

УДК 579.841.11: 577.175.122; 579.222.3

Е.А. ХРАМЦОВА, С.С. ЖАРДЕЦКИЙ, Н.П. МАКСИМОВА

СИНТЕЗ ИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS MENDOCINA*. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ МУТАНТОВ*

We investigated the IAA biosynthesis pathway in bacteria *P. mendocina* ВКМВ 1299 and showed that in studied bacteria this compound is synthesized via the indole-3-pyruvic acid pathway. With the help of NG-mutagenesis regulation mutants with 8-10 fold increase of IAA production level were obtained. These mutants were established to possess an increased level of enzymes which take part in the formation of this substance (ДАHP-синтаза, антранилат-синтаза, триптофан-аминотрансфераза, индолепируват декарбоксилаза).

Триптофан - один из важнейших предшественников вторичных метаболитов ароматической природы у бактерий. Наиболее важными из них являются индол-3-уксусная кислота (ИУК) и ее производные, пигменты виолоцеин и индиго, а также антибиотик пирролнитрин и др. Продукция ИУК широко распространена среди ризосферных и почвенных бактерий, в частности, представителей рода *Pseudomonas*, что обеспечивает последним способность стимулировать рост и развитие растений [1].

Синтез ИУК из триптофана у бактерий *Pseudomonas* может происходить через: индол-3-пируват (у *P. fluorescens* и *P. putida*) [2], обходной триптофановый путь (у *P. syringae pv savastanoi* и *P. fluorescens*) и индолил-3-ацетамид (у *P. syringae pv savastanoi*) (рис. 1) [3]

Целью работы являлось исследование пути синтеза ИУК у ризосферных бактерий *P. mendocina* ВКМВ 1299, а также получение и характеристика регуляторных мутантов с повышенным синтезом гормона.

Материал и методика

Для проведения исследований использовали штамм *P. mendocina* ВКМВ 1299 (Всероссийская коллекция микроорганизмов и вирусов), а также его мутанты, полученные в данной работе.

Бактерии культивировали при 28° или 37 °С в минимальной среде [4]. Для накопления в культуральной жидкости ИУК бактерии выращивали с аэрацией в течение 36-48 ч в ростовой среде (РС) [3], содержащей триптофан в концентрации 500 мкг/мл, и полноценной среде Кинг В [5].

* Авторы статьи - сотрудники кафедры генетики.

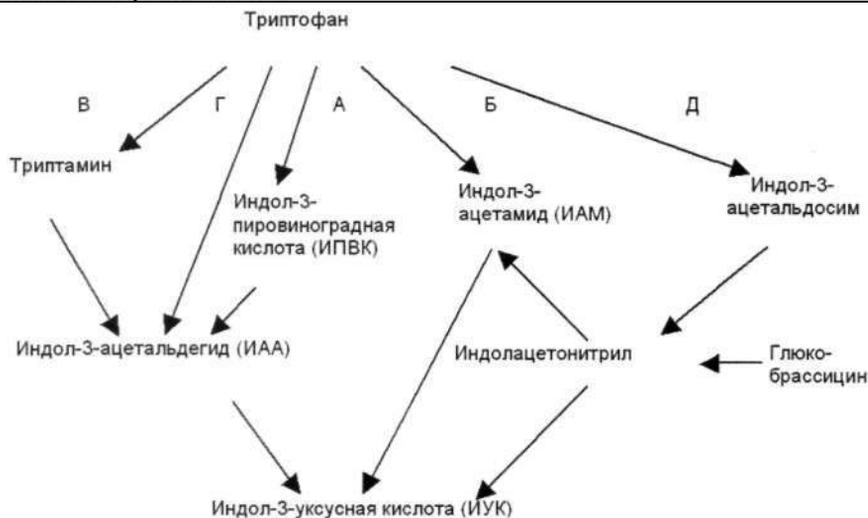


Рис. 1. Пути синтеза ИУК из триптофана у бактерий:
 А – через индол-3-пировиноградную кислоту; Б – через индол-3-ацетамид; В – через триптамин; Г – обходной триптофановый путь; Д – через индол-3-ацетонитрил

Мутанты получали с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (концентрация 100 мкг/мл, экспозиция 30 мин). Регуляторных мутантов отбирали по устойчивости к токсическим аналогам триптофана [6], мутантов, продуцирующих ИУК, - по способности к сверхсинтезу данного фитогормона. Количество ИУК в культуральной жидкости определяли с помощью реактива Сальковского [7].

