The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	RNAレプリカーゼの鋳型特異性に関する研究
Author(s)	深見, 泰夫
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27736
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

RNAレプリカーゼの鋳型特異性に関する研究

大阪大学理学研究科　生物化学専攻

深見 泰夫

昭和53年2月

緒論

遺伝子として活性をもつウィルスRNAの複製機構の研究は、1961年のLoebとZinder[1]による大腸菌を宿主とするRNAファージの発見以後本格的に開始された。ことに、1965年に春名とSpiegelman[2]により、RNAファージQβの感染した大腸菌から、Qβ RNAに依存してRNA合成を行なうQβレプリカーゼが単離され、この酵素が試験管内において、感染性のあるQβ RNAを合成するRNA複製酵素であることが証明されて[3]以後、RNA複製機構の解析がin vitroで行なえるようになり、多くの知見[4,5,6]が蓄積されるに至った。

しかしながら、RNA複製系としては、Qβレプリカーゼを使った系が唯一のものであり、しかもその複製機構にはなお不明な点も多く残されていた。とりわけ、この酵素の大きな特徴の一つである、鋳型特異性、即ち自己のRNAであるQβ RNAはRNA合成の鋳型となるけれども、宿主である大腸菌のRNAやDNA、また近縁関係のないファージや植物ウィルスのRNAは鋳型とならない[2]という鋳型に対する特異性がどのようにして発現されているのかは全く明らかにされていなかった。

鋳型特異性は、様々な分子種の核酸が存在する感染菌内で、ファージRNAのみが選択的に複製されるために

は、非常に合目的的な性質であり、生物の種の保存という点からみても興味ある問題であるので、その発現機構の解明が期待された。

1971年春名ら[7]はQβレプリカーゼとは異なる鋳型特異性を持つRNAレプリカーゼ（SP、FIレプリカーゼ）を単離することによって、鋳型特異性の発現機構の解明に比較研究の道を開き、同時に三宅ら[8]は、これらの酵素を使って、RNAファージ間の近縁性と鋳型特異性との関係を明らかにして、RNAファージを血清学的性質や鋳型特異性の面等から4つのグループに大別した。これらの研究によって、同じ大腸菌を宿主とするRNAファージであっても、鋳型特異性の異なるいくつかのグループが存在することが明らかにされた。春名ら*は、ファージグループに応じて各々のレプリカーゼの鋳型特異性に違いがみられるのは、それぞれのレプリカーゼによるRNA複製反応の機構が元来全く異なっているためではなく、鋳型特異性は本質的には共通の複製反応機構の中で発現されるものであろうと考え、鋳型特異性の発現機構を、特異性の異なるレプリカーゼを使って、比較研究することによって明らかにしていく試みを開始した。

---

* 故春名一郎、大森治夫、深見泰夫、米崎哲朗、森啓.

そのためには、まず特異性の異なるいくつかのレプリカーゼの構成成分やそれぞれのRNA複製反応に関与している因子を明らかにし、それらを相互に比較してその共通性や特異性を明らかにしていかなければならない。

比較研究のための材料として著者は、Qβレプリカーゼと SPレプリカーゼを選んだ。なぜならば、先の春名ら[7]及び三宅ら[8]の研究によってこの両酵素では互いのRNAを自分自身のRNAの約25%の効率で鋳型とするという部分的交叉反応が認められており、この交叉反応の存在は、とりもなおさず共通の複製機構の存在を示唆していると考えられるからである。

著者の行なった、レプリカーゼの鋳型特異性に関する研究は、次の4部から成っている。

(1) SPレプリカーゼの精製と性質

(2) SPレプリカーゼを構成している宿主由来のサブユニットの同定

(3) ファージRNAを鋳型とした反応でのSPレプリカーゼとQβレプリカーゼの鋳型特異性の比較

(4) バリアントRNAを鋳型とした反応での両酵素の鋳型特異性の比較

(1)と(2)は、それぞれ、大森治夫、森啓との共同研究であり、著者はそれぞれにおいて、SPレプリカーゼの精製

と、サブユニットの免疫学的交叉反応による同定を担当した。結果は参考論文の1)及び2)にまとめられているのでここでは以下に、あわせて要約するにとどめる。

また(3)は、ファージRNAを鋳型とした反応系での鋳型特異性に対する宿主因子の影響を調べたもので、その結果は(4)の研究の発端となったものであるので、(1)、(2)の要約のあとに、その結果の意味する所を述べ、(4)の導入としたい。

Qβレプリカーゼは、1970年にKondo ら[9]及びKamen[10]によってその分子構成が明らかにされていたが、SPレプリカーゼを精製し、その分子構成を調べてみると、Qβのそれとよく似ており、4つの分子量の異なるサブユニットⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ（分子量はそれぞれ、74,000、69,000、47,000、33,000）から成っていることが明らかとなった（参考論文1)）。Qβレプリカーゼのサブユニットについては、Groner ら[11]やWahba ら[12]によって、サブユニットⅠが宿主のリボソームタンパクのS1と同一のものであることが明らかにされ、サブユニットⅢ、Ⅳについては、それぞれタンパク合成の伸長因子であるEF-Tu、EF-Tsであることがblumenthal ら[13]によって明らかにされていたが、SPレプリカーゼについても、Ⅰ、Ⅲ、Ⅳは

宿主由来で、それぞれ、S1、EF-Tu、EF-Tsであることが確められた（参考論文2）；J. Biochemistryに投稿中）。

SPレプリカーゼの宿主由来のサブユニットが、Qβのそれらと共通であるという事実は、両酵素によるRNA複製反応が共通した機構で起こるという最初の仮説を強く支持している。しかし一方、両酵素によるRNA合成反応の比較研究（参考論文1）及び本論文・実験結果I）は、QβRNAに依存した反応ではレプリカーゼの他に宿主由来のタンパクであるHFI[14]（host factor one）が必要であるのに対して、SPRNAに依存した反応はHFIを必要としないという非共通点をも明らかにしている。後に示すように、この宿主因子の存在量はQβRNAに依存したRNA合成活性を大きく左右するため、レプリカーゼのみかけの鋳型特異性に対して大きな影響を与える要因の一つとなっている。

HFIはQβファージRNAを鋳型とした反応では必要であるが、ファージRNAに相補的なRNA（マイナス鎖RNA）を鋳型とした反応には必要でないことが示されており[4,15]、HFIは、QβRNAに結合してQβRNAが鋳型として働くようにその高次構造を変化させているのであろうと考えられている[14,16]。しかし、レプリカーゼによる鋳型RNAの識別に際して、この因子が実際に

どのような機能を果しているのか、あるいはまた、鋳型の識別そのものとは無関係であるのかは明らかにされていない。

このQβの宿主因子の存在は、ファージRNAを鋳型とした反応を解析する場合に必然的に起こる問題点を提起している。即ち、ファージRNAはRNA複製の鋳型となるだけでなく、同時にタンパク合成の鋳型となる条件や、コートタンパクに包み込まれてファージとなるための条件等をも満している高次構造物であり、レプリカーゼの各サブユニットや宿主因子との相互作用も単に鋳型の識別や複製に直接かかわったものばかりではないと考えられるのである。例えば、Qβレプリカーゼのサブユニット I であるリボソームタンパクS1もまたHF I と同様に、ファージRNAを鋳型とした場合にのみ必要とされるサブユニットである[15]か、ファージRNAのコートタンパク・シストロンの翻訳を阻害し、レプリカーゼ・シストロンの翻訳を促進する作用をもつ[11]ことから、RNA合成だけでなく、むしろ、ファージRNAの翻訳から複製への転換に重要な働きをしていることが示唆されている[17,18]。S1はまた、16SリボソームRNAの3′末端とメッセンジャーRNAとの間に塩基対合をつくらせ、タンパク合成の開始に関与していることも知られている[19,20]。

従って、メッセンジャーRNAでもあるファージRNAと、レプリカーゼの各サブユニット及び宿主因子との相互作用は、当所考えられていたよりも複雑な様相を呈しているように思える。そこで、そのような複雑なファージRNAの複製系から、RNAの複製反応のみをとり出したような形で解析できる簡単な系はないであろうかということが方法論として考えられるわけである。即ち、できるかぎり簡単な複製系でレプリカーゼの反応様式や各サブユニットの機能を明らかにし、その後にファージRNA複製系の解析に戻ろうとする方法である。

Qβレプリカーゼは、サブユニットIやHFIがなくとも、Poly Cなどシチジル酸を含む合成ポリマーを鋳型としてRNA合成を行なうことが知られている[15,21]。ちょうどタンパク合成の際のメッセンジャーRNAの暗号コードとアミノ酸との対応を決めるために人工ポリマーが非常に有効であったように、このような人工ポリマーを使った系[22]は、RNA複製反応の解析に有効であろうか。

たしかに、合成ポリマーを鋳型とした系は、人工的操作が可能であり、系も単純であるが、残念ながらこの場合には、加えた鋳型に相補的なRNAが合成されるにとどまり（例えば、Poly CからはPoly Gが合成される）、鋳型RNAの複製は起こらない。しかも、Poly C等は、

Qβレプリカーゼ以外の今までに調べられたすべてのRNAレプリカーゼの鋳型となるため[23]（参考論文1））。鋳型特異性を伴ったRNA複製機構の解析には、人工ポリマーを鋳型として使った系は適していない。

Qβレプリカーゼの鋳型となるRNAとしては、ファージRNAやPolyC等の他に「バリアントRNA[24,25,26]」と呼ばれるファージRNAの数%程度の大きさをもつ小さいRNA群が存在する。Kacian 5[24]はQβレプリカーゼを、鋳型を加えない条件下でインキュベートすることによって、MDV-1（midivariant 1）と名づけられたバリアントRNAを合成、分離し、このRNAがQβレプリカーゼによって複製されることを示した。このような小さいRNAは、SumperとLuce[27]によっても報告されており、その複製にはレプリカーゼのサブユニットIやHFIが必要でないことが示されている。さらに、MDV-1等一部のバリアントRNAについては、その一次構造が決定されている[25,26]。しかしながら、これらバリアントRNAの複製に鋳型特異性が伴っているかどうか、つまりPolyCのように他のレプリカーゼの鋳型となるのかあるいはならないのかということについては調べられていなかった。またQβ以外のレプリカーゼもまたバリアントRNAを生成するかどうかについてもわかっていなか

った。

著者は、SPレプリカーゼを使ってもこのような自己複製能をもったRNAが生成されることを見い出した[28]ので、Qβ及びSP由来のバリアントRNAを単離し、それらを鋳型としたときの二つの酵素の特異性を比較した。その結果、ファージRNAについてみられた特異性と対応した鋳型特異性がバリアントRNAを使った系でも観察されることを見い出した。

バリアントRNAの複製系は系を構成する要素の数が少なく、RNAも小さいので、ファージRNA複製系より単純ある。この系は、ファージRNAを使った系にかわるモデル系として、RNAレプリカーゼによる鋳型の特異的認識機構の解明に有効な系を提供するものであると考えられる。

