

УДК 547.599.3

БИОСИНТЕЗ ТЕРПЕНОИДОВ *

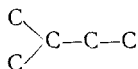
Дж. Корнфорт

Рассмотрены и систематизированы данные биосинтеза терпеноидов, одного из основных классов природных соединений. Наиболее подробно обсуждены биосинтетические пути построения ключевого тритерпена сквалена и его циклизация в ланостерин. Библиография — 48 наименований.

1. Введение

Терпеноиды являются одним из основных классов природных соединений. Они происходят от терпенов группы углеводов $C_{10}H_{16}$, выделяемых из терпентина и других природных масел. В настоящее время к ним относят не только моно-, сескви- ди-, сес- и тритерпеноиды, содержащие, соответственно, 10, 15, 20, 25 и 30 атомов углерода, но и стерины и разнообразные их метаболиты, каротиноиды, природные каучуки и полипренины, а также два витамина и многие гормоны. Кроме того, обнаружено, что в молекулах многих других веществ, наряду со структурами иного биосинтетического происхождения, содержатся терпеноидные элементы. Такие вещества называют меротерпеноидами; представителями этого класса являются хлорифилл, два витамина и многочисленные алкалоиды.

Часто справедливо правило, в прошлом бывшее очень полезным, что углеродный скелет терпеноидов может быть полностью разделен на изопентановые фрагменты:



Такого рода структурные соображения прежде были единственной основой для обсуждения биосинтетических процессов. В данной статье приведены основные биохимические данные, которые могут быть использованы для создания теории биосинтеза терпеноидов.

Что касается других биосинтетических путей, то применение изотопных меток было почти единственным надежным принципом. Исследователи биосинтеза терпеноидов использовали в качестве меток ^2H , ^3H ; ^{13}C , ^{14}C , ^{18}O и ^{32}P по отдельности или иногда в комбинации; в большинстве случаев один конкретный изотоп оказывался специфически подходящим для проводимого эксперимента.

Общий подход обычно состоит во введении изотопной метки (вначале беспорядочно, а затем более специфично) в предшественник или ожидаемый предшественник изучаемого природного соединения; во введении меченого вещества в содержащую энзим систему, в качестве которой может быть как весь живой организм, так и очищенный препарат его тканей; и в выделении меченого продукта после инкубационного периода. Дальнейшее зависит от целей эксперимента: можно определить продукт превращения, содержание в нем изотопной метки, выявить какие атомы молекулы выделенного вещества являются мечеными и в какой

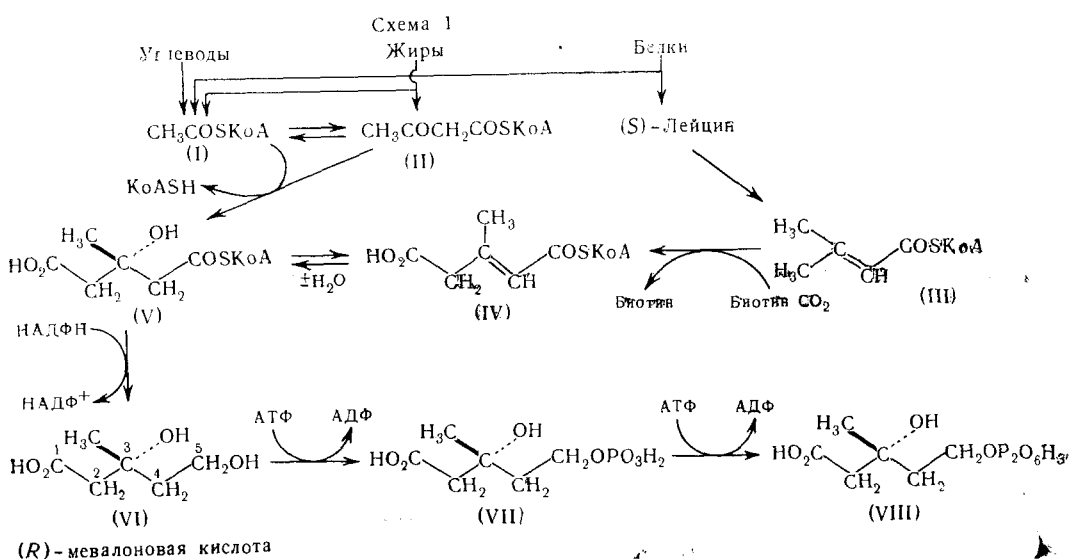
* Chem. in Britain, 4, 102 (1968). Перев. с англ. И. Г. Болесова.

