

577.15.02

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОФАКТОРОВ В БИОСИНТЕЗЕ ХИРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ДЕГИДРОГЕНАЗ

В.И. Тишков

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

Рассмотрены принципы синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ с использованием системы регенерации восстановленного кофермента формилатдегидрогеназой (ФДГ, КФ 1.2.1.2). Описано получение нового поколения биокатализаторов для регенерации NAD(P) на основе NAD⁺-зависимой ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101. Созданы рекомбинантные штаммы *E. coli* – продуценты различных типов ФДГ, а также разработана дешевая и высокоэффективная методика крупномасштабной очистки фермента. Методами белковой инженерии получены мутанты ФДГ с повышенной стабильностью, улучшенными кинетическими свойствами и с измененной коферментной специфичностью.

Оптически активные (хиральные) соединения являются основными строительными “блоками” живого мира. Как правило, только одна из двух возможных форм хирального соединения используется для определенных целей. Например, природные белки состоят только из L-изомеров аминокислот, в то время как D-аминокислоты входят в состав клеточных стенок и ряда других соединений. “Хиральность” живого мира приводит к тому, что разные оптические изомеры оказывают разный терапевтический эффект. В оптимальном случае второй изомер также может оказывать лечебный эффект. Положительным является и тот случай, когда второй изомер не оказывает никакого воздействия на живую клетку. В обоих случаях рацемическая смесь изомеров без опасений может быть использована в качестве лекарства. В худшей ситуации второй изомер может оказаться высокотоксичным. В качестве примера можно привести широко известный седативный препарат талидомид (*thalidomid*), продававшийся в виде рацемической смеси. Позднее выяснилось, что только S-изомер этого соединения оказывает успокаивающее и усыпляющее действие, в то время как R-изоформа талидомида обладает тератогенным действием, что приводило к неправильному развитию плода при беременности. Этот побочный эффект и послужил причиной изъятия

талидомида из обращения как лекарственного средства. В связи с вышесказанным хиральные лекарства играют все большую роль по сравнению с рацематами и нехиральными соединениями. Количество соединений в виде единственного энантиомера среди 500 наиболее продаваемых во всем мире лекарств в 2000 г. составило 287 (58%), а объем продаж – 107,1 миллиарда долларов (55%) [1] (табл. 1).

Согласно прогнозам [1] в течение ближайших трех лет рынок хиральных лекарств вырастет со 130 до 172 миллиардов долларов. Кроме того, доля хиральных соединений среди новых лекарственных препаратов, выпущенных на рынок в 1998–2000 гг., составила более 65% [1].

Получение хиральных соединений с помощью дегидрогеназ

Обычные методы химического синтеза, как правило, позволяют получать только смесь рацематов. Для получения оптически активных соединений с успехом могут быть использованы природные биокатализаторы – индивидуальные ферменты и полиферментные системы. Можно выделить несколько подходов получения хиральных соединений с помощью биокатализаторов:

- 1) стереохимическое окисление;
- 2) стереохимическое восстановление;

Таблица 1

Доля типов соединений и объемы продаж в 2000 г. среди наиболее продаваемых 100, 300 и 500 лекарственных препаратов (Тор 100, Тор 300 и Тор 500)

Показатель	Тор 100	Тор 300	Тор 500
Количество хиральных лекарств	52 (52%)	173(58%)	287(58%)
Количество лекарств – рацематов	19(19%)	51(17%)	91(18%)
Количество нехиральных лекарств	29(29%)	76(25%)	122(24%)
Объем продаж в 2000 г. хиральных лекарств *	63,0(51%)	96,4(54%)	107,1(55%)
Объем продаж в 2000 г. лекарств–рацематов *	27,5(22%)	35,8(20%)	45,1(26%)
Объем продаж в 2000 г. нехиральных лекарств *	33,6(27%)	45,1(26%)	49,2(25%)

* Миллиарды долларов США

3) стереоселективная конверсия одной формы соединения в другую (изомеризация);

4) стереоселективное разделение с помощью гидролиза.

Первые два процесса могут быть осуществлены с помощью оксидоредуктаз, в частности NAD(P)^+ -зависимых дегидрогеназ или редуктаз. В качестве примера стереохимического окисления можно привести реакцию Байера–Виллигера, катализируемую циклогексанонмонооксигеназой [2]. Для стереохимического восстановления широко используют алкогольдегидрогеназы с разной субстратной специфичностью [3].

Все дегидрогеназы характеризуются исключительно высокой стереоспецифичностью переноса гидрид-иона между субстратом и коферментом. Никотинамидное кольцо NAD(P)^+ может связываться в активном центре

в anti- и syn-конформациях (рис. 1). В зависимости от того, с какой стороны присоединяется гидрид-ион к атому С-4 никотинамидного кольца – proR или proS, все дегидрогеназы делятся на ферменты со стереоспецифичностью переноса гидрид-иона типа А и В соответственно. Жесткая взаимная ориентация молекулы органического субстрата и никотинамидной части кофактора в активном центре дегидрогеназ обеспечивает высокую точность стереоспецифического переноса гидрид-иона. Например, лактатдегидрогеназа из мышц свиньи при восстановлении пирувата [4] и алкогольдегидрогеназа из пекарских дрожжей при восстановлении ацетальдегида [5] совершают всего по одной “стереоспецифической ошибке” – отщепляют гидрид-ион из proS-положения молекулы NADH, на каждые $1 \cdot 10^7$ и $7 \cdot 10^9$ (!) каталитических циклов отщепления гидрид-иона из proR-положения соответственно.

