

氏 名 (本籍)	たいら 平	ひで 秀	はる 晴 (福島県)
学位の種類	農	学	博 士
学位記番号	農 博 第	1 4 9	号
学位授与年月日	昭 和 4 9 年	9 月 1 2 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻		
学位論文題目	家蚕絹糸腺 G 因子の作用機作に関する 研究		

(主 査)
論文審査委員 教授 志村 憲助 教授 高橋 甫
助教授 松田 和雄

論文内容要旨

第 I 章 序 論

蛋白質合成の機構に関しては、過去十余年多くの研究によってほぼ基本骨格が明らかとなった。ペプチド鎖伸長には、リボソーム、mRNA、aminoacyl-tRNA、2種以上の蛋白性因子およびGTP等の因子が関与することが知られている。ペプチド結合生成そのものは、化学的には単純な反応であるが、これに mRNA を介してのアミノ酸配列の決定機構が加わるために生化学的に非常に複雑な要素が入ってくる。現在各因子がほぼ出そろい、その作用もほぼ明らかとなったが、その中で特にGTPの役割についてはなお未知の問題が多く、現在の生化学の領域で最も興味ある課題の1つである。

著者は、無細胞系蛋白質合成の機作を解明する目的で、材料として高い蛋白合成能を有する5令期のカイコ絹糸腺に着目し、研究を進めた。江尻らは絹糸腺細胞よりリボソーム上でアミノ酸縮合に関与する因子として、3種の蛋白性因子 APase I、APase II および G 因子の分離に成功した。このうち APase I は aminoacyl-tRNA のリボソームへの結合に関与し、APase II はこの結合反応を促進することが明らかとなった。G 因子はリボソーム依存性GTPase反応の他に、translocation を触媒し、リボソーム上の peptidyl-tRNA-mRNA を A-site (aminoacyl-tRNA site) より P-site (peptidyl-tRNA site) へ転位させる。

この translocation の段階におけるGTPの役割、リボソーム依存性GTPase反応との関連、その詳細な機構については、この系の複雑さのためほとんど不明であった。しかも研究開始当時、eukaryotic cell のG因子についてはほとんど精製されておらず、リボソーム依存性GTPase反応の酵素化学的な基礎的知見も得られていなかった。そこでこのGTPase反応がリボソーム、G因子、GTPの3者よりなる比較的簡単な系であることに着目し、ここで行なわれる反応機構を詳細に検討することにより、蛋白合成におけるGTPの役割-translocationとの関連を明らかにすることを本研究の目的とした。

第 II 章 G 因子の分離精製

上記の理由から、まず絹糸腺細胞よりG因子の分離精製から着手した。後部絹糸腺磨砕液の105,000×g 上清より、硫酸分画、DEAE-セフデックス、ハイドロキシアパタイト、ゲル濾過、等電点クロマトグラフィーによって電気泳動的に均一な標品を得た(表1)。硫酸分画より約120倍に精製され、比活性は $0.47 \mu\text{mol pi/mg 蛋白/37C 10分}$ であり、これまでに eukaryotic cell より得られたG因子中では、最高の比活性であった。

表1. カイコ絹糸腺よりG因子の精製

精製過程	全蛋白	比活性*	全活性	収量 (%)
1 硫酸分画	3200 mg	0.004	12.8	100
2 DEAE-セファデックス	190	0.036	6.8	50
3 ハイドロキシアパタイト	60	0.100	6.0	47
4 セファデックスG-200	26	0.200	5.2	40
5 等電点クロマトグラフィー	10	0.470	4.7	31

*比活性; $\mu\text{mole pi}/\text{mg}$ 蛋白/ 37°C 10分

第Ⅲ章 G因子の諸性質

この様にして精製されたG因子について諸性質を調べることにより、以後のリボソーム、GTPとの相互作用を知る上で、重要な知見が得られると思われ、次にG因子の酵素としての基本的性質について検討した。

(I) 基本的性質

精製されたG因子の分子量はゲル濾過法により80,000、SDS-ゲル電気泳動では90,000と推定され、尿素処理、SH阻害剤、S-カルボキシメチル化等の処理により分子量は変化せずサブユニット構造はないと推定された。

