

Н. Е. ВЕСЕНИНА, Н. П. РОДИОНОВА, Т. И. ХЕЙФЕЦ,
И. Г. АТАБЕКОВ

ДАЛЬНЕЙШЕЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕКОНСТРУКЦИИ ВТМ: ОБРАЗОВАНИЕ МИНИМАЛЬНОГО НУКЛЕОПРОТЕИДНОГО КОМПЛЕКСА

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 5 X 1972)

Независимыми исследованиями в четырех лабораториях было показано, что молекула РНК вируса табачной мозаики (ВТМ) содержит участок, обладающий повышенным сродством к структурному белку, ответственный за инициацию процесса реконструкции вирусных частиц (¹⁻⁸). Участок РНК, иницирующий реконструкцию (у.и.р.) локализован на 5'-конце молекулы ВТМ (¹⁻⁵).

В условиях частичной реконструкции удается сформировать неполный нуклеопротеидный комплекс (н-НПК), содержащий молекулу РНК ВТМ, лишь частично одетую белком. Частицы н-НПК, полученные при различных условиях реконструкции, содержат белок ВТМ, связанный с одним концом вирусной РНК (^{5, 6, 8}). Было показано, что концевой фрагмент РНК ВТМ, защищенный белком в составе н-НПК, обладает повышенным сродством к структурному белку, т. е. содержит у.и.р. (⁷). Весьма очевидно, что протяженность у.и.р. не может быть слишком велика, так как генетическая информация, обеспечивающая белок-РНК-узнавание (содержащаяся в у.и.р.), и генетическая информация относительно аминокислотной последовательности вряд ли могут быть совмещены в значительной части молекулы РНК ВТМ. В связи с этим представляется маловероятным, что н-НПК, описанный в литературе (^{5, 6, 8}) и содержащий не менее 1/6 молекулы РНК ВТМ в форме, связанной со структурным белком, представляет собой минимальный комплекс (м-НПК), образуемый в процессе реконструкции. По-видимому, частицы н-НПК (^{6, 8}) содержат наряду с у.и.р. часть молекулы РНК ВТМ, расположенную за пределами у.и.р. Настоящая работа имела своей целью обнаружение минимального НПК среди продуктов, образуемых при взаимодействии белка и РНК ВТМ в процессе реконструкции.

Из инкубационной смеси, содержащей РНК и белок ВТМ, после 30–60 мин. инкубации выделяли осадок центрифугированием при 164 000 *g* в течение 90 мин., фиксировали его в 3% формальдегиде и фракционировали в градиенте плотности сульфата цезия. Материалы и методы, применявшиеся в этой работе, были описаны в предыдущих публикациях (^{6, 7}).

Анализ продуктов, образуемых при различных условиях инкубации белка и РНК ВТМ, позволил сделать следующие выводы. 1) В 0,25 *M* фосфатном буфере, pH 6,5, т. е. при условиях преимущественного образования н-НПК (^{7, 8}), в градиенте плотности сульфата цезия удалось выявить м-НПК с величиной плавучей плотности 1,57–1,59 г/см³ (рис. 1А). Уменьшение отношения РНК : белок от 1 : 20 (стандартная величина при реконструкции ВТМ) до 1 : 5 сопровождается появлением пика с плотностью 1,67 г/см³, соответствующего свободной РНК ВТМ, не связанной со структурным белком (рис. 1А). 2) Аналогичный м-НПК удалось обнаружить в 0,25 *M* фосфатном буфере, pH 7,3, т. е. при условиях, обеспечивающих образование нативного ВТМ одновременно с некоторым количеством н-НПК (^{6, 7}). Нам не удалось отделить в градиенте Cs₂SO₄ частицы н-НПК от частиц свободного ВТМ. К сожалению, описываемые опыты требуют нанесения весьма значительного общего количества материала, по-

