



УДК 577.113.5:577.152.312*71'15

РИБОНУКЛЕАЗА ИЗ *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus*. СТРУКТУРА ГЕНА И РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА

© 2000 г. А. А. Шульга, Л. В. Знаменская*#, О. В. Морозова*,
И. Б. Лещинская*, М. П. Кирпичников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

* Казанский государственный университет, кафедра микробиологии, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

Поступила в редакцию 18.02.2000 г. Принята к печати 03.04.2000 г.

Определена полная нуклеотидная последовательность гена внеклеточной гуанилспецифичной рибонуклеазы *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* (РНКаза Vth), близкого гомолога РНКазы *B. intermedius* (биназы). Анализ нуклеотидных последовательностей в областях, прилегающих к генам РНКаз, выявил идентичную организацию хромосомных локусов РНКазы Vth и биназы. Изучены закономерности роста штамма *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* и синтеза им РНКазы. Показано, что экзогенный неорганический фосфат подавляет биосинтез РНКазы. В то же время актиномицин D в малых дозах стимулирует синтез фермента. Сравнительный анализ влияния неорганического фосфата и актиномицина D на биосинтез РНКазы Vth и биназы указывает на возможность совпадения путей регуляции синтеза этих ферментов.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*; рибонуклеаза; нуклеотидная последовательность гена; биосинтез; репрессия; неорганический фосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Щелочная внеклеточная рибонуклеаза *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* (РНКаза Vth) относится к классу циклизующих РНКаз (КФ 3.1.27.1), которые осуществляют гидролиз полинуклеотидных цепей по двустадийному механизму, включающему реакцию трансфосфорилирования с образованием нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и последующее их расщепление до соответствующих производных 3'-фосфорной кислоты [1]. К настоящему времени выделены и охарактеризованы внеклеточные щелочные РНКазы ряда бацилл, которые оказались близкими по первичной структуре, физико-химическим и каталитическим свойствам. Уровень гомологии аминокислотных последовательностей РНКаз составляет 80–100%, что свидетельствует об эволюционной консервативности данных ферментов [1–8]. Однако в нуклеотидной последовательности промоторных областей генов гуанилспецифичных РНКаз и путях регуляции их биосинтеза имеются существенные различия [9, 10].

В настоящей работе приведена полная нуклеотидная последовательность гена РНКазы Vth, охарактеризованы районы хромосомы, фланки-

рующие этот ген, а также установлены закономерности биосинтеза этого фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

PvuII-фрагмент хромосомы *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* В388 размером ~4.5 т.п.о., содержащий полный ген РНКазы, был клонирован ранее. В результате делеционного картирования ген РНКазы обнаружен в составе фрагмента длиной ~0.9 т.п.о [11]. Это позволило определить его 3'-концевую последовательность при помощи универсальных праймеров. Дальнейшая стратегия секвенирования состояла в синтезе олигонуклеотидов, узнающих участки ДНК, граничащие с непрочитанными областями, и использовании их в качестве праймеров. В итоге нами была установлена полная нуклеотидная последовательность гена РНКазы Vth, представленная на рис. 1.

Сравнение гена РНКазы *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* с геном родственной РНКазы *B. intermedius* (биназы) [3, 12] обнаруживает их большое структурное сходство. В пределах части генов, кодирующих зрелые белки, уровень гомологии нуклеотидных последовательностей составляет 84.4%. Из рис. 1 видно, что замены нуклеотидов приходится, как правило, на третье положение кодонов и не влияют на аминокислотную последовательность белкового продукта. РНКазы отличаются всего лишь по одному остатку: Ala106 в РНКазе Vth соответствует Thr106 в биназе. В части

Сокращения: РНКазы Vth, Vi, Va – соответственно, рибонуклеазы *B. thuringiensis*, *B. intermedius* (биназа) и *B. amyloliquefaciens* (барназа); AD – актиномицин D.

