



УДК 547.96.02

ДНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА *E. coli*.
ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
 α -СУБЪЕДИНИЦЫ

Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н.,
Чертков О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С.,
Шуваева Т. М.

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

Процесс транскрипции генетической информации в клетке осуществляет ДНК-зависимая РНК-полимераза (нуклеозидтрифосфат: РНК-нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.6), имеющая сложную субъединичную структуру (M РНК-полимеразы *E. coli* равен $\sim 500\,000$) и состоящая из двух больших субъединиц β и β' (M 155 000 и 165 000 соответственно), двух α -субъединиц ($M \sim 40\,000$) и фактора инициации σ ($M \sim 90\,000$) [1,2]. Сложность организации фермента обусловлена, по всей видимости, многостадийностью процесса транскрипции, катализируемого РНК-полимеразой.

В настоящее время имеется ограниченное число данных о роли отдельных субъединиц в процессе функционирования РНК-полимеразы. Такое положение отчасти объясняется отсутствием сведений о химическом и пространственном строении субъединиц РНК-полимеразы. В связи с этим мы предприняли исследование первичной структуры ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* В.

В данном сообщении описывается определение полной аминокислотной последовательности α -субъединицы. Выделение фермента и разделение субъединиц было описано ранее [3]. В процессе изучения структуры α -субъединицы были использованы гидролизы трипсином, протеазой из *Staphylococcus aureus* и термוליном, а также расщепление бромцианом, гидроксиламином и BNPS-скатолом (Pierce, США).

Для триптического гидролиза α -субъединицы применялся препарат карбоксиметилированного белка, радиоактивно меченного ^{14}C по всем аминокислотам [3]; использование радиоактивной метки существенно облегчило детекцию пептидов в процессе их выделения. Первоначальное разделение гидролизата проводилось на катионите AG 50W-X4 (Bio-Rad, США). Дальнейшее деление и очистка пептидов осуществлялись с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге и гель-фильтрации. В результате из триптического гидролизата были выделены все фрагменты полипептидной цепи α -субъединицы.

N-Концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли по методу Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных производных и фенилтиогидантои-

нов, С-концевую — с помощью карбоксипептидаз А, В и С [4]. Для установления структуры некоторых пептидов применялся дополнительный гидролиз стафилококковой протеазой, химотрипсином или термолизином.

Первоначальные данные о структуре триптических пептидов показали, что в молекуле α -субъединицы содержится более 30 остатков глутаминовой кислоты, причем только 6 из них расположены рядом с остатками основных аминокислот. Поэтому оказалось целесообразным в качестве следующего типа гидролиза использовать расщепление белка протеазой из *Staphylococcus aureus*, которая гидролизует в основном связи, образованные α -карбоксильными группами остатков глутаминовых кислот [5]. Разделение смеси пептидов, полученных при гидролизе карбоксиметилированной α -субъединицы стафилококковой протеазой, проводилось на катионите AG 50W-X2 с последующим делением и очисткой, как и в случае триптических пептидов. В итоге из гидролизата удалось выделить 41 пептид; установление структуры этих пептидов позволило объединить в более крупные фрагменты 28 триптических пептидов.

Для нахождения дополнительных перекрытий между полученными фрагментами проводился гидролиз 0,5 мкмоль α -субъединицы термолизином. Поскольку в данном случае наибольший интерес представляли пептиды, содержащие остатки лизина и аргинина, был использован препарат белка, радиоактивно меченный ^{14}C только по этим аминокислотам (полученный из бактерий, выращенных на среде с мечеными лизином и аргинином). В процессе разделения термолитического гидролизата детекция пептидов осуществлялась с помощью автордиографии, что позволило избирательно и с минимальными потерями выделить искомые пептиды.