степени или же установить, является ли меченое вещество предшественником в последующей биосинтетической последовательности. При необходимости разделить последовательные стадии процесса используемые биологические системы подвергают очистке. В течение последних 15 лет для изучения стерина использовались подопытные животные — обычно крысы; срезы и гомогенат печени крыс и препараты растворимых и связанных с клеточными структурами (particle-bound) энзимов из печени и дрожжей требовались для получения более подробной информации о процессе.

После того как были выявлены промежуточные стадии в биосинтезе, предпринимались попытки очистить индивидуальные энзимы, осуществляющие их. Недалеко то время, когда из уксусной кислоты и смеси энзимов и кофакторов после инкубации выделяют ланостерин, каждая молекула которого построена из 18 молекул предшественника. В противоположность этому, при изучении биосинтеза терпеноидов в высших растениях до сих пор часто используют весь организм. Выделение из растительной ткани эффективных энзиматических систем до сих пор значительно не совершенствовалось; медленное развитие частично обусловлено сложностью проблемы, частично недостаточными усилиями исследователей. Среди химиков все еще существует тенденция рассматривать растение скорее как скопление природных продуктов чем как недостаточно неисследованный химический механизм.

2. Шестиуглеродные промежуточные соединения

Биохимическая реакция, с которой начинается биосинтез терпеноидов, состоит в энзиматическом восстановлении (*S*)-3-окси-3-метилглютарилкоэнзима А (V) посредством переноса двух атомов водорода от восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотидфосфата (НАДФ). Следует отметить, что это восстановление трудно обратимо и приводит к образованию (*R*)-мевалоновой кислоты (VI). Насколько известно, мевалоновая кислота не образуется другим путем и используется лишь для синтеза терпеноидов. Упомянутый энзим (из растворимого препарата дрожжей), осуществляющий превращение $V \rightarrow VI$, был частично очищен¹⁻³.



Тиолэфир (V), однако, встречается на многих биосинтетических путях. Он может образовываться при энзиматической гидратации глутаконного эфира (IV), который является продуктом карбоксилирования 3-метилкротоноилкоэнзима А (III), получающегося при расщеплении лейцина. Другой, биологически более важный путь к V состоит в конденсации ацетилкоэнзима А (I) с ацетоацетилкоэнзимом А^{1,2,4}, последний может образовываться в результате расщепления жирных кислот или синтеза из двух молекул ацетилкоэнзима А (схема 1). Таким образом, мевалоновая кислота может быть построена из трех молекул уксусной кислоты, поскольку существует энзим, этерифицирующий уксусную кислоту с помощью коэнзима А. Тиолэфир (V), в свою очередь, не является лишь предшественником мевалоновой кислоты — важная для метаболизма печени энзиматическая реакция расщепляет его на ацетилкоэнзим А и ацетоуксусную кислоту.

Таким образом, между общим метаболизмом и мевалоновой кислотой, ключевым промежуточным соединением в биосинтезе терпеноидов, имеется связь, которая осуществляется одним и, вероятно, единственным способом. Конечно, ацетилкоэнзим А находится в центре общего метаболизма: он участвует в энергетическом цикле трикарбоновых кислот и может образовываться из углеводов, жиров или белков.

