

УДК 577.151

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО МАЛИК-ФЕРМЕНТА У АЭРОБНОГО МЕТАНОТРОФА *Methylosinus trichosporium**

© 2019 О.Н. Розова, В.Н. Хмеленина**, И.И. Мустахимов,
С.Ю. Бут, Ю.А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия;
электронная почта: khmelena@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.08.2018

После доработки 12.12.2018

Принята к публикации 18.12.2018

Рекомбинантный малик-фермент из облигатного метанотрофа *Methylosinus trichosporium* получен гетерологичной экспрессией в *Escherichia coli* и очищен металл-хелатной аффинной хроматографией. Гомогексамерный малик-фермент (6 × 80 кДа) катализировал обратимую реакцию декарбоксилирования малата с образованием пирувата и CO₂ в присутствии одно- и двухвалентных катионов и NADP⁺ в качестве кофактора. Значения k_{cat}/K_m указывали на более высокую каталитическую эффективность фермента в реакции декарбоксилирования малата по сравнению с реакцией карбоксилирования пирувата. Анализ транслированной аминокислотной последовательности белка выявил C-концевой участок, гомологичный последовательности фосфоацетилтрансферазы, однако фосфоацетилтрансферазная активность не обнаружена ни для полного размера белка, ни для C-концевого фрагмента, полученного как самостоятельный протеин. C-концевой домен белка оказывал стимулирующее влияние на активность малик-фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: малик-фермент, метанотрофы, *Methylosinus trichosporium*.

DOI: 10.1134/S0320972519040067

Малик-фермент (МФ) широко распространен у макро- и микроорганизмов. МФ катализирует окислительное декарбоксилирование малата до пирувата и CO₂ с восстановлением NAD⁺ или NADP⁺ [1, 2]:



Малик-ферменты подразделяются на три категории на основе субстратной специфичности и зависимости от кофактора: NAD⁺-зависимые, декарбоксилирующие оксалоацетат (EC 1.1.1.38), NAD(P)⁺-зависимые, недекарбоксилирующие оксалоацетат (EC 1.1.1.39), NADP⁺-зависимые (EC 1.1.1.40) [1, 3]. Некоторые малик-ферменты используют оба пиридиновых нуклеотида, но при этом имеют различную специфичность к кофакторам. Хотя считается, что малик-ферменты катализируют обратимую реакцию, они

различаются по способности карбоксилировать пируват – от полного отсутствия этой реакции до ее превалирования над реакцией декарбоксилирования [4, 5].

Аэробные бактерии, использующие метан в качестве ростового субстрата (метанотрофы), имеют возрастающий потенциал для биотехнологий, при этом для его успешного использования в настоящее время широко применяются методы генетической модификации и коррекции метаболизма перспективных штаммов. Это, в свою очередь, требует понимания функционирования основных биохимических путей и свойств ферментов. Облигатный метанотроф *Methylosinus trichosporium* OV3b – представитель класса Alphaproteobacteria, является одним из модельных организмов при изучении метилотрофии как способа существования микроорганизмов и оценки метаболического потенциала этих бактерий. *Ms. trichosporium* использует сериновый путь для C1-ассимиляции, в котором C3-соединение (серин) является первичным продуктом, образующимся в результате конденсации метилентетрагидрофолата (метилентГФ) и глицина (рис. 1). Малат, один из центральных метаболитов этого пути, синтезируется посредством трансформации серина в серии ре-

Принятые сокращения: МФ – малик-фермент, ТГФ – тетрагидрофолат, ФЕП – фосфоенолпируват, ДТНБ – 5,5-дितिобис-2-нитробензойная кислота.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-230, 28.01.2019.

** Адресат для корреспонденции.

акций, включающих переаминирование с гликоксилатом, восстановление образующегося гидроксипирувата в глицерат, фосфорилирование глицерата и карбоксилирование фосфоенолпирувата (ФЕП) в оксалоацетат [6, 7]. Последнюю из перечисленных реакций у *Ms. trichosporium* осуществляет высокоактивная ФЕП карбоксилаза, представленная двумя изоформами [8], а син-

