



УДК 577.214.(337+622)

ТРИ ОБЛАСТИ МИНИ-СУБЪЕДИНИЦЫ Rpb10 ЯДЕРНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ СТРОГО КОНСЕРВАТИВНЫ У ВСЕХ ЭУКАРИОТ

© 1996 г. Г. В. Шпаковский*[#], Е. Н. Лебеденко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Институт биоорганической химии АН Белоруссии, Минск

Поступило в редакцию 08.07.96 г.

Двумя независимыми подходами (ПЦР и генетическая супрессия) клонирована кДНК гена *rpb10*⁺ делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, кодирующего субъединицу Rpb10, общую для всех трех ядерных РНК-полимераз. Сравнение выведенной из кДНК первичной структуры субъединицы Rpb10 *Sz. pombe* (71 а.о.) с гомологичными субъединицами РНК-полимераз I–III *Saccharomyces cerevisiae* и *Homo sapiens* показало, что наиболее консервативными в эволюции структурными мотивами этих субъединиц являются три гептапептида: **RCFT/SCGK** (участок 6–12), **RYCCRRM** (43–49) и **HVDLIEK** (53–59). Установлено, что субъединица Rpb10 *Sz. pombe* способна с успехом замещать свой гомолог (субъединицу ABC10β) в клетках пекарских дрожжей *S. cerevisiae*.

Ключевые слова: ядерные РНК-полимеразы, общие субъединицы, *Schizosaccharomyces pombe*, ген *rpb10*⁺, супрессоры, структурные мотивы.

Ядерные ДНК-зависимые РНК-полимеразы I, II и III эукариот представляют собой сложные гетеромультимерные белки, состоящие из 12–17 различных субъединиц. В последние 10 лет достигнут существенный прогресс в клонировании и секвенировании генов различных субъединиц РНК-полимераз некоторых эукариотических организмов, особенно пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Накоплена также информация о возможной роли ряда компонентов ядерных РНК-полимераз в процессе транскрипции [1, 2]. Однако до сих пор ничего не известно о функции пяти субъединиц, которые присутствуют во всех трех ферментных комплексах и абсолютно необходимы для жизнеспособности эукариотических клеток [1, 3].

С целью изучения этих общих субъединиц, не имеющих эквивалентов в РНК-полимеразах эубактерий, мы клонируем их гены из делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* и проводим сравнение структуры и функции этих генов и кодируемых ими белков с соответствующими гомологами из эволюционно далеких дрожжей *S. cerevisiae*. Ранее мы клонировали гены *rpb6*⁺ и *rpb10*⁺ *Sz. pombe*, кодирующие гомологи общих субъединиц ABC23 и ABC10α *S. cerevisiae* [4, 5]. Кроме того, мы впервые продемонстрировали, что субъединицы Rpb6 и Rpb10 *Sz. pombe* способны полностью заменять свои гомологи в составе РНК-

полимераз *S. cerevisiae* [4]. Такая межвидовая комплементация позволяет исследовать гены (включая их мутантные формы) общих субъединиц РНК-полимераз разных эукариот в наиболее изученной к настоящему времени системе *S. cerevisiae*.

В настоящем сообщении мы описываем клонирование двумя независимыми путями кДНК гена еще одной общей субъединицы РНК-полимераз *Sz. pombe* – *rpb10*⁺. Путем ПЦР с использованием вырожденных праймеров

(5') TCGGGATCCGTYGTYGGYGAYAARTGGGA

и

(5') ACGTGAATTCRRATCATNCKNCKRCARCA,

соответствующих двум консервативным участкам некоторых известных гомологов субъединицы ABC10β (аминокислотные остатки 10–19 и 45–54 [5]), на матрице суммарной кДНК *Sz. pombe* получили фрагмент ДНК длиной 120 п.о., который клонировали в плазмидном векторе pGEN [5] и секвенировали. На основании полученной информации сконструировали специфические праймеры

(5') GATAAGTGGGACACSTATCTC

и

(5') CATTCGCCGGCAGCAATAAC

для скрининга экспрессирующей кДНК-клонотки *Sz. pombe* [6] методом последовательных разведений, описанным нами ранее [4]. В результате получили плазмиду pENL44, содержащую вставку

