



УДК 547.963.32.02

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
РЕГУЛЯТОРНОГО УЧАСТКА МЕЖДУ ГЕНАМИ *rplL*
И *rpoB* *E. coli*

Гуревич А. И., Аваков А. Э., Колосов М. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

β -Белок является важнейшим компонентом РНК-полимеразы *E. coli*, так как он непосредственно взаимодействует с ДНК-матрицей при узнавании промотора и в инициаторном комплексе и, вероятно, содержит каталитический центр фермента [1]. Ген этого белка, *rpoB* [2], транскрибируется с промотора P_3 [3] вместе с генами рибосомных белков L10 (*rplJ*) и L7/L12 (*rplL*) (см. рис. 1), но с меньшей эффективностью, причем холофермент и промежуточный ассоциат $\alpha_2\beta$ репрессируют экспрессию оперона *rpoBC*, не влияя на биосинтез белков L10 и L7/L12 [4]. Таким образом, участок между генами *rplL* и *rpoB* выполняет регуляторную функцию, по-видимому в качестве аттенюатора [3, 5].

Мы предприняли изучение этого участка с целью выяснения его структурных особенностей. Ранее из трансдуцирующего фага λrif^{47} нами был выделен *EcoRI*-фрагмент величиной около 1200 п.п. (*EcoRI*-1200), который содержит межцистронную область *rpl* — *rpo* вместе с примыкающими к ней частями структурных генов *rplL* и *rpoB* [6]. Для сравнительной наработки этого фрагмента мы использовали химерную плазмиду (рOD-262), полученную О. Н. Данилевской путем рекомбинации *in vitro* *EcoRI*-рестриктов ДНК λrif^{47} и рМВ9. При расщеплении фрагмента *EcoRI*-1200 рестриктазой *HpaII* образуется 7 субфрагментов, величина и порядок расположения которых в исходной ДНК указаны на рис. 1. Определение нуклеотидной последовательности первого (по направлению транскрипции) из этих субфрагментов, *EcoRI/HpaII*-115, показало [7], что он является частью структурного гена *rplL* и кодирует аминокислотную последовательность Glu¹² — Pro⁹¹ белка L7/L12, строение которого известно [8]. Поскольку L7/L12 содержит 120 аминокислотных остатков [8], то отсюда следовало, что ген *rplL* простирается почти до самого конца соседнего фрагмента, *HpaII*-100.

В связи с этим мы исследовали третий субфрагмент, *HpaII*-220, и смежную с ним часть предыдущего субфрагмента, *HpaII*-100. Введение радиоактивной метки в их 5'-концы осуществляли с помощью Т4-поли-нуклеотидкиназы и [γ -³²P]АТФ (>1000 Ки/ммоль), а для 3'-метки использовали ДНК-полимеразу I *E. coli* и [α -³²P]дСТР (>150 Ки/ммоль) в присутствии избытка немеченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов [7]. Разделение комплементарных цепей проводили электрофорезом в 5% поли-

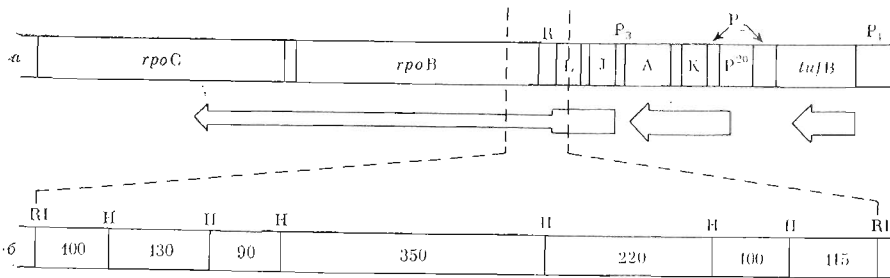


Рис. 1. Схема (а) оперонов *rpo* и *rpl* *E. coli* [3] и (б) рестриктазная карта их пограничной области. Обозначены гены β - и β' -белков РНК-полимеразы (*rpoB* и *rpoC*), рибосомных белков L7/L12 (*rplL*), L10 (*rplJ*), L1 (*rplA*), L11 (*rplK*), белка P²⁰ и фактора элонгации EF-Tu (*tufB*). P₁, P₂, P₃ – промоторы; R – регуляторный участок; RI и H – сайты рестриктаз *EcoRI* и *HpaII*, расстояние между ними дано в н.п. Стрелками указано направление и (качественно) интенсивность транскрипции [3]

