

УДК 577.151.42

БИОСИНТЕЗ МЕТИОНИНА В МИКРООРГАНИЗМАХ: О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИН-СУЛЬФИДРИЛАЗА – ОСНОВНОЙ ФЕРМЕНТ ПУТИ ПРЯМОГО СУЛЬФИДРИЛИРОВАНИЯ (ОБЗОР)

© 2024 г. В. В. Куликова^{1, *}, Е. А. Морозова¹, А. Д. Лыфенко¹, В. С. Коваль¹,
Н. В. Ануфриева¹, П. Н. Сольев¹, С. В. Ревтович¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vitviku@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

Биосинтез метионина в большинстве микроорганизмов осуществляется двумя альтернативными путями. Каждый путь катализируется независимыми ферментами и регулируется по механизму обратной связи метионином. Путь транссульфурирования включает образование промежуточного продукта цистатионина, а в качестве источника серы выступает цистеин. Ферменты этого метаболического пути подробно охарактеризованы. Путь прямого сульфидрирования подразумевает синтез гомоцистеина с участием неорганического источника серы напрямую из *O*-ацетилгомосерина и является преобладающим в большинстве классов бактерий. Предметом настоящего обзора являются свойства и функционирование одного из наименее изученных ферментов пути прямого сульфидрирования – *O*-ацетилгомосерин-сульфидриказы. Глубокое понимание механизмов, контролирующих субстратную и реакционную специфичность *O*-ацетилгомосерин-сульфидриказы, является необходимым шагом рационального редизайна фермента с целью создания перспективного катализатора для синтеза метионина и его производных, а также, в комплексе с кристаллографическими данными, для разработки новых антимикробных соединений на основе эффективных ингибиторов фермента.

Ключевые слова: *O*-ацетилгомосерин-сульфидриказа, биосинтез метионина, прямое сульфидрирование

DOI: 10.31857/S0555109924030017 EDN: EXEKTZ

Метионин является незаменимой протеиногенной аминокислотой, уникальные функции которой заключаются в биосинтезе серосодержащих соединений, инициации трансляции [1]. Большинство микроорганизмов могут синтезировать метионин, в то время как животные, включая людей, зависят от внешних источников метионина [2]. Как основная серосодержащая аминокислота, метионин является предшественником всех других серосодержащих аминокислот и их производных, таких как гомоцистеин и глутатион [3]. Метионин является ключевым компонентом одноуглеродного метаболизма, а в форме своего производного *S*-аденозилметионина является метильным донором в эпигенетической регуляции и процессах детоксикации [4].

В современном обществе метионин стал массовым товаром в мировой экономике – ежегодно производится более 1 млн тонн метионина из нефти для обогащения кормов для скота, что является третьим показателем в мире после глутаминовой кислоты и лизина. Синтетическое производство способствует производству дешевого животного

белка и оказывает прямое влияние на здоровье человека и экосистемы [5]. Однако 95% такого синтетически получаемого метионина образуется в виде *D*, *L*-смеси изомеров. Для решения проблемы рацемического синтеза перспективно изучение ферментов, участвующих в метаболизме метионина, для разработки биотехнологических методов синтеза метионина путём рационального редизайна ферментов и потенциального получения суперпродукента [6].

Метаболический путь биосинтеза метионина в бактериях наиболее подробно охарактеризован у *Escherichia coli* [7, 8]. В клетках *E. coli* предшественник метионина гомоцистеин синтезируется по пути транссульфурирования из *O*-сулцинил-*L*-гомосерина в две стадии (рис. 1), катализируемые цистатионин γ -синтазой (CGS, КФ 2.5.1.48) и цистатионин β -лиазой (CBL, в настоящее время включена в КФ 4.4.1.13, цистеин-*S*-конъюгат β -лиаза). В большинстве классов бактерий, в отличие от *E. coli*, преобладающим является путь прямого сульфидрирования



Рис. 1. Биосинтез метионина в микроорганизмах.

(рис. 1), либо используются оба пути [9], что обеспечивает метаболическую гибкость и адаптивность микроорганизмов. Функциональность обоих путей подробно исследована у таких бактерий как *Pseudomonas aeruginosa* [10], *P. putida* [11], *Corynebacterium glutamicum* [12–14], *Leptospira meyeri* [15, 16], *Thermus thermophilus* [17, 18], *Streptococcus anginosus* [19]. Анализ геномов выявил, что транссульфурирование, как единственный путь биосинтеза метионина, присутствует в основном в протеобактериях [9].

O-ацетилгомосерин-аминокарбоксипропилтрансфераза катализирует прямое сульфидрирование *O*-ацетил-*L*-гомосерина (ОАН). Предшествующее название – *O*-ацетилгомосерин(тиол)-лиаза – было основано на ее первоначальной классификации (КФ 4.2.99.10). Позднее Комиссия по ферментам определила его в класс

трансфераз (КФ 2.5.1.49) [20]. В настоящее время общепринятыми названиями являются *O*-ацетилгомосерин-аминокарбоксипропилтрансфераза и *O*-ацетилгомосерин-сульфидрилаза [21]. Микроорганизмы используют *O*-ацетилгомосерин-сульфидрилазу (ОАНС) для катализа образования предшественника *L*-метионина – *L*-гомоцистеина из *O*-ацетил-*L*-гомосерина и бисульфида или для прямого синтеза *L*-метионина с использованием метантиола (рис. 2). В некоторых микроорганизмах, например у *Bacillus subtilis* и *E. coli*, CGS может действовать как сульфидрилаза с использованием в качестве субстрата как *O*-ацетил-*L*-гомосерина, так и *O*-сукцинил-*L*-гомосерина [22, 23]. Данные о разнообразии бактериальных путей биосинтеза метионина важны для понимания жизнедеятельности и эволюции бактерий, а также могут быть использованы в микробной биотехнологии. За последние годы возросла активность

Таблица 1. Кинетические параметры реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой ОАHS из различных источников

Микроорганизм	Удельная активность*, мкмоль/мин мг	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	Ссылка
<i>T. thermophilus</i> HB8 oah1	49.8 (pH 7.8, 70°C)	н.о.	6.8	н.о.	[18]
<i>T. thermophilus</i> HB8 oah2	67.7 (pH 7.8, 70°C)	н.о.	2.0	н.о.	[35]
<i>B. stearothermophilus</i> CN3	17.2 (pH 7.5, 45°C)	н.о.	1.9	н.о.	[26]
<i>S. cerevisiae</i>	10.5 (pH 7.8, 30°C)	н.о.	4.5×10^{-3}	н.о.	[36]
<i>N. crassa</i>	4.2 (pH 8.0, 30°C)	н.о.	7.0×10^{-3}	н.о.	[40]
<i>Aspergillus nidulans</i>	4.4 (pH 8.0, 30°C)	н.о.	н.о.	н.о.	[31]
<i>L. meyeri</i>	15.0 (pH 7.5, 30°C)	н.о.	н.о.	н.о.	[15]
<i>C. glutamicum</i>	6.0 (pH 7.5, 30°C)	28.0	6.4	4.4×10^3	[41]
<i>T. maritima</i>	1521.0 (pH 7.0, 70°C)	900.0	8.0	1.0×10^5	[28]
<i>C. difficile</i>	50.0 (pH 7.5, 25°C)	94.1	0.6	1.6×10^5	[27]
<i>C. novyi</i>	0.9 (pH 7.5, 25°C)	1.3	0.1	1.3×10^4	[37]

* Условия, при которых определяли активность, указаны в скобках; н.о. – не определяли.

