

УДК 577.21

## НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ *Escherichia coli* MG1655 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГИСТИДИН

© 2013 г. В. Г. Дорошенко, А. О. Лобанов, Е. А. Федорина

Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика (ЗАО "АГРИ"), Москва, 117545

e-mail: Vera\_Doroshenko@agri.ru

Поступила в редакцию 14.02.2012 г.

В результате последовательных направленных модификаций хромосомы из лабораторного штамма *Escherichia coli* MG1655<sup>+</sup> с известной первичной структурой получен штамм MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>f</sup> hisL<sup>-</sup>Δ ΔpurR*, способный продуцировать гистидин из глюкозы с весовым коэффициентом конверсии ~12%. Устойчивая к ретроингибированию АТФ-фосфорибозил-трансфераза, кодируемая мутантным аллелем *hisG<sup>f</sup>* (E271K), явилась определяющим фактором для продукции гистидина. Дальнейшее увеличение продукции было достигнуто в результате увеличения уровня экспрессии мутантного *his* оперона, содержащего *hisG<sup>f</sup>*, посредством удаления аттенюатора (*hisL<sup>-</sup>Δ*). Аналогичное увеличение экспрессии *his* оперона дикого типа к накоплению гистидина не приводило. Удаление гена транскрипционного регулятора *purR* увеличило накопление биомассы в условиях проведения ферментации, сохранив специфическую продукцию гистидина (на клетку).

DOI: 10.7868/S0555109913020037

Незаменимая аминокислота гистидин в настоящее время производится микробиологическим синтезом из глюкозы или мелассы и применяется для профилактики и лечения различных заболеваний [1, 2]. В качестве бактериальных продуцентов гистидина используют мутанты, полученные на основе *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* [1, 3].

Биосинтез гистидина, исследованный первоначально в *Salmonella typhimurium* и *E. coli* [4], во многом сходен для всех организмов его продуцирующих [5]. Путь биосинтеза гистидина из его предшественников фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) и АТФ, образующихся в центральном метаболизме, включает десять реакций (рис. 1). Ферменты биосинтеза кодируются генами, входящими в *E. coli* в состав оперона – *hisLGDCBHAFI*. Первая из биосинтетических реакций катализируется АТФ-фосфорибозилтрансферазой (КФ 2.4.2.17) – продуктом гена *hisG*. В клетках *E. coli* фермент HisG находится в равновесии между активной димерной и неактивными формами, образованными из димеров: гексамерной и т.д. [6]. Гексамер HisG доминирует в присутствии гистидина, за счет чего происходит ретроингибирование фермента, а также в присутствии АМФ, продукта реакции фосфорибозил-АТФ, и при высоких концентрациях АТФ [6].

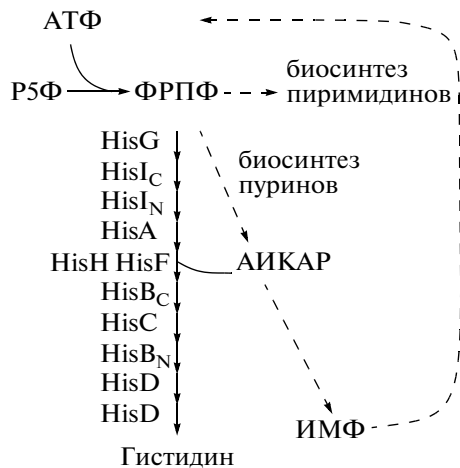
Кроме того, биосинтез гистидина контролируется на уровне транскрипции оперона *hisLGDCBHAFI* [5]. Инициация транскрипции регулируется гуанозин тетрафосфатом, а элонгация – механизмом

аттенюации транскрипции, реагирующим на количество аминоацелированной гистидином тРНК<sup>His</sup> (рис. 2а).

Для достижения сверхсинтеза гистидина в клетке необходимо, в первую очередь, нарушить регуляцию его биосинтеза конечным продуктом – гистидином. Известные продуценты, как правило, получали генетико-селекционным путем, отбирая мутанты, способные к росту в присутствии аналогов гистидина, ингибирующих, в частности, активность HisG дикого типа (2-триазоаланин), репрессирующих транскрипцию *his* оперона, связываясь с тРНК<sup>His</sup> (1,2,4-триазол-3-аланин) или ингибирующих гистидил-тРНК синтетазу (2-метилгистидин) [7–9].

