

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИГЛИКОЗИЛ-ГИДРОЛАЗЫ ОБЛИГАТНОГО МЕТАНОТРОФА
METHYLOFERULA STELLATA: НЕОБЫЧНАЯ ЭВОЛЮЦИОННАЯ
СТРАТЕГИЯ БЕЗ ДАЛЬНИХ ГОРИЗОНТАЛЬНЫХ ПЕРЕНОСОВ© 2023 г. Д. Г. Наумов^а, *, С. Н. Дедыш^а^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: daniil_naumoff@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

В геноме облигатно метанотрофной бактерии *Methyloferula stellata* AR4 закодировано три десятка гликозил-гидролаз. Подавляющее большинство из них в качестве ближайших гомологов имеет белки из других бактерий класса *Alphaproteobacteria*. Два исключения составляют гены белков семейств GH39 и GH65, которые появились предположительно за счет горизонтального переноса из неблизкородственных бактерий. Настоящая работа посвящена исследованию эволюционной истории этих двух генов. В случае с представителем семейства GH65 гликозил-гидролаз этот сценарий не подтвердился. Кодлируемая этим геном фосфорилаза коджибиозы является типичной для альфапротеобактерий. Предполагавшийся горизонтальный перенос гена оказался направленным в противоположную сторону: в одну из эволюционных линий класса *Betaproteobacteria*. Потенциальная гликозил-гидролаза семейства GH39 является единственной, чей ген имеет непротеобактериальное происхождение. Обсуждается роль горизонтальных переносов в эволюции генов гликозил-гидролаз и их гомологов у метанотрофов и других бактерий.

Ключевые слова: гликозил-гидролаза, карбогидрат-фосфорилаза, семейство GH39, семейство GH65, метанотрофы, *Methyloferula stellata*, *Beijerinckiaceae*, *Burkholderiaceae*, филогенетическое древо белков, эволюция белков, горизонтальный перенос, поиск гомологов, аннотация генов

DOI: 10.31857/S002636562260078X, EDN: FWAFFVA

Methyloferula stellata AR4 – аэробный ацидофильный облигатный метанотроф из семейства *Beijerinckiaceae* класса *Alphaproteobacteria* (Vorobev et al., 2011). В отличие от подавляющего большинства известных метанотрофных бактерий и подобно метанотрофам рода *Methylocella*, в клетках *Methyloferula* отсутствует мембранная метанмонооксигеназа, а окисление метана осуществляет растворимая форма этого фермента. *M. stellata* AR4 растет на метане и метаноле, но не может расти ни на одном субстрате, содержащем C–C химическую связь, в том числе на углеводах. Следовательно, можно предположить, что все имеющиеся у этой бактерии гликозил-гидролазы используют исключительно субстраты, которые синтезируются внутриклеточно. Геномная последовательность *M. stellata* AR4 была определена в Joint Genome Institute и аннотирована нами ранее (Dedysh et al., 2015). Анализ генома выявил 30 генов потенциальных гликозил-гидролаз, относящихся к семействам GH2, GH3, GH10, GH13, GH15, GH23, GH25, GH39, GH65, GH77, GH94, GH102, GH103 и PF06202 (Naumoff, 2017). Использование каталитических доменов каждой из

них в качестве запроса при скрининге базы данных аминокислотных последовательностей почти во всех случаях выявляло белки представителей *Alphaproteobacteria* в качестве ближайших гомологов (исключение составили лишь два белка из семейств GH39 и GH65 гликозил-гидролаз). Полученные данные указывали на малую роль горизонтального переноса генов гликозил-гидролаз в эволюции облигатных метанотрофов. Это до сих пор является уникальным случаем среди бактерий, так как спектр закодированных гликозил-гидролаз обычно очень зависит от занимаемой экологической ниши (доступных углеводных субстратов) и может существенно отличаться даже у близкородственных микроорганизмов (Наумов, 2011). Согласно полученным нами ранее данным (Naumoff, 2017), предполагаемая β-галактозидаза *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1) из семейства GH39 имела в качестве ближайших гомологов (23–31% идентичности аминокислотных последовательностей) белки ряда бактерий филумов *Actinobacteria* и *Firmicutes*, а карбогидрат-фосфорилаза (WP_020177329.1) из семейства GH65 –

белки из бактерий класса *Betaproteobacteria* (60–64%).

