

УДК 579.262(282.256.3)

DOI 10.18101/2306-2363-2020-1-45-53

ПОИСК ПРИРОДНЫХ ПЕПТИДАЗ В МИКРОБНОМ МАТЕ ГОРЯЧЕГО ИСТОЧНИКА ГАРГА И ИХ РАЗНООБРАЗИЕ

© **Лаврентьева Е. В.**

кандидат биологических наук,

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова

Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а

E-mail: lena_1@mail.ru

© **Раднаев В. С.**

Бактериологическая лаборатория

Больница скорой медицинской помощи им. В. В. Ангапова

Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Профсоюзная, 48а

Цель исследования — определить природные пептидазы в микробном мате горячего источника Гарга и их разнообразие. Статья посвящена комплексному исследованию пептидаз, которые представляют отдельную группу гидролитических ферментов участвующие в разложение органического вещества. Научная новизна работы заключается в анализе препаратов микробных сообществ горячих источников Байкальской рифтовой зоны методом высокопроизводительного секвенирования, которые обеспечивают гидролиз биополимеров на первых этапах деструкции органического вещества. В результате был проведен метагеномный анализ, который позволил выявить распространение пептидаз класса металлопептидаз в изученных микробных сообществах. В метагеномных последовательностях были идентифицированы потенциальные пептидазы, которые могут представлять биотехнологический интерес.

Ключевые слова: пептидазы; микробный мат; гидролитические ферменты; металлопептидазы; метагеномы; секвенирование; Байкальская рифтовая зона.

Для цитирования: *Лаврентьева Е. В., Раднаев В. С.* Поиск природных пептидаз в микробном мате горячего источника Гарга и их разнообразие // Вестник Бурятского государственного университета. Химия. Физика. 2020. Вып. 1. С. 45–53.

Гидролитические бактерии являются инициаторами процесса разложения органического вещества в микробных сообществах природных местообитаний. За последнее десятилетие появляется все больше информации о наличии полного комплекса гидролитических ферментов у представителей прокариот [1–3]. Интенсивность их деятельности очень сильно зависит от многих экологических факторов, в том числе температуры, окислительно-восстановительных условий, реакции среды. В составе органического вещества одним из основных компонентов является белок. Процесс протеолиза имеет важное биологическое значение, так как играет регулируемую роль в функционировании как клетки, так и экосистемы в целом.

Пептидазы (ЕС. 3.4) представляют собой отдельную подгруппу гидролитических ферментов, которые катализируют расщепление пептидных связей в белковых субстратах. В зависимости от способа действия и каталитического механиз-

ма пептидазы делятся на шесть основных классов, включая сериновые пептидазы (ЕС. 3.4.21), цистеиновые пептидазы (ЕС. 3.4.22), аспарагиновые пептидазы (ЕС. 3.4.23), металлопептидазы (ЕС. 3.4.24), треониновые эндопептидазы (3.4.25) и глутаминовые (3.4.23.32) (<http://merops.sanger.ac.uk/>). В дополнение к их ключевой метаболической и физиологической значимости, они имеют различное коммерческое применение во всем мире.

Процесс деструкции белка пептидазами в природных экосистемах слабоизучен, известно лишь несколько работ, посвященных изучению гидролиза белка в морских экосистемах [2, 4] и в почве [5].

Объекты и методы исследования

Высокотемпературный источник Гарга находится в долине р. Гарги, расположен в отрогах Икатского хребта, окаймляющего котловину с восточной стороны (54°19'203" N и 110°59'646" E. Участок выхода сложен водноледниковыми верхне-четвертичными отложениями, которые перекрывают палеозойские граниты, и связаны с мощным Гаргинским разломом, протягивающимся в северо-восточном направлении на 30-40 км. Температура воды на изливке достигает 74°C, pH 8,3.

Поиск пептидаз в микробном мате горячего источника Гарга проведен в ООО «Биоспарк», г. Москва.

Результаты и обсуждение

Физико-химические условия горячего источника Гарга

Термальная сульфатно-натриевая вода изливается со скоростью 5 л/с в небольшой грот, расположенный на правом берегу реки Гарга, на высоте около 100 м от уреза воды (674 м над уровнем моря). Температура воды на выходе достигает 74°C. Вода, стекая по ручью, образует травертин высотой 1,5-2 м, длиной до 50 м, шириной до 25 м и является одним из самых крупных в Байкальском регионе.

