

Title	試験管内におけるファージGARNA複製系の確立
Author(s)	米崎, 哲朗
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/24594">https://hdl.handle.net/11094/24594</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

試験管内におけるファージGA RNA複製系の確立

米崎 哲朗

# 目 次

項 目	頁
第一部 GAL7プロカーゼの性質およびサブユニット構造-----	1
序 論 -----	2
材 料 と 方 法 -----	7
結 果 -----	14
考 察 -----	47
文 献 -----	53
第二部 GA RNA 複製に関与する宿主因子の 単離およびその性質-----	56
序 論 -----	57
材 料 と 方 法 -----	59
結 果 -----	61
考 察 -----	82
文 献 -----	86
謝 意 -----	87

## 第一部

GAレプリカーゼの性質およびサブユニット構造

## 序 論

RNAを遺伝子として含み、大腸菌雄株に特異的に感染するRNAバクテリオフェージは、1961年のLoebとZinderによる最初の発見<sup>1)</sup>以来、世界各地で多数分離されて来た。RNAフェージは、多量に得るのが容易であること、取り扱いが非常に簡単なこと、また遺伝学的及び生化学的解析が良く進んでいる大腸菌を宿主とすることから、RNA複製機構と研究する上で有利な材料であると考えられる。また、フェージRNA複製機構の研究は、ウイルスRNA等のRNA型遺伝子の複製を解明する上で、重要な知見と概念を与えると考えられる。

フェージRNAは分子量約 $1 \times 10^6$ <sup>2)</sup>の直線状一本鎖分子<sup>3)</sup>であり、その約70%の部分が二次構造をとっている<sup>4,5)</sup>ことが知られている。フェージRNA複製に関する研究は、1965年にHarunaとSpiegelmanにより、Q $\beta$ フェージの感染菌からQ $\beta$ レプリカーゼ<sup>6)</sup>が単離され、試験管内において複製系が確立された<sup>7,8)</sup>ことから本格的に開始された。その結果、重要な次の二点が明らかとなった。1) Q $\beta$  RNA複製系では、Q $\beta$  RNAの複製を行うことはできるが、他のフェージRNA (例えばMS2 RNA, f2 RNA) やフェージ以外のRNA (大腸菌リボソームRNA, 転移RNA, タバコモザイクウイルスRNA等) の複製を行うことはできない。<sup>5)</sup>

この性質を鋳型特異性と呼んでいる。2)  $Q\beta$  RNAの複製は第一段階として  $Q\beta$  RNA (プラス鎖) を鋳型にして、相補的な塩基配列をもつ RNA (マイナス鎖) を合成し、次に第二段階として、マイナス鎖を鋳型にしてプラス鎖を合成する。<sup>9,10,11)</sup> 従って、 $\phi$ -RNA複製は、他のウイルス RNA 遺伝子や DNA 遺伝子の複製と同じく、基本的には鋳型に相補的な塩基配列をした鎖の形成であるが、他の多くの場合と異なる独特な点は、中間体として安定な二重鎖を形成しないこと<sup>12)</sup> である。——  $\phi$ -RNA複製の特徴をなすこれらの二点か、どのような機構により生ずるのかを解明することは、RNA複製機構と明らかにする上で重要な課題であると考えられる。

鋳型 RNA の認識機構に関しては、 $Q\beta$  RNA の切断により得られる断片鎖を用いた場合、反応が異常になるという、Haruna らの観察から、限られた特定の塩基配列ばかりでなく RNA の高次構造が関与していることが示唆されている。<sup>12)</sup> また、Spiegelman らの、 $Q\beta$  レプリカーゼ<sup>13)</sup> によって試験管内で複製される小さな RNA を用いた実験から、この RNA の認識機構にはやはり高次構造の関与が示唆されている。<sup>13)</sup> さらに、Weissmann らの最近の観察によれば、<sup>14)</sup>  $Q\beta$  レプリカーゼの  $Q\beta$  RNA の結合部位は、合成開始部位である 3' 末端

とは、かなりかけ離れた位置にあり、銹型 RNA の空間的な配置が重要な役割をもっていることが示されている。この様に、巨大分子であるフェージ RNA の高次構造の研究が銹型 RNA の識別機構解明に重要であることが明らかになっているにもかかわらず、この高次構造特に局所的なそれと取り扱う実験的手法が未だ確立されていないことから、詳細な解析が困難な状況にある。またレプリカーゼ<sup>3)</sup>による識別過程も解析が殆んど行なわれていない。このような状況においては、 $Q\beta$ レプリカーゼと異なる銹型特異性を示すレプリカーゼによる複製系と確立し、 $Q\beta$ 系との比較研究が可能になればそれを通して重要な知見が得られるであろうと考えられる。

一方、 $Q\beta$ レプリカーゼの系は、現在までに確立されている唯一の RNA 複製系であることから、フェージ RNA 複製のより詳細な、かつより普遍的な概念を構築するためにも他のフェージ RNA 複製系を確立することが不可欠であると考えられる。

RNA フェージは、これまで明らかにされた限り、フェージ粒子の形状、大きさ、構成成分及び RNA の遺伝学的構造等の諸性質は非常に類似している<sup>3)</sup>が、Watanabe らの研究から主に血清学的な性質に基づいて 4 つのグループ (I ~ IV) に分類されている (図 1)<sup>15, 16, 17)</sup>。

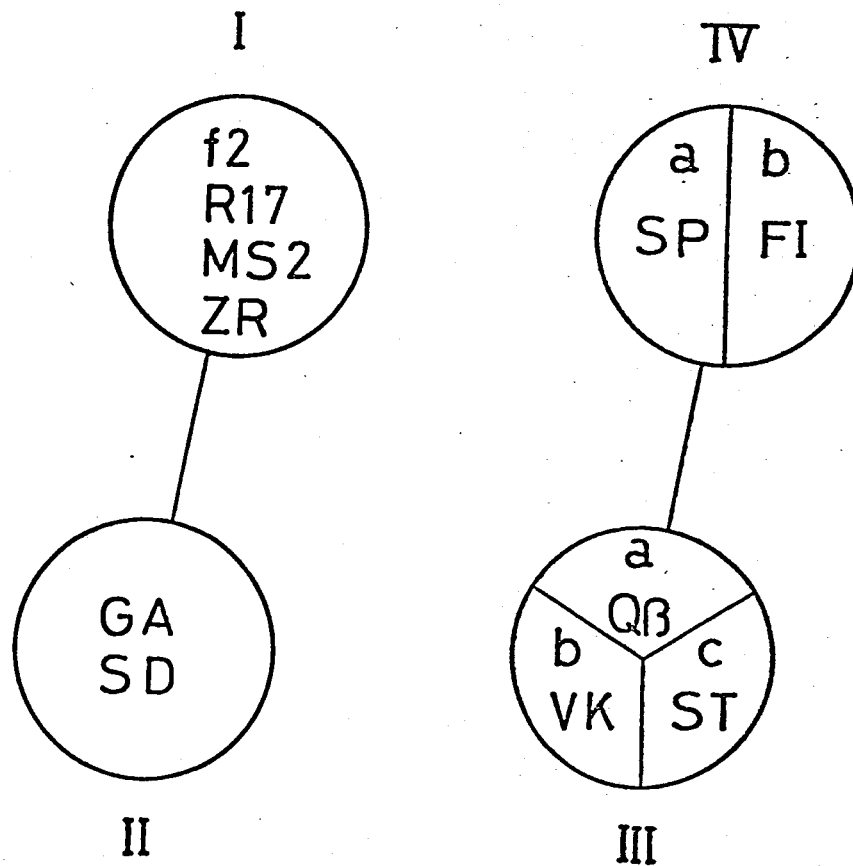


図1. RNAファージのグループリング模式図<sup>17)</sup>

円内は、同一グループに属するファージを表わす。

円内の分割線はそれぞれのグループか、サブグループに分類されていることを表わす。また、円どうしの連結線によってグループ間の近縁性を示した。



これらの内、第I及び第IIグループに属する  $\Phi$ - $\Sigma$  の RNA は  $Q\beta$  レプリ  
カーゼにより全く複製されない<sup>17)</sup> ことが明らかにされている。従って、  
第IIグループに属する  $\Phi$ - $\Sigma$  GA の レプリカーゼは、 $Q\beta$  レプリカーゼとは  
全く異なる鋳型特異性を示すことが予想されることから、GA レプリ  
カーゼの単離及びそれによる複製系を確立することを試みた。

これより先に、第Iグループに属する  $\Phi$ - $\Sigma$  f2 の レプリカーゼが Fedoroff  
と Zinder により単離された<sup>18)</sup> が、この酵素は非常に不安定（活性の  
半減期は  $0^\circ$  で約12時間）で実用には至らなかった。これに対し、  
GA レプリカーゼは、はるかに安定な酵素であることが明らかとなった。  
本論文では、GA レプリカーゼの単離、精製及びその性質について述  
べる。

## 材料と方法

### 材料

#### 1) 試薬及び酵素

非標識のリボヌクレオシド三リン酸は Sigma 社,  $[^3H]$ UTP  
及び  $[^{14}C]$ ATP は New England Nuclear 社, DEAEセルロースは  
Brown 社, リン酸セルロースは Whatman 社, 硫酸フロタミン及  
び脾臓 DNase I は Sigma 社からそれぞれ購入した。

#### 2) 培地及び緩衝液

大腸菌の培養に用いた L-ブロスは、1ℓ当り、10g ホリハポフ  
トン, 5g 酵母エキス, 5g 塩化ナトリウムを含み、水酸化ナトリウムで  
pH 7.0 に合わせた。

緩衝液 A の組成は、10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM  
EDTA (pH 7.4), 5mM  $\beta$ -xilカプトI91-IL, 20% (V/V) グリセロ  
-IL である。緩衝液 B の組成は 50mM Tris-HCl (pH 7.4) 以外  
は緩衝液 A と同じである。

### 3) フェージ及び大腸菌

GA フェージ及び RNA を調整するために用いた フェージは全て慶応義塾大学医学部の渡辺裕博士からいただいた。大腸菌 O13<sup>6)</sup> 株は Hfr, PNP<sup>-</sup>, RNase I<sup>-</sup> であり、RNA フェージの増殖及び GA レプリカーゼの調製に用いた。

### 4) フェージ RNA

精製した MS2 RNA, FI RNA 及び ST RNA は 渡辺博士からいただいたものである。

### 5) 抗体

精製したリボソームタンパク S1, EF-Tu 及び EF-Ts に対する抗体は全て 東京大学医科学研究所の上代淑人博士から提供していただいた。

## 方法

### 1) ファージ及びファージRNAの調製

ファージの増殖は 0.1% グルコース を添加した L-7ブロス中  
で Q13 を宿主として行なった。ファージRNA の精製は Pace らの方法<sup>19)</sup>  
に従った。

### 2) GA 感染菌の調製

L-7ブロスで一晩培養した Q13 を同じ7ブロスで 20倍に希釈  
し、37° で通気培養する。細胞濃度が  $4 \times 10^8 / \text{ml}$  に達したら、多重度  
20~50 で GA ファージと感染させる。通気培養を続け、感染 60分後  
に碎氷を加え、速やかに増殖を止める。20,000×g の連続遠心  
により感染菌を集め、使用するまで -20° で凍結保存する。

### 3) 1回目の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

0.42 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A で透析した粗抽出  
液 (step I) に 2倍量の緩衝液 A を加えて希釈した後、あらかじめ  
緩衝液 A で平衡化しておいて DEAE セルロースカラム (200mg のタンパ  
クに対して 17cm × 1.6cm) に吸着させる。吸着後、カラムを 0.14 M,

0.20M 次いで 0.30M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A で洗浄する。  
GAL7ポリカーゼは、0.20M で溶出する。0.20分画は、グリセロールが  
含まれているため 2倍量の飽和アンモニウム溶液を加えて、1時間  
以上静置した後、12,000×g 10分間の遠心により沈澱を集め  
濃縮する。

#### 4) 2回目の DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

1回目のクロマトグラフィーで得られた 0.20M 分画を、0.1M  
塩化ナトリウムを含む緩衝液 B に対して 1晩透析した後、  
緩衝液 B で平衡化された DEAEセルロースカラム (60mg のタンパ  
クに対して 15cm × 1.6cm) に吸着させる。タンパクの吸着後、カラムを  
0.1M から 0.5M までの塩化ナトリウム直線的濃度勾配により展開  
する。GAL7ポリカーゼは 0.18M 付近で溶出されるため、0.3M 付  
近で溶出される宿主 RNAポリメラーゼが標品に混入していても、この  
操作によりほぼ完全に分離される。活性のある部分は、80%飽  
和の硫酸アンモニウム溶液に対して 1晩透析することにより沈澱  
させる。

## 5) グリセロール濃度勾配遠心

4) で得られた沈澱を  $20,000 \times g$  10分間の遠心により集めた後、グリセロールを含まない緩衝液 B で溶解し、同じ緩衝液に対して 1時間透析する。タンパク溶液  $1\text{ml}$  を、 $50\text{mM}$  Tris-HCl (pH 7.4),  $1\text{mM}$  EDTA,  $5\text{mM}$   $\beta$ -xilカフトエチール,  $0.2\text{M}$  硫酸アンモニウムの組成をもつ緩衝液中に形成された、 $16\text{ml}$  の 5から 20%(%) のグリセロール直線的濃度勾配上に重層する。遠心は、Beckman L3-50 型遠心機、SW27.1 ローターによって、 $2^\circ\text{C}$  で  $27,000\text{ rpm}$  44時間行なう。

## 6) リン酸セルロースカラムクロマトグラフィー

グリセロール濃度勾配遠心により得られた活性のピーク付近を集め、 $0.05\text{M}$  塩化ナトリウムを含む緩衝液 B に対して 1晩透析した後、あらかじめ同じ緩衝液で平衡化しておいたリン酸セルロースカラム (タンパク  $4\text{mg}$  に対して  $7\text{cm} \times 0.55\text{cm}$ ) に吸着させる。吸着後、カラムを 1-2 容量の同じ緩衝液で洗浄し、その後、 $0.05\text{M}$  から  $0.5\text{M}$  の塩化ナトリウム直線的濃度勾配によって展開する。

## 7) ショ糖密度勾配遠心によるレゾリカーゼ合成産物の解析

Weissmannらにより報告されているように、抽出操作によって人工産物が形成される<sup>11)</sup>のを避けるため反応溶液をそのまま、4.8mLの2.5から15%のショ糖密度勾配上に重層し遠心した。ショ糖の溶液組成は30mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM MgCl<sub>2</sub>である。遠心はBeckman L3-50型遠心機、SW50.1 R-9-1によって10°で45,000rpm 2時間行なった。[3H]で標識したフェージRNAをマーカーとして加えた。遠心後、底から10滴づつ口紙上に集め赤外線ランプで乾燥させた後、5% TCA 溶液で洗淨して未反応の標識基質を取り除き、それぞれ口紙上に残されている放射活性を測定した。

## 8) アニールンク及び熱変性

アニールンクは80mM Tris-HCl (pH 7.4), 2mM EDTAの溶液中で60° 5分間処理することにより行なった。熱変性は10mM Tris-HCl (pH 7.4), 2mM EDTA 溶液中で98°以上100°以下2分間の処理により行なった。

### 9) SDSホリアクリルアミドゲル電気泳動

ホリアクリルアミド濃度は7.5%を用いた。その他はWeberとOsbornの方法<sup>20)</sup>に従った。

### 10) 免疫学的交叉反応

Ouchterlonyの方法<sup>24)</sup>に従った。

### 11) レゾリカーゼ活性の測定

GALレゾリカーゼによって合成されたRNA量を、酸不溶性分画に取り込まれた放射活性量により測定した。標準反応溶液0.25mlは、Tris-HCl (pH 7.4) 20  $\mu$ moles;  $MgCl_2$  2.0  $\mu$ moles; ATP, [<sup>3</sup>H]UTP (比活性 4 mCi/mol), CTP, GTP 各 0.2  $\mu$ moles; 錳型RNA; 酵素を含む。30° 20分間反応させた後、速やかに氷冷して反応を止める。セロリン酸-リン酸カリウム混液 0.3ml, 80% TCA 溶液 0.1ml と加えた後、10分間以上静置し酸不溶性分画をSaltorius SM 11307 X77ランフィルター上に集め、5mlの5% TCA 溶液で8回洗浄する。フィルターを赤外線ランプで乾燥させ、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。



## 結 果

### A. GAL7ポリカーゼの単離及び精製

最初、 $\alpha$ -GAL7ポリカーゼの単離に用いられた Haruna と Spiegelman の方法により、GAL7ポリカーゼを単離することを試みたが不成功であった。そこで、原法を改変し、硫酸プロタミンの使用濃度を約2倍高めることにより GAL7ポリカーゼ活性を単離することに成功した。この方法では原法に比し約5倍のタンパクが回収されるためポリカーゼの比活性は下がるが、反面、RNase等ポリカーゼの阻害物質を早い段階で取り除くのに役立った。各精製段階における活性の回収率及び比活性を表1に要約した。以下に示した操作は全て4°C以下で行なう。

#### a) GAL7ポリカーゼを含む細胞粗抽出液の調製

50gの凍結菌体と氷の上で緩やかに融解し、250mlの10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 5mM  $\beta$ -ヒルカゾール、5% (v/v) グリセロール, 5 $\mu$ g/ml DNase I を含む緩衝液で懸濁する。懸濁液に150mgのリゾチムを加え、凍結融解を2回繰り返す。3mlの1M MgCl<sub>2</sub>, 1.25mlの500 $\mu$ g/mlのDNase Iを加え10分間静置する。その後、30,000 $\times$ g 20分間の遠心を行

Step	Protein(mg)	Total units	Recovery(%)	Sp.act.	
I	930	3500	100	3.8	
II	310	2900	84	9.6	
III	59	2400	68	40	
IV	8.6	940	27	110	
V	Fr.B	0.25	120	3.3	460
	Fr.C	0.44	-	-	-

表 1. GAレポリカーゼの精製

活性の回収率は step I を 100% とした。

活性単位は、飽和量の鋳型 GA RNA を加え、〈材料と方法〉に述べた標準反応条件で 1nmole の  $[^3H]$  UTP を酸不溶性分画に取り込む活性を 1 単位と定義した。比活性は、1mg タンパクあたりの単位数で表わした。

たう。沈査を 60ml の 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 10mM  $MgCl_2$ , 5mM  $\beta$ -xilカフトイタノール, 5% (v/v) グリセロールで再び懸濁し、同じ条件で遠心する。得られた上清と 1 回目の上清と合わせ (320 ml), これに 16 ml の 0.11M EDTA (pH 7.4) を加え、5 分間静置後 30,000  $\times g$  20 分間の遠心により上清を得る (334 ml)。上清に 25mg/ml 硫酸アミノ酸液 (pH 7.4) を 37 ml 加え、10 分間静置後、12,000  $\times g$  10 分間の遠心をし、得られた沈澱を 40 ml の 0.4M 硫酸アンモニウム, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 5mM  $MgCl_2$ , 5mM  $\beta$ -xilカフトイタノール, 5% (v/v) グリセロールを含む緩衝液で懸濁し、1 晩静置する。懸濁液に硫酸アンモニウムだけを除いた上記と同じ緩衝液を 80 ml 加え 20 分間静置後 30,000  $\times g$  20 分間遠心し上清を得る (135 ml)。上清に等量の飽和硫酸アンモニウム (pH 7.4) を加える。10 分間静置後、12,000  $\times g$  10 分間の遠心により沈澱を集める。沈澱を緩衝液 A に溶解し、0.42M NaCl を含む緩衝液 A に対して 1 晩透析する (step I)。

この段階以降、GAL リリカーゼ活性は  $0^\circ$  で 10 日間、 $-20^\circ$  で 2 ヶ月の半減期を示す。

## b) DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

1回目のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーはタンパク量をある程度減らしGALポリカーゼを濃縮することにより2回目のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーでより良い分離能を得るために必要な操作である。また0.14M塩化ナトリウムによる溶出では、残留している70ロタミンが取り除かれる。さらに宿主のRNAポリメラーゼは0.20Mによる溶出では活性の90%以上がカラムに吸着してままである。GALポリカーゼの活性は大部分0.20M分画に回収され、0.30M分画に回収される活性は通常0.20M分画の約10%である。また、0.14M分画には有意な活性は認められない。得られた0.20M分画(step II)は、2回目のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによりさらに精製される。図2に示したようにGALポリカーゼは単一のピークを形成して溶出される(step III)。大部分の活性を含む画分を集め、硫酸アンモニウム沈澱によってグリセロールの除去とタンパクの濃縮を行なった後、グリセロール密度勾配遠心を行なう。

