

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.121

А.Ю. ГУЛЕВИЧ^{1,*}, М.С. СКОНЕЧНЫЙ², А.В. СУХОЖЕНКО¹, А.Ю. СКОРОХОДОВА¹, В.Г. ДЕБАБОВ¹

¹ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

²ФГАОУ высшего образования “Российский университет дружбы народов”, Москва, 117198

e-mail: gulevich@genetika.ru

Исследование аэробного биосинтеза 4-гидроксимасляной кислоты клетками *Escherichia coli* при гетерологичной экспрессии гена 2-кетоглутарат-декарбоксилазы

Ген Rv1248c (*kgd*) *Mycobacterium tuberculosis* был экспрессирован в рекомбинантном штамме *E. coli* с инактивированными путями смешаннокислотного брожения и анаэробной генерации ацетил-КоА, а также с модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы и измененной регуляцией гена *udfG*, кодирующего NADPH-зависимую дегидрогеназу гидроксикарбоновых кислот. Установлено, что при интенсивном формировании 2-кетоглутарата в ходе аэробной утилизации глюкозы синтез 4-гидроксимасляной кислоты рекомбинантным штаммом *E. coli* возможен не только при прямой конверсии 2-кетоглутарата в сукцинат-полуальдегид под действием чужеродной ферментативной активности, но и в результате вовлечения соответствующего интермедиата цикла трикарбоновых кислот в каскад нативных биохимических реакций. Индуцированная экспрессия гена 2-кетоглутарат-декарбоксилазы в клетках рекомбинантного штамма обеспечивала эффективную конверсию 2-кетоглутарата в производные сукцинат-полуальдегида; при этом концентрация синтезированной 4-гидроксимасляной кислоты достигала 0,3 мМ и лимитировалась, по-видимому, активностью фермента, катализирующего терминальную стадию восстановления предшественника.

Ключевые слова: 4-гидроксимасляная кислота, 2-кетоглутарат-декарбоксилаза, *Escherichia coli*.

Гамма-бутиролактон (ГБЛ) — промышленно значимый химикат, находящий широкое применение в полимерной химии, при синтезе пестицидов, гербицидов, витаминов и лекарственных средств. В настоящее время ГБЛ получают химическим синтезом путем гидрирования малеинового ангидрида или же дегидрирования 1,4-бутандиола — веществ, являющихся продуктами нефтепереработки [1]. Однако ГБЛ легко образуется при

циклизации 4-гидроксимасляной кислоты (4-ГМК), являющейся интермедиатом центрального метаболизма ряда микроорганизмов, что обуславливает потенциальную возможность получения данного вещества путем микробного синтеза из возобновляемого сырья. Тем не менее, недостаточная изученность представителей соответствующих видов микроорганизмов ограничивает возможность создания на их основе промышленных штаммов —

Гулевич Андрей Юрьевич, Сконечный Михаил Сергеевич, Сухоженко Алексей Владимирович, Скороходова Александра Юрьевна, Дебабов Владимир Георгиевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ГБЛ — гамма-бутиролактон; 4-ГМК — 4-гидроксимасляная кислота; ИПТГ — изопропил-β-D-тиогалактозид; КЖ — культуральная жидкость; ПЦР — полимеразная цепная реакция; СПА — сукцинат-полуальдегид; среда LB — среда Лурия-Бертани; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот; NADPH — никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный.

* Автор для переписки.

продуцентов 4-ГМК. Благодаря хорошо изученному метаболизму и развитому генно-инженерному инструментарию бактерии *E. coli* традиционно используются для создания на их основе высокоэффективных рекомбинантных продуцентов химических веществ с высокой добавленной стоимостью. 4-ГМК не является природным метаболитом клеток *E. coli*, вместе с тем обладающих активностью оксидоредуктаз, способных осуществлять формирование 4-ГМК при восстановлении сукцинат-полуальдегида (СПА). С биохимической точки зрения СПА может быть рассмотрен как продукт декарбоксилирования 2-кетоглутарата или восстановления сукцинил-КоА, консервативных интермедиатов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Действительно, анаэробный биосинтез 4-ГМК из глюкозы в результате катализа соответствующих реакций гетерологичными ферментами был продемонстрирован в клетках *E. coli* [2] и *Mannheimia succiniciproducens* [3]. Следует отметить, что биосинтез 4-ГМК с формированием СПА из 2-кетоглутарата более термодинамически выгоден, чем из сукцинил-КоА, благодаря процессу необратимого декарбоксилирования субстрата [4]. Вместе с тем, анаэробная конверсия глюкозы в 4-ГМК с участием оксидативной ветви ЦТК сопряжена с генерацией избыточных восстановленных эквивалентов и таким образом является окислительно-восстановительно несбалансированной. В данной связи аэробные условия представляются более предпочтительными для реализации эффективных процессов микробного синтеза 4-ГМК из глюкозы.

