

## ヒト型アデノウイルス 2 型 $\mu$ 蛋白前駆体の 同定とその存在意義

川崎医科大学 第 I 生化学

(指導: 細川桂一教授)

崔 哲 洵

(昭和60年 2 月26日 受付)

### Detection of Precursor to $\mu$ -protein in Adenovirus Type 2 and the Biological Significance of the Precursor

Tetsujun Sai

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 26, 1985)

ヒト型アデノウイルス 2 型のクロマチンを構成する 4 種類の蛋白の 1 つ,  $\mu$  蛋白の前駆体の存在について調べた。感染後期の KB 細胞より oligo (dT) セルロースカラムクロマトグラフィーにより poly (A<sup>+</sup>) mRNA を精製し, rabbit reticulocyte lysate や wheat germ extract の無細胞アミノ酸導入系に <sup>35</sup>S-メチオニン, <sup>3</sup>H-アルギニンを用い同定を試みた。得られた標識蛋白質の解析から  $\mu$  蛋白前駆体は, 分子量約 8,000 Dalton であり該当する mRNA 画分はおよそ 10S であった。その存在意義をウイルスの増殖・成熟の過程から考えると, ウイルスクロマチンの supersolenoid 構造の形成と維持 また ウィルス粒子前駆体である empty shell への DNA 充填の促進であると考えている。

It has been established that  $\mu$ -protein is one of the four chromatin proteins in human adenovirus type 2. I have examined the possible existence of pro- $\mu$ , a precursor of  $\mu$ -protein. Poly (A<sup>+</sup>) mRNA was purified by oligo (dT) cellulose column chromatography from adenovirus-infected, late phase KB cells, and translated by using L-<sup>35</sup>S-methionine and L-<sup>3</sup>H-arginine in a cell free amino acid incorporation system with rabbit reticulocyte lysate, or wheat germ extract. The labeled protein thus obtained was analyzed by gel electrophoresis. It was found that the expected pro- $\mu$  showed an approximate molecular weight of 8,000 daltons, and the corresponding subfraction of mRNA sedimented at approximately 10S. The biological role of pro- $\mu$  was speculated from the process of virus multiplication and maturation. Pro- $\mu$  is thought to participate in the formation of supersolenoid structure of virion chromatin and in the DNA filling of the empty shell, the precursor of the virion.

Key Word ① mRNA: messenger RNA ② rRNA: ribosomal RNA

はじめに

アデノウイルスは<sup>1),2)</sup> 直径 80nm の正20面体の蛋白質外殻と その中に包み込まれる分子量  $2.5 \times 10^7$  Dalton の直鎖 2 重らせん DNA と 4 種類の結合蛋白 V, VII,  $\mu$ , TP (terminal protein) より構成されるコア (クロマチン) からできている (Fig. 1). そして発癌性の強弱や血球凝集反応に対する態度などから, 当ウイルスは いくつかの亜群に分類されている. 高発癌性のヒト型アデノウイルス12型では, ハムスター新生児に接種後 2 週間以内に腫瘍を作ることから発癌機構解明の好適モデルとして研究されている. 一方, 非発癌性のヒト型アデノウイルス 2 型や 5 型は増殖にあたって, 初期・後期遺伝子制御を行い, 2 重らせん DNA の両鎖から mRNA を転写すること, また DNA の組換えを頻繁に行うことから 真核生物の遺伝子発現と DNA 複製の好適モデルとして研究されている. そしてヒト型アデノウイルス 2 型の14種類の構造蛋白質のうち, 直接遺伝子の構造およびその発現に関係している 4 種類のコア蛋白の 1 つである  $\mu$  蛋白は, 1976年 高アルギニン 塩基

性蛋白として細川らによってヒト型アデノウイルス 5 型においてその存在が報告され<sup>3)</sup>, また 1984年ヒト型アデノウイルス 2 型においてもその存在が 確認された<sup>4)</sup>. その後 M. T. Sung, 細川らの DNA 塩基配列解析の結果 (未発表), ヒト型アデノウイルス 2 型  $\mu$  蛋白の構造遺伝子は約 3 倍の長さの前駆蛋白をコードすることが示唆された. そこで今回, 無細胞アミノ酸導入系を用い, <sup>35</sup>S-メチオニン, <sup>3</sup>H-アルギニンで標識された蛋白をアセトンにて回収し, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により  $\mu$  蛋白前駆体の同定, および該当する mRNA 画分の検索を行い, その意義について検討を加えた.

