

アルテミアサリーナのリボソームに関する研究

第2報：ペプチドマッピングによるアルテミアサリーナと ラット肝の 40S リボソーム蛋白質の比較

新潟大学医学部生化学第一教室（主任：緒形規矩雄教授）

剣持直哉

Studies on Ribosomes of *Artemia salina*

Report II: Comparisons of 40S ribosomal proteins of *Artemia salina*
with those of rat liver by using peptide mapping

Naoya KENMOCHI

Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Kikuo OGATA)

Forty-S ribosomal proteins of *Artemia salina* were compared with those of rat liver by using a convenient method for peptide mapping of proteins (Cleveland, *et al.* J. Biol. Chem. **252**, 1102-1106, 1977). Cyanogen bromide, α -chymotrypsin and papain were used as the cleavage reagents for peptide mapping. The cleavage products were analysed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and the patterns of peptide fragments of *Artemia* ribosomal proteins were compared with those of rat liver. There were some similarities between the peptide patterns of *Artemia* and rat liver 8 ribosomal proteins (S2, S4, S6, S7, S8, S9, S20 and S23) out of 12 proteins that were examined, especially those of 5 proteins (S2, S4, S6, S7 and S8) were very similar. Although this method has some limitations to analyse a homology between distinct proteins, the results suggest that some 40S ribosomal proteins are highly resistant to evolutionary change from *Artemia salina* to rat liver.

Key words: *Artemia salina*, ribosomal protein, peptide mapping

アルテミアサリーナ, リボソーム蛋白質, ペプチドマッピング

略語表

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

真核細胞のリボソーム蛋白質の機能を研究する上でアルテミアサリーナのリボソームは、前報でも述べたよう

に、モノソームの大量調製が容易であること、アルテミアの系での蛋白質合成系の解析がかなりよく進んでいること等、最も分析の進んでいるラット肝のリボソームに比べて有利な点がある。そこでまず、前報で示したように、アルテミアサリーナのリボソーム蛋白質を2次元電気泳動法にて分析し、ラット肝のそれと比較して、ス

Reprint request to: Naoya Kenmochi,
Facilities for Comparative Medicine &
Animal Experimentation, Niigata
University School of Medicine

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部附属動物実験施設

剣持直哉

ポットのゲル上での位置をラット肝の場合に対応させることにより、蛋白質の番号を命名した。真核細胞のリボソームは約70種の蛋白質を持ち、その2次元電気泳動パターンは進化の過程でよく保存されていると報じられているが¹⁾、前報で明らかにしたように、アルテミアサリーナとラット肝を比較した場合もよく保存されており、60S 亜粒子に比べ 40S 亜粒子において非常に顕著であった。

Cleveland 等は²⁾、キモトリプシン、*Staphylococcus aureus* のプロテアーゼ、パパインを用いて、簡便な蛋白質のペプチドマッピング法を開発し、Lam と Kasper はさらに、ブロムシアン、ハイドロキシアミン、酢酸を用い、磷酸化を受けるミクロソームの2つの蛋白質の相同性を比較し、その方法の有効性を報告³⁾した。本研究では前報に引き続いて、アルテミアサリーナとラット肝の40S リボソーム蛋白質をさらに詳細に比較するために、ブロムシアン、キモトリプシン、パパインを用いて両者蛋白質のペプチドマッピングを行い、その相同性を比較した。

実験方法

1. リボソーム蛋白質の分離と ¹²⁵I による標識

ラット肝の 40S リボソーム蛋白質は Terao と Ogata の方法⁴⁾に従い調製し、アルテミアサリーナの 40S リボソーム蛋白質は第1報に従い調製した。

得られたリボソーム蛋白質の ¹²⁵I による標識は、第1報で示したとおり Hunter と Greenwood の方法⁵⁾に従い、クロラミン T を用いて行った。個々のリボソーム蛋白質の分離は、第1報で報告した2次元電気泳動法 (システム I) にて行い、以下のペプチドマッピングに用いた。

2. ペプチドマッピング法

40S リボソーム蛋白質の2次元電気泳動ゲルより、目的とする蛋白質スポットを切り抜き、厚さ 1mm、直径 4mm の円柱状にゲルの大きさを揃えた後、ブロムシアンまたは酵素等で処理し蛋白質の切断を行った。

