



УДК 547.963.32.02+547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*.
НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТА
ГЕНА *rpoB* И СООТВЕТСТВУЮЩАЯ ЕМУ АМИНОКИСЛОТНАЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ N-КОНЦЕВОЙ ЧАСТИ β -СУБЪЕДИНИЦЫ

Монастырская Г. С., Губанов Р. В., Гурьев С. О.,
Липкин В. М., Свердлов Е. Д.

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

В процессе параллельного изучения первичных структур β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы и *rpoBC*-оперона *E. coli* ранее была определена структура фрагментов *EcoRI-C* и *EcoRI-F* (см. [1], рис. 1), содержащих большую часть гена *rpoB*, участок, кодирующий N-концевую последовательность β' -субъединицы и межцистронную область *rpoB* — *rpoC* [1, 2]. Оставшаяся часть гена *rpoB*, которая соответствует N-концевой последовательности β -субъединицы, расположена в смежном *EcoRI-G*-фрагменте. В этом же фрагменте находятся часть гена *rplL* и межцистронная область *rpl* — *rpo*. Структура двух последних частей фрагмента *EcoRI-G* была установлена в лаборатории Номуры [3]. Недавно опубликована еще одна работа о структуре данного фрагмента [4]. Сопоставление нуклеотидной последовательности, приведенной в работе [4], с аминокислотными последовательностями пептидов, полученных нами при различных расщеплениях β -субъединицы, обнаружило ряд существенных расхождений. Вследствие этого мы предприняли исследование нуклеотидной последовательности той части фрагмента *EcoRI-G*, которая кодирует последовательность относящуюся к β -субъединице. Результаты этого анализа в совокупности с данными анализа аминокислотных последовательностей пептидов из соответствующей области β -субъединицы являются предметом настоящего сообщения.

Схема установления нуклеотидной последовательности дана на рис. 1. В целом стратегия исследования аналогична стратегии, примененной нами в работах [1, 2]. Для получения коротких субфрагментов ДНК, пригодных для структурного анализа, фрагмент гидролизовали следующими рестрикционными эндонуклеазами: *HpaII*, *HinfI* в смеси с *SalI* и *Sau3AI* в смеси с *SalI*. Взаимное расположение фрагментов *HpaII-F* и *HpaII-C* основано на перекрывании их концевых последовательностей пептидом Arg-Glu-Ala-Pro-Glu (400—414).

На рис. 2 представлена установленная нами последовательность части фрагмента *EcoRI-G*, содержащая 645 п.о. Подчеркнуты аминокислотные последовательности, определенные в процессе изучения пептидов, полученных при расщеплении β -субъединицы РНК-полимеразы трипсином и протеиназой из *Staphylococcus aureus*.

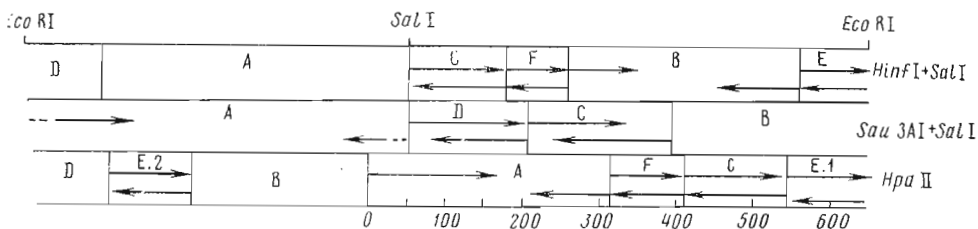


Рис. 1. Карта расщепления фрагмента *EcoRI-G* рестрикционными эндонуклеазами *HpaII*, *HinfI+SalI*, *Sau3AI+SalI*. Субфрагменты, получающиеся при действии рестриктаз, изображены прямоугольниками. Стрелки обозначают длину установленной последовательности комплементарных цепей данного субфрагмента. Пронумерована часть фрагмента *EcoRI-G*, структура которой представлена на рис. 2

