



УДК 547.962.02+576.858.77+576.12

СРАВНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
БЕЛКОВ ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЙ ВИРУСОВ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА
ТУТОВОГО И НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДОВ
И БОЛЬШОЙ ВОЩИНОЙ МОЛИ

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

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Реконструированы полипептидные цепи полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза непарного шелкопряда и большой воциной моли путем сравнения аминокислотных последовательностей триптических пептидов этих белков с аминокислотной последовательностью полиэдренного белка вируса тутового шелкопряда. Полипептидные цепи этих белков содержат 237 и 240 остатков аминокислот соответственно. Обсуждаются филогенетические взаимоотношения полиэдренных белков трех перечисленных вирусов ядерного полиэдроза. Первичные структуры этих белков в высокой степени гомологичны (82%). Эволюционная устойчивость первичной структуры полиэдренных белков связывается с устойчивостью их функций.

Аминокислотные последовательности триптических пептидов [1, 2] белков тел включений (полиэдренных белков) вирусов ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Porthetria dispar* [1] и большой воциной моли *Galleria mellonella* [2] дают возможность реконструировать полипептидные цепи этих белков путем сравнения их триптических пептидов с известной аминокислотной последовательностью полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда *Bombyx mori* [3]. Сходство первичных структур настолько велико, что отыскание гомологичных последовательностей не составляет труда. Исключение представляет N-концевой участок полиэдренного белка вируса *P. dispar*. В препарате белка, полученном экстракцией 67%-ной уксусной кислотой [4], свободная N-концевая NH₂-группа не обнаруживается, а в белке, полученном при pH 10,5 при 90°С, найдена N-концевая аминокислота — метионин. Возможно, что NH₂-группа N-концевой аминокислоты ацилирована остатком муравьиной или, что менее вероятно, уксусной кислоты. Лейцинаминопептидаза отщепляет от белка, полученного при 90°С, Lys (0,2) и амид (0,1). Остаток метионина с помощью лейцинаминопептидазы не определяется. Методом Эдмана в сочетании с дансильрованием удается обнаружить в белке, полученном при 90°С, три остатка: Met, неидентифицированный остаток и Asx. Среди триптических пептидов [1] имеется только один с N-концевым метионином — Met-Lys. На основании перечисленных данных N-концевую последовательность полиэдренного белка вируса *P. dispar* можно предположительно записать: Acyl-Met-Lys-Asn (Acyl — Ac или Form).

и Glx в полипептидной цепи белка *G. mellonella* приняты нами за остатки, идентичные соответствующим остаткам аминокислот в двух других белках. Из табл. 1 хорошо видны относительные расстояния в филогенезе между каждой парой из трех рассматриваемых белков.

Пользуясь методом и терминологией, предложенной Хэбером и Кошландом [6], можно определить «степень родства» этих белков. Из трех групп «функционально-гомологичных» аминокислот, предложенных этими авторами для определения родства, мы использовали только одну — группу А, т. е. группу с химически сходными остатками аминокислот. Если сравнивать три рассматриваемых белка, то число идентичных остатков равно 176. С учетом 24 функционально-гомологичных остатков, обозначенных на схеме звездочкой, число «соответствий», т. е. идентичных и функционально-гомологичных остатков, равно 200. Это составляет 82% сравниваемых последовательностей. Числа «соответствий» между различными парами рассматриваемых белков можно свести в табл. 2.

Таблица 2

Число «соответствий» [6] (идентичные + функционально-гомологичные остатки аминокислот) между последовательностями полиэдренных белков вируса ядерного полиэдроза *B. mori*, *P. dispar* и *G. mellonella*

Полиэдренный белок	<i>B. mori</i>	<i>G. mellonella</i>	<i>P. dispar</i>
<i>B. mori</i>	244		
<i>G. mellonella</i>	225 (92%)	240	
<i>P. dispar</i>	210 (86%)	204 (84%)	237

Рорман и др. [7] расшифровали последовательность 36 остатков с N-конца полиэдренных белков двух штаммов вируса ядерного полиэдроза, поражающих одного хозяина — *Orgyia pseudotsugata*. Эти N-концевые последовательности двух штаммов отличаются шестью заменами как одна от другой, так и от опубликованной нами [3, 8] N-концевой последовательности полиэдренного белка вируса ядерного полиэдроза *B. mori*.

