



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 SVGIKEMRTFVHTLGDHNNHTGILYANSMTPSAAKIATVTGQFTIETFQESDLIVNI THHELVPKHILLSPDEKKELL 160
 161 DRYKLRRETQLPRIQLADPVARYLGLKRGEVVKIVRRSETSGRYNSYRICA 210

Rpb7:

1 MPFFLKELSLTISLHPSYFGPRMQDYLKAKLLADVEGTCSGQYGYICVLDSENTIDDKGRVVPQGQFAEFVVKYRAVLW 80
 81 RPFGEVVDIVTTVNMKGFFANIGPLNVFVSSHLPVPPDMKFDPTANPPNYSGEDQVIEKGSNVLKIVGTRTDATEIFA 160
 161 IATMKEDYLGVL 172

Rpb11:

1 MNQPERYELIELMGLPKVTYELDSKSPNAAVVTLEKEDHTLANMLANQLLSDERVLVAGYKVPHPHNNFILRVQTVEDC 80
 81 SPKQVIVDAAKSLITHLEEIKVNFMEWELKMSIVEGVEMEFS 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 ₁ , 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.

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.