

ФИТОХЕЛАТИНЫ И ИХ РОЛЬ В ДЕТОКСИКАЦИИ КАДМИЯ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

© 2001 г.

И. В. СЕРЕГИН

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

I. Введение II. Структура и синтез фитохелатинов III. Функции фитохелатинов IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В связи с нарастающим антропогенным воздействием возрастает загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Попадая различными путями в атмосферу и почву, эти металлы поступают сначала в растения, а затем – в организм человека и животных. Кадмий является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов, с чем связан все возрастающий интерес к этому элементу. По способности накапливать металлы растения можно разделить на три группы: 1) аккумуляторы, накапливающие металлы главным образом в надземной сфере; 2) индикаторы, у которых содержание металла отражает его концентрацию в окружающей среде и 3) исключители, у которых поддерживается низкая концентрация металлов в побегах, несмотря на их высокую концентрацию в окружающей среде [9]. Большинство из изученных видов растений относится к исключителям, накапливающим тяжелые металлы в подземной сфере [6].

Закономерности распределения металлов по органам могут быть связаны с особенностями их транспорта по тканям. Так, в наших исследованиях на проростках кукурузы было показано, что Cd локализуется главным образом в апопласте ризодермы и коры корня [3]. Структурные особенности клеток эндодермы и центрального цилиндра ограничивают его поступление в стель, а следовательно и в надземные органы растения [4]. Однако некоторое количество металла поступает в цитоплазму клеток и может оказывать множественное токсическое действие на метаболизм. Более подробно эти вопросы рассмотрены в обзоре Серегина и Иванова [6].

Адрес для корреспонденции: e-mail: ivanov@ippras.ru

В ответ на поступление металлов в клетку происходит активация различных систем защиты, направленных на поддержание гомеостаза. К таким системам относятся: 1) активация «ферментов стресса» (каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы); 2) суперпродукция осмолитов в ответ на металл индуцированный водный стресс; 3) изменение физико-химических свойств клеточных оболочек; 4) синтез полиаминов; 5) изменение гормонального баланса; 6) синтез металл-связывающих соединений и стрессовых белков [6]. Все эти защитные механизмы, функционирующие на этапе стресс-реакции, обеспечивают выживание организма и его адаптацию в изменившихся условиях окружающей среды. Многие из этих механизмов (1–5) являются неспецифическими, характерными для действия различных стресс-факторов и являются звеньями единой программы ответа клетки на стресс. Другие (6) являются в той или иной степени специфическими для действия тяжелых металлов. В настоящем обзоре мы подробно остановимся на специфической системе защиты растений, ведущую роль в которой играют металлсвязывающие соединения.

В 1957 году Маргошес и Вэлли впервые выделили необычный Cd-связывающий белок из коркового слоя почки лошади, который был назван металлотионеином из-за высокого содержания металла и серы [55].

Позднее Cd-связывающие белки с высоким содержанием цистеина были обнаружены как у про-, так и у эукариот. С начала 80-х годов стали появляться работы, посвященные высшим растениям, в которых авторы пытались провести аналогию между металлсвязывающими белками растений и металлотионеинами животных. При обработке Cd металлотионеин-подобные белки были выделены из корней и листьев фасоли [99], корней томата [12], корней кукурузы [67], листьев гороха [32], а также корней сои [13]. Более подробный обзор ранних работ дается в работах [2, 69, 89, 90].

Новый этап в изучении этой проблемы начинается со второй половины 80-х гг. Из многих видов растений были выделены небольшие пептиды, способные связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Впервые они обнаружены независимо в двух лабораториях у *Schizosaccharomyces pombe* [44] и в культуре клеток *Rauvolfia serpentina* [28]. Такие пептиды были названы кадистинами А и Б [44] или фитохелатинами [28]. Название «кадистины» является приоритетным, а «фитохелатины» стало более распространенным применительно к пептидам, выделенным из водорослей и высших растений. Во многих случаях ранее выделенные белки оказались фитохелатинами.

Помимо фитохелатинов важную роль в детоксикации некоторых тяжелых металлов (особенно меди) играют металлотионеины, которые

обладают высокой гомологией к металлотионеинам животных. Однако есть и существенные различия в расположении остатков цистеина вследствие чего металл-связывающие белки растений отнесены ко второму классу металлотионеинов [73, 77, 78]. Объем данной работы не позволяет остановиться на металлотионеинах животных и растений. Этим белкам посвящены вышеупомянутые обзоры. Мы же рассмотрим более подробно структуру, биосинтез и возможные функции фитохелатинов – соединений, являющихся одним из звеньев ответа клетки на поступление тяжелых металлов.

II. СТРУКТУРА И СИНТЕЗ ФИТОХЕЛАТИНОВ

В настоящее время первичная структура фитохелатинов определена для целого спектра видов покрытосеменных растений из различных семейств. Они представляют собой небольшие, богатые цистеином пептиды, способные связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Основными чертами первичной структуры фитохелатинов являются:

— остаток глутаминовой кислоты, расположенный на N-конце полипептида;

— связанный пептидной связью с γ -карбоксилем Глу остаток цистеина;

— пары γ -Глу-Цис, повторяющиеся два или большее число раз [71, 102].

Таким образом, основная структура этих пептидов следующая:



где $n = 2\text{—}11$ (обычно не более 6) (табл. 1).

При добавлении солей различных металлов к культуре клеток *Rauvolfia serpentina* в высоких, но не летальных концентрациях было найдено, что синтез фитохелатинов не индуцировался в присутствии Al^{3+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cs^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , MoO_4^{2-} , Na^+ и Va^{2+} . Индукция наблюдалась с Pb^{2+} , Zn^{2+} (1 мМ); Cd^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , SeO_3^{2-} , Bi^{3+} (100 мкМ); Ag^+ , Cu^{2+} , Au^+ (50 мкМ); AsO_4^{3-} (20 мкМ); Sb^{3+} и Te^{4+} (10 мкМ) [30]. Аналогичные результаты были получены с использованием культуры клеток *Rubia tinctorum* [54]. Хотя синтез фитохелатинов может активироваться *in vivo* различными металлами, они могут не играть существенной роли в их детоксикации, что может быть вызвано недостаточной прочностью комплекса фитохелатинов с металлом или другими причинами. Фитохелатины обладают высоким сродством к ионам Cd ($K_3 \approx 10^{19}$) [74], что определяет их важную роль в его детоксикации.

