



УДК 547.962.02 + 576.858.77

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКА ТЕЛ
ВКЛЮЧЕНИЙ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА
ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С.,
Гусак Н. М., Серебряный С. Б.

Институт молекулярной биологии и генетики
Академии наук УССР, Киев

Полипептидная цепь белка тел включений вируса ядерного полиэдроza тутового шелкопряда *Bombyx mori* реконструирована на основании опубликованных ранее данных по пептидам триптического, химотриптического и частичного кислотного гидролиза немодифицированного белка и триптическим фрагментам малеил-белка. Полипептидная цепь построена из 244 остатков аминокислот с молекулярным весом 28 576. Отмечается неравномерное, кластерное распределение основных, кислых, гидрофобных остатков аминокислот и остатков тирозина. Особенности распределения аминокислотных остатков в полипептидной цепи обсуждаются в связи с возможными функциями белков тел включений бакуловирусов.

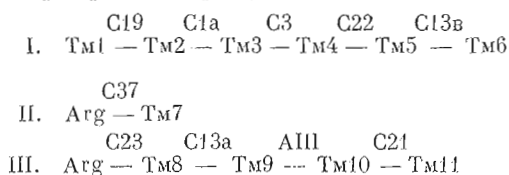
Вирус ядерного полиэдроza тутового шелкопряда — типичный представитель малоизученного семейства бакуловирусов, поражающих только насекомых. Среди многочисленных семейств вирусов позвоночных нет вирусов, обладающих биологическими, химическими и физическими свойствами, аналогичными свойствам бакуловирусов. Из вирусов беспозвоночных это наиболее распространенная группа, поражающая около 500 видов насекомых. Бакуловирусы широко применяются для борьбы с насекомыми-вредителями, поэтому изучение их представляет не только теоретический, но и практический интерес.

При поражении насекомых этими вирусами в ядрах клеток образуются кристаллические белковые образования — тела включения, включающие вирусные частицы типа ДНК. В их состав, возможно, входят также вирус-специфическая РНК, щелочная вирус-специфическая протеаза, ДНКаза и некоторые химические элементы [1]. Козлов и др. [2], Эппштейн и др. [3] и Саммерс и Смит [4] показали, что основным строительным материалом тел включения является один белок с молекулярным весом 28 000. Некоторые косвенные данные позволяют предполагать, что белок тел включения кодируется ДНК вируса [1]. Тела включения имеют форму полиэдров или гранул. По этому признаку семейство бакуловирусов разделяют на две группы: вирусы ядерного полиэдроza и вирусы гранулеза. Полиэдры включают множество вирионов, гранулы — один вирион. Показано, что аминокислотные составы белков полиэдров [5] и гранул [4] близки. Есть некоторые основания предполагать, что их

аминокислотные последовательности гомологичны [4, 5]. Знание первичной структуры этих белков поможет выяснить филогенетические взаимоотношения между вирусами в указанных группах семейства бакуловирусов. Выяснение аминокислотной последовательности полиэдренных белков вируса ядерного полиэдрома важно еще и потому, что эти белки обладают рядом биологических свойств [1], в том числе высокой антираковой активностью [6]. На белках тел включения вируса ядерного полиэдрома можно изучать основные закономерности белок-белковых взаимодействий, которые в случае этих белков приводят к образованию *in vivo* полиэдров с числом граней, характерным для каждого вируса. Кроме того, знание первичной структуры белков тел включения поможет выяснению взаимодействий белка с протеазой и РНК тел включения. Белок тела включения является природным субстратом протеазы тела включения, которая специфически расщепляет его в нескольких точках [2, 7]. РНК полиэдров, по-видимому, взаимодействует с полиэдренным белком, влияя на процессы его ассоциации-диссоциации [8].

В настоящем сообщении мы представляем аминокислотную последовательность полиэдренного белка вируса ядерного полиэдрома тутового шелкопряда — первого представителя большой группы белков тел включения семейства бакуловирусов. Опубликованные нами результаты исследований пептидов триптического [9], химотриптического и частичного кислотного гидролиза [10] и бромциановых фрагментов [11] не позволяют реконструировать полипептидную цепь белка. Поэтому было предпринято исследование триптических фрагментов малеил-белка [12, 13]. Реконструкцию полипептидной цепи белка удобно провести на основании известных полных аминокислотных последовательностей этих триптических фрагментов Т_{м1} — Т_{м11} [13].