Мутации, приводившие к снятию ретроингибирования HisG (*hisG<sup>f</sup>*), были картированы в дистальной части гена *hisG* [10]. Однако данные о первичной структуре таких мутантов к началу настоящей работы отсутствовали. Мутации, нарушающие аттенюацию транскрипции *his* оперона, локализовались как непосредственно в области аттенюатора, так и в шести локусах за пределами *his* оперона [4]. В таких мутантах наблюдалось снижение общего внутриклеточного пула тРНК<sup>His</sup> или была снижена эффективность ее аминоацелирования гистидином [5].

Продуктивность отобранных мутантов в дальнейшем улучшали с помощью методологии геной инженерии, вводя в клетки рекомбинантные плазмиды как с генами биосинтеза гистидина, так и с



**Рис. 1.** Биосинтез гистидина в *E. coli*. Биосинтетические реакции обозначены по ферментам их осуществляющим. Для бифункциональных ферментов подстрочными буквами С или N обозначены карбоксильная или аминная части, осуществляющие данную реакцию. Соединения, указанные на схеме: P5Ф – рибозо-5-фосфат, ФРПФ – фосфорибозилпирофосфат, АИКАР – аминокимидазол карбоксиламид рибонуклеотид, ИМФ – инозин монофосфат.

генами ферментов, необходимых для синтеза метаболитических предшественников гистидина [1, 3].

Цель работы – получение продуцента гистидина в результате прецизионной модификации бактериального генома известной исходной структуры и исследование роли каждой модификации в достигаемом уровне продукции.

## МЕТОДИКА

**Бактериальные штаммы *E. coli* и условия выращивания культур.** Штамм MG1655 $rph^+ilvG15$ , обозначенный в работе как MG1655 $^+$ , был предоставлен И.В. Бирюковой [11]. Штамм VKPM В-7270 был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (<http://www.genetika.ru/vkpm>). Штамм BW25113 $\Delta hisG::Km^r$  был из Кио коллекции (Япония) [12].

Клетки растили на средах LB, SOB, M9 [13]. В минимальную среду M9 добавляли гистидин – 50 мг/л, аденозин – 100 мг/л. Ампициллин добавляли до концентрации 200 мкг/мл, хлорамфеникол – до 25 мкг/мл, канамицин – до 40 мкг/мл.

Для оценки способности штаммов продуцировать гистидин проводили ферментацию в пробирках. Для этого одну петлю (3 мм) клеток со свежесозданной чашки (LB) вносили в пробирку (13 × 150 мм), содержащую 3 мл среды LB, и инкубировали с аэрацией (250 об/мин) при 30°C 3 ч. Затем по 200 мкл культуры переносили в пробирку (18 × 200 мм) с ферментационной средой следующего состава (г/л): глюкоза – 40,

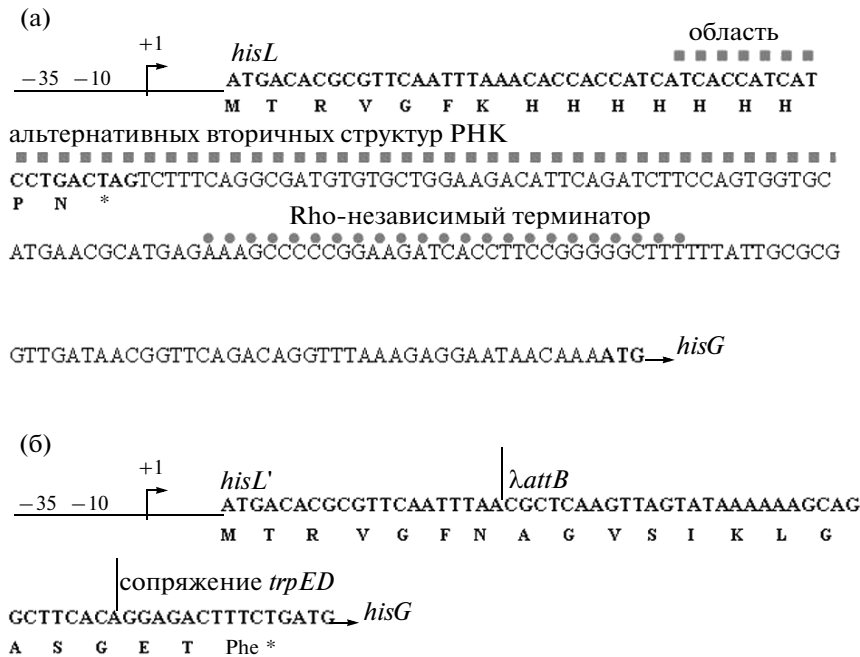
CaCO<sub>3</sub> – 30, дрожжевой экстракт – 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 16, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O – 0.6, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.005, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 0.005. Культивирование проводили при 30°C (250 об/мин) до полного потребления глюкозы (30–36 ч). Массу сухих клеток рассчитывали по оптической плотности (ОП<sub>600</sub>): 1.0 OD<sub>600</sub> = 0.45 г сухих клеток/л.