Таблица 1
Структура фитохелатинов у разных видов покрытосеменных растений

Семейство	Вид растения	Анализируемый материал	C (μM)	Время инкубации (дни, часы)	Структура ФХ (п)	Источник	
1	2	3	4	5	6	7	
Ариáceе	<i>Datura innoxia</i>	Культура клеток	250	До 2 ч	2-5	22	
Аросунáceе	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Культура клеток	200	1-9 ч	2-5	30	
Brassicáceе	<i>Armoracia rusticana</i>	Корни	1000	3	3-4	48	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Проростки	30	1	2-4	38	
	<i>Brassica oleracea</i>	Проростки	90	21	2-6	30	
Caryophyllaceae	<i>Silene vulgaris</i> (<i>S.cucubalus</i>)	Культура клеток	20	3	2-4	30	
		Вакуоли клеток мезофилла листа	5-40,	3	2-3	14	
		Корни	0,3-180 4×10^{-5}	3 21	2-4 2-3	21 96	
Cucurbitaceae	<i>Pisum sativum</i>	Корни	20	3	2-3 ³⁾	42	
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	Корни	20	4	2-7 ⁴⁾	29	
Rubiaceae	<i>Rubia tinctorum</i>	Культура клеток	100	3	2-4 2-4 ²⁾	54	
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Культура клеток	100	2 ч	3-5	85	
			100, 300	1-12	2	15	
			600	36 ч	3-4	88	
			10-100	4	2-4	16	
			100	7	2-4	59	
		Корни	3	7	3	53	
		Проростки	90	21	2-6	30	
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Культура клеток	250	3	4-5	37
		<i>Nicotiana rustica</i>	Листья	20	7	3-4	97
	Poaceae	<i>Agrostis tenuis</i>	Культура клеток	20	3	2-4	30
<i>Avena sativa</i>		Корни	10	4	2-3	82	
<i>Secale cereale</i>		Корни	50, 250	3ч-14;	2-3	100	
		Побеги		7, 14	2-3 ¹⁾	-"-	
					2-3 ²⁾	-"-	
<i>Triticum vulgare</i>		Корни	50, 250	3-14	2-3	-"-	
		Побеги		7, 14	2-3 ¹⁾	-"-	
					2-3 ²⁾	-"-	
<i>Zea mays</i>	Корни	50	3ч-14	2-4	-"-		
				2 ³⁾	-"-		
				2-3 ²⁾	-"-		

см. окончание табл. 1

окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
			0,01	1	2	92
			0,05; 0,1	1	2-3	-"
			0,5-10	1	2-4	-"
			3	2ч-2	2-4	-"
			3	1-7	2-4	61
					2-4 ²⁾	
					2-4 ³⁾	
		Проростки	20	3	2-4	30
Pontede- riaceae	<i>Eichornia crassipes</i>	Проростки	20	3	2-4	-"

Примечание: ¹⁾ — оксиметилфитохелатины $[(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{Сер}]$, ²⁾ — фитохелатины, не содержащие С-терминальной аминокислоты $[(\gamma\text{-Глу-Цис})_n]$, ³⁾ — фитохелатины с С-терминальным Глу $[(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{Глу}]$, ⁴⁾ — гомофитохелатины $[(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\beta\text{Ала}]$.

Наличие γ -Глу связи в этих пептидах свидетельствует о том, что они не синтезируются через мРНК. Металлотионеины, выделенные из млекопитающих и растений, в отличие от фитохелатинов, являются первичными генными продуктами [1, 73, 77, 78]. Кроме того, была сделана попытка охарактеризовать металлотионеин-подобные белки гороха и табака с помощью иммунологической реакции. Такой подход показал отсутствие антигенного сродства между металл-связывающими соединениями растений и животных [32, 74]. Эти различия послужили причиной выделения этих пептидов в отдельный, третий, класс металлотионеинов [77].

Известно 5 семейств фитохелатинов, различающихся по аминокислотному остатку на С-конце полипептида [71]. Некоторые из них, вероятно, свойственны отдельным семействам покрытосеменных растений. Так, например, гомофитохелатины (с С-терминальным аланином) в настоящее время обнаружены главным образом у бобовых [29] и тыквенных [42], а оксиметилфитохелатины (с С-терминальным серином) — у злаков [41, 100]. Фитохелатины, не содержащие С-терминальной аминокислоты и имеющие структуру $[\gamma\text{-Глу(Цис)}]_n$ были выделены из корней кукурузы [61, 72, 100], корней и побегов пшеницы и ржи [100], а также из культуры корней *Rubia tinctorum* [54]. Наконец, фитохелатины с С-терминальным Глу обнаружены только в корнях кукурузы [60, 61, 72, 100] и являются, по мнению некоторых авторов, продуктом распада представителей других семейств фитохелатинов [71] (табл. 1). Фитохелатины с С-терминальным Ала, Глу и Сер было предложено также называть изофитохелатинами [83].

В экспериментах с культурой клеток *Rauvolfia serpentina* была замечена зависимость между количеством γ -Глу-Цис остатков и временем экспозиции культуры в присутствии Cd. Непосредственно после прибавления $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (200 мкМ) клетки синтезировали только [Глу-(Цис)]₂-Гли. Фитохелатины с более длинной цепью синтезировались только после значительного лаг-периода [30]. Аналогичные результаты по кинетике аккумуляции фитохелатинов были получены другими авторами на разных объектах [41, 61, 98].

Одновременно с синтезом фитохелатинов наблюдалось уменьшение пула клеточного глутатиона, из чего был сделан вывод об участии глутатиона в синтезе фитохелатинов [30]. Последующие исследования показали, что суммарное содержание цистеина и глутатиона было выше в апикальном участке корней проростков кукурузы. Cd вызывал 27%-ное уменьшение содержания глутатиона в апексе и более чем 50%-ное снижение его количества в вышележащих зонах после первого дня экспозиции [92]. Аналогичное снижение содержания глутатиона под воздействием солей Cd было обнаружено у проростков гороха [42], в корнях *Pistia stratiotes* [66], корнях и листьях кукурузы [68, 70, 100] и *Brassica juncea* [35], а также в клетках суспензионной культуры томата [85].

