綜 説

大腸菌における蛋白合成の開始

京都大学 理学部 前 田 章 夫*
東京大学 教養学部 大 隅 良 典**
東京大学 教養学部 深 見 博 一***

1. 序 説

Nirenberg に始まる遺伝暗号解読へ向けての数多くの努力は、64のトリプレットとアミノ酸との対応関係を完全に明らかにしたことによって、情報の発現様式に関する分子的機構の解明に一つの終止符を打ったように思われる。この間、ポリUを初めとする種々の合成ポリヌクレオチドとか、種々のトリプレットが、ある場合には非常に高濃度のマグネシウムを含む系の中で、徹底的に精製されたりリボゾームを用いての実験に使用されて、実際に蛋白を合成している細胞内の条件とか、その他の考慮すべきいくつかの条件を無視してきたわけである。この結果は、遺伝暗号の解明はできたが、それとは別に天然の M-RNA を用いての蛋白合成にこのような系を用いることができなかった。このことへの解決をもたらしたのは、AUG というトリプレットに対応しての、最初にリボゾームに結合する tRNA であるホルミルメチオニル tRNA (FMet-¹tRNA) の発見であり、リボゾーム精製中に除去されてしまった蛋白中に、この tRNA をリボゾームに結合させ、最初のペプチド結合を形成しうるように成しう²るいわゆる開始因子 (initiation factor) と呼ばれるものの発見²⁾であり、またこのような系においてきわめて狭い範囲の中に至適マグネシウム濃度¹⁾のあることが分ったことなどがある。

いろいろのことから考えて、FMet-tRNA と開始因子の関与するこのような蛋白合成の開始反応が、少なくとも大腸菌において菌体中で行なわれている蛋白合成の開始機構と、本質的には同じものであることが想像されるのである。

先にも述べたように、ポリUを初めとする合成ポリヌクレオチドを M-RNA として使った諸々の実験は、コードの解明に寄与する所はきわめて大きかったが、逆に細胞内における蛋白合成の機作の解明に寄与する所が、大きかったとは考えられない。AUG というヌクレオチド連鎖を 5' 側末端に持つ合成オリゴヌクレオチドを使つての実験は開始因子の役割を初めとして、主として酵素的見地からの研究を促進したが、それ以上のことがそれほど期待できるようには思えない。無細胞系での仕事が真に細胞内での出来事への近似になるようにするには、できるだけ天然の M-RNA を使うことが望ましいように思われる。そのための最も始都合な材料が、比較的容易に均一なものとして得られる RNA フェージ (ここでは R17 と称せられるものを使つた) に含まれる RNA である。このような天然の M-RNA と、前記の AUG を含んである程度には天然のものに似せたと考えられる合成 M-RNA との間の最も明瞭な差異は、開始コドン AUG の前に、後者は何もないのに対して、天然 M-RNA は明らかに何物かをもつということである。³⁾ 合成 M-RNA、特にポリUを含むものは、一般的に経験されるフェニルアラニル tRNA のリボゾームへの結合の容易さというものからみて、種々のアミノ酸の配列を与える M-RNA とは異なるし、局所的な二次構造についても明らかに異なることが考えられる。天然 MRNA はいくつかのシストロンより成り、それに従つて、いわゆる

Initiation of Protein Synthesis in *E. coli* ;

* Akio MAEDA; Faculty of Science Kyoto University.

** Yoshinori OHSUMI; College of General Education Univ. of Tokyo.

*** Hiroichi FUKAMI; College of General Education Univ. of Tokyo.

極性 (polarity) のような問題もあるわけだが、このことについて、蛋白合成の終点と開始点との間に関与する M-RNA の構造等は全然未知であるし、このように複雑な配列をもつポリヌクレオチドを製作しえる技術もないわけである。

無細胞系での蛋白合成の研究におけるもう一つの留意すべき点は、使用するリボゾームにあるものと思われる。

生細胞中において起こると考えられる蛋白合成の過程において、リボゾームは蛋白合成を進行させつつあるポリゾーム、蛋白合成が終って M-RNA がポリゾームを通り抜け、最後のリボゾームに M-RNA がついていると考えられる、比較的高濃度のマグネシウム中でも、蛋白性の解離因子 (dissociation factor) で 30S と 50S リボゾームに解離しうる native 70S リボゾーム⁴⁾、さらに高濃度のマグネシウムによつても 70S に成りえない、いわゆる native 30S、50S と称せられるリボゾームがある。いろいろのことから、M-RNA が最初につくのはこの native 30S リボゾームである⁵⁾と考えられ、少なくともポリシストロンの最初のシストロンの開始反応はこのような native リボゾームによつて行なわれていることが考えられる。

