OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/24594
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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　GAレプリ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バクテリオファージは、1961年のLoebとZinderによる最初の発見[1]以来、世界各地域で多数分離されて来た。RNAファージは、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複製機構を研究する上で有利な材料であると考えられる。また、ファージ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。

ファージRNAは分子量約1×10^6[2]の直線状一本鎖分子[3]であり、その約70%の部分が二次構造をとっている[4,5]ことが知られている。ファージRNA複製に関する研究は、1965年にHarunaとSpiegelmanにより、Qβファージの感染菌からQβレプリカーゼが単離され[6]、試験管内において複製系が確立された[7,8]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) QβRNA複製系では、QβRNAの複製を行うことはできるが、他のファージRNA（例えばMS2 RNA, f2 RNA）やファージ以外のRNA（大腸菌リボソームRNA, 転移RNA, タバコモザイクウィルスRNA等）の複製を行うことはできない[5]。

この性質を鋳型特異性と呼んでいる。 2) QβRNAの複製は第一段階としてQβRNA（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。[9,10,11] 従って、ファージ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もっ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[11]である。—— ファージRNA複製の特徴をなすこれらの二点が、どのような機構により生ずるのかを解明することは、RNA複製機構を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、QβRNA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。[12] また、Spiegelmanらの、Qβレプリカーゼによって試験管内で複製される小さなRNAを用いた実験からも、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。[13] さらに、Weissmannらの最近の観察によれば、[14] Qβレプリカーゼのの QβRNAへの結合部位は、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、鋳型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、巨大分子であるファージRNAの高次構造の研究が鋳型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を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。またレプリカーゼによる識別過程も解析が殆んど行なわれていない。この様な状況においては、Qβレプリカーゼと異なる鋳型特異性を示すレプリカーゼによる複製系を確立し、Qβ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、Qβ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、ファージ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ァージ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ファージは、これまで明らかにされた限り、ファージ粒子の形状、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[3]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[15,16,17](図1)。

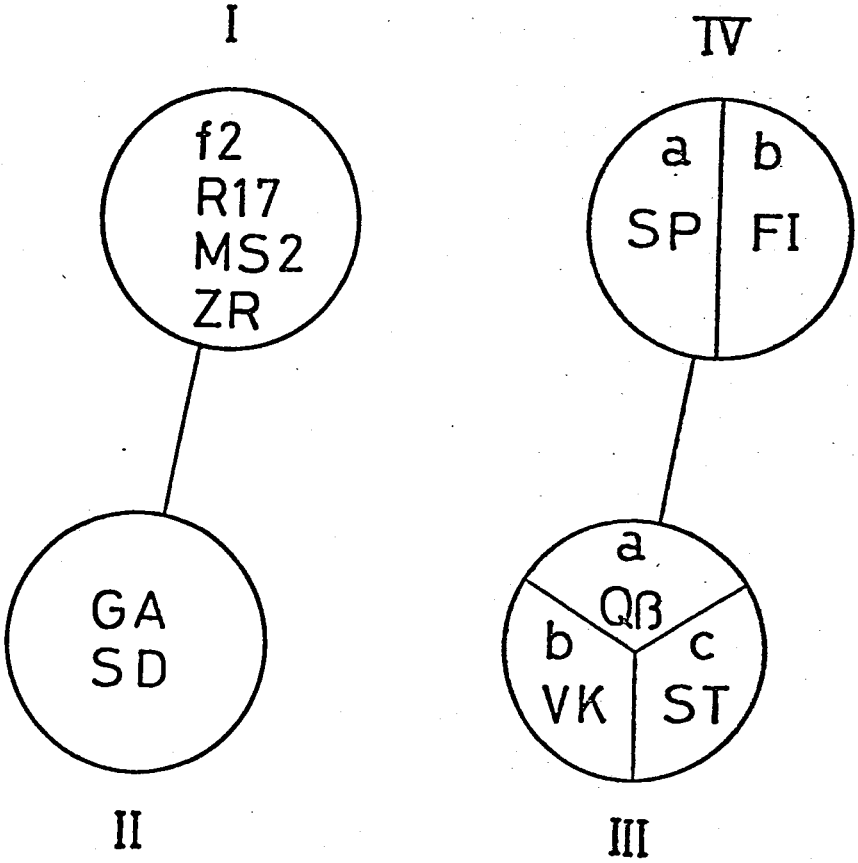

図1. RNAファージのグルーピング模式図[17]

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が、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グループに属するファージのRNAはQβレプリカーゼにより全く複製されない[17]ことが明らかにされている。従って、第IIグループに属するファージGAのレプリカーゼは、Qβ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グループに属するファージf2のレプリカーゼがFedoroffとZinderにより単離された[18]が、この酵素は非常に不安定（活性の半減期は0°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，[^{3}H]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，硫酸プロタミン及び膵臓 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 ポリペプトン，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 β-メルカプトエタノール，20% (v/v) グリセロールである。緩衝液 B の組成は 50mM Tris-HCl (pH 7.4) ソルトは緩衝液 A と同じである。

3) ファージ及び大腸菌

GAファージ及びRNAを調整するために用いたファージは全て慶応義塾大学医学部の渡辺格博士からいただいた。大腸菌Q13[6]株は Hfr, PNP⁻, RNase I⁻ であり、RNAファージの増殖及びGAレプリカーゼの調製に用いた。

4) ファージ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-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[19]に従った。

2) GA感染菌の調製

L-ブロスで一晩培養したQ13を同じブロスで20倍に希釈し、37°で通気培養する。細胞濃度が 4×10^8/ml に達したら、多重度20～50でGAファージを感染させる。通気培養を続け、感染60分後に砕氷を加え、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

0.42M 塩化ナトリウムを含む緩衝液Aで透析した粗抽出液（stepI）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 0.14M,

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。GAレプリカーゼは、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。GAレプリカーゼは 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 × 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 1ml を、50mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 5mM β-メルカプトエタノール, 0.2M 硫酸アンモニウムの組成をもつ緩衝液中に形成された、16ml 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° で 27,000 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って得られた活性のピーク付近を集め、0.05M 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 4mg に対して 7cm × 0.55cm)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、0.05M から 0.5M 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プ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[11]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。ショ糖の溶媒組成は30mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM $MgCl_2$である。遠心はBeckman L3-50型遠心機、SW50.1ローターによって10°で45,000rpm 2時間行なった。[3H]で標識したファージRNAをマーカーとして加えた。遠心後、底から10滴ずつ口紙上に集め赤外線ランプで乾燥させた後、5% TCA溶液で洗浄して未反応の標識基質を取り除き、それぞれの口紙上に残されている放射活性を測定した。

8) アニーリング及び熱変性

アニーリングは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ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポ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[20]に従った。

10) 免疫学的交叉反応

Ouchterlonyの方法[21]に従った。

11) レプリカーゼ活性の測定

GAレプ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 μmoles; $MgCl_2$ 2.0 μmoles; ATP, [3H]UTP (比活性 4 mCi/mol), CTP, GTP 各 0.2 μmoles; 鋳型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。ピロリン酸ーリン酸ナトリウム混液 0.3ml, 80% TCA溶液 0.1mlを加えた後、10分間以上静置し酸不溶性分画をSaltorius SM 11307 メンブ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. GAレプリカーゼの単離及び精製

最初、Qβレプリカーゼの単離に用いられた Haruna と Spiegelman の方法により、GAレプ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GAレプ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レプリカーゼの比活性は下がるが、反面、RNase等レプ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) GAレプリカーゼを含む細胞粗抽出液の調製

50gの凍結菌体を氷の上で緩やかに融解し、250mlの10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 5mM β-メルカプトエタノール, 5%(V/V)グリセロール, 5μg/ml DNaseIを含む緩衝液で懸濁する。懸濁液に150mgのリゾチームを加え、凍結融解を2回繰り返す。3mlの1M $MgCl_2$, 1.25mlの500μg/mlのDNaseIを加え10分間静置する。その後、30,000×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レプリカーゼの精製

活性の回収率は stepI 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〔^{3}H〕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。

なう。沈査を 60mℓ の10mM Tris-HCℓ (pH 7.4), 10mM $MgCℓ_2$, 5mM β-メルカプトエタノール, 5%(W/V) グリセロールで再び懸濁し、同じ条件で遠心する。得られた上清を1回目の上清と合わせ(320 mℓ)、これに16mℓ の 0.11M EDTA (pH 7.4) を加え、5分間静置後 30,000×g 20分間の遠心により上清を得る(334mℓ)。上清に25mg/ml 硫酸プロタミン液 (pH 7.4) を37mℓ加え、10分間静置後、12,000 ×g 10分間の遠心をし、得られた沈澱を 40mℓ の 0.4M 硫酸アンモニウム, 10mM Tris-HCℓ (pH 7.4), 5mM $MgCℓ_2$, 5mM β-メルカプトエタノール, 5%(W/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80mℓ加え 20分間静置後 30,000×g 20分間遠心し上清を得る(135mℓ)。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×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 (stepI)。

この段階以降、GAレプリカーゼ活性は 0°で10日間, −20°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GAレプ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、残留しているプ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たままである。GAレプ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(stepⅡ)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GAレプリカーゼは単一のピークを形成して溶出される(stepⅢ)。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

GAレプ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

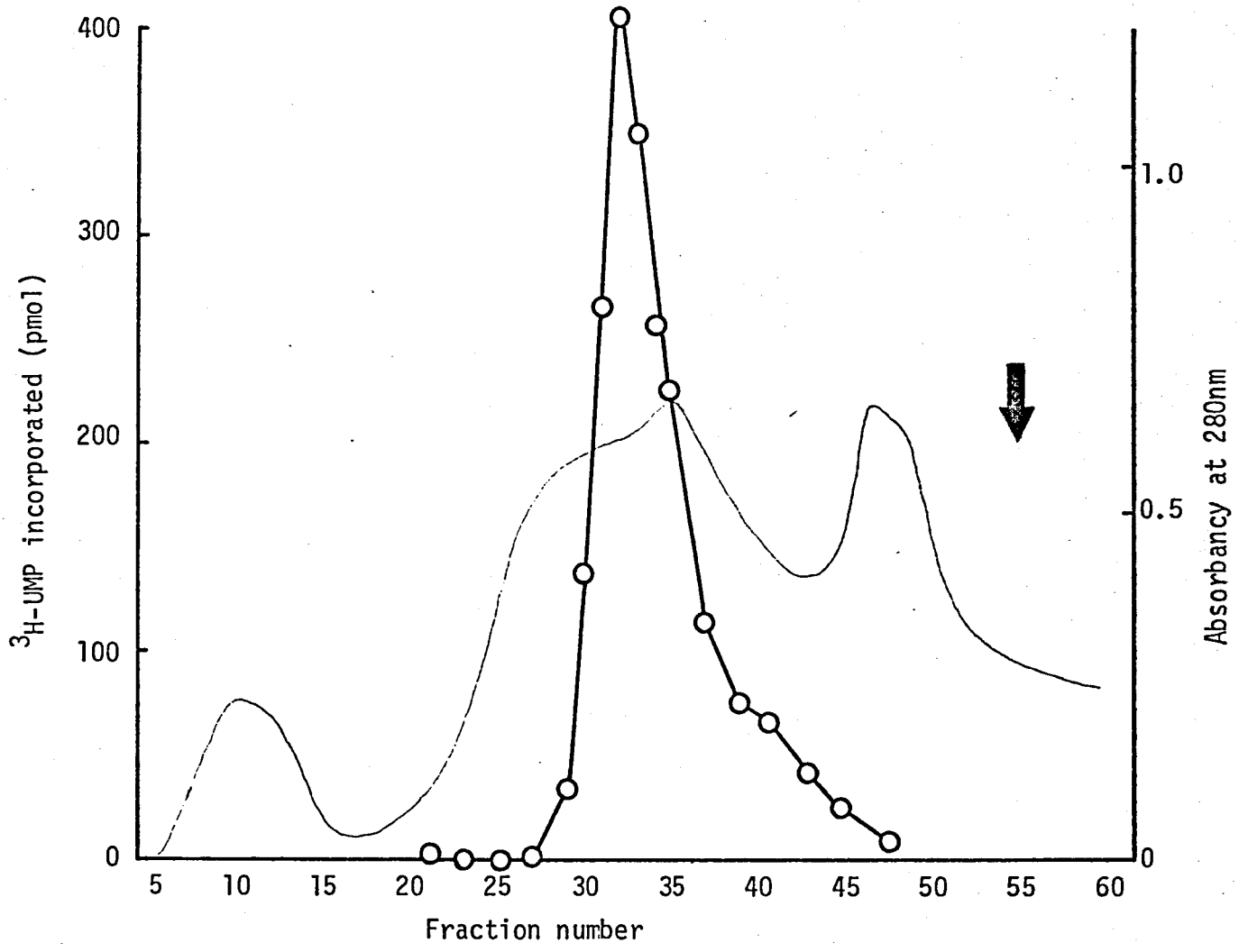

図2．塩化ナトリウム直線的濃度勾配溶出による DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

〈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容量は、カラムの10倍である。溶出は分画番号17から始めた。5μg GARNAを含む標準反応液に各分画の10μl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，—○— ； A280，— 。図中の矢印は、大腸菌RNAポリメラーゼの溶出位置を示す。

