

УДК 579.22+577.11

Cloning and Characterization of Polyhydroxybutyrate Synthase from *Methylobacterium extorquens* AM1

**Svetlana A. Zamakhaeva, Dmitry N. Fedorov*,
Nina V. Doronina and Yuri A. Trotsenko**

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry
and Physiology of Microorganisms RAS
5 Prospect Nauki, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia
Pushchino State Institute of Natural Sciences
3 Prospect Nauki, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia*

Received 11.11.2015, received in revised form 30.03.2016, accepted 01.04.2016

*Multiple genes encoding putative PHB synthases (up to 5 in single strain) were found in *Methylobacterium* genomes. As a result of phylogenetic analysis proteins PhaC1, PhaC2, PhaC3 were identified as class I PHB synthases, PhaC4 proteins were identified as class III PHB synthases, while PhaC5 apparently belongs to uncharacterized class of PHB synthases. Firstly, the recombinant class I PHB synthase (EC 2.3.1.B2) encoded by phaC1 gene from *Methylobacterium extorquens* AM1 was purified and characterized. Molecular mass of enzyme monomer was 78 kDa. Michaelis constant (K_m) for PhaC1 was 1,3 mM and maximal reaction rate (V_{max}) was 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. The deletion mutant of *Methylobacterium extorquens* in the phaC gene was obtained which is promising for further study of peculiarities of methylobacteria's PHB biosynthesis.*

*Keywords: methylotrophs, polyhydroxybutyrate, PHB-synthase, *Methylobacterium extorquens*, phaC.*

DOI: 10.17516/1997-1389-2016-9-2-169-179.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: fedorov@ibpm.pushchino.ru

Клонирование и характеристика полигидроксibuтиратсинтазы из *Methylobacterium extorquens* AM1

С.А. Замахаева, Д.Н. Федоров,
Н.В. Доронина, Ю.А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН
им. Г.К. Скрыбина

Россия, 142290, Московская область, Пущино, проспект Науки, 5
Пущинский государственный естественно-научный институт
Россия, 142290, Московская область, Пущино, проспект Науки, 3

В результате поиска генов, кодирующих вероятные ПГБ-синтазы в геномах бактерий рода *Methylobacterium*, выявлены множественные (до пяти у одного штамма) гены ПГБ-синтаз. Филогенетическим анализом показано, что белки *PhaC1*, *PhaC2*, *PhaC3* относятся к I классу ПГБ-синтаз, белки *PhaC4* – к ПГБ-синтазам III класса, тогда как *PhaC5*, по-видимому, представляет неохарактеризованный класс ПГБ-синтаз. Впервые выделена и охарактеризована рекомбинантная ПГБ-синтаза I класса (КФ 2.3.1.В2) из *Methylobacterium extorquens* AM1, кодируемая геном *phaC1*. Молекулярная масса мономера фермента составила 78 кДа. Константа Михаэлиса (K_m) для *PhaC1* из штамма AM1 составила 1,3 мМ, а максимальная скорость реакции (V_{max}) – 0,1 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹. Получен делеционный мутант *Methylobacterium extorquens* по гену *phaC*, перспективный для дальнейшего исследования особенностей биосинтеза ПГБ метиловобактериями.

Ключевые слова: метилотрофы, полигидроксibuтират, ПГБ-синтаза, *Methylobacterium extorquens*, *phaC*.

Введение

Полигидроксиалканоаты – полиэфиры микробного происхождения, синтезируются прокариотами при несбалансированных условиях роста (лимит по одному из питательных веществ – азоту, фосфору, калию и другим при избытке углерода) и являются для клеток резервным субстратом эндогенного дыхания (Anderson, Dawes, 1990; Braubegg et al., 1998; Madison, Huisman, 1999). К настоящему моменту описано более 300 продуцентов ПГА и около 150 различных полигидроксиалкановых кислот, однако наибольшую коммер-

ческую ценность представляет полигидроксibuтират (ПГБ) (Steinbuechel, Valentin, 1995; Ezhov et al., 2013). Хотя ПГБ обладает рядом полезных свойств (термопластичность, биоразлагаемость и биосовместимость), высокая стоимость препятствует реализации процесса биосинтеза полимера в промышленных масштабах. Для повышения рентабельности ПГБ ведется поиск доступных по цене углеродородных субстратов и активных штаммов – продуцентов ПГБ (Doronina et al., 2008). В качестве основных ростовых субстратов для биосинтеза полимеров чаще всего использу-

ют углеводы. В то же время для РФ дешевым источником углерода служит метанол, производимый в стране крупнотоннажно (Ezhov et al., 2013).