Синтез глутатиона из глутамата, цистеина и глицина является АТФ-зависимым, двухстадийным процессом. Первая реакция образования γ -Глу-Цис из глутамата и цистеина катализируется γ -глутамилцистеинсинтетазой (ЕС 6.3.2.2) [36], которая кодируется *gsh 1* геном [56]. Реакция, катализируемая этим ферментом рассматривается в качестве лимитирующей стадии синтеза глутатиона [15, 57]. Вторая стадия синтеза глутатиона из γ -Глу-Цис и Гли катализируется глутатионсинтетазой (ЕС 6.3.2.3), которая кодируется геном *gsh2* [101].

Глутатион является сильным восстановителем и легко подвергается окислению, образуя окисленную форму. Глутатионредуктаза (ЕС 1.6.4.2) катализирует обратное превращение окисленной формы в восстановленную. У арабидопсиса выделено два гена, кодирующих этот фермент. Один из них (*gr2*) кодирует пластидную форму фермента, а другой (*gr1*) ответственен за цитозольную изоформу [101].

Снижение содержания глутатиона под действием Cd сопровождалось некоторым увеличением активности как глутамилцистеинсинтетазы, глутатионсинтетазы [17, 79, 80] и глутатионтрансферазы [93], так и АТФ-сульфуриказы [25, 35]. Увеличение активности ферментов синтеза глутатиона коррелирует с усилением экспрессии соответствующих генов (*gsh 1* и *gsh2*), которые регулируются, по некоторым данным, жасмоновой кислотой [84, 101] (рис. 1). Не исключена возможность регуляции экспрессии этих генов через сигнальную

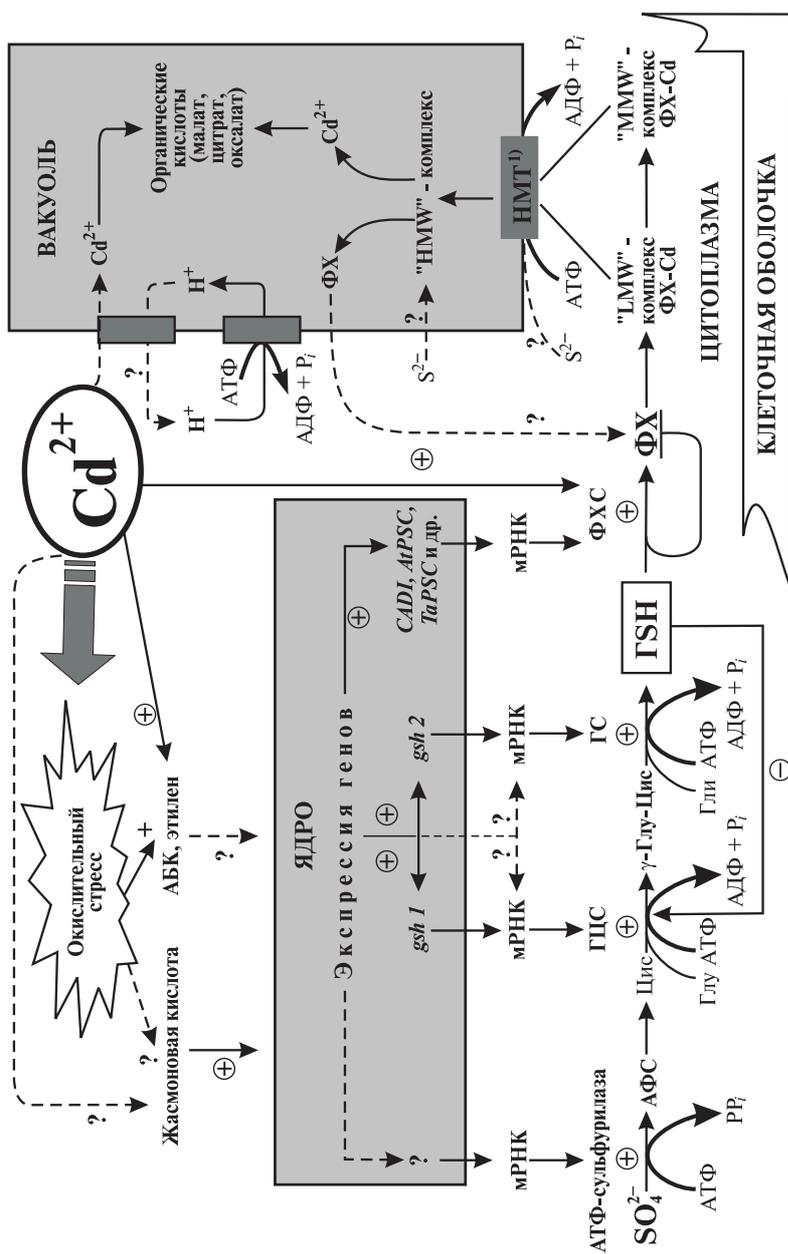


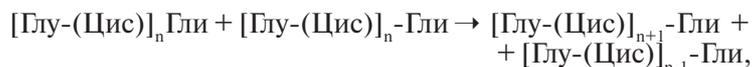
Рис. 1. Синтез фитохелатинов и его регуляция. АБК — абсцизовая кислота; АФС — аленизин-5'-фосфосульфат; ГС — глутатионсинтетаза; ГЦС — γ-глутамилцистеинсинтетаза; ГШ — глутатион; ФХС — фитохелатинсинтаза; ФХ — фитохелатины. 1) — показано для *S. pombe*.

систему с участием этилена или абсцизовой кислоты, содержание которых увеличивается под действием Cd [6]. Представляет интерес проверить это предположение.

Помимо структурного сходства между фитохелатинами и глутатионом, а также появления фитохелатинов с последующим снижением содержания глутатиона, в пользу синтеза фитохелатинов из глутатиона свидетельствует уменьшение их содержания после обработки суспензионной культуры табака [75] и томата [15, 59, 85, 88] ингибитором γ -глутамилцистеинсинтетазы.