## c) グリセロール密度勾配遠心

GALポリカーゼはグリセロール非存在下では不安定であり、活性の半減期は約12時間である。従って、この操作により通常

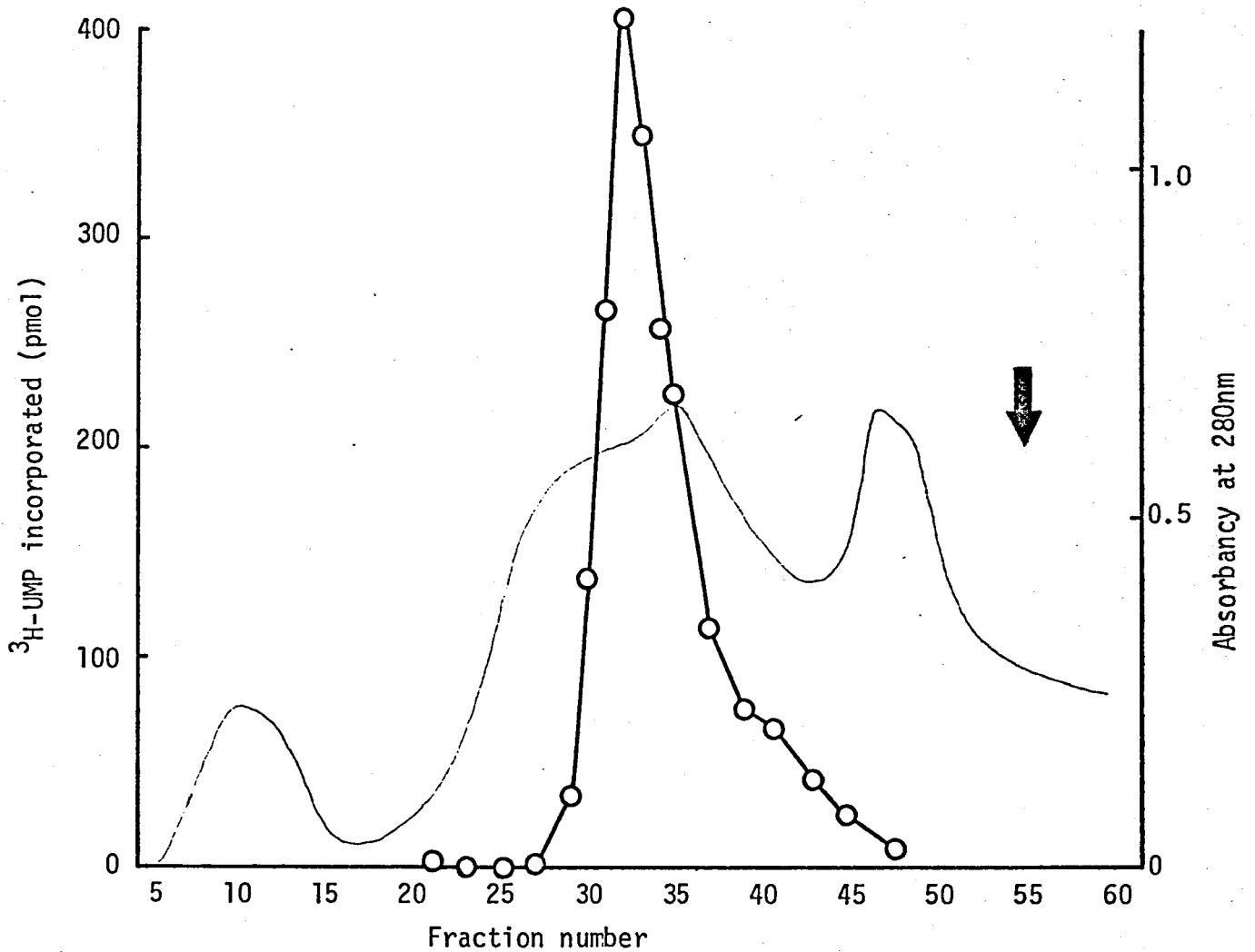


図2. 塩化ナリウム直線的濃度勾配溶出による DEAEセルロース  
カラムクロマトグラフィー

〈材料と方法〉に従ってクロマトグラフィーを行なった。溶出に用いた緩衝液の全溶量は、カラムの10倍である。溶出は分画番号17から始めた。5 $\mu\text{g}$  GARNAを含む標準反応液に、各分画の10 $\mu\text{l}$ を加え〈材料と方法〉に従って、酵素活性を測定した。酵素活性、—○—； $A_{280}$ 、—。図中の矢印は、大腸菌RNAポリメラーゼの溶出位置を示す。

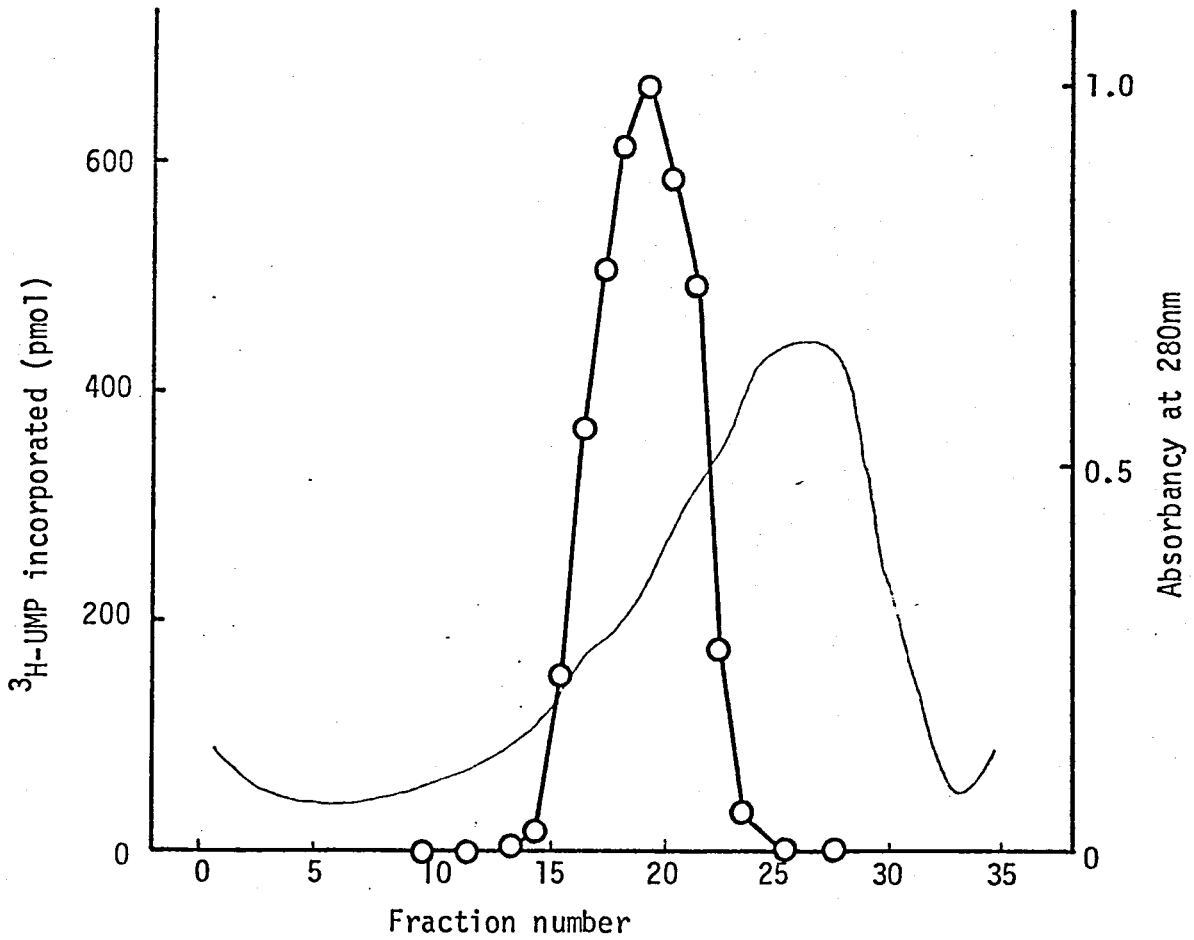


図3. グリセロール濃度勾配遠心による精製

〈材料と方法〉に従って遠心を行なった後、遠心管の底を針で刺して、0.5ml ずつ分画した。各分画 10 $\mu$ l の酵素活性を図2で述べたのと同じ方法で測定した。遠心方向は図中、右から左である。酵素活性, —○—;  $A_{280}$ , —

約60%の活性を失う。GAL7オリカーゼの活性は宿主RNAポリメラーゼの1量体の沈降距離に比し、 $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{2.5}$ の位置に単一のピークを形成する(図3)(step IV)。

#### d) リン酸セルロースカラムクロマトグラフィ

GAL7オリカーゼは最終的にリン酸セルロースカラムクロマトグラフィにより精製され、均一な標品が得られる。このクロマトグラフィ(step V)ではGAL7オリカーゼの活性に関して3つの分画が得られる(それぞれをFr. A, Fr. B, Fr. Cと命名する。図4)。Fr. Bは自身でGAL7オリカーゼ活性を示す。Fr. AとFr. Cはいずれも単独では活性を示さないが、両者を0°で混ぜ合わせることにより速やかにGAL7オリカーゼ活性を回復することが出来る(図5)。この時、Fr. Cに含まれるサブユニットI・II複合体(B項参照)の量をもとに算出すれば、10分目で約60%の回復率を示す。また、Fr. AとFr. Cは混ぜ合わせた後、リン酸セルロースにより再クロマトグラフィを行なうと、全体的には図4と同じパターンが得られ、Fr. Bが再び現われる。このことから、Fr. AとFr. CはGAL7オリカーゼの相補的な成分を含んでいることが結論される。

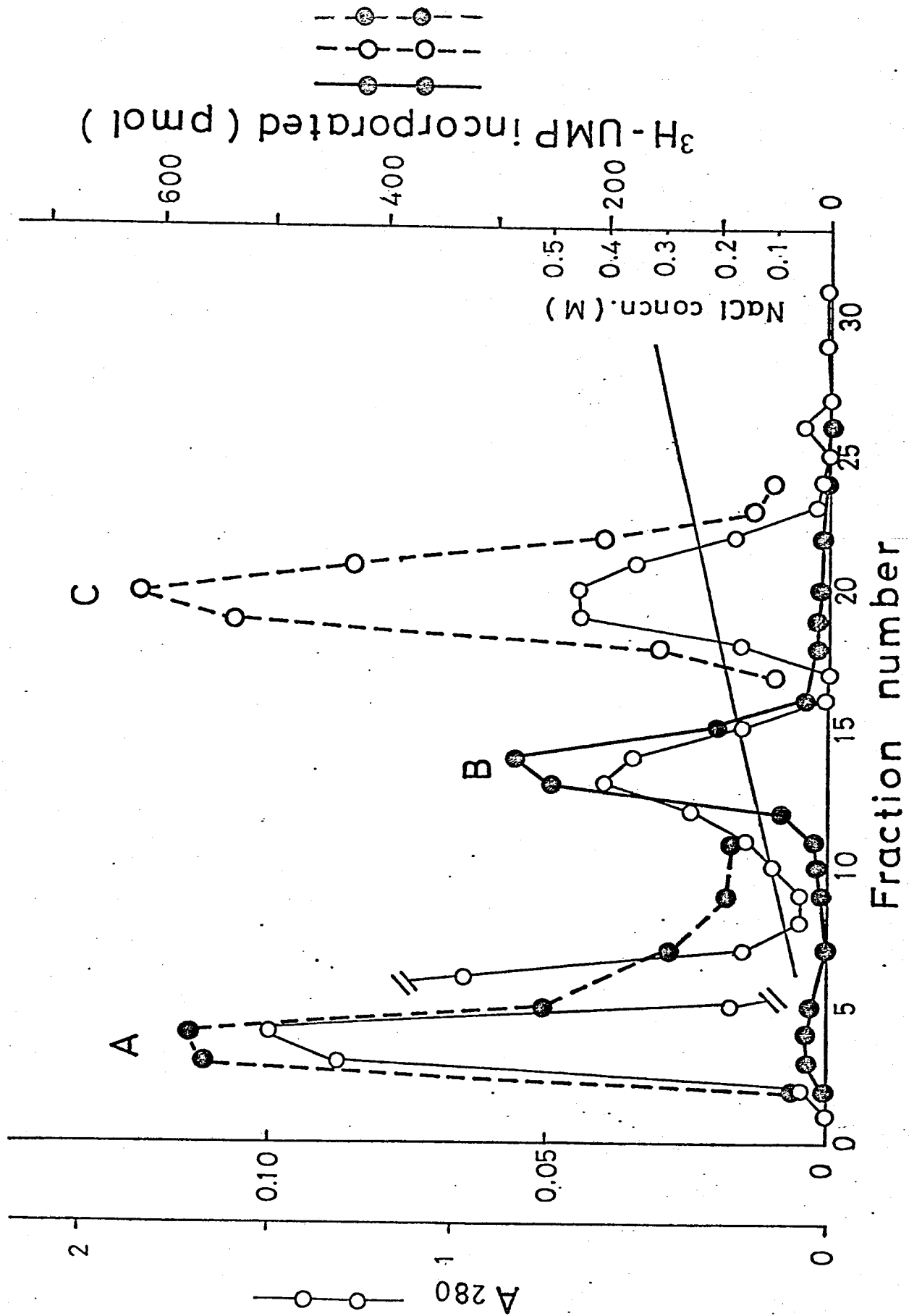


図 4. リン酸セルロースカラムクロマトグラフ



#### 図4の説明

<材料と方法>に従って、クロマトグラフィーを行なった。  
溶出に用いた緩衝液の全溶量はカラム溶積の  
10倍である。

各分画  $10\mu\text{l}$  (—●—), 分画19と20の混液  $20\mu\text{l}$   
+ 各分画  $20\mu\text{l}$  (--●--), 或いは 分画3と4の混液  
 $20\mu\text{l}$  + 各分画  $20\mu\text{l}$  (--○--) の酵素活性と図2  
に述べた方法で測定した。

二種類の分画を混ぜて酵素活性を測定する時には、あらかじめ図5に述べた方法に従い1時間静置して、GAレゾリカーゼの再構成を行なった。

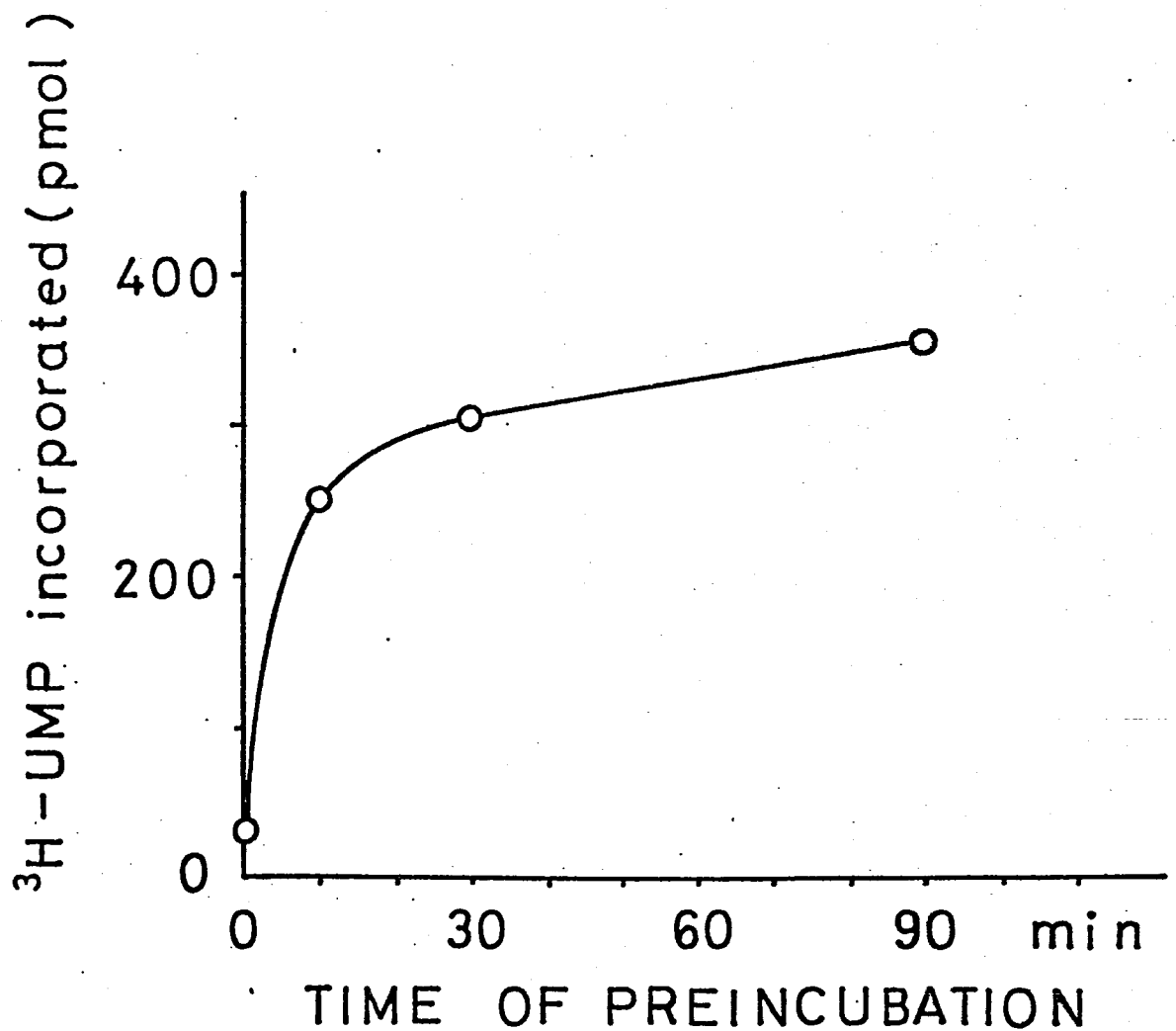


図5. GAL7オリカーで再構成の時間経過

0.125M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B 中で Fr. A タンパク 30 $\mu$ g と Fr. C タンパク 1 $\mu$ g を混ぜ (全溶量 40 $\mu$ l)、横軸に示した時間 0 で静置した後、5 $\mu$ g GARNA を含む標準反応液に加え、〈材料と方法〉に従って GAL7オリカーで活性を測定した。Fr. A タンパクと Fr. C タンパクを混ぜ合わせることなく、それぞれ別々に反応液に加えた時の活性を 0 分の値とした。

## B. GAL7オリカーゼのサブユニット構造

Fr. Bを SDS-ホリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した結果から、GAL7オリカーゼはほぼ当量比の4種の異なる分子量のポリペプチドから成っていることがわかる。それぞれを分子量の大きい方からサブユニットI, II, III, IVと命名した(図6-a)。また図4でFr. Bの活性を示す曲線と280nmの紫外線吸収曲線とにそれが認められる。その理由は、イオン強度の低い方で溶出する画分ほどサブユニットI, III, IVの含有量がサブユニットIIに対し過剰になっているためである。一方、2つの相補的な成分の内、Fr. CはサブユニットIとIIのみを含んでいる(図6-b)。サブユニットIは、後述するように単独ではリン酸セルロースカラムに吸着することはできない酸性タンパクのS1であることが同定されたこと、またグリセロール密度勾配遠心によりサブユニットIとIIは共に同じ位置に沈降することとを考えると、この二つのサブユニットは複合体を形成していると考えられる。結果は示さないが、Fr. Aには多量の夾雑タンパクが存在しているものの、予想通りサブユニットIIIとIVに対応するポリペプチドを含んでいた。