	10	20	30	40	50	60
I-60	TTCCGGTCAACAAATAGTGTTCACAAACTGTCGGCTCAATGGACAGATGGGTCGACTT					
5I-120	GTCAGCGAGCTGAGGAACCCTATGGTTTACTCCTATACCGAGAAAAACGTATTTCGTAAG <u>fMetValTyrSerTyrThrGluLysLysArgIleArgLys</u>					
12I-180	GATTTTGGTAAACGTCCACAAGTTCTGGATGTACCTTATCTCCTTCTATCCAGTTGAC <u>AspPheGlyLysArgProGlnValLeuAspValProTyrLeuLeuSerIleGlnLeuAsp</u>					
18I-240	TCGTTTCAGAAATTATCGAGCAAGATCCTGAAGGCGAGTATGGTCTGGAAGCTGCTTTC <u>SerPheGlnLysPheIleGluGlnAspProGluGlyGlnTyrGlyLeuGluAlaAlaPhe</u>					
24I-300	CGTTCGGTATTTCCCGATTTCAGAGCTACAGCGGTAATTCGAGCTGCAATACGTACAGCTAC <u>ArgSerValPheProIleGlnSerTyrSerGlyAsnSerGluLeuGlnTyrValSerTyr</u>					
30I-360	CGCCTTGGCGAACCGGTGTTTGACGCTCCAGGAATGTCAAATCCGTGGCGTGACCTATTCC <u>ArgLeuGlyGluProValPheAspValGlnGluCysGlnIleArgGlyValThrTyrSer</u>					
36I-420	GCACCGCTGCGCGTTAAACTGCGTCTGGTGTATCTATGAGCGGAAGCGCCGGAAGGCACC <u>AlaProLeuArgValLysLeuArgLeuValIleTyrGluArgGluAlaProGluGlyThr</u>					
42I-480	GTAAAAGACATTAAGAACAAGAAGTCTACATGGCGAAATTCGCTCATGACAGACAAC <u>ValLysAspIleLysGluGlnGluValTyrMetGlyGluIleProLeuMetThrAspAsn</u>					
48I-540	GGTACCTTTGTTATCAACGGTACTGAGCGTGTTATCGTTTCCCAGCTGCACCGTAGTCGG <u>GlyThrPheValIleAsnGlyThrGluArgValIleValSerGlnLeuHisArgSerPro</u>					
54I-600	GGCGTCTTCTTTGACTCCGACAAAGGTAACCCCACTCTTCGGGTAAAGTGCTGTATAAC <u>GlyValPhePheAspSerAspLysGlyLysThrHisSerSerGlyLysValLeuTyrAsp</u>					
60I-645	GCGCGTATCATCCCTTACCGTGGTTCCTGGCTGGACTTCGAATTC <u>AlaArgIleIleProTyrArgGlySerTrpLeuAspPheGluPhe</u>					

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность части фрагмента *EcoRI-G* и аминокислотная последовательность N-концевой части β-субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* (приведена последовательность комплементарной цепи ДНК, адекватная последовательности мРНК). Ориентировка фрагмента *EcoRI-G* соответствует приведенной на рис. 1. Подчеркнуты аминокислотные последовательности, структура которых установлена анализом соответствующих пептидов. C* — остатки 5-метилцитидина

С помощью автоматического секвенатора была установлена N-концевая последовательность β -субъединицы Met-Val-Tyr-Ser-Tyr-Thr-Glu-Lys- [5]. Эта последовательность совпадает с аминокислотной последовательностью, гипотетически выведенной из нуклеотидной, если принять за инициирующий кодон ATG (82—84), перед которым расположена последовательность GAGG, комплементарная 3'-концу 16S РНК [6, 7]. Это позволяет считать, что ген *groV* начинается в положении 82 и соответствующая данному фрагменту ДНК N-концевая последовательность β -субъединицы содержит 188 аминокислотных остатков.