Химический состав воды (табл. 1). Доминирующий катион — Na⁺, его содержание составило 312,04 мг/дм³. Концентрации ионов Mg²⁺, K⁺ и Ca²⁺ составили 0,08, 11,3 и 23 мг/дм³, соответственно. Содержание карбонатов составило 6 мг/дм³, гидрокарбонатов — 109 мг/дм³. Концентрация сульфатов 390 мг/дм³. Содержание хлоридов и фторидов 51 мг/дм³ и 11 мг/дм³, соответственно. Для источника Гарга характерно высокое содержание радона, до 43 эман.

Таблица 1

Химический состав воды горячего источника Гарга, мг/дм³
(в месте отбора микробного мата)

Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	H ₂ SiO ₃	F	PO ₄ ³⁻	Cl ⁻
312,04	11,3	23	0,08	6	109,83	7,4	0,004	390	89	10,5	2,02	51,41

Микроэлементный состав воды показал, что в Гаргинских водах отмечены повышенные концентрации В, Rb, Li, Ba, Sr. Повышенные содержания данных элементов в целом характерны для термальных источников, разгружающихся в

Е. В. Лаврентьева, В. С. Раднаев. Поиск природных пептидаз в микробном мате горячего источника Гарга и их разнообразие

пределах Икатского хребта. Высокие содержания Sг и некоторых других элементов в горячем источнике связаны с их высоким содержанием в гранитоидных породах Баргузинского комплекса.

Для поиска природных пептидаз был отобран микробный мат при температуре воды 54,2°С, рН воды составила 8,3 и минерализация 0,74 г/ дм³.

Метагеномный анализ

На первой стадии выполнения работ по метагеномному анализу были получены данные по поглощению света препаратом ДНК (рис. 1, табл. 2)

Таблица 2
Качество и количество ДНК в полученных препаратах (Гарга)

A260 Concentration (ng/ul)	A230 (10 mm)	A260 (10 mm)	A280 (10 mm)	Raw A340 (10 mm)	A260 /A230	A260 /A280	A260 Turbidity (10 mm)	Общее кол-во ДНК, мкг
215,94	3,24	4,32	2,22	0,9	1,33	1,94	2,23	21,6

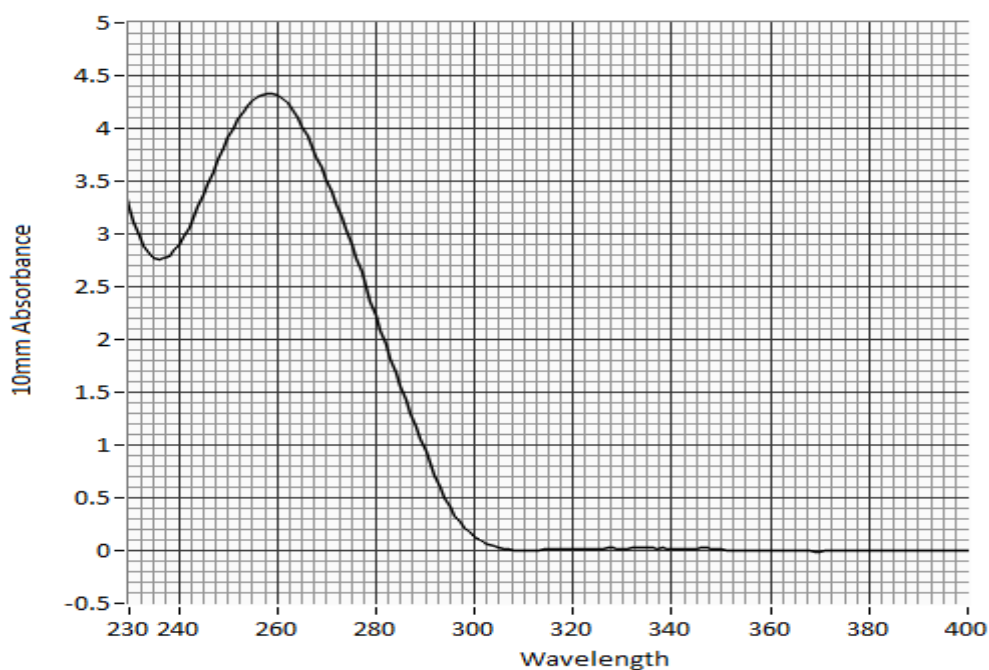


Рис. 1. Кривая поглощения света препаратами ДНК

Секвенирование полученных библиотек на платформе Illumina HiSeq

Качественные и количественные характеристики полученных данных секвенирования (табл. 3) Усредненные показатели качества прочтения (Q) каждого нуклеотида (рис. 2).