#Автор для переписки (тел.: (8432) 35-84-42; e-mail: Lilia.Znamenskaya@ksu.ru).

```

      A   TT   AGA  GTTA CA GA           AG
CTTTTTGTTTTACGTCATCTAGAGACAGTAGGTCAAAAAGCCTCATTTTTT
*

A  GAA   T   -35   TC   G T G   -10
CSAATCTCCTGATTCTTACATTTCTCTTCATATGCCGGTGCTATAATATG
***** * * ***** *

      A       G       AAT
AGGTAGACAAGCATCAAGAGGACGGCATCCCATTTTCSTTTTGAGGAGGAT
SD

G       C       G       A   T       C
CAAGATGAAAAAATAAGTTCGATTTTTACTCTGTTGCTCTGATGCTG
M K K I S S I F T L F A L I A A

T       T       T       C T   C       T
CCATCTGTTTTCTGGATTTATCCCGCAGCAAGTCCATGCAGAAACACCA
I L F S G F I P Q Q V H A E T P

      AG C       A A A TA T A A T
CTTACACCAACAGCCACAAATGAGACTGCTTCCGTACAGCTTGCACCAGA
L T P T A T N E T A S V Q L A P D

TG A       G       T
CCTTCGTACCCTTGCCGTCATTAATACCTTTGATGGTGTAGCAGATTACT
L R T L A V I N T F D G V A D Y L

T       C       T       C       A       A
TAATCCGCTATAAACGACTACCTGATAATTACATCACCAAATCACAAGCG
I R Y K R L P D N Y I T K S Q A

T T T       G       C A G T C
AGCGCCCTCGGATGGGTGGCATCAAAAAGGAAATTTAGCTGAAGTCGCGCC
S A L G W V A S K G N L A E V A P

A T       T T       C       T
GGGCAAAAGCATCGGTGGAGACGTATTCTCTAATCGGGAGGGACGCCTTC
G K S I G G D V F S N R E G R L P

T A A C       A       G A T       T
CATCCGCTAGTGGCCGTACATGGCGTGAAGCCGACATCAACTACGTCTCC
S A S G R T W R E A D I N Y V S

C       A T       C G T       C
GGTTTCCGTAATGCAGACCGCCTAGTATACTCAAGTGAAGTGGCTTATTTA
G F R N A D R L V Y S S D W L I Y

C       A C T       A T CA AC T       A       CA
TAAACAACCGATCACTATGCGACATTTGCGAGGATTCGTTAATCAATTG
K T T D H Y A T F A R I R stop

Bi           V M           AY       Q       TI TS VH
Bth        MKKISSIFTLFALIAAILFSGFIPQQVHAETPLTPATNETASVQLAPDLRTL

```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность гена РНКазы *B. thuringiensis* var. *subtoxicus*. Верхней строкой приведены нуклеотиды гена биназы (Bi) [12], отличающиеся от нуклеотидов гена РНКазы Bth. Подчеркнуты предполагаемые -10- и -35-области промотора, сайт связывания рибосомы (SD) и терминирующий кодон (stop). Звездочками показано положение палиндroma в -35-области гена биназы. Нижней строкой дана аминокислотная последовательность, кодируемая геном РНКазы Bth. Последовательность предполагаемого лидерного пептида выделена курсивом. Первый аминокислотный остаток зрелого белка подчеркнут [1]. Жирным шрифтом выделено место единственной аминокислотной замены в РНКазе Bth в сравнении с биназой. Под нуклеотидной последовательностью гена РНКазы приведено выравнивание аминокислотных последовательностей лидерных пептидов РНКаз Bth и Bi.

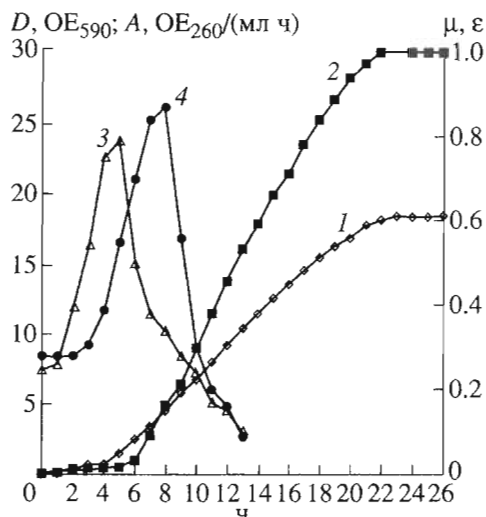


Рис. 2. Динамика роста культуры клеток *B. thuringiensis* и биосинтеза РНКазы Vth. 1 — оптическое поглощение культуры D_{590} ; 2 — активность РНКазы А $\times 10^{-3}$, $OE_{260}/(\text{мл ч})$; 3 — скорость роста культуры ($\mu, \text{ч}^{-1}$); 4 — скорость накопления РНКазы ($\epsilon, \text{ч}^{-1}$).

