

Title	ワクチニアウイルス メッセンジャーRNAキャップ構造生合成機構
Author(s)	漆原, 敏之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32938
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

[37]

氏名・(本籍)	漆 原 敏 芝
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 1 6 1 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 2 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ワクチニアウイルス メッセンジャーRNAキャップ構造 生合成機構
論文審査委員	(主査) 教 授 松原 謙一 (副査) 教 授 本 庶 佑 教 授 松代 愛三

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

ウイルス粒子を酵素源とする *in vitro* の合成系でワクチニアウイルスメッセンジャーRNA(mRNA)を合成させ、mRNA 生合成前駆体であるオリゴヌクレオチドを分取する。種々の長さのオリゴヌクレオチドの5'末端に結合しているキャップ構造を精密に分析し、転写の初期におけるmRNA鎖の伸長とキャップ構造の生合成機構との関係について検討する。

[材料と方法]

ワクチニアウイルス粒子：BHK細胞で増殖し、シヨ糖濃度勾配遠心法により精製した。

ウイルス粒子を酵素源とする *in vitro* の合成反応：mRNA 合成反応系にメチル基をトリチウムでラベルしたS-アデノシル-L-メチオニンを加えて30°で行った。

オリゴヌクレオチドの分取：合成反応終了後、SDS処理によりウイルス粒子を破壊し、遊離したオリゴヌクレオチドはDEAE-セルロースを担体とするカラムクロマトグラフィーで鎖長別に分取した。

キャップ構造の分析：分取したオリゴヌクレオチドをトリエチルアミン炭酸塩を用いて脱塩濃縮してから、ベニシリウムヌクレアーゼPI処理し、あるいはさらにへび毒ホスホジェステラーゼ処理してから、陰イオン交換樹脂Dowex 1×2を担体とするカラムクロマトグラフィーで分析した。

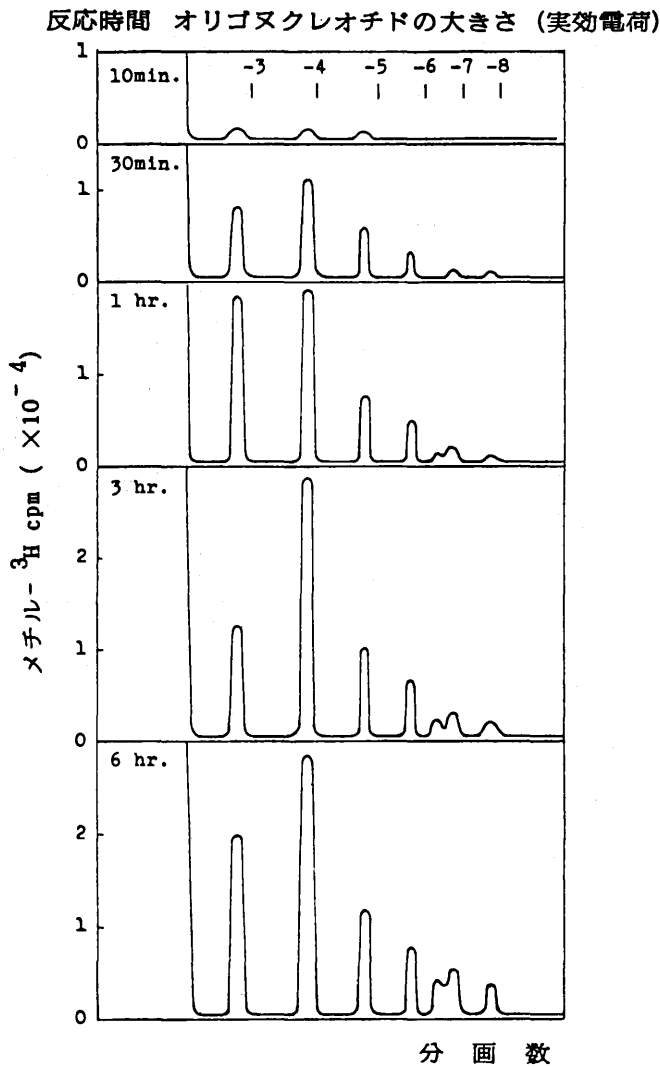
[成 績]