Культивирование клеток штаммов MG1655 $^+$ *hisG<sup>r</sup>* и MG1655 $^+$ *hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* для протеомики проводили в колбах (0.7 л) на среде M9 с аденозином при 200 об/мин, 37°C.

**Конструирование штаммов.** Мутация *hisG<sup>r</sup>* из штамма VKPM В-7270 была введена в клетки MG1655 $^+$  в две стадии с помощью P1 трансдукции [14]. Первоначально ген *hisG* инактивировали, замещая на  $\Delta hisG::Km^r$  из BW25113 $\Delta hisG::Km^r$ . Штамм MG1655 $^+$  $\Delta hisG::Km^r$  не рос на среде M9 без добавления гистидина. Замещение  $\Delta hisG::Km^r$  на *hisG<sup>r</sup>* восстанавливало рост на минимальной среде. Модификация аттенуатора *his* оперона, обозначенная как *hisL'-Δ*, и делеция гена *purR* были получены с помощью системы Red фага  $\lambda$  [15] с модификациями [16]. В требуемое место хромосомы с замещением необходимой последовательности интегрировали фрагмент, полученный с помощью полимеразной цепной реакции. Интегрированный фрагмент содержал ген *cat* (маркер Cm<sup>r</sup>), фланкированный *attL* и *attR* бактериофага  $\lambda$ , и в случае *hisL'-Δ* та же последовательность сопряжения *trpED* (рис. 2б). Интеграцию проводили в клетках, предварительно трансформированных плазмидой rKD46, любезно предоставленной проф. Ваннером (США). Маркер Cm<sup>r</sup> удаляли с помощью сайт-специфической рекомбиназы фага  $\lambda$ . После удаления Cm<sup>r</sup> маркера оставался *attB* (см. рис. 2б, например). Для амплификации интегрированных фрагментов в качестве матрицы использовали плазмиду pMW118- $\lambda attL$ -Cm<sup>r</sup>- $\lambda attR$ . Фрагмент для *hisL* получали в результате двух последовательных ПЦР, используя праймер 1 (5'-ATTACAGAGACTTTTATGACACGCGTTCAATTAAACGCTCAAGTTAGTATAAAAAGCTGA-3') и праймер 2 (5'-GTC-TGTCATCAGAAAGTCTCCTGTGAAGCCTGCTT-TTTTATACTAAGTTG-3') в первой реакции, праймеры 1 и 3 (5'-CTGCATAGCTATGCGTAAACGAGTGTGTCTGTTCATCAGAAAGTCTCCTG-3') во второй реакции.

Все проведенные модификации бактериальной хромосомы подтверждали секвенированием.

**Определение концентрации гистидина.** Концентрации гистидина в культуральной жидкости определяли с помощью тонкослойной хроматографии [17], используя оборудование фирмы “САМАГ” (Швейцария). Разведенные образцы культуральной жидкости разделяли на пластинах Сорбфил в мобильной фазе: изопропанол–ацетон – 25%-ный водный аммиак – вода, 12.5 : 12.5 : 3 : 2 (v/v). После



**Рис. 2.** Последовательности ДНК лидерного пептида *hisL* и аттенюатора, включающего область вторичных структур РНК и Rho-независимый терминатор транскрипции, *his* оперона *E. coli* (а) и их модификация, проведенная в данной работе (б).

окрашивания в растворе нингидрина (1%) в ацетоне концентрацию гистидина определяли количественным денситометрированием пластины.

