



УДК 577.214.(337+622)

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ *rpc19⁺* И *rpc40⁺* *Schizosaccharomyces pombe*, КОДИРУЮЩИХ ОБЩИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ЯДЕРНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I И III*

© 1998 г. Г. В. Шпаковский[#], Е. К. ШематороваИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 14.08.98 г. Принято к печати 20.08.98 г.

Из геномной и кДНК-клеточек *Schizosaccharomyces pombe* выделены и проанализированы полно-размерные кДНК и участки хромосом (~10 т.п.о.) с генами *rpc19⁺* и *rpc40⁺*, кодирующими общие субъединицы ядерных РНК-полимераз I и III. Установлено, что клонированные гены расположены соответственно на хромосомах I и II делящихся дрожжей, причем ген *rpc40⁺* безынтронный, а ген *rpc19⁺* содержит два интрона. Сопоставление выведенных из кДНК первичных структур субъединиц Rpc19 (125 а.о.; M 13722 кДа; pI 4.51) и Rpc40 (348 а.о.; M 39141 кДа; pI 5.40) *Sz. pombe* с ортологичными компонентами других эукариот позволило выявить наиболее консервативные структурно-функциональные домены этих белков.

Ключевые слова: делящиеся дрожжи; ядерные РНК-полимеразы I и III; гены *rpc19⁺* и *rpc40⁺*; субъединицы Rpc19 и Rpc40; α -мотив.

Аппарат транскрипции эукариотических организмов устроен гораздо сложнее, чем у прокариот, и состоит из трех ядерных РНК-полимераз (I, II и III) [3]. Каждый из этих трех ферментов организован вокруг сердцевины, включающей в себя субъединицы, родственные компонентам кора РНК-полимеразы бактерий ($\alpha_2\beta\beta'$), а также набор из пяти субъединиц (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 и Rpc10), общих для всех трех РНК-полимераз. Структурными гомологами субъединиц β' и β бактериальной РНК-полимеразы у эукариот являются две самые большие субъединицы ядерных РНК-полимераз [3]. Роль же прокариотического гомодимера α_2 в эукариотических ферментах, по всей видимости, выполняют гетеродимер Rpc40–Rpc19 в случае ферментов I и III [4] и гетеродимер Rpb3–Rpb11 в случае РНК-полимеразы II [5, 6]. С целью изучения эволюционной консервативности этих компонентов РНК-полимераз I, II и III мы ранее клонировали ген *rpbl1⁺*, кодирующий субъединицу РНК-полимеразы II *Sz. pombe* [7] и впоследствии показали, что он способен функционально замещать ген-ортолог (*RPB11*) в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, хотя полученный штамм характеризуется замедленным ростом и выраженным *ts*-фенотипом** (Г.В.Ш., не-

опубликованные данные). Настоящая работа посвящена клонированию и характеристике генов *Sz. pombe*, кодирующих две другие родственные белку α субъединицы, Rpc19 и Rpc40, входящие в состав ядерных РНК-полимераз I и III.

Компьютерный анализ базы данных GenBank/EMBL на присутствие гомологов субъединицы RPC19 *S. cerevisiae* [8] выявил гомологичную гену этой субъединицы нуклеотидную последовательность, описанную в качестве побочного продукта поиска генетических детерминант *Sz. pombe*, препятствующих (в случае их повышенной экспрессии с мультикопийных плазмид) нормальному расхождению хромосом [9]. Эта структурная информация позволила нам сконструировать специфические праймеры (см. подпись к рис. 1) для поиска кДНК *rpc19⁺* в представительной клонотеке *Sz. pombe* [10]. Просеивание кДНК-клеточек делящихся дрожжей, проведенное по методу последовательных разведений [11], привело к клону рESH38, содержавшемуся в первичном разведении № 18 (клон #18-2-1-6-38). ПЦР с теми же специфическими праймерами на матрице геномной ДНК *Sz. pombe*, а также на матрице первичного разведения А6 геномной клонотеки привела к более длинному продукту (620 п.о. вместо 460 п.о.), что указывает на присутствие в гене *rpc19⁺* по крайней мере одного интрона (рис. 1). Полное секвенирование вставки ДНК *Sz. pombe*, содержащейся в плазмиде рESH38, позволило установить первичную структуру полноразмерной кДНК *rpc19⁺* и

* Результаты данной работы были частично представлены ранее [1, 2].

