

УДК 577.15

## НОВЫЕ НАДФН-СПЕЦИФИЧНЫЕ L-АСПАРТАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ МЕЗОФИЛЬНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *Rhodopseudomonas palustris* И *Bradyrhizobium japonicum*

© 2013 г. Т. М. Куваева, Ж. И. Каташкина, А. Д. Киверо, С. В. Смирнов

Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика, Москва, 117545, e-mail: Tatiana\_Kuvaeva@agri.ru

Поступила в редакцию 12.04.2012 г.

Гены предполагаемых L-аспартат дегидрогеназ (КФ 1.4.1.21, АДГ) из мезофильных азотфиксирующих бактерий *Rhodopseudomonas palustris* и *Bradyrhizobium japonicum* были клонированы и экспрессированы в *Escherichia coli*. Соответствующие ферменты, в виде гибридных белков с N-концевой гексагистидиной меткой, были очищены до гомогенного состояния. Оба фермента *in vitro* катализировали восстановительное аминирование оксалоацетата до L-аспартата на порядок быстрее, чем обратную реакцию при соответствующих оптимальных pH 8.0–9.0 и 9.8; при этом ферменты катализировали только аминирование при физиологических условиях (pH 7.0–8.0). Их специфичность к НАДФН была на 1–2 порядка больше, чем к НАДН. Значения кажущихся констант  $K_M$  по оксалоацетату, аммонию и НАДФН при pH 9.0 для АДГ из *R. palustris* составили 9.2, 11.3 и 0.21 мМ соответственно, а для АДГ из *B. japonicum* – 21, 4.3 и 0.032 мМ. Аминирующая активность новых АДГ может быть важна для фиксации неорганического азота *in vivo* и использована для создания бактериального штамма-продуцента L-аспартата методами метаболической инженерии.

DOI: 10.7868/S0555109913010108

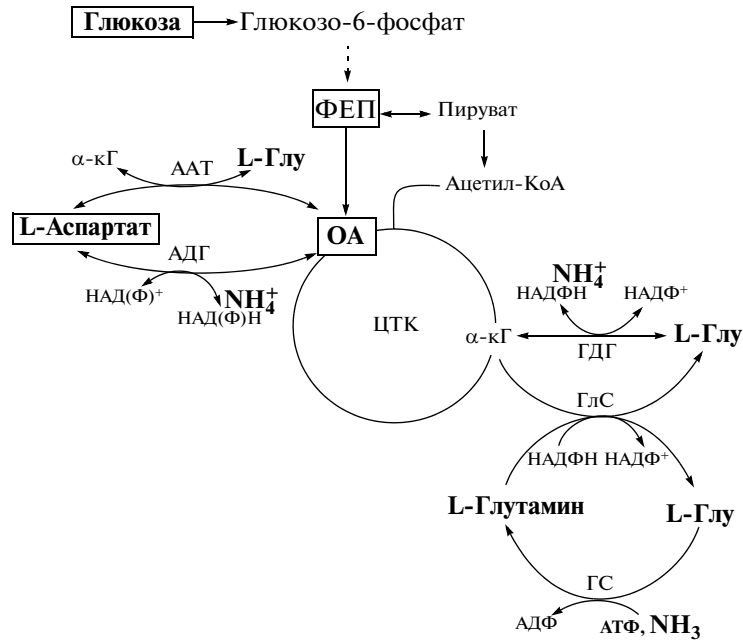
В настоящее время L-аспарагиновая кислота (L-Асп) находит широкое применение в пищевой и химической промышленности, а также медицине. Основная часть L-Асп, производимого в мире за 1 г. (около 7000 тонн), используется для синтеза аспартама – низкокалорийного сахарозаменителя, входящего в состав более чем 6 тыс. пищевых продуктов [1]. Соли калия и магния L-Асп применяются для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Кроме того, они входят в состав лекарственных препаратов, используемых для лечения печеночной энцефалопатии [3]. Для химической промышленности L-Асп является перспективной “технологической платформой” для синтеза биodeградируемых полимеров, аспарагинового ангидрида и аминированных аналогов таких мировых химических “бестселлеров”, как 1,4-бутандиол, тетрагидрофуран и гамма-бутиролактон, используемых в производстве растворителей, ПАВ, ингибиторов коррозии и супер-абсорбирующих полимеров [4].

**Сокращения:** АДГ – L-аспартат дегидрогеназа; L-Асп – L-аспарагиновая кислота; L-Глу – L-глутаминовая кислота; ОА – оксалоацетат; ААТ – аспартат аминотрансфераза; ГлС – глутамат синтаза; Гс – глутамин синтаза; ГДГ – глутамат дегидрогеназа; АДГ<sub>тна</sub> – АДГ из *Thermotoga maritima*; АДГ<sub>афу</sub> – АДГ из *Archaeoglobus fulgidus*; АДГ<sub>реу</sub> – АДГ из *Ralstonia eutropha*; АДГ<sub>рае</sub> – АДГ из *Pseudomonas aeruginosa*; АДГ<sub>гра</sub> – АДГ из *Rhodopseudomonas palustris*; АДГ<sub>жа</sub> – АДГ из *Bradyrhizobium japonicum*; Гис – гистидин; Арг – аргинин; Иле – изолейцин; Про – пролин; ОРС – открытая рамка считывания; Ар – ампициллин; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; α-кГ – α-кетоглутарат; ФЕП – фосфоенолпируват.