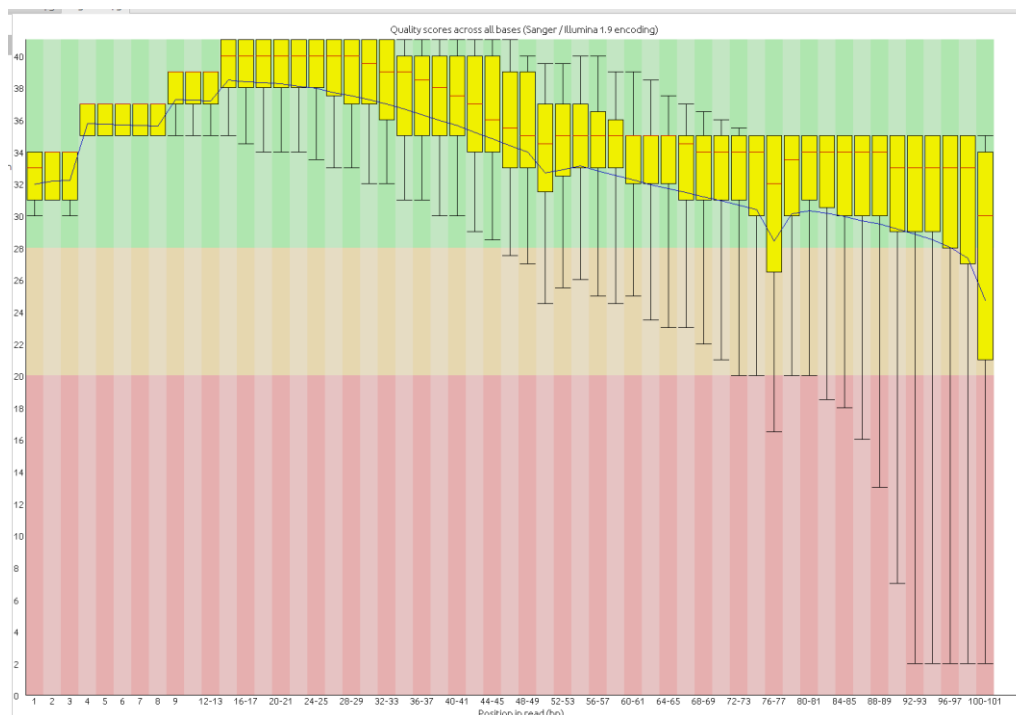


Рис. 2. Усредненные показатели качества прочтения (Q — ось ординат) каждого нуклеотида (позиции обозначены по оси абсцисс)

Таблица 3

Качественные и количественные характеристики полученных данных секвенирования

Образец	Количество прочтений	Длина прочтений	Усредненный GC состав прочтений
Гарга	94242298	101	59%

На основании полученной аннотации в изученном образце был получен перечень всех выявленных типов протеаз (табл. 4)

Ферменты, идентифицированные в метагеномных последовательностях, которые могут представлять интерес для биотехнологии

Таблица 4

Перечень всех выявленных типов протеаз для каждого образца (Гарга)

Тип протеазы	Код фермента по ЕС	Номенклатура
ATP-dependent Clp protease	3.4.21.92	Сериновая пептидаза Гидролиз белка на мелкие пептиды в присутствии АТФ и Mg ²⁺
ATP-dependent zinc metalloprotease	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
CAAX amino terminal protease self- immunity		
Carboxy-terminal processing protease	3.4.21.102	Сериновая пептидаза
Caudovirus prohead protease		
Cysteine protease StiP	3.4.22.-	Цистеиновая эндопептидаза
DNA-binding ATP-dependent protease La		
Extracellular basic protease	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Extracellular metalloprotease	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Extracellular serine protease	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Germination protease precursor	3.4.24.78	Металлоэндопептидазы Принадлежит семейству пептидаз М63
Hydrogenase maturation protease		
Intracellular serine protease	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
intramembrane serine protease GlpG		
Lon protease	3.4.21.53	Сериновая эндопептидаза La Принадлежит семейству S 16
Metalloprotease LoiP	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Metalloprotease MmpA	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Minor extracellular protease Epr	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Minor extracellular protease vpr	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Multifunctional acyl-CoA thioesterase I and protease I and lysophospholipase L1		
Neutral metalloprotease	3.4.24.-	Металлоэндопептидаз
Neutral protease B	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Papain family cysteine protease		
Periplasmic pH-dependent serine endoprotease DegQ	3.4.21.107	Сериновая эндопептидаза Принадлежит семейству S1B
Periplasmic serine endoprotease DegP	3.4.21.107	Сериновая эндопептидаза Принадлежит семейству S1B
Prohead core protein protease		

