

動物の蛋白質生合成の研究から

新潟大学医学部生化学教室 緒 方 規矩雄

Our Studies on protein biosynthesis of animal tissues

Kikuo OGATA

Department of Biochemistry Niigata University School of Medicine

Main topics of our studies since 1957 were reviewed with special references of their backgrounds.

Key words: protein biosynthesis, animal tissues.

私は昭和24年暮東大大学院の途中で島藺教授に招れて新潟大学に助教授として着任以後37年余医学部の生化学教室で研究させてもらった。ここでは私が動物の蛋白質合成の研究を行ったまでの経緯や、その研究のうちかなり明確に結果がえられたものを示しながら私の考え方を述べて最終講義の責を果たしたいと考えている。

私は東大時代は戦後で動物実験は全く出来なかった。新潟に来てみると島藺先生がビタミン B₁ 欠乏ラットを使う代謝の実験が出来るようにされていた。そこで私はビタミン B₁ 欠乏ラットの肝、腎のホモジェネートを使って焦性ブドウ酸 α ケトグルタル酸の酸化やそれに共軛する磷酸化に対するコカルボキシラーゼの影響を実験した。はじめて代謝の実験をやれたことで非常に嬉しく充実した毎日を過ごすことが出来た。更に幸運なことに当時伊藤泰一学部長がアイソトープの重要性を認識されて本学にアイソトープを導入することを企画された。そこで昭和26年、東大での第一回の RI 講習会に出席した。その暮、³²PO₄ が入手出来ることになったので、³²PO₄ を用いる磷酸代謝に関するアメリカの文献を東大と日比谷の CIE の図書館で2~3ヶ月かかって手写し、米国でアイソトープを使い研究をやって来られた東大の吉川助教授の研究室で方法を聞いて帰新した。12月に ³²PO₄

が2mC 入り、ラットに注射して清水、榎両君と Δ 7P を中心にする酸溶性磷酸化合物や磷脂質、核酸へのとりこみを実験して代謝の実験の醍醐味を味わうことが出来た。更に ¹⁴C グリシンが入手した折、岡山医大の父が教授であった衛生学教室で弟が免疫を専攻していたので、足のうらに卵白アルブミンを注射して局所免疫した家兎の膝窩リンパ腺の浮遊液を用いて抗体へのとりこみを研究することにした。この実験は夏休み岡山医大で始められたが、その後新潟の生化学教室で西山君によって継続され抗体へのとりこみの高い系を作成することが出来た¹⁾。後島藺教授は東大に移つられ、平出教授が来られたが、先生は脳の疾患を持っておられ、二年後に帰京して療養されることになった。その折伊藤辰治学部長に呼ばれて「平出先生に恩給がつくまで他の教授を呼ぶわけには行かないから、君が二年間留守番するように」と言われた。そこで何か独自のものを研究したいと思い、丁度細菌学教室に超遠心器が入ったのを幸いに、動物の蛋白質合成の研究を本格的に志すことにした。丁度その時分、アメリカのハーバード大学の MGH の Zamecnik 教授一派がラット肝のミクロソームと上清或はこれを pH 5 で沈澱させた分画 (pH5 分画) が ATP, GTP の存在で ¹⁴C ロイシンを蛋白質にとりこませることをみた。更に同

Institute for Gene Expression, Dobashi
Kyoritsu Hospital, Dobashi 3-1,
Matsuyama-city, Ehime 790, Japan.