材料および方法

(1) mRNA の精製<sup>5),6)</sup>

ヒト型アデノウイルス 2 型感染 KB 細胞 (ヒト喉頭癌由来) に Iso-high-pH 緩衝液 [10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.14 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% (v/v) NP-40 (Nonidet P-40)]<sup>7)</sup> を細胞沈渣 1 ml に 15 ml の割合で

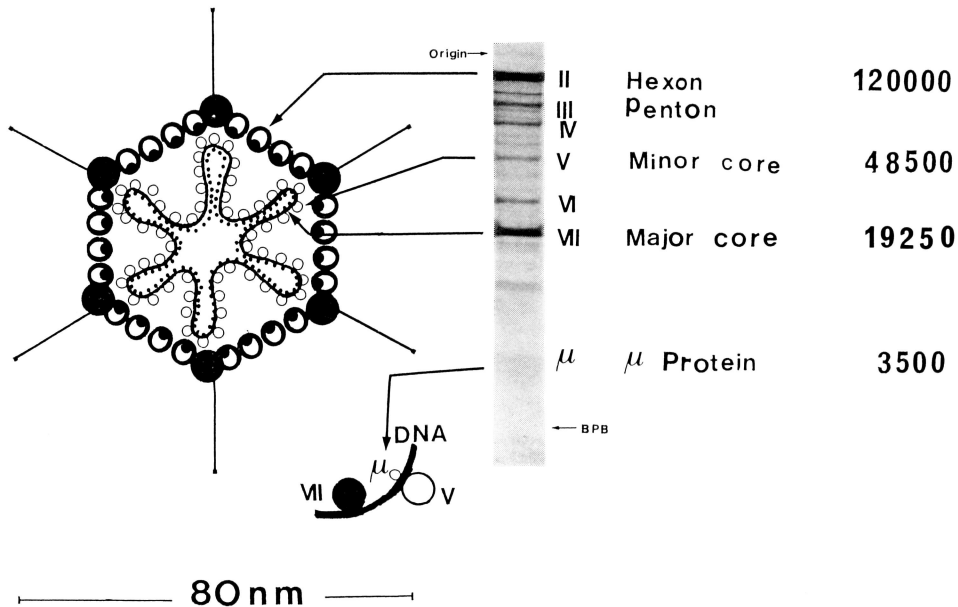


Fig. 1. A schematic illustration of internal organization of adenovirion.

加え10分間氷水中に静置し、細胞膜を化学的に処理し、1,000 rpm 5分間遠心し細胞質成分を上清として回収した。この上清にヘパリン、SDS, Tris-HCl, pH 8.5 をそれぞれ最終濃度 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.5% (w/v), 0.1M になる様に加え、さらに同量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (50: 50: 1) の混合液を加え、室温にて15分間攪拌し、15,000 rpm 20分間遠心した後、その水層を回収し、再度2倍量のフェノールを加え遠心をくり返すことによって全RNAを抽出した (フェノール抽出)。

(2) oligo (dT) セルロース カラム クロマトグラフィー<sup>8)</sup>

oligo (dT) セルロース type II (Sigma 社製) 2 g を dd-H<sub>2</sub>O (再々蒸留水) にて充分洗浄・膨潤させた後 binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M KCl) にて活性化した。一方フェノール抽出法で調精された全RNAは1 mg/ml になる様に binding buffer に溶解し、55°C 5分間熱処理を行い、直ちに冷却したものをカラムに充填し、4 ml/hr の流速で2回カラムを通過させ、poly (A<sup>+</sup>) mRNA を oligo (dT) セルロースに吸着させた。その後カラムを 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl を含む washing buffer で洗浄し、dd-H<sub>2</sub>O で poly (A<sup>+</sup>) mRNA を抽出した。また素通り画分は マーカー rRNA として用いるため回収した。

(3) 蔗糖密度勾配遠心法<sup>9)</sup>

5 ml の Beckman SW 50.1 水平ローター用遠心管に 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM EDTA を含む10~30%の蔗糖密度勾配を作成した。また oligo (dT) セルロースカラムクロマトグラフィーにより得られた poly (A<sup>+</sup>) mRNA はエタノール沈殿によって回収し、さらにこの沈殿を蔗糖密度勾配を作成したと同じ緩衝液に溶解し 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  とした。これを 55°C 5分間熱処理を行い、21,000 rpm, 16時間 15°C で遠心を行い、poly (A<sup>+</sup>) mRNA を分画した。またこれと平行して 5  $\mu\text{g}$  の rRNA の遠心を行い、28 S, 18 S のピークを