リボソーム依存性GTPase反応の種々の基本的性質を表2に示した。リボソームとG因子を別々にN-エチルマレイミド処理する実験により、GTPase活性には

表2. G因子の基本的性質(GTPase反応)

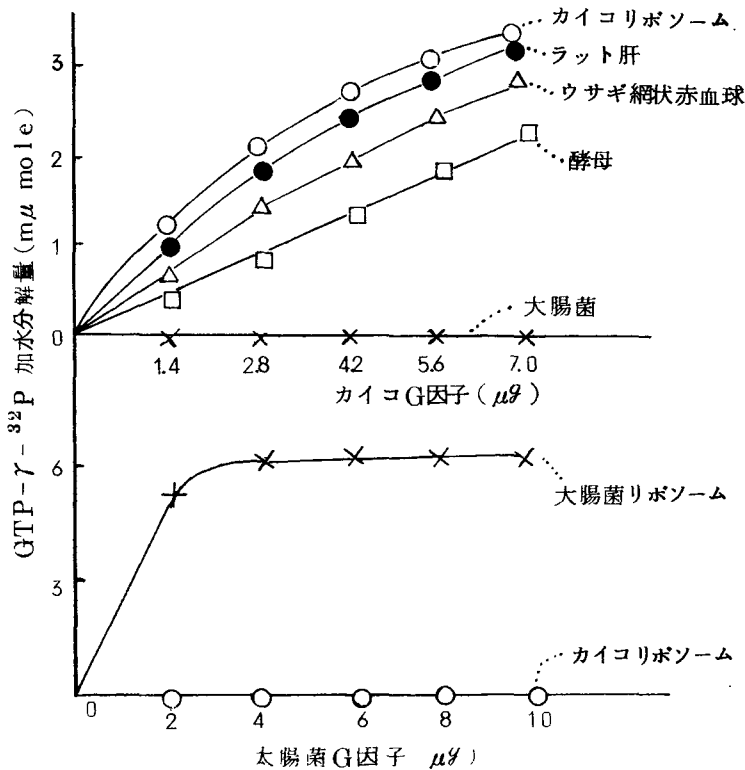
分子量	80,000~90,000
等電点	pI 6.2
比活性	$0.47 \mu\text{mole}/\text{mg}$
Km(GTP)	$4.5 \times 10^{-6} \text{ M}$
至適pH	8.5~9.0
NH_4^+ , K^+	促進せず
Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}	至適濃度5~10mM
SH試薬	促進
SH阻害剤	阻害
フシジン酸	1 mMで80%阻害
ジフテリア毒素+NAD	80%阻害
アミノアシル-tRNA	促進せず
熱処理(55°C, 4)	100%残存

(G因子のSH基が関与していることが判った。アミノ酸分析値やGTPase反応の基本的性質は大腸菌とほぼ同じであったが、異なる点として、大腸菌G因子の特異的阻害剤であるフシジン酸による阻害が、大腸菌の場合(0.1 mMで95%阻害)程、顕著でなかった(0.1 mMで50%阻害)。また精製した大腸菌G因子の比活性が $10 \mu\text{モル pi}/\text{mg}/37^\circ\text{C}$ 10分と非常に高いのに比し、カイコG因子のそれは $0.47 \mu\text{モル pi}/\text{mg}$ で約1/20であった。動物細胞の蛋白合成阻害剤であるジフテリア毒素+NADによりGTPase反応は阻害された。

(2) GTPase 反応の種特異性

カイコG因子の種々の基本的性質は大腸菌G因子のそれと非常に類似していることが明らかとなった。そこで大腸菌のG因子およびリボソームを調製し、GTPase 反応の種特異性を調べた。大腸菌G因子は粗酵素より約50倍に精製し、比活性は $10\mu\text{モル pi/mg}/37^\circ\text{C}$ 10分であった。図1に示した様に、カイコG因子は、カイコ、ラット肝、ウサギ網状赤血球、酵母の様な eukaryotic リボソーム上では反応するが、prokaryotic リボソーム上では反応しなかった。一方、大腸菌G因子は eukaryotic リボソームとは組み合わせず、prokaryotic リボソームとのみ組み合った。以上の様に GTPase 反応では明瞭な種特異性が存在することが認められた。