別刷請求先: 〒790 愛媛県松山市土橋町3-1
土橋共立病院附属遺伝子発現研究所

緒方規矩雄

じ研究室の Dr. Hoagland が肝 pH5 分画をアミノ酸と ATP の存在で保温するとアデニールアミノ酸を形成するアミノ酸活性化酵素があることを発見した。私は肝上清を pH5 で分画するとリボ核蛋白が沈殿することを Griffin 等が報告しているのに眼をつけた。そして RNA の蛋白合成への重要性を考えて、ここに含まれる RNA がアミノ酸活性化反応に何等かの関与しているのではないかと想定した。そして野原君と肝 pH5 分画を ATP と ^{14}C ・アラニンで保温すると ^{14}C アラニンが pH5 分画の RNA (今の tRNA) に結合することを見出した²⁾。この場合 ^{14}C 放射能の測定は外国ではガスフローカウンターで行っているのに、私共はローリッツエンの検電器で行っていた。この研究はほぼ同時に同様の研究をして発表した Dr. Hoagland や Dr. Zamecnik を初めとする欧米の研究者によって認められることになり、私が1959年アメリカのペンシルバニア大学に留学中、オランダでの蛋白合成のシンポジウム(1960年)と翌年のモスクワでの国際生化学会でのシンポジウムに招待されることになった。これによって私は蛋白合成の初期の段階で同じ分野の外国の研究者と親交を重ねることが出来たのは幸いだったといえよう。

このような tRNA に結合したアミノ酸が蛋白合成の中間体であらうことは私共も予想していたが、その頃 GTP 等が日本では中々入手出来なかったので Hoagland に遅れをとってしまった。

そんなことで私は情報も得にくい新潟で蛋白合成の研究をやってゆくには少し手間暇がかかる研究をやらねばならぬと考えた。そして以前、リンパ腺を用いて抗体合成を行っていたことから、アミノアレル tRNA が肝の血清アルブミン合成、免疫脾での抗体、 γ グロブリン合成の中間体であることを無細胞系で証明することにした。広川、大森君の努力でラット肝のマイクロソームと上清の pH5 分画でアルブミン合成を、既往免疫脾のマイクロソームとラット肝の pH5 分画の系で γ グロブリン合成を認めえた。又、更に ^{14}C ロイシル tRNA を用いて、これがアルブミンや γ グロブリン合成の中間体であることを認めることが出来た^{3) 4)}。この場合アルブミン合成は英国の Campbell の報告と重なってしまったが、 γ グロブリン、抗体合成は RNase の少い肝 pH5 分画を用いたことにより世界で初めて成功することが出来た。

その後、ラット肝で mRNA を証明しようとして苦労した。その頃ポリゾームが知られておらず、我々のあつかったものが無傷の mRNA でなかったことや、これを翻訳される適当な系がなかったことから或程度成功

したが、決定的な証拠はえられなかった。又当時私は脳研の教授をしていたこともあって、脳でも tRNA を経る系で蛋白合成が行われることを示すことが出来た⁵⁾。そのうち動物細胞でポリソームが見出され、小膜体の膜を界面活性剤で可溶化する時に RNase inhibitor を用いて調製出来ることが知られた。又動物組織に小胞体膜に結合するポリソームと遊離型のポリソームがあり、これを分画する方法も知られ、菅野君等もその調製法について実験してくれた⁶⁾。私はアルブミン合成の研究をしていたこともあり、この両型のポリソームに機能的な差があるのではないかと考えた。そして東大応微研から来た高木君と田中君とでこの問題を追及することにした。その結果血清アルブミンが肝の結合型のポリソームで合成されることを無細胞系と in vivo の実験で示すことが出来た^{7) 8)}。尚我々と同時に Redman が血清蛋白について in vivo で同じことを報告している。つづいて肝の細胞上清の酵素であるアルギナーゼが遊離のポリソームで合成されることも証明することが出来た⁹⁾。更に小胞体の膜蛋白の合成について実験してみたかったが、チトクローム b_5 の良い抗体がえられなかったこと等で膜の蛋白を専門的にやっている九大の大村教授のところまで研究がはじめられたので中止することにした。