求めた。

(4) 無細胞アミノ酸導入系<sup>7), 10), 11)</sup>

BRL 社の Rabbit reticulocyte lysate 系およびマイクロコッカススクレアーゼ処理をした、wheat germ extract の無細胞翻訳系を用い<sup>35</sup>S-メチオニン、<sup>3</sup>H-アルギニンで蛋白質を標識した。

(a) Rabbit reticulocyte lysate

Rabbit reticulocyte lysate 10  $\mu\text{l}$  に <sup>35</sup>S-メチオニン 1  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{Ci}$ ) を加えた master mixture にヒト型アデノウイルス感染KB細胞から精製した mRNA の 0.125, 0.25, 0.50, 1.0  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) をそれぞれ加え、総量 12  $\mu\text{l}$  とし、30°C, 40分間加温することによって蛋白合成を行った。この後得られた標識蛋白の一部をグラスファイバー濾紙 (Whatman GF-C) 上に採取し、10% (w/v) TCA 処理を行い、液体シンチレーション計測によって <sup>35</sup>S-メチオニンの取り込みと mRNA の至適濃度を測定した。

(b) Wheat germ extract

マイクロコッカススクレアーゼで処理された *in vitro* translation system Kit を用い、実験の目的に従いこのシステムよりアルギニン、メチオニン、ヒスチジンを除去したものを使用した。測定の方法は蛋白合成混合液 3  $\mu\text{l}$ , 500 mM 酢酸カリウム、酢酸マグネシウムをそれぞれ 2  $\mu\text{l}$ , 0.9  $\mu\text{l}$ , 非標識アミノ酸のヒスチジン、メチオニン、あるいはアルギニンを最終濃度 500  $\mu\text{M}$  になる様に加え、さらに wheat germ extract 10  $\mu\text{l}$  および標識アミノ酸の <sup>3</sup>H-アルギニン 2  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{Ci}$ ) あるいは <sup>35</sup>S-メチオニンを加えた master mixture に加える mRNA の濃度を 1, 2, 3, 4, 5  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) と変化させ、総量 30  $\mu\text{l}$  の系で 25°C, 90分間加温し蛋白合成を行わせた。反応後 3  $\mu\text{l}$  を GF-C 濾紙上に採取し、10% (w/v) TCA で処理し、液体シンチレーション計測によって <sup>3</sup>H-アルギニン あるいは <sup>35</sup>S-メチオニンの取り込みと mRNA の至適濃度を求めた。

(5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>4), 12)</sup>

Rabbit reticulocyte lysate や Wheat germ extract を用いた *in vitro* translation system から得られた標識蛋白に非標識アミノ酸、ヒト型アデノウイルス 2 型全蛋白質を担体として加え、さらに RNase (ウシ臍臓抽出 RNase I, DNase & proteinase free) を添加し、37°C 10分間加温した後、アセトンを加え沈殿物として標識アデノウイルス蛋白を回収した。この回収した蛋白に 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) グリセロール, 0.05% (v/v) メルカプトエタノールおよび 1% Bromophenolblue (BPB) を含む 30  $\mu$ l の SDS 変性緩衝液を加え 100°C 90秒間熱処理したものを 2時間の pre-run を済ませた 12% SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル (12%分離ゲル上に 5%の濃縮ゲルを重ねたもの) 厚さ 1 mm を用い電気泳動を行った。また、濃縮ゲル 15 mA, 分離ゲル 20 mA で通電し、用いた電極緩衝液は 0.05M Tris-Glycin, pH 8.5 である。分離された標識蛋白同定のためヒト型アデノウイルス 2 型全蛋白質と分子量マーカー (Pharmacia 社製) を同時に泳動した。泳動後 7% (v/v) 酢酸, 25% (v/v) メタノール 0.1% (w/v) Coomassie brilliant blue (CBB) を含む溶液でゲルの染色と固定を行い、続いて CBB を含まない同溶液で脱染色を行った。