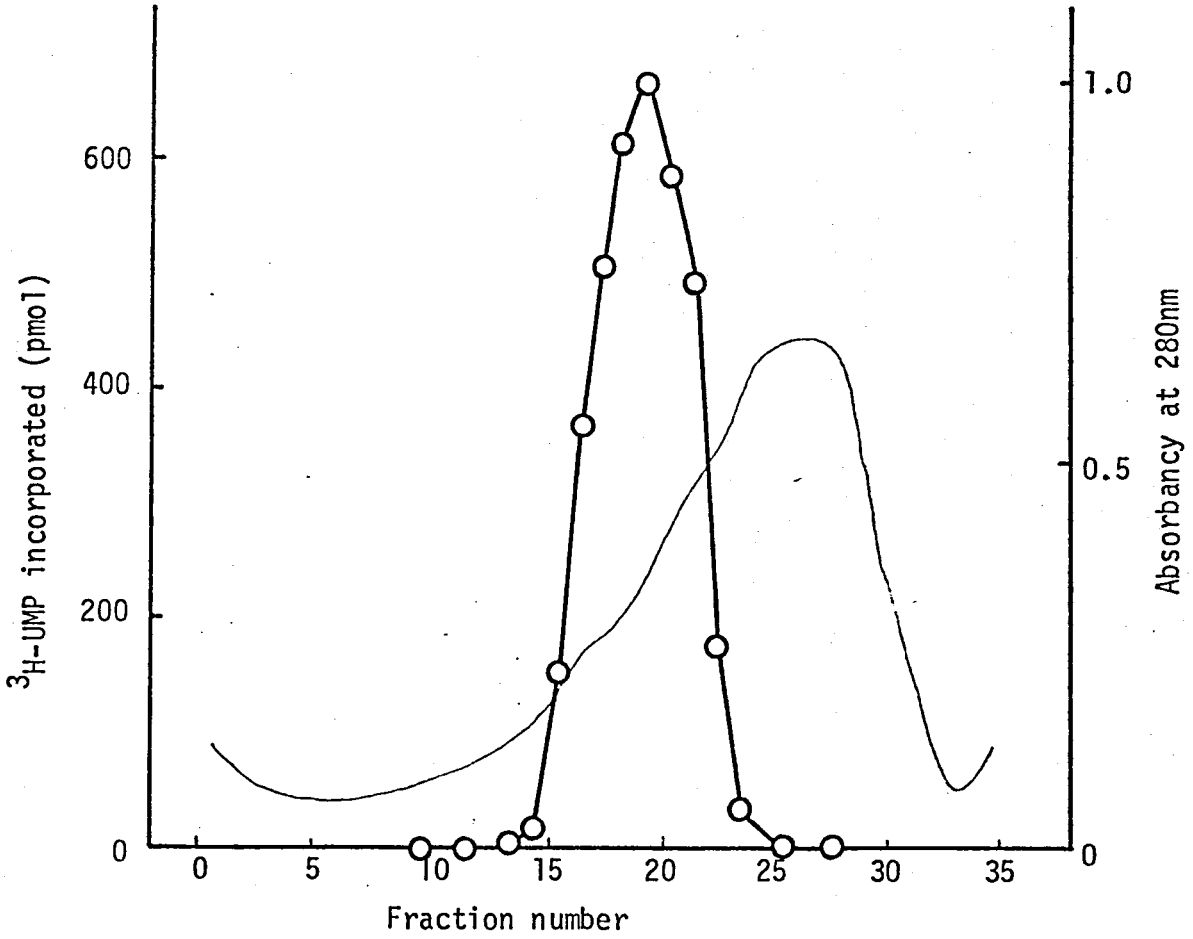

図3. グリセロール濃度勾配遠心による精製

〈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 10μl 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。GAレプ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、1/2～1/2.5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ー

GAレプ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ーにより精製され、均一な標品が得られる。このクロマトグラフィー（step Ⅴ）ではGAレプ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はそれ自身でGAレプ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GAレプリカーゼ活性を回復することができる（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ーを行なうと、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GAレプ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。

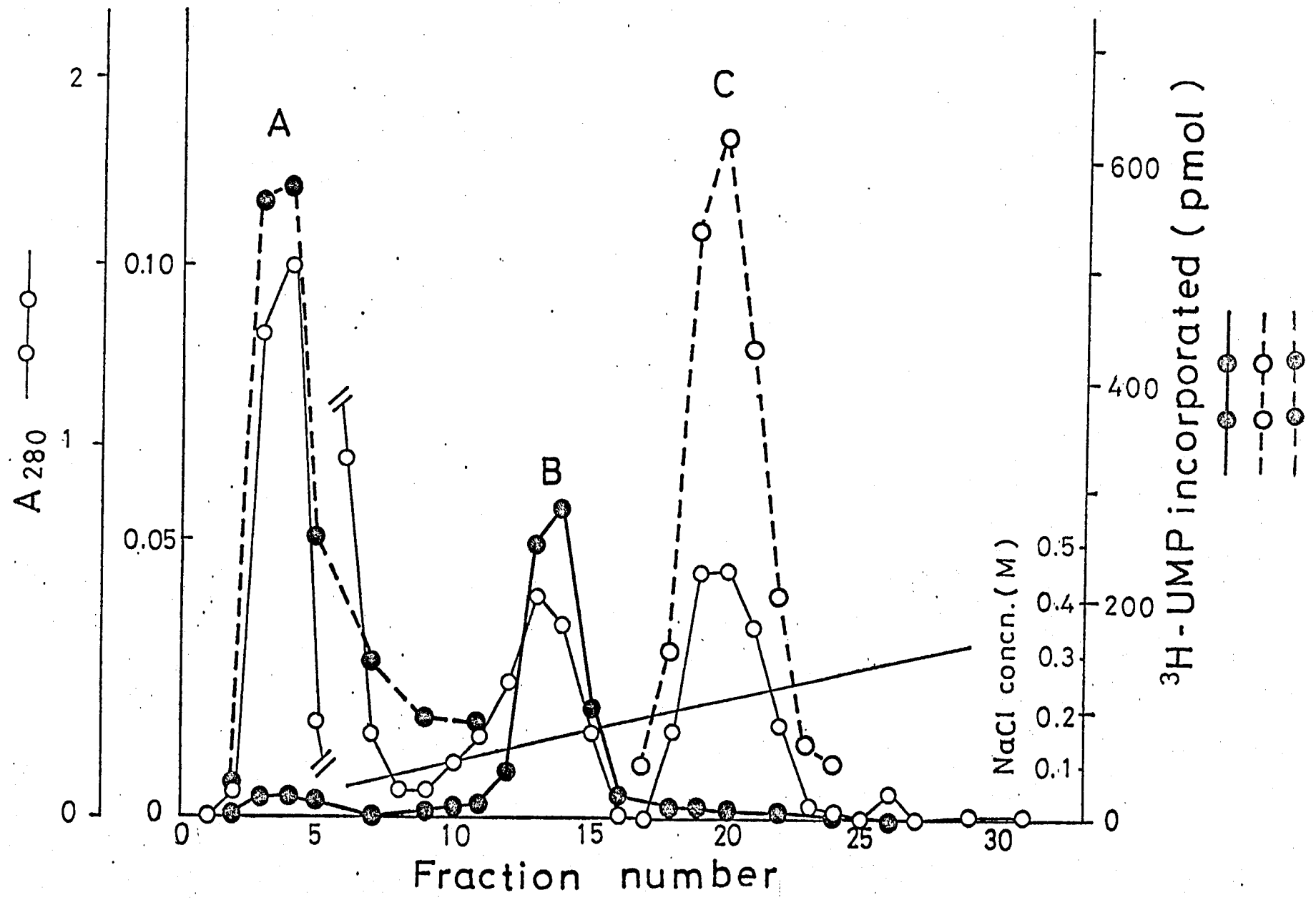

図 4. リン酸セルロースカラムクロマトグラフィー

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 カラム容積の
10倍である。
各分画 10μl (—●—), 分画19と20の混液 20μl
+ 各分画 20μl (--●--), 或いは 分画3と4の混液
20μl + 各分画 20μl (--○--) の酵素活性を図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で述べた方法に従い1時間静置
して、GAレプリカーゼの再構成を行なった。

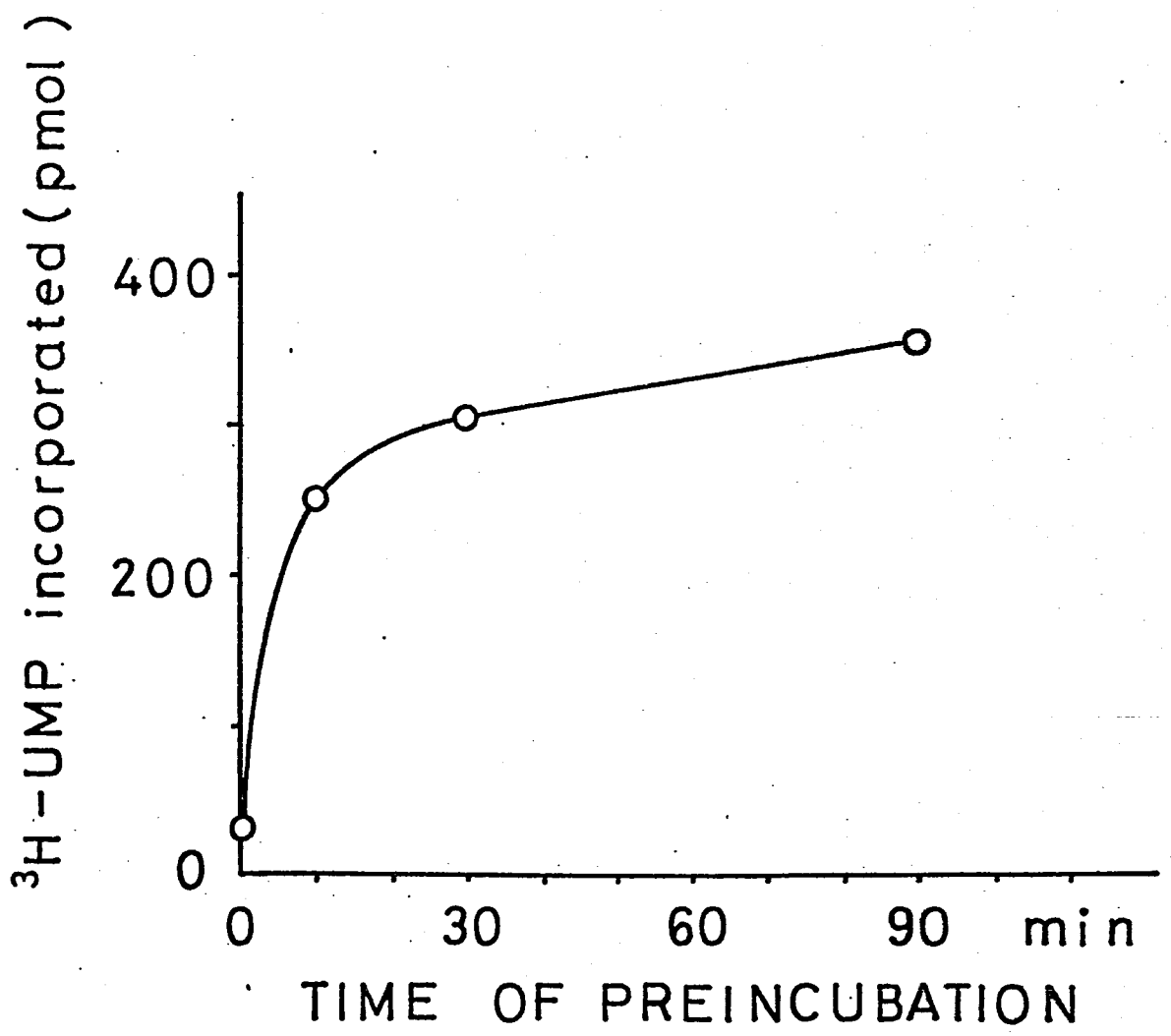

図5. GAレプリカーゼ再構成の時間経過

0.125M 塩化ナトリウムを含む緩衝液B中で Fr.A タンパク 30μg と Fr.C タンパク 1μg を混ぜ（全容量 40μl）、横軸に示した時間 0°で静置した後、5μg GA RNAを含む標準反応液に加え、<材料と方法>に従ってGAレプリカーゼ活性を測定した。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. GAレプリカーゼのサブユニット構造

Fr.BをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した結果から、GAレプ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ずれが認められる。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SI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合わせると、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。