Целью данной работы являлось исследование принципиальной возможности аэробного биосинтеза 4-ГМК из глюкозы клетками *E. coli* при гетерологичной экспрессии 2-кетоглутарат-декарбоксилазы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, праймеры, плазмиды и среды. Используемые в работе штаммы, праймеры и плазмиды представлены в табл. 1. Штамм *E. coli* SGM1.0ΔptsG P_Lglk P_{tac}galP [5], обозначенный как MSG1.0, был взят в качестве исходного для конструирования использованных в работе рекомбинантных штаммов. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB и SOC [6] с добавлением при необходимости ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Реагенты. Использовали препараты рестриктаз и T4 ДНК-лигазы (Fermentas, Литва), ДНК-полимеразы *Taq* (Fermentas) и Phusion (Finnzymes,

Финляндия). Олигонуклеотидные праймеры (см. табл. 1) были синтезированы в ЗАО “Синтол” (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и выделяли, используя QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты были производства Panreac (Испания) и Sigma (США).

Конструирование штаммов и плазмид. Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [7]. Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *ydfG* искусственным генетическим элементом P_{trc-ideal-4}-SDφ10, содержащим эффективно репрессирующийся сильный LacI-зависимый промотор и эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, осуществлялось в несколько стадий. На первой стадии с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий в начале участок узнавания *Bgl*II, промотор P_{trc-ideal-4}, последовательность SD гена φ10 из фага T7 и наконец 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *ydfG*. Фрагмент получали в два этапа. На первом этапе в качестве матрицы использовали плазмиду pMW-O_{lac-ideal}-P_{trc}/O_{lac-ideal}-lacZ [8] и на этой основе получили фрагмент ДНК, содержащий в начале участок узнавания *Bgl*II, промотор P_{trc-ideal-4} и часть последовательности SD гена φ10 из фага T7. ПЦР проводили с применением праймеров P1 и P2. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующем раунде ПЦР с использованием праймеров P1 и P3. Праймер P3 содержал область, комплементарную 3'-концу промотора P_{trc-ideal-4}, последовательность SD гена φ10 из фага T7 и 36 нуклеотидов из рамки считывания гена *ydfG*. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагмента ДНК: фрагмент, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, непосредственно предшествующему кодирующей области гена *ydfG*, был получен при помощи ПЦР с использованием праймеров P4 и P5 и плазмиды pMW118-(*attL*-Cm-*attR*) [9] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P3 и P4. Полученный ПЦР-продукт был использован для интеграции в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Соответствие запланированной и экспериментально полу-

Использованные штаммы, плазмиды и нуклеотидные праймеры

Объект	Генотип, последовательность	Источник, ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MSG1.0	<i>E. coli</i> MG1655 (Δ ackA-pta, Δ proxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P _{Lglk} , P _{lacgalP})	[5]
MSGM1.0	<i>E. coli</i> MG1655 (Δ ackA-pta, Δ proxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P _{Lglk} , P _{lacgalP} , P _{trc-ideal-4-ydfG})	Данная работа
MSGM1.1	<i>E. coli</i> MG1655 (Δ ackA-pta, Δ proxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, Δ pflB, P _{Lglk} , P _{lacgalP} , P _{trc-ideal-4-ydfG})	То же
Плазмида		
pMW-O _{lac-ideal} -P _{trc} / O _{lac-ideal} -lacZ	pSC101, bla, O _{lac-ideal} -P _{trc} /O _{lac-ideal} -lacZ	[8]
pMW118- (λ attL-Cm- λ attR)	pSC101, bla, cat, λ attL-cat- λ attR	[9]
pKD46	pINT-ts, bla, P _{araB} - λ gam-bet-exo	[7]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, bla, P _R - λ xis-int, cIts857	[10]
pMW119	pSC101, bla, cat	GenBank AB005476.2
pMW119-kgd	pMW119, Rv1248c <i>M. tuberculosis</i>	Данная работа
Праймер		
P1	5'-tgcgacagatctgaattgtgagcgtcacaattggatc-3'	Данная работа
P2	5'-cttcgctcacaattccacacattataattgtgagcgtcacaatgtcaac-3'	То же
P3	5'-aaaacctgcccgttgctccagttaactaaaacgatcat atgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'	—"
P4	5'-tgttattgacacacaaaagcgttgaggaacagtgga gctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'	—"
P5	5'-ctagtaagatcttgaaagcctgctttttataactaagtgg-3'	—"
P6	5'-cgaggtgttccatagcgtag-3'	—"
P7	5'-ctcctgcaaccgttctgg-3'	—"
P8	5'-catgtccgagcttaatagaaaagtagccacagcctg cgtcaagtagtataaaaaagctgaac-3'	—"
P9	5'-ttacatagattgagtgaaaggtacgagtaataacgtctgaagcctgc ttttataactaagtgg-3'	—"
P10	5'-gtcatttacctgcgtgaaaacg-3'	—"
P11	5'-gacattgcgggtgttctccag-3'	—"
P12	5'-agtaattctagaaggagcagacatggccaacataagttcaccattc-3'	—"
P13	5'-gacagtgaattctacgccgagcatcggtacc-3'	—"

