

УДК 577.16

МИКРОБИОЛОГИЯ

Г. М. ШАВЛОВСКИЙ, Л. П. СТРУГОВЩИКОВА, Е. М. ЛОГВИНЕНКО

ФЛАВИНОГЕНЕЗ У ГУАНИН-ЗАВИСИМЫХ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 24 IV 1970)

В опытах с микроорганизмами было доказано, что ранним предшественником изоаллоксазинового кольца молекулы рибофлавина является пурин (¹). Однако точная структура этого вещества пока окончательно не установлена. В настоящее время роль предшественника флавинов приписывается ксантину (^{2, 3}), гуанину (⁴), аденину или гипоксантину (⁵), т. е. всем пуринам, принимающим участие в метаболизме клетки.

Есть экспериментальные доказательства в пользу предположения, что у дрожжей флавиногенез сопряжен с метаболизмом гуаниловой, а не адениловой кислот. Так, в опытах с *Candida flaresi* было установлено, что в молекулу рибофлавина включается до 85% экзогенного C¹⁴-гуанина и только 19% C¹⁴-аденина (⁶). Однако вопрос о природе пуринового предшественника рибофлавина трудно решить при помощи одного лишь изотопного метода, поскольку микроорганизмы обычно способны к взаимопревращению пуринов.

Гораздо более перспективным представляется применение с этой целью ауксотрофных мутантов, у которых блокированы отдельные реакции метаболизма пуринов. В предыдущей работе было показано (³), что у пурин-зависимого мутанта *Candida guilliermondii* У-4, который был лишен способности синтезировать инозиновую кислоту, а также превращать ксантин и гуанин в аденин, первые два пурина отчетливо стимулировали флавиногенез. На питательных средах с резко пониженным содержанием железа до 70% экзогенного ксантина превращалось дрожжами в рибофлавин. Поскольку ксантин, в отличие от гуанина, не стимулировал рост этого мутанта, высказано предположение, что именно ксантин является предшественником рибофлавина. Однако в этих исследованиях не была строго доказана невозможность превращения ксантина штаммом У-4 в гуанин или его производные.

Чтобы получить более убедительные данные об участии одного из указанных выше пуринов в построении молекулы рибофлавина, казалось целесообразным провести опыты с мутантами флавиногенных организмов, у которых повреждены реакции синтеза ксантиновой и гуаниловой кислот.

Таблица 1

Частоты возникновения гуанин-ауксотрофных мутаций у штаммов *C. guilliermondii* под действием у.-ф. лучей и нитрозогуанидина

Исходный штамм	Мутаген	Выживаемость клеток, %	Число обследов. колоний	Число мутантов	Частота возникновения мутаций, %
АТСС 9058	у.-ф. лучи	1,2—3,5	96750	21	0,021—0,036
У-1114	»	1,0—1,2	11200	5	0,028—0,07
У-1114	Нитрозогуанидин	0,6—40	276270	100	0,012—0,06

В настоящей статье описываются особенности биосинтеза рибофлавина у гуанин-зависимых мутантов *C. guilliermondii* с блокированной ГМФ-синтетазой. Предварительное сообщение о свойствах этих штаммов было недавно опубликовано (⁷).

Для выделения мутантов использовали прототрофную структуру *C. guilliermondii* ATCC 9058, а также ранее полученный из нее штамм У-1114, у которого была блокирована ксантиноксидаза (⁸). Гуанин-зависимые мутанты селекционировали при помощи метода отпечатков, используя в качестве мутагенов у.-ф. лучи или N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин. Суспензию клеток двухсуточной культуры, выросших на сусло-агаре,

Таблица 2

Влияние низких и высоких концентраций гуанина на рост и флавиногенез гуанин-зависимых мутантов *C. guilliermondii* при дефиците железа в среде

