

РАЗНООБРАЗИЕ КУПРОПРОТЕИНОВ И СИСТЕМ ГОМЕОСТАЗА МЕДИ У *MELIORIBACTER ROSEUS* – ФАКУЛЬТАТИВНО АНАЭРОБНОГО ТЕРМОФИЛЬНОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НОВОГО ФИЛУМА *IGNAVIBACTERIAE*

© 2015 г. О. В. Карначук^{1,*}, С. Н. Гаврилов^{**}, М. Р. Авакян*,
О. А. Подосокорская^{**}, Ю. А. Франк*, Е. А. Бонч-Осмоловская^{**}, И. В. Кубланов^{1,**}

*Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет

**Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского Российской академии наук, Москва

Поступила в редакцию 14.05.2013 г.

В геноме *Melioribacter roseus*, одного из двух представителей недавно описанного филума *Ignavibacteria* был проведен поиск генов, кодирующих белки, связанные с транспортом меди и содержащие медь в качестве кофактора, с последующей их характеристикой. В результате геномного анализа у данного факультативно анаэробного организма были выявлены различные медьсодержащие оксидоредуктазы. Было исследовано влияние концентрации ионов Cu^{2+} в культуральной среде на рост *M. roseus*. В результате геномного анализа у данного факультативно анаэробного организма были выявлены различные медьсодержащие оксидоредуктазы. Было детектировано три АТФазы, осуществляющие транспорт меди, одна из которых (MROS_1511) с большой вероятностью участвует в сборке медьсодержащей цитохром *c*-оксидазы, тогда как две других (MROS_0327 и MROS_0791) обладают, по-видимому, детоксификационной функцией. Наличие нескольких медьсодержащих оксидоредуктаз и систем гомеостаза меди у *M. roseus* соотносится с ранее высказанной гипотезой происхождения филума *Ignavibacteriae* от общего с *Bacteroidetes* и *Chlorobi* аэробного предка.

Ключевые слова: геномные исследования, купропротеины, гомеостаз меди, медные АТФазы, *Melioribacter roseus*, *Ignavibacteriae*.

DOI: 10.7868/S0026365615020056

ВВЕДЕНИЕ

Медь, наряду с железом и цинком, является одним из наиболее распространенных металлов, входящих в состав белков прокариотических и эукариотических клеток [1]. Медь в качестве кофактора содержат такие белки прокариот как цитохромоксидазы, супероксиддисмутазы, аминоксидазы, метанмонооксигеназы, прочие медные оксидазы и лакказы. Как показывают геохимические расчеты, в анаэробных условиях основное количество меди недоступно для живых клеток, так как присутствует в виде сульфидов с чрезвычайно низкой растворимостью [2]. Предполагается, что доступная для живых клеток медь в значимых количествах появилась в океане только после его оксигенирования, начавшегося между 3 и 2 млрд лет назад, в связи с чем медь характеризуют как “современный” металл [3]. Анализ полных геномов бактерий и архей, доступных к 2008 г., показал, что большинство анаэробов не исполь-

зует Cu в качестве кофактора ферментов, в то время как в геномах аэробов гены, кодирующие медьсодержащие белки, представлены достаточно широко [1]. Таким образом, геномные исследования подтвердили высказанную биогеохимиками идею о том, что геохимические сигналы окружающей среды, закодированные в белках, сохраняются в течение геологических масштабов времени, и их использование может помочь определить ход некоторых эволюционных событий у живых организмов [2].

Медь не только входит в состав биологических молекул, но в высоких концентрациях (>1 мг/л) является токсичной для живых клеток. Предполагается, что биохимические механизмы, защищающие клетку от ионов меди, появились эволюционно значительно раньше первых купропротеинов [3, 4]. Основным механизмом детоксификации меди является выкачивание ее излишков из цитоплазмы медными АТФазами Р-типа [5]. Наряду с АТФазами у грамотрицательных прокариот были обнаружены другие механизмы, действующие

¹ Авторы для корреспонденции (e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru, kublanov.ilya@gmail.com).

“RND efflux” транспортеры, транслоцирующие медь преимущественно из периплазматического пространства; секвестирующие медные оксиды; образующие полифосфаты полифосфаткиназы. В отличие от медных АТФаз, RND-транспортеры выводят наружу ионы меди и других металлов по принципу антипорта. В настоящее время данная группа классифицируется как надсемейство 2.A.6 базы данных TCDB [6], содержащее огромное количество транспортных белков, обнаруженных во всех доменах живых организмов [7]. Внутри этого надсемейства транспортеры меди относятся к семейству HME (heavy metal efflux – эффлюкс-транспортеры тяжелых металлов 2.A.6.1).

В качестве возможных мест обитания микроорганизмов, где могли появиться различные механизмы детоксификации меди (в том числе основанные на медных АТФазах), рассматривают как оксигенированные водные экосистемы с высокой растворимостью ионов Cu^{2+} , так и морские гидротермы, где вследствие повышенных температур и высокой концентрации тяжелых металлов возможно присутствие значительных количеств растворимых сульфидов меди в анаэробных условиях [1].

Описанная недавно факультативно анаэробная умеренно термофильная бактерия *Melioribacter roseus* [8] представляет собой хорошую модель для оценки взаимосвязи наличия у организма купропротеома (совокупности медьсодержащих белков) с аэробным или анаэробным характером его роста. *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov. [8] был охарактеризован как представитель нового семейства *Melioribacteraceae* внутри нового филума *Ignavibacteriae*. Последний относится к группе близкородственных филумов, включающей также филумы *Chlorobi* и *Bacteroidetes* [8, 9]. Помимо *M. roseus*, еще одним культивируемым представителем *Ignavibacteriae* является *Ignavibacterium album* [10, 11]. Оба организма – *M. roseus* и *I. album* – являются факультативными анаэробами и органо-гетеротрофами [8]. На основании геномных и фенотипических характеристик представителей *Chlorobi*, *Bacteroidetes* и *Ignavibacteriae* была предложена следующая цепь эволюционных событий: разделение общего аэробного предка на *Bacteroidetes* и общего предка *Ignavibacteriae/Chlorobi*; последовавшее за этим разделение *Ignavibacteriae* и *Chlorobi*, связанное с захватом последними новой экологической ниши и принципиальным изменением их метаболизма [8].

