

Клонирование и характеристика глюконаткиназ у нерастающих на сахарах метанотрофных бактерий

¹Мустахимов И.И., ¹Решетников А.С., ²Бекен М.М., ¹Екимова Г.А

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, mii80@ Rambler.ru

²Пушинский государственный естественно-научный институт, г. Пушкино

Аэробные метанотрофные бактерии – уникальная группа прокариот, использующих метан в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом они не способны расти на полиуглеродных субстратах, таких как глюкоза и могут служить модельными объектами для изучения ферментов ее метаболизма. Свободная глюкоза в клетках метанотрофов может образоваться только в результате деградации запасных питательных веществ - сахарозы или гликогена. Ранее было показано, что глюкоза фосфорилируется глюкокиназой в глюкозо-6-фосфат (через 6-фосфоглюконо-лактон) (Mustakhimov et al., 2017). Помимо этого анализ геномов *in silico* выявил наличие у некоторых метанотрофов генов, предположительно кодирующих ферменты окисления глюкозы до 6-фосфоглюконата (глюкозодегидрогеназу, глюконолактоназу и глюконаткиназу), что указывает на функционирование у них второго, параллельного пути утилизации внутриклеточной глюкозы, ферменты которого не изучены.

Глюконаткиназа катализирует НАДФ-зависимую реакцию фосфорилирования глюконата до 6-фосфоглюконата с восстановлением никотинамидного кофактора. Целью данной работы является получение и биохимическая характеристика рекомбинантных глюконаткиназ у метанотрофов – галоалкалотолерантного *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z и нейтрофильного негалофильного *Methylobacter luteus*.

Открытые рамки считывания генов глюконаткиназы (*gntK*) *Mm. alcaliphilum* 20Z и *M. luteus* клонировали в экспрессионном векторе pET-30. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* и последующей металл-хелатной аффинной хроматографии получили электрофоретически гомогенные препараты рекомбинантных белков GntK. С помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле и гель-фильтрации было показано, что оба белка являются мономерами с молекулярной массой 20 кДа. Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом по образованию НАДФН в сопряженной реакции с 6-фосфоглюконатдегидрогеназой. Показано, что активность обоих ферментов полностью зависела от присутствия АТФ и ионов Mg. Глюконаткиназа из *Mm. alcaliphilum* 20Z проявляла наибольшую активность при 30 °C и pH 9.0, GntK из *M. luteus* был наиболее активен при 40 °C и значении pH 8.5. Фермент из *Mm. alcaliphilum* 20Z отличался высокой термостабильностью, резкое снижение активности наблюдали только при 70 °C. После инкубации в течении часа при 40 °C остаточная активность фермента из *M. luteus* составила 50% от контрольного значения, а после 5 минут при 50 °C снижалась в 10 раз. Увеличение концентрации NaCl в реакции до 0,2 М в случае фермента из *Mm. alcaliphilum* 20Z приводило к снижению активности в 2 раза по сравнению с контролем, при этом активность фермента из *M. luteus* оставалась неизменной. Увеличение концентрации NaCl до 2 М приводило к практически полной потере активности обоими ферментами. Ионы некоторых двухвалентных металлов, такие как Cu, Zn, Ni, Cd, Ba существенно ингибировали активность GntK из *Mm. alcaliphilum* 20Z (на 95-99,5%).

Активность глюконаткиназы из *Mm. alcaliphilum* 20Z на 80% ингибировалась в присутствии глюкозо-6-фосфата и на 95% при добавлении 6-фосфоглюконата, продукта реакции, а также фосфоенолпирувата. Активность GntK из *M. luteus* также ингибировалась 6-фосфоглюконатом и фосфоенолпируватом, но в меньшей степени - на 20% и 27% соответственно.

Таким образом, показано, что гены *gntK* *Mt. alcaliphilum* 20Z и *Methylobacter luteus* действительно кодируют глюконаткиназы. Образованный в результате их активности 6-фосфоглюконат поступает далее в окислительный пентозофосфатный цикл с получением энергии, но потерей C-C связи, или распадается до C₃ метаболитов в пути Энтнера-Дудорова. Полученные данные свидетельствуют о метаболическом разнообразии путей вовлечения внутриклеточной глюкозы в центральный метаболизм у нерастающих на сахарах метанотрофов и являются фундаментальной основой для дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00728-а

Литература

1. Mustakhimov II, Rozova ON, Solntseva NP, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, Trotsenko YA. The properties and potential metabolic role of glucokinase in halotolerant obligate methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 Mar;110(3):375-386.