Промышленное производство L-Асп основано на ферментативном аминировании фумаровой кислоты с использованием иммобилизованного фермента аспартазы или иммобилизованных бактериальных клеток с высокой аспартазной активностью. Кроме того, L-Асп получают из малеиновой кислоты в мембранной реакторной системе с использованием бактериальных клеток с высокими активностями малеат изомеразы и аспартазы [5]. В обоих случаях, в качестве исходного сырья, используются продукты переработки нефти (фумарат, малеат), что существенно ограничивает перспективы развития данной технологии ввиду исчерпаемости мировых углеводородных ресурсов и, как следствие, неизбежного роста цен на нефтепродукты. Кроме того, на пищевом рынке наблюдается активное продвижение “натуральных продуктов” (natural foods), содержащих исключительно “биогенные” компоненты.

В этой связи микробиологический синтез L-Асп из возобновляемых и дешевых углеводов (по аналогии с известными примерами биотехнологического производства L-глутаминовой кислоты (L-Глу), L-лизина, и т.д. [6, 7]) мог бы стать перспективной альтернативой современному производству L-Асп из субстратов, получаемых из нефти.

Аэробный синтез L-Асп можно разделить на две принципиальные части: синтез оксалоацетата (ОА) из глюкозы и ассимиляцию азота посредством аминирования ОА (рис. 1). В клетках *E. coli*



**Рис. 1.** Схема биосинтеза L-Асп в клетках *E. coli* дополненная путем аминирования ОА с помощью АДГ. ОА рассматривается как продукт карбоксилирования фосфоенолпирувата (ФЕП), синтезированного в гликолизе. Встраивание азота в молекулу L-Асп рассматривается тремя путями с помощью ААТ/ГС/ГлС, ААТ/ГДГ или АДГ.

аминирование ОА осуществляет аспарат-амино-трансфераза (ААТ) путем переноса аминогруппы с L-Глу; тогда как неорганический азот может фиксироваться в молекуле L-Глу благодаря активности глутамат синтазы (ГлС) и глутамин синтазы (ГС) или глутамат дегидрогеназы (ГДГ) [8]. Принято считать [9, 10], что задача биосинтеза L-Асп значительно упрощается, если для аминирования ОА использовать не ферменты метаболизма L-Глу, а аспарат дегидрогеназу (АДГ) (рис. 1).

На данный момент охарактеризованы только 4 прокариотические АДГ, для которых *in vitro* показан катализ как окислительного дезаминирования L-Асп, так и восстановительного аминирования ОА с использованием НАД(Ф)<sup>+</sup>/НАД(Ф)Н в качестве кофактора [10–13]. Однако *in vivo* основной функцией термофильных АДГ из *Thermotoga maritima* (АДГ<sub>тма</sub>) и *Archaeoglobus fulgidus* (АДГ<sub>афу</sub>) является, по-видимому, катализ окислительного дезаминирования L-Асп до промежуточного продукта реакции – иминоаспартата, который далее используется в пути биосинтеза НАД<sup>+</sup> de novo [12, 13]. АДГ из мезофильной почвенной бактерии *Ralstonia eutropha* (АДГ<sub>реу</sub>), по-видимому, *in vivo* участвует в катаболизме L-Асп для обеспечения клеток азотом и углеродом [11]. Биологическая роль недавно обнаруженной АДГ в клетках мезофильной бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, (АДГ<sub>рае</sub>) не установлена, тем не менее в экспериментах Ли и соавт. [10] удалось использовать способность этого фермента аминировать

ОА в разработанных авторами системах биоконверсии фумарата или сукцината до L-Асп. Однако возможность использования гена АДГ<sub>рае</sub> для конструирования промышленного продуцента L-Асп ограничена тем, что *P. aeruginosa* является условным патогеном для человека и относится к группе второго уровня биологической безопасности.

Цель работы – поиск и характеристика “биосинтетических” (аммонийфиксирующих) АДГ в бактериях первого уровня биологической безопасности для дальнейшего конструирования штаммов-продуцентов L-Асп методами метаболической инженерии.

## МЕТОДИКА

**Бактериальные штаммы, плазмиды, среды и реактивы.** Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные и (или) сконструированные в данной работе, представлены в табл. 1.; химические реактивы фирмы “Sigma” (США), за исключением L-аминокислот полученных от компании “Ajinomoto” (Япония).

**ДНК-манипуляции.** Манипуляции с ДНК проводили по стандартным методикам [14] с использованием коммерчески доступных ферментов (“Fermentas”, Литва; “Promega”, США).

**Конструирование плазмид.** Гибридные гены, кодирующие изучаемые АДГ из *R. palustris* и *V. japonicum* и слитые с лидерной последовательностью, кодирующей N-концевую Гис<sub>6</sub>-метку,

**Таблица 1.** Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные или сконструированные в данной работе

Штамм или плаزمид*	Генотип, характеристика	Источник, ссылка
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) <i>lon gal λ</i> (DE3)	“Novagen” (США); [15]
<i>E. coli</i> TG1	Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>supE thi hsdΔ5 F' traΔ36 proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i>	ВКПМ**
pET-15b	Экспрессионный вектор для системы с T7 РНК-полимеразой; Ap <sup>R</sup>	“Novagen” (США)
pPCRScript_ADH1-Rp	Источник RPB_0147 ОРС <i>R. palustris</i> с замененными редкими кодонами и Гис <sub>6</sub> сигналом; Ap <sup>R</sup>	“Sloning BioTechnology GmbH” (Германия)
pSlo3.1A_2_ADH-Bj	Источник bl16567 ОРС <i>B. japonicum</i> с замененными редкими кодонами и Гис <sub>6</sub> сигналом; Ap <sup>R</sup>	“Sloning BioTechnology GmbH” (Германия)
pET15-ADH-Rp	pET-15b с клонированной RPB_0147 ОРС <i>R. palustris</i> с замененными редкими кодонами и Гис <sub>6</sub> сигналом; Ap <sup>R</sup>	Данная работа
pET15-ADH-Bj	pET-15b с клонированной bl16567 ОРС <i>B. japonicum</i> с замененными редкими кодонами и Гис <sub>6</sub> сигналом; Ap <sup>R</sup>	Данная работа

\* Штаммы *E. coli* культивировали аэробно при 37°C в среде LB [14]. Для селекции и поддержания плазмидосодержащих клеток их культивирование проводили в присутствии 200 мг/л ампициллина (Ap).

