

Title	トリ肉腫ウイルス粒子構成蛋白の精製と酵素機能
Author(s)	上野, 明道
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32662">https://hdl.handle.net/11094/32662</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

[ 3 ]

氏名・(本籍)	上野明道
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4886 号
学位授与の日付	昭和 55 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	トリ肉腫ウイルス粒子構成蛋白の精製と酵素機能
論文審査委員	(主査) 教授 豊島久真男 (副査) 数 授 加藤 四郎 教 授 松田 守弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

トリ肉腫ウイルスの各抗原の精製は、塩酸グアニジン変性下でのゲルろ過法しかなく、この方法では逆転写酵素の活性を維持できない。また従来の逆転写酵素を目的とした精製法でも、活性及び蛋白量の回収が低いのみならず、他のウイルス蛋白の分離は困難で、変異株解析など少量のウイルスについては、応用不可能である。本研究では、1) 酵素活性も含め全蛋白を、非変性下で同一batchから、収量良く回収する方法の確立をはかった。2) この方法をもとに、ウイルスがコードする粒子構成蛋白を精製し、そのうち酵素活性を有するもの、すなわち蛋白プロセッシング酵素と逆転写酵素の生理機能について、詳細な検討を加え、変異株・組換え株解析への応用を試みた。

#### 〔方法ならびに成績〕

実験材料として、トリ肉腫ウイルス野生株B77、B77由来の温度感受性(T plusR class)変異株tsLA334、LA334株と内在性ウイルスとのrecombinantでTs<sup>+</sup>株のQV2を用いた。B77、LA334はニワトリ線維芽細胞、QV2はウズラ細胞にそれぞれ感染させ、それら培養上清から集めたウイルスを、ショ糖密度勾配遠心等で精製し、以下の出発材料とした。

- (1) 精製法の確立：精製したウイルスを高塩濃度下、1%NP-40を含むdisruption bufferで破碎後、塩化セシウムの密度勾配遠心にかけた。その結果、上層に内部蛋白(gag蛋白)の大部分が、また逆転写酵素活性が中層に認められ、被膜糖蛋白は主に下層に存在した。これら3画分のうち、DNAポリメラーゼ画分はpoly(C)-agaroseカラム、env蛋白画分はレクチン・カラムにかけ、それぞれアフィニティー・クロマトグラフィーにより精製した。この段階で、DNAポリメラーゼは90%以上

の純度で回収することができた。さらに必要に応じて、グリセロール密度勾配遠心にかけ、純度を高めた。また env 蛋白の gp 85 も、グリセロール遠心後、90%以上の純度のものが得られた。一方、上層に多く含まれた gag 蛋白 (p27, p19, p15) は、まず Sephacryl S-200 のゲルろ過にかけ、混在する宿主細胞並びに血清由来の蛋白を除くことができた。次に gag 蛋白溶出画分を 2 つ (前半の p27 rich fraction, と後半の p15 rich fraction) に分け、Phosphocellulose カラムにかけた。その flow-thru から p15 を、さらに塩濃度の上昇に従って、p27, p19 をそれぞれ約 99% の純度で回収した。

- (2) 酵素機能 i) 蛋白プロセッシング酵素：各種阻害剤の効果から thiol プロテアーゼと分類され、至適 pH は 6 であった。tsLA334 は gag 蛋白の maturation に変異があるとされている。この事実が p15 のプロテアーゼ活性の ts 性によるものかどうかについて検討した。3 株について、32°, 37°, 42°, 47° の温度で p15 プロテアーゼの反応を調べた。基質である gag 蛋白の前駆体 Pr 76 は感染細胞から anti-p27 血清で沈澱させ、泳動後ゲルから溶出させたものを用いた。その結果、LA 334 (非許容温度 41°) の p15 は 42° においても、他の 2 株と同様、高い活性を示した。また他の一般の蛋白基質として、大腸菌の RNA ポリメラーゼを用いた場合も同様であった。ii) 逆転写酵素：DNA ポリメラーゼは、poly (C)-agarose カラムから塩濃度の上昇に伴い、3 株ともポリメラーゼ I, ポリメラーゼ II とに分かれて溶出された。それらの SDS-PAGE の結果、ポリメラーゼ I は  $\alpha\beta$ , II は  $\beta$  の subunit から構成されており、相対的泳動度から  $\alpha$  の分子量は 5~5.5 万、 $\beta$  は 10~11 万と推定された。なお、これらの値は従来報告されているデータよりも、 $\beta$  は約 1~1.5 万ほど大きく、 $\alpha$  は逆に 3000~8000 ほど小さい。比活性は、LA 334 で 573 と従来のあらゆる報告の数十倍の値を示し、他の 2 株も高く、この精製法の有用性を示した。また収量からみると、全蛋白中 B 77 1.29%, LA 334 0.494%, QV2 0.255% と含量に大きな差のあることを示す結果が得られた。さらに反応に対する温度の影響を調べたところ、rA · dT では、37° 前後で、dT の取り込みが最大となるが、rC · dG では、さらに直線的に dG の取り込みが上昇した。このことは 3 株とも同様であった。
- (3) その他：精製した QV2 p19 を二次元電気泳動にかけると、等電点 6.7, 7.0, 8.1, 8.4 の位置に、spot を認め、charge isomer の存在が強く示唆された。また LA 334 では他の 2 株よりも、p27, p15 の泳動度が僅かに小さいことも認められた。

[総括]

- (1) 単一 batch から native な状態で、ウイルス全蛋白を精製する方法を確立した。
- (2) この方法では、逆転写酵素の収率は従来報告の 10 倍以上であった。また分子量、含量などに対する従来値も大幅に修正した。
- (3) LA 334 の p15, 逆転写酵素とも温度感受性は認められず、ウイルスの ts 性とは直接関係がないことがわかった。
- (4) 逆転写反応で、用いる template-primer が rA · dT と rC · dG では温度による影響が全く異なることが見いだされた。
- (5) p15 プロテアーゼを、SDS や熱などで前処理していない一般の蛋白基質に対して作用させ、pro-

teolysis を確認した最初の例である。

(6) 変異・組換えを通して、charge isomer 等の新しい gag 蛋白の出現が認められた。

### 論文の審査結果の要旨

本研究では、単一バッチのレトロ・ウイルスから抗原性や酵素活性を保持した状態で、すべてのウイルス蛋白を、系統的に精製する方法を、初めて確立した。逆転写酵素と蛋白プロセッシング酵素については、特に、従来より、はるかにすぐれた収量と比活性を得ることが出来、両酵素の性状に関して、数多くの新しい知見を得ると共に、変異株解析等少量のウイルスへの応用も可能にした。この方法を用い、温度感受性株の酵素機能を明らかにした。

本研究は、変異株、遺伝子組換え株等の詳細な解析に役立つのみならず、逆転写酵素の能率的な供給手段を開発したもので、広く分子生物学に寄与出来るものと期待される。