

Новий ген *RED1*, який контролює біосинтез рибофлавіну і активність фериредуктази у дріжджів *Pichia guilliermondii*

М. М. Стенчук, К. Є. Капустяк

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

Селекціоновано мутант *red1* дріжджів *P. guilliermondii* з високою редуктичною активністю стосовно трифенілтетразолійхлориду. Показано, що мутація *red1* проявляє плейотропну дію, а саме — посилює біосинтез рибофлавіну (РФ), активність GTP-циклогідролази і фериредуктази та нагромадження негемінового заліза в клітинах. Мутантним клітинам притаманна збільшена чутливість до іонів міді. Генетичний аналіз показав, що, по-перше, всі ці властивості обумовлені одним і тим самим мутантним алелем *red1* і, по-друге, мутація *red1* комплементує ідентифіковані раніше мутації зі схожим фенотипом *hit1*, *rib80* та *rib81*. Мутації *red1* і *rib81* стимулюють біосинтез РФ за типом синергізму. Таким чином, виявлений нами новий ген *RED1* бере участь у регуляції як біосинтезу РФ, так і фериредуктазної активності, а також, можливо, і транспорту заліза та міді в клітини *P. guilliermondii*.

Вступ. Природні штами дріжджів *Pichia guilliermondii* синтезують підвищені кількості рибофлавіну (РФ) під час росту у залізодефіцитних середовищах. За цих умов у дріжджів відбувається депресія ферментів флавіногенезу, яка пригнічується інгібіторами транскрипції і трансляції [1].

Селекціоновано регуляторні мутанти *rib81* [2], *rib80* [3] та *hit1* [4], які нагромаджують підвищені кількості РФ у середовищах з високим вмістом заліза внаслідок депресії ферментів біосинтезу РФ за цих умов. Ці мутації характеризуються плейотропною дією — крім впливу на синтез ферментів флавіногенезу, вони також стимулюють фериредуктазну активність і, як наслідок, — транспорт заліза і нагромадження його в клітинах [2—4].

Очевидно, у дріжджів *P. guilliermondii* існують механізми координованого постачання дихального ланцюга двома кофакторами — залізом і вітаміном B₂ [1]. Їхня ідентифікація вимагає виявлення всіх генів, що регулюють зазначені процеси. У даній роботі наведено експериментальні докази існування

нового гена *RED1*, мутантний алель якого посилює як синтез РФ, так і фериредуктазну активність у *P. guilliermondii*.

Матеріали і методи. Перелік використаних робіт штамів подано в табл. 1. Склад середовищ для вирощування дріжджів, умови вирощування і методи генетичного аналізу описано раніше [6, 7]. Для ідентифікації мутантів з підвищеною редуктазною активністю використовували агаризоване середовище Беркгольдера, яке містило 40 мг/л 2,3,5-трифенілтетразолійхлориду (ТТХ) і 20 г/л глюкози [4]. При вивченні впливу міді на ріст досліджуваних штамів у середовище додавали CuSO₄·5H₂O у відповідній концентрації. Біомасу дріжджів визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі ФЕК-56М (кювета 3 мм, світлофільтр № 6). Концентрацію флавінів у культуральному середовищі визначали флюориметрично на апараті ЕФ-3М. Активність GTP-циклогідролази реєстрували в безклітинних екстрактах за описаною раніше методикою [8]. Фериредуктазну активність у клітинах дріжджів визначали за [9], а концентрацію заліза — за [10]. В обох випадках для зв'язування Fe²⁺ використовували α,α'-дипіридил. Концентрацію комплексу Fe²⁺—дипіридил

Таблиця 1
Штами *P. guilliermondii*, використанні в роботі

Штам	Генотип*	Походження
L2	<i>MAT⁻ his-17</i>	[5]
LV113	<i>MAT⁺ lys-1</i>	Дана робота
LV163	<i>MAT⁻ rib1-86 ade2-19</i>	[11]
LV381	<i>MAT⁻ hit1-1 his-17</i>	[4]
LV107	<i>MAT⁻ rib80-22 arg-1</i>	[3]
LV158	<i>MAT⁻ rib81-131 his-17</i>	[2]
LV393	<i>MAT⁻ rib1-86 rib81-13 red1-1 ade2-19</i>	Дана робота
LV455	<i>MAT⁻ red1-1 his-17</i>	Дана робота
LV458	<i>MAT⁺ red1-1 lys-1</i>	Дана робота