Однако применение дегидрогеназ, когда в качестве восстановленного кофермента используется NADH или NADPH, очень невыгодно с экономической точки зрения в связи с очень высокой стоимостью восстановленных кофакторов. В настоящее время стоимость 1 моля NADH (709 г) и NADPH (833 г) при покупке в количествах более 1 кг составляет 5000 и 39000 долларов США соответственно. Получаемые оптически активные соединения, как правило, имеют молекулярную массу 200–350 Д, следовательно, для синтеза 1 кг целевого продукта необходимо 4–6 кг восстановленного кофактора. Себестоимость такого продукта составляет несколько десятков тысяч долларов. Для снижения себестоимости получения хиральных соединений с помощью дегидрогеназ было предложено ввести в систему второй фермент, обеспечивающий регенерацию NAD(P)^+ *in situ* [6]. Общая схема проведения процесса с системой регенерации кофермента приведена на рис. 2, а. Дегидрогеназа 1 катализирует основную реакцию получения целевого оптически активного соединения, а дегидрогеназа 2 (иногда это может быть та же самая дегидрогеназа 1, что и в основном процессе) катализирует реакцию восстановления NAD(P)^+ до NAD(P)H . Можно сформулировать следующие требования к

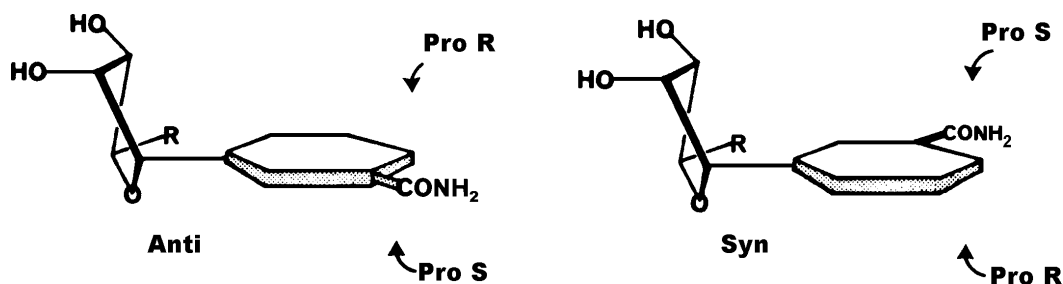


Рис. 1. Возможные конформации никотинамидного кольца NAD(P)^+ в активном центре дегидрогеназ и пути присоединения гидрид-иона в proR- и proS-положения С-4-атома

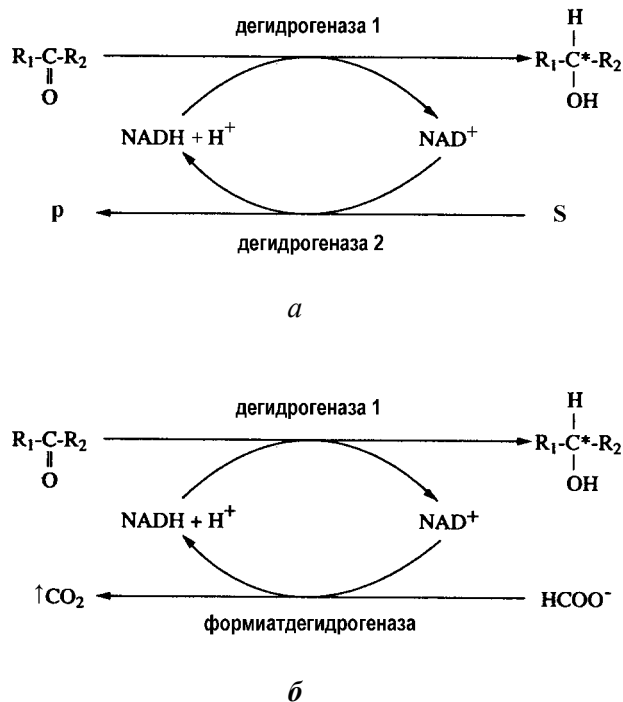


Рис. 2. Общая схема синтеза оптически активных соединений с помощью дегидрогеназ с системой регенерации NADH: а – общий принцип регенерации с помощью дегидрогеназы 2; б – регенерация с помощью формиатдегидрогеназы

ферменту, катализирующему регенерацию восстановленного кофактора.