Штамм	Гуанин, $\mu\text{г/мл}$	Биомасса, мг/мл	Рибофлавин	
			$\mu\text{г на 1 мл среды}$	$\text{мг на 1 г биомассы}$
У-2156	6	$1,15 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,09$	0,38
	30	$2,10 \pm 0,12$	$5,40 \pm 0,33$	2,57
У-1114/Н64	6	$2,10 \pm 0,06$	$1,70 \pm 0,21$	0,81
	30	$2,50 \pm 0,23$	$9,05 \pm 0,21$	3,62
У-1114/Н62	6	$1,90 \pm 0,13$	$2,43 \pm 0,08$	1,12
	30	$2,20 \pm 0,02$	$11,52 \pm 0,30$	5,24
У-1114/Н66	6	$1,78 \pm 0,05$	$2,25 \pm 0,41$	1,21
	30	$2,21 \pm 0,34$	$18,10 \pm 0,20$	8,19
У-1114/Н51	6	$0,70 \pm 0,03$	$3,38 \pm 0,19$	4,83
	30	$1,01 \pm 0,09$	$17,14 \pm 0,88$	17,00

облучали у.-ф. лучами в дозе 2050 эрг/мм²; обработку дрожжей нитрозогуанидином проводили по методу Адельберга и др. (⁹).

Всего было получено 126 ауксотрофных штаммов, которые проявляли абсолютную потребность в гуанине (табл. 1). Частота возникновения мутации в разных опытах колебалась в пределах 0,012—0,07%.

При клонировании культур установлено появление у части штам-

мов ревертантов, способных расти на средах без гуанина. Некоторые мутанты ревертировали настолько быстро, что нам не удалось сохранить их достаточно длительное время в культуре в качестве гуанин-зависимых штаммов.

Адепин, гипоксантин и ксантин не поддерживали рост мутантов, в то же время гуанозин использовался ими в качестве «ростового вещества». В интервале концентрации гуанина 0—40 $\mu\text{г}$ на 1 мл среды при культивировании дрожжей на качалке (200 об/мин) в среде Беркгольдера (¹⁰) наблюдалась отчетливая зависимость роста клеток от содержания пурина в среде. При субоптимальных концентрациях гуанина (10 $\mu\text{г/мл}$) 123 штамма накапливали в культуральной жидкости у.-ф. поглощающие соединения в количестве 2—5 ед. E_{260} на 1 мг биомассы, чего не наблюдалось при выращивании исходных штаммов.

Изучение у.-ф. спектров нативных культуральных жидкостей показало, что эти мутанты выделяли в среду вещества, обладающие спектрофотометрическими константами, близкими к константам ксантозина. При помощи активированного угля и смолы Дауэкс 1 $\times$ 8 (200—400 меш; HCOO-форма) у.-ф. поглощающие соединения культуральной жидкости 9 мутантов были выделены и очищены. Оказалось, что дрожжи выделяли в среду ксантозин и небольшие количества ксантина. Эти вещества были идентифицированы по спектрам поглощения в кислоте (рН 2) и щелочи (рН 11), а также по хроматографической подвижности в следующих системах растворителей: *n*-бутанол — этанол — вода (4 : 1 : 5); *n*-бутанол — вода (1 : 1); изомасляная кислота — 0,5 *N* NH₄OH (10 : 6), рН 3,6. Продуктами гидролиза ксантозина были ксантин и рибоза; фосфор в образце не обнаруживался.

Таким образом, у преобладающего большинства выделенных нами мутантов был поврежден процесс превращения ксантиновой кислоты в гуаниловую, т. е. была блокирована ГМФ-синтетаза. Ксантиновая кислота

разрушалась, по-видимому, клеточным фосфатазами до ксантозина, который и накапливался в среде.