Метанол, получаемый из возобновляемых ресурсов, обладает значительным потенциалом в качестве сырья для биотехнологических задач из-за большого разнообразия метилотрофных микроорганизмов, отличающихся путями метаболизма и поэтому являющихся ценным ресурсом для биоинженерии различных продуктов из метанола. Аэробные метиловобактерии с сериновым путем C_1 -метаболизма синтезируют из метанола 40-80 % ПГБ от веса сухой биомассы, среди них наиболее широко изучен факультативный метилотроф *Methylobacterium extorquens* (Urakami and Komagata, 1984), способный также к росту на метаноле-сырце. За последние пятьдесят лет были изучены физиологические, биохимические, транскриптомные, протеогеномные аспекты метаболизма *M. extorquens* (Ochsner et al., 2015; Ezhov et al., 2013; Poroshina et al., 2014). Несмотря на это, недостаточно исследованы такие важные аспекты биосинтеза ПГБ, как разнообразие и распространение генов ПГБ-синтаз, а также биохимические свойства этих ферментов. Определение биохимических свойств ПГБ-синтазы актуально, поскольку основные свойства ПГБ – молекулярная масса, степень кристалличности – могут варьировать в достаточно широких пределах вследствие генетических особенностей продуцентов, условий синтеза и выделения полимеров (Anderson, Dawes, 1990). Вероятно, исследование свойств ферментов биосинтеза полимера позволит выявить связь между свойствами ПГБ-синтаз и различными физико-химическими особенностями ПГБ, что в дальнейшем даст возможность осуществлять направленный синтез биополимера с заданными характеристика-

ми. Направленный синтез ПГБ с заданными характеристиками – сложная теоретическая задача, решение которой требует фундаментальных знаний о закономерностях синтеза и влиянии структуры на физико-химические свойства полимера.

Целью данной работы было изучение биохимических свойств ПГБ-синтазы *M. extorquens* AM1 и разнообразия генов биосинтеза ПГБ у представителей рода *Methylobacterium*.

Материалы и методы

Векторы, бактериальные штаммы и условия их культивирования

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, перечислены в табл. 1. *Methylobacterium extorquens* AM1 (CIP 106787 = DSM 6343 = VKM B-2191) выращивали на среде «К» при 29 °С в колбах объемом 0,75 л на качалке (180 об/мин), в качестве источника углерода и энергии вносили CH_3OH (0,5 %) (Ivanova et al., 2001), сукцинат натрия (0,3 %) или ацетат натрия (0,3 %). При культивировании мутанта метиловобактерий в среду добавляли гентамицин – 20 мкг/мл.

Штаммы *Escherichia coli* (табл. 1) культивировали на среде LB. Для выращивания трансформированных штаммов *E. coli* TOP10 и S17-1 в среду добавляли антибиотики (мкг/мл): ампициллин – 100, канамицин – 30, гентамицин – 2,5, хлорамфеникол – 40.

Общие методы

Выделение геномной и плазмидной ДНК, эндонуклеазные реакции, лигирование, трансформацию штаммов *E. coli* проводили при помощи стандартных методов (Sambrook, Russell, 2001). Реакционная смесь полимеразной цепной реакции (ПЦР) содержала (30 мкл): 1×буфер для Pfu-ДНК-полимеразы, по 150 мкМ каждого из дезоксирибонуклеотид-

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм/плазида	Генотип/ Характеристика	Источник
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>thi pro recA hsdR</i> [RP4-2Tc::Mu-Km::Tn7] Tr ^r Sm ^r	(Simon et al., 1983)
<i>E. coli</i> TOP10	<i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Phi80 <i>lacZ(del)</i> M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL(SmR)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosetta	<i>F-ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R)</i>	Novagen
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	Штамм дикого типа	VKM B-2064T (=NCIMB 9399T = JCM2802T = TK001T)
<i>M. extorquens</i> AM1 Δ <i>phaC1</i>	Нокаут-мутант AM1 по гену <i>phaC1</i> , Gm ^r	Данная работа
pHUE	Вектор для экспрессии аутентичных рекомбинантных белков, Ap ^r	(Catanzariti et al., 2004)
pK18-mob	Мобилизуемый суицидальный вектор для клонирования, Km ^r	(Schafer et al., 1994)
p34S-Gm	Вектор, содержащий Gm ^r -кассету, Gm ^r , Ap ^r	(Dennis, Zylstra, 1998)
p7A-108	pHUE, содержащий Acc65I/EcoRI-фрагмент с геном <i>phaC</i> из <i>M. extorquens</i> AM1	Данная работа
p7A-112	pK18mob, содержащий 5'-концевой участок гена <i>phaC1</i> из <i>M. extorquens</i> AM1, Km ^r	«»
p7A-113	p7A-112, с клонированным 3'-концевым участком гена <i>phaC1</i> из <i>M. extorquens</i> AM1, Km ^r	«»
p7A-114	Производная p7A-113, содержащая BamHI-фрагмент Gm ^r -касеты из p34S-Gm, Km ^r , Gm ^r	«»