M. roseus был выделен из образца микробных обрастаний, развивающихся на изливе геотермальной воды из скважины РЗ (Парабельский район Томской области), вскрывающей подземные водоносные горизонты на глубине не менее 2700 м. Предполагается, что в поверхностный мат *M. roseus* попал именно из глубинных горизонтов,

которые характеризуются повышенной концентрацией металлов и металлоидов [8]. Таким образом, *M. roseus* должен обладать набором систем, контролирующих внутриклеточное содержание токсичных металлов, в том числе меди.

Целью настоящего исследования был поиск в геноме *M. roseus* генов, кодирующих купропротеины и системы гомеостаза меди и проверка высказанной ранее гипотезы об изначально аэробном метаболизме *Ignavibacteriae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм *Melioribacter roseus* РЗМ-2^T был взят из коллекции культур лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН. Проверку его устойчивости к ионам Cu^{2+} проводили при выращивании на модифицированной среде Видделя [8] с добавлением меди из стерильного раствора CuCl_2 до конечной концентрации 10, 20, 30 или 50 мг/л.

Для поиска генов, кодирующих белки, связанные с гомеостазом меди, использовали полный геном *M. roseus* РЗМ-2^T, депонированный в GenBank NCBI (CP003557.1). Искомые гены определяли по сходству с кодирующими последовательностями, определенными для *Bacteria* и *Archaea* Ридж и соавт. [1]. Для RND-транспортеров дополнительно проверяли консервативные последовательности трансмембранной α -спирали IV [7], для медных АТФаз – консервативные домены [12]. Гомологи найденных в геноме *M. roseus* генов искали с помощью алгоритма BLASTp, используя стандартные параметры [13]. Полученные наборы белков *M. roseus* и их гомологов использовали для филогенетического анализа, который проводили с применением пакета MEGA5 [14]. Были взяты ближайшие 100 гомологов для каждого белка, таким образом, общий начальный набор последовательностей для филогенетического анализа состоял из 3 АТФаз *M. roseus* и 297 ближайших родственников. С помощью сервера CD-hit [15] были удалены 100%-но идентичные последовательности (дубликаты), после чего осталось 270 последовательностей; из них 3 неполные последовательности (2 из *Firmicutes* и 1 из *Bacteroidetes*) были удалены вручную, таким образом, финальный набор сиквентов равнялся 267. Для построения дендрограмм использовали метод ближайшего соседа (Neighbor-Joining) и метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гены, кодирующие купропротеины присутствуют в геноме *Melioribacter roseus*. В геноме *M. roseus* было обнаружено несколько генов, кодирующих

Таблица 1. Присутствие купропротеинов в геномах представителей *Ignavibacteriae*, *Chlorobi* и *Bacteroidetes* (по результатам анализа базы данных NCBI)

	<i>Ignavibacteriae</i>		<i>Chlorobi</i>	<i>Bacteroidetes</i>
	<i>M. roseus</i>	<i>I. album</i>		
Ферменты семейства цитохром <i>c</i> -оксидаз	+	+	—*	+
Медьсодержащая редуктаза закиси азота	+	+	—	+
Медная оксидоредуктаза, полифенол оксидаза, лакказы	+	+	+	+

* За исключением *Chlorobaculum parvum*.

Таблица 2. Доменная структура и основные консервативные мотивы функциональных доменов медных АТФаз Р-типа у *Melioribacter roseus* РЗМ-2

Номер ОРС АТФазы в геноме	N-концевой домен			Каталитический цитоплазматический домен		
	мотивы связывания металлов	стабилизирующий мотив	мембранный сайт связывания тяжелых металлов	мотив фосфорилирования	мотив связывания фосфата	мотив “hinge”-региона, связывающего каталитический и C-концевой домены
MROS_0327	CASC	TGES	CPC	DKTGTIT	LLTGD	VAMVGDGINDAPALAQAADLSIAI
MROS_0791	CSTC... CASC	TGEP	CPC	DKTGTIT	MITGD	VAMVGDGINDAPALAQAADIGLAI
MROS_1511	CFHC... CNGC... CSSC	TGES	CPC	DKTGTIT	LLTGD	VMMIGDGLNDAGALQKSD

* Жирным шрифтом выделены наиболее консервативные аминокислотные остатки по данным Чан с соавт. [16].

различные медьсодержащие белки, включая цитохром *c*-оксидазы (кислородредуктазы) *cbb₃* (MROS_1513) и *cc(o/b)o₃* (MROS_0038), N₂O редуктазу (MROS_1106) и лакказу (MROS_0146) (табл. 1). Ближайшие гомологи этих купропротеинов были также обнаружены у *I. album*. В частности, сходство аминокислотных последовательностей медьсодержащих лакказ из двух видов, представляющих различные семейства филума *Ignavibacteriae*, составило 52%. Гены лакказ были обнаружены в геномах многих представителей филума *Chlorobi*. Помимо представителей *Chlorobi*, относительно близкие аминокислотные последовательности лакказ присутствуют у представителей филума *Bacteroidetes*, у *Caldithrix abyssi* (одного из двух культивируемых представителей глубокой ветви бактерий, близкой к *Chlorobi-Bacteroidetes-Ignavibacteriae*), а также у представителей *Firmicutes* (сходство лакказ всех перечисленных групп и *M. roseus* составляет 30–37%).

Генами медьсодержащих субъединиц цитохром *c*-оксидаз *cbb₃*-типа обладают пять представителей филума *Chlorobi*, однако у всех них соответствующие генные кластеры неполные — у *Chlorobium chlorochromatii* отсутствует ген структурной субъединицы IV, у *C. phaeobacteroides*, *C. limicola*, *Chlorobaculum parvum* и *Pelodictyon phaeoclathratiforme* отсутствуют также гены функ-

циональной субъединицы III. У *Chlorobium ferrooxidans* есть только ген медной субъединицы, равноудаленной от из известных типов медных кислородредуктаз.

