



УДК 575.24:582.282.23

Г. М. Шавловский, Н. Н. Стенчук, Б. В. Кшановская

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ МУТАЦИИ В ЛОКУСЕ RIB1 НА БИОСИНТЕЗ РИБОФЛАВИНА У *PICHA GUILLIERMONDII*

Селекционирован мутант rib1-86 P. guilliermondii, у которого рибофлавинзависимость супрессируется регуляторной мутацией rib81, но не таковой rib80. Двойной мутант rib1-86 rib81 характеризуется низким уровнем активности ГТФ-циклогидролазы, синтез которой слабо регулируется железом. По-видимому, мутация rib1-86 лежит в промоторной области гена RIB1, кодирующего ГТФ-циклогидролазу.

Введение. Биосинтез рибофлавина (РФ) у дрожжей *P. guilliermondii* регулируется двумя генами негативного типа действия *RIB80*, *RIB81* и двумя — позитивного — *RIB83*, *RIB84* [1—3]. Дефицит железа в среде, а также мутации *rib80* и *rib81* вызывают дерепрессию биосинтеза большинства ферментов флавиногенеза и, как следствие, сверхсинтез РФ дрожжами. Мутанты *rib83* и *rib84* неспособны к сверхсинтезу этого витамина в условиях дефицита железа.

До сих пор не удалось селекционировать мутанты дрожжей с поврежденными промоторными зонами структурных генов биосинтеза РФ. На основе работ по изучению регуляции биосинтеза изо-1-цитохрома *c* и других дрожжевых ферментов известно, что в этих зонах находится несколько локусов (UAS, TATA, I), являющихся акцепторами различных регуляторных сигналов и эффективно влияющих на уровень экспрессии структурного гена [4]. Поэтому выделение мутантов с поврежденными элементами промотора является важной предпосылкой создания модели регуляции экспрессии исследуемого гена.

В настоящем сообщении приводятся данные о выделении мутанта *rib1-86 P. guilliermondii* с нарушенной регуляцией флавиногенеза, у которого, по-видимому, повреждена промоторная зона гена *RIB1*, кодирующего ГТФ-циклогидролазу.

Материалы и методы. Генотипы использованных в работе штаммов представлены в таблице. Культуры дрожжей выращивали в синтетической модифицированной среде Беркгольдера. Состав среды и методы генетического анализа описаны ранее [5]. Среду от металлов очищали с помощью 8-оксихинолина [6]. Биомассу дрожжей определяли турбидиметрически на фотоэлектроколориметре ФЭК-56М (кувета 3 мм, светофильтр № 6). Концентрацию РФ в среде измеряли флуориметрически на приборе ЭФ-3М. Активность ГТФ-циклогидролазы и РФ-синтазы определяли, используя известные методы [7, 8]. В таблице представлены средние величины, полученные в двух — трех экспериментах.

Результаты и обсуждение. Для выделения новых мутантов с дефектом позитивного контроля биосинтеза РФ применяли в качестве исходного штамм *S131/6*, который из-за наличия у него мутации *rib81* способен к сверхсинтезу РФ в условиях оптимального для роста обеспечения железом (см. таблицу). Клоны с резко сниженной интенсивно-

© Г. М. ШАВЛОВСКИЙ, Н. Н. СТЕНЧУК, Б. В. КШАНОВСКАЯ, 1991

Флавиногенез, активность ГТФ-циклогидролазы и РФ-синтазы, регуляторных мутантов *P. guilliermondii*

Штамм	Генотип	Концентрация железа в среде, мг/л	РФ среды, мг/г клеток	Удельная активность, Е/мг белка·10 ⁻⁵	
				ГТФ-цикло-гидролаза	РФ-синтаза
S131,6	<i>rib81 met-1</i>	0,2	1,1	11,0	—
		0,01	25,6	13,8	—
LV124	<i>rib1-86 rib81 met-1</i>	0,2	0,02	0,4	9,9
		0,01	0,01	0,2	35,8
LV166	<i>rib1-86 ade2-19 met-1</i>	0,2	—	0,1	3,0
		0,01	—	0,1	14,8
LV166-8	<i>rib1-86 rib81 ade2-19 met-1</i>	0,2	0,02	0,2	11,5
		0,01	0,17	0,1	16,3
LV172	<i>rib1-86 rib80 rib81 ade2-19 met-1</i>	0,2	0,03	—	—
		0,01	0,09	—	—
ATCC9058	Дикий тип	0,2	0,10	2,7	2,0
		0,01	14,4	14,7	19,8

Примечание. *ade2*, *met* — мутации, обуславливающие аденин- и метионинзависимость соответственно; знак «—» — не определяли.

