

ПОЛИЩУК Л.В.[✉], ЛУКЬЯНЧУК В.В.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net
[✉]LVPolishchuk@ukr.net, (044) 522-67-62, (066) 641-97-01

ОРГАНИЗАЦИЯ crt-КЛАСТЕРОВ ШТАММОВ ИЗ *STREPTOMYCES GRISEUS* ГРУППЫ

Каротиноиды – это естественные пигментирующие соединения, которые производятся эукариотами и прокариотами [1]. Как у фотосинтезирующих, так и у нефотосинтезирующих организмов, каротиноиды, в основном, служат для нейтрализации вредного воздействия свободных радикалов и других агрессивных условий окружающей среды. Организмы, продуцирующие каротиноиды, окрашены в желтый, оранжевый или красный цвет [1].

Способность стрептомицетов синтезировать каротиноиды хорошо известна [2, 3]. Каротиногенезис был обнаружен у большого количества штаммов стрептомицетов, представителей группы (а clade – таксон низшего ранга) *Streptomyces griseus*, которая является наибольшей кладой в роду *Streptomyces*.

Конститутивный синтез каротиноидов был обнаружен у штаммов из группы *Streptomyces griseus* или их производных (например, *S. chrysomallus* var. *carotenoides*, *S. globisporus* 1912, *S. mediolani* 2215174 FI) [2, 3–7]. Криптические кластеры crt-генов были идентифицированы в геномах других многочисленных штаммов из этой клады (*S. setonii* (*griseus*) ISP5395, *S. griseus* IFO13350, *S. globisporus* 1912) [3, 4, 6].

Цель данного исследования – выявить сходство и различие организации crt-кластеров ряда штаммов из группы *Streptomyces griseus* посредством проведения сравнительного анализа их первичного строения и генетических карт штаммов.

Материалы и методы

Исследовали строение кластеров crt-генов 17 штаммов стрептомицетов: *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493, 8545929 п. н.), *S. griseus* XylebKG-1 (GL877172, 8727767 п. н.), *S. fulvissimus* DSM 40593 (CP005080, 7905758 п. н.), *S. globisporus* C-1027 (CP013738, 7608611 п. н.), *Streptomyces* sp. CFMR 7 (CP011522, 8207742 п. н.), *Streptomyces* sp. SirexAA-E (CP002993, 7414440 п. н.), *Streptomyces* sp. S10(2016)

(CP015089, 9083372 п. н.), *S. pratensis* ATCC 33331 (CP002475, 7337497 п. н.), *Streptomyces* sp. PAMC26508 (CP003990, 7526197 п.н.), *S.pristinaespiralis* HCCB 10218 (CP011340, 8532592 п. н.), *Streptomyces* sp. Mg1 (CP011664, 7868178 п. н.), *S. griseus* DSM 40236 (FNTW01000002, 5991967 п. н.), *Streptomyces* sp. NTK 937 (JJOB01000001, 7003153 п. н.), *S. agglomeratus* 5-2-6 (MEHN01000001, 8348226 п. н.), *S. subbrutilus* 10-1-1 (MENK01000001, 7295351 п. н.), *S. griseus* BIG105 (MDKB01000001, 1709508 п.н.); crt-кластер *S. globisporus* 1912 (KM349312.1, 10020 п. н.) из базы данных Genome (Chromosome) сервера NCBI [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/].

Сравнительный анализ первичной структуры crt-кластеров стрептомицетов проводился с помощью компьютерных программ BLAST (blastn и bl2seq) на сервере NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast].

В качестве референсных использовались нуклеотидные последовательности *S. griseus* NBRC 13350 (AP009493): 16S рНК-гена (rrn1, 2102295 п. н. – 2103827 п. н.) и crt-кластера (crt1, 8206573 п. н. – 8214963 п. н.).

Результаты и обсуждение

Первичная структура crt-генов и организация crt-кластеров многих *Streptomyces* spp. представлены в Интернет-базах данных и источниках научной литературы. Как правило crt-кластеры состоят из семи генов, которые организованы в два полицистрона (crtEIBV и crtUTY). Опероны в crt-кластерах стрептомицетов имеют или сходящуюся (например, *S. griseus* NBRC13350), или расходящуюся ориентации (*S. avermitilis* MA-4680) [2]. Установлены ферменты, синтез которых определяют гены кластера и их функции в продукции каротиноидов: CrtE кодирует геранилгеранил пирофосфат синтазу; CrtI – фитоин дегидрогеназу; CrtB – фитоин синтазу; CrtV – метилтрансферазу; CrtU – бета-каротин дегидрогеназу; CrtT – метилтрансферазу; CrtY – ликопин синтазу. Установ-

лено, что только пять генов *crt*-кластеров кодируют ферменты, необходимые для биосинтеза каротиноидов. Участие энзимов *CrtV* и *CrtT* в каротиногенезе на данный момент не показано [2].

