

УДК: 579.66

Глутамил- и глутаминил-тРНК-синтетаза – перспективные мишени для создания штамма-продуцента L-треонина

© 2019 Д. М. БУБНОВ^{1,*}, Т. В. ЮЗБАШЕВ^{1,2}, А. С. ФЕДОРОВ¹, Ф. В. БОНДАРЕНКО¹, А. С. САВЧЕНКО³, Т. В. ВЫБОРНАЯ¹, С. С. ФИЛИПОВА¹, С. П. СИНЕОКИЙ¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИГенетика), Москва, 117545

²Department of Bioengineering, Imperial College London, London SW72AZ, Great Britain

³Department of Integrated Biosciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

*e-mail: bubnov.dmitrii@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2019 г.
После доработки 13.11.2019 г.
Принята к публикации 29.11.2019 г.

В настоящей работе приводится описание подхода, позволяющего улучшить свойства штамма-продуцента L-треонина путем снижения накопления биомассы в ходе ферментации. В качестве мишеней были выбраны глутамил- и глутаминил-тРНК-синтетаза. Были получены мутанты, несущие аллели, которые кодируют температурочувствительные варианты указанных ферментов. С использованием этой системы было показано, что подавление функции тРНК-синтетаз ведет к быстрой остановке роста культуры, увеличению продуктивности и конверсии синтеза L-треонина. На основе одного из температурочувствительных штаммов в непермиссивных условиях были получены мутанты, у которых данный фенотип супрессирован. Некоторые из таких мутантов накапливают меньше биомассы и на 10–12% больше L-треонина относительно исходного штамма.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, продуцент, треонин, аминоксил-тРНК-синтетаза, *ts*-мутация

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-39-50

В процессе микробного биосинтеза культуры штамма *Escherichia coli*, продуцента L-треонина, помимо основного продукта накапливает значительное количество собственной биомассы, которую можно рассматривать как побочный продукт, конкурирующий с L-треонином за метаболиты и источники энергии. Снижение накопления биомассы в ходе ферментации наряду с другими подходами может быть использовано для совершенствования свойств штаммов-продуцентов [1]. Анализ научной литературы показывает, что эту задачу решают преимущественно путем лимитирования роста культуры каким-либо субстратом,

чаще всего аминокислотой, например L-лизинном или L-метионином [2, 3]. С этой целью в геноме штамма-продуцента получают мутации, фенотипическое проявление которых заключается в ауксотрофности по определенному соединению. К недостаткам такой стратегии следует отнести повышение себестоимости конечного продукта из-за добавления в среду существенного количества чистых аминокислот. Кроме того, требуется строгий контроль за содержанием лимитирующего соединения в составе питательной среды, так как превышение его оптимального уровня не позволяет достигнуть необходимого результата.

Список сокращений: ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; КЖ – культуральная жидкость; ОП₆₆₀ – оптическая плотность при длине волны 660 нм; тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота; *fb*r – feedback resistant (устойчивый к ингибированию по принципу отрицательной обратной связи); ppGpp – гуанозинтетрафосфат; pppGpp – гуанозинпентафосфат; Sp^R – устойчивость к спектиномицину; *ts* (temperature sensitive) – температурочувствительный; ати – избыточное атмосферное давление.

Это накладывает ограничение на концентрацию богатых добавок неопределенного состава, например, дрожжевого или кукурузного экстракта, которые вносят в минеральную основу ферментационной среды. Вариации состава таких добавок могут приводить к нестабильным результатам ферментаций.

Лимитирование роста культуры аминокислотами применяют по нескольким причинам. Одна из них заключается в относительной доступности этих соединений в отличие, например, от витаминов или нуклеотидов. Вторая причина состоит в том, что в условиях дефицита аминокислот в клетке запускается механизм, известный как «строгий ответ». Необходимым условием для индукции «строгого ответа» является накопление в клетках особых сигнальных соединений, гуанозинтетрафосфата и гуанозинпентафосфата (ppGpp и pppGpp). Их синтез осуществляет фермент RelA в ответ на увеличение отношения незаряженных к заряженным тРНК [4]. К положительным эффектам данного механизма, направленного на выживание в условиях стресса [5], можно отнести активацию транскрипции генов, контролирующей синтез аминокислот [6], а также прямую стимуляцию активности анаплеротического фермента фосфоенолпируваткарбоксилазы в присутствии ppGpp [7, 8].

Целью настоящей работы было исследование возможности применения альтернативного подхода к увеличению накопления L-треонина штаммом-продуцентом путем снижения накопления биомассы. Учитывая успешное применение лимитирования культуры аминокислотами и связанные с ним позитивные эффекты «строгого ответа», авторами был выбран подход, в рамках которого у прототрофной культуры на богатой среде вызывают физиологическое состояние, эквивалентное состоянию аминокислотного голодания. Как было указано выше, сигналом для синтеза ppGpp является увеличение соотношения незаряженных и заряженных тРНК. К этому может приводить как недостаток аминокислот, так и снижение активности аминоацил-тРНК-синтетаз. Для настоящей работы в качестве мишеней были выбраны гены *glnS* и *gltX*, контролирующие синтез глутаминил-тРНК-синтетазы (GlnRS) и глутамил-тРНК-синтетазы (GluRS). На основе штамма *E. coli*, продуцента L-треонина, были сконструированы штаммы, в которых активность данных ферментов находится под контролем условий эксперимента. Были проанализированы изменения продуктивности и роста данных штаммов в ответ

на снижение активности аминоацил-тРНК-синтетаз, и, на основании полученных результатов, были отобраны мутанты, накапливающие больше L-треонина в ходе культивирования.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Среды, олигонуклеотиды, бактериальные штаммы

Клетки *E. coli* культивировали в жидкой среде LB (триптон (Sigma-Aldrich, США) – 10 г/л, дрожжевой экстракт (Biospringer, Франция) – 5 г/л, NaCl – 10 г/л). LB агар готовили путем добавления к жидкой LB агар-агара до концентрации 20 г/л. Электрокомпетентные клетки растили в низкосолевого LB (NaCl 5 г/л). Жидкую и агаризованную среду LB стерилизовали автоклавированием в течение 20 мин при 1 ати (избыточное атмосферное давление). Когда было необходимо, в среду добавляли антибиотики (AppliChem, Германия): ампициллин – 200 мг/л, хлорамфеникол – 20 мг/л, спектиномицин (Медокеми Лтд, Кипр) – 50 мг/л. Для приготовления инокулята использовали посевную среду, г/л: дрожжевой экстракт (Biospringer, Франция) – 35; глюкоза – 2,5; NaCl – 2,5; K₂HPO₄ – 2,5. Для измерения накопления L-треонина штаммами-продуцентами использовали ферментационную среду следующего состава, г/л: глюкоза (Roquette Freres, Франция) – 40; (NH₄)₂SO₄ («Химмед», Россия) – 30; кукурузный экстракт (Roquette Freres) – 10; K₂HPO₄ («Химмед») – 2,5; MgSO₄·7H₂O («Химмед») – 2; лимонная кислота (Sigma, США) – 0,192; FeSO₄·7H₂O («Химмед») – 0,03; MnSO₄·H₂O («Химмед») – 0,021; CaCO₃ (Sigma) – 20; pH 7,0. Растворы глюкозы с концентрацией 400 г/л, раствор MnSO₄·H₂O с концентрацией 2,1 г/л, и 1М раствор MgSO₄·7H₂O стерилизовали отдельно автоклавированием при 1 ати в течение 40 мин. Отдельно готовили водный раствор FeSO₄·7H₂O с концентрацией 2 г/л. Для полного растворения сульфата железа в раствор вносили серную кислоту до pH 2,0. Полученный раствор стерилизовали фильтрованием через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм. Навески CaCO₃ по 40 мг стерилизовали автоклавированием при 1 ати в течение 40 мин в стеклянных пробирках объемом 50 мл. Для изучения кинетики роста культуры использовали такую же среду, за исключением того, что для поддержания pH 7,0 применяли Бис-трис (Sigma) в концентрации 50 г/л.