Мевалоновая кислота используется в биосинтетических исследованиях гораздо чаще, чем любой другой предшественник терпеноидов. Химически она устойчива и может быть синтезирована по крайней мере одиннадцатью различными способами, что важно для введения желаемой метки; кроме того неизвестно, чтобы она использовалась иначе, чем для биосинтеза терпеноидов, хотя в некоторых биологических системах (например, *Dioscorea tibers*⁵) она неспособна проникать к реакционному центру. Лишь (R)-форма мевалоновой кислоты превращается в терпеноиды; насколько известно, (S)-форма метаболически инертна⁶. Это важно, поскольку оптическое разделение синтетической кислоты затруднено, и обычно используются рацемические меченые мевалоновые кислоты.

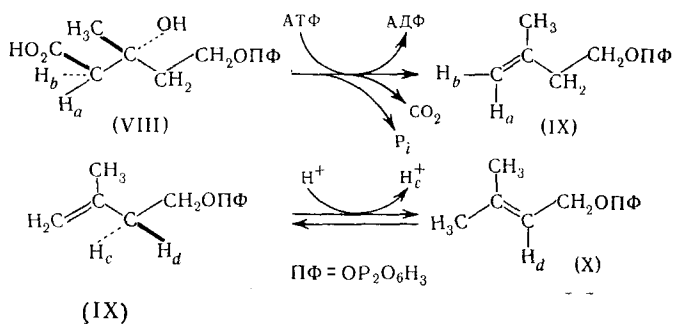
Однако попадание радиоактивности из меченой ¹⁴C мевалоновой кислоты в природное вещество не является доказательством принадлежности этого вещества к терпеноидам или меротерпеноидам. Хотя прямой путь возврата углерода мевалоновой кислоты в круговорот общего метаболизма неизвестен, это несправедливо в отношении некоторых терпеноидов, в которые может быть превращена мевалоновая кислота. Для подтверждения следует использовать другие данные; первый критерий — эффективность включения метки, второй — распределение ее, обнаруживаемое при расщеплении природного вещества, и третий — данные экспериментов, в которых предшественник помечен дважды, например, ³H и ¹⁴C.

Первые два энзиматических процесса, ведущие от мевалоновой кислоты к терпеноидам, включают фосфорилирование. В результате последовательно образуются 5-фосфат мевалоновой кислоты (VII) и ее 5-пирофосфат (VIII). Концевая фосфорильная группа аденозинтрифосфата (АТФ) на каждой стадии является фосфатным донором. Два осуществляющих эти превращения энзима, выделенные из дрожжей^{7,8} и печени^{9,10}, тщательно очищались в особенности энзим, продуцирующий монофосфат. Последний использует лишь (R)-мевалоновую кислоту^{7,11}. Реакции, ведущие к указанным C₆-промежуточным соединениям, приведены на схеме 1.

3. Пятиуглеродные промежуточные соединения

Следующая стадия биосинтеза терпеноидов заключается в расщеплении, а не в синтезе. 5-Пирофосфат мевалоновой кислоты (VIII) реагирует на энзиме с аденозинтрифосфатом (АТФ), образуя аденозиндифосфат (АДФ), двуокись углерода и 3-метил-3-бутенилпирофосфат (IX)⁸. Атом кислорода концевой гидроксильной группы обнаружен после реакции в неорганическом фосфате¹². Этот факт свидетельствует о том, что фосфорилирование этой гидроксильной группы с помощью АТФ происходит до элиминирования, но промежуточный фосфат не был обнаружен. Образование новой двойной связи обязательно происходит в результате согласованного элиминирования, а не дегидратации и последующего декарбоксилирования, поскольку в продукт реакции не включается водород из водной среды. Stereoхимически процесс является *транс*-элиминированием¹³, как показано на схеме 2. Этот тип