Гомологи медьсодержащей цитохром *c*-оксидазы *cc(o/b)o₃*-типа есть в геномах представителей *Bacteroidetes* и только одного представителя *Chlorobi* — *Chlorobaculum parvum*. Однако в случае *Bacteroidetes* генный кластер этой оксидазы имеет организацию, отличную от таковой у *M. roseus*, а в случае *Chlorobaculum parvum* не содержит генов двух субъединиц фермента (II и IV).

***M. roseus* обладает различными системами транспорта меди** Культивирование *M. roseus* в присутствии повышенной концентрации Cu(II) показало, что максимальная концентрация меди в среде, при которой наблюдался рост, составляла 30 мг/л. При содержании 50 мг/л Cu²⁺ в среде культивирования рост *M. roseus* полностью ингибировался.

В геноме *M. roseus* было детектировано три медных АТФазы: все три имеют по 4 пары трансмембранных участков, характерных для АТФаз тяжелых металлов (семейства 3.A.3.5 и 3.A.3.6) и обладают схожей с этими АТФазами доменной организацией (табл. 2), подразумевающей наличие сайтов связывания металлов и стабилизирующего мотива TGEA цитозольной петли в

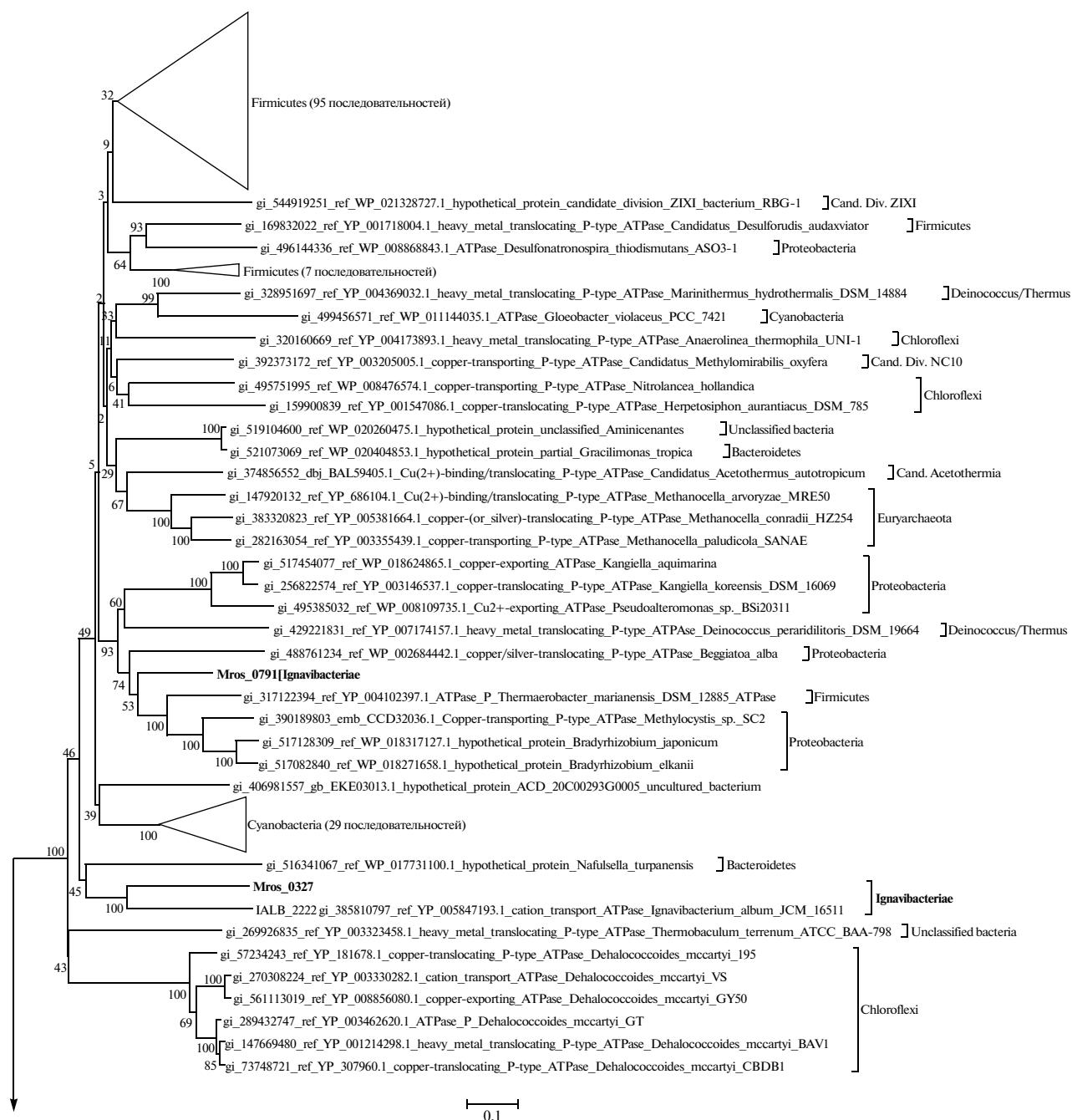


Рис. 1. Филогенетическое положение медных АТФаз MROS_0327, MROS_0791, MROS_1511 и родственных белков. Для построения дендрогаммы использовали метод ближайшего соседа (Neighbor-Joining) и Пуассоновское распределение вероятности замен аминокислот [23]. Метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с применением модели JTT (Jones–Taylor–Thornton (JTT) model) дал схожий результат топологии. Шкала соответствует замене 10% аминокислотных остатков. Цифры в узлах дерева – значения бутстреппинга (100 итераций).

N-концевом домене, а также консервативных сайтов фосфорилирования, связывания фосфата и “hinge”-региона в каталитическом домене; третий, С-концевой мембранный, домен является наиболее варибельным [16].