DreamTaq ДНК полимеразы была получена из Thermo Fisher Scientific (Литва). Высокоточную амплификацию фрагментов ДНК для последующего

клонирования проводили с использованием Кара HiFi ДНК-полимеразы (Кара Biosystems, МА, США). Выделение плазмидной ДНК из клеток и фрагментов ДНК из агарозного геля проводили при помощи наборов реагентов GeneJet Plasmid Miniprep Kit и GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) соответственно.

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы в ЗАО «Евроген» и

стандартным образом очищены, обессолены и лиофилизированы (табл. 1).

Все использованные в работе штаммы являются производными *Escherichia coli* К-12 (табл. 2).

Получение мутаций

Хромосомные мутации получали путем встраивания двунитевых интегративных кассет или введения однонуклеотидных замен с использованием

Таблица 1

Праймеры, используемые в работе

Oligonucleotides used in the work

Праймер	Последовательность 5'→3'
2844	TGGAAC TCAAGCGTACACAGAGAGTGC GTAATACCTTTCAGGGCATCGCTGATGCAGTGGGTGAAGTCGTACA
2845	GTCACCAGCAGGTTCAACTTACGCTTGGACATCACGGGGTATTCCAGATTCAGGCGCGAGAACTCATACTGGC
2906	GCATTGCTTATCAATTTGTTGC
2908	CAGGGTTTTCCCAGTCACGA
2009	ATATATGGAAGAAGAATTTGAAGAGTTCGAAGAGCATCCTCAGGATGTGATTCATTAAGAGGAGAAATTAAC TATGCCTAAACTTGTCACTGG
2910	CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGT TACTTACTACCGTATTCTCGG
3039	GAAAATCGACATGGCTTACC
3040	AATAGAAGCCCGCAGTGTAACC

Таблица 2

Бактериальные штаммы, используемые в работе

Bacterial strains used in the work

Штамм	Генотип	Фенотип	Источник
MG1655	F ⁻ λ <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	–	ВКПМ
B1310	F ⁻ λ(<i>cI⁸⁵⁷Δ[cro-attR]</i>) <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	<i>ts</i>	[9]
MG1655Z1	F ⁻ λ <i>ilvG rfb-50 rph-1 lacI^q P_{N25}-tetR</i>	<i>Sp^R</i>	[10]
B1340	F ⁻ λ(<i>cI⁸⁵⁷Δ[cro-attR]</i>) Δ[<i>ral-int</i>]:: <i>aadA-hipA</i>) <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	<i>ts</i>	Настоящая работа
B1175	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA</i>	–	ВКПМ
B1363	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA λ(cI857Δ[cro-attR] Δ[ral-int]::<i>aadA-hipA</i>)</i>	<i>ts, Sp^R</i>	Настоящая работа
B1307	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA glnRS^{Glu222Lys}</i>	<i>ts</i>	То же
B1339	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA glnRS^{Thr266Pro}</i>	<i>ts</i>	» »
B1485	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA glnRS^{Glu222Lys}</i>	–	» »
B1486	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA glnRS^{Glu222Lys}</i>	–	» »
B1487	Δ <i>tdh</i> P _{H207} - <i>thrA^{fb}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pucA P_{LtetO1}-rhtA glnRS^{Glu222Lys}</i>	–	» »

«→» – не имеет явного фенотипа (the strain does not have an obvious phenotype).

λ Red-зависимой рекомбинации. Для этого использовали вспомогательные плазмиды pDL17 и pDL14 в соответствии с протоколом, описанным ранее в работе [9]. Маркированные мутации переносили трансдукцией бактериофагом P1vir в соответствии с работой Thomason et al. [11].

Ферментации в пробирках

Культуру растили на чашках с агаризованной средой LB в течение 24 ч при 37 °С. В пробирки объемом 50 мл, содержащие по 2 мл посевной среды, вносили клетки до стартового значения оптической плотности 0,1 при длине волны 660 нм (OP_{660}). Пробирки инкубировали на роторной качалке в течение 5 ч при 37 °С, со скоростью перемешивания 220 об/мин. Непосредственно перед ферментацией в стерильной емкости смешивали все компоненты ферментационной среды и разливали по 2 мл в пробирки с навесками мела. Затем в пробирки со средой вносили инокулят до OP_{660} 0,1. Пробирки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С на роторной качалке со скоростью 200 об/мин. По окончании ферментации концентрацию накопленного в среде L-треонина определяли методом ВЭЖХ с помощью прибора Waters 2695 (Alliance, США) и измеряли OP_{660} культуры в 20-кратном разведении в дистиллированной воде.

Кинетика роста температурочувствительных мутантов и анализ биосинтеза L-треонина

Для приготовления инокулята изолированную колонию с агаризованной среды LB стерильной зубочисткой переносили в стеклянную пробирку объемом 50 мл, содержащую 5 мл жидкой LB. Пробирки инкубировали в течение 18–24 ч на роторной качалке при 30 °С и 200 об/мин, после чего измеряли OP_{660} . В L-образные пробирки объемом 15 мл (Advantec Тоуо, Япония) вносили по 5 мл ферментационной среды с Бис-трис, которую предварительно центрифугировали 10 мин при 5000 g для удаления взвесей. Пробирки инокулировали культурой в LB до OP_{660} 0,025 и инкубировали в приборе Rocking Incubator TVS062CA (Advantec Тоуо) при 30 °С и 70 об/мин. Одну из пробирок не засеивали и использовали для определения исходной концентрации глюкозы. OP_{660} измеряли в автоматическом режиме каждые 60 мин. Временной промежуток между остановкой перемешивания и измерением составлял 10 с. По достижении OP_{660} ~1,5 температуру увеличивали до 39 °С. В случае со штаммом B1363, несущим ген *hipA*, температуру поднимали до 42 °С на 4 ч, после чего снижали до 30 °С. Суммарная

длительность процесса в двух температурных режимах составляла 30–38 ч. Поскольку используемый прибор занижает результат измерений при $OP_{660} > 1$, по окончании отбирали пробы и измеряли OP_{660} в 10- или 20-кратном разведении в дистиллированной воде на спектрофотометре. Пробы в объеме 1 мл центрифугировали в течение 5 мин, разбавляли в 3 раза дистиллированной водой и использовали для измерения L-треонина и глюкозы на приборе Waters 2695 (Alliance).

