



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

博士學位論文

RNALプリカーゼの鑄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イルスRNAの複製機構の研究は、1961年のLoebとZinder¹⁾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Spiegelman²⁾により、RNAファージQ β の感染した大腸菌から、Q β RNAに依存してRNA合成を行なうQ β 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Q β 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、Q β 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Q β 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イルスの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 $D\phi$ 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ると考え、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、Q β 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Q β 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 R/A 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。

Q β レプリカーゼは、1970 年に Kondo 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、Q β 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))。Q β レプリカーゼのサブユニットについては、Gröner ¹¹⁾ や Wahba 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 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、 $S1$ 、 $EF-Tu$ 、 $EF-Ts$ であることが確かめられた（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、 $Q\beta$ 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。しかし一オ、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、 $Q\beta$ RNA 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、 SP RNA に依存した反応は HFI を必要としないという非共通性を明らかにしている。

● 後に示すように、この宿主因子の存在量は $Q\beta$ RNA 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 $Q\beta$ 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、 $Q\beta$ RNA に結合して $Q\beta$ RNA 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ると考えられている^{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たしているのか、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 $Q\beta$ 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、 $Q\beta$ 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' 末端とメッセージャー 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、ファージRNA複製系の解析に戻ろうとする方法である。

Q_β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は²²⁾、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が合成されるといまり（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、

$Q\beta$ 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。

$Q\beta$ レプリカーゼの鋳型となる RNA としては、ファージ RNA や Poly C 等の他に「バリエーション 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。Kacian²⁴⁾ は $Q\beta$ 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エーション RNA を合成、分離し、この RNA が $Q\beta$ 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 Luce²⁷⁾ 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 等一部のバリエーション 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、これらバリエーション RNA の複製に鋳型特異性が伴っているかどうか、つまり Poly C 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 $Q\beta$ 以外のレプリカーゼもまたバリエーション RNA を生成するかどうかについてもわかっていないか

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、Q β 及びSP由来のバリエーション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につけてみられた特異性と対応した鋳型特異性がバリエーションRNAを使った系でも観察されることを見い出した。

バリエーション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複製系より単純である。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 λ^{29} (Hfr, $SuII^+$)、 $K37^{30}$ (Hfr, SuI^+) 及び $Q13^{21}$ (Hfr, $PNPase^-$, $RNaseI^-$, Su^-) を使用した。野生株 RNA ファージ SP^{31} 及び $Q\beta^{32}$ は λ あるいは $Q13$ 株を使って生育させた。 $Q\beta$ 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

$Q\beta$ レプリカーゼと SP レプリカーゼは、それぞれ、 $Q\beta$ 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 Spiegelman²⁾ 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、0.2 M の硫酸を含む M-緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 - 5 mM $MgCl_2$ - 1 mM EDTA - 5 mM β -メルカプトエタノール - 20% (v/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 Lowry³³⁾ 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 Q β レプリカーゼを用いた。

Q β RNA の複製に必要とされる宿主因子 HFI¹⁴⁾ は、ファージの感染していない Q β 菌体から堀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、伊藤と着名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。[³H] 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) ホリペプトン - 0.5% (v/v) 酵母エキス - 0.5% (v/v) NaCl, pH 7.0) で、100 ml の培養液に 1 mCi の [³H] ウラシル (比活性; 24 Ci/m mole) を加えた。

[¹⁴C] ウラシル標識した大腸菌 RNA は、Q β 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 Q β を 1×10^8 cells/ml になるまで生育させ、100 μ Ci の [¹⁴C] 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 $\times g$, 4°C

で10分間)で集め、1mlのT.E-緩衝液(10mM Tris-HCl, pH 7.4 - 3mM EDTA)に懸濁し、500 μ g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ねす。遠心(15,000 $\times g$, 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5 μ gのRNaseを含まないDNase Iで0°C、10分間処理後、 $\frac{1}{40}$ 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 $\times g$, 4°Cで5分間)し、水層をとり、 $\frac{1}{20}$ 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 $\times g$, -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1で調製し、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。

$[^{32}\text{P}]$ 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⁾ (125 μl あるいは 250 μl) は、80 mM Tris-HCl (pH 7.4)、12 mM MgCl_2 、0.8 mMヌクレオシド三リン酸 (ATP、GTP、UTP 及び CTP)、1.0 - 2.5 Ci/mole の $[^3\text{H}]$ UTP あるいは $[^{14}\text{C}]$ ATP、それにレアリカーゼと鉍型 RNA をそれぞれの図表に示した量だけ含んでいる。

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

RNA 合成反応は 37°C で通常 20 分間行ない、氷冷後 80% (v/v) TCA (trichloroacetic acid) を 12% (v/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

$\alpha\beta$ のバリアント RNA は、鉍型と標識した基質を含まない反応溶液 (2.5 ml) 中で 50 μg の $\alpha\beta$ レアリカーゼを 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 $\frac{1}{40}$ 容の 20% (v/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、エタノール濃縮

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、銑型と標識した基質を含
まない反応溶液 (20 ml) 中で $400\mu\text{g}$ の SPレプリカーゼ
を 37°C でインキュベートし、30分後に $400\mu\text{g}$ 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、 $Q\beta$ 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を銑型としたときの反応産物の抽出

反応溶液 ($500\mu\text{l}$) を 37°C で60分間インキュベートした
のち、 $500\mu\text{l}$ の1% (w/v) SDSを加えて反応を止め、 $200\mu\text{g}$ 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R
NAを加えずに抽出し、1mM EDTA (pH 7.4) に溶解後、
Sephadex G-50 カラム ($0.8 \times 16\text{ cm}$) によるゲル透過を行な
い、塩及び未反応の基質を除いた。

ii) バリアントRNAを銑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 $250\mu\text{l}$ 当り $50\mu\text{g}$ 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 ($0.8 \times 16\text{cm}$) 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

$50 - 100\mu\text{l}$ 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 $35,000\text{ r.p.m.}$ 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分間を濾紙 (直径 2.5cm) にしみこませ、濾紙を一度乾燥させた後、約 500ml の 5% (v/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 ⁵³⁸⁾ の方法に準じて行なった。反応産物 ($0.4 - 0.6\mu\text{g}$) と拮抗させる RNA ($0 - 12\mu\text{g}$) を含む $180\mu\text{l}$ の 1mM EDTA ($\text{pH } 7.4$) 溶液を沸騰

水中で3分間加熱後、20 μ lの4M NaClを加え、85 $^{\circ}$ 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 (pH 7.4) に溶かした 25 μ g/ml の濃度のウシ脾臓 RNase A 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ 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 を加えて反応を止め、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。

い) 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 ^{53D} 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 $\times$ 12 $\times$ 16 cm) を使用して 160 V/16 cm、30 $^{\circ}$ 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12cm泳動した。