GAレプリカーゼのサブユニットを、SP或いはQβレプリカーゼ

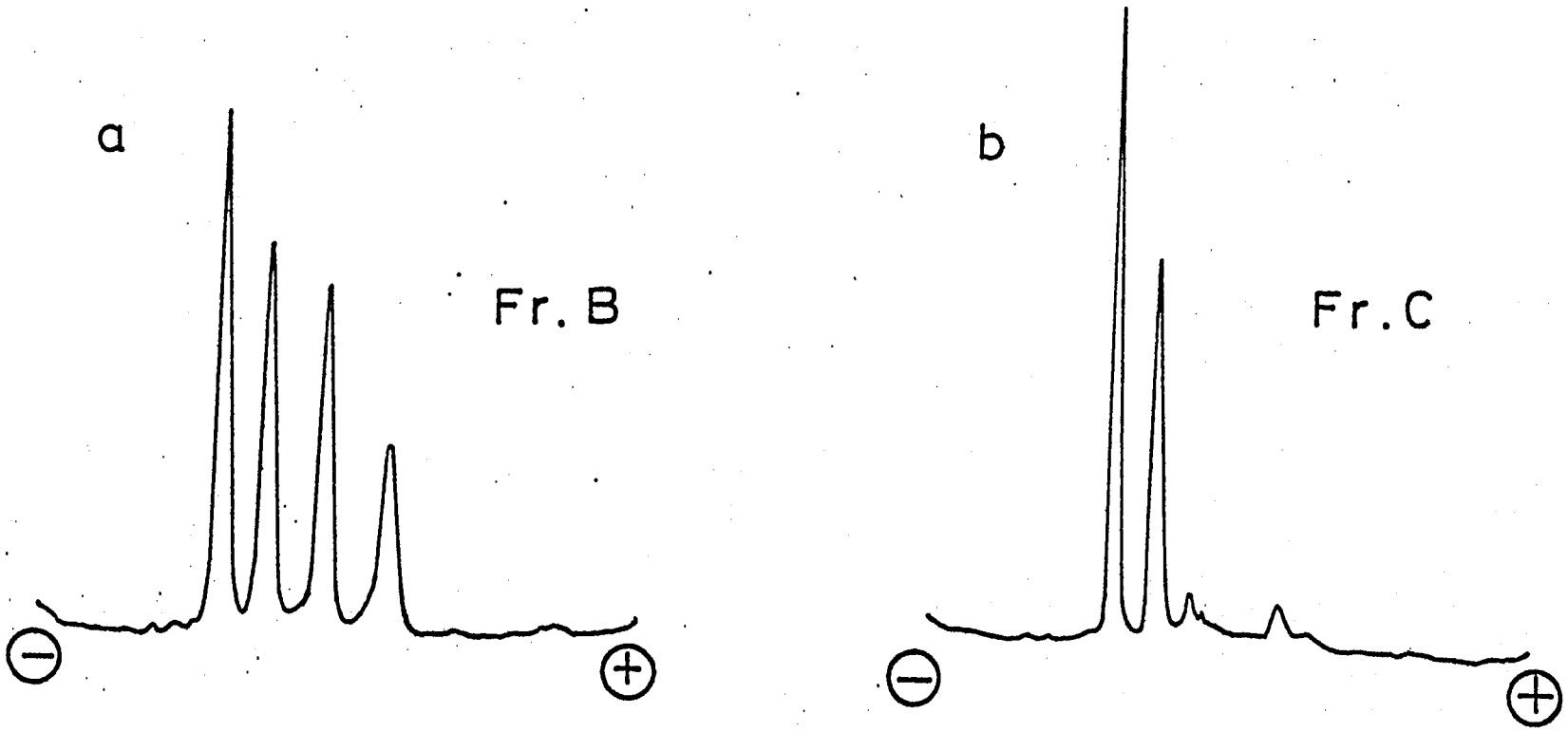

図6. SDS ポリアクリルアミド電気泳動による サブユニット構造の分析

Fr. B タンパク 3μg (a), 或いは Fr. C タンパク 2μg (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/cm², 3.5 時間である。泳動後、ゲルを、1ℓ当り 2.5g クマシーブルー, 46ml 氷酢酸, 277ml メタノールを含む水溶液中に浸し、37°で 1時間染色する。染色後、1ℓ当り 75ml 酢酸、50ml メタノールを含む水溶液中で脱色した後、デンシトメトリーを行なった。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[22])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(Qβ)レプリカーゼのそれは分子量69,000であるのに対し、GA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)。

Qβレプリカーゼのサブユニットは、IIのみがQβファージの遺伝子にコードされたタンパクであり[23,24]、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[25]、タンパク合成伸長因子EF-Tu及びEF-Ts[26]であることが知られている。従って、GAレプリカーゼのサブユニットI, III, IVはQβレプリカーゼのそれらと分子量自体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めることができた。

1. GA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、沈降線を形成する。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2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の活性と同じく、Fr.Bと混ぜ合わせることによりGAレプリカーゼ活性を回復することができる(表2)。

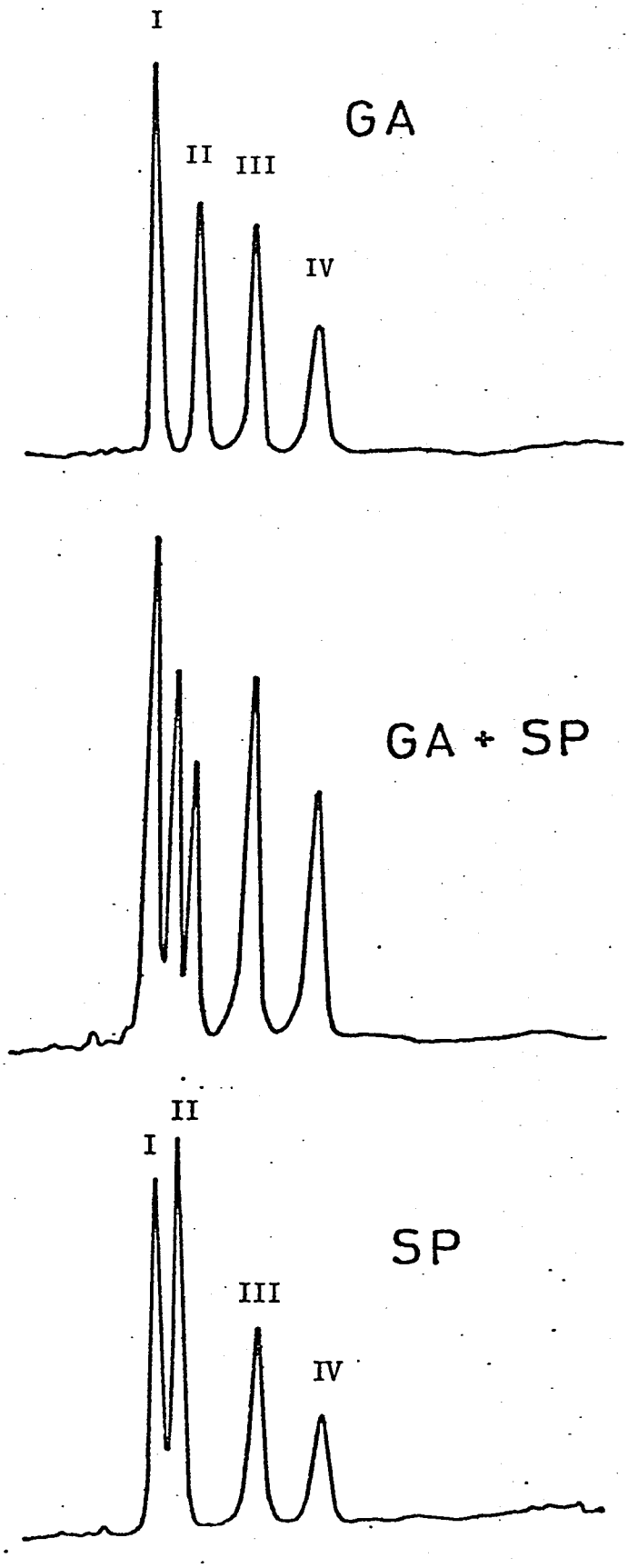

図7. SPレプリカーゼのサブユニットとの比較

GAレプリカーゼ3μg, SPレプリカーゼ3μgを単独で或いは混ぜて、図6に述べた方法で電気泳動及びデンシトメトリーを行なった。SPレプリカーゼは当研究室で調製した。[22]

SPレプ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である。[22]

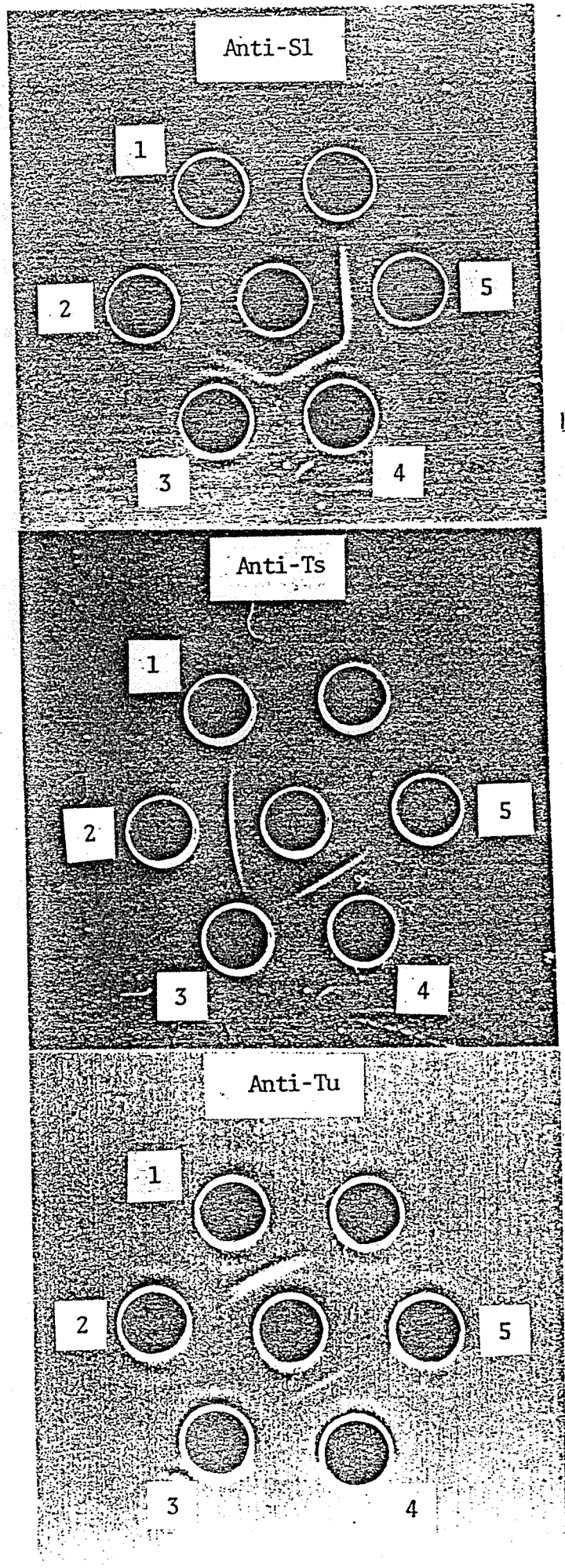

図8. 免疫学的交叉反応

真中のウエルには、それぞれの図中に示した抗体を入れた。周りのウエルには、1 EF-Tu 1.5μg, 2 EF-Ts 1.5μg, 3 S1 1.5μg, 4 GAレプリカーゼ 10μg, 5 GAレプリカーゼのサブユニットI・II複合体(F.C) 10μg, が入っている。反応は37°で36時間行なった。

combination	[^{3}H]UMP incorporated	
I•II	11	pmol
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. GAレプリカーゼの再構成

0.2M 塩化ナトリウムを含む緩衝液(40μl)中で、サブユニットI・II複合体(Fr.C) 0.5μg, Fr.A タンパク 20μg, EF-Tu 1μg, EF-Ts 1μgを適当な組み合わせで混ぜ、0°で25分間静置した後、GAレプリカーゼの活性を、5μg GA RNAを鋳型として、<材料と方法>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. GAレプリカーゼの諸性質

a) 反応の要求性及び阻害剤の効果

GAレプリカーゼの反応は、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調べた結果を要約した。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[27] 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 T1 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、GAレプ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[28]に対して高い抵抗性を示す。

b) 鋳型特異性

GAレプリカーゼがどの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
-$MgCl_2$	8	19
-GTP	13	9
-CTP	36	48
-ATP	21	-
-UTP	-	13
+rifampicin	261	314
+DNaseI	260	302
+RNaseA	3	9
+$RNaseT_1$	-	26

表3 反応の要求性および阻害剤の効果

stepⅡタンパク 75μg, GA RNA 10μg, 或いは stepⅤタンパク 1μg, GA RNA 5μg 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十系、での〔^{3}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 リファンピシン 3μg, DNaseI 10μg, RNaseA 10μg, RNase T_1 2μg 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に関しては結果を図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みられることは注目に値いする。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，Qβ RNAは、Qβレプリカーゼがこの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HFI[29]を添加しても、GAレプリカーゼに対しては不活性なままである。4. 第III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レプリカーゼの示す鋳型特異性は当初の予想通り、Qβレプリカーゼ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

