипотезе, пузырек мог бы быть местом локализации биосинтеза шиконина, что подтверждается следующими наблюдениями [29]:

- 1) микросомальная фракция ($\rho = 1,09-1,10 \text{ г/см}^3$) содержит активную 4-ГБ:геранилтрансферазу и многочисленные пузырьки с $d = 0,1-0,5 \text{ м}^6$;
- 2) образец фермента, встроенного в мембрану пузырька, отличается от таковых мембраны ЭР, вакуолей, пластид, также как и плазматической мембраны;
- 3) плотность пузырька очень близка к ЭР.

Кроме того, криоэлектронный микроскопический анализ с высоким разрешением при чрезвычайно низкой температуре (4,2 °К) показал, что пузырек охвачен монослоем фосфолипидов вместо двойного слоя липидов (рис. 8).

В монослое, сохраняющем свою стабильность благодаря равновесию между внешним и внутренним давлением, связанный с ним фермент типа 4-ГБ:геранилтрансферазы частично выставлен на внешнюю сторону слоя липидов. Здесь может протекать ферментативная реакция с водорастворимым субстратом [14]. Учитывая эти факты, а также внутриклеточную локализацию растворимой ДМА трансферазы в пределах цитозоля [19], М. Табата постулировал, что первой реакцией, происходящей в пузырьке, могло быть превращение 4-ГБ с помощью 4-ГБ:геранилтрансферазы в монослое фосфолипидов, что сопровождается рядом ферментативных реакций, включая декарбоксилирование, гидрокселирование, циклизацию и окисление, ведущих к формированию шиконина [14]. Эта гипотеза была подтверждена следующими наблюдениями:

- 1) во фракции пузырьков была обнаружена активность 4-ГБ:декарбоксилазы, которая преобразует 4-ГБ – продукт реакции 4-ГБ:геранил-

трансферазы – в следующее промежуточное звено ГГХ;

2) ^{14}C -меченый дезоксишиконин, культивированный в пузырьках *in vitro*, был преобразован в шиконин и его сложные эфиры, включая ацетил- и гидроксиизовалерилшиконин в течение 3 ч при 27 °С [44], что указывает на присутствие в пузырьках ферментов, ответственных и за гидроксилирование и за ацилирование дезоксишиконина;

3) желтоватая жидкость свежей фракции пузырьков стала красной при выдерживании в условиях комнатной температуры. Это превращение было ускорено при более высокой температуре или дополнительной аэрации. В пузырьках происходит формирование шиконина из предшественников.

Однако в пузырьках живых клеток конечные продукты реакции, вероятно, накапливаются как бесцветные соединения (непостоянные нафтолы), которые способны окисляться с образованием красных нафтохинонов (пигментов шиконина), выделяемых из клеток в среду [14].

Получение шиконина в культуре растительных клеток

Источником получения шиконина являются растения семейства *Boraginaceae* родов *Arnebia*, *Lithospermum*, *Onosma*, *Echium*, *Lapulla* и др. Шиконин впервые выделен из корней *Lithospermum erithrorhizon*. Выделяли шиконин также из корней ряда других растений – *Macrotomia ugamentis* (выход 0,67%), *M. euchroma* (выход 2,21%), *Lithospermum euchromon*, *Onosma caucasicum*, *Echium rubrum* (выход 0,46%), *Arnebia tibetana* [45].

Впервые шиконин и его производные из каллусной культуры были выделены М. Табатой и сотрудниками в 1974 г. [45]. Каллусы, полученные из проросших семян *L. erithrorhizon* на среде Линсмайер и Скуга (LS) [14], которая содержала кинетин и 2,4-дихлорфенолуксусную кислоту (2,4-D), не продуцировали нафтохиноновые пигменты. Пересадка каллусов через три месяца на питательную среду, содержащую ауксин 3-ИУК (ИУК), индуцировала биосинтез пигмента. Для успешного формирования нафтохинонов, согласно гипотезе авторов, необходимо было провести культивирование клеток в темноте, что соответствует природным условиям образования пигментов в корнях растения [14]. Свет блокирует синтез ключевого фермента 4-ГБГТ, что исключает синтез шиконина [17].