1. Поскольку дегидрогеназы сильно различаются по величине рН-оптимума катализируемой реакции, то дегидрогеназа 2 должна обладать широким рН-оптимумом активности. Иначе для каждой дегидрогеназы 1 надо подбирать дегидрогеназу 2 с таким же рН-оптимумом активности.

2. Как правило, у большинства дегидрогеназ равновесие реакции сминуто в сторону кетона и NAD(P)H. Поэтому для достижения высоких степеней конверсии в основном процессе (>95–99%) реакция, обеспечивающая регенерацию восстановленного кофермента, должна быть необратимой.

3. Субстрат дегидрогеназы 2 должен быть очень дешевым и не ингибировать дегидрогеназу 1, а продукт реакции регенерации восстановленного кофермента Р (рис. 1, а) не должен мешать очистке целевого соединения.

4. Дегидрогеназа 2 должна быть доступна в больших количествах по низкой себестоимости.

5. Дегидрогеназа 2 должна обладать высокой операционной стабильностью, не инактивироваться в ходе проведения процесса. Фермент должен легко регенерироваться для повторного использования.

Регенерация восстановленных коферментов с помощью формиатдегидрогеназы

За более чем 28-летний период проведения экспериментов по синтезу хиральных соединений с помощью

дегидрогеназ разные ферменты (алкогольдегидрогеназа – изопропанол, глюкозодегидрогеназа – глюкоза и др.) были испытаны для создания системы регенерации восстановленного кофермента. Данные по использованию этих ферментов можно найти в обзорах [7, 8]. Сравнение этих данных показало, что безусловным лидером является NAD^+ -зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) из метилотрофных микроорганизмов (рис. 2, б). Только этот фермент одновременно удовлетворяет всем требованиям, изложенным выше.

1. Активность ФДГ не изменяется в диапазоне рН 5,5–11,0, значения констант Михаэлиса по NAD^+ и формиату постоянны в диапазоне рН 6,0–9,5 [9].

2. Реакция, катализируемая формиатдегидрогеназой, необратима (рис. 1, б); во всех процессах с участием этого фермента были достигнуты степени конверсии 98–100% [7].

3. Формиат натрия или аммония очень дешевы. В настоящее время известен только один фермент – ксилитолредуктаза [10], который ингибируется формиатом, причем константа ингибирования (182 мМ) сравнима с концентрациями формиата, используемыми на практике. Диоксид углерода (продукт реакции, катализируемой ФДГ) также не ингибирует большинство дегидрогеназ, не мешает очистке целевого соединения и может быть легко удален из реакционной среды при пониженном давлении.

4. Источники ФДГ – метанол-утилизирующие бактерии и дрожжи могут быть получены в больших количествах при использовании метанола в качестве единственного источника углерода. Содержание фермента при оптимальных условиях культивирования достигает 15–20% от общего растворимого белка клетки [11, 12]. Была разработана крупномасштабная методика очистки ФДГ из дрожжей *Candida boidinii* (до 10 млн единиц активности за одно выделение) с помощью двукратной экстракции в двухфазных системах на основе системы вода–полиэтиленгликоль–соль [13].

5. Формиатдегидрогеназы из бактерий и дрожжей являются высокостабильными ферментами и могут работать в системе в течение недель и месяцев.

Из рассмотренного выше видно, что ФДГ является почти идеальным ферментом для регенерации восстановленного NADH. К недостаткам этого фермента можно отнести довольно низкую удельную активность (6–7 и 10 ед. на 1 мг белка для гомогенных ФДГ из дрожжей [14, 15] и бактерий [16] соответственно). Кроме того, в природе пока не найдены ФДГ, специфичные к $NADP^+$, что не позволяет использовать этот фермент для регенерации NADPH. Отметим, что отсутствие в природе $NADP^+$ -зависимых формиатдегидрогеназ привело к тому, что до последнего времени так и не были созданы эффективные и дешевые системы регенерации NADPH с помощью других дегидрогеназ. Такая система была

создана только после получения в нашей лаборатории в 1993 г. мутантной ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.101* с коферментной специфичностью, измененной от NAD⁺ к NADP⁺ (см. ниже).

Необходимость получения нового поколения биокатализаторов регенерации коферментов на основе форматдегидрогеназы

Преимущество ФДГ в системе регенерации NADH над другими дегидрогеназами настолько велико, что в настоящее время на практике крупномасштабные (десятки и сотни тонн) процессы синтеза хиральных соединений (например, процесс фирмы *Degussa* получения *tert*-L-лейцина [17]) реализованы только с использованием ФДГ. Наиболее широкое применение нашла ФДГ из метилотрофных бактерий *Candida boidinii*. Для получения этого фермента были оптимизированы условия культивирования исходного штамма дрожжей, обеспечивающие высокий выход биомассы с высоким содержанием ФДГ [12], и разработан метод крупномасштабного выделения и очистки этого фермента [13]. Однако процесс получения ФДГ из дрожжей *C. boidinii* (CbdФДГ) имел ряд недостатков.