(a) ブロムシアンによるペプチドマッピング

切り出されたゲル断片は Lam と Kasper の方法³⁾に従い、20mg のブロムシアンを含む75%のギ酸 1ml 中にて室温で20時間保温し、ゲル断片の pH を中性に戻すために 1M Tris 中で数回振とうした後、3% SDS、5% メルカプトエタノール、20%グリセロール、80mM Tris-HCl pH6.8 を含む緩衝液中で30分間、室温で保温した。ゲル断片はそのまま SDS スラブ電気泳動にか

け、Coomassie Brilliant Blue で染色した後、その染色パターンより、ブロムシアンにより切断されたペプチドの分析を行った。

(b) 酵素によるペプチドマッピング

¹²⁵I で標識された蛋白質を含むゲル断片は、緩衝液 A (0.1% SDS, 1mM EDTA, 20% グリセロール, 80mM Tris-HCl pH6.8) 1ml 中で30分間、室温にて保温した後、SDS スラブゲルのサンプルウェル内に入れた³⁾。そこに 20μg の α-キモトリプシンまたは 0.3 μg のパパイン (Worthington Biochemical Corp. 製) を含む緩衝液 A 20μl を加え、ただちに SDS スラブ電気泳動を行った。ゲル断片中の蛋白質は、SDS スラブ電気泳動の間に、酵素により部分的に切断される。切断されたペプチドの電気泳動パターンは、ゲルを乾燥後オートラジオグラフィーを行うことにより比較した。

結 果

1. アルテミアサリーナとラット肝の 40S 塩基性リボソーム蛋白質の2次元電気泳動パターン

アルテミアサリーナとラット肝の 40S リボソーム蛋白質の2次元電気泳動は、前報に従い、システム I (尿素存在下, pH8.6-pH4.9) のゲルシステムを用いて行った。前報で報告した通り、両者とも非常によく似た泳動パターンを示しており (図1)、進化の過程で 40S リボソーム蛋白質がよく保存されていることがわかる。しかし、システム I での2次元ゲル上で完全に一致する位置にある蛋白質は S8 と S9 の2つしかなく、また前報で示したようにシステム II (尿素存在下 pH8.6-SDS 存在下) のゲル上では S7, S9, S27 であり、従って両ゲルシステムで完全に一致する位置にくる蛋白質は S9 だけであり、アルテミアとラット肝の間で若干の違いが存在するようであった。

2. 分子量が異なる蛋白質のペプチドマッピング

比較する2種類の蛋白質に相同性があっても分子量が異なる場合、両者のペプチドマップはかなり違った様子を示すと考えられる。この点を考察するために、図2に相同性はあるが分子量の異なる2つの蛋白質 A と B の、予想されるペプチドマップを模式図に示した。図2で X と Y は蛋白質の切断部位を示すが、仮に X が強く完全に切断される部位で、Y が弱い部分的な切断部位であるとすると、その予想されるペプチドマップは図2a のようになる。また逆に、Y が強く X が弱い切断部位である場合、図2b のようなペプチドマップが予想される。