Биосинтез L-треонина в лабораторном ферментере объемом 3 л с начальным рабочим объемом 1 л проводили по описанию процесса в работе Выборной и др. [12] с модификацией температурного режима культивирования. Для исследования температурочувствительных мутантов посевной материал готовили при 33 °С. Культивирование в основном процессе начинали так же при 33 °С, а по достижении OP_{660} 25–27 температуру поднимали до 39 °С. Момент изменения температуры указан при описании экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование штаммов, обладающих контролируемой активностью глутаминил- и глутамил-тРНК синтетаз

В качестве условий, с помощью которых можно варьировать активность глутаминил- и глутамил-тРНК синтетаз, был выбран температурный режим культивирования. Такой подход позволяет добиться строгого контроля активности фермента с минимальной задержкой между изменениями условий и ответом культуры штамма-производителя L-треонина в отношении роста и продуктивности.

Для того чтобы получить возможность контролировать активность GlnRS в ходе ферментации были получены штаммы B1307 и B1339, несущие мутации *glnS1* [13] и *glnS172* [14], которые приводят к температурочувствительности (*ts*) фермента GlnRS при непермиссивной температуре (>37 °С) и *ts*-фенотипу мутанта. Мутантные аллели *glnS1* и *glnS172* кодируют белки с аминокислотной заменой Glu222Lys и Thr266Pro [15]. Соответствующие им нуклеотидные замены были внесены в геномную ДНК штамма-производителя B1175 (табл. 2) путем λ Red-зависимой трансформации олигонуклеотидами 2844 и 2845 (табл. 1). Температурочувствительные рекомбинанты были отобраны методом реплик на среде LB при 30 °С и 42 °С. Наличие корректной замены было подтверждено секвенированием ПЦР-фрагментов, амплифицированных с геномной ДНК мутантов по праймерам 3039 и 3040.

Для инактивации GluRS в ответ на повышение температуры культивирования была использована экспрессия токсина HipA, контролируемая P_L-промотором и температурочувствительным репрессором CI⁸⁵⁷. Токсичность HipA вызвана тем, что данный фермент инактивирует GluRS путем фосфорилирования по остатку серина в положении 239 полипептидной цепи [16]. Сначала на основе штамма B1310 (табл. 2), содержащего регуляторную область и левый оперон бактериофага λcI⁸⁵⁷, был получен штамм B1340. С матрицы геномной ДНК штамма MG1655 по праймерам 2909 и 2910 был амплифицирован фрагмент, несущий ген *hipA*. Затем по праймерам 2906 и 2908 с плазмиды pISA [12] был амплифицирован ген *aadA*, продукт которого сообщает клеткам устойчивость к спектиномицину. Оба фрагмента были объединены методом ПЦР-сшивки. Полученный фрагмент был встроен в хромосому штамма B1310 между геном *sieB* и последовательностью *attL* одновременно с делецией области [*ral-int*] (рис. 1). Таким образом, базальный уровень экспрессии *hipA* оказывается под дополнительным контролем N-зависимого механизма антитерминации [17]. Из одного из полученных рекомбинантов (B1340) геномный локус, содержащий целевую экспрессионную кассету, был перенесен трансдукцией фагом P1vir в штамм B1175. Полученный штамм получил название B1363.

Кинетика роста температурочувствительных мутантов

В клетках полученных штаммов активность GlnRS и GluRS регулировали температурой культивирования. В непермиссивных условиях активность данных ферментов снижается, по крайней мере настолько, чтобы рост культуры прекратил-

ся, несмотря на способность клеток самостоятельно синтезировать L-глутамин и L-глутамат и одновременно получать эти аминокислоты из питательной среды. С целью оценить последствия падения активности GlnRS и GluRS на свойства культуры продуцента, клетки *ts*-мутантов и штамма B1175 в качестве контроля культивировали в двух температурных режимах. Культуры штаммов B1307 и B1339 сначала растили в пермиссивных условиях при 30 °C, а затем, по достижении ОП₆₀₀ ~1,5, температуру поднимали до 39 °C и поддерживали вплоть до окончания процесса. Со штаммом B1363 работали сходным образом, с тем исключением, что температуру поднимали до 42 °C на 4 ч, а затем снижали до 30 °C, так как нагрев культуры B1363 до 39 °C практически не снижал ее рост. Это, скорее всего, объясняется недостаточной депрессией промотора P_L, в результате чего, токсин HipA синтезировался в недостаточном количестве, чтобы преодолеть действие соответствующего антитоксина HipB, ген которого также присутствует в геноме штамма. Одновременно с этим, штамм B1175 не способен был расти в используемой ферментационной среде при 42 °C (результаты не приведены), что не позволяло поддерживать такие условия на протяжении длительного времени.

Результаты исследования кинетики роста *ts*-мутантов в сравнении с исходным штаммом B1175 приведены на рис. 2. Для каждого штамма показаны результаты одного из двух независимых экспериментов. Для каждого *ts*-штамма кривую роста снимали в двух повторностях, а для штамма B1175, использованного в качестве контроля, – в одной.

При рассмотрении приведенных результатов надо учитывать, что прибор, использованный для культивирования и автоматического измерения

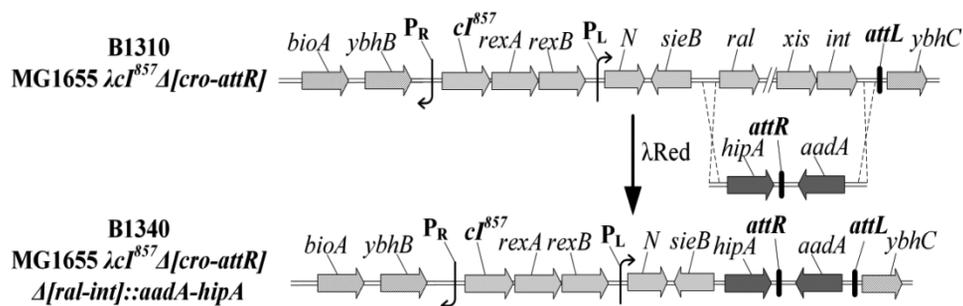


Рис. 1. Схема интеграции фрагмента *hipA-aadA* посредством λRed-зависимой рекомбинации в хромосому штамма B1310 и полученный геномный локус (B1340), содержащий целевую экспрессионную кассету. Штриховкой отмечены участки хромосомы *E. coli*, светло-серой заливкой – участок, соответствующий профагу λ, темно-серой – фрагмент, содержащий *hipA* и *aadA*

