



УДК 577.214.(337+622)

РНК-ПОЛИМЕРАЗА II *Schizosaccharomyces pombe* СОДЕРЖИТ 12 РАЗЛИЧНЫХ СУБЪЕДИНИЦ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СУБЪЕДИНИЦЫ Rpb4

© 1999 г. Г. В. Шпаковский[#], Г. М. Баранова

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

Поступило в редакцию 30.06.99 г. Принято к печати 30.08.99 г.

В представительной клонотеке делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* обнаружена полно-размерная кДНК, способная при ее экспрессии в *Saccharomyces cerevisiae* полностью компенсировать дефекты нулевого аллеля *rpb4Δ1::HIS3* одной из специфических субъединиц РНК-полимеразы II почкующихся дрожжей. Таким образом, с помощью функционального анализа в геноме *Sz. pombe* идентифицирован ген, кодирующий последний, до сих пор оставшийся неохарактеризованным компонент РНК-полимеразы II этого организма, субъединицу Rpb4, присутствие которой в транскрипционном аппарате *Sz. pombe* долгое время отрицалось (см. Gene. 1996. V. 180. P. 63–67; Gene. 1997. V. 196. P. 165–174). Ген *rpb4*⁺ содержит три интрона и расположен на хромосоме II. Сравнение выведенной из кДНК первичной структуры субъединицы Rpb4 *Sz. pombe* (135 а.о.; M 15362 кДа; pI 4.84) с аминокислотными последовательностями субъединиц-ортологов из *S. cerevisiae* и других эукариот показало, что субъединица Rpb4 *Sz. pombe* более сходна с гомологичными субъединицами высших эукариот, в составе которых, в отличие от субъединицы RPB4 *S. cerevisiae*, отсутствует протяженный гидрофильный N-концевой домен. Основным структурирующим мотивом субъединицы Rpb4 ядерной РНК-полимеразы II эукариот является, по-видимому, мотив “лейциновой застезки”.

Ключевые слова: делящиеся дрожжи; ген *rpb4*⁺, субъединица Rpb4; межвидовая комплементация; ядерная РНК-полимераза II, лейциновая застезка.

Транскрипцию генов, кодирующих белки, осуществляет в эукариотической клетке ядерная ДНК-зависимая РНК-полимераза II. Этот фермент представляет собой мультисубъединичный комплекс, состоящий как минимум из 10 различных белков [1, 2]. К сегодняшнему дню наиболее детально охарактеризованы РНК-полимеразы II почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и человека: для этих организмов клонированы гены, кодирующие все 12 субъединиц соответствующих ферментных комплексов [3–6]. Еще одним объектом, удобным для изучения базового аппарата транскрипции, являются делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* [7]. В течение последних 10 лет усилиями лаборатории А. Ишихамы (Национальный институт генетики, Мишима, Япония) и нашей группы (ИБХ РАН) был достигнут значительный прогресс в изучении структуры и функций РНК-полимеразы II этого организма [8, 9]. Было установлено, что ядерная РНК-полимераза II *Sz. pombe*, как и соответствующие ферменты человека и *S. cerevisiae*, состоит по крайней мере из 10 субъединиц, необходимых для жизнедеятельности клетки: трех больших субъединиц (Rpb1, Rpb2,

Rpb3), гомологичных субъединицам β', β и α бактериального фермента, пяти общих субъединиц (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 и Rpb10), входящих в состав всех трех ядерных РНК-полимераз, и двух малых субъединиц (Rpb7 и Rpb11), которые являются специфическими белками РНК-полимеразы II. При этом японские авторы утверждали, что гомологи двух необязательных для жизнеспособности клетки *S. cerevisiae* субъединиц, а именно RPB4 и RPB9, в препаратах РНК-полимеразы II *Sz. pombe* отсутствуют, никак не влияя на активность (функциональность) препаратов фермента *in vitro* [8, 10]. Однако позднее эти же авторы с помощью ПЦР клонировали ген, кодирующий субъединицу Rpb9 *Sz. pombe*, и показали, что эта субъединица в препаратах очищенного фермента комигрирует с субъединицами Rpb8 и Rpb11 [11]. В настоящей работе мы доказываем существование у *Sz. pombe* последней, оставшейся до сих пор неохарактеризованной субъединицы РНК-полимеразы II – Rpb4. Поскольку для всех других 11 субъединиц фермента II в РНК-полимеразах I и III существуют одинаковые или по крайней мере родственные субъединицы (см. [3, 12]), приходится признать, что субъединица Rpb4 является в строгом смысле единственным специфическим полипептидом эукариотической РНК-полимеразы II.