Схема 2



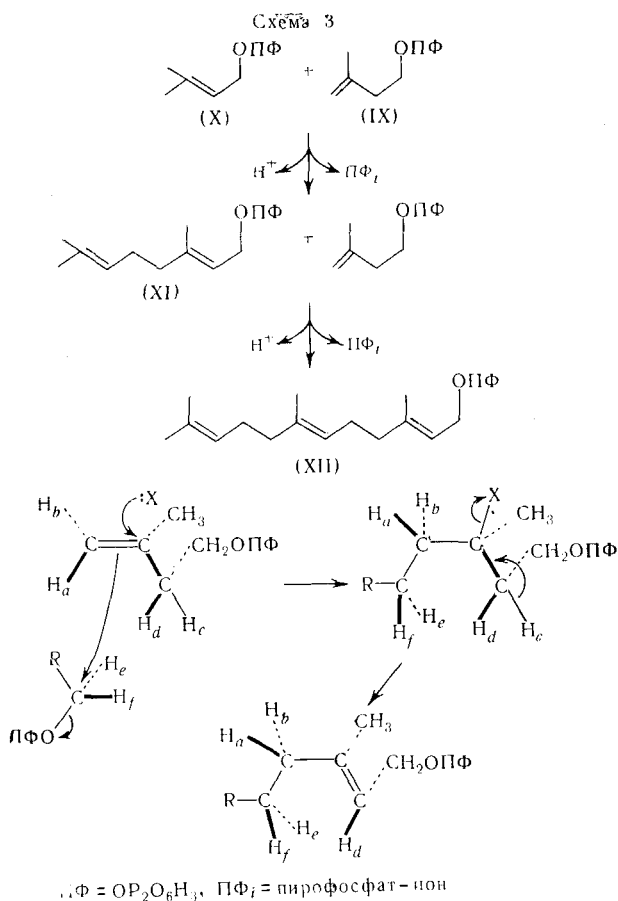
реакции не обнаружен в других областях энзиматической химии, но напоминает некоторые органические реакции, например, элиминирование CO₂ и галогенид-иона из солей 3-галлоидпропионовых кислот.

Далее 3-метил-3-бутенилпирофосфат (IX) в результате прототропного сдвига превращается в 3-метил-2-бутенилпирофосфат (X). Это одна из немногих обратимых реакций в биосинтезе терпеноидов; равновесие, изученное для частично очищенного энзима из дрожжей или печени, значительно смещено в сторону X¹⁴⁻¹⁶.

Элиминирование протона в превращении IX → X — стереоспецифично, при этом удаляется лишь H_c-протон. Значение этого превращения в химическом отношении заключается в том, что вещество с относительно неактивной фосфорильной группой и нуклеофильной двойной связью превращается в очень реакционноспособный электрофильный аллилпирофосфат.

4. Связывание пятиуглеродных звеньев

Два промежуточных соединения (IX) и (X) — совместные субстраты для энзима («пренилтрансфераза»), катализирующего следующие стадии. Хотя этот процесс, строго говоря, не является полимеризацией, он напоминает ее в некоторых отношениях: 3-метил-2-бутенилпирофосфат можно рассматривать как инициатор, а 3-метил-3-бутенилпирофосфат — как переносчик. Эти две молекулы объединяются, теряя пирофосфат-ион из одной и ион водорода — из другой с образованием геранилпирофосфата (XI). Последнее соединение далее реагирует с IX таким же способом, как и X с IX; в итоге образуется фарнезилпирофосфат (XII)¹⁷ (схема 3).



Трансфераза, выделенная из печени, частично очищалась¹⁷⁻¹⁹, и при этом не было получено данных о том, что различные ферменты катализируют две последовательные стадии образования **XI** и **XII**. Однако этот препарат фермента не способен использовать **XII** в качестве субстрата для последующего присоединения звеньев C_5 . По-видимому, структура фермента позволяет расположить на нем как **X**, так и **XI**, но не имеет достаточного пространства для ориентации большего по размерам **XII**, необходимого для реакции с соединением **IX**. Пока это единственная «пренил-трансфераза», активность которой изучена для выделенного состояния; однако должны существовать другие ферменты, не останавливающиеся на стадии C_{15} . Например, трансфераза, продуцирующая промежуточные соединения для синтеза каротиноидов и дитерпеноидов, должна останавливаться на стадии C_{20} (геранилгеранилпирофосфат), как в случае трансферазы, выделенной из бактерий и синтезирующей каротиноиды²⁰, а трансферазы синтеза каучука и гуттаперчи должны быть способными присоединять новые звенья бесконечно; почти невозможно себе представить, что каждую из нескольких сотен тысяч стадий должен осуществлять индивидуальный фермент.