\*\* ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва).

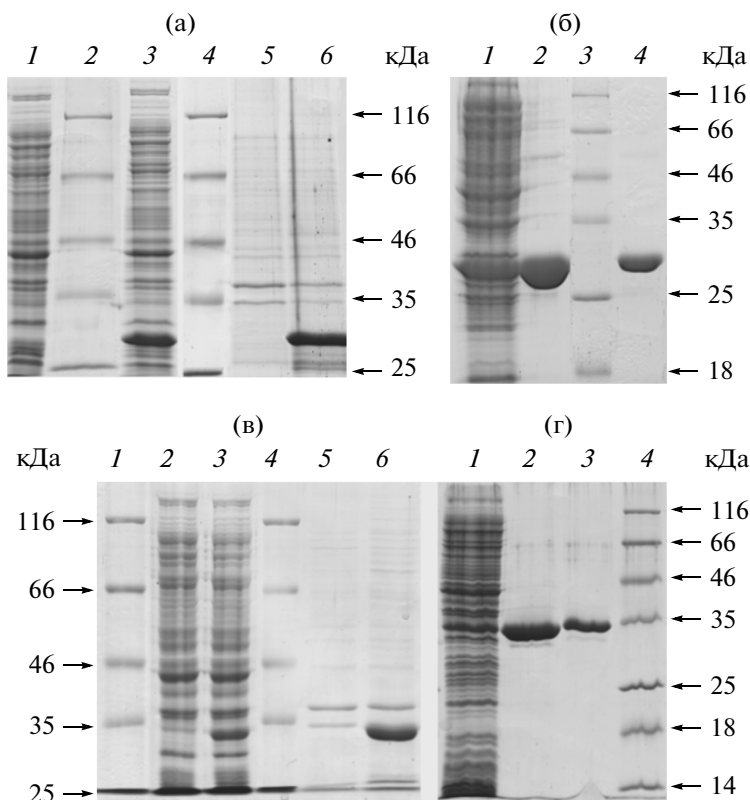
были химически синтезированы “Sloning BioTechnology GmbH” (Германия). Поскольку структурные части исследуемых нативных генов содержали редко используемые в *E. coli* кодоны, при химическом синтезе искусственных генов было решено заменить эти кодоны синонимическими, часто встречающимися в геноме *E. coli* (AGG<sup>Arg</sup> → CGU<sup>Arg</sup>, AGA<sup>Arg</sup> → CGU<sup>Arg</sup>, AUA<sup>Ile</sup> → AUC<sup>Ile</sup>, CCC<sup>Pro</sup> → CCG<sup>Pro</sup>). Для этого в последовательность открытой рамки считывания (ОРС) RPB\_0147 (NCBI GeneID:3908117) из генома *R. palustris* были введены следующие нуклеотидные замены: G15T, G162T, A235C, G237C, A277C, G279T, G435T, G702T, C741G, G807T. Аналогичной модификации подверглась ОРС bl16567 (NCBI GeneID:1050893) из генома *B. japonicum*: A7C, A9T, A10C, G12T, C153G, C501G, C765G. Фрагменты ДНК, содержащие синтетические гены, фланкированные сайтами рестрикции *XbaI* и *VamNI*, были химически синтезированы, а затем клонированы в составе вектора pET15(b) по сайтам *XbaI* и *VamNI*. Первичная структура ДНК синтетических гибридных генов в составе сконструированных плазмид pET15-ADH-Rp и pET15-ADH-Bj была подтверждена секвенированием с использованием праймеров Pr1 (5'-AGCAACCGCACCTGTGGCGC-3') и Pr2 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), синтезированных в ЗАО “Синтол” (Россия).

**Очистка и определение активности АДГ.** Клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3)[pET15-ADH-Rp] и BL21(DE3)[pET15-ADH-Bj], содержащие ген РНК полимеразы фага T7 под контролем промотора P<sub>lacUV5</sub> в хромосоме, а гены исследуемых АДГ под контролем промотора, узнаваемого РНК полимеразой T7, в составе рекомбинантных плазмид, выращивали в колбах (5 × 200 мл) в среде LB с добавлением ампициллина (Ap) до D<sub>595</sub> = 1. Синтез це-

левых белков индуцировали добавлением 1 мМ изо-пропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и продолжали культивирование в течение 3 ч. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в буфере № 1 (20 мМ фосфат натрия, рН 7.0, 0.5 мМ NaCl, 20 мМ имидазол) и разрушали с помощью Френч-пресса (P = 2000 psi). Клеточные обломки и остатки неразрушенных клеток удаляли центрифугированием. Из полученного супернатанта выделяли целевые белки с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке HisTrap HP согласно рекомендациям производителя (“GE Healthcare”, Великобритания). Элюированные имидазолом целевые белки переводили в буфер А (20 мМ фосфат натрия, рН 7.0, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 15% глицерина) с помощью гель-хроматографии на колонке PD10 (“GE Healthcare”, Великобритания) и хранили при -70°C.