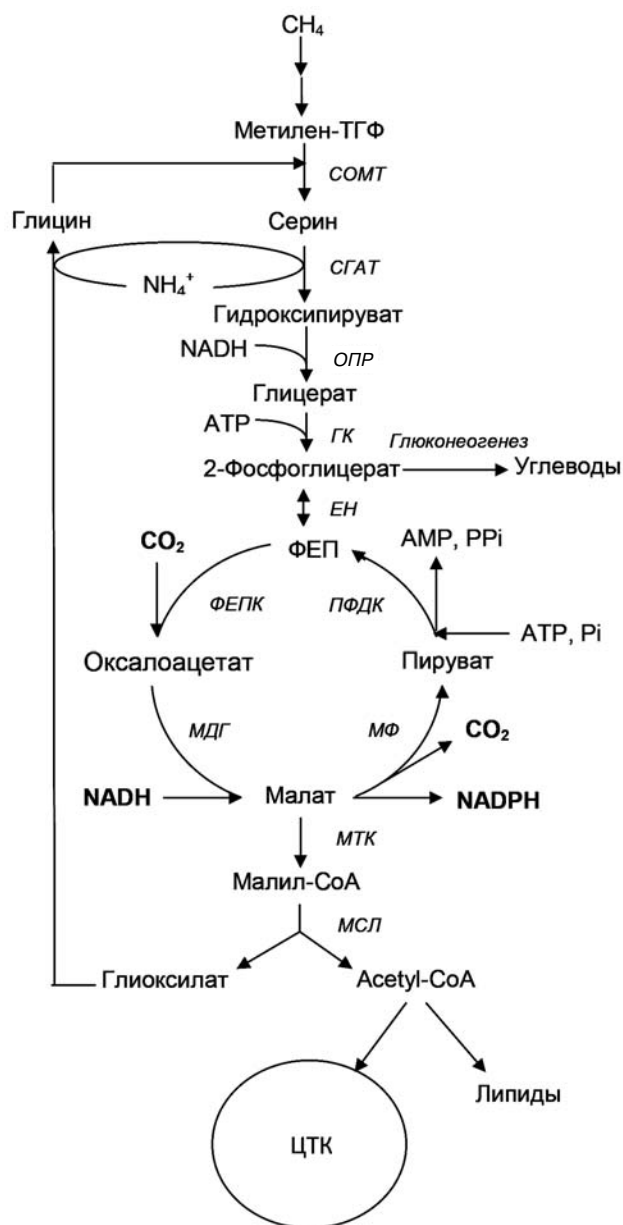


Рис. 1. Предполагаемое участие малик-фермента в центральном метаболизме *Ms. trichosporium*. COMT – сериноксиметилтрансфераза, CGAT – серингликоксилатаминотрансфераза, OPR – оксипируватредуктаза, GK – глицераткиназа, EN – енолаза, ФЕПК – ФЕП-карбоксилаза, MDG – малатдегидрогеназа, МФ – малик-фермент, ПФДК – пируватфосфаткиназа, MTK – АТФ-зависимая малаттиокиназа, MSL – малил-СоА-лиаза, метилен-ТГФ – метилентетрагидрофолат

тез малата из оксалоацетата – малатдегидрогеназа в NADH-зависимой реакции [7]. Дальнейшее превращение малата в сериновом пути связано с образованием малил-СоА и распадом этого соединения в ацетил-СоА и гликоксилат, который является предшественником глицина – акцептора одноуглеродного соединения. Таким образом, декарбоксилирующая активность малик-фермента приводит к потере С–С-связи, образованной в процессе С1-ассимиляции. Данная работа направлена на изучение каталитических свойств рекомбинантного малик-фермента с целью понимания регуляции данного участка метаболизма у аэробного метанотрофа *Ms. trichosporium*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии и условия выращивания. *Ms. trichosporium* ОВ3b^T (VKM В-2117=ATCC 35070) выращивали в атмосфере метана и воздуха (1 : 1) (v/v) на минеральной среде «П» [9], содержащей (г/л): KNO₃ – 1,0; MgSO₄ × 7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,02; Na₂HPO₄ × 5H₂O – 1,5; KH₂PO₄ – 0,7; Трилон Б (Na₂ЭДТА) – 0,005; FeSO₄ × 7H₂O – 0,002; ZnSO₄ × 7H₂O – 0,0001; MnCl₂ × 4H₂O – 0,00003; CoCl₂ × 6H₂O – 0,0002; CuSO₄ × 5H₂O – 0,0001; NiCl₂ × 6H₂O – 0,00002; Na₂MoO₄ × 2H₂O – 0,00003, при 28 °С и постоянном перемешивании (200 об/мин) в термостатированной качалке («New Brunswick Scientific», США). Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) («Novagen», Германия) выращивали в жидкой или на агаризованной среде Луриа–Бертани [10] при 37 °С. При выращивании клеток *E. coli*, содержавших плазмиду, добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Методы работы с ДНК. Выделение плазмид, рестрикцию, агарозный гель-электрофорез, лигирование и трансформацию клеток *E. coli* проводили согласно описанным методикам [10]. Использовали рестрикционные ферменты, T4 ДНК-лигазу, *Pfu* и *Taq* ДНК-полимеразы, смесь dNTPs и белковые маркеры Page Ruler Prestained Protein Ladder для Ds-Na-ПААГЭ («Thermo Scientific», США).

Получение и очистка малик-фермента. Хромосомную ДНК из *Ms. trichosporium* выделяли описанным ранее методом [11]. Ген *dme* (ID 2507408727), кодирующий предполагаемый МФ у *Ms. trichosporium* (IMG <https://img.jgi.doe.gov>), амплифицировали с помощью ПЦР и праймеров N-dme-Nde (5'-TCCATATGGCGGAGAAGCCGCGCATGGACC-3') и C-dme-Hind (5'-ATAAGCTTCCCCCGACGCCGAAGGCCGCCAGC-3'), содержащих сайты для эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *HindIII* соответственно. Для экспрессии

гена был сконструирован вектор pET22b:dme, которым трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3). Синтез фермента индуцировали добавлением 0,5 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в экспоненциальной фазе роста культуры ($A_{600} = 0,6-0,7$). После 15 ч роста при 18 °С клетки осаждали центрифугированием (30 мин при 8 °С и 5000 g) и хранили при -20 °С. Рекombинантный фермент очищали аффинной хроматографией на колонке с Ni²⁺-нитрилотриацетат (Ni-NTA) агарозой, как описано ранее [12]. Очищенный малик-фермент хранили в 40%-ном глицерине при -20 °С.