исследований в области ферментативного получения аминокислот [6]. На сегодняшний день является актуальным получение L-метионина в промышленных масштабах методом ферментативного синтеза с применением ферментов, участвующих в метаболизме серы [24].

В настоящем обзоре собраны данные о каталитических свойствах ОАHS из различных микробных источников, обсуждается механизм ферментативной реакции и роль отдельных аминокислотных остатков активного центра с учетом анализа имеющихся в международных базах кристаллографических структур фермента и данных мутагенеза.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

ОАHS является пиридоксаль-5'-фосфат (ПДФ)-зависимым ферментом, который катализирует реакцию γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина с использованием сульфидиона с образованием L-гомоцистеина и ацетата (рис. 2). Один из ферментов альтернативного пути транссульфурирования, CGS, катализирует сходную реакцию γ -замещения,

используя в качестве субстрата *O*-сукцинил-L-гомосерин или, в условиях отсутствия *O*-сукцинил-L-гомосерина, *O*-ацетил-L-гомосерин, и L-цистеин в качестве источника серы [25]. ОАHS из большинства микробных источников являются строго специфичными к *O*-ацетил-L-гомосерину и не катализируют реакцию γ -замещения *O*-сукцинил-

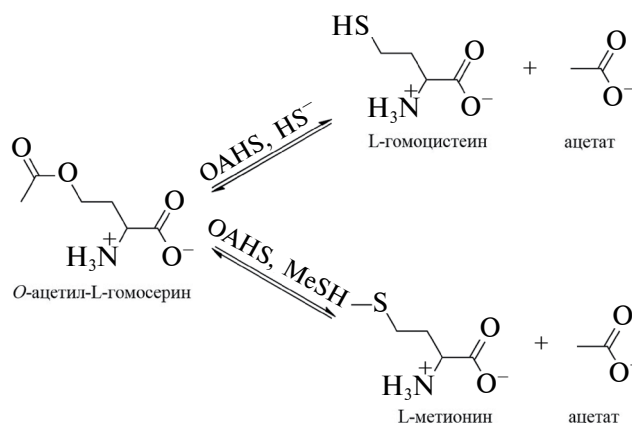


Рис. 2. Схема реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS.

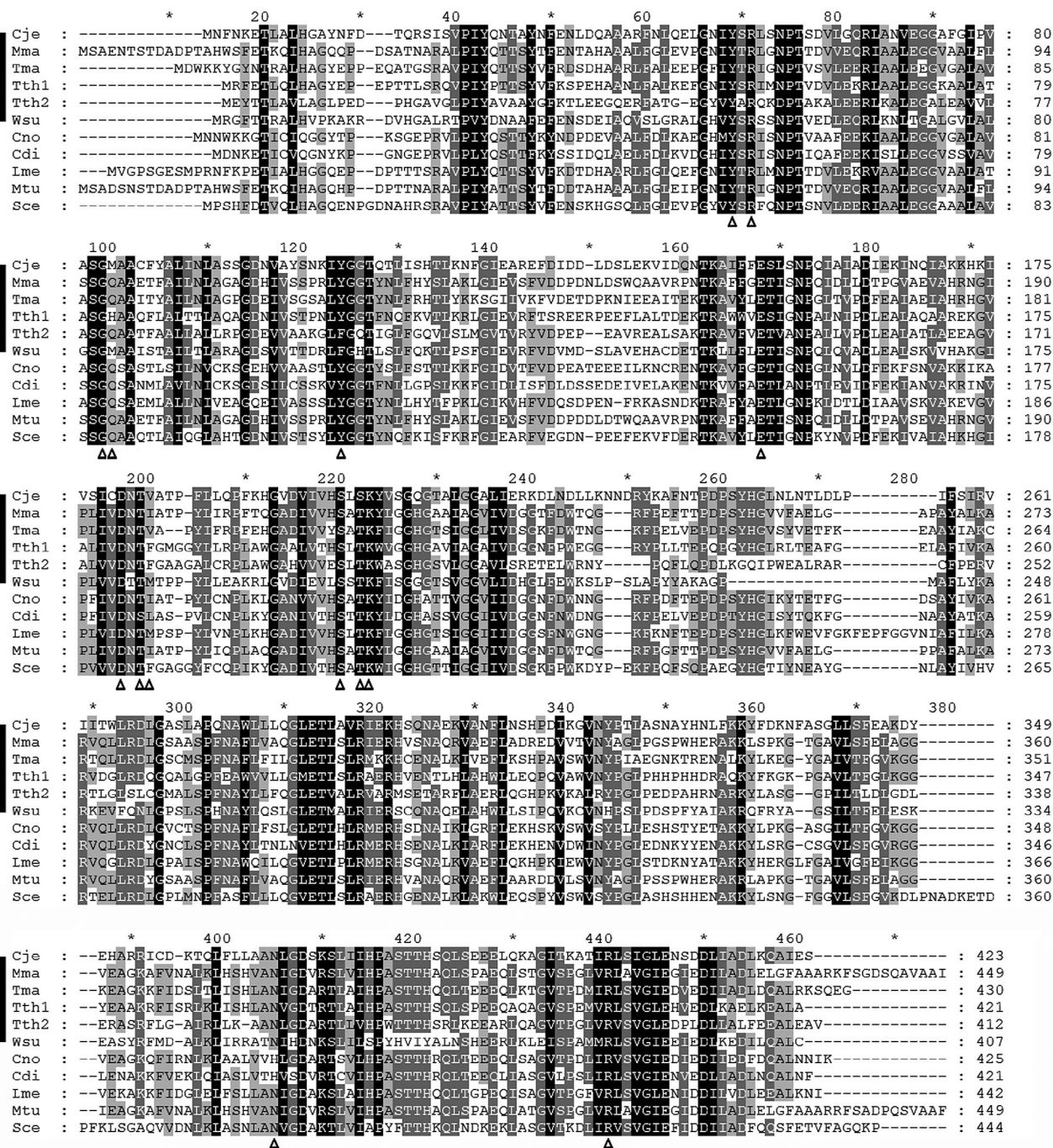


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей OAHs из *Campylobacter jejuni* (Cje; 40C9), *Mycobacterium marinum* (Mma; B2HDS7), *T. maritima* (Tma; Q9WZY4), *T. thermophilus* (Tth1; Q5SK88 и Tth2; Q5SJ58), *W. succinogenes* (Wsu; Q7M9C8), *Clostridium novyi* (Cno; A0A5B8NE14), *Clostridium difficile* (Cdi; A0A1L7H895), *L. meyeri* (Lme; P94890), *M. tuberculosis* (Mtu; L7N4M1), *Saccharomyces cerevisiae* (Sce; P06106). Консервативные остатки отмечены черным. Последовательности ферментов с известными 3D структурами отмечены вертикальной линией; треугольниками отмечены функциональные остатки активного центра.

L-гомосерина [26, 27], либо катализируют со скоростями, на несколько порядков ниже, чем скорость основной реакции [10, 18, 28]. Также фермент не может использоваться в качестве источника серы L-цистеин [29]. Источник серы, используемый OAHs в процессе биосинтеза

метионина, может отличаться у разных организмов. Например, у OAHs из *Wolinella succinogenes* источником серы является тиокарбосилат белка, так что атом серы метионина включается OHSS с использованием белка-переносчика серы, а не сульфиды, как это имеет место у других OAHs [30].