** *ts* – термочувствительный.

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


```

gctgtttgcatagaagtttcgctgtatcttttctttttttataaaaataaacttttagac      59
MetAlaAlaMetThrAspValThrAspProSerSerValAlaMetGluSerAlaThrGlu      [20]
ATGGCGGCAATGACAGACGTAACAGATCCTAGCTCAGTTGCTATGGAATCTGCAACTGAA      119
LysIleIleIleLeuProGlyHisSerAlaGluLeuThrSerValThrPheGlnIleGln      [40]
AAAATAATATATCCTTCCTGGTCATTCTGCTGATCTTACATCTGTGACATTTCAAATTCAA      179
LysGluAspHisThrLeuGlyAsnSerLeuArgTyrValIleMetLysAsnProGluVal      [60]
AAAGAGGACCATAACGCTAGGCAATTCTCTCGCTATGTCATATGAAAAATCCTGAGGTT      239
GluPheCysGlyTyrSerIleProHisProSerGluAlaLysMetAsnPheArgIleGln      [80]
GAGTTTTCGCGTTACTCCATCCCACATCCATCTGAAGCAAAAATGAATTTTCGAATTCAG      299
                                     EcoRI
ThrAlaProSerThrThrAlaValAspValLeuArgLysGlyLeuAspAspLeuIleAsp      [100]
ACAGCACCTTCAACAACCGCTGTAGATGTTTAAAGAAAAGGGCTCGATGATTTGATTGAC      359
LeuCysAspAlaValThrGluLysPheThrGluGlnLeuProArgAspThrSerThrThr      [120]
CTTTGTGATGCGGTTACAGAAAATTTACTGAACAACCTCCTAGAGATACATCTACTACC      419
MetGluValAspGly***                                     SwaI      [125]
ATGGAGGTTGATGGATAAatttggttatttgttccttggacttttccatttaaatttct      479
                                     PstI
atcattccatcagctgcagtttagcaggaatatttgggcatttctaattccattaaggt      539
cggtgaaatagttaagagagaaataacttttatttggtagggtatgggttgcttactta      599
aaattgatgtttttattttttaaaaaaaaaa                                     628
    
```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность кДНК *rpc19⁺* *Sz. pombe* и выведенная из нее аминокислотная последовательность субъединицы Rpc19 РНК-полимераз I и III. Приведены нумерации нуклеотидов и (в скобках) аминокислот; отмечены уникальные участки узнавания рестриктаз и расхождения с депонированной последовательностью [9]. Тремя звездочками отмечен терминирующий кодон ТАА.

<i>A. thaliana</i>		1	MEHGS	5
			+ +	
<i>S. cerevisiae</i>	1	MTEDIEQKKTATEVTPQEPKHIQEEEEQDQDVTMGDEEQEPEPDRKIKLLTQAT		54
			D+T E EKI +L	
<i>Sz. pombe</i>		1	MAAMTDVTDPPSSVAMESATEKIIILP-GH	28
			++ + E + +	
<i>M. musculus</i>		1	MEDDQELERKISGLKTSMAEGERKTALEMVQAA	33
6		FTNVSHASEFTLSE EDHTLANAVRFVLNQDPRVTVAAYTI PHPSLEQVNIRVQTTGD-PAREVFKDAC		71
		+ ASF + EEDHTL NA+R+V+ + P V Y+IPHPS +NIR+QT G+ A + +		
55		SEDGTSASFQIVE EDHTLGNALRYVIMKNP DFEFCGYSIPHPSENLLNIRIQTYGETTAVDALQKGL		121
		S D TS +FQI +EDHTLGN+LRYVIMKNP+VEFCGYSIPHPSE +N RIQT TTAVD L+KGL		
29		SADLTSVTFQIQK EDHTLGN SLRYVIMKNPEVEFCGYSIPHPSEAKMNFRIQTAPSTTAVDVLRKGL		95
		D VTF + +EDHTLGN LRY+IMKNPEVEFCGY+ HPSE+K+N RIQT + AV+ +KGL		
34		GTDRQCVTFFVLHE EDHTLGNCLRYIIMKNPEVEFCGY TTHPSESKINLRIQTRGALPAVEPFQKGL		100
72		QELMQMNRHVRVSFDKAVA EYKDEQKRKEEAEEEEELKRQRDLFGSMDIENN		122
		++LM + V S F + +		
122		KDLMDLCDVVESKFTEKIKSM		142
		DL+DLCD V KFE++		
96		DDLIDLCDAVTEKFTEQLPRDTSTTMEVDG		125
		++L+++C V KF + +		
101		NELLNVCQHVLVKFEASIKDYKAKKASKKEPTF		133

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей субъединицы Rpc19 РНК-полимераз I и III *Sz. pombe* и ее ортологов из *S. cerevisiae* [8], *M. musculus* (GenBank D86609) и *A. thaliana* (GenBank U35050); здесь и ниже -- программа Advanced Gapped BLAST 2.0 [15]. Жирным шрифтом отмечен консервативный α -мотив.