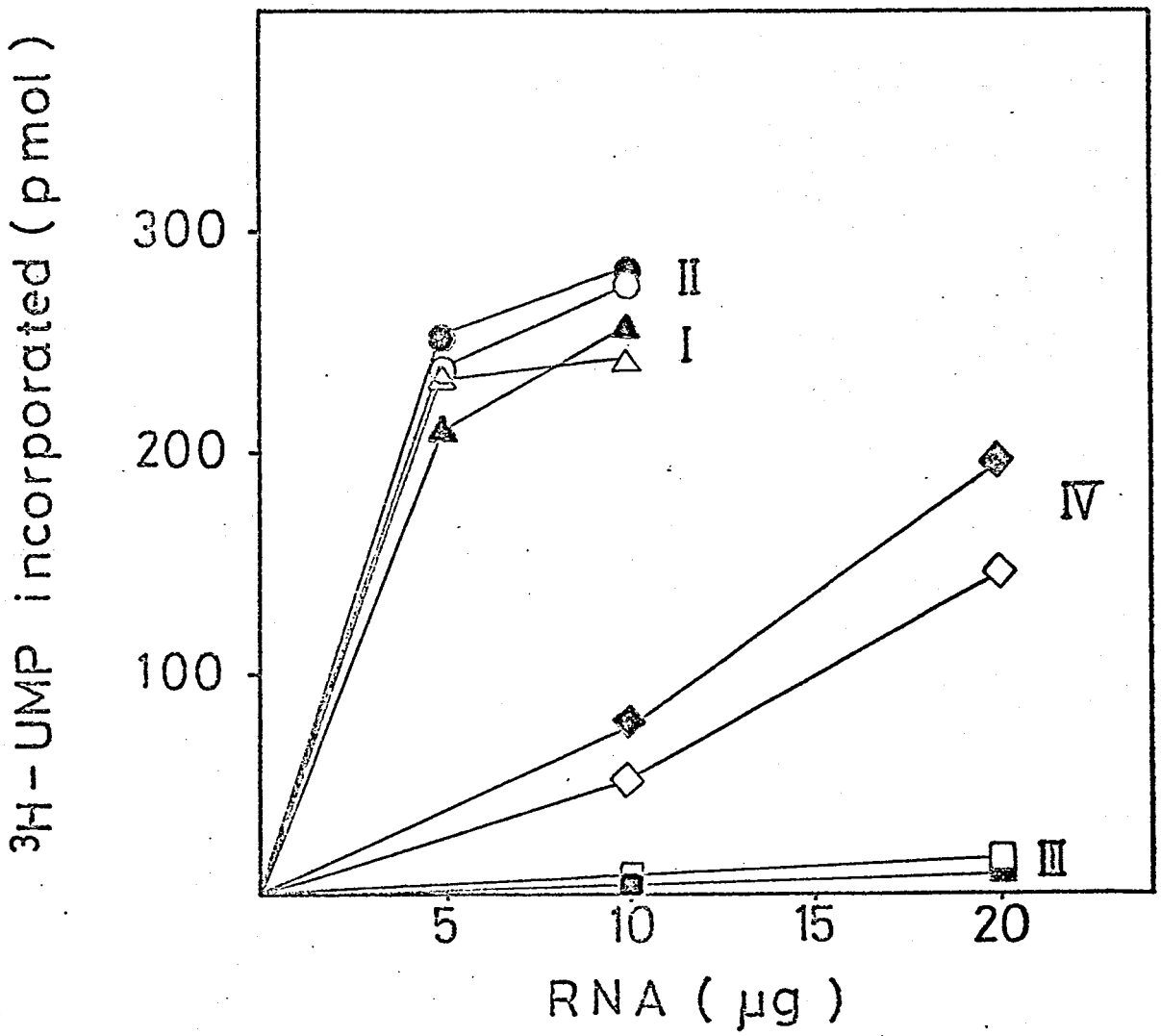

図9. 種々のファージRNAのGAレプリカーゼに対する鋳型活性

それぞれのグループ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(GAレプリカーゼは、stepⅡ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グループ f2(△), MS2(▲); 第IIグループ GA(○), SD(●), 第IIIグループ Qβ(□), ST(■), 第IVグループ FI(◇), SP(◆), の各RNAである。

性[17]を確認すると共に、現在確立されているRNAファージの分類がGAレプリカーゼに対するファージRNAのも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) GAレプリカーゼによるRNA合成反応のその他の側面

GAレプリカーゼによる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GAレプリカーゼによる反応それ自身に帰せられるべきである。また図11は、GAレプリカーゼ量と鋳型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。GA RNAのGAレプ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、レプ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。

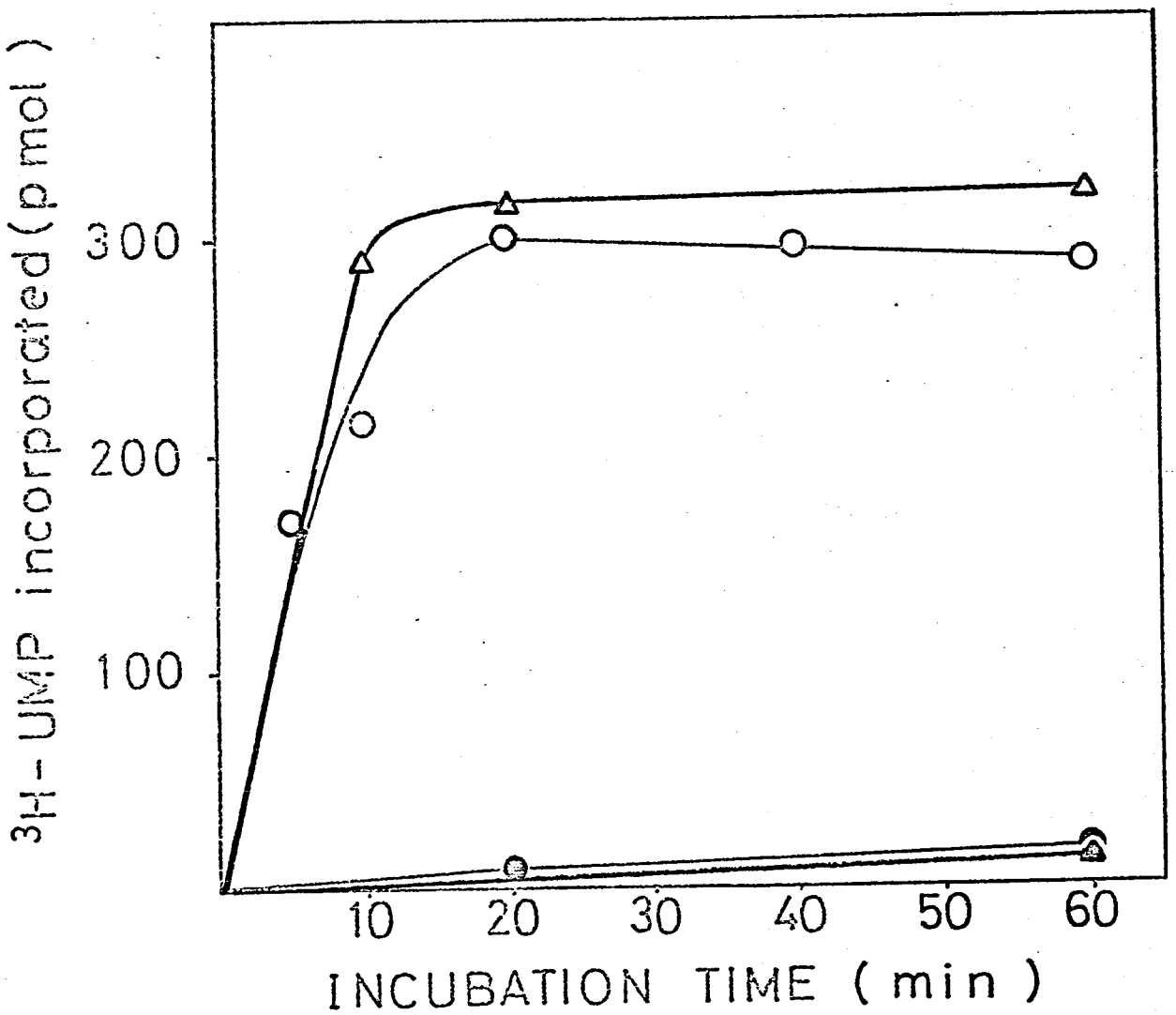

図10. RNA合成反応の時間経過

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タンパク 75μg 或いはstep Vタンパク 0.75μg を含む。鋳型 GA RNA を加える時は、step II酵素の場合 10μg, step V酵素の場合は 5μg である。
横軸に示した時間、30°で反応させた後、<材料と方法>に従って[3H]UMPの取り込み量を測定した。step II, +RNA —○—, -RNA —●— ; step V, +RNA —△—, -RNA —▲— 。

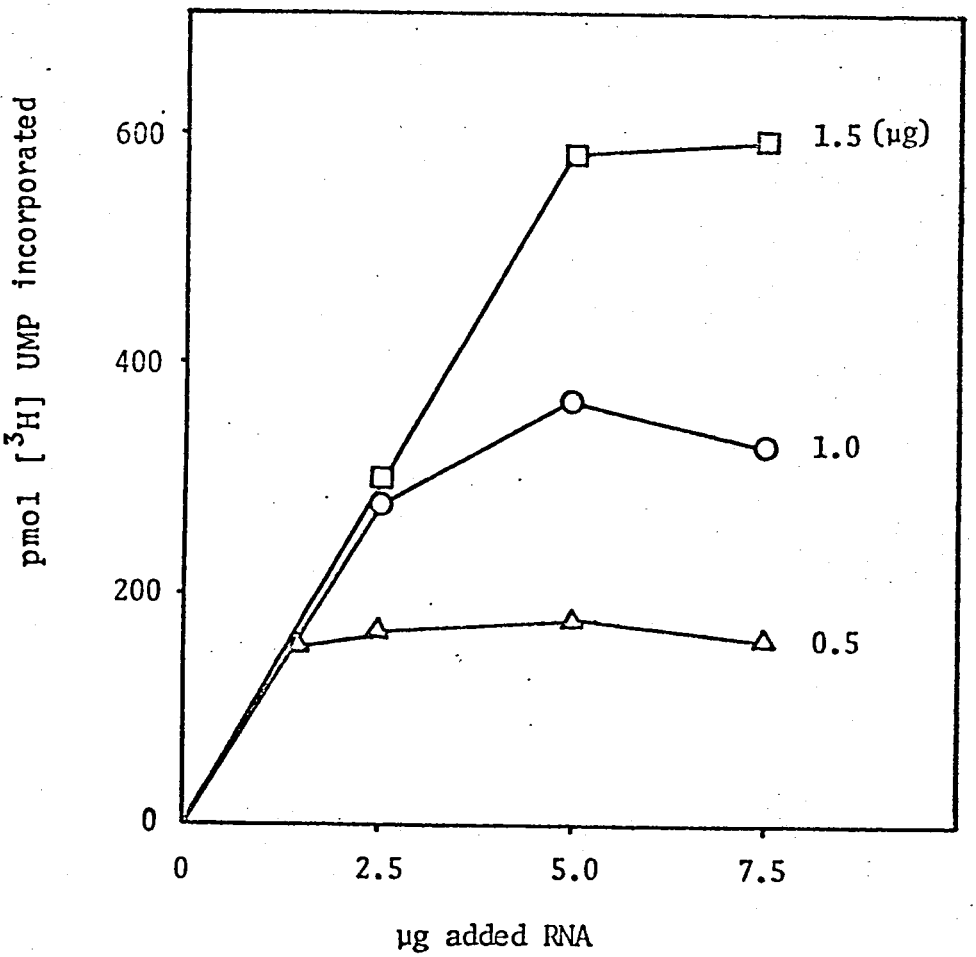

図11. 酵素量と鋳型RNA量との関係

横軸に示したGARNA量と、図中に示した量のGAレプリカーゼ(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、[3H]UMPの取り込み量を測定した。

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}C〕で標識した反応産物を、〔^{3}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ィールである。GA RNA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GA-RNA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、GA RNAと沈降速度が一致していたピークがf2 RNAの位置とは明らかにずれている。これらのことから、GAレプリカーゼ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に対応したピーク以外にそれより遅く沈降するもう一つのピークが認められる（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