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

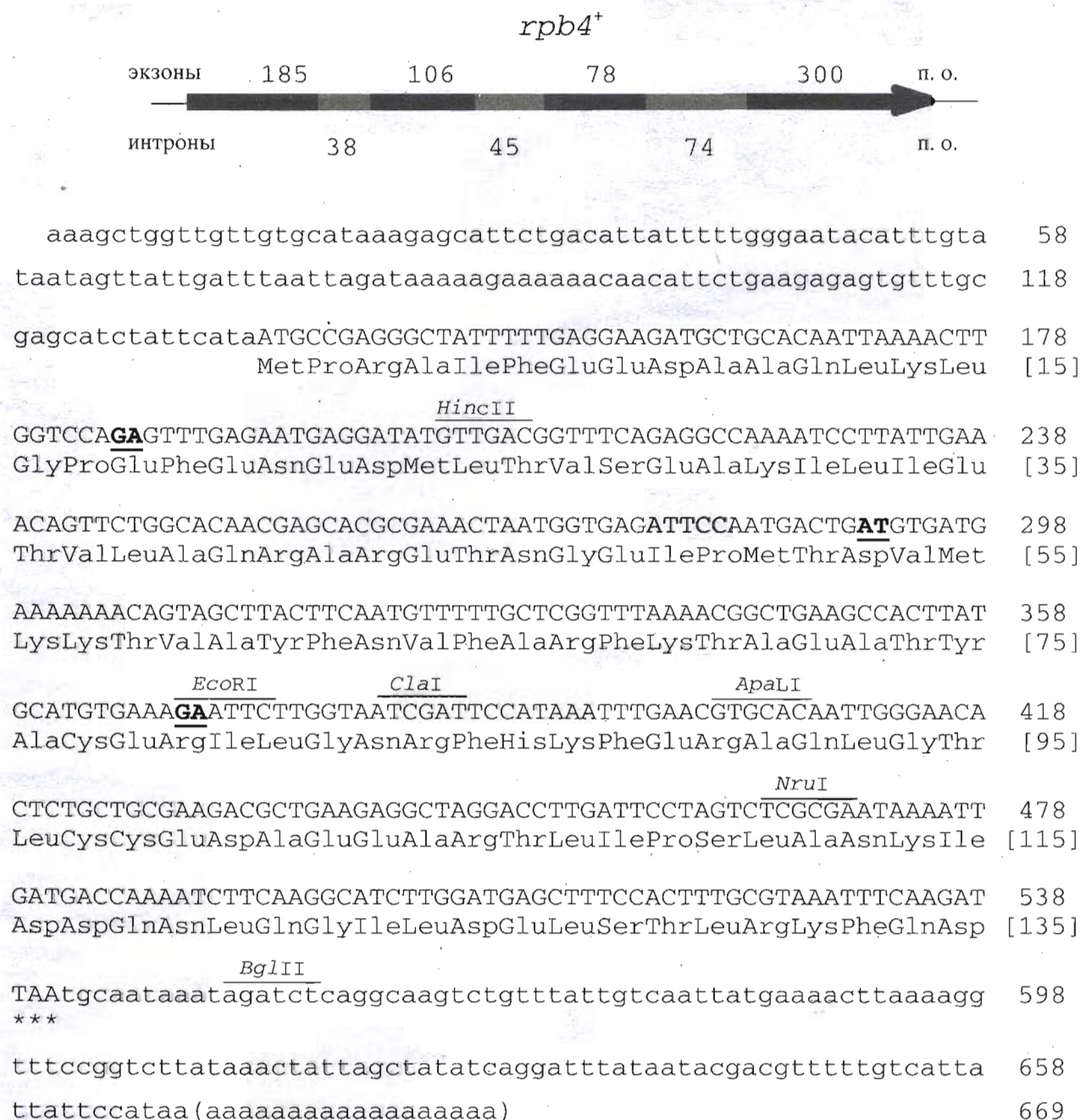


Рис. 1. Общая организация гена *rpb4⁺* *Sz. pombe*, нуклеотидная последовательность соответствующей кДНК и выведенная из нее аминокислотная последовательность субъединицы Rpb4 РНК-полимеразы II делящихся дрожжей. Приведены нумерация нуклеотидов и (в скобках) аминокислот; показаны уникальные участки узнавания рестриктаз. Тремя звездочками отмечен терминирующий кодон ТАА. Нуклеотиды кДНК, между которыми в гене *rpb4⁺* располагаются интроны, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В скобки заключена последовательность poly(A), присутствующая на 3'-конце кДНК *rpb4⁺* *Sz. pombe*.

Компьютерный анализ базы данных GenBank/EMBL на присутствие гомологов субъединицы RPB4 *S. cerevisiae* [13] выявил гомологичную гену этой субъединицы нуклеотидную последовательность в составе космиды с337,

секвенированной в Сэнгеровском центре (Великобритания, номер депонирования AL031854). Исходя из этой структурной информации были сконструированы специфические праймеры (5') CGAGGATCCATTTCATAATGCCGAG и (5')

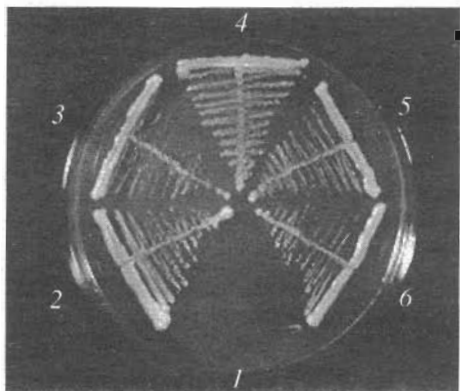


Рис. 2. Межвидовая комплементация нулевого аллеля *rpb4Δ1::HIS3* *S. cerevisiae* полноразмерной кДНК *rpb4⁺ Sz. pombe*.

