



УДК 577.214.(337+622)

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ *rpb5⁺*, *rpb7⁺* и *rpb11⁺* *Schizosaccharomyces pombe* – ЗАВЕРШЕНИЕ ВЫЯСНЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ВСЕХ НЕЗАМЕНИМЫХ СУБЪЕДИНИЦ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II ДЕЛЯЩИХСЯ ДРОЖЖЕЙ*

© 1997 г. Г. В. Шпаковский[#], Е. Н. ЛебеденкоИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 04.08.97 г. Принято к печати 20.08.97 г.

Клонированы и секвенированы гены, кодирующие субъединицы Rpb5, Rpb7 и Rpb11 ДНК-зависимой РНК-полимеразы II *Schizosaccharomyces pombe*, в результате чего завершена структурная характеристика всех незаменимых компонентов одного из важнейших ферментов аппарата транскрипции делящихся дрожжей.

Ключевые слова: делящиеся дрожжи; ядерная РНК-полимераза II; субъединицы Rpb5, Rpb7, Rpb11; гомолог RPB9; интроны.

Экспрессия генов, кодирующих белки, осуществляется в эукариотической клетке одной из трех ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз – РНК-полимеразой II (или В). Именно на изучение этого важнейшего фермента аппарата транскрипции эукариот направлены основные усилия экспериментаторов. К настоящему времени наиболее детально охарактеризованы РНК-полимеразы II почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1, 2] и человека [3–5]. Для этих организмов клонированы гены, кодирующие все 12 субъединиц, входящих в состав соответствующих ферментных комплексов [1–6].

В меньшей степени изучена РНК-полимераза II делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, другого удобного объекта молекулярно-генетических исследований, эволюционно далекого как от *Homo sapiens*, так и от *S. cerevisiae* [7]. Подробные биохимические исследования этого фермента были проведены в лаборатории А. Ишихамы (Национальный институт генетики, г. Мишима, Япония) [8, 9]. В этой же лаборатории были клонированы гены трех самых больших субъединиц: Rpb1 [10], Rpb2 [11] и Rpb3 [8], а также, по-видимому, Rpb5 (Т. Мияо et al., неопубликованные данные; цитируем по [9]). В процессе структурно-функционального изучения субъединиц, общих для всех трех ядерных РНК-полимераз эукариот,

мы клонировали генетические детерминанты, кодирующие четыре другие субъединицы *Sz. pombe*: Rpb6 [12], Rpb10 [13, 14], Rpb10 [5, 15] и Rpb8 [16].

В настоящей работе из представительной экспрессирующей клонотекы делящихся дрожжей *Sz. pombe* с использованием гибридизации *in situ* и подходов, описанных нами ранее [12, 14, 15], изолированы и секвенированы полноразмерные кДНК еще четырех генов, кодирующих незаменимые (см. [17–19]) субъединицы РНК-полимеразы II: Rpb5, Rpb7 и Rpb11, а также гомолог субъединицы RPB9 *S. cerevisiae*. Это позволило вывести первичную структуру, а также вычислить молекулярные массы и изоэлектрические точки этих, до сих пор остававшихся не охарактеризованными, субъединиц основного фермента транскрипции *Sz. pombe* (см. рис. 1 и таблицу).

Пока неясно, кодирует ли обнаруженный нами у *Sz. pombe* гомолог гена RPB9 [21] субъединицу именно РНК-полимеразы II, поскольку японским авторам не удалось путем микросеквенирования белковых полос идентифицировать субъединицу Rpb9 в составе очищенных препаратов РНК-полимеразы II делящихся дрожжей [9]. Тем не менее в пользу этого предположения свидетельствуют сходство первичных структур обсуждаемых гомологов (рис. 2) и примерное соответствие вычисленной молекулярной массы обнаруженного нами гомолога массе неидентифицированной белковой полосы I (12 кДа) в препаратах РНК-полимеразы II делящихся дрожжей (см. [9] и таблицу). Вместе с тем в GenBank мы обнаружили в виде неохарактеризованной открытой рамки считывания (ORF) из хромосо-

*Результаты данной работы были впервые доложены на III Международной Энгельгардтовской конференции по молекулярной биологии, Москва–Ярославль–Москва (река Волга), 9–14 июня 1997 г.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-65-83; e-mail: gvs@ibch.siobc.ras.ru; факс: (095) 335-71-03).