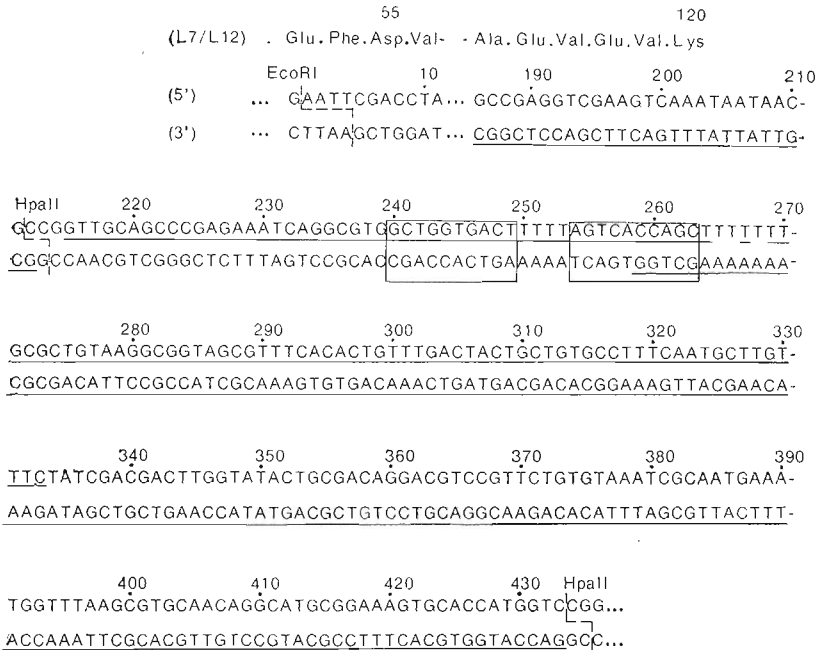


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность регуляторного участка между генами *rplL* и *rpoB* *E. coli*. В рамки заключены элементы симметрии второго порядка. Подчеркнуты последовательности, экспериментально найденные в настоящей работе

акриламидном геле после термической денатурации в 50% диметилсульфоксиде. Нуклеотидную последовательность определяли методом химических модификаций по Максаму – Гилберту [9] с изменениями, описанными в работах [10, 11], причем структуру концевых участков анализировали двухмерным разделением [12] продуктов частичного гидразинолиза и депуринизации [13]. Установленная таким образом нуклеотидная последовательность представлена на рис. 2 вместе с соответствующей аминокислотной последовательностью белка L7/L12.

Из полученных нами результатов следует, что структурный ген *rplL* оканчивается двумя терминирующими триплетами TAA в положении 204–209, считая от ближайшей точки расщепления ДНК нуклеазой *EcoRI*. Далее, на расстоянии 30 н.п., расположен 20-членный палиндром, который разделен на две половины четырьмя парами Т·А, а непосредственно за ним находится октануклеотидная последовательность (T₇G)·(C A₇).

Идентичный октануклеотид, и тоже после палиндрома, разделенного четырьмя парами Т·А, имеется в аттенуаторе триптофанового оперона [14]. Поэтому мы предполагаем, что именно здесь терминируется большинство ($\sim 1/3$; см. [15]) мРНК, транскрипция которых начинается на промоторе Р₃. Какую функцию выполняет оставшая часть спейсера и где он кончается — неизвестно. В установленной нами нуклеотидной последовательности нет такого участка, который мог бы кодировать опубликованную для β-белка N-концевую аминокислотную последовательность Met-Val-Tyr-Arg [16]. Очевидно, начало гена *rpoB* находится в следующем фрагменте, *HpaII*-350.

Авторы выражают благодарность О. Н. Даниялевской (Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва) за штамм *E. coli*, содержащей плазмиду рOD 262.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hilled Z., Wu C.-W. (1978) *Biochemistry*, **15**, 2954–2961.
2. Scaife J. (1976) in: *RNA Polymerase* (Losick R., Chamberlin M., eds.), pp. 207–225, Cold Spring Harbor Lab.
3. Linn T., Scaife J. (1978) *Nature*, **276**, 33–37.
4. Fukuda T., Taketo M., Ishihama A. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 4501–4504.
5. Lindahl L., Yamamoto M., Nomura M., Kirschbaum J. B., Allet B., Rochaix J.-D. (1977) *J. Mol. Biol.*, **109**, 23–47.
6. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 628–638.
7. Гуревич А. И., Аваков А. Э. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 301–304.
8. Terhorst C., Möller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 138–152.
9. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560–564.
10. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1420–1422.
11. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1281–1283.
12. Brownlee G. G., Sanger F. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **11**, 395–399.
13. Коробко В. Г., Грачев С. А., Петров Н. А. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1423–1426.
14. Lee F., Bertrand K., Bennett G., Yanofsky C. (1978) *J. Mol. Biol.*, **121**, 193–217.
15. Dennis P. P. (1977) *J. Mol. Biol.*, **115**, 603–625.
16. Fujiki H., Zurek G. (1975) *FEBS Letters*, **55**, 242–244.

Поступило в редакцию
10.1.1979

THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A REGULATORY SITE BETWEEN *rplL* AND *rpoB* GENES OF *E. coli*

GUREVICH A. I., AVAKOV A. E., KOLOSOV M. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A *HpaII* restriction fragment of λ rif^d47 DNA, containing the *rplL*-*rpoB* intergenic region of *E. coli*, was sequenced by the modified Maxam-Gilbert method. The C-terminus of the structural gene *rplL* was identified and the sequence of ca. 230 nucleotides downstream from it was determined. In 30 b.p. from termination triplets of *rplL* a rotationally symmetrical site was found which consisted of two G:C-rich decanucleotides separated with T₄ and followed by T₇G sequence (in the anti-sense strand). It is supposed to be the regulatory site functioning as terminator for gene *rplL* and attenuator for *rpoBC* operon.