

УДК 543.545.4:582.282.23:621.039.85

ТОПОГРАФИЯ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА АЦИЛГЛИЦЕРИНОВ В МЕМБРАНАХ ДРОЖЖЕЙ

Г. А. ЗИНЧЕНКО, А. П. БЕЛОВ

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Все белки, входящие в состав мембран липидных гранул дрожжей, идируются с помощью лактопероксидазы, что свидетельствует о локализации их на цитоплазматической стороне мембраны. Состав промежуточных продуктов при синтезе ацилглицериннов *in vitro* в липидных гранулах и микросомах различен, что обусловлено особенностями биосинтеза липидов в этих структурах. Разработана схема топографии ферментов биосинтеза ацилглицериннов в субклеточных структурах, учитывающая регуляторные процессы.

Известно, что в клетках дрожжей существует метаболическая компартиментализация биосинтеза триацилглицериннов (ТАГ) и фосфолипидов (ФЛ), основанная на различном средстве ацилтрансфераз к жирным кислотам разной степени ненасыщенности [2, 3]. Кроме того, установлено наличие пространственной компартиментализации: в липидных гранулах находятся ацилтрансферазы биосинтеза ТАГ, а в эндоплазматической сети — ацилтрансферазы биосинтеза и ТАГ и ФЛ [2].

Однако о мембранной топографии ферментов метаболизма ацилглицериннов известно немного. Показано, что они локализованы на цитоплазматической стороне мембран эндоплазматического ретикулума [10]. Предполагается [6], что ферменты биосинтеза ацилглицериннов, как и многие другие ферментные комплексы, объединенные единой метаболической функцией, могут быть организованы по принципу метаболона. Вероятно, компартиментализация метаболизма ацилглицериннов связана с топографией ферментов их биосинтеза. В связи с этим целью настоящей работы было изучение структурной организации ферментов биосинтеза ТАГ и ФЛ.

МЕТОДИКА

Работу проводили на дрожжах *Candida maltosa*, *C. utilis* (мезофильные штаммы) и *Leucosporidium gelidum* (психрофильный штамм), полу-

ченных из коллекции ВНИИсинтезбелок. Дрожжи выращивали в периодической культуре; затем из клеток или протопластов путем дифференциального центрифугирования выделяли фракции микросом и липидных гранул [2, 3]. В опытах использовали немеченые и тотально меченые клетки дрожжей. Последние выращивали на среде, содержащей ^{14}C -этанол с удельной активностью 3 МБк·г $^{-1}$.

Иодирование и электрофорез белков липидных гранул проводили согласно методикам [8] и [5] соответственно.

Обмен жирными кислотами между ацил-КоА и фосфолипидами микросом определяли в инкубационной среде (объем 1 мл) следующего состава: ^{14}C -микросомы — 2—3 мг (по белку); олеил-КоА — 0,6 мкмоль, обезжиренный альбумин — 10 мг в 50 мМ фосфатном буфере с рН 7,2. Реакцию останавливали через определенные промежутки времени добавлением 7,5 мл смеси хлороформ — метанол (1 : 2) и немедленно подкисляли среду 1 мл 2% уксусной кислоты для предотвращения гидролиза ацил-КоА. Водорастворимые продукты фракционировали с помощью тонкослойной хроматографии в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (170 : 30 : 20 : 7).

Активность лизофосфатидилхолина-ацилтрансферазы измеряли в реакционной смеси (объем 1 мл), содержащей лизофосфатидилхолин из яичного

лецитина в конечной концентрации 0,4 мМ, ^{14}C -олеил-КоА — 0,5 мМ (удельная радиоактивность 2,4 МБк·мкмоль $^{-1}$), микросомы — 200 мкг·мл $^{-1}$ (по белку). Реакцию останавливали описанным выше способом, экстрагировали липиды и определяли их фракционный состав. Линейность реакции сохранялась в течение первых 15 мин инкубации.

Для получения микросом и липидных гранул, меченных *in vitro* по холину, немеченные фракции (30–40 мг по белку) инкубировали 15 мин в 50 мМ трис-НСl-буфере с рН 7,8 в присутствии MgCl $_2$ (30 мМ) и цитидиндифосфо (метил- ^{14}C) холина (с удельной радиоактивностью 1,8 МБк·мкмоль $^{-1}$), затем отмывали от непрореагировавшей метки центрифугированием и использовали в реакциях обмена.