Клетки суспензионной культуры *L. erithrorhizon*, которые не могли производить шиконин в жидкой среде LS, восстанавливали актив-

ность после пересадки на жидкую среду Уайта. Нарушение синтеза шиконина в среде LS, как оказалось, объяснялось присутствием ионов аммония, главного источника азота, который представлен в среде Уайта азотнокислыми солями. Базируясь на этом факте, была разработана продукционная среда М9, содержащая не соль аммония, а нитрат. Как было показано позже, ингибирование синтеза шиконина происходит не из-за иона аммония непосредственно, а вызвано высоким уровнем амида α -аминоглутаровой кислоты, который накапливается клетками, обогащенными такой солью аммония, как NH_4NO_3 [14].

Выявлено, что синтез шиконина стимулируется добавлением небольшого количества агара (0,05%) к жидкой среде LS. Таким образом, агар, который долго расценивался как физиологически неактивная субстанция, оказался мощным индуктором биосинтеза шиконина. Позже было установлено, что ответственной за активность компонентой агара является агаропектин [14].

Успех этого метода инициировал исследования возможностей биосинтеза шиконина культивируемыми клетками других видов *Boraginaceae*, которые были выполнены с различной степенью успеха. Для подобных исследований использовали каллусные культуры *Echium licopsis* [14], *Onosma paniculatum* [46], *O. visianii* [16], *O. confertum* [47]. Однако накопление шиконина в этих культурах было низким: 5,8 мг/г сухой клеточной биомассы у *O. paniculatum* [48], 5,2 мг/г – у *O. visianii* [16], 3,5 мг/г – у *E. licopsis* [14].

Перспективным источником получения шиконина являются растения рода *Arnebia*. Анализ *Arnebia euchroma* (популяция растений из Западного Памира, Таджикистан) показал, что в корнях накапливается от 0,43 до 2,47% шиконина от сухой массы. По продуктивности этот вид не уступает воробейнику краснокорневому *L. erithrorhizon*, 5–7-летние растения которого накапливают 1–2% шиконина [50].

Культура клеток *Arnebia euchroma* была впервые получена в Институте лекарственных растений (ВИЛР) в России в 1987 году [49]. Для получения каллусной культуры использовали меристему спящих почек растения. Авторы показали, что в суспензионной культуре клеток однолетнего возраста накапливаются шиконин, дезоксишиконин, β,β -диметилакрилшиконин, изобутирилшиконин. Спектр нафтохинонов не отличался от наблюдаемого в интактном растении, но при этом в суспензионной культуре накапливалось значительно больше шиконина, дезоксишиконина и ацетилшиконина. В культуре клеток арнебии, в отличие от интактных растений, кроме нафтохинонов были выявлены желтые пигменты, идентифицированные как бензохиноны (эхи-

нофураны), что наблюдалось ранее и в культивируемых клетках *L. erithrorhizon* [14]. Позднее культура клеток арнебии была получена в Китае [51].

В нашей лаборатории методами клеточной селекции создано несколько клеточных штаммов, в том числе высокопродуктивный штамм АЕ-3 арнебии красящей *A. euchroma* [52]. Штамм АЕ-3 получен в результате многократных повторных клонирований мелких клеточных агрегатов (до 2 мм) наиболее продуктивного клона, полученного от штамма АЕ-2 (в свою очередь полученного от штамма АЕ-1), и выращивается в жидкой и на твердой питательной среде. Он накапливает до 8% шиконина в сухой ткани или до 1,12 г на 1 л питательной среды за 14 сут при глубинном выращивании и до 15% шиконина в сухой ткани при поверхностном выращивании. Прирост биомассы на 11–14-е сут роста составляет 13–16 г (в некоторых случаях до 18–20 г) сухой массы на 1 л питательной среды (рис. 9, 10). Таким образом, штамм АЕ-3 превышает по накоплению шиконина исходный штамм АЕ-2 в 2,5–3,5 раза

при выращивании в суспензионной культуре и в 3–6 раз при выращивании на твердой (агаризованной) среде в виде каллусной культуры (таблица). Общая продуктивность каллуса составляет 0,7–1,5 г шиконина с 1 л питательной среды или 50–107 мг шиконина с 1 л за сутки (рис. 11).

Обработка посадочного материала низкими положительными температурами (+4 °С в течение 30 мин) уменьшает прирост биомассы каллусной культуры, но стимулирует биосинтез шиконина: его содержание возрастает до 20,2% в сухой ткани, что на 60% превышает контроль. Общая продуктивность возрастает при этом на 9,5%, действие холода максимально реализуется в 4–5-ом пассаже после обработки (рис. 11).