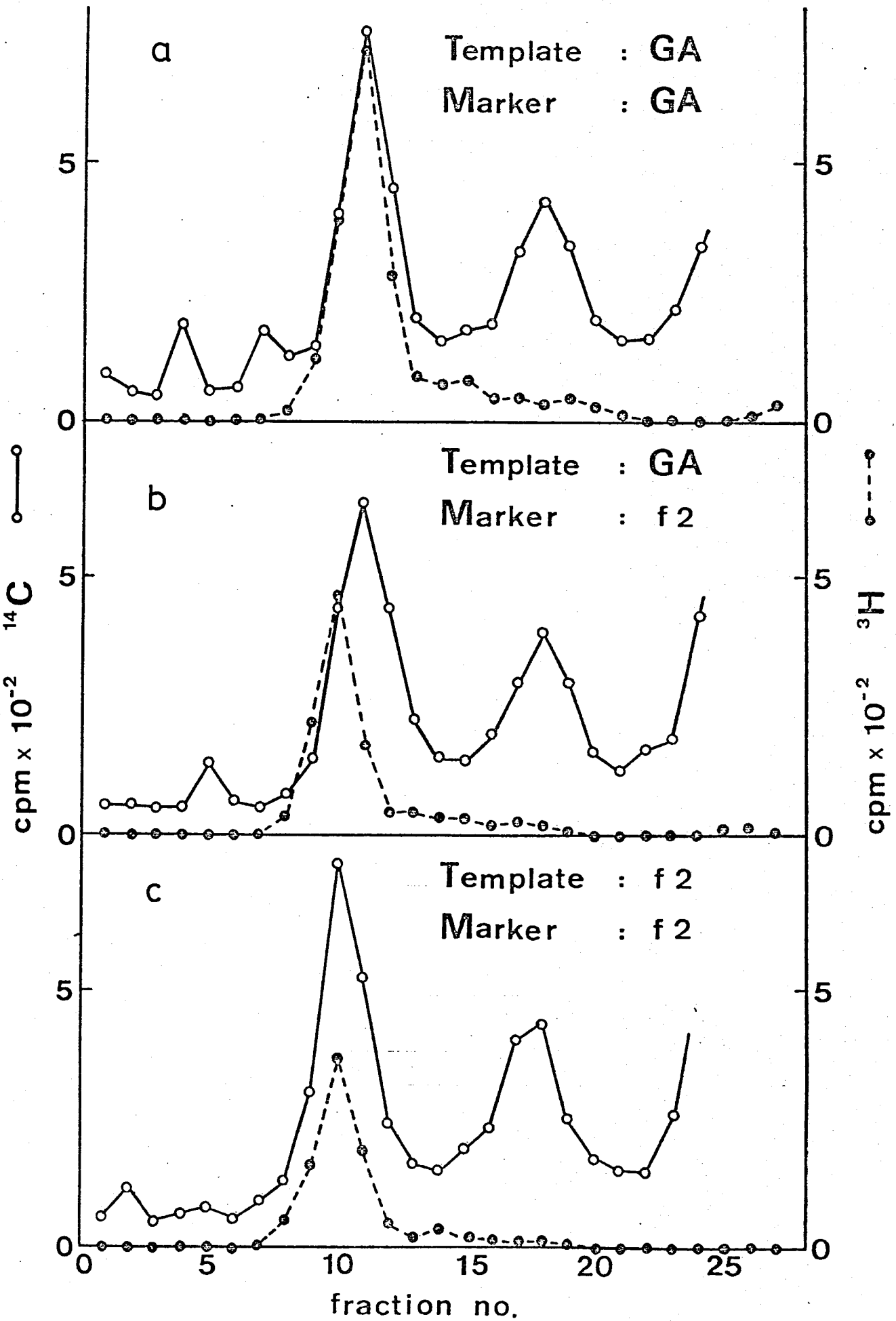

図12. GAレプリカーゼによる合成産物のショ糖密度勾配遠心による分析

図12の説明

Step Ⅲ タンパク 20μg 及び鋳型 RNA 15μg 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 5μl（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。遠心方向は図中、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。
反応に用いた鋳型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[30]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、鋳型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、アニーリングによる二重鎖形成及びその熱変性を行なった後、ショ糖密度勾配遠心による分析を行なった。まずGARNAを鋳型として合成された産物をショ糖密度勾配遠心し、23S分画を集めた。この時の反応では、10μgのGARNAを鋳型として加え、合成量は0.5μgであったから、得られた23S分画には[^{14}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ーリングした後、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鋳型RNA(プラス鎖)と二重鎖を形成するため、[^{14}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[^{14}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、アニーリング処理後23S位置のピークは消

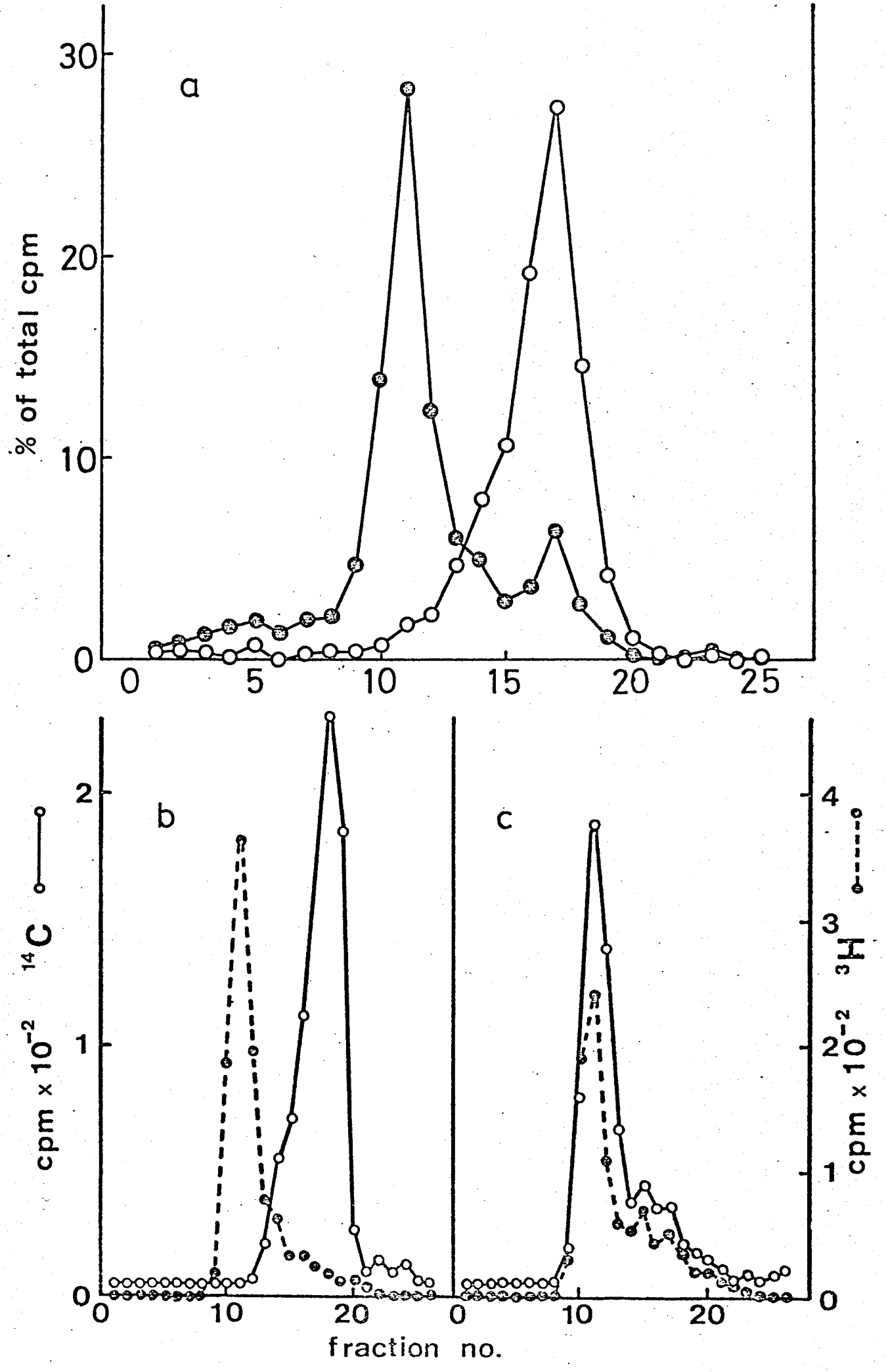

図13. 産物23S RNAの解析

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、キャリヤーとして大腸菌RNAを加え(最終濃度100μg/ml)た後、エタノール沈澱[19]によって濃縮した。標品を二分し、一方はそのまま(—●—)、他方はアニーリングを行なった後(—○—)、再遠心した。

bとC. GARNAを鋳型として合成された23S RNAをアニーリングし、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をキャリヤーとして加え(最終濃度100μg/ml)、エタノール沈澱によって濃縮した。[3H]GA RNAを加えた後、2等分し一方はそのまま(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。

失し、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起こった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を鋳型にして合成された23S RNAは殆んど全てマイナ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。これら不均一な長さを示すRNAにプラ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。

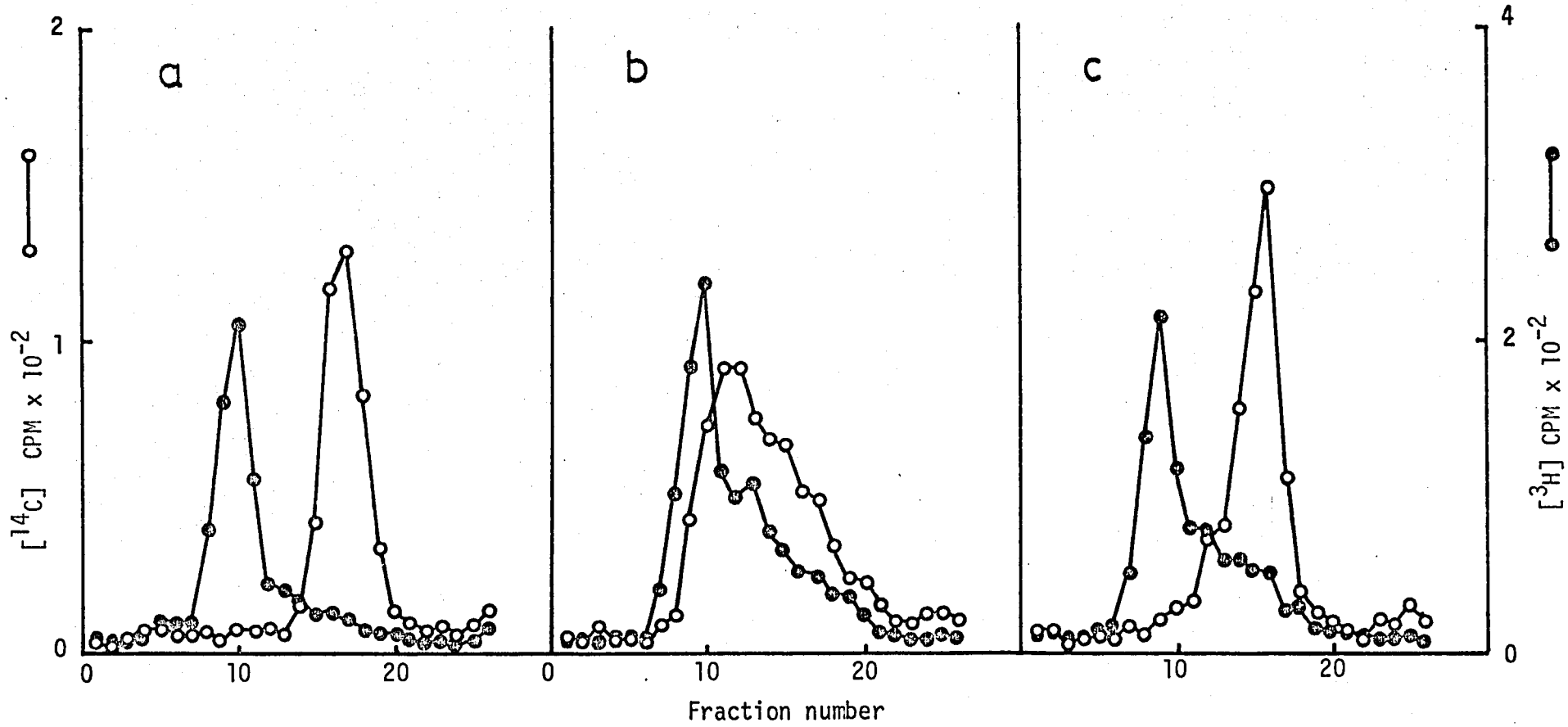

図14. 産物12S RNAの解析

図13 a で述べたのと同じ方法で、GA RNAを鋳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、3等分しそのそれを、そのまま(a)、熱変性行なった後(b)、或いは熱変性を行なった後、さらに10μg GA RNAを加えてアニーリングを行なってから(c)、〈材料と方法〉に従って5-20%糖密度勾配遠心を行なった。遠心方向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、GAレプリカーゼ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。