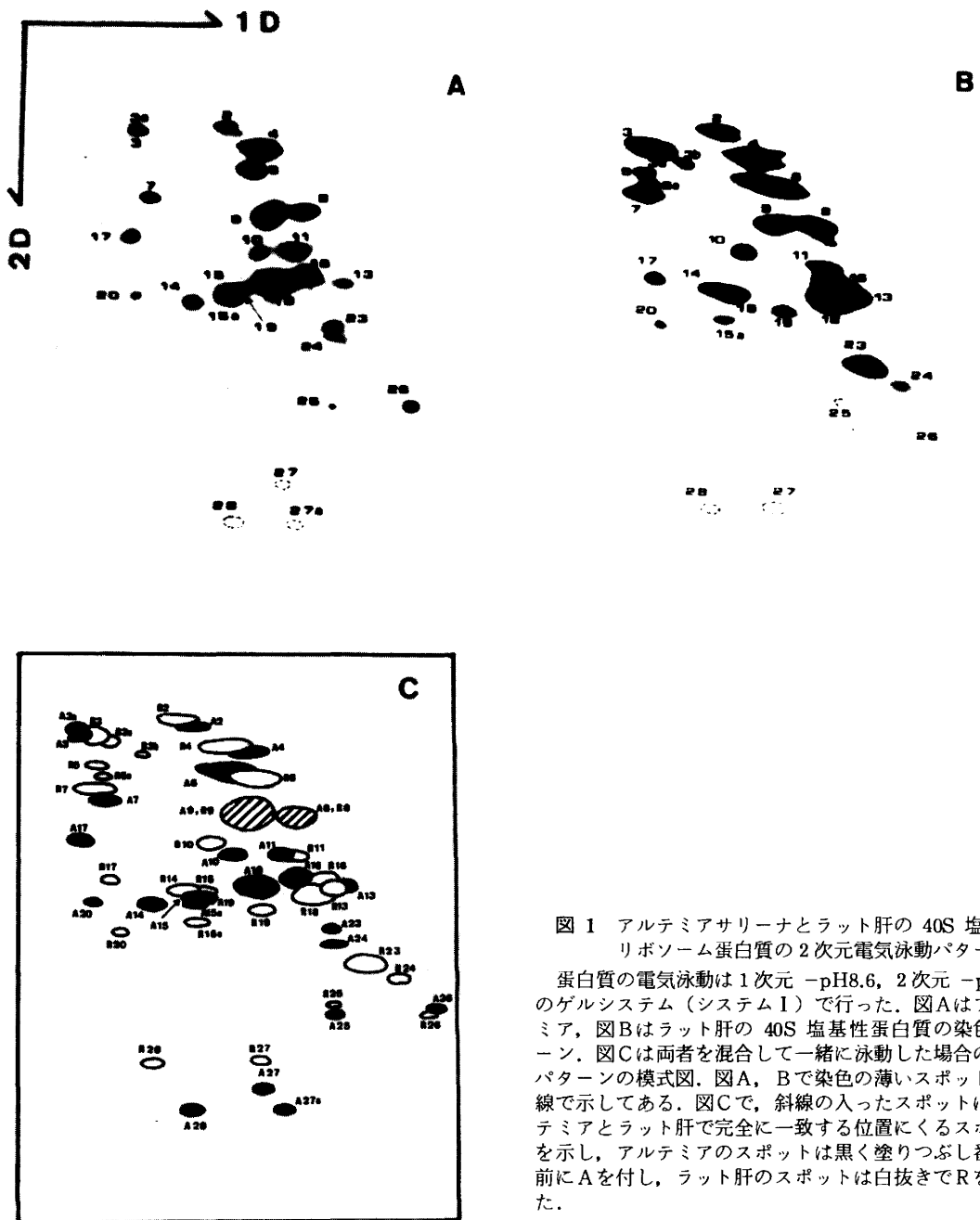


図1 アルテミアサリーナとラット肝の40S塩基性リボソーム蛋白質の2次元電気泳動パターン

蛋白質の電気泳動は1次元 $-pH8.6$, 2次元 $-pH4.9$ のゲルシステム(システムI)で行った。図Aはアルテミア、図Bはラット肝の40S塩基性蛋白質の染色パターン。図Cは両者を混合して一緒に泳動した場合の染色パターンの模式図。図A、Bで染色の薄いスポットは点線で示してある。図Cで、斜線の入ったスポットはアルテミアとラット肝で完全に一致する位置にくるスポットを示し、アルテミアのスポットは黒く塗りつぶし番号の前にAを付し、ラット肝のスポットは白抜きでRを付した。

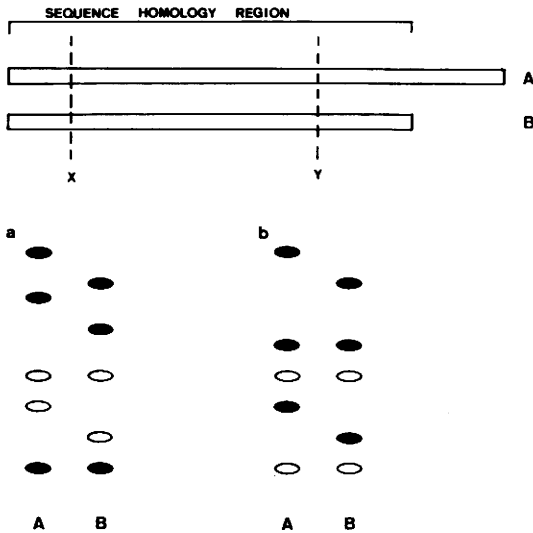


図2 相同性はあるが分子量が異なる蛋白質の予想されるペプチドマップ

A, Bは相同性はあるが分子量の違う蛋白質を示す。X, Yは蛋白質の切断部位を示す。a, bは予想されるペプチドマップを示すが、Xが強い切断部位でYが弱い部位の場合aのようなマップが予想され、反対にXが弱くYが強い切断部位の場合bのようなマップが予想される。黒いスポットはメジャーなスポットを示し、白抜きのスポットはマイナーなスポットを示す。