Таким образом, изменение условий культивирования приводит к отличиям в интенсивности биосинтеза вторичных метаболитов клетками культуры арнебии красящей. На рис. 11 дана сравнительная картина общей продуктивности по шиконину штаммов АЕ-2 и АЕ-3 в разных условиях выращивания. Наиболее продуктивным среди представленных вариантов является каллус

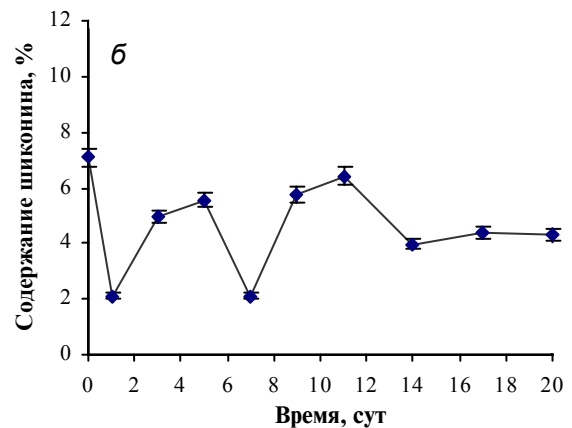
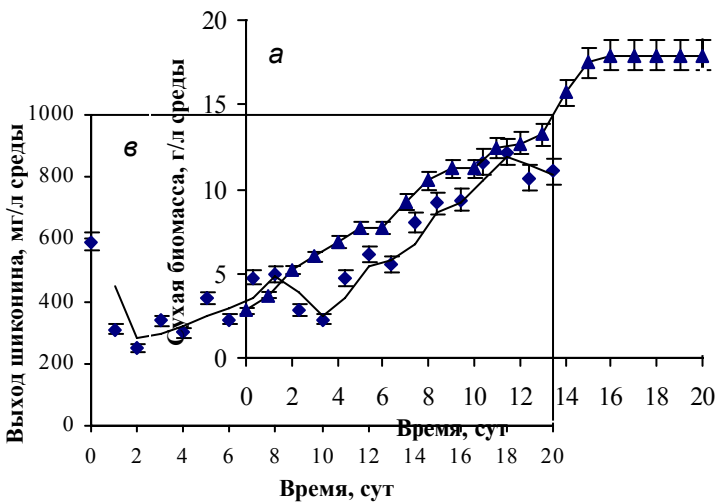


Рис. 9. Продуктивность суспензионной культуры *Arnebia euchroma*, штамм АЕ-3 (собственные данные): а) накопление сухой биомассы, г/л среды; б) содержание шиконина в сухой ткани, %; в) общее количество шиконина в биомассе и среде, мг/л среды.

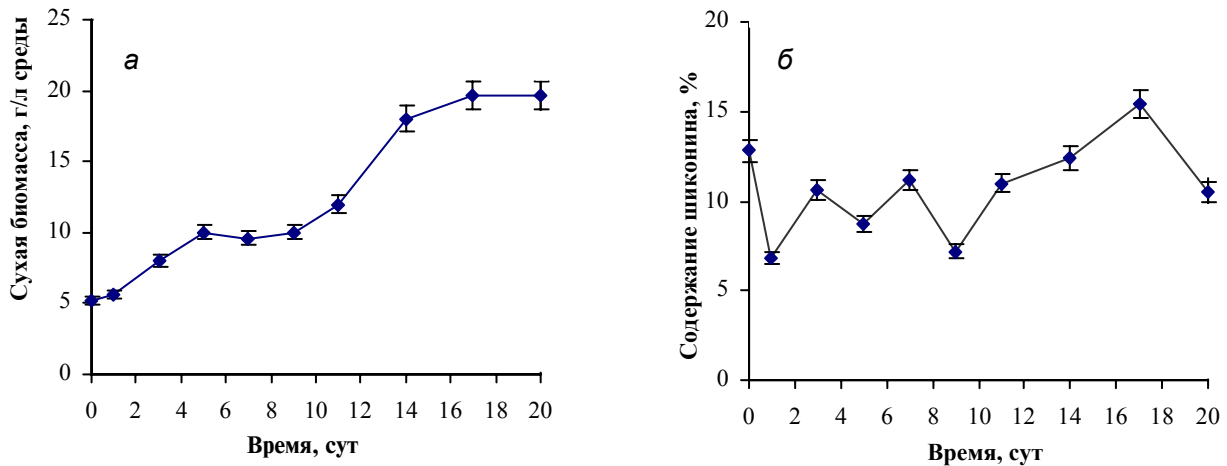


Рис. 10. Продуктивность каллусной культуры *Arnebia eichroma*, штамм АЕ-3 (собственные данные): а – накопление сухой биомассы, г/л среды; б – содержание шиконина в сухой биомассе, %.

