

原

著

逆相—高速液体クロマトグラフィーを用いた微量アミノ酸  
分析による *Artemia salina* リボソーム小亜粒子  
蛋白質のアミノ酸組成—ラットとの比較

新潟大学医学部第一生化学教室（主任：緒方規矩緒教授）

小 谷 スミ子

Comparison of the amino acid compositions of individual 40S  
ribosomal proteins between *Artemia salina* and rat liver  
by micro amino acid analyses with reverse-phase  
high-performance liquid chromatography

Sumiko ODANI

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

To establish a method for the micro determination of the amino acid compositions of individual proteins of *Artemia salina* 40S ribosomal subunit and to compare the amino acid compositions with those of corresponding rat liver 40S proteins [Kenmochi, Tsurugi and Ogata (1981) *J. Biochem.*, **89**, 1293~1308], following experiments were carried out.

The proteins of a small subunit of *A. salina* ribosomes were separated into twenty seven basic proteins by two-dimensional gel electrophoresis and eluted from the gels by diffusion into 70% formic acid. The eluted proteins were then purified by using size-exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC). Amino acid analyses were performed by the preparation of dimethylaminoazobenzenesulfonyl (DABS) derivatives of amino acids, followed by reverse-phase HPLC. It was found that the amino acid compositions of horse heart cytochrome C and two *A. salina* 40S ribosomal proteins (S6 and S8) determined by the present methods were similar to those determined by the conventional amino acid analyzer. This method allowed to determine amino acids in pmole range.

The amino acid compositions of *A. salina* and rat liver 40S ribosomal proteins were com-

Reprint requests to: Sumiko Odani, Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine, Niigata City, 951, JAPAN

別刷請求先：〒951 新潟市旭町1番町  
新潟大学医学部第一生化学教室 小谷スミ子

paired and the similarity of amino acid compositions of the corresponding proteins of rat liver and *A. salina* are evaluated by the method of Cornish-Bowden [Cornish-Bowden (1980) Anal. Biochem., **105**, 233~238]. Ten pairs of proteins (S2, S3, S4, S6, S7, S8, S15a, S16, S17 and S18) are positive in the "strong" test, six pairs of proteins (S14, S15, S20, S23, S24 and S26) are positive in the "weak" test and seven pairs of proteins (S9, S10, S11, S13, S27, S27a and S28) are not related.

Key words: *Artemia salina*, 40S ribosomal protein, two-dimensional acrylamide gel electrophoresis, high-performance liquid chromatography, dimethylaminoazobenzene-sulfonyl derivative of amino acid  
アルテミアサリーナ, リボソーム小亜粒子蛋白質, 二次元アクリルアミドゲル電気泳動, 高速液体クロマトグラフィー, ダブシルアミノ酸

### 略語表

SDS: ソジウムドデシルサルフェート  
HPLC: 高速液体クロマトグラフィー  
Tris: トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン  
EDTA: エチレンジアミン四酢酸  
2-ME: 2-メルカプトエタノール  
CM-セルロース: カルボキシメチルセルロース  
DNP: ジニトロフェニル  
DABTH: ジメチルアミノアゾベンゼンチオヒダントイン  
DABS: ジメチルアミノアゾベンゼンスルホニル  
ITH: ジフェニルインデノニルチオヒダントイン  
PTH: フェニルチオヒダントイン  
MTH: メチルチオヒダントイン  
DANS: ジメチルアミノナフタレンスルホニル  
OPA: オルトフタルアルデヒド  
NBD: ニトロベンゼンオキサジアゾール  
*A. salina*: *Artemia salina*  
TEMED: N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン

緒方らは、長年ラット肝リボソームの構造と機能の研究を行ってきた。しかしそのラット肝リボソームは大部分ポリゾームとして存在し、小胞体に結合しているものと遊離のものがある。そして蛋白合成因子やアミノアシル tRNA, ペプチジル tRNA が結合しているなど複雑な構造で、活性ある純粋の 80S モノゾームや 60S, 40S 亜粒子を調製することは必ずしも容易でない。これに対し *Artemia salina* (以下 *A. salina* と略す) の乾燥卵はほとんどポリゾームを含まず大半が純粋の遊離型モノゾームの状態になっており、ラットの場合より

簡単に活性ある蛋白合成因子等の夾雑のない純粋のモノゾームを調製できる<sup>1)2)</sup>。そこでそのリボソームの開始、延長因子の活性をみるのによく使われ<sup>3)</sup>、又これらの因子との相互作用を研究するのにも有利と考えられよう。尚この点で *A. salina* 開始因子や延長因子なども最近よく研究されている点も重要であろう<sup>4)7)</sup>。

*A. salina* のリボソームの構造や機能の研究をすすめるためには、まず個々のリボソーム蛋白質を同定し、その命名法を確立するのが必須と考えられる。この際動物のリボソームで最も解析の進んだラット肝のそれと同定できれば最も望ましい。剣持ら<sup>8)</sup>は、一次元目に尿素 (pH 8.6) を二次元目に尿素 (pH 4.6) を用いる二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法と、一次元目に尿素 (pH 8.6) を二次元目に SDS を用いる二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および上述の尿素-尿素ゲルで分離したものを更に SDS ゲルで泳動する三次元電気泳動法を併用し、*A. salina* のリボソーム蛋白質を同定し、二次元ゲル上での位置比較からラット肝のリボソーム蛋白質との一応の対応づけを試みている。全体のパターンはよく類似し、一応の対応づけは出来ているが、重なっているものの他、かなり離れているものもあり、更に他の方法による同定が望まれる。そこでこの対応づけをさらに検討するため個々の蛋白質のアミノ酸組成を分析することにした。この場合個々のリボソーム蛋白質を純粋にすることが必要だが、組成のよく以たりボソーム蛋白質をクロマトグラフィーで調製するためにはラット肝の場合でも大量のリボソームから蛋白質を分離し、二種類以上の大規模なカラムクロマトグラフィーを併用することが必要であった<sup>9)16)</sup>。そこで著者は二次元上のスポットを切り出しそのアミノ酸組成を微量アミノ酸分析法により解明することを試みた。又アミノ酸組成につ

いても従来のアミノ酸自動分析法は、イオン交換クロマトグラフィーにより塩基性アミノ酸と中・酸性アミノ酸に分けて分離し、その後ニンヒドリン発色させ可視部で検出する手段をとっていたため、30~40 μg 必要であり分析時間は4時間を要した。近年、高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略す）が開発され多くの化合物を高速、高感度、高分解能で分析することが可能となってきた。HPLC によるアミノ酸分析法も多数開発されている。その中でプレカラム発色法によるアミノ酸分析法が蛋白質のアミノ酸配列を研究する面から報告されている。可視部で検出する方法として DNP-アミノ酸<sup>17)</sup>、DABTH-アミノ酸<sup>18)</sup>、DABS-アミノ酸<sup>19) 20)</sup> および ITH-アミノ酸<sup>21)</sup> が、紫外部で検出する方法として PTH-アミノ酸<sup>22)-29)</sup> および MTH-アミノ酸<sup>30)</sup> が、また蛍光分析法として DANS-アミノ酸<sup>1)-37)</sup>、OPA-アミノ酸<sup>38)-40)</sup> および NBD-アミノ酸<sup>41)-43)</sup> があげられる。これらの発色法によるアミノ酸分析は、従来のニンヒドリン発色法に較べてはるかに感度が高く分離時間も短くてすむが、実際のアミノ酸組成をみた応用例はまだわずかしかない。著者はアミノ酸のダブシル誘導体（DABS-アミノ酸）を逆相-HPLC で分析する Chang らの方法<sup>19) 20)</sup> を一部改変し、*A. salina* リボソーム小亜粒子蛋白質のアミノ酸分析に応用した。

アミノ酸の DABS 化反応式を図1に示す。4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-スルホニルクロリド（DABS-Cl）によるアミノ基のアシル化で生ずる DABS-アミノ酸は、逆相系のカラムを用いて分離でき、高感度分析（2~5 pmol）が可能である。尚 DABS-Cl は α-アミノの基と反応するほか、ε-アミノ基、イミダゾール基、フェノール性水酸基、チオール基をスルホニル化する。そこで個々のアミノ酸について後述するように実験的にダブシル化を定量する必要がある。

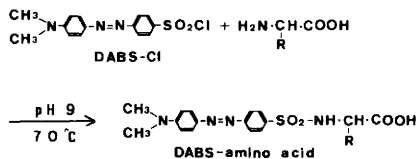


図1 アミノ酸の DABS 化

実験方法

1) 実験材料および試薬

*A. salina* 乾燥卵は San Francisco Bay Brand 社より購入した。馬筋筋チクローム C は Sigma 社か

ら、DABS-Cl は同仁化学研究所から購入した。DABS-Cl は次のように精製して用いた。DABS-Cl 1g を熱アセトン 100ml に溶かし、不溶物をガラスフィルターで濾別、冷却後 -20°C に一夜放置して析出した結晶を集めた。他の試薬はすべて特級品を用いた。

2) リボソーム小亜粒子の調製

*A. salina* リボソーム小亜粒子の調製は Zasloff と Ochoa の方法<sup>2)</sup> を一部改変した上代らの方法<sup>3)</sup> により行った。操作はすべて 0~4°C の冷凍室中で行った。すなわち *A. salina* の乾燥卵に冷 1% NaClO 100ml を加え 5 分間攪拌し卵の殻を柔らかくした後、冷水 1l を加えて NaClO を希釈した。浮いてきた塵とこわれた卵をアスピレーターで吸引除去して卵を洗浄した。この洗浄操作を12回繰り返した後、最後に緩衝液 A (35mM Tris-HCl, pH 7.6, 70mM KCl, 9mM MgCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 10mM 2-ME, 0.25M 蔗糖) 200ml

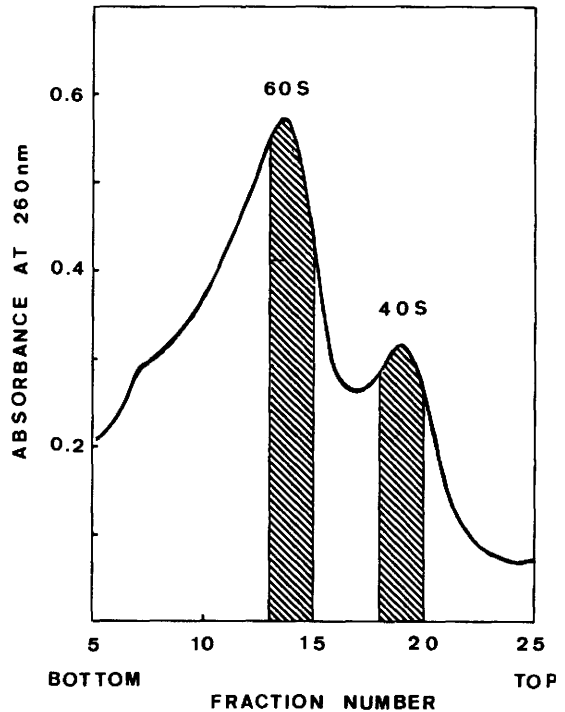


図2 *Artemia salina* リボソーム大小亜粒子の蔗糖密度勾配遠心プロフィール

160A<sub>260</sub> 単位に相当する 1.5ml の粗リボソームを 36ml の 15~30% の蔗糖密度勾配に重層し、SW27 ローターで、24,000r.p.m., 4°C で 13~14 時間遠心した後、ISCO フラクシオネーターで A<sub>260nm</sub> の紫外線吸収のパターンを記録した（斜線はブルーし用いた亜粒子を示す。）。