С целью проведения обменной реакции между фосфатидилхолином и ДАГ использовали меченные ^{14}C *in vivo* и *in vitro* микросомы и липидные гранулы дрожжей *S. utilis*. Субклеточные фракции инкубировали в среде, содержащей в 1 мл цитидиндифосфохолин в конечной concentra-

Т а б л и ц а 1

Белки мембраны липидных гранул дрожжей *Candida maltosa*

Электрофоретическая подвижность	Содержание белка, %	Доля активности ^{125}I , %
0,96 ± 0,03	4,4	5,1 ± 0,3
0,94 ± 0,03	8,1	14,2 ± 0,4
0,84 ± 0,02	0,3	2,9 ± 0,1
0,79 ± 0,04	0,4	10,2 ± 0,3
0,69 ± 0,03	15,3	15,7 ± 0,5
0,64 ± 0,02	—	4,1 ± 0,3
0,59 ± 0,02	39,0	13,2 ± 0,5
0,55 ± 0,02	—	10,0 ± 0,2
0,51 ± 0,02	32,6	7,5 ± 0,4
0,46 ± 0,02	—	13,0 ± 0,2
0,40 ± 0,03	—	3,7 ± 0,2

ции 0,5 мМ, цитидинмонофосфат — 0,5 мМ, 50 мМ трис-НСl-буфера с рН 7,8, MgCl $_2$ — 30 мМ, ЭДТА — 0,25 мМ, ЭДТА — 0,5 мМ, дитиоэритрит — 1 мМ, микросомы или липидные гранулы — 0,5 мг·мл $^{-1}$ (по белку). Реакцию останавливали добавлением 3,75 мл смеси хлороформ — метанол (1:2), после чего определяли фракционный состав липидов [2] или радиоактивность водно-метанольной фазы.

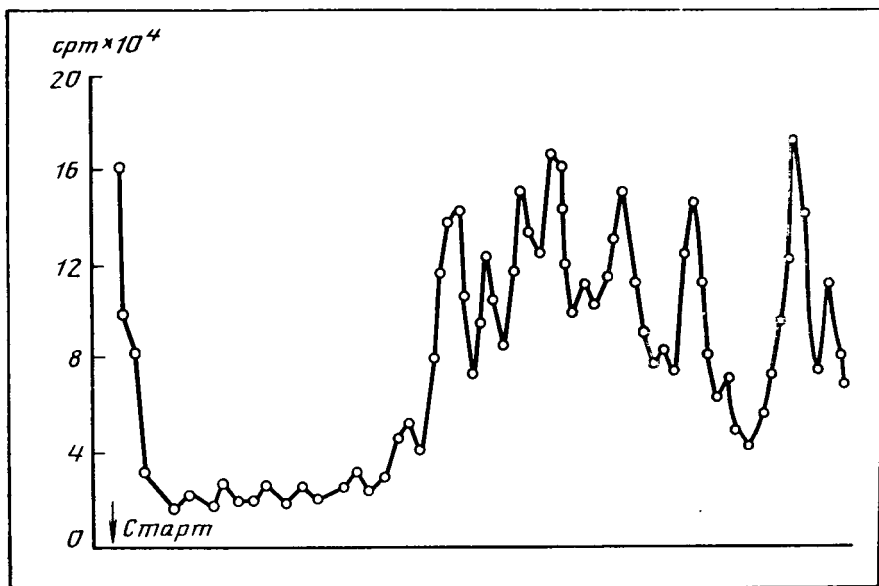


Рис. 1. Электрофореграмма белков липидных гранул дрожжей.

Молекулярные виды фосфолипидов и ДАГ определяли методом препаративной тонкослойной хроматографии [2]. Для этого фракцию фосфолипидов обрабатывали фосфолипазой; затем ДАГ, полученные из фосфолипидов и выделенные из микросом, трансформировали в диацилглицеридацетаты с помощью уксусного ангидрида в пиридине [7]. Разделение диацилглицеридацетатов на молекулярные виды проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Мерк, импрегнированных 12,5% AgNO_3 в системе толуол — ацетонитрил (98 : 2).

Радиоактивность в образцах измеряли в толуольном или диоксановом сцинтилляторах на бета-спектрометре ЛКБ Валлак-1219 (Швеция—Финляндия) с использованием кривых гашения для ^{14}C .