трифосфатов, по 200 нМ соответствующих праймеров, 100 нг геномной ДНК, 3 % (об/об) диметилсульфоксида (Sigma), 2 ед. Pfu-ДНК-полимеразы (СибЭнзим). Для всех комбинаций праймеров использовали следующий температурно-временной режим: начальная денатурация – 3 мин при 96 °С, с последующими 30-ю циклами 20 с при 94 °С, 20 с при 60 °С, 4 мин при 72 °С; конечная полимеризация – 5 мин при 72 °С. Все ПЦР-фрагменты очищали при помощи Zymoclean Gel DNA Kit (Zymo Research, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Филогенетический анализ

Для выявления генов, кодирующих ПГБ-синтазу, в хромосомах бактерий из рода *Methylobacterium*, полные геномные последо-

вательности которых представлены в GenBank, применяли программу поиска аминокислотных последовательностей (Protein Blast) в пакете программ BLAST с использованием аминокислотной последовательности белка PhaC (номер доступа GenBank: WP_012753238.1) из *Methylobacterium extorquens* AM1. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили при помощи программы ClustalW (Thompson et al., 1994). Для построения филогенетического дерева брали модель UPGMA (unweighted-pair group method with average linkages), реализованную в пакете программ MEGA (Tamura et al., 2007), для тестирования надежности построенного дерева использовали значения bootstrap (1000 повторностей). В дерево включены последовательности охарактеризованных ПГБ синтаз I класса из

Cupriavidus necator, II класса из *Pseudomonas aeruginosa*, III класса из *Allochromatium vinosum* и IV класса из *Bacillus megaterium*.

Получение нокаут-мутанта

Methylobacterium extorquens AM1
по гену ПГБ-синтазы

Фрагмент ДНК, содержащий полную последовательность гена *phaC1* из хромосомы *Methylobacterium extorquens* AM1, амплифицировали, используя праймеры *phaC-F* (SphI) 5'-ATTATGCATGCTAGACSTTTGGGAGGACGTGTCG-3' и *phaC-R* (Acc65I) 5' –C ACGGTACCTGTCGATCCCTCACACCTTCATG-3'. Полученный ПЦР-фрагмент длиной 1888 п.н. обработали рестриктазами SphI и BamHI, в результате чего получили фрагмент в 300 п.н., содержащий 5'-концевой участок гена ПГБ-синтазы. Далее фрагмент клонировали в векторе pK18mob (табл. 1), раскрытом по тем же сайтам. В результате получили вектор p7A-112 (табл. 1). Фрагмент гена *phaC1*, содержащий 3'-концевой участок, амплифицировали с помощью сочетания праймеров MexT-*phaCBamHIF* (BamHI) 5'-CCAGGATCCGCGCAAGGTCGATTACG-3' и *phaC-R*, который после обработки рестриктазами BamHI и Acc65I клонировали в векторе p7A-112, что дало плазмиду p7A-113. Затем в векторе p7A-113, раскрытом по сайту BamHI, клонировали BamHI-фрагмент плазмиды p34S-Gm размером 865 п.н. Таким образом, получили вектор p7A-114, который содержит ген *phaC*, вместо центральной части которого находится кассета устойчивости к гентамицину. Плазмидой p7A-114 трансформировали клетки *E. coli* S17-1, которые использовали для конъюгативного переноса в клетки *M. extorquens* AM1, как описано ранее (Fedorov et al., 2010). Колонии трансконъюгантов отбирали на агаризованной среде К с добавлением метанола и гентамицина, а

также дополнительно проверяли ПЦР на наличие мутантного аллеля.

