

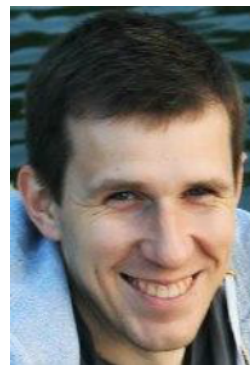
УДК 579; 577; 57.03

1-АМИНОЦИКЛОПРОПАН-1-КАРБОКСИЛАТДЕЗАМИНАЗЫ АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФОВ: БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ



Ю.С. Герасимова¹, магистрант

¹Уральский Федеральный университет имени
первого Президента России Б.Н. Ельцина



Д.Н. Федоров², научный сотрудник,

канд.биол.наук, ²Пушкинский
государственный естественно-научный
институт, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН

Ключевые слова: аэробные метилотрофные бактерии; 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаза; *Methylobacterium*; *Amycolatopsis methanolica* 239; D-цистеиндесульфогидраза; фитосимбиоз

1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаминаза - ключевой фермент, участвующий в деградации предшественника фитогормона этилена. На данный момент является слабо изученным, несмотря на его важную роль в фитосимбиозе. В последнее время считается, что сероводород (H_2S) вносит существенный вклад в регуляцию роста и развития растений, а также стрессового ответа. Однако молекулярные механизмы, действующие в растениях, недостаточно изучены, но достоверно известно, что одним из ферментов биосинтеза H_2S является D-цистеиндесульфогидраза.

Изучено распространение генов *acdS* и *dcyD*, кодирующих ключевые ферменты повышения устойчивости растений бактериями АЦК-деаминазу и D-цистеиндесульфогидразу, у аэробных метилотрофов рода *Methylobacterium*. И характеризуется АЦК-деаминаза из факультативно метилотрофного актиномицета *Amycolatopsis methanolica* 239.

В результате ПЦР-скрининга были обнаружены и секвенированы *acdS* из *Methylobacterium goesingense* DSM 21331 и *dcyD* из *Methylobacterium trifolii* DSM 23632 и *Methylobacterium gnaphalii* 23e DSM 24027, а также был проведен филогенетический анализ.

Впервые для представителей филума Actinobacteria была клонирована и охарактеризована АЦК-деаминаза из *Amycolatopsis methanolica* 239, что свидетельствует о

потенциальной способности этой бактерии вступать в симбиоз с растениями. Определены основные свойства: значение константы Михаэлиса-Ментен (K_m) фермента составило 1.7 ± 0.2 мМ, каталитическая константа фермента (k_{cat}) - $5,1 \pm 0,2$ мин⁻¹. Фермент является тиридоксаль-зависимым гомотетрамером с молекулярной массой 144 кДа. АЦКД из *A. Methanolica* 239 проявляла наибольшую активность в 50 мМ Tris-HCl при pH 8.5 и температуре 60° С.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований метаболических основ связи метилотрофных бактерий с растениями

1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATED DEAMINASES FROM AEROBIC METHYLOTROPHS:

BIOCHEMICAL AND PHYLOGENETIC ASPECTS

J.S. Gerasimova¹, D.N. Fedorov²

¹Ural Federal University named after the first president of Russia B.N. Yeltsin, master student;

²Pushchino State Institute of Natural Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, research associate, PhD.

Keywords: aerobic methylotroph; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase; *Methylobacterium*; *Amycolatopsis methanolica* 239; D-cysteine desulphydrase; plant-bacterial interactions

The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases, the key enzymes of degradation of the precursor of the phytohormone ethylene, and have been poorly studied despite their great importance for plant-bacterial interactions. Last time there is an opinion, H₂S takes important part in growth and development regulation of plants and stress answer. However, molecular mechanisms of H₂S action in plants are poorly understood, although it is clear that key enzymes for hydrogen sulfide biosynthesis are D-cysteine desulphydrases.