Одними из ближайших гомологов АТФаз MROS_1511 и MROS_0327 являются белки

IALB_0720 и IALB_2222 из *I. album*; в то же время близкого гомолога MROS_0791 в геноме *I. album* не оказалось (рис. 1). АТФаза MROS_1511 находится в одном опероне с *ccb₃* цитохром *c*-оксидазой (MROS_1513-1515) и ее аксессуарными белками (рис. 2в). АТФаза MROS_0327 находится в опероне (рис. 2а) с медным шапероном

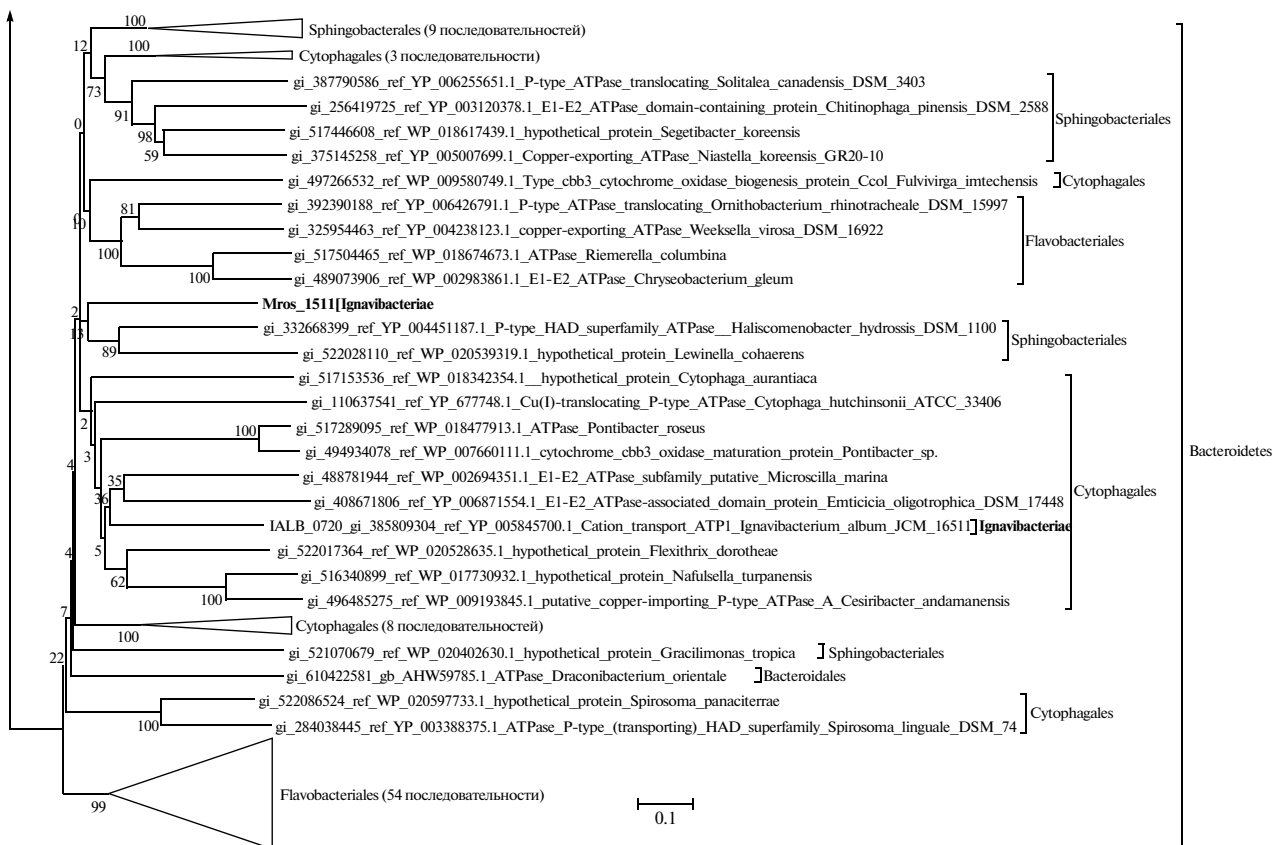


Рис. 1. Окончание.

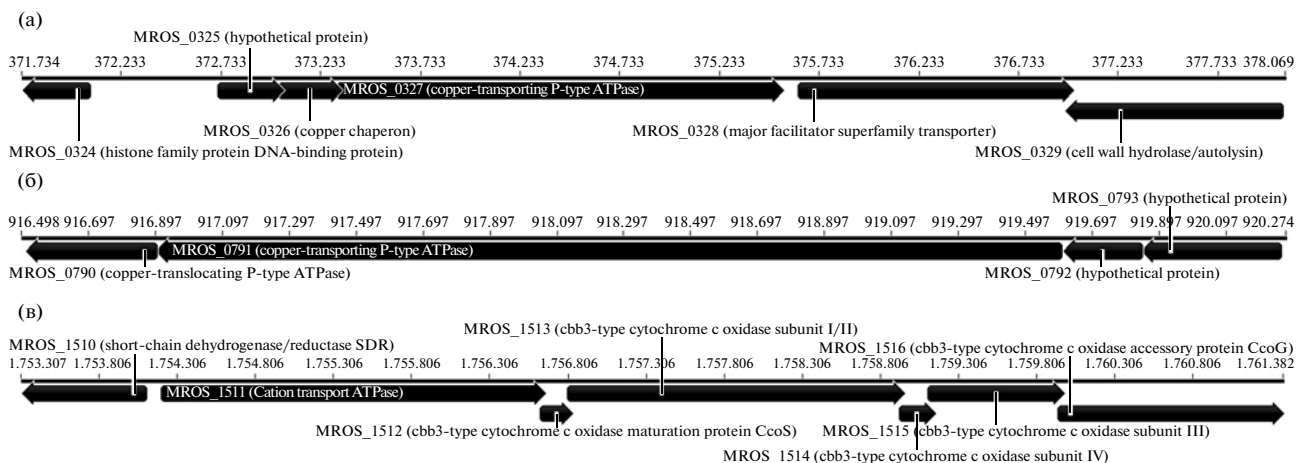


Рис. 2. Генное окружение медных АТФаз MROS_0327 (а), MROS_0791 (б) и MROS_1511 (в). Графическое изображение было выполнено с использованием программного обеспечения Geneious, версия 4.8.5 (<http://www.geneious.com>).