Такое объединение звеньев C_5 является необычной реакцией даже для фермента. Установлено, что в природе большинство углерод-углеродных связей образуется в результате конденсаций типа альдольной или Кляйзена; в данном случае речь идет об алкилировании олефинов. Этот

Схема 5

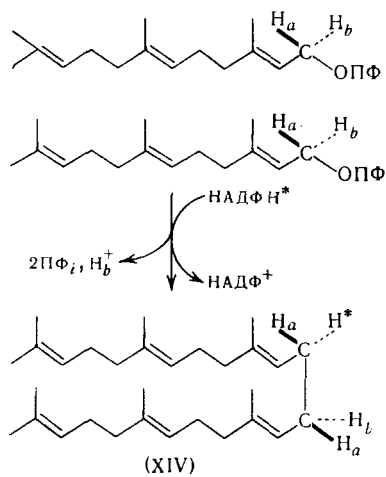
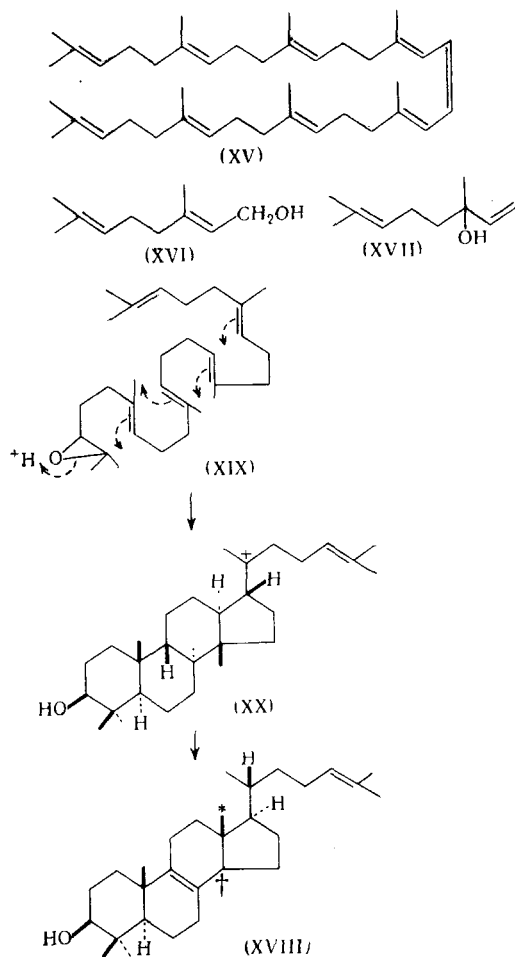


Схема 6



Последний перенос, по-видимому, происходит на заключительной стадии процесса, так как при выведении НАДФ из инкубации накапливается устойчивое промежуточное соединение²⁵. Стереохимия такого сочетания выяснена с помощью асимметрических водородных меток²¹. Система «скаваленсинтетазы» еще не получена в растворимой форме, не связанной с клеточными частицами, и поэтому неясно, содержит ли эта система один или больше энзимов.

В биосинтезе каротиноидов (схема 6) происходит аналогичная конденсация типа «голова к голове» двух звеньев C_{20} , по-видимому, геранилгеранилпирофосфата, однако продуктом является фитоен (XV), окисленный в большей степени, чем скавален. Можно предположить, что на последней стадии вместо восстановления происходит элиминирование, приводящее к дополнительной двойной связи. Превращения фитоена в общие каротиноиды, включающие дегидрирования и циклизации, изучались подробно²⁶. Недавно опубликовано изучение этого биосинтетического пути с помощью асимметрической водородной метки²⁷.