Ценная информация о строении N-концевой и средней части молекулы α -субъединицы была получена после расщепления исходного белка бромцианом. Все ожидаемые фрагменты были выделены в гомогенном состоянии после разделения гидролизата на сефадексе G-75 при pH 8,0 (0,05 М Трис-HCl, 6и М гуанидин-HCl, 0,1% 2-меркаптоэтанол). В отсутствие меркаптоэтабола наблюдалась сильная агрегация пептидов, очевидно, вызванная образованием дисульфидных связей. Для установления структуры бромциановых фрагментов, содержащих остатки 1—51, 143—205 и 206—316, проводился дополнительный гидролиз этих фрагментов химотрипсином и стафилококковой протеазой с последующим выделением и определением аминокислотной последовательности образовавшихся пептидов.

При изучении структуры триптического пептида (201—218) была обнаружена последовательность аспарагинил — глицил, единственная в молекуле данного белка. Для уточнения аминокислотной последовательности этого участка полипептидной цепи было проведено расщепление α -субъединицы по связи Asn-Gly гидроксиламином [6] и с помощью хроматографии на сефадексе G-100 был выделен образовавшийся С-концевой фрагмент (209—329). Анализ структуры этого пептида на секвенсоре 890 С (Beckman, США) позволил установить аминокислотную последовательность остатков 209—234.

N-Концевая последовательность α -субъединицы РНК-полимеразы (40 остатков) была определена на секвенсоре, С-концевая установлена при исследовании структуры пептида, полученного при гидролизе белка по единственному остатку триптофана (321) с помощью BNPS-скатола [7].

В результате проведенных исследований была установлена структура α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы, приведенная на схеме. Судя по установленной первичной структуре, α -субъединица содержит 329 аминокислотных остатков и имеет следующий аминокислотный состав: Asp 21; Asn 9; Thr 19; Ser 17; Glu 36; Gln 10; Pro 16; Gly 20; Ala 23; Cys 4; Val 30; Met 5; Ile 24; Leu 38; Tyr 5; Phe 4; His 8; Lys 16; Arg 23; Trp 1. Ее молекулярный вес 36 512.

Аминокислотная последовательность α -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*

Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-Glu-Phe-Leu-Lys-Pro-Arg-Leu-Val-Asp-Ile-Glu-Gln-Val-Ser-¹⁰
²⁰
-Ser-Thr-His-Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu-Arg-Gly-Phe-Gly-His-Thr-Leu-Gly-³⁰
⁴⁰
-Asn-Ala-Leu-Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Ser-Ser-Met-Pro-Gly-Cys-Ala-Val-Thr-Glu-Val-Glu-⁵⁰
⁶⁰
-Ile-Asp-Gly-Val-Leu-His-Glu-Tyr-Ser-Thr-Lys-Glu-Gly-Val-Gln-Glu-Asp-Ile-Leu-Glu-⁷⁰
⁸⁰
-Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Leu-Ala-Val-Arg-Val-Gln-Gly-Lys-Asp-Glu-Val-Ile-Leu-⁹⁰
¹⁰⁰
-Thr-Leu-Asn-Lys-Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-Ala-Asp-Ile-Thr-His-Asp-Gly-Asp-Val-¹¹⁰
¹²⁰
-Glu-Ile-Val-Lys-Pro-Gln-His-Val-Ile-Cys-His-Leu-Thr-Asp-Glu-Asn-Ala-Ser-Ile-Ser-Met-¹³⁰
¹⁴⁰
-Arg-Ile-Lys-Val-Gln-Arg-Gly-Arg-Gly-Tyr-Val-Pro-Ala-Ser-Thr-Arg-Ile-His-Ser-Glu-Glu-¹⁵⁰
¹⁶⁰
-Asp-Glu-Arg-Pro-Ile-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Asp-Ala-Cys-Tyr-Ser-Pro-Val-Glu-Arg-Ile-Ala-¹⁷⁰
¹⁸⁰
-Tyr-Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg-Val-Glu-Gln-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Lys-Leu-Val-Ile-Glu-¹⁹⁰
²⁰⁰
-Met-Glu-Thr-Asn-Gly-Thr-Ile-Asp-Pro-Glu-Glu-Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ala-Thr-Ile-Leu-Ala-²¹⁰
²²⁰
-Glu-Gln-Leu-Glu-Ala-Phe-Val-Asp-Leu-Arg-Asp-Val-Arg-Gln-Pro-Glu-Val-Lys-Glu-Glu-²³⁰
²⁴⁰
-Lys-Pro-Glu-Phe-Asp-Pro-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro-Val-Asp-Asp-Leu-Glu-Leu-Thr-Val-Arg-²⁵⁰
²⁶⁰
-Ser-Ala-Asn-Cys-Leu-Lys-Ala-Glu-Ala-Ile-His-Tyr-Ile-Gly-Asp-Leu-Val-Glu-Arg-Thr-²⁷⁰
²⁸⁰
-Glu-Val-Glu-Leu-Leu-Lys-Thr-Pro-Asn-Leu-Gly-Lys-Lys-Ser-Leu-Thr-Glu-Ile-Lys-Asp-²⁹⁰
³⁰⁰
-Val-Leu-Ala-Ser-Arg-Gly-Leu-Ser-Leu-Gly-Met-Arg-Leu-Glu-Asn-Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-³¹⁰
³²⁰
-Ile-Ala-Asp-Glu-³²⁹