Rpb5:

```

1  MSAEEKNIVRVFRAWKTAHQVLVHDRGYGVSAELDLTLDQFKAMHCGMGRNLDRTTLSFYAKPSNDSNKGTIYIEFAKEP  80
81  SVGIKEMRTFVHTLGDHNNHTGILYIANSMTPSAAKIATVTGQFTIETFQESDLIVNI THHELVPKHILLSPDEKKELL  160
161 DRYKLRRETQLPRIQLADPVARYLGLKRGEVVKIVRRSETSGRYNSYRICA  210
    
```

Rpb7:

```

1  MPFFLKELSLTISLHPSYFGPRMQDYLKAKLLADVEGTCSGQYGYICVLDSENTIDDKGRVVPQGQFAEFVVKYRAVLW  80
81  RPFGEVVDIVTTVNMKGFFANIGPLNVFVSSHLPVPPDMKFDPTANPPNYSGEDQVIEKGSNVRLLKIVGTRTDATEIFA  160
161 IATMKEDYLGVL  172
    
```

Rpb11:

```

1  MNQPERYELIELMGLPKVTYELDSKSPNAAVVTLEKEDHTLANMLANQLLSDERVLVAGYKVPHPHNNFILRVQTVEDC  80
81  SPKQVIVDAAKSLITHLEEIKVNFMEWELKMSI SVEGVEMEF  123
    
```

Гомолог Rpb9:

```

1  MQFCPTCGNHLIVAVDEEGRNAFDCRTCPYHFPISFLYSRHEFAQKEVDDVLGGEEAFESNQQTVEVTCENTKCDNNRAY  80
81  FFQLQIRSADEPMSTFYRCKCKFQWREN  109
    
```

Рис. 1. Первичные структуры субъединиц Rpb5, Rpb7 и Rpb11 ядерной ДНК-зависимой РНК-полимеразы II *Sz. pombe*, а также гомолога субъединицы RPB9 *S. cerevisiae*, выведенные из нуклеотидных последовательностей соответствующих кДНК делящихся дрожжей. Стрелками указано положение интронов в генах *rpb5⁺* и *rpb11⁺* *Sz. pombe* (стрелка, направленная на символ аминокислоты, означает, что соответствующий интрон расположен между вторым и третьим звеньями кодона).

мы IV *S. cerevisiae* еще один гомолог клонированного нами гена (рис. 2). Весьма вероятно, что эта ORF представляет собой не клонированный до сих пор ген субъединицы С11 РНК-полимеразы III (см. [2]). В таком случае обнаруженный на-

ми гомолог RPB9 из *Sz. pombe*, скорее всего, кодирует субъединицу РНК-полимеразы III, поскольку его продукт структурно более близок именно этому гипотетическому белку из *S. cerevisiae* (рис. 2).

РНК-полимераза II *Schizosaccharomyces pombe*: субъединицы и их гены

Ген	Хромосомная локализация	Число интронов и их длина, п. о.	Комплементация гена-гомолога в <i>S. cerevisiae</i>	Субъединица	Число а. о.	Молекулярная масса		р _f , расчетн.	Ссылка
						эксперим., кДа [9]/[20]	расчетн., Да		
<i>rpb1⁺</i>	Не установлена	6 (35 + 40 + 39 + 45 + 92 + 47)	Не изучена	Rpb1	1752	210	194163	5.62	[10]
<i>rpb2⁺</i>	I	1 (38)	»	Rpb2	1210	150	137819	6.43	[11]
<i>rpb3⁺</i>	Не установлена	2 (43 + 46)	»	Rpb3	296	41	33603	4.55	[8]
<i>(rpb4⁺)</i>	Ген не клонирован	—	—	(Rpb4)	—	34(?)	—	—	[6]
<i>rpb5⁺</i>	I	2 (64 + 211)	В процессе исследования	Rpb5	210	27/24	23915	9.28	[*]
<i>rpb6⁺</i>	?	1 (219)	⊕	Rpb6	142	22/19.5	15729	4.28	[12]
<i>rpb7⁺</i>	I	0	⊕	Rpb7	172	21	19103	5.39	[*]
<i>rpb8⁺</i>	?	2 (59 + 48)	⊖	Rpb8	125	16/12.8	14300	5.66	[16]
<i>rpb11⁺</i>	I	2 (45 + 46)	В процессе исследования	Rpb11	123	15	14127	4.93	[*]
<i>(rpb9⁺)</i>	I	0	⊕	(Rpb11)	109	12(?)	12815	4.96	[*]
<i>rpb10⁺</i>	I	2 (316 + 63)	⊕	Rpb10	71	11/<10	8276	7.60	[14]
<i>rpb10⁺</i>	II	1 (53)	⊕	Rpb10	63	?/<10	7289	10.21	[15]

[*] – данные настоящей работы.