Легко понять, как фосфорилированные промежуточные соединения могут генерировать другие нециклические терпеноиды. Например, геранилпирофосфат может быть энзиматически гидролизован в обычный для природных масел компонент гераниол (XVI), а другой тип гидролиза мог бы привести к линололу (XVII), главному продукту неэнзиматического гидролиза пирофосфата при кислых pH. Линалоол может возникать в различных природных маслах в виде практически чистых (R)- или (S)-форм, или в виде смесей обоих энантиомеров. Возможно, что существуют два энзима, продуцирующие, соответственно (R)- и (S)-линалол, и оба иногда присутствуют в одном и том же расстоянии.

6. Циклические терпеноиды

Большинство реакций, ведущих от ациклических к циклическим терпеноидам, могут быть представлены как алкилирование олефинов; в химических обобщениях их стремятся рассматривать как реакции карбониевых ионов, так же как и обсуждавшуюся выше ассоциацию звеньев C_5 . Лучше всего понята циклизация скавалена в ланостерин (XVIII)²⁸. Этот процесс может быть представлен очень упрощенно следующим образом: $C_{30}H_{50} + 1/2 O_2 \rightarrow C_{30}H_{49}OH$. В сущности, молекулярный кислород необходим для такого превращения (хороший способ прекращения биосинтеза стероидов на стадии скавалена заключается в проведении инкубации в атмосфере азота), и атом кислорода из него вводится в молекулу ланостерина; кроме того, в стерине не обнаруживается прочно связанного водорода из среды²⁹.

Некоторое время полагали, что циклизующая энзиматическая система (неочищенная), выделенная из печени и дрожжей, может в одну стадию превращать скавален в ланостерин; однако недавно было показано, что в первую очередь образуется моноэпоксид (XIX)^{30, 31}. В связи с этим циклизация эпоксида скавалена может быть представлена как присоединение вначале одного иона водорода и выброс другого на заключительной стадии. Стереохимия циклизации приписывается специфическому типу наложения энзима на длинную углеводородную цепь, а стереохимия конечного продукта обусловлена также рядом согласованных и стереоспецифических перегруппировок, сопровождающих циклизацию. Несколько упрощенная форма обычно принимаемого механизма³² постулирует последовательность циклизаций, ведущую к промежуточному катиону (XX), который далее претерпевает последовательные 1,2-сдвиги, оканчивающиеся отрывом водорода (схема 6). В подтвержде-

дение этого механизма было показано, что: 1) метильные группы, отмеченные значками * и † в соединении (XVIII), попали в указанные положения в результате перегруппировок^{33, 34}, и по крайней мере первая из них,— в результате внутримолекулярного сдвига; 2) перегруппировка и элиминирование атома водорода происходит в соответствии с постулированной схемой³⁵. Однако циклизующий фермент до сих пор известен лишь в неочищенной форме и неясно, один ли фермент катализирует весь процесс.

Расщепление ланостерина, ведущее к холестерину, не рассматривается в настоящей статье, поскольку по этому вопросу опубликованы хорошие обзоры^{36, 37}.