1960~1966年にかけてリボソーム RNA が核小体で合成されることは多くの研究があったが、リボソーム蛋白の合成の場については研究がなかった。私は遊離核での蛋白への ^{14}C アミノ酸のとりこみが低いことから、リボソーム蛋白は細胞質のリボソームで合成されるのではないかと考えた。そして1963年頃から教室へ研究に来ることもあった寺尾君に実験してもらった。一応これを支持する結果がえられたが、方法的にも難点があり、問題を残していた¹⁰⁾。そのうち、後述の二次元アクリルアミドゲル電気泳動法で個々のリボソーム蛋白を分画出来るようになったので、リボソーム蛋白がどちらの型のポリソームで合成されるかについて鍋島君に実験してもらって、ほとんど総てのリボソーム蛋白が遊離のポリソームで合成されることを見出すことが出来た¹¹⁾。又それ以前に鉤君は核小体に 60S 顆粒があり、リボソーム大亜粒子蛋白の大部分と少数の核小体固有蛋白からなることや、代謝的研究から、リボソーム大亜粒子の前駆体であることを推定した¹²⁾。鉤君が最近遊離核を用いてリボソーム蛋白の核への移行を実験し、エネルギー源としての ATP の他、rRNA 合成が最大の移行に必要なこと、又核小体の大亜粒子前駆体にリボソーム蛋白がとりこまれることをみている。これらを図示すると図1のようになる¹³⁾。