材料と方法

a) 菌株とファージ

大腸菌雄株 A/λ[29] (Hfr, SuII$^+$)、K37[30] (Hfr, SuI$^+$) 及び Q13[2] (Hfr, PNPase$^-$, RNaseI$^-$, Su$^-$) を使用した。野生株 RNA ファージ SP[31] 及び Qβ[32] は A/λ あるいは Q13 株を使って生育させた。Qβ am12 変異株（ロックフェラー大学の堀内賢介博士よりいただいた）の生育には K37 株を使った。感染菌の調製には Q13 株を用いた。[2]

b) RNA レプリカーゼと宿主因子（HFI）の調製

Qβ レプリカーゼと SP レプリカーゼは、それぞれ、Qβ am12 ファージと野生株 SP ファージの感染した Q13 菌体から調製した。DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる精製段階（部分精製段階酵素）までは春名と Spiegelman[2] によって報告されている方法に準じて行なった。DEAE-セルロースカラムから溶出されたレプリカーゼを含む分画は、さらにホスフォセルロースカラムクロマトグラフィーと、それに続く2回のショ糖密度勾配遠心によって精製した（大森、深見、春名、投稿準備中）。精製された2つのレプリカーゼは、それぞれ、0.2M の硫安を含む M-緩衝液（50mM Tris-HCl, pH 7.4 - 5mM $MgCl_2$ - 1mM EDTA - 5mM β-メルカプトエタノール - 20%(w/v) グリセロール）に対して透析の後、

0°C もしくは −70°C で保存した。タンパク量の定量は Lowry ら[33] の方法によった。

実験には、SDS (sodium dodecyl sulfate) を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動法[34] による解析によって、95% 以上純化されたと算定された、SP 及び Qβ レプリカーゼを用いた。

Qβ RNA の複製に必要とされる宿主因子 HFI[14] は、ファージの感染していない Q13 菌体から塩[35] の方法に準じて調製した。

C). ファージ RNA と大腸菌 RNA の調製

ファージ RNA は、伊藤と春名[36] によって述べられている方法に従って、精製ファージ粒子からフェノール処理法により調製した。[^{3}H] ウラシルで標識した SP ファージは、志村[37] の方法に準じて調製した。但し、培養液は L-ブロス (1%(w/v) ポリペプトン − 0.5%(w/v) 酵母エキス − 0.5%(w/v) NaCl, pH7.0) で、100 ml の培養液に 1 mCi の [^{3}H] ウラシル (比活性; 24 Ci/m mole) を加えた。

[^{14}C] ウラシル標識した大腸菌 RNA は、Q13 株を用いて以下のようにして調製した。

1 ml の L-ブロスに Q13 を 1×10^8 cells/ml になるまで生育させ、100 μCi の [^{14}C] ウラシル (比活性; 57 Ci/mole) を加えて、37°C で 90 分間標識後、菌体を遠心 (10,000 × g, 4°C

で10分間）で集め、1mlのT.E－緩衝液（10mM Tris-HCl, pH7.4－3mM EDTA）に懸濁し、500μgのリゾチームを加えて凍結－融解を2回くり返して菌体をこわす。遠心（15,000×g, 4°Cで10分間）して上清をとり、$MgCl_2$を10mMになるように加え、1ml当り5μgのRNaseを含まないDNaseIで0°C、10分間処理後、1/40容の20%(w/v) SDSを加えて5分間室温におく。次に水を飽和させたフェノールを同容量加え、4°Cではげしく振とうしたのち、遠心（4,000×g、4°Cで5分間）し、水層をとり、1/20容の1M CH_3COONaと4M NaCl及び倍容量のエタノールを加えて、－20°Cで約3時間放置しRNAを沈澱させる。沈澱を遠心（20,000×g、－20°Cで20分間）で集め、T.E－緩衝液に溶解し、これを大腸菌全RNA分画とした。

非標識大腸菌全RNAも同様にして調製し、RNA合成反応産物抽出の際のキャリアとして用いた。[^{14}C]標識した大腸菌全RNAは、それに含まれている4－5SのRNAをマーカーとして用いるために、T.E－緩衝液5ml中につくった、2.5－15%(w/v)ショ糖密度勾配の上に重層し、SW 50.1のローターで、45,000 r.p.m.、10°C、2.5時間の遠心により分画した。各分画の一部をとって放射能を測り遠心パターンを確認後、4Sから5Sの大きさのRNAを含む分画を集めてゲル電気泳動による反応産物解析の際のマーカーとして用いた。

[^{32}P]標識された大腸菌全RNAは、慶応大学渡辺研究室よりいただいた。

d) RNA合成反応溶液

標準反応溶液[2]（125μlあるいは250μl）は、80mM Tris-HCl (pH7.4)、12mM $MgCl_2$、0.8mMヌクレオシド三リン酸（ATP、GTP、UTP及びCTP）、1.0－2.5 Ci/moleの[^{3}H]UTPあるいは[^{14}C]ATP、それにレプリカーゼと鋳型RNAをそれぞれの図表に示した量だけ含んでいる。

[γ-^{32}P]GTPを使用したときは、標準反応液に6.4 Ci/moleを加えた。

RNA合成反応は37°Cで通常20分間行ない、氷冷後80%(w/v) TCA (trichloroacetic acid)を12%(w/v)になるように加えて反応を停止させ、メンブレンフィルター法によって酸不溶性分画への標識された基質のとり込みを測定した[2]。

e) バリアントRNAの調製

QβのバリアントRNAは、鋳型と標識した基質を含まない反応溶液（2.5ml）中で50μgのQβレプリカーゼを37°Cで3.5時間インキュベートして生成させた。反応液に1/40容の20%(w/v) SDSを加えて反応を停止させ、反応産物をフェノール法[3]により抽出し、エタノール沈殿

後、T.E－緩衝液に溶かした。保存は－20°Cで凍結保存あるいはエタノール沈澱のまま－20°Cで保存した。

SPのバリアントRNAは、鋳型と標識した基質を含まない反応溶液（20ml）中で400μgのSPレプリカーゼを37°Cでインキュベートし、30分後に400μgのSPレプリカーゼを加え、さらに1.5時間インキュベートすることによって生成させ、Qβのバリアント RNA と同様にして抽出し、保存した。

f）反応産物の抽出

i）ファージRNAを鋳型としたときの反応産物の抽出

反応溶液（500μl）を37°Cで60分間インキュベートしたのち、500μlの1%(W/V)SDSを加えて反応を停め、200μgの大腸菌全RNAをキャリアーとして加えてから、反応産物をフェノール法[3]により抽出し、エタノール沈澱後、T.E－緩衝液にとかした。平均収率は75%であった。

アニーリングの実験に使用した反応産物は、大腸菌RNAを加えずに抽出し、1mM EDTA (pH 7.4)に溶解後、Sephadex G-50 カラム（0.8×16cm）によるゲル沪過を行ない、塩及び未反応の基質を除いた。

ii）バリアントRNAを鋳型としたときの反応産物の抽出

反応は標準反応溶液で、37°C 20分間行ない、EDTAを最終濃度が10mMになるように加えて反応を停止させ、さらに5分間インキュベートした。次に、反応液250μl当り50μgの大腸菌全RNAを加え、フェノール抽出はせずに直接 Sephadex G-50 カラム (0.8 x 16 cm) にかけて 1mM EDTA で溶出し、塩及び基質を除いた。

g) 反応産物のショ糖密度勾配遠心による解析

50－100μlのT.E－緩衝液に溶解したファージRNAを鋳型としたときの反応産物を、5mlの同じ緩衝液中に作った5－20%(w/w)ショ糖密度勾配の上に重層し、SW 50.1ローターで35,000 r.p.m. 5時間、10°Cで遠心した。チューブの底に針で穴をあけ7滴ずつ約40分画を沪紙(直径2.5cm)にしみこませ、沪紙を一度乾燥させた後、約500mlの5%(w/v) TCAで数回洗い、最後にエタノールで洗った後、乾燥させ、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

h) ファージRNAを鋳型とした反応産物のアニーリングとRNase処理

アニーリングは、Fedoroff 5[38]の方法に準じて行なった。反応産物(0.4－0.6μg)と拮抗させるRNA(0－12μg)を含む180μlの1mM EDTA (pH 7.4) 溶液を沸騰

水中で3分間加熱後、20μlの4M NaClを加え、85°Cに2時間保ったのち、約6時間かけて室温にまで除冷した。

このようにしてアニールした試料に、0.4M NaCl-1mM EDTA (pH7.4)に溶かした25μg/mlの濃度のウシ膵臓RNase A 50μlを加え、37°Cで30分間インキュベートしたのち、氷冷し0.4mlの20%(w/v) TCAを加えて反応を停め、RNase処理後に残った、酸不溶性分画の放射能をメンブレンフィルター法で測定した。

i) バリアントRNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲルからの抽出

5%(w/v) アクリルアミド-0.25%(w/v) BISアクリルアミドゲル電気泳動は、Bishop 5[39]の方法に準じた。但し、緩衝液(40mM Tris-酢酸-1mM EDTA)のpHは7.8に調整し、ゲルはスラブゲル(0.3×12×16 cm)を使用して160 V/16 cm、30°Cで2時間泳動した。この条件でマーカー色素ブロモフェノールブルーは約12 cm泳動した。

非標識RNAは、水に溶かした50μg/mlのエチジウムブロマイドで約40分間室温で染色し、紫外線ランプの下でバンドを検出した。[^{14}C]標識したRNAは、フルオログラフィー法[40](参考論文3))により検出した。

非標識RNAは、鋳型として用いるため、各バンドを

切り出し、遠心管（30 ml COREX Tube）内でガラス棒をつかってよくすりつぶしたのち、T.E－緩衝液を10 ml加え、4°Cで3時間放置後、遠心（15,000×g、4°Cで20分間）して上清をとり、沈澱したゲルに再び10 mlのT.E－緩衝液を加えて懸濁し、再び遠心して上清をあつめた。得られた上清はエタノール沈澱により濃縮し、1mM EDTAにとかして、Sephadex G-50カラムによるゲル沪過を行ない、塩を除去した。

j）バリアントRNAの熱変性、アニーリング、及びRNase処理

バリアントRNAの熱変性は、50μlの1mM EDTA（pH 7.4）に溶解した試料（0.5－1μg）を沸騰水中で1.5分間加熱後、ドライアイス－エタノール中につけて急冷することによって行なった。

熱変性した試料のRNaseによる処理は、37°Cで30分間、最終濃度が5μg/mlのRNase T₁あるいはRNase Aを用いて行なった。但し、RNase Aを用いた場合は、塩を加えない時には完全消化が起こるので、熱変性後の試料溶液に1/10容の4.4M NaClを加え、二重鎖RNAがRNase抵抗性となる条件[38]とした。

バリアントRNAのアニーリングは、試料溶液を一旦沸騰水中で1.5分間加熱し、1/10容の4.4M NaClを加えてか

ら、数時間かけて室温にまで除冷して行なった。

ト）試薬

ヌクレオシドミリン酸（ATP. GTP. UTP及びCTP）、ウシ膵臓RNase A、リゾチームはSigma Chemical Companyより、またRNase T1は三共K.K.，RNaseを含まないDNase IはWorthington Biochemical Co.よりそれぞれ購入した。

[^{3}H]ウラシル（24 Ci/mmole）、[^{14}C]ウラシル（57 Ci/mole）、[^{3}H]UTP（17 Ci/mmole）、[^{14}C]ATP（50 Ci/mole）はNew England Nuclearより、また[γ-^{32}P]GTP（32 Ci/mmole）はRadiochemical Centre Amersham Englandより、それぞれ日本アイソトープ協会を通じて入手した。

実験結果

I. ファージRNAに対する鋳型特異性

a) 宿主因子の影響

Qβレプリカーゼによる RNA合成反応にはある種の因子が必要であることは早くから報告されており[21,41]、Qβレプリカーゼの構成成分が明らかにされたのちにも、この因子がないとQβ RNAに依存したRNA合成反応がほとんど起らないということがわかっている[15]。この因子は熱処理に対して安定なタンパク質で、非感染菌からも得ることができ、HFI (host factor one) と名づけられている[14,42,43] HFIの宿主での機能については、わかっていない。