С помощью химотриптических пептидов С19, С1а, С3, С22, С13в, С37, С23, С13а, С21 [10] и пептида частичного кислотного гидролиза АIII-03-4 [10] удается реконструировать три участка полипептидной цепи:



Среди пептидов, полученных различными способами гидролиза белка [9—11], не было найдено таких, которые бы перекрывали N- и C-концевые последовательности этих частей и соединяли их. Эти три участка полипептидной цепи белка насчитывают 246 остатков аминокислот, что соответствует количеству аминокислотных остатков в белке — 244 [5]. Последовательность этих трех участков включает в себя все известные ранее аминокислотные последовательности триптических [9, 11] и химотриптических [10] пептидов. Кроме того, эти три участка перекрываются между собой остатками аргинина. Так как полипептидная цепь белка имеет N-концевую последовательность H-Pro-Asp-Tyr [12], а на C-конце содержит тирозин [5], то эти три участка соединяются в последовательности I—II—III, т. е. Т_{м1}-Т_{м2}-Т_{м3}-Т_{м4}-Т_{м5}-Т_{м6}-Т_{м7}-Т_{м8}-Т_{м9}-Т_{м10}-Т_{м11}.

Полная аминокислотная последовательность полипептидной цепи белка тел включения вируса ядерного полиэдрома тутового шелкопряда *B. mori* представлена на схеме. Здесь же показаны пептиды, полученные при гидролизе трипсином (обозначены буквой Т), химотрипсином (обозначены буквой С) и частичном кислотном гидролизе, — АIII-03-4. Бруттоформула белка записывается следующим образом: Lys₂₁, His₅, Arg₁₁, Asn₁₉, Asp₁₁, Thr₁₀, Ser₁₀, Gln₆, Glu₂₁, Pro₁₅, Gly₁₂, Ala₁₀, Cys₂, Val₁₉, Met₆, Ile₁₆, Leu₁₈, Tyr₁₆, Phe₁₂, Trp₄.

Полипептидная цепь построена из 244 остатков аминокислот с молекулярным весом 28576. Эти результаты хорошо согласуются с ранее опубликованным аминокислотным составом [5] и молекулярным весом белка по данным электрофореза в полиакриламидном геле [2].

Следует отметить некоторые особенности расщепления белка химотрипсином и трипсином. Расщепление химотрипсином идет согласно его специфичности. Однако некоторые специфические для химотрипсина связи не расщепляются: Tyr-Asn (положение 5—6), Leu-Gly (23—24), Leu-Ile (26—27), Tyr-Val (146—147) и (159—160). Вероятно, эти связи относятся к труднодоступным в белке. Тем не менее во фрагменте Tm1 связь Tyr-Asn (5—6) также не расщепляется, но очень легко расщепляется связь Thr-Ile (8—9) (схема 1 [13]).

В нашей лаборатории [2] и Эппштейн и Тома [14] показано, что тела включения бакуловirusов содержат протеазу, которая расщепляет белок тел включения в нескольких специфических точках при растворении полиэдров и гранул при pH 10,5 [2, 7]. Мы показали, что протеаза не инактивируется 67% уксусной кислотой: при растворении в щелочных растворах (pH 10,5) полиэдренный белок, полученный растворением тел включения в 67% уксусной кислоте, расщепляется на те же фрагменты, что при растворении полиэдров при pH 10,5 [2]. Вполне вероятно, что при расщеплении как «щелочного», так и «уксуснокислотного» белка химотрипсином или трипсином должны появляться пептиды в результате расщепления связей, специфических для протеазы тел включения. Среди химотриптических пептидов неспецифических для химотрипсина пептидов не обнаружено. Среди же триптических найдено несколько пептидов, которые расщепляются по связям, специфическим для химотрипсина [9]: Trp-Asp (46—47), Tyr-Met (52—53), Trp-Ser (88—89), Tyr-Leu (119—120), Tyr-Thr (186—187), Phe-Val (193—194), Tyr-Lys (203—204), Tyr-Ile (208—209). Можно полагать, что протеаза тел включения обладает химотрипсиноподобной активностью. Однако наблюдается протеолиз связи, неспецифической для химотрипсина: Ala-Asn (122—123) (пептид T4, схема 9 [13]). Эппштейн и Тома [14] показали на синтетических субстратах, что протеаза тел включения имеет химотрипсиноподобную активность. Очевидно, что протеаза тел включения может расщеплять полиэдренный белок в нескольких или всех девяти перечисленных точках. Но нельзя исключить того, что сам трипсин может проявлять химотрипсиноподобную активность. Так, например, на фрагментах из малеил-белка трипсин расщепляет связи Trp-Asp (46—47), Tyr-Met (52—53), Tyr-Leu (119—120), Phe-Val (193—194).