Смесь для АДГ<sub>гра</sub> или АДГ<sub>бја</sub> в реакции аминирования содержала 0.1 М трис-НСl, рН 9.0, 0.15 мМ НАДФН, 100 или 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl и 20 или 30 мМ ОА соответственно. Смесь для АДГ<sub>гра</sub> или АДГ<sub>бја</sub> в реакции дезаминирования содержала 0.1 М трис-НСl, рН 9.8, 1 или 2 мМ НАДФ<sup>+</sup> и 40 или 100 мМ L-Асп соответственно. Реакции инициировали добавлением субстрата (ОА или L-Асп). Контрольное измерение проводили в отсутствие NH<sub>4</sub>Cl в реакции аминирования и без L-Асп в реакции дезаминирования. За единицу активности фермента принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль НАДФН за 1 мин при 28°C. Для расчета активности использовали коэффициент поглощения НАД(Ф)Н при 340 нм, равный 6.22 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

Оптимальные значения рН для очищенных АДГ определяли с использованием следующих буферов: 0.1 М MES-NaOH (рН от 6.0 до 7.0), 0.1 М трис-НСl



**Рис. 2.** Биосинтез и очистка рекомбинантных АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бja</sub>; а – клеточные экстракты индуцированных ИПТГ штаммов BL21(DE3)[pET15-ADH-Rp] и BL21(DE3)[pET15b], контроля; 1, 3 – растворимая фракция контрольного и опытного штамма, 2, 4 – белковые маркеры молекулярных масс, 5, 6 – нерастворимая фракция контрольного и опытного штамма; б – очистка His<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub>; 1 – растворимая фракция клеточного экстракта BL21(DE3)[pET15-ADH-Rp], 2, 4 – очищенный His<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> (12 и 3 мкг), 3 – маркеры; в – клеточные экстракты индуцированных ИПТГ штаммов BL21(DE3)[pET15-ADH-Vj] и BL21(DE3)[pET15b], контроля; 1, 4 – маркеры, 2, 3 – растворимая фракция контрольного и опытного штамма, 5, 6 – нерастворимая фракция контрольного и опытного штамма; г – очистка His<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub>; 1 – растворимая фракция клеточного экстракта BL21(DE3)[pET15-ADH-Vj], 2, 3 – очищенный His<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub> (5 и 2 мкг), 4 – маркеры.

(рН от 7.0 до 9.8) и 0.05 М глицин-NaOH (рН от 8.1 до 12.0) с добавлением 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0.15 мМ НАДФН и 20 мМ ОА в реакции аминирования или с добавлением 2 мМ НАДФ<sup>+</sup> и 10 мМ L-Асп в реакции дезаминирования. Исследование субстратной специфичности очищенных ферментов проводили в присутствии 20 мМ кетокислот (пируват, α-кетоглутарат (α-кГ), α-кетобутират, кетоизовалериат и кетометилвалериановая кислота) для реакции аминирования (100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0.15 мМ НАДФН, 0.1 М трис-НСl, рН 9.0) или 20 мМ аминокислот (L-Глу, L-аланин, α-аминобутират, L-валин, L-изолейцин и аспаргин) для реакции дезаминирования (2 мМ НАДФ<sup>+</sup>, 0.1 М трис-НСl, рН 9.8).

Значения кажущихся констант  $K_M$  находили с помощью регрессионного анализа соответствующих кривых насыщения для исследованных субстратов и кофакторов с использованием программы Sigma Plot 8.0. Значения  $k_{кат}$  и  $k_{кат}/K_M$  рассчитывали

с учетом молекулярных масс ферментов: в 30.63 кДа для His<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и 30.76 кДа для His<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub>.

**Аналитические методы.** Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [16] с использованием БСА в качестве стандарта. Белковый денатурирующий электрофорез в 10–12% ПААГ выполняли по методу Лэммли [17]. Определение ОА, образовавшегося в ферментативной реакции, проводили методом капиллярного электрофореза [18]. Для определения L-Асп и ионов аммония (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), образовавшихся в ферментативных реакциях, использовали метод ВЭЖХ [19, 20]. Реакционная смесь для аминирования ОА содержала 0.1 М трис-НСl, рН 9.0, 2 мМ НАДФН, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 20 мМ ОА и 1 мкл очищенного фермента АДГ; через 0 или 20 мин инкубации при 28°C реакцию останавливали путем охлаждения смеси до 0°C. Реакционная смесь для дезаминирования L-Асп содержала 0.05 М трис-НСl, рН 9.8, 5 мМ

**Таблица 2.** Очистка рекомбинантных АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бja</sub> из *E. coli*

Фермент	Этап очистки	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность*, Е/мг	Выход, %	Степень очистки, раз
АДГ <sub>гра</sub>	Клеточный экстракт	48	30.2	0.62	100	1
	Аффинная хроматография	1.8	5.7	3.1	19	5
АДГ <sub>бja</sub>	Клеточный экстракт	95	14.1	0.15	100	1
	Аффинная хроматография	1.8	7.5	4.2	53	28