стью биосинтеза РФ отбирали визуально после подрачивания мутагенезированной N-метил-N'-нитро-N'-нитрозогуанидином культуры этого штамма на агаризованной среде. Последующее выращивание их в дефицитной по железу жидкой среде (0,01 мг Fe/л) позволило отобрать 35 мутантов, неспособных к сверхсинтезу РФ в этих условиях. В коллекции полученных мутантов оказался один (LV124), у которого это свойство вызвано мутацией, комплементирующей идентифицированные ранее мутации *rib83* и *rib84*. Очевидно, неспособность к сверхсинтезу РФ штамма LV124 вызвана нарушением механизма дерепрессии синтеза ферментов флавиногенеза. Определение активности ГТФ-циклогидролазы и РФ-синтазы показало (см. таблицу), что в условиях дефицита железа дерепрессирована только последняя из них.

Для разделения новой регуляторной мутации и мутации *rib81* штамм LV124 скрестили со штаммом дикого типа и проанализировали характер мейотического расщепления у полученного гибрида. Неожиданным было то, что среди сегрегантов обнаружены не только таковые с фенотипами штаммов S131/6 и LV124, но и РФ-зависимые ауксотрофы. Результаты гибридизации таких РФ-зависимых сегрегантов с РФ-зависимыми мутантами генотипов *rib1—rib7*, дефектных по соответствующим структурным генам биосинтеза РФ [5], показали, что новая мутация комплементирует с мутациями во всех структурных генах, кроме *rib1*, и, следовательно, локализована в гене *RIB1*, кодирующем синтез ГТФ-циклогидролазы; она обозначена нами *rib1-86*.

Штамм LV166 (один из сегрегантов), обладающий этой мутацией, является полным РФ-ауксотрофом. Оптимальной для его роста концентрацией РФ является 200 мкг/мл, что характерно для РФ-зависимых ауксотрофов *P. guilliermondii* [5]. При длительной (более 5 сут) инкубации клеток этого штамма в среде без РФ в ряде случаев наблюдали увеличение оптической плотности культуры только за счет размножения прототрофных ревертантов, но не мутантных клеток *rib1-86*. Активность ГТФ-циклогидролазы у штамма LV166 не обнаруживается даже при росте в условиях дефицита железа, в то время как синтез РФ-синтазы репрессирован в условиях оптимального для роста обеспечения клеток железом и дерепрессирован при его дефиците в среде. Таким образом, штамм LV166 не является брадитрофным (leaky) мутантом по гену *RIB1*.

РФ-независимость штамма LV124 свидетельствует о том, что мута-

ция *rib81* супрессирует такую *rib1-86*. Дополнительные доказательства в пользу этого вывода получены с помощью анализа свойств 128 спонтанных РФ-независимых ревертантов штамма *LV166*. Результаты комплементационного анализа показали, что 126 из них являются двойными мутантами *rib81 rib1-86*. Свойства одного из них (*LV166-8*) представлены в таблице. Характерным для него, как и для штамма *LV124*, является неспособность к сверхсинтезу РФ в условиях дефицита железа, низкий уровень активности ГТФ-циклогидролазы и дерепрессия синтеза РФ-синтазы.

Дерепрессию биосинтеза ферментов флавиногенеза у *P. guilliermondii* вызывает также мутация *rib80* [1]. Сконструированный нами двойной мутант *rib80 rib1-86* является РФ-зависимым ауксотрофом даже в условиях дефицита железа. Следовательно, мутация *rib80* не супрессирует такую *rib1-86*.

РФ-зависимость мутанта *rib80 rib1-86* позволила легко ввести в его геном третью мутацию — *rib81* за счет отбора спонтанных РФ-независимых ревертантов. Тройной мутант *LV172-2* (прототроф по РФ), как и штамм *rib81 rib1-86*, неспособен к сверхсинтезу РФ в условиях дефицита железа, т. е. мутация *rib80* в этом случае не усиливает влияния мутации *rib81* на биосинтез РФ (см. таблицу).

Таким образом, выделен регуляторный мутант *P. guilliermondii* с поврежденным геном *RIB1*, у которого мутация локализована, очевидно, в промоторной зоне этого гена. Об этом свидетельствует полная ауксотрофность мутанта *LV166* по РФ и высокая специфичность супрессии потребности в РФ под влиянием мутации *rib81*, но не таковой *rib80* или дефицита железа в среде.

Можно предположить, что мутация *rib1-86* приводит к нарушению взаимодействия факторов позитивного типа действия (продуктов генов *RIB83*, *RIB84* или других, пока не идентифицированных) с их акцепторными сайтами в промоторной зоне гена *RIB1*. У мутантов *rib1-86* продукт гена *RIB81*, являющийся, очевидно, репрессором, полностью подавляет экспрессию структурного гена ГТФ-циклогидролазы, так как мутация *rib81* частично восстанавливает синтез этого фермента.