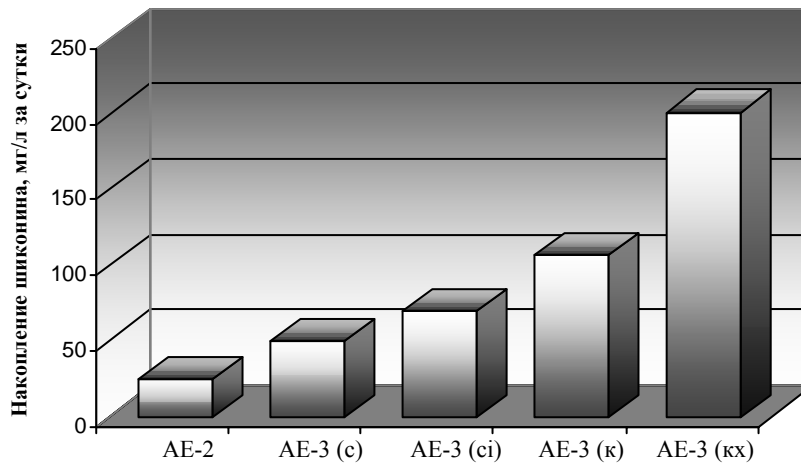


Рис. 11. Продуктивность АЕ-2 и АЕ-3 по содержанию шиконина штаммов в разных условиях выращивания, мг/л за 1 сутки (собственные данные): АЕ-2 – исходный штамм (суспензия); АЕ-3 (с) – суспензия штамма АЕ-3 в стандартных условиях выращивания; АЕ-3 (сi) – суспензия штамма АЕ-3 в условиях интенсивного перемешивания; АЕ-3 (к) – каллусная культура штамма АЕ-3 в стандартных условиях выращивания; АЕ-3 (кк) – каллусная культура штамма АЕ-3 после действия непродолжительной гипотермии.

штамма АЕ-3 после обработки холодом, который в 8 раз превышает исходный штамм по содержанию шиконина. Это вдвое больше, чем свой-

ственно каллусной культуре штамма АЕ-3, растущей в стандартных условиях. Однако для биотехнологического производства более оптималь-

Продуктивность родственных клеточных штаммов арнебии красящей (*Arnebia eichroma*). Собственные данные

Клеточная линия	Выход сухой биомассы, г/л	Содержание шиконина в сухой биомассе, мг/г	Накопление шиконина, мг/л за 1 сутки
АЕ-1 (суспензия)	10–12	8	6,3
АЕ-2 (суспензия)	10–14	12–25	10,7–25,0
АЕ-3 (суспензия)	17–20	40–80	40–80
АЕ-3 (калус)	17–20	70–150	50,0–107,1

ным сырьем для получения шиконина следует рекомендовать суспензию штамма АЕ-3, которая выращивается в условиях интенсивного перемешивания и при этом имеет наиболее стабильные характеристики продуктивности [45].

Растительные пигменты фенольного происхождения нетоксичны и обладают широким спектром терапевтического действия. Они перспективны также для использования в качестве дефицитных природных пищевых красных красителей, поскольку антоцианы являются нестойкими [54], а синтетические соединения признаны вредными. Природное растительное сырье для получения нафтохиноновых пигментов в промышленных масштабах отсутствует. Промышленное получение красного пигмента шиконина, цена которого на мировом рынке достигает 4500 \$ США за 1 кг, разработано на основе культивируемых клеток воробейника краснокорневого *L. erythrorhizon* в Японии [53]. Шиконин, получаемый таким путем фирмой «Mitsui Petrochemicals Industries» (Япония), с 1984 года широко используется в косметической промышленности [55].

Нами получены клеточные линии арнебии красящей *A. euchroma*, накапливающие до 20% шиконина в сухой биомассе, что на порядок выше, чем в корнях природных растений [51–53]. По продуктивности клеточный штамм АЕ-3 приближается к лучшим линиям воробейника краснокорневого, полученным в Японии.