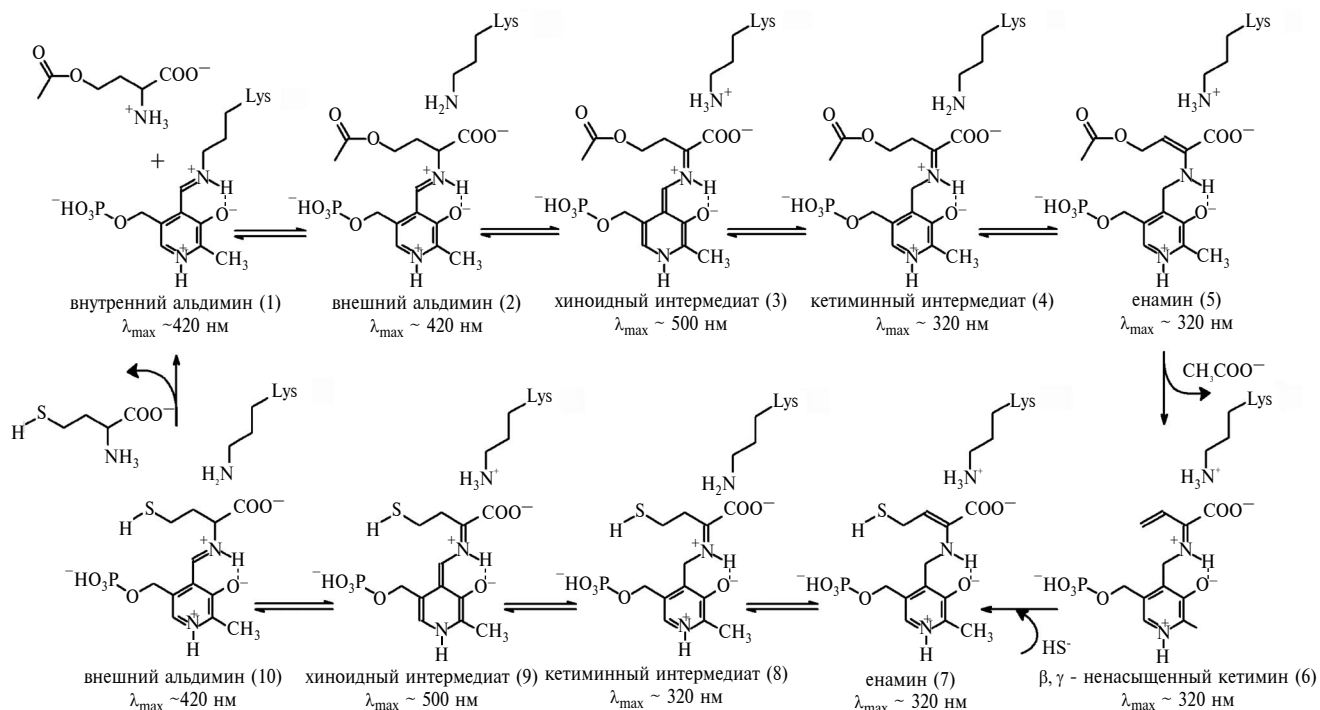


Рис. 4. Предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS.

В качестве источника серы фермент может использовать так же меркаптоэтанол, метилмеркаптан, этилмеркаптан [26, 31, 32]. Кроме того, в реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой ОАHS, в качестве присоединяемого нуклеофила может выступать азид, как в ОАHS из *C. glutamicum* [33] или диселенид, как в ферменте из дрожжей [34]. В литературе имеются ограниченное количество данных о каталитических параметрах реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой ОАHS из различных источников (табл. 1). Сродство к субстрату у разных ферментов варьируется в широком диапазоне в зависимости от микроорганизма (0.004–8.0 мМ). Кинетические параметры реакции ($k_{кат}$ и $k_{кат}/K_M$) были определены только для четырех очищенных ферментов, наибольшую скорость реакции проявлял фермент из термофильной бактерии *Thermotoga maritima* (табл. 1), при этом эффективность катализа была в 1.6 раз выше у ОАHS из *Clostridium difficile* за счет меньшей величины K_M . Ферменты из другой термофильной бактерии *T. thermophilus* также обладали высокой активностью (табл. 1). Сульфгидрильная активность с *O*-ацетил-L-гомосерином и *O*-сукцинил-L-гомосерином была обнаружена в клеточных экстрактах *P. putida* и *P. aeruginosa* [10, 11]. Поскольку в данных бактериях присутствуют ферменты обоих путей биосинтеза метионина, активность с *O*-сукцинил-L-гомосерином может быть связана с наличием CGS, которая, как было отмечено выше, способна катализировать данную реакцию.

Температурный оптимум ОАHS из термофильных бактерий *T. thermophilus* и *T. maritima* составил 70°C, *B. stearothermophilus* – 60°C [18, 26, 28, 35]. рН оптимум ферментов из различных источников находился в диапазоне 7.0–8.0 [18, 25, 28, 36–39].

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ

ПЛФ-зависимые ферменты используют один и тот же кофактор для катализа различных реакций, поэтому промежуточные стадии катализа имеют много общего [42], при этом белковая матрица обеспечивает реакционную и субстратную специфичность этих ферментов. Механизмы, посредством которых ПЛФ-зависимые ферменты контролируют переходные состояния кофактора в процессе катализа, исследуются при помощи рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза. Для ряда ПЛФ-зависимых ферментов, участвующих в биосинтезе L-метионина, были получены мутантные формы [23, 38, 43–45], исследование которых позволило сделать предположения о роли отдельных аминокислотных остатков в катализе. Анализ кинетических и спектральных свойств, а также имеющихся кристаллических структур ферментов и комплексов фермент-ингибитор позволяет сделать предположение о механизме реакций, катализируемых этими ферментами [42, 39, 46–50].

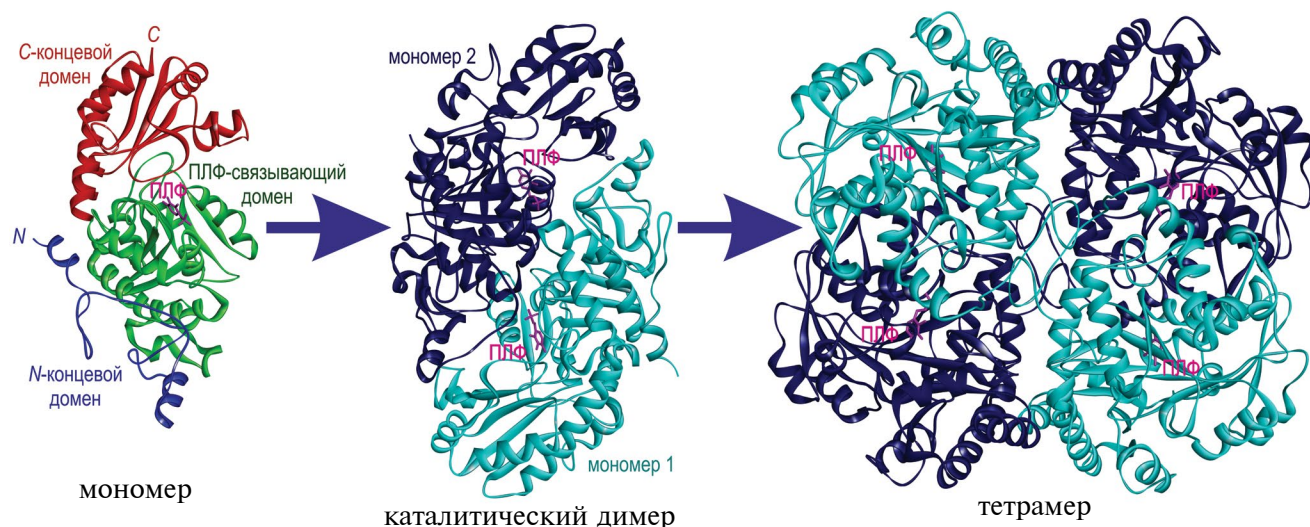


Рис. 5. Тетрамерная организация ОАHS на примере структуры фермента из *T. thermophilus* (pdb код 2ctz).

Предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS, включает несколько стадий (рис. 4). В активном центре фермента ПЛФ, связанный с остатком лизина, образует внутренний альдимин (1). При связывании *O*-ацетил-*L*-гомосерина происходит образование внешнего альдимина (2). Последующий отрыв $\text{C}\alpha$ -протона субстрата приводит к образованию хиноидного интермедиата (3), следствием протонирования $\text{C4}'$ -атома кофактора является образование кетимина (4). Дальнейший отрыв $\text{C}\beta$ -протона приводит к отщеплению ацетильной группы субстрата и образованию ключевого интермедиата ферментативной реакции – β, γ -ненасыщенного кетимина (6). Присоединение сульфид-иона к β, γ -ненасыщенному кетимину и последующий перенос протонов приводят к образованию второго хиноидного интермедиата (9), дальнейшее протонирование $\text{C}\alpha$ -положения которого приводит к образованию внешнего альдимина (10) и высвобождению продукта реакции – гомоцистеина. Для протекания реакции необходимо участие каталитического основания фермента на стадии отрыва $\text{C}\alpha$ - и $\text{C}\beta$ -протонов субстрата и кислотный катализ на стадии элиминирования γ -заместителя. Для ряда ПЛФ-зависимых ферментов было сделано предположение, что каталитическим основанием является аминокислотный остаток лизина [42]. Исследование мутантных форм ОАHS из *S. difficile* с заменами остатков Y52 и Y107 на аланин и фенилаланин позволило сделать предположение, что Y107 может выполнять функцию общего кислотного катализатора на стадии элиминирования ацетата [45].

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

ОАHS принадлежит к первому структурному классу ПЛФ-зависимых ферментов, подклассу СВЛ [42]. В настоящее время определены семь пространственных структур ОАHS из пяти источников: *T. thermophilus* (pdb 2CTZ, 2CB1) [18], *W. succinogenes* (pdb 3RI6) [51], *M. marinum* (pdb 4KAM) [52], *T. maritima* (pdb 7KB0, 7KB1) [28] и *C. jejuni* (pdb 4OC9). Функциональной единицей фермента является димер (рис. 5), однако, как и многие ПЛФ-зависимые ферменты, ОАHS существует в растворе в виде тетрамера или гексамера, что подтверждается как биохимическими, так и структурными данными [18, 27, 31, 36, 37, 51, 52]. Отдельный мономер представляет собой α/β белок, состоящий из 421–453 аминокислот, уложенных в 11–14 α -спиралей, несколько 3_{10} -спиралей и 11, 12 или 14 β -слоев (рис. 5). Мономер состоит из трех доменов, что характерно для всех ПЛФ-зависимых ферментов первого типа укладки, включая ферменты сульфурилирования, участвующие в биосинтезе метионина [42, 53]. Небольшой N-концевой домен состоит из двух α -спиралей, соединенных длинной петлей, способствует образованию тетрамера, а также совместно с аминокислотными остатками большого ПЛФ-связывающего домена соседней субъединицы формирует активный центр фермента. Большой ПЛФ-связывающий домен состоит из β -слоя, окруженного α -спиральями, и содержит большинство каталитических остатков активного центра (рис. 5, табл. 2), в том числе ковалентно связанный с ПЛФ остаток лизина, образующий внутренний альдимин. С-концевой домен содержит четырехслойную β -структуру, которая образует

Таблица 2. Роль остатков активного центра ОАHS с известными 3D структурами

Функциональная роль	Микроорганизм*					
	Cje	Mma	Tma	Tth1	Tth2	Wsu
	PDB код					
	4OC9	4KAM	7KB1	2CTZ	2CB1	3RI6
Образует водородную связь с фосфатной группой ПЛФ. Предположительно участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофермент-связывающего остатка лизина на стадиях элиминирования C-α-протона и боковой группы субстрата	Y53	Y67	Y58	Y52	Y50	Y53
Образует водородную связь с фосфатной группой ПЛФ	R55	R69	R60	R54	R52	R55
Взаимодействуют с фосфатной группой ПЛФ атомами азота главной цепи	G83	G97	G88	G82	G80	G83
	M84	Q98	Q89	H83	Q81	M84
Фенольное кольцо копланарно кольцу ПЛФ. Стабилизирует пиридиновое кольцо ПЛФ через π-стэкинговое взаимодействие. Увеличивает электронно-акцепторный характер кофактора	Y108	Y122	Y113	Y107	F105	F108
Ориентирует положение Tug108 (нумерация <i>C. jejuni</i>) в активном центре фермента	E151	E166	E157	E151	E147	E151
Образует солевой мостик с N1H атомом ПЛФ. Играет ключевую роль в стабилизации положительного заряда атома пиридина N1, тем самым повышая электрофильный характер кофактора	D180	D195	D186	D180	D176	D180
Ограничивает подвижность кольца ПЛФ (π-сигма взаимодействие с электронным кольцом кофактора). Азот амидной группы фиксирует положение боковой цепи Asp180 (нумерация <i>C. jejuni</i>), обеспечивая оптимальное расположение Asp180 для взаимодействия с N1H атомом пиридина	T182	T197	T188	T182	T178	T182
π-алкил взаимодействие с гидрофобной частью кольца ПЛФ, ограничивает подвижность кольца кофактора	V183	I198	V189	F183	F179	M183
Образуют водородные связи с фосфатной группой ПЛФ	S202	S217	S207	S203	S199	S202
	S204	T219	T209	T205	T201	T204
Образует внутренний альдимин с ПЛФ	K205	K220	K210	K206	K202	K205
Участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофермент-связывающего остатка лизина на стадиях элиминирования C-α-протона и боковой группы субстрата	N367	N379	N370	N366	N355	N352
Гуанидиновая группа аргинина взаимодействует с карбоксилатной группой субстрата	R402	R414	R405	R401	R390	R387

* Cje – *C. jejuni*, Mma – *M. marinum*, Tma – *T. maritima*, Tth – *T. thermophilus*, Wsu – *W. succinogenes*.

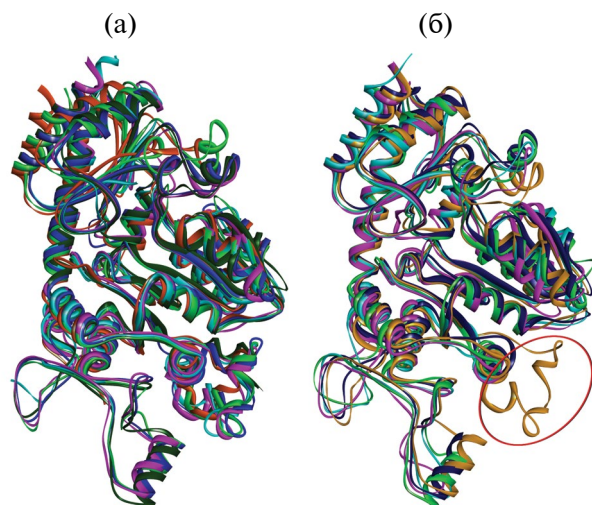


Рис. 6. Наложение полипептидных цепей (а) пространственных структур OASH из разных микроорганизмов: *C. jejuni* OASH (pdb код 4OC9) – темно-синий, *M. marinum* OASH (pdb код 4КАМ) – голубой, *T. maritima* OASH (pdb код 7KB1) – пурпурный, *T. thermophilus* OASH (pdb код 2CTZ) – зеленый, *T. thermophilus* OASH (pdb код 2CB1) – темно-зеленый, *W. succinogenes* OASH (pdb код 3RI6) – оранжевый; (б) пространственных структур ферментов подкласса CBL: *T. maritima* OASH (pdb код 7KB1) – оранжевый, *Citrobacter freundii* метионин γ -лиаза МГЛ (pdb код 2RFV) – темно-синий, *Arabidopsis thaliana* CBL (pdb код 1IBJ) – голубой, *Nicotiana tabacum* CGS (pdb код 1I41) – зеленый, *S. cerevisiae* цистатионин γ -лиаза (pdb код 1N8P) – пурпурный. Овалом выделен уникальный фрагмент, характерный для фермента OASH.