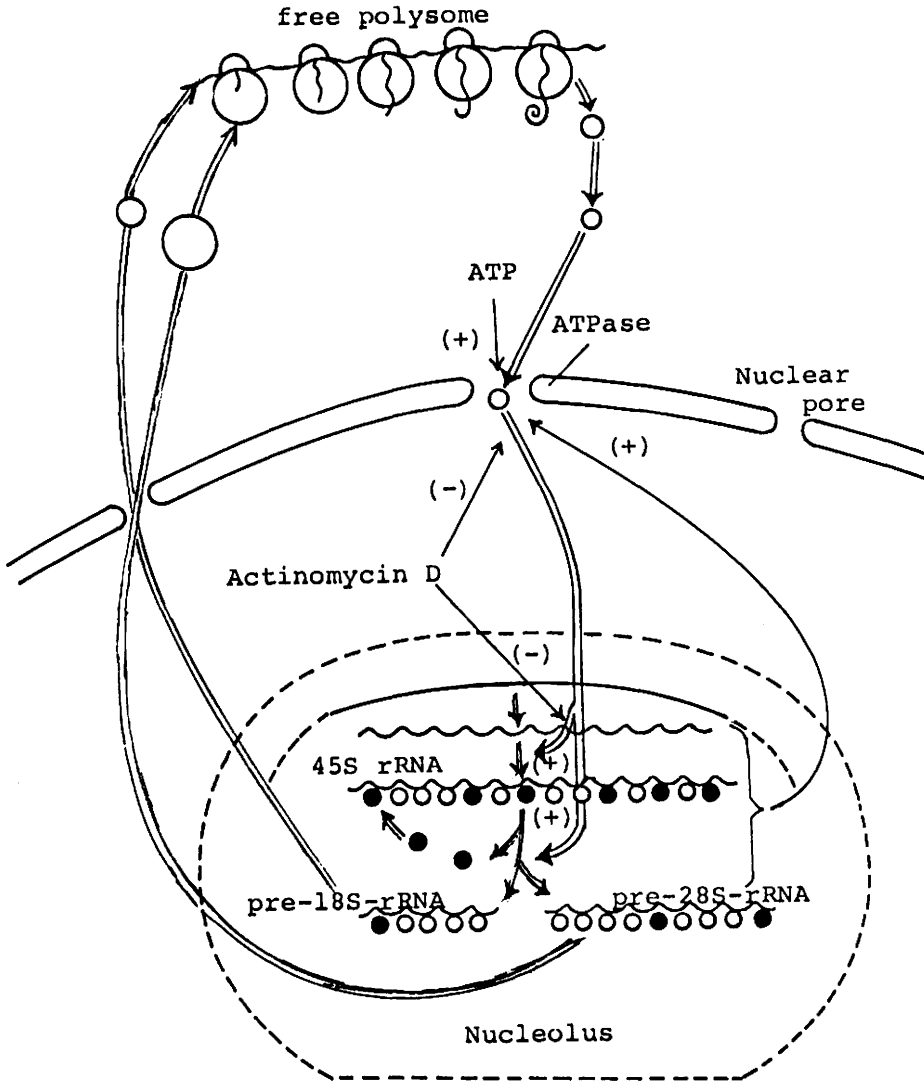


図1 動物のリボゾーム蛋白の合成と核及び核小体への移行とリボゾームの形成
○ リボゾーム蛋白, ● 核小体蛋白

動物リボゾーム蛋白の機能については活性あるリボゾーム大小亜粒子が分離出来ないこともあって手つかずの状態であった。しかし、1969年シカゴ大学の Dr. Wool の研究室で筋肉細胞からペプチド延長活性ある大小亜粒子を分離することを報じた。そこで私はその当時、ブラックボックスといわれるリボゾーム蛋白について研究することにした。寺尾君がこの方法を改良してくれて、ラット肝から活性のある大小亜粒子を純粋に調製する方法を確立した¹⁴⁾。更に寺尾君は小亜粒子蛋白を CM セルロース

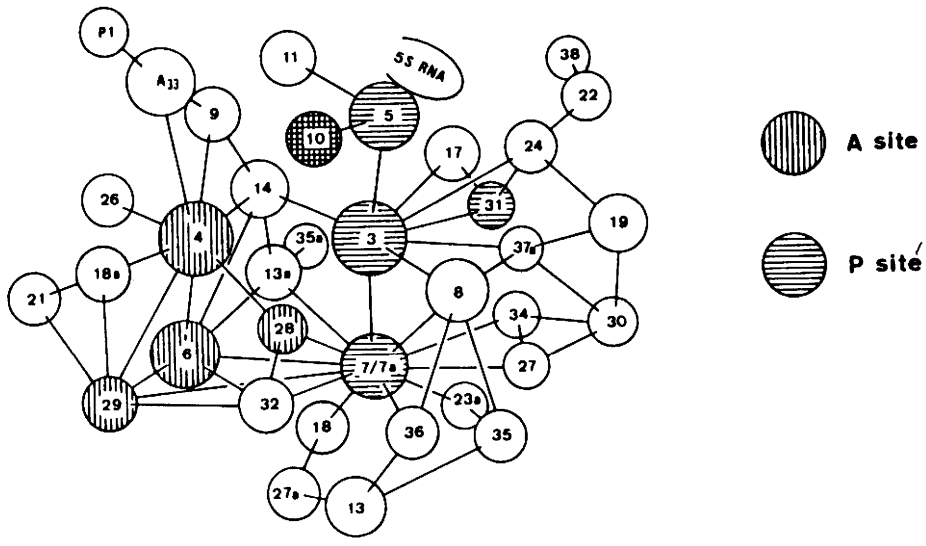
カラムクロマトグラフィーとゲル濾化法で精製することを試みてくれ、或程度の成功を収めた¹⁵⁾。しかし、全蛋白を純粋に分離することは大量のリボゾームを使う大規模な実験が必要と予想された。そこでリボゾーム蛋白の同定には大腸菌のリボゾーム蛋白で Dr. Wittmann が開発した二次元アクリルアミドゲル電気¹¹⁾泳動を用いることにした。寺尾君はゲル上のスポットを切り出して SDS アクリルアミドゲル電気泳動法で分析する“三次元ゲル電気泳動法”を考案して、殆んど総ての大小亜粒