非標識 RNA は、水に溶かした 50 μ g/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。¹⁴C 標識した RNA は、フルオログラフィー法⁴⁾ (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 ($15,000 \times g$, 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、1 mM EDTA にとかして、Sephadex G-50 カラムによるゲル濾過を行ない、塩を除去した。

h) 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、50 μ l の 1 mM EDTA (pH 7.4) に溶解した試料 (0.5 - 1 μ g) 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 5 μ g/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 10 容の 4.4 M NaCl を加え、二重鎖 RNA が RNase 抵抗性となる条件³⁹⁾ 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、10 容の 4.4 M 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。

h) 試薬

ヌクレオシド三リン酸 (ATP, GTP, UTP 及び CTP)、ウシ睪臓 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。

[³H] ウラシル (24 Ci/mmole)、[¹⁴C] ウラシル (57 Ci/mole)、[³H] UTP (17 Ci/mmole)、[¹⁴C] ATP (50 Ci/mole) は New England Nuclear より、また [γ -³²P] 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

$Q\beta$ 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)}、 $Q\beta$ レプリカーゼの構成成分が明らかにされたのにもかかわらず、この因子がないと $Q\beta$ 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、 $Q\beta$ 両酵素で SP ファージ RNA、あるいは $Q\beta$ 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、 $Q\beta$ 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、 $Q\beta$ レプリカーゼに対してでなく、 $Q\beta$ 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 $Q\beta$ 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 $Q\beta$ 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¹⁾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、 $Q\beta$ レプリカーゼの場合には、部分精製する際に $Q\beta$ 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 $Q\beta$ 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 $Q\beta$ 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、 $Q\beta$ 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化するということである。図に示した $2\mu g$ の $Q\beta$ RNAと $5\mu g$ のSP RNAは、 $2\mu g$ 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 $Q\beta$ 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。

6) 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かめるため、反応産物をショ糖密度勾配遠心及びアニールングと 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 $Q\beta$ RNA に依存した SP レプリカーゼによる反応系は、「 $Q\beta$ -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、 $Q\beta$ 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)}。

$Q\beta$ -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エント RNA であると思われる。

後に示すように、SP のバリエント 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、まれに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 Q β 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）（図 1(A)）では、加えた RNA 量に比例した RNA 合成が起こることかしばしばみられ、その時の反応産物には 28S の Q β 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 バリエント 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、Q β RNA によって SP バリエント 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 Q β -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エント 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拮抗を受け、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 Q β 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-SP_{rep}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 0.6 μ g ([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 1 μ g の最初に鋳型として加えた標識されている 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 SP RNA と同じ塩基配列をもつ RNA を少なくとも 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。 $Q\beta$ - $Q\beta$ rep. 系以外の系での反応産物の RNase 抵抗性は、 $Q\beta$ - $Q\beta$ rep. 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、 $Q\beta$ - $Q\beta$ rep. 系の才が大きいが、このことは、 $Q\beta$ - $Q\beta$ rep. 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 $Q\beta$ - $Q\beta$ rep. 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。

以上を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、その少な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 $Q\beta$ 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。

$Q\beta$ 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

ることか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Q β 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、Q β 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

α) バリアントRNAの生成

$Q\beta$ 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 $Q\beta$ 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合成が引き起こされた。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うときには、SPレプリカーゼは $Q\beta$ 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

キューベートした後、新たな酵素を加えることによって、
じめて RNA 合成が起こることを示している。

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種のヌクレオシド三リン酸のすべて、そ
れに Mg^{2+} 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) バリエーション RNA の性質

$Q\beta$ 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 $Q\beta$ 由来のバリエーション 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
リエーション 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、 $Q\beta$ 由来のバリエーション RNA では、

図に $Q\beta$ 及び $Q\beta'$ と示した二本のバンドがみられ (図6, a), SP 由来のバリエーション RNA では、A 及び B の二本のバンドと A' 及び B' のやや小さいバンドがみられる (図6, b)。 $Q\beta$ 、A 及び B と表わしたバリエーション 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。

$Q\beta'$ 、A' 及び B' と表わした RNA は、それぞれ常に $Q\beta$ 、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 $Q\beta$ 、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 $Q\beta$ 、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、 $Q\beta'$ や A'、B' は一本鎖構造をとった RNA であり、 $Q\beta$ 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 バリエーション 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、アニールによって鋳型活

性を失った。Weissmann⁵⁾によつて、 $\alpha\beta$ レポリカーゼは、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、アニール後の各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⁴⁾、反応産物の5'-末端を[γ - ^{32}P]GTPで標識し、その他の部分を[^3H]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[^3H]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[^3H]UTP以外の標識基質を用い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、一オ、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、アニール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 $[^3\text{H}]$ UMPと $[\text{e}^{-32}\text{P}]$ 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。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) バリエーション RNA の複製と鋳型特異性

バリエーション 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、 $Q\beta$ のバリエーション RNA と SP のバリエーション RNA の鋳型活性を、こ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、 $Q\beta$ バリエーション RNA ($Q\beta$)、SP バリエーション A、及び B の各 RNA を用いた。

図 7 に示したように、SP と $Q\beta$ 両レプリカーゼは、自己由来のバリエーション 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、互いのバリエーション 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エーション 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 (1 n mole の $[^3H]$ UMP のとり込みは、約 1.2 μg

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き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、 $Q\beta$ レプリカーゼを使ってSPバリエーション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 $Q\beta$ バリエーションRNAを鋳型とした時、及び $Q\beta$ レプリカーゼを用いてSPバリエーションAを鋳型とした時の両交叉反応系においても、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、これらの交叉反応系での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バリエーションBに依存した $Q\beta$ レプリカーゼによる反応産物の大部分は、バリエーションBより大きいバリエーションAの大きさのRNAであり、バリエーションBは少量しか合成されていない(図8-6)。このことの原因としては、おそらく、バリエーション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エーションAが、 $Q\beta$ レプリカー

せによって選択的に複製されたためであると思われるが、バリエーション B からなんらかの機構でバリエーション A が生成する可能性も現在の所除外されていいる。

また、SP バリエーション A や B に依存して Q β 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、Q β レプリカーゼが、SP バリエーション RNA を鋳型とするときは、どちらかの鎖にわたった RNA 合成が起こっていることが示唆されている。

バリエーション RNA を鋳型とした反応を解析するうち、SP と Q β 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出した。

