



ПИСЬМО
РЕДАКТОРУ

УДК 577.214.(337+622)

ПЕРВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО СЕМЕЙСТВА
ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ,
ОБНАРУЖЕННЫЙ С ПОМОЩЬЮ МЕЖВИДОВОЙ
КОМПЛЕМЕНТАЦИИ

© 1997 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

Поступило в редакцию 01.11.96 г.

Заговорило, зацвело все, что вчера томилось немо...

А.А. Фет

Межвидовой комплементацией условнодефектной функции незаменимого компонента ядерных РНК-полимераз I–III *Saccharomyces cerevisiae* – субъединицы ABC10β – клонирована кДНК ранее не описанного гена *fet5* (от *factor of eukaryotic transcription*; цифра 5 обозначает номер соответствующего супрессорного клона) делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, кодирующего новый эукариотический фактор транскрипции. Фактор *Fet5 Sz. pombe* оказался первым членом целого семейства широко распространенных у эукариот и консервативных в эволюции белков, для которого определена сфера функционирования. Новое Fet-5-семейство белков включает в себя три подсемейства с характерными структурными особенностями. Консервативные домены, обнаруженные нами в аминокислотной последовательности *Fet5*, указывают на то, что он является, вероятно, ATP/GTP-связывающим белком.

Ключевые слова: общая субъединица РНК-полимераз I–III ABC10β, мультикопийный гетерологичный супрессор, *Schizosaccharomyces pombe*, ген *fet5*, фактор транскрипции, пуринсвязывающие белки, новое семейство белков.

Эукариотические организмы имеют очень сложный аппарат транскрипции, включающий три ядерные ДНК-зависимые РНК-полимеразы и множество других белковых факторов (общих факторов инициации, активаторов, медиаторов транскрипции и т.д.), участвующих на различных этапах синтеза РНК, прежде всего в инициации этого процесса [1, 2]. Одним из важных подходов к установлению возможных функциональных партнеров в сложном процессе экспрессии генома является генетический метод супрессорного анализа [3]. Арсенал генетических подходов для изучения системы транскрипции эукариот был расширен в конце 1992 г., когда мы впервые продемонстрировали возможность межвидовой комплементации, т.е. показали, что некоторые субъединицы ядерных РНК-полимераз взаимозаменяемы даже для эволюционно очень далеких эукариотических видов [4].

Позднее было показано, что заменяемы многие (хотя и далеко не все) компоненты и что иногда комплементация является лишь частичной,

приводя к образованию условных мутантов дрожжей по специфической функции [5]. Дальнейшее развитие этого подхода привело к первому доказательству функционального родства субъединиц РНК-полимераз Archaea и Eucarya (см. [6]), а также к успешному клонированию компонента эукариотических РНК-полимераз путем межвидовой комплементации [6, 7].

Действительно, клонирование кДНК гена *rpb10*, кодирующего одну из пяти малых общих субъединиц ядерных РНК-полимераз *Schizosaccharomyces pombe*, было осуществлено нами прямой супрессией с помощью межвидовой комплементации соответствующего термочувствительного мутанта *Saccharomyces cerevisiae* [6, 7]. Мы рассчитывали также, что среди мультикопийных супрессоров в этом эксперименте помимо субъединицы *Rpb10* (гомолог дефектной субъединицы *S. cerevisiae*) окажутся и новые, ранее не описанные белки (гетерологичные супрессоры). Поскольку чужеродная генетическая система является очень строгим функциональным фильтром для гетерологичных супрессоров, в случае их обнаружения можно было ожидать, что они будут действительно прямыми, а значит, наиболее ценностными с

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

-20 -1 1 30 60

aaaagacgttagtcttttaaaaaa ATG GTT AAG GTG GCA GCT TTT GTT TGT GGT GTT GCC AGC AGT GGT AAA AGT ACT TTT TGT
Met Val Lys Val Ala Ala Phe Val Cys Gly Val Ala Ser Ser Gly Lys Ser Thr Phe Cys