Protease 1	3.4.21.50	Сериновая эндопептидаза Lysyl endopeptidase
Protease 2	3.4.21.83	Сериновая эндопептидаза Oligopeptidase B
Protease 3	3.4.24.55	Металлоэндопептидаза Pitrilysin
Protease 4	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Protease HtpX	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Protease LasA	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Protease PrsW		
Protease TldD		
Putative CtpA-like serine protease	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Putative cysteine protease YraA		
Putative metalloprotease YpwA	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Putative peptide zinc metalloprotease protein YydH		
Putative protease YdeA		
Putative protease YhbU		
Putative serine protease HhoA		
Putative serine protease HtrA		
Putative subtilase-type serine protease precursor	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Putative zinc metalloprotease Rip3		
Putative zinc protease AlbF	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза
Retroviral aspartyl protease		
Rhomboid protease AarA	3.4.21.105	Сериновая эндопептидаза Rhomboid protease
Rhomboid protease GlpG	3.4.21.105	Сериновая эндопептидаза Rhomboid protease
Rhomboid protease GluP	3.4.21.105	Сериновая эндопептидаза Rhomboid protease
Serine endoprotease DegS	3.4.21.107	Сериновая эндопептидаза Принадлежит семейству S1B
Serine protease AprX	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Serine protease Do-like HtrA	3.4.21.107	Сериновая эндопептидаза Принадлежит семейству S1B
Serine protease Do-like HtrB	3.4.21.107	Сериновая эндопептидаза Принадлежит семейству S1B
Serine protease HtrA-like protein	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Serine protease SplB	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Sporulation-specific protease YabG		
Tail-specific protease	3.4.21.102	Сериновая эндопептидаза Re
Thermophilic metalloprotease (M29)		
Thermostable alkaline protease	3.4.21.-	Сериновая эндопептидаза
Transglutaminase-activating metalloprotease		
Zinc metalloprotease Rip1	3.4.24.-	Металлоэндопептидаза

В природных местообитаниях гидролитические бактерии занимают нишу первичных деструкторов, благодаря способности гетеротрофно расти на биополимерах различной природы. Особенностью изученных микробных сообществ термальных источников Прибайкалья является его термофилия и алкалитолерантность, что предполагает термо- и рН стабильность соответствующих ферментов.

Проведенный метагеномный анализ позволил выявить гены пептидаз в природном образце микробного мата горячего источника Гарга. Анализ собранных метагеномных последовательностей позволил систематизировать и дать характеристику выявленных генов. Сравнение метагеномных последовательностей репрезентативных данных показало доминирование ферментов класса сериновых пептидаз. Ферменты, относящиеся к этому классу, ингибируются диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфонилфторидом, а также субстратоподобными галоидметилкетонами, такими как тозиллизинхлорметилкетон (TLCK) или тозилфенилаланинхлорметилкетон (TPCK). Из литературных данных известно, что сериновые пептидазы обычно активны при нейтральных и щелочных значениях рН и имеют оптимум рН между 7 и 11 [6]. На основании аминокислотной последовательности, пептидазы делят на семейства и в настоящее время выделено более 20 семейств. В нашем исследовании было выявлено 7 представителей сериновых пептидаз (табл. 4). Принято считать, что эволюционное родство ферментов выражается в гомологии первичной и сходстве пространственной структур. Поэтому этим признакам придается большое значение. Известны случаи, когда сходство структуры каталитического центра не сопровождается гомологией пространственной и первичной структур. Вероятно, такое сходство является следствием конвергентной эволюции.