Белок определяли по методу Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ацилтрансферазы в дрожевой клетке локализованы в нескольких компартментах, основными из которых являются микросомы и липидные гранулы [2, 3, 10]. Последние представляют собой высокоспециализированную структуру, содержащую весь комплекс ферментов биосинтеза ацилглицеринов [1, 9]. Для изучения топографии ферментов в мембранах липидных гранул использовали иоди-

Таблица 2

Липиды, синтезированные *in vitro* в субцелочных фракциях дрожжей *Candida maltosa*

Фракция липидов	Содержание липидов, %	
	Микросомы	Липидные гранулы
Моноглицериды	Следы	Следы
Диглицериды	$19,5 \pm 2,2$	$5,04 \pm 1,50$
Триглицериды	$6,7 \pm 1,4$	$36,2 \pm 3,5$
Лизофосфатидная кислота	$26,9 \pm 2,1$	$2,85 \pm 0,73$
Фосфатидная кислота	$20,1 \pm 1,4$	$52,8 \pm 3,4$
Прочие фосфолипиды	$26,8 \pm 4,9$	$3,23 \pm 1,20$
Суммарная скорость включения ^{14}C -олеата (в ноль · мин $^{-1}$ × хмг^{-1} белка)	$39,6 \pm 5,9$	$82,4 \pm 11,1$

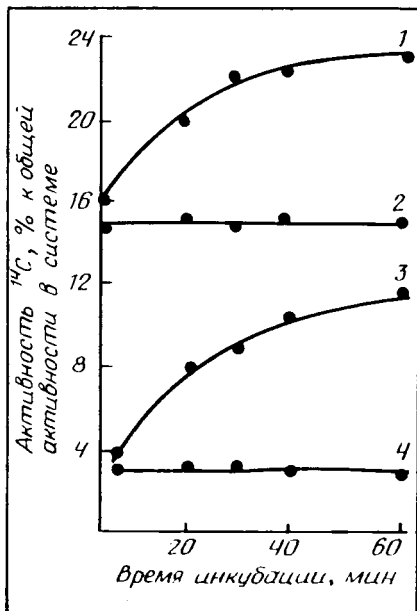


Рис. 2. Динамика ацильного обмена в системе, содержащей ^{14}C -микросомы психрофильных (1, 3) и мезофильных (2, 4) дрожжей;

1, 2 — водорастворимые продукты; 3, 4 — ацил-КоА.

рование с помощью лактопероксидазы, позволяющее избирательно помечать только те белки, которые экспонированы в цитоплазму [8]. С помощью этого метода установлено, что все мембранные белки липидных гранул иодируются, т. е. ферменты локализованы на внешней стороне мембраны липидных гранул (табл. 1, рис. 1). Проведенная отмывка слабосвязанных белков привела к удалению из мембран четырех белковых фракций. Необходимо отметить, что удельная радиоактивность белков не совпадает с их относительным содержанием, что может быть обусловлено как количеством доступного тирозина в белках, так и положением их в мембране. Таким образом, мембранные белки липидных гранул, представляющие ферменты биосинтеза ацилглицеринов, локализованы на цитозольной стороне мембраны подобно ацилтрансферазам эндоплазматического ретикулума [10].