子蛋白を同定することを可能にしてくれた¹⁶⁾。

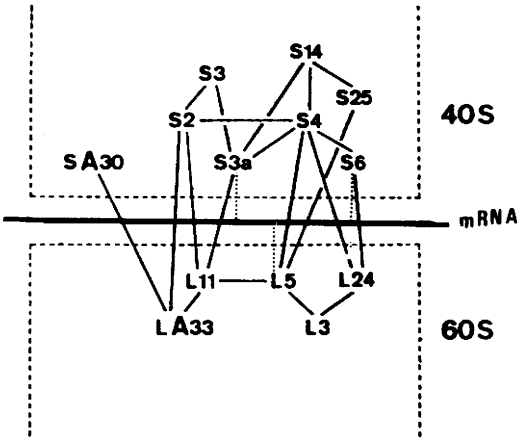
又、リボゾーム蛋白の機能を知る上のいまひとつの基盤として、リボゾーム中でのリボゾーム蛋白の位置的関係を知る必要がある。大腸菌の場合にはリボゾーム蛋白の抗体を家兎に注射してえられるので、これと電子顕微鏡を用いた免疫電顕が用いられているが、ラットの場合には高い抗体価をもつ血清がえられないので、余り行われていない。そこで蛋白の架橋剤を用いることにした。

又、小亜粒子についてはおそらく他の研究室で行われるであろうから、大亜粒子蛋白について実験することに

した。尚このような実験が可能になったのは、¹²⁵J で高い比放射能の蛋白の標識可能になり、これによって架橋した微量の蛋白をオートラジオグラフィーを用いて二次元ゲル上で同立可能になったことによる。この研究は寺尾、内海君によって始められた¹⁷⁾。内海君は数種の架橋剤や H₂O₂ を用いて、大亜粒子蛋白の 85% の 36 種が関与する 53 の隣接蛋白のペアを明らかにして、大亜粒子を構築する蛋白の相立関係をかなり解明した¹⁸⁾ (図 2)。これは、今後リボゾーム蛋白の機能を論ずる上で貴重なデータを提供するものと信ずる。又、リボソ



(1)



(2)

図 2 (1) 60S 亜粒子における蛋白の配置 (2) 大小亜粒子の界面における蛋白質の配置と mRNA と結合する蛋白質

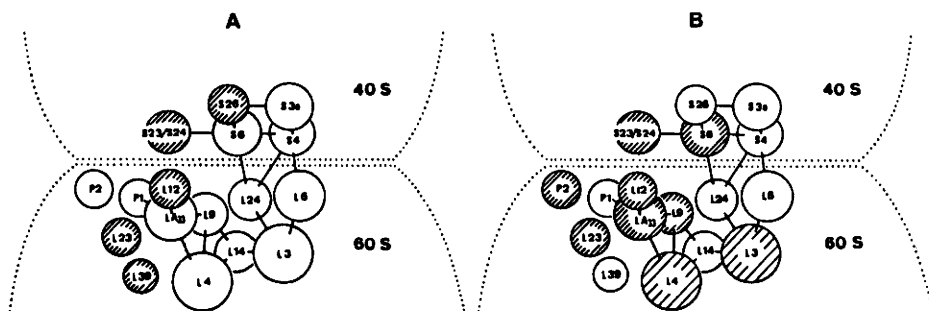


図3 ペプチッド延長因子 EF-1 α (A) 及び EF-2 と結合するリボソーム蛋白質の配置

ームの大小亜粒子の間は mRNA が通過し、アミノアシル tRNA, ペプチゲル tRNA があること等から蛋白合成に重要と考えられるが、架橋剤 2-iminothiolane を用いて大小亜粒子間にある8種のペアーを同定することが出来た¹⁹⁾ (図2(2)).

これ等のデータをリボソームの機能と関係づけようとして、ペプチッドの延長反応にかかわる EF-1 α 或は EF-2 とリボソームを結合させた後、2-iminothiolane を用いて架橋させて EF-1 α , EF-2 と結合するリボソーム蛋白を上記の隣接蛋白を顧慮しつつ画いたものがこの図である^{20) 21)}. EF-1 α はアミノアシル tRNA を A 部位に結合さすが、EF-2 は新しく生成したペプチゲル tRNA を mRNA のトリプレットと共に A 部位から P 部位に移動さす (translocation) という複雑な機能をもっている。図3に示すように、EF-1 α , EF-2 は今迄いわれていたように一部重複した部位をもつが、EF-2 のほうがより広汎な領域でリボソームと接触していることは上述の機能をよく説明しうる事項であろう。