このように、かなりの相同性がある蛋白質でも若干の分子量の違いがあると、そのペプチドマップはかなり異なったパターンをとる場合が考えられ、ただ単に分解産物の電気泳動ゲル上での位置が同一であるということだけでは、両者の相同性を判断できない場合がある。また切断部位が多い場合やその切断が部分的である場合等を考えると、得られるペプチドパターンは非常に複雑になると予想され、単純なパターンの比較だけでは両者の相同性を決定することはできず、他の方法の併用が必須でであると考えられ、ここに2つの蛋白質の相同性をペプチドマッピング法で分析する場合の限界があると考えられる。本研究で比較したアルテミアサリーナとラット肝の40Sリボソーム蛋白質も、分子量の違う蛋白質がかなりあるため、この点を考慮して両者の相同性の有無を以下検討した。

3. ブロムシアンを用いたペプチドマッピング

2次元ゲルスラブより切り抜かれた個々の蛋白質は、ブロムシアン処理した後 SDS スラブ電気泳動にかけ、その Coomassie Brilliant Blue による染色パターン

から、ブロムシアンによる分解産物の比較をした。この方法は、ブロムシアンの切断位置であるメチオニン含量が少ないため、S2, S4, S6, S8 等の分子量 25,000 以上の蛋白質でよい結果が得られたが、分子量の小さい蛋白質については分解産物の数が少なく、あまり明瞭な結果は得られなかった (図3)。しかし分解産物を標識することなく染色パターンで比較できること、酵素に比べると均一に作用するため、比較的明瞭なペプチドマップが得られることが有効であった。ラット肝の40S蛋白質のアミノ酸組成^{61,71}より推定されるメチオニン数は、本研究で用いた蛋白質については、S2-4.6, S4-4.7, S6-3.7, S7-2.4, S8-0.8, S9-3.8, S11-3.3, S17-2.7, S18-1.3 であるが、ブロムシアンによる分解が限定分解であったとすると、例えば S2 の場合14~20個の分解産物が生じると考えられ、事実ゲル上で11個程度は確認できる (図3)。しかし S8 の場合、切断部位は1つであるのにゲル上では4個の分解産物が確認され、非特異的な切断が存在することが考えられる。これは、ブロムシアンを処理する際に75%き酸中で行うために、ペプチド中のアスパラギン酸とプロリンの間も非特異的に切断されたためと考えられる。

4. α -キモトリプシンとパパインをを用いたペプチドマッピング

この方法は、ゲル中で酵素を作用させそのまま電気泳動するため、ゲルを染色した場合、ペプチドの染色パターンの中に酵素自身のバンドが出てくるという不都合があるため、あらかじめ ^{125}I で標識したリボソーム蛋白質についてペプチドマッピングし、そのオートラジオグラムのパターンを比較した (図3)。電動泳動中にだけ酵素が作用するため、ブロムシアンに比べて未分解物が多いが、切断部位が多いため出てくるスポットの数が多くことと、 ^{125}I を使っているためその検出感度が高いことにより、低分子量の蛋白質についてもある程度分析可能であった。切断部位については、 α -キモトリプシンの場合おもに芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン) の C 末端側を切断するが、ロイシンの C 末端側を切ることもある。またパパインの場合その特異性は広く、多くのアミノ酸の C 末端側のペプチド結合を切断する。両者共にブロムシアンに比べて特異性は低く、酵素の濃度と処理時間によりペプチドマップは変化するが、アルテミアとラット肝の間では、 ^{125}I の標識の強弱はあるものの総て同一条件で処理しているため、いくつかの有効な結果が得られた。