図1. カイコG因子、大腸菌G因子のリボソーム依存性 GTPase 反応における種特異性



第IV章 G 因子，リボソーム，GTP の相互作用

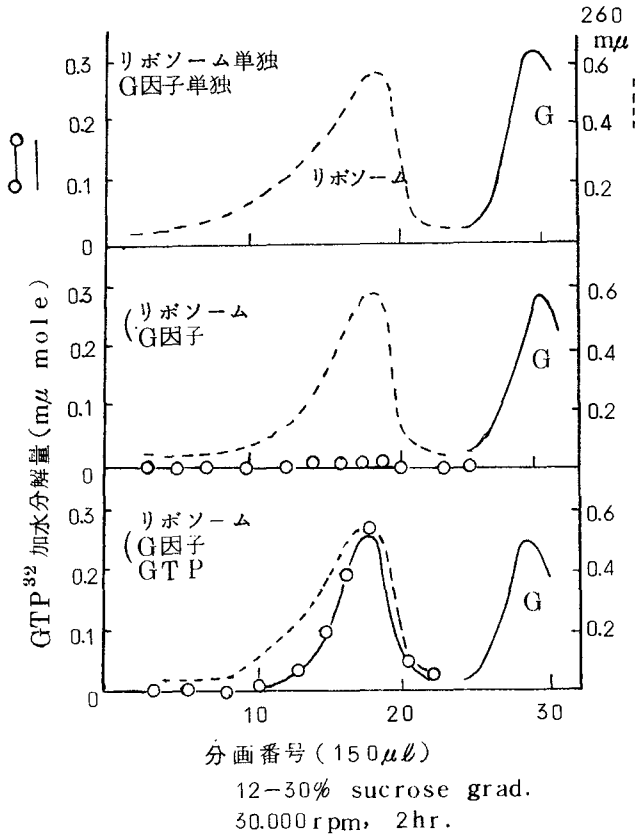
次にG因子、リボソーム、GTPの3者がいかに結合してGTPを加水分解するかをさらに詳しく検討する目的で、精製したG因子およびG因子の混在がなくなるまで洗浄したリボソーム

△を用いて、3者の相互作用を調べた。

(1) G因子のリボソームへの結合

G因子のリボソームへの結合を蔗糖密度勾配遠心法で調べた結果、この結合にはGTPが必須であり(図2)、GTPの

図2. G因子のリボソームへの結合



代わりにGDPあるいはGMP-PCP(GTPのアナログ)も有効であることが判った。

G因子とGTP, リボソームとGTPの結合は認められなかった。

次に、G因子とリボソームの結合反応を³H-GTPを用いて解析したところ、これら3者は相互に作用して、3者の高分子複合体を形成し、この複合体が蔗糖密度勾配遠心、ゲル濾過、ニトロセルロースフィルター等的手段によりその存在が証明された。

複合体に結合しているヌクレオチドをDEAE-セルロースペーパークロマトにより分析したところ、³H-GDPとして回収されたところから、

この複合体はG因子-リボソーム-GDPの3者よりなると推定した。

(2) 複合体形成反応の解析

上記の方法により GTPase 反応の中間体として活性ある複合体を分離することに成功したので、次にこの複合体の性質、形成反応の性質について検討した。

複合体形成量をG因子に依存する³H-GTPあるいは³H-GDPのリボソームへの結合量で表示し、主にニトロセルロースフィルター法で調べた。³H-GTPあるいは³H-GDPの結合反応は0°Cで3~5秒で完了した。この反応に伴うPiの放出量をGTP-