*Studied the spread of gene *acdS* and *dcyD*, which code key enzymes for increasing plants stability by bacteria, ACC-deaminase and D-cysteine desulphydrase of aerobic methylotrophs genus *Methylobacterium*. And characterized ACC-deaminase from facultative methylotrophic actinomycetes *Amycolatopsis methanolica* 239.*

*In result of research there were detected and sequenced genes *acdS* from *Methylobacterium goesingense* DSM 21331 and *dcyD* from *Methylobacterium trifolii* DSM 23632 and *Methylobacterium gnaphalii* 23e DSM 24027, and also constructed phylogenetic tree which was based on the translated amino acid sequence of proteins.*

*For the first time ACC-deaminase was cloned and characterized from bacteria of phylum Actinobacteria *A. methanolica* 239, what says about her supposed ability to be in symbiosis with plants. The enzyme had K_m 1.7 ± 0.2 мМ. The k_{cat} values were $5,1 \pm 0,2$ мин⁻¹. *AcidS* is homotetramer with a molecular mass of 144 kDa. The purified enzyme displayed the maximum activity at 60 °C and pH 8.5.*

Results can be used for next researches of metabolic foundations plant-bacterial interactions.

Аэробные метиловобактерии, использующие окисленные и замещенные производные метана (но не CH₄), широко распространены в природе и часто ассоциированы с растениями. Эти ассоциации постоянны и обусловлены тем, что с одной стороны, метилотрофы потребляют

метанол, выделяемый растениями через устьица в окружающую среду, с другой стороны, стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов и витаминов [2]. Наиболее изученными микотрофными симбионтами являются представители рода *Methylobacterium* [2,3].

Также одним из ключевых механизмов влияния бактерий на развитие растений является способность снижать уровень этилена за счет активности 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы (АЦК-деаминазы) [5]. Этот фермент катализирует гидролиз 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК), непосредственного предшественника в биосинтезе этилена, до α -кетобутирата и ионов аммония (Рисунок 1).

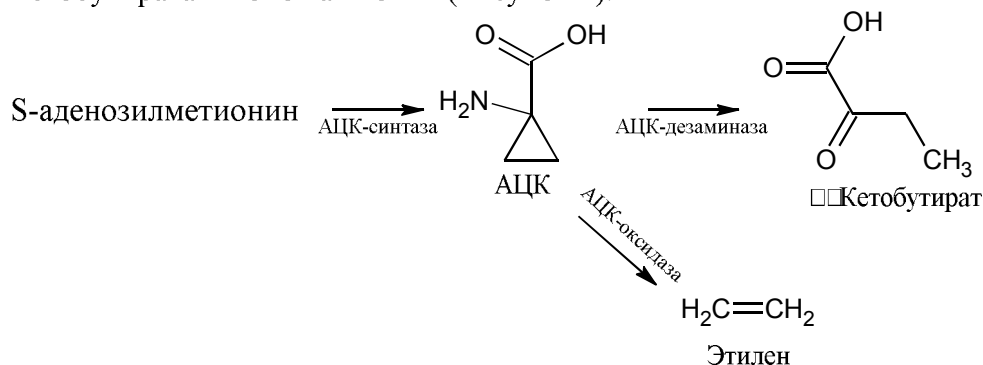


Рисунок 1 - Метаболизм 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК)

Показано, что бактерии, обладающие АЦКД, способствуют повышению устойчивости растений к различным негативным воздействиям, таким как засуха, засоленность почвы, загрязнение тяжелыми металлами, присутствие фитопатогенов [5].

Amycolatopsis methanolica 239 – представитель филума *Actinobacteria*, одна из немногих грамположительных бактерий, обитающих в почве и использующих метанол в качестве ростового субстрата [6]. Актиномицеты являются типичными почвенными бактериями, и сведения об их возможном симбиозе с растениями отсутствуют. Однако на это может указывать наличие в геноме *A. methanolica* гена *acdS* – структурного гена АЦК-деаминазы.

В последнее время считают, что H_2S принимает большое участие в регуляции роста и развития растений, а также стрессового ответа. Изучение генов *acdS* затрудняется высоким сходством с геном *dcyD*, кодирующим D-цистеиндесульфогидразу – один из ферментов биосинтеза сероводорода [2,3,4].

