

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ НАД⁺-ЗАВИСИМЫЕ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, В ТАКСОНОМИИ АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *ANCYLOBACTER*

© 2023 г. А. А. Чемодурова^а, А. С. Решетников^а, Н. В. Агафонова^а, Н. В. Доронина^{а, *}

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН” Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Московская обл., Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 29.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Проведен сравнительный филогенетический анализ генов НАД⁺-зависимых формиатдегидрогеназ (НАД⁺-ФДГ), которые обнаружены во всех доступных геномах метилотрофов родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*, а также у других бактерий семейства *Xanthobacteraceae* (*Xanthobacter*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*). Отмечено, что расположение представителей *Xanthobacteraceae* на дереве, построенном на основании сравнения аминокислотных последовательностей НАД⁺-ФДГ, коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК. Выявлено, что последовательности белка НАД⁺-ФДГ родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium* имеют уровень идентичности 87.8–98.3%, что свидетельствует о высокой консервативности этого белка в пределах данной группы метилотрофов. Впервые анализ функциональных генов НАД⁺-ФДГ рекомендован в качестве дополнительного критерия для межвидовой дифференциации метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*.

Ключевые слова: метилотрофы, *Ancylobacter*, семейство *Xanthobacteraceae*, НАД⁺-зависимые формиатдегидрогеназы

DOI: 10.31857/S002636562260047X, EDN: NOFTGB

НАД⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (НАД⁺-ФДГ) обнаружены у бактерий, дрожжей, грибов, растений и позвоночных (Alekseeva et al., 2011). У растений, патогенных бактерий и грибов этот фермент является стрессовым белком, у аэробных метилотрофных бактерий (метилотрофов) и дрожжей играет ключевую роль в снабжении клеток энергией (Natrongjit, Packdibamrung, 2010; Alekseeva et al., 2011). Окисление формиата до СО₂, сопряженное восстановлением НАД⁺ до НАДН, катализируется НАД⁺-ФДГ и является завершающей стадией цепи реакций прямого С₁-окисления у метилотрофов. НАД⁺-ФДГ относится к надсемейству D-специфических дегидрогеназ 2-оксикислот, имеет гомодимерную структуру, не содержит в активном центре простетических групп и ионов металлов (Shabalin et al., 2010). Данный фермент распространен у метилотрофов с рибулозобисфосфатным путем С₁-ассимиляции (Троценко с соавт., 2010). Типичным примером являются представители рода *Ancylobacter* (семейство *Xanthobacteraceae*, порядок *Huyphomicrobiales*), выделяемые из водной среды, донных осадков, активных илов, почвы и растений. В настоящее время род включает 11 валидно описанных видов

(<https://lpsn.dsmz.de/genus/ancylobacter>), очень близких по физиолого-биохимическим, хемотаксономическим свойствам и последовательностям генов 16S рРНК, поэтому актуален поиск новых генетических маркеров, позволяющих осуществить быструю дифференциацию представителей данного рода без привлечения геномного анализа. Известно, что аминокислотные последовательности НАД⁺-ФДГ довольно консервативны и уровень их сходства у разных организмов составляет ~50%, а у растений эти ферменты имеют до 80% идентичности (Natrongjit, Packdibamrung, 2010; Alekseeva et al., 2011). Ранее фермент НАД⁺-ФДГ исследовали только у одного представителя рода *Ancylobacter* – *A. aquaticus* KNK607M (Nanba et al., 2010), но значение соответствующего функционального гена в таксономии бактерий не рассматривалось.

Цель данной работы – оценка эффективности использования сравнительного анализа последовательностей генов НАД⁺-ФДГ в таксономии метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*.

В работе использовали новые метилотрофные изоляты штаммы *Ancylobacter* sp. VT, *Starkeya* sp. 3C и 1A, выделенные ранее авторами данной работы, а также ближайший родственник штаммов

3С и 1А – штамм *Starkeya* sp. HF14-78462, геном которого найден в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (CACAS000000000). Поиск последовательностей генов 16S рРНК, белков НАД⁺–ФДГ и геномов проводили в базах данных NCBI GenBank и JGI (<https://img.jgi.doe.gov/>), филогенетический анализ осуществляли с помощью пакетов программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), ClustalW (Thompson et al., 1997) и MEGA5 (метод neighbor-joining) (Tamura et al., 2011), надежность построенных деревьев проверена значением “bootstrap” для 1000 деревьев. Средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) и ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) рассчитывали с использованием программ Species 1.2.1 (Richter, Rosselló-Móra, 2009) и GGDC 2.1 (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) (Meier-Kolthoff et al., 2013) соответственно. Амплификацию и секвенирование гена НАД⁺–ФДГ для штамма 1А проводили с использованием “вырожденных” праймеров, разработанных на консервативные аминокислотные участки НАД⁺–ФДГ. Анализ доступных аминокислотных последовательностей фермента НАД⁺–ФДГ из *A. aquaticus*, *Starkeya* sp. 3С и ряда других гомологичных ФДГ ферментов из NCBI GenBank позволил выделить две консервативные аминокислотные области, на основе которых составлена пара “вырожденных” праймеров *fmd* (F2-*vir*); TGCGTTCTYTACGAY-GAYCC и *fmd* (R-*vir*); TCTTCCGARCCGC-CAGTSGCRTT. Амплифицирован участок гена 1170 п.н., кодирующий фермент НАД⁺–ФДГ из метилотрофного изолята штамма 1А. Секвенирование и анализ полученного фрагмента выявил 99.9% идентичности аминокислотной последовательности с ферментом НАД⁺–ФДГ из *Starkeya* sp. 3С.