гена, кодирующей лидерный пептид, ситуация иная. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей здесь практически такой же — 83%. Однако характерно, что замены нуклеотидов в этом районе часто сопряжены с изменением смыслового содержания кодонов. Вследствие этого, уровень гомологии лидерных пептидов составляет всего лишь 79% (рис. 1). Вероятно, это связано с большей мутационной изменчивостью лидерных пептидов, для функционирования которых, как известно, важна лишь определенная схема строения [13].

Проведенный нами выборочный анализ нуклеотидных последовательностей в областях, прилегающих к гену РНКазы Vth и биназы [12], выявил идентичную организацию хромосомных локусов этих ферментов. В хромосоме *B. thuringiensis* var. *subtoxica* обнаружено несколько открытых рамок трансляции (ОРТ), которые демонстрируют высокий уровень гомологии (81–95%) с соответствующими генами *B. intermedius* [12]. Ряд полипептидов, кодируемые этими ОРТ, очень близки по последовательности некоторым белкам из международной базы данных EMBL/GenBank, функции которых известны (таблица). На основании этого сходства можно с большой степенью уверенности утверждать, что со стороны 5'-конца к генам РНКазы Vth и биназы примыкают гены глицератдегидрогеназы [14] и некоего транспортног белка, а со стороны 3'-конца — гены *N*-гидроксиариламин-*O*-ацетилтрансферазы и белка Cth — регулятора катаболической репрессии [15].

Некодирующие области генов РНКазы Vth и биназы, в которых сосредоточены основные ге-

нетические элементы, определяющие закономерности биосинтеза этих ферментов, очень похожи. Предполагаемые участки связывания рибосом (SD), -10 - и -35 -районы промоторов идентичны. Однако нельзя не заметить, что в результате ряда нуклеотидных замен в зоне, предшествующей -35 -району, в этой области промотора гена РНКазы Vth по сравнению с геном биназы [12] исчезает инвертированный повтор (на рис. 1 отмечен звездочками). Последовательности ДНК с симметричной структурой зачастую являются участками связывания регуляторных белков или же аттенуаторами транскрипции. Это означает, что, несмотря на внешнюю схожесть генов, системы регуляции биосинтеза РНКаз Vth и биназы могут различаться.

Динамика биосинтеза РНКазы *B. thuringiensis*. Динамика роста культуры и накопления РНКазы Vth в культуральной жидкости приведены на рис. 2. Фаза экспоненциального роста *B. thuringiensis* является достаточно короткой, поскольку используемая среда оптимизирована для биосинтеза РНКазы и лимитирована по фосфору, в силу чего не оптимальна для роста культуры. Активное накопление РНКазы Vth в культуральной жидкости происходит в стадии замедления роста культуры. В этот период скорость синтеза фермента (ϵ) резко возрастает, тогда как скорость роста (μ) падает (см. кривые 3 и 4). Максимальное количество РНКазы накапливается к началу стационарной фазы роста (~ 22 ч, кривые 1 и 2).

Влияние экзогенного неорганического фосфата на биосинтез РНКазы *B. thuringiensis*. В процессе подбора компонентов среды было установлено, что неорганический фосфат (P_i) подавляет биосинтез РНКазы Vth. Нам представлялось интересным установить степень этого репрессирования. С этой целью P_i вносили в среду культивирования в момент посева в концентрации от 10 до 1000 мг/мл. На рис. 3а, б приведены результаты сравнительного анализа влияния P_i на биосинтез РНКаз бацилл *B. thuringiensis* var. *subtoxica* (Bth), *B. intermedius* (биназа) и *B. amyloliquefaciens* (барназа). Последние РНКазы приведены в качестве примеров, демонстрирующих, соответственно, регулируемый и нерегулируемый фосфатом биосинтез ферментов [9]. Увеличение концентрации P_i в среде вызывает увеличение биомассы клеток и монотонное снижение как суммарной, так и удельной активности РНКазы Vth и биназы. При этом удельная активность барназы остается на постоянном уровне — ингибирование синтеза этой РНКазы неорганическим фосфатом не происходит. Биосинтез бациллярных РНКаз Vth и биназы в рекомбинантных штаммах *E. coli* также подавляется P_i (хотя в меньшей степени, чем в исходных штаммах), тогда как синтез барназы даже несколько повышается по мере увеличения концентрации фосфора в среде (рис. 3в, г).

Сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей гипотетических белков, кодируемых участками геномов в районе генов РНКаз *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* и *B. intermedius*

| Гомолог в банке данных EMBL/GenBank ^a | Сравнение аминокислотных последовательностей ^б | Степень идентичности, % | |
|--|--|---------------------------------|------------------------------------|
| | | нуклеотидная последовательность | амино-кислотная последовательность |
| Глицерацдегидрогеназа (Gdh, YvcT) | <p>Q N N N</p> <p>N I S R G K T V D E K S L I Q A L Q E G W I K G A G L D V Y E Q E R L Q E D H R F K E M D N V T L A</p> <p>I A P L L</p> <p>P H I G S A T E T T R D L M L K R A I H N V L H G I D K A P V D I V K E L A S S</p> | 87.6 | 90.1 |
| Транспортный белок (YvdB) | <p>V A I P L G M A F A I A S G V G P E Y G L Y T V I V A G I L I S L F G G S K Y Q I G G P T G A F V P</p> <p>I L F G I V S Q Y G I E N L L I A G F M A G C M L V L F G I F K L G K L M K F I P R P V I I G F T A</p> <p>G I A V I I F S G Q I A N F L G L K G V E K H E S F F L N M R E I V V H L G T A N S L A I L T A I V</p> <p>V G A L</p> <p>G L I V I L A A Q K Y I P K I P S A L L G L L V S T F I A V L F F Q G Q V E T I G S</p> | 94.5 | 96.4 |
| НРТ-подобный белок (Cth) | <p>P E T</p> <p>G L Q A R S A A L F V Q E A N R F G A D I F L E K D G K K V N A K S I M G L M S L A I S S G V T V K</p> <p>L I A D G A D E Q E A I D A L T D F I N Q E N</p> | 90.0 | 95.9 |
| N-Гидроксиарил-амин-O-ацетил-трансфераза (YvcN) | <p>Q G Q D V K L N Q S N</p> <p>M I Q S A F L R K I G Y E A S I T F D Q L P D L L R K M A Y T F P F F E N R S V V G K H A Y A L D</p> <p>Q E G L K H N L L E G S R G G L C Y D L N P L L Y Y V L K E A G L A V K L V Q</p> | 80.6 | 83.1 |

^a В скобках приведены обозначения гомологичных генов.

^б Фрагменты аминокислотных последовательностей гипотетических белков *B. thuringiensis*, выведенные на основании данной работы, приведены полностью. Для *B. intermedius* приведены только отличающиеся аминокислотные остатки [12].