Интересно, что, хотя вирусы ядерного полиэдроза, инфицирующие чешуекрылых (Lepidoptera), и представляют собой одну группу серологически близкородственных вирусов [9] семейства бакуловирусов (Baculoviridae) [10], геномы представителей этой группы могут значительно различаться. Так, например, геномы двух штаммов вируса *O. pseudotsugata* существенно различаются по G-C-содержанию [11, 12], величине [13], рестриктам [14] и имеют 1% гомологии по данным гибридизации [12, 14]. Такое же явление наблюдается и для других вирусов ядерного полиэдроза [15]. Вирионы вирусов ядерного полиэдроза могут значительно различаться и по своему полипептидному составу [16, 17]. Можно полагать, что отдельные представители вирусов ядерного полиэдроза дивергировали в значительной степени. Однако, как видно из результатов настоящих исследований, полиэдренные белки по крайней мере трех представителей группы вирусов ядерного полиэдроза Lepidoptera высокогомологичны. Этот вывод, по-видимому, можно распространить и на другие вирусы ядерного полиэдроза Lepidoptera на основании вышеупомянутых данных для полиэдренных белков, генетически почти полностью неродственных штаммов вируса *O. pseudotsugata* [7], а также значительного сходства аминокислотных составов [18, 19] и пептидных карт [18–20] полиэдренных белков различных вирусов ядерного полиэдроза.

Вирусы вообще и вирусы ядерного полиэдроза в частности способны быстро эволюционировать вследствие высокой скорости их репликации. Устойчивость аминокислотных последовательностей полиэдренных белков трех вирусов ядерного полиэдроза Lepidoptera, исследованных нами, и одного вируса, изученного Рорманом и др. [7], дает основание предполагать,

что структура полиэдренных белков группы вирусов ядерного полиэдроза, вероятно, не может подвергаться значительным изменениям. В то время как эволюционное давление вызвало, по-видимому, значительную дивергенцию других вирусных белков ядерного полиэдроза, первичная структура полиэдренных белков этих вирусов консервативна.

Генетическая устойчивость полиэдренных белков отражает устойчивость их функций. Ранее [1, 21] мы предполагали, что белок полиэдров вируса ядерного полиэдроза *B. mori* может иметь две функции. Первая, очевидная функция заключается в том, что полиэдренный белок образует защитный кристалл вокруг вирионов, предохраняющий их от воздействий внешней среды после лизиса клеток и выхода вирионов наружу. Известно, например, сохранение инфекционных свойств полиэдров после того, как они пролежали в почве 11 лет [22]. Эта способность образовывать прочные кристаллы осуществляется, по-видимому, за счет белок-белковых взаимодействий в С-концевой части полипептидной цепи белка. При рассмотрении участка 181—244 у трех белков можно видеть, что замены здесь функционально-гомологичны. Особенно это характерно для «кбрового» фрагмента 209—228, ответственного за белок-белковые взаимодействия [21].

Вторая, гипотетическая функция заключается в способности полиэдренного белка образовывать структурно-функциональные комплексы с нуклеиновыми кислотами за счет взаимодействия с N-концевой частью полипептидной цепи. Важную роль в этих взаимодействиях должны играть остатки тирозина и основных аминокислот. Несмотря на большое количество замен в N-концевой части молекул (22 замены на 88 остатков), концентрация и характер распределения остатков тирозина и основных аминокислот для трех белков сохраняется. Особенно характерно наличие кластера основных остатков в положении 34—35 не только для рассматриваемых трех белков, но и для двух других полиэдренных белков, первичная структура N-концевой части которых расшифрована Рорманом и др. [7].