Важно отметить, что у мутантов *rib81 rib1-86* дефицит железа не вызывает дерепрессии активности ГТФ-циклогидролазы и, как следствие, сверхсинтеза РФ. Из этого вытекает, что мутация *rib1-86* нарушает механизм регуляции синтеза ГТФ-циклогидролазы, в котором участвует железо.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что механизмы регуляции синтеза ферментов флавиногенеза у дрожжей являются значительно более сложными по сравнению с таковыми у бактерий. Как известно, у *Bacillus subtilis* в регуляции транскрипции РФ-оперона участвует ген-регулятор *ribC* и оператор *ribO* [9].

Очевидно, мутант *rib1-86 P. guilliermondii* является удобной моделью для изучения взаимодействия различных регуляторных сигналов, участвующих в контроле биосинтеза ферментов флавиногенеза, путем конструирования штаммов, несущих несколько регуляторных мутаций. Клонирование гена *RIB1 P. guilliermondii* [10] открывает возможность более глубокого изучения структуры регуляторных сайтов промотора этого гена.

Резюме

У роботі селекціонований мутант *rib1-86 P. guilliermondii*, у якого рибофлавінзалежність супресується регуляторною мутацією *rib81*, але не *rib80*. Подвійний мутант *rib1-86 rib81* характеризується низьким рівнем активності ГТФ-циклогидролази, синтез якої слабо регулюється залізом. Очевидно, мутація *rib1-86* лежить в промоторній області гену *RIB1*, що кодує ГТФ-циклогидролазу.

Summary

The *rib1-86* mutant of *P. guilliermondii* in which riboflavin auxotrophy is suppressed by mutation *rib81*, but not by *rib80* was selected. Double *rib1-86 rib81* mutant is characterized by low GTP-cyclohydrolase activity. The enzyme synthesis is faintly regulated by iron. It is supposed that *rib1-86* mutation is localized in the promoter region of *RIB1* gene which codes for GTP-cyclohydrolase.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Выделение и характеристика флавиногенных штаммов *Pichia guilliermondii*, несущих регуляторную мутацию *rib80/ribR* / Г. М. Шавловский, Д. В. Федорович, Е. М. Логвиненко, Л. В. Колтун // Микробиология.— 1985.— 54, № 6.— С. 919—926.
2. Генетический контроль биосинтеза рибофлавина у дрожжей *Pichia guilliermondii*. Обнаружение нового регуляторного гена *rib81* / Г. М. Шавловский, Л. Я. Бабяк, А. А. Сибирный, Е. М. Логвиненко // Генетика.— 1985.— 21, № 3.— С. 368—371.
3. Регуляция биосинтеза рибофлавина элементами позитивного контроля у дрожжей *Pichia guilliermondii* / Г. М. Шавловский, Л. В. Колтун, Б. В. Кшановская и др. // Там же.— 1987.— 25, № 2.— С. 250—258.
4. Guarente L. Regulatory proteins in yeast // Annu. Rev. Genet.— 1987.— 21.— P. 425—452.
5. Генетическая классификация рибофлавинзависимых мутантов дрожжей *Pichia guilliermondii* / Г. М. Шавловский, А. А. Сибирный, Б. В. Кшановская и др. // Генетика.— 1979.— 15, № 9.— С. 1561—1568.
6. Waring W. S., Werkman C. H. Growth of bacteria in iron-free medium // Arch. Biochem.— 1943.— 4, N 2.— P. 303—310.
7. Влияние железа, актиномицина D и циклогексимида на синтез рибофлавинсинтазы у флавиногенных дрожжей / Е. М. Логвиненко, Г. М. Шавловский, А. Е. Закальский, И. В. Заходило // Биохимия.— 1982.— 47, № 1.— С. 28—33.
8. Исследование роли флавинов в регуляции синтеза рибофлавинсинтазы у дрожжей *Pichia guilliermondii* и *Candida utilis* / Е. М. Логвиненко, Г. М. Шавловский, В. М. Трач, А. А. Сибирный // Микробиология.— 1973.— 42, № 6.— С. 1008—1013.
9. Оперонная организация генов биосинтеза рибофлавина *Bacillus subtilis* / В. М. Миронов, М. Л. Чикиндас, А. С. Краев и др. // Докл. АН СССР.— 1990.— 312, № 1.— С. 237—240.
10. Клонирование гена *RIB1*, кодирующего фермент первого этапа флавиногенеза у дрожжей *Pichia guilliermondii* — ГТФ-циклолидролазу, в клетках *Escherichia coli* / А. Е. Закальский, М. Л. Злочевский, Ю. З. Стасив и др. // Генетика.— 1990.— 26, № 4.— С. 614—620.

Львов, отд-ние Ин-та биохимии им. А. В. Палладина
АН УССР

Получено 15.03.91