1. Скорость роста дрожжей, особенно на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода метанол, была невелика и для получения высокого выхода биомассы в проточном режиме культивирования требовалось большое время удерживания культуры в ферментере. Кроме того, не удалось обеспечить высокий выход биомассы с 1 л среды в сутки одновременно с высоким содержанием ФДГ в клетках. Максимальный выход фермента составлял 2500–3000 ед. активности в сутки с 1 л [13]. Содержание CbdФДГ составляло всего 50 ед. активности на 1 г сухой биомассы.

2. Методика очистки CbdФДГ требует довольно дорогих реактивов – полиэтиленгликолей с разной молекулярной массой (400, 1500 и 20000), а выход активного фермента составлял не более 55–60% [13], что существенно повышало стоимость получения биокатализатора. Стоимость одной единицы CbdФДГ, полученной по данной методике, составляла не менее 5 центов США, а чистота полученного препарата не превышала 35%.

3. Стабильность CbdФДГ также не удовлетворяет полностью практическим требованиям – инактивация не более 1% фермента в сутки при 30°. Гомогенный фермент при комнатной температуре теряет 50% активности уже за несколько часов, а при 4° – за две недели. Увеличение стабильности CbdФДГ, наблюдаемое при добавлении в систему NAD⁺, все равно не обеспечивало приемлемой стабильности биокатализатора. Как показали эксперименты по изучению стабильности этого фермента, инактивация CbdФДГ обусловлена двумя основными причинами – низкой термостабильностью и химической модификацией остатков цистеина [14].

Вышеперечисленные недостатки ФДГ из метилотрофных дрожжей *C. boidinii* не позволили создать действительно дешевую и эффективную систему регенерации NADH. Поэтому необходимо было разработать новый процесс получения биокатализаторов регенерации NAD(P)H нового поколения. Для этого необходимо было решить следующие задачи.

1. Повысить выход фермента при культивировании.
2. Разработать новую методику крупномасштабной очистки фермента.
3. Улучшить кинетические свойства ФДГ и повысить ее стабильность как при инактивации при повышенных температурах, так и под действием химических реагентов.
4. Получение с помощью методов белковой инженерии ФДГ, специфичной к NADP⁺, поскольку в природе форматдегидрогеназы с такой специфичностью отсутствуют.

Отметим, что все четыре задачи должны были решаться в тесной взаимосвязи. Например, для повышения выхода фермента при культивировании (задача 1) наиболее целесообразно идти по пути использования генно-инженерных штаммов *E. coli*, поскольку такие штаммы позволяют получить целевой продукт в количестве до 40–50% от общего растворимого белка клетки, чего невозможно достичь при использовании природных штаммов. Увеличение содержания фермента в исходной биомассе также имеет очень большое значение для снижения стоимости процесса его очистки (задача 2). Однако для достижения высокого содержания фермента в биомассе в виде активного белка необходимо обеспечить его высо-

Таблица 2

Сравнение кинетических свойств и стабильности форматдегидрогеназ из дрожжей *C. boidinii* и бактерий *Pseudomonas sp.101*

Параметр	<i>C. boidinii</i> ФДГ [14, 15]	<i>Pseudomonas sp. 101</i> ФДГ [9, 16]
Удельная активность, Ед./мг белка (30 °С)	6–7	10
K_m по формату, мМ	6–12	7–12
K_m по NAD ⁺ , мкМ	50–60	55
Время полуинактивации при 57°, $\tau_{1/2}$	20 мин	72 ч
Время полуинактивации при +4°, $\tau_{1/2}$	2 недели	> 4 года
Условия хранения	–20°, 50% глицерин	+4°, фосфатный буфер

кую стабильность (задача 3). Получение рекомбинантной мутантной ФДГ с повышенной термостабильностью также может быть использовано и в процессе очистки для удаления примесных белков *E. coli* с помощью термообработки бесклеточного экстракта при температуре выше 55°.

Выбор источника формиатдегидрогеназы

Как уже отмечалось выше, все эксперименты по практическому применению ФДГ для регенерации NADH проводили с ферментом из метанолискользующих дрожжей *C. boidinii*. Для создания биокатализатора регенерации NADP(H) нами была выбрана ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.101* (PseФДГ). Основные свойства этих ферментов приведены в табл. 2. Оба фермента имеют очень близкие значения констант Михаэлиса с формиатом и NAD⁺. Однако бактериальный фермент имеет два очень важных преимущества. Во-первых, его удельная активность в 1,5–1,6 раза выше, чем у дрожжевого фермента. Это означает, что даже при одинаковом уровне экспрессии в клетках *E. coli* для PseФДГ выход по активности будет в 1,5–1,6 раза больше, чем для CbdФДГ. Во-вторых, бактериальный фермент намного превосходит его ортолог из дрожжей по стабильности (табл. 2). Особо отметим, что в дополнение к высокой термостабильности бактериальная ФДГ очень устойчива к действию протеаз, что должно обеспечить ее сохранность от инактивации протеазами при длительном культивировании рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента этого фермента. Еще одним немаловажным преимуществом PseФДГ по сравнению с CbdФДГ является его способность (хотя и с очень низкой эффективностью) катализировать реакцию с NADP⁺, в то время как с дрожжевым ферментом при обычных условиях такой реакции зарегистрировать не удастся. В связи с этим PseФДГ является более удачным кандидатом в качестве исходного объекта для получения мутантной ФДГ с измененной от NAD⁺ к NADP⁺ коферментной специфичностью, что и было подтверждено на практике (см. ниже).