Успешная расшифровка стадий биосинтеза шиконина, выделение и клонирование генов ферментов и других белков, регулирующих его синтез, разработка условий введения в культуру *in vitro* других видов красильных растений семейства *Boraginaceae* являются перспективными для биотехнологического получения дефицитных нафтохиноновых пигментов.

BIOSYNTHESIS OF NAPHTHOQUINOINE PIGMENTS IN PLANTS FROM *Boraginaceae* FAMILY IN NATURE AND IN VITRO CULTURE

O. O. Poronnyk, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

S u m m a r y

Literature data on the production of naphthoquinone pigment, shikonin, by the intact plants and cell cultures derived from the members of *Boraginaceae* family have been reviewed. The results of our own studies on generation of highly productive *Arnebia*

euchroma cell lines able to accumulate up to 20% of shikonin in dry biomass are presented. Data on localization, application of naphthoquinone pigments, peculiarities and enzyme control of their biosynthesis and transportation within plant cells and in culture *in vitro* are summarized.

К е у w o r d s: biosynthesis of naphthoquinone pigment, stage of shikonin biosynthesis, *Boraginaceae*, *Arnebia euchroma*, plant cell cultures, cell lines – producers of shikonin.

1. Доброчаева Д. Н. Бурачникцветные (*Boraginales* Hutch.) Европейской части СССР. Дис. ... д.б.н. Ин-т ботаники им. Холодного. – К., 1977. – С. 269–290.
2. Жизнь растений. Цветковые растения / Под ред. Тахтаджан А. Л. 5. Ч. 2. – М.: Просвещение, 1981. – С. 394–398.
3. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Caprifoliaceae* – *Plantaginaceae* / Под ред. Соколова П. Д. – Л.: Наука, 1990. – С. 109–133.
4. Fujita N., Sakaguchi I., Kobayashi H. et al. // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – 26, N 3. – P. 329–335.
5. Kourounakis A. P., Assimopoulou A. N., Papageorgiou V. P. et al. // Arch. Pharm. (Weinheim). – 2002. – 335, N 6. – P. 262–266.
6. Ozgen U., Houghton P. J., Ogundipe Y., Coskun M. // Fitoterapia. – 2003. – 74, N 7–8. – P. 682–685.
7. Masuda Y., Nishida A., Hori K. et al. // Oncogene. – 2003. – 22, N 7. – P. 1012–1023.
8. Sasaki K., Abe H., Yoshizaki F. // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – 25, N 5. – P. 669–670.
9. Nahrstedt A., Albrecht M., Wray V. et al. // Planta Med. – 1990. – 56, N 4. – P. 395–398.
10. Chen X., Yang L., Zhang N. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – 47, N 9. – P. 2810–2816.
11. Ho T. Y., Wu S. L., Lai I. L. et al. // Antiviral Res. – 2003. – 58, N 3. – P. 199–208.
12. Jewess P. J., Chamberlain K., Boogaard A. B. et al. // Pest Manag. Sci. – 2002. – 58, N 3. – P. 243–247.
13. Terada A., Tanoue Y., Taniguchi H. // Synth. Org. Chem. – N 48. – 1990. – P. 866–875.
14. Tabata M. // Plant Tissue Culture Letters. – 1996. – 13, N 2. – P. 117–125.
15. Tanaka S., Tajima M., Tsukada M., Tabata M. // Nat. Prod. – 1986. – 49, N 3. – P. 466–469.
16. Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Coula-douros E. A. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. – 1999. – 38. – P. 270–300.
17. Heide L., Nishioka N., Fukui H. // Phytochem. – 1989. – 28. – P. 1873–1877 a.