最後に、私共が長年やって来た 5 SRNA-蛋白複合体について記そう。5 SRNA は分子量4万くらいの小さな rRNA であるが、前核細胞から真核細胞まで大亜粒子に存在することから蛋白合成に重要な役割を果していることが推定されていたが、まだその具体的な役割は不明である。

ラット肝リボソーム大亜粒子を EDTA で処理すると 5 SRNA が蛋白と結合した顆粒として大亜粒子から遊離することは Blobel によって認められていた。寺尾君はこれが L5 蛋白であることを同定することが出来た²²⁾。又これが EDTA が作用することによる人工産物でないことも証明することが出来た。即ち 5 SRNA は 5 SRNA-L5 蛋白顆粒 (5 SRNP と略)

として存在することになる^{23) 24)}。一方、高橋君はラット肝ポリソームを紫外線照射すると、L5 蛋白が S3a, S6, L6 と共に、polyA⁺ mRNA に結合することを見出した²⁵⁾。これを発展させてグロビン mRNA の 5' リーダー領域が 80S 開始複合体で 5 SRNP と相互作用をすることを見出した²⁶⁾。私は更に動物の mRNA の 5' リーダー領域のヌクレオチド配列は色々であり、共通のものは開始コドン AUG を含む $\boxed{\text{A}}\boxed{\text{G}}\text{NN}$ $\boxed{\text{AUG}}\boxed{\text{G}}$ であり、これにも例外があり厳密に云えば AUG のみともいえることに気付いた。そこで 5 SRNP が 80S 開始複合体で mRNA の 5' リーダー領域と結合するのが一般論とすれば AUG と結合することが考えられた。山形大の田中、日高君に相談するとこれを証明するためにタバコモザイクウィールス RNA を T₁ ヌクレアーゼで処理をした 5' に CAP を欠き又 3' 末端に開始コドン AUG を含む \mathcal{Q} クラグメントがよいとのことで、AUG の 3' 末端部分を ³²pCp で標識してくれた (³²p \mathcal{Q})。これを家兔網状赤血球の系で保温すると ³²p \mathcal{Q} を含んでいる 80S 開始複合体が形成されることを示した。そしてこれをマイクロカスのヌクレアーゼ処理役、EDTA を加えてえた 5 SRNP が約 20 ヌクレオチド残基の ³²p \mathcal{Q} クラグメントを含むことを示した。又 80S 開始複合体中の ³²p \mathcal{Q} と 5 SRNP とを UV 照射により架橋させた後、5 SRNP を RNaseA で処理した場合には、5 SRNP による保護断片として ACA $\boxed{\text{AUG}}$ ³²p Cp がえられた。更にこれが L5 蛋白に結合することが見出された。この結果から開始コドン AUG が 80S 開始複合体中で 5 SRNP と結合することや、その L5 蛋白が Peptidyl (P) 部位にあることを示す報告があることから、5 SRNP の機能は図4に示すように開始コドン AUG を P 部位に結合させて次の延長反応にスイッチするのに必要だと推定した²⁶⁾。