Клонирование гена *phaC*

в экспрессионном векторе

Открытую рамку считывания гена *phaC* амплифицировали из геномной ДНК *M. extorquens* AM1 с использованием пары праймеров (в скобках указаны сайты рестрикции) *phaC-UpF* (EcoRI) 5'-TGAATTCATGGGCACCGAGCGGACGAAC-3' и *phaC-R*. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в векторе рНUE, раскрытом по соответствующим сайтам, в результате чего получена плазида p7A-108 (табл. 1).

Очистка рекомбинантной

ПГБ-синтазы

Для синтеза рекомбинантного белка PhaC клетки *E. coli* Rosetta, трансформированные плазмидой p7A-108, выращивали в 2 л среды LB с добавлением ампициллина и хлорамфеникола при 28 °С до ОП₆₀₀ = 0.6-0.7. Синтез белка индуцировали добавлением 0.2 мМ изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозидом (ИПТГ); клетки инкубировали в течение ночи на качалке (180 об/мин) при 28 °С. Рекомбинантный белок выделяли из суперпродукта *E. coli* в соответствии с методиками фирмы Qiagen с небольшими изменениями (Henco, 1992). Клетки осаждали центрифугированием (7000 g, 15 мин) при 4 °С, осадок ресуспендировали в 30 мл 20 мМ Tris (pH 8.0), содержащий 0.5 М NaCl, 5 мМ имидазола. Ресуспендированные клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (Англия) (150 Вт, 10 Гц, 6 раз по 15 с с 1 мин интервалами) при охлаждении (лёд). Клеточный лизат центрифугировали (10000 g, 20 мин) при 4 °С, супернатант наносили на колонку, содержащую 1 мл Ni²⁺-нитрилтриацетатной (НТА) агарозы (Invitrogen). После интенсивного про-

мывания буфером, содержащим 20 мМ Tris (pH 8.0), 0.5 М NaCl, 80 мМ имидазола, связанный рекомбинантный белок элюировали с колонки буфером следующего состава: 20 мМ Tris (pH 8.0), 0.5 М NaCl, 200 мМ имидазола. Белковые фракции по 0.5 мл проверяли при помощи ДСН-ПААГ (Laemmli, 1970). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, с применением коэффициента экстинкции, рассчитанного по предсказанной аминокислотной последовательности в пакете программ Vector NTI Suite 9.1 (Invitrogen), а также методом Брэдфорда (Bradford, 1976).

Определение активности ПГБ-синтазы

Активность ПГБ-синтазы определяли при 30 °С непрерывным и дискретным методами. Для непрерывного исследования активности фермента реакционная смесь включала в себя (общий объем 200 мкл): 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, от 0.005 до 0.8 мМ D,L-β-гидроксипутирил коэнзима А (ЗГБ-КоА; Sigma), 0.124 мкг очищенного His₆-PhaC, 20 мМ дитионитробензоата (ДТНБ). Реакцию начинали добавлением ПГБ-синтазы. Активность определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1700), по образованию тионитробензоата (ТНБ), продукта реакции освобожденного коэнзима А с ДТНБ, при длине волны 412 нм, учитывая молярный коэффициент экстинкции ТНБ (13600 М⁻¹ см⁻¹). Активность PhaC наблюдали в течение нескольких минут (Pfeiffer, Jendrossek, 2014).

Кроме того, активность ПГБ-синтазы определяли дискретным методом. Реакционная смесь (200 мкл) содержала: 50 мМ Tris-HCl pH 8.0; 0.5 мМ ЗГБ-КоА; 0.6 мкг His₆-PhaC. Реакцию начинали добавлением фермента. Аликвоты реакционной смеси (20 мкл) отбирали сразу, через 2, 10 и 40 мин и после инкубации при 30 °С останавливали реакцию добавлением 40 мкл 10%-ный (в/об)

трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования к 55 мкл супернатанта добавляли 145 мкл 1 мМ ДТНБ и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Концентрацию освободившегося в реакции полимеризации КоА определяли спектрофотометрически (λ=412 нм) по образованию ТНБ.

Результаты и обсуждение

ПГБ синтезируют природные и генетически модифицированные штаммы при лимите по одному из конструктивных элементов (азоту, кислороду, фосфору и т.д.) и избытке источника углерода (Braunegg et al., 1998). Известно, что цена источника углерода составляет около 40 % общей себестоимости пластика, поэтому важной задачей является подбор продуцентов, растущих на недорогом источнике углерода (Choi, Lee, 1997). Такими продуцентами служат метиловобактерии, потребляющие дешевый непитательный субстрат – метанол, а также метанол-сырец (Poroshina et al., 2014). Среди метилотрофных продуцентов ПГБ наиболее известны представители рода *Methylobacterium* с сериновым путем C₁-метаболизма, способные накапливать до 80 % ПГБ от сухой биомассы при росте на метаноле (Follner et al., 1997).