П р и м і т к а. **rib1-86*, *his*, *lys*, *ade*, *arg* — локуси, що обумовлюють рибофлавін-, гістидин-, лізин-, аденін- та аргінінзалежність відповідно; *rib80*, *rib81*, *hit1*, *red1* — мутантні алелі регуляторних генів негативного типу дії.

визначали на спектрофотометрі СФ-46 при 522 нм. Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програми «Microcal origin».

Результати. Для виявлення нових мутацій, які би порушували регуляцію біосинтезу РФ, як вихідний використано РФ-залежний штам *LV163*. Ауксотрофність по РФ у нього обумовлена мутацією *rib1-86*, яка локалізується у локусі *RIB1* і блокує активність GTP-циклогідролази — ферменту, що каталізує перший етап флавіногенезу. Ауксотрофність по РФ штама *LV163* супресується мутаціями в регуляторному гені негативного типу дії *RIB81* — подвійні мутанти *rib1-86*, *rib81* є РФ-незалежними [11].

Можна було очікувати, що, крім *rib81*, мутація *rib1-86* супресується й іншими мутаціями, що порушують регуляцію біосинтезу РФ у *P. guilliermondii*. Для перевірки цього припущення виділено нову колекцію спонтанних РФ-незалежних ревертантів штама *LV163* шляхом посіву його клітин на мінімальне середовище без РФ. Для подальшого аналізу було відібрано ті з ревертантів, які, крім РФ-незалежності, набули ще одну ознаку — здатність активно відновлювати ТТХ. Висока редуказна активність є однією з характерних властивостей ідентифікованих раніше мутантів *P. guilliermondii* з порушеним негативним контролем біосинтезу РФ [12].

Ревертанти схрестили зі штамом дикого типу *LV113* і детально проаналізували характер мейо-

тичного розщеплення в одержаних гібридів шляхом схрещування їхніх мейотичних сегрегантів з описаними раніше регуляторними мутантами *rib81*, *rib80*, *hit1* та *rib1-86*. Аналіз показав, що всі ревертанти з високою редуказною активністю зберегли батьківську мутацію *rib1-86*, а їхня РФ-незалежність обумовлена появою в геномі супресорних мутацій, деякі з яких комплементували вже відомі регуляторні мутації *rib81*, *rib80* та *hit1* і належали, таким чином, до нових комплементацийних груп. Результати детального дослідження особливостей супресії мутації *rib1-86* будуть представлені в окремому повідомленні, а в даній роботі ми наведемо результати аналізу одного з ревертантів, який позначено *LV393*. Комплементацийний аналіз показав, що цей ревертант містить, крім *rib1-86*, ще дві мутації — *rib81* і нову, яку ми позначили *red1-1* (reduction). За допомогою сегрегаційного аналізу мутацію *red1-1* відокремлено від інших двох регуляторних мутацій і одержано колекцію штамів *red1* з різними комбінаціями локуса *MAT* та ауксотрофних маркерів, що дозволило схрещувати їх між собою або з іншими регуляторними мутантами.

Оскільки мутація *hit1* також виявлена як така, що обумовлювала високу редуказну активність клітин [4], ми вважали за доцільне в даній роботі провести порівняльне дослідження фенотипового проявлення обох мутацій — *red1* і *hit1*. Для зручності у подальшому будемо називати штам за їхніми регуляторними мутаціями.

Як видно з представлених у табл. 2 даних, штам *red1* нагромаджує у середовищі в 2,5 раза більше РФ, ніж штам дикого типу, але в 3 рази менше, ніж штам *hit1*. Питома активність GTP-циклогідролази у штама *red1* у 3,4 раза більша, ніж у штама дикого типу, і в 2 рази менша, ніж у штама *hit1*. Додаткові дослідження інших штамів, які містять мутацію *red1-1*, разом з наведеними вище результатами дають підставу для висновку, що вона веде до посилення синтезу РФ шляхом дерепресії активності GTP-циклогідролази і, очевидно, інших ферментів флавіногенезу, але ступені прояву цих процесів є слабшими, ніж у мутанта *hit1*.