**Активность АТФ-фосфорибозилтрансферазы.** Определяли в клеточных экстрактах по методике [18].

**Получение протеомных профилей и их анализ.** Получение водорастворимой фракции клеточных белков, их 2-мерное разделение по изоэлектрической точке и молекулярному весу, используя систему Ettan IPGphor “Amersham Pharmacia” (США), а также масс-спектрометрический анализ белковых образцов в Протеомном исследовательском центре Института биомедицинской химии РАМН (Москва) проводились, как описано ранее [16].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Для конструирования продуцента гистидина использовали штамм MG1655<sup>+</sup> с улучшенными ростовыми характеристиками по сравнению с MG1655, который содержал прецизионно реконструированные аллели генов *rph* и *ihvG* [12]. Донором мутантного гена *hisG<sup>r</sup>*, кодирующего устойчивую к ретроингибированию гистидином АТФ-фосфорибозилтрансферазу [19], служил штамм *E. coli* VKPM В-7270. Нуклеотидная последовательность гена *hisG<sup>r</sup>*, а также расположенных перед ним участков промотора и аттенюатора была

определена в данной работе. Относительно известной последовательности MG1655 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/U00096>) последовательность из VKPM В-7270 содержала единичную нуклеотидную замену в кодирующей части *hisG*, которая приводила к замене E271К в С-концевой части белкового продукта, имеющего общую длину 299 аминокислотных остатков. Обнаруженная замена была удалена от остатков N232 и T252, которые участвовали в связывании с гистицином [6]. С другой стороны, замена E271К локализовалась между остатками V268 и L273, принимающими участие в формировании неактивного гексамерного комплекса HisG. Предположительно, замена E271К повышала устойчивость HisG к ретроингибированию из-за снижения вероятности формирования неактивного гексамера, стабилизируемого гистицином.

Мутантный ген *hisG<sup>r</sup>* был перенесен в MG1655<sup>+</sup> и секвенирован. Штамм MG1655<sup>+</sup> *hisG<sup>r</sup>*, в отличие от исходного MG1655<sup>+</sup> с геном *hisG* дикого типа, накапливал гистидин в среде культивирования (табл. 1).

Дальнейшее повышение уровня продукции гистидина могло быть достигнуто в результате удаления аттенюатора мутантного *hisLG<sup>r</sup>DCBHAFl* оперона. Чтобы обеспечить оптимальную трансляцию гена *hisG<sup>r</sup>*, использовался вариант, ранее предложенной стратегии конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами [20]. Как

**Таблица 1.** Продукция гистидина для штаммов, полученных в работе (средние значения от трех экспериментов)

Генотип штамма MG1655 <sup>+</sup>	Клетки, г/л	Гис, г/л	Спец. продукция Гис, мг/г сухих клеток	Гис/глюкоза, %
<i>hisG</i>	18.3 ± 2.0	<0.05	–	–
<i>hisG<sup>r</sup></i>	11.3 ± 0.8	0.2 ± 0.1	20 ± 10	0.5
<i>hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ</i>	6.3 ± 1.5	2.7 ± 0.2	430 ± 50	6.8
<i>ΔhisL'-Δ</i>	18.5 ± 1.5	<0.1	–	–
<i>hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ ΔpurR</i>	10.8 ± 2.0	4.9 ± 0.5	450 ± 50	12.3

**Таблица 2.** Относительные уровни белков *his* оперона, идентифицированные на 2D-электрофореграммах (см. рис. 3)

Штамм	Оптическая интенсивность пятна относительно всех пятен того же 2D-ПААГ						
	HisG	HisD	HisC	HisH	HisA	HisF	HisI
MG1655 <sup>+</sup> <i>hisG<sup>r</sup></i>	0.15	0.05	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03
MG1655 <sup>+</sup> <i>hisG<sup>r</sup> ΔhisL'-Δ</i>	2.1	2.23	0.9	0.4	0.52	0.42	0.4

показано на рис. 2б, была создана искусственная рамка считывания *hisL'-λattB'-trpE*, начинающаяся с ATG *hisL* и соединяющаяся с открытой рамкой *hisG<sup>r</sup>* через межцистронное сопряжение *trpED* [21]. Искусственная рамка включала проксимальную часть *hisL* до гистидиновых кодонов, последовательность *λattB*, оставшуюся после вырезания маркера Cm<sup>r</sup> и спланированную таким образом, чтобы не создавать терминирующих кодонов в этой рамке, а также дистальную часть *trpE* (5 кодонов). Терминирующий кодон TGA *trpE* был терминирующим кодоном рамки *hisL'-λattB'-trpE*. Трансляционное сопряжение достигалось в результате перекрытия этого терминирующего кодона и ATG *hisG<sup>r</sup>*.