図1は、SP、Qβ両酵素でSPファージRNA、あるいはQβファージRNAを鋳型としたときのRNA合成反応に対するHFIの影響を調べたもので、Qβ RNAを鋳型とした反応では、どちらの酵素を用いてもこの因子が必要であるのに対して、SP RNAを鋳型とした反応ではどちらの酵素を用いても宿主因子HFIは必要ではないということがわかる。即ち、宿主因子HFIは、Qβレプリカーゼに対してでなく、Qβ RNAに対して特異的に働く因子であるということである。

春名ら[7]は、部分精製段階での酵素(「材料と方法(b)」参照)を使って、SPとQβの間に互いのRNAを自己のRNAの約25%の効率で鋳型とするという交叉反応が

あることを報告しているが、図1の結果は、このような交叉反応が高度に精製された両酵素を使った場合にも認められることを示している。しかし、部分精製段階の酵素を使って得られた結果に比べて、SPレプリカーゼに対するQβ RNAの鋳型活性がかなり高くなっている(図1-A)。これは、部分精製段階の酵素を使った際には、外から宿主因子を加えていない[7]ためであり、SPレプリカーゼ分画中に混在していた宿主因子だけでは十分量でなかったためと考えられる。一方、Qβレプリカーゼの場合には、部分精製する際にQβ RNAに依存したRNA合成活性を指標としているため[2]、その反応に必要な宿主因子HFIもQβレプリカーゼとともに精製されていたことになり、そのため高度に精製されたQβレプリカーゼにHFIを十分量加えたとき(図1-B)と同様の結果を与えるのであると考えられる。

図1の結果でもう一つ重要なことは、宿主因子によって、Qβ RNAの鋳型活性のみが促進されるため、宿主因子量の変化に応じて、両酵素のみかけ上の鋳型特異性が大きく変化し、交叉反応の程度も変わるということである。図に示した2μgのQβ RNAと5μgのSP RNAは、2μgのレプリカーゼに対して飽和量であり、調べられたかぎりの条件下で、SPレプリカーゼとQβレプリカーゼの鋳型特異性は、異なっているがよく似ていると

いえる。

b) ファージRNAを鋳型とした反応産物の解析

上で述べられた二種類の酵素と二種類のファージRNAを組み合わせた4つの系において、実際に加えた鋳型に対して忠実なRNA合成が起こっているかどうかを確めるため、反応産物をショ糖密度勾配遠、及びアニーリングとRNase処理の実験によって解析した。2つのファージRNAと2つのレプリカーゼを組み合わせた系は、以後簡略化のため、例えばQβ RNAに依存したSPレプリカーゼによる反応系は、「Qβ−SP rep.」というように表わすことにする。

図2は、4つの系での反応産物を抽出し、ショ糖密度勾配遠心によりその大きさを調べたものである。いずれの系においても、SP、Qβ両ファージRNAの大きさに相当する28SのRNAとそれに続く23−16SのRNAが合成されている。23−16SのRNAはSDS−フェノール抽出することによって、鋳型と新生RNA鎖が二重鎖構造をとった、反応中間体であると考えられている[5,6]。

Qβ−SP rep.系では、小さい約6Sの沈降定数をもつRNAが生成している(図2-c)が、これはSPレプリカーゼによって生成されるバリアントRNAであると思われる。後に示すように、SPのバリアントRNAは通常、反応

系に酵素を添加することによって生成されるか、または酵素添加をしなくとも生成する場合があった。特に、宿主因子HFIを加えずにQβ RNAを鋳型とした反応（この場合通常はRNA合成はほとんどみられない（図1(A)）では、加えたRNA量に比例したRNA合成が起こることがしばしばみられ、その時の反応産物には28SのQβ RNAに相当するRNAはみられず、すべて約6Sの小さいRNAであり、しかもこのRNAは、酵素添加によって生成したSPバリアントRNAと、大きさ、RNase抵抗性等の点から区別できなかった（未発表データ）。従って、理由は全く不明であるが、宿主因子が不足したときには、Qβ RNAによってSPバリアントRNAの生成は誘発もしくは促進されるようであり、図2-cのQβ-SPrep.系でみられる小さいRNAもこのようにして生成したバリアントRNAであると思われる。

図3は、SP－SPrep.系での反応産物をセルフアニール、あるいは標識されていないRNAを加えてアニールしたのち、RNase処理した実験結果を示している。もし、反応産物中に、ファージRNAと同じ塩基配列をもつRNAが存在すれば、過剰量のファージRNAを加えることによって抵抗を受け、RNaseに対して感受性になるはずである。図3の結果は、反応産物の約20%が、鋳

型として用いたSP RNAによって拮抗され、RNase感受性となっているが、鋳型とならない大腸菌RNAや、鋳型として用いなかったQβ RNAによっては拮抗を受けないことを示している。

この実験では、マイナス鎖RNAは外から加えておらず、マイナス鎖RNAは反応産物自身から供給されている。一本鎖のRNAであるSPファージRNAは、セルフアニール後、2.8%しかRNase抵抗性でないので（表1-e）、SP RNAで拮抗させたあとに残ったRNase抵抗性の放射能の大部分は、拮抗させたRNAと二重鎖構造をとっているマイナス鎖RNAによるものと考えられる。

また、SP－SPrep.系での反応産物の合成量は加えた鋳型RNAの約60%であったので、反応産物0.6μg（[3H]-UMPのとり込み量から算定した）は、セルフアニーリングの時点ですでに約1μgの最初に鋳型として加えた標識されていないSP RNAによって拮抗されていることになる。従って、約20%の反応産物があとから加えたSP RNAによってさらに拮抗されるということは、この系で合成されたRNAは、SPファージRNAに相補的なマイナス鎖のRNAだけでなく、プラス鎖のSPRNAと同じ塩基配列をもつRNAを少くとも20%以上含んでいるといえる。

図3と同様の実験を他の系での反応産物についても行ない、結果を表1にまとめた。

各々の系での反応産物は、それぞれの系で鋳型として用いたRNAによってのみ拮抗されている。Qβ－Qβrep.系以外の系での反応産物のRNase抵抗性は、Qβ－Qβrep.系の反応産物のそれより高く、逆に鋳型RNAによって拮抗されてRNase感受性になる反応産物の割合は、Qβ－Qβrep.系の方が大きいが、このことは、Qβ－Qβrep.系では、他の系に比べてプラス鎖のファージRNAと同じ塩基配列をもつRNAが多く合成されていることを示しており、反応産物の鋳型に対する合成量がQβ－Qβrep.系では約250％であったが、他の系では約60％であったことと対応している。

以上に示した反応産物の解析結果から、精製酵素を使った系でも鋳型RNAに忠実なRNA合成が起こっており、その少くとも一部はマイナス鎖からさらにファージRNAであるプラス鎖の合成にまで及んでいること、そして、SPとQβの間には、実際に互いのRNAを鋳型とするという交叉反応があることが結論される。

Qβ RNAの複製には、宿主因子HFIが必要とされるが、SP RNAには必要とされないという非共通点があるにもかかわらず、両酵素が互いのRNAを鋳型とす

ることができるということは、レプリカーゼによるRNA複製反応は、共通の機構で起こっているであろうという最初の仮説を支持するものである。このことはさらに、宿主因子HFIは単にQβ RNAが鋳型として働くために必要な因子であり、レプリカーゼの鋳型特異性と本質的にはかかわっていないのではないかということを想像させる。

それでは、宿主因子を必要としないような複製系が他にあれば、そこにおいてもSP、Qβ両レプリカーゼはファージRNA複製系での鋳型特異性と同様の鋳型特異性を示すのであろうか。以下はそのような系での両酵素の特異性について調べたものである。

Ⅱ. バリアントRNAに対する鋳型特異性

a) バリアントRNAの生成

Qβレプリカーゼを鋳型を加えない状態で長時間インキュベートしておくと、やがて自己複製能をもつ小さいRNA分子（バリアントRNA）が生じてくることが知られている[24,27]。そこで、SPレプリカーゼについても同様な実験を行なってみた。図4に示したように、SPレプリカーゼはQβレプリカーゼと異なり、単に鋳型を加えないでインキュベートすることによってはRNA合成は起こらず、インキュベーションの途中で新しく酵素を添加することによってRNA合成がひき起こされた。このとき、酵素のかわりにSP RNAを添加してもRNA合成がみられないことから（図4、差し込み図）、最初に入っていた酵素はこの時点ですでに失活しており、そのためそれ以上インキュベーションを続けてもRNA合成が起こらないのであると考えられる。このことは鋳型を入れないときには、SPレプリカーゼはQβレプリカーゼより早く失活するという観察（参考論文1）と一致している。

図5は、酵素の添加を時間を変えて行ない、添加後のRNA合成量を測定したもので、最初から倍量の酵素を入れておいたり、2－3分以内に酵素を添加してもRNA合成は起こらず、最初に入れた酵素を2－3分以上イン

キュベートした後に新たな酵素を加えることによってはじめてRNA合成が起こるということを示している。

この最初のインキュベーションの間にどのような条件が満たされたときにRNA合成が起こるかを調べた結果を表2にまとめた。5分間のプレインキュベーションの間に、酵素と4種のヌクレオシドミリン酸のすべて、それにMgイオンがなければ、あとから酵素が添加されたときにRNA合成が起こらないことが示されている。

これらのものは、SPレプリカーゼによるRNA合成が起こるためには必須のものである[7]。従って、最初の酵素が失活するまでの間に、4種のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが合成、蓄積され、その後添加された酵素によって、そのオリゴヌクレオチドをプライマーもしくは鋳型としたRNA合成が起こるものと考えられる。

b) バリアントRNAの性質

Qβレプリカーゼを、鋳型を入れない条件下でインキュベートして生成したQβ由来のバリアントRNAと、SPレプリカーゼの添加によって生成したSP由来のバリアントRNAを抽出し、その大きさをポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。

図6に示したように、Qβ由来のバリアントRNAでは、

図にQβ及びQβ′と示した二本のバンドがみられ（図6, a）、SP由来のバリアントRNAでは、A及びBの二本のバンドとA′及びB′のややうすいバンドがみられる（図6, b）。Qβ、A及び、Bと表わしたバリアントRNAの大きさは、大腸菌の4S、5S RNAをマーカーとして測定すると、それぞれ約8S、6S、及び5.2Sである。

Qβ′、A′及び、B′と表わしたRNAは、それぞれ常にQβ、A及びBのRNAに伴って表われるRNAであり、アニールしてからゲル電気泳動で解析すると、それぞれQβ、A及びBと同じ移動度を示した（図6, C-3及び図8）。またこれらは熱処理することによって、それぞれ対応するQβ、A及びBのRNAから離れ、現われてくるRNAであった（B′について図6, C-2に示した）。さらに、RNaseに対する感受性をB′とBとで比較した所、B′はRNase処理により消失したが、Bは抵抗性であった（図6, d-1,2）。これらのことは、Qβ′やA′、B′は一本鎖構造をとったRNAであり、QβやA、Bは二重鎖構造をとったRNAであることを示唆している。

SPバリアントRNAの各バンドをゲルから切り出して、RNAを抽出し、その鋳型活性を調べた。表3に示したように、抽出してきた各RNAは、そのままでは鋳型活性は部分的にしかなく、熱処理することによって鋳型活性の促進がみられ、アニーリングによって鋳型活

性を失った。 Weissmann ら[5]によって、Qβレプリカーゼは、二重鎖RNAを鋳型とできないということが報告されているので、上の結果から、アニーリング後の各RNAは二重鎖構造をとっており、鋳型活性のある熱処理後のRNAの方は一本鎖構造をとっていることが示唆される。