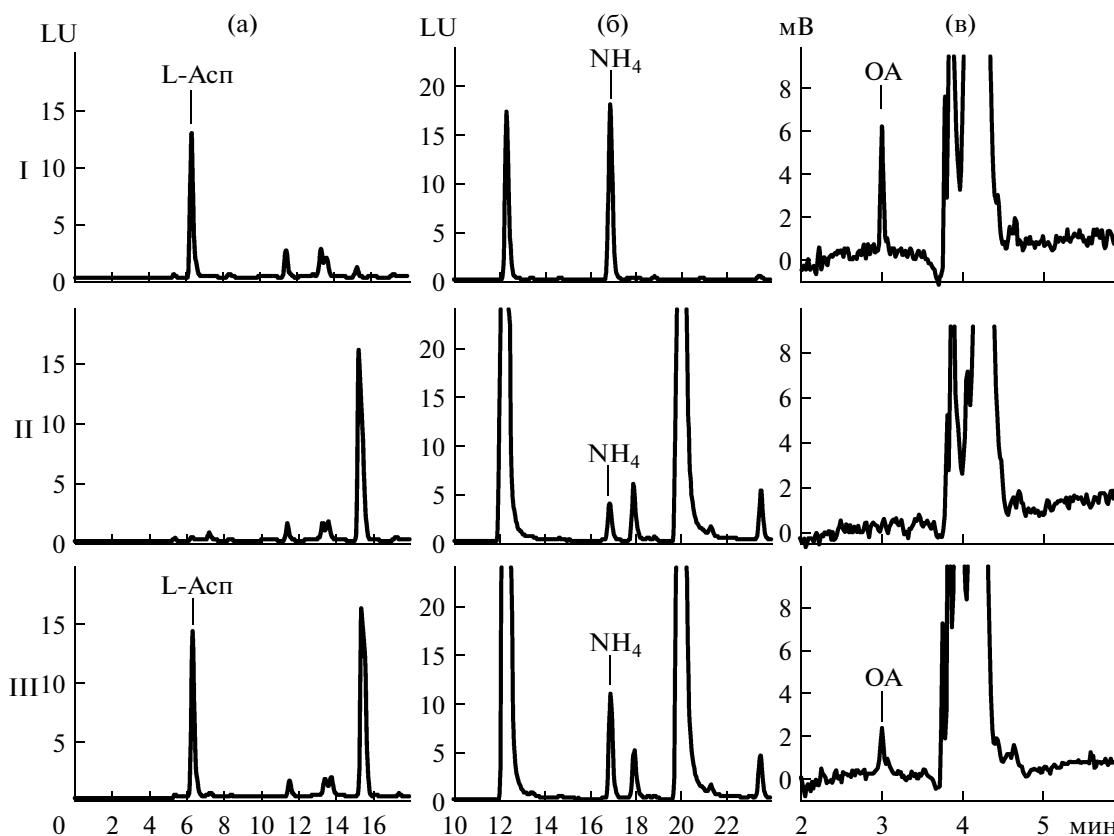
\* Активность определяли при 28°C в окислительной реакции (0.1 М трис-НСl, рН 9.8, 2 мМ НАДФ<sup>+</sup>, 10 мМ L-Асп).

НАДФ<sup>+</sup>, 40 мМ L-Асп и 10 мкл очищенного фермента АДГ; через 0 или 90 мин инкубации при 28°C реакцию останавливали путем охлаждения смеси до 0°C.

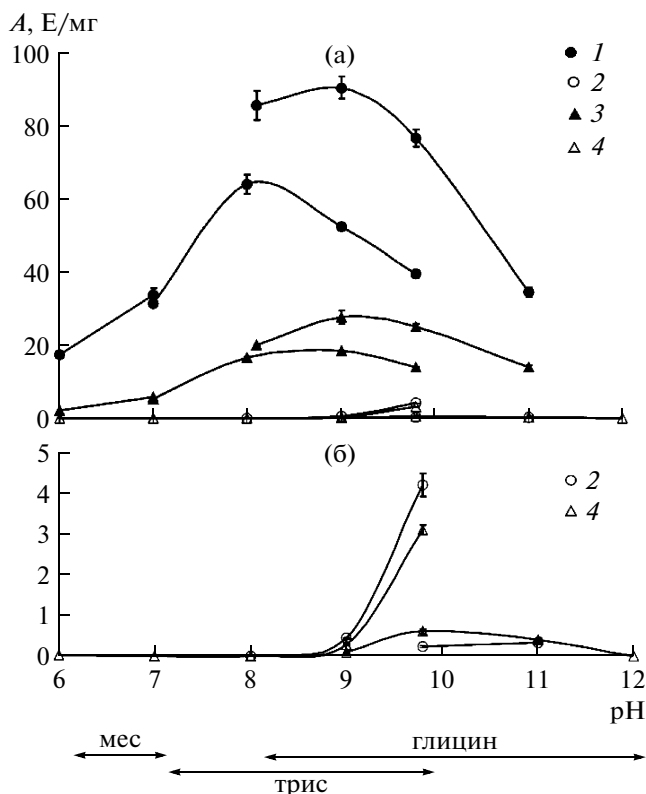
[12] по базе данных NCBI был проведен с помощью компьютерной программы BLASTP (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Была обнаружена группа гомологичных ОРС предполагаемых АДГ в геномах азотфиксирующих бактерий, что, в частности, могло свидетельствовать о наличии дополнительного пути фиксации аммония в результате биосинтеза L-Асп в этих микроорганизмах. К тому же согласно современной модели углеродного и азотного обмена между симбиотическими бактериями и растениями, L-Асп наряду с аммонием и L-аланином, об-

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Поиск анаболических АДГ в геномах мезофильных бактерий и экспрессия соответствующих генов в *E. coli*.** Поиск гомологов охарактеризованной термофильной АДГ<sub>tma</sub> (NCBI protein\_id:NP\_229443.1)



**Рис. 3.** Определение продуктов реакции методом ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. Ферментативное образование L-Асп (а), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (б) и ОА (в); I – стандарты L-Асп и NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в водном растворе, стандарт ОА в растворе реакционной смеси без фермента; II – стартовая реакционная смесь (аналогичная картина наблюдалась в контрольной реакционной смеси без субстрата или фермента после инкубирования); III – после инкубирования. LU – единицы люминесценции.



**Рис. 4.** Зависимость активности рекомбинантных АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бжа</sub> от рН. Активность Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бжа</sub> в реакциях аминирования ОА (1) и дезаминирования L-Асп (2); активность Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> в реакциях аминирования ОА (3) и дезаминирования L-Асп (4). Дезаминирование L-Асп также приведено в увеличенном в 10 раз по оси ординат масштабе (б).

разовавшиеся в бактериоиде, секретируются в цитозоль растительной клетки в качестве носителей азота [21]. И хотя в основном образование L-Асп в бактериоидах происходит путем трансаминирования ОА за счет активности ААТ [22, 23], в то же время в бактериоидных экстрактах *Rhizobium lupini* экспериментально зарегистрирована активность АДГ [24].