Посилений синтез РФ є характерним для всіх виділених раніше регуляторних мутацій негативно-го типу дії *rib81*, *rib80* та *hit1*. Для підтвердження приналежності мутації *red1* до нової групи комплементации штами *LV455* та *LV458* схрестили з вищезгаданими мутантами і визначили фенотип одержаних диплоїдів за двома ознаками — рівнем біосинтезу РФ та кольором їхніх колоній на середовищі з ТТХ. Із представлених на рис. 1 даних видно, що диплоїди «*redD* × *rib80*», «*red1* × *rib81*» та

Таблиця 2

Флавіногенез, активність GTP-циклогідролази і фериредуктази, вміст заліза в клітинах штама дикого типу та регуляторних мутантів *P. guilliermondii* ($M \pm m$, $n = 2-4$)

Штам*	Активність GTP-цик- логідролази, Е/мг білка · 10 ⁻⁵	Швидкість відновлення Fe ³⁺ , нмоль Fe/мг сухих клітин за 1 хв	Вміст Fe, мкг/мг сухих клітин	Рибофлавін, мкг/мг сухих клітин
L2	0,42±0,01	3,63±0,08	70,59±3,28	0,21±0,01
LV455 (<i>red1</i>)	1,43±0,02	20,25±0,26	288,71±6,47	0,54±0,08
LV381 (<i>hit1</i>)	2,29±0,20	22,84±0,09	326,34±8,82	1,68±0,22
LV462 (<i>rib81-13</i>)	1,24±0,02	4,32±0,02	188,23±3,12	0,56±0,03
LV463 (<i>red1 rib81-13</i>)	5,47±0,12	19,59±1,44	305,76±2,44	5,36±0,16

*У дужках позначено генотип штама за регуляторною мутацією.

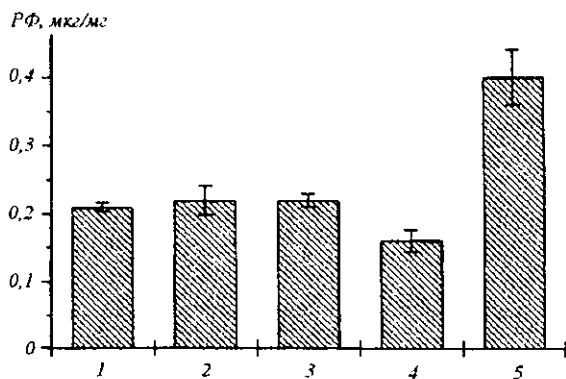


Рис. 1. Біосинтез РФ гібридами: 1 — «*rib80 × red1*»; 2 — «*rib81 × red1*»; 3 — «*hit1 × red1*»; 4 — «дикий *mun × red1*»; 5 — «*red1 × red1*» ($M \pm m$, $n = 2-4$)

«*red1 × hit1*» не відрізняються істотно за рівнем флавіногенезу від диплоїда «*red1 × дикий mun*», що свідчить про комплементарність мутації *red1* з іншими регуляторними мутаціями. В той же час у диплоїда «*red1 × red1*» рівень біосинтезу РФ значно вищий, що вказує на відсутність комплементарності між двома гомоалелями *red1-1*. Цей висновок підтверджується і у випадку вирощування гібридів на середовищі з ТТХ — всі вони мали білий колір (комплементарність), за виключенням гібрида «*red1 × red1*», колір якого був червоним (відсутність комплементарності).