Создание рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента бактериальной формиатдегидрогеназы

Ген PseФДГ был клонирован в 1992 г. Его экспрессия в клетках *E. coli* была осуществлена под контролем *lac*-промотора [18]. Этот промотор является достаточно сильным и с его помощью можно достигнуть уровня экспрессии до 40–50% от общего растворимого белка клетки. Однако в случае PseФДГ уровень экспрессии составил не более 5–7%. Одной из причин такой низкой экспрессии является высокое содержание G/C-пар (65%) в гене фермента, что намного превышает аналогичное значение для клеток *E. coli* (50%). Для повышения уровня экспрессии фермента был использован тандем двух сильных промоторов – *lac*- и *tac*- [16], проведена замена

в гене ФДГ ряда неоптимальных для *E. coli* кодонов на оптимальные, и оптимизирована структура рибосом-связывающего участка перед геном фермента [19]. В результате проведенных исследований был достигнут уровень экспрессии 45–50% от растворимого белка клетки, причем всю рекомбинантную PseФДГ синтезировали в виде активного и растворимого белка [19]. Отличительной особенностью экспрессии гена PseФДГ в клетках *E. coli* является его синтез в виде полноразмерного пептида длиной 400 аминокислот. В исходном штамме бактерий *Pseudomonas sp.101* после экспрессии происходит посттрансляционная модификация фермента, в результате чего с С-конца отщепляется 7 аминокислот, из которых три являются остатками лизина. Было показано, что наличие трех дополнительных положительно заряженных остатков лизина в полноразмерной рекомбинантной PseФДГ приводит к уменьшению K_m по формиату до 6 мМ по сравнению с 15 мМ для фермента, выделенного из исходного штамма *Pseudomonas sp.101* [16].

Были изучены условия культивирования и оптимизирован состав среды для достижения максимального уровня экспрессии PseФДГ. Процесс получения рекомбинантного фермента был масштабирован до объема нескольких сотен литров. В результате выход PseФДГ при крупномасштабном культивировании составил минимум 10000 ед. активности с 1 л среды в сутки [19], что в 4 раза выше, чем для дрожжевой ФДГ [14]. В настоящее время получены новые экспериментальные данные, свидетельствующие, что выход фермента достаточно легко может быть увеличен до 40000–45000 ед. активности с 1 л среды в сутки.

Очистка рекомбинантной PseФДГ, экспрессированной в *E. coli*

Для крупномасштабной очистки ФДГ из дрожжей *C. boidinii* используется методика очистки в двухфазных системах на основе системы вода–полиэтиленгликоль(–ПЭГ)–соли [14]. Подобная методика была разработана нами и для очистки рекомбинантной PseФДГ, экспрессированной в клетках *E. coli* [19]. Принцип очистки белков в таких системах представлен на рис. 3. Нижняя фаза представляет собой водный раствор с высокой концентрацией соли и низкой концентраций ПЭГ. Верхняя фаза, наоборот, содержит большое количество ПЭГ и малые количества воды и соли. На первой стадии создается двухфазная система, в которой клеточный дебрис и ДНК находятся в нижней, богатой водой фазе, а фермент экстрагируется в верхнюю фазу, богатую ПЭГ. Систему оставляют до полного разделения фаз, отбирают верхнюю фазу и на ее основе создают вторую двухфазную систему за счет добавления новых порций ПЭГ (как правило, с более высокой молекулярной массой), соли и воды. Состав этой системы подбирается так, чтобы фермент перешел в нижнюю фазу. Таким образом, после второй экстракции удаляется

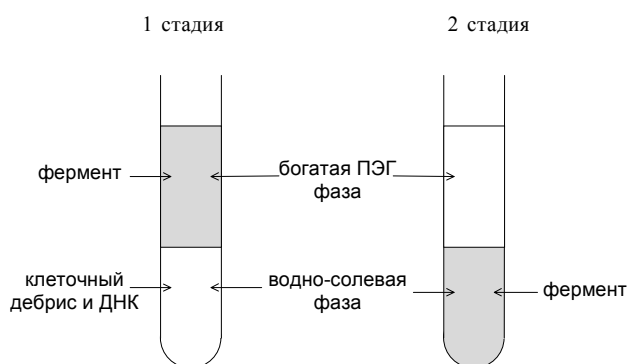


Рис. 3. Очистка белков с помощью двух экстракций в двухфазных системах вода–полиэтиленгликоль–соль

нерастворимый осадок разрушенных клеток и получается водный раствор фермента, свободный от ДНК и некоторых других небелковых примесей. Отметим, что очистка ферментов в таких системах, если не используются в качестве специальных добавок аффинные реагенты, не приводит к увеличению чистоты препарата по белку. Эта система предназначена в основном для удаления клеточного дебриса и других (кроме белков) компонентов клетки. Поэтому для окончательной очистки ФДГ из *C. boidinii* после двухфазной системы проводят диализ и дополнительную стадию хроматографической очистки на ДЭАЕ-носителе. Выход CbdФДГ по активности составлял не более 50–55%. Чистота препаратов фермента не превышала 30–35%. В случае PseФДГ в качестве дополнительной стадии использовали хроматографию на гидрофобном носителе, что позволило исключить стадию диализа. Выход фермента (чистота 85–95%) по активности составлял 70–80%.