図 3-1

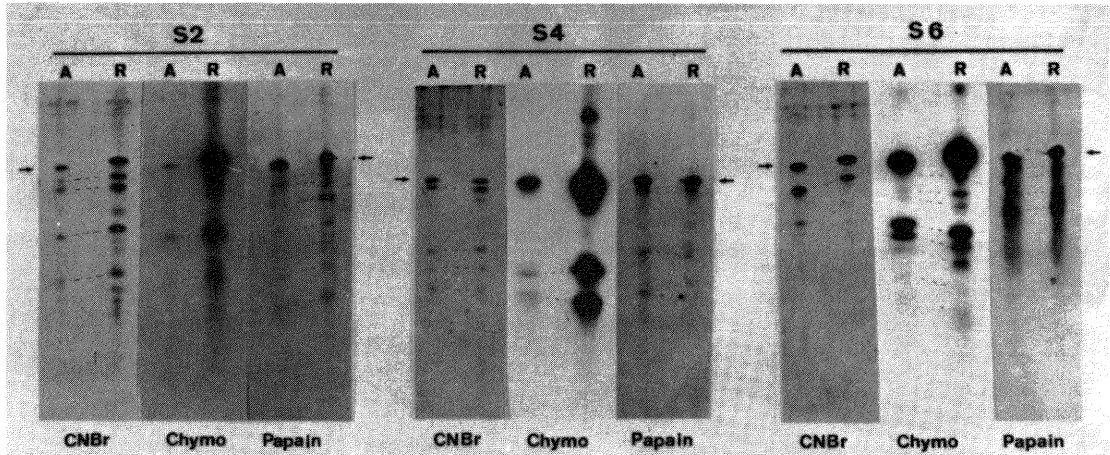


図 3-2

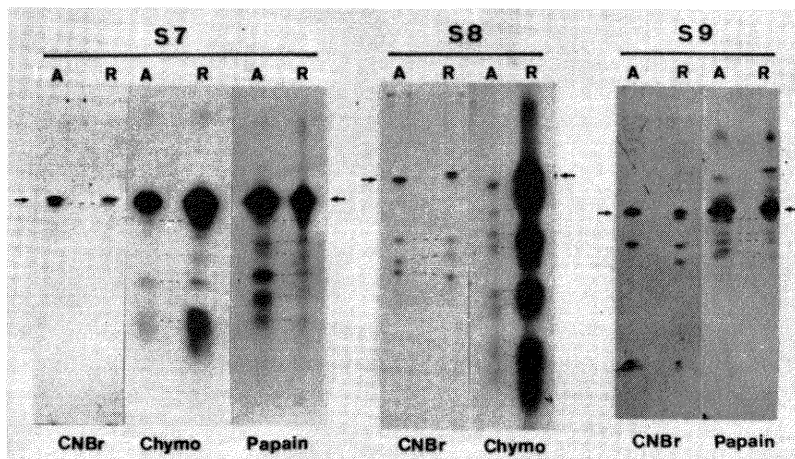


図 3 アルテミアサリーナとラット肝の 40S リボソーム蛋白質のペプチドマップ

2次元電気泳動ゲルより抜き出された両者の蛋白質を、ブロムシアン、 α -キモトリプシン、パパインを処理し、分解産物を18%アクリルアミドを含む SDS スラブ電気泳動にて分析し、ブロムシアンの場合は Coomassie Brilliant Blue を用いた染色パターンを、その他は ^{125}I によるオートラジオグラムのパターンを以較した。

AとRはそれぞれアルテミアとラット肝のリボソーム蛋白質を示し、矢印は未分解の蛋白質の位置を示す。CNBr, Chymo, Papain はそれぞれブロムシアン、 α -キモトリプシン、パパインを用いてペプチドマッピングしたことを示す。点線は分解産物の中で、対応している可能性のあるものを結んだ。