Для наших исследований организации *crt*-кластеров штаммов отобрали штаммы как принадлежащие к кладе *S. griseus*, так и тех которые могут быть вероятными членами ее. При отборе штаммов в качестве референсной использовали первичную структуру 16S рРНК-гена штамма *S. griseus NBRC13350*. Идентичность выше 97,8 % структур 16S рРНК штаммов стрептомицетов считается показателем принадлежности их к одной кладе [8].

Первоначально для исследований было отобрано 45 штаммов стрептомицетов, первичная структура 16S рРНК-генов которых идентична на 97,8–100 % аналогичному гену *S. griseus NBRC 13350*. У всех 16S рРНК-генов показатели перекрытия (Query cover) и значимость сходства (E value) гомологичных последовательностей были максимально возможными (соответственно 100 % и 0).

В результате изучения генетических карт отобранных штаммов стрептомицетов было выбрано 16 (35,6 %), в геномах которых содержатся *crt*-кластеры.

В то время как большинство геномов содержат по 1 кластеру *crt*-генов, в геномах 2 штаммов (*S. griseus DSM 40236* и *S. globisporus C-1027*) содержатся по 2 *crt*-кластера, а в геноме *S. griseus NBRC 13350* присутствуют 3 кластера. В соответствии с нашими исследованиями нуклеотидных последовательностей хромосомы штамма *S. globisporus 1912* в его геноме содержатся 2 кластера *crt*-генов.

Изучением строения *crt*-кластеров выбранных 16 штаммов стрептомицетов установлено, что большинство из них (кластеры 15 штаммов) включают по 7 генов. Однако *crtE*-гены в кластерах 2 штаммов охарактеризованы, как псевдогены – нефункциональные аналоги структурных генов. Кроме того, геном 1 штамма содержит *crt*-кластер из 6 генов – в них отсутствует *crtE*-ген.

Определение *in silico* (blastn) гомологии строения *crt*-кластеров стрептомицетов и *crt1* кластера *S. griseus NBRC 13350* показало наличие значительных фрагментов ДНК (с перекрытием (Query cover) более чем 91 %) со степенью идентичности (Identity) выше 73 %. Показатели достоверности выравниваний (E value) были

максимальными (0) при анализе *in silico* последовательностей *crt*-кластеров всех штаммов (табл. 1).

В базах данных сервера NCBI представлена информация о первичной структуре фрагмента хромосомы (scaffold1) *S. griseus BIG105* (MDKB01000001). На данном этапе изучения нуклеотидной последовательности данного штамма еще не построена его генетическая карта. Наш анализ *in silico* первичной структуры хромосомы *S. griseus BIG105* показал наличие последовательности (1207394 п. н. – 1215792 п. н.), гомологичной *crt1* кластеру *S. griseus NBRC 13350*. Показатели гомологичности последовательностей были значительными (табл. 2). Вся последовательность (100 %) этого же скаффолда 1 (59 п. н. – 1591 п. н.) гомологична на 99,9 % структуре 16S рРНК-гена (*trnA1*) *S. griseus NBRC 13350*.

Поиск *in silico* в базе данных Genome (Chromosome) выявил 45 штаммов, которые были отобраны по степени идентичности первичных структур их 16S рРНК-генов последовательности *trn1*-гена, что необходимо для членов *S. griseus* группы. В геномах 17 из них (37,7 %) содержатся *crt*-кластеры. Наши исследования проведены на штаммах как признанных членов *S. griseus* группы (например, *S. griseus NBRC 13350*, *S. griseus DSM 40236*, *S. griseus XylebKG-1*, *S. fulvissimus DSM 40593*, *S. globisporus C-1027*, *S. griseus BIG105*), так и возможных ее членов (*Streptomyces sp. S10(2016)*, *Streptomyces sp. Mg1*, *S. pratensis ATCC 33331*, *S. globisporus 1912*).