## (6) フルオログラフィー

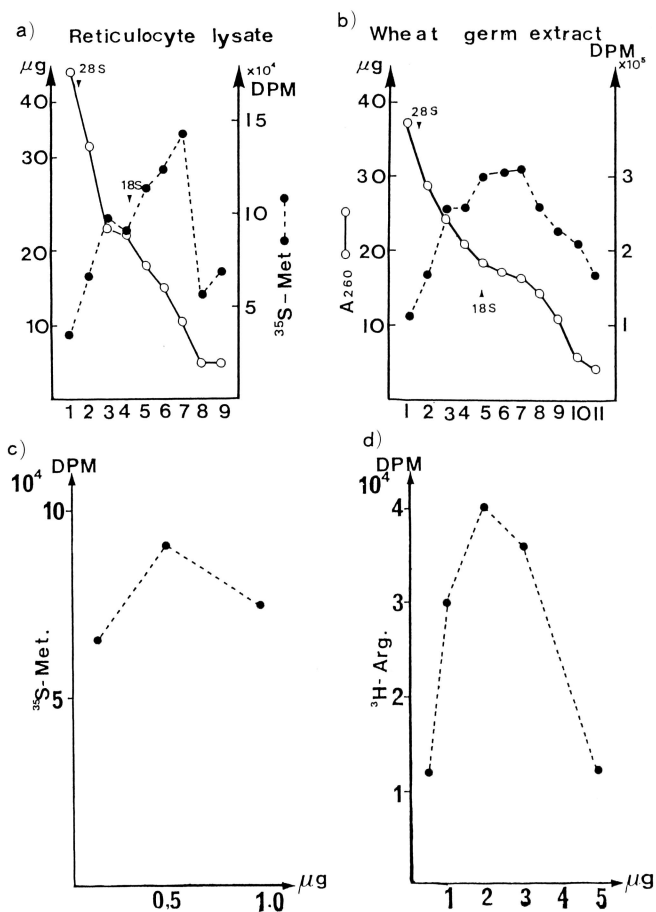
脱色・固定の完了したゲルは 100% (w/v) DMSO (dimethyl-sulfoxide) 溶液の中に室温で 30分間浸漬し、さらに再度この操作を行いゲルの脱水を充分にする。さらに 22% (w/v) PPO (2, 5-diphenyloxazole) を含む 100% DMSO 溶液中に 3時間浸漬し、その後 dd-H<sub>2</sub>O 中に約 1時間放置し、もとのゲルの大きさに回復したものを、スラブゲル乾燥器を用い乾燥させた。この乾燥したゲルに FUJI RXL フィルムを使用し -70°C 2~14日以上露出することによってフルオログラムを得た。

(7) ヒト型アデノウイルス 2 型蛋白の調製<sup>3), 4)</sup>

グリセロールを含むウイルス懸濁液を 0.1% (w/v) SDS-リン酸緩衝液で希釈し 260 nm の吸光度を測定しウイルスの蛋白濃度を求めた (1A<sub>260</sub> unit=0.05 mg DNA=0.28 mg 蛋白)。1 ml のウイルス懸濁液に 0.5 ml の 3M 酢酸ナトリウムと 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9 を加え、さらに 10 ml のアセトンを用い 30分以上 0°C で保存した後 10,000 rpm 15 分間遠心することによってウイルス粒子を沈殿物として回収した。またこの沈殿物が最終濃度 2 mg/ml となる様に dd-H<sub>2</sub>O を加え凍結融解を 20回以上くり返しウイルス粒子を物理的に破壊した。そしてこのアデノウイルス蛋白溶液に DNase I, 酢酸マグネシウム, Tris-HCl, pH 7.9 をそれぞれ最終濃度 20  $\mu$ g/ml, 0.003 M, 0.01 M となる様に加え室温で 90分間静置しウイルス DNA を分解し、尿素を最終濃度 6 M になる様に加え PH 4.7 に調製したものをヒト型アデノウイルス 2 型蛋白のマーカーとして用いた。

## 結 果

5% NCS (new born calf serum) を含む Joklik modified MEM (minimum essential medium) 中に KB 細胞 (ヒト喉頭癌由来) を最終細胞密度が  $2.5 \times 10^5$  cells/ml となる様に懸濁培養し MOI (multiplicity of infection) 10 となる様にヒト型アデノウイルス 2 型の感染を行った。感染細胞の懸濁培養液 8.6 l から 3,000 rpm 3分間の遠心によって回収された感染 KB 細胞は約 8g であった。これを Iso-hig-pH 緩衝液により細胞質成分と核成分に分画し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出法によって全 RNA (収量: 60 mg) を得た。さらに oligo (dT) セルロースカラムクロマトグラフィー法により得られた poly (A<sup>+</sup>) mRNA はその吸光度の測定 (1A<sub>260</sub> unit=50  $\mu$ g) から約 600  $\mu$ g であった。これを蔗糖密度勾配遠心によってそれぞれ 9本, 11本に分画した。その蛋白濃度と <sup>35</sup>S-メチオニ



**Fig. 2.** Cell free translation of poly (A<sup>+</sup>) mRNA isolated from adenovirus-2 infected KB cells in late phase.

