



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	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32938">https://hdl.handle.net/11094/32938</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	塗原敏之
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5161 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マッセンジャー 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 鎮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、ショ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 处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、ペニシリウムヌクレアーゼ P1 处理し、あるいはさらにへビ毒ホスホジ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。

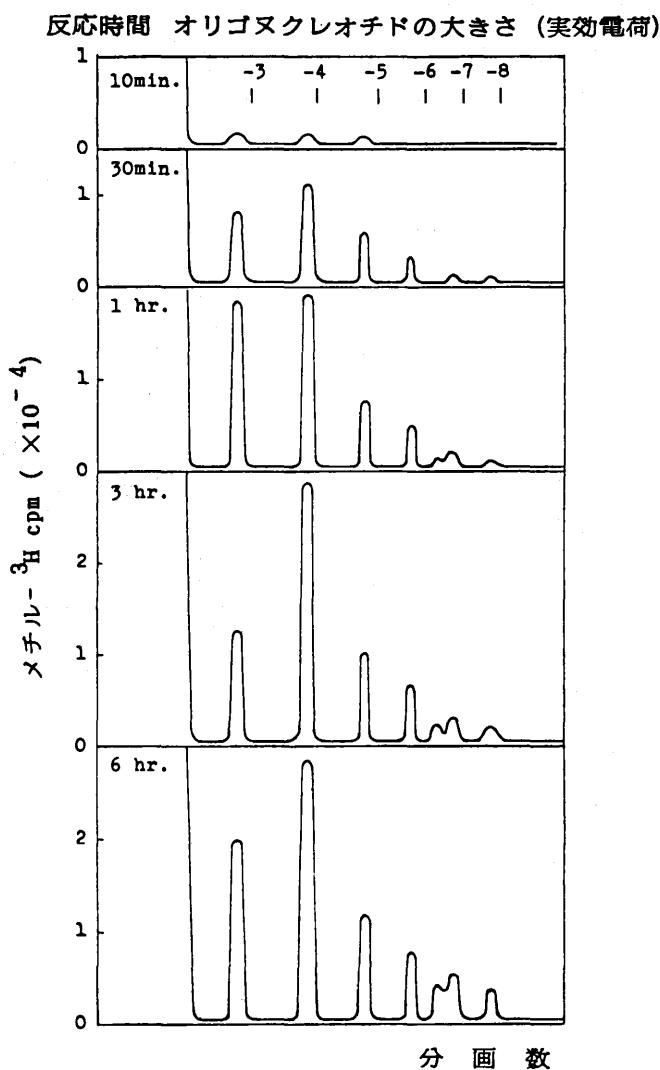
#### [成績]

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。

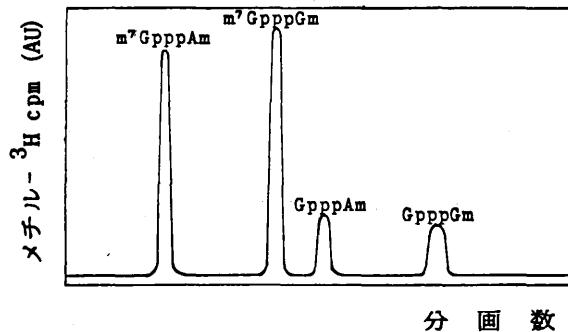
オリゴヌクレオチドの蓄積量は反応時間とともに増し、反応開始後約 6 時間には最大となった。ま

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。

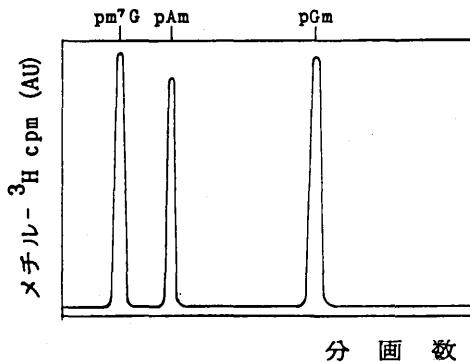
2. 分取したオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼP1分解生成物の分析結果を第2図に示す。完成したキャップ構造 ( $m^7$ GpppRm, R=AまたはG) に相当する二つのピークのほかに、未完成キャップ構造 (GpppRm) に由来する二つのピークが存在した。未完成キャップ構造 ( $m^7$ GpppR) は見付からなかったので、キャップ構造形成の中間体は  $m^7$ GpppRではなくGpppRmであると判断された。
3. 分取したオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼP1およびヘビ毒ホスホジエステラーゼ分解生成物の分析結果を第3図に示す。キャップを構成している三成分 ( $p\text{m}^7\text{G}$ ,  $\text{pAm}$ ,  $\text{pGm}$ ) 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 鎮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 鎮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 鎮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マッセンジャー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mRNA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考える。