を加え洗浄した。ついで乳鉢で卵を磨砕し、4層のガーゼを通して濾過し殻を取り除いた。濾液を12,000 r.p.m. (15,000×g), 20分間遠心し(久保田遠心分離機 KH-180形), ミトコンドリア上清を集めるが, その際再び4層のガーゼを通して表面に浮いている紅色の卵黄を除去した。次にグリコーゲン顆粒を除くため濾液を27,000 r.p.m. (105,000×g), 30分間遠心し(日立分離用超遠心機 30P形), 集めた上澄みをさらに50,000 r.p.m. (250,000×g), 90分間遠心して(日立分離用超遠心機 65P-7形), 得られた沈殿をリボソームとした。沈殿の表面を緩衝液Aで軽く洗った後, 亜粒子の分離を行った。

リボソームを160A<sub>260</sub>単位の濃度となるよう緩衝液B(20mM Tris-HCl, pH 7.6, 300mM KCl, 3mM MgCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) 1.5mlに懸濁し, 緩衝液Bを含む15~30%の蔗糖溶液の直線密度勾配によりBeckmannのSW 27水平ローターを使用して, 4°C, 24,000r.p.m.で13~14時間の遠心を行って分離した。波長260nmにおけるその吸収パターンを図2に示す。40S画分を集め蔗糖無添加の緩衝液Aで2倍に希釈し, 30,000r.p.m. (105,000×g), 14時間遠心し得られた沈査を小亜粒子とした。なお得られた小亜粒子は二次元ゲル電気泳動法で大亜粒子の夾雑が認められなかった。

### 3. リボソーム蛋白質の抽出

A. *salina* 小亜粒子からのリボソーム蛋白質の抽出は酢酸法<sup>47) 48)</sup>によった。0.1M MgCl<sub>2</sub>でホモジナイズした小亜粒子に2倍容の水酢酸を徐々に加え一昼夜抽出した。抽出液は27,000r.p.m. (105,000×g), 30分間の遠心でRNA成分を除き, 10倍容のアセトンを加え-20°Cで一晩静置し, 3,000r.p.m. (1,500×g), 30分間の遠心操作でリボソーム蛋白質を集め, 6M尿素に溶かし-20°Cで貯蔵した。

### 4. 二次元ゲル電気泳動法によるリボソーム塩基性蛋白質の分離及びゲルからの抽出

リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質はKaltshmidtとWittmannによる方法<sup>44) 45)</sup>を一部改変したLastickとMcConkeyによる尿素(pH 8.6)一尿素(pH 4.6)二次元アクリルアミド電気泳動法<sup>46)</sup>により分離した。一次元目は6.5mm×180mmのカラムを使用し, カラム1本あたり900μgのリボソーム小亜粒子蛋白質をのせpH 8.6の8%ゲル中(6M尿素, 0.20M Tris, 0.01M EDTA, 0.26M ホウ酸, 8% (w/v) アクリルアミド, 0.13% (w/v) ビスアクリルアミド, 0.2% (v/v) TEMED, 1.9mM 過硫酸アンモニウム), 100Vで20時間の泳動を行った。二次元目は4mm×200mm×200mm

の平板を使用し, pH 4.6の15%ゲル中(6M尿素, 0.44M酢酸, 0.025M水酸化カリウム, 15% (w/v) アクリルアミド, 0.47% (w/v) ビスアクリルアミド, 0.50% (v/v) TEMED, 0.010M 過硫酸アンモニウム), 100Vで24時間の泳動を行った。二次元泳動後のゲルは0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250溶液中(酢酸-メタノール-水, 1:3:6, v/v/v) 15~20分間染色後, 5%酢酸溶液(酢酸-メタノール-水, 5:15:80, v/v/v)で2~3時間脱色した。その後ゲルを5回水洗し, 外部からのアミノ酸の混入を出来るだけ除去した。ゲル中の24種類の重なっていない蛋白質スポットを切り取り, カミソリで2~3mm四角に細切れにし, 70%蟻酸をゲル破片1cm<sup>3</sup>当たり1ml添加し, 室温で一晩抽出した<sup>49)</sup>。抽出を二度繰り返す, 真空濃縮乾燥後, 極少量の6M尿素(100μl以下)に溶かした。次いでLichrosorb DIOLカラム(関東化学社製, 4mm×250mm)を用いる分子篩-HPLCでリボソーム蛋白質を精製した。溶離液は70%蟻酸を用い, 流速は0.5ml/minであった。蛋白質はあらかじめ測定していたカラム容量のあたりに溶出されるが, 電気泳動用緩衝液中の溶質, 尿素, クーマシー青など小分子量のものは遅れて溶出する。この場合クーマシー青の色がよい標識となる。蛋白質を含む溶出液は濃縮乾燥し, その後の分析に用いた。

### 5. DABS-アミノ酸の調製

標準DABS-アミノ酸の調製はChangの方法<sup>19)</sup>を一部改変して行った。通常アミノ酸100nmolを0.1M NaHCO<sub>3</sub>緩衝液, pH 9.0, 100μlに溶かした。アスパラギン酸やグルタミン酸を溶かした時はpHが下がるので0.1M NaOHでpH 9.0に調製した。DABS-Clのアセトン溶液(2nmol/μl) 200μlを加え, 70°Cで10分間反応させた。ついで反応液を減圧乾燥し, 70%エタノール1mlに溶かして(DABS-アミノ酸1nmol/10μl) HPLC用の標準液とした。

リジン, チロシン, ヒスチジンのDABS化は上記条件のうちアミノ酸を50nmolにしDABS-Cl溶液(4nmol/μl)を200μl用い, 70%エタノールを500μlに減らすほかは同じ条件で行った。

### 6. DABS-Cl法による蛋白質のアミノ酸分析<sup>19)</sup>

ゲルより抽出した微量のリボソーム蛋白質のアミノ酸組成を分析する際一番気をつけることは試料への外部からのアミノ酸の夾雑である。これを防ぐため50%硝酸で煮沸消毒したガラス管, 再蒸留した6M塩酸, 泳動用の試薬および滅菌した手袋を用いた。尚蛋白質の加水分解及びアミノ酸のDABS誘導体の合成は同一ガラス管を

用いた。

*A. salina* リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質 0.1~1.0 $\mu$ g を小型試験管 (4mm $\times$ 100mm) にとり、凍結乾燥後 6M 塩酸 20 $\mu$ l を加え、真空下で封管した後、110 $^{\circ}$ C で18時間加熱し加水分解した。その後低速で遠心し、試験管底から 5cm のところで開管し、減圧乾燥により完全に塩酸を除去した。次いで 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液, pH9.0, 10 $\mu$ l を加えてアミノ酸を溶解し、DABS-Cl のアセトン溶液 (4nmol/ $\mu$ l) 20 $\mu$ l を加えて、70 $^{\circ}$ C で10~15分間、時々振り混ぜながら加温した。反応後室温にもどし、70%エタノールで 100~500 $\mu$ l に希釈し、そのうち 10 $\mu$ l を HPLC 分析に供した。

Chang<sup>19)</sup> は次のように述べている。アミノ酸の大部分は過剰の DABS-Cl が存在すると pH9.0 ではほぼ定量的に反応するが、スレオニン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸は他のアミノ酸に比べ反応しにくい。そのため DABS-Cl 法によるアミノ酸の定量分析には全アミノ酸と試薬量が 1/4~1/80 の範囲に入るよう DABS 化条件を選ぶ必要がある。この条件では DABS-Cl の 3~10% が DABS-ONa に加水分解されるため、多量の試薬を使用すると DABS-ONa が増加し、HPLC 分析に好ましくない。そこで大過剰の試薬の使用を避ける必要がある。蛋白質を 0.1~1.0 $\mu$ g 用いると加水分解後のアミノ酸は 1~10nmol となるので上記の DABS-Cl の濃度は適当である。

この場合、アミノ酸標準液 (16種のアミノ酸を 0.5nmol ずつ含む) を蛋白質を加水分解するのと同条件 (110 $^{\circ}$ C で18時間加熱) で処理した。これは、アミノ酸のうち特にアスパラギン酸、セリン、スレオニン、メチオニン、チロシン、リジンとヒスチジンは加水分解操作により一部分解されるためその補正を行う必要があるためである。次いで蛋白質と同条件で DABS 化し、各アミノ酸を定量するための基準とした。なお DABS-アミノ酸標準液は暗所 -20 $^{\circ}$ C で保存すると少なくとも一年間は安定であった。用いた HPLC 装置は日立高速液体クロマトグラフ 638-30形であり、検出器はオーヨー分光 UVILOG-3 III 形であった。カラムは Cosmoil 5C<sub>18</sub> (半井化学社製、4.6mm $\times$ 150mm) を用いた。展開は溶媒 A [2% (v/v) ジメチルホルムアミドを含む 17mM リン酸緩衝液, pH6.5] に溶媒 B [4% (v/v) ジメチルホルムアミドを含むアセトニトリル] を15%添加したものをスターティング溶液とし、これに試料注入と同時に溶媒 B を順次添加し25分後に溶媒 B が45%、35分後に70%になるようプログラムを作成することにより

行った。流速は 1.0ml/min., カラム温度は 25 $^{\circ}$ C に設定した。DABS アミノ酸を 10pmol 相当量含む試料を 2~10 $\mu$ l 注入し、波長 420nm, Auf. 0.01 で検出した。

## 実験結果

### 1. *Artemia salina* リボソーム小亜粒子蛋白質の種類

*A. salina* リボソーム小亜粒子の主成分である塩基性蛋白質の分離は、Kaltschmidt と Wittman<sup>45)</sup> によって開発された二次元ゲル電気泳動法により行った。各蛋白質のスポットは明確に分離しており27種類の小亜粒子蛋白質を検出した。これら塩基性蛋白質の命名は剣持ら<sup>8)</sup> によった。図3に *A. salina* とラット肝のリボソーム小亜粒子塩基性蛋白質の二次元ゲル電気泳動パターンを示した。なおラット肝リボソームの塩基性蛋白質については、1979年に統一的な命名法<sup>50)</sup> が発表されているのでそれに従った。図では *A. salina* のものを A, ラット肝のものを R をつけて区別し、小亜粒子蛋白質を示す S は省略した。二次元ゲル上 S8 (A8 と R8) と S9 (A9 と R9) のスポットは両種間で一致している。S2, S3, S4, S6, S7, S11, S13, S15, S16, S25,