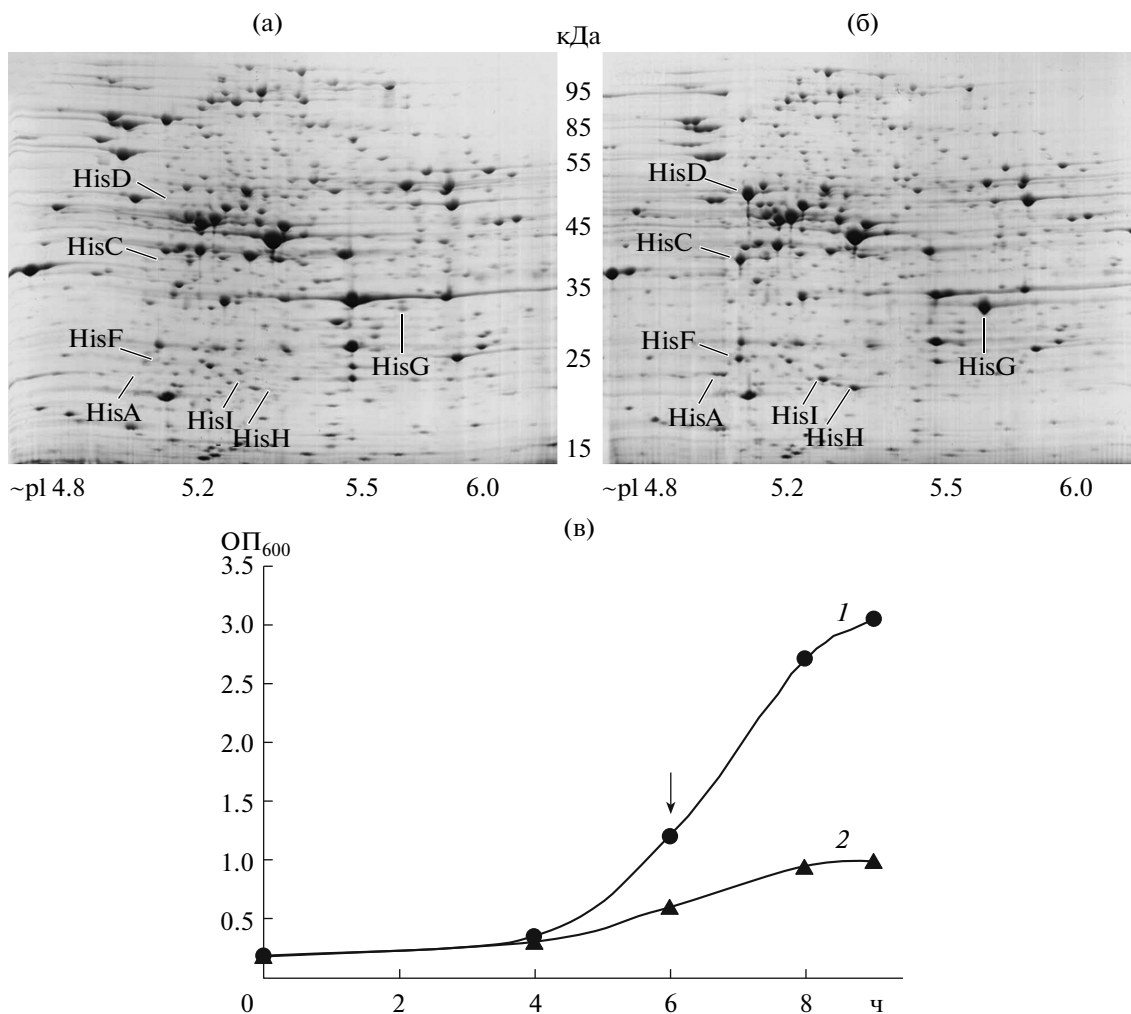
Предложенная стратегия была реализована как с MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup>*, так и с MG1655<sup>+</sup>. Полученные штаммы MG1655<sup>+</sup>*hisL'-Δ* и MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* отличались по способности к росту на минимальной среде. Второй штамм стал ауксотрофом по аденозину.