GAL7オリカーゼのサブユニットを、SP或いはQ $\beta$ レフィナーゼ

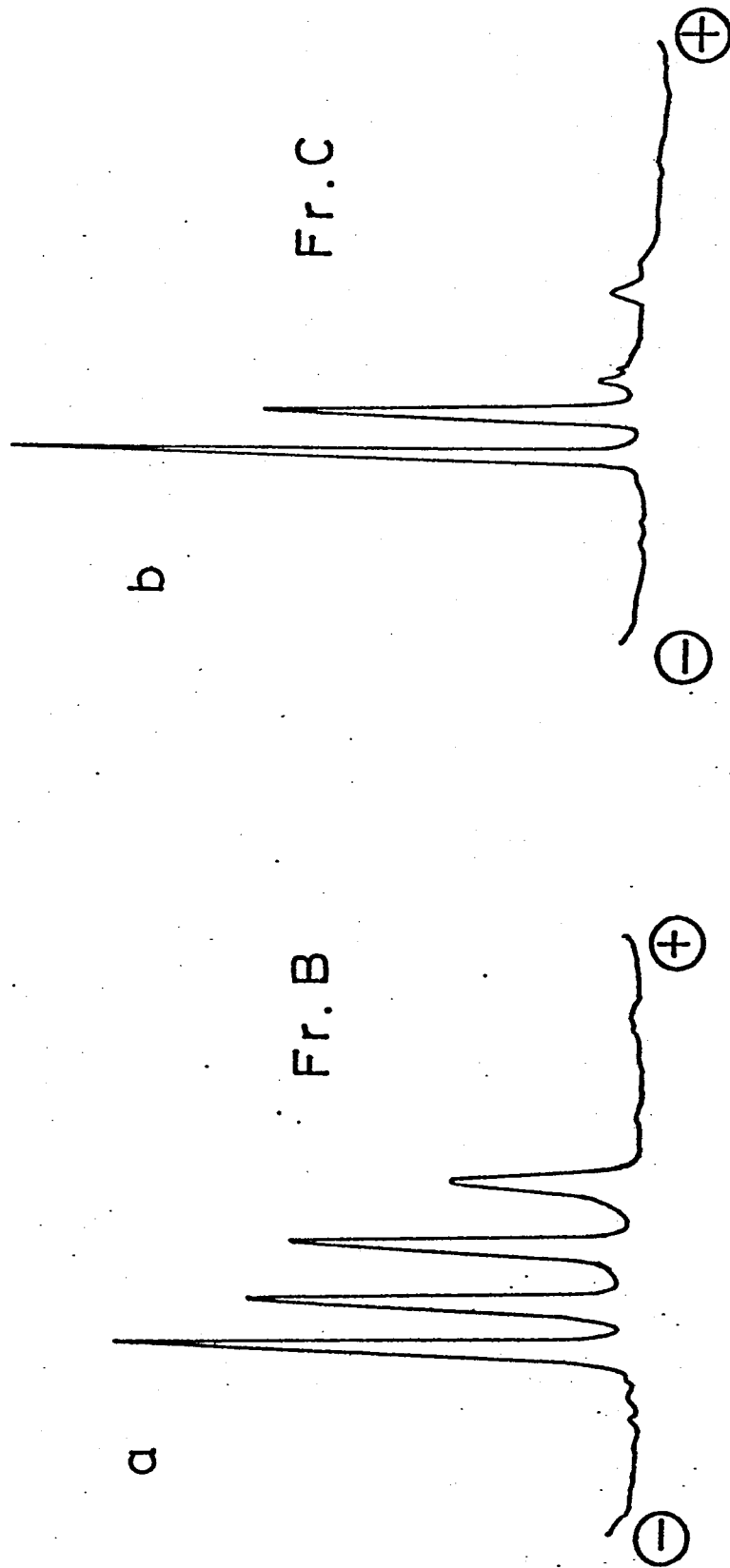


図6. SDS ホリアクリルアミド電気泳動による サブユニット構造の分析

Fr. B タンパク 3 $\mu$ g (a), 或いは Fr. C タンパク 2 $\mu$ g (b) を、<材料と方法>に従って、電気泳動を行なった。泳動条件は 29mA/cm<sup>2</sup>, 3.5時間である。泳動後、ゲルを、1 $\mu$ 当り 2.5g 7マシール、46ml 水酢酸、277ml  $\times$ 91-1L と含む水溶液中に浸し、37 $^{\circ}$ で1時間染色する。染色後、1 $\mu$ 当り 75ml 酢酸、50ml  $\times$ 91-1L を含む水溶液中で脱色した後、7 $\mu$ シトリン-1を行なった。図中泳動方向は左から右である。

(この2つのレプリカーゼは同一のサブユニット構造をもっている<sup>22)</sup>)のそれと比較したところ、サブユニット II のみが明らかに異なっていた。即ち、SP (Q $\beta$ )レプリカーゼのそれは分子量69,000であるのに対し、GALレプリカーゼのそれは約60,000であった。しかし、他の3つのサブユニットについては、それぞれ対応した等しい分子量であった(図7)。

Q $\beta$ レプリカーゼのサブユニットは、IIのみがQ $\beta$ ファージの遺伝子にコードされたタンパクであり<sup>23,24)</sup>、サブユニット I, III, IVはそれぞれ宿主大腸菌由来のリボソームタンパク S1<sup>25)</sup>、タンパク合成伸長因子 EF-Tu 及び EF-Ts<sup>26)</sup> であることが知られている。従って、GALレプリカーゼのサブユニット I, III, IVはQ $\beta$ レプリカーゼのそれらと分子量自々に区別できないことからやはり S1, EF-Tu, EF-Ts であることが強く示唆される。この考えは、次に示す事実からさらに確かめることができた。

1. GALレプリカーゼは S1, EF-Tu 或いは EF-Ts に対する抗体と反応し、沈降線と形成する。一方、サブユニット I・II複合体は、EF-Tu 及び EF-Ts に対する抗体とは反応せず、S1に対する抗体とのみ反応し、沈降線を形成する(図8)。2. EF-Tu と EF-Ts は、Fr.A に含まれているサブユニット III と IV の活性と同様に、Fr.B と混ぜ合わせることにより GALレプリカーゼ活性を回復することができた(表2)。

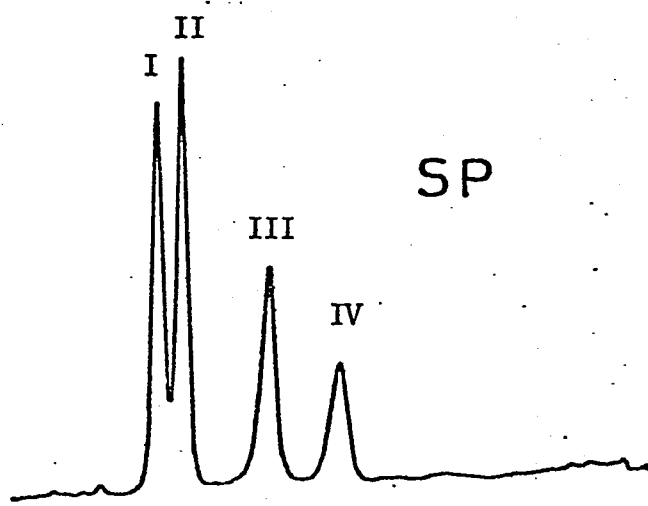
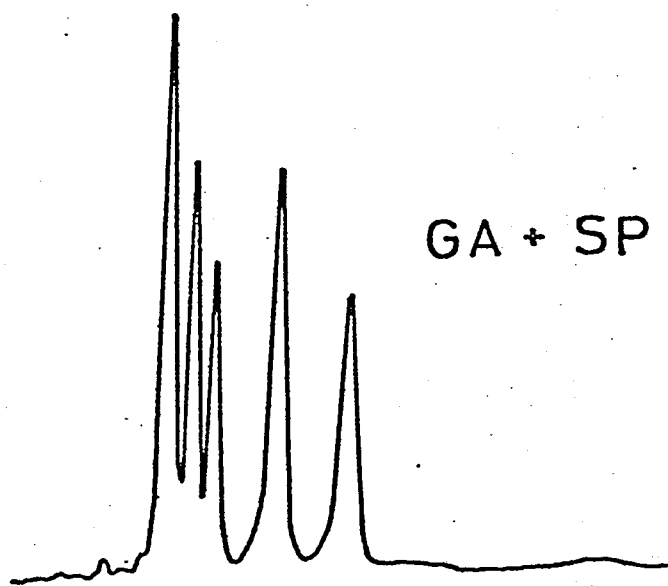
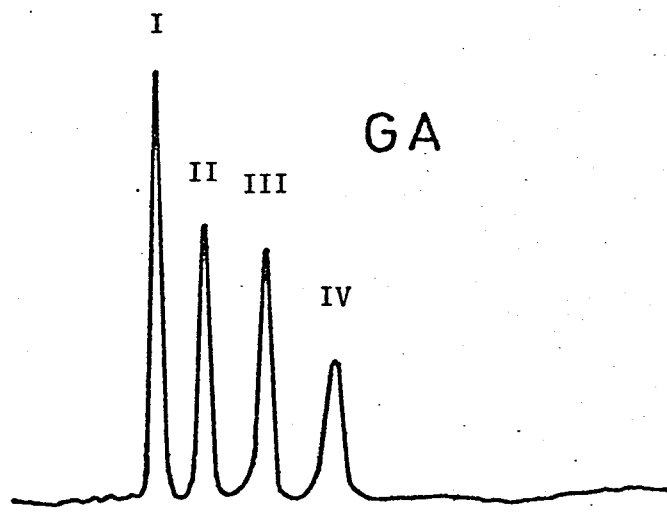


図7. SPレオリカーゼの  
 サブユニットとの比較

GAレオリカーゼ 3 $\mu$ g, SP  
 レオリカーゼ 3 $\mu$ g を単独で  
 あるいは混せて、図6に述  
 べた方法で電気泳動及  
 ビデンストメリーを行なった。  
 SPレオリカーゼは当研究  
 室で調製した。<sup>22)</sup>

SPレオリカーゼのサブユニ  
 ットの分子量は、それぞれ、  
 I, 75,000; II, 69,000;  
 III, 47,000; IV, 33,000と  
 ある。<sup>22)</sup>

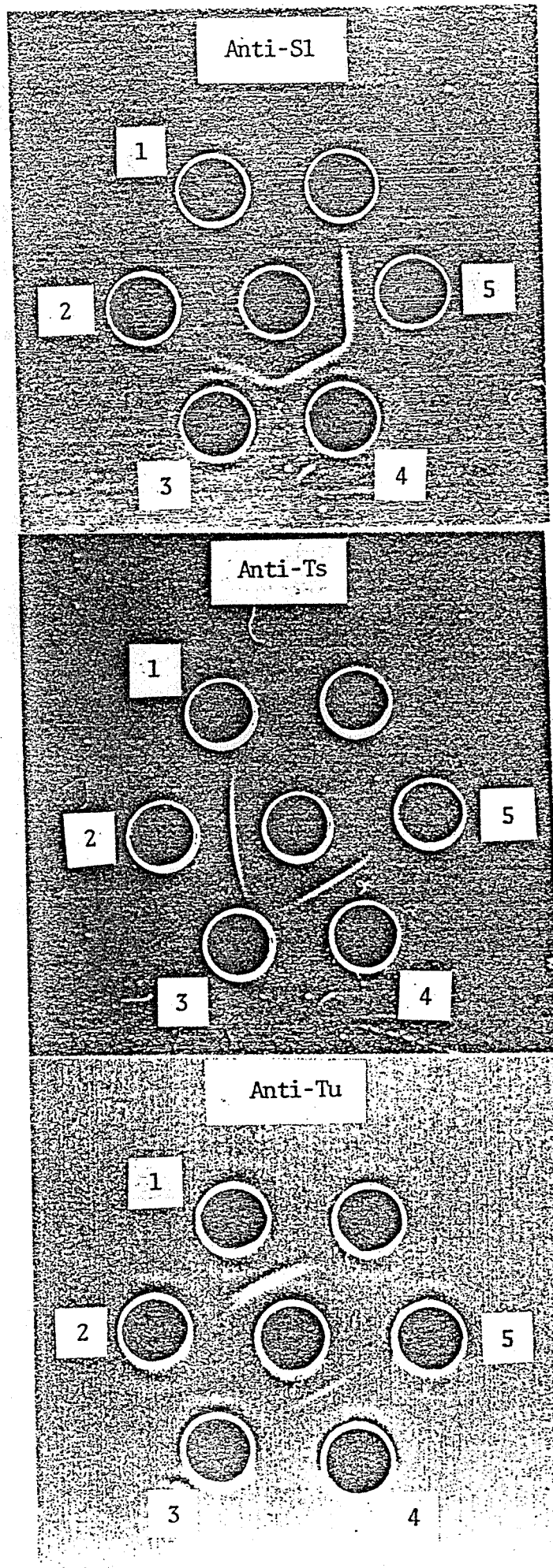


図8. 免疫学的な交叉反応

真中のウエルには、それぞれこの  
 図中に示した抗体を入れた。  
 周りのウエルには、1 EF-Tu  
 1.5 $\mu$ g, 2 EF-Ts 1.5 $\mu$ g, 3  
 SI 1.5 $\mu$ g, 4 GAL7<sup>+</sup>リカーゼ  
 10 $\mu$ g, 5 GAL7<sup>+</sup>リカーゼの  
 サブユニットI・II複合体(F<sub>1</sub>C)  
 10 $\mu$ g, が入っている。  
 反応は37°で36時間行  
 った。

combination	[ <sup>3</sup> H]UMP incorporated
I·II	11 pmoI
I·II + Fr.A	144
I·II + EF·Tu	7
I·II + EF·Ts	12
I·II + EF·Tu + EF·Ts	131
EF·Tu + EF·Ts	2

表2. GALポリリカーゼの再構成

0.2M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 (40 $\mu$ l) 中で、サブユニット I-II 複合体 (Fr.C) 0.5 $\mu$ g, Fr.A タンパク 20 $\mu$ g, EF-Tu 1 $\mu$ g, EF-Ts 1 $\mu$ g を適当な組み合わせで混ぜ、0°で25分間静置した後、GALポリリカーゼの活性を、5 $\mu$ g GA RNA を鋳型として、〈材料と手法〉に従って測定した。精製した EF-Tu, EF-Ts, S1 は 東京大学医科学研究所の上代淑人博士から提供していただいた。



## C. GALポリカーゼの諸性質

### a) 反応の要求性及び阻害剤の効果

GALポリカーゼの反応は、他の核酸合成酵素と同じくマグネシウムイオンを要求し、その至適濃度は6~10mMである。マンガンイオンも反応を促進することができるが至適濃度下(1~2mM)でも、マグネシウムの場合に比し10~20%の合成を促進するのみである。

表3には step II 及び step V の標品を用いて反応の要求性及び阻害剤の効果を検討した結果を要約した。反応液から GA-RNA 或いは4種の基質のうち1種を除いた場合、RNA合成は著しく抑制される。これらの事実は、ヘテロポリマーである<sup>27)</sup> GA RNA が鋳型として用いられていることを示唆するものである。さらに RNase A 或いは RNase T<sub>1</sub> に対して著しく感受性であるのに対し、DNase I は何ら阻害効果を示さないことは、この RNA 合成反応が鋳型 RNA に依存していることを示唆している。また、GALポリカーゼによる反応は、大腸菌 RNA ポリメラーゼの特異的な阻害剤であることが知られているリファンピシン<sup>28)</sup> に対して高い抵抗性を示す。

### b) 鋳型特異性

GALポリカーゼがどのような様な鋳型特異性を示すかを調べるために、

System	Step II	Step V((Fr.B)
complete	254	293 pmol
-RNA	0	12
-MgCl <sub>2</sub>	8	19
-GTP	13	9
-CTP	36	48
-ATP	21	-
-UTP	-	13
+rifampicin	261	314
+DNase I	260	302
+RNase A	3	9
+RNase T <sub>1</sub>	-	26

表3 反応の要求性および阻害剤の効果

step II タンパク 75 $\mu$ g, GA RNA 10 $\mu$ g, 或いは  
 step V タンパク 1 $\mu$ g, GA RNA 5 $\mu$ g を含む  
 標準反応液を完全系とし、これに対して1成分  
 を取り除いた一系、及び他の成分を加えた系  
 での [<sup>3</sup>H]UMP 取り込み量を <材料と方法> に  
 従って測定した。

添加量は リファンピリン 3 $\mu$ g, DNase I 10 $\mu$ g,  
 RNase A 10 $\mu$ g, RNase T<sub>1</sub> 2 $\mu$ g である。

種々の RNA の鋳型としての活性を測定した。タバコモザイクウイルス RNA, 大腸菌 RNA, ラット肝 RNA は全く鋳型活性を示さなかった。種々のファージ RNA については結果を図 9 に示した。ファージ RNA の鋳型活性には次の 4 つの顕著な点が観察された。1. GA と同じグループ II に属するファージ SD の RNA は、GA RNA と同程度の活性を示す。2. 現在迄に調べた限り、第 I グループに属するファージ f2, MS2 (図 9), R17 及び JP500 の RNA は全て、第 II グループファージの RNA に匹敵する鋳型活性をもっている。この観察と関連して、第 I グループと第 II グループのファージの間には血清学的に近縁性が見られることは注目し得る。3. 第 III グループに属するファージの RNA は有意な鋳型活性を示さない。さらに、 $\phi\beta$  RNA は、 $\phi\beta$  リンカーセがこの RNA を鋳型にしてマイナス鎖を合成する時に必須な因子である HTI<sup>29)</sup> を添加しても、GA リンカーセに対しては不活性なままである。4. 第 IV グループに属するファージの RNA は中間的な活性を示す。—— これらの結果から GA リンカーセの示す鋳型特異性は当初の予想通り、 $\phi\beta$  リンカーセのそれとは著しく異なっていることがわかる。さらに、これらの結果は Haruna らによって報告されているファージ RNA のグループ特異

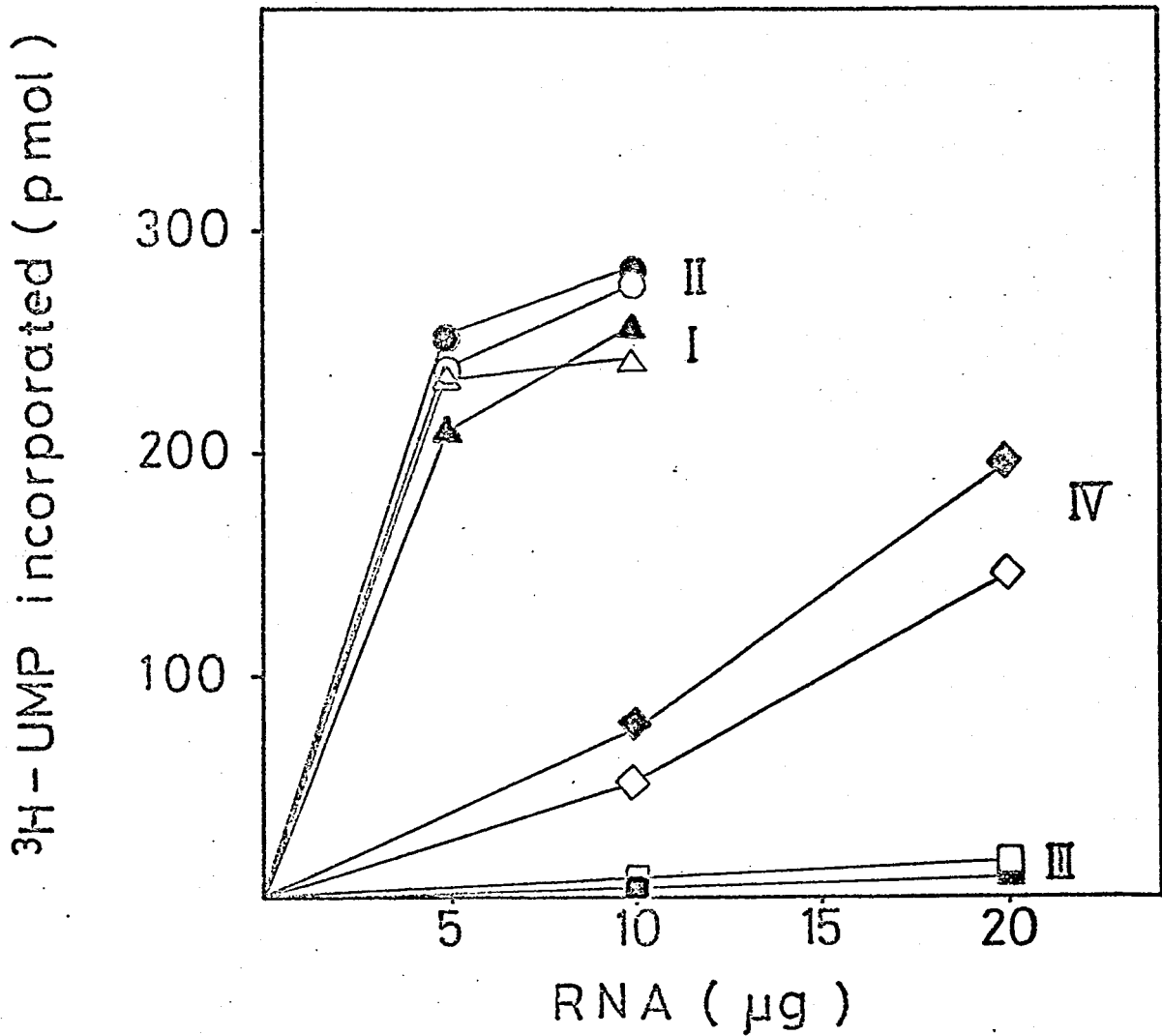


図9. 種々のファージRNAのGAL7オリカセに対する鋳型活性

それぞれのケル-7°に属する代表的なファージを2種類ずつ選  
び、それらのRNAを横軸に示した量、標準反応液(GAL7オリカ  
セは、step II タンパク 75μg)に加え、30° 20分間の反応後、(材  
料と方法)に従って[3H]UMPの取り込み量を測定した。