表1 透析法と分子篩-HPLCによるチトクロームCのアミノ酸組成

Amino acid	Expected value <sup>53)</sup>	Dialysis <sup>a</sup>	SE-HPLC <sup>b</sup>
Asp	8.0	8.8	7.7
Glu	12.0	13.5	12.1
Ser	0.0	4.6	0.0
Thr	10.0	9.0	9.5
Gly	12.0	14.5	11.9
Ala	6.0	6.8	6.4
Arg	2.0	1.5	1.6
Pro	4.0	3.6	4.0
Val	3.0	2.7	3.3
Met	2.0	1.5	2.1
Ile	6.0	5.1	5.8
Leu	6.0	6.3	6.2
Phe	4.0	3.4	3.7
Lys	19.0	17.9	19.2
His	3.0	2.7	3.2
Tyr	4.0	2.0	3.6

a: 3回の平均、b: 2回の平均 (mol%)

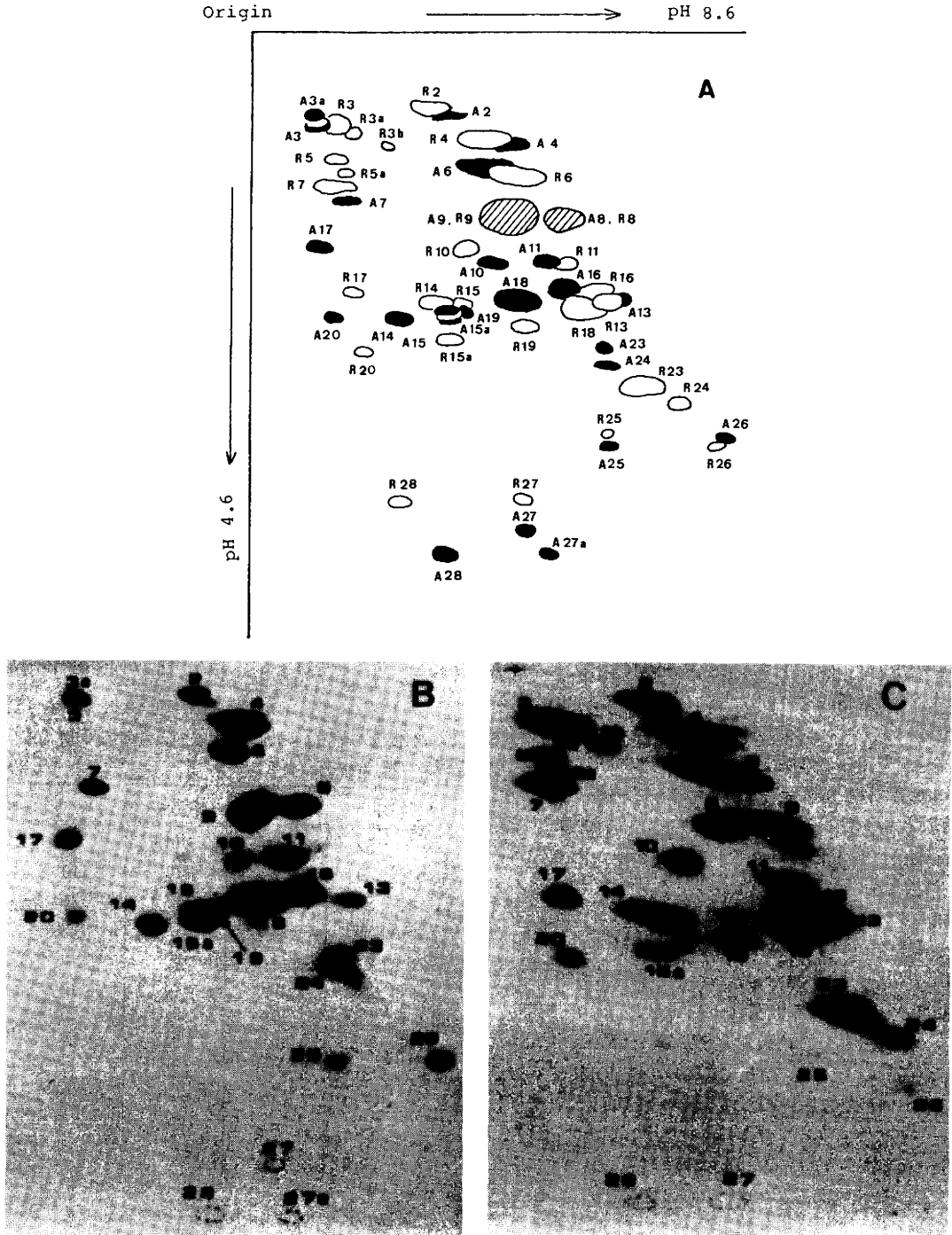


図 3 *Artemia salina* およびラット肝リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質の  
 二次元ゲル電気泳動パターン

A: *A. salina* とラット肝リボソーム小亜粒子蛋白質の二次元ゲル電気泳動の模式。黒いスポット: *A. salina* (頭文字 A), 白いスポット: ラット肝 (頭文字 R), 斜線のスポット: *A. salina* とラット肝で重複するスポット, B: *A. salina* のリボソーム小亜粒子蛋白質, C: ラット肝のリボソーム小亜粒子蛋白質

S26 の11種類は兩種間で部分的にかさなっているかきわめて近い位置にある。しかし S3a, S10, S14, S15a, S17, S18, S19, S20, S23, S24, S27, S28 はかなり離れている。又ラット肝に認められた S3b, S5, S5a のスポットに相当する蛋白質は *A. salina* に認められなかった。

## 2. 電気泳動ゲルから抽出したリボソーム蛋白質への外部よりアミノ酸の混入とその除去法

尿素-尿素を用いる二次元電気泳動法により分けたりボソーム蛋白質をゲルから抽出して精製するに際し、あらかじめアミノ酸組成既知で塩基性蛋白質であるチトクローム C について検討した。まずチトクローム C 50 $\mu$ g を尿素-尿素二次元ゲル電気泳動し、染色した蛋白質のスポットを細かく切って 0.1% SDS を含む 0.1M リン酸緩衝液, pH7.0 で抽出した後, SDS 濃度とリン酸濃度をそれぞれ 0.05%-0.05M, 0.01%-0.01M, 0.005%-0.001M と順次下げながら透析して、得られたチトクローム C のアミノ酸組成を従来のアミノ酸自動分析計 (日本電子 JLC-6A 形) により求めたところ、表 1 に示すように本来含有しないセリンをかかなりの量含む他グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸もかなり多くふくまれていた。Goerl ら<sup>51)</sup> はラット肝リボソーム蛋白質のアミノ酸組成を分析した際、上述の方法で個々の蛋白質を 1mg ずつ精製したことを報告した。しかし微量の蛋白質を用いる本法では上述のように抽出、透析による精製法では、操作過程で混入してくる外部アミノ酸が分析に影響を及ぼすことが明かとなった。なお Brown と Howard<sup>52)</sup> はポリアクリルアミドゲルから 0.02% SDS 溶液で抽出し水で透析したチトクローム C のアミノ酸組成を分析し、無添加の場合のアスパラギン酸の対照値はチトクローム C 200 $\mu$ g 用いた時の値は 7.8% であり 50 $\mu$ g 用いた時は 26% もあったことを報告している。

そこで次田<sup>49)</sup>による塩基性蛋白質をゲルから抽出した後ゲル濾過を用いて精製する方法を一部改変し、70% 蟻酸で抽出し、Lichrosorb DIOL カラムを用いる分子篩-HPLC で分取精製した。図 4-A に示したチトクローム C のピーク a を分取し再クロマトグラフィーを行ったのが図 4-B である。この単一ピークを示す蛋白質のアミノ酸組成はチトクローム C の文献値<sup>53)</sup> とセリン、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸でもよく一致した (表 1)。これらの結果からゲルより微量蛋白質を抽出、精製するには 70% 蟻酸抽出と分子篩-HPLC との併用が外部アミノ酸来雑を避けるのに良い方法であることがわかり、この方法をリボソーム蛋白質に適用した。

図 5 に *A. salina* S6 蛋白質の HPLC による分離例を示す。なお単離した蛋白質の純度は尿素-尿素と SDS-アクリルアミドゲルを併用する三次元ゲル電気泳動法により検討し単一蛋白質であることを確認している<sup>8)</sup>。

## 3. 単離蛋白質の収量

*A. salina* の乾燥卵 30g からリボソーム小亜粒子蛋白質は 13mg 得られた。調製用二次元ゲル一枚につきリボソーム小亜粒子蛋白質 900 $\mu$ g を泳動し全部で 10 mg 用いた。ゲルより抽出し HPLC で精製して得られた個々の塩基性蛋白質の収量は多いもので S6 の 199 $\mu$ g、少ないもので S27, S28 の 3 $\mu$ g であった (表 2)。収量の測定は HPLC で分取した蛋白質を再クロマトし得られたピーク面積をチトクローム C を用いた場合のピーク面積から換算することによった。

## 4. DABS-アミノ酸の逆相-HPLC による分離

蛋白質を加水分解するのと同一条件で処理して得られた DABS-アミノ酸標準液 (各 DABS-アミノ酸を 5 pmol 含む) の逆相系カラムによる分離例を図 6 に示す。Chang ら<sup>19)</sup> は HPLC で DABS-アミノ酸を分離するため Zorbax ODS カラム (Dupont 社製) を用い、展開液を 50mM 酢酸緩衝液, pH4.13-アセトニトリル系にして良好な分離を得ている。またカラムを Zorbax

表 2 *Artemia salina* リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質の収量

Protein	Yield	Protein	Yield
S2	20	S15a	4
S3	5	S16	110
S4	25	S17	78
S6	175	S18	199
S7	143	S20	43
S8	109	S23	18
S9	119	S24	20
S10	121	S25	32
S11	140	S26	15
S13	17	S27	3
S14	14	S27a	9
S15	23	S28	3

( $\mu$ g)

*A. salina* リボソーム小亜粒子蛋白質 10mg を二次元ゲル電気泳動で分け、70% 蟻酸抽出後、SE-HPLC (Lichrosorb DIOL カラム) で精製した。蛋白質の収量はチトクローム C の検量線 (波長 280nm) より定量した。

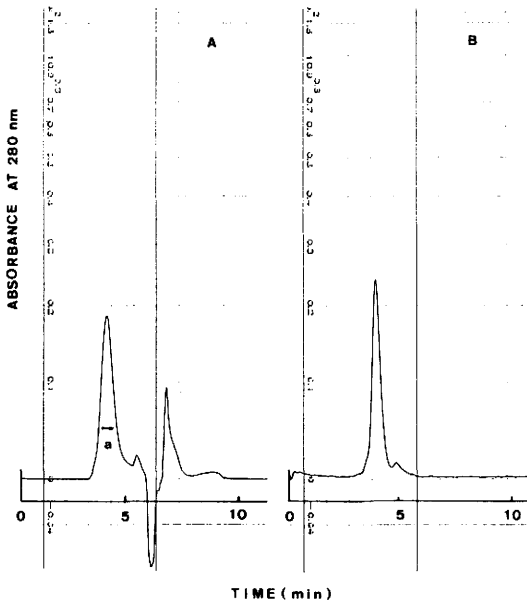


図4 チトクローム C の分子篩-HPLC による分離

A: 二次元ゲルより抽出したチトクローム C を70% 蟻酸で平衡化した Lichrosorb DIOL カラムに添加し流出させた (流速 0.5ml/min.). B: A のピーク a を分取し再クロマトグラフィーした.