90 120 150

GAA GCA TTA ATG TCT TAT ATG AAA AGC GTT GGA CGT TCT TGC CAT TTA GTT AAT TTA GAT CCT GCT GCA GAA AAC TTC GAA TGG GAA CCA
Glu Ala Leu Met Ser Tyr Met Lys Ser Val Gly Arg Ser Cys His Leu Val Asn Leu Asp Pro Ala Ala Glu Asn Phe Glu Trp Glu Pro

180 210 240

ACT GTT GAT ATT AGA GAC TTA ATA TCC ATT GAT GAT GTT ATG GAA GAG CTG GAC TAC GCC CCT AAT GGT GGG TTA ATT TAT TGT TTC GAA
Thr Val Asp Ile Arg Asp Leu Ile Ser Ile Asp Asp Val Met Glu Glu Leu Asp Tyr Ala Pro Asn Gly Leu Ile Tyr Cys Phe Glu

270 300 330

TTT TTG ATG GAA AAC TTA GAT TGG TTA AAT GAA GAA ATT GGC GAT TAC GAC GAA GAC TAT TTA ATT TTC GAT ATG CCT GGA CAA ATT GAA
Phe Leu Met Glu Asn Leu Asp Trp Leu Asn Glu Glu Ile Gly Asp Tyr Asp Glu Asp Tyr Leu Ile Phe Asp Met Pro Gly Gln Ile Glu

360 390 420

TTG TAT ACT CAC GTA CCA ATT TTA CCA GCA TTA ATT CGC CAT CTT CAA GTA ACC CTA AAC TTT CGT CCT TGT GCT GTC TAC CTG TTA GAA
Leu Tyr Thr His Val Pro Ile Leu Pro Ala Leu Ser Ala Ile Arg His Leu Gln Val Thr Leu Asn Phe Arg Pro Cys Ala Val Tyr Leu Leu Glu

450 480 510

AGC CAA TTT CTC GTT GAC CGT ACA AAG TTC TTT GCG GGT GTT TTA AGC GCA ATG AGC GCA ATG GTT ATG ATG GAA GTC CCG CAT ATT AAC
Ser Gln Phe Leu Val Asp Arg Thr Lys Phe Ala Gly Val Leu Ser Ala Met Ser Ala Met Val Met Met Glu Val Pro His Ile Asn

540 570 600

TTA TTG AGC AAA ATG GAT TTA CTC AAA GAC AAC ATT AAC ATT ACA AAA GCG GAA TTA AAA AGG TTT CTC AAT ACA GAT CCA CTC TTG CTC
Leu Leu Ser Lys Met Asp Leu Leu Lys Asp Asn Asn Ile Thr Lys Ala Glu Leu Lys Arg Phe Leu Asn Thr Asp Pro Leu Leu Leu

630 660 690

ACA GGT GAA ATT AAC GAA ACA AAC CCA AAC TTT CAC GAA CTT ATT CGG TGC ATT GTT CAA CTG ATT GAT GAC TTT AAT ATG GTC ATT
Thr Gly Glu Ile Asn Glu Thr Thr Asn Pro Lys Phe His Glu Leu Asn Arg Cys Ile Val Gln Leu Ile Asp Asp Phe Asn Met Val Asn

720 750 780

TTC CTT CCT CTT GAG AGC GGA AAC GAG GAA AGC GTA ACG GAG TAC TTA GTT ATA TTG ACG ATG CCT ACC CAA TGG TAC GAA GAT CAG GAA
Phe Leu Pro Leu Glu Ser Gly Asn Glu Glu Ser Val Thr Glu Tyr Leu Val Ile Leu Thr Met Pro Thr Gln Trp Tyr Glu Asp Gln Glu

810 850

CCA AAA GAT CCT GAT CGG TTT GAA GCA GAT GAT TTA GAA GAC GAT GAA TAG ggagatacacgtatagaagggt(aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa)
Pro Lys Asp Pro Asp Arg Phe Glu Ala Asp Asp Leu Glu Asp Asp Glu stop

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность кДНК гена *fet5 Sz. pombe* и выведенная из нее аминокислотная последовательность соответствующего белка. Цифры вверху строк обозначают нумерацию нуклеотидов, отрицательные номера использованы для нуклеотидов 5'-некодирующей области. В рамку заключен 11-звенный сегмент, идентичный соответствующему сегменту гена *rpb10 Sz. pombe*.