Несмотря на то, что у многих бактерий обнаружена АЦК-деаминая активность, очищены и охарактеризованы только четыре фермента (Таблица 1). АЦК-деаминазы представителей филума *Actinobacteria* не известны. Кроме того, ранее установлено, что микотрофы имеют D-цистеиндесульфогидразу и АЦК-деаминазу.

Цель данной работы – изучение распространения генов *acdS* и *dcyD* среди представителей рода *Methylobacterium*, клонирование гена *acdS* и характеристика фермента АЦК-деаминазы из *Amycolatopsis methanolica* 239.

В ходе исследования проведен ПЦР-скрининг среди 29 коллекционных штаммов микотрофных бактерий рода *Methylobacterium*, большинство из которых выделены из растений и являются фитосимбионтами.

Ген *acdS* обнаружен, очищен и секвенирован только у *Methylobacterium goesingense* DSM 21331. Стоит отметить, что гены, кодирующие АЦК-деаминазу, проявляют высокую

аминокислотную идентичность (65-99%) и среди бактерий распространены только у ассоциированных с растениями, что указывает на значение этого фермента в фитосимбиозе [1,3]. (Рисунок 2)

Ген *dcyD* обнаружен и секвенирован у *Methylobacterium trifolii* DSM 23632 и *Methylobacterium gnaphalii* 23е DSM 24027. В отличие от АЦК-деаминаз, аминокислотная последовательность D-цистеиндесульфогидраз среди бактерий различного таксономического положения проявляла невысокий уровень сходства (40-50%). Однако наличие гена *dcyD* также вероятно свидетельствует о способности бактерий образовывать ассоциации с растениями [4] (Рисунок 3)

Примечательно, что ни один из штаммов не обладал двумя генами *acdS* и *dcyD* одновременно.

Впервые охарактеризована рекомбинантная АЦК-деаминаза представителя филума *Actinobacteria* - *Amycolatopsis methanolica* 239. И впервые это сделано для грамположительной бактерии. Молекулярная масса фермента 144 кДа, что указывает на гомотетрамерную структуру белка. Значение K_m фермента составило 1.7 ± 0.2 мМ, каталитическая константа ($k_{cat} = 5.1 \text{ мин}^{-1}$) значительно ниже, чем у всех ранее охарактеризованных ферментов.

Температурный оптимум фермента наблюдали при 60°C, наибольшая активность - в 50 мМ Tris-HCl при pH 8.5. Проведена сравнительная характеристика ферментов, ранее выделенных из других бактерий, что позволило выявить закономерности в их структуре и свойствах (Таблица 1).