<i>S. cerevisiae</i>	1	MSNIVGIEYNRVTNTTSTDFPGFSKDAENENWVEKFKKDFEVNISSLDAREANFDLINDITSIA	64
		+ + +RVT+ S DFPG+ D +N W+++KFKK+ +V+I+SLD F++ ID SIA	
<i>Sz. pombe</i>	1	MAAVDRSRTEISVLSDRVTDVGSVDFFPGYFDEDNIWDLDKFKKLNKVSITSLDQETMVFIEISGIDASIA	70
		AV+ RT + + V +V + DFPG Y D+ WD ++F+KN +V + +D++T+ F++ GIDA+IA	
<i>Mm</i>	1	MGCTRLVSMMAAAQAVEEMRTRVVLGDFGVRNVHTTDFPGNYAGYDDAWDQNRFEKNFRVGVVQMEDDTLEFDMVGIIDAAIA	82
<i>Hs</i>	1	MAASQAVEEMRSRVVLGDFGVRNVHTTDFPGNYSYDADWDQDRFEKNFRVIVVHMDENSLFEDMVGIDAATA	73
α-МОТИВ			
	65	NAFRRIIMISEVPSVAAEYVYFFNNTSVIQDEVLAHRIGLVPLKVDPMMLTWVDSNLPDDEK-FTDENTIV	133
		NAFRRI+I+E+P++A E+VY NNTS+IQDEVL+HRIGLV+ DPDM W LP E TD +T+V	
	71	NAFRILIAEIPTLAFEFVYIINNTSIIQDEVLSHRIGLVPIADPDMFKWFQHPFGQEATHTDYDTVV	140
		NAFRRI+L+A +PT+A E V + NNTSI+QDE+L+HR+GL+PI ADP +F++ E T+ DT+	
<i>M. musculus</i>	83	NAFRRIILLARVPTMAVEKVLVYNNNTSIVQDEILAHRLGLIPIILADPRLFEYRNQG----EEEGTEIDTLQ	150
<i>H. sapiens</i>	74	NAFRRIILLAEVPTMAVEKVLVYNNNTSIVQDEILAHRLGLIPIHADPRLFEYRNQG----DEEGTEIDTLQ	141
	134	LSLNVKCTRNPDAPKGSTDPKELYNNNAHVYARDLKFEPQGRQSTTFADCPVVPADPDILLAKLRPGQEIS	203
		SLN KC N +A DPK LY N+ VY+ DL ++PQGRQ FAD P+ +PDI++AKLRPGQEI	
	141	FSLNKKCFEKNKNAATDEKDPKRLVNSEVYSGDLIWKPQGRQEERFADNP IRVNVDPDIVVAKLRPGQEID	210
		F L +C N NAA D DP LYVN +VY+ + W P G Q + F + IR V+ DI++A+LRPGQEID	
	151	FRLQVRCTRNPNAAKDSDDPNELYVNHKVVYTRHMTWVPLGNQADVFPEGTIRPVHDDILIAQLRPGQEID	220
	142	FRLQVRCTRNPHAAKDSDDPNELYVNHKVVYTRHMTWIPLGNQADLFPEGTIRPVHDDILIAQLRPGQEID	211
	204	LKAHCILGIGGDHAKFSPVSTASYRLLPQINILQPIKGESARRFQKCFPPGVIGIDEGSD---EAYVKDA	270
		L+AH ILGIG DHAKFSPV+T SYRLLP I+IL PI+GE A +FQKCFP GVI ++EG D +A V D	
	211	LEAHAILGIGGDHAKFSPVATGYSYRLLPTIHLSPIEGEDAVKFKCFPKGVIELEEGPDGKKQARVADV	280
		L H + GIG+DHAKFSPVAT SYRLLP J +L P+EGE A + +CF GVIE+EE GKK ARVA+	
	221	LMHCVKIGIGGDHAKFSPVATASYRLLPAITLLEPVEGEAAEELSQCFSFGVIEVEE-VQGKVARVANA	289
	212	LMHCVKIGIGGDHAKFSPVATASYRLLPDITLLEPVEGEAAEELSRCSFGVIEVQE-VQGKVARVANP	280
	271	RKDTVSREVLRYEEFADKVKLGRVNRHFI FNVESAGAMTPEEIFFKSVRILNKAEYLKNCPIQ	336
		RKDTVSRE LR+ EFADKV+LGRVR+H++F+VES G M P+ +F KS+ +LK+K +K+	
	281	RKDTVSRECLRHPFADKVLGRVDRHLYFSVESTGIMKPDVLFIKSIAVLKSKCLAVKSSSLQNISSD	348
		R DT SRE RH + V+L RVRDHY+FSVESTG++ PDVL ++I +L KC L + D	
	290	RLDTSFREIFRNEKLKAVRLARVRDHYIFSVESTGVLPPDVLVSEAIKILMGKCRRELDDELDAVEMD	356
	281	RLDTSFREIFRNEKLKVVRLARVRDHYIFSVESTGVLPPDVLVSEAIKVLMGKCRRELDDELDAVQMD	347

Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей субъединицы Rpc40 РНК-полимераз I и III *Sz. pombe* и ее ортологов из *S. cerevisiae* [16], *M. musculus* (*Mm*, mRPA40) [17] и *Homo sapiens* (*Hs*, hRPA39; GenBank AF008442). Жирным шрифтом отмечены наиболее консервативные участки; в аминокислотной последовательности hRPA39 человека подчеркнуты отличия от последовательности mRPA40 мыши.

семи общих субъединиц ядерных РНК-полимераз делящихся дрожжей *Sz. pombe*. Установленные последовательности депонированы в GenBank под номерами AF079779 (кДНК *rpc19+* *Sz. pombe*) и AF082512 (ген *rpc40+* *Sz. pombe*).

Настоящая работа частично финансирована грантами Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 96-04-49867) и Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" (направление "Тенная и клеточная инженерия").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпаковский Г.В., Лебеденко Е.Н. // Цитология. 1996. Т. 39. С. 122-123.
2. Shpakovski G.V., Proshkin S.A., Shematorova E.K., Lebedenko E.N. // Abstracts of papers presented at the 3rd EMBL Meeting on Transcription, Heidelberg, 1998. P. 222.
3. 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.
4. Lalo D., Carles C., Sentenac A., Thuriaux P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 5524-5528.
5. Pati U.K. // Gene. 1994. V. 145. P. 289-292.
6. Ulmasov T., Larkin R. M., Guilfoyle T.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 5085-5094.
7. Шпаковский Г.В., Лебеденко Е.Н. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 988-991.
8. Dequard-Chablat M., Riva M., Carles C., Sentenac A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 15300-15307.
9. Javerzat J.P., Cranston G., Allshire R.C. // Nucl. Acids. Res. 1996. V. 24. P. 4676-4683.
10. Becker D.M., Fikes J.D., Guarente L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1968-1972.

11. Shpakovski G.V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
12. Weaver D.C., Shpakovski G.V., Caputo E., Levin H.L., Boeke J.D. // Gene. 1993. V. 131. P. 135–139.
13. Hoheisel J.D., Maier E., Mott R., McCarthy L., Grigoriev A.V., Schalkwyk L.C., Nizetic D., Francis F., Lehrach H. // Cell. 1993. V. 73. P. 109–120.
14. Lehmann A.R., Walicka M., Griffiths D.J., Murray J.M., Watts F.Z., McCreedy S., Carr A.M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 7067–7080.
15. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
16. Mann C., Buhler J.-M., Treich I., Sentenac A. // Cell. 1987. V. 48. P. 627–637.
17. Song C.Z., Hanada K., Yano K., Maeda Y., Yamamoto K., Muramatsu M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 26976–26981.
18. Mizukami T., Chang W.I., Garkavtsev I., Kaplan N., Lombardi D., Matsumoto T., Niwa O., Kounosu A., Yanagida M., Marr T.G., Beach D. // Cell. 1993. V. 73. P. 121–132.

Molecular Cloning and Characterization of the *rpc19⁺* and *rpc40⁺* Genes of *Schizosaccharomyces pombe* Encoding Subunits Shared by Nuclear RNA Polymerases I and III

G. V. Shpakovski[#] and E. K. Shematorova

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

Full-length copies of cDNAs of the *rpc19⁺* and *rpc40⁺* genes encoding the common subunits of nuclear RNA polymerases I and III and the corresponding fragments of chromosomes were isolated from genomic and cDNA libraries of *Schizosaccharomyces pombe* and characterized. It was established that the cloned genes are located on chromosomes III and II of the fission yeast, respectively. The *rpc40⁺* gene lacks introns, and the *rpc19⁺* gene contains two intervening sequences. The comparison of subunits Rpc19 (125 aa; *M* 13 722 Da; pI 4.51) and Rpc40 (348 aa; *M* 39 141 Da; pI 5.40) of *Sz. pombe*, whose characteristics were deduced from the sequences of their cDNAs, with the orthologous components of other eukaryotes allowed the most conserved structure-functional domains of these proteins to be identified.

Key words: fission yeast, nuclear RNA polymerases I and III, rpc19⁺ and rpc40⁺ genes, subunits Rpc19 and Rpc40, α -motif

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-6583; fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: gvs@ibch.siohc.ras.ru.