научной точки зрения генетическими партнерами субъединицы ABC10 β .

Реальные результаты эксперимента полностью оправдали наши ожидания. Из восьми отобранных нами супрессорных клонов семь несут независимые вставки кДНК гена *rpb10*, а восьмой клон (плазмида pGVS510, супрессор № 5) содержит вставку полноразмерной кДНК нового гена делящихся дрожжей *Sz. pombe*, названного нами *fet5* (от *factor of eukaryotic transcription*). Установленная нами первичная структура гена *fet5*, кодирующего белок с молекулярной массой 31.7 кДа, состоящий из 276 а. о., приведена на рис. 1.

Способность гена *fet5 Sz. pombe* супрессировать дефектный аллель гена *RPB10 S. cerevisiae* прямо указывает на то, что белок Fet5 является непосредственным участником транскрипционного процесса. Интересно, что в участке инициации трансляции мРНК *fet5* имеется сегмент длиной в 11 п. о., полностью идентичный соответствующей последовательности в гене *rpb10 Sz. pombe* (см. рис. 1). Поскольку вероятность такого совпадения чисто мала (не более 10^{-5}), можно предположить, что для генов *rpb10* и *fet5* возможна согласованная регуляция их экспрессии.

Новый фактор транскрипции Fet5 из *Sz. pombe* представляет собой ATP- и/или GTP-связываю-

щий белок, так как он содержит классическую фосфатсвязывающую петлю Gly-X-X-X-Gly-Lys-Ser/Tyr (мотив A, или Р-петля) и структурный домен C (Asp-X-X-Gly-Gln), характерные для луринсвязывающих полипептидов [8, 9], а также специфичный для связывания только гуанинодержащих нуклеотидов домен G (Asn/Ser-Lys-X-Asp) [10] (рис. 2).

Открытый нами фактор транскрипции Fet5 характерен для всех эукариот и высококонсервативен в эволюции. Об этом свидетельствует наличие в банках данных гомологичной гену *fet5* (по всей его протяженности) открытой рамки считывания неизвестной природы из хромосомы XII *S. cerevisiae* (номер депонирования U29865; аминокислотная последовательность L9672.8 на рис. 2), а также неполных последовательностей кДНК из риса (*Oryza sativa*; номер депонирования D40187) и мыши (*Mus musculus*; номер депонирования R74631), кодирующих полипептиды с чрезвычайно высокой гомологией с N-концевой частью Fet5 (данные не приведены).

Кроме того, в своей N-концевой части (а. о. 1-112) Fet5 явно гомологичен трем другим, более длинным, белковым последовательностям (347, 385 и 355 а. о.), кодируемым открытами рамками считывания неизвестной природы (из *S. cerevisiae* и

Р-Петр

Fe5 (Sz.pombe) :	MVKVAAFVGAVASSGKSTFCEALMSYMKSVGRSCHLVLNLDPAARENFEWPTVDIRDLLISDDVMEELDYAPNGGLIYCF	79
* +* + * *	* +*	
MSRGVGMVLPAGAGKSTFCNSIISSHNOTVGRRAHIVNLDPAAEATKYEFITDIRDLLISDDVMEEMDLGPNGAALIYCF	79	
+ +* + * +*		
MPFAQIVIGPRGSCKSTFCNSQFFNPAQGRHSQVNMDPNDALPPCAVDIRDETEIMQFOLQIGMMLYAV	78	
* +* + * +*		
MSLSTIICIGMAGSGKTTFMORLNSHILRAEKTPPYVINVLDPAFLRVPYGANIDIRDLSIKYKKVMEINYOLGPNGAALVTSI	79	
+ + + +*		
Y1B2_CE: MAEKAENLPSSSAEASEESEPPSQTGPVNQKPSILVGMAGSGKTEVQLTAFHLARKTPPYVINLDPAVSKVYPVNVDIRDTVKYKEVMKEFGMGNGAAMTCI	106	
(C. elegans)		

