

## Q $\beta$ レプリカーゼの精製と酵素に関するいくつかの検討

西原 徹

Q $\beta$  レプリカーゼの精製を行い、四つの異なったサブユニットよりなる精製酵素を得た。精製酵素と精製途中の酵素標品を用いて、複製反応の生成物を検討した。その結果精製途中の標品を用いると複製反応生成物に分解がみられることがわかった。また酵素の保存に用いているグリセリンの酵素反応に対する影響を検討した。(平成3年12月18日採用)

### Purification of Q $\beta$ Replicase and Some Properties of the Enzyme

Tohru Nishihara

Q $\beta$  replicase has been purified and it is shown that the purified enzyme consists of four different subunits. Analysis of the reaction products from each enzyme purification step shows that all other enzyme preparations except pure enzyme have degradative effects on product RNAs. Glycerol effect on enzyme reaction is also tested. (Accepted on December 18, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 18 (1): 33-36, 1992

**Key Words** ① Q $\beta$  replicase ② RNA-dependent RNA polymerase

#### はじめに

Q $\beta$  レプリカーゼ<sup>1)</sup> (Q $\beta$  ファージ RNA 依存 RNA 複製酵素)の精製法に関しては今までいくつもの方法が試みられ、単一の酵素にまで精製されてきている。<sup>2)-5)</sup>ここでは Kamen<sup>5)</sup>によって行われた方法を主にして、やや変更を加えて精製を行い、精製途中の酵素及び精製された酵素を酵素標品として RNA 複製に用いた場合の反応生成物に与える影響や酵素に安定剤として加えているグリセリンの酵素反応に対する影響を検討した。

#### 実験材料と方法

##### 1. Q $\beta$ レプリカーゼの精製

Q $\beta$  レプリカーゼの精製のための Q $\beta$  ファージ感染菌は Q $\beta$  am 12 感染大腸菌 Q13 株 (深見泰夫氏より分与) を用いた。凍結した菌塊を破碎

後ガラスビーズ (直径 0.2 mm) とワーリングブレンダーを用いて菌を破碎した。菌塊 100 g 当たりガラスビーズ 200 g, 100 ml の Buffer A (0.05 M Tris-HCl, pH7.5, 0.005M MgCl<sub>2</sub>, 1m M EDTA, 0.1mMDTT, 20% (w/w) グリセリン) を加えて、氷水で冷却しながら、3 分間最高速度で破碎後、1 分間休む間隔で 5 回この操作をくり返した。その後 DNase (1 mg/ml) 1ml を加えてから、破碎された菌体は 6,000 回転/min, 20 分間の遠心分離により菌の残渣とビーズを除いて上清を得た (crude extract)。

得られた上清はそのまま秤量し、その重量の 0.3 重量のポリマー混合液 (Dextran T 500 3.6g, Polyethylene glycol 6000 14.2 g に 32.2 ml の水を加えて、50 g としたもの) を加え、10 倍濃度の Buffer A 0.03 重量を加え、30 分間 (4°C) 攪拌した後 10,000 回転/min, 10 分間遠心分離した。上清は除外し、下層の粘性の高い層には上清の体積と同じ体積の Polyethylene glycol 6000 (6.9% w/w, Buffer B) を加え、

さらに NaCl を加えて 10.3% (w/w) として、溶解後 30 分間攪拌を続けた (Buffer B=Buffer A+1.0 M NaCl)。この混合物は遠心分離によりレプリカーゼを含む上清を得た。さらに下層より再抽出を 4 回繰り返して、レプリカーゼを含む上清を集めた。この溶液は Buffer C (Buffer A より MgCl<sub>2</sub> を除いたもの) に対して透析を行い (dialysed phase partition fraction) を得た。

上記分画は NaCl で 0.1M 以下まで希釈した後、DEAE-セルロースカラム (4×15 cm) に直接試料を吸着させた後、0.1-0.5M NaCl (Buffer C) の直線的濃度勾配により溶出を行った。Poly G ポリメラーゼ活性を測定することにより Qβ replicase 活性を測定し、活性のある分画を集めた (DEAE-fraction)。この分画の NaCl 濃度を 0.1M 以下まで希釈した後、燐酸-セルロースカラム (2.5×8 cm) に吸着させ、前記と同様に 0.1-0.5M NaCl (Buffer C) により溶出し Poly G ポリメラーゼ活性のある分画を得た (P-cellulose fraction) 上記分画は 0.8 飽和になるよう硫酸アンモニウムを加えて、Beckman 超遠心分離機により Type 45 T1 ローターを用いて 45,000 rpm 30 分間遠心分離を行って沈殿を集めた。沈殿は少量の Buffer A に溶解して直接次の試料とした。

上記溶液を Bio-Gel A 0.5 m (1×90 cm) (0.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Buffer A) を用いてゲル濾過を行った。Poly G ポリメラーゼ活性のある分画を集めてコロジオンバッグを用いて Storage Buffer<sup>3)</sup> (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50% (w/w) グリセリン) に対して透析・濃縮を行い精製酵素分画 (Bio-Gel fraction-pure Qβ replicase) を得た。

## 2. Qβ レプリカーゼ活性の測定

(a) Poly C 依存 Poly G ポリメラーゼ活性の測定。

50 μl の反応液で行い以下のものを含む; 0.08 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.012 M MgCl<sub>2</sub>, 2.5 μg/ml Rifamycin, 100 μg/ml Poly C, 0.8 mM [<sup>3</sup>H] GTP (1,000~2,000 cpm/n mol), 担