Продукцию триптофана находили ауксонографическим методом с помощью тест-культуры *P. putida trpB* [8]. Количественный анализ триптофана проводили согласно методике [9], идентификацию промежуточных продуктов триптофанового пути (антранилата, индола и индол-3-глицерофосфата) - стандартными методами [10].

Предшественников синтеза ИУК идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии, для чего супернатант подкисляли HCl до pH 3,0, добавляли равный объем серного эфира, тщательно перемешивали и выпаривали на ротаторном испарителе (KIKI WERKE RV05-ST). Осадок растворяли в 20 мкл эфира и 5 мкл наносили на хроматографическую пластину «Silufol». Для хроматографии использовали следующую систему растворителей: хлороформ - этилацетат - муравьиная кислота в соотношении 5:4:1. Хроматограмму проявляли в парах металлического йода.

Активность 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы (ДАГФ-синтазы) определяли по стандартной методике [11], активность антранилат-синтазы (АС) - по флуоресценции образующегося продукта реакции - антранилата [12], удельную активность триптофан-аминотрансферазы и индолпируват-декарбоксилазы - в соответствии с описанными ранее методами [6, 13], белок - по Брэдфорду [14].

Результаты и их обсуждение

Идентификация пути синтеза ИУК у бактерии *P. mendocina* VKMB 1299. Для изучения пути биосинтеза ИУК у *P. mendocina* проведена хроматография эфирного экстракта культуральной жидкости с последующим анализом образующихся промежуточных продуктов. В качестве стандартов были взяты ИУК, индол-3-молочная кислота (ИМК), индол-3-ацетальдегид (ИАА) и индол-3-ацетонитрил. ИМК использовали вместо индол-3-пировиноградной кислоты (ИПВК), которая является нестабильным соединением и способна к обратному превращению в ИМК [4].

Результаты хроматографического анализа промежуточных продуктов синтеза ИУК представлены на рис. 2. Выявление ИМК в культу-

ральной жидкости *P. mendocina* позволяет сделать вывод, что у бактерии этого штамма ИУК синтезируется через индол-3-пируват (см. рис. 1). Дополнительным доказательством существования этого пути является наличие у изучаемых бактерий активностей триптофан-аминотрансферазы и индол-3-пируватдекарбоксилазы, ферментов, обеспечивающих превращение триптофана в ИПВК и затем в ИАА.

Получение аналого-резистентных мутантов *P. mendocina* ВКМВ 1299. Одним из путей повышения выхода ИУК является использование регуляторных мутантов, способных к сверхпродукции триптофана, а значит, и ИУК. Подобные мутанты бактерий рода *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. aeruginosa*) характеризуются дерепрессией генов *trpE*, *trpD*, *trpC*, а также снятием ретроингибирования антранилат-синтазы - ключевого фермента триптофанового пути и, как следствие, способностью продуцировать триптофан [15]. Для получения регуляторных мутантов *P. mendocina* предварительно осуществлялся подбор наиболее эффективных токсических аналогов триптофана. Для этих целей использовали: NL-ацетил-DL-триптофан, DL-5-фтор-триптофан, D-триптофан, L-триптофан-метилловый эфир гидрохлорида, 5-метил-триптофан и α-метилтриптофан. Наиболее эффективным аналогом для выделения регуляторных мутантов оказался NL-ацетил-DL-триптофан, с помощью которого были получены мутанты, способные продуцировать триптофан в количестве 10-30 мкг/мл, а также DL-5-фтор-триптофан, который позволил отобрать мутанты, продуцирующие 40-60 мкг/мл триптофана. Полученные регуляторные мутанты были проверены на способность к синтезу ИУК. Наиболее продуктивными оказались штаммы *P. mendocina* PM364 и PM9-40, клетки которых образовывали ИУК в количестве от 80 до 100 мкг/мл, что в 8-10 раз выше, чем у клеток дикого типа. При этом большинство остальных аналого-резистентных мутантов выделяли в культуральную жидкость антранилат (табл. 1). Подобное явление было описано ранее для *P. putida* [15].