バリアントRNAを鋳型としたRNA合成は、ファージRNAを鋳型とした反応と同じく、5′-末端のGTPから合成が始まるので[44]、反応産物の5′-末端を[γ-^{32}P]GTPで標識し、その他の部分を[^{3}H]UTPで標識することができる。 そこで、表3に示したように、とり込まれた[^{3}H]UMPと[γ-^{32}P]GTPのモル比から、各RNAの相対的鎖長を比較すると、AとA′、及びBとB′のUMPのモル数は5-末端当りそれぞれ、14と12であり、AとA、及びBとB′はそれぞれ同じ鎖長であることがわかる。

同じ実験を[^{3}H]UTP以外の標識基質を使って行なっても同様の結果を得た(データは示していない)。
これらのことから、A′やB′はAやBの断片ではなく、またA、A′はB、B′より大きいRNAであるといえる。

B′がBと同じものであることは、B′を鋳型としたときの反応産物がBの大きさをもつRNAであること(図8-8)、また抽出したB′のRNAをアニールして再びゲル電気泳動で解析するとBの位置に泳動すること(図6, d-3)からさらに確認された。

以上に得られた結果を総合して考えると、AやBのRNAは、それぞれ、一本鎖のRNAであるA′やB′によって構成されている二重鎖RNAであり、一方、A′やB′のRNAは、同じ長さのプラス鎖とマイナス鎖のRNAをほぼ同量含んだ混合物であって、アニーリングによって容易にそれぞれ、AとBの二重鎖RNAに移行すると考えられる。

AとBのRNAが抽出直後、部分的にではあるが鋳型活性をもっている理由としては、次の二つが考えられる。一つは、抽出の過程で一本鎖RNAがはずれてきている可能性であり、もう一つは、レプリカーゼは、塩の入っていないゆるい二重鎖RNAを鋳型とするという可能性である。反応産物の[^{3}H]UMPと[α-^{32}P]GTPの比が、熱処理によって活性化された鋳型をつかった場合の反応産物のそれよりも低いということ（表3）は、RNA合成の伸長段階がやや阻害されていることを示しており、このことは、後者の可能性を支持している。

しかし、AやBは、塩を加えてアニールすることによって、鋳型とならない二重鎖構造を形成すること、また熱処理によって鋳型活性が著しく促進されること（表3）から、レプリカーゼの実際の鋳型となっているのは、AやBでなく、一本鎖RNAのA′やB′であると考えられる。

A′とB′は、ゲルから抽出した直後、熱処理した場合に

比べて鋳型活性が低いが、これは、これらのRNAが、ほぼ同量のプラス鎖とマイナス鎖のRNAから成っているため、容易に二重鎖RNA（即ち、A及びB）を形成するからであると考えられる。

C）バリアントRNAの複製と鋳型特異性

バリアントRNAに対して、レプリカーゼの鋳型特異性がみられるかどうかを調べるため、Qβのバリアント RNAとSPのバリアントRNAの鋳型活性を、二つの酵素のそれぞれについて調べた。鋳型としては、熱処理した、Qβバリアント RNA（Qβ）、SPバリアント A、及びBの各RNAを用いた。

図7に示したように、SPとQβ両レプリカーゼは、自己由来のバリアントRNAの方が鋳型活性が高いという特異性は保持しながらも、互いのバリアントRNAもまた鋳型とするという、ファージRNAを使った系の場合と同様の交叉反応が認められる。しかし、ファージRNA系と異なっているのは、これらの系ではいずれのバリアントRNAを鋳型とした場合にも宿主因子を必要としないという点である。

交叉反応系も含めて、どのRNAと酵素の組み合わせの系でも、合成されたRNA量は、加えた鋳型の何倍量もあるので（1n mole の [^{3}H] UMP のとり込みは、約1.2μg

の合成RNA量に相当する)、これらの系では、加えた鋳型の複製が起こっていることが予想される。このことを確認するために、反応産物の大きさをポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

図8(1—7)に示したように、Qβレプリカーゼを使ってSPバリアントBを鋳型とした反応系を除いて、すべての系で加えた鋳型と同じ大きさのRNAが合成されている。特に、SPレプリカーゼを用いてQβバリアントRNAを鋳型とした時、及びQβレプリオーゼを用いてSPバリアントAを鋳型とした時の両交叉差反応系においても、それぞれ鋳型として加えたRNAと同じ大きさのRNAが合成されていることは注目すべきで、このことは、これら交叉反応系でのRNA合成量が自己のRNAに依存した反応でのそれより低いのは、反応産物の長さが短かくなったためではないということを示しており、一旦起こったRNA合成は途中で止まらずに最後まで行くことを示している。

SPバリアントBに依存したQβレプリカーゼによる反応産物の大部分は、バリアントBより大きいバリアントAの大きさのRNAであり、バリアントBは少量しか合成されていない(図8-6)。このことの理由としては、おそらく、バリアントBをゲルから切り出して抽出する際に少量混入してきたバリアントAが、Qβレプリカー

ゼによって選択的に複製されたためであろうと思われるが、バリアントBからなんらかの機構でバリアントAが生成する可能性も現在の所、除外されていない。

また、SPバリアントAやBに依存してQβレプリカーゼによって合成されたRNAには、電気泳動に先だって、アニーリングを行なったにもかかわらず、A′のRNAが観察される（図8－6，7）。このことは、これらの反応産物に、Aを構成するプラス鎖とマイナス鎖のRNAの内のどちらか一方が過剰に含まれており、アニーリング後も、一本鎖のRNAとしてA′の位置に泳動したためと考えられる。従って、Qβレプリカーゼが、SPバリアントRNAを鋳型とするときは、どちらかの鎖にかたよったRNA合成が起こっていることが示唆されている。

バリアントRNAを鋳型とした反応を解析するうち、SPとQβ間の交叉反応の程度が、反応系の塩濃度や基質濃度によって変化することを見い出した。

表4-aに示したように、SPレプリカーゼに対するQβバリアントRNAの鋳型活性は、標準条件下（0mM硫安－0.80mM 4 NTP）ではSPバリアントRNA（バンドB）の鋳型活性の44%であるが、塩を加え、基質濃度を下げた抑制条件下（24mM硫安－0.27mM 4 NTP）では、3.5%とほぼ鋳型を加えない時のレベルにまで抑制され

ている。　Qβレプリカーゼを使った場合にも、同様に交叉反応が選択的に抑制されるという結果を得た（表4-b）。

このような抑制条件下でのレプリカーゼの鋳型特異性を再検討した結果が図9に示されている。　SPとQβ間の互いに相手のバリアントRNAを鋳型とする交叉反応は、ほぼ完全に抑制されているが、自己由来のバリアントRNAを鋳型とする反応は、標準条件下の約50%に抑制されるにとどまっている。

従って、このような条件下では、両酵素の鋳型特異性は、より厳しい形で発現されており、両者の鋳型特異性の違いがより明確に現われている。

考察

本論文に示された結果を要約すると以下の通りである。

(1) SPレプリカーゼとQβレプリカーゼは似た鋳型特異性をもっており、互いのファージRNAを鋳型として忠実なRNA合成を行なうことができる。

(2) どちらの酵素をつかっても、Qβ RNAを鋳型とした反応には宿主因子(HFI)が必要であるが、SP RNAを鋳型とした反応には必要でない。

(3) 両酵素のみかけ上の鋳型特異性は、宿主因子によって、変化する。

(4) SPレプリカーゼもQβレプリカーゼと同じく、鋳型を加えない条件下で、自己複製する小さいRNA(バリアントRNA)を生成する。

(5) バリアントRNAを鋳型とした系においても、SPレプリカーゼとQβレプリカーゼは、互いに相手のバリアントRNAを鋳型としてRNA合成を行なう。

(6) しかし、自己のバリアントRNAの方が鋳型活性が高いという、特異性は保持されている。

(7) 反応系の塩濃度を上げ、基質濃度を下げることによって、両酵素が互いのバリアントRNAを鋳型とする交叉反応は、選択的に抑制される。

鋳型特異性の発現機構を解明していこうとする時、

ファージRNAの複製に必要な宿主因子の存在は、状況を一見複雑なものにしている。Qβ RNAの複製に必要な宿主因子HFIは、確かにQβやSPレプリカーゼによるRNA合成を左右し、両者のみかけの鋳型特異性に対して大きな影響を与えている（図1）。しかしながら、この宿主因子は、レプリカーゼによる鋳型の特異的識別に対して本質的な役割を担っているとは思われない。

なぜならば、バリアントRNAを鋳型とした反応系でこの因子の関与なしに鋳型特異性がみられること（図7、図9）、HFIはQβレプリカーゼによるRNA合成に必要な因子ではなく、Qβ RNAを鋳型とした反応に限られた因子であること（図1）、またQβのRNAでもマイナス鎖RNAを鋳型とした反応には必要とされないこと[15]等は、この宿主因子がレプリカーゼの鋳型特異性とは本質的には無関係であり、Qβ RNAが鋳型として働くためにだけ要求されている因子であることを示唆しているからである。

もしこの宿主因子がレプリカーゼの特異性発現に関して、必要でないものであるならば、この因子を必要としないバリアントRNA系で観察されるSPとQβ間の交叉反応（図7）は、宿主因子によってみかけ上大きく左右されるファージRNA系での交叉反応と違って、本来の両酵素の鋳型特異性の類似性を反映したものであると

考えられる。

Qβ RNAに対する宿主因子の存在はまた、ある酵素の鋳型特異性を調べる際、あるRNAが鋳型活性をもっていないからといって、簡単に判断してしまうことができないということをも教えている。つまり何かそのRNAが鋳型と働くために必要な因子が欠けていて鋳型とならないでいるのかもしれないからである。この場合、そのRNAを本来鋳型とするはずのレプリカーゼ（自己あるいは同族ファージのレプリカーゼ）を単離して、その酵素が宿主因子の関与なしにそのRNAを鋳型とするかどうか調べることがぜひとも必要である。こういう意味からも、単独の酵素を用いて研究を進めるよりも複数の酵素の特異性を相互に比較研究することが、鋳型特異性の発現機構の解明には重要である。

種々のレプリカーゼによって示される鋳型特異性の違いは、RNA合成の段階ですでにとらえられているわけであるから、それがどのようにして発現されてくるかを解明するためには、RNA合成に至るまでの反応段階を細かく分け、どの段階に各レプリカーゼの識別機構が働いており、またどの段階が共通したものであるかを解析していかなければならないであろう。この試みは、各レプリカーゼの鋳型特異性は共通の複製反応様式の中で発現されているであろうという、最初の仮説を直接検証し

て行こうとするものであり、またそれは、各レプリカーゼに共通した宿主由来のサブユニットが、これらのどの反応段階においてどのような機能を果しているかを明らかにするための土台ともなるものである。現在の所、本研究等によって、SPレプリカーゼとQβレプリカーゼを使った系で、その系を構成する要素が記述され、相互に比較可能な系であることが示されて、上に述べたような研究方法が具体的に採れる段階にまできたといえる。

今後、適当なRNA－タンパク架橋剤やサブユニットの阻害剤、あるいは温度感受性変異株等を得ることができれば、RNA複製と鋳型特異性発現の機構及びサブユニットの機能の解明に大きく近づくことができるであろう。

上に述べたような研究方法を採る場合に、鋳型としてファージRNAを選ぶことによって必然的に伴う系の複雑さについては緒論の中でも述べた通りであるが、それにかわる系として、本研究において提示したバリアントRNAを鋳型とした系は、