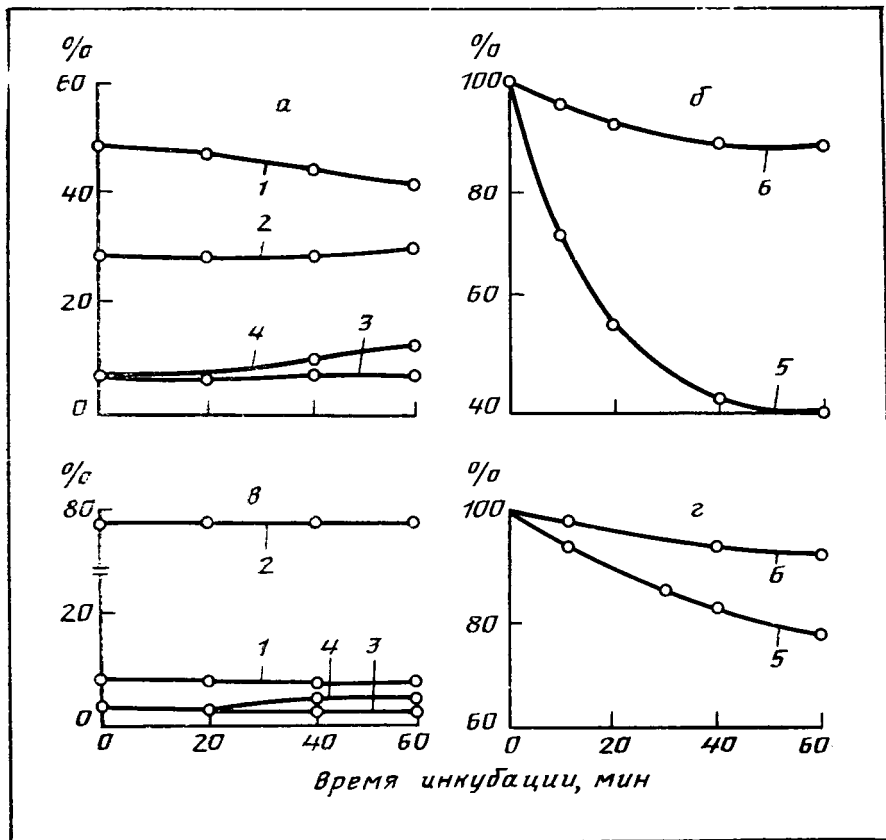


Рис. 3. Динамика изменений липидного состава микросом (а, б) и липидных гранул (в, г) дрожжей *Candida utilis*, меченных *in vivo* (а, в) и *in vitro* (б, г), при инкубации в присутствии ЦМФ и ЦДФ-холлина.

1 — фосфолипиды; 2 — ТАГ; 3 — ДАГ; 4 — жирные кислоты; 5 — фосфатидил-¹⁴С-холлин; 6 — фосфатидил-¹⁴С-холлин (без кофакторов).

При синтезе ацилглицеринов *in vitro* происходят частичная регуляторная дезорганизация биосинтеза и накопление заметных количеств промежуточных продуктов, которые растворяются в мембранных липидах [3, 9, 10]; их состав может отражать внутримембранную организацию ацилтрансфераз. Основным промежуточным продуктом в липидных гранулах является фосфатидная кислота (ФК), тогда как в микросомах аккумулируются как лизофосфатидная кислота (ЛФК), так и фосфатидная кислота (табл. 2). Накопление ЛФК

в микросомах при синтезе *in vitro* обнаружено и у дрожжей *S. cerevisiae* [9]. Подобные различия могут быть обусловлены неодинаковой организацией надмолекулярных ферментных комплексов (метаболонов) в мембранах клетки [6]. В пользу подобной гипотезы свидетельствуют и данные об ограниченном включении экзогенных промежуточных продуктов в микрокомпартменты метаболона [9, 10].

Организация метаболонов, вероятно, связана с особенностями липидного метаболизма. Нами было обна-

Таблица 3

Состав молекулярных видов ДАГ и фосфолипидов в микросомах дрожжей
Leucosporidium gelidum

Источник ДАГ	Время инкубации, мин	Количество двойных связей n_e					
		0	1	2	3	4	5
Фосфолипиды	0	0,34 ± 0,11	1,6 ± 0,9	12,0 ± 1,2	20,3 ± 1,4	34,8 ± 2,2	30,7 ± 1,9
	40	3,2 ± 0,5	20,6 ± 1,7	33,2 ± 3,1	23,4 ± 1,6	14,9 ± 1,1	4,5 ± 0,5
Диацил-глицерин	0	0,5 ± 1,4	19,2 ± 1,4	35,1 ± 3,9	25,6 ± 1,9	14,4 ± 1,4	4,9 ± 0,4
	40	1,6 ± 0,9	14,7 ± 1,2	33,4 ± 3,1	27,9 ± 1,8	16,8 ± 1,5	5,6 ± 0,5

Приведены средние данные по двум независимым опытам.

ружено, что в дрожжах реализуется два пути обмена жирными кислотами между ФЛ и ТАГ.

В микросомах психрофильных дрожжей осуществляется обмен между фосфолипидами (фосфатидилхолином) и пулом ацил-КоА. На рис. 2 представлена динамика изменения активности ^{14}C в водно-метанольной фазе и ее главным меченом компонентом — ацил-КоА при инкубации тотально ^{14}C меченных микросом в присутствии немеченого олеил-КоА. Ацильный обмен катализируется ацил-КоА: лизофосфатидилхолинацил-трансферазой [12]. В микросомах психрофильных дрожжей активность этого фермента составляет 29 ± 3 нмоль \cdot мин $^{-1}$ \cdot мг белка $^{-1}$; в мезофильных дрожжах она значительно ниже — $2,4 \pm 0,4$ нмоль \cdot мин $^{-1}$ \cdot мг белка $^{-1}$ и ацильный обмен в условиях эксперимента отсутствует. Возможно, высокая активность фермента у *L. gelidum* связана с более интенсивным синтезом полиненасыщенных жирных кислот в микросомах психрофильных дрожжей, где субстратом действия десатураз являются фосфолипиды [4]. Посредством ацильного обмена эти кислоты обогащают цитоплазматический пул ацил-КоА и используются в дальнейшем для синтеза ТАГ, что подтверждается и высоким сродством диацилглицероацил-трансферазы к полиненасыщенным жирным кислотам [3]. В липидных гранулах мезофильных и психрофильных дрожжей активность ацил-КоА-лизофосфатидилхолинацил-трансферазы не была обнаружена.