ченной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, вставленного в полученных клонках перед кодирующей областью гена *ydfG*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P6 и P7.

Линейный фрагмент ДНК для инактивации гена *pflB*, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P8, P9 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [9] в качестве матрицы. Полученный фрагмент ДНК был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемой и полученной экспериментально структуры хромосомы отобранного штамма с индивидуально инактивированным геном *pflB* подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локусов-специфичных праймеров P10 и P11.

Штаммы MSGM1.0 и MSGM1.1 были сконструированы путем введения полученных индивидуальных модификаций в хромосому штамма MSG1.0 с помощью последовательных P1-зависимых трансдукций [6]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [10].

Ген Rv1248c (*kgd*) *Mycobacterium tuberculosis*, кодирующий 2-кетоглутарат-декарбоксилазу (КФ 4.1.1.71), был клонирован в составе плазмиды pMW119. Фрагмент ДНК, содержащий ген *kgd* с последовательностью SD гена *aroG E. coli* был получен с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы хромосомы штамма *M. tuberculosis* H37Rv и праймеров P12 и P13. Этот ПЦР-продукт был в дальнейшем последовательно обработан эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Eco*RI. Параллельно действию тех же эндонуклеаз была подвергнута плазида pMW119. Полученные линейные фрагменты ДНК, содержащие ген *kgd* и большой *Xba*I-*Eco*RI фрагмент плазмиды pMW119, были лигированы с помощью T4 ДНК-лигазы. Данной лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* MG1655 с последующим отбором Ap^R-трансформантов на агаризованной среде LB, содержащей 100 мг/л ампициллина. Выделенная по стандартной методике из соответствующих трансформантов плазида была названа pMW-kgd. Корректность нуклеотидной последовательности гена *kgd* в составе полученной плазмиды подтверждали секвенированием.

Трансформацию штамма MSGM1.1 плазмидами pMW119 и pMW-kgd осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов для биосинтеза 4-гидроксимасляной кислоты. Клетки штамма MSGM1.1 [pMW-kgd], а также контрольных штаммов MSGM1.1 [pMW119] и MG1655 выращивали в течение ночи в среде LB при 37°. Полученные ночные культуры (0,05 мл) разбавляли в 100 раз, добавляя 4,95 мл среды LB, содержащей или не содержащей 10 г/л глюкозы, и инкубировали в течение 24 ч в пробирках размером 20×200 мм с вентилируемыми пробками при 37° на роторной качалке при 250 об/мин. Индукцию экспрессии генов *kgd* и *ydfG* осуществляли при добавлении ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. При работе со штаммами MSGM1.1 [pMW-kgd] и MSGM1.1 [pMW119] среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g и в полученных супернатантах определяли концентрацию секретируемых метаболитов. Все эксперименты повторяли не менее трех раз, результаты повторных экспериментов варьировали в диапазоне значений, не превышающих 15%.

Аналитические методы. Концентрацию органических кислот в культуральной жидкости (КЖ), освобожденной от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы Waters HPLC system (Waters, США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (300×7,8 мм, 8 мкм, Phenomenex, США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2,5 мМ) со скоростью потока 0,5 мл/мин.