Целью настоящей работы было исследование эволюционного происхождения генов этих двух нетипичных для метанотрофов белков.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Геномная последовательность *Methyloferula stellata* AR4 (GenBank, ARWA00000000.1) была использована в настоящем исследовании. Ближайших гомологов белков *M. stellata* искали по алгоритму blastp на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Списки экспериментально охарактеризованных представителей для анализируемых семейств гликозил-гидролаз составляли на основании информации, имеющейся в базе данных CAZy (Drula et al., 2022).

Для филогенетического анализа отбирали по несколько десятков ближайших гомологов исследуемых белков бактерии *M. stellata* AR4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили вручную в программе-редакторе BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>), при этом учитывали результаты попарных выравниваний с помощью программы blastp.

В качестве внешней группы при исследовании филогении семейства GH65 использовали четыре наиболее близких к белку из *M. stellata* экспериментально охарактеризованных ферментов (GenPept: AAC74398.1, ABR66077.1, ACL68803.1 и BAV97300.1). Для семейства GH39 специально внешняя группа не подбиралась; при визуализации древа в качестве внешней была выбрана наиболее дивергентная группа из числа проанализированных белков.

Результаты множественного выравнивания (после удаления наиболее вариабельных участков последовательностей) использовали для построения филогенетических деревьев с помощью программы PROTPARS (метод максимальной экономии, Protein Sequence Parsimony method, MP) из пакета PHYLIP (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>). Статистическую надежность узлов древа оценивали с использованием бутстреп-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Семейство GH65 гликозил-гидролаз. С целью проверки ранее выдвинутой нами гипотезы (Nautoff, 2017) о возможном получении *Methyloferula stellata* гена потенциальной карбогидрат-фосфоорилазы от бетапиротеобактерий (ближайшим гомологом в базе данных NCBI в то время являлся белок SEE89066.1 из *Burkholderia* sp. WP9 с уровнем идентичности аминокислотных последовательностей 61%) был проведен филогенетический анализ с использованием пяти десятков ближайших ныне известных гомологов. Среди них пре-

обладали белки альфапротеобактерий. Бетапротеобактериальных белков оказалось существенно меньше, и все они принадлежали представителям только трех родов семейства *Burkholderiaceae*: *Burkholderia*, *Caballeronia* и *Paraburkholderia* (согласно таксономии GTDB эти таксоны относятся к классу *Gammaproteobacteria*; Parks et al., 2018). Мы дополнительно провели скрининг базы данных NCBI среди бетапиротеобактериальных белков, не принадлежащих бактериям этих трех родов, и обнаружили в качестве самого близкого гомолога белок бактерии *Herbaspirillum* sp. ST 5-3 (семейство *Oxalobacteraceae*; согласно таксономии GTDB – семейство *Burkholderiaceae*), который был также включен в выборку для филогенетического анализа. Для более надежного предсказания энзиматической активности исследуемой фосфоорилазы *M. stellata* было проведено ее попарное сравнение со всеми экспериментально охарактеризованными белками семейства GH65. Четыре ближайших гомолога из *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Yamamoto et al., 2011), *Escherichia coli* (Mukherjee et al., 2018), *Halothermothrix orenii* (De Beul et al., 2021) и *Thermoanaerobacter brockii* (Yamamoto et al., 2004) оказались обладателями одной и той же активности (К.Ф. 2.4.1.230) фосфоорилазы коджибиозы (англ. kojibiose phosphorylase); они были взяты нами для филогенетического анализа в качестве внешней группы. На основе полученных данных можно предположить, что все проанализированные в работе белки семейства GH65 обладают этой же энзиматической активностью.