субстрат-связывающий карман в активном центре, закрытый α -спиралями. Активный центр OASH, расположенный на границе раздела димеров, образован аминокислотными остатками обеих субъединиц, таким образом, молекула гомотетрамера содержит четыре активных центра (рис. 5).

Пространственные укладки известных структур OASH схожи как между собой (рис. 6а), так и с пространственными укладками других ферментов подкласса CBL (рис. 6б), однако отличаются от последних уникальным фрагментом, состоящим из примерно 30 аминокислотных остатков [54], следующих после последнего β -листа ПЛФ-связывающего домена.

Вымачивание кристаллов OASH из *Thermotoga maritima* в растворе *O*-ацетил-L-гомосерина приводило к образованию стабильного промежуточного продукта в активном центре фермента (6 на рис. 4), то есть в отсутствие сульфид-иона реакция не могла дойти до завершения и протекала до стадии образования β , γ -ненасыщенного кетимина [28]. В пространственной структуре комплекса OASH с *O*-ацетил-L-гомосерином карбоксилат

этого промежуточного интермедиата образует солевой мостик с боковой группой остатка R405 (рис. 7), С β - и С γ -атомы располагаются в относительно просторном кармане на расстоянии около 3 Å от боковых цепей остатков K210 и Y58*. Для OASH из *Clostridioides difficile* было сделано предположение, что гомологичный остаток Y52* обеспечивает оптимальное положение ПЛФ-связывающего остатка K205 на стадиях отрыва С α -протона и ацетата [45]. В структурно похожем ферменте CGS в отсутствие второго субстрата (L-цистеина) β , γ -ненасыщенный кетимин таутомеризуется в винилглициновый хиноидный интермедиат и далее в α -аминокротонат с последующим его гидролизом до α -кетобутирата и аммиака [25, 38, 39]. Согласно биохимическим данным, полученным для OASH из нескольких источников, фермент не катализирует побочную реакцию γ -элиминирования *O*-ацетил-L-гомосерина [26, 27, 37, 40], что подтверждается и кристаллографическими данными о наличии стабильного β , γ -ненасыщенного кетимина (6 на рис. 4) в комплексе фермента с субстратом [28]. Метионин γ -лиаза является структурным гомологом OASH и также принадлежит к структурному подклассу CBL [42]. Для метионин γ -лиазы из *Citrobacter freundii* было показано, что остаток S339 необходим для эффективного катализа реакции γ -элиминирования [55]. Гомологичный остаток серина является консервативным для ферментов подкласса CBL, за исключением OASH [54]. В последовательностях OASH из различных источников положение остатка S339 занимают остатки аспарагина или гистидина, возможно, из-за отсутствия именно этого остатка OASH может катализировать только реакцию γ -замещения.

Анализ пространственной структуры OASH из *T. maritima* и CGS из *Xanthomonas oryzae* [56] позволил идентифицировать R270 активного центра как остаток, который препятствует связыванию *O*-сукцинил-L-гомосерина, а также обеспечивает строгую специфичность к бисульфиду в качестве второго субстрата за счет перекрывания доступа к активному центру более крупного субстрата – L-цистеина как источника серы [28]. Однако для OASH с доказанной функцией и определенными пространственными структурами из *T. thermophilus* и *W. succinogenes* в данной позиции находятся S258 и Q254 соответственно (рис. 3).

ИНГИБИТОРЫ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА

Транссульфурирование и сульфгидрирование регулируются метионином, ингибирующим ферменты обоих биосинтетических путей [57]. Ингибирование реакции γ -замещения OAH различными аминокислотами было исследовано для OASH из *C. difficile* и *C. novyi* [27, 37]. Конечный продукт

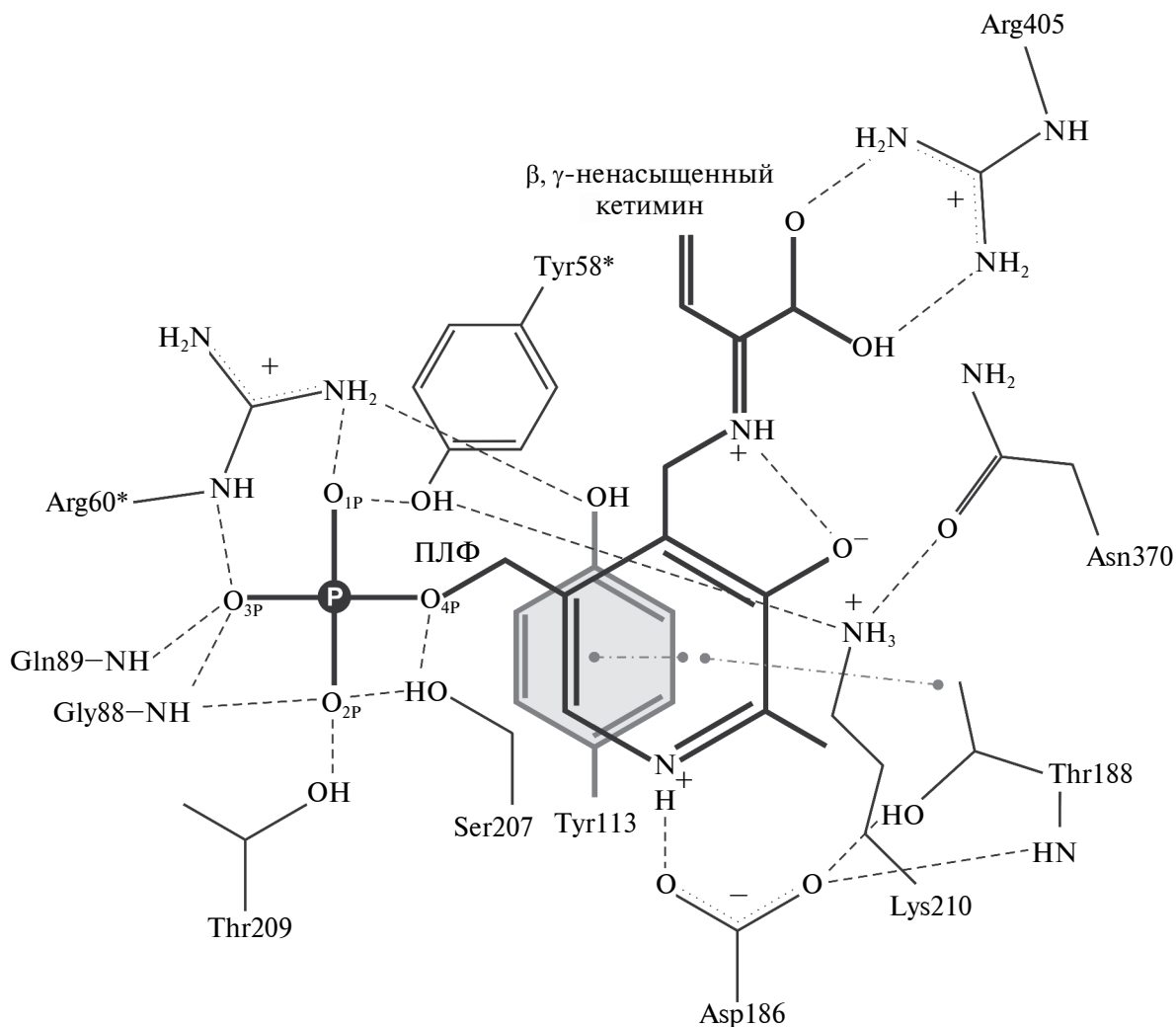


Рис. 7. Схема взаимодействий α,β -ненасыщенного кетимина с аминокислотными остатками активного центра ОАHS (нумерация *T. maritima*). Аминокислотные остатки соседнего мономера обозначены звездочкой. Штриховыми линиями показаны водородные связи, штрих-пунктирными – π -взаимодействия.