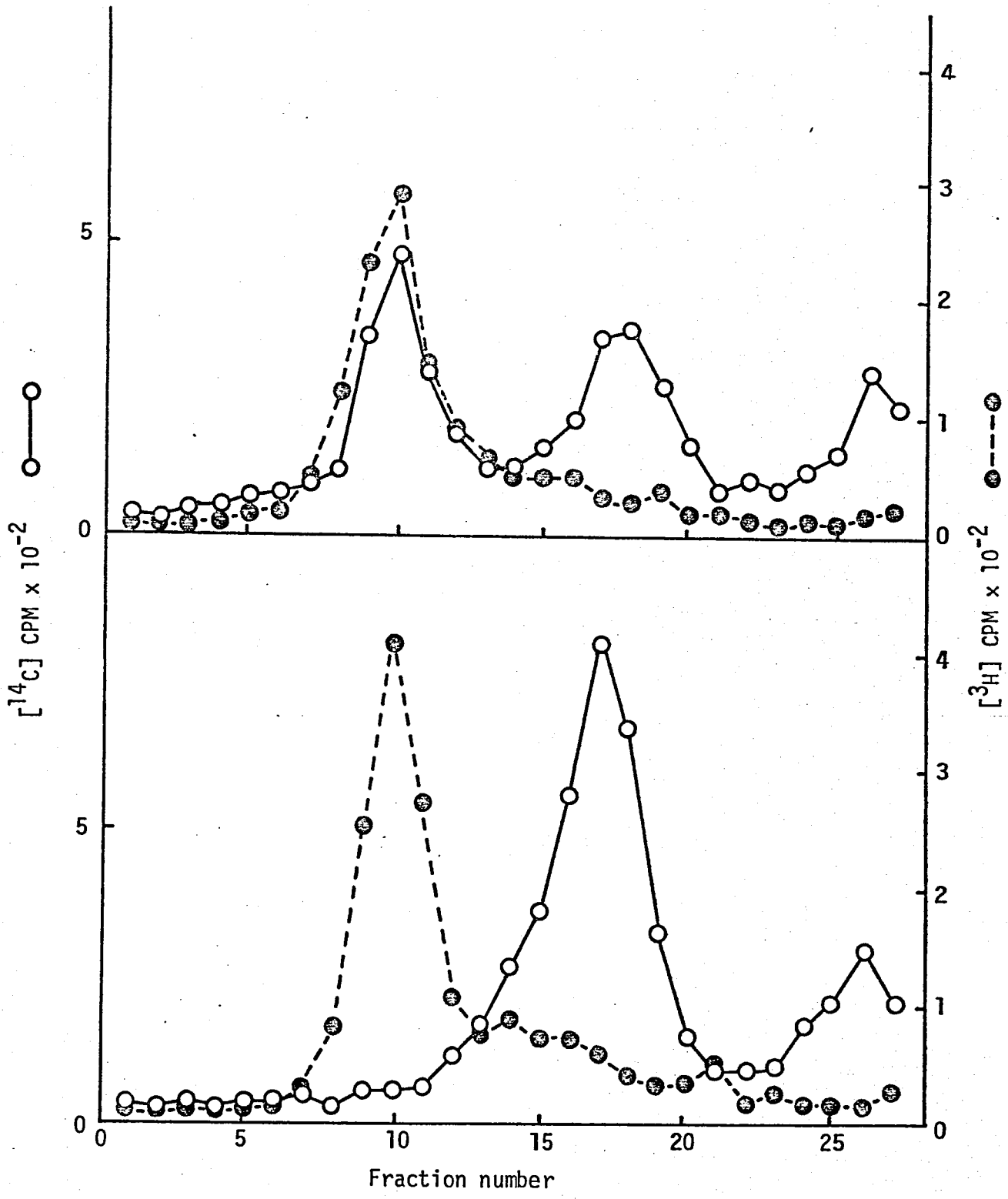

図15. f2 RNA依存反応産物の解析

<step III タンパク 40μg, f2 RNA 15μg 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 5μl 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 ショ糖密度勾配遠心を行なった。
マーカー [3H] f2 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ポ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Qβ（SP）のレプリカーゼで明らかな差異が認められた。GAのサブユニットⅡの分子量は約60,000であり、Qβ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Qβ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、f2レプリカーゼの宿主由来のサブユニットⅠ,Ⅲ,ⅣはQβレ

プ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。[18] 従って、タンパク合成系因子であるS1, EF-Tu, EF-Tsが RNAレプ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。

GAレプ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GAレプリカーゼ活性を効率よく回復することができる。また、GAレプリカーゼは他のレプリカーゼ[18,22,31]同様、人工ポリマーであるpolyCに依存してpolyG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GAレプリカーゼは、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レプリカーゼは全くRNA合成を行なわないことが報告されている。[32] 一方、GAレプリカーゼはf2 RNAを含め、いくつかのファージ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を鋳型とした反応において、f2レプリカーゼとGAレプリカー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レプリカー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[18]、f2レプリカーゼは彼らの精製法によって最終段階に致った標品（精製度約80%）においてもRNaseの混入がみられる。一方、GAレプリカーゼの標品ではstepII以降RNaseの混入は認められないにもかかわらず鋳型RNAの飽和量は通常5～10μgを要求する。このことを考えると、f2レプリカー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レプリカーゼの系に比してかなり少ない量（1～2μg）しか、鋳型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グループファージのRNAはGAレプリカーゼに対して中間的な鋳型活性を示すことが明らかとなった。それらのRNAは、Qβレプリカーゼに対しても同様に部分的な活性を示す[18]ことが知られている。従って、これらのRNAの存在は鋳型RNAの認識機構を解

明する上で有用であると考えられる。

GAレプリカーゼによるRNA合成反応は早期に停止してしまう。さらに、レプリカーゼ量とGA RNA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鋳型に対して20%を越えることはない。GAレプリカーゼによっては、Qβレプリカーゼの様に鋳型RNAの何倍もの合成量が得られない原因として、GA RNA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、GAレプリカーゼの反応が、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っ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ったもう一つのことは、ds二重鎖RNAの形成である。Weissmannらによって示された様に[11]、Qβレプ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、この様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レプ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Qβ RNAを鋳型として用いた場合、Qβレプリカーゼによって合成された産物はQβ 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[12]。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確められている。従って、GAレプリカーゼ産物に含まれる二重鎖RNAは、この様な短いRNAを鋳型にして反応した結果、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 $MgCl_2$ 存在下で65°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Qβレプリカー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'末端に至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。

これまでQβレプリカーゼ以外に、R17[33]、f2、SP[22]の各レプリカーゼが報告されているが、Qβレプリカー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レプリカーゼの反応はリファンピシ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レプリカー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レプリカーゼは、構造的、機能的にQβレプリカーゼと非常に類似している。一方、GAレプリカーゼはQβレプリカー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 RECOGNITION (Vogel, H.J., ed) pp533-547, Academic Press, New York

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. & Hofschneider, 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III グループに属するファージGAの感染菌から、初めてGAレプリカーゼを単離することに成功した。このGAレプリカーゼは(1) Qβレプリカーゼと類似したサブユニット構成をしているにも、かかわらず、全く異なる鋳型特異性を示す。(2) Qβレプリカーゼは、単独ではQβRNAに依存したRNA合成を行なうことができないのに対し、GAレプ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、GAレプ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, GAレプ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索を行なった。その結果、促進因子はGAレプリカーゼ精製法に従って分画して行った時、早い段階でGAレプリカーゼとは分離されてしまう分画から検出された。この因子は最初、GA

感染宿主から検出されたが、その後非感染菌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セファデックス A-50は Pharmacia社から購入した。

GAレプリカーゼは Step血標品を用いた。

方法； GA-HFの単離及び部分精製

大腸菌Q13の凍結菌体を、GAレプリカーゼ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100mlあたり31g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×g 10分間の遠心により集める。沈澱を10mMリン酸ナトリウム(pH7.4), 1mM EDTA, 5mM β-メルカプトエタノール, 0.2M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5mg/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×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

緩衝液Aで平衡化しておいたDEAセファデックスA-50カラム（80mgのタンパクに対し5cm×2.2cm）に吸着させる。吸着後、0.05M塩化ナトリウムを含む緩衝液A，続いて0.30M塩化ナ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、0.30M分画に回収される。本実験では、この標品を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ケ月間は、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DEAセルロースカラム（30mgのタンパクに対して8cm×1.6cm）に吸着させ、0Mから0.5Mまでの塩化ナ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、5μgのGA RNAの存在下でレプリカーゼ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GA RNA量との関係を調べた結果（図1）から、促進効果は鋳型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108μgのGA-HFを添加した場合、鋳型RNAが5μgの時反応は2～3倍促進されるのに対して、鋳型が1μgの時には約30倍に達している。これまで調べた限りでは、鋳型RNAが0.1～5.0μg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レプリカーゼ量にも比例する。そして、これまで調べられた限りにおいて、GA-HF量，GAレプリカーゼ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GA RNA量を変えていった時、合成量を示す曲線は、1μg RNAを境にして二相になっている。この理由は、1μg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レプリカーゼ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

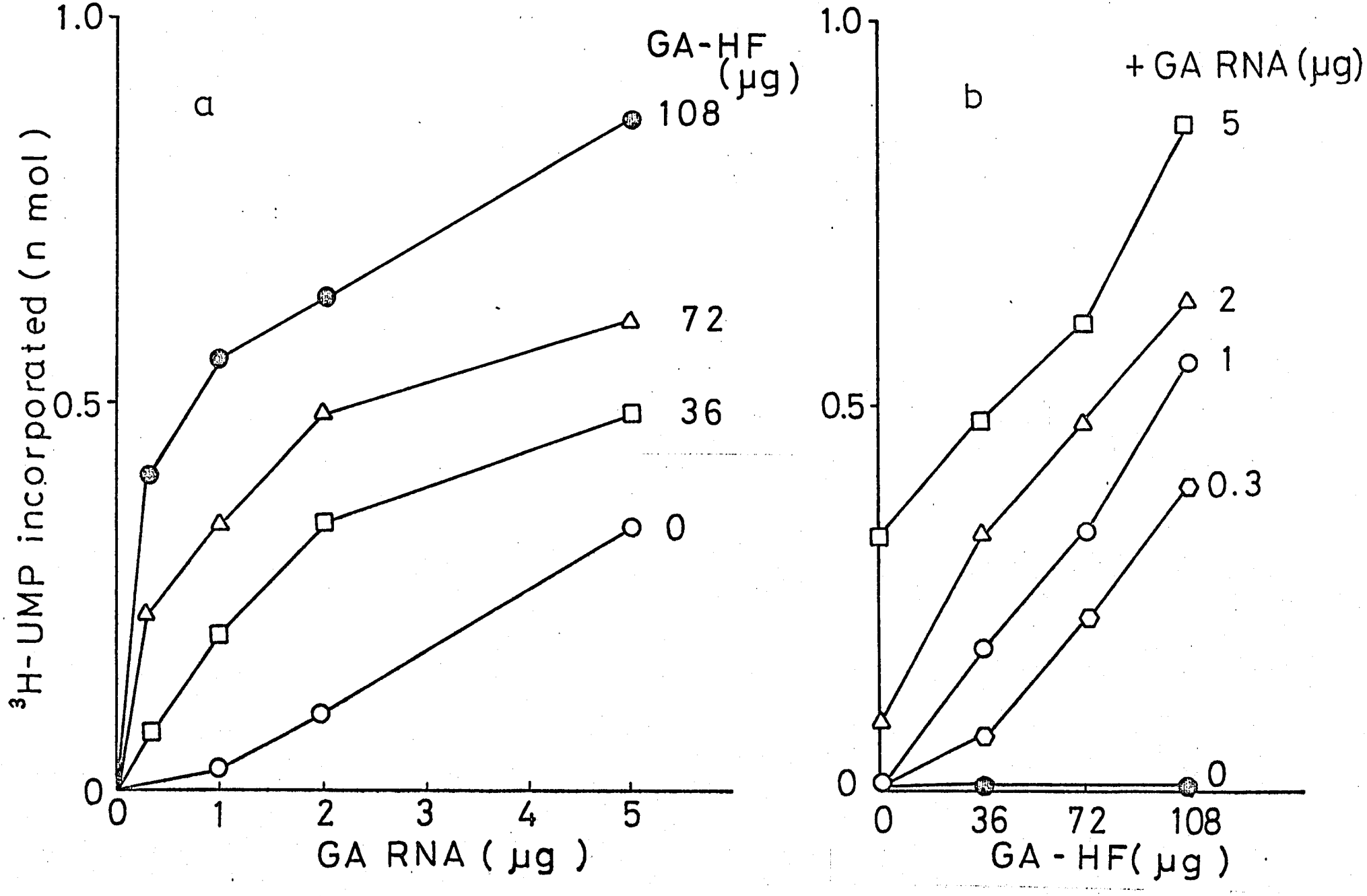

図1. GA-HFによるRNA合成反応の促進

図1の説明

a. GAレフプリカーゼ 20μg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° 60分間の反応の後、[3H]UMP取り込み量を測定した。

b. aで得られた結果を、GA-HF量を横軸にとってプロットしなおしたもの

GA replicase	GA-HF	GA RNA	^{3}H-UMP incorporated (pmol)
+	+	−	0
+	−	+	32
−	+	+	4
+	+	+	682

表1. GAレプリカーゼ, GA RNA, GA-HFの関係。

GAレプリカーゼ 20μg, GA-HF 108μg, GA RNA 1μg をそれぞれ加えた(+)或いは除いた(−)標準反応液を30° 60分間の反応後、〈材料と方法〉に従って[^{3}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, レプリカーゼ, GA-HF, 三者の関係を表わしたもので、反応系から鋳型RNA, レプ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、GAレプリカーゼによる1μg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GAレプリカーゼと共存するとレプリカーゼの合成能を促進する活性をもつことがわかる。

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が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様になる。また、GA-HFを添加した反応系で、より多くの鋳型RNAが存在している時、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0.2μgの時も1.0μgの時も合成量は共に同じく約5μgに達している。