Для клонирования N-концевой последовательности гена (*mae* фрагмент), использовали праймер N-dme-Nde (см. выше) и обратный праймер (5'-TAAGCTTATCCAGCGCGGCGA-CCGGATCGCGCC-3'). Для клонирования C-концевой области гена (*patr* фрагмент) использовали праймеры C-dme-Hind и PaTR74-Nde-F (5'-TACATATGCATACGATCTACGATCGCGTGCGGC-3'). Клонирование и экспрессия *mae* и *patr* фрагментов и очистку белков проводили, как описано выше.

Определение молекулярной массы. Определение четвертичной структуры фермента проводили гель-электрофорезом в неденатурирующих условиях с использованием пороограничивающего градиента полиакриламида (4–30%) [13] и набора белковых маркеров («Sigma-Aldrich», Германия), включавшего тироглобулин (660 кДа, димер), ферритин (440 кДа, 24 субъединицы), каталазу (232 кДа, тетрамер), лактатдегидрогеназу (140 кДа, тетрамер), бычий сывороточный альбумин (67 кДа, мономер).

Определение активности МФ. Активность малик-фермента в направлении декарбоксилирования малата определяли, измеряя скорость восстановления NADP⁺ при 30 °С в реакционной смеси (1 мл), содержащей 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,5; 2,5 мМ MgCl₂; 0,3 мМ NADP⁺ и ~1 мкг фермента. Реакцию начинали добавлением малата в конечной концентрации 10 мМ. Активность карбоксилирования пирувата измеряли по окислению NADPH в 1 мл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 мМ MgCl₂, 0,25 мМ NADPH, 50 мМ KHCO₃, 25 мМ пирувата натрия и ~9 мкг белка.

Способность МФ декарбоксилировать оксалоацетат тестировали двумя методами. I) Спектрофотометрически по уменьшению поглощения оксалоацетата при 280 нм [14] в реакционной смеси, содержащей 50 мМ К-фосфатный буфер (pH 7,5) или MES-NaOH (pH 5,0), 2,5 мМ MgCl₂, 1–10 мМ оксалоацетата и 50 мкг МФ в присутствии или отсутствии 0,1 мМ NADP⁺ или NADPH. II) Образование пирувата в данной ре-

акции анализировали с помощью HPLC на колонке Reprosil-Pur с 18-AQ (5 мкм, 250 × 10 мм) («Dr. Maisch», Германия) с использованием 1 мМ H₂SO₄ и 8 мМ Na₂SO₄ в качестве подвижной фазы при 25 °С и скорости потока 1 мл/мин.

Тестирование фосфотрансацетилазной активности МФ и его C-концевого фрагмента проводили по образованию 5-тио-2-нитробензойной кислоты в результате взаимодействия 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) с образующимися в ходе реакции сульфгидрильными группами CoA-SH [15]. Реакционная смесь (1 мл) содержала 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,5, 0,1 мМ ДТНБ, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ацетил-CoA. Реакцию начинали добавлением 10–50 мкг фермента. Измерения проводили при 412 нм.

Для изучения влияния pH на активность фермента использовали следующие буферы (50 мМ): Glycine-NaOH (pH 9,0–10,5), CHES-NaOH (pH 8,5–10,0), Tris-HCl (pH 7,6–8,9), К-фосфатный (pH 6,0–8,0) и MES-NaOH (pH 5,0–7,0). Зависимость активности МФ от одно- и двухвалентных ионов тестировали добавлением водных растворов KCl, NH₄Cl, NaCl (в конечной концентрации 50 мМ) и MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂ (1 мМ). В качестве потенциальных ингибиторов или активаторов МФ в реакции декарбоксилирования тестировали интермедиаты, такие как: глюкоза, фруктоза, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат (в концентрации 5 мМ), пируват, ФЕП, гидроксипируват, оксалоацетат, цитрат, серин, аспарат, глицерат, α-кетоглутарат (1 мМ), АТР, АДР, АМР, РРi (1 или 2 мМ). Для определения влияния двухвалентных металлов на активность малик-фермента в стандартную реакционную смесь, содержащую 1 мМ MnCl₂ (вместо 2,5 мМ MgCl₂), вносили водные растворы CuCl₂, RbCl₂, CdCl₂, NiCl₂, SnCl₂, CoCl₂, BaCl₂, ZnCl₂ или CaCl₂ до конечной концентрации 1 мМ. Для изучения термостабильности аликвоту концентрированного фермента инкубировали в пробирке Eppendorf при 30, 40, 50, 60 и 70 °С от 5 мин до 3 ч. После прогревания аликвоту разводили 50× в охлажденном буфере и определяли активность при 30 °С. Процент остаточной активности рассчитывали по отношению к активности непрогретого фермента. Для определения оптимальной температуры измеряли скорость реакции при 10–70 °С. При определении K_m активность измеряли, варьируя субстраты в диапазоне концентраций 0,156–10 мМ (малат), 0,0047–0,25 мМ (NADP⁺), 1,56–25 мМ (пируват), 0,0156–0,375 мМ (NADPH). Значения кажущихся K_m и V_{max} рассчитывали с помощью программы SigmaPlot (версия 10). Концентрацию белка определяли модифицирован-