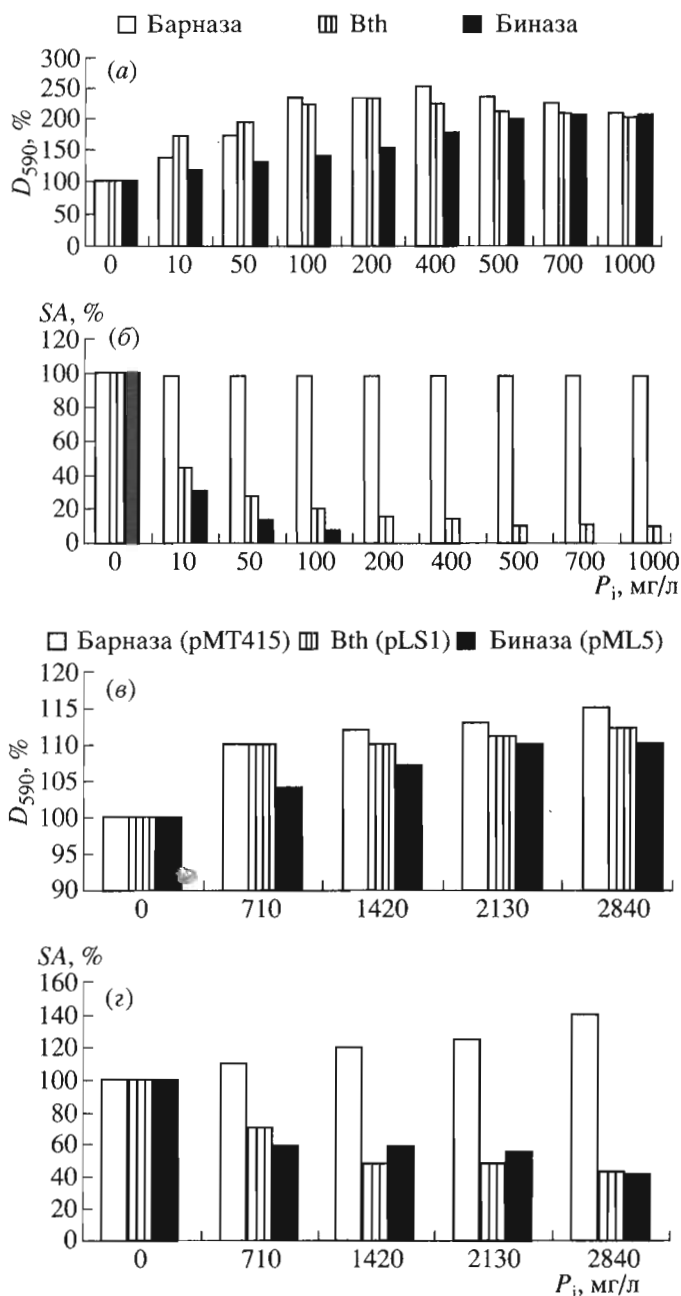


Рис. 3. Влияние неорганического фосфата на клеточный рост (D_{590} , а, в) и удельную активность (SA, б, г) бациллярных РНКаз Bth, биназы и барназы в исходных штаммах бацилл (а, б) и рекомбинантных штаммах *E. coli* XL1 Blue (в, г). За 100% приняты значения D_{590} и SA РНКаз в культурах без внесения неорганического фосфата.

Влияние актиномицина D на биосинтез РНКазы *B. thuringiensis*. Ранее было показано, что биосинтез щелочных внеклеточных РНКаз *B. intermedius* и *B. pumilus* стимулируется малыми дозами актиномицина D – ингибитора транскрипции [16]. При этом максимальный стимулирующий эффект проявляется при добавлении антибиотика в среду в период активации их биосинтеза, то есть в период возрастания скорости синтеза РНКаз. В связи с отмечавшейся выше высокой гомологи-

ей генов РНКазы Bth и биназы представляло интерес выяснить влияние актиномицина D на биосинтез РНКазы, синтезируемой *B. thuringiensis*. Установлено, что введение актиномицина D в среду культивирования угнетает рост *B. thuringiensis* и стимулирует синтез РНКазы (рис. 4). Максимальная стимуляция наблюдается при внесении антибиотика на шестой час культивирования. Удельная активность РНКазы Bth повыша-

ется в 2.6 раза при концентрации антибиотика 0.125 мкг/мл.

Таким образом, структурная и функциональная общность РНКаз *B. thuringiensis* и *B. intermedius*, обусловленная гомологией нуклеотидных последовательностей структурных генов этих ферментов, подтверждается также общими закономерностями регуляции их биосинтеза. Дальнейшие эксперименты будут направлены на установление молекулярной природы регуляции биосинтеза РНКазы *B. thuringiensis* var. *subtoxicus*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и плазмиды. В работе использовали штамм *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* В388 из коллекции Центра "Биоинженерия" и штамм *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США): F':Tn10^{tet}, proA⁺B⁺, lacI^Q, Δ(lacZ)M15/recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r_K-m_K), supE44, relA1, lac. Плазмиды pLS1, pML5 и pMT415 содержали, соответственно, хромосомные гены РНКаз Bth, биназы и барназы. Во всех плаزمидах имелся природный ген барстара [17], внутриклеточного ингибитора гуанилспецифичных РНКаз. Плазмиды pML5 и pMT415 были любезно предоставлены д-р. Р. Хартли (Национальный институт здоровья, США).