Как уже отмечалось выше, стоимость использованных для очистки фермента полиэтиленгликолей разной молекулярной массы составляет основную часть затрат

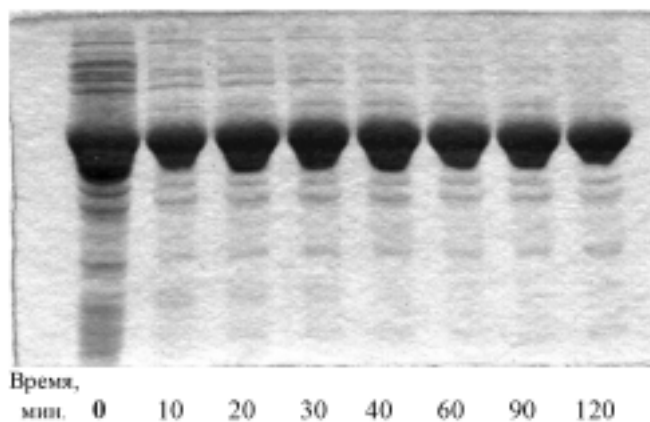


Рис. 4. Электрофорез в 14%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия образцов исходного бесклеточного экстракта клеток *E. coli* и после его термообработки при 63° в течение разных периодов времени. Основная полоса – рекомбинантная ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.101*

при очистке CboФДГ. Кроме того, на каждой стадии очистки происходят потери белка (до 5%), обусловленные невозможностью 100%-го переноса растворов из одной емкости в другую. Очевидно, что чем меньше стадий очистки, тем меньше такие потери. Поэтому для удешевления и упрощения методики выделения, а также для повышения выхода целевого продукта было решено отказаться от стадий экстракции в двухфазных системах. Поскольку нами были получены мутанты PseФДГ с повышенной термостабильностью (см. ниже), то вместо двух стадий экстракции в двухфазных системах была введена стадия термообработки суспензии разрушенных клеток при 62–63°. На рис. 4 представлены результаты электрофореза исходного бесклеточного экстракта до термообработки (левая дорожка) и после выдерживания при 63° в течение определенного времени. Как следует из этого рисунка, уже после 20–30 мин термообработки содержание фермента увеличивается с 45 до 85–90%. Кроме того, термообработка приводит к образованию хорошо сформированного осадка, который может быть удален с помощью простой фильтрации. Далее к полученному раствору добавляли сульфат аммония до концентрации около 1,6 М и фермент очищали ступенчатой хроматографией на гидрофобном носителе на основе фенильных групп [20]. Полученный препарат PseФДГ можно хранить при 4° более 12 мес без потери ферментативной активности.

Повышение стабильности и улучшение кинетических свойств бактериальной формиаатдегидрогеназы

Инактивация PseФДГ происходит по двум механизмам. При температуре выше 40–45° основной причиной инактивации фермента является термоденатурация [9]. При температуре ниже 45° потеря ферментативной активности происходит вследствие химической модификации или окисления остатков цистеина [21, 22]. Поэтому эксперименты по повышению стабильности PseФДГ проводились в двух направлениях: 1) замена существенных для активности остатков цистеина на остатки аланина или серина; 2) направленный мутагенез остатков фермента для повышения его термостабильности.

Повышение химической стабильности ФДГ. Все ФДГ из разных источников (бактерии, дрожжи, растения и т.д.) содержат существенные для проявления каталитической активности остатки цистеина. В PseФДГ имеется 7 остатков цистеина на субъединицу. Из них только два, Cys255 и Cys354, расположены на поверхности белковой глобулы. Остаток Cys255 находится в кофермент-связывающем домене. Этот остаток был заменен на остатки Ser и Met [23]. Эти замены привели к увеличению химической стабильности фермента более чем 200 раз, однако значение K_m по коферменту возросло в 3 и 7 раз соответственно. Полученный недавно мутант PseФДГ C255A имел те же кинетические

параметры, что и фермент дикого типа [24]. Анализ стабильности мутантов PseФДГ показал, что в молекуле фермента имеется еще один остаток Cys [23]. Нами были получены мутанты PseФДГ C354R, C354S и C354A [23]. Анализ свойств этих мутантов показал, что наиболее приемлемой является мутация C354S. Эта замена была объединена с мутацией C255A. Предварительные данные свидетельствуют, что такой двойной мутант PseФДГ C2 обладает химической стабильностью, как минимум в 1000 раз большей, чем у фермента дикого типа.