Рост контрольных (секторы 1, 4) и тестируемых (секторы 2, 3, 5, 6) штаммов дрожжей оценивали после 5 сут инкубации строго при 37°C на богатой среде YPD: (1) – штамм MC11-1 с нулевым аллелем *rpb4Δ1::HIS3*; (2, 3, 5, 6) – независимые трансформанты штамма MC11-1, несущие кДНК гена *rpb4⁺ Sz. pombe*; (4) – штамм YPH499 *S. cerevisiae* дикого типа с нативным геном *RPB4*.

СТТГССТГAGATCTATTТТATTGС, использованные для поиска кДНК *rpb4⁺* в представительной клонотеке *Sz. pombe* [14] с помощью метода последовательных разведений [15]. Из 20 протестированных первичных разведений клонотеки три (№ 9, № 14 и № 23) дали положительный сигнал. В результате дальнейшего анализа первичного разведения № 9 была получена плаزمида pSUB4 (клон # 9-1-3-2). Полное секвенирование вставки ДНК *Sz. pombe*, содержащейся в этой плазмиде, позволило установить первичную структуру полноразмерной кДНК *rpb4⁺*, сравнение которой с геномной последовательностью из космиды с337 показало, что ген, кодирующий субъединицу Rpb4 *Sz. pombe*, содержит три интрона длиной соответственно 38, 45 и 74 нуклеотидов (рис. 1). Присутствие интронов в гене *rpb4⁺* подтверждается также тем, что ПЦР со специфическими праймерами на матрице геномной ДНК *Sz. pombe* привела к более длинному продукту, ~600 п.о. вместо 447 п.о. (данные не приведены). На космидной карте генома *Sz. pombe* [16] космида с337, а значит и ген *rpb4⁺*, расположены на коротком плече хромосомы II, в области между маркерными генами *sds11⁺* и *suc1⁺*.