(1) 鋳型特異性を伴った複製系である。

(2) 系を構成する要素がすべて同定されている。

(3) 宿主因子に依存しない。

(4) 一次構造の解析が容易にできる程度に鋳型RNAが小さい。

(5) SPとQβ間での交叉反応を許容する条件と抑制する条件の2つの条件下で解析ができる。

という特徴をそなえており、ファージRNAを鋳型とした系にかわるモデル系として、レプリカーゼによる鋳型RNAの特異的認識機構の解明に有効な系であると考えられる。

一方、このようなバリアントRNAの由来については興味がもたれる所であるが、現在二つの説があって、いずれが本当かはわかっていない。一つは、in vitroにおいて鋳型に依存しないでde novoに合成されるとする説[27]であり、もう一つは、ファージ感染菌中に存在していてそれが、レプリカーゼ分画中にもちこまれ、in vitroでインキュベートするうちに複製増殖されて生じてくるとする説[15]である。

様々な条件下で反応を行なうことによって色々な分子種のバリアントRNAが生成するという観察[27]は前者のde novo説を支持しているが、Banerjee ら[44]によって、部分精製段階のQβレプリカーゼ分画から、自己複製される"6S RNA"が分離されており、Qβ感染菌中にそのようなRNAが存在していると報告されていることは後者のcontamination説を支持している。著者自身は、contamination説を支持している。なぜならば、生成し

したバリアントRNAは単なるランダムポリマーではなく、鋳型特異性を伴って複製されるRNAであるからである。

Qβ やSPファージと異なるグループに属するMS2ファージの感染菌においても6-7S RNAが存在すること[45,46]や、著者自身もSPファージ感染菌において、感染後期に6S RNAが蓄積されることを見い出している[47]、ことから、いわゆる"6S RNA"の存在は、ファージ感染に伴った、かなり普遍的なことのように思われる。

しかしながら、これらin vivoの6S RNAが、in vitroで生成するバリアントRNAと同じものを含んでいるかどうか、またそれがファージのゲノム由来なのかそれとも宿主由来なのか、さらには感染菌内でどのような働きをしているのか等についてはわかっていない。

In vivoでのファージRNA複製に、このような小さいRNAがどのような関わりをもっているのかを明らかにすることは、今後に残された課題の一つであろう。

謝辞

本研究は、故春名一郎教授の指導のもとに開始されたものであり、その教えに負う所が大きい。生前の博士の懇篤なる御指導に対し深く感謝するとともに御冥福を心から祈るものである。

また春名一郎博士亡きあとも、適切なる御指導をもって、本研究の遂行を可能にして下さった、本学理学部遺伝学講座、小川英行助教授、並びに多大なる援助と励ましを賜った、京都大学ウィルス研究所、石浜明助教授、慶応大学医学部、渡辺格教授に対し謹しんで感謝の意を表する。

参考論文2)の作成に際しては、畏友森啓氏の手を煩わした。また本論文を作成するにあたって、本学蛋白質研究所倉橋潔教授の助言をいただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

文献

1) Loeb, T., and Zinder, N. D. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 282 - 289

2) Haruna, I., and Spiegelman, S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 579 - 587

3) Spiegelman, S., Haruna, I., Holland, I.B., Beaudreau, G., and Mills, D. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 919 - 927

4) August, J. T., Banerjee, A.K., Eoyang, L., Franze de Fernandez, M.T., Hori, K., Kuo, C.H., Rensing, U., and Shapiro, L. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 73 - 81

5) Weissmann, C., Feix, G., and Slor, H. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 83 - 100

6) Spiegelman, S., Pace, N.R., Mills, D., Levisohn, R., Eikhom, T.S., Taylar, M.M., Peterson, R.L., and Bishop, D.H.L. (1968) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 101 - 124

7) Haruna, I., Itoh, Y.H., Yamane, K., Miyake, T., Shiba, T., and Watanabe, I. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1778 - 1779

8) Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Itoh, Y.H., Yamane, K., and Watanabe, I. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68,

2022 - 2024

9) Kondo, M., Gallerani, R., and Weissmann, C. (1970) Nature 228, 525 - 527

10) Kamen, R. (1970) Nature 228, 527 - 533

11) Groner, Y., Scheps, R., Kamen, R., Kolakofsky, D., and Revel, M. (1972) Nature New Biol. 239, 19 - 20

12) Wahba, A.J., Miller, M.J., Niveleau, A., Landers, T.A., Carmichael, G.G., Weber, K., Hawley, D.A., and Slobin, L.I. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3314 - 3316

13) Blumenthal, T., Landers, T.A., and Weber, K. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1313 - 1317

14) Franze de Fernandez, M.T., Hayward, W.S., and August, J.T. (1972) J. Biol. Chem. 247, 824 - 831

15) Kamen, R., Kondo, M., Römer, W., and Weissmann, C. (1972) Eur. J. Biochem. 31, 44 - 51

16) Senear, A.W., and Steitz, J.A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1902 - 1912

17) Kolakofsky, D., and Weissmann, C. (1971) Biochim. Biophys. Acta 246, 596 - 599

18) Kolakofsky, D., and Weissmann, C. (1971) Nature New Biol. 231, 42 - 46

19) Dahlberg, A.E., and Dahlberg, J.E. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2940 - 2944

20) Steitz, J. A., and Jakes, K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4734 - 4738

21) Hori. K., Eoyang, L., Banerjee, A.K., and August, J. T. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1790 - 1797

22) Küppers, B., and Sumper, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2640 - 2643

23) Fedroff, N.V., and Zinder, N. D. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1838 - 1843

24) Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R., and Spiegelman, S. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3038-3042

25) Mills, D.R., Kramer, F.R., and Spiegelman, S. (1973) Science 180, 916 - 927

26) Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara, T., and Spiegelman, S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4252 - 4256

27) Sumper, M., and Luce, R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 162 - 166

28) Fukami, Y., and Haruna, I. (1974) Proc. Mol. Biol. Mtg. Japan 32 - 33

29) Miyake, T., and Shiba, T. (1971) Virology 43, 675 - 684

30) Zinder, N.D., and Cooper, S. (1964) Virology 23, 152 - 158

31) Sakurai, T., Miyake, T., Shiba, T., and Watanabe, I. (1968) Jap. J. Microbiol. 12, 544 - 546

32) 桜井稔三、渡辺格、大野典也 (1967) ウィルス 17, 165-171

33) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Landall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

34) Weber, K., and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

35) 堀勝治 (1972) 蛋白質核酸酵素 核酸実験法 上, 153-158

36) 伊藤佑子、春名一郎 (1972) 蛋白質核酸酵素 核酸実験法 上, 159-164

37) 志村令郎 (1972) 蛋白質核酸酵素 核酸実験法 上, 25-29

38) Fedoroff, N. V., and Zinder, N. D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4577-4585

39) Bishop, D. H. L., Claybrook, J. R., and Spiegelman, S. (1967) J. Mol. Biol. 26, 373-387

40) Bonner, W. M., and Laskey, R. A (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83-88

41) Eikhom, T. S., and Spiegelman, S. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1833-1840

42) Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L., and August, J. T. (1968) Nature 219, 588-590

43) Shapiro, L., Franze de Fernandez, M. T., and August J. T. (1968) Nature 220, 478-480

44) Banerjee, A. K., Rensing, U., and August, J. T. (1969) J. Mol. Biol. 45, 181-193

45) Kelly, R.B., Gould, J.L., and Sinsheimer, R.L. (1965) J. Mol. Biol. 11, 562 - 575

46) Lunt, M.R., and Sinsheimer, R.L. (1966) J. Mol. Biol. 18, 541-546

47) Fukami, Y., and Haruna, I. (1976) Proc. Mol. Biol. Mtg. Japan 18 - 19

表1. ファージRNAを鋳型とした反応産物のアニーリングとRNase処理

Annealed sample	Competitor	Per cent RNase-resistant
a. SP-SPrep. product	SP RNA	62.2
	Qβ RNA	83.1
	E.coli RNA	79.7
	None	78.4
b. Qβ-Qβrep. product	Qβ RNA	26.4
	SP RNA	52.9
	E.coli RNA	50.3
	None	53.0
c. Qβ-SPrep. product	Qβ RNA	58.8
	SP RNA	68.7
	E.coli RNA	65.9
	None	69.4
d. SP-Qβrep. product	SP RNA	76.6
	Qβ RNA	81.9
	E.coli RNA	82.0
	None	85.6
e. [^{3}H]SP RNA	None	2.8

反応産物は、図2の説明に示した条件で得た。但し、SPレプリカーゼを使った場合の反応時間は20分間であり、Qβレプリカーゼを使った場合は60分間である。[^{3}H]標識された反応産物(0.4-0.7μg; 比活性, 2.8-4.1×10^{3}cpm/μg)をセルフアニールあるいは、12μgの非標識RNAと共にアニール後、RNase処理した。[^{3}H]SPファージRNAはセルフアニール後RNase処理した。アニーリング及びRNase処理の条件は「材料と方法(h)」に示した通りである。RNase抵抗性の放射能は、RNaseを加えない時の値を100%として表わしてある。RNaseを加えない時の値は以下の通りである。a, SP-SPrep., 1678cpm; b, Qβ-Qβrep, 1845cpm; c, Qβ-SPrep., 2209cpm; d, SP-Qβrep., 1642cpm; e, [^{3}H]SPRNA, 43,942cpm.

表2. SPバリアントRNA生成の条件

Preincubation	Additions	Incorporation (p mole)
Complete	Enzyme	5,402
Complete	-	93
- Enzyme	Enzyme	279
- ATP	Enzyme + ATP	153
- GTP	Enzyme + GTP	286
- CTP	Enzyme + CTP	204
- UTP	Enzyme + UTP	97
- Mg^{++}	Enzyme + Mg^{++}	196

Completeと表わした反応溶液(250μl)は、5μgのSPレプリカーゼ, 0.20μmoleのATP, GTP, CTP及びUTP、[^{3}H]-UTP(2.5 Ci/mole)と3μmoleの$MgCl_2$を含んでいる。UTPを除いた時は、[^{3}H]UTPのかわりに[^{14}C]ATP(1Ci/mole)を使用した。表に示した条件の反応溶液を、37°Cで5分間プレインキュベートしたのち、5μgのSPレプリカーゼ(10μlのM-緩衝液にとかしたもの)等図に示したものを加え、さらに20分間インキュベートしてから反応を停め、[^{3}H]UMPあるいは、[^{14}C]AMPの酸不溶性分画へのとり込みを測定した。

表3．SPバリアントRNAの鋳型活性

Template		Incorporation (p mole)		Ratio
		[^{3}H]UMP	[γ-^{32}P]GTP	(^{3}H/^{32}P)
Band A	-	1,674	145	11.5
	heated	3,602	251	14.4
	annealed	54	33	-
Band B	-	760	95	8.0
	heated	3,600	294	12.2
	annealed	18	34	-
Band A'	-	1,712	144	11.9
	heated	3,322	245	13.6
	annealed	48	-	-
Band B'	-	2,360	236	10.0
	heated	2,812	229	12.3
	annealed	859	-	-

図6-bに示したSPバリアントRNAの各バンドに対応するRNAを「材料と方法(i)」に述べた方法でゲルから抽出し、その0.3μgを表に示した処理をしたのち、[^{3}H]UTP(1.7 Ci/mole)、[γ-^{32}P]GTP(6.4 Ci/mole)及び2μgのSPレプリカーゼを含む反応溶液(250μl)に鋳型として加え、37°Cで20分間反応を行なった。反応系の最終塩濃度は80mM NaClである。