用いたファージRNAは、第Iケル-7° f2(Δ), MS2(▲), 第II  
ケル-7° GA(○), SD(●), 第IIIケル-7° Qβ(□), ST(■), 第IV  
ケル-7° FI(◇), SP(◆), の各RNAである。

性<sup>17)</sup>を確認すると共に、現在確立されている RNA マージの分類が GAL7ポリカーゼに対する マージ RNA の持つ 鋳型活性を指標にした時の分類と基本的に一致していることを示した。

### C) GAL7ポリカーゼによる RNA 合成反応のその他の側面

GAL7ポリカーゼによる RNA 合成反応は早期に停止してしまう(図10)。反応の早期停止は部分精製の酵素及び均一な段階に致るまで精製された酵素を用いても観察されることから、この原因は GAL7ポリカーゼによる反応その自身に帰せられるべきである。また図11は、GAL7ポリカーゼ量と鋳型 GARNA 量との関係を示したものであるが、両者の間には定量的な関係が存在する。GARNA の GAL7ポリカーゼに対する飽和量は重量比にして約3であり、合成量は鋳型 RNA に対し約15%である。これらの値は、ポリカーゼの精製段階また鋳型 RNA の保存状態により変動する。

また反応は塩の添加により著しく阻害される。イオン強度0.1では、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウムどちらの塩によっても70~80%の阻害を受ける。

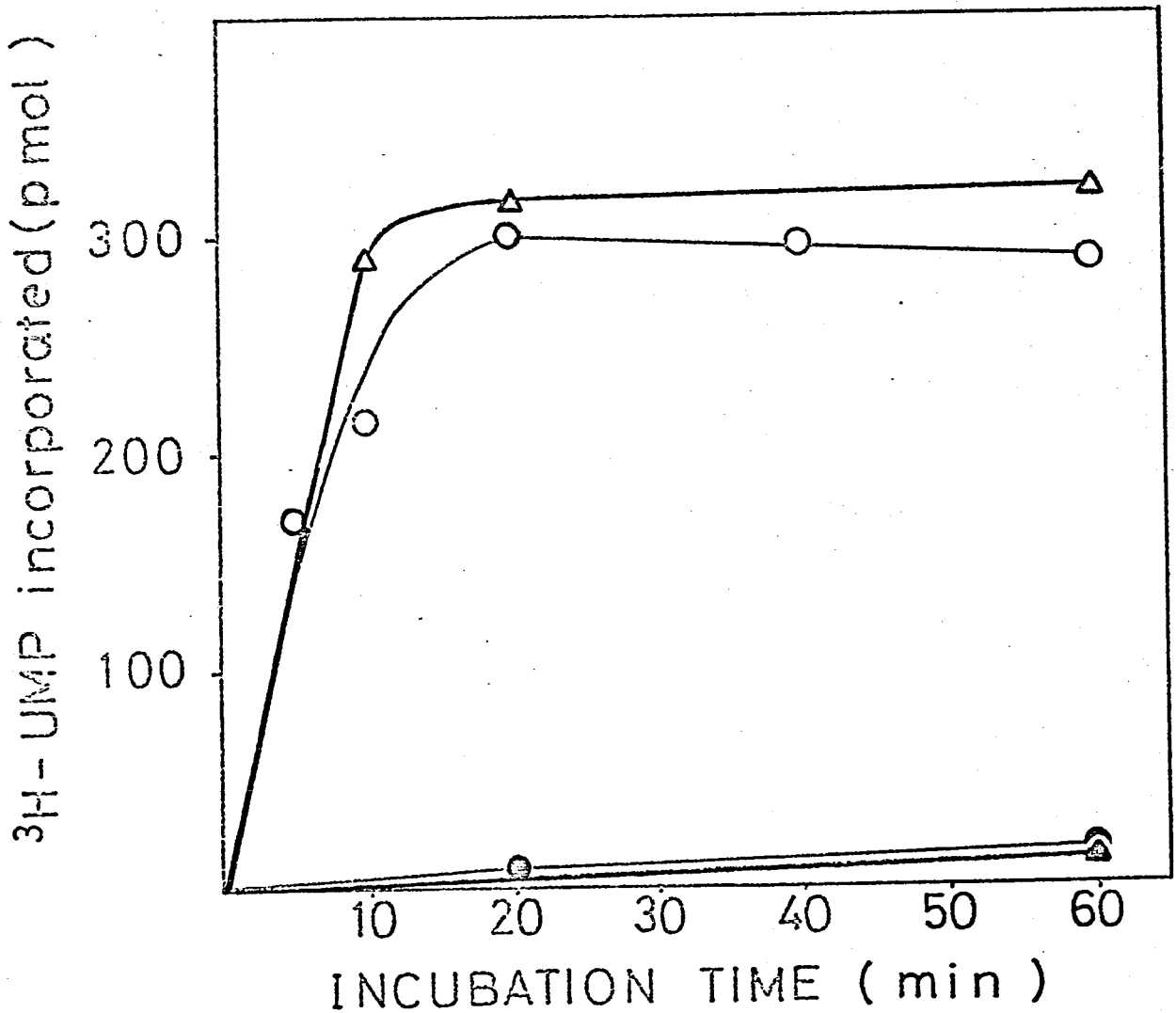


図10. RNA合成反応の時間経過

RNA合成の時間経過を、Step II 及び step V の酵素標品を用いて、鋳型 RNA の有無の条件下で調べた。

各標準反応溶液は、step II が  $75 \mu\text{g}$  或いは step V が  $0.75 \mu\text{g}$  を含む。鋳型 GA RNA を加える時は、step II 酵素の場合  $10 \mu\text{g}$ 、step V 酵素の場合は  $5 \mu\text{g}$  である。

横軸に示した時間、 $30^\circ$  で反応させた後、〈材料と方法〉に従って  $[^3\text{H}]$  UMP の取り込み量を測定した。step II, +RNA  $\circ$ —, -RNA  $\bullet$ —; step V, +RNA  $\triangle$ —, -RNA  $\blacktriangle$ —。

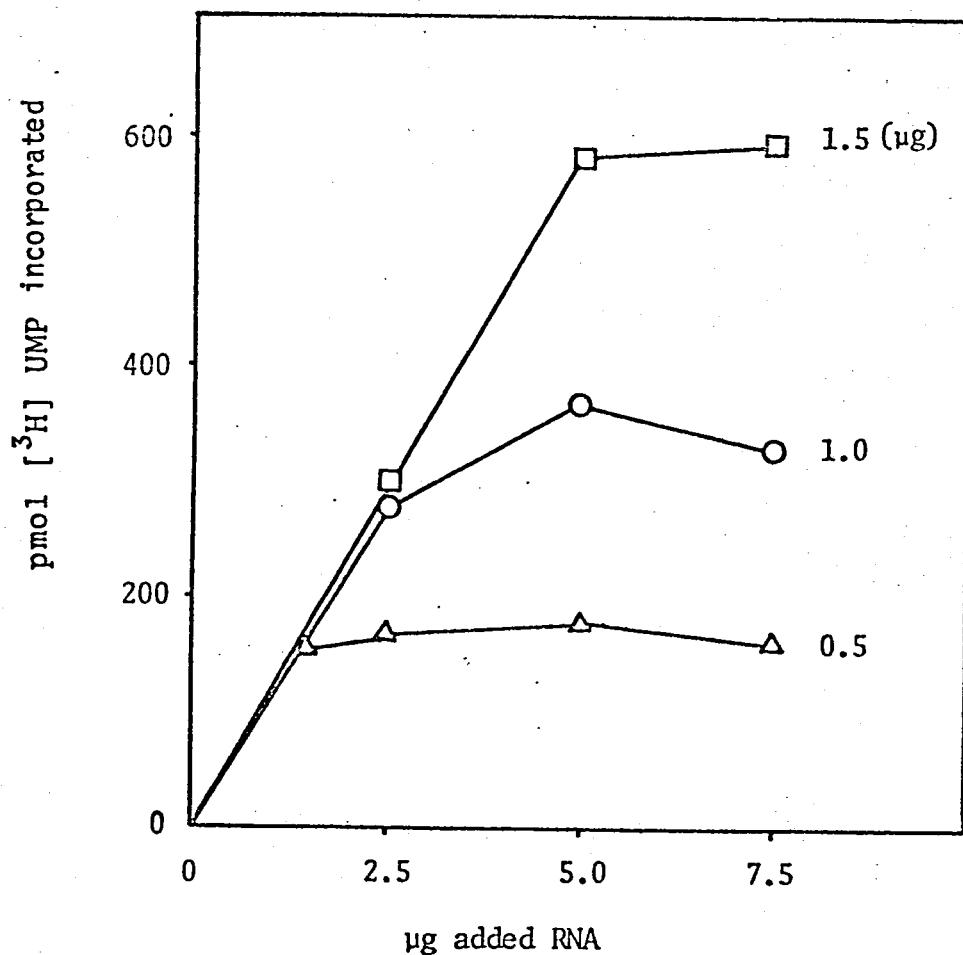


図11. 酵素量と 鋳型RNA量との関係

横軸に示したGARN量と、図中に示した量のGAL7011カーゼ(step V)を含む標準反応液を30° 20分間反応させた後、<材料と方法>に従って、<sup>3</sup>H]UMPの取り込み量と測定した。

## D. 反応産物の解析

### a) 反応産物の沈降速度の解析

反応産物の解析は、反応の性質を知る上で欠かせないものである。

図12は、 $[^{14}\text{C}]$ で標識した反応産物を、 $[^3\text{H}]$ で標識したファージRNAをマーカーとしてショ糖密度勾配遠心を行なった時の沈降プロファイルである。GARNAを鋳型として用いた場合(図12-a)もf2 RNAを鋳型として用いた場合(図12-c)も、鋳型として用いたそれぞれのRNAと同じ沈降速度をもつRNAが合成されていることがわかる。さらに図12-bは沈降定数が23SであるGARNAを鋳型として合成された産物にマーカーとして、26Sのf2-RNAを加え遠心した結果を示したものであるが、GARNAと沈降速度が一致していた $\text{E}0-7$ がf2 RNAの位置とは明らかにずれている。これらのことから、GAL70リカーゼでは鋳型として用いたRNAと同じ沈降速度をもつRNAを忠実に合成していることがわかる。

その他に、どちらのRNAを鋳型として用いた場合でも鋳型RNAに対応した $\text{E}0-7$ 以外にそれより遅く沈降するもう一つの $\text{E}0-7$ が認められる(図12)。この物質は大腸菌リボソーム16S RNAと4Sの転移RNAをマーカーとして加えて遠心した結果から算



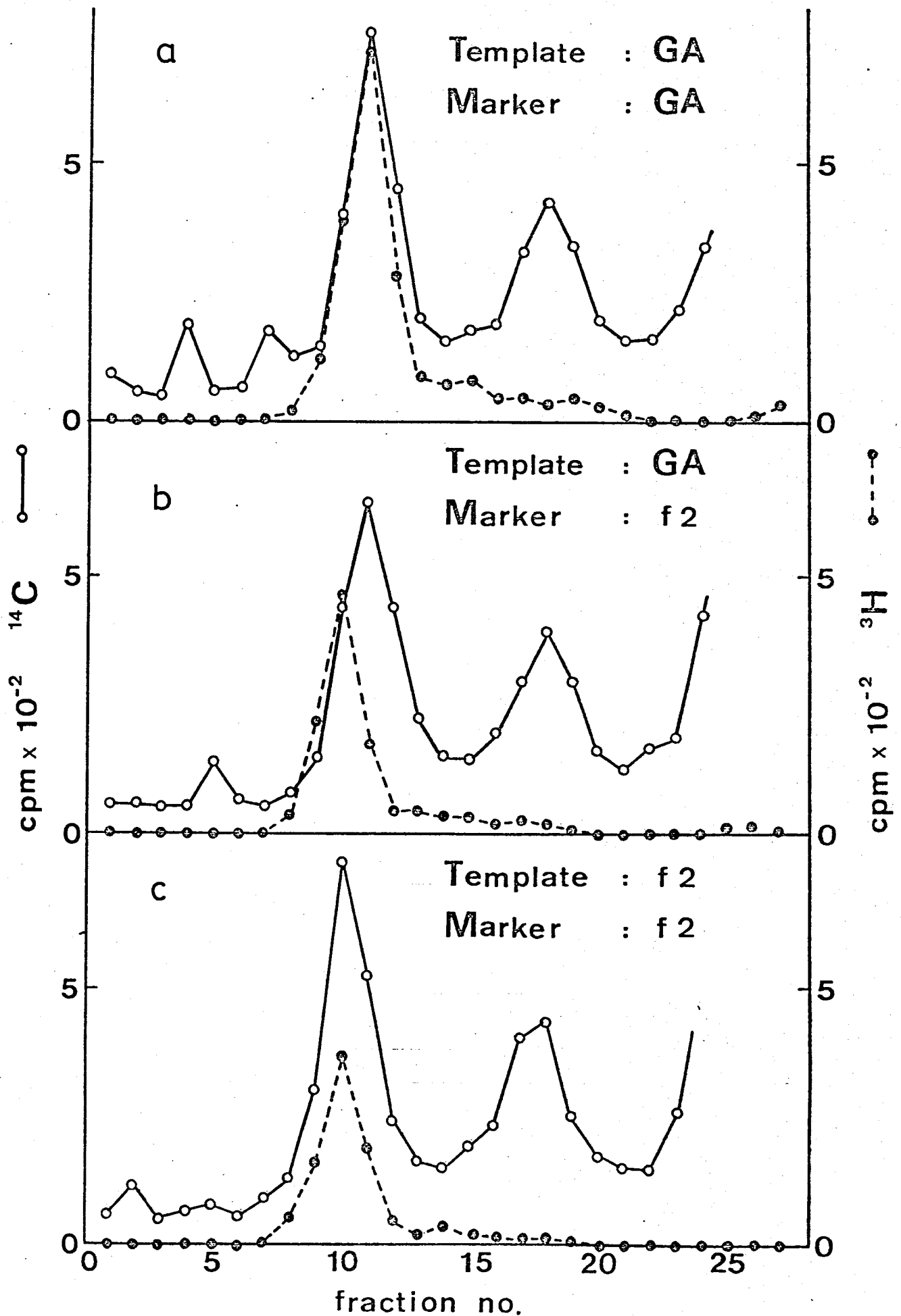


図12. GALブリアリカーゼによる合成産物のショ糖密度勾配遠心による分析

#### 図 12 の説明

step III タンパク 20 $\mu$ g 及び 鈣型 RNA 15 $\mu$ g を含む反応液 (標識基質 [ $^{14}$ C]ATP; 比活性 7.5mCi/mol 以外は標準反応液と同じもの) を 30° 20分間反応させた後、氷冷する。反応液のマグネシウムに対し過剰になるよう、0.5M EDTA を 5 $\mu$ l (最終濃度 10mM) 加える。さらに [ $^3$ H] で標識したマーカー-RNA を加えた後、〈材料と方法〉に従って遠心し、分画した。遠心を向は図中、右から左である。図中、遠心管上部の放射活性は、未反応基質が充分抜けていないためのものである。

反応に用いた鈣型 RNA および遠心時のマーカー-RNA は図中に記した。

出して、沈降定数は約12Sである。この物質は、その沈降位置から Hofschneiderらによって報告されている<sup>30)</sup> 二重鎖RNAであることが推定される。このことについては次のb)項で詳述する。

#### b) 反応産物の塩基配列構造の決定

反応産物の中に、鈣型RNAと同じ沈降速度をもつRNAが含まれていることは判明したが、次にそれがプラス鎖かマイナス鎖かを知るために、アニリンクによる二重鎖形成及びその熱変性を行なう後、ショ糖密度勾配遠心による分析を行なった。まず、GA RNAを鈣型として合成された産物をショ糖密度勾配遠心し、23S分画を身めた。この時の反応では、10 $\mu$ gのGA RNAを鈣型として加え、合成量は0.5 $\mu$ gであったから、得られた23S分画には[<sup>14</sup>C]で標識された産物に対し、20倍以上の非標識GA RNAが含まれている。次にこの標品を単独でアニリンクした後、再遠心した。この方法では、反応産物のうち、マイナス鎖は過剰の非標識鈣型RNA(プラス鎖)と二重鎖を形成するため、[<sup>14</sup>C]は12Sの位置に沈降するようになる。一方、反応産物に含まれているプラス鎖は、この二重鎖形成に殆んど関与しないため、その[<sup>14</sup>C]は元の23Sの位置に沈降するはずである。結果は図13-aに示した様に、アニリンク処理後23S位置のピークは消