γ - ^{32}P を用いて測定したところ、 ^3H -GTPの結合量とほぼ一致した。

この0°C、5秒で完了する結合反応の性質を調べた。その結果を表3に示した。この反応条件はGTPase反応に対する条件とほぼ同じであったが、温度に対する依存性が小さく0°Cでも37°Cと同程度進行した。この複合体形成反応を大腸菌の場合と比較すると、大腸菌ではフシジン酸添加により複合体形成量が明らかに増加するのに比し、カイコG因子では影響がなかった。フシジン酸のGTPase反応の阻害機構はこの複合体の分解を抑えると解釈され、更に両G因子の比活性の異なる原因としては、複合体の安定性の差に起因すると推定した。

表3. リボソーム依存性GTPase反応と複合体形成反応との比較

	GTPase 反応	複合体形成反応
GTP	$K_m = 4.5 \times 10^{-6}$ M	$K_m = 6.2 \times 10^{-7}$ M
GDP	$K_i = 3.6 \times 10^{-6}$ M	$K_m = 5.0 \times 10^{-7}$ M
GMP PCP	$K_i = 3.3 \times 10^{-7}$ M	$K_m = 3.8 \times 10^{-7}$ M
Mg ²⁺	至適 10mM	至適 5~10mM
NH ₄ ⁺ , K ⁺	促進せず	促進せず
至適 pH	8.5 ~ 9.0	8.5 ~ 9.0
温度	依存性大	依存性小
SH 阻害剤	阻害	阻害
SH 試薬	促進	促進
フシジン酸	阻害	影響なし
ジフテリア毒素	阻害	阻害
大腸菌リボソーム	反応せず	反応せず
サブユニット40s	反応せず	反応せず
サブユニット60s	反応する	反応する

この複合体は、GTPase反応の中間体と考えられるが、GTPase反応の機構と関連させて、次の2つのモデルが仮定できる。第1は、一度形成された複合体はそのまま分解しないで存在し、GTP加水分解の一種の"active center"を形成して、新たに入ってくるGTPをcatalyticに加水分解するというモデルである。第2は、複合体が形成された後、次の新たなGTPと反応する時には、複合体に結合していたGDPが解離し、次のGTP

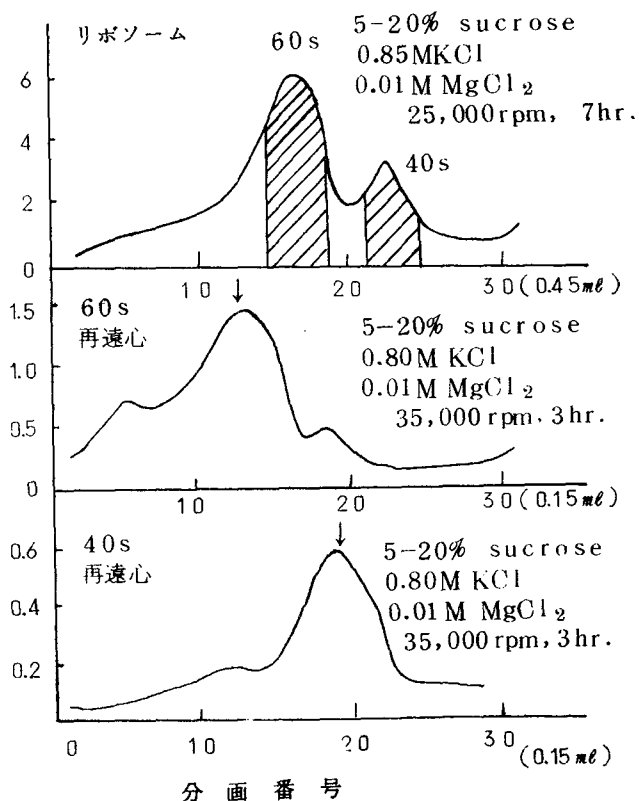
と交換して、G因子-リボソーム-GTP 複合体を経て、G因子-リボソーム-GDP 複合体に戻る cycle を繰り返すことによってGTP を加水分解するというモデルである。2つのモデルのうちどちらかを定めるために、 ^3H -GDP-複合体の ^3H -GDP が外から与えた非放射性的GTP あるいはGDP と交換するか否かを調べた。 ^3H -GDP-複合体をゲル濾過で分離し、非放射性的GTP あるいはGDP と再び反応させると、 0°C ではほとんど交換反応は見られなかったが、 37°C 5分では95%交換した。またフシジン酸はこの交換反応を阻害した。このことから前述した2つのうち第2のモデルが成立つことが示唆された。