О функции изолированной нами кДНК *rpb4⁺ Sz. pombe* судили по ее способности компенсировать дефекты нулевого аллеля *rpb4Δ1 S. cerevisiae* (рис. 2). Для РНК-полимеразы II *S. cerevisiae* установлено, что субъединица RPB4 не является необходимой для жизнедеятельности клетки [13], однако полная делеция кодирующего RPB4 гена, *rpb4Δ1*, приводит к тому, что дрожжи способны

хорошо расти лишь при умеренных температурах (18–22°C), растут гораздо медленнее обычного при 30°C и полностью не способны к ответу на стрессовые условия: не растут при температурах ниже 12°C и выше 35°C, быстро утрачивают жизнеспособность при переходе в стационарную фазу роста культуры и в условиях голодания (diauxic shift) [17, 18].

В ходе тестирования на межвидовую комплементацию полноразмерную кДНК *rpb4⁺ Sz. pombe* в составе плазмиды pSUB4 вводили в гаплоидный штамм *S. cerevisiae* MC11-1 (*MATa his3-Δ200 leu2-3, 2-112 trp1-1(am) ura3-52 rpb4Δ1::HIS3*), несущий на хромосоме нулевой аллель *rpb4Δ1::HIS3* [17]. Оказалось, что полученные трансформанты дрожжей в отличие от исходного штамма MC11-1 растут так же, как штамм дикого типа при 30°C, способны к росту при 15°C и даже при 10°C (данные не приведены), растут сравнимо со штаммом дикого типа при 37°C (рис. 2). Эти результаты говорят о том, что клонированная кДНК кодирует субъединицу Rpb4 *Sz. pombe*, которая способна продуктивно ассоциировать с РНК-полимеразой II *S. cerevisiae* и компенсировать практически все дефекты штамма почкующихся дрожжей с нулевым аллелем *rpb4Δ1::HIS3*, проявляющиеся в условиях стресса. Следует отметить, что комплементация, особенно при 37°C, была гораздо более полной, чем в случае субъединицы hRPB4 человека (Г.В.Ш., неопубликованные данные; см. также [6]).

Результаты эксперимента по межвидовой комплементации однозначно доказывают, что нами клонирована кДНК, кодирующая субъединицу Rpb4 *Sz. pombe*. Действительно, выведенная из первичной структуры этой кДНК последовательность нового белка *Sz. pombe* имеет несомненное сходство с субъединицей RPB4 РНК-полимеразы II *Homo sapiens* (43% идентичности и 57% гомологии в интервале 130 а.о.) и с ортологичными субъединицами других эукариот (рис. 3). До настоящего времени гомологи субъединицы Rpb4 были идентифицированы у следующих эукариот: *S. cerevisiae* [13], *H. sapiens* [6] и *Arabidopsis thaliana* [19], причем у человека, как и в случае *Sz. pombe*, hRPB4 была обнаружена последней из всех 12 субъединиц [6]. Кроме того, в базе данных GenBank/EMBL мы обнаружили нуклеотидные последовательности, предположительно кодирующие гомологичную субъединицу еще у двух эукариотических организмов: нематоды *Caenorhabditis elegans* (номер депонирования AF000264; предположительный ген F43E2.1, третий экзон которого предсказан неверно) и паразитического простейшего *Plasmodium falciparum* (GenBank AE001382; предположительный ген PFB0245c). Таким образом, субъединица Rpb4 присутствует в организмах, относящихся ко всем основным царствам *Eucarya*, составляющим так называемую "eukaryote crown group": простейшие (*Alveolata*),