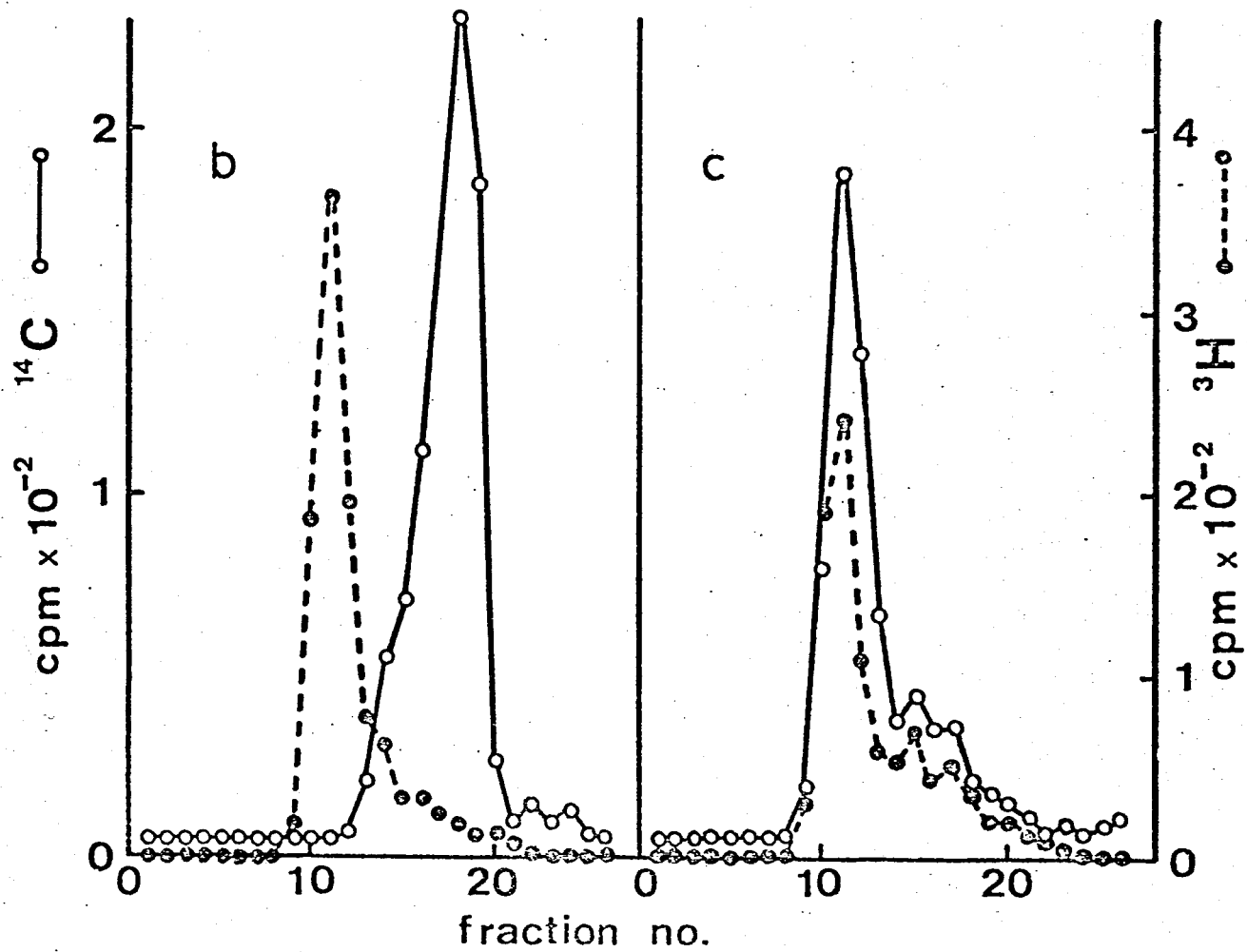
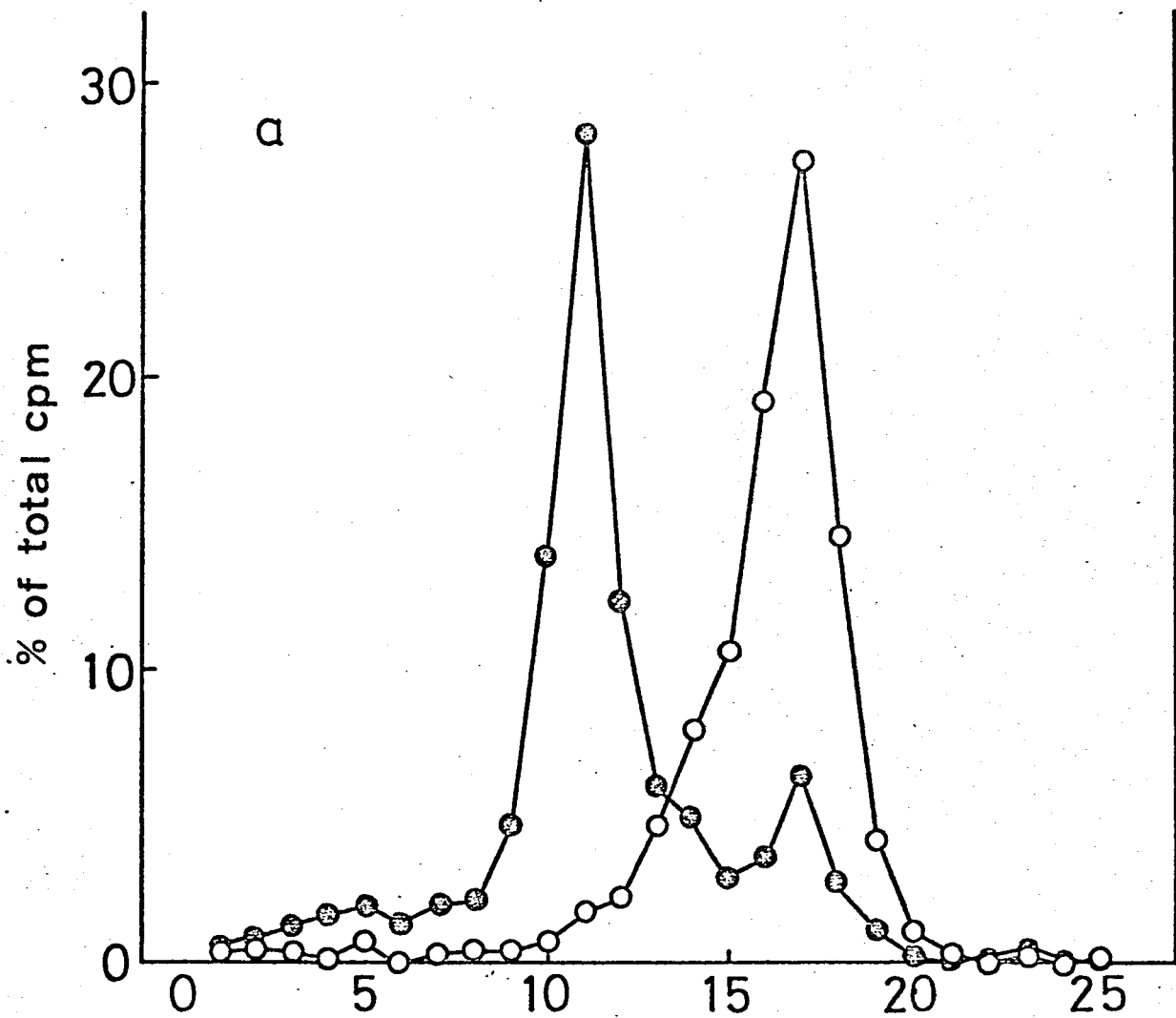


図13. 産物23S RNAの解析

## 図13の説明

a. GA RNAを鋳型にして合成された産物のうち、23S RNAを単離するため、図12で述べたのと同じ条件の反応、遠心を行なった。ただし、ここでは反応液量を2倍にしたこと、遠心時にマーカーRNAを加えなかったことが異なっている。得られた23S分画に、キャリアとして大腸菌RNAを加え(最終濃度100 $\mu$ g/ml)した後、イタール沈澱<sup>19)</sup>によって濃縮した。標品を二分し、一方はそのまゝ(—●—)、他方はアニリングを行なった後(—○—)、再遠心した。

bとc. GA RNAを鋳型として合成された23S RNAをアニリングし、遠心を行なって12S RNA分画を集めた(反応の条件、方法は全てaと同じである)。この分画に大腸菌RNAとキャリアとして加え(最終濃度100 $\mu$ g/ml)、イタール沈澱によって濃縮した。[<sup>3</sup>H]GA RNAを加えた後、2等分し一方はそのまゝ(b)、他方は<材料と方法>に従って熱処理を行なった後(c)、再遠心した。

遠心方向は、全て図中右から左である。

矢し、殆んど全ての放射活性は 12S 位置に移行している。この沈降位置の移行が "アニーリング" 処理の間に行った RNA 鎖の切断によるものではないことを示すためにさらに 12S 分画を集め熱変性を行なった後、再遠心した。図 13-C に示されている様に、この処理によって 12S の位置にあった放射活性の大部分が 23S 付近に戻っている。以上のことから、GA RNA を銚型にして合成された 23S RNA は殆んど全てマイトス鎖であると断定される。

次に、もう一つの産物である 12S RNA について同様の解析を行なった。まず、この RNA が二重鎖であることを確認するために、熱変性を行なった。その結果 (図 14-b)、大部分の放射活性はより速く沈降する様になったことから、12S RNA の全てとまでは言えなくとも、大部分は二重鎖であったことが結論される。さらに、この分画に含まれる RNA の著しい特徴は、合成された RNA の長さが不均一であるということである。そして特に注目すべきことは、GA RNA の全長に相当する 23S に放射活性のピークがみられないことである。

これから不均一な長さを示す RNA にマイトス鎖の塩基配列構造をもったものが含まれているのかどうかを調べるために過剰量の GA RNA を加えた後、"アニーリング" を行ない、再遠心した結果を 図 14-c に示した。

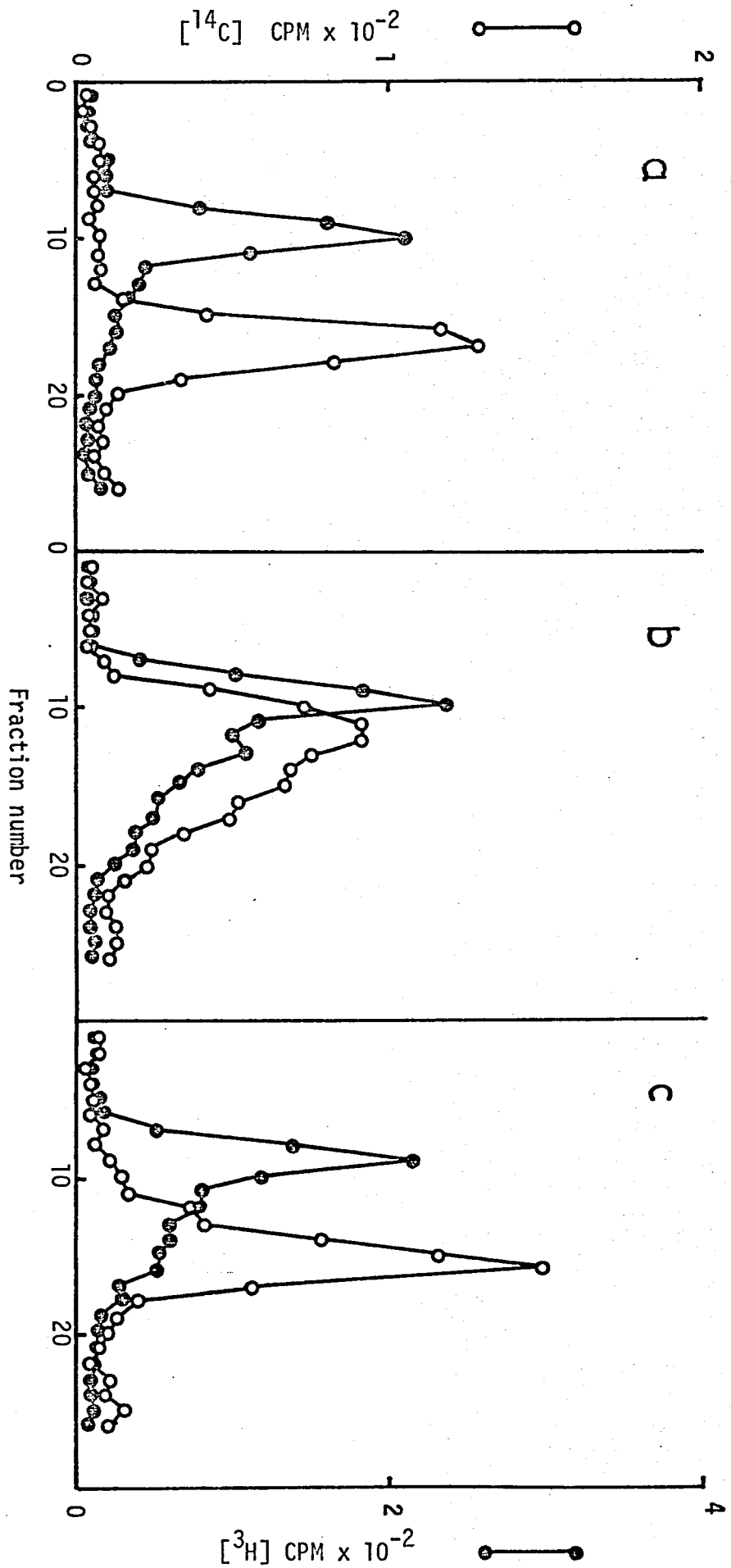


図14. 産物12S RNAの解分析

図13 a の述べたのと同一方法で、GA RNAを解型とした反応産物である12S RNAを単離、濃縮した。[3H] GA RNAを加えた後、30分しその中に、そのうち(a)、熱変性を行な、12後(b)、或いは熱変性を行な、さらに10μg GA RNAを加えてアッセイを行な、それから(c)。〈材料と方法〉に従って30糖蜜酸勾配法を行な、た。蓄心法は図中右から左である。

23S 分画と同様、この処理によって放射活性は殆んど全て、二重鎖の位置に移行したことから、12S 分画に含まれる産物の塩基配列も、大部分のものがマイナス鎖のそれであると考えられる。

f2 RNA を鋳型にした時の産物も、同様の解析を行なった結果 (図15) から、少なくともプラス鎖を含んでいないことが示された。

以上の結果を総合して、GAL7ポリカーゼンによる反応は、プラス鎖の合成段階にまで致っていないことが結論される。



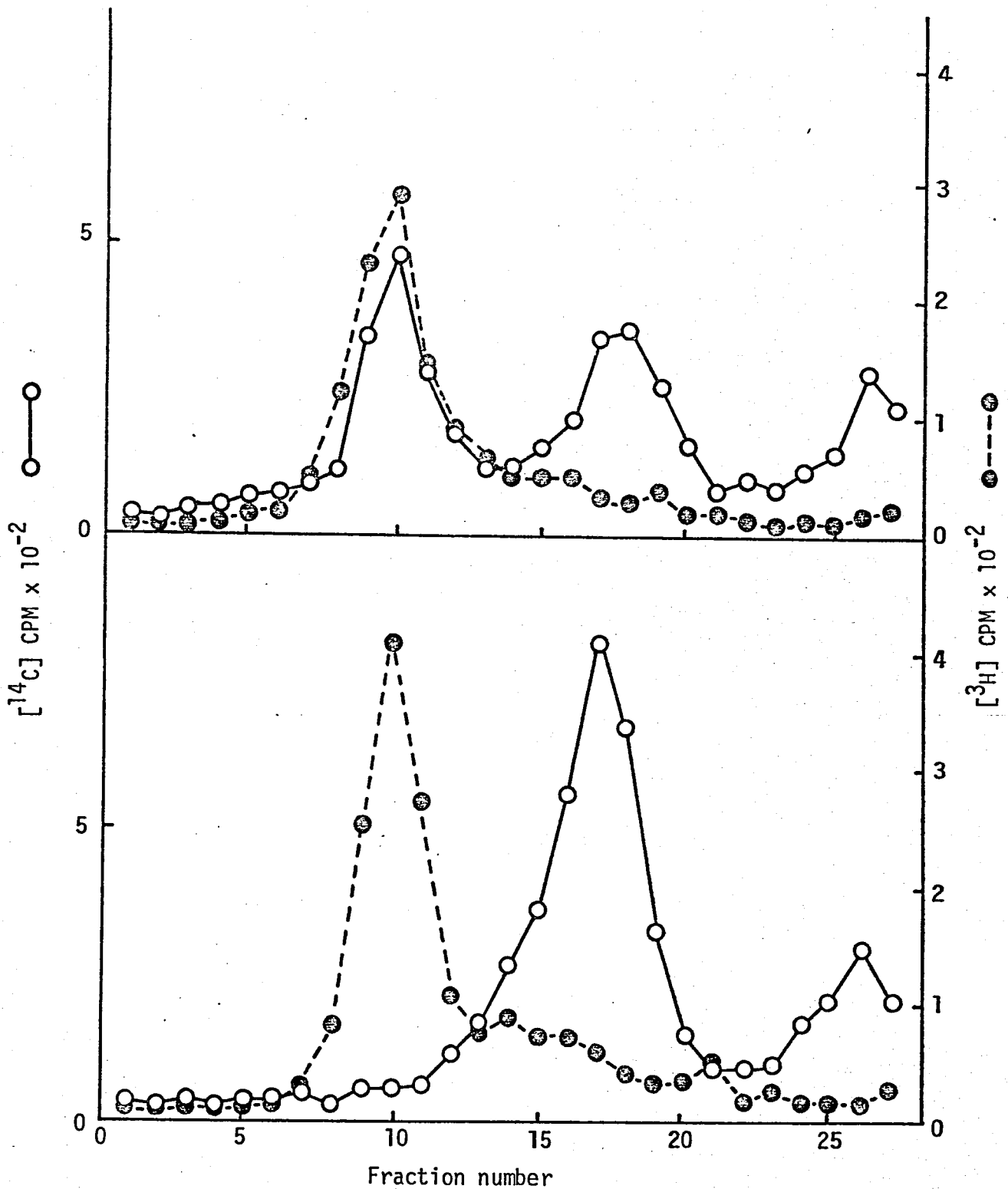


図15. +2 RNA依存反応産物の解析

step III タンハ<sup>7</sup> 40 $\mu\text{g}$ , +2 RNA 15 $\mu\text{g}$  を含む反応液 (図12で述べたものと同じ) を 30° 20分間反応させた後、氷冷し、0.5M EDTAを5 $\mu\text{l}$  加えた。標品を2等分し、一方はそのまま (上図)、他方は 60° 5分間処理後 (下図)、〈材料と方法〉に従って 30% 蔗糖密度勾配遠心を行なった。マーカー- $[^3\text{H}]$  +2 RNAは遠心直前に加えた。遠心方向は図中、右から左である。

## 考 察

第Ⅱグループに属するファージGAの感染菌から、Harunaと Spiegelmanによって確立された方法に改変を加えて、新しいRNAレプリカーゼを単離することができた。新しい方法が 原法と本質的に異なる点は、硫酸プロタミンの使用濃度が約2倍高いことである。続いて、2回目のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー、グリセロール濃度勾配遠心、リン酸セルロースカラムクロマトグラフィーにより、GAレプリカーゼは均一な段階にまで精製された。SDSホリアクリルアミドゲル電気泳動による分析から GAレプリカーゼはほぼ当量比の4種の異なるサブユニットから成っていることが明らかとなった。他のレプリカーゼのサブユニットとの比較から、ファージに特異的なサブユニットⅡは、GAと Q $\beta$  (SP) のレプリカーゼで明らかなる差異が認められた。GAのサブユニットⅡの分子量は約60,000であり、Q $\beta$  或いは SPの 69,000に比し、かなり小さい。他のサブユニットⅠ,Ⅲ,Ⅳは分子量的に区別できないことを合わせて、免疫学的交叉反応、再構成実験の結果から Q $\beta$  レプリカーゼのそれらと同じく それぞれリボソームタンパク S1, タンパク伸長因子 EF-Tu, EF-Ts であることが明らかとなった。Fedoroffと Zinderは、+2レプリカーゼの宿主由来のサブユニットⅠ,Ⅲ,Ⅳは Q $\beta$ レ

ポリカーゼのそれらと電気泳動度が一致することを報告している。<sup>18)</sup>従って、タンパク合成系因子である S1, EF-Tu, EF-Ts が RNAポリカーゼに組み込まれているということは普遍的な事実であると思われる。

GALポリカーゼのサブユニット I・II 複合体はリン酸セルロースカラムクロマトグラフィーにより容易に単離することができる。さらに、それは EF-Tu 及び EF-Ts と 0° で混ぜ合わせることにより、速やかに GALポリカーゼ活性と効率よく回復することができる。また、GALポリカーゼは他のポリカーゼ<sup>18, 22, 31)</sup>と同様、人工ポリマーである poly C に依存して poly G を合成する活性をもっているが、I・II 複合体はこの活性を欠いている。しかし、それは大腸菌 RNA ポリメラーゼ・コア酵素の添加により再び活性を回復するという特徴をもっている(未発表データ)。従って GALポリカーゼは、サブユニットの機能を研究する上で非常に大きな利点をもっていることがわかる。

f2 RNA を鋳型にして反応する時、ある種の宿主由来因子の添加がなければ f2 ポリカーゼは全く RNA 合成を行なわないことが報告されている。<sup>32)</sup>一方、GALポリカーゼは f2 RNA を含め、いくつかの f<sub>p</sub>-ジ RNA に依存して、いかなる付加的因子の存在なしに RNA 合

成できることが示された。従って f2 RNA を銻型とした反応において、f2 レプリカ-ゼと GA レプリカ-ゼの示す付加的因子に対する要求性の差異はさらに追及すべき問題であると思われる。この点に関して、f2 レプリカ-ゼの精製法及び反応条件の設定に若干の問題があることを指摘したい。Fedoroff と Zinder が報告しているように<sup>18)</sup>、f2 レプリカ-ゼは彼らの精製法によって最終段階に致した標品(精製度約 80%)においても RNase の混入がみられる。一方、GA レプリカ-ゼの標品では step II 以降 RNase の混入は認められないにもかかわらず、銻型 RNA の飽和量は通常 5~10  $\mu$ g を要求する。このことを考えると、f2 レプリカ-ゼの反応系に加える f2 RNA の量には特に注意する必要があるにもかかわらず、彼らは GA レプリカ-ゼの系に比してかなり少ない量(1~2  $\mu$ g)しか、銻型 RNA を加えていないという条件の設定はかなり問題が残る。

第 IV グループの RNA は GA レプリカ-ゼに対して中間的な銻型活性を示すことが明らかとなった。これらの RNA は、Q $\beta$  レプリカ-ゼに対しても同様に部分的な活性を示す<sup>18)</sup>ことが知られている。従って、これらの RNA の存在は銻型 RNA の認識機構を解

明るくして有用であると考えられる。

GALポリカーゼによるRNA合成反応は早期に停止してほう。  
さらに、ポリカーゼ量とGARNA量の間には定量的な関係が存在し、いくらそれらの量を増しても合成産物量は銆型に対して20%を越えることはない。GARポリカーゼによつては、 $Q\beta$ ポリカーゼの様に銆型RNAの何倍もの合成量が得られない原因として、GARNAの複製に不可欠な因子の欠落が考えられる。この可能性は、GARポリカーゼの反応が、生体条件に近いと思われるイオン強度では著しく阻害を受けること、そして最も強く示唆する事実として、反応産物の解析によつて示された様にプラス鎖の合成が殆んど認められないことを考え合わせて、最も現実的であると考えられる。この仮想の因子の探策、検出については第二部で詳述する。

反応産物の解析から明らかになつたもう一つのことば、12S二重鎖RNAの形成である。Weissmannらによつて示された様に<sup>13)</sup>、 $Q\beta$ ポリカーゼの反応産物には二重鎖RNAは殆んど認められず、かつて合成中間体と考えられた二重鎖RNAは、反応産物を抽出する過程で

形成された人工産物であることが判明した。従って、このような人工産物の形成を避けるために RNA 抽出の処理を行なわず、そのままショ糖密度勾配遠心により分析したにもかかわらず、GAレリカーゼの産物に二重鎖 RNA が含まれているという事実は注目に値する。これに関連して、Harunaらは、切断された  $\text{Q}\beta$  RNA を鋳型として用いた場合、 $\text{Q}\beta$  レリカーゼにより合成された産物は  $\text{Q}\beta$  RNA を鋳型として合成された産物に比べ、高い RNase 抵抗性を示すことを報告している<sup>(12)</sup>。RNA は、保存中に徐々に分解していくことが知られており、ショ糖密度勾配遠心により鋳型として用いた GA RNA の中にも切断を受けた短い RNA が混在していることが認められている。従って、GAレリカーゼ産物に含まれる二重鎖 RNA は、このような短い RNA を鋳型にして反転した結果、形成されたものであることが考えられる。熱変性により二重鎖 RNA に含まれる RNA には、GA RNA の全長に相当するものは殆んどなく、しかもその長さが不均一であることが示されたことは、上の可能性を強く示唆している。結果は示さないが、5mM  $\text{MgCl}_2$  存在下で  $65^\circ$  10 分間熱することにより GA RNA の非特異的切断を行ない、ショ糖密度勾配遠心によって 18-19S 分画を単離し、それを鋳型として合成された産物は殆んど全てが 12S の位置に沈降したという結果を得ていることも、上の可能性をさらに確信させる。

ものである。Harunaらによって得られた  $Q\beta$  レプリカゼに関する観察及びここで得られた結果を考え合わせると、鋳型ファージ RNA の 3' 末端から合成開始された RNA は、5' 末端に致るまで伸長された場合は一重鎖 RNA として存在するが、そこまで伸長されない場合は二重鎖を形成してしまうように思われる。従って RNA 複製機構を解明する上で、注目すべきこの現象をより詳細に解析することが必要であると考えられる。

このほかに  $Q\beta$  レプリカゼ以外に、 $R17^{33)}$ ,  $f2$ ,  $SP^{22)}$  の各レプリカゼが報告されているが、 $Q\beta$  レプリカゼと比較研究する上でそれぞれ次の様な難点を付随している。 $R17$  レプリカゼの反応は、リファンピリン感受性であることが報告されているが、宿主 RNA ポリメラーゼによる反応との区別がまだ明確ではない。 $f2$  レプリカゼは前述の様に不安定であり解析材料として適さない。 $SP$  レプリカゼは、構造的、機能的に  $Q\beta$  レプリカゼと非常に類似している。一方、 $GA$  レプリカゼは  $Q\beta$  レプリカゼと全く異なる鋳型特異性を示し、しかも安定であることから、より有利な系であると考えられる。

## 文 献

- 1) Loeb, T. & Zinder, N. D. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,  
47, 282-289
- 2) Bishop, D. H. L., Claybrook, J. R. & Spiegelman, S. (1967)  
J. Mol. Biol., 26, 373-387
- 3) Stavis, R. L. & August, J. T. (1970) Annu. Rev. Biochem., 39,  
527-560
- 4) Mitra, S., Enger, M. D. & Kaesberg, P. (1963) Proc. Natl. Acad.  
Sci. U. S. A., 50, 68-75
- 5) Boedtker, H. (1967) Biochemistry, 6, 2718-2727
- 6) Haruna, I. & Spiegelman, S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.,  
54, 579-587
- 7) Haruna, I. & Spiegelman, S. (1965) Science, 150, 884-886
- 8) Spiegelman, S., Haruna, I., Holland, I. B., Beaudreau, G.  
& Miller, D. R. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A., 54, 919-927
- 9) August, J. T., Banerjee, A. K., Eoyang, L., Franze de Fernandez,  
M. T., Hori, K., Kuo, C-H., Rensing, V. & Shapiro, L. (1968)  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 73-81
- 10) Spiegelman, S., Pace, N. R., Mills, D. R., Levisohn, R., Eikhom,  
T. S., Taylor, M. M., Peterson, R. L. & Bishop, D. H. L. (1968)  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 101-124
- 11) Weissmann, C., Feix, G. & Slor, H. (1968) Cold Spring Harbor  
Symp. Quant. Biol., 33, 83-100



- 12) Haruna, I. & Spiegelman, S. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 1189-1193
- 13) Mills, D.R., Nishihara, T., Dobkin, C., Kramer, F.R., Cole, P.E. & Spiegelman, S. (1977) in *NUCLEIC ACID-PROTEIN* (Vogel, H.J., ed) pp533-547; Academic Press, New York RECOGNITION
- 14) Vollenweider, H.J., Koller, T., Weber, H. & Weissmann, C. (1976) *J. Mol. Biol.*, 101, 367-377
- 15) Watanabe, I., Miyake, T., Sakurai, T., Shiba, T. & Ono, T. (1967) *Proc. Japan Acad.*, 43, 204-209
- 16) Sakurai, T., Miyake, T., Shiba, T. & Watanabe, I. (1968) *Japan J. Microbiol.*, 12, 544-546
- 17) Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Itoh, Y.H., Yamane, K. & Watanabe, I. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 2022-2024
- 18) Fedoroff, N.V. & Zinder, N.D. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 1838-1843
- 19) Pace, N.R., Haruna, I. & Spiegelman, S. (1968) *Methods Enzymol.* 12B, 540-555
- 20) Weber, K. & Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412
- 21) Ouchterlony, O. (1948) *Arkiv kemi. Mineral. Geol.*, 26B, No. 14
- 22) Ohmori, H., Fukami, Y. & Haruna, I. (1973) *Proc. Mol. Biol. Mtg. Japan*, pp32

- 23) Kondo, M., Gallerani, R. & Weissmann, C. (1970)  
Nature, 228, 525-527
- 24) Kamen, R. (1970) Nature 228, 527-533
- 25) Wahba, A. J., Miller, M. J., Niveleau, A., Landers, T. A.,  
Carmichael, G. G., Weber, K., Hawley, D. A. & Slobin, L. T.  
(1974) J. Biol. Chem., 249, 3314-3316
- 26) Blumenthal, T., Landers, T. A. & Weber, K. (1972) Proc. Natl.  
Acad. Sci. U. S. A., 69, 1313-1317
- 27) Osawa, S., Nishihara, T. & Watanabe, I. (1968) Virus  
(in Japanese), 18, 1-5
- 28) Chamberlin, M. J. (1974) THE ENZYMES (Boyer, P. D., ed),  
10, 333-374
- 29) Franze de Fernandez, M. T., Hayward, W. S. & August,  
J. T. (1972) J. Biol. Chem., 247, 824-831
- 30) Francke, B. & Hotschneider, P. H. (1966) Proc. Natl. Acad.  
Sci. U. S. A., 56, 1883-1890
- 31) Hori, K., Eoyang, L., Banerjee, A. K. & August, J. T. (1967)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 57, 1790-1797
- 32) Fedoroff, N. V. & Zinder, N. D. (1973) Nature New Biol.,  
241, 105-108
- 33) Igarashi, S. J. & Bissonette, R. P. (1971) J. Biochem., 70,  
835-844

## 第二部

GA RNA複製に関与する宿主因子の単離及びその性質

## 序 論

RNAファージの第Ⅱグループに属するファージGAの感染菌から、初めて GAL $\beta$ ポリカーゼを単離することに成功した。この GAL $\beta$ ポリカーゼは (1) Q $\beta$ ポリカーゼと類似したサブユニット構成をしているにもかかわらば、全く異なる鋳型特異性を示す。(2) Q $\beta$ ポリカーゼは、単独では Q $\beta$  RNA に依存した RNA 合成を行なうことができないのに対し、GAL $\beta$ ポリカーゼはいかなる付加的因子の存在なしに GA RNA を含めて、種々のファージ RNA に依存して RNA 合成を行なうことができる。しかし、この反応は、(3) 生体条件に近いイオン強度では著しく阻害される。(4) 合成産物量は、鋳型 RNA 量の 20% を越えることはない。(5) プラス鎖の合成を行なうに至るまでに、反応は停止してしまう。——

これらのうち (3)(4)(5) の性質から、GAL $\beta$ ポリカーゼは単独では複製を行なうことができず、何か必須の因子の介在を要求することが強く示唆された。そこで GA RNA, GAL $\beta$ ポリカーゼを含む反応液に添加した時、RNA 合成の促進活性をもつ因子として、その様な仮想の因子の探策を行なった。その結果、促進因子は GAL $\beta$ ポリカーゼ精製法に従って分画して行った時、早い段階で GAL $\beta$ ポリカーゼとは分離してしまう分画から検出された。この因子は最初、GA

感染面から検出されたが、その後非感染面からも得られることが明らかとなったので、宿主由来因子であることが判明し、GA-HF (Host factor(s) for replication of GA RNA) と命名された。

本論文では、GA-HFの性質及びそれが複製反応に直接関する必須因子であることを報告する。

## 材料と方法

材料と方法の大部分は第一部と同じである。以下はこの論文でのみ使用したものを記した。

材料； DEAEセファドックス A-50は Pharmacia社から購入した。

GAレプリカーセは Step皿標品を用いた。

方法； GA-HFの単離及び部分精製

大腸菌 Q13 の凍結菌体を、GAレプリカーセの精製法に従って分画し、硫酸プロタミン沈澱によって生じる上清を出発材料とする。上清に 100 ml あたり 31 g の固型硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に加える。硫酸アンモニウムが完全に溶解してから 1 時間以上静置し、生じた沈澱を  $12,000 \times g$  10 分間の遠心により集める。沈澱を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -ヒルカプトエタール, 0.2 M 塩化ナトリウム, 20% (v/v) グリセロールを含む緩衝液で溶解し、同じ緩衝液に対して 1 晩透析する。不溶性物質を遠心によって取り除いた後、タンパク濃度が 5 mg/ml になるように同緩衝液で適当に希釈する。タンパク溶液を 10 分間煮沸した後、生じた沈澱を  $20,000 \times g$  10 分間の遠心により取り除いて上清を得る。上清を緩衝液 A に対して 1 晩透析した後、あらかじめ緩

平衡液Aで平衡化しておいた DEAEセファロックス A-50 カラム (80mg のタンパクに対して 5 cm × 2.2 cm) に吸着させる。吸着後、0.05 M 塩化トリウムを含む緩衝液A, 続いて 0.30 M 塩化トリウムを含む同緩衝液によりタンパクを溶出する。GA-HF 活性は、0.30 M 分画に回収される。本実験では、この標品と GA-HF 源として用いた。この分画は、氷水中で保存すれば少なくとも1ヶ月間は、GA-HF 活性の有意な低下はみられない。

精製をさらに進める時は、緩衝液Bに対して1晩透析した後、あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいた DEAEセルロースカラム (30mg のタンパクに対して 8 cm × 1.6 cm) に吸着させ、0 M から 0.5 M までの塩化トリウム直線的濃度勾配により溶出を行なう。

## 結 果

### a) GA-HFの添加によるRNA合成反応の促進

GA-HFは、もともと、5 $\mu$ gのGARNAの存在下でレフオリカセによる合成反応を促進する因子として検出されたものである。しかし、GA-HF量とGARNA量との関係と調べた結果(図1)から、促進効果は鈣型RNA量が少ないほど顕著に現われてくることがわかる。

例えば108 $\mu$ gのGA-HFを添加した場合、鈣型RNAが5 $\mu$ gの時反応は2~3倍促進されるのに対して、鈣型が1 $\mu$ gの時には約30倍に達している。これまで調べた限りでは、鈣型RNAが0.1~5.0 $\mu$ gまで変化しても、促進される合成量はGA-HF量に比例する(図1-b参照)。結果は示さないが合成量はGAレフオリカセ量にも比例する。そして、これまで調べられた限りにおいて、GA-HF量、GAレフオリカセ量共にその飽和レベルは観察されていない。また、図1-aに表わされている様にGARNA量を変えていった時、合成量を示す曲線は、1 $\mu$ g RNAを境にして二相になっている。この理由は、1 $\mu$ gで飽和に達するGA-HFに依存した反応による合成量と、より多くのRNA存在下で検出されるGA-HFに依存しない、すなわちGAレフオリカセ単独の反応による合成量との重なりになっているためであ



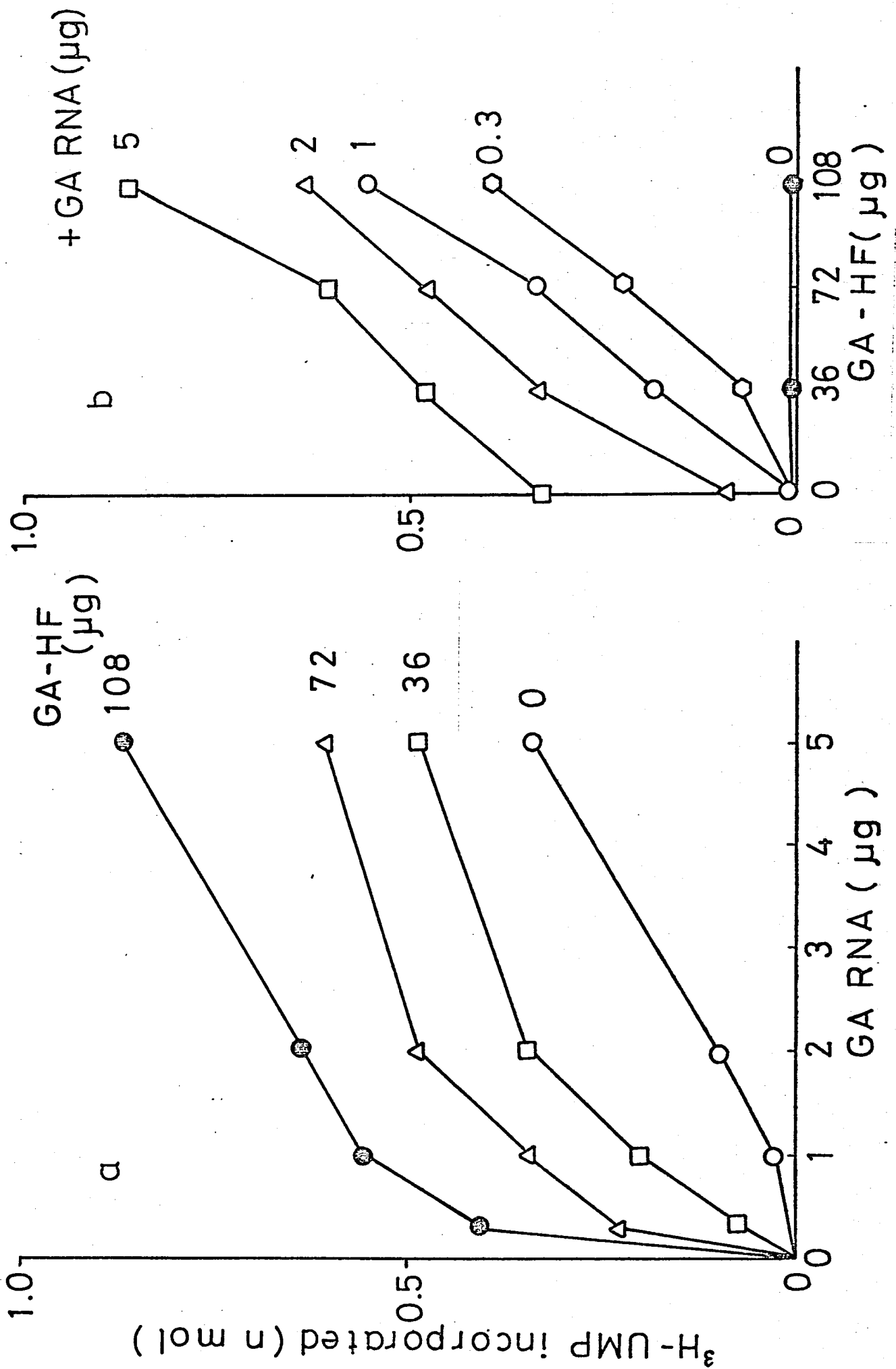


図1. GA-HFによるRNA合成反応の促進

## 図1の説明

- a. GAレプリカーで  $20\mu\text{g}$  と横軸に示した量の GA RNA  
量を含む標準反応液に図中に示した量の GA-HF を  
加え  $30^\circ$  60分間の反応の後、 $[^3\text{H}]$ UMP 取り込み  
量を測定した。
- b. a で得られた結果と、GA-HF 量と横軸にとって  
プロットしなおしたもの

GA replicase	GA-HF	GA RNA	<sup>3</sup> H-UMP incorporated ( pmol )
+	+	-	0
+	-	+	32
-	+	+	4
+	+	+	682

表1. GAL70リカーゼ, GARNA, GA-HFの関係.

GAL70リカーゼ 20 $\mu$ g, GA-HF 108 $\mu$ g, GARNA 1 $\mu$ g  
 をそれぞれ加えた (+) あるいは除いた (-) 標準反応液  
 を30° 60分間の反応後、<材料と方法>に従って [<sup>3</sup>H]  
 UMPの取り込み量を測定した。

る。このことについては、(d)項であらためて示す。

表1は、反応に対する鋳型RNA、レポリカーゼ、GA-HF、三者の関係を表わしたもので、反応系から鋳型RNA、レポリカーゼを除いた場合有意な合成は認められない。GA-HFを除いた場合には、GALレポリカーゼによる $1\mu\text{g}$ の鋳型RNAに依存した合成が検出される。この結果から、GA-HFに依存した反応も鋳型RNAを要求すること、及びGA-HFにはRNA合成活性はなくGALレポリカーゼと共存するとレポリカーゼの合成能を促進する活性ともつことがわかる。

#### b) 反応時間とRNA合成量

GA-HFの添加によりRNA合成の持続する時間かどの様に変化するかを調べてみた。図2に示したように、GA-HFを加えない反応では合成は5分以内に停止してしまう。一方、GA-HFを添加した場合には、少なくとも30分間は直線的に合成が起こるようになる。また、GA-HFを添加した反応系で、より多くの鋳型RNAが存存している時、合成の初速度はより高いが反応の停止までの時間はより短かくなっている。そして合成が停止した時点で、鋳型RNAが $0.2\mu\text{g}$ の時も $1.0\mu\text{g}$ の時も合成量は共に同じく約 $5\mu\text{g}$ に達している。

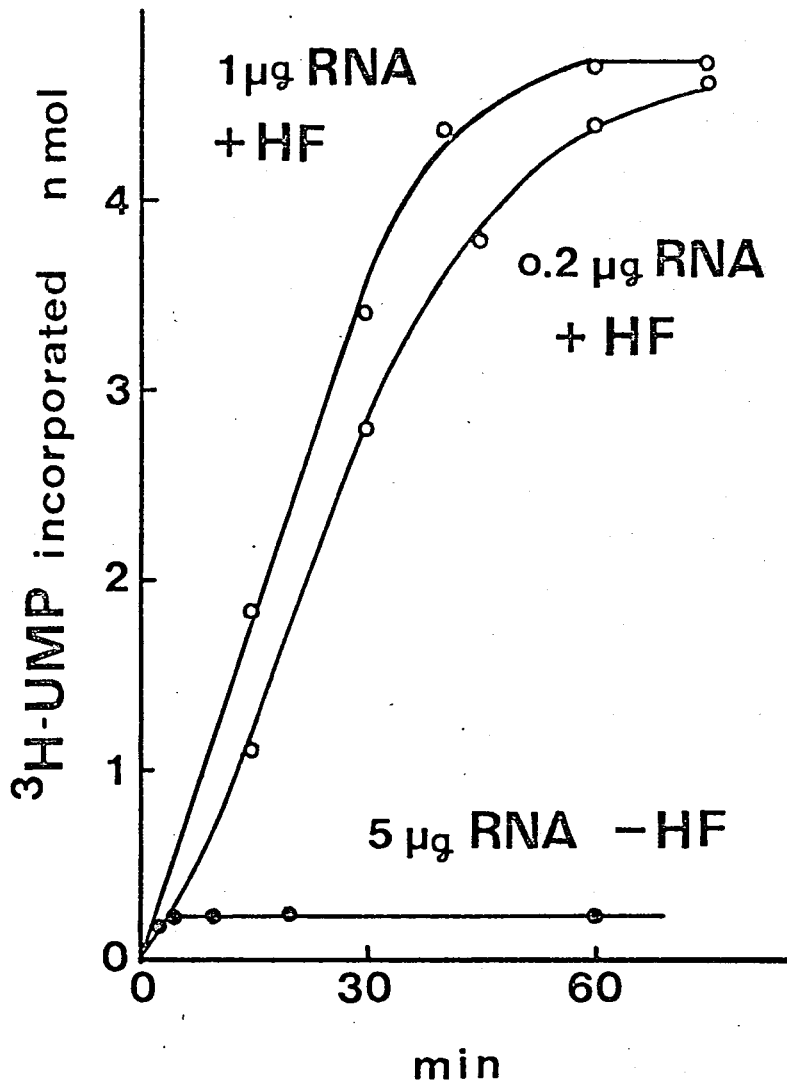


図2. RNA合成反応の時間経過

GAレゾリカーゼ 24 $\mu$ g, GA RNA 5 $\mu$ gを含む標準反応液を 30°で、横軸に示した時間反応させた後、 $[3H]$ UMPの取り込み量を測定した(—●—)。同じ反応液(ただしGA RNA量は 0.2 $\mu$ g 或いは 1.0 $\mu$ g)に GA-HF 120 $\mu$ g を加え、各反応時間ごとに 40 $\mu$ l を取り出し、 $[3H]$ UMPの取り込み量を測定した。図には、0.25 ml に還元した値を 70% として (—○—)。

結果は示さないが、反応に加える GA-HF 量をより小さくした時、  
鋳型 RNA 量の違いによって合成の停止する時間に、より大きな隔た  
りが生ずることがある。その場合の最終的な合成量はやはり同じ程  
度である。

### C) 合成産物の ショ糖密度勾配遠心による解析

Qβ リリカーでは反応液に鋳型 RNA が含まれていない時、沈  
降定数約 6S の小さな RNA を合成することが知られている。<sup>1)</sup> GAL70  
リカーでも GA-HF と共存する時、反応条件によっては鋳型 RNA 非存在  
下で同じ様に小さな RNA を合成することが明らかとなっている（  
未発表データ）。従って、GA RNA を鋳型として合成した時、生成し  
た RNA がどのような大きさであるかを知ることが、この系が複製系  
であるのかどうかを判断する上で非常に重要である。そこで、合成  
反応が直線的に進行している 15分目と 30分目の反応産物を  
ショ糖密度勾配遠心により分析した。図3に示した結果から、反応産  
物の大部分は、鋳型である GA RNA と同じ 23S の沈降定数をもつ  
RNA であることが明らかになった。さらに、この 23S RNA 量は 30分  
目では 15分目に比べほぼ2倍に増えている。このことから、この反応系

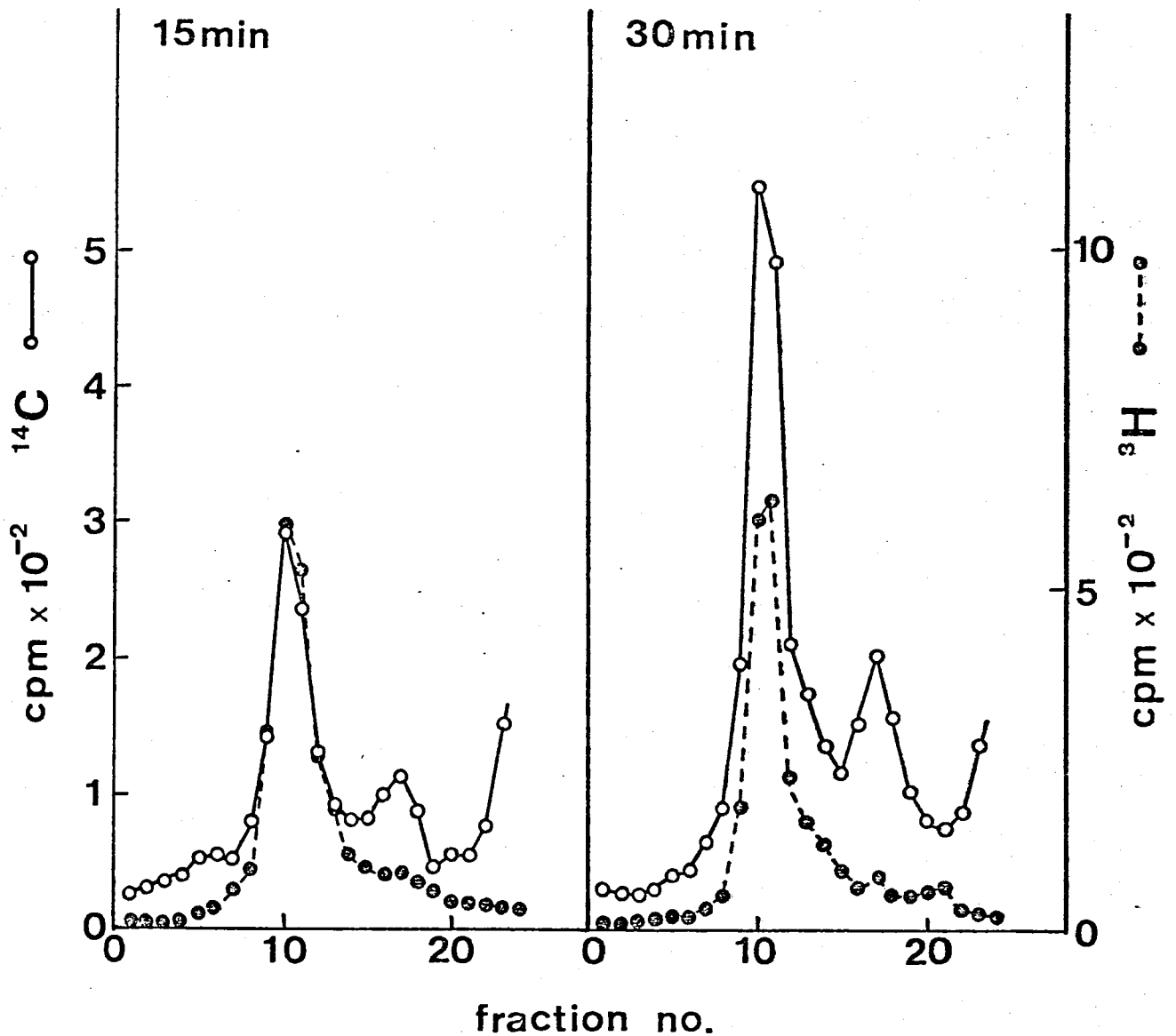


図3. 反応産物のショ糖密度勾配遠心による解析

GAレリカーゼ<sup>12</sup> 12 $\mu$ g, GA RNA 0.5 $\mu$ g, GA-HF 60 $\mu$ g  
 を含む反応液 0.125 ml (標識基質 [<sup>14</sup>C]ATP 7.5mCi/mol)  
 を 30° で反応させ、15分目、30分目に 40 $\mu$ l を取り出  
 し、氷水中で冷却した。160 $\mu$ l の 10m Tris-HCl (pH 7.4),  
 10mM EDTA を加え、さらに マーカー [<sup>3</sup>H]GA RNA を添  
 加した後、〈材料と方法〉に従って遠心した。遠心方向  
 は 図中 右から左である。

錳塩 RNA に忠実に依存して RNA を合成していることがわかる。また、量的には少ないが第二の産物として 12S RNA が認められる。12S RNA は やはり二重鎖 RNA であると思われるが、ここでは詳しい解析は行なっていない。しかし、注目すべき点は、23S RNA 同様、反応時間に比例して 12S RNA 量も増えていることである。

次に 23S RNA に フラス鎖 が含まれているかどうかを調べるために、反応後、過剰の GA RNA を加え、アニリング処理を行なった後、白糖密度勾配遠心を行なった。ここでは、フラス鎖を含んでいないことが明らかとなっている GA-70リカーゼ単独により合成された産物を標品に混ぜ、アニリング処理によって二重鎖形成か、どの程度進行したかを判断した。結果は図4に示した通り GA-HF を添加した系で合成された産物の中には、アニリング処理により沈降位置が 12S 付近に移行した RNA 以外に依然 23S 位置に沈降する RNA が存在している。一方、GA-HF を含まない系で合成された産物の中には、処理後、23S 位置に沈降する RNA は残っていないことから、二重鎖形成は充分進行したことがわかる。この結果から、GA-HF に依存した反応では、マイス鎖ばかりではなくフラス鎖の合成をも行なっていることが結論される。また、図4-b の沈降パターンを見ると、アニリング



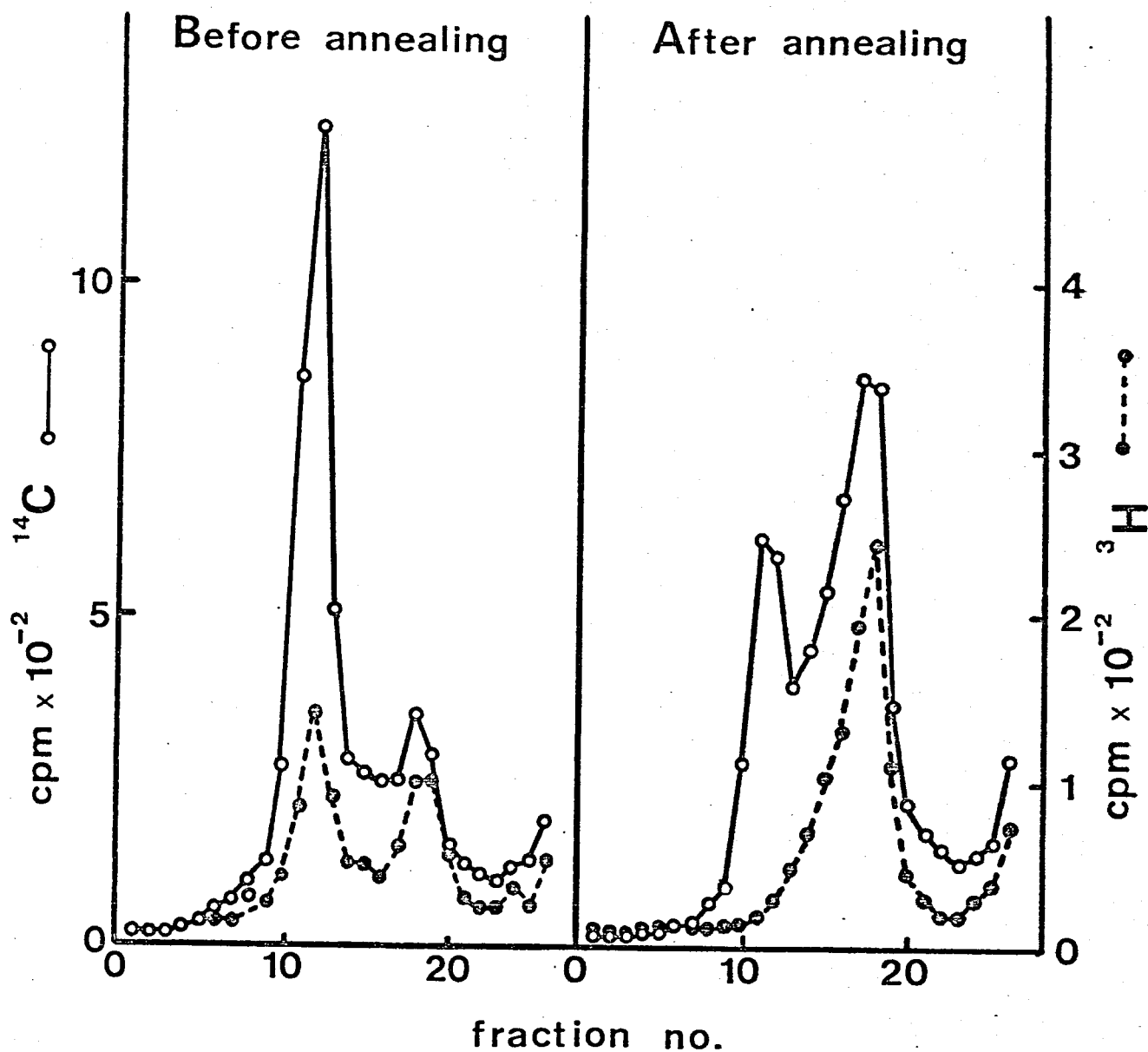


図4 アニリング実験

図3で述べたものと全く同じ組成をもつ反応液0.125mlと、GAL7-リカーゼ24 $\mu$ g及びGARNA 10 $\mu$ gを含む0.125mlの標準反応液をそれぞれ30分間反応させた後、混ぜ合わせた。0.5M EDTAと6 $\mu$ l加えた後、2等分し、一方はそのまま(左図)、他方は60°5分間処理した後(右図)、〈材料と方法〉に従って30%糖密度勾配遠心を行なった。アニリング時、標品はGA-HF溶液からのもち込みにより32mMの塩化ナトリウムを含んでいる。

遠心は図中、右から左方向へ行なした。

処理後 あらわれた 12S のヒ-7 は非対称的で、速く沈降する側により多くの放射活性が分布しているのかわかる。これは、GA-HF 溶液に含まれている塩化ナトリウムのもち込みにより、標品のイオン強度が高くなったため、ア-リンク処理により、プラス鎖とマイナス鎖が1分子ずつ結合した二重鎖 (Hofschneider 構造<sup>2)</sup>) 以外に、1分子のマイナス鎖に数分子のプラス鎖が結合した二重鎖、いわゆる、Franklin 構造<sup>3)</sup> が形成されたためであろうと思われる。この推論は、標識されたプラス鎖を含んでいる GA-HF 依存反応産物では、非依存の反応産物に比べ、速く沈降する側により顕著にあらわれていることから支持される。即ち、ここでは非標識 GA RNA による拮抗が不完全な条件になってしまったため、標識された産物のプラス鎖も二重鎖 RNA に取り込まれたためであると考えられる。従って図4からは、正確に算出することはできないが、GA-HF 依存反応産物の 23S RNA の内、少なくとも 50% はプラス鎖であると推定される。

#### d) RNA 合成に及ぼす塩の効果

GA-HF と加えない時、GA-V7-ポリカ-ゼンによる RNA 合成反応は塩の添加により強い阻害を受ける。GA-HF 依存の反応では、この性質が変わる。

り、より抵抗性になることを示したのが図5である。5 $\mu$ gのGARNA存在下でGALポリカーゼによる反応は塩化ナトリウム濃度が60mMで50%、100mMで80%の阻害を受ける(曲線—●—)。一方、1 $\mu$ gのGARNA存在下でGA-HFに依存した反応の場合100mMまで有意な阻害を受けず、200mM以上になって50%阻害を受ける(曲線—○—)。図1-aでRNA飽和曲線が二相になることが示され、その理由として鋳型RNAが多量に存在する時にはGA-HFに依存した反応と、GALポリカーゼ単独によるRNA合成が同時に起こっている可能性を考えた。そこで、この可能性を検証するために、GA-HFを含む反応系でGARNAを5 $\mu$ g加えた時、起こるRNA合成反応に対する塩の効果調べた。その結果(曲線—●—)、塩に対する感受性は二相になって表われた。第一相は約60mMで50%阻害を受け、第二相では200mM以上である。そして、この曲線は、GALポリカーゼ単独による反応の曲線とGA-HFに依存した反応の曲線を加算して合成した曲線(—)と極めて類似している。これらの結果から、多量の鋳型RNA存在下ではGA-HFが添加されていても、GALポリカーゼ単独の反応が同時に起こっていることが強く示唆される。また、塩により抵抗性を示すGA-HF依存の反応に着目した場合、鋳型RNA量が1 $\mu$ gでも5 $\mu$ gでも合成量がほぼ同じことから、1 $\mu$ gで飽和に

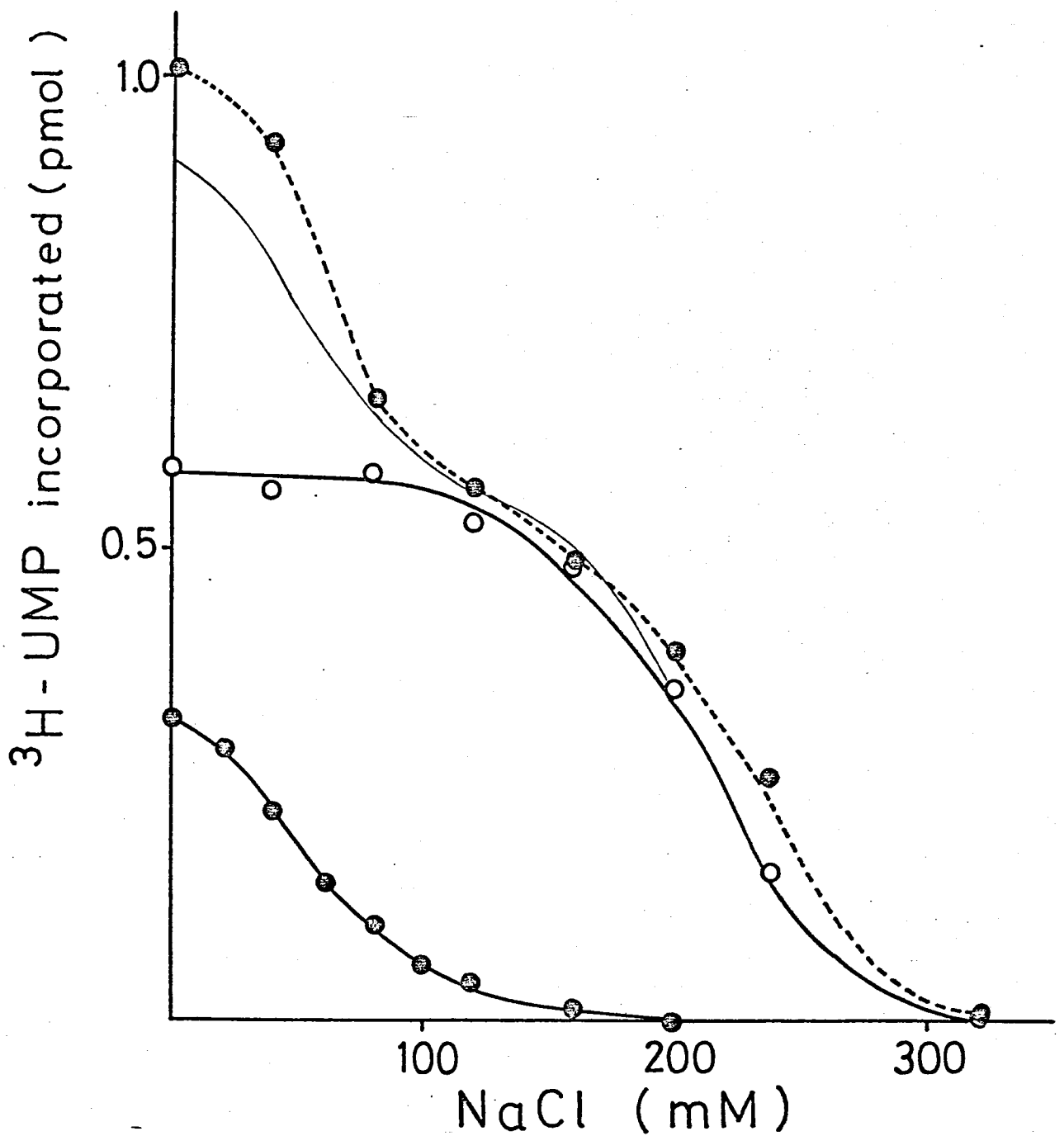


図 5. 反応におよぼす塩の効果

横軸に示した濃度の塩化ナトリウムを含む標準反応液に GAL70リカーゼ 24 $\mu$ g, GA RNA 5 $\mu$ g (—●—); GAL70リカーゼ 24 $\mu$ g, GA RNA 1 $\mu$ g, GA-HF 120 $\mu$ g (—○—); GAL70リカーゼ 24 $\mu$ g, GA RNA 5 $\mu$ g, GA-HF 120 $\mu$ g (—●—); を加えて、30° 40分間反応させた後、 $^3\text{H}$ UMP 取り込み量を測定した。図中、白線 — は、1番目と3番目の条件で得られた曲線を加算して合成したものである。

達していることを示している。

### e) GA-HF依存反応系における鋳型特異性

GA-HFを含む反応系で、GA RNA以外にどのようなRNAが鋳型活性を示すかを調べてみた。その結果(表2)、 $Q\beta$  RNA及び大腸菌RNAは有意な鋳型活性を示さなかった。さらに、GAレプリカゼのみ  
の反応系と比較して、注目すべき点は第IIゲル-707-ジR17のRNAが、やはりGA RNAと同じ程度の活性を示したこと、及び中間的な鋳型活性を示していた第IVゲル-707-ジSPのRNAがこの系では殆んど鋳型活性を示さないことである。SP RNAについては、図6に示した様にGA-HFの量を増していても全く反応の促進を受けないことがわかる。

### f) GA-HFと $Q\beta$ -HFとの関係

次に $Q\beta$ レプリカゼによる反応に必要な因子である $Q\beta$ -HFとGA-HFとの関係を調べてみた。 $Q\beta$ 系の因子は、Augustらによつて、HFIと名づけられている<sup>4)</sup>が、ここではGA-HFに対比させて $Q\beta$ -HFとした。それぞれ2種類ずつのRNA、レプリカゼ、HFを組み合わせて

Template RNA	GA - HF	
	—	+
R17 (I)	37	431 pmol
GA (II)	26	466
QB (III)	7	4
SP (IV)	12	9
E.coli bulk	5	4
—	10	5

表2. GA-HFに依存した反応系における鋳型特異性

Gal7<sup>011</sup>カ-セ 20 $\mu$ g, GA-HF 108 $\mu$ g, 表に示した鋳型RNA 1 $\mu$ gを含む標準反応液を30° 60分間反応させた後、[3H]UMPの取り込み量を測定した。7 $\mu$ -ジ名の後の括弧内は、所屬するGal-7<sup>0</sup>を示す。また表中において、—は鋳型RNAを加えなかったことを示す。

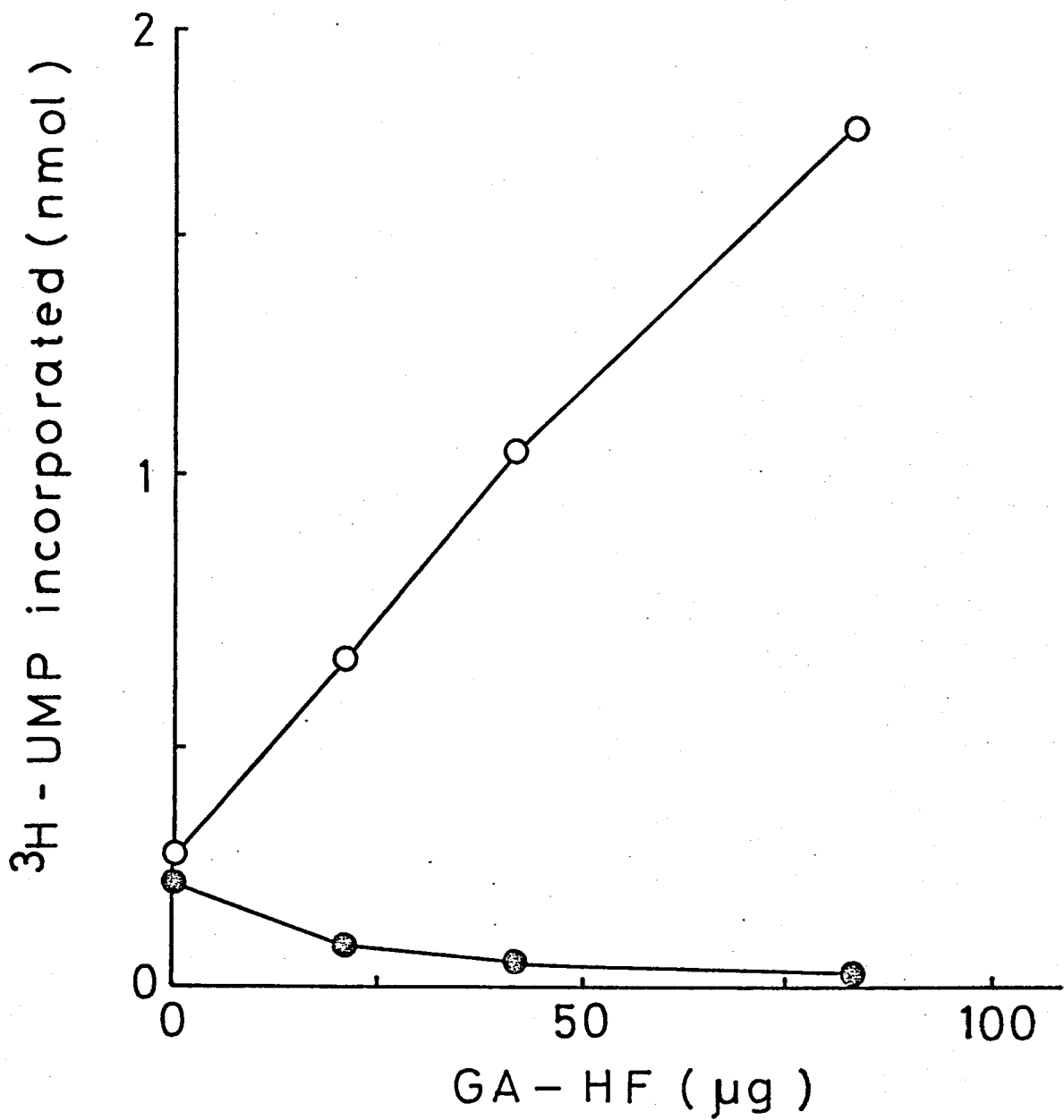


図6. GARNAとSPRNAと鋳型にした反応におよぼすGA-HFの効果

GAL70リカーゼ24μg, 横軸に示した量のGA-HFを含む標準反応液に5μgのGARNA(—○—)或いはSPRNA(—●—)を加えて30°20分間の反応を行なった後、<sup>3</sup>H]UMPの取り込み量を測定した。

反応させた結果(表3)、 $Q\beta$  RNA +  $Q\beta$  レプリカゼ +  $Q\beta$ -HF 或いは  
GA RNA + GA レプリカゼ + GA-HF の組み合わせで 顕著な RNA  
合成がみられた。その他の組み合わせでは  $Q\beta$  レプリカゼ標品に、  
 $Q\beta$ -HF が少し混入しているため、 $Q\beta$ -HF を添加しなくとも  $Q\beta$  RNA に  
依存して若干の RNA 合成が認められる以外、殆んど有意な合成は起  
こらない。この結果から、GA-HF は  $Q\beta$ -HF とは全く異なる因子であり、  
これら両因子はそれぞれ、GA RNA 或いは  $Q\beta$  RNA 複製系に特異的な  
宿主因子であることが明確に示された。

### 8) GA-HF の成分

部分精製された GA-HF 標品を、DEAEセルロースカラムによる  
クロマトグラフィーを行なった所、カラムを素通りした分画に痕跡程度の活  
性が検出される以外、有意な活性は回収されない(図7)。しかし、各  
画分を適当に組み合わせる反応液に添加した時、素通りした分画及  
び 0.12-0.18M 塩化ナトリウムにより溶出される分画に相補的な活性  
が検出されたことから GA-HF は 2 成分からなることが示された。そ  
して前者を成分 I、後者を成分 II と命名した。成分 II は二峰性である  
が、その理由は次の通りである。他の実験から、カラムに吸着させる時



	GA Replicase		QB Replicase	
	GA-RNA (1 $\mu$ g)	QB-RNA (1 $\mu$ g)	GA-RNA (1 $\mu$ g)	QB-RNA (1 $\mu$ g)
-	16	2	9	63
GA-HF	822	5	9	83
QB-HF	18	5	4	500

p mol

表3. GA-HFとQB-HFとの関係

GAレプリカゼ 24 $\mu$ g 或いは QBレプリカゼ 1 $\mu$ g,  
 GA-HF 100 $\mu$ g 或いは QB-HF 4 $\mu$ g, GARNA 1 $\mu$ g  
 或いは QB RNA 1 $\mu$ g を含む標準反応液を 30° 20  
 分間反応させた後、〈材料と方法〉に従って<sup>3</sup>H]UMP  
 取り込み量を測定した。QBレプリカゼ, QB-HFは当  
 研究室で調製したものを用いた。  
 表中、— は いずれかの HF も含まない反応系を示す。

標品のイオン強度と徐々に高めて行くと、低いイオン強度で溶出される第一のピークに回収される活性量は減って行き、第二のピークの量が増大する。さらに、この傾向と平行して 0.22M 付近に溶出される第三のピークが現われてくる。また第一のピークを集め再カラムガラスを行なった時、やはり二峰性になって溶出される。以上のことからそれぞれのピークは同一の物質が、多量体形成の違い等の原因から異なるイオン強度で溶出されたのであろうと考えられる。

現在、得られている両成分に関する知見は次の通りである。

1. 成分Ⅰ,Ⅱ共 DEAEセルロースカラムから溶出された状態のままで、非常に安定であり少なくとも1ヶ月間は有意な活性の低下はみられない。
2. 成分Ⅰは、リン酸セルロースカラムに吸着し、塩化ナトリウムの直線的濃度勾配により 0.2M で単一のピークとして溶出される。成分Ⅱは、このカラムには吸着しないが、リン酸カルシウムゲルカラムには吸着され 0.1M リン酸ナトリウムにより溶出される。
3. 限外濾過法により両成分は明確に区別される。一例を上げると、アミコン社の PM10 フィルターにより、成分Ⅰは濾過されるが成分Ⅱは殆んど全く濾過されない。
4. 成分Ⅰはタンパク濃度が  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  以下の時、或いはマグネシウムイオンの存在している時急激に失活する（0°C で活性の半減期は1日以下）。
5. 成分Ⅱは、0.5

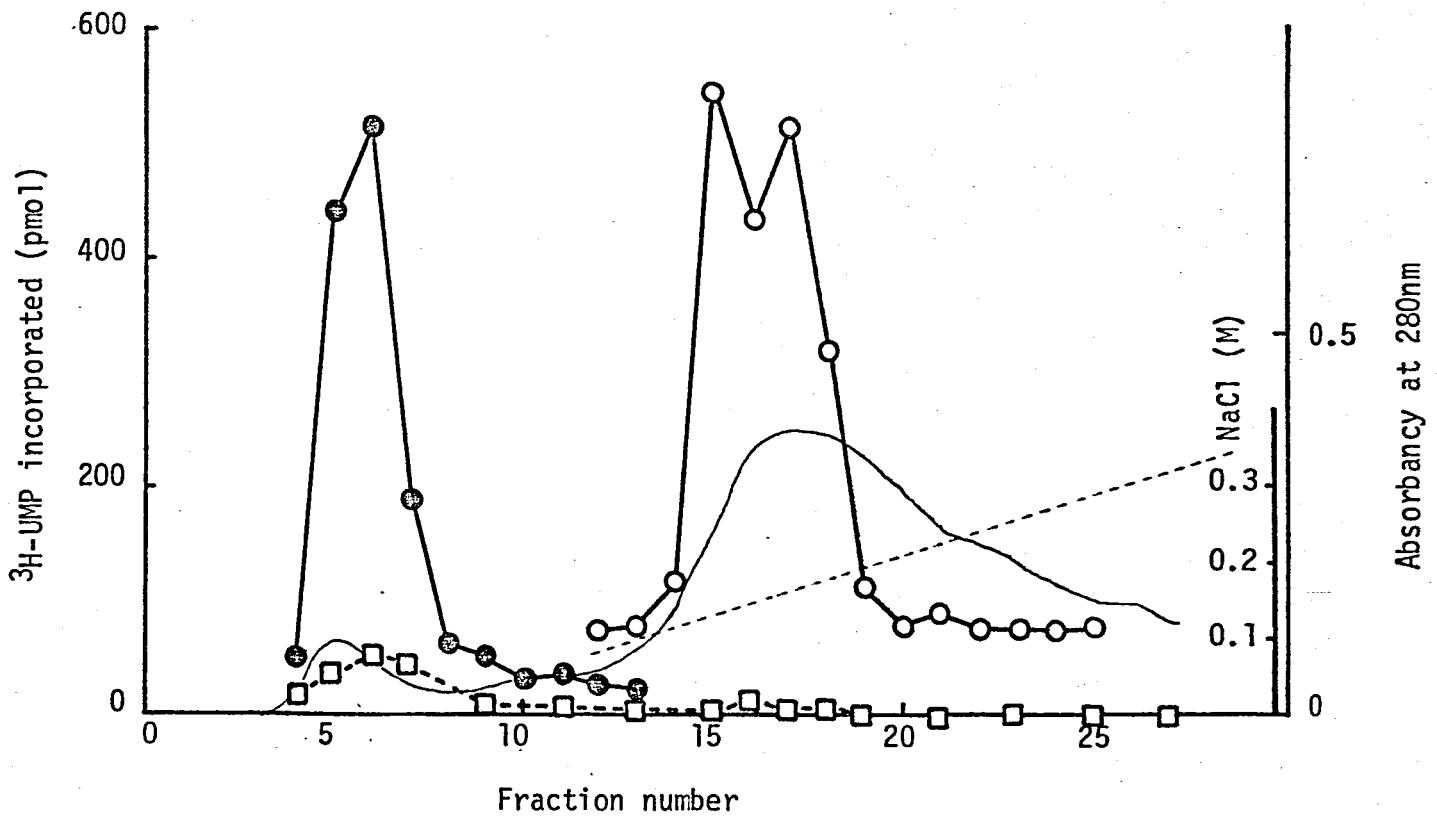


図 7. GA-HF の DEAE セルロース カラム クロマト グラフィー  
 GA-HF の カラム クロマト グラフィー を < 材料 と 方法 > に 従っ  
 て 行 っ た。 GAL7011 カーセ 48 $\mu\text{g}$ , GARNA 1 $\mu\text{g}$  を 含 む 標  
 準 反 応 液 に、 各 分 画 40 $\mu\text{l}$  (—□—), 分 画 5 と 6 の 混 液  
 40 $\mu\text{l}$  + 各 分 画 40 $\mu\text{l}$  (—○—), 或 い は 分 画 15 から 18 まで  
 の 混 液 40 $\mu\text{l}$  + 各 分 画 40 $\mu\text{l}$  (—●—) を 加 え、 30°40 分  
 間 の 反 応 の 後、 < 材 料 と 方 法 > に 従っ て [ $^3\text{H}$ ]UMP の 取  
 り 込 み 量 を 測 定 し た。

M 硫酸アンモニウムを含む溶液中では急激に失活する (0°で活性の半減期は1日以下)。

## 考 察

GALポリカーゼによる RNA 合成反応を促進する因子として単離された GA-HF は、その添加により、(1) フラス鎖の合成を行なえるようになる (2) 反応に必要な鋳型 RNA が少量 ( $1\mu\text{g}$  で飽和に達する) で満足されるようになり、しかも鋳型の数倍から数十倍の RNA を合成できるようになる (3) 生体条件に近いと思われるイオン強度でも阻害を受けなくなる —— という顕著な性質を反応系に付与する。

即ち、GA-HF を含む反応系は生体における複製反応として必要な条件を満足させていることから、これにより GA RNA の複製系が確立されたと考えられる。しかし、複製系としての最終的な証明を得るためには、合成された フラス鎖の感染性を確認することが必要であると考えられる。

GALポリカーゼは、GA-HF に依存しないで マイナス鎖の合成を行なえることが第一部で明らかとなっている。この反応は、そのまま複製反応に組み込まれているのであろうか、即ち GALポリカーゼのみにより マイナス鎖が合成され、次にそれが鋳型となって GA-HF の存在下で フラス鎖の合成を指令する機構で複製が行なわれるのであろうか。もし、この仮説が正しいならば、反応の第一段階であるマイ

ス鎖の合成に与えられる影響は反応全体に直接的に及ぼされる  
はすである。しかし、GAレプリカーゼ単独反応に対する塩の強い阻害  
効果が、複製反応には反映されていないという事実は、この考えを  
支持していない。従ってマウス鎖の合成段階においても GA-HF の  
関与していることが強く示唆される。一方、GAレプリカーゼ単独による  
合成反応は多量の鋳型 RNA の存在によって起こることを考慮すると  
GAレプリカーゼには、どこか漏れ口があるために正常でない反応を  
引き起こしてしまうような性質があるのかもしれない。しかし、この性質も  
GA-HF の機能、鋳型 RNA の認識機構を解明する上で有用であ  
るように思われる。

$\Omega\beta$ -HF は、一成分のタンパク分子から成ることが知られてい  
る<sup>4)</sup>。これに対し、GA-HF は二成分から成っていることが示された。  
一方、GA-HF には、 $\Omega\beta$ -HF に代わって  $\Omega\beta$ レプリカーゼによる反応を促  
進する活性はないことが明らかとなったことから、GA-HF の各成  
分はいずれも  $\Omega\beta$ -HF とは異なる分子であることが推定できる。  
これら各成分の機能については現在全く明らかになっていないが、  
各成分の反応に及ぼす効果の詳細な検討並びに精製をより推  
し進めることにより、解明へ接近できると考えている。

GA RNA複製系では第Iグループに属するファージR17のRNAが、かなり高い鋳型活性をもつことが示された。このことから、第Iグループに属する他のファージ、MS2、φ2等のRNAもこの系で複製され得ることが強く示唆される。MS2 RNAについては、Fiersらによって<sup>5)</sup> 全一次構造が既に決定されており、また Jacobsonら<sup>6)</sup> によって電子顕微鏡観察による二次構造のマッピングも進められている。R17 RNA<sup>7)</sup>、φ2 RNA<sup>7)</sup> についても部分的に一次構造が決定されている。一方、GA RNAについては一次構造、二次構造共に全く不明である。従って、必要に応じて第IグループのファージRNAを鋳型に用いて研究を行なうならば、より豊かな知見を得ることが可能になるであろう。

最後に、RNA複製機構を研究する上で、GAレプリカーゼ系がQβレプリカーゼよりも有用である点をまとめて記したい。GA RNA複製系は、Qβの系よりも多くの成分を必要とし、より複雑であるように思われる。しかし、最近のφX174 DNA複製に関する研究の発展<sup>8)</sup> に示されている様に、反応に関与する成分が多い程、反応をより多くの素過程に分離することが可能であり、より詳細な解析を可能にできるように思われる。また、QβレプリカーゼはQβ-HF

が存在していない時には、 $Q\beta$  RNAに依存した合成が全くみられない。一方、GAレプリカーゼの系では、GA RNAを鋳型にして、GA-HF依存と非依存の反応を観察できることから、両反応を比較しながら解析を行なうことができる。これらの特徴を利用することにより、 $Q\beta$ レプリカーゼ系では成し得なかった、反応のより詳細な分析が可能になるであろうと考えられる。



## 文 献

- 1) Banerjee, A.K., Rensing, U. & August, J.T. (1969)  
J. Mol. Biol., 45, 181-193
- 2) Francke, B. & Hofschneider, P.H. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 56, 1883-1890
- 3) Franklin, R.M. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 1504-1511
- 4) Franze de Fernandez, M.T., Hayward, W.S. & August, J.T. (1972) J. Biol. Chem., 247, 824-831
- 5) Tiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Isarentant, D., Marregart, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. & Ysebaert, M. (1976)  
Nature, 260, 500-507
- 6) Jacobson, A.B. & Spahr, P.F. (1977) J. Mol. Biol., 115, 279-294
- 7) Min Jou, W. & Tiers, W. (1976) J. Mol. Biol., 106, 1047-1060
- 8) McMacken, R., Ueda, K. & Kornberg, A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 4190-4194
- 9) Ohmori, H., Fukami, Y. & Haruna, I. (1973) Proc. Mol. Biol. Mtg. Japan, pp 32

## 謝 意

本研究を遂行するにあたり、御急逝の直前まで熱心な御指導を下さいました故春名一郎教授に深く感謝いたします。本研究は、試験管内における RNA 複製系の偉大な開拓者である春名先生の研究を引き継いだものであり、先生の豊かな経験と知識がなければ、完成し得なかったものであります。

また、暖かい励ましと熱心な討論を下さいました、小川英行助教授に深く感謝いたします。共同研究者である青山明君には、実験を遂行するにあたり多大な援助をいたたきましたことを感謝いたします。

慶応義塾大学医学部 渡辺格教授、東京大学医科学研究所 上代淑人教授には、実験に必要な材料を提供していただきましたことを感謝いたします。