На данный момент ПГБ-синтазы в целом малоизучены. В базе данных BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>) имеются сведения о нескольких ПГБ-синтазах I класса из *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas caviae*. Несмотря на многочисленные исследования, направленные на оптимизацию условий культивирования и увеличение выхода ПГБ и его сополимеров, разнообразие и распространение генов биосинтеза полигидроксипутирата и биохимические свойства ПГБ-синтаз у представителей *Methylobacterium* исследованы недостаточно.

Используя программу BLAST, мы провели поиск генов, кодирующих вероятные ПГБ-синтазы в геномах представителей рода *Methylobacterium*. В качестве исходной была взята аминокислотная последовательность белка PhaC из *M. extorquens* AM1. В результате поиска и последующего филогенетического анализа в геномах метиловых бактерий выявлены от одного до пяти паралогов ПГБ-синтаз, обозначенных нами PhaC1, PhaC2, PhaC3, PhaC4 и PhaC5 (рис. 1).

Степень аминокислотной идентичности PhaC из *M. extorquens* AM1 с белками PhaC1 остальных представителей рода составляла 100–64 %, с PhaC2 – 47 %, с PhaC3 – 43 %, с PhaC4 – 25 % и с ПГБ-синтазами PhaC5 – 21 %. Внутри каждого типа уровень аминокислотной идентичности варьировал от 72 до 83 %. На филогенетическом дереве аминокислотные последовательности ПГБ-синтаз PhaC1, PhaC2, PhaC3, PhaC4 и PhaC5 образуют отдельные ветви. Гены, кодирующие