MROS_0326 и транспортером семейства MFS (2.A.1 по TCDB) MROS_0328. Соседние гены АТФазы MROS_0791 и MROS_0790 имеют по одному – купредоксин-подобному – медьсодержащему домену.

Помимо генов, кодирующих медные АТФазы, в геноме были найдены гены двух возможных

транспортеров меди (MROS_0577 и MROS_0773), переносящих Cu^{2+} за счет антипорта с протонами (семейство RND, 2.A.6). На принадлежность данных белков к “RND-efflux” транспортерам указывают специфические мотивы в консервативной области трансмембранной α -спирали IV (ТМН IV) (Рис. 3). Основная роль RND-транспортеров

1. AcrB (HAE5)	N T L T M F G M V L	A I G L L V	D D A I V V	V E N
2. CzcA (HME1)	N L M S L G - - A L	D F G I I I	D G A V V I	V E N
3. SilA (HME4)	N I M S L G G I A I	A V G A M V	D A A V V M	I E N
4. CusA (HME4)	N I M S L S G I A I	A V G A M V	D A A I V M	I E N
5. HP0969 (HME3b)	N L M S L G G L V I	A I G M L I	D S A V V V	V E N
6. MROS_0773	N I M S L G G I A I	A I G A M V	D A S I V L	V E N
7. MROS_0577	N L M S F G G L A I	A I G M M V	D G S I V L	V E N
8. Altr5294 (HAE4)	N V F S L G G L A L	G V G I V V	D N S I V M	L E N
9. MROS_0481	N I I S M A G L A L	A V G M L V	D N S I V V	L E N
10. MROS_1253	N I I S L S S L S I	A V G L V V	D D A I V I	L E N

Рис. 3. Характерные последовательности (signatures) участка IV трансмембранной α -спирали [7] разных типов RND-транспортеров из *Meliolibacter roseus* (MROS_0773, MROS_0577, MROS_0481 и MROS_1253). 1. Группа 5 RND-транспортеров гидрофобных и амфифильных соединений (HAE5) на примере AcrB *E. coli*; 2. Группа 1 RND-транспортеров тяжелых металлов (HME1) на примере CzcA (кобальт–цинк–кадмий) *Ralstonia metallidurans*; 3. Группа 4 RND-транспортеров тяжелых металлов (HME4) на примере SilA *Salmonella typhimurium*; 4. Группа 4 RND-транспортеров тяжелых металлов (HME4) на примере CusA *E. coli*; 5. Группа HME3b RND-транспортеров тяжелых металлов (HME3b) на примере HP0969 *Helicobacter pylori*; 6. MROS_0773; 7. MROS_0577; 8. Группа 4 RND-транспортеров гидрофобных и амфифильных соединений (HAE4) на примере Altr5294 *Nostoc* sp.; 9. MROS_0481; 10. MROS_1253.

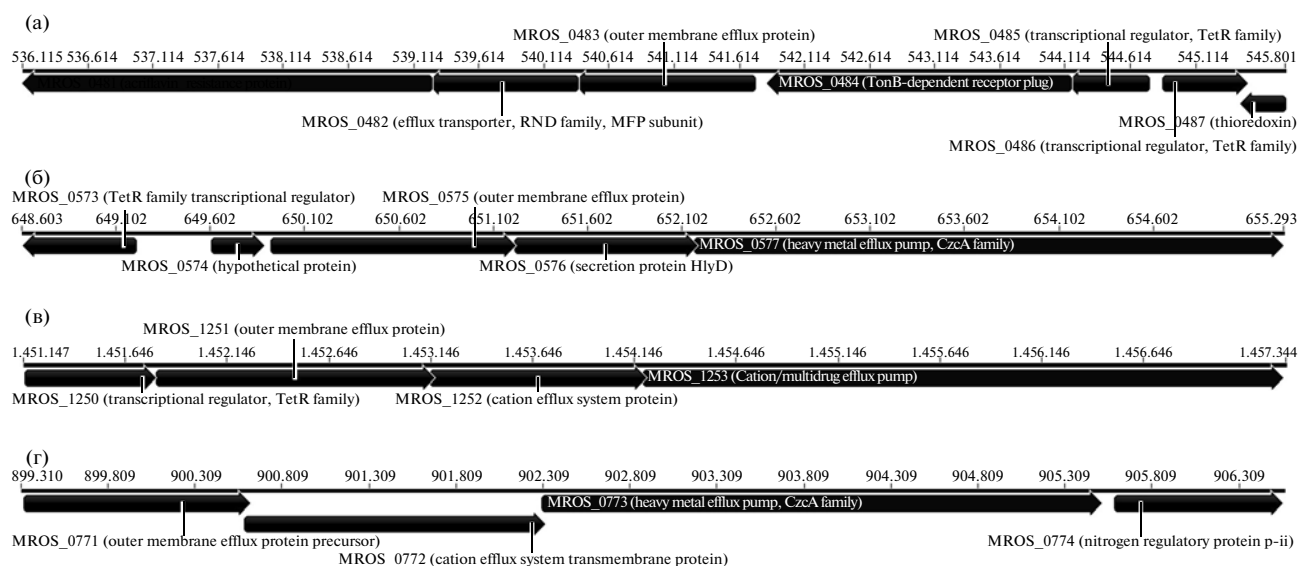


Рис. 4. Генное окружение RND-транспортеров MROS_0481 (а), MROS_0577 (б), MROS_1253 (в) и MROS_0773 (г). Графическое изображение было выполнено с использованием программного обеспечения Geneious, версия 4.8.5 (<http://www.geneious.com>).