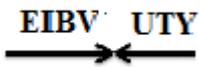
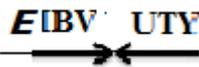
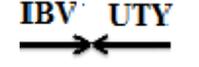
Изучение строения *crt*-кластеров этих штаммов стрептомицетов выявило общность в схемах их организации. Все они состоят из 2 конвергентных оперонов, которые в большинстве кластеров (16 из 17 рассмотренных) объединяют 7 *crt*-генов. Необходимо отметить, что функционально способными могут быть только кластеры 15 штаммов (табл. 2): так как *crt*-кластеры 2 штаммов содержат псевдогены *crtE*-генов, а в одном кластере аналогичный ген отсутствует. Показана значительная идентичность (выше 73 %) гомологичных фрагментов кластеров (перекрытие выше 90 %).

У производных ряда штаммов из *S. griseus* клады (*S. griseus NBRC 13350*, *S. globisporus 1912*, *S. griseus (setonii) ISP5395*) выявлен синтез каротиноидов, осуществляемый без дерепрессии внешними индукторами, в то время как исходные штаммы не продуцируют кароти-

ноиды. Как пример можно привести ряд спонтанных и индуцированных мутантов штамма *S. globisporus* 1912 (4Lcp, RVLcp, R3Lcp, 4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt, R3Crt ряд других), которые продуцируют значительные количества каротиноидов при выращивании в обычных условиях культивации, в которых у исходного штамма не выявлено каротиногенеза [6, 9].

Мы предполагаем, что не только первичная структура отдельных генов (16S рНК, гесА, гроВ, гуВ и другие), но и строение кластеров или оперонов (как пример организация crt-кластеров) могут быть использованы в классификации микроорганизмов до таксонов низкого ранга (например, клад).

Таблица 1. Строение кластеров crt-генов стрептомицетов

Схемы организации crt-кластеров	Штаммы стрептомицетов
	<i>S. griseus</i> NBRC13350, <i>S. griseus</i> DSM 40236, <i>S. griseus</i> XylebKG-1, <i>S. fulvissimus</i> DSM 40593, <i>S. globisporus</i> C-1027, <i>S. globisporus</i> 1912, <i>Streptomyces</i> sp. CFMR 7, <i>Streptomyces</i> sp. S10(2016), <i>Streptomyces</i> sp. SirexAA-E, <i>Streptomyces</i> sp. NTK 937, <i>S. agglomeratus</i> 5-2-6, <i>S. pratensis</i> ATCC 33331, <i>Streptomyces</i> sp. PAMC26508
	<i>S. subbrutilus</i> 10-1-1, <i>Streptomyces</i> sp. Mg1
	<i>S. pristinaespiralis</i> HCCB 10218

Примечания: E – нефункциональный аналог crtE-гена, EI – функциональные crt-гены.

Таблица 2. Показатели гомологичности первичного строения crt-кластеров стрептомицетов и референсного crt-кластера *S. griseus* NBRC 13350

Штаммы стрептомицетов	Параметры гомологии crt-кластеров стрептомицетов и референсного crt1		
	Qc	Ev	I
<i>S. griseus</i> DSM 40236	100	0	100
<i>S. griseus</i> XylebKG-1	100	0	99,4
<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593	98	0	85,5
<i>S. globisporus</i> C-1027	99	0	84,9
<i>Streptomyces</i> sp. CFMR 7	99	0	82,5
<i>S. globisporus</i> 1912-2	98	0	80,1
<i>Streptomyces</i> sp. SirexAA-E	98	0	73,2
<i>Streptomyces</i> sp. S10(2016)	95	0	77,0
<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	97	0	75,5
<i>Streptomyces</i> sp. PAMC26508	94	0	75,7
<i>S. pristinaespiralis</i> HCCB 10218	91	0	74,6
<i>S. agglomeratus</i> 5-2-6	96	0	74,3
<i>S. subbrutilus</i> 10-1-1	98	0	74,2
<i>S. pratensis</i> ATCC 33331	96	0	73,8
<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	95	0	75,1
<i>S. griseus</i> BIG105	98	0	77,9

Примечания: Qc – покрытие гомологичных последовательностей (Query cover); E. v. – значимость сходства (E value); I – идентичность (Identity).