Отже, мутація *red1* порушує механізм негатив-

ного контролю біосинтезу РФ у *P. guilliermondii*. Відомо, що для мутантів цих дріжджів з подібними порушеннями (*rib81*, *rib80* та *hit1*) характерним є дерепресія активності фериредуктази, яка контролює перший етап засвоєння іонів заліза клітинами цих дріжджів — відновлення Fe³⁺ до Fe²⁺ [2—4]. Подібне фенотипове проявлення властиве і для мутації *red1* — у відповідного мутанта активність цього ферменту майже в шість разів більша, ніж у штама дикого типу, і дещо менша порівняно з мутантом *hit1* (табл. 2). Очевидно, саме цим обумовлений високий вміст заліза в клітинах мутанта *red1* — він у 4 рази більший, ніж у штама дикого типу, хоча дещо менший за його вміст у мутанта *hit1* (табл. 2).

Мутація *red1*, як і *hit1* [12], збільшує чутливість клітин до іонів міді (рис. 2). Відносно низькі концентрації міді (0,1—0,2 мМ) дуже пригнічують ріст штама *hit1*, ніж *red1*, хоча при більших концентраціях металу різниця в чутливості двох мутантів зменшується. Дослідження впливу міді на ріст диплоїдних штамів дало можливість виявити характер взаємодії між алелями *red1* та *RED1*. На рис. 3 показано характер росту диплоїдів *RED1/RED1*, *RED1/red1* і *red1/red1* на агаризованому середовищі з різним вмістом іонів міді. Як і очікувалося, найчутливішим до міді виявився диплоїд, гомозиготний за мутантним алелем *red1* — його ріст повністю пригнічувався при концентрації міді 0,3 мМ. Клітини гетерозиготного диплоїда *RED1/red1* відзначаються більшою резистентністю, але не до такого ступеня, як клітини диплоїда з обома дикими алелями — *RED1/RED1*. Таким чином, за цих умов алель *red1* проявляє себе як кодомінантний по відношенню до алеля

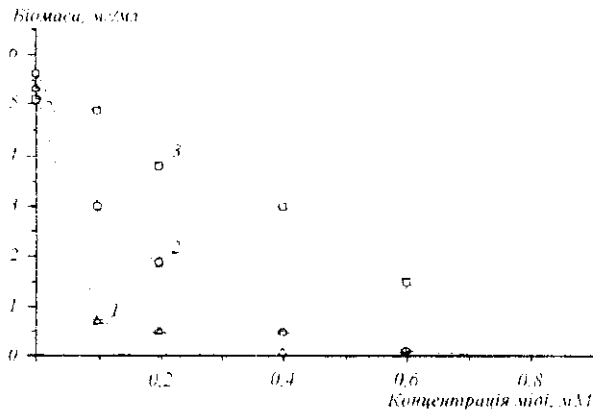


Рис. 2. Вплив міді на ріст mutantів *hit1* (1); *red1* (2) і штама дикого типу (3) ($M \pm m$, $n = 2-4$)

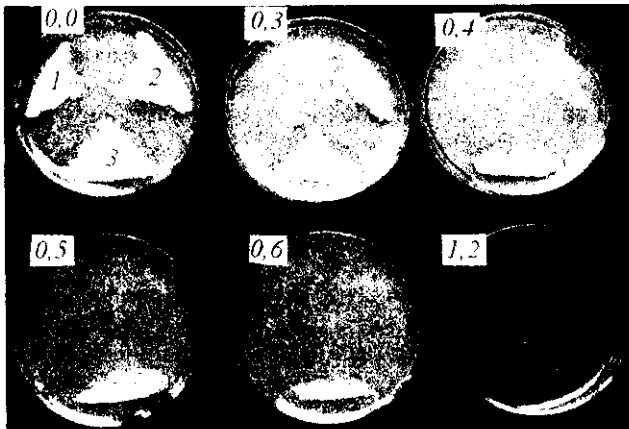


Рис. 3. Вплив іонів міді на ріст диплоїдних штамів: 1 — «*RED1/RED1*»; 2 — «*RED1/red1*»; 3 — «*red1/red1*» (концентрація міді у середовищі від 0.0 до 1.2 мМ)

дикого типу *IREDI*. Цікаво, що у випадку біосинтезу РФ алель *red1* є повністю рецесивним (рис. 1).