Наконец, мутанты арабидопсиса со сниженной активностью γ -глутамилцистеинсинтетазы (CAD 2) не способны синтезировать глутатион и фитохелатины, что, по мнению авторов, и определяет их чувствительность к Cd [19]. С другой стороны, трансгенные растения *Brassica juncea* с повышенной экспрессией гена *gsh 1* и *gsh 2* аккумулировали значительно больше Cd, чем растения дикого типа и обладали повышенной устойчивостью к металлу как на стадии проростка, так и на стадии взрослого растения. Это коррелировало с повышенным содержанием глутатиона, фитохелатинов и серы у таких растений [51, 52]. Это является еще одним подтверждением участия глутатиона в синтезе фитохелатинов.

Из клеточной культуры смолевки [31] и томата [16] был выделен фермент, катализирующий синтез фитохелатинов из глутатиона по следующей реакции:



где $n = 1, 2, 3 \dots$

Этот фермент является γ -глутамилцистеинилдипептидилтранс-пептидазой (фитохелатинсинтазой) (ЕС 2.3.2.15). Фитохелатинсинтаза — олигомерный белковый комплекс, состоящий из четырех субъединиц с молекулярной массой 25000 Да каждая [31]. Активность фермента имела оптимум при $\text{pH} \approx 8,0$, а оптимальная температура для его работы составляла 35°C . Повышение и понижение температуры на 10°C приводило к снижению активности фермента на 50% [16, 31].

По мнению ряда авторов, ионы металла необходимы для проявления энзиматической активности фитохелатинсинтазы. Наивысшая активность фермента наблюдалась с ионом Cd [16, 31, 42]. Для других металлов получены разные ряды активации (табл. 2), что может быть связано, главным образом, с различиями в использованных концентрациях солей металлов. Активация фитохелатинсинтазы, вероятно, может происходить вследствие взаимодействия металла с остатками

Таблица 2
Ряды активации фитохелатинсинтазы солями различных металлов

Вид растения	Ряды активации	Источник
<i>Silene cucubalus</i>	$Cd^{2+} > Ag^+ > Bi^{3+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Hg^{2+} > Au^+$	31
<i>Lycopersicon esculentum</i>	$Cd^{2+} > Ag^+ > Cu^{2+} > Au^+ > Zn^{2+} > Fe^{2+} > Hg^{2+} = Pb^{2+}$	16

цистеина и гистидина N-концевого каталитического консервативного домена. По-видимому, многочисленные остатки цистеина на С-конце молекулы также могут участвовать в активации фермента [33]. Фитохелатинсинтаза, выделенная из культуры клеток томата не активировалась ионами Va^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Na^+ и Ni^{2+} , хотя последний и индуцировал синтез фитохелатинов *in vivo* [16].

Скорость синтеза фитохелатинов в корнях гороха была наивысшей когда в качестве субстрата использовали глутатион. В присутствии гомоглутатиона или оксиметилглутатиона, синтез изофитохелатинов усиливался, а фитохелатинов снижался. Если в качестве субстрата давали только γ -Глу-Цис-Ала или γ -Глу-Цис-Сер, скорость образования n_2 -олигомеров была наименьшей. Отсюда авторы пришли к заключению, что фитохелатинсинтаза имеет γ -Глу-Цис-донорный участок, специфичный для глутатиона, и менее специфичный γ -Глу-Цис-акцепторный участок, способный использовать в качестве субстрата несколько пептидов. Ингибирование глутатион-зависимого синтеза фитохелатинов при добавлении в среду гомоглутатиона и оксиметилглутатиона показал, что оба трипептида конкурируют с глутатионом за акцепторный участок [42].

Недавно в нескольких лабораториях были найдены ряд генов (*TaPCS1*, *AtPCS1*, *SpPCS*, *CAD1*), кодирующих фитохелатинсинтазу (или каталитическую субъединицу этого мультимерного комплекса) [18, 33, 95] (см. рис. 1). Представляет интерес, что эти гены были найдены также у нематоды *Caenorhabditis elegans*, свидетельствующее о том, что фитохелатины могут синтезироваться не только у растений и грибов, но и у некоторых видов животных.

Исключительная роль фитохелатинсинтазы в биосинтезе фитохелатинов показана недавно при анализе различных мутантов арабидопсиса [38]. Было выявлено четыре CAD 1 мутанта, различающихся по чувствительности к Cd и по способности синтезировать фитохелатины. У всех мутантов уровень глутатиона не отличался от контроля, тогда как активность фитохелатинсинтазы была в различной степени снижена.

Таким образом, реакция, катализируемая фитохелатинсинтазой, является автотрансферазной, в которой в растительных клетках может переноситься до 10 дипептидных остатков. Возможность использования этим ферментом в качестве субстрата оксиметилглутатиона и гомоглутатиона свидетельствует о сходстве процесса биосинтеза различных семейств фитохелатинов. Роль тяжелых металлов сводится, вероятно, к активации данного фермента, так что как только все ионы металла будут связаны, синтез фитохелатинов прекратится.

Присутствие у многих растений фитохелатинов, не содержащих С-концевой аминокислоты, можно объяснить ее отщеплением от фитохелатинов, гомофитохелатинов и оксиметилфитохелатинов с помощью пептидазы или в результате гидролитической активности фитохелатинсинтазы [42].

Помимо пути, найденного у растений (перенос γ -Глу-Цис остатков с глутатиона на акцептор), у *Schizosaccharomyces pombe* существует второй путь синтеза фитохелатинов, при котором γ -Глу-Цис остатки полимеризуются, а терминальный глицин присоединяется посредством каталитической активности глутатионсинтетазы [34]. Присутствие этого пути у высших растений не исключено, но маловероятно, так как при добавлении в инкубационную среду только γ -Глу-Цис или γ -Глу-Цис и Гли (без глутатиона) не вызывало синтеза фитохелатинов [16].

Имеются лишь немногочисленные данные о локализации фитохелатинов в тканях корня. Известно только, что концентрация фитохелатинов в апексе корня кукурузы примерно в 2,5 раза выше, чем в зрелых тканях, что согласуется с данными по распределению глутатиона [92]. Существует также обратная линейная зависимость между длиной корня и содержанием фитохелатинов [25].