Таким образом, ацильный обмен

происходит в микросомах дрожжей и может быть связан с накоплением в них лизопронизводных фосфолипидов.

Другой путь переноса жирных кислот — обмен между фосфатидилхолином и диацилглицеринами (ДАГ), предположительно катализируемый холинфосфотрансферазой.

Существование этих реакций в дрожжах доказывали несколькими способами. Инкубация меченных ^{14}C *in vivo* микросом и липидных гранул в присутствии кофакторов (ЦДФ-холина и ЦМФ), стимулирующих обратную реакцию, не приводила к заметным изменениям в составе липидов (рис. 3, а, в). Однако, когда в аналогичных условиях инкубировали субклеточные фракции, меченные по холину *in situ*, наблюдали быстрый обмен холина (рис. 3, б, г). В отсутствие кофакторов скорость этих реакций резко снижалась. Интенсивность обмена в микросомах несколько выше, чем в липидных гранулах. Наличие обмена между фосфатидилхолином и ДАГ подтверждают и результаты определения состава молекулярных видов ДАГ при инкубации ^{14}C -микросом в условиях, описанных выше (табл. 3).

ДАГ — более насыщенные соединения, чем фосфолипиды, но в результате реакций обмена содержание полиеновых жирных кислот ($\text{C}_{18:2}$, $\text{C}_{18:3}$) в фонде ДАГ возрастает и доля молекулярных видов ДАГ с $n_e > 2$ увеличивается. Следовательно, обмен между фосфатидилхолином и ДАГ осуществляется как в микросомах, так и в липидных гранулах дрожжей

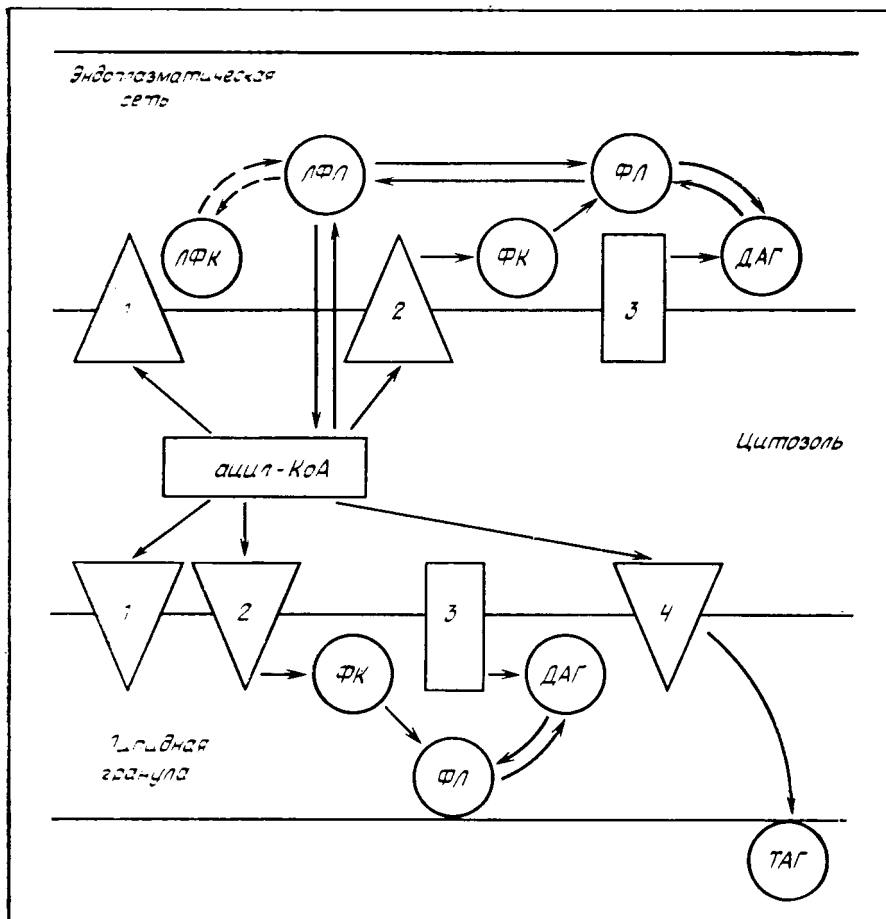


Рис. 4. Схема структурной топографии ферментов биосинтеза ацилглицеринов.