- a), b) Incorporation of <sup>35</sup>S-methionine with size fractionated mRNA.  
 c), d) Dependence of radioactive amino acid incorporation to the amount of mRNA.

ンの取り込みは **Figure 2** に示す通りである (**Fig. 2 a, b**). さらにこれに平行して遠心を行った rRNA の 28S, 18S の A<sub>260</sub> の吸光度ピークを ISCO Density Gradient Fractionator Model 185 により求めた (**Fig. 2 a, b**). 次に *in vitro* translation system に用いた mRNA の至適濃度は rabbit reticulocyte lysate の系では 0.5 µg, wheat germ extract の系では 2 µg であった (**Fig. 2 c, d**). M. T. Sung, 細川らの DNA 塩基配列解析の結果\*\* (未発表), µ 蛋白前駆体は 分子量 8,700

Dalton 80残基のアミノ酸から成り, そのうち17残基のアルギニンを含む高塩基性蛋白であることが示唆された. さらにメチオニンは4残基あり他のポリペプチドVIII, IXなどの Hexon associated protein と比較して相対的含有比率が大きいことも示唆している. 従って µ 蛋白前駆体の特異的識別を行う目的で無細胞蛋白合成系を用いて <sup>35</sup>S-メチオニンと <sup>3</sup>H-アルギニンの標識を行った.

(a) Rabbit reticulocyte lysate

12 µl の反応系の翻訳生成物を RNase 処理後15% TCA にて沈殿回収し, 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った. ポリペプチド V (minor core protein) はフルオログラム上, 同定可能であったが, 他のウイルス構成蛋白は同定不能であった (data not shown). その理由としては内因性グロビン mRNA と競合して外因性 mRNA (アデノウイルス由来) が効果的に翻訳されないのか, あるいはグロビン蛋白とアデノウイルス蛋白の相互作用によるためと考えられる. さらに翻訳生成物の抽出に用いる TCA の濃度を20%, 30% (w/v) と変

化させてみたが15%のものと変化はなかった (data not shown).

(b) Wheat germ extract

内因性蛋白合成を除去するためにマイクロコッ

**Table 1.** Analysis of some amino acid residues in adenovirus protein

amino acid	V	p-VII	p-µ	VIII	IX
Met.	5	4	5	4	2
Arg.	36	41	17	8	7

カスクレアーゼ処理した wheat germ extract を使用した.  $2 \mu\text{g}$  のアデノウイルス mRNA を含む  $30 \mu\text{l}$  の反応系において  $^3\text{H}$ -アルギニンでは mRNA を加えない対照値の約4倍,  $^{35}\text{S}$ -メチオニンでは約25倍の活性を示した (Fig. 2 b, d). またこの反応系では担体アミノ酸は添加していないが添加したものでは約40%の活性の低下を示した (data not shown). 以上のことから  $^{35}\text{S}$ -メチオニンと  $^3\text{H}$ -アルギニンをを用い 担体アミノ酸を加えず翻訳を行い, 合成されたアデノウイルス標識蛋白をアセトン沈殿にて回収し 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った. 11本に分画された mRNA と全 mRNA を翻訳鑄型として  $^{35}\text{S}$ -メチオニン標識の蛋白を合成, 同時にアデノウイルス全蛋白と市販分子量マーカーを同定のために加え電気泳動を行った (Fig. 3). この場合 ポリペプチドII (Hexon) はフルオログラム上検出されないがポリペプチドV, pro-VII,