GXXXXGKS/T

2

АДМЕН

10

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей фактора эукариотической транскрипции *Fei5* и других представителей обнаруженного нами нового суперсемейства белков. Звездочками отмечены идентичные аминокислотные остатки соседних последовательностей, плюсами – консервативные замены. Помимо *Fei5* в таблице приведены последовательности L9672.8, YLR262 и YJR072 (соответственно из хромосом XII, XV и *S. cerevisiae*), а также YLB2_CE из *C. elegans* выведены из депонированной в GenBank открытой рамок считывания из известной природы (номера депонирования соответственно U20865, Z75170, Z49572 и U10402). В рамках заключены в скобки *ATP/GTP*-связывающие белковые домены.

Caenorhabditis elegans, номера депонирования соответственно Z75170, Z49572 и U10402; последовательности YOR262w, YJR072c и YLB2_SE на рис. 2). Все три этих потенциальных белка также содержат классическую Р-петлю и структурные домены С и Г (рис. 2) и принадлежат, вместе с Fet5 и его полными гомологами из других эукариотических организмов (см. выше), к новому суперсемейству эукариотических факторов транскрипции.

Мы полагаем, что Fet5 является компонентом холофермента РНК-полимеразы II (см. [2, 6]), а возможно, и субъединицей, обнаруженной в препаратах РНК-полимеразы II *Sz. pombe* в виде полосы белка с молекулярной массой 33 кДа [11]. Белок Fet5, вероятно, непосредственно взаимодействует с субъединицей Rpb10 (ABC10β) на энергетически зависимых стадиях синтеза мРНК, например при перестройках хроматина в момент формирования открытого комплекса и при инициации транскрипции. Действительно, АТР-азная активность, необходимая для функционирования РНК-полимеразы II на этих стадиях [1], до сих пор не найдена.

Настоящая работа была поддержана грантом № 96-04-49867 Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roeder R.G. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. P. 402–408.
2. Li Y., Bjorklund S., Jiang Y.W., Kim Y.-J., Lane W.S., Stillman D.J., Kornberg R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 10864–10868.
3. Guarente L. // Trends Genetics. 1993. V. 9. P. 362–366.
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. Шпаковский Г.В., Лебеденко Е.Н., Тюль П. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 110–117.
7. Шпаковский Г.В., Лебеденко Е.Н. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 938–940.
8. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. // EMBO J. 1982. V. 1. P. 945–951.
9. Saraste M., Sibbald P.R., Wittighofer A. // Trends Biochem. Sci. 1990. V. 15. P. 430–434.
10. Lochrie M.A., Simon M.I. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 4957–4965.
11. Azuma Y., Yamagishi M., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3749–3754.

The First Member of a Novel Family of Protein Factors of Eukaryotic Transcription Discovered by the Heterospecific Complementation

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

Abstract—The cDNA of a previously uncharacterized gene *fet5* (*factor of eukaryotic transcription, clone no. 5*) of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* was cloned by the heterospecific complementation of a conditional mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in the function of the RNA polymerases I–III common subunit ABC10β. The gene encodes a new factor of eukaryotic transcription, Fet5, the first member of a superfamily of proteins for which the area of functioning is determined. The Fet5-superfamily consists of three distinct families of proteins highly evolutionarily conserved and widely spread among eukaryotes. Features of the Fet5 amino acid sequence suggest that it belongs to ATP/GTP-binding proteins.

Key words: RNA polymerases I–III; common subunit ABC10β; multicopy extragenic suppressor; heterospecific suppressor; *Schizosaccharomyces pombe*; *fet5* gene; transcription factor; purine nucleotides binding proteins; new protein superfamily.