第V章 リボソームサブユニットとG因子の相互作用

これまで単一リボソーム(80s)を用いて実験を進めてきたGTPase 反応と複合体形成反応をリボソームサブユニットのレベルで解析し、大小いずれのサブユニットがG因子と関係するかを明らかにすることを目的とした。

(1) リボソームサブユニットの分離条件

図3. リボソームサブユニットの分離



上記の目的のため、カイコ絹糸腺リボソームの分離条件を種々試みた。その結果分離条件は K^+ と Mg^{2+} の濃度比に強く依存し、最も分離が良くかつ再構成され得る条件として、0.8M KCl と 0.01M MgCl₂ を含む蔗糖密度勾配中で遠心すると、60s と 40s サブユニットに分離した。40s サブユニットはほぼ均一であるが、60s サブユニット画分には少量の40s サブユニットの2量体が混在するため、ポリU依存ポリフェニルアラニン合成能が60s 単独でも認められた。

そこで再び高濃度の KCl を含む蔗糖密度勾配速心で精製すると、均一な 60s サブユニットが得られた(図3)。この均一な 60s と 40s サブユニットは塩濃度を下げることにより、会合して 80s 粒子に戻った。ポリU によるポリフェニルアラニン合成活性は、60s と 40s の両サブユニットの組み合わせで始めて認められた。

(2) リボソームサブユニットによる GTPase 反応と複合体形成反応

上記の条件で得られた均一なリボソームサブユニットを用い、G因子による GTPase 反応、複合体形成反応を行なわせ、両反応はリボソーム全体が関与するのか？あるいは大小いずれかのサブユニットが関与するのかを調べた。

その結果を図4に示した。40s サブユニット単独では両反応とも活性が認められなかった。これに対して60s サブユニット単独でも明らかに複合体形成、GTPase 活性が認められ、これに40s サブユニットを添加することにより両活性とも3倍に促進された。

リボソームサブユニットの量比が 40s:60s = 1:1.8 (A₂₆₀ units) で両反応は飽和に達した。

以上の結果から、G因子の作用するリボソーム側の活性部位は 60s サブユニット上に存在し、しかも 40s サブユニット添加により反応が促進されることから、40s との結合部位の近傍にあることが推定される。

図4. リボソームサブユニットによる GTPase 反応と複合体形成反応

(A) 複合体形成反応

units A ₂₆₀		μμ mole ³ H-GTP 結合量
40s	60s	
0.29	-	5
0.58	-	10
0.87	-	10
-	0.52	15
-	1.04	20
-	1.56	25
0.29 +	1.04	30
0.58 +	1.04	35
0.87 +	1.04	35
(80s 2.0A ₂₆₀)		35

(B) GTPase 反応

units A ₂₆₀		mμ mole GTP ³² 加水分解量	
40s	60s	0.5	1.0
0.29	-		
0.58	-		
0.87	-		
-	0.52		
-	1.04		
-	1.56		
0.29 + 1.04	-		
0.58 + 1.04	-		
0.87 + 1.04	-		
(80s 2.0A ₂₆₀)			

要 約

無細胞系におけるカイコ絹糸腺リボソーム上でのアミノ酸縮合に関与する蛋白質因子 APase I, APase II および G 因子のうち, G 因子をとりあげ研究開始当時全く不明であったリボソーム依存性 GTPase 反応の基本的性質を明らかにすることを目的に研究を行った。即ち, その反応機構を解明することにより, 蛋白質生成における GTP の役割を理解することを意図した。

(1) 最初に, カイコ絹糸腺 G 因子の精製を試み, 電気泳動的に均一な標品を得ることに成功した。この G 因子は, eukaryotic cell では最高の比活性を示した。次にこの G 因子の基本的性質(分子量, アミノ酸分析等)ならびに, リボソーム依存性 GTPase 反応の性質(至適条件, 阻害剤の影響等)について検討したところ, 大腸菌 G 因子の性質と非常に類似していることが明らかとなった。しかし大腸菌 G 因子とカイコ G 因子の GTPase 反応については, 明らかに種特異性が認められた。