В культуральной жидкости трех гуанин-зависимых штаммов не было обнаружено заметных количеств у.-ф. поглощающих соединений. Клеточные экстракты одного из них (штамм У-1114/Н171) содержали вещество, которое по спектрофотометрическим константам напоминало инозин. Возможно, что этот штамм имел блокированную ИМФ-дегидрогеназу и накапливал продукты деградации инозиновой кислоты. К сожалению, все три мутанта очень быстро ревертировались до состояния прототрофности, и мы не могли детально исследовать особенности метаболизма этих организмов.

Для изучения флавиногенеза гуанин-зависимых мутантов использовали среду Беркгольдера, очищенную от металлов 8-оксихинолином, которая содержала в качестве источника азота сернистый аммоний (4,0 г/л). Дрожжи выращивали в течение 4 суток на качалке (200 об/мин) при 29°. Сначала было установлено, что на средах с высоким содержанием железа (Fe 0,20 мг/л) и гуанина (30 мг/л) эти штаммы, как и исходные культуры *S. guilliermondii*, синтезируют небольшие

количества рибофлавина, а при дефиците железа в среде (0,01 мг/мл) осуществляют сверхсинтез витамина В₂. Затем были определены размеры накопления рибофлавина в культурах 28 штаммов при использовании сред с низкой (6,0 мг/л) и высокой (30,0 мг/л) концентрацией гуанина и низким содержанием железа (0,01 мг/л). В табл. 2 приведены результаты типичных опытов с 5 штаммами, которые несколько различались между собой по флавиногенной активности. Они свидетельствуют о том, что синтез рибофлавина у нуждающихся в гуанине штаммов зависел от концентрации этого пурина в среде. При низкой начальной концентрации гуанина клетки синтезировали в 3,5—6,8 раз меньше рибофлавина (в пересчете на единицу биомассы), чем в присутствии большого количества гуанина. При этом само изменение содержания в среде гуанина не оказывало такого сильного влияния на рост клеток, поскольку этот процесс лимитировался дефицитом железа в среде. Очевидно, экзогенный гуанин превращался клетками в рибофлавин, и при недостатке этого пурина дрожжи не могли образовывать изохлоридное кольцо молекулы витамина В₂.

В следующем опыте было выяснено, как влияет экзогенный ксантин на флавиногенез гуанин-зависимых мутантов. Дрожжи (9 штаммов) выращивали в течение 4 суток на железodefицитной среде (Fe 0,01 мг/л), содержащей низкие концентрации гуанина (6,0 мг/л) и высокие концентрации ксантина (30,0 мг/л). Оказалось, что ни в одном случае ксантин не оказывал влияния на синтез рибофлавина у исследованных штаммов. Клетки мутантов, очевидно, не метаболизировали этот пурин, так как его содержание в среде до и после инкубации почти не менялось.

Для получения дополнительных данных о значении метаболизма гуа-

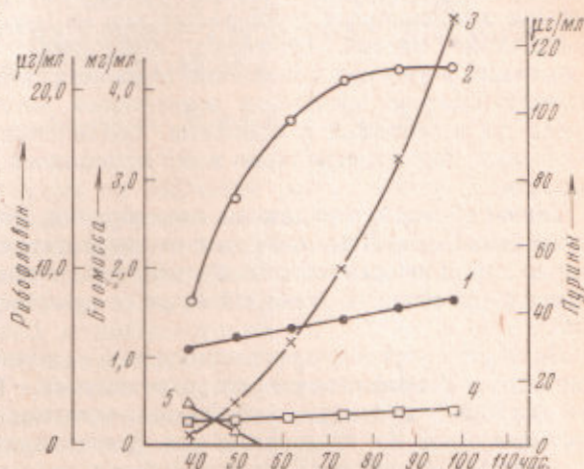


Рис. 1. Динамика роста, накопления рибофлавина, ксантозина и ксантина в культуральной жидкости гуанинзависимого мутанта *S. guilliermondii* Y-1114/H66 при выращивании на среде с низким содержанием железа (0,01 мг/л); начальная концентрация гуанина 30,0 мг/мл. 1 — биомасса, 2 — рибофлавин, 3 — ксантозин, 4 — ксантин, 5 — гуанин