Висока редуказна активність, яку обумовлює мутація *red1*, дає можливість легко ідентифікувати клони, що її містять, за їхнім червоним кольором на середовищі з ТТХ. Це дозволило виявити характер успадкування мутації *red1*. Аналіз випадкової вибірки 100 мейотичних сегрегантів диплоїда *RED1/red1* показав, що майже половина з них (48)

мали високу редуказну активність (червоний колір у присутності ТТХ), а решта (52) — низьку (білий колір). Таким чином, співвідношення двох класів мейотичних сегрегантів близьке до теоретично очікуваного 1 : 1, що вказує на моногенний характер успадкування мутації *red1*. Вимірювання флавіногенної активності сегрегантів двох класів показало (рис. 4), по-перше, що сегреганти генотипу *red1* (червоні) в середньому синтезують більші кількості РФ ($M \pm m = 0,4267 \pm 00,013$, $n = 48$), ніж сегреганти дикого типу ($M \pm m = 0,2227 \pm 00,008$, $n = 52$). По-друге, представлені дані демонструють, що хоча мутація *red1* посилює флавіногенез, однак спостерігається типове для кількісних ознак явище трансгресії — кращі за продуктивністю сегреганти дикого типу переважають слабші за цією ознакою мутантні штами. Таким чином, фенотипове проявлення мутації *red1* за ознакою «біосинтез РФ» у великій мірі залежить від її генотипового оточення.

Щоб переконатися, що такі властивості штамів *red1*, як посилений флавіногенез, підвищені фериредуказна активність та чутливість до іонів міді, обумовлені однією і тією ж мутацією. У штама *LV455* виділено ряд незалежних ревертантів, колонії яких на середовищі з ТТХ мали білий, а не червоний колір. Результати дослідження властивостей трьох таких ревертантів показали, по-перше, що продуктивність біосинтезу РФ у них достовірно менша, ніж у вихідного мутанта *red1*, хоча все ще більша, ніж у штама дикого типу (табл. 3). По-друге, активність фериредукази у ревертантів знизилася до рівня, характерного для штама дикого типу, і, по-третє, у них зникла підвищена чутливість до іонів міді (табл. 3). Очевидно, зазначені ознаки штама *LV455* обумовлені однією і тією самою мутацією *red1*.

Як уже зазначено вище, штам *LV393* містив, крім нової мутації *red1-1*, також уже відому мутацію *rib81*, яку ми позначили *rib81-13*. Генотип ревертанта *rib1-86 rib81-13 red1-1* дав підставу для припущення, що в даному випадку мутація *rib1-86* супресується обома мутаціями як *rib81-13*, так і *red1-1*, причому супресуюча дія однієї з них, можливо, посилюється в присутності іншої. Для перевірки цього припущення виділено ряд штамів генотипу *rib81-13* і досліджено їхні властивості. Як видно з представлених у табл. 2 даних, продуктивність біосинтезу РФ мутанта *rib81-13* така ж, як і у штама *red1-1*, і в 2,5 раза більша, ніж у штама дикого типу. Це спричинене підвищеною активністю GTP-циклогідролази (табл. 2) і, очевидно, інших ферментів флавіногенезу. Активність фериредукази і вміст заліза в клітинах мутанта *rib81-*

Таблиця 3

Біосинтез РФ, фериредуктазна активність і чутливість до іонів міді штамів дикого типу, мутанта *red1* і його ревертантів ($M \pm m$, $n = 2-4$)

Штам	Рибофлавін, мкг/мг сухих клітин	Швидкість відновлення Fe^{3+} , нмоль Fe^{3+} /мг сухих клітин за 1 хв	Біомаса, мг/мл	
			+Cu (0,5 мМ)	-Cu
Ревертант 1	0,25±0,06	2,53±0,17	2,10±0,3	5,70±0,11
Ревертант 2	0,22±0,07	3,25±0,32	4,42±0,15	5,80±0,21
Ревертант 3	0,28±0,04	2,93±0,12	3,10±0,10	5,65±0,45
<i>red1</i>	0,52±0,04	20,43±0,33	0,00	5,05±0,25
L2	0,20±0,01	2,77±0,17	4,00±0,20	5,40±0,20