ным методом Лоури, как описано в работе Shacterle и Pollack [16]. Скорости окисления и образования NADPH регистрировали при 340 нм на спектрофотометре UV-1700 («Shimadzu», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение и очистка малик-фермента. Ген *dme*, кодирующий предполагаемый малик-фермент в последовательности генома *Ms. trichosporium*, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Рекombинантный белок из клеточного экстракта *E. coli* очищали аффинной металл-хелатной хроматографией в одну стадию. Ds-Na-ПААГЭ белка выявил одну полосу, соответствующую молекулярной массе ~80 кДа, которая согласуется с теоретически рассчитанной (81,5 кДа) (рис. 2). Согласно электрофорезу, в неденатурирующих условиях масса белка составляет 480 кДа, что указывает на его гексамерную организацию. Ранее у микробных малик-ферментов были выявлены димерные, тетрамерные и октамерные формы. NADP⁺-МФ из *E. coli*, а также NADP⁺-МФ и NAD(P)⁺-МФ из *Sinorhizobium meliloti* представлены гомооктамерами [17, 18], тогда как NADP⁺-МФ из *Bradyrhizobium japonicum* – димером или тетрамером в зависимости от значений pH (8,0 и 7,2 соответственно) [19].

Каталитические свойства. Малик-фермент катализировал декарбоксилирование малата до пирувата с использованием в качестве кофактора NADP⁺, но не NAD⁺, активность декарбоксилирования оксалоацетата не обнаружена. Активность фермента полностью зависела от одно- и двухвалентных катионов: K⁺ (или NH₄⁺) и Mn²⁺ (или Mg²⁺) (табл. 1). В то же время NaCl в концентрации 50 мМ на 40% ингибировал его активность в присутствии 50 мМ KCl, а донором CO₂ для карбоксилирования пирувата служил KHCO₃, но не NaHCO₃. Фермент активен в широких диапазонах pH (6,0–9,0) и температуры (20–70 °С) с максимальной активностью при pH 7,0 и 65 °С. МФ проявлял умеренную термостабильность: активность фермента не снижалась после выдерживания белка 3 ч при 30–40 °С, но двукратно снижалась в результате прогревания 1 ч при 50 °С и на 80 % после 5 мин прогревания при 60 °С.

Зависимость активности малик-фермента от концентрации субстратов подчинялась кинетике Михаэлиса–Ментен. При 30 °С и оптимальном pH значения кажущихся *K_m* составили 2,7 ± 0,3 мМ для малата, 64 ± 9 мкМ – для NADP⁺, 6,0 ± 0,8 мМ – для пирувата и 47 ± 4 мкМ – для NADPH. Фермент проявлял в 4,7 раза более

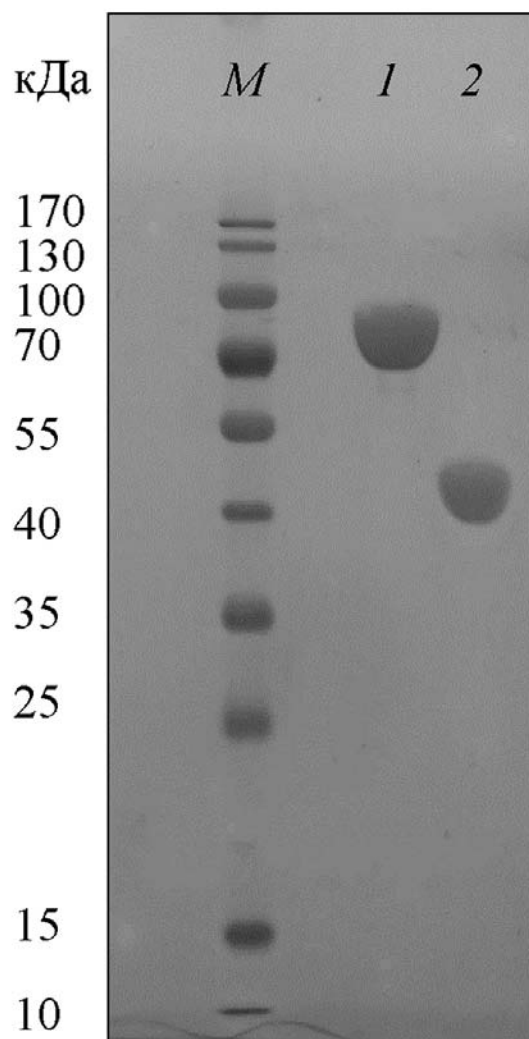


Рис. 2. Ds-Na-ПААГЭ малик-фермента *Ms. trichosporium* (1) и МФ1 (N-концевой фрагмент МФ *Ms. trichosporium*) (2). M – маркеры молекулярной массы, кДа