заключается в переносе меди из периплазматического пространства наружу, как это было показано для белков *E. coli*, кодируемых *cusCFBA* опероном [17]. Еще у двух родственных белков (MROS_0481 и MROS_1253) характерных мотивов в районе ТМН IV не было обнаружено. По-видимому, эти белки относятся к группе HAE4 семейства HAE (hydrophobic and amphiphilic compounds efflux – эффлюкс-транспортеры гидрофобных и амфифильных соединений 2.A.6.2, 2.A.6.5, 2.A.6.7) RND-транспортеров, переносящих органические молекулы [7].

Гены, кодирующие все четыре перечисленные в предыдущем абзаце транспортера, входили в состав оперонов, содержащих также гены факторов модификации мембран MFP (membrane fusion protein) и OMF (outer membrane factor) (рис. 4), что может указывать на локализацию транспортеров на внешней мембране. Все белки оперонов, содержащих транспортеры MROS_0481 и MROS_0577, имели наибольшее сходство с таковыми из *Caldithrix abyssii*, причем сходство самих транспортеров с ближайшими гомологами составляло 58 и 72%. Ближайшими гомологами всех белков из опе-

ронов, содержащих MROS_0773 и MROS_1253, были белки из *I. album*, при этом сходство самих транспортеров с ближайшими родственниками составляло 81 и 82%, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали наличие в двух геномах представителей *Ignavibacteriae* генов кодирующих медьсодержащие белки. Эти гены имеют гомологов у многочисленных представителей *Bacteroidetes* (табл. 1). У многих представителей *Chlorobi* есть гомологи генов лакказ, у некоторых есть неполные кластеры генов медьсодержащих цитохром *c*-оксидаз *ccb₃*-типа, и только у одного — *Chlorobaculum parvum* — есть неполный кластер генов цитохром *c*-оксидазы *cc(o/b)₃*-типа. В нем отсутствуют гены двух субъединиц фермента, что указывает на возможную потерю ранее существовавшего генного кластера кислородредуктазы *cc(o/b)₃*-типа представителями *Chlorobi*. У представителей *Ignavibacteriae* данный генный кластер имеет ту же структуру, что и у представителей протеобактерий *Desulfovibrionales* и *Desulfuromonadales* [8]. Для *Desulfovibrio vulgaris* показано участие цитохром *c*-оксидазы *cc(o/b)₃*-типа в генерации трансмембранного потенциала [18]. С учетом высокого уровня сходства аминокислотных последовательностей медьсодержащих субъединиц оксидаз *M. roseus* и *I. album* с таковыми у *D. vulgaris* (47 и 45% соответственно) можно предположить, что данный фермент участвует в энергетическом метаболизме представителей *Ignavibacteriae*.

Генами медьсодержащих субъединиц кислородредуктаз *ccb₃*-типа обладают пять представителей филума *Chlorobi* (*Chlorobium phaeobacteroides*, *C. limicola*, *C. chlorochromatii*, *Chlorobaculum parvum* и *Pelodictyon phaeoclathratiforme*), однако у всех у них генный кластер неполный. Помимо этого, у *C. ferrooxidans* есть 1 ген медной субъединицы кислородредуктазы, однако его нельзя с достоверностью отнести к какому-либо типу. В соответствии с высказанной гипотезой о “вторичном” анаэробии *Chlorobi* возможным эволюционным сценарием является потеря генов как вспомогательных, так и каталитических медьсодержащих субъединиц организмами, заселившими новую — анаэробную — экологическую нишу, тогда как бактерии, эволюционировавшие от общего предка *Ignavibacteriae/Chlorobi* в аэрируемой среде, сохранили полный набор генов, необходимых для аэробного дыхания.

Следует отметить, что для нормального функционирования купропротеома необходимо наличие у организма разветвленной системы гомеостаза меди, участвующей как в процессинге медьсодержащих ферментов, так и в контроле внутриклеточ-

ного содержания меди при росте в среде, где соединения Cu^{2+} растворимы. Медь легко образует комплексы и хелатируется различными органическими соединениями. Поэтому концентрация “биодоступной” меди зависит от состава питательной среды, использованной для экспериментов по определению устойчивости. Например, в экспериментах по определению максимальной концентрации меди, допускающей рост толерантных к ней изолятов *Desulfovibrio*, концентрация Cu(II) в растворе снижалась с 200 до 150 мг/л сразу же после внесения CuSO_4 в пресноводную среду Видделя с лактатом [19]. Таким образом, корректное сравнение результатов экспериментов по определению порога устойчивости, полученных в разных лабораториях с использованием разных сред, невозможно. В целом максимальная расчетная концентрация Cu^{2+} (30 мг/л), позволяющая расти *M. roseus*, составляет величину одного порядка с полученными для нетолерантных к меди, но обладающих медными оксидоредуктазами представителей сульфатредуцирующих бактерий родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* [20], выращенных на той же пресноводной среде Видделя. Те же концентрации растворенной меди, составляющие несколько десятков мг/л, характерны для анаэробных условий глубинной биосферы. Ингибирующее действие 50 мг/л Cu^{2+} на рост *M. roseus* позволяет предположить, что обнаруженные в геноме *M. roseus* транспортеры меди либо обладают к ней высоким сродством и начинают работать при очень небольших ее концентрациях, либо могут выполнять иные функции, помимо обеспечения устойчивости к этому металлу, например, функцию ассимиляции Cu^{2+} для биосинтеза медьсодержащих ферментов. Подробный анализ последних систем гомеостаза меди, обнаруженных у *M. roseus*, представлен ниже.

Основными элементами, транспортирующими ионы меди из/внутри клетки, являются выявленные у представителей всех трех доменов жизни медь-транспортирующие АТФазы Р-типа (семейство 3.А.3 по базе данных TCDB) [18]. В геноме *M. roseus* было обнаружено 3 медные АТФазы (медь-транспортирующие АТФазы), относящиеся к топологическому типу I АТФаз Р-типа (семейство 3.А.3.5, по TCDB).