Поэтому для дальнейшего исследования мы выбрали продукт, кодируемый ОРС bll6567, из симбиотической азотфиксирующей бактерии *B. japonicum* USDA 110, и его близкий гомолог (74% идентичности) из свободноживущей *R. palustris* HaA2 (ОРС RPB\_0147). Структурные части обеих ОРС с оптимизированным для трансляции в *E. coli* кодоновым составом, были химически синтезированы, клонированы в составе коммерчески доступного вектора pET-15b и экспрессированы в специализированном реципиентном штамме — *E. coli* BL21(DE3) с накоплением гибридных белков с N-концевым Гис<sub>6</sub>-лидером. Как видно из рис. 2а и 2в, через 3 ч индукции

использованной экспрессионной системы бактериофага Т7 в клетках логарифмически растущей культуры наблюдалось накопление белковых продуктов с электрофоретической подвижностью, ожидаемой для Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бжа</sub> (соответствующей белкам с массой ~31 кДа). Доля Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бжа</sub> в растворимой фракции составила 10–15% от суммарного растворимого белка. Индукция сопровождалась появлением АДГ активности в грубых экстрактах рекомбинантных штаммов (данные не представлены).

**Очистка и биохимическая характеристика новых дегидрогеназ.** Гибридные с Гис<sub>6</sub>-лидером АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бжа</sub> были очищены с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии. Чистота полученных препаратов белков была более 90% (рис. 2б и 2г) и они обладали АДГ активностью детектируемой по образованию НАДФН в реакции дезаминирования L-Асп при 28°C (табл. 2).

Поскольку аминокислотная последовательность обоих выделенных ферментов имеет низкую идентичность (28–37%) со всеми ранее охарактеризованными АДГ (АДГ<sub>тма</sub>, АДГ<sub>афу</sub>, АДГ<sub>рае</sub> и АДГ<sub>геи</sub>), образование L-Асп в реакции восстановительного аминирования ОА, катализируемое *in vitro* Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub>, было подтверждено ВЭЖХ (рис. 3а). В свою очередь, образование ОА и ионов аммония в реакции окислительного дезаминирования L-Асп, катализируемой Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub>, было подтверждено капиллярным электрофорезом (рис. 3в) и ВЭЖХ (рис. 3б) соответственно. Сходные результаты были получены с Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бжа</sub> как в реакции аминирования ОА, так и дезаминирования L-Асп (данные не представлены).

Очищенные Гис<sub>6</sub>-АДГ показали максимум активности при рН 9.8 для дезаминирования L-Асп и при рН 8.0–9.0 для аминирования ОА, причем активность аминирования ОА была значительно выше дезаминирования (рис. 4). Внутриклеточный рН в бактериоидах *B. japonicum*, клетках *R. palustris*, а также *E. coli* и других энтеробактерий по разным оценкам находится в диапазоне значений рН 7.0–8.0 [25–29]. При рН 7.0–8.0 активность дезаминирования L-Асп ферментами Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бжа</sub> *in vitro* не детектировалась, тогда как активность аминирования ОА снизилась несущественно относительно своего максимально детектируемого уровня (рис. 4). Поэтому можно предполагать, что при физиологических рН оба фермента катализируют аминирование ОА в гомологичном окружении в клетках *R. palustris* и *B. japonicum*, а также, что соответствующие ферменты могут быть использованы для выполнения аналогичной функции в искусственно созда-

ваемых продуцентах L-Асп на основе рекомбинантных клеток *E. coli* или других энтеробактерий.

**Субстратная специфичность и кинетические параметры рекомбинантных АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бja</sub>.** Анализ субстратной специфичности дегидрогеназ показал, что Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub> имеют высокое сродство к ОА и L-Асп с использованием НАДФН/НАДФ<sup>+</sup> в качестве кофакторов, но, например, не к α-кГ, пирувату, а также к ряду других проверенных субстратов (табл. 3).

Для обоих выделенных ферментов были исследованы кинетические параметры реакций аминирования ОА и дезаминирования L-Асп в области оптимальных рН (табл. 4). Кривые насыщения для обоих ферментов представляли собой классические гиперболы Михаэлиса–Ментен. Сравнение значений  $k_{кат}/K_M$  по кофакторам показало, что оба фермента значительно более специфичны к НАДФН (на 1–2 порядка), чем к НАДН. Судя по каталитической эффективности  $k_{кат}$  прямой и обратной реакций, новые Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub> катализировали аминирование ОА с НАДФН значительно быстрее (в 7–8 раз), чем дезаминирование L-Асп. Высокое сродство к НАДФ(Н) и более быстрое аминирование ОА новыми ферментами Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub> отличает их от ранее охарактеризованных АДГ (см. табл. 4).

Кажущееся значение  $K_M$  для Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>бja</sub> по амонию (4.3 мМ) значительно меньше аналогичных  $K_M$  для Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>гра</sub> и известных из литературы значений для АДГ<sub>рае</sub>, Гис<sub>6</sub>-АДГ<sub>геu</sub> и АДГ<sub>afu</sub> [10, 11, 13] (табл. 4). Для кажущихся значений  $K_M$  по ОА наблюдается обратная тенденция (табл. 4).

Необходимо отметить, что экспериментально определенные параметры в данной работе характеризуют не нативные ферменты, как в работах других авторов, а гибридные белки с Гис<sub>6</sub>-пептидом на N-конце, что, возможно, несколько занижает их функциональные характеристики.