Таблица 1. Влияние катионов K⁺, NH₄⁺, Na⁺ (в концентрации 50 мМ) и двухвалентных металлов (1 мМ) на активность рекомбинантного малик-фермента из *Ms. trichosporium*

Катионы	Активность, %
Без добавления катионов	< 0,01
K ⁺	8,2 ± 0,4
Na ⁺	< 0,01
NH ₄ ⁺	20 ± 2
Mg ²⁺	3,1 ± 0,3
K ⁺ , Mg ²⁺	100 ± 2,8
Na ⁺ , Mg ²⁺	4,2 ± 0,3
NH ₄ ⁺ , Mg ²⁺	115,2 ± 6,3
K ⁺ , Mn ²⁺	123,3 ± 8, 1
K ⁺ , Co ²⁺	73,8 ± 5,6
K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺	59,9 ± 4,2

высокую активность в направлении декарбоксилирования малата, по сравнению с карбоксилированием пирувата (табл. 2). Судя по значениям k_{cat}/K_m , эффективность фермента в реакции декарбоксилирования на порядок превышала эффективность в реакции карбоксилирования. Гидроксипируват в концентрации 1 мМ ингибировал активность МФ на 45% (табл. 3). Наибольший ингибирующий эффект оказывал ацетил-СоА (0,1 мМ), в присутствии которого остаточная активность составила 24%. АТР и РРi в концентрации 2 мМ ингибировали активность на 50%, которая, однако, полностью восстанавливалась при увеличении концентрации Mg^{2+} в реакционной смеси до 5 мМ. В присутствии Mn^{2+} ионы Cd^{2+} практически полностью ингибировали активность МФ (5,9% остаточной активности), а ионы Sn^{2+} снижали активность фермента на 31%. Остальные тестируемые металлы (см. «Методы исследования») не оказывали значительного эффекта на активность МФ.

Таблица 2. Кинетические параметры малик-фермента *Ms. trichosporium* и его N-концевого фрагмента (МФ1)

Параметры	МФ	МФ1
М.м. (число субъединиц), кДа	480 (80 × 6)	90 (45 × 2)
V_{max} , Е/мг белка (малат → пируват)	36 ± 2	12,0 ± 0,3
V_{max} , Е/мг белка (пируват → малат)	8,0 ± 0,4	1,60 ± 0,03
Ингибиторы, (остаточная активность, %)	0,2 мМ Ацетил-СоА (24%), 1 мМ Гидроксипируват (55%)	1 мМ Гидроксипируват (64%)
	K_m	
Малат, мМ	3,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3
NADP ⁺ , мкМ	64 ± 9	н.о.
Пируват, мМ	6,0 ± 0,8	11 ± 1
NADPH, мМ	47 ± 4	н.о.
k_{cat} малат, 1/мин	18	1
$k_{cat}/K_m^{малат}$, 1/(мМ × мин)	7	0,3
k_{cat} пируват, 1/мин	4	0,1
$k_{cat}/K_m^{пируват}$, 1/(мМ × мин)	0,6	0,01

н.о. — не определяли.

Влияние C-концевого домена малик-фермента на активность. В аминокислотной последовательности МФ *Ms. trichosporium*, состоящего из 437 а.о., обнаружен N-концевой фрагмент, гомологичный малик-ферментам (МФ1), и протяженный C-концевой домен из 322 а.о., соответствующий фосфоацетилтрансферазам (ЕС 2.3.1.8). Сходная аминокислотная последовательность ранее описана у NADP⁺-зависимых малик-ферментов ряда бактерий, таких как *E. coli* и *Sinorhizobium meliloti*, а также растений [17, 18, 20].

Клонированием N- и C-концевых последовательностей ДНК получены и очищены два отдельных белка: МФ1 и предполагаемая фосфоацетилтрансфераза. Удельная активность МФ1 в направлении декарбоксилирования и карбоксилирования были, соответственно, 12 и 1,6 Е/мг белка. При этом значения кажущихся K_m для углеродных субстратов выше у МФ1, по сравнению с исходным двудоменным белком (табл. 2). В отличие от полноразмерного белка, ацетил-СоА не влиял на активность МФ1, тогда как ин-

Таблица 3. Активность малик-фермента *Ms. trichosporium* ОВ3б в присутствии некоторых метаболитов