表 4-a に示したように、SP レプリカーゼに対する Q β バリエーション RNA の鋳型活性は、標準条件下 (0 mM 硫酸 - 0.80 mM 4 NTP) では SP バリエーション 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 (24 mM 硫酸 - 0.27 mM 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。 $Q\beta$ 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 $Q\beta$ 両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 Q β 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、Q β 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 Q β 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 (バリエーション RNA) を生成する。
- (5) バリエーション RNA を鋳型とした系においても、SP レプリカーゼと Q β レプリカーゼは、互いに相手のバリエーション RNA を鋳型として RNA 合成を行なう。
- (6) (かし、自己のバリエーション RNA の方が鋳型特異性が高いという、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エーション 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かうとする時、

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。 $Q\beta$ RNA の複製に必要な宿主因子 HFI は、確かに $Q\beta$ 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、バリエーション 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 $Q\beta$ レプリカーゼによる RNA 合成に必要な因子ではなく、 $Q\beta$ 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 $Q\beta$ 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¹³⁾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、 $Q\beta$ 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与して、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エーション RNA 系で観察される SP と $Q\beta$ 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。

Q β 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 を鋳型とすることが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、それがどのような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た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Q β 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来たといえる。

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を選ぶことにより、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 Q β 面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、このようなバリエーション RNA の由来については興味をもたれる所であるが、現在この説があつて、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ゐてそれが、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つて色々な分子種のバリエーション RNA が生成するという観察²⁷⁾は前者の *de novo* 説を支持してゐるが、Banerjee ら¹⁴⁾によつて、部分精製段階の Q β レプリカーゼ分画から、自己複製される "6S RNA" が分離されてあり、Q β 感染菌中にそのような RNA が存在してゐると報告されてゐることは後者の contamination 説を支持してゐる。著者自身は、contamination 説を支持してゐる。なぜならば、生成し

したバリエーション 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。

Q β 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と思われる。

しかしながら、これら *in vivo* の 6S RNA が、*in vitro* で生成する バリエーション 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、京都大学ウイルス研究所、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。

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ます。

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., Eikhorn, 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., Nivelean, 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) Seneear, 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) Fedoroff, 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., Mishiara, 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. Microbid.* 12, 544 - 546

- 32) 桜井稔三、渡辺格、大野典也 (1967) ウイルス 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) Eikhon, 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
	Q β RNA	83.1
	E.coli RNA	79.7
	None	78.4
b. Q β -Q β rep. product	Q β RNA	26.4
	SP RNA	52.9
	E.coli RNA	50.3
	None	53.0
c. Q β -SPrep. product	Q β RNA	58.8
	SP RNA	68.7
	E.coli RNA	65.9
	None	69.4
d. SP-Q β rep. product	SP RNA	76.6
	Q β 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レプリカゼ"を使った場合の反応時間は20分間であり、Q β レプリカゼ"を使った場合は60分間である。 [3 H] 標識された反応産物 (0.4-0.7 μ g; 比活性, 2.8-4.1 $\times 10^3$ cpm/ μ g) をセルフアニールあるいは、12 μ g 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., 1678 cpm; b, Q β -Q β rep., 1845 cpm; c, Q β -SPrep., 2209 cpm; d, SP-Q β rep., 1642 cpm; e, [3 H]SPRNA, 43,942 cpm.

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 (250 μ l) は、5 μ g の SPレポ
リカーゼ、0.20 μ mole の ATP, GTP, CTP 及び UTP、[³H]-
UTP (2.5 Ci/mole) と 3 μ mole の MgCl₂ を含んでいる。
UTP を除いた時は、[³H]UTP のかわりに [¹⁴C]ATP (1
Ci/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、5 μ g
の SPレポリカーゼ (10 μ l の M-緩衝液にとおしたもの)
等図に示したものを加え、さらに 20 分間インキュベート
してから反応を止め、[³H]UMP あるいは、[¹⁴C]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 ($^3\text{H}/^{32}\text{P}$)
	$[^3\text{H}]\text{UMP}$	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$	
Band A	-	1,674	145
	heated	3,602	251
	annealed	54	33
Band B	-	760	95
	heated	3,600	294
	annealed	18	34
Band A'	-	1,712	144
	heated	3,322	245
	annealed	48	-
Band B'	-	2,360	236
	heated	2,812	229
	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0.3 μg を表に示した処理をしたのち、 $[^3\text{H}]\text{UTP}$ (1.7 Ci/mole)、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (6.4 Ci/mole) 及び2 μg のSPレプリカーゼを含む反応溶液(250 μl)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: 53 p mole, $[^3\text{H}]\text{UMP}$; 42 p mole, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 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)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mM)	Incorporation	
			p mole	%
SP variant RNA (band B)	0.80	0	3,764	100
		24	3,743	
	0.27	0	2,143	100
		24	1,869	
Q β variant RNA	0.80	0	1,666	44
		24	710	
	0.27	0	666	3.5
		24	66	
None	0.80	0	102	2.7
	0.27	24	40	2.1

b. Q β replicase

Template RNA	4 NTP (mM)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mM)	Incorporation	
			p mole	%
Q β 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

2 μ gのSPレプリカゼ(a)、あるいはQ β レプリカゼ(b)を含む反応溶液(250 μ l)を、表に示した硫酸濃度、基質濃度に調整し、0.5 μ gのSPバリアントRNA(バンドB)あるいはQ β バリアントRNAを鋳型として加え、37 $^{\circ}$ 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