Идентификацию и количественный анализ 4-ГМК в КЖ осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Пробоподготовка включала экстракцию целевого анализа из КЖ, упаривание экстракта в токе азота и дериватизацию с получением триметилсилильного производного. Газохромато-масс-спектрометрический анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N, укомплектованном масс-селективным детектором Agilent 5975 MSD (Agilent, США). Система была оснащена капиллярной колонкой Agilent DB-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм. В качестве газа-носителя использовали гелий. Пробу вводили в испаритель в режиме деления потока 1:20; температура испарителя и интерфейса составляла 230°. Температурная программа термостата колонки была следующей: начальная изотерма — 3 мин при 60° с последующим линейным градиентом до 230° со скоростью

5°/мин; конечная изотерма — 5 мин при 230°. Ионизация аналита была проведена с помощью электронного удара. Температура ионного источника масс-спектрометра составляла 230°. Масс-анализатор функционировал в режиме сканирования в диапазоне 40—400 *m/z*. Идентификацию и количественный анализ проводили с помощью программы AMDIS и стандартизированной базы масс-спектров NIST 2008. Для идентификации 4-ГМК использовали библиотечные данные (индекс удерживания и масс-спектр).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аэробный биосинтез 4-ГМК клетками *E. coli* был исследован с использованием направленно сконструированного штамма MSGM1.1, обладающего инактивированными генами *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA*, *adhE*, *ptsG*, *pflB*, кодирующими ацетаткиназу (КФ 2.7.2.1), фосфотрансацетилазу (КФ 2.3.1.8), пируватоксидазу (КФ 1.2.5.1), лактатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.28), альдегид/алкоголь-дегидрогеназу (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3), пируват-формиат-лиазу (КФ 2.3.1.54) и пермеазу глюкозы, соответственно, а также усиленной экспрессией генов *galP*, *glk*, *ydfG*, кодирующих H⁺-симпортер галактозы, глюкокиназу (КФ 2.7.1.2) и дегидрогеназу гидроксикарбоновых кислот (КФ 1.1.1.276). Данный штамм был получен при последовательной замене в штамме MSG1.0 нативной регуляторной области гена *ydfG* искусственным промотором P_{trc-ideal-4} [8] и делеции гена *pflB*. Штамм MSG1.0 был выбран в качестве базового потому, что в результате инактивации в нем путей смешаннокислотного брожения и модификации системы транспорта и фосфорилирования глюкозы данный штамм способен аэробно потреблять глюкозу без характерной для клеток *E. coli* интенсивной секреции в среду продуктов избыточного метаболизма [5]. В клетках *E. coli* несколько ферментов потенциально способны катализировать восстановление СПА в 4-ГМК: NADPH-зависимая альдегидредуктаза YqhD (КФ 1.1.1.2), NADH-зависимая 3-сульфолактальдегид-редуктаза YihU (КФ 1.1.1.61) и NADPH-зависимая дегидрогеназа гидроксикарбоновых кислот YdfG (КФ 1.1.1.276). Поскольку образование 2-кетоглутарата в ЦТК сопряжено с генерацией NADPH, в качестве терминального фермента для биосинтеза 4-ГМК в настоящей работе была выбрана одна из двух указанных NADPH-зависимых оксидоредуктаз — дегидрогеназа YdfG. Так как в клетках *E. coli* ацетил-КоА, необходимый для функционирования ЦТК, синтезируется

в зависимости от условий аэрации либо пируватдегидрогеназой, либо пируват-формиат-лиазой, ген *pflB* в штамме MSGM1.1 был инактивирован с целью обеспечения возможности исключительно аэробного образования 2-кетоглутарата в оксидативной части ЦТК. Для придания клеткам способности конвертировать 2-кетоглутарат в СПА ген Rv1248c (*kgd*) *M. tuberculosis*, кодирующий 2-кетоглутарат-декарбоксилазу (КФ 4.1.1.71), был введен в штамм MSGM1.1 в составе плазмиды pMW119 под контролем LacI-зависимого промотора P_{lacUV5}.

Для исследования биосинтеза 4-ГМК штаммы MG1655, MSGM1.1 [pMW119] и MSGM1.1 [pMW119-*kgd*] культивировали при интенсивной аэрации в богатой среде LB, содержащей 10 г/л глюкозы. В данных условиях активность 2-кетоглутарат-дегидрогеназы в клетках *E. coli* значительно снижена [11], что обуславливает, в частности, секрецию глутаминовой кислоты, производного 2-кетоглутарата, мутантами, дефицитными по фосфотрансацетилазе [12]. Таким образом, приведенные условия культивирования должны способствовать повышению доступности 2-кетоглутарата для биосинтеза целевого вещества. Статистически достоверные концентрации метаболитов, секретированных штаммами в результате 24 ч культивирования, приведены в табл. 2.