Fig. 1. A schematic representation of the *hipA-aadA* insertion into the chromosome of the strain B1310 by λRed-mediated recombination and the resulting genomic loci of the B1340 strain with the *hipA*-expressing cassette. Hatched filling indicates regions of the *E. coli* chromosome, light gray filling and dark gray filling indicate λ prophage and *hipA-aadA* fragment, respectively

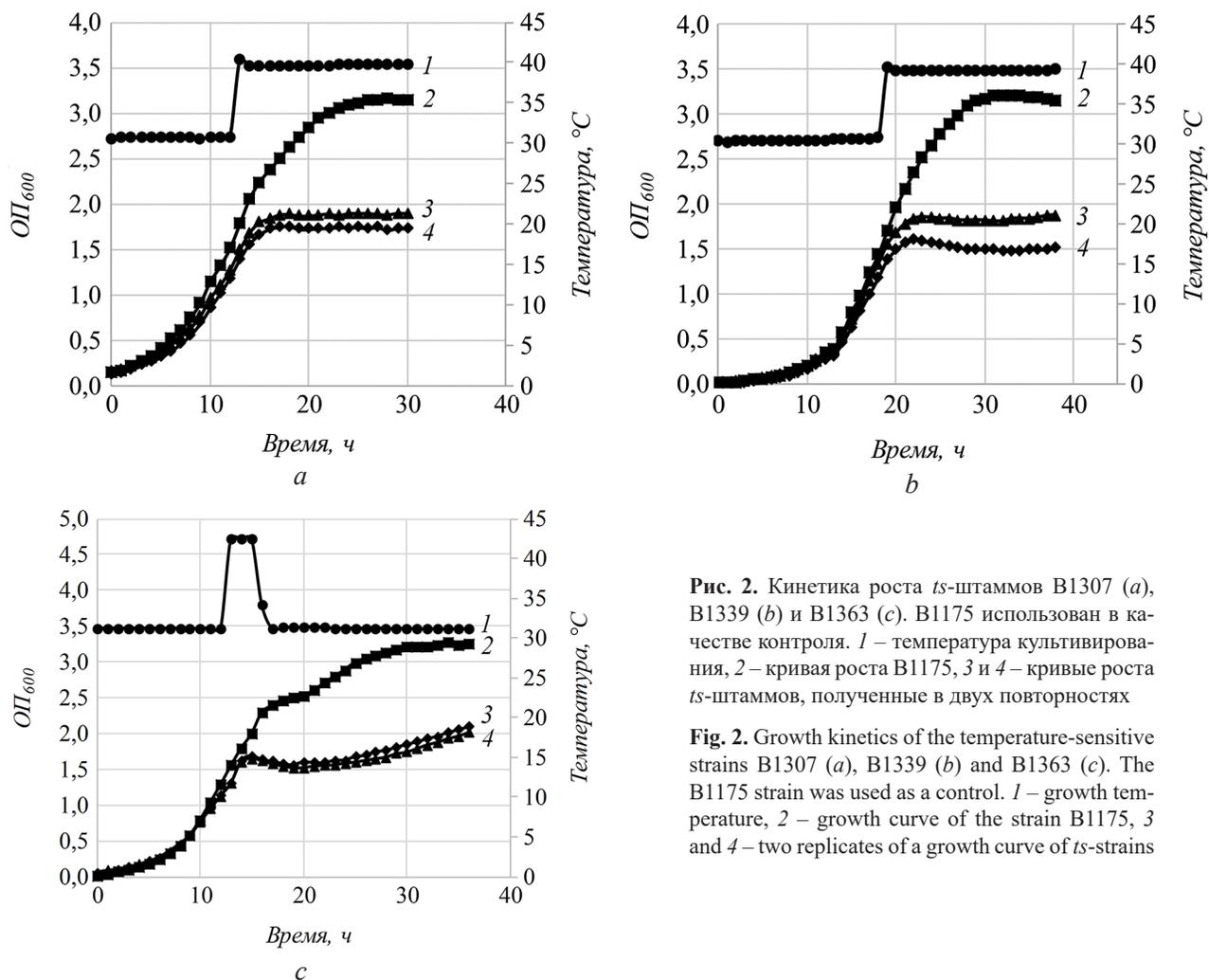


Рис. 2. Кинетика роста *ts*-штаммов В1307 (а), В1339 (b) и В1363 (с). В1175 использован в качестве контроля. 1 – температура культивирования, 2 – кривая роста В1175, 3 и 4 – кривые роста *ts*-штаммов, полученные в двух повторностях

Fig. 2. Growth kinetics of the temperature-sensitive strains В1307 (a), В1339 (b) and В1363 (c). The В1175 strain was used as a control. 1 – growth temperature, 2 – growth curve of the strain В1175, 3 and 4 – two replicates of a growth curve of *ts*-strains

оптической плотности, занижает показания при $ОП_{600} > 1$. Так, значения $ОП_{600} > 3$ ед. могут соответствовать 8 ед. при измерении оптической плотности корректно разбавленной суспензии на стационарном спектрофотометре. Поэтому представленные кривые роста оказываются сжатыми в вертикальном направлении. Корректные значения $ОП_{600}$ в последней временной точке каждой кривой роста приведены на рис. 3а.

Тем не менее, данные на рис. 2 дают адекватное представление о форме кривых роста исследуемых штаммов. В первую очередь стоит отметить, что ответ на переход к непермиссивным условиям занимает очень небольшой промежуток времени. Так, экспоненциальный рост культур В1307 и В1339 прекращается уже через 1 ч после увеличения температуры, а практически полная остановка роста наступает через 2 ч. В дальнейшем оптическая плотность культуры остается практически неизменной вплоть до окончания эксперимента. При этом характер роста контрольного штамма В1175 практически не меняется с повышением температуры. Удельная скорость роста В1307 в

пермиссивных условиях составляет $0,13 \text{ ч}^{-1}$ (87% относительно В1175) против $0,15 \text{ ч}^{-1}$ – в контроле (рис. 2), тогда как скорости роста В1339 и В1363 практически не отличаются от таковой для В1175. Ответ культуры штамма В1363 происходит приблизительно за то же время несмотря на то, что синтез НipА возможен только после того, как сработает *N*-зависимый механизм антитерминации бактериофага λ . Интересно отметить, что непродолжительной индукции оказывается достаточно, чтобы остановить рост культуры и поддерживать это состояние на протяжении 15 ч, что свидетельствует о стабильности НipА. Только в конце эксперимента культура снова начинает расти, возможно, в результате накопления мутантов, в которых экспрессия гена *hipA* была нарушена.

Исследование биосинтеза L-треонина температурочувствительными мутантами

Одновременно с исследованием кинетики роста были проанализированы различия в продуктивности культур штаммов В1307, В1339 и В1363 по сравнению с В1175. По окончании измерения

роста из каждой пробирки отбирали пробу для измерения $ОП_{600}$, концентрации L-треонина и остаточной глюкозы. На рис. 3а приведены абсолютные значения конечной оптической плотности, количества потребленной глюкозы, концентрации накопленного L-треонина и конверсии, рассчитанной как отношение концентрации L-треонина к концентрации потребленной глюкозы и выраженной в процентах. Показаны значения, полученные в одном независимом эксперименте, где штамм В1175 исследовали в одной повторности, а штаммы В1307, В1339 и В1363 – в двух повторностях (приведены средние значения).

Значения $ОП_{600}$ соответствуют кривым роста на рис. 2, тогда как на рис. 3с показаны средние величины из двух независимых экспериментов, где значения опытных штаммов были нормированы на значения контроля – В1175. Из приведенных результатов видно, что в выбранных условиях эксперимента все *ts*-мутанты ведут себя сходным образом. В результате перехода в эксперименте к непермиссивным условиям концентрация биомассы останавливалась на уровне 32–37% от контроля. При таком падении количества продуцирующей культуры можно было бы ожидать значительного снижения потребления глюкозы

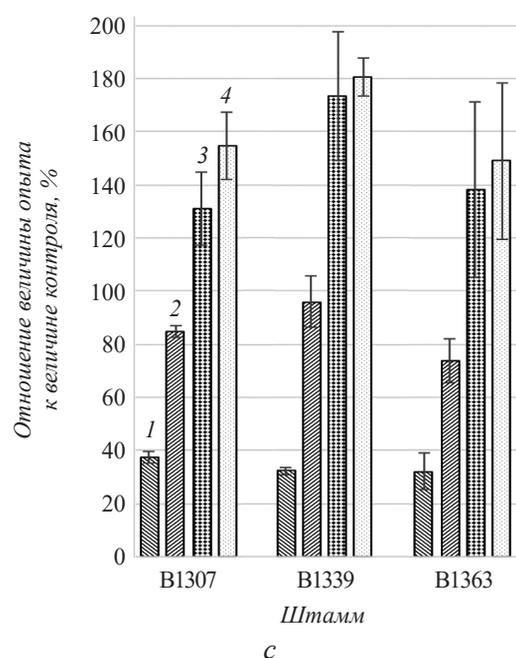
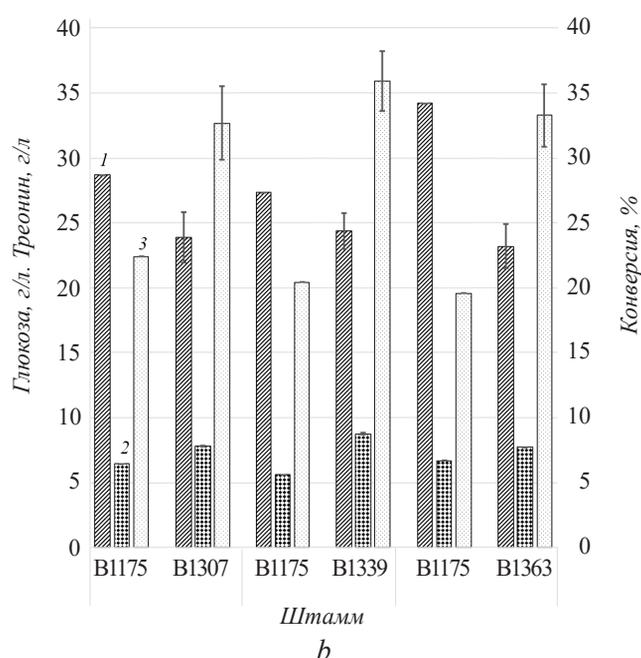
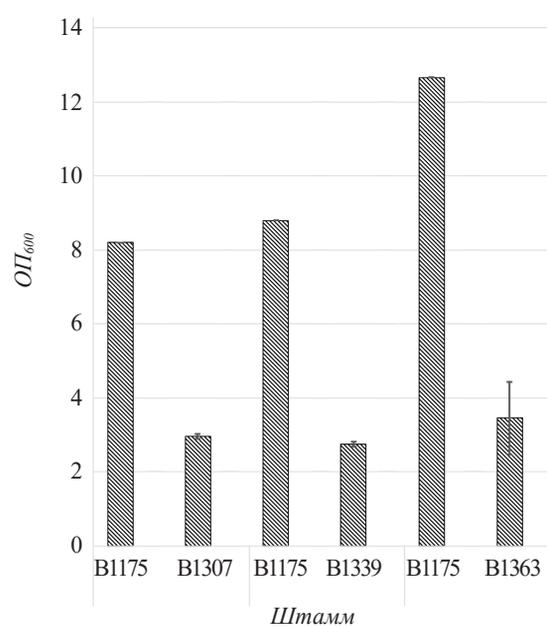


Рис. 3. Сравнение параметров накопления L-треонина *ts*-мутантами В1307, В1339 и В1363 и контрольным штаммом В1175: а – абсолютных значений конечной $ОП_{600}$; б – количества потребленной глюкозы (1), накопленного L-треонина (2) и конверсии глюкозы в L-треонин (3); в – значения конечной $ОП_{600}$ (1), количества потребленной глюкозы (2), накопленного L-треонина (3) и конверсии глюкозы в L-треонин (4), полученные для *ts*-мутантов, нормированные на значения контрольного штамма В1175. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение

Fig. 3. Comparison parameters of the L-threonine accumulation by the *ts*-mutants В1307, В1339 and В1363 with that of the control strain В1175: (a), absolute values of the final OD_{600} ; (b), the amount of glucose consumed (1), the accumulated L-threonine (2) and the yield of glucose to L-threonine (3); (c), values of the final OD_{600} (1), the amount of glucose consumed (2), the accumulated L-threonine (3) and the conversion of glucose to L-threonine (4) obtained for *ts*-mutants normalized to values of the control strain В1175. Error bars indicate standard deviation

и накопления продукта. Однако глюкозы потреблялось всего на 4–27% меньше по сравнению с В1175 (100%). Одновременно с этим, на 31–73% возрастает накопление L-треонина, что объясняет повышение удельной скорости потребления субстрата. Важно отметить, что ни один из штаммов, в том числе и В1175, не заканчивал синтезировать L-треонин, полностью потребив весь внесенный субстрат, в то время, как другие штаммы продолжали биосинтез. Этот вывод следует из того, что КЖ всегда содержала остаточную глюкозу (7,3–21,6 г/л). Таким образом, все штаммы синтезировали L-треонин на протяжении одного и того же промежутка времени вплоть до окончания культивирования. Поэтому повышение конечной концентрации продукта в случае культуры *ts*-мутантов говорит об увеличении ее продуктивности.

Исследование биосинтеза L-треонина в условиях культивирования в ферментере

Свойства *ts*-штамма В1307 были дополнительно исследованы в условиях ферментации в лабораторном ферментере объемом 3 л с начальным рабочим объемом 1 л. В первом эксперименте сравнивали изменение накопления L-треонина в ответ на ограничение накопления биомассы. Процесс вели таким образом, чтобы рост культуры штамма В1307 остановился на 19–22-й час культивирования по достижении ОП₆₆₀ 25–27. Из результатов, приведенных на рис. 4 (а–с), следует, что при переходе к непермиссивным условиям рост останавливается так же, как это наблюдалось в экспериментах, описанных выше. Падение оптической плотности к концу процесса было связано, прежде всего, с разбавлением КЖ, вызванным внесением подпитывающего раствора глюкозы.

К концу процесса на 36-й час ОП₆₆₀ культуры В1307 в непермиссивных условиях составляла 43% (20,4 ед. против 47,8 ед.) от таковой для культуры, рост которой не был ограничен. Конечная концентрация L-треонина в непермиссивных условиях (94,5 г/л) была повышена на 17% относительно таковой в стандартном процессе (81,1 г/л). При этом конверсия глюкозы в L-треонин возросла на 6% в абсолютном и на 14% в относительном выражении.

Результаты сравнения штамма В1307 в режиме ограничения роста с родительским штаммом В1175 в стандартном режиме ферментации приведены на рис. 4d–4f. Из этих результатов следует, что при ограничении конечной оптической плотности культуры В1307 на уровне 53% от контрольной оба штамма накапливают сходное количество L-треонина до концентрации бо-

лее 100 г/л. Однако ограничение роста приводит к увеличению конверсии на 4% в абсолютном и на 10% в относительном выражении.

Результаты, полученные при культивировании в пробирках, свидетельствуют о том, что блокирование роста приводит к увеличению продукции не только в результате высвобождения части субстрата, который мог бы пойти на построение биомассы клеток. В таком случае, до тех пор, пока не была потреблена вся глюкоза, увеличивалась бы только конверсия, тогда как концентрация продукта была бы ниже таковой в контрольном эксперименте. Здесь же, напротив, благодаря нарушению процесса образования аминокислот-ТРНК одновременно возрастают как конверсия, так и продуктивность культуры. Сходный эффект ограничения роста наблюдается и при значительном масштабировании процесса в условиях лабораторного ферментера, приближенных к промышленному процессу. Как и при культивировании в пробирках, возрастает удельная скорость синтеза и остается стабильной с момента остановки роста культуры до окончания процесса через 14–17 ч. При этом существенно возрастает значение конверсии субстрата в L-треонин. Различие заключается в том, что величина прироста скорости биосинтеза и конверсии в таких условиях не так велики по сравнению с культивированием в пробирках, из-за существенно большего количества синтезируемого L-треонина в расчете на единицу биомассы в ферментере, по сравнению с пробирками. Поэтому ограничение роста культуры приводит к несколько меньшему приросту в синтезе продукта. Так, увеличение конечной концентрации и скорости синтеза L-треонина наблюдается только при сравнении культивирования штамма В1307 в стандартном режиме и режиме ограничения роста, тогда как при сравнении В1307 с родительским штаммом скорости синтеза практически равны (рис. 4). Одной из причин этого является режим подпитки культуры глюкозой. В процессе биосинтеза в ферментере, в отличие от культивирования в пробирках, глюкоза присутствует не в избытке, а подается небольшими порциями по мере потребления. В результате такого режима подпитки, направленного на снижение накопления органических кислот, скорость синтеза L-треонина ограничена в большей степени скоростью внесения субстрата, чем свойствами штамма. Различия в скорости дополнительно могут нивелироваться тем, что в условиях ферментера она ограничена высокой, близкой к насыщенной, концентрацией конечного продукта, что может

ГЛУТАМИЛ- И ГЛУТАМИНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗА

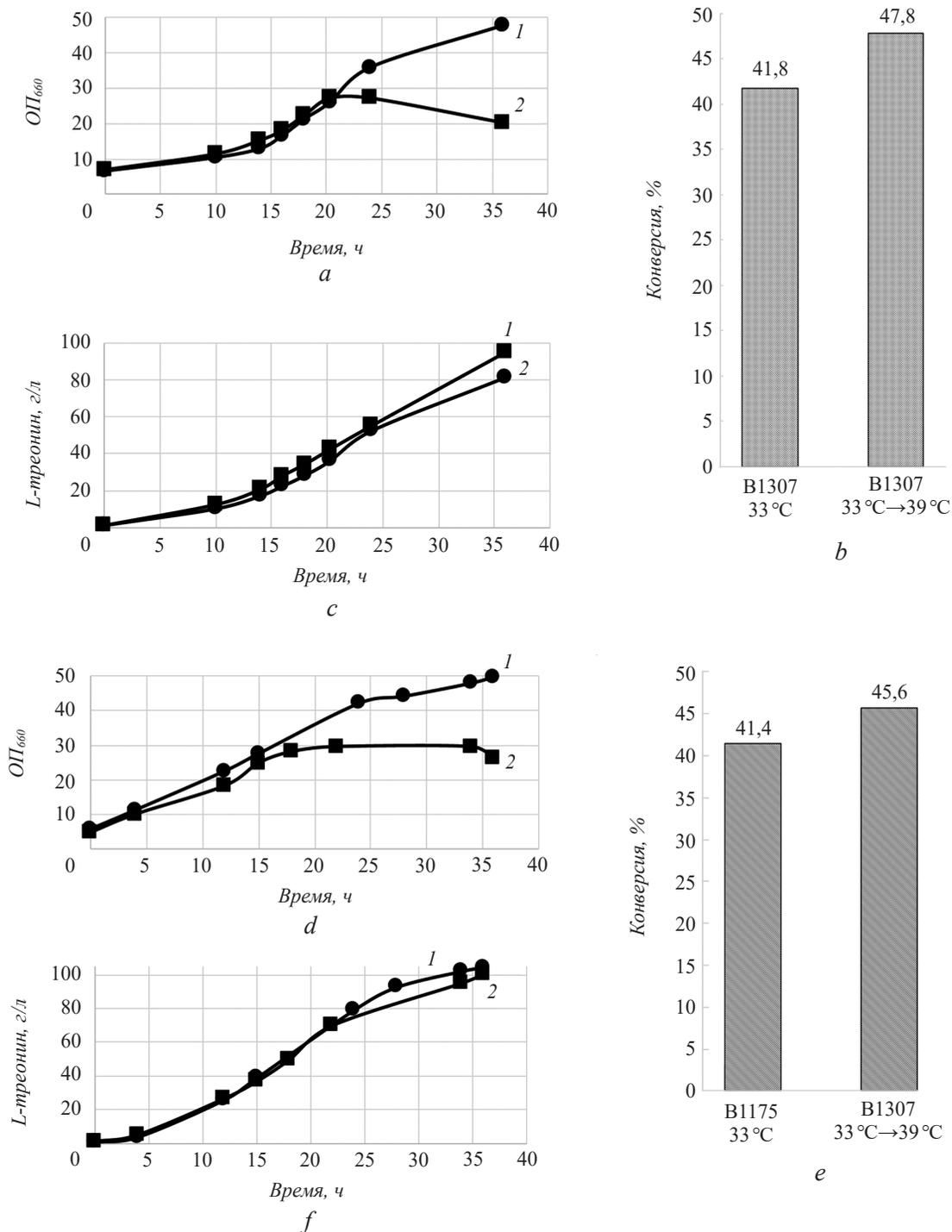


Рис. 4. Сравнение процесса биосинтеза L-треонина культурой штамма B1307 в двух режимах культивирования (a–c) и биосинтеза L-треонина штаммом B1175 в стандартном режиме культивирования со штаммом B1307 в режиме ограничения накопления биомассы (d–f): a, d – кинетика роста, b, e – конверсия; c – накопление L-треонина штаммом B1307 в стандартном режиме культивирования при 33 °C (1) и в режиме ограничения роста культуры (2) путем повышения температуры до неперmissible значения 39 °C на 22-й час процесса; f – накопление L-треонина штаммом B1175 в стандартном режиме культивирования при 33 °C (1) и штаммом B1307 в режиме ограничения роста культуры путем повышения температуры до неперmissible значения 39 °C на 19-й час процесса (2)

Fig. 4. Analysis of the biosynthesis of L-threonine by the strain B1307 in a laboratory fermenter. Comparison of the growth kinetics (a), yield (b) and accumulation of L-threonine (c) by the strain B1307 in the standard cultivation mode at 33 °C (1) and in the mode of the culture growth restriction by raising the temperature to a non-permissible value of 39 °C at 22nd hour of the process (2). Comparison of the growth kinetics (a), yield (b) and accumulation of L-threonine (c) by the strain B1175 in the standard cultivation mode at 33 °C (1) and the strain B1307 in the mode of the culture growth restriction by raising the temperature to a non-permissible value of 39 °C at 19 th hour of the process (2)

приводить к ингибированию ферментов биосинтеза, осмотическому шоку и другим негативным последствиям для культуры. Впрочем, увеличения скорости синтеза, вероятно, можно достичь путем ограничения роста по достижении большего уровня OP_{660} . Тем не менее, в обоих приведенных экспериментах ограничение роста биомассы приводит к увеличению важнейшей для себестоимости производства продукта характеристики – конверсии – при, по меньшей мере, сохранении скорости синтеза и конечной концентрации L-треонина.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение активности GlnRS и GluRS является перспективным подходом при конструировании продуцента L-треонина. Эти результаты согласуются с литературными данными о влиянии накопления ppGpp на физиологические процессы в клетке и, в частности, биосинтез аминокислот. Кроме того, о вовлеченности «строгого ответа» в наблюдаемые изменения в росте и продуктивности *ts*-мутантов свидетельствует то, что нарушение функции и GlnRS, и GluRS приводит к сходным последствиям. Исходя из этих рассуждений, такие же результаты могут быть получены с использованием любой другой аминоксил-тРНК-синтетазы в качестве мишени.

Отбор мутантов, несущих супрессорные мутации по отношению к *glnS1*

Резко изменять и затем поддерживать температуру культивирования в ферментерах большого объема достаточно сложно с технической точки зрения. Для применения в промышленном производстве необходимы штаммы, характеризующиеся высоким уровнем накопления продукта и конверсии в стандартных условиях процесса. Исходя из результатов проведенных экспериментов, штамм B1307, несущий мутацию *glnS1*, был выбран для отбора мутантов, которые обладают конститутивно сниженным ростом и повышенной продуктивностью.

Из анализа ограниченного числа *ts*-мутантов известно, что супрессорные мутации по отношению к *ts*-мутациям в гене *glnS* могут быть, по крайней мере, трех типов [15]: истинные реверсии; мутации, приводящие к повышенному синтезу глутамин-специфичных молекул тРНК; третий тип – мутации по кодону, затронутому *ts*-мутацией, но дающие измененный аминокислотный остаток. Некоторые из мутаций третьего типа снижают активность GlnRS. Чтобы их получить, был проведен отбор мутантов, у которых супрессирован *ts*-фенотип. Для этого ночную культуру B1307

разбавляли в свежей LB так, чтобы титр клеток составлял $<1 \cdot 10^4$ в 1 мл. Эту суспензию разделяли на 10 отдельных пробирок с тем, чтобы в каждой из них супрессорные мутации возникали независимо и были уникальными. Затем культуры растили до насыщения и 1 мл суспензии высевали на агаризованную среду LB и инкубировали 48 ч при 42 °C. С каждой чашки отбирали по 10 мутантов и тестировали их в отношении накопления L-треонина при 37 °C как описано в подразделе «Ферментации в пробирках» раздела «Условия эксперимента». Таким образом, в результате трех независимых экспериментов удалось получить несколько температуроустойчивых мутантов (B1485, B1486 и B1487), продуцирующих значительно больше L-треонина, чем в контроле (рис. 5).

Увеличение накопления L-треонина составило 10–12% относительно контроля, при этом оптическая плотность снизилась на 20–25%. Здесь нужно отметить, что среди всех проанализированных мутантов большинство продуцировали на уровне контроля и число промежуточных форм, например, таких, которые за 24 ч не успевали потребить глюкозу было очень мало (результаты не приведены).

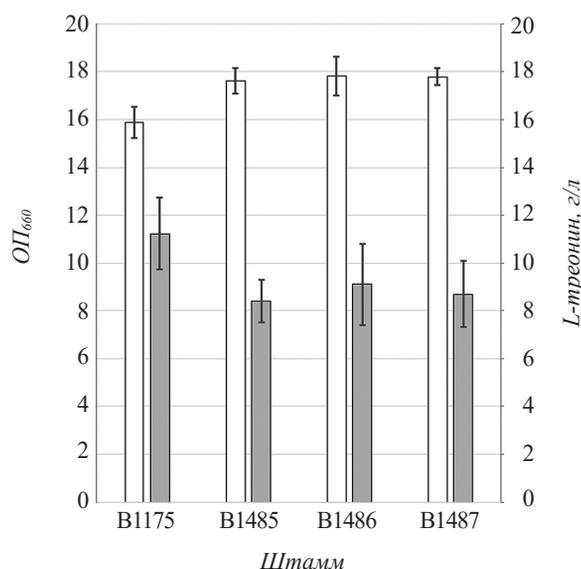


Рис. 5. Накопление L-треонина температуроустойчивыми мутантами, производными B1307, в сравнении с B1175. Белый столбик – концентрация L-треонина; серый – ОП₆₆₀. Показанные значения представляют собой среднее трех независимых экспериментов, планки погрешностей обозначают стандартное отклонение

Fig. 5. The study of the L-threonine accumulation by temperature-resistant mutants derived from the B1307 compared with the B1175. Data are presented as the average of three independent experiments. White bar is L-threonine concentration, grey bar is OD₆₆₀. Error bars indicate standard deviation

Это свидетельствует либо о низком разнообразии спонтанных мутаций, супрессирующих *ts*-фенотип аллеля *glnS1*, либо о том, что такие мутанты растут слишком медленно, чтобы их можно было выделить и отобрать на фоне более быстрорастущих клонов. Поэтому отобранные штаммы могут обладать неоптимальной для продукции активностью GlnRS. Более того, все полученные мутанты показывали сходные результаты. Поэтому нельзя исключить, что они несут идентичные замены. Для получения равномерного градиента по росту культуры и продукции L-треонина в дальнейшем планируется использовать техники направленного мутагенеза с тем, чтобы разнообразие мутаций не было ограничено лишь теми, которые супрессируют температурочувствительность фермента.