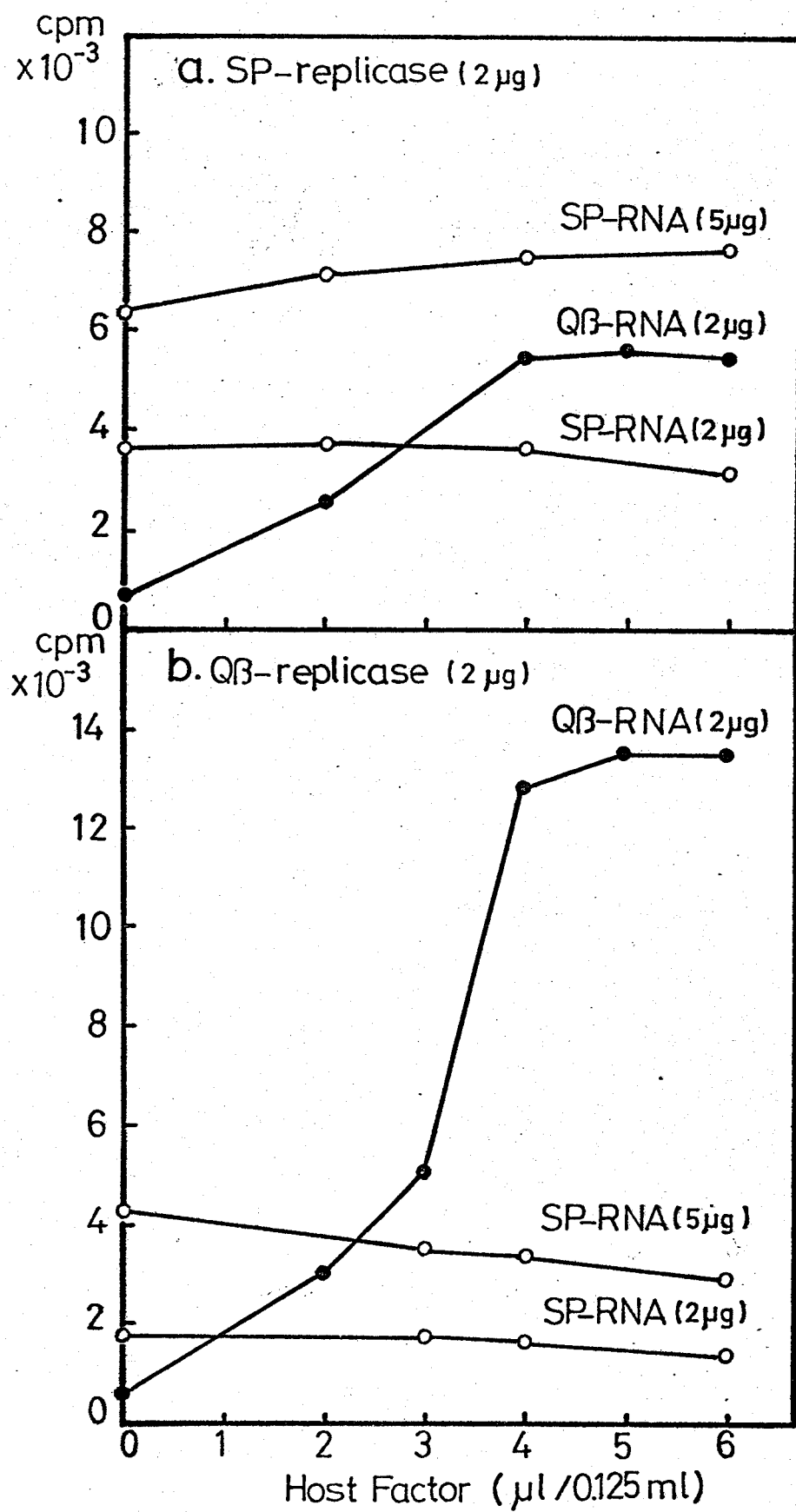


図1. ファージ RNA を鋳型とした反応への宿主因子 (HFI) の影響

2 μ g のレプリカーゼと 2 μ g あるいは 5 μ g のファージ RNA を含む標準反応液 (125 μ l) に、図に示した量の HFI 分画 (約 4mg/ml) を加えて、37 $^{\circ}$ C 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, Q β レプリカーゼ。鋳型 RNA：SP RNA, ○—○；Q β RNA, ●—●。

2.