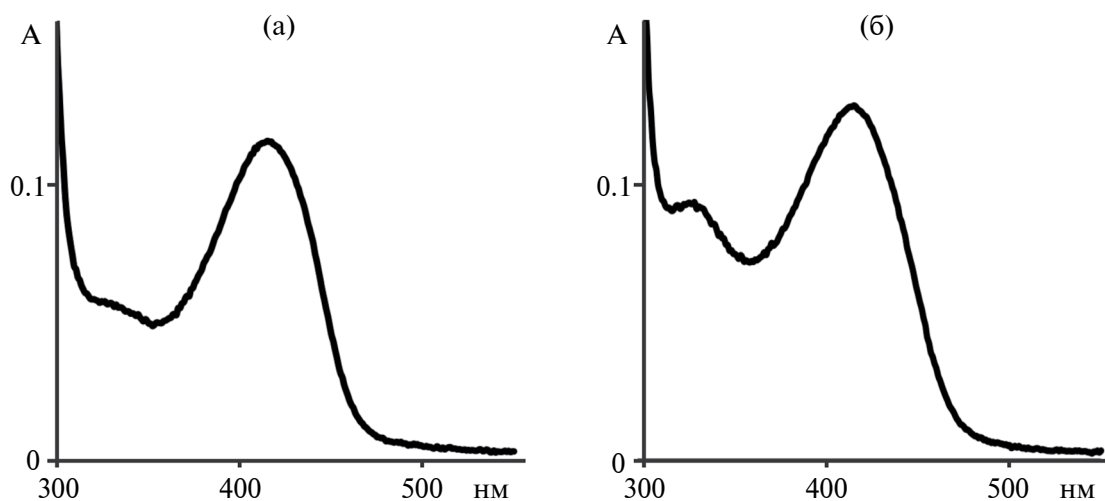


Рис. 8. Спектры поглощения ОАHS из *C. difficile* (а) и *C. novyi* (б) при pH 7.5.

биосинтетического пути L-метионин оказался конкурентным ингибитором фермента с величиной $K_i = 9$ мМ. N γ -ацетил-L-2,4-диаминомасляная кислота, которая является структурным аналогом субстрата, может останавливать каталитическую реакцию на стадии образования енамина (5 на рис. 4) из-за отсутствия уходящей группы в γ -положении. N γ -ацетил-L-2,4-диаминомасляная кислота обратно ингибировала реакцию γ -замещения ОАН с величиной $K_i = 0.04$ мМ. Пропаргилглицин, являющийся суицидальным ингибитором пиридоксалевого ферментов, участвующих в метаболизме серосодержащих аминокислот (цистатинин γ -лиазы, CGS и CBL), приводил к полной необратимой инактивации ОАНС из *C. difficile* [27]. Благодаря наличию ПЛФ в активном центре холофермент и его комплексы с аминокислотами обладают характерными спектрами поглощения, которые отражают состояние внутреннего альдимины и позволяют идентифицировать интермедиаты ферментативной реакции. Спектры поглощения ОАНС из *C. difficile* и *C. novyi* при pH 7.5 в области 300–550 нм имеют вид, типичный для внутренних альдиминов ПЛФ-зависимых ферментов, с основной полосой в области 415 нм и минорной в области 320 нм (рис. 8). Фермент из *T. thermophilus* имел похожий спектр поглощения с максимумом при 425 нм [18].

В спектрах поглощения комплексов ОАНС из *C. difficile* и *C. novyi* с L-метионином и N γ -ацетил-L-2,4-диаминомасляной кислотой интенсивность полосы в области 420 нм уменьшалась, а поглощение в области 320–360 нм увеличивалось, что может быть связано с изменением ионного состояния внешних альдиминов и их таутомеризацией, а также с поглощением интермедиатов, имитирующих промежуточные продукты реакции (рис. 4).

Для фермента из *T. thermophilus* было показано, что L-метионин и D, L-пропаргилглицин также ингибировали реакцию γ -замещения с ОАН [18, 35]. L-метионин являлся конкурентным ингибитором ОАНС из *S. cerevisiae* ($K_i = 0.9$ мМ) [36] и *C. glutamicum* [41]. Кроме того, O-ацетил-L-серин ($K_i = 21.8$ мМ), O-сукцинил-D, L-гомосерин ($K_i = 19.0$ мМ) и L-гомосерин ($K_i = 16.0$ мМ) ингибировали ОАНС дрожжей по конкурентному типу [36].

ЭВОЛЮЦИЯ ПУТИ БИОСИНТЕЗА МЕТИОНИНА В МИКРООРГАНИЗМАХ

Поскольку в некоторых микроорганизмах присутствует бифункциональная CGS, которая может участвовать в пути прямого сульфидрирования, а также в присущем ей пути транссульфурирования, возникает вопрос эволюционного обоснования выбора микроорганизмами различных путей биосинтеза метионина. Для выяснения этого были проведены тесты на комплементацию *in vivo*

и филогенетический анализ ферментов, участвующих в биосинтезе метионина в микроорганизмах [58, 59]. Полученные данные, в комплексе с анализом субстратной специфичности, позволили сделать предположение, что общий предковый ген этих ферментов был способен действовать как сульфидрилаза O-ацетил-L-гомосерина или O-сукцинил-L-гомосерина. У некоторых бактерий этот древний фермент, скорее всего, эволюционировал в CGS, тем самым сохранив способность использовать различные гомосеринэтерифицированные субстраты, а также различные источники серы, и, таким образом, сохранил мультисубстратную специфичность своего предка. В некоторых организмах этот предковый ген, вероятно, подвергся дупликации, в результате которой образовались отдельно CGS и сульфидрилаза. Это привело к развитию двух параллельных путей получения метионина, транссульфурированию и прямому сульфидрированию в этих организмах. Хотя оба пути существуют у нескольких организмов, большинство из них, по-видимому, используют один специфический путь биосинтеза метионина. Скорее всего, выбор микроорганизмами того или иного пути биосинтеза метионина связан с особенностями их внутреннего метаболизма и зависит от их естественной среды обитания.

ПРИМЕНЕНИЕ ОАНС ДЛЯ СИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Метионин применяется главным образом при производстве современных комплексных кормов для сельского хозяйства. Выявлено положительное влияние метионина на показатели продуктивности в животноводстве [60, 61]. Кроме того, метионин используется в фармацевтике и спортивном питании [62]. Промышленное получение L-метионина путем микробиологической ферментации является затруднительным ввиду строгой клеточной регуляции его биосинтеза, поэтому он производится преимущественно синтетическим путем, в результате чего образуется рацемическая смесь D, L-метионина [63]. Во многих живых организмах может усваиваться только L-форма, и именно она используется для синтеза гормонов, ферментов и других белков. Биологически активный L-метионин может быть получен ферментативным синтезом с использованием биоконверсии предшественников [64].