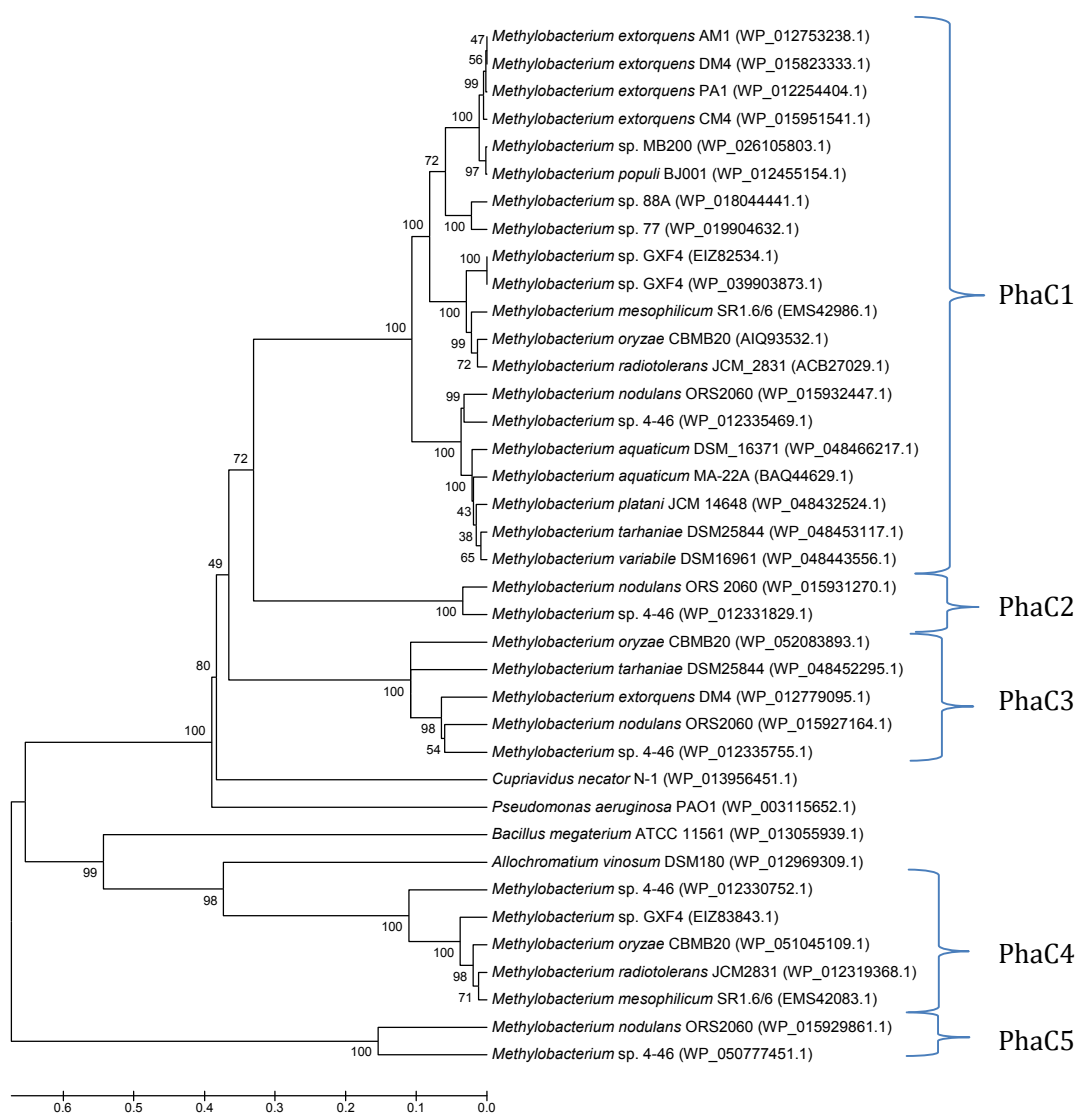


Рис. 1. Филогенетическое дерево ПГБ-синтаз

белки PhaC1, были обнаружены у всех представителей рода *Methylobacterium*, геномы которых опубликованы на данный момент, поэтому ПГБ-синтаза PhaC1 является ключевым ферментом биосинтеза полигидроксиалканоатов у данного рода. На дендрограмме кластер PhaC1 делится на две большие ветви, что коррелирует с филогенетическим деревом, построенным на основе последовательностей гена 16S рНК. Это свидетельствует о том, что у метиловых бактерий основной фермент биосинтеза ПГБ наследуется вертикально.

Поскольку аминокислотные последовательности белков PhaC1, PhaC2, PhaC3 имеют наибольшее сходство с PhaC из *Cupriavidus necator* (WP_013956451.1) и формируют общую ветвь на дендрограмме, данные ферменты относятся к ПГБ-синтазам I класса.

Филогенетический анализ показал, что белки PhaC4 наиболее близки к ПГБ-синтазам III класса, например к PhaC из *Allochromatium vinosum* DSM180 (WP_012969039.1), которая образует с синтазами PhaC4 общую ветвь на дендрограмме. ПГБ-синтазы III класса представляют собой гетеромерные ферменты, состоящие из двух субъединиц: PhaC и PhaE, молекулярная масса которых составляет ~40 кДа. Так, у пяти штаммов *Methylobacterium*, содержащих гены *phaC4*, в генетическом контексте, выше гена *phaC*, обнаружены гены *phaE*, что в совокупности с филогенетическими данными позволяет отнести белки PhaC4 к ПГБ-синтазам III класса.

Интересно, что ПГБ-синтаза PhaC5 встречается только у тех штаммов, в геноме которых обнаружены синтазы PhaC2. Аминокислотная последовательность белков PhaC5 не проявляет высокий уровень сходства ни с одним из описанных ранее классов ПГБ-синтаз (уровень аминокислотной идентичности ниже 21 % с остальными синтазами) и формирует отдельную ветвь на

дендрограмме. Помимо этого белки PhaC5 имеют нехарактерную молекулярную массу субъединицы 49 кДа. По-видимому, белки PhaC5 относятся к неопisanному ранее классу ПГБ-синтаз.

На данный момент единственным штаммом, обладающим генами всех пяти типов ПГБ-синтаз, является *Methylobacterium* sp. 4-46. Практически все штаммы *M. extorquens* имеют ген только одной ПГБ-синтазы, PhaC1, за исключением *M. extorquens* DM4, в геноме которого есть также ген, кодирующий PhaC3. Вероятно, в этом случае дополнительная ПГБ-синтаза может участвовать в метаболизме данного деструктора дихлорметана.

Для детального изучения ПГБ-синтазы I класса ген *phaC1* из *M. extorquens* AM1 выбрали для клонирования и экспрессии в клетках *E. coli* Rosetta. Гетерологичный белок с полигистидиновой меткой на N-конце был выделен и очищен методом металл-хелатной хроматографии. Электрофорезом His₆-PhaC1 в ДСН-полиакриламидном геле установлена молекулярная масса мономера, которая равна 78 кДа, что соответствует расчетному значению.