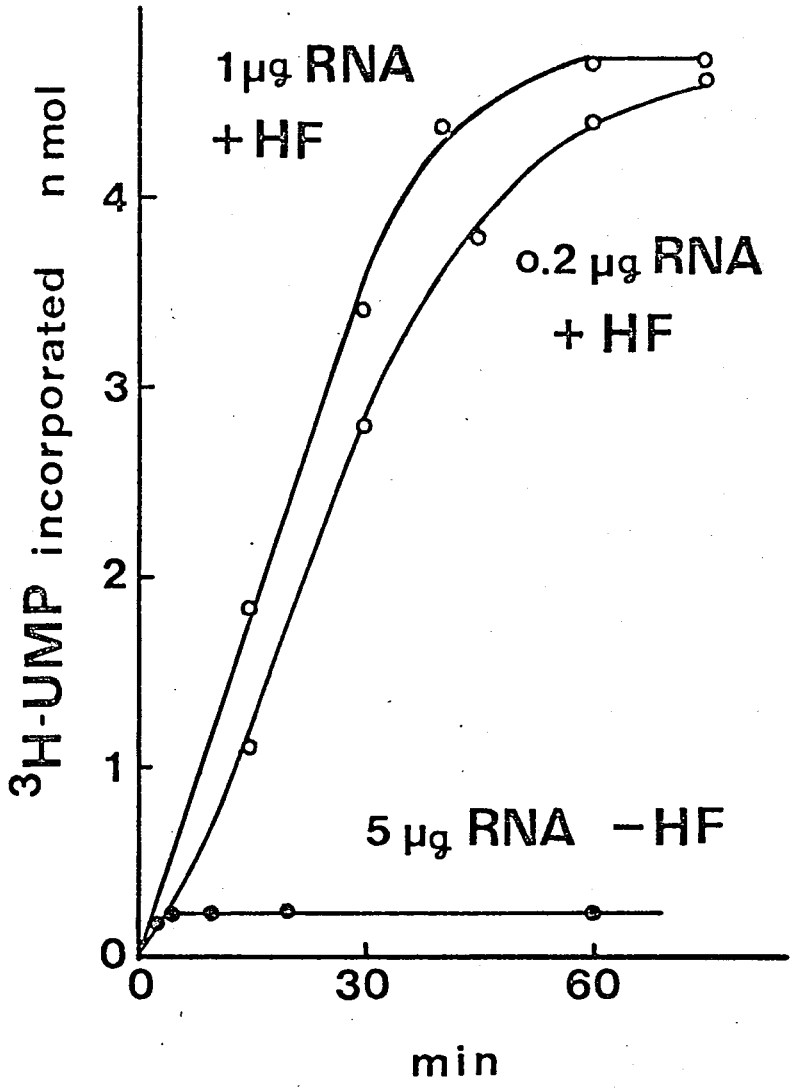

図2. RNA合成反応の時間経過

GAレプリカーゼ 24μg, GA RNA 5μg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 0.2μg或いは 1.0μg)にGA-HF 120μgを加え、各反応時間ごとに40μlを取り出し、[3H]UMPの取り込み量を測定した。図には、0.25mlに還算した値をプロットした(—○—)。

結果は示さないが、反応に加えるGA-HF量をより少なくした時、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レプリカーゼは反応液に鋳型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。[1] GAレプリカーゼも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がどの様な大きさであるかを知ることは、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

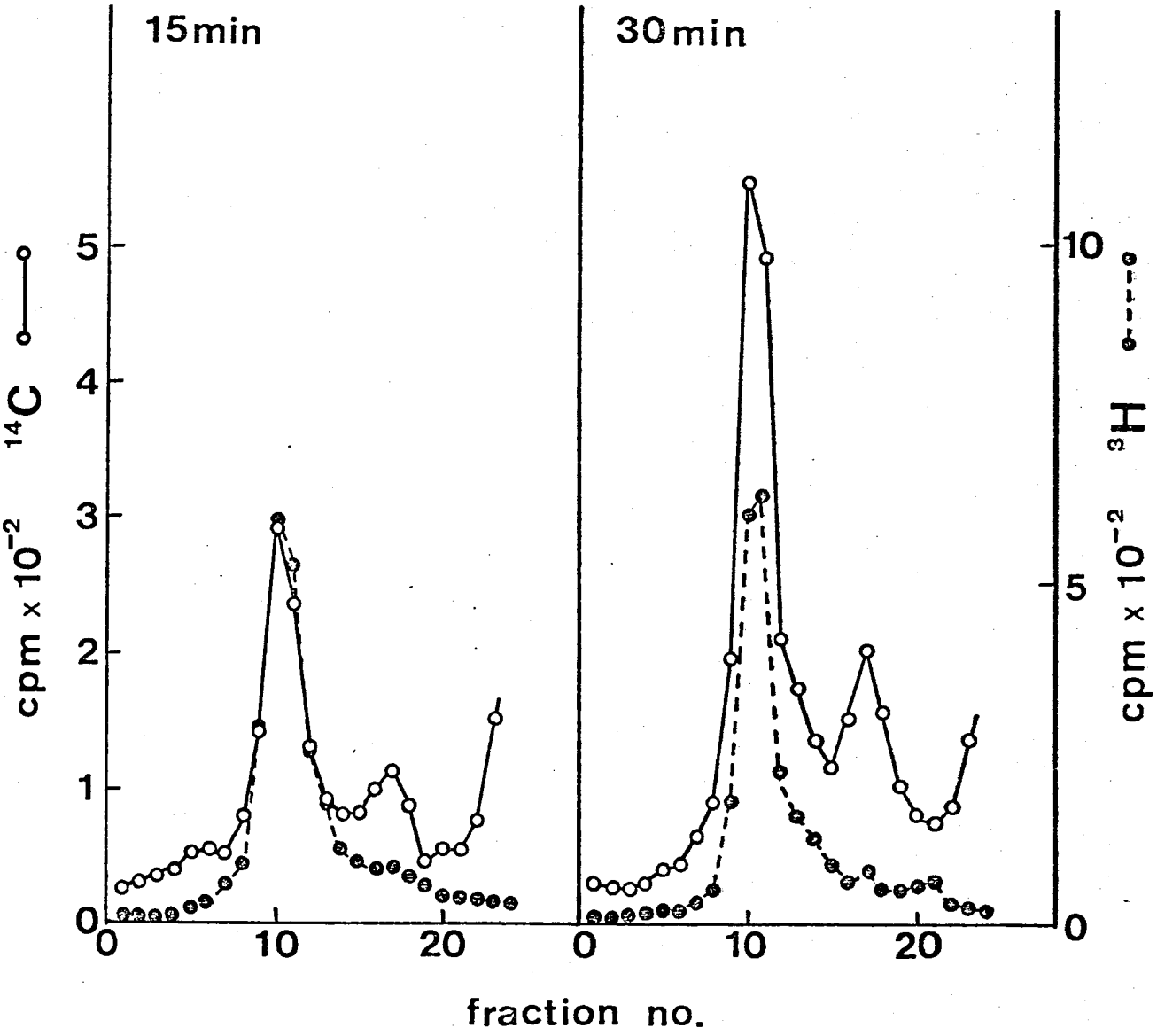

図3. 反応産物のショ糖密度勾配遠心による解析

GAレプリカーゼ 12μg GA RNA 0.5μg, GA-HF 60μg を含む反応液 0.125 ml (標識基質 [14C] ATP 7.5mCi/mol) を30°で反応させ、15分目、30分目に40μlずつを取り出し、氷水中で冷却した。160μl の 10mTris-HCl (pH7.4), 10mM EDTA を加え、さらにマーカー [3H] 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。

鋳型DNA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にプ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を加えアニーリング処理を行なった後ショ糖密度勾配遠心を行なった。ここでは、プラス鎖を含んでいないことが明らかとなっているGAレプリカーゼ単独により合成された産物を標品に混ぜ、アニーリング処理によって二重鎖形成が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-HTを添加した系で合成された産物の中には、アニー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-HT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、二重鎖形成は完全進行したことがわかる。この結果から、GA-HTに依存した反応では、マイナス鎖ばかりでなくプ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の沈降パターンをみると、アニーリング

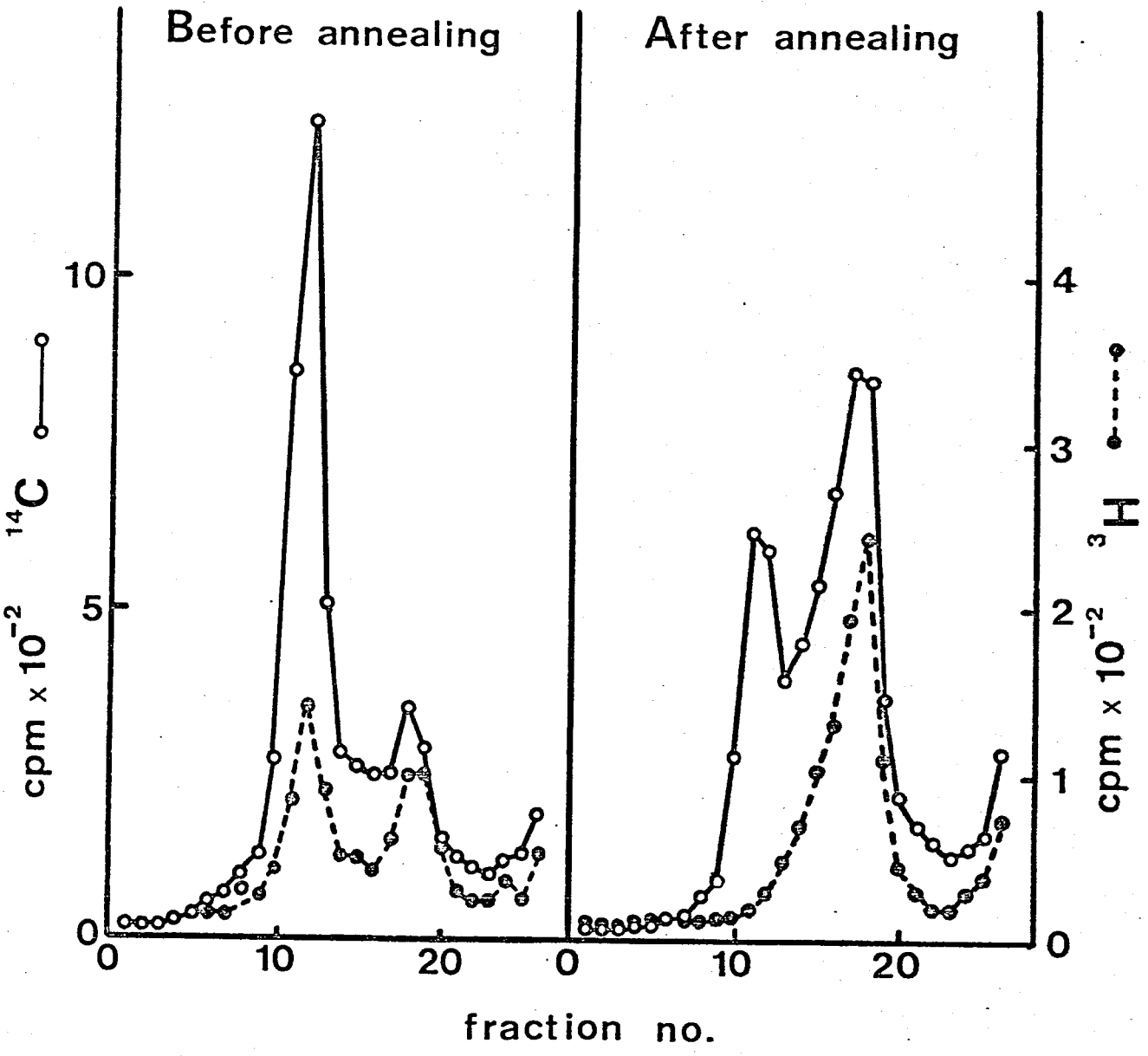

図4　アニーリング実験

図3で述べたものと全く同じ組成をもつ反応液0.125mlと、GAレフリカーゼ24μg及びGARNA 10μg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を6μl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〉に従ってショ糖密度勾配遠心を行なった。アニーリング時、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った。

処理後あらわれた12Sのピークは非対称的で、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がわかる。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、アニーリング処理により、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[2]）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[3]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も支持される。即ち、ここでは非標識GA RNAによる捕捉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指定される。

d）RNA合成に及ぼす塩の効果

GA-HFを加えない時、GAレプリカーゼによる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

り、より抵抗性になることを示したのが図5である。5μgのGARNA存在下でGAレプ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、1μg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、GAレプ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5μg加えた時、起こるRNA合成反応に対する塩の効果を調べた。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%阻害と受け、第二相では200mM以上である。そして、この曲線は、GAレプ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、GAレプ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1μgでも5μgでも合成量がほぼ同じことから、1μgで飽和に