К настоящему времени многочисленные протеиногенные аминокислоты и некоторые специальные аминокислоты, важные для фармацевтики, производятся путем ферментации [24, 65]. В связи с этим является актуальным получение аминокислот и их производных при помощи изолированных ферментов. Такие бактерии как *E. coli*, *C. glutamicum* широко используются в промышленности для микробного синтеза аминокислот.

Ферментативный способ с применением определенных штаммов бактерий или дрожжей достаточно прост, но с другой стороны, микроорганизмы могут быть чувствительны к изменениям условий процесса, в частности pH, температуре.

В живых организмах ПЛФ-зависимые ферменты способны катализировать широкий спектр биохимических реакций с участием субстратов – аминокислот и их аналогов [66, 67]. По этой причине ПЛФ-зависимые ферменты вызывают интерес как инструмент в биотехнологии для производства ряда специфических аминокислот и их производных [68, 69]. Кроме того, тонкое регулирование метаболических путей, опосредуемых ПЛФ-зависимыми ферментами, является многообещающим подходом к продуцированию клетками неканонических аминокислот из простых источников углерода или предшественников [70]. Методами генной инженерии был создан метионин-штамм *E. coli* ауксотрофный по метионину, позволяющий получить L-азидогомоаланин из O-ацетил-L-гомосерина и азидата натрия и включить его в рекомбинантные белки-мишени [33]. В данной системе путь биосинтеза метионина у *E. coli* сначала был перенаправлен в сторону получения желаемой неканонической аминокислоты, используя широкую субстратную специфичность рекомбинантной ОАHS из *S. glutamicum*, а затем была достигнута экспрессия целевого белка барстар, которая сопровождалась эффективным включением L-азидогомоаланина вместо L-метионина [33].

В последние годы исследуются новые пути получения L-метионина с использованием свойств ОАHS. Биосинтез метионина подробно исследовался в *S. glutamicum* с целью использования этой бактерии как промышленного продуцента. В результате были созданы новые штаммы с повышенным производством L-метионина и S-аденозил-L-метионина [24, 32, 63, 71–74]. Замена естественного пути транссульфурирования в *E. coli* более распространенным путем прямого сульфгидрирования, используемым другими бактериями, привела к увеличению по сравнению с штаммом дикого типа выработки L-метионина у ауксотрофного штамма *E. coli* (MG1655) [75]. Для получения такого метионинового штамма из генома кишечной палочки были удалены гены CGS и CBL и добавлен ген ОАHS. ОАHS дрожжей, полученная из рекомбинантного штамма *E. coli* BL-21, была использована для получения L-метионина из O-ацетил-L-гомосерина и 3-метилтиопропиональдегида *in vitro* [76]. Известны примеры улучшения каталитических свойств ОАHS по сравнению с природным ферментом в реакции O-ацетил-L-гомосерина с метилмеркаптаном [77]. С целью получения эффективного продуцента L-метионина была получена мутантная форма ОАHS из *Rhodobacter sphaeroides* при помощи сайт-направленного

мутагенеза: ген ОАHS из *R. sphaeroides* с заменами трех аминокислотных остатков был клонирован в клетках *E. coli* K-12. В результате активность мутантной формы с заменами I3N, F65Y и V104A оказалась в 1.75 раз выше по сравнению с ферментом дикого типа [77].

Таким образом, представленные в настоящем обзоре данные позволяют рассматривать ОАHS как перспективный объект для использования ее в ферментативном синтезе L-метионина, других аминокислот, а также их производных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–00255).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cavuoto P., Fenech M.F.* // *Cancer Treat. Rev.* 2012. V. 38. P. 726–736.
2. *Finkelstein J.D.* // *J. Nutr. Biochem.* 1990. V. 1. P. 228–237.
3. *Stipanuk M.H.* // *Annu. Rev. Nutr.* 2004. V. 24. P. 539–577.
4. *Locasale J.W.* // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. V. 13. P. 572–583.
5. *Neubauer C., Landecker H.* // *Lancet Planet Health.* 2021. V. 5. P. 560–569.
6. *François J.M.* // *Biotechnol. Adv.* 2023. V. 19. P. 108259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108259>
7. *Born T.L., Blanchard J.S.* // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 14416–14423.
8. *Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.D., Messerschmidt A.* // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 262. P. 202–224.
9. *Ferla M.P., Patrick W.M.* // *Microbiology.* 2014. V. 160. P. 1571–1584.
10. *Fogliano M., Borne F., Bally M., Ball G., Patte J.* // *Microbiology.* 1995. V. 141. P. 431–439.
11. *Vermeij P., Kertesz M.A.* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 5833–5837.
12. *Hwang B.J., Kim Y., Kim H.B., Hwang H.J., Kim J.H., Lee H.S.* // *Mol. Cells.* 1999. V. 9. P. 300–308.
13. *Hwang B.J., Yeom H.J., Kim Y., Lee H.S.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1277–1286.
14. *Lee H., Hwang B.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 62. P. 459–467.
15. *Belfaiza J., Martel A., Margarita D., Saint Girons I.* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 250–255.
16. *Picardeau M., Bauby H., Saint Girons I.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 225. P. 257–262.