При непрерывном мониторинге активности фермента в течение 5 мин после запуска реакции не была выявлена лаг-фаза. С другой стороны, при использовании дискретного метода, когда активность фермента измеряли через 0, 2, 10 и 40 мин, в первых трех пробах не наблюдали детектируемого изменения ОП. Возможно, в реакции полимеризации PhaC1 присутствует лаг-фаза, но, по-видимому, длительнее, чем у ранее описанных ПГБ-синтаз I класса (Song et al., 2000; Pfeiffer and Jendrossek, 2014).

Поскольку ПГБ-синтаза проявляла достаточно высокую активность в присутствии ГБ-КоА, были определены кинетические характеристики фермента. В результате анализа

зависимости активности фермента от концентрации субстрата выяснили, что синтаза PhaC подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 2). Эффект кооперативности отсутствует, поскольку при тестировании уравнением Хилла коэффициент равен единице.

Максимальная скорость реакции исследуемого фермента 0.1 мкмоль/мин/мг белка. Значение Константы Михаэлиса PhaC1 составило 1.3 мМ 3-ГБ-КоА, что примерно в 7 раз больше K_m ПГБ-синтазы I типа PhaC из *C. necator* ($K_m = 0.19$ мМ) (Normi et al., 2005). Такое отличие в значениях можно объяснить значительными различиями в аминокислотных последовательностях этих белков, а также наличием аффинных меток на N-конце ПГБ-синтазы из *M. extorquens* AM1. Кроме того, известно, что на N-концевом участке ПГБ-синтаз нет консервативных последовательностей, что определяет уровень активности ПГА-синтазы (Grage et al., 2009).

Очевидно, что ПГБ-синтаза метиловых бактерий, кодируемая геном *phaC1*, выполняет

основную функцию в биосинтезе ПГБ. Чтобы понять роль дополнительных ферментов в биосинтезе ПГБ у метиловых бактерий и оценить возможность комплементации мутации дополнительным геном, закодированным в геноме, необходимо получить мутант *M. extorquens* AM1 по гену *phaC1*. При помощи ПЦР, а также реакций клонирования и лигирования был получен вектор p7A-114, содержащий 5'- и 3'-концевые участки гена *phaC1*, вместо центральной части которого клонирована кассета устойчивости к гентамицину. Вектор для мутагенеза переносили при помощи конъюгативного переноса из штамма *E. coli* S17-1 в клетки штамма AM1 и отбирали мутантов метиловых бактерий с делецией в гене *phaC* на селективных средах с гентамицином и метанолом. Наличие мутантного аллеля гена *phaC1* в геноме *M. extorquens* AM1 подтверждено ПЦР-анализом.

Мутант *M. extorquens* по гену *phaC1* оказался неспособен к биосинтезу ПГБ и

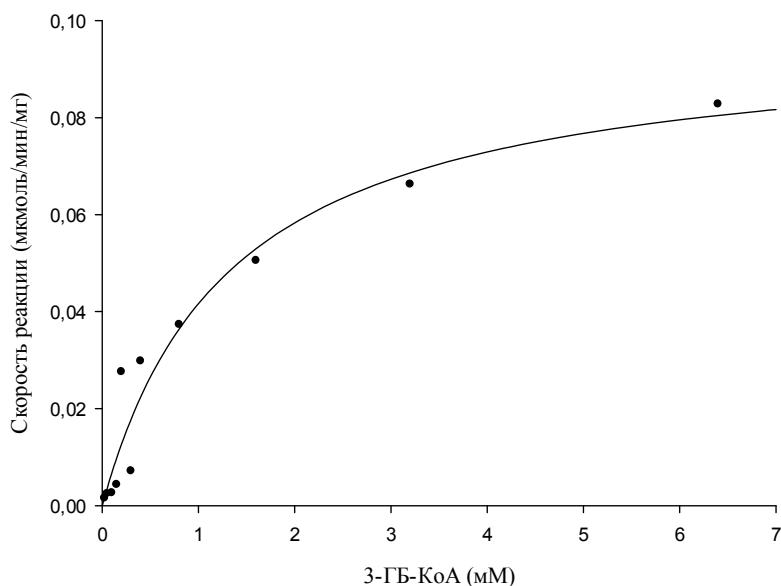


Рис. 2. График зависимости активности ПГБ-синтазы PhaC1 из *Methylobacterium extorquens* AM1 от концентрации субстрата 3-ГБ-КоА

имел ростовые дефекты. Так, скорость роста *M. extorquens* AM1 Δ *phaC1* на среде “К” с метанолом в качестве источника углерода была крайне низкой. Ростовые характеристики улучшались при росте мутанта на среде с ацетатом или сукцинатом натрия. При продолжительном пересеве культуры на жидкую среду “К” с сукцинатом наблюдали увеличение скорости роста, что может быть связано с компенсацией мутации анаплеротическими биохимическими путями. Ранее мутант *M. extorquens* AM1 Δ *phaC1* был получен в лаборатории Лидстром (Korotkova, Lidstrom, 2001) и также характеризовался различными ростовыми нарушениями.