Рассмотрев структуру, локализацию и возможные пути биосинтеза фитохелатинов, перейдем к анализу возможных функций этих полипептидов в клетках растений.

III. ФУНКЦИИ ФИТОХЕЛАТИНОВ

УЧАСТИЕ ФИТОХЕЛАТИНОВ В ГОМЕОСТАЗЕ

Одним из существенных аспектов поддержания гомеостаза является защита ферментов от токсического действия тяжелых металлов. Cd^{2+} , взаимодействуя с SH-группами ферментов, обычно ингибирует их активность [6, 94]. Однако, Cd в форме Cd-связывающего комплекса был в 10–1000 раз менее токсичным для нитратредуктазы, алкогольдегидрогеназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и уреазы, чем в форме нитрата [43].

Особый интерес в изучении функций фитохелатинов представляют мутанты CAD1-3 арабидопсиса, не способные синтезировать фитохелатины из-за отсутствия фитохелатинсинтазы. Эти мутанты нормально росли в присутствии микроколичеств Cu, Zn и Co в среде. Это служит, по мнению авторов, доказательством того, что в данных условиях фитохелатины не играют заметной роли в гомеостазе [38].

ДЕТОКСИКАЦИЯ КАДМИЯ С ОБРАЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСОВ

Как уже упоминалось выше, образование фитохелатинов напрямую зависит от активности ферментов синтеза глутатиона, находящихся в цитоплазме и хлоропластах. В то же время хорошо известно, что около 96% поглощенного Cd находится в клеточной стенке и вакуоли [62], а $110 \pm 8\%$ протопластного Cd и $104 \pm 8\%$ фитохелатинов содержится в вакуоли [97]. Отсюда было сделано предположение, что, связывая Cd²⁺ в цитоплазме, фитохелатины могут транспортироваться в вакуоль, где благодаря более кислому pH вакуолярного сока эти комплексы могут диссоциировать, а пептиды – подвергаться деградации вакуолярными протеазами и покидать вакуоль, выполняя, таким образом, роль челночного механизма для переноса Cd [97, 98]. Cd²⁺ же может связываться с органическими кислотами и аминокислотами вакуолярного сока [45, 58].

К настоящему времени выделено три комплекса фитохелатинов с Cd, различающихся по молекулярной массе. Низкомолекулярный комплекс («LMW»-комплекс) [8, 97] и комплекс со средней молекулярной массой («MMW»-комплекс) [43] различаются степенью полимеризации и образуются, по-видимому, сразу после синтеза фитохелатинов в цитоплазме.

Высокомолекулярный комплекс («HMW»-комплекс) выделен из растений *Brassica juncea* [86], томата [76], кукурузы [72], арабидопсиса [38, 39] и *Canavalia lineata* [17]. «HMW»-комплекс кукурузы был образован пептидами трех семейств [72]. Отличительной чертой этого комплекса является присутствие кислото-лабильного сульфида (acid-labile sulfide, S²⁻), в результате чего повышается его сродство к ионам Cd. Показано, что в реакциях, ведущих к образованию сульфида у *Schizosaccharomyces pombe* могут принимать участие ферменты метаболизма пуринов [40, 87]. У высших растений его происхождение остается неизвестным. В одной из последних работ было установлено, что Cd и S имеют в составе фитохелатинов кукурузы тетраэдрическую координацию с длиной связи Cd-S 2,54 Å [65].

Клеточная локализация «HMW»-комплекса стала известна после исследований Ortiz с соавт. [63, 64], которые идентифицировали *hmt1* (heavy metal tolerance 1) ген *Schizosaccharomyces pombe*, кодирующий

НМТ 1 белок. Последний является представителем одного из наиболее крупных семейств мембранных переносчиков и включает, в отличие от других представителей семейства, один трансмембранный и нуклеотидсвязывающий домен. Являясь белком тонопласта, НМТ 1 способен осуществлять энергозависимый транспорт как апофитохелатинов, так и «LMW»-комплексов. АТФ-зависимый транспорт фитохелатинов через тонопласт был также показан на корнях овса [82]. «НМW»-комплекс формируется, вероятно, уже в вакуоли [63, 64] или на уровне тонопласта [83] и служит для более эффективной изоляции металла, а следовательно и его детоксикации.

Так как НМТ 1 переносчик способен транспортировать не только «LMW»-комплекс, но и апофитохелатины, вероятно нельзя исключить и другой путь образования «НМW»-комплекса, при котором апофитохелатины поступают в вакуоль и там связывают Cd и S.

Наряду с транспортом Cd в виде «LMW»- (или «MMW»-) комплекса в литературе имеются данные о двух альтернативных путях его поступления в вакуоль. Недавно показана возможность транспорта Cd через Cd^{2+}/H^{+} антипорт [27, 81]. Однако, при повторении этих экспериментов при более низких концентрациях соли Cd, участие Cd^{2+}/H^{+} антипорта в транспорте Cd через тонопласт обнаружено не было или, по крайней мере, его вклад в этот процесс был незначительным [14]. Другой путь был открыт в середине 90-х гг. у *Saccharomyces cerevisiae* [49, 50]. Ведущую роль в механизме транспорта Cd через

тонопласт по этому пути играет глутатион, который образует с металлом сложный комплекс, структурная формула которого приведена на рис. 2. Выделен белок-переносчик (YCF1 – yeast cadmium factor 1) и кодирующий его ген (*YCF1*), ответственный за энергозависимый перенос данного комплекса в вакуоль. Участие этого белка в переносе комплекса фитохелатинов с Cd маловероятно, так как данный переносчик не способен транспортировать n_2 -олигомеры фитохелатинов [50]. Из этого следует, что основным механиз-

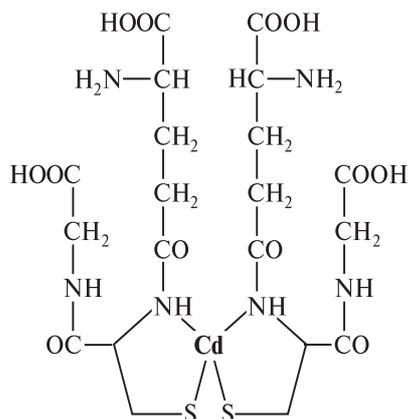


Рис. 2. Структура комплекса глутатиона и Cd, транспортирующегося через тонопласт с помощью белка — переносчика YCF 1.