17. Yamagata S., Ichioka K., Goto K., Mizuno Y., Iwama T. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 2086–2092.
18. Shimizu H., Yamagata S., Masui R., Inoue Y., Shibata T., Yokoyama S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1549. P. 61–72.
19. Yoshida Y., Negishi M., Nakano Y. // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 221. P. 277–284.
20. Bairoch A. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 304–305.
21. UniProt Consortium // Nucleic Acids Res. 2023. V. 51 (D1). D523–D531.
22. Auger S., Yuen W.H., Danchin A., Martin-Verstraete I. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 507–518.
23. Farsi A., Lodha P.H., Skanes J.E., Los H., Kalidindi N., Aitken S.M. // Biochem. Cell Biol. 2009. V. 87. P. 445–457.
24. Shim J., Shin Y., Lee I., Kim S.Y. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2017. V. 159. P. 153–177.
25. Aitken S.M., Kim D.H., Kirsch J.F. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 11297–11306.
26. Omura H., Ikemoto M., Kobayashi M., Shimizu S., Yoshida T., Nagasawa T. // J. Biosci. Bioeng. 2003. V. 96. P. 53–58.
27. Kulikova V.V., Revtovich S.V., Bazhulina N.P., Anufrieva N.V., Kotlov M.I., Koval V.S. et al. // IUBMB Life. 2019. V. 71. P. 1815–1823.
28. Brewster J.L., Pacht P., McKellar J.L., Selmer M., Squire C.J., Patrick W.M. // J. Biol. Chem. 2021. V. 296. P. 100797.
29. Ferla M.P., Brewster J.L., Hall K.R., Evans G.B., Patrick W.M. // Mol. Microbiol. 2017. V. 105. P. 508–524.
30. Krishnamoorthy K., Begley T.P. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 379–386.
31. Brzywczy J., Yamagata S., Paszewski A. // Acta Biochim. Pol. 1993. V. 40. P. 421–428.
32. Bolten C.J., Schröder H., Dickschat J., Wittmann C.J. // Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. P. 1196–1203.
33. Ma Y., Biava H., Contestabile R., Budisa N., di Salvo M.L. // Molecules. 2014. V. 19. P. 1004–1022.
34. Dauplais M., Bierla K., Maizeray C., Lestini R., Lobinski R., Pierre Plateau P. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22: 2241. <https://doi.org/10.3390/ijms22052241>.
35. Iwama T., Hosokawa H., Lin W., Shimizu H., Kawai K., Yamagata S. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. P. 1357–1361.
36. Yamagata S. // J. Biochem. 1971. V. 70. P. 1035–1045.
37. Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Kotlov M.I., Morozova E.A., Koval V.S., Belyi Y.F. et al. // Protein Expr. Purif. 2021. V. 180. P. 105810.
38. Aitken S.M., Kirsch J.F. // Arch. Biochem. Biophys. 2005. V. 433. P. 166–175.
39. Brzovic P., Holbrook E.L., Greene R.C., Dunn M. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 442–451.
40. Kerr D.S. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 95–102.
41. Hwang B.J., Park S.D., Kim Y., Kim P., Lee H.S. // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. P. 1010–1017.
42. Messerschmidt A., Worbs M., Steegborn C., Wahl M. C., Huber R., Laber B., Clausen T. // Biol. Chem. 2003. V. 384. P. 373–386.
43. Aitken S.M., Lodha P.H., Morneau, D.J.K. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 814. P. 1511–1517.
44. Lodha P.H., Jaworski A.F., Aitken S.M. // Protein Sci. 2010. V. 19. P. 383–391.
45. Куликова В.В., Ревтович С.В., Лыфенко А.Д., Морозова Е.А., Коваль В.С., Бажулина Н.П. и др. // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 737–747.
46. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.-D., Messerschmidt A. // J. Mol. Biol. 1996. V. 262. P. 202–224.
47. Clausen T., Huber R., Messerschmidt A., Pohlenz H.D., Laber B. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12633–12643.
48. Clausen T., Huber R., Prade L., Wahl M.C., Messerschmidt A. // EMBO J. 1998. V. 23. P. 6827–6838.
49. Steegborn C., Messerschmidt A., Laber B., Streber W., Huber R., Clausen T. // J. Mol. Biol. 1999. V. 290. P. 983–996.
50. Breiting U., Clausen T., Ehlert S., Huber R., Laber B., Schmidt F. et al. // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 631–642.
51. Tran T., Krishnamoorthy K., Begley T.P., Ealick S.E. // Acta Cryst. 2011. V. D67. P. 831–838.
52. Baugh L., Phan I., Begley D.W., Clifton M.C., Armour B. et al. // Tuberculosis (Edinb). 2015. V. 95. P. 142–148.
53. Wahl M.C., Huber R., Prade L., Marinkovic S., Messerschmidt A., Clausen T. // FEBS Lett. 1997. V. 414. P. 492–496.
54. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // Докл. АН. 2012. Т. 445. № 2. С. 214–220.
55. Ануфриева Н.В., Морозова Е.А., Ревтович С.В., Бажулина Н.П., Тимофеев В.П., Ткачев Я.В. и др. // Acta Naturae. 2022. Т. 14. С. 4–15.
56. Ngo H.-P.-T., Kim J.-K., Kim S.-H., Pham T.-V., Tran T.-H., Nguyen D.-D., Kim J.-G., Chung S., Ahn Y.-J., Kang L.-W. // Acta Crystallogr. Sect. F. 2012. V. 68. P. 1515–1517.
57. Mondal S., Das Y.B., Chatterjee S.P. // Folia Microbiol (Praha). 1996. V. 41. P. 465–472.
58. Hacham Y., Gophna U., Amir, R. // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 1513–1520.
59. Gophna U., Baptiste E., Doolittle W.F., Biran D., Ron E.Z. // Gene. 2005. V. 1. P. 48–57.
60. Jankowski J., Ognik K., Konieczka P., Dariusz Mikulski D. // Poult. Sci. 2020. V. 99. P. 4730–4740.

61. *Konieczka P., Tykałowski B., Ognik K., Kinsner M., Szkopek D., Wójcik et al.* // *Vet. Res.* 2022. V. 26 P. 59. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01080-7>.
62. *Navik U., Sheth V.G., Khurana A., Jawalekar S.S., Allawadhi P., Gaddam R.R., Bhatti J.S., Tikoo K.* // *Ageing Res. Rev.* 2021. V. 72. P. 101500.
63. *Li Y., Cong H., Liu B., Song J., Sun X., Zhang J., Yang Q.* // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2016. V. 109. P. 1185–1197.
64. *Kumar D., Gomes J.* // *Biotechnol Adv.* 2005. V. 23. P. 41–61.
65. *Hashimoto S.-I.* // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2017. V. 159. P. 15–34.
66. *Eliot A. C., Kirsch J. F.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 383–415.
67. *Paiardini A., Contestabile R., Buckle A.M., Cellini B.* // *Biomed. Res. Int.* 2014. Article ID856076. <https://doi.org/10.1155/2014/856076>.
68. *Omura H., Ikemoto M., Kobayashi M., Shimizu S., Yoshida T., Nagasawa T.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2003. V. 96. P. 53–58.
69. *Di Salvo M.L., Fesko K., Phillips R.S., Contestabile R.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. Article ID52. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00052>.
70. *Ravikumar Y., Nadarajan S.P., Yoo T.H., Lee C.-S., Yun H.* // *Biotechnol. J.* 2015. V. 10. P. 1862–1876.
71. Ковалева Г.Ю., Гельфанд М.С. // *Молекулярная биология.* 2007. Т. 41. № 1. С. 139–150.
72. *Park S.D., Lee J.Y., Sim S.Y., Kim Y., Lee H.S.* // *Metab. Eng.* 2007. V. 9. P. 327–336.
73. *Han G., Hu X., Qin T., Li Y., Wang X.* // *Enzyme Microb. Technol.* 2016. V. 83. P. 14–21.
74. *Qin T., Hu X., Hu J., Wang X.* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015. V. 62. P. 563–573.
75. *Gruzdev N., Hacham Y., Haviv H., Stern I., Gabay M., Bloch I. et al.* // *Microbial Cell Factories.* 2023. V. 22:151 <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02150-x>
76. *Wang H., Li Y., Che Y., Yang D., Wang Q., Yang H. et al.* // *J. Agric. Food Chem.* 2021. V. 69. P. 7932–7937.
77. Кум С.Й., Сун Й.Ю., Сео Ч.И., Сон С.К., Хео И.К., Лу Х.Д., Кум Д.Е., Кум Х.А., Бае Д.Й., Ха К.Х. Патент РФ 2011. № 2573 928 С2.

***O*-Acetylhomoserine Sulphydrylase as a Key Enzyme of Direct Sulphydrylation in Microbial Methionine Biosynthesis**

V. V. Kulikova^{a,*}, E. A. Morozova^a, A. D. Lyfenko^a, V. S. Koval^a, N. V. Anufrieva^a, P. N. Solyev^a, and S. V. Revtovich^a

^a*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: vitviku@yandex.ru*

Methionine biosynthesis in most microorganisms proceeds in two alternative ways. Each pathway is catalyzed by independent enzymes and is tightly regulated by methionine. The transsulfurylation pathway involves the formation of a cystathionine, and cysteine acts as a source of sulfur. The enzymes of this metabolic pathway are characterized in detail. The direct sulphydrylation pathway involves the synthesis of homocysteine with the participation of an inorganic sulfur source directly from *O*-acetylhomoserine and is predominant in most classes of bacteria. The subject of this review is the properties and functioning of one of the least studied enzymes of the direct sulphydrylation pathway – *O*-acetylhomoserine sulphydrylase. A deep understanding of the mechanisms controlling the substrate and reaction specificity of *O*-acetylhomoserine sulphydrylase is a necessary step in the rational redesign of the enzyme in order to create a promising catalyst for the synthesis of methionine and its derivatives, as well as, in combination with crystallographic data, for the development of new antimicrobial compounds based on effective enzyme inhibitors.

Keywords: *O*-Acetylhomoserine Sulphydrylase, methionine biosynthesis, direct sulphydrylation