RPB9 (<i>S. cerevisiae</i>)	1	MTTFRFCRDCNNMLYPREDKENRLLFECRTCSYVEEAGSP--LVYRHELITNIGETAGVVQDI	62
Гомолог		+++* * * * *+++* *+***** * + * ****+ + ++	
Rpb9 (<i>Sz. pombe</i>)	1	MQFCPTCGNHLIVAVDEEG-RNAFDCRTCPYHFPISTF--LYSRHEFAQKEVDDVLGGEEA	58
		+ ****+ * *++ + * + ***** ** + ** * ++ *****	
RPC11? (<i>S. cerevisiae</i>)	1	MLSFCPSCNNMLLITSGDSG-VYTLACRSCPYEFPFIEGI-EIYDRKKLPRKEVDDVLGGGWD	60
		* * * *++* ++ * + * * * * * + * + * + * + *	
RPA12 (<i>S. cerevisiae</i>)	1	MSVVGSLIFCLDCGDLLENPNAVLG--SNVECSQCKAIYPKSQFSNLKVVTTTADDAFPSSLRAKKS	65
		FC C L C C	
RPB9 (<i>S. cerevisiae</i>)	63	-----GSDPTLPRSDRECPKCHSRENVFFQSQRRKDTSMVLFVCLSCSHIFTSQKKNRTQFS	122
Гомолог		* ** + * * * * * * * * * * * + * +	
Rpb9 (<i>Sz. pombe</i>)	59	-----FESNQQTVEVTCENTKCDNNRAYFFQLQIRSADEPMTFYRCCTKCKFQWREN	109
		+ + * + * + *****+***** * +**	
RPC11? (<i>S. cerevisiae</i>)	61	-----NVDQTKTQCPNYDTCCGGESAYFFQLQIRSADEPMTFYKCVNCGHRWKN	110
		++ + * * * * + ***** * * * *++* ++* *	
RPA12 (<i>S. cerevisiae</i>)	66	VVKTSLKKNELKDGATIKEKCPQCGNEEMNYHTLQLRSADGATVFYTCSCGYKFRFTNN	125
		C C Q R D F C C	

Рис. 2. Сравнение аминокислотной последовательности гомологов субъединицы RPB9 (B12.6) *S. cerevisiae*. Представлены первичные структуры обнаруженного нами гомолога из *Sz. pombe* (Rpb9), субъединиц RPB9 (B12.6) (GenBank M73060) и RPA12 (A12.2) (GenBank L35564) соответственно ядерных РНК-полимераз II и I *S. cerevisiae*, а также полипептида RPC11? (C11?), кодируемого в геноме *S. cerevisiae* открытой рамкой считывания неизвестной природы (EMBL Z49209). В нижнюю строку вынесены аминокислотные остатки, инвариантные во всех последовательностях; жирным шрифтом выделены остатки цистеина, предположительно участвующие в связывании ионов цинка (см. [2]).

Как видно из таблицы, до настоящего времени в *Sz. pombe* не идентифицирован также гомолог гена RPB4 *S. cerevisiae* [22]. У почкующихся дрожжей этот ген кодирует второй (наряду с субъединицей RPB9) не обязательный для жизнедеятельности клетки компонент РНК-полимеразы II. Именно гомолог гена RPB4 был обнаружен последним среди генов РНК-полимеразы II человека (V. Khazak et al., готовится к печати; ср. [5]). Поскольку в ферментах *S. cerevisiae* и *H. sapiens* субъединица Rpb4 непосредственно взаимодействует с субъединицей Rpb7, образуя легко отделяющийся от основного фермента субкомплекс [23], есть основания предполагать наличие подобного компонента и в РНК-полимеразе II *Sz. pombe*. Как и субъединицу hsRPB4 человека (V. Khazak et al., готовится к печати; номер депонирования в GenBank U85510), субъединицу Rpb4 *Sz. pombe*, по-видимому, можно будет обнаружить по ее взаимодействию с Rpb7, например с использованием дрожжевой системы двойных гибридов (ср. [24]).