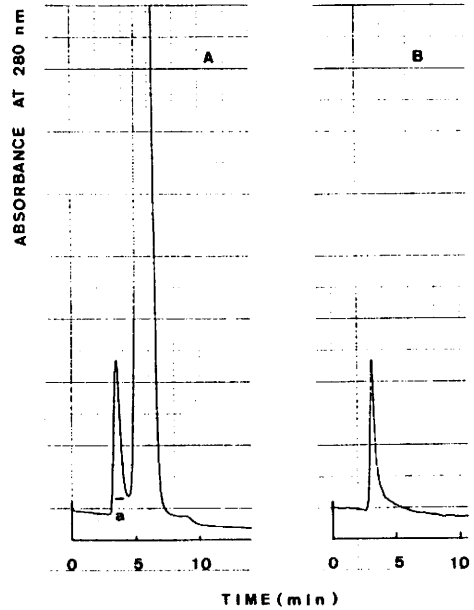


図5 *Artemia salina* リボソーム小垂粒子 S6 蛋白質の分子篩-HPLC による分離

A: 二次元ゲルより抽出した *A. salina* S6 蛋白質を 図4と同一条件で流出させた。(流速 1.0ml/min.) B: A のピーク a を分取し再クロマトグラフィーした.

ODS よりシラノール含量の少ない Lichrosorb RP-18 (Merk 社製) に変え, 展開液を 4% (v/v) ジメチルホルムアミドを含む 12mM リン酸緩衝液, pH 6.5-4% (v/v) ジメチルホルムアミドを含むアセトニトリル系とし濃度グラジエントに溶出してさらに良好な分離ができたことを報告している. 本実験で, はじめ Lichrosorb RP-18 (関東化学社製) を用いたが各 DABS-アミノ酸の分離が良好でなかったため Lichrosorb RP-18 と同じ炭素数の Cosmosil 5C<sub>18</sub> (半井化学社製) に変え, 展開液をリン酸緩衝液-アセトニトリル系で有機溶媒の濃度グラジエントで分けたところすべての DABS-アミノ酸は完全に分離し, ピークはシャープであり, 全 DABS-アミノ酸の分析時間は40分であった (図6).

DABS-アミノ酸を逆相-HPLC で分離する際, 分離条件として次のことがあげられる. (1) Chang ら<sup>19)</sup> はカラム温度を高くした方がよりシャープなピークが得られカラム圧は低くなると報告し, 実際 50°C で分析している. しかし著者は 25°C でも 50°C でも同様なピークが得られたので, 本実験では 25°C で分析した. 尚カ

ラム圧は 80~100kg/cm<sup>2</sup> であった. (2) 展開液のアセトニトリル濃度が高くなるとリン酸塩が沈殿しカラムを劣化させるため, リン酸塩濃度はあまり高くできなかった. (3) ジメチルホルムアミドは必ずしも添加しなくてよいが, 添加した方が分離は良好であった. (4) DABS-アルギニンはリン酸塩濃度で著しく溶出時間が変動した. 5mM では24.0分 (バリンとメチオニンの中間) に, 10mM では23.2分 (バリンと重なる) に, 15mM では22.5分 (プロリンと重なる) に, 17mM では 22.2分 (アラニンとプロリンの中間) に, 20mM では21.6分 (アラニンと重なる) に, そして 34mM では21.0分 (スレオニンとグリシンの中間) に溶出されリン酸塩の濃度が高い程溶出時間が早まった. この実験では 17mM で行った. (5) 酸性 DABS-アミノ酸はリン酸緩衝液の pH に依存して溶出時間が変わった. 例えば pH6.5 から pH6.3 に変わると DABS-アスパラギン酸の溶出時間は25秒ほど遅れた. (6) 新しいカラムを使用する時は前述の変動を考慮して, 全 DABS-アミノ酸が重ならない条件を設定した.



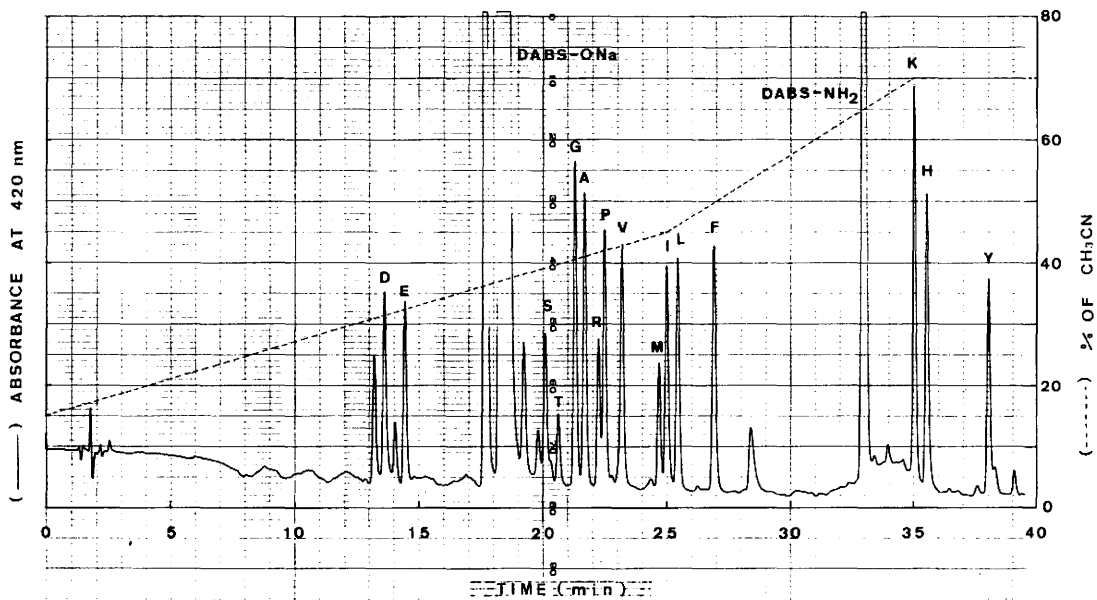


図6 標準 DABS-アミノ酸の逆相-HPLC による分離

カラム: Cosmosil 5C<sub>18</sub>, 展開液: 2%ジメチルホルムアミドを含む 17mM リン酸緩衝液, pH 6.5-4%ジメチルホルムアミドを含むアセトニトリル. アセトニトリルの濃度勾配は点線で示した. 流速: 1ml/min., カラム温度: 25°C, チャート速度: 60cm/h., Auf.: 0.01, 試料量: 各 DABS-アミノ酸 5pmol, 略号: D. DABS-Asp; E. DABS-Glu; S. DABS-Ser; T. DABS-Thr; G. DABS-Gly; A. DABS-Ala; R. DABS-Arg; P. DABS-Pro; V. DABS-Val; M. DABS-Met; I. DABS-Ile; L. DABS-Leu; F. DABS-Phe; K. DABS-Lys; H. DABS-His; Y. DABS-Tyr.

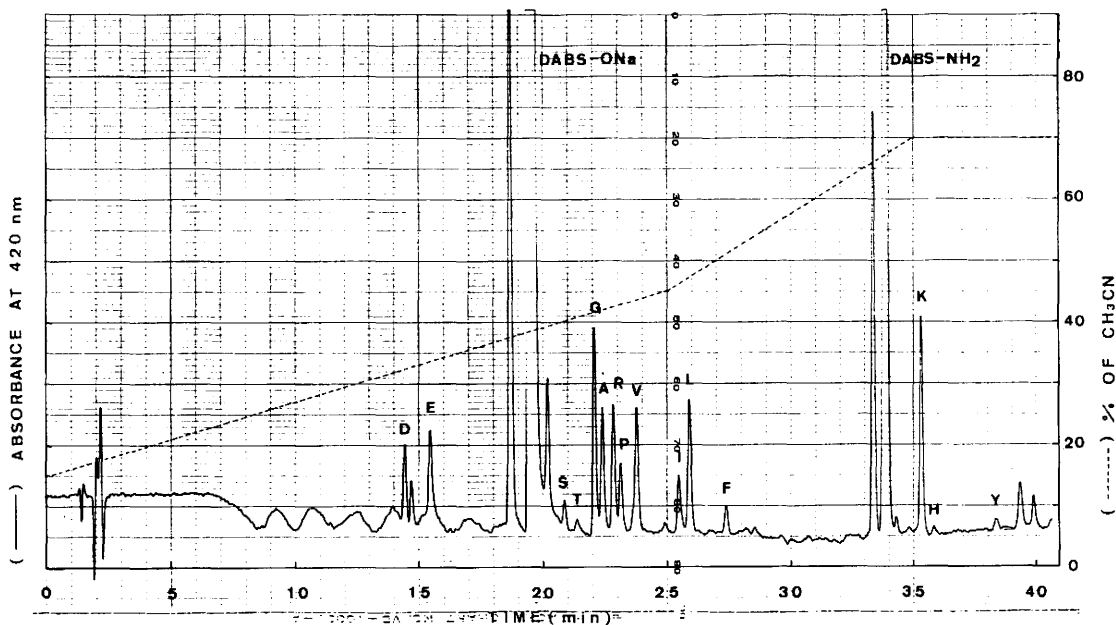


図7 *Artemia salina* リボソーム小亜粒子 S6 蛋白質の逆相-HPLC による分離  
HPLC の条件は図6と同一. 略号は図6を参照すること.