pro-VI はよく検出された. そして pro VII のバンドは RNA 画分 No. 1, 2 に現われ, 一方 pro-VI は RNA 画分 No. 3, 4 に出現しているが (Fig. 3), これは pro-VII の mRNA の方が pro-VI の mRNA よりも大きいためである. そしてポリペプチドVの分子量は 48,500 Dalton, pro-VII の分子量は 21,000 Dalton であることから分子量マーカーと翻訳生成物の移動度は分子量において大体一致しており 同時に電気泳動を行ったアデノウイルス全蛋白を対照として解析した結果, RNA 画分 No. 7, 8 に分子量 8,000 Dalton のバンドを求めることができた (Fig. 3 lane no. 7, 8). さらに  $^{35}\text{S}$ -メチオニン標識翻訳生成物を対照として  $^3\text{H}$ -アルギニンで標識した翻訳生成物を 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したが, メチオニンを強く取り込み かつ アルギニンも同時に取り込む泳動度の等しい1本のバンドを確認することができた (Fig. 5). その分子

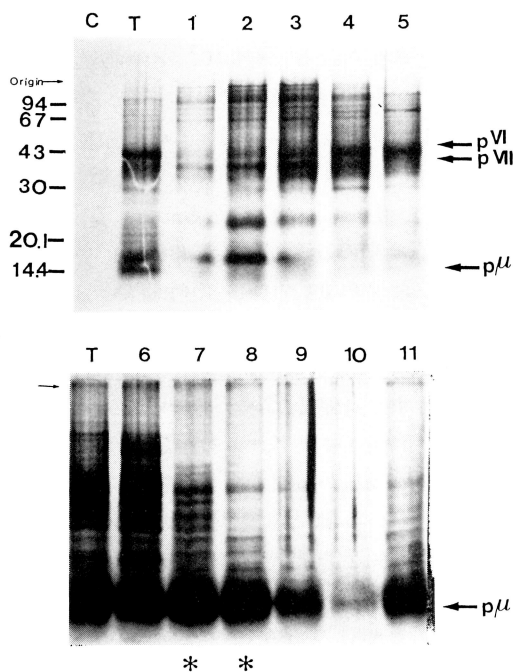


Fig. 3. Fluorogram of  $^{35}\text{S}$ -methionine labeled translation products directed by size-fractionated mRNA of adenovirus infected KB cells.

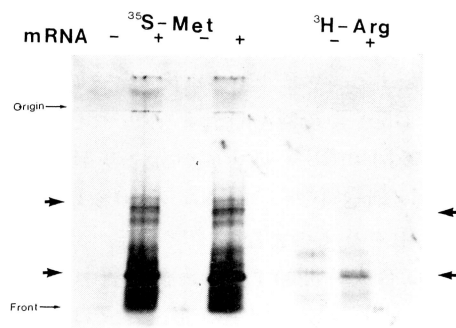


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of cell-free translation products directed by Ad-2 mRNA.

量は約8,000 Dalton で該当する mRNA 画分はおよそ10Sであり細川, M. T. Sung らの結果\*\* (未発表) とよく一致している. また rabbit reticulocyte lysate や wheat germ extract のシステムにおける  $^{35}\text{S}$ -メチオニンの取り込みが, RNA 画分 No. 1, 2 でその RNA の濃度に比較して, 低いのは rRNA の混入のためと思われる (Fig. 2 a, b).

## 考 案

アデノウイルス  $\mu$  蛋白は感染後期に出現する高アルギニン高塩基性蛋白として1976年細川らによってヒト型アデノウイルス 5型において報告されたが<sup>3)</sup> (i) 強塩基性 (アルギニン54%, ヒスチジン14%) であること,<sup>3)</sup> (ii) 分子量が小さいこと,<sup>3)</sup> (iii) ウイルス粒子中の含量が少ない ( $V:VII:\mu = 1:6:1$ )\*<sup>15)</sup> (\*: 細川: 未発表) ことなどから分離同定が非常に困難であった。しかしながらスターチゲル電気泳動とアルギニン高感度染色法の併用により明確に  $\mu$  蛋白を検出でき、これらの方法を用い、ヒト型アデノウイルス 2型においても高アルギニン塩基性蛋白の存在が確認されている。<sup>4)</sup> また、その後の M. T. Sung, R. Roberts, K. Hosokawa らの研究によればその構造遺伝子は約3倍の長さの前駆蛋白質をコードすることが示唆され、今回無細胞アミノ酸導入系を用い、その存在の確認を試みた。まずアデノウイルスは許容宿主 (KB 細胞, HeLa 細胞) で増殖し感染の成立した細胞は細胞分裂を停止しやがて死滅する。ウイルス感染後 6~8 時間でウイルス DNA の複製を開始する。<sup>1), 2)</sup> これと同時に、後期 mRNA の合成が始まり 15~16 時間では、細胞質中の mRNA の 90% 以上はウイルス由来のものとなる。<sup>16)</sup> また、ウイルス DNA の合成が始まると、細胞質中の宿主 mRNA は減少し、宿主の蛋白合成は著しく低下する。<sup>1), 17), 18)</sup> 従って、今回実験に用いた mRNA は、ヒト型アデノウイルス 2型感染 KB 細胞から感染後 36 時間を経過したものから抽出したものであり、従ってその大部分は感染後期のウイルス mRNA と考えることができ、さらに、この mRNA を翻訳鋳型として用いればウイルスを構成する蛋白を無細胞アミノ酸導入系で合成することができる。今回行った実験において wheat germ extract の系ではポリペプチド II は、全く翻訳されていないが、ポリペプチド III (Penton fiber) 以下の比較的分子量の小さいものは、同定可能であった。さ