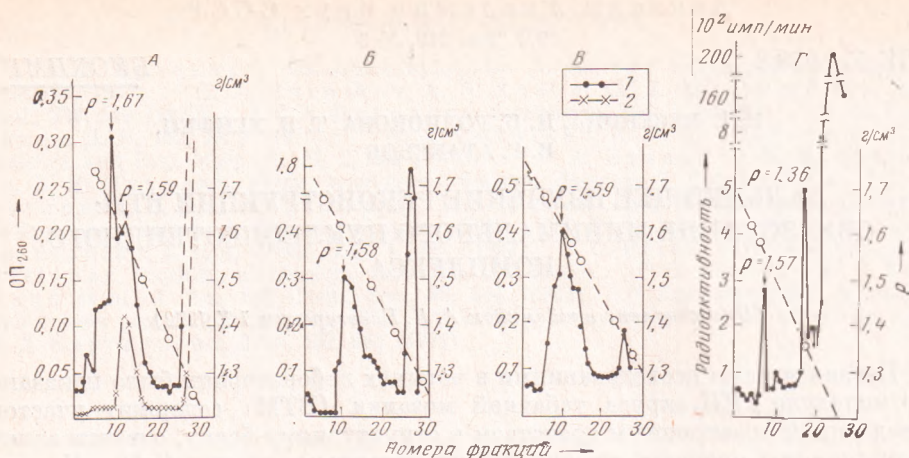


Рис. 1. Центрифугирование в градиенте плотности сульфата цезия материала, реконструированного *in vitro* из РНК и белка ВТМ. Ротор SW 50 центрифуги «Spinco L2»; 37 тыс. об/мин. А — инкубация в течение 30 мин. при 24° в 0,25 М фосфатном буфере pH 6,5; 1 — соотношение РНК/белок 1:5, 2 — соотношение РНК/белок 1:20; Б — инкубация в течение 60 мин. при 24° в 0,25 М фосфатном буфере pH 7,3; В — инкубация в течение 60 мин. при 24° в 0,08 М фосфатном буфере pH 7,3. Соотношение РНК/белок 1:10; Г — C^{14} -белок ВТМ. Инкубация в течение 60 мин. при 24° в 0,08 М фосфатном буфере pH 7,3. Соотношение РНК/белок- C^{14} 1:10

сколько м-НПК составляет лишь небольшую часть от массы реконструированного материала. Основная часть этих продуктов присутствует в зоне 1,27–1,35 г/см³, образуя нерастворимый в CS_2SO_4 преципитат (рис. 1А, Б). В 0,08 М фосфатном буфере pH 7,3, т. е. при условиях преимущественного образования нативного ВТМ (^{6,7}), м-НПК удается обнаружить в большем количестве, если отношение РНК: белок составляет 1:10, вместо обычного 1:20 (рис. 1В).

Дополнительные доказательства существования м-НПК были получены в опытах по реконструкции с использованием C^{14} -меченного белка ВТМ. При этом удалось обнаружить C^{14} -НПК с плотностью 1,57 г/см³ и два компонента с величиной плавучей плотности 1,36 и 1,26 г/см³, вероятно, соответствующие ВТМ и белку (рис. 1Г).

м-НПК содержит около 25% белка и 75% РНК. Допустив, что в составе частицы м-НПК присутствует интактная молекула вирусной РНК (мол. вес. $2 \cdot 10^6$ дальтон), следует полагать, что частица м-НПК содержит около 30–40 субъединиц белка ВТМ (мол. вес. 17 000 дальтон). Выше отмечалось, что при инициации реконструкции белок ВТМ взаимодействует с 5'-концевым участком вирусной РНК. Известно, что в процесс реконструкции вовлекается белок, предварительно агрегированный до состояния 20S-агрегата (дисковидная структура, построенная примерно из 34 субъединиц) (¹). Рассмотренные выше результаты позволяют предполагать, что частица м-НПК образуется в результате взаимодействия индивидуального преформированного диска с молекулой РНК ВТМ, т. е. представляет собой НПК, иницирующий процесс реконструкции.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. J. G. Butler, A. Klug, Nature, New Biol., 229, 42 (1971).
- ² В. Г. Джавахия, Н. П. Родионова, И. Г. Атабеков, Реф. докл. Конфер. ЛБХ МГУ, Декабрь 1970, 1971, стр. 127.
- ³ H. Guilleu, C. Stussi, L. Hirth, C. R., 272, 1181 (1971).
- ⁴ J. C. Thouvenel, H. Guilleu et al., FEBS Letters, 16, 204 (1971).
- ⁵ T. Ohno, Y. Nozu, Y. Okada, Virology, 44, 510 (1971).
- ⁶ N. P. Rodionova, N. E. Vesenina et al., Virology, 46, 183 (1971).
- ⁷ N. P. Rodionova, N. E. Vesenina et al., Virology, in press.
- ⁸ C. Stussi, G. Lebeurier, L. Hirth, Virology, 38, 16 (1969).
- ⁹ И. Г. Атабеков, Исследование свойств и функций, структурного белка вирусов растений, Докторская диссертация, МГУ, 1970.
- ¹⁰ И. Г. Атабеков, Реализация генетической информации вирусных РНК, «Наука», 1972.