Sc: 1 MNVSTSTFQTRRRRLKKEVEEENAAATLQLGQEFQKQINHQGEEELIALNLSEARLVIKEALVERRR 68

Sc: 69 AFKRSQKHKHKKHLKHENANDETTAVEDEDDDDLEDDVNADDDDFMHSETREKELESIDVLLBQTTGGNN 138

Sp: 1 MPRAIFEEDAAQLKLGPEFENE--DMLTVSEAKILLETVL-AQRARETNGEIPMT 52

Hs: 1 MAAGGSDPRAGDVEEDASQLIFPKFEFETA--ETLLNSEVHMLLEHR--KQNESAEDEQELS 58

Ce: 1 MSSGGGNQKSDGQVEEDAAECKFPKFEFETTTCDALLTAEVYLLLEHR--RQSSSESKDEIEEMS 61

At: 1 MSGEEENAAELKIGDEFKAKC--LNNCEVSLILEHKFEQLQQISEDPMNQVS 52

Pf: 1 MANNINGDIKNLDLGPDKFNCKC--LNLCELQLILGDQLRLTSKRNEE----AQ 48

EEDA L EFE L E LE

Sc: 139 KDEKNTMQYLTFNFSRFRDQETVGAVIQ--LLKSTGLHPFEVAQLGSLACDTADEAKTLIPSLNNKISDDE 206

Sp: 53 DVMKKTVAYFNVFARFKTAEATYACER--ILGNR-FHKFERAQLGTLCCEDAEEARTLIPSLANKIDDQN 119

Hs: 59 EVFMKTLNYTARFSRFRKRE-TIASVRSLLQKK-LHKFELACLANLCPETAEEESKALIPSLNLEGRFEDEE 126

Ce: 62 EVFIKTLNYARRMSRFRKRE-TIRAVRAIFSEKH-LHKFEVAQLANLCPENAEAAKALVPSLENKIEESE 129

At: 53 QVFEKSLQYVKRFSRYKNPD-AVRQVREILSRHQ-LTEFELCVLGNLCPETVEEAVAMVPSLKTGKRAHD 120

Pf: 49 ALIKSSYDYANKFAAIKNRS-SIVDIRTNLERIGDLHEYEIAMLVNLLPKTILEARYLIPSLIRL----N 113

V KT Y FSRFKN E R L LH FE A L NLCPE AEEA LIPSL K

Sc: 207 LERILKELSNLETLY 221

Sp: 120 LQGILDELSTLRKFQD 135

Hs: 127 LQQILDDIQTKRFSQY 142

Ce: 130 LEEVLKDLQSKRTFQ 144

At: 121 DEATEKMLNDLSLVKRFE 138

Pf: 114 DETLNSILEHLISYKMYVS 132

LE IL L L

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей субъединицы Rpb4 РНК-полимеразы II *Sz. pombe* (Sp) и ее гомологов из *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) [13], *Homo sapiens* (Hs) [6], *Arabidopsis thaliana* (At) [19], *Caenorhabditis elegans* (Ce) (GenBank AC004277; предположительный ген F43E2.1, третий экзон которого в GenBank предсказан неверно) и *Plasmodium falciparum* (Pf) (GenBank AE001382; предположительный ген PFB0245c). В нижнюю строку вынесены и жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, присутствующие по крайней мере в четырех последовательностях, инвариантные последовательности подчеркнуты. Серым цветом отмечены остатки лейцина, предположительно участвующие в формировании "лейциновой застежки".

грибы (*Fungi*), зеленые растения (*Viridiplantae*) и животные (*Metazoa*).

Субъединица Rpb4 *Sz. pombe* (135 а.о.), как и ее гомологи из *P. falciparum*, *A. thaliana*, *H. sapiens* и *C. elegans* (132–144 а.о.), гораздо короче субъединицы RPB4 *S. cerevisiae* (221 а.о.), что связано с тем, что только у субъединицы RPB4 из *S. cerevisiae* имеется довольно протяженный N-концевой домен, обогащенный аминокислотными остатками с отрицательным (глутаминовая и аспарагиновая кислоты) или положительным (лизин, аргинин) зарядом (рис. 3). Из полученных нами данных по комплементации следует, что этот уникальный для субъединицы RPB4 *S. cerevisiae* гидрофильный N-концевой домен (а.о. 1–85), по-видимому, не яв-

ляется необходимым для жизнеспособности дрожжевой клетки.

Сравнение всех приведенных гомологов субъединицы Rpb4 позволяет также сделать предположение о том, что основным структурирующим мотивом субъединицы Rpb4 ядерной РНК-полимеразы II эукариот является, по-видимому, мотив "лейциновой застежки", причем наиболее явно он наблюдается в самом консервативном C-концевом фрагменте молекулы (рис. 3).