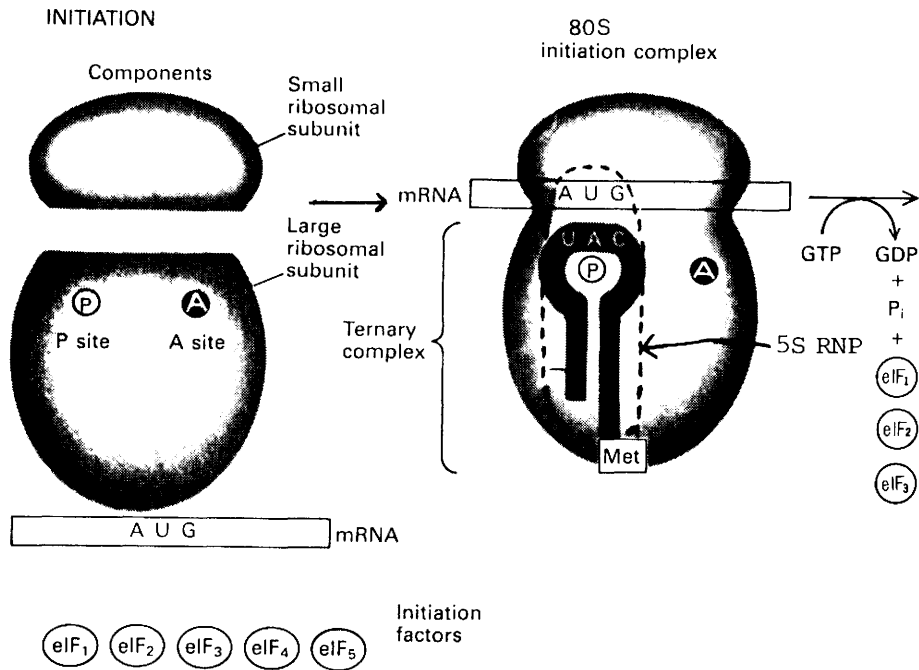


図4 蛋白生成における5S RNPの役割

又最近 L5 蛋白の mRNA の cDNA のクローンが田村君等によりえられて、そのヌクレオチド配列が決定されつつある。又それから L5 蛋白のアミノ酸配列が推定出来つつある。5SRNA はラット肝、酵母では一種類の分子量の大きい蛋白、夫々 L5, YL3 と結合し、真核細胞に近いといわれるハロバクテリアでは分子量の小さい HL 13 と HL 19 が、大腸菌では L18, L25, L5 の三つが結合蛋白として知られており、これらの関係は興味深い。大腸菌の三つの蛋白は全アミノ酸配列が知られているが、他の二つは部分的にしか知られていないのでかなり比較が困難である。しかし N 末端側はラット、酵母、ハロバクテリア HL 13 の間ではかなりの相同性が認められる。C 末端側は少くもイーストとラットとはかなり相同性がある。しかしハロバクテリウムの HL 19 は部分的にしか配列が決められておらず相同性は不明である。しかし L5 のアミノ酸配列が推定されたことはこれ等のことの推定に役立つ他、L5 蛋白と 5SRNA の結合の詳細を知る上でも重要な知見を提供するであろう。

終わりに、困難な研究を推進してくれた教室員諸君に心から感謝の意を表します。又この研究は文部省の科学

研究費、内藤財団からの助成を受けたことに感謝します。

参 考 文 献

- 1) Ogata, K., Ogata, M., Mochizuki, Y. and Nishiyama, T.: The in vitro incorporation of ¹⁴C-glycine into antibody and other protein fraction by popliteal lymph nodes of rabbit following the local injection of crystalline ovalbumin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 43: 653-668, 1956.
- 2) Ogata, K. and Nohara, H.: The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH5 enzyme in amino acid activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 31: 142, 1957.
- 3) Hirokawa, R., Omori, S., Tabahashi, T. and Ogata, K.: Transport of amino acid from soluble ribonucleic acid to microsomal albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, 49: 612, 1961.
- 4) Ogata, K., Omori, S. and Hirokawa, R.: Studies on the biosynthesis of antibody and other γ -globulin in microsomes of