### 5. *Artemia salina* リボソーム小亜粒子蛋白質のアミノ酸組成

リボソーム小亜粒子蛋白質のアミノ酸組成を DABS-Cl 法で分析するに先立ち, DABS-アミノ酸による分析値が従来のアミノ酸自動分析計による値と一致するかどうかを確かめた。即ちアミノ酸組成既知のチトクローム C<sup>53)</sup>と, 未知の *A. salina* リボソーム小亜粒子の S6 および S8 蛋白質について検討した。DABS-アミノ酸の定量は, 既知濃度の DABS-アミノ酸標準液 (図 6) を対照にしてピークの高さまたはピーク面積から試料中の DABS アミノ酸の量を求めることが出来る。ピークの高さから定量する方法は簡単に迅速に計算できるがシャープなピークが得られなければならない。ここで用いた分離条件では再現性よくシャープなピークが得られたためピークの高さから計算した。なおチトクローム C の 4 回の分析を通し

表 3 DABS-Cl法とアミノ酸自動分析計によるチトクロームCと *Artemia salina* S6, S8 蛋白質のアミノ酸組成

Amino acid	Cytochrome C		<i>A. salina</i> S6		<i>A. salina</i> S8	
	DABS-Cl method <sup>a</sup>	Standard method <sup>b</sup>	DABS-Cl method <sup>a</sup>	Standard method <sup>b</sup>	DABS-Cl method <sup>a</sup>	Standard method <sup>b</sup>
Asp	7.2	7.7	6.5	7.1	7.6	8.7
Glu	12.7	12.1	10.1	9.7	11.1	10.6
Ser	0.0	0.0	6.0	4.4	6.9	5.6
Thr	9.6	9.5	6.6	7.5	6.0	5.1
Gly	12.9	11.9	6.9	8.1	9.1	8.7
Ala	5.5	6.4	5.2	8.1	7.8	8.4
Arg	1.8	1.6	11.5	11.7	9.5	9.2
Pro	4.4	4.0	4.8	4.7	3.0	2.8
Val	3.5	3.3	7.6	7.5	6.0	6.5
Met	2.0	2.1	1.1	1.8	0.0	0.0
Ile	6.2	5.8	3.7	3.8	5.4	5.1
Leu	6.8	6.2	8.9	8.9	9.6	8.7
Phe	4.1	3.7	2.2	1.6	2.2	2.7
Lys	18.9	19.2	9.5	9.7	11.2	11.7
His	2.8	3.2	1.8	2.2	3.2	3.4
Tyr	1.8	3.6	2.0	3.3	1.3	2.5

(mol %)

a: DABS-Cl法による分析は Cosmasil 5C<sub>18</sub> カラムで図 6 に記した条件でおこなった。蛋白質量は 1 μg であった。b: アミノ酸自動分析計は日本電子 JLC-6AS を用い蛋白質量は 3-40 μg であった。

た定量値の誤差は, 含量の少ないアルギニン, メチオニン, チロシンはやや大きい, それらのアミノ酸以外では 10% 以内で理論値と合致した。図 7 に *A. salina* リボソーム小亜粒子 S6 蛋白質のアミノ酸組成を逆相-HPLC で分析したクロマトグラムを示す。両方法による分析値を表 3 に示すが, 3 種の蛋白質ともチロシンを除いてきわめて近く, DABS-Cl 法による微量アミノ酸分析法は信頼できる方法と言えよう。

表 4 に二次元ゲルから抽出し精製した *A. salina* リボソーム小亜粒子を構成する塩基性蛋白質のアミノ酸組成を DABS-Cl 法により分析した結果を示した。個々の蛋白質の組成を後述の Cornish Bowden<sup>54)</sup> による指数値から判断し比較すると (S3 と S7), (S6 と S8), (S7 と S17), (S7 と S15), (S8 と S9), (S16 と S18), (S23 と S24) については弱い相似性が認められたが, 他の大部分の蛋白質はお互いに相似性は認められなかった。

### 6. *Artemia salina* リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質のアミノ酸組成とラットとの比較

得られた *A. salina* リボソーム小亜粒子の塩基性蛋白質のアミノ酸組成をラット肝の組成と比較したのが表 4 である。ラット肝のアミノ酸組成値は Collatz<sup>12)</sup> <sup>15)</sup> が従来のアミノ酸自動分析計により得た値を用いた。

両蛋白質の相似性を検討するため Cornish-Bowden<sup>54)</sup> による指数<sup>54)</sup>を用いた。すなわち 2 種の蛋白質を A (*A. salina*), B (ラット肝) とし, それぞれの残基数を N<sub>A</sub>, N<sub>B</sub> とする。個々のアミノ酸残基数を N<sub>iA</sub>, N<sub>iB</sub> (i=1~16) とするとアミノ酸組成値 X<sub>iA</sub>, X<sub>iB</sub> はそれぞれ N<sub>iA</sub>/N<sub>A</sub>, N<sub>iB</sub>/N<sub>B</sub> で表せる。これらの記号を使って "difference index" DI<sup>55)</sup> "composition difference" D<sup>56)</sup> および "Marchalonis と Weltman index" SΔQ<sup>57)</sup> を表すと次の式となる。DI=1/2Σ100|X<sub>iA</sub>-X<sub>iB</sub>|, D=(Σ(X<sub>iA</sub>-X<sub>iB</sub>))<sup>1/2</sup>, SΔQ=10<sup>4</sup>Σ(X<sub>iA</sub>-X<sub>iB</sub>)<sup>2</sup>

これらの指数はアミノ酸残基数でなくモル分率で計算するので, 大きさのかなり異なった蛋白質についても比較できる特徴がある。これらの計算例を S6 蛋白質について示したのが表 5 である。表 5 の b より DI=7.70, c より SΔQ=26.8, D=0.0518 と計算できる。S6 蛋白質の N<sub>A</sub> は 269, N<sub>B</sub> は 287 である (表 6)。残基数の多い値を N=287 とし Cornish-Bowden の作成した表<sup>54)</sup> から指数の臨界値を求めると強い相似性の認められる値として DI=8.52, SΔQ=29.5, D=0.0542 が与えられる。計算により求めた指数はすべてこの臨界値より小さい値となり両蛋白質は強い相似性があると判断で

表 4-1 *Artemia salina* およびラット肝リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質のアミノ酸組成

Amino acid	S 2	S 3	S 4	S 6	S 7	S 8
Asp	5.3 ( 6.1)	6.2 ( 4.7)	10.7 (10.1)	6.5 ( 7.0)	7.1 ( 7.8)	7.6 ( 8.0)
Glu	8.1 ( 7.3)	12.1 (11.3)	6.7 ( 5.6)	10.1 (11.4)	11.8 (12.6)	11.1 (10.7)
Ser	5.0 ( 4.9)	5.0 ( 3.1)	3.0 ( 2.3)	6.0 ( 5.0)	3.0 ( 4.9)	6.9 ( 5.7)
Thr	6.2 ( 6.5)	4.3 ( 4.6)	6.5 ( 6.7)	6.6 ( 4.4)	5.1 ( 4.0)	6.0 ( 4.2)
Gly	14.2 (16.4)	8.7 (10.4)	7.7 ( 9.7)	6.9 ( 8.6)	6.6 ( 7.1)	9.1 (10.9)
Ala	8.9 ( 9.2)	7.3 ( 7.5)	6.3 ( 5.7)	9.2 ( 7.0)	8.8 ( 6.2)	7.8 ( 6.1)
Arg	6.5 ( 4.4)	7.4 ( 7.1)	8.0 ( 7.9)	11.9 (12.3)	8.3 ( 6.7)	9.5 (10.5)
Pro	5.9 ( 5.9)	5.1 ( 6.9)	5.9 ( 5.3)	4.8 ( 3.9)	7.2 ( 4.4)	3.0 ( 3.3)
Val	6.2 ( 7.6)	10.5 (12.0)	6.2 ( 7.5)	7.6 ( 8.1)	9.8 ( 9.4)	6.0 ( 5.4)
Met	0.0 ( 1.6)	0.0 ( 2.2)	0.0 ( 1.8)	1.1 ( 1.3)	0.0 ( 1.2)	0.0 ( 0.3)
Ile	6.1 ( 5.9)	5.7 ( 6.3)	8.5 ( 9.5)	3.7 ( 4.1)	8.4 ( 6.8)	5.4 ( 5.3)
Leu	7.2 ( 7.7)	9.4 ( 8.8)	7.8 ( 7.8)	8.9 ( 8.7)	11.8 ( 9.2)	9.6 ( 7.8)
Phe	3.5 ( 4.2)	3.2 ( 3.1)	4.0 ( 4.8)	2.2 ( 2.0)	5.2 ( 5.4)	2.3 ( 1.9)
Lys	9.6 ( 8.3)	9.8 ( 8.0)	12.3 (10.1)	9.5 (12.6)	12.5 (11.5)	11.2 (13.3)
His	3.9 ( 1.6)	2.9 ( 1.1)	5.0 ( 2.6)	1.8 ( 1.5)	2.6 ( 2.0)	3.2 ( 2.3)
Tyr	3.7 ( 2.2)	2.5 ( 2.8)	3.5 ( 2.3)	2.0 ( 1.7)	0.4 ( 0.9)	1.3 ( 4.2)

Amino acid	S 9	S10	S11	S13	S14	S15
Asp	6.5 ( 7.3)	4.7 ( 7.1)	4.6 ( 7.5)	6.0 ( 7.4)	7.0 ( 7.4)	6.0 ( 5.5)
Glu	7.2 (10.5)	8.0 (11.4)	9.6 ( 9.7)	7.5 ( 7.7)	9.4 (10.0)	6.7 (11.1)
Ser	5.4 ( 3.7)	10.4 ( 4.3)	4.5 ( 3.4)	4.2 ( 7.4)	3.8 ( 5.1)	4.6 ( 4.3)
Thr	5.2 ( 6.5)	7.5 ( 5.0)	2.7 ( 7.3)	9.6 ( 3.3)	7.0 ( 5.4)	3.8 ( 3.9)
Gly	6.5 ( 8.8)	16.3 ( 9.6)	8.5 ( 7.7)	6.3 (10.3)	6.5 (11.7)	10.2 ( 7.4)
Ala	8.2 ( 4.1)	7.9 ( 8.1)	8.9 ( 3.6)	6.9 ( 8.3)	5.5 (10.1)	6.1 ( 4.4)
Arg	11.0 ( 8.8)	7.9 (10.1)	14.7 ( 9.3)	11.6 ( 7.8)	15.0 (10.7)	10.4 (10.6)
Pro	5.5 ( 3.8)	4.9 ( 8.6)	5.4 ( 4.0)	3.6 ( 4.7)	3.5 ( 5.7)	4.5 ( 5.5)
Val	7.3 (10.3)	7.1 ( 5.8)	7.5 ( 7.5)	7.2 ( 9.6)	7.6 ( 6.4)	7.8 ( 6.3)
Met	1.4 ( 1.8)	2.8 ( 2.0)	0.8 ( 1.9)	0.0 ( 0.0)	0.0 ( 1.0)	0.0 ( 4.3)
Ile	5.0 ( 6.9)	4.0 ( 3.1)	8.0 ( 7.6)	3.6 ( 5.0)	6.3 ( 4.4)	4.7 ( 4.8)
Leu	11.4 ( 6.4)	6.4 ( 7.3)	8.9 ( 6.3)	5.5 (12.1)	7.7 ( 7.3)	8.7 ( 9.7)
Phe	3.0 ( 4.9)	2.5 ( 3.5)	2.9 ( 5.3)	5.0 ( 2.1)	2.7 ( 2.7)	3.7 ( 3.6)
Lys	12.7 (10.6)	5.6 ( 8.1)	11.2 (12.4)	15.2 ( 9.5)	10.6 ( 7.8)	10.6 (11.4)
His	3.8 ( 2.1)	3.9 ( 2.8)	0.6 ( 2.1)	5.0 ( 2.8)	5.4 ( 2.7)	7.6 ( 3.6)
Tyr	0.0 ( 3.6)	0.0 ( 3.0)	1.2 ( 4.5)	1.8 ( 1.7)	2.0 ( 1.7)	4.6 ( 3.9)

