

Полная аминокислотная последовательность полиэдрина вируса ядерного полиэдроза лунчатого шелкопряда, *Selenephra lunigera*

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Выяснено строение 32 триптических пептидов полиэдрина (ВЯП) S. lunigera. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина реконструирована путем сравнения строения триптических пептидов с выясненными в нашей лаборатории первичными структурами полиэдринов ВЯП Mamestra brassicae, Malacosoma neustria, Galleria mellonella, Bombyx mori, Agrotis segetum и Porthetria dispar. Полипептидная цепь полиэдрина ВЯП S. lunigera содержит 246 остатков аминокислот.

Введение. Ранее в нашей лаборатории классическими химическими методами изучена первичная структура полиэдринов шести ВЯП: тутового (*Bombyx mori*) [1], непарного (*Porthetria dispar*) [1] и кольчатого (*Malacosoma neustria*) [2] шелкопрядов, большой воцинной моли (*Galleria mellonella*) [1], озимой (*Agrotis segetum*) [1] и капустной (*M. brassicae*) [3] совок. Химическими методами первичную структуру полиэдринов ВЯП изучали только в нашей лаборатории.

Исследование физико-химическими и химическими методами самих белков и их фрагментов дает большое преимущество перед изучением аминокислотной последовательности по их гену, так как позволяет связать особенности физико-химических свойств белков и их фрагментов с особенностями их первичной структуры (связь структуры и функции). Предварительные структурно-функциональные взаимоотношения полиэдринов ВЯП проанализированы ранее [4] на трех полиэдринах ВЯП, первичная структура которых была выяснена нами. Полиэдрин ВЯП *S. lunigera* — это седьмой полиэдрин, физико-химические свойства и первичную структуру которого мы исследовали. В предыдущем сообщении [5] приведены результаты анализа его физико-химических свойств. В настоящей

работе представлены данные по изучению первичной структуры *S. lunigera*.

Материалы и методы. Получение «щелочного» полиэдрина, его восстановление, карбоксиметилирование и расщепление трипсином описаны в предыдущем сообщении [5]. Триптический гидролизат (рН 7,8) подкисляли 0,2 н. CH_3COOH до рН 6,5. Выпавший осадок (фракция нерастворимых пептидов) центрифугировали при 5000 об/мин и промывали дважды дистиллированной водой. Для предварительного разделения растворимых пептидов (надосадочная жидкость) триптического гидролизата применяли метод гель-фильтрации через сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция). Условия гель-фильтрации описаны под соответствующим рисунком. Материалы пиков I—V, полученных с помощью гель-фильтрации, подвергали препаративному пептидному картированию [3]. Аминокислотную последовательность коротких пептидов (до 10 стадий) определяли ручным методом [6], а пептидов, содержащих более 10 остатков, — с использованием секвенатора 890C («Beckman», США). Аминокислотный состав пептидов определяли по стандартной методике [7].

Результаты и обсуждение. Полиэдрины ВЯП бакуловирусов представляют собой группу высокомолекулярных белков со степенью гомологии свыше 80 % [2]. Ранее нами разработан ускоренный метод определения аминокислотной последователь-

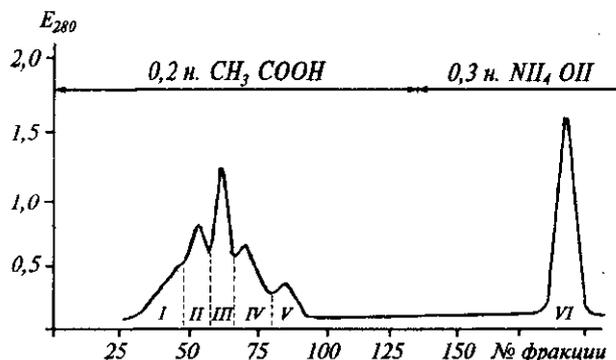


Рис. 1. Гель-фильтрация растворимой при pH 6,5 фракции триптического и гидролизата полиэдрина ВЯП *S. lunigera* через сефадекс G-25. Колонка 2,5 × 100 см, скорость элюции составила 30 мл/ч, объем фракции 5 мл