Эппштейн и др. [3] выделили из «щелочного» полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *Trichoplusia ni* N-концевой фрагмент с молекулярным весом 9400, что соответствует содержанию примерно 90 остатков аминокислот. Можно полагать, что аналогичный N-концевой фрагмент в случае полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *B. mori* должен получаться расщеплением связи Trp-Ser (88—89). Для выяснения специфичности протеазы тел включения по отношению к белкам тел включения необходимы дополнительные исследования.

Особенностью первичной структуры полиэдренного белка является неравномерное распределение полярных, гидрофобных остатков аминокислот и остатков тирозина. Большое скопление полярных аминокислот наблюдается в N-концевом участке (31—44). Внутри этой области следует отметить кластер из пяти основных остатков (31—35). Скопление кислых остатков наблюдается на участке 103—117 (6 остатков), причем на большом протяжении (со 101-го по 124-й остаток) нет основных остатков, а на участке 125—142 — 6 основных остатков и ни одного кислого. Имеются небольшие кластеры основных остатков (172—173) и кислых (215—217). Интересно рассмотреть распределение остатков по двум фрагментам белка: N-концевой по 88-й остаток (фрагмент, возможно

отщепляемый протеазой тел включения) и С-концевой — от остатка метионина (180) (фрагмент ВгСN-V [15]). В N-концевом фрагменте имеется 18 остатков основных аминокислот из 37 в белке и 11 кислых из 32. Следует отметить, что на участке 1—35 находится 9 остатков основных и только один кислый. Здесь же, на участке 5—20, — скопление шести остатков тирозина (40% всех остатков тирозина в белке). В С-концевом фрагменте — только 5 основных остатков и большое скопление оксиаминокислот, гидрофобных и кислых аминокислот. Хорошо известно, что в гидрофобном окружении внутри белковой глобулы прочность водородных связей значительно возрастает [16]. Около 80% остатков аминокислот в С-концевом фрагменте — остатки, способные вносить наибольший вклад в стабилизацию третичной и четвертичной структуры полиэдренного белка за счет гидрофобных взаимодействий и образования водородных связей. Возможно, этим объясняется необычное поведение в растворах С-концевого фрагмента ВгСN-V [15] и нерастворимого пептида Тн [9], аминокислотная последовательность которого является частью этого фрагмента. Фрагмент ВгСN-V отличается высокой степенью агрегации даже в 50% муравьиной кислоте [15]. Пептид Тн нерастворим при рН 6,5 и при электрофорезе остается на старте, хотя в нем имеется 5 кислых остатков аминокислот (см. схему). Отщепление от Тн химотрипсином только трех остатков от С-конца Val-Phe-Lys резко изменяет свойство получающегося пептида Тм11С1 (фрагмент Тм11 [13]): при электрофорезе при рН 6,5 он обладает высокой подвижностью. Тем не менее у этого короткого 15-членного пептида пептидные связи остаются недоступными для действия карбоксипептидазы и химотрипсина. При протеолитическом расщеплении в течение суток карбоксипептидаза при рН 7,8 и 5,6 отщепляет только Leu и Ser, а химотрипсин совершенно не расщепляет связи Leu-Phe в середине пептидов Тн и Тм11С1 (схема 17 [13]). Представляется интересным исследовать вторичную структуру этого пептида.

Можно полагать, что неравномерное распределение основных, кислых, гидрофобных остатков аминокислот и остатков тирозина связано с функциональными свойствами полиэдренного белка. В начале сообщения мы отмечали, что тела включения содержат РНК. Если полиэдренный белок взаимодействует с этой РНК, образуя с ней функциональный комплекс, то это взаимодействие должно осуществляться N-концевым и средним участками (125—142) полипептидной цепи белка, где отмечено скопление основных остатков аминокислот и остатков тирозина (как известно, остатки тирозина способны взаимодействовать с нуклеотидами [17]). С-Концевой же участок, как и предполагалось ранее [15], по-видимому, отвечает за белок-белковые взаимодействия, которые в данном случае приводят к образованию специфических полиэдров. Эти гипотезы нуждаются в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

Экспериментальная часть

Полиэдренный белок. Для исследования первичной структуры использовали препараты белка, полученные «щелочным» и «уксуснокислотным» методом [2]. Применяли препараты белка, как немодифицированные, так и модифицированные восстановлением и карбоксиметилированием [18] и малеинированием [12]. Физико-химические и химические характеристики белка обсуждались в работах [2, 5, 8, 12].