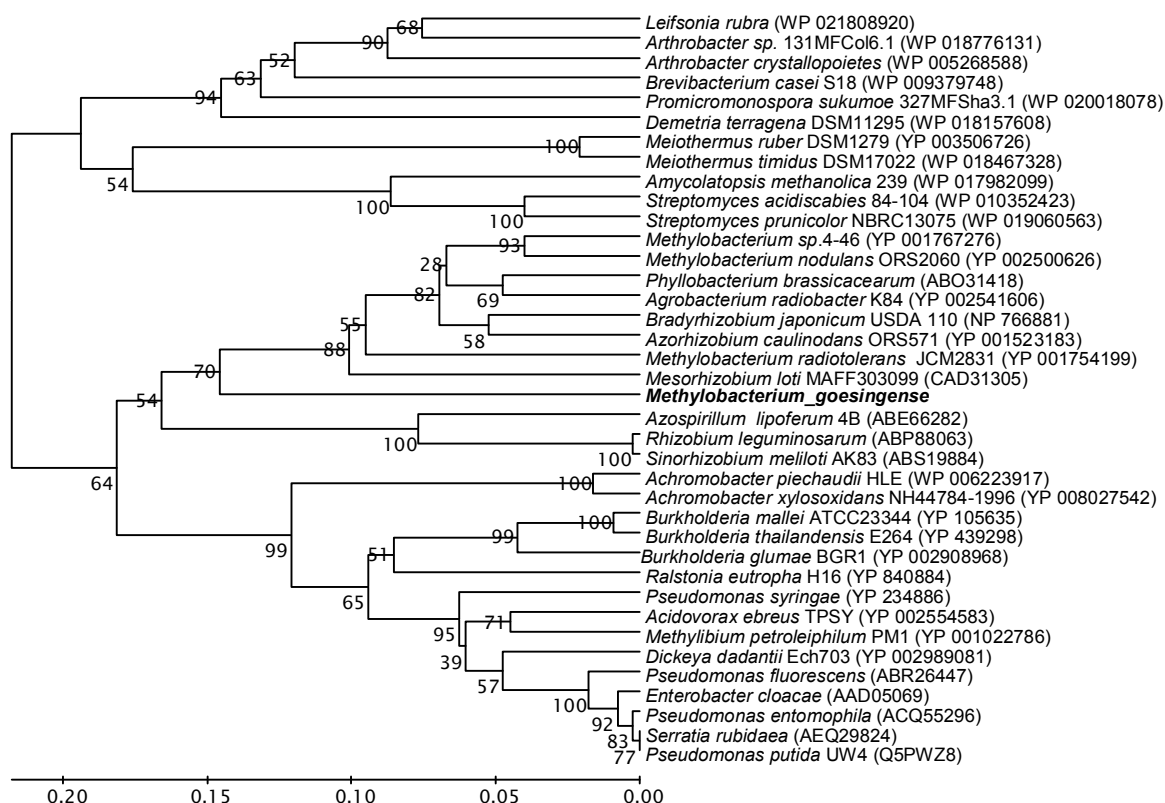


Рисунок 2 - Филогенетическое дерево, построенное на основании транслированных аминокислотных последовательностей АЦК-деаминаз бактерий. Охарактеризованные ферменты выделены жирным шрифтом