ности для высокомолекулярных белков [3]. Этот метод применен для установления первичной структуры полиэдрина ВЯП *M. brassicae* [3]. Однако при препаративном пептидном картировании всего триптического гидролизата некоторые пептиды не разделялись и их последовательности определяли в смеси [3]. В данной работе мы несколько модифицировали стратегию разделения триптического гидролизата. Нерастворимая при pH 6,5 фракция (см. «Материалы и методы») представляла собой пептид T25. Смесь пептидов, растворимых при pH 6,5, наносили на колонку и гель-фильтровали в 0,2 н. CH_3COOH . При этом часть материала в процессе гель-фильтрации осаждалась на колонке. Осадок с колонки элюировали 0,3 н. NH_4OH (пик VI, рис. 1). Нерастворимый при pH 5,0 материал представлял собой смесь пептидов T31, T32 и T33. Эти пептиды отличались только окисленными формами метионина (один содержал метионин, два других — метионин-сульфон и метионин-сульфоксид). Они были получены разделением материала пика VI только хроматографией на бумаге (второй этап препаративного картирования). Далее материал каждого из пиков I—V (рис. 1) подвергали препаративному пептидному картированию. Пептиды на препаративных хроматограммах электрофоретических зон идентифицировали (нумеровали) по аналитической пептидной карте [5]. Одноименные пептиды из пиков I—V подвергали гидролизу для определения аминокислотного состава и секвенированию. Результаты секвенирования представлены в таблице. Локализацию пептидов в полипептидной цепи устанавливали, сравнивая их строение с аминокислотной последовательностью шести полиэдринов, структура которых была выяснена в нашей лаборатории [1—3]. Высокая степень гомологии первичных структур полиэд-

Триптические пептиды полиэдрина вируса ядерного полиэдроза *S. lunigera*

№ пептида по карте	Аминокислотная последовательность	Локализация на полипептидной цепи
T1	Lys	35—36
T2	Lys-Lys	35—36
T3	Arg	175
T4	Asn-Gln-Lys	67—69
T5	Leu-Val-Ala-Asn-Met-Lys-Pro-Thr-Arg-Pro-Asn-Arg	121—132
T6	Gln-Ala-Asn-Arg	31—34
T7	Ile-Lys	231—232
T8	Asn-Val-Lys-Pro-Asp-Thr-Met-Lys	78—85
T9	Met-His-Asn-Leu-Tyr-Ser-Tyr-Arg-Pro-Thr-Leu-Gly-Lys	1—13
T10	Ile-Asn-Arg	196—198
T11	Phe-Val-Ala-Gln-His-Ala-Leu-Arg	136—143
T12	Tyr-Tyr-Lys	21—23
T13	Asn-Leu-Gly-Ser-Val-Ile-Lys	24—30
T14	Ile-Ser-Leu-Gly-Lys	170—174
T15	Lys-Pro-Leu-Leu-Tyr	206—210
T16	Leu-Leu-Val-Asn-Trp-Ser-Gly-Lys	86—93
T17	Leu-Thr-Leu-Phe-Lys	70—74
T18	Glu-Ile-Arg	75—77
T19	Thr-Asn-Ser-Phe-Glu-His-Phe	189—195
T20	Glu-Thr-Trp-Thr-Arg	98—102
T21	Asn-Leu-Asp-His-Leu-Asp-Lys	47—53
T22	Glu-Phe-Leu-Arg	94—97
T23	Cys-Phe-Arg	133—135
T24	Thr-Tyr-Val-Tyr-Asp-Asn-Lys	14—20
T25	Val-Gly-Thr-Asp-Ser-Ala-Glu-Glu-Glu-Glu-Ile-Leu-Leu-Glu-Val-Ser-Leu-Leu-Phe-Lys	211—230
T26	Gly-Gly-Gly-Cys-Pro-Val-Met-Asn-Ile-His-Ala-Glu-Tyr	176—188
T27	Asn-Ala-Ala-Glu-His-Glu-Ile-Asp-Glu-Arg	37—46
T28	Tyr-Leu-Val-Ala-Glu-Asp-Pro-Phe-Leu-Gly-Pro-Gly-Lys	54—66
T29	Ile-Val-Glu-Pro-Ser-Tyr-Val-Gly-Ser-Asn-Asn-Glu-Tyr-Arg	156—169
T30	Glu-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-Pro-Leu-Tyr-Thr-Gly-Pro-Ala-Tyr	233—246
T31, 32, 33	Phe-Met-Glu-Asp-Ser-Phe-Pro-Ile-Val-Asn-Asp-Gln-Glu-Val-Met-Asp-Ile-Phe	103—120
T34	Trp-Asp-Glu-Asp-Tyr-Val-Pro-His-Glu-Val-Ile-Arg	144—155
T35	Val-Ile-Trp-Glu-Asn-Phe-Tyr	199—205