Основным продуктом утилизации глюкозы штаммом MG1655 ожидаемо являлась уксусная кислота, значительные количества которой были накоплены штаммом в результате эффекта избыточного метаболизма. При этом штамм не секретировал значимые количества других метаболитов за исключением яблочной и янтарной кислот и не синтезировал 4-ГМК. Фоновая продукция яблочной и янтарной кислот, отмеченная для всех штаммов при культивировании в среде LB с глюкозой, являлась, очевидно, результатом активации глиоксилатного шунта [13] (см. табл. 2).

В отсутствие экспрессии генов *ydfG* и *kgd* штаммы MSGM1.1 [pMW119] и MSGM1.1 [pMW119-*kgd*] в отличие от штамма MG1655 накапливали значительно меньшие количества уксусной кислоты, секретировав при этом в среду 2-кетоглутарат. Неожиданным являлся достоверный синтез штаммами значимых количеств 4-ГМК (0,1 мМ) (см. табл. 2). Поскольку синтез 4-ГМК наблюдался и для штамма MSGM1.1 [pMW119], не несущего ген гетерологичной 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, данный факт свидетельствовал о способности рекомбинантных штаммов *E. coli* в определенных условиях синтезировать целевое вещество в результате действия нативных ферментов.

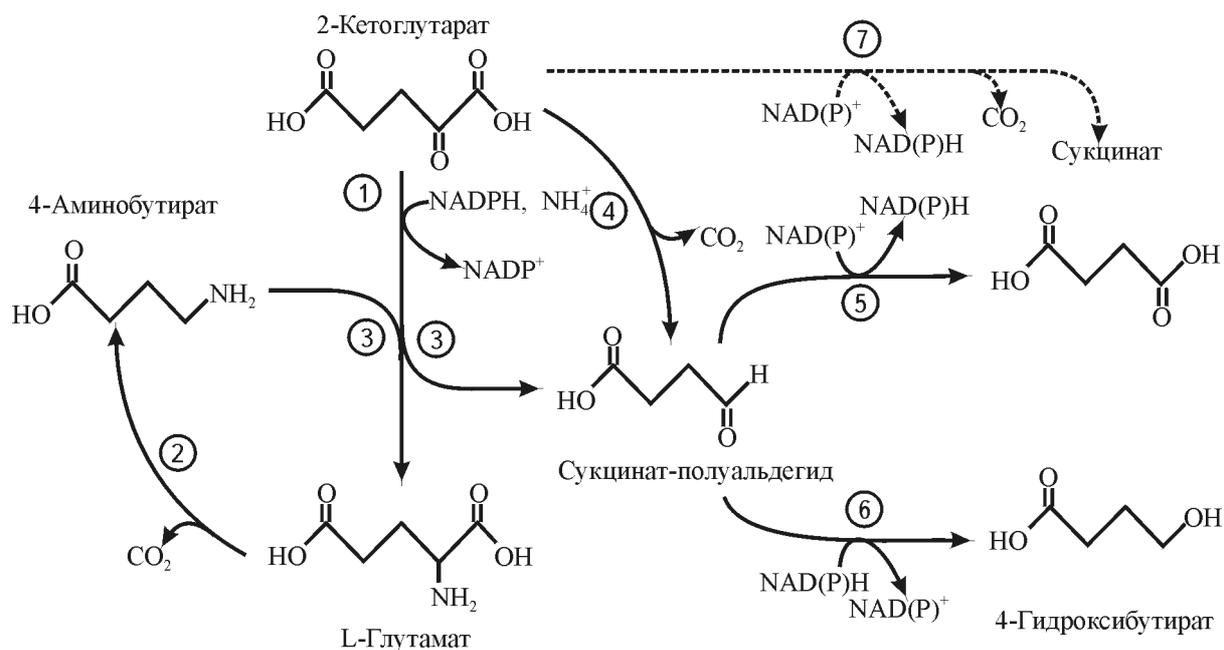
Статистически достоверные концентрации метаболитов, синтезированных исследованными штаммами при культивировании в аэробных условиях

Штамм	ИПТГ	Пиро- виноградная кислота, мМ	Уксусная кислота, мМ	Яблочная кислота, мМ	Янтарная кислота, мМ	2-Кето- глутаровая кислота, мМ	4-Гидрокси- масляная кислота, мМ
<i>Среда LB + 10 г/л глюкозы</i>							
MG1655	–	0,7	57,0	1,2	1,6	–	–
MSGM1.1 [pMW119]	–	3,8	7,0	1,1	1,8	2,5	0,1
MSGM1.1 [pMW119-kgd]	–	3,9	6,8	1,0	1,9	2,4	0,1
MSGM1.1 [pMW119-kgd]	+	3,3	9,3	1,7	6,0	–	0,3
<i>Среда LB</i>							
MG1655	–	0,5	2,0	–	–	–	–
MSGM1.1 [pMW119]	–	–	–	1,0	1,6	–	–
MSGM1.1 [pMW119-kgd]	–	–	–	1,0	1,7	–	–
MSGM1.1 [pMW119-kgd]	+	–	–	1,1	1,7	–	–