Определение активностей ДАГФ-синтазы, антранилат-синтазы, триптофан-аминотрансферазы и индолпируват-декарбоксилазы у регуляторных мутантов *P. mendocina* ВКМВ 1299. Ранее было показано, что ДАГФ-синтаза изучаемых бактерий *P. mendocina* подвержена ретроингибированию, а антранилат-синтаза - репрессии и ретроингибированию [16]. В связи с этим для установления механизмов сверхпродукции ИУК у полученных регуляторных мутантов *P. mendocina* (PM364 и 9-40) была измерена активность указанных ферментов. Как видно из данных табл. 2, активность ДАГФ-синтазы у мутанта PM364 и штамма дикого типа была практически одинаковой, тогда как у мутанта PM9-40 - выше в 2 раза.

Что касается аллостерической регуляции ДАГФ-синтазы, то у мутантов *P. mendocina* PM364 и PM9-40 ингибирующее действие тирозина и триптофана в отношении этого фермента снижено в 1,5 и 2 раза соответственно (табл. 3), что говорит о частичном снятии ретроингибирования ключевого фермента ароматического пути.

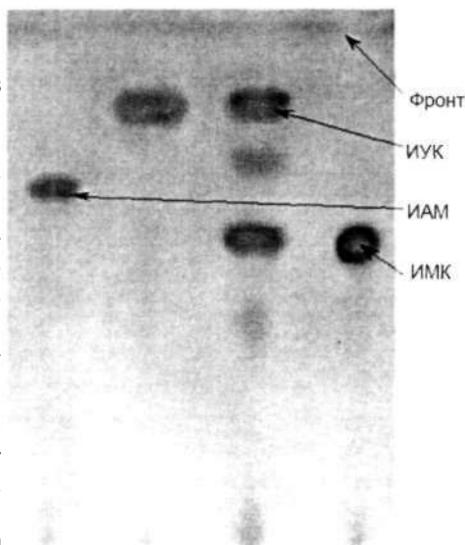


Рис. 2. Хроматография эфирных экстрактов культуральной жидкости бактерий *P. mendocina* ВКМВ 1299

Таблица 1

Продукция ИУК регуляторными мутантами *P. mendocina*

Штаммы	Продукция, мкг/мл	
	ИУК	анранилата
PM364	90±10,0	—
PM9-40	90±10,0	—
PM382	30±2,4	+
PM315	42±3,6	+
PM373	25±1,7	+
Дикий тип	5±2	+

При изучении ретроингибирования анранилат-синтазы у мутантов *P. mendocina* PM364 и PM9-40 показано, что чувствительность фермента к ретроингибированию триптофаном у этих штаммов также снижена по сравнению с клетками дикого типа (рис. 3).

Таблица 2

Активности ферментов ДАГФ-синтазы и анранилат-синтазы у регуляторных мутантов *P. mendocina*

Штаммы	Удельная активность ферментов, нмоль (мин·мг) белка	
	ДАГФ-синтаза	Анранилат-синтаза*
Дикий тип	7,1±0,4	1,0±0,2
PM364	7,3±0,35	1,8±0,2
PM9-40	14,5±0,4	2,2±0,25

Примечание. * Различия удельной активности фермента мутантов и штамма дикого типа достоверны при $P < 0,01$.

Так, 50 %-е ингибирование триптофаном достигается при концентрации последнего около 10^{-3} М, что на два порядка выше ингибирующей концентрации для дикого типа. Таким образом, сверхсинтез триптофана и ИУК у аналогорезистентных мутантов *P. mendocina*, а также повышение уровня синтеза ДАГФ-синтазы и анранилат-синтазы связаны с частичным снятием ретро, ингибирования обоих ферментов.

Таблица 3

Ингибирование активности ДАГФ-синтазы у регуляторных 5ФТ^R мутантов *P. mendocina* *

Штаммы	Ингибирование, %	
	тирозином	триптофаном
Дикий тип	63,7±2,1	36,0±0,7
PM364	45,0±1,6	21,0±0,5
PM9-40	46,0±2,0	20,5±0,5

Примечание. * Приведены средние значения.

В дальнейшие эксперименты по определению активности триптофан-аминотрансферазы и индолпируват-декарбоксилазы был взят штамм PM9-40, образование ИУК у которого сочеталось с высоким уровнем удельной активности ДАГФ-синтазы и анранилат-синтазы. Установлено возрастание уровня удельной активности как аминотрансферазы, так и декарбоксилазы по сравнению с диким типом (табл. 4). Ранее было показано, что ключевым ферментом синтеза ИУК через ИПВК является индолпируват-декарбоксилаза [17], возможно, изменение уровня синтеза данного фермента и повлекло смещение равновесия в сторону повышения синтеза ИУК.