На построенном филогенетическом древе семейства GH65 (рис. 1) белки бетапиротеобактерий трех родов семейства *Burkholderiaceae* сформировали четко обособленный субкластер I (100% бутстреп-поддержки) внутри альфапротеобактериального кластера (100%). Другой крупный субкластер IV (95%) внутри него сформировали метилотрофы, представители близкородственных родов *Methylobacterium* и *Methylorubrum*. Вне субкластера IV оказался белок из *Methylobacterium* sp. BTF04 (NEU14609.1). Белки метанотрофов *Methylocapsa palsarum* NE2 (SFK64348.1) и *Methyloferula stellata* AR4 (WP_020177329.1), а также филогенетически близкой алканокисляющей бактерии из газовых сипов *Candidatus Rhodoblastus alkanivorans* (Haque et al., 2022) не проявили существенной склонности к кластеризации. Белок из бетапиротеобактерии *Herbaspirillum* sp. (WP_136416394.1) занял внешнее по отношению к альфапротеобактериальному кластеру положение, примыкая к аутгруппе. Наблюдаемая топология филогенетического древа свидетельствует о том, что горизонтальный перенос гена карбогидрат-фосфоорилазы был осуществлен от альфапротеобактерий к бетапиротеобактериям семейства *Burkholderiaceae*, а белок *M. stellata* имеет типичное для альфапротеобактерий происхождение.

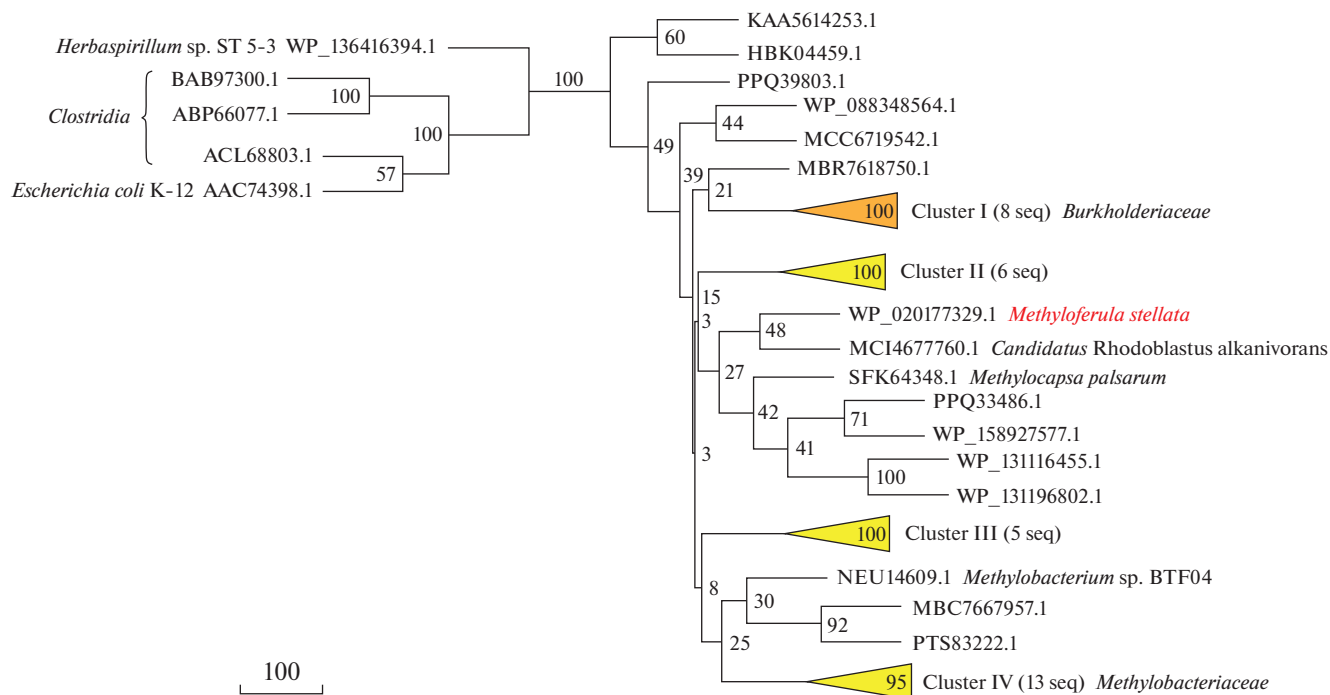


Рис. 1. Филогенетическое древо семейства GH65 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореplik из 100. Красным цветом указан белок из *M. stellata* (GenPept, WP_020177329.1). Подписаны названия организмов-хозяев для белков, обсуждаемых в тексте (все неподписанные белки принадлежат альфапротеобактериям). Треугольниками обозначены четыре кластера ветвей (I–IV), внутри каждого треугольника указана бутстреп-поддержка соответствующего кластера, а справа от него – число относящихся белков. Кластер I, закрашенный оранжевым цветом, содержит 8 белков из бактерий трех родов семейства *Burkholderiaceae*: *Burkholderia* (EIF33191.1 и SEE89066.1), *Caballeronia* (OTP72132.1, OXC75000.1 и SAL64053.1) и *Paraburkholderia* (CAB3772267.1, WP_175773125.1 и WP_244146697.1). Кластер II содержит 4 белка альфапротеобактерий (MBV8092699.1, MBV8522152.1, MBV9117068.1 и SHH85324.1) и по одному метагеномному белку, проаннотированному как принадлежащему к *Deltaproteobacteria* (MBV8360260.1) и *Verrucomicrobia* (MBV8815903.1). Кластер III содержит 5 белков альфапротеобактерий (MBV3873090.1, MBU2167958.1, PZO03164.1, PZO38736.1 и VDC48943.1). Кластер IV содержит 12 белков метилотрофов из родов *Methylobacterium* (ACA17291.1, ACL60972.1, ACL62778.1, AIQ92494.1, APT32891.1, AWW15942.1, KQQ21384.1, MBA9064749.1, MBO1021890.1, SFV05091.1 и UHC19996.1) и *Methylorubrum* (CAX21997.1), а также один белок из актинобактерии *Streptomyces purpurogeniscleroticus* NRRL B-2952 (KOX54615.1).

Семейство GH39 гликозил-гидролаз. Для исследования эволюционного происхождения гена потенциальной β-галактозидазы *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1) был проведен сравнительный анализ с использованием трех с половиной десятков ближайших гомологов. При этом самым близким из них на основании попарного сравнения оказался белок из *Candidatus Melainabacteria bacterium* GWF2_37_15 (OGI03707.1), который содержал два гомологичных домена (31 и 29% идентичности аминокислотных последовательностей для N- и C-концевого домена соответственно). Для более надежного предсказания энзиматической активности исследуемого белка *M. stellata* было проведено его попарное сравнение со всеми известными экспериментально охарактеризованными белками семейства GH39. Однако сколько-нибудь близких гомологов среди них обнаружено не было. Ближайшими оказались эндо-гликозидаза PslG из *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (AAG05625.1;

Yu et al., 2015) с 21% идентичности аминокислотных последовательностей (*E-value* = 0.003) и β-ксилозидаза XynB2 из *Caulobacter vibrioides* CB15 (AAK24328.1; Corrêa et al., 2012) с 25% идентичности (*E-value* = 0.065). Такой низкий уровень сходства последовательностей не дал возможности использовать их для проведения филогенетического анализа, а также не позволил сделать каких-либо заключений относительно возможной субстратной специфичности фермента из *M. stellata*. Наши предварительные выводы о предполагаемом наличии β-галактозидазной активности (Naumoff, 2017) следует считать необоснованным предсказанием (англ. overprediction).

На построенном филогенетическом древе семейства GH39 (рис. 2) гликозил-гидролаза *M. stellata* попала в один кластер (83.7% бутстреп-поддержки) с белками из филумов *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*, что хорошо согласуется с ранее полученными нами данными (Naumoff,

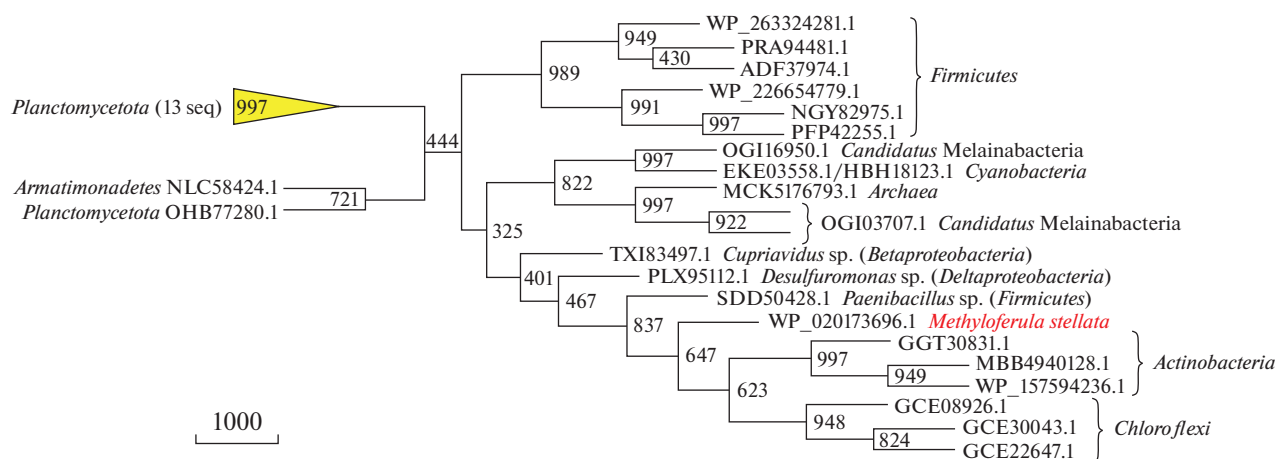


Рис. 2. Филогенетическое древо семейства GH39 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореplik из 1000. Красным цветом указан белок из *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1). Треугольником обозначен кластер ветвей, содержащий 13 белков филы *Planctomycetota* (HCO96457.1, KPL25053.1, MBL7154686.1, MBL7188229.1, MBN2312629.1, OHB65322.1, OHB72897.1, OHB81953.1, TKJ39371.1, TSA53485.1, UCC98674.1, UCE46477.1 и UCF13893.1). Внутри треугольника указана бутстреп-поддержка (99.7%). Белок из *Candidatus Melainabacteria bacterium GWF2_37_15* (OGI03707.1) содержит два гомологичных домена семейства GH39 гликозил-гидролаз.

2017) о предполагаемом переносе соответствующего гена от грамположительных бактерий. Два других взятых в анализ белка из протеобактерий — бетапиротеобактерии *Cupriavidus* sp. Bin_4_1 (GenPept, TXI83497.1; согласно таксономии GTDB — класс *Gammaproteobacteria*) и дельтапротеобактерии *Desulfuromonas* sp. VM515 (PLX95112.1; согласно GTDB — филум *Desulfobacterota*) — оказались за пределами этого кластера. Оба они закодированы в метагеномах, поэтому к указанной таксономической принадлежности их хозяев надо относиться с осторожностью. В правой части рисунка мы видим еще два стабильных кластера. Один из них (98.9%) состоит исключительно из белков фирмикут семейства *Bacillaceae*, а второй (82.2%) имеет крайне гетерогенный состав, указывающий на множественные горизонтальные переносы. Таким образом, эта уникальная потенциальная гликозил-гидролаза демонстрирует нетипичную для *M. stellata* эволюционную историю: кодирующий ее ген, вероятно, был получен из какой-то бактерии совсем другой филогенетической группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Семейство *Beijerinckiaceae*, к которому принадлежит *M. stellata*, включает бактерии метаболически различных групп, таких как облигатные и факультативные метанотрофы, факультативные метилотрофы, хемоорганотрофы и даже аноксигенные фототрофы (Dedysh et al., 2016). Исследование эволюции этого семейства на основании сравнительного геномного анализа позволило сделать предположение о происхождении его

представителей от общего метанотрофного предка (Tamas et al., 2014). Ряд членов этого семейства, таких как классический хемоорганотроф *Beijerinckia indica*, в ходе эволюции утратили метано- и метилотрофный потенциал и приобрели способность к росту на широком спектре углеводных субстратов. По всей видимости, все гены гликозил-гидролаз этой бактерии, обеспечивающие рост на углеводах, были получены в результате эволюционно недавних горизонтальных переносов. В частности, в геноме *B. indica* закодировано два белка семейства GH32 (ACB94959.1 и ACB95642.1) и по одному белку семейств GH25 (ACB95246.1), GH68 (ACB95643.1), GH108 (ACB96931.1) и GH144 (ACB96038.1) гликозил-гидролаз (Drula et al., 2022). Все эти семейства не представлены у *M. stellata*. Белок семейства GH39 из *B. indica* (ACB96331.1) имеет лишь 22% идентичности аминокислотных последовательностей со своим гомологом из *M. stellata* (WP_020173696.1). Будущие исследования происхождения всех этих генов *B. indica* позволят лучше понять эволюцию бактерий семейства *Beijerinckiaceae*. Наши предварительные данные показывают, что один из генов β-фруктозидазы семейства GH32 (ACB94959.1), вероятно, имеет эукариотическое происхождение (49% идентичности аминокислотных последовательностей с энзиматически охарактеризованной экзоинулиной из *Penicillium* sp. TN-88; VAC16218.1), в то время как другой (GenPept, ACB95642.1) был получен от бетапиротеобактерий.