らに、ポリペプチド IX や  $\mu$  蛋白前駆体は、ポリペプチド V, VII と比較して非常によく翻訳されていた。一方、 $\mu$  蛋白と分子量、アミノ酸組成が類似したものに、サケ、マスの精子中のプロタミンが知られている。<sup>4)</sup> この様にプロタミン様蛋白は広く高等動物胚芽に見られ、生物の進化の過程の中でよく保持されていると考えられる。アデノウイルスの  $\mu$  蛋白もプロタミン同様生物界において普遍的重要性をもつために植物の系である、wheat germ extract の系を用いてもよく翻訳されたのではないかと考えられる。<sup>11)</sup> また、 $\mu$  蛋白前駆体の存在意義については未だ憶測の域を出ないが、ウイルスの増殖・成熟過程から考えてみると  $\mu$  蛋白前駆体と同じ様にアデノウイルスのクロマチン構造の形成に関与し、DNA に結合し前駆蛋白を有するものに major core protein VII がある。これはウイルスクロマチンに 6 量体として存在し、その意義は、真核生物のヒストン 8 量体に相当し、DNA 鎖が約 2 回半それに巻きつくことによって supersolenoid 構造の形成に関与していると考えられる。そして、その前駆蛋白である pro-VII の存在意義は DNA との複合体の形成を容易にし、さらにウイルス前駆体である、empty shell 内への DNA の充填 (DNA filling) を可能にしていると考えられる。<sup>20), 21)</sup> また、石橋らの実験から<sup>22)</sup> core packaging の完了した young virion の時期では pro-VII はプロセスされていないことが証明されている。<sup>21), 22)</sup> young virion から mature virion へと移行する過程で Gly-Gly-Ala の部位を認識する内因性プロテアーゼの作用を受け、21個のアミノ酸残基から成るポリペプチドが切断され pro-VII から VII となり<sup>21)</sup> 感染能をもった成熟ウイルスになる。<sup>21), 22)</sup> この様に pro-VII はウイルスクロマチンの分子集合に深く関与しており  $\mu$  蛋白前駆体の存在意義も同一のものであると考えられる。さらに pro-VII から切断されたポリペプチドはウイルス外殻を構成する Hexon の pore を通りウイルス粒子外へ拡散して出て行くと考えられる。 $\mu$  蛋白前駆体は、

約80個のアミノ酸から構成され、プロセスされると約30個のアミノ酸で構成されるポリペプチド  $\mu$  になる。すなわち、約50残基のアミノ酸が1分子の pro- $\mu$  から切断され、何らかの形でウイルス粒子外に放出されることになる。

### おわりに

アデノウイルス  $\mu$  蛋白前駆体の存在を証明するために無細胞アミノ酸導入系を用い、その生合成を試みた。

- (1) アデノウイルス感染 KB 細胞から oligo (dT) セルロースカラムクロマトグラフィーを用い、感染後期の poly (A<sup>+</sup>) mRNA を精製した。
- (2) 蔗糖密度勾配遠心法を用い、サイズによる分画を行った。
- (3) 分画した poly (A<sup>+</sup>)mRNA を翻訳鑄型とし、それぞれ <sup>35</sup>S-メチオニンや <sup>3</sup>H-アルギ

ニンを取り込んだ生成物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析し  $\mu$  蛋白前駆体に相当するバンドに特異的アミノ酸の取り込みが見られた。