Ac-Met-His-Asn-Leu-Tyr- Ser-Tyr- Arg- Pro- Thr- Leu- Gly- Lys- Thr- Tyr-
 Val- Tyr- Asp- Asn- Lys- Tyr- Tyr- Lys- Asn- Leu- Gly- Ser- Val- Ile- Lys- Glu-
 Ala- Asn- Arg- I-ys- Lys- Asn- Ala- Ala- Glu- His- Glu- Ile- Asp- Glu- Arg- Asn-
 Leu- Asp- His- Leu- Asp- Lys- Tyr- Leu- Val- Ala- Glu- Asp- Pro- Phe- Leu- Gly-
 Pro- Gly- Lys- Asn- Gln- Lys- Leu- Thr- Leu- Phe- Lys- Glu- Ile- Arg- Asn- Val-
 Lys- Pro- Asp- Thr- Met- Lys- Leu- Val- Val- Asn- Trp- Ser- Gly- Lys- Glu- Phe-
 Leu- Arg- Glu- Thr- Thr- Arg- Phe- Met- Glu- Asp- Ser- Phe- Pro- Ile- Val-
 Asn- Asp- Gln- Glu- Val- Met- Asp- Ile- Phe- Leu- Val- Ala- Asn- Met- Lys- Pro-
 Thr- Arg- Pro- Asn- Arg- Cys- Phe- Arg- Phe- Val- Ala- Gln- His- Ala- Leu- Arg-
 Trp- Asp- Glu- Asp- Tyr- Val- Pro- His- Glu- Val- Ile- Arg- Ile- Val- Glu- Pro-
 Ser- Tyr- Val- Gly- Ser- Asn- Asn- Glu- Tyr- Arg- Ile- Ser- Leu- Gly- Lys- Arg-
 Gly- Gly- Gly- Cys- Pro- Val- Met- Asn- Ile- His- Ala- Glu- Tyr- Thr- Asn- Ser-
 Phe- Glu- His- Phe- Ile- Asn- Arg- Val- Ile- Trp- Glu- Asn- Phe- Tyr- Lys- Pro-
 Leu- Leu- Tyr- Val- Gly- Thr- Asp- Ser- Ala- Glu- Glu- Glu- Glu- Ile- Leu- Leu-
 Glu- Val- Ser- Leu- Leu- Phe- Lys- Ile- Lys- Glu- Phe- Ala- Pro- Asp- Ala- Pro-
 Leu- Tyr- Thr- Gly- Pro- Ala- Tyr

Рис. 2. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *S. lunigera*

ринов позволяет однозначно локализовать все пептиды. Таким путем все пептиды, представленные в таблице, выписываются в непрерывную аминокислотную последовательность от N-концевого остатка Met до C-концевого остатка Tyr полиэдрина. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина ВЯП *S. lunigera*, насчитывающая 246 остатков аминокислот, представлена на рис. 2. Сравнение ее с аминокислотными последовательностями шести полиэдринов, определенных нами химическими методами, представлено на рис. 3. Ранее нами показана высокая степень гомологии полиэдринов шести ВЯП (80—95 % [2]). Степень гомологии полиэдрина ВЯП *S. lunigera* с шестью другими лежит в этих же пределах.