Эффектор (Концентрация)	Остаточная активность, %
Без эффектора	100
Оксалоацетат (1 мМ)	97 ± 3
Изоцитрат (1 мМ)	98 ± 4
Цитрат (1 мМ)	84 ± 4
α-Кетоглутарат (1 мМ)	103 ± 1
Сукцинат (1 мМ)	97 ± 1
Глутамат (1 мМ)	110 ± 1
Фосфоенолпируват (1 мМ)	98 ± 2
Пируват (1 мМ)	104 ± 2
Гидроксипируват (1 мМ)	55 ± 3
Серин (1 мМ)	97 ± 3
Аспаргат (1 мМ)	108 ± 2
Глюкоза (5 мМ)	93 ± 2
Глюкозо-6-фосфат (5 мМ)	89 ± 3
Фруктоза (5 мМ)	93 ± 2
Фруктозо-6-фосфат (5 мМ)	93 ± 1
Фруктозо-1,6-бисфосфат (5 мМ)	80 ± 1
АТР (2 мМ)	47 ± 4
АТР (2 мМ), MgCl ₂ (5 мМ)	89 ± 3
ADP (2 мМ)	96 ± 3
AMP (2 мМ)	103 ± 1
РРi (2 мМ)	46 ± 2
РРi (2 мМ), MgCl ₂ (5 мМ)	89 ± 3
СоА (0,1 мМ)	94 ± 2
Acetyl-CoA (0,2 мМ)	24 ± 3

гибирующий эффект гидроксипирувата сохранялся и для *N*-концевого фрагмента. Ни полный «химерный» белок, ни фосфоацетилтрансферазный домен не катализировали перенос ацетильных групп и образование CoA-SH из ацетил-CoA.

Белок МФ1 имел молекулярную массу 90 кДа, что соответствовало димерной структуре, тогда как фосфоацетилтрансферазный фрагмент — гексамер с молекулярной массой 210 кДа. Очевидно, C-концевые 322 а.о. ответственны за оптимальную олигомеризацию малик-фермента. Аналогичное предположение было сделано для двух малик-ферментов из *Sinorhizobium meliloti* [17]. Фосфоацетилтрансферазная активность не была обнаружена ни для одного из изученных «химерных» малик-ферментов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы впервые охарактеризовали малик-фермент из облигатного метанотрофа *Ms. trichosporium*. Фермент принадлежит к группе NADP⁺-зависимых малик-ферментов. Для проявления его активности необходимы ионы двухвалентных металлов (Mn²⁺ или Mg²⁺) и одновалентные катионы (K⁺ или NH₄⁺), при этом ионы Na⁺ оказывали ингибирующий эффект. Активация катионами NH₄⁺ свойственна как NADP⁺-зависимым малик-ферментам (например, МФ из *Clostridium thermocellum*) [21], так и NAD⁺-зависимым (из *Streptococcus bovis*) [22]. Однако в случае NAD⁺-МФ из *S. bovis* ионы K⁺ имели лишь небольшую стимулирующий эффект. В литературе не найдены сведения об ингибирующем влиянии ионов Na⁺ на активность малик-ферментов.

Подобно другим NADP⁺-зависимым малик-ферментам, МФ из *Ms. trichosporium* катализирует обратимую реакцию, при этом активность карбоксилирования пирувата существенно ниже, чем декарбоксилирование малата. Кроме того, фермент из *Ms. trichosporium* имеет высокую *K_m* для пирувата (~6 мМ) относительно его физиологических концентраций. Хотя содержание пирувата в клетках данного метанотрофа может достигать высоких значений (>1 мМ) [23], эта концентрация все же не поддерживает эффективную ассимиляцию CO₂. Высокие значения кажущейся *K_m* к пирувату обнаружены для NADP⁺-МФ из *E. coli* и *Corynebacterium glutamicum* (6,21 и 13,8 соответственно) [18, 24]. Интересно, что лишь у фермента из гипертермофильной археи *Thermococcus kodakaraensis* *K_m* к пирувату ниже, чем к малату (7,3 и 16,9 соответственно) [5], хотя каталитическая эффективность ре-

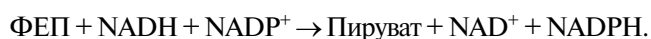
акций декарбоксилирования и карбоксилирования практически одинакова. Также как NADP⁺-МФ из *Clostridium thermocellum* [21] и *Thermococcus kodakaraensis* [5], МФ из *Ms. trichosporium* не декарбоксилирует оксалоацетат.

Активность МФ из *Ms. trichosporium* ингибировали интермедиаты серинового пути ассимиляции углерода — гидроксипируват и ацетил-CoA. Обычно на активность бактериальных малик-ферментов влияют интермедиаты ЦТК. Малат, сукцинат и фумарат активировали, но ацетил-CoA ингибировал NAD(P)⁺-зависимый фермент из *Sinorhizobium meliloti*, тогда как NADP⁺-МФ не подвергался какой-либо регуляции [25]. Активность NADP⁺-МФ из *E. coli* ингибировали фумарат, оксалоацетат и ацетил-CoA, а глутамат, аспартат, глюкозо-6-фосфат и ацетилфосфат активировали этот фермент [18].