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

```

-30                               -1 1                               30
gtcaagaaggcgacgggtgttcaaagttagaata ATG ATC ATT CCT ATT CGC TGC TTT TCT TGT
Met Ile Ile Pro Ile Arg Cys Phe Ser Cys

GGA AAG GTT ATT GGT GAC AAG TGG GAC ACC TAT CTC ACA CTC CTT CAA GAG GAT AAC
Gly Lys Val Ile Gly Asp Lys Trp Asp Thr Tyr Leu Thr Leu Leu Gln Glu Asp Asn

90                               120
ACA GAG GGT GAG GCA TTG GAT AAA CTT GGC CTT CAA CGT TAT TGT TGT CGT CGT ATG
Thr Glu Gly Glu Ala Leu Asp Lys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Cys Cys Arg Arg Met

150                               180
ATT CTT ACT CAT GTC GAC TTA ATC GAA AAG CTA CTT TGC TAT AAT CCG TTG TCA AAA
Ile Leu Thr His Val Asp Leu Ile Glu Lys Leu Leu Cys Tyr Asn Pro Leu Ser Lys

210                               240                               270
CAA AAG AAT CTT TAA tcggttagccacgcttgaagaatgtgaggtttatacttgagattaggccgaga
Gln Lys Asn Leu stop

```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность кДНК гена *rpb10⁺* *Sz. pombe* и выведенная из нее аминокислотная последовательность общей субъединицы РНК-полимераз I–III *Sz. pombe* Rpb10. Нуклеотидная последовательность (депонирована в базе данных EMBL под номером X95733) соответствует идентичным вставкам в плаزمиды pENL44 (получена с помощью ПЦР-скрининга) и pGVS413 (получена генетической супрессией). Цифры над последовательностью указывают нумерацию нуклеотидных звеньев, отрицательные номера соответствуют 5'-некодирующей области кДНК. Жирным шрифтом выделены обсуждаемый в тексте консервативный остаток гистидина и четыре инвариантных остатка цистеина, образующих атипичный Zn-связывающий домен.

| | | |
|----------------------|---|----|
| <i>S. cerevisiae</i> | 1 MIVPVRFCSCGKVVVGDKWESYLNLLQEDELDEGTALSRLGLKRYCCRRMILTHVDLIEKFLRYNPLEKRD | 70 |
| | ***:*****:*****:*** ***** ** ** :*** ***** ***** * **** * | |
| <i>Sz. pombe</i> | 1 MIIPVRCFSCGKIVIGDKWDTYLTLQED-NTEGEALDKLGLORYCCRRMILTHVDLIEKLLCYNPLSKQKNL | 71 |
| | *****:***:***** ***** ** ** * ** :*** ** * *****; ***** ** * * | |
| <i>O. sativa</i> | 1 MIIPVRCFTCGKIVIGNKWDLYLDLLQAD-YTEGDALDALGLVRYCCRRMLMTHVDLIEKLLNYNTLEKTE | 69 |
| | *****:*****:***** ***** * ***** * ***** ***** ***** *****: ; | |
| <i>B. napus</i> | 1 MIIPVRCFTCGKIVIGNKWDAYLDLLQLD-YTEGDALDALNLVRYCCRRMLMTHVDLIEKLLNYNTLEKSDNS | 71 |
| | *****:*****:*** ** * : ***** * ***** ***** ***** * | |
| <i>H. sapiens</i> | 1 MIIPVRCFTCGKIVGNKWEAYLGLLQAE-YTEGDALDALGLKRYCCRRMLLAHVDLIEKLLNYAPLEK | 67 |
| | MI P RCF CGK G KW YL LLQ EG AL L L RYCCRRM HVDLIEK L Y L K | |

Рис. 2. Сопоставление первичных структур эукариотических белков, родственных общей субъединице ABC10β РНК-полимераз I–III *S. cerevisiae*. Для гомологов из *S. cerevisiae*, *H. sapiens* и *Sz. pombe* показано, что они действительно являются субъединицами РНК-полимераз ([1, 5] и данные этой работы), а приведенные аминокислотные последовательности из *O. sativa* и *B. napus* выведены нами из недавно депонированных в GeneBank открытых рамок считывания неизвестной природы. Звездочками обозначены идентичные аминокислотные остатки соседних последовательностей, а двоеточиями – консервативные замены. На нижнюю строку вынесены аминокислотные остатки, инвариантные во всех приведенных последовательностях. Жирным шрифтом выделены три консервативные области; подчеркнуты аминокислотные остатки, по-видимому, участвующие в связывании ионов Zn²⁺.

полноразмерной копии кДНК интересующего нас гена (рис. 1).