В статье о полипептидном составе вирионов вируса ядерного полиэдроза *B. mori* [23] мы высказывали предположение о том, что полиэдренный белок может подвергаться посттрансляционному расщеплению с образованием N-концевого фрагмента, возможно участвующего в морфогенезе вирионов. Одновременно с нашим сообщением была опубликована статья [24], в которой отмечается, что в процессе репликации вируса ядерного полиэдроса *Autographa californica* некоторые вирус-специфические полипептиды действительно подвергаются посттрансляционному расщеплению. Полиэдренный белок начинает синтезироваться на ранних стадиях, и синтез его продолжается до поздних стадий инфекции. При этом полиэдренный белок сам является продуктом расщепления белка-предшественника. Авторы не исключают возможности того, что протеиназы, обнаруженные нами [4,18] и другими исследователями [25] в телах включения вирусов ядерного полиэдроза, принимают участие в этих процессах.

Мы показали, что протеиназа тел включений расщепляет полиэдренный белок вируса *B. mori* в пяти точках [3] (см. схему). Как видно из схемы, в других белках химическая природа остатков аминокислот, непосредственно образующих расщепляемые связи и соседних с ними, не изменяется. Можно думать, что по первичным и вторичным специфичностям протеиназы тел включений различных вирусов ядерного полиэдроза близки. Как отмечалось нами ранее [18], это должно приводить к одинаковому расщеплению протеиназой тел включений всех трех белков с образованием положительно заряженного N-концевого фрагмента с M 10500, способного взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами. Из возможных одинаковых по природе центров расщепления исключение составляет один, обозначенный на схеме пунктирной стрелкой. Расщепление связи Ala-Asn (122—123) было показано только на белке вируса *B. mori*. Эта же связь на белке вируса *G. mellonella* не расщепляется, хотя последовательности

этих двух белков на участке 120—142 идентичны. Но в белке вируса *G. mellonella* на этом участке расщепляется связь Gln-His (138—139) (обозначена пунктирной стрелкой под последовательностью *G. mellonella*). Это было обнаружено при исследовании триптических пептидов белка вируса *G. mellonella* (см. пептиды T21 [2]). Поскольку связи Ala-Asn и Gln-His обычно не расщепляются трипсином, то, вероятнее всего, они были разорваны еще до воздействия трипсина протеиназой тел включений, так как для исследований применяли расщепленные ею белки [4]. Возможно, что тела включения вируса ядерного полиодроза содержат не одну протеиназу или же протеиназа обладает не только химотрипсиноподобной активностью [25]. Так, например, в расщеплении белков-предшественников в процессе морфогенеза онковирусов участвует несколько протеиназ [26, 27], причем одна из них расщепляет связи Tyr-Pro и Phe-Pro [27]. В нашем случае, если существует протеиназа, которая расщепляет связи Ala-Asn и Gln-His в белках вирусов *B. mori* и *G. mellonella* и не расщепляет подобных связей на этом же участке в белке вируса *P. dispar*, можно полагать, что специфичность протеиназы этих тел включений проявляется не только на уровне первичной структуры, но и на уровне структур более высокого порядка, так как первичные структуры больших участков этих белков (120—142) гомологичны. Вывод о влиянии третичной или четвертичной структуры на специфичность протеиназы тел включений по отношению к белкам тел включений подтверждается и другими фактами, которые обсуждались нами ранее [18]. Тем не менее из данных, приведенных здесь и опубликованных ранее [18], можно предположить, что в силу близости именно первичных структур протеиназы тел включений расщепляют исследованные полиэдренные белки сходным образом с образованием N-концевого фрагмента, возможно функционально важного.

Таким образом, эволюционная устойчивость характерных особенностей первичных структур белков тел включений вирусов ядерного полиодроза несомненно связана с устойчивостью их функций, что свидетельствует о важности этих белков в процессе репродукции вирусов и распространении вирусной инфекции.