Исследование возможного эволюционного происхождения закодированных в геноме *Methyloferula stellata* генов трех десятков гликозил-гид-

ролаз показало, что почти все они либо наследовались строго по вертикали, либо были переданы горизонтальным переносом от других представителей класса *Alphaproteobacteria* (Naumoff, 2017). Это резко контрастирует с огромным массивом накопленных данных о характере эволюции генов гликозил-гидролаз у хемоорганотрофных бактерий (Наумов, 2011). Играя ключевую роль в утилизации разнообразных углеводных субстратов, гликозил-гидролазы являются очень динамичной группой ферментов: их гены легко приобретаются посредством горизонтальных переносов от других обитателей той же экологической ниши, затем часто подвергаются дупликациям и дальше элиминируются при смене среды обитания. Даже у штаммов одного вида наблюдаются существенные различия в пуле закодированных в геноме гликозил-гидролаз. Лишь часть из этих ферментов отвечает за внутриклеточные функции и поэтому обладает большей эволюционной стабильностью. По всей видимости, у облигатных метанотрофов имеются гликозил-гидролазы только этого типа.

Проведенный нами ранее анализ (Naumoff, 2017) позволил выявить лишь два гена предполагаемых гликозил-гидролаз, для которых тогда не нашлось близких гомологов среди других альфа-протеобактерий. Это могло объясняться либо малым числом доступных тогда геномов, либо отражать имевший место относительно недавно горизонтальный перенос гена от неблизкородственной бактерии. Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что в случае с семейством GN65 имел место первый сценарий. Горизонтальный перенос был направлен в противоположную сторону: бетапротеобактерии семейства *Burkholderiaceae* получили ген от альфапротеобактерий. Однако это не отменяет того факта, что данный ген является относительно редким среди последних. Так, из известных метанотрофов он оказался только в геномах *Methylocapsa palsarum* NE2 (Miroshnikov et al., 2017) и *Methyloferula stellata* AR4 (Dedysh et al., 2015). Это свидетельствует в пользу того, что функция закодированной в нем фосфорилазы коджибиозы является факультативной и у метанотрофов, и у других альфапротеобактерий.

В случае с семейством GN39 мы, очевидно, наблюдаем пример дальнего горизонтального переноса гена в геном *M. stellata*. Кодированный им белок является очень дивергентным представителем этого семейства. Даже со своими наиболее близкими гомологами он проявляет низкий уровень сходства аминокислотных последовательностей (около 30%). Среди этих белков нет ни одного экспериментально охарактеризованного, что не позволяет сделать достоверного предсказания о возможной субстратной специфичности фермента. Аннотации этих белков настолько противоречивы, что оставляют возможность усомниться в их принадлеж-

ности к обсуждаемому семейству. Однако, по крайней мере, один из них (GenPept, ADF37974.1; см. рис. 2) нам удалось обнаружить в списке семейства GN39, приведенном на сайте CAZy (Drula et al., 2022). Это позволяет рассматривать их как отдельное подсемейство в рамках этого семейства. Не исключено, что все эти белки не обладают какой-либо энзиматической активностью, выполняя иную биологическую функцию. Хорошо известны примеры из ряда белковых семейств, когда гомологи гликозил-гидролаз утрачивали ферментативные активности и превращались в ингибиторы, лактальбумины, рецепторы, транспортеры и т.д. (Coutinho et al., 2003; Stam et al., 2006; Drula et al., 2022). Если обсуждаемый белок *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1) тоже утратил гликозил-гидролазную активность, то это было бы хорошим объяснением, почему его ген имеет принципиально иную эволюционную историю в сравнении с генами других гликозил-гидролаз этого организма.