Выводы

В crt-кластерах 16 штаммов выявлено протяженные гомологичные фрагменты (перекрывание выше 90 %) со значительной идентичностью (выше 73 %) референсному crt-кластеру *S. griseus* NBRC 13350.

Установлено одинаковую схему организации crt-кластеров 17 исследованных штаммов из *S. griseus* клады: они состоят из 2 конвергентных оперонов, которые в большинстве сво-

ем объединяют 7 crt-генов (исключение – штамм *S. pristinaespiralis* HCCB 10218, crt-кластер которого состоит из 6 генов).

Показано, что функционально способными могут быть только crt-кластеры 15 штаммов: так как кластеры 2 штаммов содержат псевдогены crtE-генов (*Streptomyces* sp. *Mg1*, *S. subbrutilus* 10-1-1), а в кластере штамма аналогичный ген отсутствует.

Литература

1. Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J Bacteriol. – 2005. – V. 187, 5. – P. 1825–1832.
2. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2006. – V. 33, 2. – P. 88–93.
3. Kato F., Hino T., Nakaji A., Tanaka M., Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene *crtS*, whose product is similar to a sigma factor // Mol. Gen. Genet. – 1995. – V. 247. – P. 387–390.
4. Bianchi M.L., Grein A., Julita P., Marnati M.P., Spalla C. *Streptomyces mediolani* (Arcamone et al.) emend. Bianchi et al. and its production of carotenoids // Z. Allg. Mikrobiol. – 1970. – V. 10. – P. 237–244.
5. Нефелова М.В., Свердлова А.Н., Алексеева Л.Н. Эффект органических кислот на биосинтез каротиноидов штаммом *Actinomyces chrysomallus* // Микробиология. – 1978. – V. 47, 2. – С. 208–211.
6. Matselyukh B.P., Matselyukh D.Y., Golembiowska S.L., Polishchuk L.V., Lavrinchuk V.Y. Isolation of *Streptomyces globisporus* and *Blakeslea trispora* mutants with increased carotenoid content // Мікроб. Ж. – 2013. – V. 75, 6. – С. 10–16.
7. Зарецкая М.Ш., Нефелова М.В., Баратова Л.А., Полин А.Н. К вопросу о составе клеточных стенок 2 мутантов *Streptomyces chrysomallus* // Антибиотики. – 1984. – V. 29, 12. – С. 902–906.
8. Rong X., Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species // Int J Syst Evol Microbiol. – 2010. – V. 60, 3. – P. 696–703.
9. Голембіювська С.Л., Полищук Л.В., Коцюк А.Ю., Мацелюх Б.П. Лімітуючі каротиногенез умови культивування мутантів *Streptomyces globisporus* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2016. – V. 33, 1. – С. 29–39.

POLISHCHUK L.V., LUKYANCHUK V.V.

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

ORGANIZATION OF crt-CLUSTERS OF STRAINS FROM THE STREPTOMYCES GRISEUS GROUP

Aim. The purpose of this study was to reveal similarities and differences in structures of crt-clusters of some strains from the *Streptomyces griseus* group. **Methods.** Resources of the server NCBI (programs BLAST: blast and bl2seq and database Genome (Chromosome)) were used for analysis *in silico* of crt-cluster organizations of 17 strains from the *S. griseus* clade. **Results.** Search *in silico* in the database Genome (Chromosome) identified 45 strains that have been selected according to the degree of identity of the primary structures of their 16S rRNA gene sequences *rrn1*-gene necessary for *S. griseus* group members. The genomes of these 17 (37.7 %) strains had crt-clusters. 16 of them consisted of two convergent operons that combined 7 crt-genes. It showed the identity above 73 % of greater homologous fragments of crt-cluster (overlap 90 %). Only the crt-clusters of 15 strains were theoretically capable to synthesize carotenoids because crt-clusters of two strains (*Streptomyces* sp. *Mg1*, *S. subbrutilus* 10-1-1) were with mutated crtE-genes and one cluster from the *S. pristinaespiralis* HCCB 10218 genome had no the crtE-gene. **Conclusions.** It was found the same scheme of crt-clusters organization in 17 studied strains from the *S. griseus* clade: they consisted of two convergent operons, which were mostly combined from 7 crt-genes (except was the strain *S. pristinaespiralis* HCCB 10218, whose cluster concluded of 6 genes).

Keywords: crt-cluster, organization of cluster, strain, genome, search *in silico*.