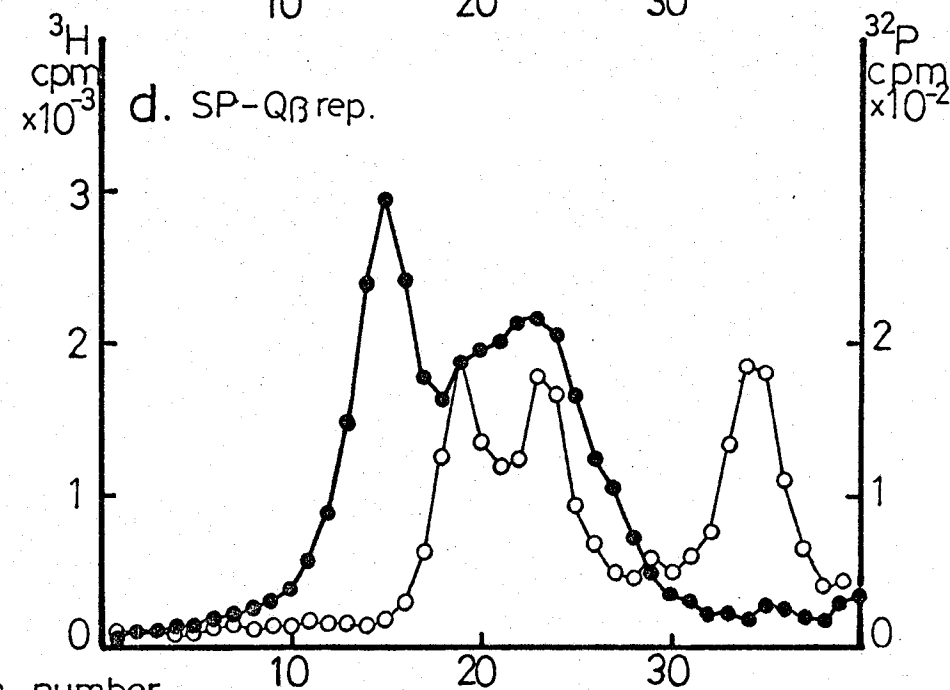
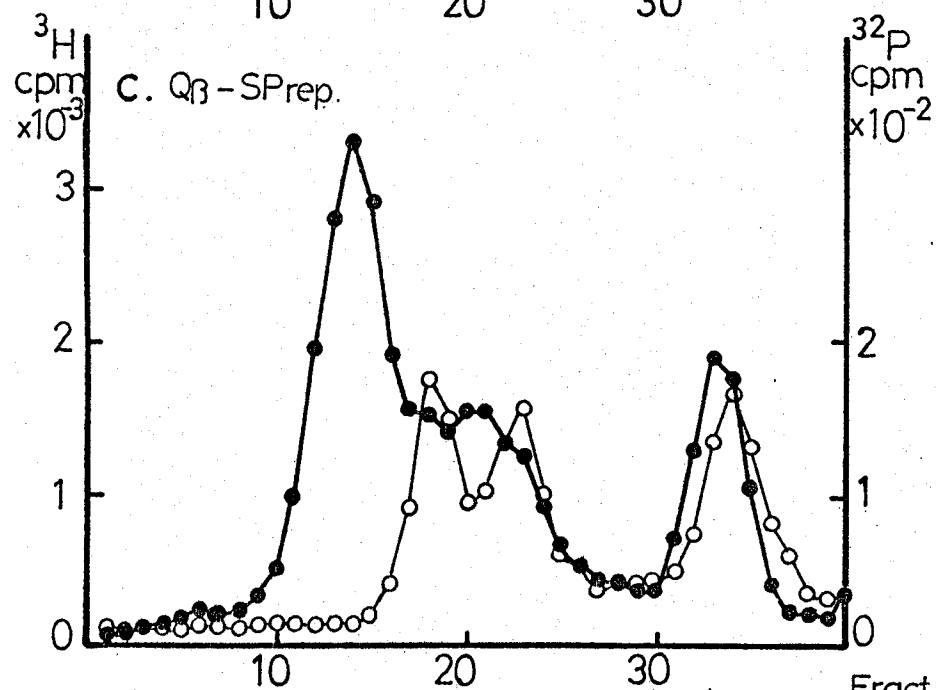
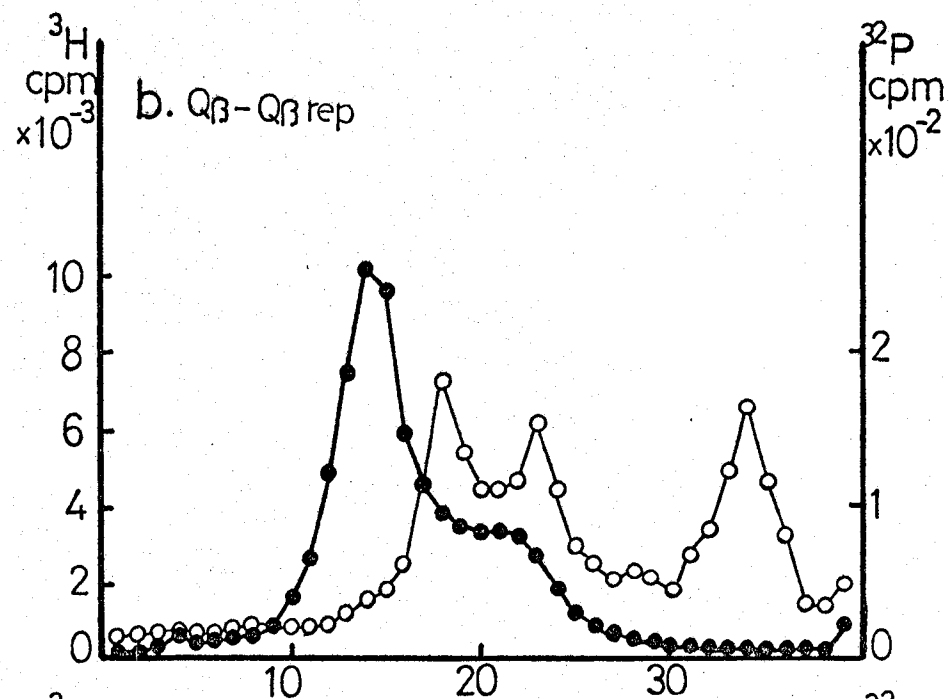
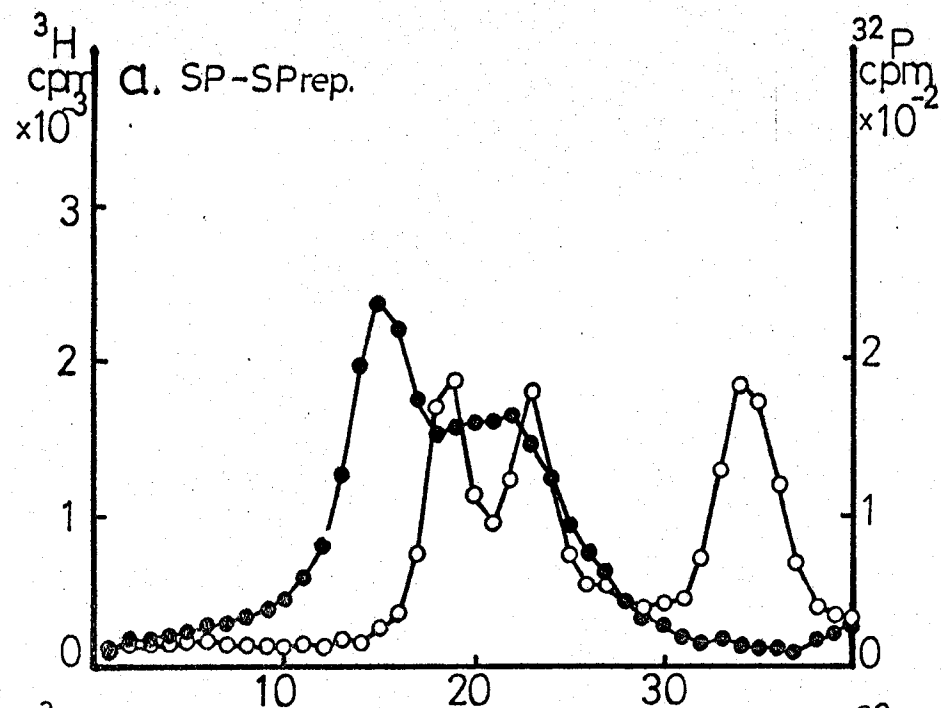


図2. ファージRNAを鋳型とした反応産物のショ糖密度勾配遠心による解析

[^3H] 標識した反応産物は、 $12\mu\text{g}$ のレプリカーゼと $16\mu\text{g}$ の $Q\beta$ RNAあるいは、 $30\mu\text{g}$ のSP RNAを含む反応溶液($500\mu\text{l}$)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、 $Q\beta$ RNAを鋳型とした反応では、 $24\mu\text{l}$ のHF I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、 $[^{32}\text{P}]$ 標識した大腸菌全RNA ($3 \times 10^3 \text{ cpm}$, ○—○)を反応産物と混ぜて遠心した。

[^3H] 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, $Q\beta$ RNAに依存した $Q\beta$ レプリカーゼによる反応産物 ; c, $Q\beta$ 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 $Q\beta$ レプリカーゼによる反応産物。

3

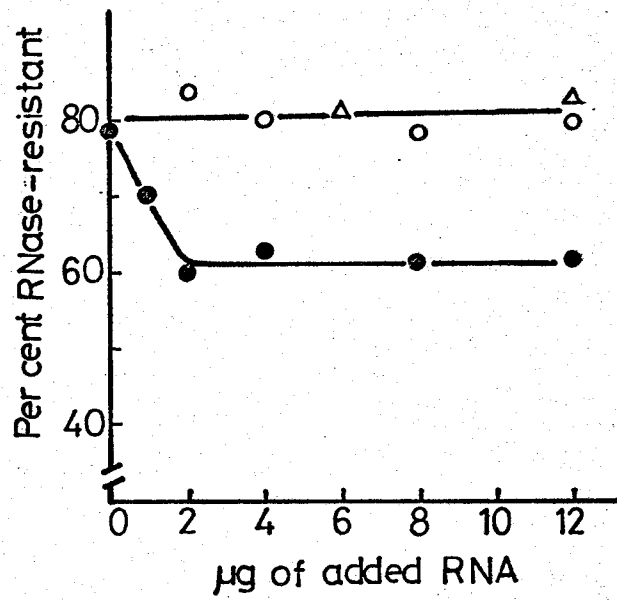


図3. SP RNA を鋳型とした SP レプリカ ーゼによる反応産物のアニーリングと RNase 処理

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 ($0.6\mu\text{g}$) 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, ○—○ ; Q β RNA, Δ — Δ .