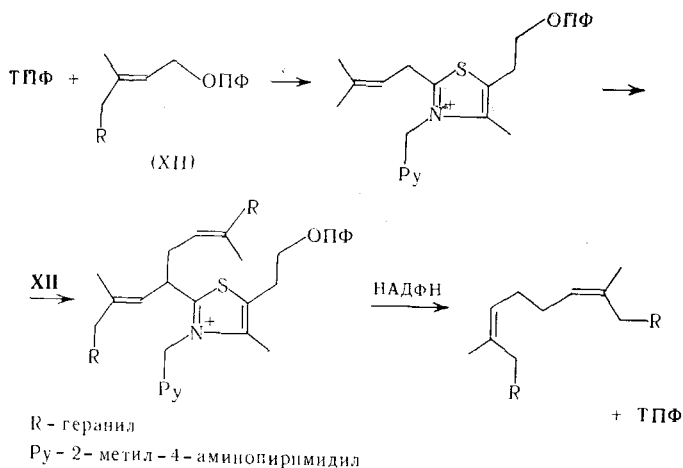
Постулирована аналогичная последовательность циклизаций и перегруппировок, связывающая сквален со всеми известными типами тритерпеноидов³². Другие схемы³⁸ описывали возможный генезис моно-, сескви- и дитерпеноидов из соответствующих аллилпирофосфатов. Эти схемы химически обоснованы, и в тех случаях, когда они были проверены (как правило расщеплением тритерпеноидов, полученных биосинтезом из специфически меченой ¹⁴C-мевалоновой кислоты), результаты удовлетворительно согласуются с теорией. Описаны некоторые более существенные достижения в этой области³⁹. Недавно опубликована работа по терпеноидной части класса меротерпеноидов — индольных алкалоидов⁴⁰.

Как указано ранее, изучение биосинтеза полиизопреноидов открыло область ферментатической химии, не встречавшуюся при исследовании других жизненных процессов. Теперь, когда выяснение структуры «природных продуктов» является значительно более легким, проблемы биосинтеза бросают вызов химикам-органикам, и многие химики отвечают на него. Если представления, основанные на структуре, должны быть заменены более определенными знаниями, необходимо изучение биосинтеза на ферментатическом уровне.

* * *

Недавно опубликованы новые данные* о механизме восстановительной димеризации фарнезилпирофосфата⁴¹ и стереохимии превращения мевалоновой кислоты в холестерин⁴².

Схема 7



* Дополнение переводчика.

Найдено, что димеризация фарнезилпирофосфата (XII) в сквален (XIV), протекающая по типу «голова к голове» (см. стр. 922), катализируется тиамином или тиаминпирофосфатом. Предложенная последовательность реакций с участием тиаминпирофосфата (ТПФ) представлена на схеме 7. Биосинтез фитоена (XV) и некоторых нерегулярных терпенов (например артемизия-кетона) объясняется в связи с указанным выше коэнзиматической активностью тиамин⁴¹.

Инкубацией (3R, 2R)-2Т-2-¹⁴С-мевалоновой кислоты с препаратом печени крысы получен холестерин, содержащий 1β- и 7β-атомы трития⁴². Превращение ланостерина в холестерин протекает с обращением конфигурации у C₇ и поэтому C₇-Т занимает 7α-конфигурацию в промежуточном ланостерине (см. также⁴³).

Кроме того, опубликованы данные^{44, 45} о стереохимии элиминирования водорода у C₁₅ при биосинтезе холестерина.

Установлено, что превращение сквалена в тетрагиманол, протекающее под влиянием простейших одноклеточных *Tetrahymena pyriformis*, сопровождается включением дейтерия из среды^{46, 47}. Эти результаты подтверждают иницируемый протоном механизм циклизации сквалена.