Следует отметить, что ранее нами (Наумов, 2016) был обнаружен другой редкий пример вертикального наследования генов, кодирующих гомологи гликозил-гидролаз. Все исследованные геномы гетеротрофных планктомицетов содержат ген, кодирующий белок семейства GN10 гликозил-гидролаз. Его филогения хорошо согласуется с таксономической принадлежностью организмов-хозяев генов (см. рис. 2 в работе (Наумов и соавт., 2014) и рис. 3 в работе (Наумов и соавт., 2022)). Детальное исследование первичных структур этих белков позволило показать, что они имеют разрушенный активный центр – в них отсутствуют два ключевых остатка Glu (см. рис. S1 в работе Rakitin et al., 2021), выполняющих роль донора протона и нуклеофила, – что делает невозможным наличие у них какой-либо ферментативной активности.

Полученные нами результаты указывают на необычный характер наследования генов гликозил-гидролаз у метанотрофных бактерий. Можно ожидать, что их близкие гомологи из хемоорганотрофных организмов тоже не вовлечены в утилизацию внеклеточных субстратов, а отвечают за внутриклеточные функции.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-14-00034 (С.Н.Д.), а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Д.Г.Н.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 764–780.
- Naumoff D.G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
- Наумов Д.Г. Семейство GH10 гликозилгидролаз: структура и эволюционные связи // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 151–160.
- Naumoff D.G. GH10 family of glycoside hydrolases: structure and evolutionary connections // Mol. Biol. (Moscow). 2016. V. 50. P. 132–140.
- Наумов Д.Г., Иванова А.А., Дедыш С.Н. Филогения β-ксилазаз планктомицетов // Мол. биология. 2014. Т. 48. С. 508–517.
- Naumoff D.G., Ivanova A.A., Dedysh S.N. Phylogeny of β-xylanases from Planctomycetes // Mol. Biol. (Moscow). 2014. V. 48. P. 439–447.
- Наумов Д.Г., Куличевская И.С., Дедыш С.Н. Генетические детерминанты утилизации ксилана у планктомицета класса *Phycisphaerae*, *Humisphaera borealis* M1803^T // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 300–311.
- Naumoff D.G., Kulichevskaya I.S., Dedysh S.N. Genetic determinants of xylane utilization in *Humisphaera borealis* M1803^T, a planctomycete of the class *Phycisphaerae* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 249–258.
- Corrêa J.M., Graciano L., Abrahão J., Loth E.A., Gandra R.F., Kadowaki M.K., Henn C., Simão Rde C. Expression and characterization of a GH39 β-xylosidase II from *Caulobacter crescentus* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 168. P. 2218–2229.
- Coutinho P.M., Stam M., Blanc E., Henrissat B. Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? // Trends Plant Sci. 2003. V. 8. P. 563–565.
- De Beul E., Jongbloet A., Franceus J., Desmet T. Discovery of a kojibiose hydrolase by analysis of specificity-determining correlated positions in glycoside hydrolase family 65 // Molecules. 2021. V. 26. Art. 6321.
- Dedysh S.N., Haupt E.S., Dunfield P.F. Emended description of the family *Beijerinckiaceae* and transfer of the genera *Chelatococcus* and *Camelimonas* to the family *Chelatococcaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 3177–3182.
- Dedysh S.N., Naumoff D.G., Vorobev A.V., Kyrpides N., Woyke T., Shapiro N., Crombie A.T., Murrell J.C., Kalyuzhnaya M.G., Smirnova A.V., Dunfield P.F. Draft genome sequence of *Methyloferula stellata* AR4, an obligate methanotroph possessing only a soluble methane monooxygenase // Genome Announc. 2015. V. 3. Art. e01555-14.
- Drula E., Garron M.-L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50 (Database issue). P. D571–D577. (<http://www.cazy.org/>).
- Haque M.F.U., Hernández M., Crombie A.T., Murrell J.C. Identification of active gaseous-alkane degraders at natural gas seeps // ISME J. 2022. V. 16. P. 1705–1716.
- Miroshnikov K.K., Didriksen A., Naumoff D.G., Huntemann M., Clum A., Pillay M., Palaniappan K., Varghese N., Mikhailova N., Mukherjee S., Reddy T.B.K., Daum C., Shapiro N., Ivanova N., Kyrpides N., Woyke T., Dedysh S.N., Svenning M.M. Draft genome sequence of *Methylocapsa palsarum* NE2^T, an obligate methanotroph from subarctic soil // Genome Announc. 2017. V. 5. Art. e00504-17.
- Mukherjee K., Narindoshvili T., Raushel F.M. Discovery of a kojibiose phosphorylase in *Escherichia coli* K-12 // Biochemistry. 2018. V. 57. P. 2857–2867.
- Naumoff D.G. Glycoside hydrolases encoded by the *Methyloferula stellata* genome // Glycoconjugate J. 2017. V. 34. N. S1. P. S96–S97. (https://www.researchgate.net/publication/328772143_Glycoside_hydrolases_encoded_by_the_Methyloferula_stellata_genome).
- <https://doi.org/10.1007/s10719-017-9784-5>
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz Ph. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Rakitin A.L., Naumoff D.G., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., Ravin N.V., Dedysh S.N. Complete genome sequence of the cellulolytic planctomycete *Telmatocola sphagniphila* SP2^T and characterization of the first cellulolytic enzyme from planctomycetes // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126276.
- Stam M.R., Danchin E.G., Rancurel C., Coutinho P.M., Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α-amylase-related proteins // Protein Eng. Des. Sel. 2006. V. 19. P. 555–562.
- Tamas I., Smirnova A.V., He Z., Dunfield P.F. The (d)evolution of methanotrophy in the *Beijerinckiaceae* – a comparative genomics analysis // ISME J. 2014. V. 8. P. 369–382.
- Vorobev A.V., Baani M., Doronina N.V., Brady A.L., Liesack W., Dunfield P.F., Dedysh S.N. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium possessing only a soluble methane monooxygenase // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2456–2463.
- Yamamoto T., Maruta K., Mukai K., Yamashita H., Nishimoto T., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y. Cloning and sequencing of kojibiose phosphorylase gene from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 // J. Biosci. Bioeng. 2004. V. 98. P. 99–106.
- Yamamoto T., Nishio-Kosaka M., Izawa S., Aga H., Nishimoto T., Chaen H., Fukuda S. Enzymatic properties of recombinant kojibiose phosphorylase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ATCC43494 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. P. 1208–1210.
- Yu S., Su T., Wu H., Liu S., Wang D., Zhao T., Jin Z., Du W., Zhu M.J., Chua S.L., Yang L., Zhu D., Gu L., Ma L.Z. PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix // Cell Res. 2015. V. 25. P. 1352–1367.