図 4.

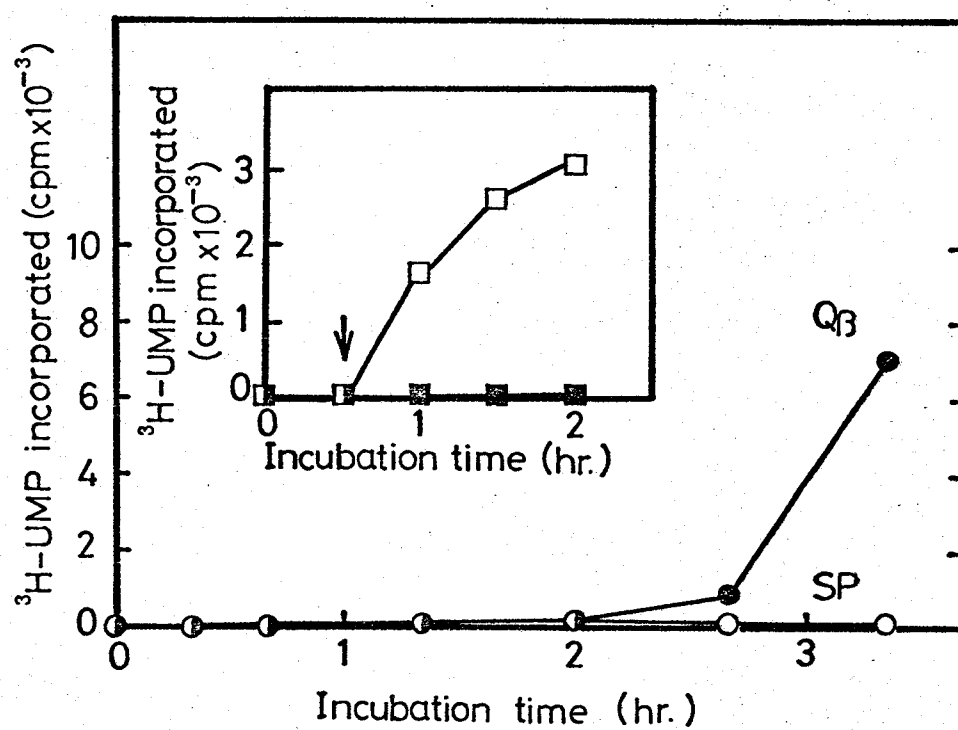


図4. 鋳型を加えない条件下で起こるRNA合成反応の 時間経過

3 μ gのQ β レプリカーゼ (●—●) あるいは3 μ gのSPレプリカーゼ (○—○)を含む標準反応液(125 μ l)を鋳型を加えずに、37 $^{\circ}$ 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 $[^3\text{H}]$ 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: 4 μ gのSPレプリカーゼを含む標準反応液(250 μ l)を37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベート後、4 μ gのSPレプリカーゼ (□—□) あるいは、10 μ g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、50 μ lずつを図に示した時間にとり、酸不溶性分画への $[^3\text{H}]$ UMPのとり込みを測定した。

図 5

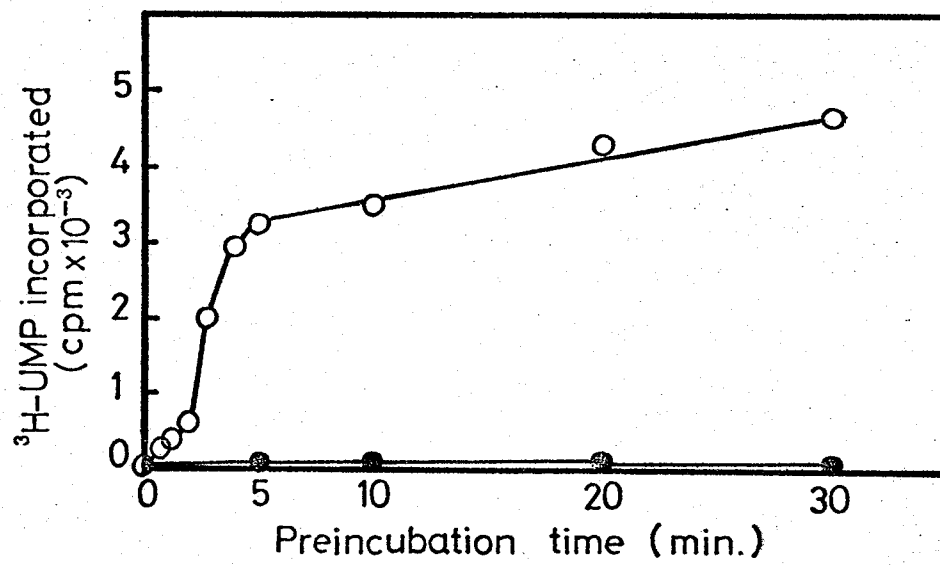


図5. 酵素添加する時間とRNA合成量の関係

2 μ gのSPレプリカーゼを含む標準反応溶液(125 μ l)を37 $^{\circ}$ Cで図に示した時間インキュベートしたのち、2 μ gのSPレプリカーゼ(10 μ l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、 $[^3\text{H}]$ 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, ●—●.

图 6.