Для целого ряда субъединиц, входящих в состав основного фермента транскрипции *Sz. pombe*, нами клонированы также соответствующие геномные фрагменты, большинство из которых, как следует из недавних данных Сэнгеровского центра (Великобритания; <http://www.sanger.ac.uk>) по крупномасштабному секвенированию хромосомы I *Sz. pombe*, располагается именно на этой хромосоме (см. таблицу).

Клонирование генов всех субъединиц РНК-полимеразы II *Sz. pombe* делает возможным вы-

яснение взаимодействий между этими компонентами в составе ферментного комплекса с применением как биохимических, так и генетических подходов. Кроме того, все белковые компоненты РНК-полимеразы II теперь могут быть получены в гомогенном состоянии в количестве, необходимом для детальной характеристики физико-химических свойств и установления пространственной структуры.

Последовательности, установленные в этой работе, депонированы в GenBank под следующими номерами: AF027820 (*rpb5*⁺), AF020780 (*rpb8*⁺), AF027821 (*rpb7*⁺), AF027822 (*rpb11*⁺) и AF027823 (гомолог RPB9).

Настоящая работа частично поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований и Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" (направление "Генная и клеточная инженерия").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Young R.A. // Annu. Rev. Biochem. 1991. V. 60. P. 689–715.
2. Thuriaux P., Sentenac A. // The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression / Eds J.R. Broach, J.R. Pringle, E.W. Jones. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. V. II. P. 1–48.
3. Lu H., Flores O., Weinmann R., Reinberg D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 10004–10008.

4. Acker J., Wintzerith M., Vigneron M., Kedinger C. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5345–5350.
5. Shpakovski G.V., Acker J., Wintzerith M., Lacroix J.-F., Thuriaux P., Vigneron M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 4702–4710.
6. Khazak V., Sadhale P.P., Woychik N.A., Brent R., Golemis E.A. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 6. P. 759–775.
7. Sipiczki M. // Molecular Biology of the Fission Yeast / Eds A. Nasim, P. Young, B.F. Johnson. San Diego; London; Sydney; Tokyo: Acad. Press, 1989. P. 431–452.
8. Azuma Y., Yamagishi M., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3749–3754.
9. Sakurai H., Miyao T., Ishihama A. // Gene. 1996. V. 180. P. 63–67.
10. Azuma Y., Yamagishi M., Ueshima R., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 461–468.
11. Kawagishi M., Yamagishi M., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 469–473.
12. Shpakovski G.V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
13. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 938–940.
14. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н., Тюрью П. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 110–117.
15. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 441–448.
16. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Цитология. 1997. Т. 39. С. 122–123.
17. Woychik N.A., Liao S.-M., Kolodziej P., Young R.A. // Genes Dev. 1990. V. 4. P. 313–323.
18. McKune K., Richards K.L., Edwards A.M., Young R.A., Woychik N.A. // Yeast. 1993. V. 9. P. 295–299.
19. Woychik N.A., McKune K., Lane W.S., Young R.A. // Gene Expr. 1993. V. 3. P. 77–82.
20. Riva M., Buhler J.-M., Sentenac A., Fromageot P., Hawthorne D.C. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 4570–4577.
21. Woychik N.A., Lane W.S., Young R.A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 19053–19055.
22. Woychik N.A., Young R.A. // Mol. Cell. Biol. 1989. V. 9. P. 2854–2859.
23. Edwards A.M., Kane C.M., Young R.A., Kornberg R.D. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 71–75.
24. Korobko I.V., Yamamoto K., Nogi Y., Muramatsu M. // Gene. 1997. V. 185. P. 1–4.

Molecular Cloning of the *rpb5⁺*, *rpb7⁺*, and *rpb11⁺* Genes of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Completing the Primary Structure of All Indispensable Subunits of Its RNA Polymerase II

G. V. Shpakovski and E. N. Lebedenko

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Genes encoding subunits *Rpb5⁺*, *Rpb7⁺*, and *Rpb11⁺* of RNA polymerase II of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* have been cloned and sequenced to complete the structural characterization of all indispensable components of one of the most important enzymes of the transcription machinery of the fission yeast.

Key words: fission yeast; nuclear RNA polymerase II; subunits *Rpb5*, *Rpb7*, *Rpb11*; *Rpb9* homologue; introns.