表に示した値は、鋳型を加えない時のとり込み：53p mole, [^{3}H]-UMP；42p mole, [γ-^{32}P]GTP．を差し引いてある。

表4. バリアントRNAを鋳型とした反応への塩と基質濃度の影響

a. SP replicase

Template RNA	4 NTP (mM)	$(NH_4)_2SO_4$ (mM)	Incorporation p mole	%
SP variant RNA (band B)	0.80	0	3,764	100
		24	3,743	
	0.27	0	2,143	
		24	1.869	100
Qβ variant RNA	0.80	0	1,666	44
		24	710	
	0.27	0	666	
		24	66	3.5
None	0.80	0	102	2.7
	0.27	24	40	2.1

b. Qβ replicase

Template RNA	4 NTP (mM)	$(NH_4)_2SO_4$ (mM)	Incorporation p mole	%
Qβ variant RNA	0.80	0	1,824	100
	0.27	24	1,077	100
SP variant RNA (band B)	0.80	0	891	49
	0.27	24	117	11
None	0.80	0	455	25
	0.27	24	120	11

2μgのSPレプリカーゼ(a)、あるいはQβレプリカーゼ(b)を含む反応溶液(250μl)を、表に示した硫安濃度、基質濃度に調整し、0.5μgのSPバリアントRNA(バンドB)あるいはQβバリアントRNAを鋳型として加え、37°Cで20分間反応させ、[^{3}H]UMPの酸不溶性分画へのとり込みを「材料と方法(d)」に述べた方法で測定した。

図 1

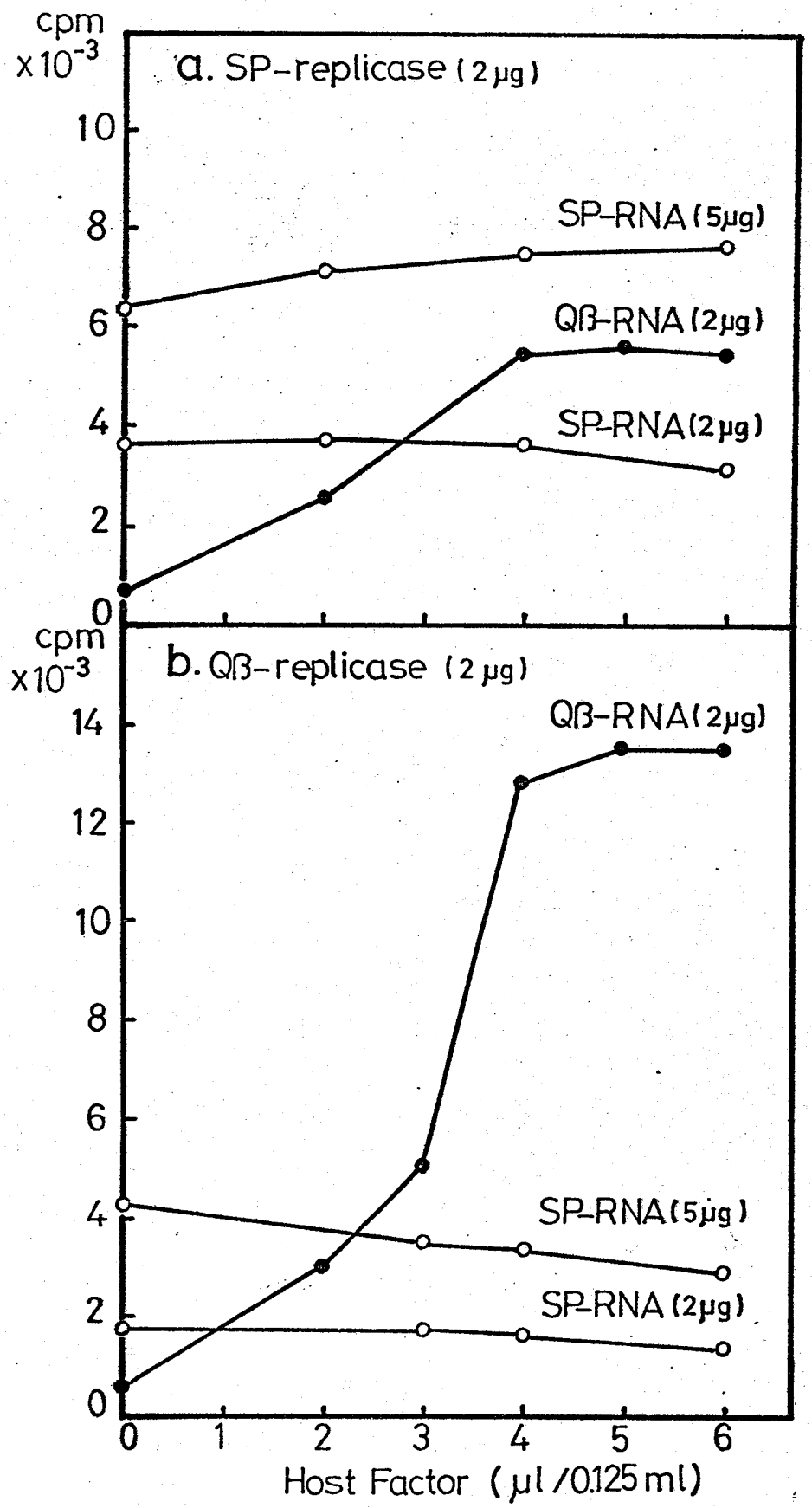

cpm
x10^-3
a. SP-replicase (2 μg)
SP-RNA (5μg)
Qβ-RNA (2μg)
SP-RNA (2μg)
10
8
6
4
2
0
cpm
x10^-3
b. Qβ-replicase (2 μg)
Qβ-RNA (2μg)
SP-RNA (5μg)
SP-RNA (2μg)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
Host Factor (μl/0.125 ml)

図1. ファージRNAを鋳型とした反応への宿主因子（HFI）の影響

2μgのレプリカーゼと2μgあるいは5μgのファージRNAを含む標準反応液（125μl）に、図に示した量のHFI分画（約4mg/ml）を加えて、37℃で20分間インキュベートし、酸不溶性分画への[^{3}H]UMPのとり込みを、「材料と方法(d)」に述べた方法で測定した。

用いたレプリカーゼ：A, SPレプリカーゼ；B, Qβレプリカーゼ. 鋳型RNA： SP RNA, ○——○; Qβ RNA, ●——●.

図2.

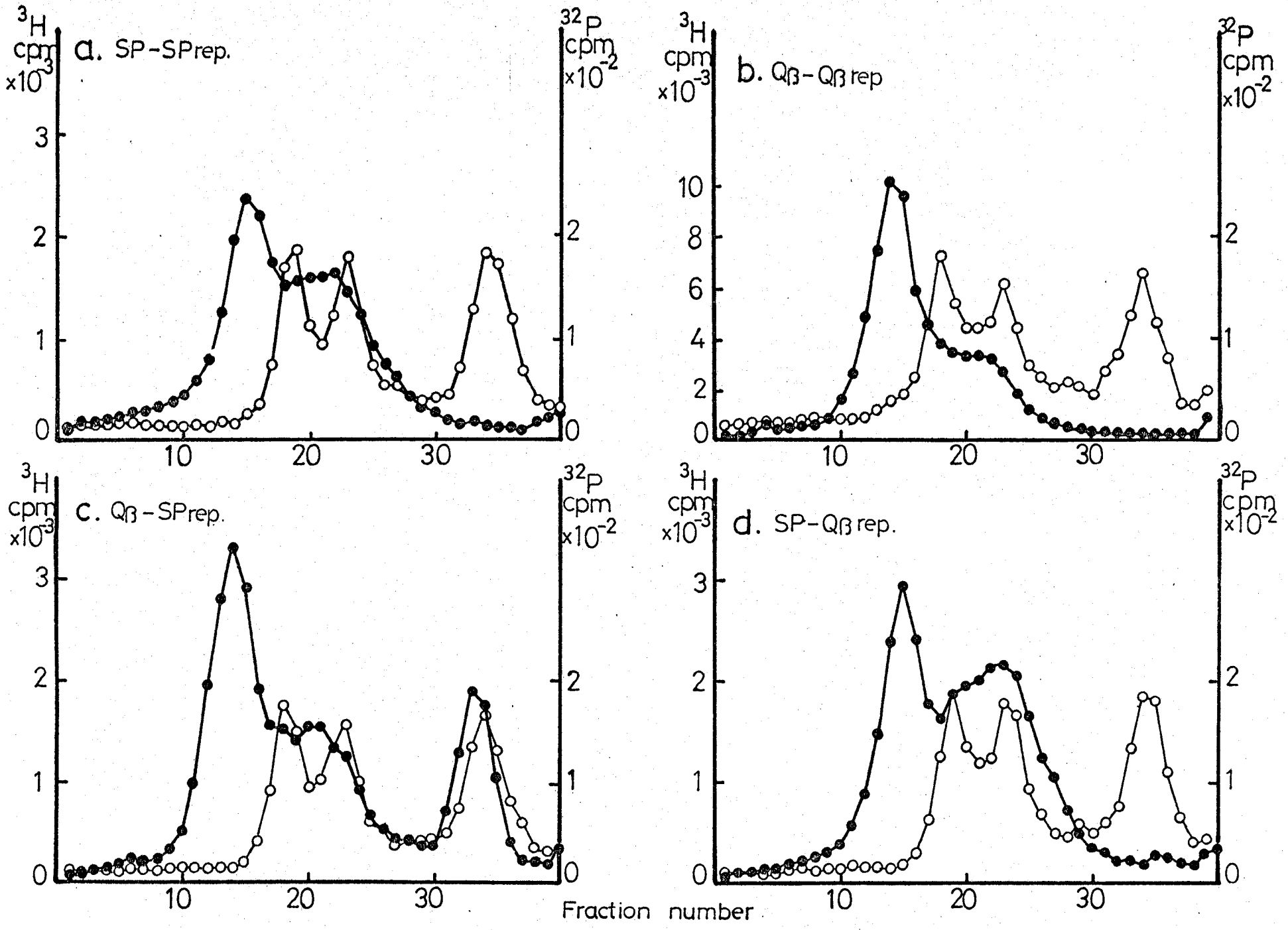

a. SP-SPrep.
b. Qβ-Qβrep
c. Qβ-SPrep.
d. SP-Qβrep.
^{3}H cpm ×10^{-3}
^{32}P cpm ×10^{-2}
Fraction number

図2. ファージRNAを鋳型とした反応産物のショ糖密度勾配遠心による解析

[^{3}H]標識した反応産物は、12μgのレプリカーゼと16μgのQβ RNAあるいは、30μgのSP RNAを含む反応溶液(500μl)を37°Cで60分間インキュベートすることによって得られた。但し、Qβ RNAを鋳型とした反応では、24μlのHFI分画(約4mg/ml)を加えた。反応産物の抽出とショ糖密度勾配遠心による解析は「材料と方法(f)-i)及び(g)」に述べた通りに行なった。

大きさのマーカーとして[^{32}P]標識した大腸菌全RNA(3×10^3 cpm, ○—○)を反応産物と混ぜて遠心した。

[^{3}H]標識した反応産物(●—●):a, SP RNAに依存したSPレプリカーゼによる反応産物;b, Qβ RNAに依存したQβレプリカーゼによる反応産物;c, Qβ RNAに依存したSPレプリカーゼによる反応産物;d, SP RNAに依存したQβレプリカーゼによる反応産物。

図 3

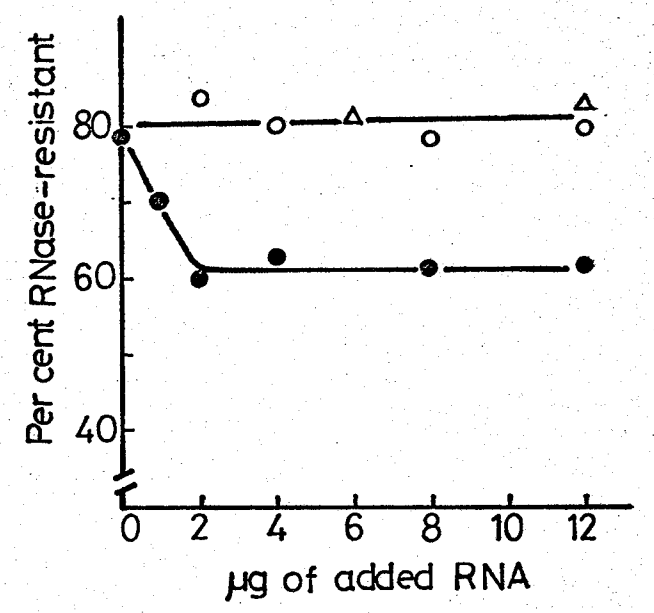


図3. SPRNAを鋳型としたSPレプリカーゼによる反応産物のアニーリングとRNase処理

反応産物の調製は、図2で述べられたと同様にして行なった。但し、インキュベーションの時間は20分間である。反応産物（0.6μg）のアニーリングとRNase処理は、「材料と方法（h）」に示した方法で行なった。RNase抵抗性の放射能は、RNase処理しない時の値（1678 cpm）を100%として示した。

拮抗させた非標識RNA：SP RNA，●—●；大腸菌RNA，○—○；QβRNA，△—△．

図4.