Замены остатков цистеина, C23S и Cys262A в молекуле CbdФДГ также привели к повышению химической стабильности [14]. Однако эти мутации одновременно очень сильно снизили термостабильность фермента: константа скорости термоинактивации двойного мутанта CbdФДГ C23S/Cys262A при 50° была в 76 раз больше соответствующей константы для дрожжевой ФДГ дикого типа. В случае PseФДГ введение двойной мутации C255A/C354S снижало термостабильность мутантного фермента всего в 8 раз. Однако это снижение термостабильности было компенсировано дополнительными мутациями, повышающими стабильность PseФДГ при повышенных температурах (см. ниже).

Повышение термостабильности PseФДГ. ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.101* является наиболее стабильным ферментом среди всех известных в настоящее время формиадегидрогеназ. Поэтому к данному ферменту нельзя было применить подходы по повышению термостабильности, основанные на сравнении аминокислотных последовательностей белков из мезофилов и термофилов. Для повышения термостабильности PseФДГ были использованы следующие подходы:

1) гидрофобизация α -спиралей (замена остатков Ser на Ala);

2) удаление молекул воды из внутренних полостей белковой глобулы;

3) оптимизация электростатических взаимодействий;

4) оптимизация конформации полипептидной цепи.

Было получено более 60 различных мутантов [25, 26]. Семь мутаций, обеспечивающих положительный эффект по повышению стабильности и не влияющих на кинетические свойства, были объединены в один многоточечный мутант PseФДГ T7. Этот мутант был в 20 раз более стабилен, чем фермент дикого типа. Кроме того, некоторые мутации повышали сродство PseФДГ к коферменту. Окончательный мутант, объединяющий 7 “термостабильных” и 2 “химических” мутаций, PseФДГ T7C2 значительно превосходил фермент дикого типа как по устойчивости против термоденатурации, так и по химической стабильности. Кроме того, увеличение термостабильности мутантной PseФДГ было использовано для дополнительной очистки фермента из клеток *E. coli* с помощью термообработки при 62–63°.

Инженерия коферментной специфичности формиадегидрогеназы

ФДГ является NAD^+ -зависимым ферментом, однако ее специфичность к NAD^+ по отношению к NADP^+ сильно зависит от источника. Наиболее специфичным к NAD^+ является ФДГ из пекарских дрожжей (SceФДГ). Величина коферментной специфичности SceФДГ, выраженная как отношение $(k_{\text{кат}}/K_m)^{\text{NAD}^+}/(k_{\text{кат}}/K_m)^{\text{NADP}^+}$, составляет $>3 \cdot 10^9$ [27]. Аналогичные значения для ФДГ из дрожжей *Candida methylca* и бактерий *Pseudomonas sp.101* составляют 250 000 [28] и 2 400 соответственно [27]. Таким образом, PseФДГ среди остальных ФДГ является наименее специфичным к NAD^+ ферментом.

В нашей лаборатории были проведены эксперименты по изменению коферментной специфичности PseФДГ и SceФДГ. В обоих случаях были получены ферменты более специфичные к NADP^+ , чем к NAD^+ [27]. Для SceФДГ и PseФДГ увеличение коферментной специфичности составило $9 \cdot 10^9$ и 10^4 раз соответственно [27]. Эксперименты по изменению коферментной специфичности SceФДГ, проведенные в Бристольском университете (Англия), не позволили получить мутантный фермент, специфичный к NADP^+ [28].

Полученная мутантная NADP^+ -зависимая PseФДГ имела кинетические параметры очень близкие к таковым для фермента дикого типа с NAD^+ [27]. Это один из немногих описанных к настоящему времени в литературе примеров по успешному изменению коферментной специфичности дегидрогеназ. Аналогичные результаты были достигнуты еще с дигидролипоамиддегидрогеназой из *E. coli* [29], алкогольдегидрогеназой из дрожжи [30] и 3-изопропилмалатдегидрогеназой из *Thermus thermophilus* [31].

Первые варианты NADP^+ -специфичной PseФДГ проявляли высокое сродство к коферменту только при pH 6,0–7,3. Дальнейшие эксперименты позволили получить мутанты NADP^+ -зависимой PseФДГ второго поколения с pH-оптимумом связывания NADP^+ 6,0–9,0, а у ферментов третьего поколения K_m по NADP^+ была постоянной уже при pH 6,0–10,0, что полностью перекрывает весь диапазон pH-оптимумов NADP^+ -специфичных дегидрогеназ, используемых на практике для органического синтеза. Мутантные NADP^+ -зависимые PseФДГ разных поколений были успешно использованы для получения оптически активных спиртов с помощью алкогольдегидрогеназ [32] и в реакциях Байера–Виллигера для синтеза хиральных лактонов с помощью циклогексанонмонооксигеназ [2, 33, 34].