Медная АТФаза MROS_1511 находится в опероне с *ccb3* цитохром *c*-оксидазой (MROS_1513-1515), а также генами, связанными с ее процессингом (рис. 2в). Это наводит на мысль о том, что АТФаза MROS_1511 транспортирует Cu не из цитоплазмы, а в обратном направлении, и помимо транспорта, возможно, участвует в сборке цитохром *c*-оксидазы. Существование АТФаз, транспортирующих медь в противоположных направлениях, известно для некоторых грамположительных бактерий. Классическим примером является транс-

порт меди в *Enterococcus hirae*, где АТФаза CopA отвечает за перенос ионов меди в цитоплазму, а АТФаза CopB — за экскрецию Cu в периплазматическое пространство [3]. Филогенетический анализ показал, что медная АТФаза MROS_1511 вместе с IALB_0720 находится внутри кластера гомологичных белков из представителей *Bacteroidetes*, однако принадлежат к удаленным друг от друга ветвям этого кластера (рис. 1). Оба белка, по-видимому, выполняют схожую функцию, так как их гены находятся в оперонах с цитохром *c*-оксидазой. Близкое родство MROS_1511 и IALB_0720 с АТФазами различных ветвей *Bacteroidetes*, вероятно, является следствием независимых горизонтальных переносов данных генов *M. roseus* и *I. album*, причем произошло это, по-видимому, довольно давно, до разделения филума *Bacteroidetes* на 4 класса.

MROS_0791, в отличие от MROS_1511, является единственным представителем из игнавибактерий внутри обособленного кластера белков, что указывает на возможность горизонтального переноса MROS_0791 к *M. roseus* (Рис. 1) или его ближайшему предку после их разделения с *I. album*, так как в геноме последнего не было обнаружено близких гомологов этого белка. Функция MROS_0791, очевидно, связана с транспортом ионов меди (предположительно, экспортом), и, возможно, ионов серебра. Доменная структура MROS_0791 характерна для многих известных медь-транспортирующих АТФаз. Соседний ген MROS_0790 (рис. 2б) содержит медь-связывающий купредоксин-подобный домен и, по-видимому, также вовлечен в транспорт меди, однако его роль в точности не ясна. Возможно, он действует по аналогии с медным шапероном CopZ *cop*-оперона *Enterococcus hirae* [2]. В геноме *I. album* гомологи MROS_0790 не обнаружены.

MROS_0327 и IALB_2222 составляют хорошо обособленную ветвь на дереве медных АТФаз, при этом ближайшая этому кластеру последовательность принадлежит представителю *Bacteroidetes*. Это, наряду с отсутствием других близких родственников из *Bacteroidetes*, позволяет предположить вертикальное наследование генов MROS_0327 и IALB_2222. Геномное окружение АТФазы MROS_0327 — медный шаперон MROS_0326, транспортер семейства MFS MROS_0328 (рис. 2а) — характерно для АТФаз, выполняющих функцию детоксификации.

Таким образом, филогенетический анализ всех трех медных АТФаз *M. roseus*, а также их геномное окружение указывают на разное происхождение и различные роли в метаболизме бактерии. Две из них с большой долей вероятности были наследованы горизонтально, что не удивительно, так как показано, что АТФазы Р-типа подвержены горизонтальному переносу между прокариотными ор-

ганизмами [18]. Вероятно, приобретенные АТФазы были получены из микроорганизмов, относящихся к филумам *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, которые распространены в местах обитания *M. roseus*, что благоприятствует горизонтальному переносу между ними. Следует учитывать также способность *M. roseus* образовывать биопленки, что является еще одним дополнительным фактором, способствующим такому переносу [21]. Предположительно, ген MROS_0327 наследовался вертикально от общего предка *Ignavibacteriae*, *Chlorobi* и *Bacteroidetes*, при этом отсутствие близких гомологов MROS_0327 у представителей последних двух филумов (за исключением одной последовательности из *Nafulsella turpanensis*) говорит о произошедшей у них потере этих генов в ходе эволюции. Сохранение предполагаемого оперона системы детоксификации Cu²⁺ у *M. roseus* отражает важность поддержания гомеостаза меди в условиях геотермальных вод, характеризующихся повышенным содержанием тяжелых металлов. Однако следует отметить, что у *Bacteroidetes* известно довольно много медных АТФаз, что может быть следствием как метаболического разнообразия, так и большого числа секвенированных геномов представителей данного филума. В то же время, до сих пор известно всего лишь 15 гомологов медь-транспортирующих АТФаз в 12 общедоступных (21.10.2014 г.) геномах представителей *Chlorobi*. Все эти гомологи филогенетически удалены от игнавибактериальных генов медных АТФаз, при этом ни одна из них не имеет медьсодержащих цитохром *c*-оксидаз в своем геномном окружении, что подтверждает участие этих АТФаз в детоксификации (выведении) ионов меди, но не в процессинге оксидоредуктаз. Это соответствует строго анаэробному метаболизму *Chlorobi*. Ту же функцию осуществляют и RND-транспортеры, обнаруженные как у представителей *Ignavibacteriae*, так и у представителей *Chlorobi*.

В целом, выявление у *M. roseus* медных оксидоредуктаз (лакказы, цитохром *c*-оксидазы *cc(o/b)_{o3}* и *ccb₃* типов) и нескольких систем гомеостаза меди, а также филогенетический анализ их геномных детерминант позволяют предположить, что предковые формы *Ignavibacteriae* возникли в аэробных экологических нишах, содержащих растворимые соединения меди. Таким образом, наши данные соотносятся с предположением об “аэробных корнях” *Ignavibacteriae*, чем подтверждают верность отделения данного филума от общего с филумом *Chlorobi* предка, имевшего на момент обособления *Ignavibacteriae* аэробный тип метаболизма. Такой эволюционный сценарий предполагает возникновение “вторичного анаэробнобиоза” у представителей филума *Chlorobi*, которые в ходе эволюции от общего предка с *Ignavi-*