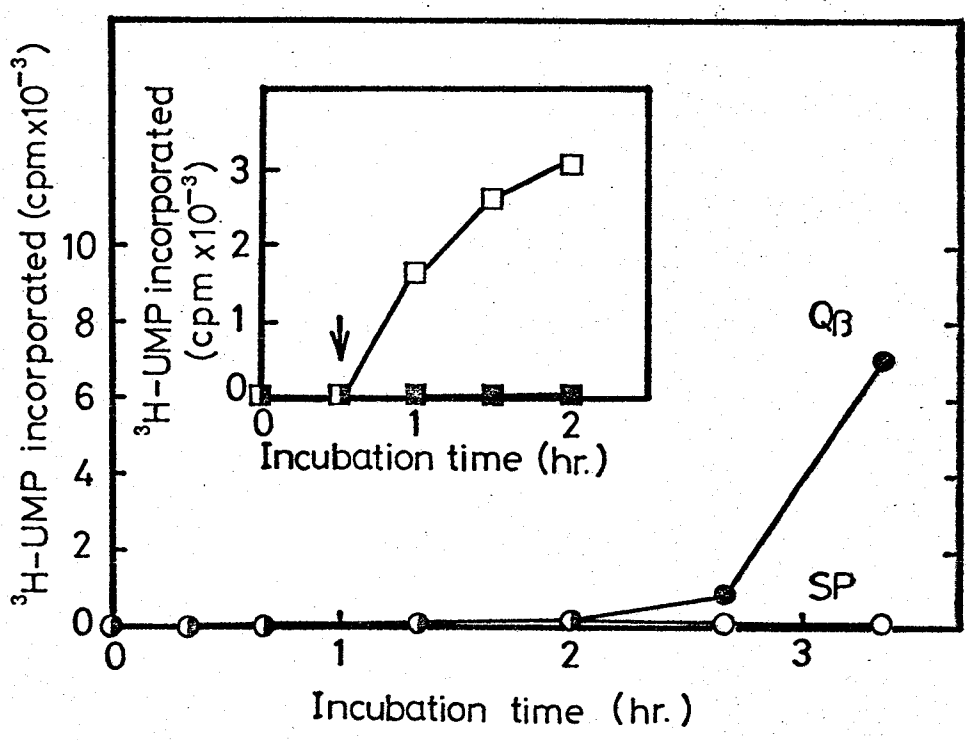

^{3}H-UMP incorporated (cpm x10^{-3})
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
Incubation time (hr.)
Qβ
SP
^{3}H-UMP incorporated (cpm x10^{-3})
3
2
1
0
0
1
2
Incubation time (hr.)

図4. 鋳型を加えない条件下で起こるRNA合成反応の時間経過

3μgのQβレプリカーゼ(●—●)あるいは3μgのSPレプリカーゼ(○—○)を含む標準反応液(125μl)を鋳型を加えずに、37°Cで図に示した時間インキュベートしたのち反応を停め、酸不溶性分画への[^{3}H]UMPのとり込みを「材料と方法(d)」に示した方法で測定した。

差し込み図: 4μgのSPレプリカーゼを含む標準反応液(250μl)を37°Cで30分間インキュベート後、4μgのSPレプリカーゼ(□—□)あるいは、10μgのSPファージRNA(■—■)を加え(↓)、さらにインキュベーションを続けた。それぞれから、50μlずつを図に示した時間にとり、酸不溶性分画への[^{3}H]UMPのとり込みを測定した。

図5

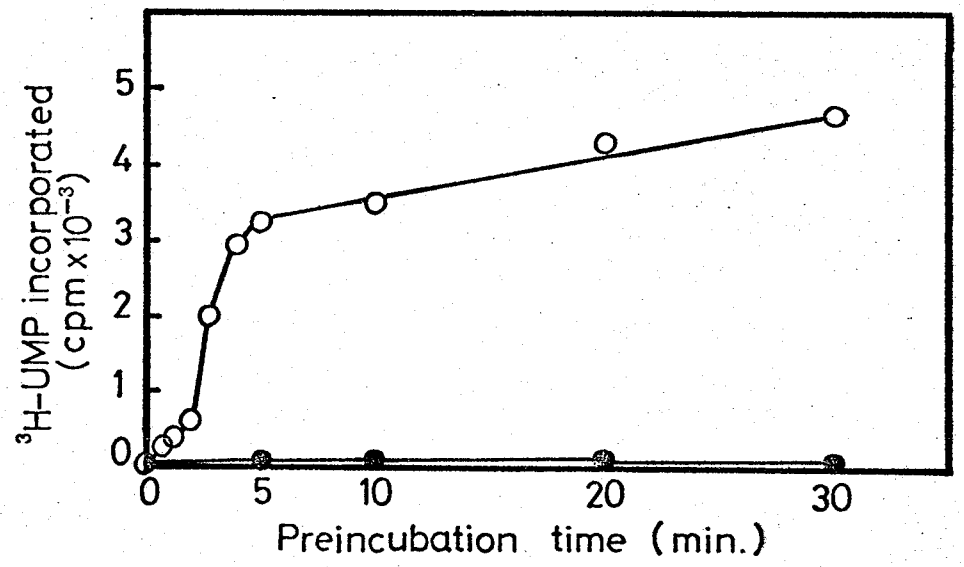

^{3}H-UMP incorporated
(cpm x 10^{-3})
5
4
3
2
1
0
0
5
10
20
30
Preincubation time (min.)

図5. 酵素添加する時間とRNA合成量の関係

2μgのSPレプリカーゼを含む標準反応溶液(125μl)を37℃で図に示した時間インキュベートしたのち、2μgのSPレプリカーゼ(10μlのM-緩衝液にとけている)を加え、さらに5分間インキュベートし、[^{3}H]UMPの酸不溶性分画へのとり込みを測定した。

添加したもの: SPレプリカーゼ, ○——○ ; M-緩衝液, ●——● .

図 6.

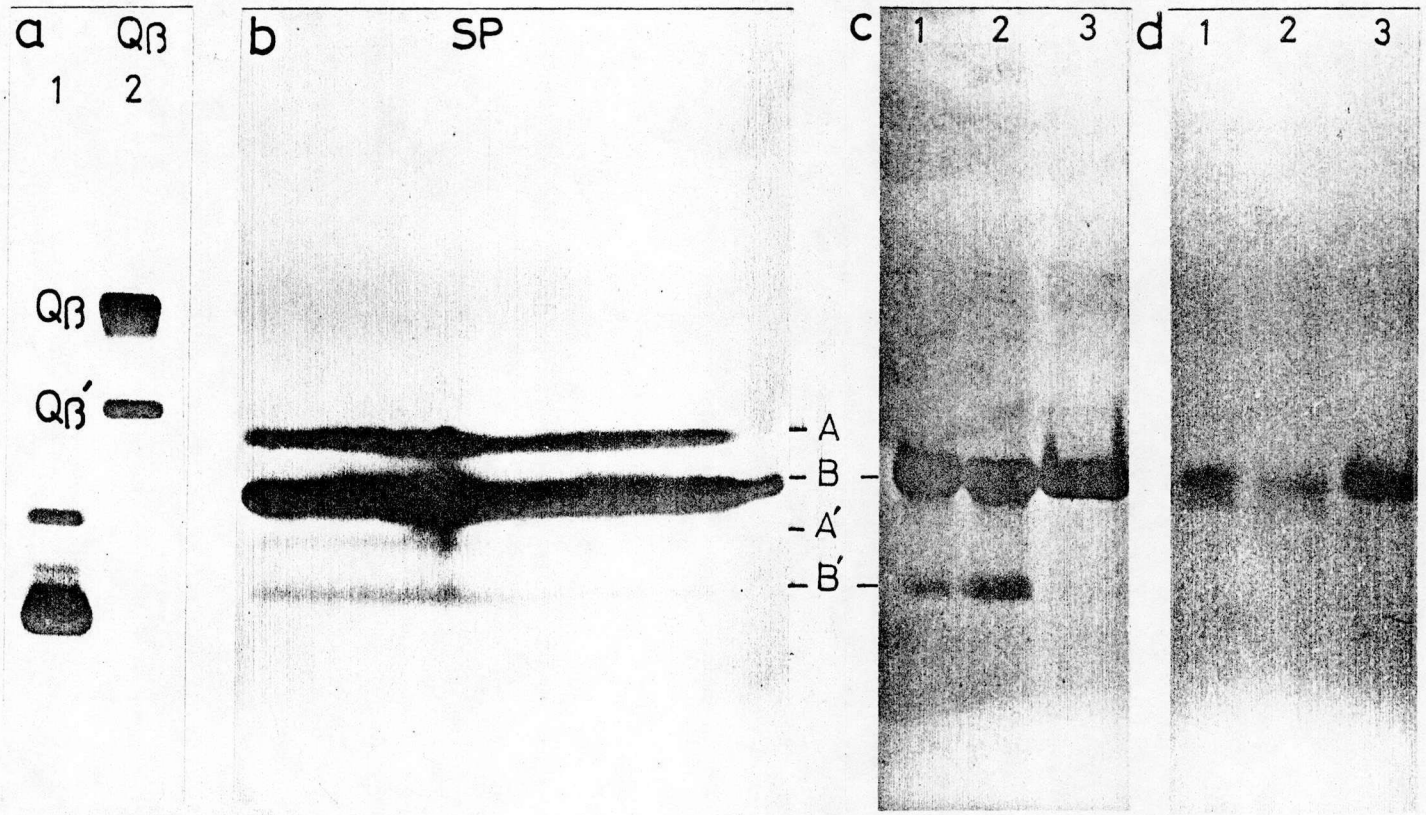


図6　バリアントRNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析

Qβのバリアント RNA 及び SP のバリアント RNA は、図4での条件に準じて「材料と方法(e)」に述べた方法で調製した。但し、Qβのバリアント RNA は、[^{14}C] ATP (1.0 Ci/mole) で標識した。　5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、「材料と方法(i)」に述べた通りである。　a：1, マーカーの [^{14}C] 大腸菌 4-5S RNA (5043 cpm); 2, [^{14}C] Qβ バリアント RNA (3042 cpm). b：エチジウムブロマイド染色した SP バリアント RNA (555 μg).