Экспериментальная часть

Полиэдренные белки получали растворением полиэдров в 67% уксусной кислоте [4]. Для определения заблокированной N-концевой последовательности полиэдренного белка вируса ядерного полиодроза *P. dispar* белок получали растворением полиэдров при 90°С и рН 11,0. Для этого 20 мл раствора 0,05 М Na₂CO₃, содержащего 0,1 М NaCl, подогрели до 90°С и затем добавляли 100 мг сухих полиэдров. Растворяли при 90°С в течение 5 мин. Раствор быстро охлаждали и белок осаждали 14% трихлоруксусной кислотой. Осадок, полученный после центрифугирования, растворяли в водном аммиаке и лиофилизировали.

N-Концевую последовательность аминокислот в препаратах белка определяли методом Эдмана в сочетании с дансильрованием с применением додецилсульфата натрия для растворения белков [28].

Триптические пептиды. Расщепление полиэдренных белков вируса ядерного полиодроза *P. dispar* и *G. mellonella* трипсином, разделение триптических пептидов и установление их аминокислотных последовательностей описано ранее [1, 2].

Аминокислотная последовательность полиэдренного белка вируса *B. mori* была установлена ранее [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиодроза непарного шелкопряда *Porthetria dispar*.— Биоорг. химия. 1981, т. 7, № 7, с. 985—995.