18. *Loscher R., Heide L.* // *Plant Physiol.* – 1994. – **106**. – P. 271–279.
19. *Sommer S., Soverin K., Camara B., Heide L.* // *Phytochem.* – 1995. – **38**. – P. 623–627.
20. *Запрометов М. Н.* Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высшая школа, 1974. – 213 с.
21. *Herrmann K. M.* // *Plant Physiol.* – 1995. – **107**. – P. 7–12.
22. *Rubin J. L., Gaines C. G., Jensen R. A.* // *Ibid.* – 1982. – **70**. – P. 833–839.
23. *Ganson R. J., d'Amato T. A., Jensen R. A.* // *Ibid.* – 1986. – **82**. – P. 203–210.
24. *Jakeman D. L., Mitchell D. J., Shuttleworth W. A., Evans J. N. S.* // *Biochem.* – 1998. – **37**. – P. 12012–12019.
25. *Yazaki K., Matsuoka S., Ujihara T., Sato F.* // *Plant Biotechnol.* – 1999. – **16**. – P. 335–342.
26. *Yamamura Y., Ogihara Y., Mizukami H.* // *Plant Cell Rep.* – 2001. – **20**. – P. 655–662.
27. *Heide L., Nishioka N., Fukui H., Tabata M.* // *Phytochem.* – 1989. – **28**. – P. 1873–1877 б.
28. *Лукнер М.* Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. – М.: Мир, 1976. – 548 с.
29. *Schnitzler J-P., Madlung J., Rose A., Seitz H. U.* // *Planta.* – 1992. – **188**. – P. 594–600.
30. *Yazaki K., Heide L., Tabata M.* // *Phytochem.* – 1991. – **30**. – P. 2233–2236.
31. *Lange B. M., Severin K., Bechthold A., Heide L.* // *Planta.* – 1998. – **204**. – P. 234–241.
32. *Yazaki K., Ogawa A., Tabata M.* // *Plant and Cell Physiol.* – 1995. – **36**, N. 7. – P. 1319–1329.
33. *Goldstein J. L., Brown M. S.* // *Nature.* – 1990. – **343**. – P. 425–430.
34. *Li S-M., Hennig S., Heide L.* // *Tetrahedron Lett.* – 1998. – **39**. – P. 2721–2724.
35. *Васильева И. С., Пасешниченко В. А.* // *Успехи биол. химии.* – 2000. – **40**. – С. 153–204.
36. *Heide L., Tabata M.* // *Phytochem.* – 1987. – **26**, N 6. – P. 1651–1655 б.
37. *Gaisser S., Heide L.* // *Ibid.* – 1996. – **41**, N 4. – P. 1065–1072.
38. *Muhlenweg A., Melzer M., Li S.M., Heide L.* // *Planta.* – 1998. – **205**. – P. 407–413.
39. *Yamaga Y., Nakanishi K., Fukui H., Tabata M.* // *Phytochem.* – 1993. – **32**. – P. 633–636.
40. *Yazaki K., Fukui H., Tabata M.* // *Ibid.* – 1986. – **25**, N 7. – P. 1629–1632.
41. *Bechthold A., Berger U., Heide L.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – **288**. – P. 39–47.
42. *Li S-M., Wang Z-X., Heide L.* // *Phytochem.* – 1997. – **46**, N 1. – P. 27–32.
43. *Yamamoto H., Inoue K., Li S-M., Heide L.* // *Planta.* – 2000. – **210**. – P. 312–317.
44. *Okamoto T., Yazaki K., Tabata M.* // *Phytochem.* – 1995. – **38**. – P. 83–88.
45. *Пороннік О. О.* Одержання і характеристика нового високопродуктивного штаму культивованих клітин арнебії барвної *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. Автореф. дис. ... к.б.н. – Ін-т молекулярної біології і генетики. – К., 2001. – 25 с.
46. *Zhu R., Cao R., Wang M., Pan D. et al.* // *Acta bot. Sin.* – 1990. – **32**, N 10. – P. 315–320.
47. *Ai K., Li F., Li Y. et al.* // *Ibid.* – 1989. – **31**, N 7. – P. 549–553.
48. *Zhou L., Zheng G., Wang S.* // *Acta bot. Yunnanica.* – 1991. – **13**, N 3. – P. 749–753.
49. *Давыденков В. Н., Патудин А. В., Попов Ю. Г. и др.* // *Хим.-фарм. журн.* – 1991. – № 1. – С. 53–55.
50. *Хиггинс И., Беста Д., Джанса Дж.* Биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
51. *Dong J., Ye H., Wu X et al.* // *Acta Bot. Sin.* – 1993. – N 35. – P. 57–61.
52. *Кунах В. А., Пороннік О. О.* // Деклараційний патент на винахід № 42151 від 15.10.2001. Бюл. № 9.
53. *Пороннік О. О., Мірюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А.* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2000. – **32**, № 5. – С. 377–385.
54. *Барабой В. А.* Растительные фенолы и здоровье человека. – М.: Наука, 1984. – 160 с.
55. *Fontanel A., Tabata M.* // *Nestle Research News.* – 1987. – P. 93–103.

Получено 16.03.2005