При сопоставлении определенной нами последовательности с опубликованной в работе [4] обнаружили следующие расхождения. В последовательности [4] отсутствуют (здесь и далее в скобках даны координаты оснований по рис. 2): А (262), G (296), С (301), Т (368), Т (519) и октапуклеотид TGTCAAAT (334—341). С другой стороны, последовательность [4] содержит несколько не обнаруженных нами нуклеотидных звеньев: А (между 289 и 290), С (между 316 и 317), С (между 321 и 322) и А (между 623 и 624). Обнаружен также ряд замен: установленная нами последовательность содержит G (318), m⁵C (328), А (472), А (535) и Т (597). В соответствующих местах последовательности [4] содержатся звенья Т, G, G, С и С.

В последовательности, определенной нами, в положениях 321—323, 326—329 и 624—623 не обнаружено участков узнавания рестрикционной эндонуклеазой *TaqI*, в то время как по данным работы [4] в этих местах *TaqI* расщепляет фрагмент *EcoRI*-G. *

По данным Поста и др. [3] между нуклеотидами 54 и 55 находится тринуклеотид CGT, тогда как согласно Гуревичу и соавт. [4] этот тринуклеотид отсутствует. Наши результаты согласуются с данными Гуревича и соавт.

Правильность наших результатов подтверждается совпадением гипотетической аминокислотной последовательности β -субъединицы, выведенной нами из нуклеотидной, с аминокислотными последовательностями пептидов, полученных при гидролизе этого белка. Изменения этой последовательности типа делеций и вставок, которые обнаруживаются в работе [4], приводят к тому, что разные части одного и того же пептида или разные пептиды попадают в разные «рамки» считывания.

Публикуемая в настоящей работе последовательность завершает структурный анализ гена β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Свердлов Е. Д., Липкин В. М., Монастырская Г. С., Чертов О. Ю., Губанов В. В., Гурьев С. О., Модянов Н. П., Гринкевич В. А., Макарова И. А., Марченко Т. В., Половинкова И. П. (1980) Биоорган. химия, 6, 655—665.
2. Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. (1980) Биоорган. химия, 6, 1106—1109.
3. Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H., Dennis P. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 1697—1701.
4. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Колесов М. Н. (1979) Биоорган. химия, 5, 1735—1739.
5. Lipkin V. M., Modyanov N. N., Marchenko T. V., Chertov O. Y., Ovchinnikov Yu. A. (1980) in: Methods in peptide and protein sequence analysis, Proc. 3rd Int. Conf. (Chr. Birr, Ed.), Elsevier North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam. pp. 453—459.
6. Shine J., Dalgarno L. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 1342—1346.
7. Steitz J. A., Jakes K. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4734—4738.

Поступило в редакцию
27.V.1980

* В процессе этой работы нами установлена также последовательность участка фрагмента *EcoRI*-G, соответствующего 31—218 п.о. в координатах работы [4]. Здесь согласно работе [4] содержится четвертый участок узнавания *TaqI* (координаты 104—107), тогда как по данным работы [3] в этом месте находится тетрапуклеотид TAGA. Мы подтвердили данные Поста и др. [3].

PRIMARY STRUCTURE OF RNA POLYMERASE FROM *E. COLI*.
NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE *rpoB* GENE FRAGMENT
AND CORRESPONDING N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCE OF THE β -SUBUNIT

MONASTYRSKAYA G. S., GUBANOV V. V., GURYEV S. O., LIPKIN V. M.,
SVERDLOV E. D.

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

During the investigation of primary structures of *E. coli* DNA-dependent RNA-polymerase β -subunit and its structural gene *rpoB* the nucleotide sequence of the part *EcoRI*-G fragment (645 base pairs), coding β -subunit N-terminus has been established. The determined N-terminal β -subunit amino acid sequence consists of 188 amino acid residues. It is in accordance with sequences of isolated β -subunit peptides and differ from sequence, which had been published by Gurevich et al. [4].