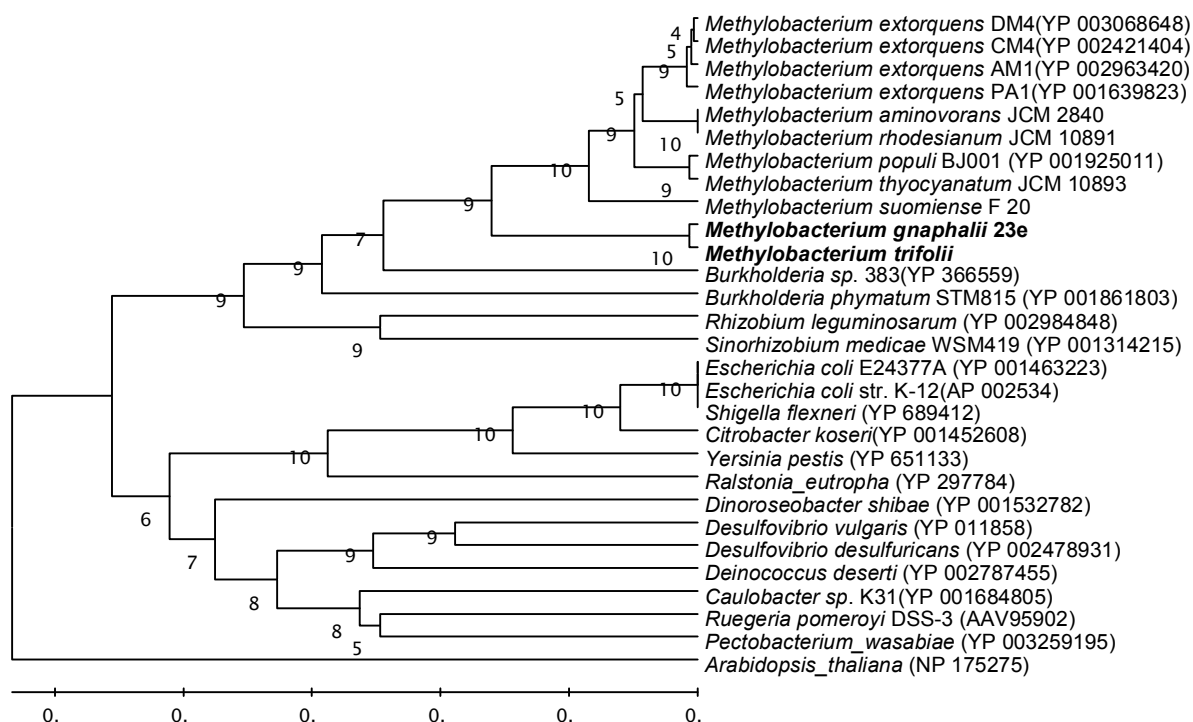


Рисунок 3 - Филогенетическое дерево, построенное на основании транслированных аминокислотных последовательностей D-цистеиндесульфогидаз бактерий. Охарактеризованные ферменты выделены жирным шрифтом

Таблица 1 - Сравнительная характеристика АЦК-дезаминаз

Характеристика	<i>M. nodulans</i> ORS2060	<i>M. radiotolerans</i> JCM2831	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> UW4	<i>Cyberlindera</i> <i>saturnus</i>	<i>A. methanolic</i> 239
K_m , мМ	0,80±0,04	1,8±0,3	3,4±0,2	2,6	1,7±0,2
k_{cat} , мин ⁻¹	111,8±0,2	65,8±2,8	146±5	-	5,1±0,2
pH-оптимум	8,0	8,0	8,0	9,0	8,5
Температурный оптимум, °C	50	45	37	-	60
Структура	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 168 кДа	Мономер 69 кДа	Гомотетрамер 144 кДа
Кофактор		Пиридоксальфосфат			
Ссылка	Fedorov et al, 2013	Fedorov et al, 2013	Hontzeas et al., 2004	Honma and Shimomura, 1978	Данная работа

В целом, филогения АЦКД коррелирует с филогенией генов 16S рРНК, тем не менее имеются данные о существенной роли горизонтального переноса в распространении и эволюции гена *acdS*, в том числе между царствами (рисунок 4) [1,3,7]. Отмечено, что кинетические характеристики АЦК-дезаминазы, вероятно, зависят от местообитания бактерии.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований метаболических основ связи митилотрофных бактерий с растениями.