[^{14}C] SP バリアント B は、非標識の SP バリアント B を鋳型として合成し（表3、及び図8-3参照）、以下の処理をしたのち電気泳動した。　c：1, 無処理; 2, 熱処理; 3, 熱処理後アニーリング. d：1, 熱処理後 RNase T_1 処理; 2, 熱処理後 RNase A 処理.　d-3 は [^{14}C]-SP バリアント B を熱処理して得られたバンド B′ の RNA (c-2) を抽出し、アニーリング後再び電気泳動したものである。　各処理の方法は「材料と方法(j)」に示した通りである。

図 7

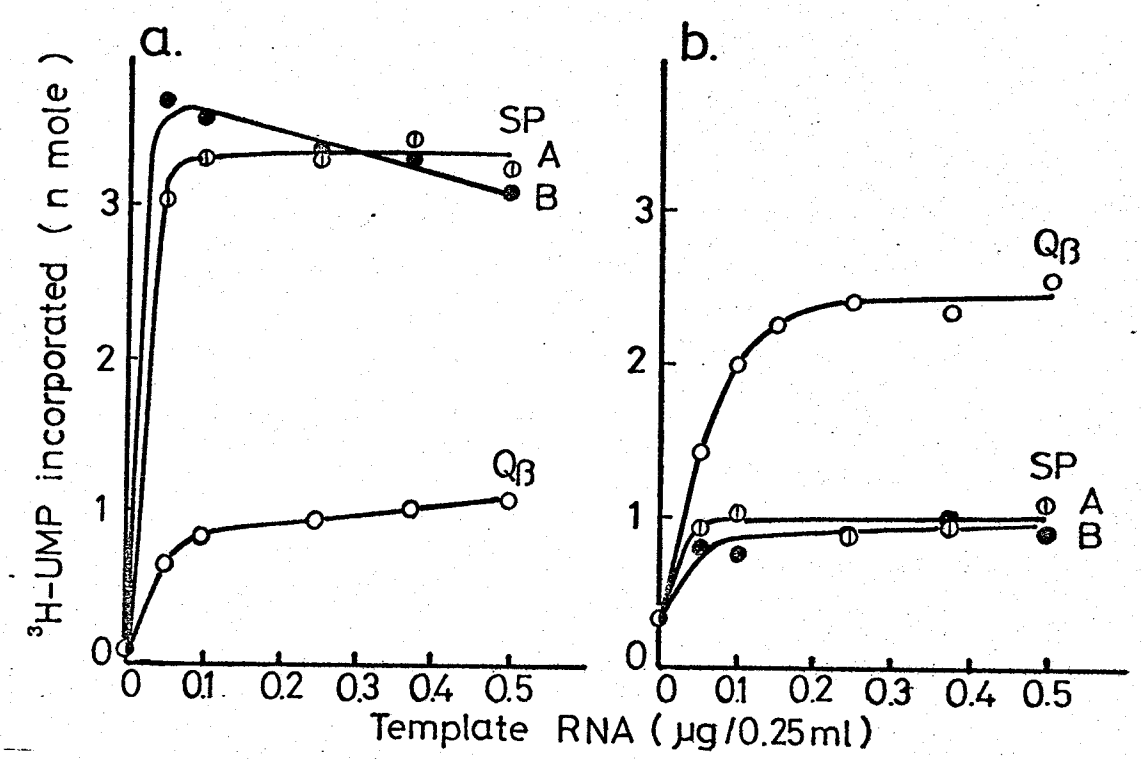
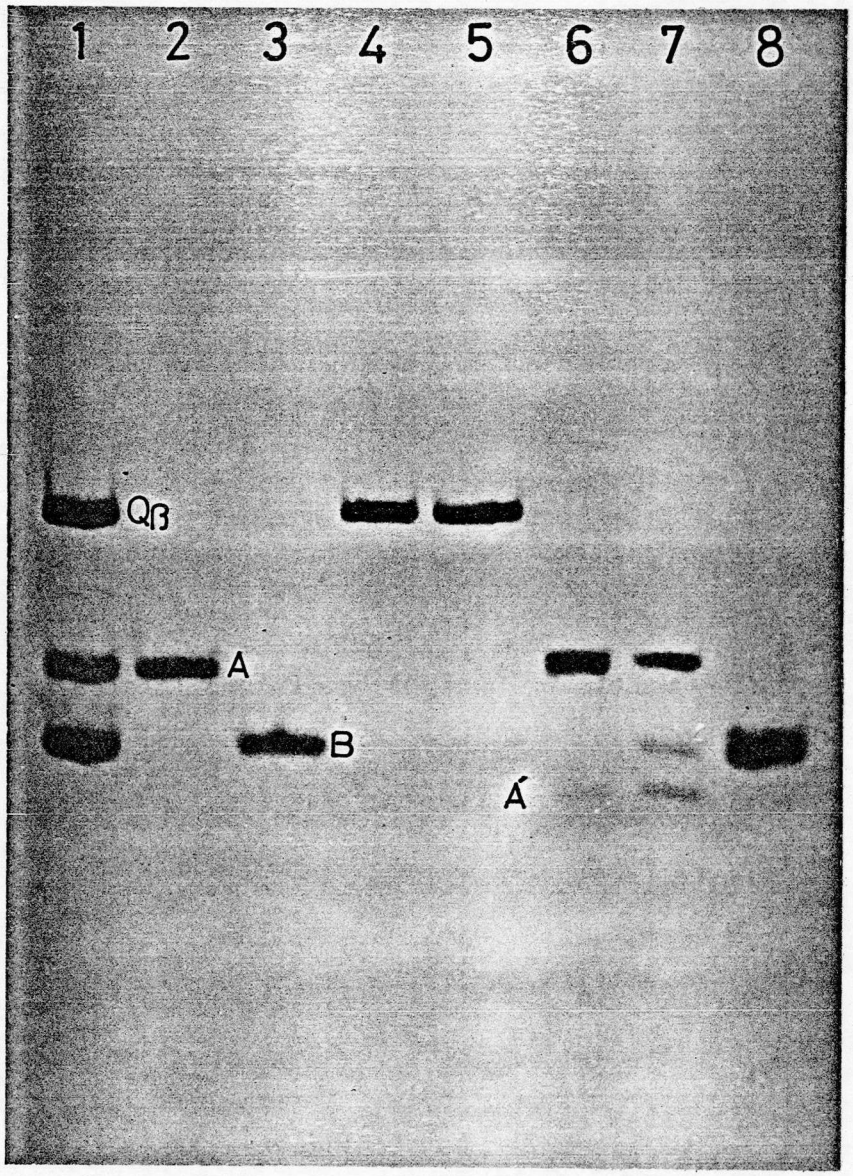

a.
b.
SP
A
B
Qβ
^{3}H-UMP incorporated (n mole)
0
1
2
3
0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5
Template RNA (μg/0.25ml)

図7　バリアントRNAの鋳型活性

2μgのSPレプリカーゼ（a）あるいは、2μgのQβレプリカーゼ（b）を含む標準反応溶液（250μl）に、図に示した量のバリアントRNAを加え37℃で20分間反応させ、酸不溶性分画への[^{3}H]UMPのとり込みを「材料と方法（d）」に述べた方法で測定した。

鋳型RNA：SPバリアントA，①—①；SPバリアントB，●—●；Qβバリアント RNA，○—○．

図 8



Template:	SP-A	SP-B	Qβ	Qβ	SP-A	SP-B	SP-B'
Replicase:	SP	SP	SP	Qβ	Qβ	Qβ	SP

図8. バリアントRNAを鋳型とした反応産物のゲル電気泳動による解析

0.3μgの各鋳型RNAと2μgのSPあるいはQβレプリカーゼを含む標準反応溶液(250μl)を37°Cで20分間インキュベートして得られた反応産物を「材料と方法(f)-ii)」に述べた方法で抽出し、アニーリングしたのち、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

1, マーカーのQβバリアントRNA(4440 cpm), SPバリアントA(4461 cpm), 及びSPバリアントB(4734 cpm). 用いたレプリカーゼ: SPレプリカーゼ, 2-4及び8; Qβレプリカーゼ, 5-7. 鋳型としたRNA: SPバリアントA, 2と6; SPバリアントB, 3と7; Qβバリアント RNA, 4と5; SPバリアントB', 8.

図 9

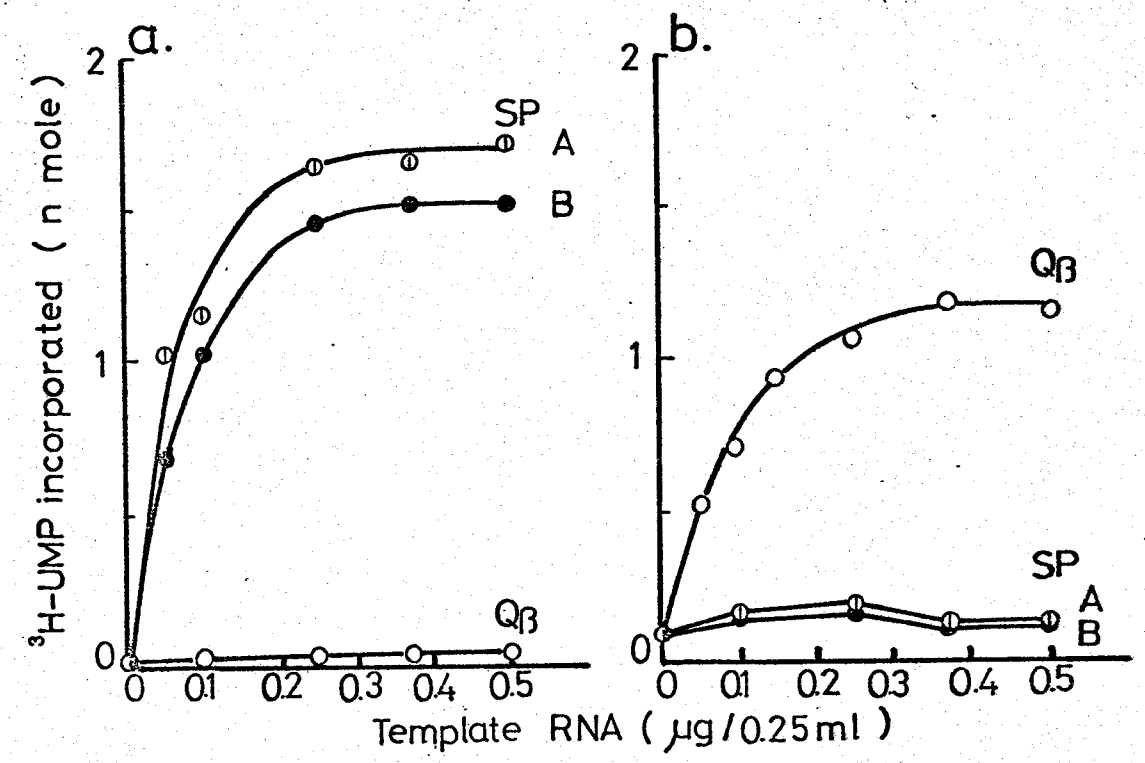

a.
b.
^{3}H-UMP incorporated (n mole)
2
1
0
SP
A
B
Qβ
0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5
Template RNA (μg / 0.25 ml)

図9. 抑制条件下でのバリアントRNAの鋳型活性

反応は図7の説明に述べたようにして行なった。但し、反応液中の基質濃度を0.80mMから0.27mMに下げ、硫安を最終濃度が24mMになるように加えた。

用いたレプリカーゼ：a, SPレプリカーゼ；b, Qβレプリカーゼ。　鋳型RNA：SPバリアントA, ①—①；SPバリアントB, ●—●；Qβバリアント RNA, ○—○.