При индукции экспрессии генов *kgd* и *ydfG* синтез 4-ГМК штаммом MSGM1.1 [pMW119-kgd] повышался на фоне резко возросшего образования янтарной кислоты. Отсутствие в среде 2-кетоглутарата свидетельствовало при этом о его эффективной утилизации в клетках штамма под действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы. СПА, продукт декарбоксилирования 2-кетоглутарата, является общим субстратом оксидоредуктаз, катализирующих реакции восстановления и окисления альдегидной группы с формированием 4-ГМК и янтарной кислоты, соответственно. Так, если формирование 4-ГМК из СПА возможно в результате проявления соответствующей активности белками YqhD, YihU и YdfG, то за окисление СПА с образованием янтарной кислоты в клетках *E. coli* ответственны NADP⁺-зависимая сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа GabD (КФ 1.2.1.79) и NAD⁺-зависимая сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа Sad (КФ 1.2.1.24). При этом известно, что экспрессия гена *sad* значительно возрастает в

присутствии СПА и физиологической ролью фермента Sad является защита клетки от токсичного эффекта данного вещества [14]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о низкой эффективности выбранной дегидрогеназы YdfG в отношении конверсии СПА в 4-ГМК. Синтез 4-ГМК из СПА в исследованных штаммах, вероятно, катализировался альтернативными ферментами. При индуцированной экспрессии гетерологичной 2-кетоглутарат-декарбоксилазы у штамма MSGM1.1 [pMW119-kgd] базальная активность соответствующего фермента(ов) была недостаточна для эффективного восстановления образующегося СПА, что обуславливало компенсаторное окисление последнего в янтарную кислоту под действием сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназы.

На рисунке показаны возможные пути образования 4-ГМК и янтарной кислоты в исследованных рекомбинантных штаммах. Так, в отсутствие 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, при сниженной



Возможные пути образования 4-ГМК и янтарной кислоты в исследованных рекомбинантных штаммах (цифры в кружках): 1 — глутаматдегидрогеназа GdhA/глутаматсинтаза GltBD (КФ 1.4.1.4); 2 — глутаматдекарбоксилаза A/B GadA/GadB (КФ 4.1.1.15); 3 — 4-аминобутират-аминотрансфераза GabT (КФ 2.6.1.19); 4 — 2-кетоглутарат-декарбоксилаза Kgd (КФ 4.1.1.71); 5 — NADP⁺-зависимая сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа GabD (КФ 1.2.1.79) / NAD⁺-зависимая сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа Sad (КФ 1.2.1.24); 6 — NADPH-зависимая альдегидредуктаза YqhD (КФ 1.1.1.2) / NADH-зависимая 3-сульфолактальдегид-редуктаза YihU (КФ 1.1.1.61) / NADPH-зависимая дегидрогеназа гидроксикислот YdfG (КФ 1.1.1.276); 7 — 2-кетоглутарат-дегидрогеназа SucAB, сукцинил-КоА-синтаза SucCD (КФ 6.2.1.5). Косая означает «или — или»

активности 2-кетоглутарат-дегидрогеназы и интенсивном формировании 2-кетоглутарата синтез СПА у штамма MSGM1.1 и его производных возможен в результате переаминирования 2-кетоглутарата и 4-аминобутирата под действием 4-аминобутират-аминотрансферазы GabT (КФ 2.6.1.19). L-Глутамат, образующийся при переаминировании, или же сформированный в результате прямого аминирования 2-кетоглутарата под действием глутаматдегидрогеназы GdhA или глутаматсинтазы GltBD (К.Ф. 1.4.1.4), может служить источником 4-аминобутирата. Реакция декарбоксилирования L-глутамата с образованием 4-аминобутирата в клетках *E. coli* катализируется глутаматдекарбоксилазами GadA и GadB (КФ 4.1.1.15). Присутствие 2-кетоглутарат-декарбоксилазы у штамма MSGM1.1 [pMW119-kgd] обеспечивает дополнительную возможность прямого образования СПА из 2-кетоглутарата. Сформированный в результате действия тех или иных ферментов СПА может быть в дальнейшем восстановлен в 4-ГМК или же окислен с образованием янтарной кислоты соответствующими оксидоредуктазами.