Таким образом, на примере ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.101* была успешно решена комплексная задача по созданию биокатализаторов нового поколения для регенерации NADH и NADPH в процессах синтеза оптически активных соединений с помощью

дегидрогеназ. Использование генно-инженерных штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных PseФДГ и разработка простой и высокоэффективной очистки фермента позволили снизить себестоимость получения 1 ед. активности до 0,2–0,3 центов США. С помощью

методов белковой инженерии сконструированы биокатализаторы с повышенной химической и температурной стабильностью, а также впервые в мировой практике получены не имеющие природных аналогов различные формы NADP⁺-зависимой ФДГ.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 99-04-49156 и 02-04-49415, контракта Министерства науки, промышленности и технологий “Биокаталитические технологии” и Фонда им.Александра фон Гумбольдта (стипендия ВИТ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erb S.E. //Genetic and Engineering News. 2002. **22**. P. 47
2. Schwarz-Linek U., Krüdel A., Ludwig F.-A. et al. // Synthesis. 2001. **33**. P. 947.
3. Hummel W. // Trends in Biotechnol. 1999. **17**. P. 487.
4. LaReau R.D., Anderson V.E. // J. Biol. Chem. 1989. **264**. P. 15338.
5. Weinhold E.G., Glasfeld A., Ellington A.D., Benner S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1991. **88**. P. 8420.
6. Wichmann R., Wandrey C., Buckmann A.F., Kula M.R. // Biotechnol.Bioeng. 1981. **23**. P. 2789.
7. Hummel W., Kula M.R. // Eur. J. Biochem. 1989. **184**. P. 1.
8. Leonida M.D. // Curr. Med. Chemistry 2001. **8**. P. 345.
9. Popov V.O., Lamzin V.S. // Biochem. J. 1994. **301**. P. 625.
10. Neuhauser W., Steining M., Haltrich D., Kulbe K.D., Nidetzky B. // Biotechnol.Bioeng. 1998. **60**. P. 277.
11. Березин И.В., Тишков В.И., Карзанов В.В., Авилова Т.В., Егоров А.М., Петкявичене Р.Й., Вайткявичюс Р.-К., Глемжа А.А. // AC СССР №1479513. БИ 1989. №18.
12. Weuster-Botz D., Wandrey C. // Process Biochem. 1995. **30**. P. 563.
13. Weuster-Botz D., Paschold H., Gieren H. et al. // Chem. Eng. Technol. 1994. **17**. P. 131
14. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // Eur. J. Biochem. 2000. **267**. P. 1280.
15. Labrou N.E., Rigden D.J., Clonis Y.D. // Eur. J. Biochem. 2000. **267**. P. 6657.
16. Тишков В.И., Галкин А.Г., Гладышев В.Н. и др. // Биотехнология. 1992. **5**. С. 52.
17. Bommarius A. S., Schwarm M., Stingl K. et al. // Tetrahedron: Asymmetry 1995. **6**. P. 2851.
18. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N. et al. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1993. **18**. P. 201.
19. Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V. et al. // Biotechnol. Bioeng. 1999. **64**. P. 187.
20. Тишков В.И., Галкин А.Г., Егоров А.М., Кадушевичюс В.А., Петкявичене Р.Й., Вайткявичюс Р.-К., Глемжа А.А. // AC СССР №1551741. БИ 1990. №11.
21. Попов В.О., Егоров А.М. // Биохимия. 1979. **44**. С. 207.
22. Диков М.М., Осипов А.П., Егоров А.М. // Биохимия. 1980. **45**. С. 1554.
23. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N. et al. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1993. **192**. P. 976.
24. Одищева Е.Р., Попова А.С., Рожкова А.М., Тишков В.И. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. С. 355
25. Rojkova A.M., Galkin A.G., Kulakova L.B. et al. // FEBS Letters. 1999. **445**. P. 183.
26. Федорчук В.В., Галкин А.Г., Ясный И.Е. и др. // Биохимия. 2002. **67**. С. 1385.
27. Serov A.E., Popova A.S., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. // Biochem. J 2002. **367**. P. ?
28. Gul-Karaguler N., Sessions R. B., Clarke A. R., Holbrook J. // Biotechnol. Lett. 2001. **23**. P. 283.
29. Bocanegra J. A., Scrutton N. S., Perham, R. N. // Biochemistry. 1993. **32**. P. 2737.
30. Chen Z., Lee, W. R., Chang, S. H. // Eur. J. Biochem. 1991. **202**. P. 263.
31. Chen, R., Greer, A., Dean, A. M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. **93**. P. 12171.
32. Seelbach K., Riebel B., Hummel W. et al. // Tetrahedr. Lett. 1996. **37**. P. 1377.
33. Schwarz-Linek U., Krüdel A., Ludwig F.-A., et al. // Synthesis 2001. **33**. P. 947.
34. Zambianchi F., Pasta P., Carrea G. et al. // Biotechnol.Bioeng. 2002. **78**. P. 489.

Поступила в редакцию 25.10.02