

Биохимические свойства НАДФ⁺-зависимой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы галоалкалофильного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

^{1,2}Андрянов П.А., ¹Мустахимов И.И.

¹ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
²ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт; pas1816@yandex.ru

Метанотрофы – физиологическая группа аэробных бактерий, использующих метан и метанол в качестве источников углерода и энергии. Особенностью углеводного метаболизма галоалкалофильного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z является функционирование одновременно нескольких путей распада фосфосахаров – пирофосфат-зависимого гликолиза, фосфорилирующего и полуфосфорилирующего вариантов пути Энтнера-Дудорова, фосфокетолазного пути и окислительного пентозофосфатного цикла. Одной из ключевых реакций пути Энтнера-Дудорова и пентозофосфатного цикла является окисление глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконата глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФДГ) с восстановлением НАДФ(Ф)⁺. В геноме *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z обнаружено две изоформы Г6ФДГ с идентичностью аминокислотных последовательностей 38,3%. Цель данной работы заключалась в биохимической характеристике НАДФ⁺-зависимой Г6ФДГ.

Идентифицированная открытая рамка считывания 1491 п.о., предположительно кодирующая ген НАДФ⁺-зависимой Г6ФДГ, была амплифицирована из геномной ДНК *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. ПЦР-фрагмент клонировали в экспрессионный вектор рЕТ-30а, предназначенный для синтеза белка с навеской из 6 гистидинов на С-конце. Полученной плазмидой рЕТ-30а-Г6ФДГ трансформировали клетки *Escherichia coli* Rosetta (DE3), синтез белка индуцировали добавлением 0,5 мМ изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозида в логарифмической фазе роста культуры. Гомогенный препарат белка был получен с использованием аффинной хроматографии на Ni-НТА агарозе. Молекулярная масса субъединицы, определенная с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, соответствовала теоретически рассчитанной (57 кДа). С использованием гель-фильтрации была определена нативная м. м. фермента ~300 кДа, что указывает на гексамерную форму энзима.

Рекомбинантная Г6ФДГ активна в диапазоне рН 7,5 - 10,5 с оптимумом рН 10. Фермент проявлял активность в температурном диапазоне 20 – 45 °С, с максимумом при 38 °С. Активность фермента снижалась на 50% при температуре измерения 45 °С, при 50 °С фермент полностью терял свою активность. Активность фермента зависела от ионов Mg²⁺, при добавлении 1 мМ Sn²⁺ или Ba²⁺ активность возрастала в 2,61 и 1,7 раз, соответственно. 1 мМ Ni²⁺ и Cd²⁺ ингибировали фермент соответственно в 2,7 и 2,04 раза.

Анализ влияния метаболитов на активность Г6ФДГ показал, что в присутствии оксалоацетата активность фермента увеличивалась в 3,55 раз, в присутствии малата и фруктозо-6-фосфата - в 2,35 и 2 раза, соответственно. Фосфоенолпируват, пируват, глюкозо-1-фосфат и α-кетоглутарат не оказывали существенного эффекта на Г6ФДГ. Г6ФДГ подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен (K_m для глюкозо-6-фосфата составила 2,09 мМ; K_m для НАДФ 0,95 мМ). Максимальная скорость реакции (V_{max}) составила 9,56 Е/мг белка.

Работа поддержана РФФИ №18-04-00728а.