( ) 内の数字は、Collatzら<sup>12, 15)</sup>によるラット肝40S蛋白質のアミノ酸組成を示す。

表 4-2 *Artemia salina* およびラット肝リボソーム小垂粒子塩基性蛋白質のアミノ酸組成

Amino acid	S 15a	S 16	S 17	S 18	S 20	S 23
Asp	12.2 ( 9.4)	6.4 ( 5.9)	7.3 ( 9.8)	4.4 ( 8.6)	4.4 ( 8.1)	6.8 ( 8.5)
Glu	11.1 ( 9.4)	9.1 (10.3)	12.8 (12.1)	9.5 ( 8.7)	12.4 (10.0)	8.7 ( 8.2)
Ser	5.4 ( 4.4)	5.9 ( 4.5)	6.0 ( 3.8)	4.1 ( 2.4)	6.2 ( 5.5)	5.1 ( 2.4)
Thr	4.5 ( 4.6)	3.7 ( 3.1)	3.2 ( 6.2)	5.4 ( 5.9)	6.2 ( 8.8)	8.9 ( 3.2)
Gly	7.2 ( 9.7)	12.9 (10.0)	8.1 ( 7.1)	9.0 ( 9.0)	6.7 ( 6.9)	6.9 (12.1)
Ala	8.0 ( 6.4)	9.0 ( 8.8)	9.0 ( 5.9)	5.3 ( 6.0)	5.4 ( 5.8)	5.3 ( 8.5)
Arg	10.3 ( 8.8)	10.0 ( 9.2)	7.0 (10.0)	14.2 (13.9)	8.0 ( 8.8)	10.3 ( 8.9)
Pro	5.1 ( 4.2)	6.3 ( 5.2)	8.1 ( 5.3)	3.6 ( 2.5)	5.7 ( 5.2)	3.1 ( 3.4)
Val	6.9 ( 7.1)	7.1 ( 8.4)	8.2 ( 8.0)	8.4 ( 7.7)	8.1 ( 8.2)	5.9 ( 8.9)
Met	0.0 ( 1.9)	0.0 ( 0.8)	2.4 ( 1.8)	0.0 ( 0.8)	0.0 ( 1.1)	0.0 ( 1.3)
Ile	4.7 ( 6.2)	7.1 ( 5.5)	4.0 ( 6.3)	6.8 ( 6.9)	9.2 ( 8.7)	2.9 ( 4.3)
Leu	6.5 ( 9.0)	11.6 ( 8.9)	8.1 ( 7.8)	10.8 ( 9.8)	5.0 ( 7.0)	6.2 ( 7.0)
Phe	2.8 ( 4.2)	2.7 ( 2.1)	2.5 ( 2.6)	2.0 ( 2.6)	3.0 ( 2.4)	4.9 ( 3.9)
Lys	10.1 ( 9.4)	12.1 (11.2)	10.6 ( 9.2)	10.2 ( 9.3)	16.0 (10.1)	16.8 (14.4)
Hjs	3.6 ( 3.2)	1.3 ( 1.6)	2.5 ( 2.0)	1.5 ( 3.6)	3.4 ( 2.7)	4.0 ( 3.3)
Tyr	1.7 ( 1.6)	1.0 ( 4.5)	0.0 ( 2.9)	0.4 ( 2.2)	4.3 ( 0.6)	4.1 ( 1.6)
Amino acid	S 24	S 25	S 26	S 27	S 27a	S 28
Asp	5.2 ( 8.5)	4.5	5.2 ( 8.3)	4.0 ( 9.2)	6.8 ( 4.6)	5.0 ( 7.0)
Glu	6.3 ( 8.2)	6.7	5.7 ( 4.2)	9.5 ( 8.5)	7.8 (10.4)	6.3 (16.9)
Ser	4.6 ( 2.4)	8.0	6.0 ( 4.3)	7.7 ( 6.4)	3.9 ( 7.4)	6.5 (15.7)
Thr	7.7 ( 3.2)	4.9	2.9 ( 2.0)	7.7 ( 4.0)	4.0 ( 6.2)	5.4 ( 4.2)
Gly	7.6 (12.1)	6.4	5.0 ( 4.7)	6.3 (12.2)	14.2 ( 7.8)	31.8 (22.0)
Ala	5.9 ( 8.5)	7.1	8.1 (11.1)	4.6 ( 4.9)	6.0 ( 4.8)	6.8 ( 8.5)
Arg	12.0 ( 8.9)	9.8	18.1 (14.6)	10.8 ( 6.8)	6.4 ( 6.9)	5.2 ( 1.8)
Pro	4.1 ( 3.4)	4.9	7.1 (10.4)	5.8 ( 3.7)	2.7 ( 7.1)	4.1 ( 3.0)
Val	7.3 ( 8.9)	4.7	6.8 ( 9.7)	6.1 ( 6.8)	5.3 ( 9.7)	5.0 ( 3.9)
Met	0.0 ( 1.3)	0.0	0.0 ( 0.9)	0.0 ( 1.1)	0.0 ( 1.2)	0.0 ( 0.7)
Ile	3.2 ( 4.3)	4.2	3.5 ( 5.2)	2.2 ( 2.7)	1.7 ( 2.5)	3.3 ( 2.7)
Leu	6.9 ( 7.0)	8.1	2.7 ( 3.2)	7.1 ( 6.2)	3.9 ( 9.7)	4.9 ( 4.1)
Phe	5.0 ( 3.9)	1.7	2.5 ( 2.9)	4.0 ( 3.6)	2.9 ( 3.6)	2.6 ( 2.7)
Lys	15.1 (14.4)	19.2	11.4 (11.9)	9.3 (18.0)	20.5 (11.8)	5.9 ( 2.3)
His	4.7 ( 3.3)	3.4	7.7 ( 3.1)	10.8 ( 3.2)	7.9 ( 4.6)	2.3 ( 2.9)
Tyr	4.4 ( 1.6)	6.5	3.5 ( 2.7)	3.6 ( 3.1)	6.2 ( 1.8)	4.9 ( 1.8)

( ) 内の数字は、Collatz ら<sup>12, 15)</sup>によるラット肝40S蛋白質のアミノ酸組成を示す。

表5 *Artemia salina* とラット肝リボソーム小亜粒子蛋白質S6のアミノ酸組成の比較

Amino acid	100X <sub>IA</sub> <sup>a</sup>	100X <sub>IB</sub> <sup>a</sup>	100 X <sub>IA</sub> -X <sub>IB</sub>	10 <sup>4</sup> (X <sub>IA</sub> -X <sub>IB</sub> ) <sup>2</sup>
Asp	6.5	7.0	0.5	0.25
Glu	10.1	11.4	1.3	1.69
Ser	6.0	5.0	1.0	1.00
Thr	6.6	4.4	2.2	4.84
Gly	6.9	8.6	1.7	2.89
Ala	9.2	7.0	2.2	4.84
Arg	11.9	12.3	0.4	0.16
Pro	4.8	3.9	0.9	0.81
Val	7.6	8.1	0.5	0.25
Met	1.1	1.3	0.2	0.04
Ile	3.7	4.1	0.4	0.16
Leu	8.9	8.7	0.2	0.04
Phe	2.2	2.0	0.2	0.04
Lys	9.5	12.6	3.1	9.61
His	1.8	1.5	0.3	0.09
Tyr	2.0	1.7	0.3	0.09
Total	100.0	100.0	15.4 <sup>b</sup>	26.80 <sup>c</sup>

a: *A. salina* S6蛋白質をAとし、Collatzら<sup>12)</sup>によるラット肝S6蛋白質をBとした。b: この値から  $D I = 1/2\sum 100 |X_{iA} - X_{iB}| = 7.70$  が求まる。c: この値は直接  $S\Delta Q$  をしめす。すなわち  $S\Delta Q = 26.8$ 、 $D = 0.01 \cdot S\Delta Q^2 = 0.0518$

きる。

$N_A$  と  $N_B$  がまったく同じか、差が18残基以内の蛋白質の場合、“Cornish-Bowden index”  $S\Delta n$ <sup>54)</sup> を用いると便利である。 $S\Delta n$  は  $S\Delta Q$  を変形した指数で  $S\Delta n = 0.5N^2\sum (X_{iA} - X_{iB})^2 = 0.00005N^2 \times S\Delta Q$  と表される。アミノ酸配列未知の2種蛋白質について相似性を検討する最も簡単な方法は  $S\Delta n$  を計算し、それを0.42N値あるいは0.93N値と比較することである。すなわち  $S\Delta n < 0.42N$  であれば強い相似性を示し、 $0.42N < S\Delta n < 0.93N$  であれば弱い相似性を持つことを示し、 $S\Delta n > 0.93N$  の場合は相似性がないものとみなす。この方式でS6蛋白質について計算すると  $S\Delta n = 109$  となり  $0.42N = 121$  より値が小さく、強い相似性を示すことがわかる。

これらの指数および上述の相似性を示す基準を用いて、*A. salina* とラット肝の小亜粒子塩基性蛋白質23種について検討すると表6のようになる。S2, S11, S15の3種についてはアミノ酸残基数の差が両種間でそれぞれ

19, 28, 23であったため指数  $S\Delta n$  による判定はできず、指数  $D I$ ,  $S\Delta Q$ ,  $D$  のみにより相似性を判定した。S25はラット肝で、S3aとS19は *A. salina* で単離されなかったため比較できなかった。すなわち10種の蛋白質(S2, S3, S4, S6, S7, S8, S15a, S16, S17, S18)には強い相似性があり、6種の蛋白質(S14, S15, S20, S23, S24, S26)は弱い相似性が認められた。しかし7種の蛋白質(S9, S10, S11, S13, S27, S27a, S28)については相似性が認められなかった。

### 考 察

リボソームの構造と機能を研究する上で、リボソーム小亜粒子蛋白質を精製し同定することは最良の方法であろう。しかしながら動物細胞のリボソームを材料とした場合、他の蛋白質の精製に使われるカラムクロマトグラフィーを用い純粋な蛋白質を調製するのはかなり困難である。これについては今までに Westermann ら<sup>9)10)</sup>と Collatz ら<sup>12)15)</sup>はラット肝リボソーム小亜粒子蛋白質を3.8gと大量に用いて、CM-セルロースクロマトグラフィーとセファデックス G-75によるゲル濾過クロマトグラフィーを併用し、単離精製した。また釧ら<sup>14)</sup>

<sup>16)</sup>も同様の方法で2.3gの大亜粒子蛋白質を精製した。これに代わるものとして、本研究では尿素(pH 8.6)一尿素(pH 4.6)を用いる二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で *A. salina* リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質を分画し、ゲルから70%蟻酸で抽出し、Lichrosorb DIOL カラムを用いる分子篩-HPLCで分取することにより個々の蛋白質を単離精製した。本法によれば少量のリボソーム蛋白質を比較的短時間に精製することができた。単離した蛋白質の純度はSDS-アクリルアミドを併用する三次元電気泳動法<sup>8)</sup>およびHPLCにより確認した。本法により調製した蛋白質はアミノ酸組成分析の試料として適当であることを組成既知のチトクロームCを用いて明らかにした。さらにゲルから抽出し精製して得られた少量の蛋白質のアミノ酸組成を分析するにあたり、従来のアミノ酸自動分析計による分析では蛋白質を多く必要とするため、微量のアミノ酸分析法を検討した。そして近年開発されたHPLCで、可視部に吸収帯を持つDABS-アミノ酸をピコモル単位で分析する方法をチトクロームCや *A. salina* リボソーム蛋白質のアミノ酸分析に応用してほぼ満足する結果をとることが出来たことは重要であろう。