Успешная межвидовая комплементация субъединиц-ортологов Rpb4 из *Sz. pombe* и *S. cerevisiae* открывает возможности для тестирования мутантных форм субъединицы *Sz. pombe* в клетках *S. cerevisiae*. Очевидными кандидатами для проведения сайт-направленного мутагенеза являются

остатки лейцина, предположительно участвующие в формировании лейциновой застежки, а также аминокислоты в семи позициях, которые консервативны у всех эукариотических видов (см. рис. 3).

Установленная в данной работе последовательность кДНК *rpb4⁺* *Sz. pombe* депонирована в GenBank под номером AF149308.

Настоящая работа частично финансирована грантом Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" (направление "Генная инженерия и трансгеноз").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sentenac A. // Crit. Rev. Biochem. 1985. V. 18. P. 31–91.
2. Young R. // Annu. Rev. Biochem. 1991. V. 60. P. 689–715.
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. 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.
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., Estojak J., Cho H., Majors J., Sonoda G., Testa J. R., Golemis E. A. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 1935–1945.
7. Sipiczki M. // Ant. Leeuw. 1995. V. 68. P. 119–149.
8. Sakurai H., Miyao T., Ishihama A. // Gene. 1996. V. 180. P. 63–67.
9. Шпаковский Г. В., Лебедево Е. Н. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 988–991.
10. Sakurai H., Ishihama A. // Gene. 1997. V. 196. P. 165–174.
11. Sakurai H., Kimura M., Ishihama A. // Gene. 1998. V. 221. P. 11–16.
12. Шпаковский Г. В., Шематорова Е. К. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 791–796.
13. Woychik N. A., Young R. A. // Mol. Cell. Biol. 1989. V. 9. P. 2854–2859.
14. Becker D. M., Fikes J. D., Guarente L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1968–1972.
15. Shpakovski G. V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
16. Mizukami T., Chang W. I., Garkavtsev I., Kaplan N., Lombardi D., Matsumoto T., Niva O., Kounosu A., Yanagida T., Marr T. G., Beach D. // Cell. 1993. V. 73. P. 121–132.
17. Choder M., Young R. A. // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. P. 6984–6991.
18. Rosenheck S., Choder M. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 6187–6192.
19. Larkin R. M., Guilfoyle T. J. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 5631–5637.

RNA Polymerase II of *Schizosaccharomyces pombe* Contains Twelve Different Subunits: Identification and Characterization of Subunit Rpb4

G. V. Shpakovski[#] and G. M. Baranova

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

In a comprehensive cDNA library of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, we have detected a cDNA which, when expressed in *S. cerevisiae*, is capable of the complete compensation of defects of the null allele *rpb4Δ1::HIS3* of one of the specific subunit of RNA polymerase II of the budding yeast. Thus, using a functional approach, the gene was identified in the *Sz. pombe* genome encoding apparently the last, not yet characterized, component of the *Sz. pombe* RNA polymerase II, namely, subunit Rpb4, whose presence in the transcription apparatus of the fission yeast had been disputed (*Gene*, 1996, vol. 180, pp. 63–67; *Gene*, 1997, vol. 196, pp. 165–174). This gene contains three introns and is located on chromosome II. Comparison of the primary structure of subunit Rpb4 of *Sz. pombe* (135 aa; *M* 15 362 Da; *pI* 4.84), deduced from the cDNA, with the amino acid sequences of the orthologous subunits from *Saccharomyces cerevisiae* and other eukaryotes showed that the subunit Rpb4 of *Sz. pombe* is closer to the homologous subunits of higher eukaryotes, which do not contain the extended hydrophilic N-terminal domain present in subunit RPB4 of *S. cerevisiae*. The main structuring motif of subunit Rpb4 of the eukaryotic nuclear RNA polymerase II is probably the leucine zipper.

Key words: fission yeast; *rpb4⁺* gene; subunit Rpb4; interspecific complementation; nuclear RNA polymerase II; subunit composition; leucine-zipper motif.

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: gvs@ibch.siobc.ras.ru; phone: +7 (095) 330-65-83; fax: +7 (095) 335-71-03.