Определение нуклеотидной последовательности проводили методом Сэнгера с Sequenase ver. 2.0 (фирма USB, США) [18].

Культивирование бактерий. Штамм *B. thuringiensis* В388 выращивали при 30°C при соотношении объема культуральной жидкости к объему колбы 1 : 7.5. Для культивирования *B. thuringiensis* использовали специально подобранную среду, содержащую (%): пептон – 5.0, глюкозу – 1.1, CaCl₂ – 0.01, MgSO₄ · 7H₂O – 0.03, MnSO₄ – 0.01, NaCl – 0.3, pH 8.5. Штамм *E. coli* XL1 Blue с плазмидами, несущими гены РНКаз, выращивали на описанной ранее среде [19] при 37°C. Во всех экспериментах использовали обедненный неорганическим фосфатом пептон (Семипалатинский мясокомбинат) (содержание P_i не превышало 0.4 мг/г). Влияние P_i и актиномицина D на биосинтез РНКазы Bth изучали в периодической культуре. Неорганический фосфат (Na₂HPO₄) вносили в момент посева, актиномицин D – на шестой час роста культуры.

РНКазную активность определяли модифицированным методом Анфинсена по кислоторастворимым продуктам гидролиза высокополимерной РНК и выражали как величину оптического поглощения продуктов реакции на длине волны 260 нм, приходящуюся на единицу объема культуры в единицу времени реакции (ОЕ/(мл ч)) [20]. Удельную активность РНКазы (SA) рассчитывали как отношение суммарной РНКазной активности к количеству биомассы.

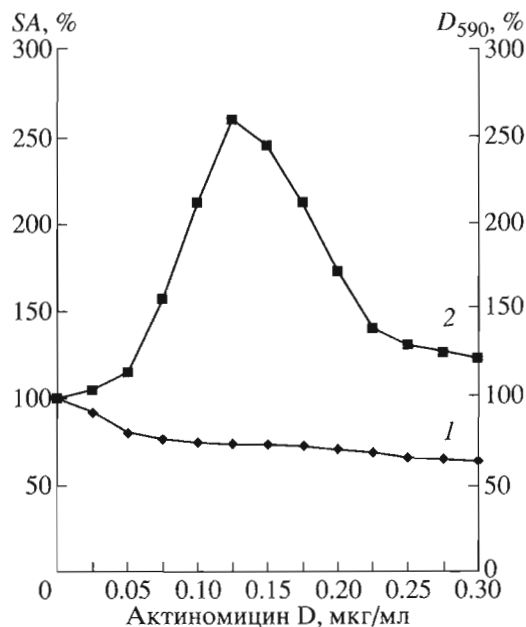


Рис. 4. Влияние актиномицина D на клеточный рост (1) и биосинтез РНКазы Bth (2). Антибиотик вносили на 6-й час культивирования. За 100% приняты значения поглощения среды и удельной активности РНКазы в культурах без внесения антибиотика.

Определение показателей роста культуры. Прирост биомассы определяли нефелометрически. Скорость роста культуры (μ) за определенный период времени ($t_1 - t_0$) рассчитывали по формуле: $\mu = (\ln m_1 - \ln m_0) / (t_1 - t_0)$, где m_0 – количество биомассы в начале, m_1 – в конце отрезка времени. Аналогичным образом рассчитывали скорость накопления РНКазы (ϵ): $\epsilon = (\ln A_1 - \ln A_0) / (t_1 - t_0)$, где A_0 и A_1 – величина РНКазной активности в начале и в конце отрезка времени.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ-ИНТАС № 97-245 и РФФИ № 99-04-48424).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дементьев А.А., Рябченко Н.Ф., Протасевич И.И., Гольшин П.Н., Степанов А.И., Орлов В.М., Пустобаев В.Н., Макаров А.А., Моисеев Г.П., Карнейский М.Я., Кирпичников М.П., Шляпников С.В. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1338–1349.
2. Hartley R.W., Barker E.A. // Nature New Biol. 1972. V. 235. P. 15–16.
3. Schulga A.A., Nurkiyanova K.M., Zakharyev V.M., Kirpichnikov M.P., Skryabin K.G. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 2375.
4. Струминская Н.К., Ивайловский В.Л., Дементьев А.А., Моисеев Г.П., Федосов Ю.В., Яковлев Г.И. // Биол. науки. 1992. № 2. С. 41–44.