図3-3

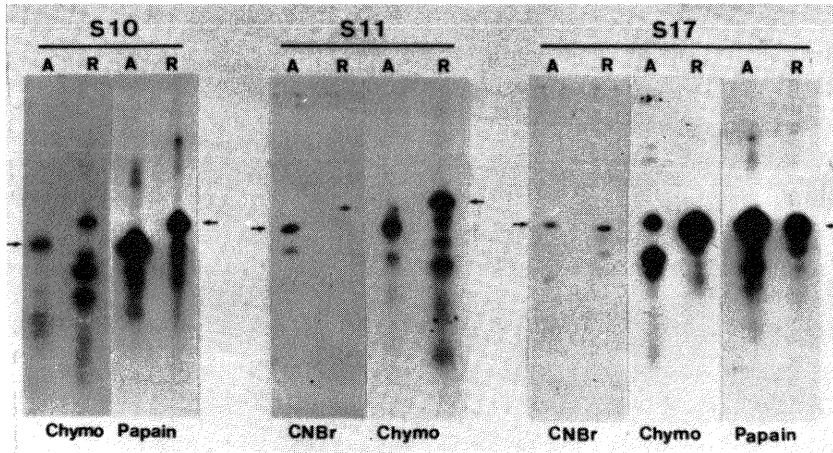
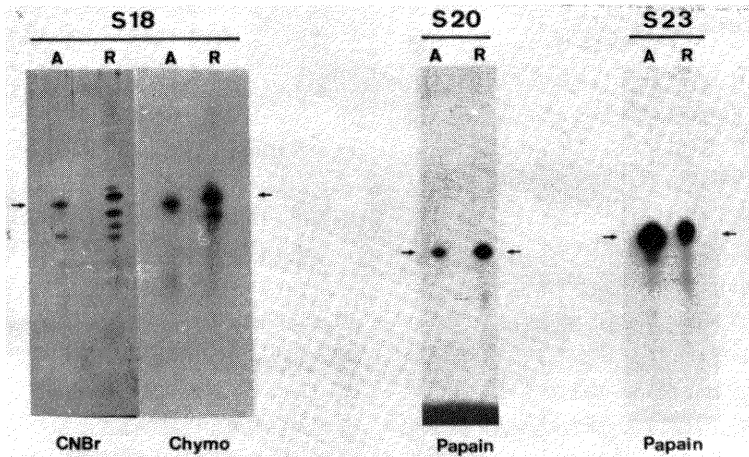


図3-4



5. 個々の蛋白質のペプチドマップの比較

個々の蛋白質についてそのペプチドマップを比較し、分解産物の中で対応している可能性のあるスポットを、その位置と相対的な濃さより判断して図3において点線で結んだ。S2 に関してブロムシアンの場合、ラットに比べてアルテミアの分解産物の数が少ないが、分子量の差を考慮すると濃いスポットは比較的良好に対応していると考えられる。 α -キモトリプシンの場合、アルテミア

の蛋白質の標識の効率が悪かったためオートラジオグラムの濃淡に差があるが、2つの主な分解産物に対応が見られる。パパインの場合未分解物が多く残っているが、分解産物は分子量の差を反映してよく対応していると考えられる。S4 に関してブロムシアンの場合、対応できないスポットがラットに1つあるが、他は比較的良好に対応している。 α -キモトリプシンの場合 S2 の場合と同様で、主な分解産物は対応している。パパインの場合、

図中に点線で示した5組の分解産物のうち分子量の大きいほうから4組は、スポットの位置および濃さ共に比較的良好に対応しているが、一番低分子量の組については、スポットの濃さは対応しているが位置に違いがあり対応していない可能性もある。S6 に関しては、磷酸化を受けること⁸⁾⁹⁾、ポリソーム上で mRNA と結合していること¹⁰⁾等の報告があり、機能面で重要と考えられる蛋白質であるが、そのペプチドマップはブロムシアンまたはパパインの場合、各々分子量の違いに応じた4組の対応が見られるが、S2 と S4 の場合程ははっきりとした対応ではない。 α -キモトリプシンの場合、分子量の違いを反映はしていないが、スポットの位置と濃さから判断して8組の分解産物が比較的良好に対応していると考えられる。S7 に関してブロムシアンの場合、分解産物は1つしか認められなかったが、その位置は一致している。 α -キモトリプシンの場合、アルテミアのほうは分解産物の数が少ないが、主な3つのスポットに対応が見られパパインの場合は分解産物のスポットの位置と濃さに若干の差が見られるものもあるが、6組が比較的良好に対応していると考えられる。S8, S9 はシステム I の2次元ゲル上で、アルテミアサリーナとラット肝ともに同一の位置にくる蛋白質であるが(図1)、S8 はブロムシアンの場合3組の比較的良好対応が認められ、 α -キモトリプシンの場合はオートラジオグラムの濃淡に差があるが、主な分解産物はある程度対応できる。一方 S9 は分子量も等しいのであるが、パパインで4組の分解産物にある程度の対応が認められるものの、ブロムシアンでははっきりした対応は認められない。S10 は、ブロムシアンでは両者とも分解産物が検出されず(図は省略)、パパインでは若干の相同性は見られるが分解産物の対応はあまりはっきりせず、 α -キモトリプシンではほとんど相同性が認められない。S11 は2次元ゲル上でかなり近い位置にある蛋白質であるが(図1)、両者のペプチドマップは、ブロムシアン、 α -キモトリプシンともにあまり相同性が認められず、アルテミアとラット肝で対応していない蛋白質である可能性も考えられる。S17 はブロムシアンでのマップは違っており、 α -キモトリプシン、パパインでは分解産物の位置は多少相同性があるものの、そのスポットの黒化度の濃淡にかなり差が見られるため、対応はあまりはっきりしない。S18 はブロムシアン、 α -キモトリプシンともにかなり違ったマップを示しているが、ラット肝の S18 を2次元ゲルより切り抜くときに、他の蛋白質が混入した可能性も考えられる。S20, S23 はパパインで若干の相同性が見られ、S20 は1つ、S23 は