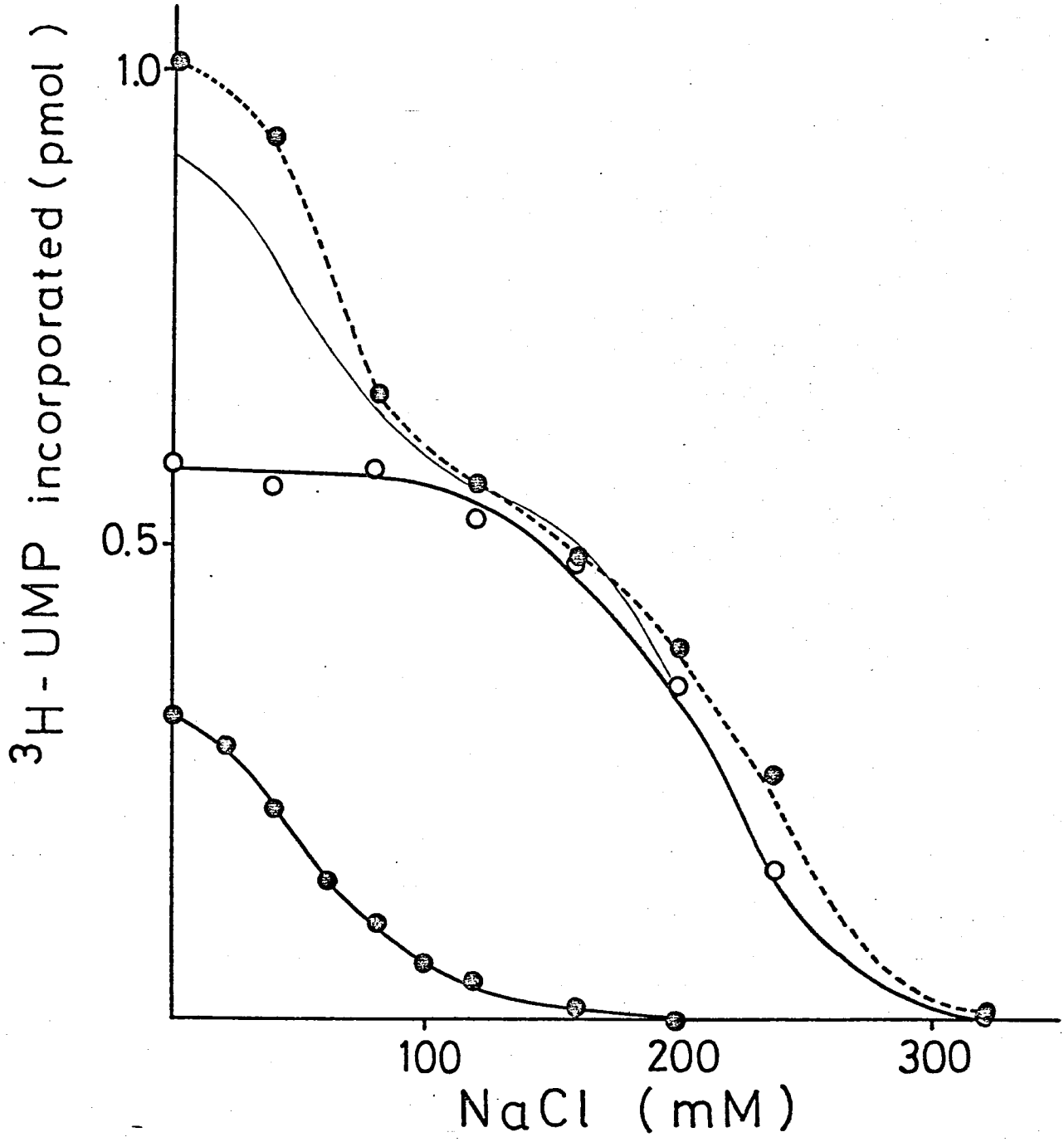

図 5. 反応におよぼす塩の効果

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 GA レプリカーゼ 24μg, GA RNA 5μg (—●—); GA レプリカーゼ 24μg, GA RNA 1μg, GA-HF 120μg (—○—); GA レプリカーゼ 24μg, GA RNA 5μg, GA-HF 120μg (--●--); を加えて, 30° 40分間反応させた後, [3H] 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。

違っ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レプリカーゼにどの様なRNAが鋳型活性を示すかを調べてみた。その結果(表2)、Qβ 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レプリカーゼのみの反応系と比較して、注目すべき点は第Ⅱグループファージ 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グループファージ 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。SPRNAについては、図6に示した様にGA-HFの量を増していっても全く反応の促進を受けないことがわかる。

f) GA-HFとQβ-HFとの関係

次にQβレプリカーゼによる反応に必須な因子であるQβ-HFとGA-HFとの関係を調べてみた。Qβ系の因子は、Augustらによって、HFIと名づけられている[4]が、ここではGA-HFに対比させてQβ-HFとした。それぞれ2種類ずつのRNA、レプリカーゼ、HFを組み合わせて

Template RNA	GA-HF —	GA-HF +
R17 (I)	37	431 pmol
GA (II)	26	466
Qβ (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

GAレプリカーゼ 20μg, GA-HF 108μg, 表に示した鋳型RNA 1μg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。ファージ名の後の括弧内は、所属するグループを示す。また表中において、— は鋳型RNAを加えなかったことを示す。

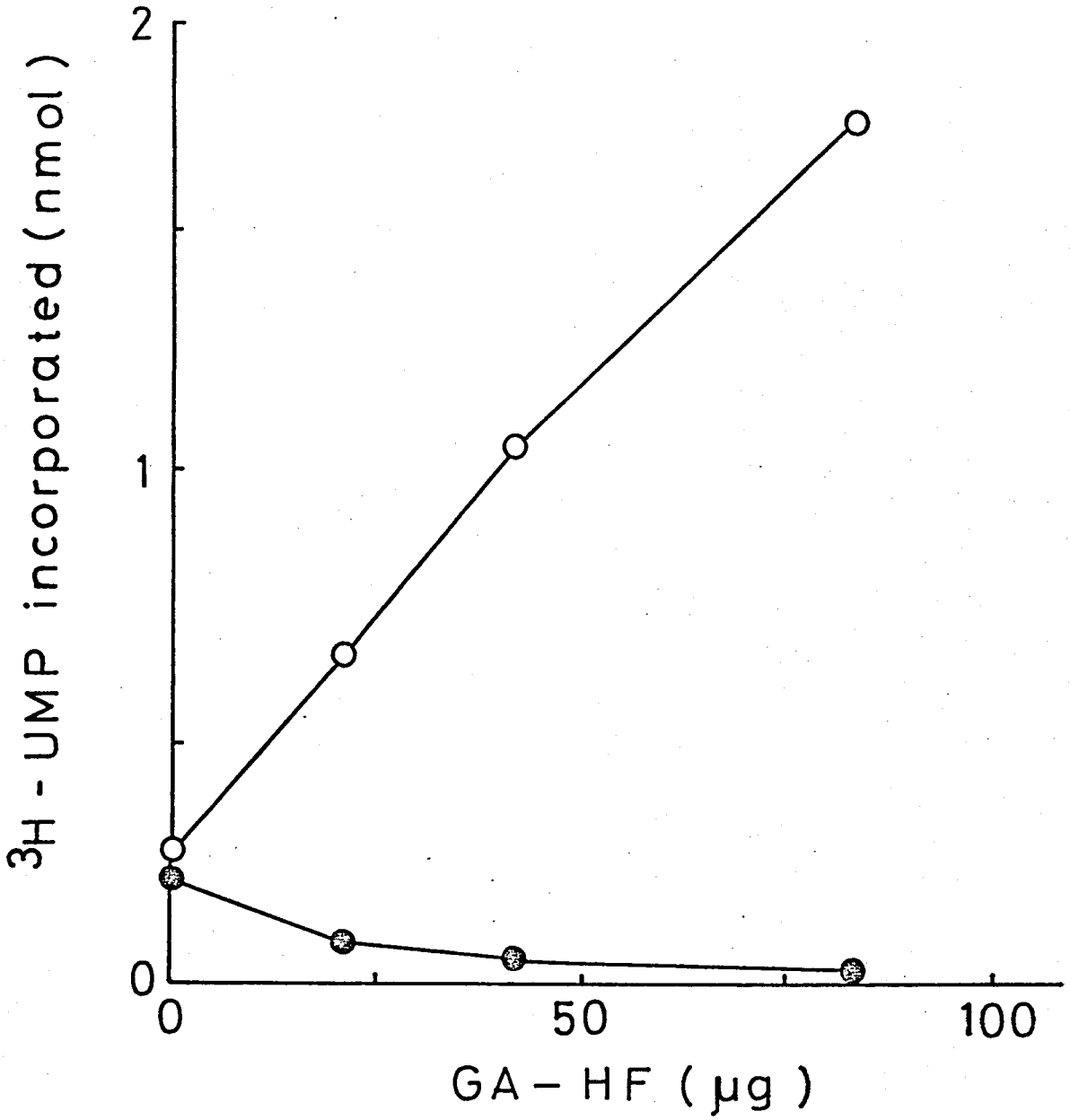

図6. GA RNAとSP RNAを鋳型にした反応におよぼすGA-HFの効果

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

反応させた結果（表3）、Qβ RNA + Qβレプリカーゼ + Qβ-HF 或いは GA RNA + GAレプリカーゼ + 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Qβレプリカーゼ標品に、Qβ-HFが少し混入しているため、Qβ-HFを添加しなくともQβ 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Qβ-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Qβ 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。

g) 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って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て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		Qβ Replicase	
	GA-RNA (1μg)	Qβ-RNA (1μg)	GA-RNA (1μg)	Qβ-RNA (1μg)
-	16	2	9	63
GA-HF	822	5	9	83
Qβ-HF	18	5	4	500

p mol

表3. GA-HFとQβ-HFとの関係

GAレプリカーゼ24μg或いはQβレプリカーゼ1μg，GA-HF 100μg或いはQβ-HF 4μg，GA RNA 1μg或いはQβ RNA 1μg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[3H]UMP取り込み量を測定した。Qβレプリカーゼ，Qβ-HFは当研究室で調製したものを用いた。

表中，—はいずれのHFも含まない反応系を示す。

標品のイオン強度を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クロマトグラフィーを行なった時、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ケ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. 限外沪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は沪過されるが 成分Ⅱは殆んど全く沪漏されない。4. 成分Ⅰはタンパク濃度が 10μg/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°で活性の半減期は1日以下）。5. 成分Ⅱは、0.5

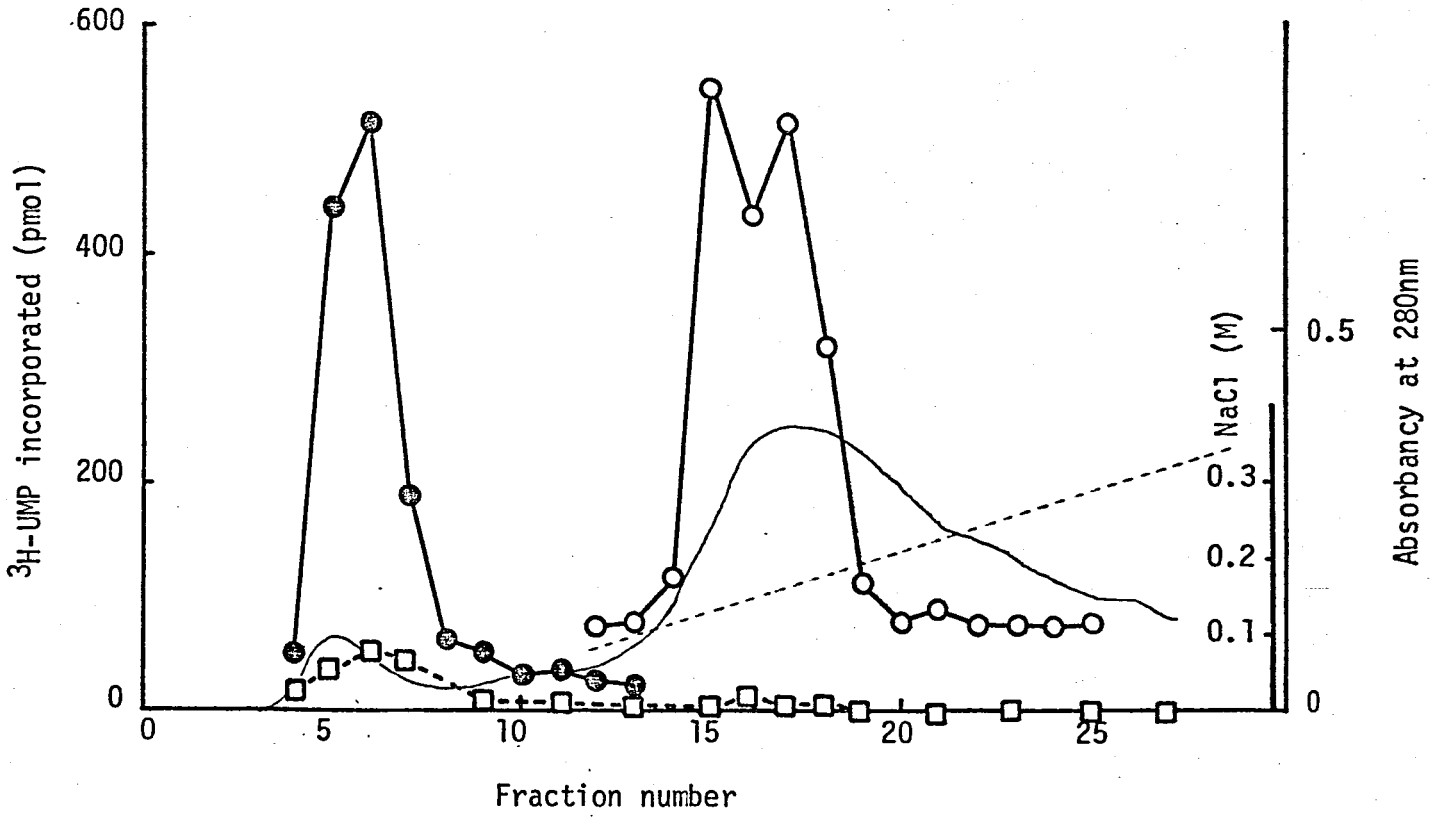

図7. GA-HFのDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

GA-HFのカラムクロマトグラフィーを〈材料と方法〉に従って行なった。GAレプリカーゼ48μg, GA RNA 1μgを含む標準反応液に、各分画40μl (--□--), 分画5と6の混液40μl + 各分画40μl (—○—), 或いは分画15から18までの混液40μl + 各分画40μl (—●—) を加え、30°40分間の反応の後、〈材料と方法〉に従って〔^{3}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

GAレプリカーゼによる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)プ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（1μg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GARNA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、合成されたプ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。

GAレプリカーゼは、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GAレプ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の存在下でプ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ナ

マイナ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ずである。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。従ってマイナ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ひ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。

Qβ-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[4]。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Qβ-HFに代わってQβ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Qβ-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, f2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[5]全一次構造が既に決定されており、またJacobsonら[6]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[7], f2 RNA[7]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[8]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、QβRNA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-H下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、Qβ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, 121-193

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) Fiers, 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. & Fiers, 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だ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。