- immunized spleen cells. *J. Biochem.(Tokyo)*, **49**: 660, 1961.
- 5) Satake, M., Mase, K., Takahashi, Y. and Ogata, K.: Incorporation of leucine into microsomal protein by a cell-free system of guinea-pig brain. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 366, 1961.
- 6) Sugano, H., Watanabe, I. and Ogata, K.: Stabilizing effect of ribonuclease inhibitor on structures of polysomes and some properties of four classes of ribosomal particles in rat liver cytoplasm. *J. Biochem.(Tokyo)*, **61**: 778, 1967.
- 7) Takagi, M. and Ogata, K.: Direct evidence for albumin biosynthesis by membrane bound polysomes in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**: 55, 1968.
- 8) Takagi, T., Tanaka, T. and Ogata, K.: Evidence for exclusive biosynthesis in vivo of serum albumin by bound polysomes of rat liver. *J. Biochem.(Tokyo)*, **61**: 651, 1969.
- 9) Tanaka, T. and Ogata, K.: Preferential synthesis of arginase by free polysomes from rat liver. *J. Biochem.(Tokyo)*, **76**: 693, 1971.
- 10) Ogata, K., Terao, K., Morita, T. and Sngano, H.: Synthesis of "basic structure proteins" of liver ribosomes by a cell-free system. *Biochim, Biophys. Acta*, **129**: 217, 1966.
- 11) Nabeshima, Y., Tsurugi, K. and Ogata, K.: Preferential biosynthesis of ribosomal structural proteins by free and loosely bound polysomes from regenerating rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **414**: 30, 1975.
- 12) Tsurugi, K., Morita, T. and Ogata, K.: Identification and metabolic relationship between proteins of nuclear 60S particles and of ribosomal large subunits of rat liver by means of two-dimensional disc electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, **32**: 555, 1972.
- 13) Tsurugi, K. and Ogata, K.: Effects of cell sap, ATP, and RNA synthesis on the transfer of ribosomal proteins into nuclei and nucleoli in a rat liver cell-free system. *Eur. J. Biochem.* **145**: 83~89, 1984.
- 14) Terao, K. and Ogata, K.: Preparation and some properties of active subunits from rat liver ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**: 80, 1970.
- 15) Terao, K. and Ogata, K.: Characterization of the proteins of the small subunits of rat liver ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **285**: 473, 1972.
- 16) Terao, K. and Ogata, K.: Studies on structural proteins of the rat liver ribosomes. molecular weights of the proteins of large and small subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **402**: 214, 1975.
- 17) Uchiumi, T., Terao, K. and Ogata, K.: Identification of neighboring protein pairs in rat liver 60S ribosomal subunits cross-linked with dimethyl suberimidate or dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate. *J. Biochem(Tokyo)*, **88**: 1033~1044, 1980.
- 18) Uchiumi, T., Kikuchi, M., Terao, K. and Ogata, K.: Cross-linking study on protein topography of rat liver 60S ribosomal subunits with 2-iminothiolane. *J. Biol. Chem.* **260**: 5675~5682, 1985.
- 19) Uchiumi, T., Kikuchi, M. and Ogata, K.: Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. *J. Biol. Chem.* **261**: 9663~9668, 1986.
- 20) Uchiumi, T., Kikuchi, M., Terao, K., Iwasaki, K. and Ogata, K.: Cross-linking of elongation factor 2 to rat liver ribosomal proteins by 2-iminothiolane. *Eur. J. Biochem.* **156**: 37~48, 1986.
- 21) Uchiumi, T. and Ogata, K.: Cross-linking study on localization of the binding site for elongation factor 1 α on rat liver ribosomes. *J. Biol. Chem.* **261**: 9668~9671, 1986.
- 22) Terao, K., Takahashi, Y. and Ogata, K.: Differences between the protein moieties of active subunits and EDTA-treated subunits of rat liver ribosomes with specific references

- to a 5S rRNA protein complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **402**: 230, 1975.
- 23) **Terao, K., Uchiumi, T. and Ogata, K.:** Cross-linking of L5 protein to 5S RNA in rat liver 60S subunits by ultraviolet irradiation. *Biochim. Biophys. Acta*, **609**: 306~312, 1980.
- 24) **Terao, K., Uchiumi, T. and Ogata, K.:** Identification of the protein cross-linked to 3'-terminus of 5S RNA in rat liver ribosomal 60S subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **697**: 20~24, 1982.
- 25) **Takahashi, Y. and Ogata, K.:** Ribosomal proteins cross-linked to natural mRNA by UV irradiation of rat liver polysomes. *J. Biochem.(Tokyo)*, **90**: 1549~1552, 1981.
- 26) **Takahashi, Y. and Ogata, K.:** Attachment of initiator AUG to the 5S-RNA. L5 protein (5S RNP) of the 80S initiation complex. 原稿作成中.
-