

Характеристика новых ферментов с фосфоацетальдегид гидролазной активностью у бактерий-деструкторов глифосата рода *Achromobacter*

Эпиктетов Д.О., Свиридов А.В., Леонтьевский А.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;
г. Пушкино; epiktetoff@gmail.com

Фосфоацетальдегидгидролаза (фосфонатаза, ЕС 3.11.1.1) – наиболее известный фермент катаболизма природных ортофосфонатов (ОФ), таких как 2-аминоэтилфосфоновая кислота (2-АЭФ). Фосфонатаза катализирует расщепление С–Р связи (углерод-фосфор) молекулы фосфоацетальдегида (ФАА) в ацетальдегид и ортофосфат. Этот фермент был впервые обнаружен у бактерии-деструктора 2-АЭФ – *Bacillus cereus*, затем выделен у *Salmonella typhimurium* и *Pseudomonas aeruginosa* и считается относительно хорошо изученным. Фосфонатаза представляет собой гомодимер с молекулярной массой (ММ) субъединицы около 32 кДа, активный в присутствии ионов Mg^{2+} , в диапазоне значений рН 8–9, с относительно высоким сродством к субстрату ($K_m=0,033$ мМ) и высокой максимальной скоростью реакции ($V_{max}=29,7$ Ед./мг белка). В литературе приведены косвенные данные о возможности существенного структурного и функционального разнообразия фосфонатаз у разных таксонов бактерий, но систематического изучения данного вопроса не проводилось. Однако в последнее время опубликован ряд научных работ, допускающих участие этого фермента в катаболизме не только природных, но и синтетических ОФ, среди которых наиболее распространен гербицид глифосат (ГФ, N-фосфонометилглицин) – средство для борьбы с однолетними и многолетними сорными растениями. В некоторых странах мира ГФ признан канцерогенным соединением, по современным данным он также способен оказывать негативное воздействие на репродуктивную функцию, сердечно-сосудистую и мочеполовую системы животных и человека. Поэтому в настоящее время в научном сообществе возрос интерес к изучению метаболизма этого соединения.

На сегодняшний день описано 2 пути биоразложения ГФ посредством бактериальных ферментных систем: 1) особая ГФ-специфичная С–Р лиаза и 2) ГФ-оксидоредуктаза. Имеются предварительные экспериментальные и литературные данные о том, что у ряда штаммов-деструкторов, таких как *Ochrobactrum anthropi* GPK3 и *Achromobacter aegrifaciens* Kg 16, терминальную стадию ГФ-оксидоредуктазного пути утилизации ГФ, связанную с непосредственным гидролизом С–Р связи, могут катализировать ферменты с фосфоацетальдегидгидролазной активностью, то есть фосфонатазы.

Ранее нами были выделены и очищены до электрофоретически гомогенного состояния 9 белков с фосфоацетальдегид гидролазной активностью из бактерий-деструкторов ГФ. Целью настоящей работы является подробная биохимическая характеристика выделенных ферментов в сравнении с литературными данными. Продуцентами новых ферментов являются 6 штаммов рода *Achromobacter*, способные использовать ГФ в качестве единственного источника фосфора и экспрессирующие фосфонатазу при росте на среде с ГФ. У трех штаммов (*A. insolitus* Kg 19, *A. aegrifaciens* Km 11А и *A. aegrifaciens* Km 11В) было впервые обнаружено по 2 изоформы фосфонатазы в пределах одной клетки. Все выделенные белки существенно отличались от описанных в литературе ферментов по кинетическим характеристикам и субъединичному составу. Большинство белков представляли собой мономеры с ММ около 60 кДа, кроме фосфонатаз у *A. aegrifaciens* Km 11 и *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа II), которые представляли собой гомодимеры с ММ 25 и 30 кДа соответственно. Фосфонатазы *A. aegrifaciens* Kg 16, *A. insolitus* Kg 13, *A. insolitus* Kg 19 (изоформы I и II), *A. aegrifaciens* Km 11В (изоформы I и II), *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа II) проявляли относительно низкое сродство к субстрату

(ФАА) и низкую максимальную скорость гидролиза ФАА по сравнению с фосфонатазами, описанными в литературе. Относительно высоким сродством к субстрату обладали фосфонатазы *A. aegrifaciens* Km 11 ($K_m=0,44$ мМ ФАА, $V_{max}=0,28$ Ед./мг белка) и *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа I), где $K_m=0,114$ мМ, $V_{max}=0,258$ Ед/мг белка. Кинетическая кривая реакции гидролиза ФАА ферментами штаммов *A. aegrifaciens* Km 11 и *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформа II) не описывались уравнением Михаэлиса-Ментен и имела S-образную форму с точкой перегиба. Такой тип кривой характерен для аллостерических ферментов, где взаимодействие активных центров, связывающих лиганд в молекуле фермента, протекает так, что сродство к лиганду растет по мере насыщения связывающих центров в молекуле фермента. Поэтому расчет значений K_m и V_{max} проводился по уравнению Хилла. Фосфонатаза бактерии *A. aegrifaciens* Km 11 обладала положительной кооперативностью ($n=1,54$), что говорит о высоком сродстве к лиганду. Наоборот, изоформа II фосфонатазы штамма *A. aegrifaciens* Km 11А проявляла отрицательную кооперативность ($n=0,55$), что соответствовало данным о низком сродстве к субстрату в отличие от изоформы I этого же штамма.

Ферменты также отличались по диапазонам оптимальных значений pH и термостабильности. Так, большинство фосфонатаз у *Achromobacter* имели весьма узкий оптимум pH 7,2–7,6. Максимальная фосфонатазная активность у большинства очищенных белковых препаратов наблюдалась при температуре 40 °С, исключение составляли фосфонатазы бактерий *A. insolitus* Kg 13, *A. aegrifaciens* Km 11А (изоформы I и II) и *A. aegrifaciens* Km 11В (изоформа I), у которых температурный оптимум составлял 45 °С. Активность очищенных ферментных препаратов наилучшим образом сохранялась в условиях заморозки при температуре -40 °С. Ингибиторный анализ новых ферментов также продемонстрировал их существенные отличия от описанных ранее фосфонатаз. Так, ГФ и 2-АЭФ выступали конкурентными ингибиторами, соответственно, изоформ I и II фосфонатаз *A. insolitus* Kg 19, в то время как в литературе для фосфонатаз известен только один конкурентный ингибитор – борогидрид. Эти же соединения, а также аминометилфосфонат и глутатион, могли являются активаторами других изученных нами фосфонатаз.

Таким образом, впервые показано существенное разнообразие фосфонатаз у представителей одного рода бактерий *Achromobacter*. Отличия в ММ, субъединичном составе и кинетических характеристиках, а также в наборе активаторов и ингибиторов позволяет говорить об обнаружении новых, ранее не описанных в литературе ферментов с фосфоноацетальдегидгидролазной активностью, не тождественных ранее изученным фосфонатазам.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №18-74-00021.