表1 アルテミアサリーナとラット肝の 40S リボソーム蛋白質のペプチドマッピングによる相同性の比較

	Molecular weight		Correspondence		
	Artemia	Rat liver	CNBr	Chymotrypsin	Papain
S 2	29,000	31,000	++	+	++
S 4	28,500	28,000	++	+	++
S 6	29,000	31,000	+	++	+
S 7	22,000	22,000	+	+	+
S 8	25,000	27,000	+	+	n.d.
S 9	23,000	23,000	±	n.d.	+
S10	17,000	19,000	n.d.	—	±
S11	16,000	19,000	—	—	n.d.
S17	17,000	16,000	—	±	±
S18	17,000	17,000	—	—	n.d.
S20	14,500	14,500	n.d.	n.d.	+
S23	16,000	16,000	n.d.	n.d.	+

両者の蛋白質をペプチドマッピングにより比較した結果をまとめた。分子量は第1報によった。

- ：分解産物の対応が認められないもの
- ±：分解産物の対応が明瞭でないもの
- ＋：分解産物に何らかの対応が認められるもの
- ++：分解産物に4組以上の対応が認められ、かつスポットの濃淡がよく一致しているもの
- n.d.：分解産物の分析が不能だったもの

2つの分解産物が対応していることが認められる。しかし、未分解物が多く分解産物の数が少ないためはっきりしたことは言えない。

以上の結果をまとめて表1に示したが、S2, S4, S6, S7, S8 の5種類の蛋白質は、アルテミアとラット肝の間で比較的良好に対応する蛋白質であること、S9, S20, S23 は何らかの対応がある蛋白質であることが明らかにされたが、対応関係ははっきりしなかった蛋白質については尚今後の研究が必要と考えられる。

考 察

アルテミアサリーナとラット肝の 40S リボソーム蛋白質12種類について、その相同性をブロムシアン、 α -キモトリプシン、パパインを用いたペプチドマッピングにより検討した。蛋白質を抽出することなく、ゲル中で酵素等を処理する方法は、リボソーム蛋白質のように電気泳動法以外では分離が難しい蛋白質に対して、非常に簡便でかつ有効であった。12種類の蛋白質のうち8種類についてアルテミアとラット肝で何らかの対応関係が確認され、そのうち5種類の蛋白質 S2, S4, S6, S7,

S8 については、比較的良好に対応するペプチドマップが得られた (図3)。またこの方法は表1からも明らかのように、分子量20,000以上の蛋白質については有効であったが、それ以下のものについては、分解産物の種類が少ないこと、低分子量の分解産物がゲル上でうまく分離されない等の理由により、ややあいまいな結果しか得られなかった。低分子量の蛋白質については、違った種類の酵素の使用および SDS スラブゲルシステムの改良が必要と考えられ、最終的にはアミノ酸配列の解析が必須であると考えられる。