Триптические пептиды. Белок расщепляли трипсином и пептиды разделяли и очищали, как описано [19]. Определение аминокислотной последовательности триптических пептидов подробно описано [9, 20].

Химотриптические пептиды. Расщепление белка химотрипсином, разделение и очистка химотриптических пептидов приведены в работе [21]. Аминокислотные последовательности химотриптических пептидов представлены в работах [10, 22].

Частичный кислотный гидролиз белка 0,03 н. HCl, выделение и последовательности аминокислотных остатков некоторых пептидов приведены в работе [10].

Триптические фрагменты малеил-белка. Получение гомогенных фрагментов описано в статье [12], а определение их аминокислотных последовательностей — в работе [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов Э. А. (1977) в сб. Молекулярная биология, с. 3—22, вып. 17, «Наукова думка», Киев.
2. Kozlov E. A., Sidorova N. M., Serebryani S. B. (1975) *J. Invert. Pathol.*, 25, 97—101.
3. Erpstein A., Thoma J. A., Scott H. A., Young S. Y. (1975) *Virology*, 67, 591—594.
4. Summers M. D., Smith G. E. (1975) *J. Virology*, 16, 1108—1116.
5. Kozlov E. A., Levitina T. L., Sidorova N. M., Radavski Y. L., Serebryani S. B. (1975) *J. Invert. Pathol.*, 25, 103—107.
6. Yamafuji K., Yoshihara J. F., Shinohara K. (1971) *Z. Krebsforschung.*, 75, 114—119.
7. Summers M. D., Egawa K. (1973) *J. Virology*, 12, 1092—1103.
8. Козлов Э. А., Согуляева В. М., Левитина Т. Л., Верещак В., Серебряный С. Б. (1969) *Биохимия*, 34, 679—685.
9. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. (1976) *Биохимия*, 41, 228—236.
10. Кацман М. С., Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. (1977) *Биоорг. химия*, 3, 1455—1466.
11. Радавский Ю. Л., Сухаренко Н. В., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. (1976) *Укр. біохім. ж.*, 48, 706—711.
12. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С., Серебряный С. Б. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 1029—1035.
13. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С., Гусак Н. М., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 1036—1047.
14. Erpstein D. A., Thoma J. A. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 62, 478—484.
15. Кибирев В. К., Радавский Ю. Л., Сухаренко Н. В., Серебряный С. Б. (1976) *Молекулярн. биология*, 10, 1272—1278.
16. Шахмаи Х. (1967) в сб. Биосинтез белка и его регуляция, с. 349—397, «Мир», М.
17. Богданов А. А., Леднева Р. К. (1975) в сб. Молекулярная биология, т. 5, с. 10—12, ВИНТИ, М.
18. Серебряный С. Б., Кавсан В. М., Кибирев В. К., Кацман М. С. (1968) *Хим. природн. соедин.*, 3, 174—178.
19. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Согуляева В. М., Серебряный С. Б. (1973) *Биохимия*, 38, 1215—1220.
20. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. (1974) *Биохимия*, 39, 303—309.
21. Кацман М. С., Кавсан В. М., Серебряный С. Б. (1973) *Биохимия*, 38, 971—975.
22. Кацман М. С., Кавсан В. М., Серебряный С. Б. (1974) *Биохимия*, 39, 543—551.

Поступила в редакцию
14. II. 1978

RECONSTRUCTION OF THE POLYPEPTIDE CHAIN OF THE INCLUSION BODY PROTEIN OF THE SILKWORM NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS. COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE

KOZLOV E. A., LEVITINA T. L., KATSMAN M. S., GUSAK N. M.,
SREBRYANY S. B.

*Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of the Ukrainian SSR, Kiev*

The complete amino acid sequence of the inclusion body protein of the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm was reconstructed using earlier published data on tryptic, chymotryptic, and partial acid hydrolyses of unmodified protein, as well as on tryptic fragments obtained from maleylated protein. The polypeptide chain comprises 244 amino acid residues, the protein having the molecular weight of 28576. Irregular distribution of basic, acidic and hydrophobic amino acid residues was found. The basic amino acid and tyrosine residues are concentrated in the N-terminal and middle parts of the polypeptide chain, whereas acidic and hydrophobic residues occupy predominantly the middle and C-terminal portion. The peculiarities of such a distribution are discussed from the viewpoint of possible function of inclusion body proteins of baculoviruses.