нина и ксантина в флавиногенезе *S. guilliermondii* была изучена динамика накопления рибофлавина, ксантозина и ксантина в культуре при выращивании одного из высокопродуктивных мутантов У-1114/Н66 на железодефицитной среде (Fe 0,01 мг/л) в присутствии гуанина (30 мг/л). Как видно из результатов этого опыта (рис. 1), после 50 час. инкубации клетки исчерпали запасы гуанина в среде, что сопровождалось торможением темпов флавиногенеза. В этот период и позже дрожжи почти не росли из-за недостатка пурина и железа в культуре. Низкая вначале, скорость выделения ксантозина в среду быстро возрастала после исчерпания запасов гуанина и продолжала поддерживаться на высоком уровне до конца культивирования клеток. Очевидно, понижение концентрации гуаниловых соединений в клетках вследствие дефицита гуанина в среде вызывало стимуляцию синтеза дрожжами ксантиловой кислоты, которая затем распадалась до ксантозина и ксантина. Содержание последнего в среде было невысоким; оно относительно мало изменялось на разных этапах развития культуры.

Таким образом, эти данные подтвердили, что сверхсинтез рибофлавина мутантами *S. guilliermondii* мог осуществляться только при обеспечении клеток гуаниловыми соединениями; этот процесс не зависел от синтеза ксантиловой кислоты и образования ее производных — ксантозина и ксантина.

Недавно получены другие указания на ключевую роль гуаниловых соединений в флавиногенезе микроорганизмов. Так, Бахер и Лингенс (¹¹) обнаружили в культуре рибофлавин-зависимого мутанта *Saccharomyces cerevisiae* один из возможных предшественников витамина В₂ — 2,5-диамино-6-оксн-4-рибнотиламинопиримидин, который, если исходить из структурных соображений, мог синтезироваться только из гуанина, но не из ксантина. В самое последнее время эти авторы (¹²) сообщили, что мутант бактерий *Aerobacter aerogenes*, лишенный ГМФ-синтетазной активности, превращал 2-С¹⁴-гуанин в радиоактивный рибофлавин и не использовал для этой цели 2-С¹⁴-ксантина.

Пока не ясно, какое гуаниловое соединение — свободное основание, нуклеозид или нуклеотид — служит «строительным блоком» в образовании молекулы рибофлавина. Необходимо проведение энзиматических исследований в этой области.

Львовское отделение Института биохимии
Академии наук УССР

Поступило
14 IV 1970

Львовский государственный университет
им. И. Франко

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. W. Goodwin, The Biosynthesis of Vitamins and Related Compounds, London, 1963.
- ² E. G. Brown, T. W. Goodwin, T. G. Jones, Biochem. J., 68, 40 (1958).
- ³ Г. М. Шавловский, Е. М. Логвиненко, ДАН, 169, 967 (1966).
- ⁴ A. Bacher, F. Lingens, Angew. Chem., 81, 393 (1969).
- ⁵ K. zur Nieden, W. Fritsche et al., Acta biol. et med. germ., 23, 235 (1969).
- ⁶ B. G. Audley, T. W. Goodwin, Biochem. J., 84, 587 (1962).
- ⁷ Г. М. Шавловский, Л. П. Струговщикова и др. II Всесоюз. биохимич. съезд, Тез. секционных сообщений, 14 секция, химия, обмен и функции витаминов, Ташкент, 1969, стр. 51.
- ⁸ G. M. Shavlovsky, N. P. Ksheminskaya et al., 35, Supplement Yeast Symposium, Part II, N. 1 (1969).
- ⁹ E. A. Adelberg, Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, № 5-6, 788 (1965).
- ¹⁰ P. Burkholder, Arch. Biochem., 3, 121 (1943).
- ¹¹ A. Bacher, F. Lingens, Angew. Chem., 80, 237 (1968).