Следует также отметить обсуждение проблемы биосинтеза терпеноидов с точки зрения возможного участия илидов сульфония⁴⁸.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Rudney, G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor, Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, стр. 75, London-Churchill, 1959.
2. F. Lynen, см.¹, стр. 95.
3. M. J. Schlesinger, M. J. Coon, J. Biol. Chem., **236**, 2421 (1961).
4. G. Popják, J. W. Cornforth, Adv. Enzymol., **22**, 281 (1960).
5. E. Heftmann, R. D. Bennett, J. Bonner, Arch. Biochem. Biophys., **92**, 13 (1961).
6. R. H. Cornforth, K. Fletcher, H. Hellig, G. Popjak, Nature, **185**, 923 (1960).
7. T. T. Tchen, J. Biol. Chem., **233**, 1100 (1958).
8. K. Bloch, S. Chaykin, A. H. Phillips, A. de Waard, Там же, **234**, 2595 (1959).
9. H. R. Levy, G. Popják, Biochem. J., **75**, 417 (1960).
10. H. Hellig, G. Popják, J. Lipid Res., **2**, 235 (1961).
11. R. H. Cornforth, J. W. Cornforth, G. Popják, Tetrahedron, **18**, 1351 (1962).
12. M. Lindberg, C. Yuan, A. de Waard, K. Bloch, Biochem., **1**, 182 (1962).
13. J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják, L. S. Yengoyan, J. Biol. Chem., **241**, 3970 (1966).
14. B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, F. Lynen, Там же, **235**, 326 (1960).
15. D. H. Shah, W. W. Cleland, J. W. Porter, Там же, **240**, 1946 (1965).
16. P. Holloway, G. Popják, Biochem. J. (в печати).
17. F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, E. M. Möslin, Angew. Chem., **71**, 657 (1959).
18. C. R. Benedict, J. Kett, J. W. Porter, Arch. Biochem. Biophys., **110**, 611 (1965).
19. P. W. Holloway, G. Popják, Biochem. J., **104**, 57 (1967).
20. A. A. Kandutsch, H. Paulus, E. Levin, K. Bloch, J. Biol. Chem., **239**, 2507 (1964).
21. J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popják, Proc. Roy. Soc. (B), **163**, 492 (1966).
22. B. L. Archer, D. Barnard, E. G. Cockbain, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják, Там же, **163**, 519 (1966).
23. F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, I. Kessel, Angew. Chem., **70**, 738 (1958).
24. G. Popják, De W. S. Goodman, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, R. Ryhage, J. Biol. Chem., **236**, 1934 (1961).
25. H. Rilling, Там же, **241**, 3233 (1966).
26. T. W. Goodwin, Biosynthetic Pathways in Higher Plants, **37**, T. B. Pridham, T. Swain (eds), London, Academic Press, 1965.

27. R. J. H. Williams, G. Britton, J. M. Charlton, T. W. Goodwin, *Biochem. J.*, **104**, 767 (1967).
28. R. B. Clayton, K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, **218**, 305, 319 (1956).
29. T. T. Tchen, K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, **226**, 921, 931 (1957).
30. E. J. Corey, W. E. Russey, P. R. O. de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4750 (1966).
31. E. E. van Tamelen, J. D. Willett, R. B. Clayton, K. E. Lord, Там же, **88**, 4752 (1966).
32. A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1890 (1955).
33. J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning, G. Popják, *Proc. Chem. Soc.*, **1958**, 112; *Tetrahedron*, **5**, 311 (1959).
34. R. K. Maudgal, T. T. Tchen, K. Bloch, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2589 (1958).
35. J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popják, Y. Shimizu, S. Ichii, E. Forchiell, E. Caspi, Там же, **87**, 3224 (1965).
36. R. B. Clayton, *Quart. Rev.*, **19**, 168 (1965).
37. K. Bloch, *Science*, **150**, 19 (1965).
38. L. Ruzicka, *Pure Appl. Chem.*, **6**, 493 (1963).
39. R. B. Clayton, *Quart. Rev.*, **19**, 201 (1965).
40. A. R. Battersby, *Pure Appl. Chem.*, **14**, 117 (1967).
41. G. E. Risinger, H. D. Durst, *Tetrahedron Letters*, **1968**, 3133.
42. E. Caspi, J. B. Greig, P. J. Ramm, K. R. Varma, Там же, **1968**, 3829.
43. G. F. Gibbons, L. J. Goad, T. W. Goodwin, *Chem. Comm.*, **1968**, 1212.
44. G. F. Gibbons, L. J. Goad, T. W. Goodwin, Там же, **1968**, 1458.
45. L. Canonica и др., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3597 (1968).
46. E. Caspi и др., Там же, **90**, 3563 (1968).
47. E. Caspi, J. B. Greig, J. M. Zander, Z. Mandelbaum, *Chem. Comm.*, **1969**, 28.
48. G. M. Blackburn, W. D. Ollis, Там же, **1968**, 1261.

Лаборатория объединенных исследований
химической энзимологии,
Ситтингборн, Англия