Тем не менее даже эти экспериментально определенные параметры косвенно свидетельствуют о возможности выполнения новыми ферментами функции восстановительного аминирования ОА в своем природном биологическом окружении. Действительно, оцениваемая в 12 мМ концентрация NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в бактериоидах *B. japonicum* [30] вполне физиологична для фермента, имеющего  $K_M = 4.3$  мМ. Учитывая при этом, что отношение НАДФН/НАДФ<sup>+</sup> = 2.7 в условиях, имитирующих нахождение бактериоидов *B. japonicum* в клубеньке [31], логично предположить участие АДГ<sub>бja</sub> в ассимиляции аммония за счет катализа аминирования ОА до L-Асп для обеспечения нужд бактериоида и поддержания симбиоза с растением.

**Таблица 3.** Субстратная специфичность рекомбинантных АДГ

Субстрат	Фермент	
	АДГ <sub>гра</sub>	АДГ <sub>бja</sub>
Восстановительное аминирование*, %		
Оксалоацетат	100 ± 2	100 ± 2
α-кетоглутарат	2.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Пируват	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1
α-кетобутират	<0.2	<0.2
Кетоизовалериат	<0.2	<0.2
Кетометилвалериат	<0.2	<0.2
Окислительное дезаминирование**, %		
L-аспарат	100 ± 8	100 ± 11
L-глутамат	4.5 ± 0.4	6 ± 1
L-аланин	<2	<2

\* Для реакций аминирования с НАДФН за 100% принята активность АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бja</sub> с оксалоацетатом, равная 16.5 и 51 Е/мг соответственно.

\*\* Для реакций дезаминирования с НАДФ<sup>+</sup> за 100% принята активность АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бja</sub> с L-Асп, равная 4.4 и 5.6 Е/мг соответственно.

Интересно, что в геноме *R. palustris* HaA2 (NCBI Ref. Seq.:NC\_007778.1) не найден ген ГДГ, играющей ключевую роль в азотном метаболизме во многих микроорганизмах. Поэтому с учетом свойств идентифицированной АДГ<sub>гра</sub>, возможно, именно этот фермент контролирует ассимиляцию аммония в клетках *R. palustris*.

Таким образом, в работе найдены и охарактеризованы новые АДГ из мезофильных азотфиксирующих бактерий *B. japonicum* и *R. palustris*. На основании полученных данных оба фермента могут быть отнесены к биосинтетическим, участвующим в ассимиляции аммония, и могут быть использованы для создания штаммов-продуцентов L-Асп, а также в качестве объектов рациональной или комбинаторной белковой инженерии с целью конструирования АДГ с оптимальными кинетическими свойствами.

Авторы выражают благодарность за ценные консультации проф. Р.С. Шакулову (ФГУП ГосНИИгенетика) и проф. С.В. Машко (НИИ Аджиномото-Генетика), а также А.Е. Новиковой (НИИ Аджиномото-Генетика) за помощь в проведении ряда аналитических экспериментов.

**Таблица 4.** Кинетические параметры рекомбинантных АДГ<sub>гра</sub> и АДГ<sub>бја</sub> в сравнении с параметрами известных АДГ<sub>геу</sub> [11], АДГ<sub>рае</sub> [10], АДГ<sub>афу</sub> [13] и АДГ<sub>тма</sub> [12]

Параметр $K_M$ , мМ; $k_{кат}$ , 1/с; $k_{кат}/K_M$ , 1/(мМ × с)		АДГ <sub>гра</sub>	АДГ <sub>бја</sub>	АДГ <sub>геу</sub>	АДГ <sub>рае</sub>	АДГ <sub>афу</sub>	АДГ <sub>тма</sub>
Восстановительное аминирование оксалоацетата							
Условие		рН 9.0, 28°C	рН 9.0, 28°C	рН 8.2, 37°C	рН 8.2, 37°C	рН 7.5, 50°C	
ОА	$K_M$	9.2 ± 0.9	21 ± 6	2.32	2.12	1.2	—
	$k_{кат}$	14.2 ± 0.7	48 ± 6	—	68.4	—	—
	$k_{кат}/K_M$	1.5	2.3	—	32.3	—	—
NH <sub>4</sub> Cl	$K_M$	11.3 ± 1.1	4.3 ± 0.7	14.9	10.1	167	—
	$k_{кат}$	10.3 ± 0.3	24.7 ± 0.9	—	62.0	—	—
	$k_{кат}/K_M$	0.91	5.7	—	6.14	—	—
НАДФН	$K_M$	0.21 ± 0.05	0.032 ± 0.005	—	0.052	—	—
	$k_{кат}$	19 ± 2	41 ± 2	—	80.2	—	—
	$k_{кат}/K_M$	90	1300	—	1542	—	—
НАДН	$K_M$	4.5 ± 0.4	0.25 ± 0.04	0.061	0.045	0.014	—
	$k_{кат}$	5.2 ± 0.3	26.2 ± 1.4	—	70.5	—	—
	$k_{кат}/K_M$	1.1	100	—	1567	—	—
Окислительное дезаминирование L-аспартата							
Условие		рН 9.8, 28°C	рН 9.8, 28°C	рН 10.2, 37°C	рН 9.8, 37°C	рН 11.3, 50°C	рН 9.8, 70°C
L-Асп	$K_M$	13.4 ± 0.5	27 ± 4	2.30	4.87	0.19	0.067
	$k_{кат}$	2.86 ± 0.04	7.3 ± 0.4	—	59.7	—	0.78
	$k_{кат}/K_M$	0.21	0.28	—	12.3	—	11.6
НАДФ <sup>+</sup>	$K_M$	0.102 ± 0.011	0.12 ± 0.02	7.43	0.47	0.32	0.72
	$k_{кат}$	2.33 ± 0.07	6.2 ± 0.2	—	46.1	—	7.2
	$k_{кат}/K_M$	23	53	—	98.1	—	10.0
НАД <sup>+</sup>	$K_M$	7.0 ± 0.3	10 ± 3	0.97	0.47	0.11	0.25
	$k_{кат}$	1.59 ± 0.03	3.3 ± 0.5	—	62.9	—	1.2
	$k_{кат}/K_M$	0.23	0.33	—	133.8	—	4.7