Малик-фермент из *Ms. trichosporium* состоит из двух фрагментов, причем *N*-концевой полипептид, полученный как самостоятельный белок, имел пониженную активность и не ингибировался в присутствии ацетил-CoA. Поскольку укороченная версия малик-фермента (в отсутствие C-концевого фрагмента), в отличие от полноразмерного белка, имела структуру димера, но не гексамера, предположена роль C-концевой последовательности в оптимальной конфигурации фермента. Принимая во внимание отсутствие ингибирования ацетил-CoA активности «химерного» NADP⁺-зависимого малик-фермента из *Sinorhizobium meliloti*, влияние дополнительного фрагмента на взаимодействие с эффектором у малик-ферментов требует дальнейших исследований.

Согласно кинетическим свойствам, малик-фермент из *Ms. trichosporium* более эффективно катализирует реакцию декарбоксилирования, по сравнению с реакцией карбоксилирования, поэтому его можно рассматривать как «липогенный» фермент, осуществляющий наработку NADPH, необходимых для синтеза жирных кислот и стероидов. Такая функция была предположена для ряда бактериальных NADP⁺-МФ [1, 2, 26].

У *Ms. trichosporium* малат образуется в результате карбоксилирования фосфоенолпирувата высокоактивной ФЕП карбоксилазой [8] и восстановления образующегося оксалоацетата NADH-зависимой малатдегидрогеназой [7]. Последующее декарбоксилирование малата малик-ферментом приводит к синтезу NADPH (рис. 1). В результате работы трех перечисленных ферментов ФЕП трансформируется в пируват, что сопровождается потреблением NADH и образованием NADPH:



В случае функционирования пируват-фосфаткиназы (ID 2507410009), может происходить регенерация ФЕП с затратой молекулы АТФ и образованием РРi и АМР с суммарной реакцией футильного цикла:



Замена АТФ на РРi в данном цикле коррелирует с важной метаболической ролью РРi у метанотрофов [27]. У *Ms. trichosporium* синтез NADPH может также осуществлять NADP⁺-зависимая изоцитратдегидрогеназа [8]. Тем не менее функция малик-фермента, как дополнительного источника NADPH, не представляется избыточной, поскольку у данного метанотрофа имеются высокие потребности в NADPH, который необходим для синтеза жирных кислот и

формирования системы внутрицитоплазматических мембран, где происходит окисление метана мембранной метанмонооксигеназой.

Финансирование

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-14-00326).

Благодарности

Авторы выражают благодарность компании Евроген за синтез олигонуклеотидов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием животных или людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chang, G.G., and Tong, L. (2003) Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases, *Biochemistry*, **42**, 12721–12733, doi: 10.1021/bi035251+.
- Sauer, U., and Eikmanns, B.J. (2005) The PEP–pyruvate–oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 765–794, doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.002.
- Viljoen, M., Subden, R.E., Krizus, A., and Van Vuuren, H.J. (1994) Molecular analysis of the malic enzyme gene (*mae2*) of *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast*, **10**, 613–624, doi: 10.1002/yea.320100506.
- Liguori, M., Tessarolo, D., Abbruzzese, C., and Giacanelli, M. (1995) NAD⁺/NADP⁺-dependent malic enzyme: evidence of a NADP⁺ preferring activity in human skeletal muscle, *Biochem. Mol. Med.*, **56**, 14–18, doi: 10.1006/bmme.1995.1050.
- Fukuda, W., Ismail, Y.S., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2005) Characterization of an archaeal malic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, *Archaea*, **1**, 293–301, doi: 10.1155/2005/250757.
- Trotsenko, Y.A. and Murrell, J.C. (2008) Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy, *Adv. Appl. Microbiol.*, **63**, 183–229, doi: 10.1016/S0065-2164(07)00005-6.
- Rozova, O.N., Khmelenina, V.N., Bocharova, K.A., Mustakhimov, I.I., and Trotsenko, Y.A. (2015) Role of NAD⁺-dependent malate dehydrogenase in the metabolism of *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z and *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Microorganisms*, **3**, 47–59, doi: 10.3390/microorganisms3010047.
- Matsen, J.B., Yang, S., Stein, L.Y., Beck, D., and Kalyuzhnaya, M.G. (2013) Global molecular analyses of methane metabolism in methanotrophic Alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part I: transcriptomic study, *Front. Microbiol.*, **4**, 40, doi: 10.3389/fmicb.2013.00040.
- Гальченко В.Ф. (2001) *Метанотрофные бактерии*, Изд-во ГЕОС, Москва.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Kalyuzhnaya, M., Khmelenina, V.N., Kotelnikova, S., Holmquist, L., Pedersen, K., and Trotsenko, Y.A. (1999) *Methylobacterium scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden, *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 565–572, doi: 10.1016/S0723-2020(99)80010-1.
- Reshetnikov, A.S., Rozova, O.N., Khmelenina, V.N., Mustakhimov, I.I., Beschastny, A.P., Murrell, J.C., and Trotsenko, Y.A. (2008) Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath, *FEMS Microbiol. Lett.*, **288**, 202–210, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01366.x.
- Slater, G.G. (1969) Stable pattern formation and determination of molecular size by pore-limit electrophoresis, *Anal. Chem.*, **41**, 1039–1041, doi: 10.1021/ac60277a003.
- Sender, P.D., Martin, M.G., Peiru, S., and Magni, C. (2004) Characterization of an oxaloacetate decarboxylase that belongs to the malic enzyme family, *FEBS Lett.*, **570**, 217–222, doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.038.
- Bock, A.K., Glasemacher, J., Schmidt, R., and Schönheit, P. (1999) Purification and characterization of two extremely thermostable enzymes, phosphate acetyltransferase and acetate kinase, from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*, *J. Bacteriol.*, **181**, 1861–1867.
- Shacterle, G.R., and Pollack, R.L. (1973) A simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biological material, *Anal. Biochem.*, **51**, 654–657, doi: 10.1016/0003-2697(73)90523-X.
- Mitsch, M.J., Voegelé, R.T., Cowie, A., Osteras, M., and Finan, T.M. (1998) Chimeric structure of the NAD(P)⁺- and NADP⁺-dependent malic enzymes of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9330–9336, doi: 10.1074/jbc.273.15.9330.
- Bologna, F.P., Andreo, C.S., and Drincovich, M.F. (2007) *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure, *J. Bacteriol.*, **189**, 5937–5946, doi: 10.1128/JB.00428-07.
- Chen, F., Okabe, Y., Osano, K., and Tajima, S. (1997) Purification and characterization of the NADP-malic