体として酵母 RNA 100 μg/ml および酵素分画 10 μl を含む。30°C, 10 分間の反応によった。

(b) WS-s RNA を鋳型に用いた自己触媒的な複製反応の測定。

10 μl の反応液中で行い以下を含む; 0.08M Tris-HCl, pH 7.5, 0.012M MgCl<sub>2</sub>, ATP, GTP, UTP, CTP の各々 0.8mM, <sup>3</sup>H-GTP または <sup>32</sup>P-αGTP, 担体として酵母 RNA 5 μg/ml, WS-s RNA (100~1,000 ng/ml; 90ヌクレオチドよりなる RNA で, SP 6 ポリメラーゼにより DNA から転写された.), および Qβ replicase 40 μg/ml 37°C 20 分間の反応によった。Figures 2, 3 の実験はこの方法によった。Figure 2 では各分画から酵素分画として 2 μl を用いて全量 10 μl で反応を行った。Figure 3 では精製酵素を含む反応液に対してグリセリンを加えて反応に対する影響をみた。(a) では反応後 TCA を加えて反応を停止し, Toyo GC-50 を用いて TCA 沈殿物を集め, シンチレーションカウンターにより測定した。

## 3. 酵素反応生成物のゲルによる分析

2. (b) による反応生成物は 2 vol. の 95% formamide 0.05% の Xc, BPB を含む液を加え, 85°C 5 分間加熱, 急冷して, 分析に用いた。ゲル分析には 7 M urea, 10% ポリアクリルアミドゲル (19:1, 1mm 厚), 50 mM-Tris-Borate, EDTA Buffer を用い, Xc がゲルの先端まで泳動を行った。泳動後オートラジオグラフィーによりゲルバンドのパターンを得た。

## 4. Qβ レプリカーゼの SDS-ポリアクリルアミドゲルによる分析

SDS-ポリアクリルアミドゲルは 10~20% の濃度勾配ゲルを用いた (第一化学)。ゲル用試料は常法により作製し, 電気泳動後 Coomassie brilliant blue G-250 により染色し, 脱色により, Figure 1 のごとくバンドを得た。

Q $\beta$  replicase

Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis pattern of purified Q $\beta$  replicase

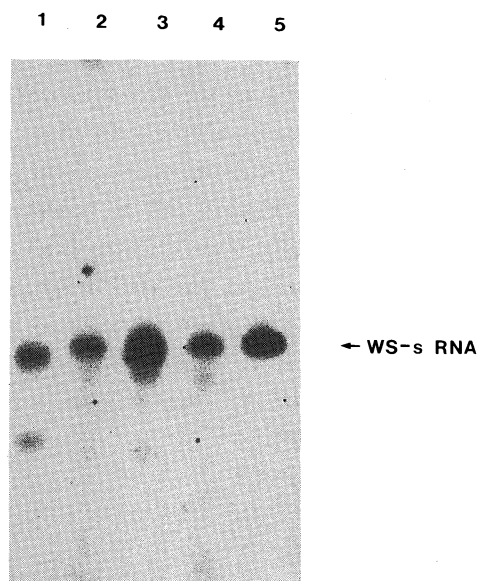


Fig. 2. Gel profiles of the reaction product RNA from each purification step.

1) crude extract, 2) dialysed phase partition fraction, 3) DEAE-fraction, 4) P-cellulose fraction, 5) Bio-Gel fraction (Pure Q $\beta$  replicase)

5 4 3 2 1

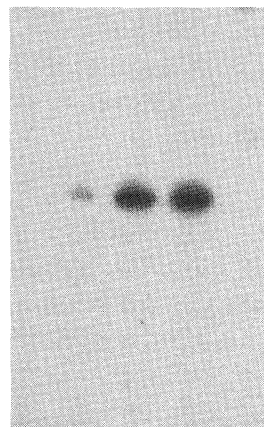


Fig. 3. Effect of glycerol on template activity.

1) no enzyme, 2)–5) enzyme plus glycerol; final glycerol percent, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 20%

## 結果と考察

Q $\beta$ レプリカーゼの精製を行い、ほぼ単一の酵素を得た。またその SDS ゲルでの分析から今までに報告されているごとく<sup>2),3)</sup> I, II, IIIおよびIVの四つの異なったサブユニットより成ることを示した (Fig. 1)。

また酵素精製のためには多くの過程を必要とするため、その過程省略の可能性を検討するために、各過程の酵素標品を用いて反応生成物に与える影響を検討した。その結果最終の精製酵素以外のどの精製過程の酵素標品を用いたときも、その反応生成物の低分子化がみられ、生成物が分解を受けていることがわかった (Fig. 2)。このことはレプリカーゼの複製反応の解析のためには、最終過程までの酵素精製の必要性を示唆している。

また酵素の安定化のために加えているグリセリンの酵素反応に対する影響を検討した。その結果 Figure 3 に示すごとく、グリセリンを 5% まで含んでもほとんど影響がみられないが、10% 含むと顕著な阻害がみられた。

## 文 献

- 1) Haruna, I. and Spiegelman, S. : Specific template requirements of RNA replicases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54 : 579—587, 1965
- 2) Kondo, M., Gallerani, R. and Weissmann, C. : Subunit structure of Q $\beta$  replicases. Nature 228 : 525—527, 1970
- 3) Kamen, R. : Characterization of the subunits of Q $\beta$  replicase. Nature 228 : 527—533, 1970
- 4) Nishihara, T., Mills, D.R. and Kramer, F.R. : Localization of the Q $\beta$  replicase recognition site in MDV-1 RNA. J. Biochem. 93 : 669—674, 1983
- 5) Kamen, R. : A new method for the purification of Q $\beta$  RNA-dependent RNA polymerase. Biochim. Biophys. Acta 262 : 88—100, 1972