Прямое клонирование кДНК гена *rpb10⁺* провели путем поиска генетических супрессоров сконструированного нами* термочувствительного мутанта *S. cerevisiae* YGVS-047, дефектного по гомологичному гену *RPB10* и не способного поэтому к нормальному росту при 37°C. После трансформации штамма YGVS-047 образцом суммарной плазмидной ДНК экспрессирующей кДНК-клонотекки

Sz. pombe [6] отбирали клоны, способные расти при 37°C, т.е. несущие супрессоры дефекта гена *RPB10* *S. cerevisiae*. Из восьми отобранных таким образом сильных супрессоров семь представляют собой независимые полноразмерные кДНК-копии гена *rpb10⁺*, а восьмой (супрессор № 5) является новым геном *Sz. pombe*. Одна из плазмид (pGVS413, супрессор № 1) оказалась полностью идентичной плазмиде pENL44, обнаруженной в клонотеке с помощью ПЦР (рис. 1). Отметим, что такое прямое клонирование гена субъединицы РНК-полимераз путем межвидовой комплементации осуществлено впервые.

* Данные будут опубликованы отдельно.

Методом перетасовки плазмид [5] мы показали, что изолированные обоими путями копии кДНК гена *rpb10⁺* *Sz. pombe* способны полностью комплементировать нуль-аллель гомологичного гена *RPB10* *S. cerevisiae*. Таким образом, субъединица Rpb10 *Sz. pombe* способна успешно функционировать в РНК-полимеразах I–III *S. cerevisiae*, полностью замещая свой гомолог ABC10β.

Ранее уже отмечалось, что все известные гомологи субъединицы ABC10β содержат два консервативных цистеинсодержащих участка (RCFT/SCGK и RYCCRRM) [5], отвечающих, вероятно, за связывание ионов цинка [7]. Анализ структуры белка Rpb10 *Sz. pombe*, выведенной из установленной нами последовательности кДНК, в сравнении с другими гомологами выявляет еще одну структурную особенность, характерную для всех эукариотических гомологов субъединицы ABC10β: абсолютную консервативность гептапептида HVDLIEK вблизи С-конца белков (рис. 2). Можно предположить, что остаток гистидина в этом мотиве также участвует в координации ионов Zn²⁺, компенсируя атипичность цистеинсодержащего мотива RYCCRRM [5, 7]. Данное предположение косвенно подтверждают наши недавно полученные результаты направленного мутагенеза указанного остатка гистидина, приводящего к

возникновению синтетической летали в паре с мутацией в консервативном, классическом для Zn-связывающих пальцев, мотиве RCFT/SCGK.

Настоящая работа частично поддержана грантами MWE000 Международного научного фонда и MWE300 Международного научного фонда и Правительства Республики Беларусь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thuriaux P., Sentenac A. // The Molecular Biology of Yeast. V. 2 / Eds E.W. Jones, J.R. Pringle, J.R. Broach. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. P. 1–48.
2. Woychik N.A., Young R.A. // Transcription Mechanisms and Regulation / Eds R.C. Conaway, J.W. Conaway. N.Y.: Raven Press, 1994. P. 227–242.
3. Woychik N.A., Liao S.-M., Kolodziej P., Young R.A. // Genes Dev. 1990. V. 4. P. 313–323.
4. Shpakovski G.V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
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. Becker D.M., Fikes J.D., Guarente L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1968–1972.
7. Treich I., Riva M., Sentenac A. // J. Biol. Chem. 1992. V. 266. P. 21971–21976.

Three Structural Motives of the Rpb10 Minisubunit of Nuclear RNA Polymerases Are Strictly Conserved between Eukaryotes

G. V. Shpakovskii* and E. N. Lebedenko

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

*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences, Minsk, Belarus

Abstract—The *rpb10⁺* cDNA from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* was cloned using two independent approaches (PCR and genetic suppression). The cloned cDNA encoded the Rpb 10 subunit common for all three RNA polymerases. Comparison of the deduced amino acid sequence of the *Sz. pombe* Rpb10 subunit (71 amino acid residues) with those of the homologous subunits of RNA polymerases I, II, and III from *Saccharomyces cerevisiae* and *Homo sapiens* revealed that heptapeptides RCFT/SCGK (residues 6–12), RYCCRRM (residues 43–49), and HVDLIEK (residues 53–59) were evolutionarily the most conserved structural motifs of these subunits. It is shown that the Rpb10 subunit from *Sz. pombe* can substitute its homolog (ABC10β) in the baker's yeast *S. cerevisiae*.

Key words: nuclear RNA polymerases I–III, common subunits, *Schizosaccharomyces pombe*, *rpb10⁺* gene, genetic suppressors, structural conservation.