Кроме высокой степени гомологии первичных структур, интересная особенность наблюдается в N-концевой последовательности полиэдринов. Полиэдрины можно разбить на две группы. Полиэдрины одной группы (*S. lunigera*, *M. neustria*, *M. brassicae*, *P. dispar*, *A. segetum*), насчитывающие по 246 остатков аминокислот, содержат на N-конце остаток формил-метионина. В другой группе (*B. mori*, *G. mellonella*) полиэдрины с N-конца на два остатка короче и содержат на N-конце свободный остаток пролина. Как доказано в работе [8], по-

странсляционное удаление N-концевого формил-метионина у цитоплазмических белков зависит от природы соседнего остатка. В 95—100 % случаев

Sl	M	I	N	L	Y	S	Y	R	P	T	I	G	K	T	Y	V	Y	D	N	K	Y	Y	K	N	I	G	S	V	I	K	
Pd	K	F	N	S	A
As	R	F	.	N	S	A	
Mb	Y	T	R	.	N	S	
Mn	Y	T	R	.	N	S	
Bm	P	.	.	.	N	S	
Gm	P	.	.	.	N	S	

Sl	Q	A	N	R	K	K	N	A	A	E	H	E	I	D	E	R	N	L	D	H	L	D	K	Y	I	V	A	E	D	P
Pd	K	K	Q	H	L	Q	.	.	.	E	S	R
As	N	K	Q	H	L	Q	.	.	.	L	K	E	.	.	.	K	Q	P
Mb	N	K
Mn	N	K
Bm	N	K
Gm	N	K

Sl	F	L	G	P	G	K	N	Q	K	L	T	L	F	K	E	I	R	N	V	K	P	D	T	M	K	L	V	V	N	W
Pd
As
Mb
Mn
Bm
Gm

Sl	S	G	K	E	F	L	R	E	T	W	T	R	F	M	E	D	S	F	P	I	V	N	D	Q	E	V	M	D	I	F	
Pd
As	
Mb	
Mn	
Bm	
Gm	K	

Sl	L	V	A	N	M	K	P	T	R	P	N	R	C	F	R	F	V	A	Q	H	A	L	R	W	D	E	D	Y	V	P
Pd	T	I
As	E
Mb	I
Mn
Bm
Gm

Sl	H	E	V	I	R	I	V	E	P	S	Y	V	G	S	N	N	E	Y	R	I	S	L	G	K	R	G	G	G	C	P
Pd
As
Mb
Mn
Bm
Gm	U

Sl	V	M	N	I	I	A	E	Y	T	N	S	F	E	H	F	I	N	R	V	I	W	E	N	F	Y	K	P	L	L	Y
Pd	I	R
As	I
Mb
Mn
Bm	I
Gm	I

Sl	V	G	T	D	S	A	E	E	E	E	I	L	F	V	S	L	L	F	K	I	K	E	F	A	P	D	A	P	I	
Pd
As	I	
Mb	
Mn	I	
Bm	I	
Gm	I	

Sl	Y	T	G	P	A	Y
Pd	F	Q
As	.	S
Mb	.	N
Mn
Bm	F
Gm	F

Рис. 3. Сравнение аминокислотной последовательности полиэдрина ВЯП *S. lunigera* (Sl) с аминокислотными последовательностями полиэдринов ВЯП *P. dispar* (Pd), *A. segetum* (As), *M. brassicae* (Mb), *M. neustria* (Mn), *B. mori* (Bm), *G. mellonella* (Gm). В последовательности полиэдринов ВЯП Pd, As, Mb, Mn, Bm и Gm точками обозначены остатки, идентичные таковым в последовательности полиэдрина Sl

он удаляется, если пролин является соседним и в 100 % — остается при остатках Tyr, Arg, His, Lys. Эти выводы авторов [8] подтверждаются нашими данными.