Единственная до сих пор известная мутация гена α -субъединицы, связанная с заменой остатка лейцина на гистидин [8], локализована в приведенной структуре в положении 289 или 290. Неопределенность положения объясняется тем, что структура пептида, выделенного из мутантной α -субъединицы [8], не была установлена полностью. При инфекции фагом T₄ *E. coli* происходит ADP-рибозилирование одного остатка аргинина в α -субъединице РНК-полимеразы [9,10]. При этом Гоффом было найдено, что модифицируется остаток аргинина, находящийся в последовательности Thr-Val-Arg ([9], ср.[10]), соответствующей остаткам 263—265 полипептидной цепи α -субъединицы.

В процессе настоящего исследования не было обнаружено каких-либо данных, свидетельствующих о структурных различиях двух α -субъединиц, входящих в состав молекулы РНК-полимеразы.

Авторы выражают благодарность В. В. Тюрину, Н. А. Потапенко, Т. М. Родиной, И. Г. Ахапкиной и С. А. Кочергинской за участие в отдельных этапах данной работы и Т. И. Муравьевой за выделение фермента. Авторы признательны проф. Е. Л. Смиту (США) и проф. Г. Р. Драпю (Канада) за образцы стафилококковой протеазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M. (1976) in RNA-Polymerase (Chamberlin M., Losick R., eds.), pp. 17—67, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
2. Burgess R. R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6168—6176.
3. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Кочергинская С. А., Чертов О. Ю., Никифоров В. Г., Лебедев А. Н. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1174—1181.
4. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Потанинко Н. А., Абдулаев Н. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3—21.
5. Drapeau G. R., Voily Y., Houvard J. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6720—6726.
6. Bornstein P. (1970) *Biochemistry*, **9**, 2408—2421.
7. Fontana A. (1972) in *Methods in Enzymol.*, vol. XXV, pp. 419—423, Acad. Press, N. Y.—London.
8. Fujiki H., Palm P., Zillig W., Calender R., Sunshine M. (1976) *Molec. gen. Genet.*, **145**, 19—22.
9. Goff C. G. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 6181—6190.
10. Zillig W., Fujiki H., Mailhammer R. (1975) *J. Biochem.*, **77**, 7p — 8p.

Поступила в редакцию
6.XII.1976

DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FROM *E. COLI*. THE AMINO ACID SEQUENCE OF α -SUBUNIT

OVCHINNIKOV Yu. A., LIPKIN V. M., MODYANOV N. N., CHERTOV O. Yu.,
SMIRNOV Yu. V., KHOKHRYAKOV V. S., SHUVAEVA T. M.

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

The amino acid sequence of α -subunit of DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli* B was determined. The protein contains 329 amino acids and its molecular weight is 36 512.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишина*

Сдано в набор 19/XI-1976 г.	Т-03702	Подписано к печати 5/II-1977 г.	Тираж 835 экз.
Зак. 1382	Формат бумаги 70×108 ^{1/2}	Усл. печ. л. 13,3 Бум. л. 4 ^{3/4}	Уч.-изд. л. 13,5

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10