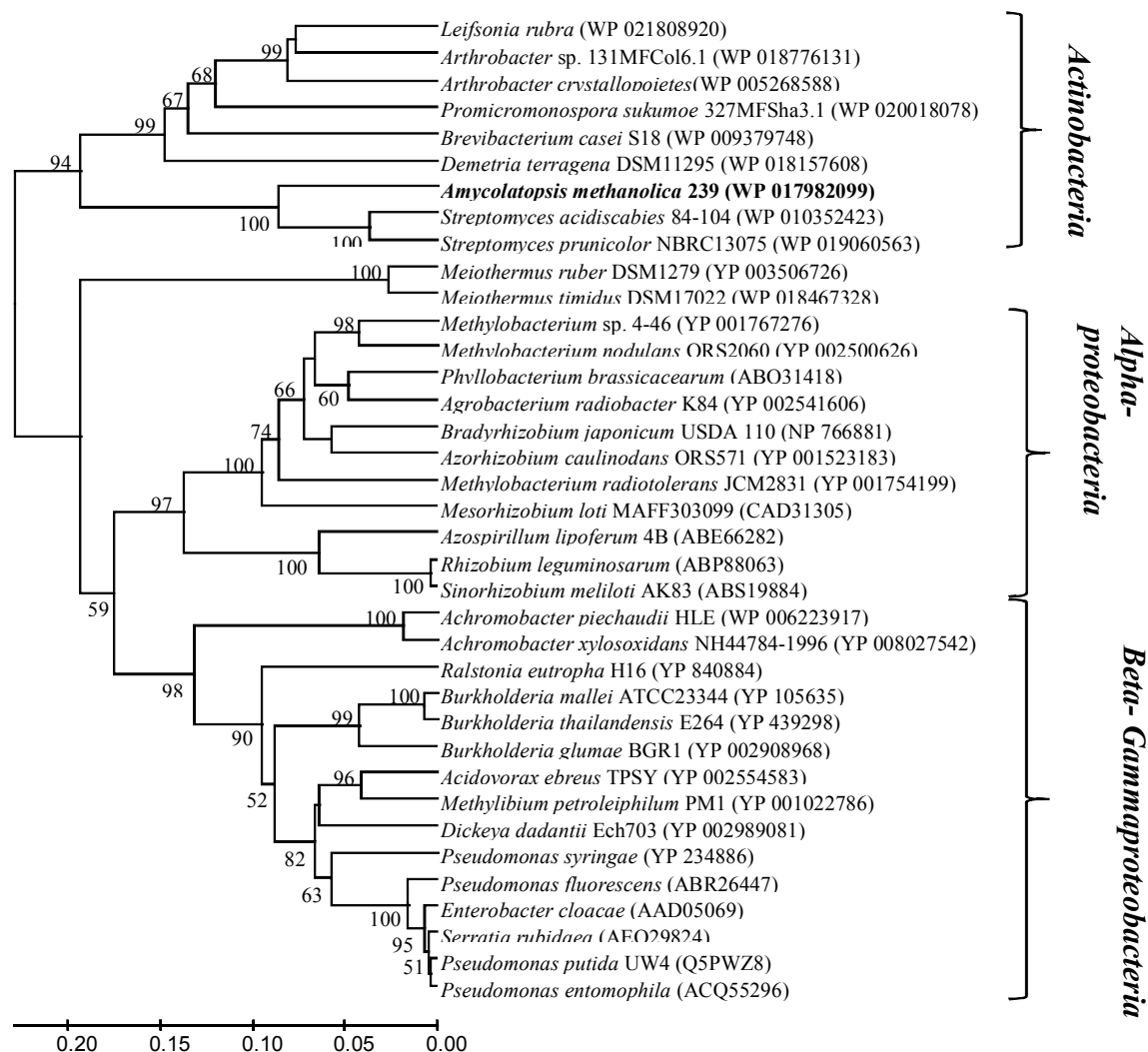


Рисунок 4 - Филогенетическое дерево, построенное на основании транслированных аминокислотных последовательностей белка AcdS *Amycolatopsis methanolica* 239

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 1 Екимова Г.А., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы аэробного факультативно митилотрофного актиномицета *Amycolatopsis methanolica* 239 // Микробиология. – 2015. – Т.84.- С.493 – 499
- 2 Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных митилотрофных бактерий: новые факты и гипотезы // Микробиология. – 2011. – Т.80. – С.435-446
- 3 Fedorov D.N, Ekimova G.A, Doronina N.V, Trotsenko Y.A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and

- Methylobacterium nodulans with higher specificity for ACC // FEMS Microbiol. Lett. - 2013. - V. 343. - P. 70–76.
- 4 Fedorov D.N, Ekimova G.A, Doronina N.V, Trotsenko Y.A. Characterization of H₂S-producing enzyme D-cysteine desulphydrase from epiphytic methylotroph Methylobacterium extorquens AM1 // FEMS Microbiol. Lett. – 2015
 - 5 Glick B.R., Todorovic B., Czarny J. Cheng Z., Duan J., McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // Crit. Rev. Plant Sci. 2007. V. 26. P. 227-242.
 - 6 L. de Boer, L. Dijkhuizen, G. Grobбен, M. Goodfellow, E. Stackebrandt, J. H. Parlett, D. Whitehead, D. Witt Amycolatopsis methanolica sp. nov. a Facultatively Methylotrophic Actinomycete // IJSEM 1990, p. 194-204
 - 7 Nascimento F.X., Rossi M.J., Soares C.R.F.S., McConkey B.J., Glick B.R. New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance // PLOS ONE. - 2014. - V.9.