



УДК 577.113.5

N-КОНЦЕВЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Плетнев А. Г., Ямциков В. Ф.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к семейству *Togaviridae*, к роду *Flavivirus*. Известно около 60 представителей этого рода. Переносчиками флавивирусов являются членистоногие — комары и клещи. Большинство представителей этого рода способны вызывать у человека генерализованные инфекции, приводящие к энцефалитам. Вирионы флавивирусов состоят из липопротеиновой оболочки и нуклеокапсида. В состав оболочки входят два белка — гликопротеин Е с молекулярной массой ~51–60 кДа и белок М с молекулярной массой 7–8,5 кДа [1]. Нуклеокапсид представляет собой комплекс белка С ( $M_r$  13–15 тыс.) с одноцепочечной РНК. Знание первичной структуры генома и белков флавивирусов имеет важное значение для понимания механизмов патогенеза заболеваний, вызываемых этими вирусами.

Ранее [2] мы сообщали о клонировании ДНК-копий участков генома ВКЭ (штамм Софьин, ВКЭ<sub>с</sub>) и начале исследований их первичной структуры. Данная работа посвящена определению нуклеотидной последовательности участка генома ВКЭ, кодирующего структурные белки вируса. Из первичных структур генов белков Е и С нами выведены N-концевые аминокислотные последовательности этих белков. Оказалось, что гены структурных белков вируса расположены единым блоком на геномной РНК ВКЭ.

ДНК-копии генома ВКЭ<sub>с</sub> клонировали в клетках *E. coli* коннекторным методом по *Pst*I-сайту плазмиды рВР322 как описано ранее [2]. В результате гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Pst*I из состава рекомбинантных плазмид выделены ДНК-вставки. Методом перекрестной гибридизации вставки были картированы относительно друг друга. Предварительные результаты картирования представлены на рис. 1. Точное расположение ДНК-вставок клонов на физической карте генома ВКЭ<sub>с</sub> пока не определе-

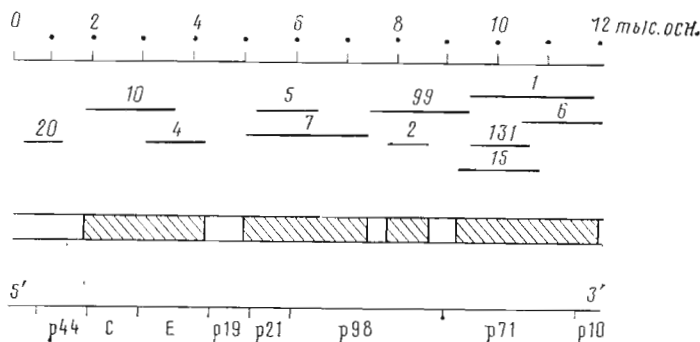


Рис. 1. Предварительные данные по картированию ДНК-копий генома ВКЭ<sub>с</sub> методом перекрестной гибридизации. Взаимное расположение участков с расшифрованной структурой дано по аналогии с генетической картой вируса Канджия [5] (нижняя часть рисунка). Номера клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды, указаны над соответствующими ДНК-вставками. Участки генома, первичная структура которых установлена, заштрихованы