мом поступления Cd в вакуоль является АТФ-зависимый транспорт металла в комплексе с фитохелатинами. Схематично этот процесс представлен на рис. 1.

ФИТОХЕЛАТИНЫ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К КАДМИЮ

Уже давно замечено, что некоторые виды растений растут на почвах, загрязненных тяжелыми металлами, а другие – нет. Было проведено несколько сравнительных исследований чувствительности разных растений к Cd, в которых одними и теми же методами и в одинаковых условиях было изучено токсическое действие повышенных концентраций солей этого металла. Для многих видов показано существование устойчивых популяций, которые и составляют основу металлофитной флоры [9, 11, 23–26].

Устойчивость растений к Cd поддерживается лишь при его наличии в окружающей среде, а при его отсутствии может утрачиваться [10].

Помимо изучения устойчивости растений на уровне вида, в последнее время начали появляться работы с использованием таксономического подхода, который может дать основу для понимания биохимического механизма устойчивости. Было установлено, что представители семейства крестоцветных наиболее устойчивы к Cd. Толерантность остальных уменьшалась в следующем порядке: пасленовые > злаки > бобовые [46, 47], что, однако, не всегда согласуется с данными о способности накапливать тяжелые металлы [5].

Устойчивость растений к тяжелым металлам может определяться несколькими механизмами: 1) преобладающим связыванием тяжелых металлов в клеточной оболочке и вакуоли толерантных популяций; 2) различной скоростью транспорта тяжелых металлов из корней в побеги; 3) синтезом ферментов, устойчивых к тяжелым металлам; 4) активированием механизмов их выведения из клеток и др. [6, 7].

В более ранних работах существовало мнение о том, что, как и в случае металлотioneинов животных, устойчивые виды (популяции) растений способны к сверхсинтезу фитохелатинов [91]. Более поздние исследования ясно показали, что как устойчивые, так и чувствительные клеточные линии и интактные растения синтезируют фитохелатины [14, 20–22, 96]. Кроме того, их содержание у чувствительных экотипов *Silene vulgaris* было даже выше, чем у устойчивых [14, 21]. Это свидетельствует о том, что сам по себе синтез фитохелатинов не определяет устойчивость растений к Cd.

У двух линий *Datura innoxia* были найдены различия в скорости образования фитохелатинов с Cd. Чувствительные клетки образовывали комплекс позже и эти комплексы имели более низкую молекулярную массу [22]. Характерно, что отсутствие «НМВ»-комплекса у

мутанта арабидопсиса (либо вследствие мутации, либо в результате ингибирования синтеза глутатиона) значительно снижало их устойчивость к Cd [39]. У толерантной популяции смолевки, подвергавшейся действию соли Cd в течение трех недель, фитохелатины связывали большее количество Cd за счет содержания в них сульфида, концентрация которого была в два раза выше по сравнению с чувствительными к избытку металла растениями [96]. Однако, при меньшем времени экспозиции, когда токсического влияния Cd на морфологию корней не наблюдалось, повышенного содержания сульфида найдено не было, что ставит его роль в толерантности под сомнение [21].

Недавно была высказана точка зрения, согласно которой различная устойчивость к Cd может определяться различиями в транспортной системе тонопласта [21], что косвенно подтверждается гиперчувствительностью *hmt1* мутанта *Schizosaccharomyces pombe* [64] и YCF мутанта *Saccharomyces cerevisiae* [50]. Однако, чтобы доказать или опровергнуть это предположение применительно к высшим растениям, необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом очевидно, что сами по себе фитохелатины не определяют устойчивость растений к тяжелым металлам. Однако, они являются неотъемлемой частью программы ответа клетки на поступление тяжелых металлов и «выключение» их синтеза (искусственно или в результате мутации) ведет к гиперчувствительности, а в крайнем случае и нежизнеспособности.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Образование фитохелатинов — одна из составных частей программы ответа клетки на поступление тяжелых металлов в цитоплазму. Обладая высоким сродством к SH-группам, ионы Cd являются одними из сильнейших активаторов их синтеза. Не являясь первичными генными продуктами, фитохелатины синтезируются на основе глутатиона или его аналогов (гомоглутатиона, оксиметилглутатиона) в результате пептидилтрансферазной реакции, катализируемой фитохелатинсинтазой. Биосинтез фитохелатинов регулируется на уровне экспрессии семейства генов, кодирующих фитохелатинсинтазу, а также генов, кодирующих ферменты синтеза глутатиона. Возможная схема регуляции детоксикации Cd с участием фитохелатинов приведена на рис. 1.

Образуя в цитоплазме «LMW» (или «MMW»)-комплекс, Cd транспортируется в вакуоль, где образуется «HMW»-комплекс, обладающий более высоким сродством к Cd и большей стабильностью в кислой среде. Транспорт «LMW»-комплекса через тонопласт энер-

гозависим и осуществляется (по крайней мере, у дрожжей) с помощью белка-переносчика. Активный транспорт Cd в вакуоль и его изоляция в виде физиологически-неактивных комплексов играет важную роль в поддержании гомеостаза. Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности существования двух альтернативных путей транспорта Cd в вакуоль: Cd^{2+}/H^{+} антипорта и транспорта в комплексе с глутатионом. Однако, их участие у высших растений полностью не доказано. Остается также неизвестным, происходит ли вторичное использование фитохелатинов, поступивших в вакуоль и если происходит, то как они поступают обратно в цитоплазму. Неясно также, какие сигнальные системы и фитогормоны участвуют в регуляции экспрессии генов, кодирующих фитохелатинсинтазу и ферменты синтеза глутатиона. Решение этих вопросов, а также изучение участия фитохелатинов в детоксикации других металлов позволит более полно понять их роль в метаболизме высших растений.