Метагеномный анализ позволил выявить распространение пептидаз класса металлопептидаз в изученных микробных сообществах. В классе металлопептидазы выделяют 25 семейств, обнаруженных в разных систематических группах. Металлопептидазы, как правило, синтезируются в неактивной форме и активируются в присутствии ионов металлов (магния, марганца, кобальта, цинка). Активность металлопротеиназ подавляется веществами, связывающими металлы — ЭДТА, 1,10-фенантролином, версеном, цитратом, фосфамидом и др. Оптимальные значения рН для металлопротеиназ также лежат в диапазоне 7–9. Также известны металлопротеиназы, обладающие свойствами термостабильности [3].

Обнаружены единичные последовательности генов класса цистеиновых пептидаз в микробном сообществе Гарга. Возможно, это связано с тем, что цистеиновые пептидазы эффективны при нейтральных значениях рН; реже зона оптимума лежит в слабокислой или слабощелочной среде (рН 4–9) в зависимости от природы гидролизуемого белка [3]. У изученного нами микробного сообщества диапазон развития находится в высокотемпературной зоне и щелочной области рН. В состав активного центра цистеиновых пептидаз входит цистеин и гистидин [7]. Цистеиновые пептидазы активируются синильной кислотой и сульфгидрильными соединениями — восстановленным глутатионом, дитиотреитолом, 2-меркаптоэтанолом и цистеином.

Таким образом, на основе анализа препаратов тотальной ДНК микробных сообществ горячих источников Байкальской рифтовой зоны методом высокопроизводительного секвенирования были получены данные о высоком разнообразии природных пептидаз в исследуемом микробном сообществе, которые обеспечи-

вают гидролиз биополимеров на первых этапах деструкции органического вещества.

В метагеномных последовательностях были идентифицированы потенциальные пептидазы, которые могут представлять биотехнологический интерес. Их использование в разных областях промышленности, медицины, биоремедиации обусловлено несколькими факторами: снижением риска контаминации, увеличением скорости процессов и повышением общей стабильности ферментов.

Работа поддержана бюджетной темой ИОЭБ СО РАН АААА-А17-117011810034-9

Литература

1. Замана Л. В., Хахинов В. В., Данилова Э. В., Бархутова Д. Д. Гидрохимия минеральных вод // Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео». 2011. С. 62–101.
2. Obayashi Y., Ueoka N., Suzuki S. Degradation and utilization of protein derived from *Pseudomonas aeruginosa* by marine microbial community // *J. Oceanogr.* 2010. V. 6. P. 513–521.
3. Oliveira A. S., Filho J. X., Sales M. P. Cysteine proteinases cystatins // *Braz Arch Biol Technol.* 2003. V. 46, № 1. P. 91–104.
4. Orsi W. D., Smith J. M., Liu S. and oth. Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean // *ISME J.* 2016. V. 10. P. 2158–2173.
5. Vranova V., Rejsek K., Formanek P. Proteolytic activity in soil: A review // *Applied Soil Ecology.* 2013. V. 70. P. 23–32.
6. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. V. 62, № 3. P. 597–635.
7. Rawlings N. D. and Barrett A. J. Evolutionary families of peptidases // *Biochem. J.* 1993. V. 290. P. 205–218.

SEARCH FOR NATURAL PEPTIDASES IN THE MICROBIAL MAT OF HOT SPRING GARGA AND THEIR VARIETY

Lavrentieva E. V.

Candidate of Biological Sciences
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
670047, Ulan-Ude, Sakhyanova Str., 6
Buryat State University
670000, Ulan-Ude, Smolina Str., 24A
E-mail: lena_1@mail.ru

Radnaev V. S.

GAUZ RK BSMP named after V. V. Angapov
Bacteriological laboratory
670000, Ulan-Ude, Trade Union, Str., 48 a

The aim of the study is to determine the natural peptidases in the microbial mat of the Garga hot spring and their diversity. The article is devoted to a comprehensive study of peptidases, which are a separate group of hydrolytic enzymes involved in the decomposition of organic matter. The scientific novelty of the work lies in the analysis of preparations of microbial communities of hot springs of the Baikal rift zone by high-performance sequencing, which

provide hydrolysis of biopolymers at the first stages of destruction of organic matter. As a result, a metagenomic analysis was performed, which revealed the spread of metal-peptidases in the studied microbial communities. Potential peptidases that may be of biotechnological interest have been identified in metagenomic sequences.

Keywords: peptidases, microbial mat; hydrolytic enzymes; metallopeptidases; metagenomes; sequencing; Baikal rift zone.