Итак, в настоящей работе было показано, что аминоксил-тРНК-синтетазы, в частности GlnRS и GluRS, являются привлекательными мишенями для совершенствования продуцента L-треонина. Анализ ответа клеток на изменения в их активности был основан на исследовании штаммов, *ts*-фенотип которых вызван либо мутацией целевого фермента, либо индукцией токсина HprA при непермиссивной температуре. Использование данного подхода показало, что регуляция их активности позволяет не только эффективно снизить рост биомассы продуцента с увеличением конверсии, но и увеличить удельную продуктивность культуры. Схожий ответ культуры на инактивацию двух различных ферментов свидетельствует о том, что этот эффект, вероятно, вызван ростом концентрации ppGpp и индукцией «строгого ответа», причиной которой является накопление незаряженных тРНК. Кроме того, было показано, что на фоне одной из *ts*-мутаций по глутаминил-тРНК-синтетазе возможен отбор супрессорных мутаций, которые, по-видимому, снижают активность фермента вне зависимости от температуры и, как следствие, ведут к снижению роста культуры и увеличению накопления L-треонина. Описанный подход и мутанты, полученные с его помощью, имеют перспективы для использования их в промышленном производстве L-треонина, поскольку, в отличие от ауксотрофных мутантов, не требуют фиксированного состава питательной среды и внесения дорогостоящих аминокислот.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Уникальный идентифи-

катор проекта RFMEFI61017X0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юзбашев Т.В., Выборная Т.В., Ларина А.С. и др. Направленная модификация метаболизма *Escherichia coli* для создания штаммов – продуцентов треонина. *Биотехнология*, 2013, 29(2), 8–33. doi: 10.21519/0234-2758-2013-2-8-33
2. Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol. Syst. Biol.*, 2007, 3(149). doi: 10.1038/msb4100196
3. Okamoto K., Kino K., Ikeda M. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61(11), 1877–1882. doi: 10.1271/bbb.61.1877
4. Haseltine W.A., Block R. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973, 70(5), 1564–1568. doi: 10.1073/pnas.70.5.1564
5. Potrykus K., Cashel M. (p)ppGpp: still magical? *Ann. Rev. Microbiol.*, 2008, 62, 35–51. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162903
6. Paul B.J., Berkmen M.B., Gourse R.L. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, 102(22), 7823–7828. doi: 10.1073/pnas.0501170102
7. Taguchi M., Izui K., Katsuki H. Activation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate. *FEBS letters*, 1977, 77(2), 270–272. doi: 10.1016/0014-5793(77)80249-4
8. Pao C.C., Dyess B.T. Effect of unusual guanosine nucleotides on the activities of some *Escherichia coli* cellular enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 677(3–4), 358–362. doi: 10.1016/0304-4165(81)90247-6
9. Bubnov D.M., Yuzbashev T.V., Vybornaya T.V., et al. Development of new versatile plasmid-based systems for λ Red-mediated *Escherichia coli* genome engineering. *J. Microbiol. Methods*, 2018, 151, 48–56. doi: 10.1016/j.mimet.2018.06.001
10. Lutz R., Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25(6), 1203–1210. doi: 10.1093/nar/25.6.1203
11. Thomason L.C., Costantino N., Court D.L. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2007, 1, 1–17. doi: 10.1002/0471142727.mb0117s79

12. Выборная Т.В., Юзбашев Т.В., Федоров А.С. и др. Использование альтернативного пути синтеза изолейцина в штаммах *Escherichia coli* – продуцентах треонина. *Биотехнология*, 2019, 35(4), 42–54. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-42-54
13. Korner A., Magee B.B., Liska B., et al. Isolation and partial characterization of a temperature-sensitive *Escherichia coli* mutant with altered glutaminyl-transfer ribonucleic acid synthetase. *J. Bacteriol.*, 1974, 120(1), 154–158.
14. Isaksson L.A., Skold S.E., Skjoldbrand J., et al. A procedure for isolation of spontaneous mutants with temperature sensitive of RNA and/or protein. *Mol. Gen. Genet.*, 1977, 156(3), 233–237. doi: 10.1007/bf00267177
15. Englisch-Peters S., Conley J., Plumbridge J., et al. Mutant enzymes and tRNAs as probes of the glutaminyl-tRNA synthetase: tRNA(Gln) interaction. *Biochimie.*, 1991, 73(12), 1501–1508. doi: 10.1016/0300-9084(91)90184-3
16. Kaspy I., Rotem E., Weiss N., et al. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat. Commun.*, 2013, 4(3001). doi: 10.1038/ncomms4001
17. Das A., Wolska K. Transcription antitermination in vitro by lambda N gene product: Requirement for a phage nut site and the products of host nusA, nusB, and nusE genes. *Cell*. 1984, 38(1), 165–173. doi: 10.1016/0092-8674(84)90537-3

Glutamyl and Glutaminyl-tRNA Synthetases Are a Promising Target for the Design of Threonine-Producing Strain

D. M. BUBNOV^{1,*}, T. V. YUZBASHEV^{1,2}, A. S. FEDOROV¹, F. V. BONDARENKO¹,
A. S. SAVCHENKO³, T. V. VYBORNAYA¹, S. S. FILIPPOVA¹, and S. P. SINEOKY¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), Moscow, 117545 Russia

²Department of Bioengineering, Imperial College of London, London SW72AZ, Great Britain

³Department of Integrated Biosciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

*e-mail: bubnov.dmitrii@mail.ru

Received October 10, 2019

Revised November 13, 2019

Accepted November 29, 2019

Abstract—The present work describes an approach that improves the properties of the strain producing L-threonine via the reduction in the biomass accumulation during fermentation. Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases were chosen as targets. Mutants carrying temperature-sensitive alleles were obtained. It was shown that the used system caused the suppression of the function of tRNA synthetases which led to a rapid arrest of the culture growth, and an increase in productivity and yield of the L-threonine synthesis. One of the temperature-sensitive strains was used to obtain under non-permissive conditions of mutants with the suppressed above phenotype. Some of these mutants accumulate less biomass and produce by 10–12% more threonine than the original strain.

Key words: *Escherichia coli*, producing strain, threonine, aminoacyl-tRNA synthetase, *ts*-mutation

Funding—This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project code RFMEFI61017X0011), and it was carried out using the equipment of the National Bio-Resource Center All-Russian Collection of Industrial Microorganisms, NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-39-50