The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	センダイウィルス（HVJ）の内部構造ポリペプチドM, NP, Pの単離
Author(s)	銭場, 俊彦
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31584
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【11】

氏名・(本籍)	銭場俊彦（せんば としひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3881 号
学位授与の日付	昭和52年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 病理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**センダイウィルス(HVJ)の内部構造ポリペプチドM, NP, Pの単離**
論文審査委員	(主査) 教授 深井孝之助 (副査) 教授 奥野 良臣 教授 岡田 善雄

論文内容の要旨

〔目的〕

発育鶏卵の漿尿腔で培養したセンダイウイルスの構成タンパクは，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により，エシベロープスパイクを構成している糖タンパク（HN,Fポリペプチド），ヌクレオキャプレドを構成しているタンパク（P,NPポリペプチド），およびエンベロープの内側にあると考えられているMポリペプチド，ウイルス遺伝子に由来するが存在部位については知られていないhmwポリペプチド等に分けられる。P,NPおよびMポリペプチドは宿主への感染過程で，細胞質内に入り，ウイルス遺伝子の複製にかかわっていると考えられる。しかしこれまでこれら内部構造ポリペプチドについての定量的単離が困難であったために，その化学構造ならびに物理的性質について明らかにされていることは少い。ここでは内部構造ポリペプチドの生物学的機能を知る基礎として，以上の画分の物質としての性質を明らかにするための分析的規模における単離法を確立することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

約80,000HAu/mlのウイルスを1％SDS，1％2-メルカプトエタノール存在下に100℃，10秒処理して，BioGel P－200 カラムクロマトグラフィーにより分画した。0.1％SDS，0.02 M 2-メルカプトエタノールを含む 0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.4）を用いて溶出すると，三つのピーク（P1，P2，P3）が認められた。ピークP1はRNAおよびhmwポリペプチドを含み，ピークP2はP,HN,NP,Fポリペプチドを含んでいた。Mポリペプチドは最も遅れて溶出されるピークとして単離された。同じカラムでhmwポリペプチドはRNAと重なって分別される。しかしリン酸濃度を 0.01

Mとするとタンパク成分はBio Gelに吸着され，リン酸濃度を上げると溶出されるのでhmwポリペプチドをRNAと分別単離することができた。

ピークP２を透析してリン酸濃度を 0.01 Mとし，さらに 0.1%SDS， 0.02M２-メルカプトエタノール存在下でハイドロキシルアパタイトカラムに吸着させ，リン酸濃度を 0.2Mから 0.4Mまで直線的に上げて溶出させるとポリペプチド成分はリン酸濃度 0.25 M— 0.35 Mの間に二つのピークとして溶出され，前のピーク（分画PH1）は主としてPおよびHNポリペプチドから成り，後のピーク（分画PH３）は主としてNPポリペプチドから成っていた。二つのピークの谷の分画にはFポリペプチドが含まれていた。ハイドロキシルアパタイトによる再クロマトグラフィーを行うと，二つのピークからともにFポリペプチドを除去することができ，PH３分画からはNPポリペプチドが単離される。

分画PH１を再クロマトグラフィーにより精製した後，溶液からSDSを除去するために，６M尿素を含む緩衝液に対し透析し，ついでDEAE Sephadex A—25カラムを通す。さらに 0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）に透析して尿素を除いた後，ポリエチレングリコール—デキストランによる水性二層分配を行うと，デキストラン層にはPポリペプチドのみが分配されることがSDSゲル電気泳動分析で確認された。しかしその収率は約50%であった。

分別されたポリペプチドのうち，MおよびNPポリペプチドについてはアミノ酸分析ならびにダンシル法によるN末端分析を行った。アミノ酸分析の結果，Mポリペプチドには疎水性アミノ酸が多く，39重量%を占めていた。NPポリペプチドには酸性アミノ酸として定量されるアミノ酸が多く，27重量%を占めていた。またNPポリペプチドでは１/２cystineは定量されなかった。N末端はMポリペプチドでは検出できなかったが，NPポリペプチドではphenylalanineが検出された。

〔総括〕

MおよびNPポリペプチドは二種のカラムクロマトグラフィーによって容易に調整される。Pポリペプチドはさらに水性二層分配法をカラムクロマトギラフィーに併用することによって単離が可能であるが現在のところその収率は低い。

hmwポリペプチドはBio Gel P— 200カラムクロマトグラフィーにおいて適当な塩類濃度を用いて溶出すればRNAと分別単離することができる。

MポリペプチドにおいてN末端は検出できず，blockされている可能性が強い。しかしN末端にはacid-labile残基が存在していたため検出できなかった可能性も否定できない。この点については他の方法による分析を検討中である。

論文の審査結果の要旨

従来から電気泳動的に識別されて来たHVJウイルスの粒子構成蛋白質HN,F,M,NP,P,hmwのうち３種の構成ポリペプチド，M（マトリクス），NP（ヌクレオキャプシド）,およびP（RNAポリメ

ラーゼに関連）のそれぞれを，著者は多くの方法を試みた結果Bio Gel P－200 およびハイドロキシルアパタイトを用いるカラムクロマトグラフィーと水性二層分配法を併用して量的に単離調製することに成功した。これらのポリペプチドはHVJの感染過程に於て宿主細胞内でウイルスRNAの複製等に関して機能すると考えられるもので，その物理・化学的性質を明らかにすることはウイルス粒子の諸特性を明らかにするために不可欠と考えられてきたものである。

著者はまた，単離したポリペプチドのうちMおよびNPについて アミノ酸組成とアミノ末端の分析を行ない，Mでは疎水性アミノ酸が多量に含まれ，アミノ末端アミノ酸が検出されないこと，NPのアミノ末端基はフェニルアラニンであることを見出した。

著者の努力による結果を加えて，HVJポリペプチドはそのすべてが単離調製可能となり，それぞれの物理・化学的性質の決定，活性およびウイルスの形態形成等の追究への道が拓かれたものと考える。