bacteriae кардинальным образом изменили тип метаболизма, заняв новую экологическую нишу [22].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках программы ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.” (Государственный контракт № 14.В37.21.0847 от 07.09.2012 и № 11.519.11.2004), Грант правительства РФ 14.Z50.31.0011 и гранты РФФИ 12-04-01635-а, 12-04-31343-мол_а, 13-04-02157-а и 13-04-92606-КО_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ridge P.G., Zhang Y., Gladyshev V.N. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 1. e1378.
- Saito M.A., Sigman D.M., Morel F.M.M. The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: the co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean–Proterozoic boundary? // Inorg. Chim. Acta. 2003. V. 356. P. 308–318.
- Solioz M., Stoyanov J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae* // FEMS Microbiol. Rev. 2003. V. 27. P. 183–195.
- Jordan K.I., Natale D.A., Koonin E.V., Galperin M.Y. Independent evolution of heavy metal-associated domains in copper chaperones and copper-transporting ATPases // J. Mol. Evol. 2001. V. 53. № 6. P. 622–633.
- Magnani D., Solioz M. How bacteria handle copper // Molecular Microbiology of Heavy Metals / Eds. Nies D.H., Silver S. Heidelberg: Springer, 2007. P. 259–285.
- Saier M.H.Jr., Yen M.R., Noto K., Tamang D.G., Elkan C. The transporter classification database: recent advances // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. Database issue. P. D274–D278.
- Nies D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // FEMS Microbiol. Rev. 2003. V. 27. № 2–3. P. 313–339.
- Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrillov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum “*Ignavibacteriae*” // Environ. Microbiol. 2013. V. 5. № 6. P.1759–1771.
- Gupta R.S., Lorenzini E. Phylogeny and molecular signatures (conserved proteins and indels) that are specific for the *Bacteroidetes* and *Chlorobi* species // BMC Evol. Biol. 2007. V. 7. P. 71–89.
- Iino T., Mori K., Uchino Y., Nakagawa T., Harayama S., Suzuki K.I. *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria // IJSEM. 2010. V. 60. № 6. P. 1376–1382.
- Liu Z., Frigaard N.-U., Vogl K., Iino T., Ohkuma M., Overmann J., Bryant D.A. Complete genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum *Chlorobi* // Front. Microbio. 2012. V. 3. P. 185–200.
- Solioz M., Vulpe C. CPX-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals // TIBS. 1996. V. 21. № 7. P. 237–241.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 2000. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.
- Ying H., Beifang N., Ying G., Limin F., Weizhong L. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 680–682.
- Chan H., Babayan V., Blyumin E., Gandhi C., Hak K., Harake D., Kumar K., Lee P., Li T.T., Liu H.Y., Tung Lo T.C., Meyer C.J., Stanford S., Zamora K.S., Saier M.H. Jr. The P-type ATPase superfamily // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 19. № 1–2. P. 5–104.
- Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 13. P. 3804–3812.
- Lamrabet O., Pieulle L., Aubert C., Mouhamar F., Stocker P., Dolla A., Brasseur D. Oxygen reduction in the strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: characterization of two membrane-bound oxygen reductases // Microbiology (UK). 2011. V. 157. P. 2720–2732.
- Karnachuk O.V., Sasaki K., Gerasimchuk A.L., Sukhanova O., Ivashenko D.A., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., Tuovinen O.H. Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates // Geomicrobiol. J. 2008. V. 25. № 5. P. 219–227.
- Karnachuk O.V., Kurochkina S.Yu., Nicomrat D., Frank Yu.A., Ivashenko D.A., Phyllipenko E.A., Tuovinen O.H. Copper resistance in *Desulfovibrio* strain R2 // Antonie van Leeuwenhoek. 2003. V. 83. № 1. P. 99–106.
- Madsen J.H., Burmølle M., Hansen L.H., Sørensen S.J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2012. V. 65. № 2. P. 183–195.
- Liu Z., Klatt C.G., Ludwig M., Rusch D.B., Jensen S.I., Köhl M., Ward D.M., Bryant D. “*Candidatus Thermochlorobacter aerophilum*”: an aerobic chlorophototrophic member of the phylum *Chlorobi* defined by metagenomics and metatranscriptomics // ISME J. 2012. V. 6. P. 1869–1882.
- Zuckerandl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins // Evolving Genes and Proteins / Eds. Bryson V. and Vogel H.J. New York: Academic Press, 1965. P. 97–166.

Diversity of Cuproproteins and Copper Homeostasis Systems in *Melioribacter roseus*, a Facultatively Anaerobic Thermophilic Member of a New Phylum *Ignavibacteriae*

O. V. Karnachuk^{a, 1}, S. N. Gavrilov^b, M. R. Avakyan^a, O. A. Podosokorskaya^b, Yu. A. Frank^a,
E. A. Bonch-Osmolovskaya^b, and I. B. Kublanov^{b, 2}

^a Department of Plant Physiology and Biotechnology, Tomsk State University, Tomsk, Russia

^b Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7, k. 2, Moscow, 117312 Russia

Received November 11, 2014

Abstract—The genome of *Melioribacter roseus*, one of two members of the recently described phylum *Ignavibacteriae*, was searched for the genes encoding proteins associated with copper transport or containing copper as cofactors, and the effect of Cu²⁺ concentration in the medium on *M. roseus* growth was investigated. Genomic analysis revealed a variety of copper-containing oxidoreductases in this facultative anaerobe. Three ATPases responsible for copper transport were identified. One of them (MROS_1511) was probably involved in assembly of the copper-containing cytochrome *c* oxidase, while two others (MROS_0327 and MROS_0791) probably carried out a detoxification function. The presence of several copper-containing oxidoreductases and copper homeostasis systems in *M. roseus* is in agreement with the previously hypothesized origin of the phylum *Ignavibacteriae* from an aerobic ancestor common with those of *Bacteroidetes* and *Chlorobi*.

Keywords: genomic research, cuproproteins, copper homeostasis, copper-containing ATPases, *Melioribacter roseus*, *Ignavibacteriae*

¹ Corresponding author; e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

² Corresponding author; e-mail: kublanov.ilya@gmail.com