1. *In vitro* の合成反応で得られたmRNA前駆体オリゴヌクレオチドの分析結果を第1図に示す。オリゴヌクレオチドの蓄積量は反応時間とともに増し、反応開始後約6時間には最大となった。ま

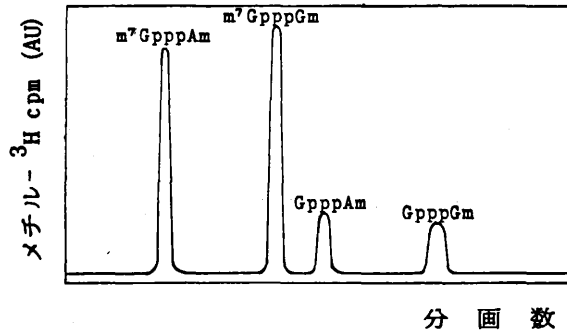
た結果から、キャップ形成はRNA合成の極めて初期に起っていると判断された。

2. 分取したオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼP1分解生成物の分析結果を第2図に示す。完成したキャップ構造 (m^7 GpppRm, R=A または G) に相当する二つのピークのほかに、未完成キャップ構造 (GpppRm) に由来する二つのピークが存在した。未完成キャップ構造 (m^7 GpppR) は見付からなかったため、キャップ構造形成の中間体は m^7 GpppR ではなく GpppRm であると判断された。

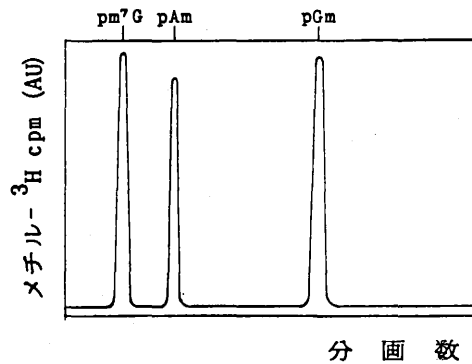
3. 分取したオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼP1 およびへび毒ホスホジェステラーゼ分解生成物の分析結果を第3図に示す。キャップを構成している三成分 (pm^7G , pAm, pGm) に相当するそれぞれのピークが見られた。しかし、三成分の量比は完成した mRNA 鎖のキャップ構造分析の結果とは異っていた。



第1図 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー



第2図 Dowex 1×2カラムクロマトグラフィー



第3図 Dowex 1×2カラムクロマトグラフィー

〔総括〕

mRNAのキャップ構造生合成には、ウイルス粒子内のmRNA合成酵素のほかに、少なくとも二種類のメチル化酵素が関与している。

ワクチニアウイルスの場合、粒子自体を酵素源として用いた *in vitro* の実験から、そのmRNAのキャップ構造の生合成は、mRNA鎖5'-末端ヌクレオチドの糖の2位のメチル化が先行し、次いで末端のブロック構造が完成し、RNA鎖の伸長が進行するとグアノシン7位のメチル化が起こるものと考えられる。一方単離したメチル化酵素を用いた *in vitro* でのキャップ構造生合成反応は、グアノシン7位のメチル化がRNA鎖末端ヌクレオチドの糖の2位のメチル化に先行することがモスら(B. Moss, *et. al.*, *Virology*, **72**, 341, 1976) により報告されており、粒子自体を用いた場合とキャップ形成の順序が異っている。

ここで報告する実験のように、関与する全ての酵素が反応に与る最も自然に近い反応条件下では、キャップ構造生合成の機構は、キャップ構造生成に関係する一連の酵素群の基質特異性と反応速度、さらにウイルス粒子内でのそれらの酵素の配列に依存するであろう。

ウイルス粒子自体を用いて行ったカイコ多角体病ウイルスやレオウイルスの場合はメチル化順序がワクチニアウイルスとは異っているので、それぞれのウイルスの酵素の配列が特異的なキャップ形成順序を決めているのであろう。

論文の審査結果の要旨

ワクチニアウイルスメッセンジャーRNAはその5'末端にキャップ構造を持つ。著者はウイルス粒子そのままの状態でもRNA合成を追跡研究できる系を確立し、mRNA合成過程とキャップ生成過程との関連を明らかにした。また、この反応過程と可溶化した酵素による反応とを比較検討してウイルス粒子内での各種酵素の配列がキャップ形成順序を支配しているという新知見を得た。

学位論文としてふさわしいものとする。