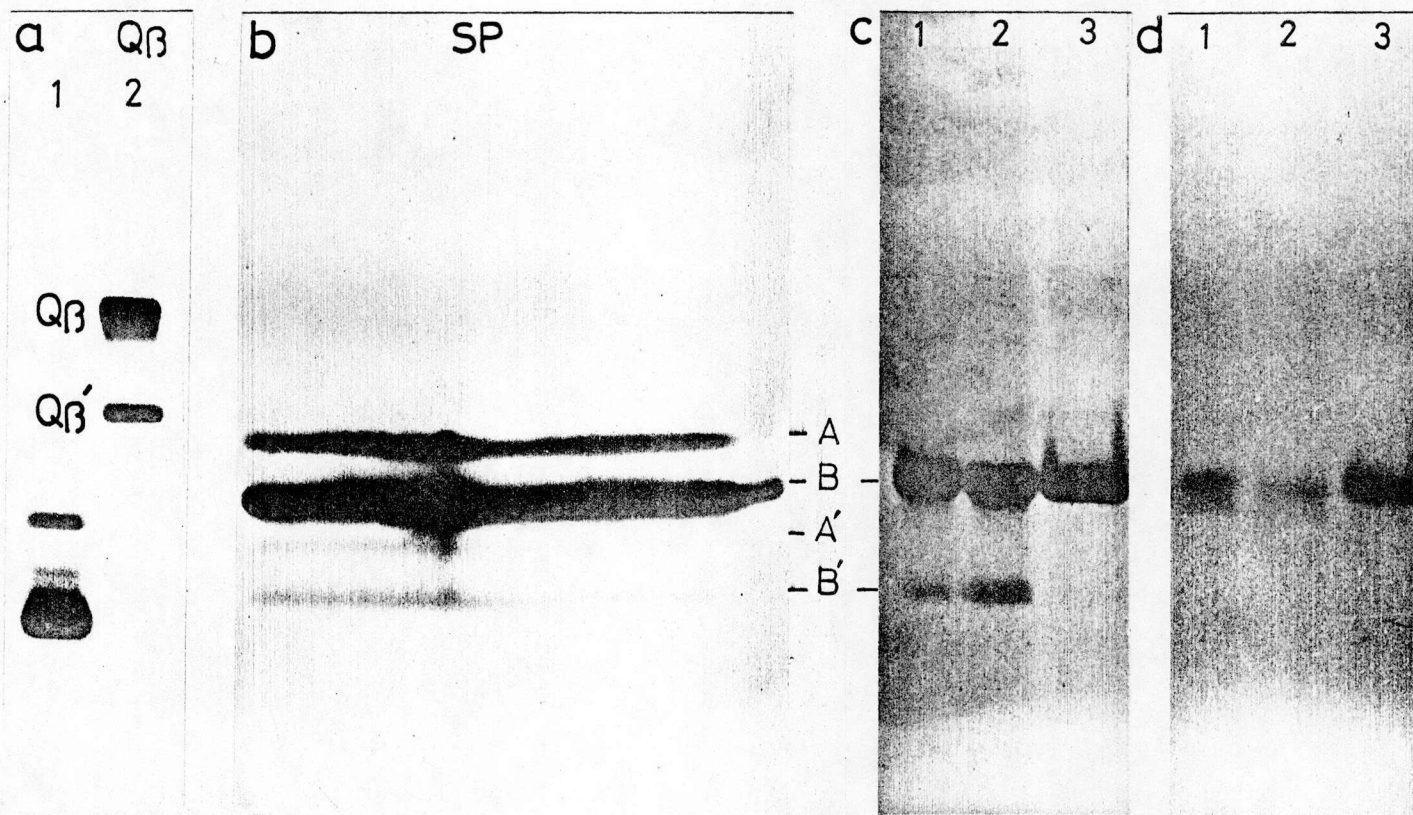


図6 バリアント RNA のホリアクリルアミドゲル電気泳動による解析

$Q\beta$ 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、 $Q\beta$ のバリアント RNA は、 $[^{14}C]$ ATP (1.0 Ci/mole) で標識した。5% ホ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 4-5 S RNA (5043 cpm); 2, $[^{14}C]$ $Q\beta$ 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 μ g).

$[^{14}C]$ 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 T₁ 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 (f)」に示した通りである。

図 7

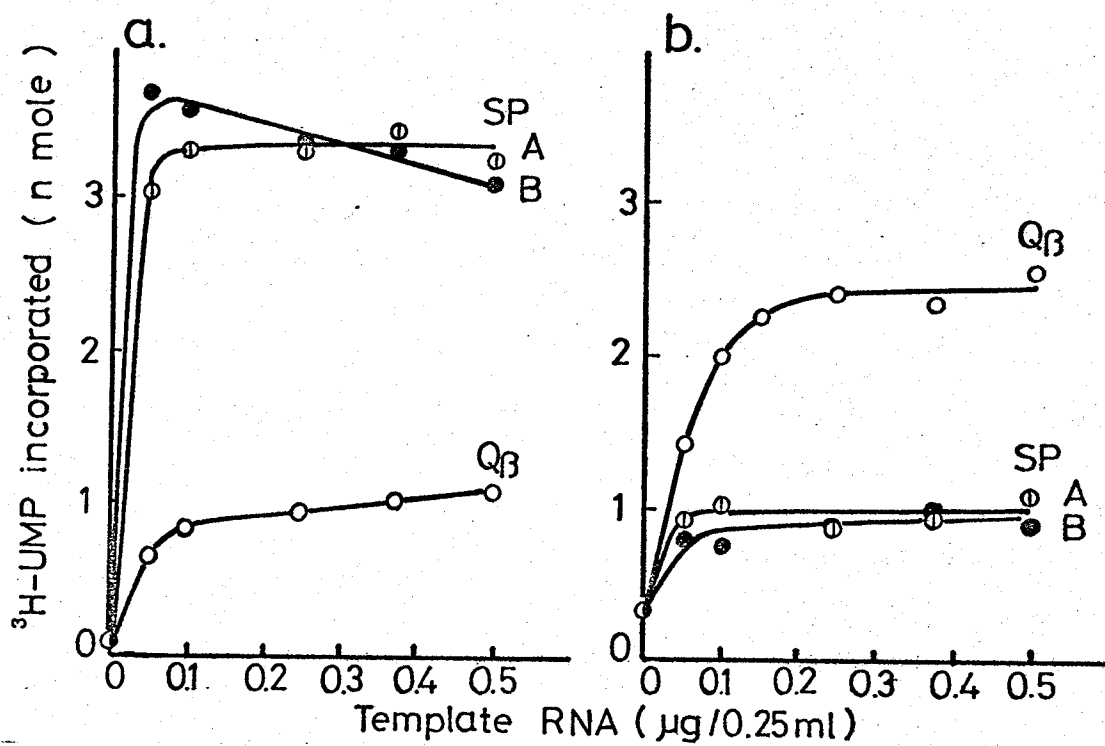
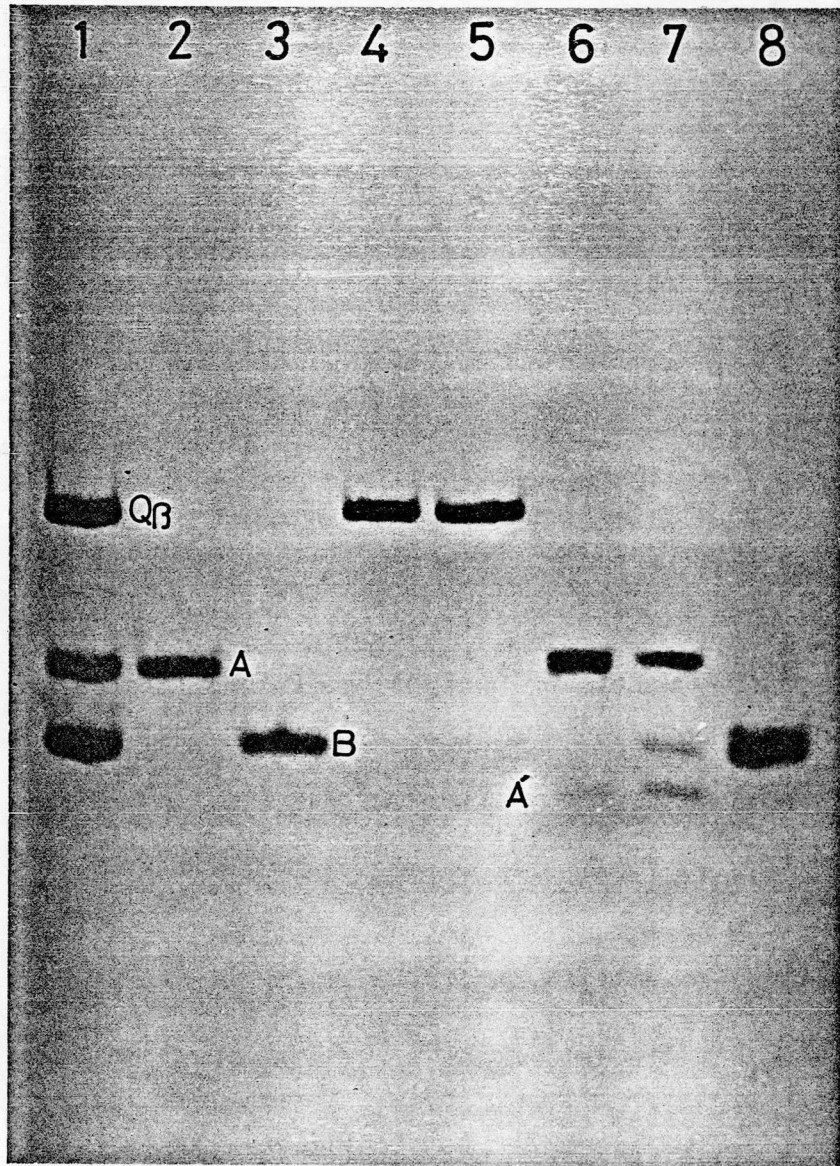