Интересно, что полиэдрины обеих групп не подвергаются действию аминопептидаз (известно, что остаток пролина является «стопером» для аминопептидаз). Кроме того, в 8-м положении от N-конца у всех полиэдринов расположен остаток пролина, который также находится в положениях 236, 239 и 244 с C-конца. Как видим, полиэдрины ВЯП надежно защищены от действия пептидаз. Возможно, это обстоятельство позволяет им накапливаться в огромных количествах и кристаллизоваться в тела включения. Таким путем особенности первичной структуры N- и C-концевых участков полиэдрина позволяют реализовать основную функцию полиэдрина — образовывать «супервириокапсид» [9] вокруг ВЯП.

E. A. Kozlov, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaja, M. N. Ovander

The complete amino acid sequence of *Selenephra lunigera* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin

Summary

The amino acid sequence of 32 tryptic peptides of *S. lunigera* NPV polyhedrin was determined. The complete polypeptide chain of *S. lunigera* polyhedrin was reconstructed from peptides by means of their comparison with amino acid sequences of polyhedrins of *Mamestra brassicae*, *Malacosoma neustria*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrotis segetum* and *Porthetria dispar* NPVs. The *S. lunigera* NPV polyhedrin contains 246 amino acid residues.

E. A. Kozlov, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaja, M. M. Ovander

Повна амінокислотна послідовність поліедрину вірусу ядерного поліедрозу лунчастого шовкопряда, *Selenephra lunigera*

Резюме

З'ясовано будову 32 триптичних пептидів поліедрину ВЯП *S. lunigera*. Реконструйовано повну амінокислотну послідовність поліедрину шляхом порівняння будови триптичних пептидів з первинними структурами поліедринів ВЯП визначеними в нашій лабораторії, *Mamestra brassicae*, *Malacosoma neustria*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrotis segetum* та *Porthetria dispar*. Поліпептидний ланцюг поліедрину ВЯП *S. lunigera* включає 246 залишків амінокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Э. Л., Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В., Атепалихина С. А., Пальчиковская Л. И. Выяснение аминокислотной последовательности полиэдрина вируса ядерного полиедроза (ВЯП) озимой совки (*Agrotis segetum*) и уточнение первичной структуры полиэдринов ВЯП тутового (*Bombyx mori*), непарного (*Porthetria dispar*) шелкопряда и большой вошинной моли (*Galleria mellonella*) // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 75—82.
2. Козлов Э. А., Роднин Н. В., Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Радомский Н. Ф. Первичная структура полиэдрина вируса ядерного полиедроза кольчатого шелкопряда, *Malacosoma neustria* // Биоорг. химия.—1994.—20, № 5.—С. 543—545.
3. Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Овандер М. Н., Кацман М. С., Козлов Э. А. Ускоренный метод определения первичной структуры высокомолекулярных белков. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина вируса ядерного полиедроза (ВЯП) капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 4.—С. 44—49.
4. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of Baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure-function aspects // Top. Microbiol. and Immunol.—1986.—131.—P. 135—164.
5. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Овандер М. Н. Физико-химические свойства полиэдрина вируса ядерного полиедроза (ВЯП) лунчатого шелкопряда, *Selenephra lunigera* // Биополимери і клітина.—2001.—17, № 5.—С. 401—405.
6. Гусак Н. М., Овандер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил-Эдман // Методы молекуляр. биологии.—К.: Наук. думка, 1979.—С. 142—154.
7. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В., Кириленко М. Т., Мирошниченко О. С., Атепалихина С. А., Гудкова Л. В., Козлов Э. А. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 5.—С. 55—63.
8. Dalboge H., Bayne S., Pederson J. In vivo processing of N-terminal methionine on *E. coli* // FEBS Lett.—1990.—226, N 1, 2.—P. 1—3.
9. Чухрий М. Г. О локализации электронноплотного вещества в «супервириокапсидах» (полиэдрах) бакуловирусов и вирусов цитоплазматического полиедроза // Актуал. вопр. электронно-микроскопических исследований в Молдавии.—Кишинев: «Штиинца», 1978.—С. 37—38.

УДК577.112.5

Надійшла до редакції 12.07.2000