По-видимому, возможность практической реализации указанных путей биосинтеза предполагает необходимость эффективного формирова-

ния в клетке ключевого метаболита-предшественника 2-кетоглутарата наряду со сниженной интенсивностью его вовлечения в конкурентные реакции центрального метаболизма.

С целью проверки данной гипотезы анализировали продукцию метаболитов штаммами MG1655, MSGM1.1 [pMW119] и MSGM1.1 [pMW119-kgd] при аэробном культивировании в среде LB без добавления глюкозы. Среда LB суммарно содержит до 2 г/л глутаминовой кислоты и глутамин, которые используются микроорганизмами в качестве основного источника 2-кетоглутарата [15]. При этом известно, что свободные аминокислоты, входящие в состав среды LB, способны поддерживать рост клеток *E. coli* лишь в течение около 3 ч и полностью исчезают из среды спустя 3,5 ч культивирования [16]. Кроме того, активность 2-кетоглутарат-дегидрогеназы в клетках *E. coli* при аэробном культивировании в среде LB без глюкозы приблизительно в 2,2 раза выше, чем в среде LB с глюкозой [11]. Таким образом, в данных условиях доступность 2-кетоглутарата для синтеза СПА должна быть снижена. Действительно, при культивировании в среде LB штаммы секретируют лишь незначительные количества органических кислот, не формируя заметного коли-

чества 2-кетоглутарата (см. табл. 2). Синтез 4-ГМК ожидаемо отсутствовал не только у штаммов MG1655, MSGM1.1 [pMW119], но и у штамма MSGM1.1 [pMW119-kgd] даже в случае индуцированной экспрессии гетерологичной 2-кетоглутарат-декарбоксилазы. Таким образом, полученные данные подтверждали ранее сделанное предположение и позволяли заключить, что компоненты среды LB не могли служить источником 4-ГМК.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что при аэробной утилизации глюкозы синтез 4-ГМК рекомбинантными штаммами *E. coli* возможен не только при прямой конверсии 2-кетоглутарата в СПА под действием чужеродной ферментативной активности, но и в результате вовлечения соответствующего интермедиата ЦТК в каскад нативных биохимических реакций метаболизма азота и кислотной устойчивости. Несмотря на то, что биосинтез 4-ГМК из глюкозы с прямым декарбоксилированием 2-кетоглутарата является наиболее термодинамически выгодным, выявление возможности биосинтеза целевого вещества нативным ферментативным аппаратом *E. coli* открывает широкие возможности для гибкого конструирования соответствующих рекомбинантных штаммов-продуцентов. Вместе с тем, полученные результаты подтверждают высокий потенциал гетерологичной экспрессии 2-кетоглутарат-декарбоксилазы для вовлечения 2-кетоглутарата в биосинтез производных от СПА веществ. При этом эффективность синтеза непосредственно 4-ГМК клетками модельного штамма MSGM1.1 [pMW119-kgd], по-видимому, лимитировалась исключительно низкой активностью фермента, катализирующего терминальную стадию восстановления СПА.

Авторы выражают благодарность сотруднику Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук Д.В. Зименкову за предоставленную хромосомную ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Получено 6.04.15