Гены НАД⁺–ФДГ выявлены нами у некоторых представителей семейства *Xanthobacteraceae* – родов *Xanthobacter*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*, а также во всех доступных геномах метилотрофных бактерий родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*. Установлено, что распределение представителей *Xanthobacteraceae* на дереве, построенном на основании сравнения аминокислотных последовательностей НАД⁺–ФДГ, коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК (рис. 1). При этом выявлено несколько кластеров на дереве, построенном по результатам сравнительного анализа последовательностей белков НАД⁺–ФДГ, объединяющих представителей семейства *Xanthobacteraceae*: (1) группа *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*; (2) группа *Xanthobacter*; (3) группа *Aquabacter* и *Azorhizobium*.

В группе (1) сходство между видами на основании сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК составляет 96.2–98.5%, а аминокислотные последовательности белка НАД⁺–ФДГ проявляют уровень межвидовой идентичности

87.8–98.3% (табл. 1), что свидетельствует о высокой консервативности белка НАД⁺–ФДГ у представителей родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*. Поиск ближайших родственников *Ancylobacter* по сходству НАД⁺–ФДГ выявил также метилотрофа *Pseudomonas* sp. 101 (91.3–92.8%) (Filippova et al., 2006), НАД⁺–ФДГ которого является одной из самых изученных ФДГ среди бактерий (Alekseeva et al., 2011). По всей видимости, данный штамм также является представителем *Starkeya* или *Ancylobacter*, однако идентификация, проведенная в 1970-х гг. (коллекция кафедры микробиологии Московского государственного университета) (Egorov et al., 1979), устарела и требует пересмотра.

Интересно, что претенденты на новые виды новые изоляты штаммы 3С, 1А, HF14-78462 (~99.9–100% сходства по гену 16S рРНК) и штамм VT также хорошо дифференцируются на видовом уровне по генам НАД⁺–ФДГ, что коррелирует с их филогенетическим положением по гену 16S рРНК (рис. 1). Анализ геномов штаммов 3С (VMBP000000000) и VT (JANCSQH000000000) подтверждает принадлежность этих микроорганизмов к новым видам, поскольку значение сходства по генам 16S рРНК, уровень ANI и dDDH составило, соответственно: 99.3–99.4, 86.4 и 28.3% между штаммом 3С и *S. novella* DSM 506^T, и 98.3–98.5, 78.0–80.6 и 22.1–24.0% между штаммом VT и ближайшими представителями рода *Ancylobacter*, что ниже пороговых значений, принятых для разделения видов (ANI = 95%, dDDH = 70%) (Richter et al., 2009; Chun et al., 2018).

Таким образом, показано, что топология филогенетического дерева по белку НАД⁺–ФДГ коррелирует с таксономическим положением представителей рода *Ancylobacter* и семейства *Xanthobacteraceae*, проведенным на основании сравнения последовательностей генов 16S рРНК. Анализ этих достаточно консервативных функциональных генов может быть рекомендован в качестве дополнительного критерия для межвидовой дифференциации прежде всего бактерий рода *Ancylobacter*.

Предложение использовать функциональные гены ферментов, вовлеченных в метаболизм метилотрофов, не является уникальным. Известно, что у метилотрофов ген *mxaF* (кодирует большую субъединицу метанолдегидрогеназы) высоко консервативен и используется в качестве функционального гена для их идентификации в различных средах обитания (McDonald, Murrell, 1997). Также в качестве молекулярных проб применяют гены *hoxF* (Ramachandran, Walsh, 2015; Taubert et al., 2015), но известные последовательности филогенетически разнообразны, делятся на пять групп (HoxF1–5) (Chistoserdova, 2011), а их идентичность в пределах одной группы ~65–70%