Знак “—” — нет данных.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Magnuson B.A., Burdock G.A., Doull J., Kroes R.M., Marsh G.M., Pariza M.W., Spencer P.S., Waddell W.J., Walker R., Williams G.M. // Crit. Rev. Toxicol. 2007. V. 37. № 8. P. 629–727.
- Иежица И.Н., Снагов А.А. // Успехи физиол. наук. 2007. Т. 38. № 4. С. 39–57.
- Cash W.J., McConville P., McDermott E., McCormick P.A., Callender M.E., McDougall N.I. // Quarterly journal of medicine (Q.J.M.). 2010. V. 103. № 1. P. 9–16.
- Werpy T., Petersen G. // US Department of Energy, Oak Ridge. 2004. P. 1–76. <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>.
- Yukawa H., Ookino S., Inui M. // Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology / Ed. M.C. Flickinger. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010. P. 1–3.
- Hermann T. // J. Biotechnol. 2003. V. 104. № 1–3. P. 155–172.
- Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L., Wubbolts M. // Metab. Eng. 2001. V. 3. № 4. P. 289–300.
- Reitzer L. // Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology / Eds. A. Böck, R. Curtiss III, J.B. Kaper, P.D. Karp, F.C. Neidhardt, T. Nyström, J.M. Slauch, C.L. Squires, D. Ussery. Washington: A.S.M. Press, 2004. P. 1–33.
- Li Y., Ogola H.J., Sawa Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93. № 2. P. 503–516.



10. Li Y., Kawakami N., Ogola H.J.O., Ishikawa T., Shibata H., Sawa Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. № 6. P. 1953–1962.
11. Li Y., Ishida M., Ashida H., Ishikawa T., Shibata H., Sawa Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. № 8. P. 1524–1532.
12. Yang Z., Savchenko A., Yakunin A., Zhang R., Edwards A., Arrowsmith C., Tong L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 10. P. 8804–8808.
13. Yoneda K., Kawakami R., Tagashira Y., Sakuraba H., Goda S., Ohshima T. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1764. № 6. P. 1087–1093.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989. 1448 p.
15. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. // Methods Enzymol. 1990. V. 185. P. 60–89.
16. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
18. Willetts M., Clarkson P., Cooke M. // Chromatographia. 1996. V. 43. № 11/12. P. 671–674.
19. Cohen S.A., Michaud D.P. // Anal. Biochem. 1993. V. 211. № 2. P. 279–287.
20. Jones B.N., Gilligan J.P. // J. Chromatog. 1983. V. 266. P. 471–482.
21. Prell J., Pool P. // Trends Microbiol. 2006. V. 14. № 4. P. 161–168.
22. Rastogi V.K., Watson R.J. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 9. P. 2879–2887.
23. Lodwig E.M., Hosie A.H.F., Bourdes A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S. // Nature. 2003. V. 422. № 6933. P. 722–726.
24. Kretovich W.L., Kariakina T.I., Weinova M.K., Sidelnikova L.I., Kazakova O.W. // Plant Soil. 1981. V. 61. № 1–2. P. 145–156.
25. Bhandary B., Nicolas D.J.D. // J. Bacteriol. 1985. V. 164. № 3. P. 1383–1385.
26. Rolin D.B., Boswell R.T., Sloger C., Tu S.-I., Pfeffer P.E. // Plant Physiol. 1989. V. 89. № 4. P. 1238–1246.
27. Harwood C.S., Gibson J. // J. Bacteriol. 1986. V. 165. № 2. P. 504–509.
28. Wilks J.C., Slonczewski J.L. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 15. P. 5601–5607.
29. Laane C., Krone W., Konings W.N., Haaker H., Veeger C. // FEBS Lett. 1979. V. 103. № 2. P. 328–332.
30. Streeter J.G. // Plant Physiol. 1989. V. 90. № 3. P. 779–782.
31. Tajima S., Kouzai K., Kimura I. // Nitrogen Fixation: Hundred Years After / Eds. H. Bothe, F.J. de Bruijn, W.E. Newton. New York: Gustav Fischer, 1988. P. 564.

## Novel NADPH-Dependent L-Aspartate Dehydrogenases from the Mesophilic Nitrogen-Fixing Bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium japonicum*

T. M. Kuvaeva, J. I. Katashkina, A. D. Kivero, and S. V. Smirnov

*Ajinomoto-Genetika Research Institute, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 117545 Russia*

*e-mail: Tatiana\_Kuvaeva@agri.ru*

Received April 12, 2012

**Abstract**—The genes encoding putative L-aspartate dehydrogenases (EC 1.4.1.21, ADH) from the mesophilic nitrogen-fixing bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium japonicum* were cloned and expressed in *Escherichia coli*. The respective enzymes in the form of hybrid proteins with N-terminal hexahistidine tags were purified to apparent homogeneity. Both enzymes catalyzed in vitro the reductive amination of oxaloacetate to L-aspartate by an order faster than the reverse reaction at a respective pH optimum of 8.0–9.0 and 9.8; also, the enzymes only catalyzed amination under physiological conditions (pH 7.0–8.0). Their specificity to NADPH was higher by 1–2 orders of magnitude than that to NADH. The apparent  $K_M$  values of ADHs from *R. palustris* for oxaloacetate, ammonium, and NADPH at pH 9.0 were 9.2, 11.3, and 0.21 mM, respectively, and the corresponding  $K_M$  values of ADH from *B. japonicum* were 21, 4.3, and 0.032 mM, respectively. The amination activity of novel ADHs may be important for the fixation of inorganic nitrogen in vivo and used for the construction of a bacterial strain-producer of L-aspartate by metabolic engineering methods.