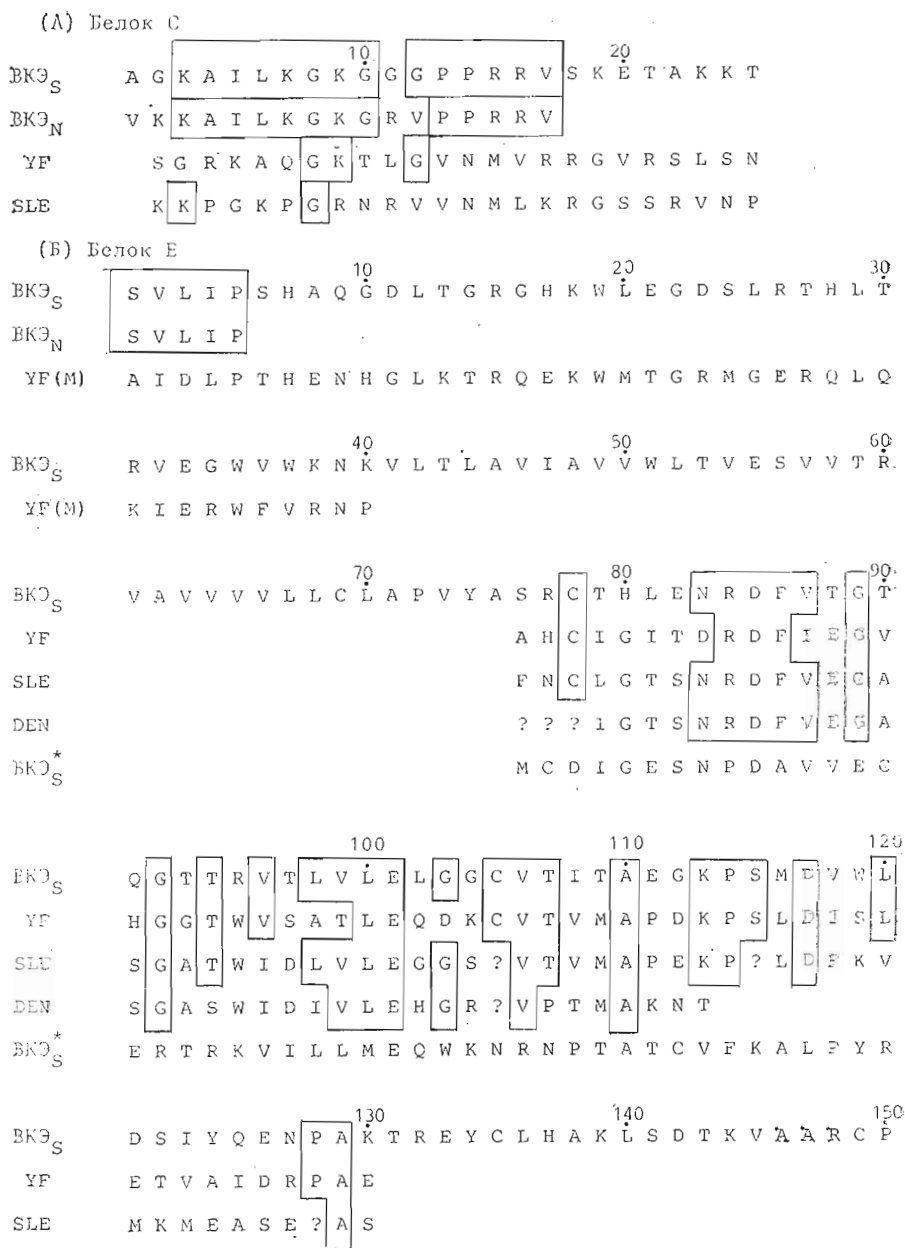


Рис. 2. Аминокислотные последовательности N-концов структурных белков флавивирусов. N-Концевые последовательности белков Е и С вирусов ВКЭ<sub>N</sub> (штамм Найдорф) приводятся по работе [3], YF, SLE, DEN — по работе [4]. ВКЭ<sub>S</sub> — N-концевые аминокислотные последовательности белков вируса клещевого энцефалита ВКЭ<sub>S</sub> (штамм Софбин), выведенные из нуклеотидных последовательностей ДНК-вставок клонов 4 и 10 (см. рис. 1); ВКЭ<sub>S</sub>\* — аминокислотная последовательность, выведенная из первичной структуры ДНК-вставок клонов 5 и 7. В рамки взяты участки гомологий аминокислотных последовательностей флавивирусных белков Е и С с аминокислотной последовательностью белков Е и С вируса ВКЭ<sub>S</sub>; последовательность аминокислот приводится в однобуквенном коде в соответствии с рекомендацией IUPAC — IUB: A — Ala, C — Cys, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr

но. ДНК-копии покрывают ~80% генома. Методом Максама — Гилберта исследована первичная структура ДНК-вставок клонов 4, 10, 5, 7, 15, 131, 1 и 6 (рис. 1). Установленная к настоящему времени нуклеотидная последовательность представляет собой прерывистую цепь оснований общей длиной 7500 остатков. Гибридизацией <sup>32</sup>P-ДНК-вставок с РНК ВКЭ<sub>S</sub> была

выявлена цепь, соответствующая мРНК. В этой цепи ДНК-вставок нуклеотидная последовательность переводится в аминокислотную только в одной рамке.