Glycoside Hydrolases of the Obligate Methanotroph *Methyloferula stellata*: an Unusual Evolutionary Strategy not Involving Distant Lateral Transfers

D. G. Naumoff¹, * and S. N. Dedysh¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: daniil_naumoff@yahoo.com

Received November 21, 2022; revised December 8, 2022; accepted December 9, 2022

Abstract—The genome of the obligately methanotrophic bacterium *Methyloferula stellata* AR4 encodes thirty glycoside hydrolases. The closest homologues for most of these proteins belong to other members of the class *Alphaproteobacteria*. Two exceptions are represented by the genes encoding glycoside hydrolases of the families GH39 and GH65, which presumably appeared in *M. stellata* AR4 due to the lateral transfer from distantly related bacteria. This work was devoted to the study of the evolutionary history of these two genes. In the case of a member of the GH65 family of glycoside hydrolases, this scenario was not confirmed. Kojibiose phosphorylase encoded by this gene is common among *Alphaproteobacteria*. The suggested lateral transfer of the corresponding gene had an opposite direction, into one of the evolutionary lineages of the class *Betaproteobacteria*. The potential glycoside hydrolase of the GH39 family was shown to be the only one which gene is not of proteobacterial origin. The role of lateral transfers in the evolution of glycoside hydrolases and their homologues in methanotrophs and other bacteria is discussed.

Keywords: glycoside hydrolase, glycoside phosphorylase, GH39 family, GH65 family, methanotrophs, *Methyloferula stellata*, *Beijerinckiaceae*, *Burkholderiaceae*, protein phylogenetic tree, protein evolution, lateral gene transfer, search for homologues, gene annotation