図7 バリアント RNA の鋳型活性

2 μ g の SP レプリカーゼ (a) あるいは、2 μ g の Q β レプリカーゼ (b) を含む標準反応溶液 (250 μ l) に、図に示した量の バリアント RNA を加え 37°C で 20 分間反応させ、酸不溶性分画への [³H]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, ○—○ ; SP バリアント B, ●—● ; Q β バリアント RNA, ○—○ .



Template:	SP-A	SP-B	Q β	Q β	SP-A	SP-B	SP-B'
Replicase:	SP	SP	SP	Q β	Q β	Q β	SP

図8. バリエーションRNAを鋳型とした反応産物のゲル電気泳動による解析

0.3 μ g の各鋳型RNAと2 μ g のSPあるいはQ β レポリカーゼを含む標準反応溶液(250 μ l)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、アニールングしたのち、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Q β バリエーションRNA(4440 cpm).
SPバリエーションA(4461 cpm). 及びSPバリエーションB(4734 cpm). 用いたレポリカーゼ: SPレポリカーゼ, 2-4及び8; Q β レポリカーゼ, 5-7. 鋳型としたRNA: SPバリエーションA, 2と6; SPバリエーションB, 3と7; Q β バリエーションRNA, 4と5; SPバリエーションB', 8.

9

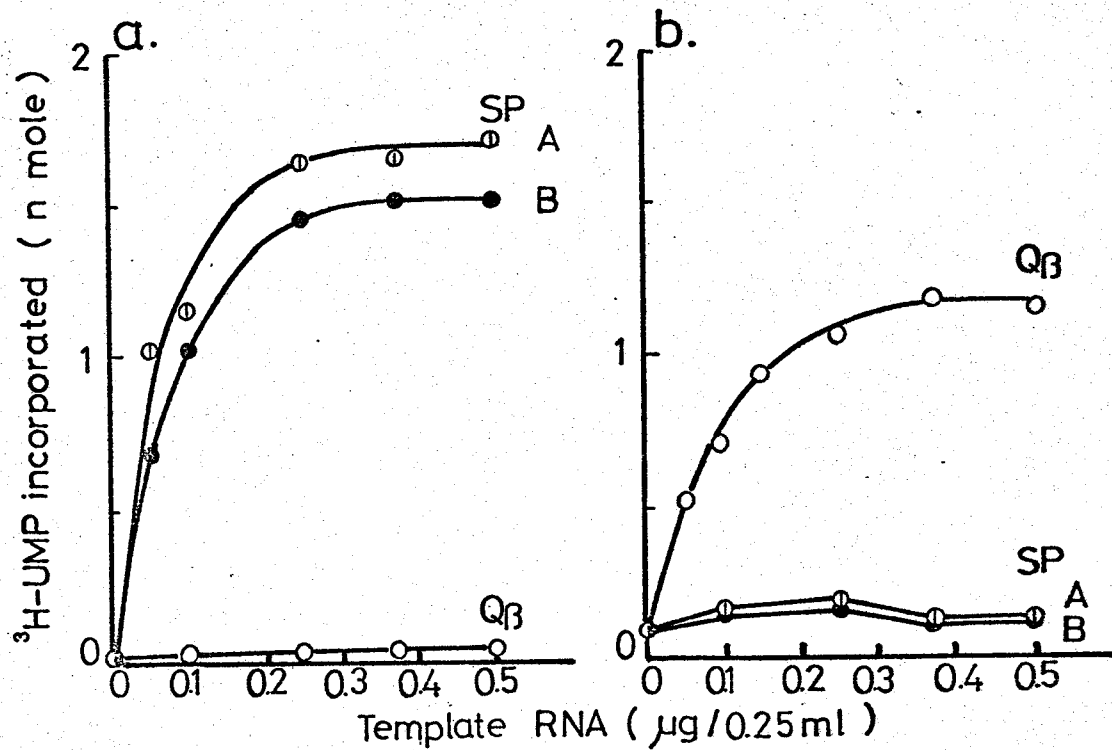


図9. 抑制条件下でのバリアントRNAの鋳型活性

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 0.80 mM から 0.27 mM に下げ、硫酸を最終濃度が 24 mM 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, $\alpha\beta$ レプリカーゼ。鋳型RNA：SPバリアントA, $\textcircled{\bullet} \text{---} \textcircled{\bullet}$ ；SPバリアントB, $\bullet \text{---} \bullet$ ； $\alpha\beta$ バリアントRNA, $\textcircled{\circ} \text{---} \textcircled{\circ}$ 。