(2) G 因子, リボソーム, GTP の 3 者の相互作用を調べた結果, GTPase 反応の中間体として G 因子-リボソーム-GDP 複合体を分離することができた。そこでこの複合体形成反応の性質を GTPase 反応の性質と比較し, また複合体の分解する過程を種々検討した結果, この複合体の分解過程が GTPase 反応の律速段階になっていることを明らかにし, さらに GTP の加水分解はこの複合体の再形成と分解の繰り返しによって進行することを推定できた。

(3) 最後に, 上記の G 因子による GTPase 反応および複合体形成反応の 2 反応をリボソ-

ムサブユニット(60s, 40s)のレベルで解析することにより, G因子の作用する部位は60sサブユニット上に存在し, 40sサブユニットは両反応を促進する作用を有することを明らかにした。

(4) 以上の実験事実をふまえてGTPase反応の機構と, その蛋白合成のモデルへの関与について論じた。

本研究に関連して発表した論文

- (1) H. Taira, S. Ejiri, and K. Shimura, J. Biochem., 72, 1527 (1972) "Purification and Some Properties of G-factor from the Silk Gland of Silkworm"
- (2) H. Taira, S. Ejiri, and K. Shimura, J. Biochem(投稿中)
"The Interaction of G-factor with Ribosomes from Silk Gland; Formation of a G-factor-Ribosome-GDP Complex"

審査結果の要旨

蛋白質合成反応機構を解明することを目的とした研究の一環として、ペプチド鎖伸長に関与する3種の因子の中から特にG因子をとりあげ、その精製、性質、作用機作について行ったのが本研究である。

本研究が開始された当時、真核細胞におけるG因子の性質については全く知られていなかったもので、著者は、家蚕絹糸腺よりG因子の分離・精製の研究から始めた。その結果、蚕蛋白質化学的に均一なG因子の精製品を得ることができた。リボソーム依存性GTPaseの活性で見た精製G因子の比活性は、 $0.47 \mu\text{mol Pi/mg 蛋白} / 37^\circ\text{C}, 10\text{分}$ で、現在真核細胞のG因子としては、もっとも純度の高いものである。

このG因子は、分子量80000～90000の蛋白質で、サブユニット構造は認められない。SH基が活性に関与し、GHPに対する K_m は $4.5 \times 10^{-6} \text{M}$ であった。これらの性質は大腸菌のG因子と類似しているが、大腸菌G因子の特異的阻害剤であるフンジン酸による阻害は、絹糸腺G因子は比較的小さい値を示した。

絹糸腺G因子、リボソーム、GTPの3者は相互に反応してternary complexを形成することを明らかにし、その形成反応について詳細に検討した。その結果、この複合体の形成には1モルのGTPの加水分解が伴い、複合体はG因子-リボソーム-CDPの形であること、反応は 0°C 、5秒以内で完了すること、GMPPCPもGTPと同じく有効である等のことを明らかにした。特に、フンジン酸により影響を受けない点は、大腸菌G因子と大きく異なる点で、動物系での蛋白質合成系を考察していく上において重要な知見である。またさらに、複合体形成にはリボソームの60Sサブユニットが直接関与し、これに40Sユニットを添加することにより反応が3倍程度増加することから、60Sと40Sとの結合部位の近傍のサブユニット上がG因子との結合点であろうと推定した。

ついで、上記のternary complexによるGTPの加水分解反応機構について詳細に検討し、ternary complexはそのままの形でGTPaseとしての活性を発現するという考え方よりは、反応の一段階でternary complexは一旦解離し、再び新しいGTPと反応してternary complexを形成する反応を繰返しながら、GTPを加水分解していくという考え方に到達した。

以上本研究は、蛋白質合成において重要な役割を演じているG因子について真核細胞ではじめてその性質および作用機作を明らかにしたもので、学術の進歩に寄与するところが大きく、農学博士を授与するに充分の価値があるものと認める。