- enzyme from *Bradyrhizobium japonicum* A1017, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 384–386, doi: 10.1271/bbb.61.384.
20. Troconi, M.A., Andreo, C.S., and Drincovich, M.F. (2018) Chimeric structure of plant malic enzyme family: different evolutionary scenarios for NAD- and NADP-dependent isoforms, *Front. Plant Sci.*, **9**, 1–15, doi: 10.3389/fpls.2018.00565.
 21. Taillefer, M., Rydzak, T., Levin, D.B., Oresnik I.J., and Sparling, R. (2015) Reassessment of the transhydrogenase/malate shunt pathway in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 through kinetic characterization of malic enzyme and malate dehydrogenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 2423–2432, doi: 10.1128/AEM.03360-14.
 22. Kawai, S., Suzuki, H., Yamamoto, K., Inui, M., Yukawa, H., and Kumagai, H. (1996) Purification and characterization of a malic enzyme from the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* ATCC 15352 and cloning and sequencing of its gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2692–2700.
 23. Yang, S., Matsen, J.B., Konopka, M., Green-Saxena, A., Clubb, J., Sadilek, M., Orphan, V.J., Beck, D. and Kalyuzhnaya, M.G. (2013) Global molecular analyses of methane metabolism in methanotrophic Alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part II. Metabolomics and ¹³C-labeling study, *Front. Microbiol.*, **4**, 70, doi: 10.3389/fmicb.2013.00070.
 24. Gourdon, P., Baucher, M.-F., Lindley, N.D., and Guyonvarch, A. (2000) Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2981–2987, doi: 10.1128/AEM.66.7.2981-2987.2000.
 25. Driscollt, B.T., and Finan, T.M. (1997) Properties of NAD+- and NADP+-dependent malic enzymes of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and differential expression of their genes in nitrogen-fixing bacteroids, *Microbiology*, **143**, 489–498, doi: 10.1099/00221287-143-2-489.
 26. Ratledge, C. (2014) The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems, *Biotechnol. Lett.*, **36**, 1557–1568, doi: 10.1007/s10529-014-1532-3.
 27. Khmelenina, V.N., Rozova, O.N., Akberdin, I.R., Kalyuzhnaya, M.G., and Trotsenko, Y.A. (2018). Pyrophosphate-dependent enzymes in methanotrophs: new findings and views, in *Methane biocatalysis: paving the way to sustainability* (Kalyuzhnaya, M.G., and Xing, X.H., eds) Springer, International Publishing AG, Switzerland, pp. 83–98.

**PROPERTIES OF THE MALIC ENZYME
FROM AEROBIC METHANOTROPH
*Methylosinus trichosporium***

**O. N. Rozova, V. N. Khmelenina*, I. I. Mustakhimov,
S. Y. But, and Yu. A. Trotsenko**

*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Federal Research Center PSCBR, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia;
E-mail: khmelenina@ibpm.pushchino.ru*

Received August 14, 2018
Revised December 12, 2018
Accepted December 18, 2018

The recombinant malic enzyme from the aerobic methanotroph *Methylosinus trichosporium* was obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* and purified by affinity metal-chelating chromatography. The homohexameric enzyme of 6 × 80 kDa catalyzed the reversible reaction of oxidative decarboxylation of malate to pyruvate in the presence of mono- and divalent cations and NADP⁺ as a cofactor. The k_{cat}/K_m ratio indicated much higher catalytic efficiency of decarboxylation reaction as compared to the pyruvate carboxylation reaction. Analysis of the protein sequence revealed that the C-region of the enzyme contains a large domain homologous to phosphoacetyltransferase sequence, but neither full chimeric malic enzyme nor the C-end fragment obtained as a separate protein possessed phosphoacetyltransferase activity. This C-end domain promoted activity of the malic enzyme.

Keywords: malic enzyme, methanotrophs, *Methylosinus trichosporium*