1 — глицерофосфатацилтрансфераза; 2 — моноацилглицерофосфатацилтрансфераза; 3 — фосфатидат фосфогидролаза; 4 — диацилглицероацилтрансфераза; ЛФК — лизофосфатидная кислота; ЛФЛ — лизофосфолипиды; ФК — фосфатидная кислота; ФЛ — фосфолипиды; ДАГ — диацилглицерины; ТАГ — триацилглицерины.

и, вероятно, является причиной накопления фосфатидной кислоты в этих органеллах дрожевой клетки.

Проведенные исследования показывают, что метаболические пути биосинтеза ФЛ и ТАГ и его регуляция в субклеточных компартаментах дрожжей существенно различаются, что может быть связано с топографией ферментов синтеза ацилглицеринов. Вполне достоверно, что ферменты

биосинтеза ФЛ и ТАГ представляют собой метаболон, структура которых существенно различается. Суммированные экспериментальные и литературные данные леги в основу схемы организации ферментов, изображенной на рис. 4, из которой следует, что возможны реакции обмена между лизофосфолипидами и микрокомпаратментом лизофосфатидной кис-

лоты. Подобные реакции обнаружены у *Tetrahymena pereziformis* [11].

Гипотеза организации ферментов биосинтеза ацилглицеринов в мембранах дрожжей по принципу метаболонов требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А. П., Давидова Е. Г. Липидные гранулы — один из компартментов синтеза липидов в дрожжевой клетке. — *Микробиол.*, 1982, т. 51, вып. 2, с. 302—307. — 2. Белов А. П., Балашова Л. Д., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. О биосинтезе ненасыщенных ацилглицеринов у дрожжей *Leucosporidium gelidum*. — *Микробиол.*, 1987, т. 56, вып. 6, с. 933—937. — 3. Белов А. П., Балашова Л. Д., Давидова Е. Г. Изучение стереоспецифичности синтеза триглицеридов и фосфолипидов в микросомах психрофильных дрожжей. — *Биохимия*, 1987, т. 52, вып. 5, с. 806—812. — 4. Белов А. П., Балашова Л. Д., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Изучение десатурации олеиновой кислоты у психрофильных и ме-

зофильных дрожжей. — *Биохимия*, 1987, т. 52, вып. 6, с. 949—955. — 5. Давидова Е. Г., Белов А. П., Рачинский В. В. Электрофоретическая характеристика белка липидных гранул дрожжей. — *Микробиол.*, 1979, т. 48, вып. 5, с. 803—807. — 6. Карасев В. А., Стефанов В. Е., Курганов Б. И. Надмолекулярные биоструктуры. — *Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия*, 1989, т. 31, с. 169—194. — 7. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 8. Хаббард А., Кон З. Специфические метки для клеточных поверхностей. — В кн.: *Биохимическое исследование мембран*. — М.: Мир, 1979, с. 376—447. — 9. Christiansen K. — *Bioch. Bioph. Acta*, 1978, vol. 530, N 1, p. 78—90. — 10. Coleman R. A., Bell R. M. — *Enzymes*, 1983, vol. 16, p. 605—626. — 11. Окуяма Н., Камеяма Я., Ямада К., Нозава Ю. — *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 254, N 10, p. 3588—3594. — 12. Slack C. R., Roughan P. G., Browse J. A. — *Bioch. Bioph. Acta*, 1985, vol: 833, N 3, p. 438—448.

Статья поступила 13 июля 1989 г.

SUMMARY

It has been found that all proteins which are part of the membrane of lipid yeast granules are iodized by lactoperoxidase, which shows that they are localized on cytoplasmic side of the membrane. With synthesis of acilglycerin in vitro the composition of intermediate products in lipid granules and microsomes is different due to specificities of lipid biosynthesis in these structures. The pattern of topographic arrangement of acilglycerine biosynthesis enzymes in subcell structures taking account of regular processes has been developed.