最近 odani はアルテミアとラット肝の 40S リボソーム蛋白質 23種類について、そのアミノ酸組成を比較したが¹¹⁾、本研究で検討した12種類の蛋白質については、S2, S4, S6, S7, S8 について強い相同性が、S20, S23 については弱い相同性が認められ、S10, S11 に関しては相同性が認められず、本研究の結果と一致していた。しかし残りの S9, S17, S18 の3種類の蛋白質については異なる結果が得られ、ペプチドマッピングによる比較とアミノ酸組成の分析による比較が一致しなかった。S17 と S18 に関しては分子量が比較的小さいため、ペプチドマッピングではあまり正確な分析ができないこともあり、このような違いが生じたのかもしれない。S9 に関しては前報で示したように、2種類の2次元電気泳動法による分析で、最も相同性があるであろうと予想された蛋白質であるが、ペプチドマッピングによる比較では若干の相同性しか認められず、またアミノ酸組成の比較ではほとんど相同性が認められなかった。この点に関しては、さらにアミノ酸配列の解析等による分析が必要と考えられる。アミノ酸配列の解析については、最近 Tanaka 等は、リボソーム蛋白質の mRNA に相補的な DNA の塩基配列の解析により、ラット肝の S11 と *H. cutirubrum* の S16 および大腸菌の S17 蛋白質に、共通の保持されたアミノ酸配列があること¹²⁾、Nakanishi 等は、ラット肝の S17 と酵母のリボソーム蛋白質 51との間に、N 末端側 2/3の領域で76.9%の相同性があること、ラット肝の L30 とマウスの L30 が、12ヶ所の塩基の変換があるものの、全く同一のアミノ酸配列を持つことを推定した¹³⁾。今後さらに詳細にアルテミアサリーナとラット肝のリボソーム蛋白質を比較するためには、このようなアミノ酸配列の研究が必要と考えられる。

要 約

アルテミアサリーナとラット肝の 40S リボソーム蛋白質の、ブロムシアン、 α -キモトリプシン、パパインを用いたペプチドマッピングを行い、その相同性を検討した。分解産物は SDS スラブ電気泳動にて分析し、両者のペプチドマップをブロムシアンの場合はゲルの染色パターンで、酵素を用いた場合はオートラジオグラムで比較した。その結果、検討した12種の蛋白質のうち8種 (S2, S4, S6, S7, S8, S9, S20, S23) について、アルテミアとラット肝で何らかの相同性が認められ、特に S2, S4, S6, S7, S8 に関しては比較的良好に対応するペプチドマップが得られた。本研究で用いた方法は、同一の蛋白質ではなく違う蛋白質の相同性を比較する場合には多少の問題点もあるが、前報に引き続き 40S リボソーム蛋白質がアルテミアサリーナからラット肝に至る進化の過程でよく保存されていることを示唆することができた。

稿を終わるに臨み、御指導、御校閲を賜った緒方規矩雄教授に深謝いたします。適切な御助言ならびに御協力いただいた生化学第二教室の小谷昌司博士に感謝いたします。また研究の遂行を御支援して下さった、動物実験施設の佐藤徳光助教授に御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Delaunay, J., Creusot, F., and Schapira, G.: *Eur. J. Biochem.*, **39**: 305~312, 1973.
- 2) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K.: *J. Biol. Chem.*, **252**: 1102~1106, 1977.
- 3) Lam, K.S. and Kasper, C.B.: *Anal. Biochem.*, **108**: 220~226, 1980.
- 4) Terao, K. and Ogata, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **402**: 214~229, 1975.
- 5) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: *Nature*, **194**: 495~496, 1962.
- 6) Collatz, E., Wool, I.G., Lin, A. and Stoffler, G.: *J. Biol. Chem.*, **251**: 4666~4672, 1976.
- 7) Collatz, E., Ulblich, N., Tsurugi, K., Lightfoot, H.N., Mackinlay, W., Lin, A. and Wool, I.G.: *J. Biol. Chem.*, **252**: 9071~9080, 1977.
- 8) Gressner, A.M. and Wool, I.G.: *J. Biol. Chem.*, **249**: 6917~6925, 1974.
- 9) Thomas, G., Siegmman, M. and Gordon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3952~3956.

1979. 1985.
- 10) Takahashi, Y. and Ogata, K.: J. Biochem. 90: 1549~1552, 1981. 13) Nakanishi, O., Oyanagi, M., Kuwano, Y. Tanaka, T., Nakayama, T., Mitsui, H., Nabeshima, Y. and Ogata, K.: Gene, 35: 289~296, 1985.
- 11) 小谷スミ子: 新潟医学会雑誌, 110: 652~668, 1986.
- 12) Tanaka, T., Kuwano, Y., Ishikawa, K. and Ogata, K.: J. Biol. Chem., 260: 6329~6333, (昭和62年1月30日受付)
-