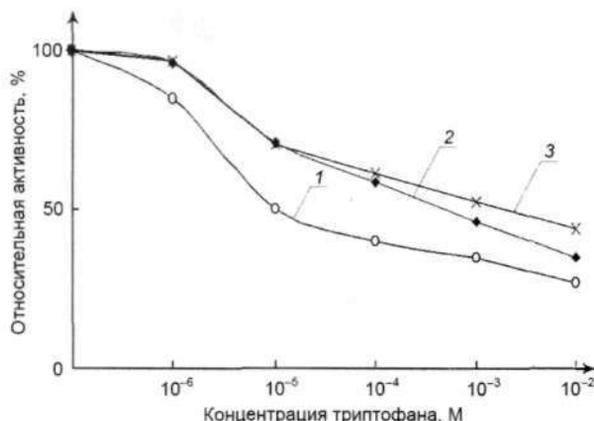


Рис. 3. Ретроингибирование анранилат-синтазы у мутантов *P. mendocina*:

1 – ВКМВ 1999, 2 – PM364, 3 – PM9-40

Удельная активность триптофан-аминотрансферазы и индолпируват-декарбоксилазы у аналого-резистентного мутанта *P. mendocina* 9-40 в сравнении с диким типом *P. mendocina* ВКМБ 1299

Штаммы	Удельная активность, мкмоль (мин·мг) белка	
	триптофан-аминотрансферазы	индолпируват-декарбоксилазы
Дикий тип	3±0,5	8,6±1,0
PM9-40	25±2,5	70±10,0

Таким образом, у бактерий *P. mendocina* определен путь синтеза индол-3-уксусной кислоты, получен ряд аналого-резистентных мутантов, продуцирующих триптофан и ИУК. Установлены нарушения в регуляции ряда ферментов метаболизма триптофана (ДАГФ-синтазы и АС) и индол-3-уксусной кислоты (триптофан-аминотрансферазы и индолпируват-декарбоксилазы). Отобраны штаммы *P. mendocina* 364 и 9-40, характеризующиеся повышенной продукцией ИУК, которые могут быть использованы для дальнейшей селекции высокоэффективных продуцентов этого растительного гормона.

1. Patten C.L., Glick B.R. // Appl. and Envir. Microbiol. 2002. Vol. 68. № 8. P. 3795.
2. Prikryl Z., Vancuza V. // Biologia plantarum. 1985. Vol. 27. №2-3. P. 159.
3. Kuo T., Ksuge T. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1970. Vol. 16. P. 191.
4. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
5. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. // J. Lab. Clin. Med. 1954. Vol. 44. P. 301.
6. Asakawa T., Wada H., Yamano T. // Biochim. Biophys. Acta. 1968. Vol.170. P. 375.
7. Gordon S.A., Weber R.P. // Plant Physiol. 1951. Vol. 26. P. 192.
8. Мордухова Е.А., Скворцова Н.П., Кочетков В.В. и др. // Микробиология. 1991. Т. 69. Вып. 3. С. 494.
9. Udenfried S., Peterson R. // Methods in enzymology / Eds. S. Colowick, N. Kaplan. New York, 1957. Vol. 3. P. 613.
10. Yanofsky C // J. Biol. Chem. 1956. Vol. 223. P. 171.
11. Ito J., Crawford I.P. // Genetics. 1965. Vol. 52. P. 1303.
12. Crawford I.P. // Bacteriol. Rev. 1975. Vol. 39. P. 87.
13. Mavrides C, Orr W. // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 4128.
14. Bradford M.M. Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248.
15. Олехнович И.Н., Максимова Н.П., Фомичев Ю.К. // Генетика. 1985. Т. 21. № 7. С. 1099.
16. Олехнович И.Н., Фомичёв Ю.К. // Там же. 1991. Т. 27. №4. С. 649.
17. Кода J., Adachi T., Hidaka H. // Mol. Gen. Genet. 1991. Vol. 226. P. 10.

Поступила в редакцию 21.04.06.

Елена Аркадиевна Храмцова - кандидат биологических наук, доцент.

Сергей Станиславович Жардецкий - младший научный сотрудник. Научный руководитель - Н.П. Максимова.

Наталья Павловна Максимова - доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой.