



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.5

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА *ADE 1* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Мясников А. Н., Плавник Ю. А., Саснаускас К. В.*,
Гедминене Г. К.*, Янулайтис А. А.*, Смирнов М. Н.

Ленинградский государственный университет;

*Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс

Ген *ADE 1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* кодирует фосфорибозиламиноимидазол-сукцинокарбоксамид—синтетазу (САЙКАР-синтетазу; КФ 6.3.2.6) — один из ферментов пуринового метаболизма [1]. Штаммы дрожжей, мутантные по гену *ADE 1*, ауксотрофны по аденину и при росте на средах в присутствии аденина образуют колонии характерного красного цвета. Свойство мутантов *ade 1* образовывать окрашенные колонии значительно облегчает генетические и генно-инженерные манипуляции с ними. Предполагается, что этот ген может быть использован в качестве селективного маркера при конструировании новых дрожжевых векторов. К настоящему времени ген *ADE 1* клонирован в нескольких лабораториях [2, 3], однако данные по его нуклеотидной последовательности в литературе отсутствуют.

Нами был клонирован ген *ADE 1* из штамма *S. cerevisiae* FH4C. Рестрикционная карта клонированного фрагмента ДНК (4 тыс. п.о.) приведена на рис. 1. Уточнить положение и направление транскрипции гена *ADE 1* удалось после того, как было обнаружено, что включение *IS1*-элемента в участок ДНК, отмеченный на рис. 1 стрелкой, приводит к резкому усилению экспрессии этого гена в клетках *E. coli*.

Анализ нуклеотидной последовательности проводили методом Сэнджера [4, 5]. ДНК фрагментировали с помощью рестриктаз, экзонуклеазы *Bal31* или обработкой ультразвуком, субклонировали в фаговых векторах M13mp10, M13mp9 и устанавливали их структуру. Нуклеотидная последовательность каждого из участков ДНК определена по результатам не менее трех независимых опытов, причем большая часть структуры проверена по обеим цепям ДНК. Общая длина фрагмента ДНК, представленного на рис. 2, составляет 1448 пар оснований.

При анализе последовательности обнаруживается единственная протяженная открытая рамка считывания, в начале которой имеется два кодона АТГ. Иницирующим является, по-видимому, первый из них, так как в этом случае наблюдается хорошее совпадение расчетной величины

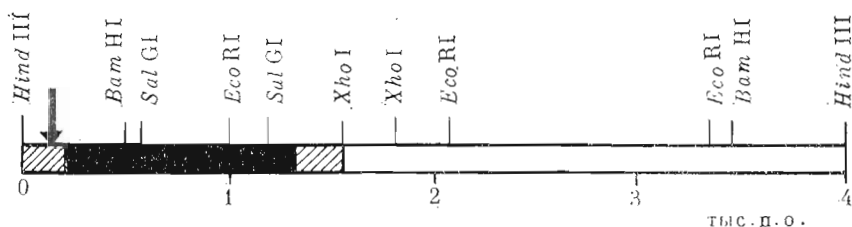


Рис. 1. Рестрикционная карта фрагмента ДНК, содержащего ген *ADE 1*. Включение *IS1*-элемента в участок, отмеченный стрелкой, активировало экспрессию гена *ADE 1* в клетках *E. coli*. Зачернена структурная часть гена *ADE 1*. Заштрихованы участки ДНК, прилегающие к гену *ADE 1*, для которых определена нуклеотидная последовательность

CCT GCC CAG GCC GCT GAG CTG GTG GGT GGA GAT TTC TCA CGT AGA GTG GCA GAA CTG GCT GTA AAA CTG TAC TCC 600
 Pro Ala Gln Ala Ala Glu Leu Val Gly Gly Asp Leu Ser Arg Arg Val Ala Glu Leu Ala Val Lys Leu Tyr Ser
 AAG TGC AAA GAT TAT GCT AAC GAG AAG GGC ATC ATC GCA GAC ACT AAA TTC GAA TTC GGT ATT GAC GAA AAG 675
 Lys Cys Lys Asp Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Ile Ile Ala Asp Thr Lys Phe Glu Phe Gly Ile Asp Glu Lys
 ACC AAT GAA ATT ATT CTA GTG GAC GAG GTG CTA ACG CCA GAC TCC TCT AGA TTC TGG AAC GGT GCC TCT TAT AAG 750
 Thr Asn Glu Ile Ile Leu Val Asp Glu Val Leu Thr Pro Asp Ser Arg Phe Trp Asn Gly Ala Ser Tyr Lys
 CTA GCA GAA TCC CAA GAT TCT TAC GAT AAG CAA TTT TTA AGA GAC TGG CTT ACT GCT AAT AAG TTG AAC GGT GTT 825
 Val Gly Glu Ser Gln Asp Ser Tyr Asp Lys Gln Phe Leu Arg Asp Thr Leu Arg Thr Ala Asn Lys Leu Asn Gly Val
 AAC GCC GTC AAA ATG CCC CAA GAC ATT GTC GAC AGG ACA AGG GCC AAA TAT ATA GAG GCT TAT CAA ACA TTG ACA 900
 Asn Gly Val Lys Met Pro Gln Asp Ile Val Asp Arg Thr Arg Ala Lys Tyr Ile Glu Ala Tyr Glu Thr Leu Thr
 GGG TCT AAA TGG TCT CAC TAA CGTGATTTACATATACTACAACTGGCCAGTGTAACTCCCTCACTGAATATGATTCATACATACCCGATCTA 992
 Gly Ser Lys Trp Ser His ***
 TTAATGTATAAATGTTCTCAGAACAAATTTTATCGATATCTTGTGTTCCAGTGGTATGCGAGGTTTGGCAAAATTTTTTACCATAAATATCCCGTTATAGATT 1092
 CTGGAACSTTACCAACTTCTTACCCGGTAAATTAATCTCCCTGGCTCCCTCACTGCTCCCTGGGGAAGTGTCCCTTCAACTGACTGACTCTCTTTCGTA 1192
 TTCAATACSTTGGCTTCCGAG