Уровни синтеза белков в клетках штаммов MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup>*, и MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* были проанализированы с помощью 2D-электрофореза в ПААГ. Образцы готовили из клеток, экспоненциально растущих на среде M9 с аденозином (рис. 3). Наблюдаемый протеомный профиль для каждого из анализированных штаммов стабильно воспроизводился в двух независимых экспериментах. Среди ~1300 белковых пятен на 2D-геле для каждого из препаратов значительные изменения касались только белков, которые, по данным масс-

спектрометрии трипсиновых гидролизатов [22], являлись продуктами *his* оперона. Уровень синтеза этих белков был увеличен более чем в 10 раз для штамма с *hisL'-Δ* (табл. 2). Наблюдаемое увеличение белковых продуктов *his* оперона соответствовало данным других авторов, которые тестировали 15-кратное увеличение активности HisD после селекционно-отобранной делеции Rho-независимого терминатора в аттенюаторе *his* оперона *S. typhimurium* [4].

В экстрактах штаммов MG1655<sup>+</sup>, MG1655<sup>+</sup>*hisL'-Δ* и MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* была определена удельная активность HisG. Ее значение ~100–140 ед/(мг кл. белка) для штаммов, содержащих *hisL'-Δ* более чем в 10 раз превышало значение удельной активности АТФ-фосфорибозилтрансферазы клеточного экстракта штамма MG1655<sup>+</sup>. В экстрактах MG1655<sup>+</sup> *hisL'-Δ* активность HisG была чувствительна к ингибированию: добавление гистидина (0.25 мМ) снижало активность на 85%. В этих же условиях фермент HisG<sup>r</sup> из MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* сохранял более 80% активности.

Штаммы MG1655<sup>+</sup> *hisL'-Δ* и MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* проверяли на способность к накоплению гистидина. Как видно из табл. 1, штамм MG1655<sup>+</sup> *hisL'-Δ* не продуцировал гистидин. В то же время, MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup> hisL'-Δ* существенно превосходил по продукции гистидина своего предшественника, MG1655<sup>+</sup>*hisG<sup>r</sup>*, даже при сниженной способности к росту в этих условиях.



**Рис. 3.** Протеомные карты клеток MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup> (а) и MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup>ΔhisL (б), отобранных в точке, указанной на кривых роста этих штаммов (в).

На (а) и (б) стрелками показаны пятна белков *his* оперона.  
(в) MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup> (1) и MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup>ΔhisL (2)

Добавление аденозина (0.1 г/л) в ферментационную среду, которая исходно была лимитирована по пуринам, содержащимся только в дрожжевом экстракте, увеличивало накопление биомассы штамма MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup>hisL'-Δ на 30%, но при этом примерно на 30% снижалось количество гистидина, накапливаемого в среде культивирования. Добавляемый аденозин мог оказывать негативное влияние на биосинтез гистидина после превращения в гипоксантин, который является индуктором транскрипционного регулятора PurR [23]. Являясь одним из глобальных регуляторов клеточного метаболизма *E. coli*, PurR сложным образом вовлечен в регуляцию биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, с которым биосинтез гистидина связан как через общий предшественник ФРПФ, так и через метаболический интермедиат – аминоконидазол карбоксиламид ри-

бонуклеотид (АИКАР) (рис. 1). В частности, сам синтез ФРПФ, катализируемый продуктом гена *purS*, репрессирован PurR [24]. Для проверки предположения о негативном влиянии PurR на биосинтез гистидина в хромосому штамма MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup>hisL'-Δ ввели делецию гена *purR*. Как видно из табл. 1, штамм MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup>ΔhisL'-ΔΔ*purR* увеличил накопление биомассы и гистидина по сравнению с предшественником MG1655<sup>+</sup>hisG<sup>+</sup>hisL'-Δ. При этом, специфическая продукция (на единицу биомассы) не изменилась, что, вероятно, отражает способность клеток, содержащих мутации *hisG<sup>+</sup>* и *hisL'-Δ*, синтезировать гистидин.

Полученный таким образом штамм с известной структурой генома может быть использован в дальнейших экспериментах по метаболической инженерии с целью повышения выхода гистидина.