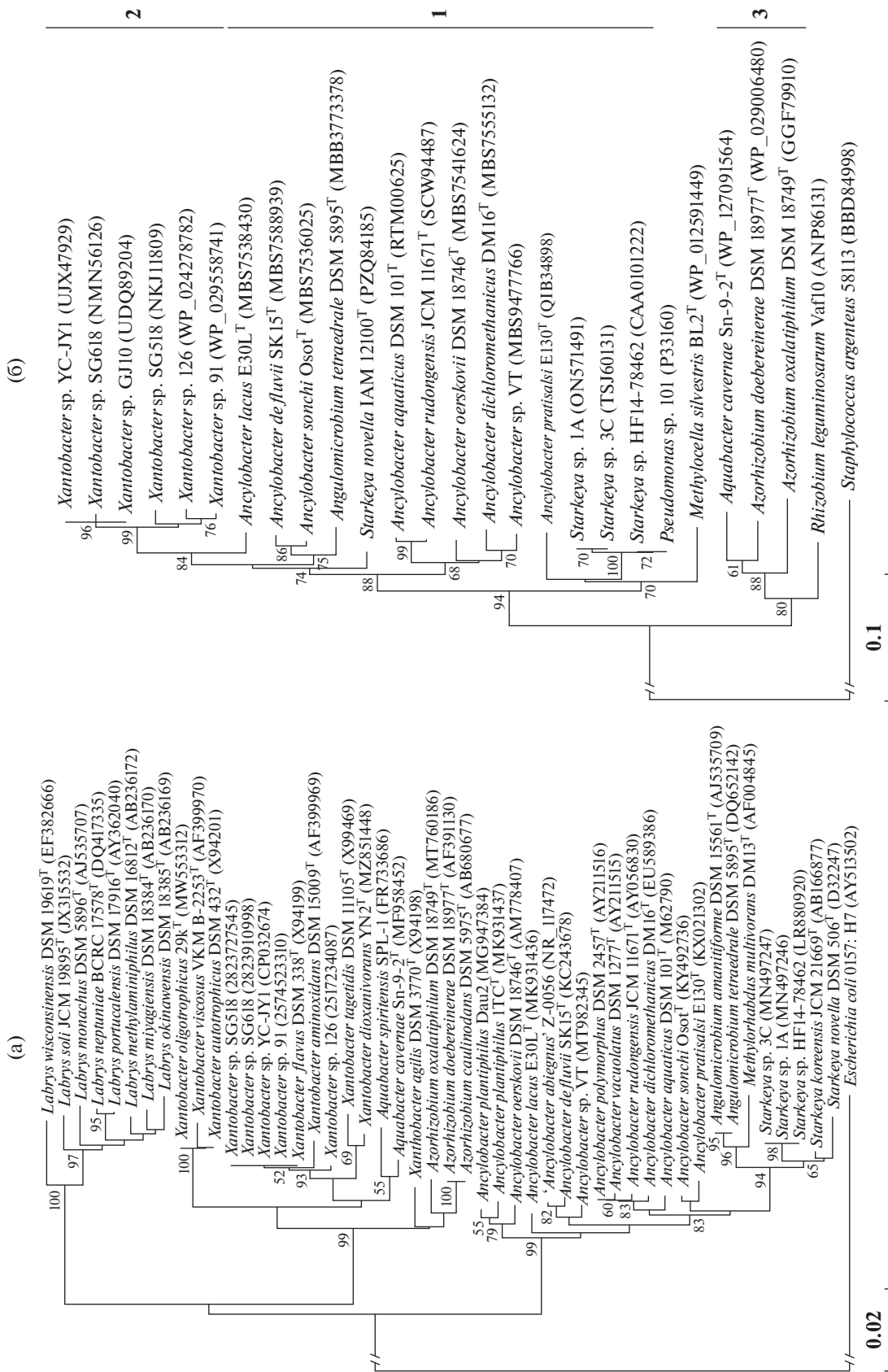


Рис. 1. а — филогенетическое положение представителей семейства *Xantobacteraceae* на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК; б — филогенетическое положение представителей рода *Ancylobacter* среди ближайших родственников, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей белка НАД⁺-ФДЛ.

Таблица 1. Уровни сходства представителей рода *Ancylobacter* с ближайшими родственниками на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и аминокислотных последовательностей белка НАД⁺–ФДГ, н.д. — нет данных

		<i>Ancylobacter</i>	
		16S рРНК, %	НАД ⁺ –ФДГ, %
<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Ancylobacter</i>	96.8–98.5	89.0–98.3
	<i>Starkeya</i>	97.0–98.0	90.3–96.8
	<i>Angulomicrobium</i>	96.2–97.7	87.8–96.0
	<i>Xanthobacter</i>	92.1–94.7	87.3–94.8
	<i>Azorhizobium</i>	92.9–94.5	84.3–87.5
	<i>Aquabacter</i>	92.9–94.6	84.0–85.8
	<i>Pseudomonas</i> sp. 101	н.д.	91.3–92.8
	<i>Methylocella silvestris</i> BL2 ^T	90.2–91.3	89.0–90.0
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Vaf10	90.6–91.6	84.7–86.7