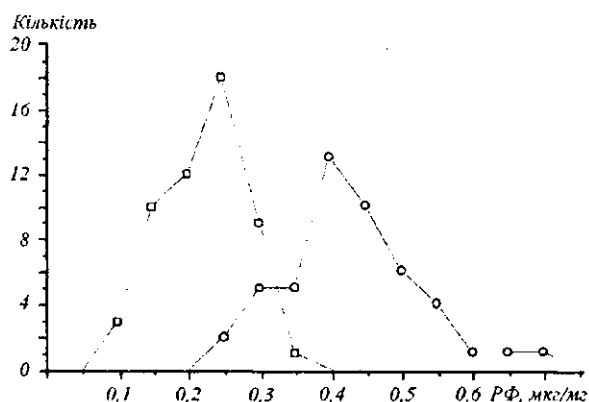


Рис. 4. Полігон розподілу флавіногенної активності у мейотичних сегрегантах диплоїда «*red1* × дикий тип»: 1 — сегреганти генотипу *red1* (червоний колір); 2 — сегреганти генотипу *RED1* (білий колір)

13 також більші, ніж у штама дикого типу. Ймовірно, що мутація *rib81-13* є неповною (*leaky*), бо вона посилює синтез РФ набагато слабше, ніж уже відомі мутації *rib81* (наприклад *rib81-131*) [2].

Мутант *rib81* схрестили зі штамом *red1* і в одержаного диплоїда виділили ряд мейотичних сегрегантів із суміщеними в одному й тому ж гаплотипному геномі мутаціями *rib81-13* та *red1-1*. Як видно з представлених у табл. 2 даних, активність GTP-циклогідролази і продуктивність біосинтезу РФ у подвійного мутанта *rib81 red1* майже в 4 і 10

разів відповідно вищі, ніж у батьківських штамів (*rib81* і *red1*). Таким чином, мутації *rib81-13* і *red1-1* стимулюють біосинтез РФ у *P. guilliermondii* за типом синергізму. Проте цей тип взаємодії двох мутацій не проявляється як щодо активності фериредуктази, так і вмісту заліза в клітинах — у подвійного мутанта вони майже такі ж, як і в кращого за цими показниками батьківського штама *red1* (табл. 2).

Обговорення. Подані в даній роботі результати дали можливість виявити новий ген *RED1*, мутантний алель якого проявляє таку ж плейотропну дію, що й описана раніше мутація *hit1*. По-перше, мутація *red1* викликає дерепресію GTP-циклогідролази і, очевидно, інших ферментів флавіногенезу, що призводить до посилення біосинтезу РФ дріжджами *P. guilliermondii* при вирощуванні їх у середовищі з оптимальним вмістом заліза. Таку ж дію на флавіногенез спричинюють і мутації *rib80* [3] та *rib81* [2]. За рівнем нагромадження РФ у середовищі штам *red1* є найслабшим серед подібних на нього штамів: якщо продуктивність флавіногенезу мутантів *rib81* [2], *rib80* [3] та *hit1* становить у середньому 15, 5 і 2 мг РФ на 1 г біомаси відповідно, то мутанта *red1* — лише 0,5 мг/г.

По-друге, мутація *red1* веде до посилення активності фериредуктази — ферменту, що бере участь у транспорті заліза в клітини дріжджів, у тому числі і в *P. guilliermondii*, на етапі відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} [9]. Хоча в даній роботі швидкість транспорту заліза в клітини не визначали, мутація *red1*, очевидно, посилює його, про що свідчать наступні факти. По-перше, вміст негемінового заліза в клітинах штама *red1* збільшений. Таке ж явище спостерігається і в інших двох

мутантів *P. guilliermondii* з посиленою активністю фериредуктази — *hit1* [4] та *rib80* [3]. По-друге, мутація *red1*, як і *hit1*, збільшує чутливість клітин до іонів міді.

Відомо, що процес засвоєння цього металу є необхідною умовою для високоафінного транспорту Fe^{2+} у клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Можна припустити, що мутація *red1* веде до посилення транспорту не тільки заліза, але й міді в *P. guilliermondii*. На користь цього припущення свідчить також той факт, що відновлення Cu^{2+} до Cu^{1+} є одним з етапів засвоєння цього металу клітинами *S. cerevisiae*, і значну долю цього процесу (50—70 %) каталізує саме фериредуктаза [13].