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность гена *ADE 1* и выведенная из нее аминокислотная последовательность САИКАР-синтетазы. Нумерация нуклеотидных остатков приведена от предполагаемой точки инициации трансляции

молекулярной массы САИКАР-синтетазы — 34 500 Да с экспериментально обнаруженной для очищенного препарата этого белка — 36 000 Да [6]. В некодирующих областях гена *ADE 1*, примыкающих к его 3'- и 5'-концам, присутствует ряд последовательностей, которые, по литературным данным, могут выполнять роль сигналов транскрипции и процессинга мРНК. Довольно трудно выделить в гене *ADE 1* последовательность Гольдберга-Хогнесса, так как область между —164 и —133 п. о. от точки начала трансляции состоит почти полностью из повторов динуклеотида ТА. Все же наиболее вероятным представляется, что в качестве «ТАТА-бокса» в гене *ADE 1* выступает участок ТАТАТАТТ, находящийся относительно старта трансляции в положении, типичном для дрожжевых промоторов (между —127 и —120 п. о.) [7, 8]. Сигналом «экспирования» мРНК [9] может служить последовательность ТТТТАТСТТТТ (между —86 и —76 п. о.). Интересно, что этот же фрагмент совпадает в 10 положениях из 11 с консервативной последовательностью *ARS*-элементов дрожжей [10], а клонированный ген *ADE 1* способен к автономной репликации в дрожжах [2]. В 3'-концевой нетранслируемой области гена *ADE 1* встречается последовательность ТАТGT...ТТТ (между 66 и 70, а также между 98—100 п. о. от терминирующего кодона), которой приписывается участие в терминации транскрипции у дрожжей [11]. В этой же области находятся два участка — ТАТААА и ААСААА (между 78 и 83 и 93 и 98 п. о. от ТАА-кодона), близких по структуре к эукариотическому сигналу полиаденилирования — ААТААА [12].

Авторы выражают благодарность В. С. Яковлевой за помощь при проведении экспериментов, А. В. Сорокину и А. П. Болотину за ценные технические консультации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fisher C. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, v. 34, p. 306—310.
2. Dimock K., James A. P., Seligy A. P. Gene, 1984, v. 271, p. 233—237.
3. Crowley J. C., Kaback D. B. J. Bacteriol., 1984, v. 159, p. 413—417.
4. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5463—5467.
5. Sanger F., Coulson A. R., Barrel C. G., Smith A. G. II., Roe B. A. J. Mol. Biol., 1981, v. 143, p. 161—168.
6. Османли К. В. Генетико-биохимическое изучение фосфорибозилсукцинилкарбоксамид-аминоимидазол-синтетазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Дис. канд. биол. наук. ЛГУ, 1985.
7. Holland J. P., Holland M. J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 2596—2605.
8. Arima K., Oshima T., Kubota I., Nakamura N., Mizunaga T., Toh-e A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, p. 1657—1672.
9. Corden J., Waslyk B., Buckwalder A., Sasson-Corsi P., Kedinger C., Chambon P. Science, 1981, v. 209, p. 1406—1414.
10. Broach J. R. CSH Symp. Quant. Biol., 1982, v. 47, p. 201—213.
11. Zaret K. S., Sherman F. Cell, 1982, v. 28, p. 563—573.
12. Fitzgerald K. S., Shenk T. Cell, 1981, v. 24, p. 251—260.

Поступило в редакцию
10.X.1985.

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE *ADE 1* GENE OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

MYASNIKOV A. N., PLYVNIK Yu. A., SASNAISKAS K. V., *
GEDMINENE G. K. *, YANULAITIS A. A. *, SMILNOV M. N.

Leningrad State University, Leningrad; * NPO «Ferment», Vilnius

The yeast *ADE 1* gene has been cloned and sequenced. The primary structure deduced from the nucleotide sequence demonstrated that phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthetase is a protein with molecular weight of 34 500 D.