(Keltjens et al., 2014). Анализ аминокислотных последовательностей белка НАД⁺–ФДГ представителей *Xanthobacteraceae* выявил уровень идентичности в пределах семейства 84.0–98.3%, а среди ближайших родственников обнаружены только *Methylocella silvestris* BL2^T (89–90%) и *Rhizobium leguminosarum* Vaf10 (84.7–86.7%), однако на дереве они держатся обособленно (табл. 1, рис. 1). Кроме того, представители родов *Angulomicrobium* и *Starkeya* по исследуемым генам НАД⁺–ФДГ образуют единый кластер с представителями *Ancylobacter*, что согласуется с результатами секвенирования генов 16S рРНК и демонстрирует высокое родство представителей этих трех родов. Таким образом, впервые предложено использовать НАД⁺–ФДГ в качестве функционального маркерного гена для дальнейшего поиска и идентификации метилотрофов рода *Ancylobacter*, обнаруживаемых в различных местах обитания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы анализировали и обсуждали данные, и участвовали в подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метилобактерии. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Torgonskaya M.L. Aerobic Methylobacteria. Pushchino: ONTI PSC RAS, 2010. 325 p.
- Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from plants // Acta Naturae. 2011. V. 3. № 4(11). P. 38–54.
- Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 2603–2622.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Y.V., Berezin I.V. NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain 1: purification and characterization // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. P. 569–576.
- Filippova E.V., Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Boiko K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. Crystal structures of complexes of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101 with formate // Crystallography Reports. 2006. V. 51. № 4. P. 627–631.
- Hatrongjit R., Packdibamrung K. A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: screening, purification and characterization // Enzyme and Microbial Technology. 2010. V. 46. № 7. P. 557–561.
- Keltjens J.T., Pol A., Reimann J., Op den Camp H.J. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare earth elements make a difference // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 6163–6183.

- McDonald I.R., Murrell J.C. The methanol dehydrogenase structural gene *mxhF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3218–3224.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics.* 2013. V. 14. P. 1–14.
- Nanba H., Takaoka Y., Hasegawa J. Purification and characterization of formate dehydrogenase from *Ancylobacter aquaticus* strain KNK607M, and cloning of the gene // *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry.* 2003. V. 67. № 4. P. 720–728.
- Ramachandran A., Walsch D.A. Investigation of XoxF methanol dehydrogenases reveals new methylotrophic bacteria in pelagic marine and freshwater ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2015. V. 91. P. fiv105.
- Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 19126–19131.
- Shabalin I.G., Serov A.E., Skirgello O.E., Timofeev V.I., Samygina V.R., Popov V.O., Tishkov V.I., Kuranova I.P. Recombinant formate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: preparation, crystal growth in microgravity, and preliminary X-ray diffraction study // *Crystallography Reports.* 2010. V. 55. № 5. P. 806–810.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Taubert M., Grob C., Howat A.M., Burns O.J., Dixon J.L., Chen Y., Murrell J.C. XoxF encoding an alternative methanol dehydrogenase is widespread in coastal marine environments // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 3937–3948.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Genes of NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenases in Taxonomy of Aerobic Methylotrophic Bacteria of the Genus *Ancylobacter*

A. A. Chemodurova¹, A. S. Reshetnikov¹, N. V. Agafonova¹, and N. V. Doronina¹, *

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Received April 29, 2022; revised May 29, 2022; accepted May 30, 2022

Abstract—Comparative phylogenetic analysis of NAD⁺-dependent formate dehydrogenases (NAD⁺-FDH) genes, which have been detected in all available genomes of methylotrophs of the genera *Ancylobacter*, *Starkeya* and *Angulomicrobium*, as well as in other members of the family *Xanthobacteraceae* (*Xanthobacter*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*), was carried out. The position of *Xanthobacteraceae* on the tree constructed based on comparison of NAD⁺-FDH amino acid sequences was found to correlate with the 16S rRNA gene-based phylogeny. The sequences of the NAD⁺-FDH proteins of the genera *Ancylobacter*, *Starkeya*, and *Angulomicrobium* exhibited 87.8–98.3% identity, indicating that this protein is very conservative within this group of methylotrophs. For the first time, analysis of the NAD⁺-FDH functional genes is recommended as a supplementary criterion for interspecies differentiation between methylotrophic bacteria of the genus *Ancylobacter*.

Keywords: methylotrophs, *Ancylobacter*, family *Xanthobacteraceae*, NAD⁺-dependent formate dehydrogenases