У дріжджів *S. cerevisiae* фериредуктазна активність забезпечується двома незчепленими генами *FRE1* і *FRE2*, продуктами яких є мембранні флавоцитохроми. Експресія обох генів регулюється як залізом (регуляторний ген *AFT1*), так і міддю (регуляторний ген *MAC1*). Обидва регуляторні гени секвеновано і показано, що їхні продукти є типовими активаторами транскрипції у дріжджів [14, 15]. Невідомо, чи ці гени беруть також участь у регуляції біосинтезу РФ у *S. cerevisiae*.

Одержані нами дані, а також результати попередніх робіт показують, що як мінімум чотири гени негативного типу дії *RED1*, *HIT1*, *RIB80* та *RIB81* беруть участь у регуляції як біосинтезу РФ, так і транспорту заліза у дріжджів у *P. guilliermondii*. Дикі алелі цих генів запобігають надмірному нагромадженню заліза в клітинах і надсинтезу РФ, мутантні — посилюють ці процеси, що свідчить про функціонування у *P. guilliermondii* механізму, який координує постачання дихального ланцюга двома кофакторами — залізом і РФ [1].

Здійснюючи регуляторні функції, продукти вищезазначених генів повинні, очевидно, якимось чином взаємодіяти між собою. Раніше ми показали, що мутації *rib80* та *rib81* взаємодіють за типом синергізму в процесі біосинтезу РФ та транспорту заліза в *P. guilliermondii* [16]. Результати даної роботи свідчать, що такий же тип взаємодії спостерігається між мутаціями *rib81* та *red1* у процесі біосинтезу РФ.

Однак молекулярні механізми дії продуктів генів *RED1*, *HIT1*, *RIB80* та *RIB81* на експресію структурних генів біосинтезу РФ і системи транспорту заліза у *P. guilliermondii* залишаються поки що невиясненими. Очевидно, подальші дослідження цієї проблеми мають не тільки фундаментальне, але й прикладне значення, оскільки їхні результати дозволили б удосконалити селекцію високофлавіногенних штамів, придатних для промислового використання як продуценти РФ.

Автори вдячні Д. В. Федорович, О. В. Протченко і В. І. Куцябі за методичну допомогу та обговорення результатів роботи.

Н. Н. Стенчук, К. Е. Капустяк

Новый ген *RED1*, регулирующий биосинтез рибофлавина и активность ферриредуктазы у дрожжей *Pichia guilliermondii*

Резюме

Селекционирован мутант *red1* дрожжей *P. guilliermondii* с повышенной редуцтазной активностью в отношении трифенилтетразолийхлорида (ТТХ). Показано, что мутация *red1* проявляет плейотропное действие, а именно — усиливает биосинтез рибофлавина (РФ), активность GTP-циклогидролазы и ферриредуктазы, а также накопление негеминного железа в клетках. Для мутантных клеток характерна повышенная чувствительность к ионам меди. Генетический анализ показал, что, во-первых, все эти свойства вызваны одним и тем же мутантным аллелем *red1* и, во-вторых, мутация *red1* комплементирует идентифицированные ранее мутации *hit1*, *rib80* и *rib81*. Мутации *red1* и *rib81* стимулируют биосинтез РФ по типу синергизма. Таким образом, выявленный нами новый ген *RED1* участвует в регуляции, как биосинтеза РФ, так и ферриредуктазной активности и, возможно, транспорта железа и меди в клетки *P. guilliermondii*.