Автор благодарит В.Б. Иванова за критические замечания и помощь в работе над обзором.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бингам Ф.Т. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Под ред. Зигель Х., Зигель А.: М.: Мир. 1993. С. 366.
2. Бурдин К.С., Полякова Е.Е. // Усп. совр. биол. 1987. Т. 103. С. 390—400.
3. Серегин И.В., Иванов В.Б. // Физиол. раст. 1997а. Т. 44. С. 915—921.
4. Серегин И.В., Иванов В.Б. // Физиол. раст. 1997б. Т. 44. С. 922—925.
5. Серегин И.В. // Дисс. канд. биол. наук. М. МПГУ. 1999. 190 с.
6. Серегин И.В., Иванов В.Б. // Физиол. раст. 2001. Т. 48. С. 461—485.
7. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. // Успехи совр. биол. 1995. Т. 115. С. 261—275.
8. Abrahamson S.L., Speiser D.M., Ow D.W. // Anal. Biochem. 1992. Vol. 200. P. 239—243.
9. Antosiewicz D.M. // Acta Soc. Bot. Pol. 1992. Vol. 61. P. 281—299.
10. Baker A.J.M., Grant C.J., Martin M.H., Shaw S.C., Whitebrook J. // New Phytol. 1986. Vol. 102. P. 575—587.
11. Baker A.J.M. // New Phytol. 1987. Vol. 106. P. 93—111.
12. Bartolf M., Brennan E., Price C.A. // Plant Physiol. 1980. Vol. 66. P. 438—441.
13. Blakeley S.D., Robaglia Ch., Brzezinski R., Thirion J.-P. // J. Exp. Bot. 1986. Vol. 37. P. 956—964.
14. Chardonens A.N., Van de Laar T., Koevoets P.L.M., Kuijper L.D.J., Verkley J.A.C. // The Role of Vacuolar Compartmentalization in the Mechanism of Naturally Selected Zinc and Cadmium Tolerance / Ed: Chardonens A.N. Vrije universiteit. 1999. P. 31—41.
15. Chen J., Goldsbrough P.B. // Plant Physiol. 1994. Vol. 106. P. 233—239.
16. Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B. // Physiol. Plant. 1997. Vol. 101. P. 165—172.
17. Choi H.R., Hwang I.D., Lee S.H., Kwon Y.M. // Mol. Cells. 1996. Vol. 6. P. 451—455.
18. Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I. // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 3325—3333.
19. Cobbett C.N., May M.J., Howden R., Rolls B. // Plant J. 1998. Vol. 16. P. 73—78.

20. de Knecht J.A., Koevoets P.L.M., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. // *New Phytol.* 1992. P. 681—688.
21. de Knecht J.A., van Dillen M., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 104. P. 255—261.
22. Delhaize E., Jackson P.J., Lujan L.D. // *Plant Physiol.* 1989. Vol. 89. P. 700—706.
23. Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat H. // *Acta Bot. Neerl.* 1992. Vol. 43. P. 229—248.
24. Ernst W.H.O. // *Ecotoxicology. Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects* / Ed: Schuurmann G., Markert B. Wiley and Sons Inc., Heidelberg. 1998. P. 587—620.
25. Ernst W.H.O. // *Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe* / Ed: Peakall D.B., Walker C.H., Migula P. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1999. P. 135—151.
26. Ernst W.H.O., Nellisen H.J.M., Ten Bookum W.M. // *Environ. Exp. Bot.* 2000. Vol. 43. P. 55—71.
27. Gries G.E., Wagner G.J. // *Planta* 1998. Vol. 204. P. 390—396.
28. Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. // *Science* 1985. Vol. 230. P. 674—676.
29. Grill E., Gekeler W.K., Winnacker E.-L., Zenk M.H. // *FEBS. Lett.* 1986. Vol. 205. P. 47—50.
30. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987. Vol. 84. P. 439—443.
31. Grill E., Löffler S., Winnacker E.-L., Zenk M.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. Vol. 86. P. 6838—6842.
32. Grunhage L., Weigel H.-J., Ilge D., Jäger H.J. // *J. Plant Physiol.* 1985. Vol. 19. P. 327—334.
33. Ha S.-B., Smith A.P., Howden R., Deitrich W.M., Bugg S., O'Connell M.J., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S. // *Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 1153—1163.
34. Hayashi Y., Nakagawa C.W., Muto N., Isobe V., Goto T. // *Biochem. Cell Biol.* 1991. Vol. 69. P. 115—121.
35. Heiss S., Schafer H.J., Haag-Kerwer A., Rausch T. // *Plant Mol. Biol.* 1999. Vol. 39. P. 847—857.
36. Hell R., Bergmann L. // *Planta* 1990. Vol. 180. P. 603—612.
37. Hirt H., Sommergruber K., Barta A. // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 1990. Vol. 186. P. 153—163.
38. Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.S., Cobbett C.S. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 1059—1066.
39. Howden R., Andersen C.S., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 1067—1073.
40. Juang R.H., McCue K.F., Ow D.W. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. Vol. 304. P. 392—401.
41. Klapheck S., Fliegner W., Zimmer I. // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 104. P. 1325—1332.
42. Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 515—521.
43. Kneer R., Zenk M.N. // *Phytochemistry* 1992. Vol. 31. P. 2663—2667.
44. Kondo N., Imai K., Isobe M., Goto T., Murasugi A., Wada-Nakagawa C., Hayashi Y. // *Tetrahedron Lett.* 1984. Vol. 25. P. 3869—3872.
45. Krotz R.M., Evangelou B.P., Wagner G.J. // *Plant Physiol.* 1989. Vol. 91. P. 780—787.
46. Kuboi T., Noguchi A., Yazaki J. // *Plant Soil* 1986. Vol. 92. P. 405—415.
47. Kuboi T., Noguchi A., Yazaki J. // *Plant Soil* 1987. Vol. 104. P. 275—280.
48. Kubota H., Sato K., Yamada T., Maitani T. // *Phytochemistry* 2000. Vol. 53. P. 239—245.
49. Li Z.-S., Szczycka M., Lu Y.-P., Thiele D.J., Rea P.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 6509—6517.
50. Li Z.-S., Lu Y.-P., Zhen R.-G., Szczycka M., Thiele D.J., Rea P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. Vol. 94. P. 42—47.