2. Гусак Н. М., Козлов Э. А., Овандер М. Н., Серебряный С. Б. Триптические пептиды белка тел включений вируса ядерного полиэдроза большой вошчинной моли *Galleria mellonella*.—Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 996–1007.
3. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Кацман М. С., Гусак Н. М., Серебряный С. Б. Реконструкция полипептидной цепи белка тел включений вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда.—Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1048–1053.
4. Kozlov E. A., Sidorova N. M., Serebryani S. B. Proteolytic cleavage of polyhedral protein during dissolution of inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* under alkaline conditions.—J. Invert. Pathol., 1975, v. 25, № 1, p. 97–101.
5. Hood L. E., Wilson J. N., Wood W. B. Molecular evolution.—In: Molecular biology of eucaryotic cells. W. A. Benjamin Inc., 1975, v. 1, p. 265–324.
6. Haber J. E., Koshland D. E. An evolution of the relatedness of proteins based on comparison of amino acid sequences.—J. Mol. Biol., 1970, v. 50, № 3, p. 617–639.
7. Bohrmann G. F., Bailey T. J., Brimhall B., Becker R. R., Beaudreau G. S. Tryptic peptide analysis and NH₂-terminal amino acid sequences of polyhedrins of two baculoviruses from *Orgyia pseudotsugata*.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 10, p. 4976–4980.
8. Serebryani S. B., Levitina T. L., Kautzman M. S., Radavski Y. L., Gusak N. M., Ovander M. N., Sucharenko N. V., Kozlov E. A. The primary structure of the polyhedral protein of nuclear polyhedrosis virus (NPV) of *Bombyx mori*.—J. Invert. Pathol., 1977, v. 30, № 3, p. 442–443.
9. Krywiencyck J., Bergold G. H. Serological relations between insect viruses and their inclusion-body proteins.—J. Insect. Pathol., 1960, v. 2, № 2, p. 118–123.
10. Wildy P. Classification and nomenclature of viruses.—Monogr. virol., 1971, v. 5, p. 1–81.
11. Rohrmann G. F., Carnegie J. W., Martignoni M. E., Beaudreau G. S. Characterization of the genome of the nucleopolyhedrosis bundle virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*.—Virology, 1977, v. 80, № 1, p. 421–425.
12. Rohrmann G. F., Beaudreau G. S. Characterization of DNA from polyhedral inclusion bodies of the nucleopolyhedrosis single-rod virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*.—Virology, 1977, v. 83, № 1, p. 474–478.
13. Schafer M. P., Rohrmann G. F., Heine P., Beaudreau G. S. DNA from two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses: molecular weight determination by means of electron microscopy and restriction endonuclease analysis.—Virology, 1979, v. 95, № 1, p. 176–184.
14. Rohrmann G. F., McPorland R. H., Martignoni M. E., Beaudreau G. S. Genetic relatedness of two nucleopolyhedrosis viruses pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*.—Virology, 1978, v. 84, № 1, p. 213–217.
15. Yurkovicova M., Van Tow J. H., Sussenbach J. S., Schegget J. T. Characterization of the nuclear polyhedrosis virus DNA of *Adoxophyes orana* and of *Barathra brassicae*.—Virology, 1979, v. 93, № 1, p. 8–19.
16. Harrap K. A., Payne C. C., Robertson J. S. The properties of three baculoviruses from closely related hosts.—Virology, 1977, v. 79, № 1, p. 14–31.
17. Summers M. D., Smith G. E., Baculoviruses structural polypeptides.—Virology, 1978, v. 84, № 2, p. 390–402.
18. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Ларионов Г. В., Веремейченко С. Н., Серебряный С. Б. Сравнительное биохимическое исследование полиэдренных белков вирусов ядерного полиэдроза.—Биохимия, 1978, т. 43, вып. 12, с. 2189–2195.
19. Cibulsky R. J., Harper J. D., Gudauskas R. T. Biochemical comparison of polyhedral protein from five nuclear polyhedrosis viruses infecting *Plusiine larva* (Lepidoptera: Noctuidae).—J. Invert. Pathol., 1977, v. 29, № 2, p. 182–191.
20. Summers M. D., Smith G. D. Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins.—Intervirology, 1976, v. 6, № 1, p. 168–180.
21. Козлов Э. А. Белки тел включений бакуловирусов.—В сб.: Молекулярная биология. Киев: Наукова думка, 1977, вып. 22, с. 42–52.
22. Thompson C. G., Scott D. W. Production and persistent of the nuclear polyhedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae) in the forest ecosystem.—J. Invert. Pathol., 1979, v. 33, № 1, p. 57–65.
23. Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Полипептиды вириона при ядерном полиэдрозе тутового шелкопряда.—Биохимия, 1980, т. 45, № 1, с. 130–136.
24. Carstens E. B., Tjia S. T., Doerfler W. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. 1. Synthesis of intracellular proteins after virus infection.—Virology, 1979, v. 99, № 2, p. 386–398.
25. Eppstein D. A., Thoma J. A. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the *Cabbage looper*.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 62, № 2, p. 478–474.
26. Yoshinaka J., Luftig R. B. Partial characterization of a p70 proteolytic factor that is present in purified virions of Rauscher leukemia virus (RLV).—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, № 1, p. 54–63.
27. Orozlan S., Henderson L. E., Stephenson J. R., Copeland T. D., Long C. W., Ihle J. N., Gildea R. V. Amino- and carboxyl-terminal amino-acid sequences of proteins coded

- by gag gene of murine leukemia virus.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 3, p. 1403–1408.
28. Weiner A. M., Platt T., Weber R. Amino-terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis.—J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 10, p. 3242–3251.

Поступила в редакцию
22.VII.1980
После доработки
4.I.1981

COMPARISON OF AMINO ACID SEQUENCES OF INCLUSION BODY PROTEINS
OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUSES OF *BOMBYX MORI*, *PTHETRIA*
DISPAR AND *GALLERIA MELLONELLA*

KOZLOV E. A., LEVITINA T. L., GUSAK N. M., OVANDER M. N.,
SEREBRYANY S. B.

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

The amino acid sequences of polyhedral proteins of nuclear polyhedrosis viruses (NPV) of *P. dispar* and *G. mellonella* were reconstructed basing on the comparison of tryptic peptides of these two proteins with the known amino acid sequence of polyhedral protein of *B. mori* NPV. Phylogeny of these proteins and a relationship between their structure and function are discussed.