真核生物リボソームの研究は原核生物についてほどは進んでいないが、真核生物のリボソームは特に動物細胞

表 6 *Artemia salina* とラット肝リボソーム小亜粒子塩基性蛋白質間のアミノ酸組成指数

Protein	MW <sub>A</sub>	MW <sub>B</sub>	N <sub>A</sub>	N <sub>B</sub>	DI	SΔQ	D	Test	SΔn	0.42N	0.93N	Test
S 2	29000	31000	268	287	7.95	24.4	0.0494	strong	—	—	—	—
S 3	30000	29000	278	268	9.20	27.2	0.0522	strong	103	117	259	SΔn<0.42N
S 4	28500	28000	264	259	8.30	25.0	0.0499	strong	85.3	111	246	SΔn<0.42N
S 6	29000	31000	269	287	7.70	26.8	0.0518	strong	109	121	267	SΔn<0.42N
S 7	22000	22000	204	204	9.45	34.5	0.0587	strong	71.8	85.5	189	SΔn<0.42N
S 8	25000	27000	232	250	7.90	29.6	0.0544	strong	90.1	105	233	SΔn<0.42N
S 9	23000	23000	213	213	18.4	107	0.103	—	243	89.4	198	SΔn>0.93N
S 10	17000	19000	157	176	19.4	146	0.121	—	226	73.9	164	SΔn>0.93N
S 11	16000	19000	148	176	17.9	122	0.111	—	—	—	—	—
S 13	18000	17000	167	157	22.7	188	0.137	—	264	70.1	155	SΔn>0.93N
S 14	16000	15500	148	144	15.3	120	0.110	weak	133	62.2	138	0.42N<SΔn<0.93N
S 15	15000	17500	139	162	11.8	70.4	0.0635	weak	—	—	—	—
S 15a	14000	14000	130	130	10.3	36.8	0.0607	strong	31.1	54.6	121	SΔn<0.42N
S 16	17000	15500	157	143	10.2	40.0	0.0632	strong	48.7	66.1	146	SΔn<0.42N
S 17	17000	16000	157	148	11.0	50.8	0.0713	strong	62.9	66.1	146	SΔn<0.42N
S 18	17000	17000	157	157	6.60	16.5	0.0407	strong	20.3	65.9	146	SΔn<0.42N
S 20	14500	14500	134	134	13.0	81.6	0.0903	weak	73.3	56.3	125	0.42N<SΔn<0.93N
S 23	16000	16000	148	148	17.0	109	0.105	weak	120	62.2	138	0.42N<SΔn<0.93N
S 24	16000	16000	148	148	16.5	93.7	0.0968	weak	103	62.2	138	0.42N<SΔn<0.93N
S 26	14500	14500	134	134	13.7	87.8	0.0937	weak	78.8	56.3	125	0.42N<SΔn<0.93N
S 27	13000	14500	120	134	23.5	290	0.170	—	262	56.3	125	—
S 27a	13000	12800	120	118	25.5	251	0.158	—	183	50.6	112	SΔn>0.93N
S 28	11000	11000	102	102	22.5	228	0.151	—	118	42.8	94.9	SΔn>0.93N

*A. salina* リボソーム小亜粒子蛋白質を A とし、Collatz ら<sup>12,15)</sup>によるラット肝リボソーム小亜粒子蛋白質を B とした。それぞれの分子量<sup>8)</sup>を MW<sub>A</sub>、MW<sub>B</sub>、アミノ酸残基数を N<sub>A</sub>、N<sub>B</sub> とした。なおアミノ酸残基数は MW-108N より算出した。両蛋白質間の相似性は“difference index” DI<sup>55)</sup>、“Marchalonis と Weltmann 指数” SΔQ<sup>57)</sup>と“composition difference” D<sup>56)</sup>を計算し Cornish-Bowden の作成した表<sup>54)</sup>により判定した。また |N<sub>A</sub>-N<sub>B</sub>| ≤ 18 については SΔn<sup>54)</sup>を用いて判定した。

間では、大きさ、リボソーム RNA の大きさ、構成蛋白質の種類などの基本構成は同じである。個々のリボソーム蛋白質について Delaunay ら<sup>58)</sup>は、尿素 (pH 9.6) - 尿素 (pH 4.6) の二次元電気泳動法のパターンで植物から人間まで 13種の 80S リボソーム蛋白質を分析し、よく保存されていることを報告した。特に爬虫類と鳥類は哺乳類によく似たパターンを示すが両生類と魚類は一部異なっているという。Kuter と Rodgers<sup>59)</sup>は HeLa 細胞、ニワトリ胚細胞と Novikoff 肝細胞の 80S リボソーム蛋白質を二次元ゲルで詳細に比較し、ニワトリに特異なスポットを示す蛋白質が約 10種類あると報告している。しかしその他のリボソーム蛋白質は二次元パターンでみるかぎり進化の過程でよく保存されていると述べている。また Ramjoué と Gordon<sup>60)</sup>はニ

ワトリ肝とラット肝の大小亜粒子について二次元ゲル電気泳動法で精査し、小亜粒子では 7種、大亜粒子では 17種の蛋白質が異なっているが全体の二次元ゲルパターンはよく似ていることを述べている。

免疫化学的には、下等動物-植物-動物のリボソーム蛋白質間にかんがりの相違があるが、動物または植物の間でそれぞれ比較するとかなりの類似性がみられた<sup>61)</sup>。また Chooi と Otaka<sup>62)</sup>は、酵母の S25 とショウジョウバエの S14 とうさぎ肝の酸性蛋白質である S12 との間に免疫的に相同性をみとめている。

堀ら<sup>63)</sup>は分子進化の速度を表すのに 1つのアミノ酸置換が 10<sup>9</sup>年に 1回の割合で 1アミノ酸座位に起こる率に相当するポーリング<sup>64)</sup>という尺度を用いて蛋白質の置換率を表した。真核生物のリボソーム大亜粒子蛋白質

L7/L12 の N 末端75残基のポーリング値は0.2~0.3 であり、成長ホルモン3.7, 免疫グロブリン3.2, ヘモグロビン1.4, ミオグロブリン1.3に較べて置換率が低く、真核生物のリボソーム蛋白質は他の蛋白質にくらべ進化の過程でよく保存されていることを報告した。

リボソーム蛋白質のアミノ酸配列の比較は主として原核生物では、大腸菌、枯草菌、好熱性 *Bacillus* 菌の30 S 亜粒子蛋白質 (大腸菌の S4, S5, S6, S7, S8, S10, S12, S13, S15, S16, S17, S19, S20 に相当する13種) について Higo と Ohsawa ら<sup>64)</sup><sup>65)</sup>により行われており、これら3種の菌の相同蛋白質には共通のアミノ酸配列を示す部分が多く、N 末端アミノ酸配列40~50残基の比較より、分類学的、遺伝的に近縁な種間である枯草菌—好熱菌での相似率は70~80%であり、枯草菌—大腸菌のようにかけ離れた種間では40~50%の相似率を示したとのことである。

真核生物間のリボソーム蛋白質の一次構造を比較するにはデータがまだ少ないが、現在までに最も研究が進んでいるのは機能的に細菌の L7/L12 に相当する酸性蛋白質である。酵母<sup>66)</sup>—エビ (*A. salina*)<sup>67)</sup>—植物 (小麦胚)<sup>68)</sup>—動物 (ラット肝)<sup>69)</sup>にわたる広い範囲の生物からこの酸性蛋白質が分離されその全構造または N 末端アミノ酸配列が決定され、相互の間には少なくとも50%の高い相同性があることが示された<sup>65)</sup>。伊藤ら<sup>70)</sup>は酵母とラット肝のリボソーム蛋白質の一次構造を比較し、酵母の YP55 とラット肝の L37 の N 末端付近のアミノ酸配列は57%の相同性を示し、また酵母の YS25 と SP28 がラット肝リボソーム小亜粒子酸性蛋白質 S21 と N 末端40残基については54~57%もの相同性を示すことを報告した。

最近ラット肝リボソーム蛋白質に特異的な cDNA のクローニング化が進められ、その塩基配列からリボソーム蛋白質の一次構造が明らかとなってきた。中西ら<sup>71)</sup>はラット肝の S17 蛋白質が酵母の YS51 蛋白質と N 末端91残基について76.9%の強い相同性を認めた。田中ら<sup>72)</sup><sup>73)</sup>はラット肝の S11 蛋白質と酵母 (*Halobacterium cutirubrum*) の S16 蛋白質は、ラット肝の N 末端から38番目から72番目までと酵母の N 末端側の31残基中17残基が保存されており、ラット肝の tRNA 結合蛋白質である L35a の C 末端側3分の2はカエルの L32 蛋白質ときわめて相同性が高いことを報告した。今までに報告されているリボソーム蛋白質のアミノ酸配列のデータバンクをマイクロコンピュータで検討し、酵母の rp59 蛋白質と朝鮮ねずみの S14 蛋白質間に強い相同

性が見出されている<sup>74)</sup>。

上述のように真核生物間のリボソーム蛋白質についての一次構造を比較すると調べられた限りでは高い相似性が認められよく保存されていると考えられる。しかし研究例が少ないことから今後の研究に待つ部分が大である。ことにクローニングによるリボソーム蛋白質に特異的な cDNA の塩基配列からリボソーム蛋白質のアミノ酸配列を求める研究が多くなされればさらに明かになるであろう。本研究で比較しえた小亜粒子蛋白質23種のうち7種を除いてラットと甲殻類とのリボソーム小亜粒子蛋白質のアミノ酸組成がよくあっていたことは、種がはなれていてもリボソーム蛋白質はよく保存されていると言えよう。またこの16種の蛋白質はラット肝と *A. salina* との間で前述の二次元アクリルアミドゲルのスポットの位置比較から推定された対応が確かと言える。このことから二次元ゲル上での近いスポットから *A. salina* とラットのリボソーム蛋白質の対応を推定したことはかなりよい方法と考えられよう。しかし相似性が認められない7種についての対応には今後アミノ酸配列の分析が必要であろう。

## 総 括

二次元アクリルアミドゲル電気泳動法で分画した *A. salina* リボソーム小亜粒子蛋白質のアミノ酸組成をダブシル化して逆相-HPLC を用いる微量化した方法で分析することができその方法を述べた。また23種の小亜粒子蛋白質を二次元ゲル上で接近しているラット肝のそれとアミノ酸組成から比較し、Cornish-Bowden による方法<sup>54)</sup>で相似性を検討した。比較した23種のうち10種 (S2, S3, S4, S6, S7, S8, S15a, S16, S17 と S18) が強い相似性を6種 (S14, S15, S20, S23, S24 と S26) が弱い相似性を示したが、7種 (S9, S10, S11, S13, S27, S27a と S28) は相似性が認められなかった。二次元アクリルアミドゲル電気泳動法で分画した少量のリボソーム蛋白質のアミノ酸組成を測定することができたことは重要であろう。