Мутант Δ *phaC1* планируется использовать для его комплементации генами ПГБ-синтаз для оценки свойств продуцируемого полимера.

Таким образом, нами впервые обнаружен полиморфизм генов биосинтеза ПГБ у метиловых бактерий, а также охарактеризована ПГБ-синтаза I класса из *Methylobacterium extorquens* AM1, которая по своим структурным и биохимическим особенностям отличается от ранее описанных синтаз. Проведенная работа является основой для последующего изучения разнообразия и свойств ПГБ-синтаз метиловых бактерий, а также продуцируемых ими биополимеров.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-14-01045.

Список литературы

- Anderson A.J., Dawes E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54: 450-472
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248-254
- Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.F. (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.*, 65(2-3): 127-161
- Catanzariti A.M., Soboleva T.A., Jans D.A., Board P.G., Baker R.T. (2004) An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Prot. Sci.*, 13(5): 1331-1339
- Choi J., Lee S.Y. (1997) Process analysis and economic evaluation for PHB production by fermentation. *Bioprocess Eng.*, 17(6): 335-342
- Dennis J.J., Zylstra G.J. (1998) Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(7): 2710-2715
- Doronina N.V., Ezhov V.A., Trotsenko Y.A. (2008) Growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b on methane and poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 44(2): 182-185
- Ezhov V.A., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. (2013) Biosynthesis of polyhydroxybutyrate/valerate with different molecular weights during the growth of *Methylobacterium extorquens* G-10 on a methanol-pentanol mixture. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 49(2): 150-153
- Fedorov D.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. (2010) Cloning and characterization of indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochemistry*, 75(2): 1435-1443
- Follner C.G., Madkour M., Mayer F., Babel W., Steinbuechel A. (1997) Analysis of the PHA granule-associated proteins GA20 and GA11 in *Methylobacterium extorquens* and *Methylobacterium rhodesianum*. *J. Basic Microbiol.*, 37(1): 11-21

Grage K., Jahns A., Parlane N., Palanisamy R., Rasiah I., Atwood J., Rehm B. (2009) Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4): 660-669

Henco K. (1992) *The QIAexpressionist: The High Level Expression and Protein Purification System*. QIAGEN Press, Hamburg, 128 p.

Ivanova E.G., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. (2001) Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology*, 70: 392-397

Korotkova N., Lidstrom M.E. (2001) Connection between poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C₁ and C₂ compounds in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.*, 183(3): 1038-1046

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Madison L.L., Huisman G.W. (1999) Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(1): 21-53

Normi Y.M., Hiraishi T., Taguchi S., Abe H., Sudesh K., Najimudin N., Doi Y. (2005) Characterization and properties of G4X mutants of *Ralstonia eutropha* PHA synthase for poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Escherichia coli*. *Macromol. Biosci.*, 5(3): 197-206

Ochsner A.M., Sonntag F., Buchhaupt M., Schrader J., Vorholt J. (2015) *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99: 517-534

Pfeiffer D., Jendrossek D. (2014) PhaM is the physiological activator of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(2): 555-563

Poroshina M.N., Doronina N.V., Ezhov V.A., Trotsenko Y.A. (2014) Comparative characteristics of biosynthesis of polyhydroxybutyrate from methanol by *Methylobacteria extorquens* G10 and *Methyloligella halotolerans* C2. *Appl. Biochem.*, 50(3): 253-258

Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn*. Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory, 676 p.

Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Puhler A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1): 69-73

Simon R., Prierer U., Pühler A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Nature Biotechnol.*, 1: 784-791

Song J.J., Zhang S., Lenz R.W., Goodwin S. (2000) *In vitro* polymerization and copolymerization of 3-Hydroxypropionyl-CoA with the PHB synthase from *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 1(3): 433-439

Steinbuechel A., Valentin Y.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, 128(3): 219-228

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) Clustal-W—improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680