N. N. Stenchuk, K. E. Kapustiak

A novel gene *RED1*, which controls riboflavin biosynthesis and ferrireductase activity in *Pichia guilliermondii* yeast

Summary

The *red1* mutant of *Pichia guilliermondii* yeast with high reducing activity for triphenyltetrazolium chloride (TTC) has been selected using solid synthetic medium with TTC. The data obtained demonstrate several phenotypes of mutant cells with: a) increased level of riboflavin biosynthesis, b) enhanced ferrireductase and GTP-cyclohydrolase activity, c) higher non-hemin iron content, d) hypersensitivity to copper. All these properties are defined by one mutant allele *red1*. Genetic studies indicated that *red1* is not allelic to previously identified *hit1*, *rib80* and *rib81* mutations with similar properties. In the double mutant *red1* and *rib81*, the production of riboflavin and the expression of GTP-cyclohydrolase is increased drastically, i. e. two genes act synergistically. Thus, the novel gene *RED1* participates in the regulation of both riboflavin biosynthesis and ferrireductase activity. It is tempting to speculate this gene is involved in the iron and copper transport in *Pichia guilliermondii* yeast.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М. Роль железа в регуляции синтеза белков у микроорганизмов // Успехи микробиологии.—1988.—22.—С. 103—108.
2. Шавловский Г. М., Федорович Д. В., Бабяк Л. Я. Влияние мутации *rib81* на биосинтез рибофлавина и транспорт железа у дрожжей *Pichia guilliermondii* // Микробиология.—1993.—62, № 5.—С. 897—903.
3. Шавловский Г. М., Федорович Д. В., Куцяба В. И. и др. Участие гена *RIB80* в регуляции биосинтеза рибофлавина и транспорта железа у *Pichia guilliermondii* // Генетика.—1992.—27, № 2.—С. 25—32.
4. Стенчук Н. Н., Протченко О. В., Федорович Д. В., Шавловский Г. М. Мутанты *Pichia guilliermondii* с повы-

- шеной способностью к восстановлению рибофлавина и ионов железа // Генетика.—1991.—27, № 27.—С. 561—563.
5. Сибирный А. А., Шавловский Г. М., Киановская Б. В., Наумов Г. И. Гибридизация и мейотическое расщепление у парафинусваивающих дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика.—1977.—13, № 2.—С. 314—320.
 6. Шавловский Г. М., Сибирный А. А., Киановская Б. В. и др. Генетическая классификация рибофлавінзависимых мутантов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика.—1979.—15, № 9.—С. 1561—1568.
 7. Шавловский Г. М., Жарова В. П., Щелокова И. Ф. и др. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. биохимия и микробиология.—1978.—14, № 2.—С. 184—189.
 8. Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М., Закальский А. Е., Заходько И. В. Влияние железа, актиномицина Д и циклогексамида на синтез GTP-циклогидролазы у флавиногенных дрожжей // Биохимия.—1982.—47, № 1.—С. 28—33.
 9. Федорович Д. В., Протченко О. В., Шавловський Г. М. Фериредуктаза *Pichia guilliermondii*: властивості і регуляція активності та синтезу // Укр. біохім. журн.—1995.—67, № 1.—С. 32—38.
 10. Ковалев Л. М., Круликовская Л. И., Якова В. М., Яшина О. Т. Определение железа в дрожжах-сахаромикетах ди-пиридиловым методом // Науч. докл. высш. шк.—1984.—12.—С. 96—100.
 11. Шавловський Г. М., Стенчук Н. Н., Киановская Б. В. Влияние регуляторной мутации в локусе *RIB1* на биосинтез рибофлавина у дрожжей *Pichia guilliermondii* // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 6.—С. 96—99.
 12. Протченко О. В. Дослідження фериредуктазної системи дріжджів *Pichia guilliermondii*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—Львів, 1997.—23 с.
 13. Askwith C. C., de Silva D., Kaplan J. Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Microbiol.—1996.—20, N 1.—P. 27—34.
 14. Hassett R., Kosmun D. J. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 1.—P. 128—134.
 15. Yamaguchi-Iwui Y., Dancis A., Klausner R. D. AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae* // EMBO J.—1995.—14.—P. 1231—1239.
 16. Шавловський Г. М., Стенчук Н. Н., Федорович Д. В., Куцяба В. І. Про взаємодію факторів негативного контролю біосинтезу рибофлавіну у дріжджів *Pichia guilliermondii* // Доп. АН України.—1994.—№ 10.—С. 138—140.

УДК 575.24:582.282.23
Надійшла до редакції 02.11.98