Авторы выражают благодарность за помощь в получении протеомных профилей Ермишеву В.Ю. (ЗАО “АГРИ”). Авторы крайне признательны Машко С.В. (ЗАО “АГРИ”) за ценные замечания, а также Шакулову Р.С. (ФГУП ГосНИИ Генетика) за консультацию по ходу работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ikeda M. // Adv. Biochem. Engin. // Biotechnol. 2003. V. 76. P. 1–36.
2. Kopple J.D., Swendseid M.E. // J. Clin. Invest. 1975. V. 55. № 5. P. 881–891.
3. Klyachko E.V., Shakulov R.S., Kozlov Yu.I. Патент США. 2008. № 7399618 B2.
4. Brenner M., Ames B.N. Metabolic Pathways, V. 5. / Ed. H.J. Vogel. N.Y.: Acad. Press, 1971. P. 349–387.
5. Winkler M.E., Ramos-Montañez S. Chapter 3.6.1.9, Biosynthesis of Histidine. In *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. <http://www.ecosal.org>. Washington, DC: ASM Press, 2009.
6. Lohkamp B., McDermott G., Campbell S.A., Coggins J.R., Lapthorn A.J. // J. Mol. Biol. 2004. V. 336. № 1. P. 131–144.
7. Kubota K., Kamijo H., Mihara O., Okumura S., Mihara O., Okada H. Патент США. 1975. № 3875001.
8. Kisumi M., Nakanishi N., Takagi T., Chibata I. // Appl. Environ. Microbiol. 1977. V. 34. № 5. P. 465–472.
9. Mizukami T., Hamu A., Ikeda M., Oka T., Katsumata R. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. № 4. P. 635–638.
10. Hoppe H., Johnston M., Biek D., Roth J.R. // Genetics. 1979. V. 92. № 1. P. 17–26.
11. Бирюкова И.В., Крылов А.А., Киселёва Е.М., Минаева Н.И., Машко С.В. // Генетика. 2010. Т. 46. № 3. С. 349–55.
12. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // Mol. Systems Biol. 2006. V. 2. doi: 10.1038/msb4100050.
13. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3 ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
14. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972.
15. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
16. Doroshenko V.G., Tsyrenzhapova I.S., Krylov A.A., Kiseleva E.M., Ermishev V.Y., Kazakova S.M., Biryukova I.V., Mashko S.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 6. P. 1287–1295.
17. Krasikov V.D., Malakhova I.I., Degterev E.V., Tyaglov B.V. // J. Planar Chromatogr. 2004. V. 17. № 1. P. 113–122.
18. Voll M.J., Appela E., Martin R.G. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 8. P. 1760–1767.
19. Аствацатуряни Г.В., Лисенков А.Ф., Смирнов Ю.В., Шакулов Р.С. // Генетика. 1988. Т. 24. № 10. С. 1928–1934.
20. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 1–11.
21. Oppenheim D., Yanofsky C. // Genetics. 1980. V. 95. № 4. P. 785–795.
22. Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В., Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торпыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 1. С. 42–49.
23. Cho B.K., Federowicz S.A., Embree M., Park Y.S., Kim D., Palsson B.Ø. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 15. P. 6456–6464.
24. He B., Choi K.Y., Zalkin H. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. № 11. P. 3598–3606.

## The Directed Modification of *Escherichia coli* MG1655 to Obtain Histidine-Producing Mutants

V. G. Doroshenko, A. O. Lobanov, and E. A. Fedorina

*Ajinomoto Genetika Research Institute (CJSC AGRI), Moscow, 117545 Russia*

*e-mail: Vera\_Doroshenko@agri.ru*

Received February 14, 2012

**Abstract**—Strain MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>f</sup> *hisL*<sup>-Δ</sup>, *purR*, which produces histidine with a weight yield of approximately 12% from glucose, was constructed through directed chromosomal modifications of the laboratory *Escherichia coli* strain MG1655<sup>+</sup>, which has a known genome sequence. A feedback-resistant ATP-phosphoribosyl transferase encoded by the mutant *hisG*<sup>f</sup> (E271K) was the main determinant of histidine production. A further increase in histidine production was achieved by the expression enhance of a mutant *his* operon containing *hisG*<sup>f</sup> through the deleting attenuator region (*hisL*<sup>-Δ</sup>). An increase in the expression of the wild-type *his* operon did not result in histidine accumulation. Deletion of the transcriptional regulator gene *purR* increased the biomass produced and maintained the level of histidine production per cell under the fermentation conditions used.