51. Liang Zhu Y., Pilon-Smits E.A.H., Jouanin L., Terry N. // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. P. 73–80.
52. Liang Zhu Y., Pilon-Smits E.A.H., Tarun A.S., Weber S.U., Jouanin L., Terry N. // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 121. P. 1169–1177.
53. Lue-Kim H., Rauser W.E. // *Plant Physiol.* 1986. Vol. 81. P. 896–900.
54. Maitani T., Kubota H., Kyoko S., Yamada T. // *Plant Physiol.* 1996. Vol. 110. P. 1145–1150.
55. Margoshes M., Vallee B.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. Vol. 79. P. 4813–4814.
56. May M.J., Leaver C.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. Vol. 91. P. 10059–10063.
57. May M.J., Vernoux T., Sanchez-Fernandez R., Van Montagu M., Inze D. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. P. 12049–12054.
58. Mazen A.M.A., El Maghraby O.M.O. // *Biol. Plant.* 1997/98. Vol. 40. P. 411–417.
59. Mendum M.L., Gupta S.C., Goldsbrough P.B. // *Plant Physiol.* 1990. Vol. 93. P. 484–488.
60. Meuwly P., Thibault P., Rauser W.E. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 336. P. 472–476.
61. Meuwly P., Thibault P., Schwan A.L., Rauser W.E. // *Plant J.* 1995. Vol. 7. P. 391–400.
62. Nishizono H., Ichikawa H., Suzuki S., Ishii F. // *Plant Soil.* 1987. Vol. 101. P. 15–20.
63. Ortiz D.F., Kreppel L., Speiser D.M., Scheel G., McDonald G., Ow D.W. // *EMBO J.* 1992. Vol. 11. P. 3491–3499.
64. Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 4721–4728.
65. Pickering I.J., Prince R.C., George G.N., Rauser W.E., Wickramasinghe W.A., Watson A.A., Dameron C.T., Dance I.G., Fairlie D.P., Salt D.E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1429. P. 351–364.
66. Rai U.N., Tripathi R.D., Gupta M., Chandra P. // *J. Environ. Sci. Health.* 1995. Vol. 30. P. 2007–2026.
67. Rauser W.E., Glover J. // *Can. J. Bot.* 1984. Vol. 62. P. 1645–1650.
68. Rauser W.E. // *Plant Sci.* 1987. Vol. 51. P. 171–175.
69. Rauser W.E. // *Annu Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 61–86.
70. Rauser W.E., Schupp R., Rennenberg H. // *Plant Physiol.* 1991. Vol. 97. P. 128–138.
71. Rauser W.E. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 109. P. 1141–1149.
72. Rauser W.E., Meuwly P. // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 109. P. 195–202.
73. Rauser W. E. // *Cell Biochem. Biophys.* 1999. Vol. 31. P. 19–48.
74. Reese R.N., Wagner G.J. // *Biochem. J.* 1987a. Vol. 241. P. 641–647.
75. Reese R.N., Wagner G.J. // *Plant Physiol.* 1987b. Vol. 84. P. 574–577.
76. Reese R.N., White C.A., Winge D.R. // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 98. P. 225–229.
77. Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J. // *Biochem. J.* 1993. Vol. 295. P. 1–10.
78. Robinson N.J., Wilson J.R., Turner J.S., Fordham-Skelton A.P., Groom Q.J. // *Plant Root-From Cells to Systems* / Ed: H.M. Anderson et al. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1997. P. 117–130.
79. Ruesegger A., Schmutz D., Brunold C. // *Plant Physiol.* 1990. Vol. 93. P. 1579–1584.
80. Ruesegger A., Brunold C. // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. P. 428–433.
81. Salt D.E., Wagner G.J. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 12297–12302.
82. Salt D.E., Rauser W.E. // *Plant Physiol.* 1995. V. 107. P. 1293–1301.
83. Sanita di Toppi L., Gabbrielli R. // *Environ. Exp. Bot.* 1999. Vol. 41. P. 105–130.
84. Schafer H.J., Haag-Kerwer A., Rausch T. // *Plant Mol. Biol.* 1998. Vol. 37. P. 87–97.
85. Scheller H.V., Huang B., Hatch E., Goldsbrough P.B. // *Plant Physiol.* 1987. Vol. 85. P. 1031–1035.

86. Speiser D.M., Abrahamson S.L., Banuelos G., Ow D.W. // Plant Physiol. 1992. Vol. 99. P. 817—821.
87. Speiser D.M., Ortiz D.F., Kreppel L., Scheel G., McDonald G., Ow D.W. // Mol. Cell Biol. 1992. Vol. 12. P. 5301—5310.
88. Steffens J.C., Hunt D.F., Williams B.J. // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 13879—13882.
89. Steffens J.C. // Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1990. Vol. 41. P. 553—575.
90. Stone H., Overnell J. // Comp. Biochem. Physiol. 1985. Vol. 80. P. 9—14.
91. Tomsett A.B., Thurman D.A. // Plant Cell Environ. 1988. Vol. 11. P. 383—394.
92. Tukendorf A., Rauser W.E. // Plant Sci. 1990. Vol. 70. P. 155—166.
93. Uotila M., Aioub A.A.A., Gullner G., Komives T., Brunola C. // Acta Biol. Hung. 1994. Vol. 45. P. 11—16.
94. Van Assche F., Glijsters H. // Plant Cell Environ. 1990. Vol. 13. P. 195—206.
95. Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.-P., Rea P.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. Vol. 96. P. 7110—7115.
96. Verkley J.A.C., Koevoets P., Van T. Riet J., Bank R., Nigdam Y., Ernst W.H.O. // Plant Cell Environ. 1990. Vol. 13. P. 913—921.
97. Vogeli-Lange R., Wagner G.J. // Plant Physiol. 1990. Vol. 92. P. 1086—1093.
98. Vogeli-Lange R., Wagner G.J. // Plant Sci. 1996. Vol. 114. P. 11—18.
99. Weigel H.J., Jager H.J. // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P. 480—482.
100. Wojcik M., Tukendorf A. // Acta Physiol. Plant. 1999. Vol. 21. P. 99—107.
101. Xiang C., Oliver D.J. // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P. 1539—1550.
102. Zenk M.H. // Gene 1996. Vol. 179. P. 21—30.