В работах [3, 4] опубликованы данные об N-концевых последовательностях структурных белков флавивирусов — ВКЭ<sub>N</sub> (штамм Найдорф), YF (вирус желтой лихорадки), SLE (вирус энцефалита Сен-Луи) и DEN (вирус Денге 2). Нами был произведен поиск гомологичных аминокислотных последовательностей этих вирусов с расшифрованными в данной работе участками генома вируса ВКЭ<sub>S</sub>. Анализ привел к следующим результатам (см. рис. 1 и 2). При сопоставлении с N-концевыми аминокислотными последовательностями белков E и C вируса ВКЭ<sub>N</sub>, штамм Найдорф [3], выяснилось, что структурные белки ВКЭ E и C локализованы в зонах, кодируемых вставками клонов 4 и 10. Следует отметить высокую (82%) степень гомологии N-концов нуклеокапсидных белков C двух штаммов ВКЭ. Гомология N-концевой последовательности белка C ВКЭ<sub>S</sub> с последовательностями, найденными для флавивирусов YF, SLE, DEN, переносимых комарами, менее выражена и составляет 12–18%. N-Конец белка C вируса ВКЭ<sub>S</sub> обогащен остатками основных аминокислот (из первых 25 остатков 8 приходится на лизин и аргинин); такая насыщенность основными аминокислотами характерна для белков, участвующих во взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами. По-видимому, N-конец белка C осуществляет функцию электростатического взаимодействия с РНК вируса. N-Концевые последовательности гликопротеинов E двух штаммов ВКЭ совершенно одинаковы, а N-концы гликопротеинов E вирусов YF, SLE, DEN не имеют гомологии с N-концом белка E вируса ВКЭ<sub>S</sub> (см. рис. 2б). Вместе с тем белок M вируса YF имеет большую (27,5%) гомологию с N-концом гликопротеина E, чем белок E этого вируса. Высокая (34–50%) гомология N-концевых аминокислотных последовательностей гликопротеинов E вирусов YF, SLE, DEN с аминокислотной последовательностью белка E вируса ВКЭ<sub>S</sub> выявляется в области, удаленной от N-конца белка на 76 аминокислотных остатков; с меньшей степенью гомологии (21%) выявляется вторая зона, которая кодируется клонами 5 и 7 (см. рис. 1 и 2б). Наличие двух зон гомологии (в клонах 4–10 и 5–7) может указывать на происшедшую при эволюции дупликацию генов флавивирусов. Поскольку N-концевые последовательности белков E и C ВКЭ<sub>S</sub> кодируются близлежащими участками генома (соответствующие им клоны 4 и 10 перекрываются, см. рис. 1), можно предполагать, что гены всех структурных белков образуют единый блок в геноме. По данным Уэствей [5], у флавивируса Канджин гены структурных белков сцеплены и находятся вблизи 5'-конца РНК, а 3'-концевая часть РНК кодирует неструктурные белки, необходимые для развития вируса. Блок структурных генов вируса Канджин транслируется в бесклеточной системе Кребс-2 независимо от блока неструктурных генов. В ретикулоцитной бесклеточной системе синтез белка РНК вируса ВКЭ<sub>S</sub> транслируется в белок с молекулярной массой ~90 кДа, который затем, при добавлении фракции мембранных белков из клеток мыши, расщепляется до структурных белков [6]. Радиоактивно меченый формилметинин в бесклеточной системе Кребс-2 с РНК ВКЭ<sub>S</sub> включается в белок С [7]. Эти факты, а также данные настоящей работы говорят о том, что белок С кодируется в начале блока структурных генов и синтез его может иницироваться с остатка метионина, который затем отщепляется в процессе созревания — кодону первой N-концевой аминокислоты, аланина, предшествует кодон метионина (рис. 2).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Westaway E. G., Schlesinger R. W., Dalrymple J. M., Trent D. W. Intervirology, 1980, v. 14, № 1, p. 114–117.
2. Чумаков М. П., Кусов Ю. Ю., Рубин С. Г., Сальников Я. В., Семашко П. В., Георгиев Г. П., Чумаков П. М., Грачев М. А., Шаманин В. А., Илетнев А. Г. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 276–279.
3. Boege U., Heinz F. X., Wengler G., Kunz C. Virology, 1983, v. 126, № 2, p. 651–657.
4. Bell J. R., Kinney R. M., Trent D. W., Lenches E. M., Dalgarno L., Strauss J. H. Virology, 1985, v. 143, № 1, p. 224–229.

5. Westaway E. G., Speight G., Endo L. *Virus Research*, 1984, v. 1, № 2, p. 333-350.
6. Svitkin Y. V., Lyapustin V. N., Lashkevich V. A., Agol V. I. *Virology*, 1984, v. 135, № 2, p. 536-541.
7. Svitkin Y. V., Ugarova T. Y., Chernovskaya T. V., Lyapustin V. N., Lashkevich V. A., Agol V. I. *Virology*, 1981, v. 110, № 1, p. 26-34.

Поступило в редакцию  
13.VIII.1985

## N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCES OF STRUCTURAL PROTEINS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

PLETNEV A. G., YAMSHCHIKOV V. F.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian  
Division of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

DNA-copies of the tick-borne encephalitis RNA fragments have been cloned in plasmid pBR322 in *E. coli* cells. The Sequencing of the cloned DNA-copies revealed clones containing genes coding for viral structural proteins E and C. Strong homology between amino acid sequences of proteins E and C from two TBF strains is found.