ЛИТЕРАТУРА

- Zhu, Y.L. An environmentally benign route to gamma-butyrolactone through the coupling of hydrogenation and dehydrogenation / Y.L. Zhu, J. Yang, G.Q. Dong, H.Y. Zheng, H.H. Zhang, H.W. Xiang, Y.W. Li // Appl. Catal. B-Environ. — 2005. — V.57. — P. 183—190.
- Yim, H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol / H. Yim, R. Haselbeck, W. Niu, C. Pujol-Baxley, A. Burgard, J. Boldt, J. Khandurina, J.D. Trawick, R.E. Osterhout, R. Stephen, J. Estadilla, S. Teisan, H.B. Schreyer, S. Andrae, T.H. Yang, S.Y. Lee, M.J. Burk, S. Van Dien // Nat. Chem. Biol. — 2011. — V.7. — P. 445—452.
- Choi, S. Production of 4-hydroxybutyric acid by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens* and its conversion to γ -butyrolactone by acid treatment / S. Choi, H.U. Kim, T.Y. Kim, W.J. Kim, M.H. Lee, S.Y. Lee // Metab. Eng. — 2013. — V.20. — P. 73—83.
- Efe, C. Options for biochemical production of 4-hydroxybutyrate and its lactone as a substitute for petrochemical production / C. Efe, A.J. Straathof, L.A. van der Wielen // Biotechnol. Bioeng. — 2008. — V.99. — P. 1392—1406.
- Моржакова А.А. Рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения, способные к быстрому аэробному росту на глюкозе при сниженном эффекте Крэбтри // А.А. Моржакова, А.Ю. Скороходова, А.Ю. Гулевич, В.Г. Дебабов // Прикл. биохим. микробиол. — 2013. — Т.49. — № 2. — С. 136—143.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. — 2nd ed. — N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. — 1659 p.
- Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — V.99. — P. 6640—6645.
- Скороходова А.Ю. Введение симметричного *Olac*-ideal в область между “-35” и “-10” гибридного промотора *P_{trc}/Olac* значительно увеличивает эффективность его репрессии белком LacI / А.Ю. Скороходова, Д.В. Зименков, А.Ю. Гулевич, Н.И. Минаева, И.В. Бирюкова, С.В. Машко // Биотехнология. — 2006. — №3. — С. 1—14.
- Каташкина Ж.И. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме / Ж.И. Каташкина, А.Ю. Скороходова, Д.В. Зименков, А.Ю. Гулевич, Н.И. Минаева, В.Г. Дорошенко, И.В. Бирюкова, С.В. Машко // Мол. биология. — 2005. — Т.39. — № 5. — С. 823—831.
- Гулевич А.Ю. Новый метод конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами в бактериальной хромосоме / А.Ю. Гулевич, А.Ю. Скороходова, В.Ю. Ермишев, А.А. Крылов, Н.И. Минаева, З.М. Полонская, Д.В. Зименков, И.В. Бирюкова, С.В. Машко // Мол. биология. — 2009. — Т.43. — № 3. — С. 547—557.
- Park, S.J. Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter / S.J. Park, G. Chao, R.P. Gunsalus // J. Bacteriol. — 1997. — V.179. — P. 4138—4142.
- Chang, D.E. Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival / D.E. Chang, S. Shin, J.S. Rhee, J.G. Pan // J. Bacteriol. — 1999. — V.181. — P. 6656—6663.

13. Vemuri, G.N. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli* / G.N. Vemuri, V.A. Eiteman, E. Altman // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — V.68. — P. 1715—1727.
14. Fuhrer, T. Computational prediction and experimental verification of the gene encoding the NAD⁺/NADP⁺-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* / T. Fuhrer, L. Chen, U. Sauer, D. Vitkup // J. Bacteriol. — 2007. — V.189. — P. 8073—8078.
15. Sezonov, G. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth / G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari // J. Bacteriol. — 2007. — V.189. — P. 8746—8749.
16. Baev, M.V. Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of amino acids, peptides, and nucleotides with transcriptional microarrays / M.V. Baev, D. Baev, A.J. Radek, J.W. Campbell // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V.71. — P. 317—322.

A.Yu. GULEVICH^{1,*}, M.S. SKONECHNYI²,
A.V. SUKHOZHENKO¹, A.Yu. SKOROKHODOVA¹,
and V.G. DEBABOV¹

¹The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), 117545, Moscow Russia

²The Russian University of People's Friendship, 117198, Moscow Russia

e-mail: gulevich@genetika.ru

Study on Aerobic Biosynthesis of 4-Hydroxybutyric Acid by *Escherichia coli* Cells with Heterological Expression of 2-Ketoglutarate Decarboxylase Gene

The *Mycobacterium tuberculosis* Rv1248c(*kgd*) gene has been expressed in the recombinant *Escherichia coli* strain with the inactivated pathways of mixed-acid fermentation and aerobic generation of acetyl-CoA, and also with modified systems of glucose transport and phosphorylation, and gene *ydfC* regulation (the latter encoding the NADPH-dependent dehydrogenase of hydrocarboxylic acids). It was established that on the background of the intense formation of 2-ketoglutarate during the glucose aerobic utilization, the direct conversion of 2-ketoglutarate to succinate semialdehyde under the action of an exogenous enzymatic activity is not the only pathway for the synthesis of 4-hydroxybutyric acid by the recombinant *E. coli* strain. This process can also proceed *via* the involvement of the appropriate intermediate of the TCA cycle in a cascade of native biochemical reactions. The induced 2-ketoglutarate-decarboxylase gene expression in the recombinant strain provided the efficient conversion of 2-ketoglutarate to succinate semialdehyde derivatives which ensured the yield of the synthesized 4-hydroxybutyric acid up to 0.3 mM and seemed to be limited by the activity of the enzyme responsible for the terminal stage of the precursor reduction.

Key words: *Escherichia coli*, 4-hydroxybutyric acid, 2-ketoglutarate decarboxylase.

* Author for correspondence.