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感謝申し上げます。実験面での御指導、御協力をいただいた本学医学部第二生化学教室の小谷昌司理学博士ならびに当教室の剣持直哉工学士に厚く御礼申し上げます。またアミノ酸自動分析計の使用を許可して下さいました第二生化学教室の小野輝夫教授に御礼申し上げます。尚この研究は文部省科学研究費の補助を受けた。

参 考 文 献

- 1) Hultin, T. and Morris, J.E.: *Develop. Biol.*, **17**: 143~164, 1968.
- 2) Zasloff, M. and Ochoa, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 3059~3063, 1971.
- 3) Mizumoto, K., Iwasaki, K., Tanaka, M. and Kajiro, Y.: *J. Biochem.*, **75**: 1047~1056, 1974.
- 4) Ochiai-Yanagi, S. and Mazumder, R.: *Eur. J. Biochem.*, **68**: 395~402, 1976.
- 5) Macrae, T.H., Roychoowdhury, M., Houston, K.J., Woodley, C.L. and Wahba, A.J.: *Eur. J. Biochem.*, **100**: 67~76, 1979.
- 6) Van Hemert, F.J., Roobol, K. and Moller, W.: *Eur. J. Biochem.*, **120**: 137~142, 1981.
- 7) De Herde, E., Piot, E., Wahba, A. and Slegers, H.: *Eur. J. Biochem.*, **151**: 455~460, 1985.
- 8) Kenmochi, N., Tsurugi, K. and Ogata, K.: *J. Biochem.*, **89**: 1293~1308, 1981.
- 9) Westermann, P. and Bielka, H.: *Molec. Gen. Genet.*, **126**: 349~356, 1973.
- 10) Westermann, P. and Bielka, H.: *Acta Biol. Med. Germ.*, **33**: 531~537, 1974.
- 11) Collatz, E., Lin, A., Stoffler, G., Tsurugi, K. and Wool, I.G.: *J. Biol. Chem.*, **251**: 1808~1816, 1976.
- 12) Collatz, E., Wool, I.G., Lin, A. and Stoffler, G.: *J. Biol. Chem.*, **251**: 4666~4672, 1976.
- 13) Tsurugi, K., Collatz, E., Wool, I.G. and Lin, A.: *J. Biol. Chem.*, **251**: 7940~7946, 1976.
- 14) Tsurugi, K., Collatz, E., Todokoro, K. and Wool, I.G.: *J. Biol. Chem.*, **252**: 3961~3969, 1977.
- 15) Collatz, E., Ulblich, N., Tsurugi, K., Lightfoot, H.N., MacKinlay, W., Lin, A. and Wool, I.G.: *J. Biol. Chem.*, **252**: 9071~9080, 1977.
- 16) Tsurugi, K., Collatz, E., Todokoro, K., Ulbrich, N., Lightfoot, N. and Wool, I.G.: *J. Biol. Chem.*, **253**: 946~955, 1978.
- 17) Zimmerman, C.L. and Pisano, J.J.: "Method in enzymology XLVII", ed. by Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., pp. 45~59, Academic Press, New York-San Francisco-London, 1977.
- 18) Chang, J.-Y.: *Biochem. J.*, **199**: 557~564, 1981.
- 19) Chang, J.-Y., Knecht, R. and Braun, D.G.: *Biochem. J.*, **199**: 547~555, 1981.
- 20) Chang, J.-Y., Knecht, R. and Braun, D.G.: *Biochem. J.*, **203**: 803~806, 1982.
- 21) Mancheva, I.N., Nikolov, R.N. and Pfletschinger, J.: *J. Chromatogr.*, **213**: 99~103, 1981.
- 22) Zimmermann, C.L., Appella, E. and Pisano, J.J.: *Anal. Biochem.*, **75**: 77~85, 1976.
- 23) Zimmermann, C.L., Appella, E. and Pisano, J.J.: *Anal. Biochem.*, **77**: 569~573, 1977.
- 24) Johnson, N.D., Hunkapiller, M.W. and Hood, L.E.: *Anal. Biochem.*, **100**: 335~338, 1979.
- 25) Somack, R.: *Anal. Biochem.*, **104**: 464~468, 1980.
- 26) Lottspeich, F.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**: 1829~1834, 1980.
- 27) Fohlman, J., Rask, L. and Peterson, P.A.: *Anal. Biochem.*, **106**: 22~26, 1980.
- 28) Black, S.D. and Coon, M.J.: *Anal. Biochem.*, **121**: 281~285, 1982.
- 29) Tsunasawa, S., Kondo, J. and Sakiyama, F.: *J. Biochem.*, **97**: 701~704, 1985.
- 30) Horn, M.J., Hargrave, P.A. and Wang, J.K.: *J. Chromatogr.*, **180**: 111~118, 1979.
- 31) Bayer, E., Gron, E., Kaltenecker, B. and Uhmann, R.: *Anal. Chem.*, **48**: 1106~1109, 1976.
- 32) Tapuhi, Y., Miller, N. and Karger, B.L.: *J. Chromatogr.*, **205**: 325~337, 1981.
- 33) Weiner, S. and Tishbee, A.: *J. Chromatogr.*, **213**: 501~506, 1981.
- 34) Tapuhi, Y., Schmidt, D.E., Lindner, W. and Karger, B.L.: *Anal. Biochem.*, **115**: 123~129, 1981.
- 35) Kaneda, N., Sato, M. and Yagi, K.: *Anal. Biochem.*, **127**: 49~54, 1982.
- 36) De Jong, C., Hughes, G.J., van Wieringen, E. and Wilson, K.J.: *J. Chromatogr.*, **241**: 345~359, 1982.
- 37) Mackey, L.N. and Beck, T.A.: *J. Chromatogr.*, **239**: 463~474, 1982.
- 38) Umagat, H., Kucera, P. and Wen, L.-F.: *J. Chromatogr.*, **239**: 463~474, 1982.



- 39) Kabus, P. and Koch, G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **108**: 783~790, 1982.
- 40) Turnell, D.C. and Cooper, J.D.H.: *Clin. Chem.*, **28**: 527~531, 1982.
- 41) Imai, K. and Watanabe, Y.: *Anal. Chim. Acta*, **130**: 377~383, 1981.
- 42) Watanabe, Y. and Imai, K.: *Anal. Biochem.*, **116**: 471~472, 1981.
- 43) Watanabe, Y. and Imai, K.: *J. Chromatogr.*, **239**: 723~732, 1982.
- 44) Kaltschmidt, E. and Wittman, H.G.: *Anal. Biochem.*, **36**: 401~412, 1970.
- 45) Kaltschmidt, E. and Wittman, H.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**: 1276~1282, 1970.
- 46) Lastik, S.M. and McConkey, E.H.: *J. Biol. Chem.*, **251**: 2867~2875, 1976.
- 47) Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P. and Mora, G.: *Biochem.*, **8**: 2897~2905, 1969.
- 48) Sherton, C.C. and Wool, I.G.: *Molec. Gen. Genet.*, **135**: 97~112, 1974.
- 49) 次田 皓: 蛋白質, 核酸, 酵素, **27**: 1486~1501, 1982.
- 50) McConkey, E.H., Bielka, H., Gordon, J., Lastic, S.H., Lin, A., Ogata, K., Rebound, J.P., Traugh, J.A., Traut, R.R., Warner, J.R., Welfle, H. and Wooli, G.: *Mol. Gen. Genet.*, **169**: 1~6, 1979.
- 51) Goerl, M., Welfle, H. and Bielka, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **519**: 418~427, 1978.
- 52) Brown, W.E. and Howard, G.C.: *Anal. Biochem.*, **101**: 294~298, 1980.
- 53) Margoliash, E., Smith, E.L., Kreil, G. and Tuppy, H.: *Nature*, **192**: 1121~1127, 1961.
- 54) Cornish-Bowden, A.: *Anal. Biochem.*, **105**: 233~238, 1980.
- 55) Metzger, H., Shapiro, M.B., Mosimann, J.E. and Vinton, J.E.: *Nature*, **219**: 1166~1168, 1968.
- 56) Harris, C.E. and Teller, D.C.: *J. Theor. Biol.*, **38**: 347~362, 1973.
- 57) Marchalonis, J.J. and Weltman, J.K.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **B38**: 609~625, 1971.
- 58) Delannary, J., Creusot, F. and Schapina, G.: *Eur. J. Biochem.*, **39**: 305~312, 1973.
- 59) Kuter, R.L. and Rodgers, A.: *Exp. Cell. Res.*, **87**: 186~194, 1974.
- 60) Ramjouw, H-P, R. and Gordon, J.: *J. Biol. Chem.*, **252**: 9065~9070, 1977.
- 61) Bielka, H. and Stahl, J.: "International review of biochemistry; Amino acid and protein biosynthesis II", ed. by Arnstein, H.R.V., Vol. 18, pp. 79~168, University Park Press, Baltimore, 1978.
- 62) Chooi, W.Y. and Otaka, E.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 2535~2539, 1984.
- 63) Hori, H., Higo, K. and Osawa, S.: *J. Mol. Evol.*, **9**: 191~201, 1977.
- 64) Higo, K., Itoh, T. and Osawa, S.: "Evolution of protein molecules", ed. by Matsubara, H. and Yamanaka, T., pp. 197, Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo, 1978.
- 65) Matheson, A.T., Moller, W., Amons, R. and Yaguchi, M.: "Ribosome; structure, function and genetics", ed. by Chambliss, C., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L. and Nomura, M., pp. 297~332, Univ. Park Press, Baltimore, 1979.
- 66) Itoh, T.: *FEBS Letters*, **114**: 119~123, 1980.
- 67) Amons, R., Pluijms, W. and Moller, W.: *FEBS Letters*, **104**: 85~89, 1979.
- 68) Visentin, L.P., Yaguchi, M. and Matheson, A.T.: *Can. J. Biochem.*, **57**: 719~726, 1979.
- 69) Wool, I.G.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**: 719~754, 1979.
- 70) Itoh, T., Otaka, E. and Matsui, K.A.: *Biochem.*, **24**: 7418~7423, 1985.
- 71) Nakanishi, O., Oyanagi, M., Kuwano, Y., Tanaka, T., Nakayama, T., Mitsui, H., Nabeshima, Y. and Ogata, K.: *Gene*, **35**: 289~296, 1985.
- 72) Tanaka, T., Kuwano, Y., Ishikawa, K. and Ogata, K.: *J. Biol. Chem.*, **260**: 6329~6333, 1985.
- 73) Tanaka, T., Wakasugi, K., Kuwano, Y., and Ogata, K.: *Eur. J. Biochem.*, **154**: 523~527, 1986.
- 74) Tanaka, T., Ishikawa, K. and Ogata, K.: *FEBS Letters*, in press.

(昭和61年7月12日受付)