5. Дементьев А.А., Орлов В.М., Шляпников С.В. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. С. 853–861.
6. Dementiev A.A., Moiseyev G.P., Shlyapnikov S.V. // FEBS Lett. 1993. V. 334. P. 247–249.
7. Шляпников С.В., Дементьев А.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 332. С. 21–25.
8. Lebedev A.A., Shlyapnikov S.V., Pustobaev V.N., Kirpichnikov M.P., Dementiev A.A. // FEBS Lett. 1996. V. 392. P. 105–109.
9. Znamenskaya L.V., Gabdrachmanova L.A., Chernokal'skaya E.B., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. // FEBS Lett. 1995. V. 357. P. 16–18.
10. Знаменская Л.В., Морозова О.В., Вершинина В.И., Краснов С.И., Шутьга А.А., Лецинская И.Б. // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 619–625.
11. Кожаринова Л.В., Федорова Н.Д., Передельчук М.Ю., Рябченко Н.Ф., Шутьга А.А., Кирпичников М.П. // Биотехнология. 1994. № 2. С. 9–11.
12. Нуркиянова К.М. // Молекулярно-структурная организация фрагмента хромосомной ДНК *Bacillus intermedius* 7P, содержащего ген биназы: Дис. ... канд. биол. наук. М.: ИМБ РАН, 1991. С. 83.
13. Kohara A., Yamamoto Y., Kikuchi M. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. P. 779–781.
14. Galinier A., Haiech J., Kilhoffer M.C., Jaquinod M., Stulke J., Deutscher J., Martin-Verstraete I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 8439–8444.
15. Yoshida T., Yamaguchi K., Hagishita T., Mitsunaga T., Miyata A., Tanabe T., Toh H., Ohshiro T., Shimao M., Izumi Y. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 223. P. 727–732.
16. Габдрахманова Л.А., Знаменская Л.В., Лецинская И.Б. // Антибиотики и химиотерапия. 1997. Т. 42. С. 15–21.
17. Hartley R.W. // J. Mol. Biol. 1988. V. 202. P. 913–915.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
19. Габдрахманова Л.А., Знаменская Л.В., Краснов С.И., Чернокальская Е.Б., Лецинская И.Б. // Микробиология. 1996. Т. 65. С. 599–606.
20. Anfinsen C.B., Redfield R.R., Choate W.I., Page J., Carol W.R. // J. Biol. Chem. 1957. V. 207. P. 201–210.

Ribonuclease from *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus*: Gene Structure and Regulation of Biosynthesis

A. A. Shulga*, L. V. Znamenskaya**#, O. V. Morozova**,
I. B. Leshchinskaya**, and M. P. Kirpichnikov*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Department of Microbiology, Kazan State University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

The gene for extracellular guanyl-specific ribonuclease of *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* (RNase Bth), a close homologue of the *B. intermedius* RNase (binase), was completely sequenced. Analysis of nucleotide sequences in the regions adjoining RNase genes revealed an identical organization of the chromosomal loci of RNase Bth and binase. Growth characteristics of the *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* strain and its synthesis of RNase were studied. It was shown that the exogenous inorganic phosphate inhibits the biosynthesis of RNase. At the same time, actinomycin D in low doses stimulates the enzyme synthesis. Comparative analysis of the influence of inorganic phosphate and actinomycin D on the biosynthesis of RNase Bth and binase suggests a possibility of coincidence of regulatory pathways of synthesis of these enzymes.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, ribonuclease, gene sequence, biosynthesis, repression, inorganic phosphate

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (8432) 358442; e-mail: Lilia.Znamenskaya@ksu.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 9. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.