- (4) 翻訳生成した  $\mu$  蛋白前駆体と考えるポリペプチドは、バンドの位置から分子量約 8,000 Dalton で該当する mRNA 画分は約 10 S であった。この結果は M. T. Sung, K. Hosokawa らの提唱と矛盾しない。

本論文の要旨は、昭和59年10月 第57回日本生化学会大会（於：東京）において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を頂いた川崎医科大学第I生化学教室 細川桂一教授ならびに山梨医科大学第II生化学教室 遠藤弥重太助教授に謹んで感謝致します。また、研究に御協力いただいた第I生化学研究補助員各位、生化学センターの方々には厚く御礼申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) 細川桂一：アデノウイルス科。高野利也，渡辺 格編：ウイルス学。東京，講談社。1980，pp. 324—336
- 2) 藤永 蕙：アデノウイルス。蛋白質核酸酵素 27：2415—2419，1982
- 3) Hosokawa, K. and Sung, M. T.: Isolation and characterization of an extremely basic protein from Adenovirus type 5. J. Virol. 17：924—934，1976
- 4) 稲垣安紀：ヒト型アデノウイルス2型のクロマチン構造とその生物学的意義。川崎医学会誌 10：76—86，1984
- 5) 十川和博，藤井義明：mRNA の精製法細胞工学 1：298—303，1982
- 6) 畑中正一：メッセンジャー RNA を取り出す。細胞工学 3：271—274 1984
- 7) Anderson, C. W., Lewis, J. B., Atkins, J. F. and Gesteland, R. F.: Cell free Synthesis of Adenovirus 2 protein Programmed by Fractionated Messenger RNA: A Comparison of Polypeptide Products and Messenger RNA Lengths: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:2756—2760, 1974
- 8) Schleif, R. F., Wensink, P. C.: Purification of Poly-A<sup>+</sup> (mRNA enriched) RNA: Practical Methods in Molecular Biology. Springer-Verlag. New York, 1981, pp. 168—170
- 9) Schleif, R. F., Wensink, P. C.: RNA size fractionation by sucrose gradient centrifugation: Practical Methods in Molecular Biology Springer-Verlag. New-York, 1981, pp. 170—172
- 10) Schleif, R. F., Wensink, P. C.: In vitro Translation system from higher organisms: Practical Methods in Molecular Biology. Springer-Verlag. New-York, 1981, pp. 161—165
- 11) 水本清久：タンパク質の無細胞生合成系（コムギ胚芽およびウサギ網状赤血球の粗抽出液を用いた系）：細胞工学 3：924—932，1984
- 12) 萩田善一，中村正二郎：ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。平井秀松，阿部正和，鳥尾和男編：電気泳動実験法。東京，文光堂。1978，pp. 167—217



- 13) Schleif, R. F., Wensink, P. C.: Fluorography of [<sup>3</sup>H]-or [<sup>35</sup>S]-Labelled Proteins in Acrylamide Gel. *Practical Methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag. New York, 1981, pp. 87—88
- 14) Maizel, J. V., Jr., White, D. O. and Scharff, M. D.: The poly-peptides of Adenovirus. I. Evidence of multiple protein components in the virion and a comparison of type 2, 7 and 12. *Virology* 36: 115—126, 1968
- 15) Mirza, M. A. and Weber, J.: Structure of Adenovirus chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 696:76—82, 1982
- 16) 吉田幸一, 藤永 蕙: アデノウイルス mRNA の転写とプロセッシング. *蛋白質核酸酵素* 27: 2447—2456, 1982
- 17) Beltz, A. G. and Flint, S. J.: Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. *J. Mol. Biol.* 131: 353—373, 1979
- 18) 白木和子: アデノウイルス遺伝子産物. *蛋白質核酸酵素* 27: 2466—2475, 1982
- 19) Laver, G. W.: Isolation of an Arginin-rich protein from particles of Adenovirus type 2. *Virology* 41 488—450, 70
- 20) Sung, M. T., Lischwe, M. A., Richards, J. C. and K. Hosokawa: Adenovirus chromatin I. *J. Biol. Chem.* 252:4981—4987, 77
- 21) Sung, M. T., Cao, T. M., Lischwe, M. A. and Coleman, R. T.: Molecular processing of Adenovirus proteins. *J. Biol. Chem.* 258:8266—8273, 83
- 22) Ishibashi, M. and Maizel, J. V. Jr.: The polypeptides of Adenovirus. *Virology* 57:409—424, 74