普通のリボゾームの標品は、菌の取り方とかつおし方に問題があるため上記のポリゾームはえられず、ほとんどがポリゾームの分解物である 70S リボゾームになっている。この中には上に述べたような既に蛋白合成を終えて、恐らくペプチジル tRNA がはずれてしまっていると考えられるリボゾームと、ポリゾームを結ぶ MRNA は、比較的接線応力とか、リボヌクレアーゼによる切断に弱いためこれらの点に特別の注意を払わない普通の精製法ではポリゾームがこわれてできてきたリボゾームより成るものといえる。前者と後者とでは多少のちがいがあことは十分予測のつくことであるし、70S リボゾームの中にも二群あり、割合に高いマグネシウム濃度でも解離する分が前者であると考えられる。いずれにしても 70S リボゾームは天然 M-RNA をテンプレートにした場合には開始反応に関しては不活性であり⁶⁾、また合成 M-RNA の場合にも開始反応は起こるが FMet-tRNA のリボゾームへの結合に関しては GTP を要しないというやや不自然な挙動を示すなど、真の開始反応を行なうリボゾームとは考えられない。これをマグネシウム濃度を 10^{-4} M 程度に下げて解離させて得た derived 30S および 50S を組み合わせた系においても結果は同じであ

る。天然 MRNA を用いた場合、このような derived 30S リボゾーム単独では FMet-tRNA の結合という意味での蛋白合成の開始反応を行ないえるので、derived 50S リボゾームが何かの機構で FMet-tRNA のリボゾームへの結合を阻害しているものと思われる。ただし、この阻害効果はすでに 30S リボゾーム単独でそれに結合した FMet-tRNA を追い出すようなものではない。このような場合にはむしろ、30S リボゾーム-M-RNA-FMet-tRNA 複合体と結合し、以後の蛋白合成をなしえる 70S リボゾームを作る。いいかえると、derived リボゾームの系においては FMet-tRNA はまず MRNA と共に 30S に結合しないと、蛋白合成の開始に導くことができないというわけである⁶⁾。derived 30S と 50S を、このような反応を行なわしめるような高いマグネシウム濃度の中にいれると、本来 70S に成るべきものであり、いずれにしろこれらのことから FMet-tRNA の結合という形で示される蛋白合成の開始反応は 70S リボゾームでは起こらないことを示している。しかしながら 70S リボゾームを使った場合でも、リボゾームを高濃度の塩化アンモンで洗ったときの洗液、いわゆる開始因子を含んだ分画を加えることにより、FMet-tRNA を結合しえるようになる。このうち、開始因子の F_1 と F_2 とは 70S リボゾームに含まれているはずであるので、(なぜなら F_1 , F_2 双方を要する AUG に依存する FMet-tRNA の結合をなしうるので) これらを補うためだけとは考えにくい。天然の MRNA を結合させるために要する開始因子の一つ F_3 や、70S リボゾームを解離させるという解離因子のことを考えにいれる必要がある。 F_3 は native 30S リボゾームのみに局在し 70S リボゾームには存在しないことが分っている。したがって F_3 は 70S リボゾームが解離するとき、または解離した後につくものと思われる。もし解離するときにつくのだとすれば現象的には解離因子と区別がない形になるわけだが、この両者、 F_3 と解離因子の関係についてはつまびらかではない。もし F_3 が働くのが 70S リボゾームを解離させる段階にあるのなら、解離因子とは同じものなのかも知れない。このようなことから考えると、蛋白合成の開始反応はいわゆる native 30S と 50S リボゾームを用いた系で行なうことが、最も細胞内で行なわれていることへの近似性をもっているものと考えられる。70S リボゾームに適当な条件のもと無細胞系において解離因子と F_3 を加えたものが、これに等しいか、または近似的

であると考えられることができるように思われる。このように native 30S に注目することの妥当性は、生細胞中において蛋白合成にあずかるポリゾームにはいる前に、native 30S リボゾームについているという結果からも支持される。

以上のリボゾームのいろいろの種類のものとの相互関係を図式的に示したものが図1である。

図1. 種々の型のリボゾームの相互関係

2. 蛋白合成の開始機構

大腸菌においては蛋白合成の開始反応を FMet-tRNA のリボゾームへの結合という形で追跡することが一般的に行なわれている。前節で述べたことがらも、このような考え方から、70S リボゾームについて論じたわけである。またこのような見地から derived 30S リボゾームが蛋白合成の開始反応にあずかっていることが推論されたのであった。この場合に方法としては二通りがある。一つは Nirenberg および Leder⁸⁾ によって開発されたミリポアフィルター法である。30S リボゾームも含めてすべてのリボゾームは、定量的にミリポアフィルターに吸着されるということを利用して、遊離状態にある tRNA を除いてリボゾームに結合している tRNA をひろい出そうというわけである。もう一つの方法としては、蔗糖密度勾配超遠心法である。遊離状態にある tRNA の沈降は、30S リボゾームに比べてもいじりくおそいので、リボゾームに結合している tRNA の量を測定できるというわけである。もう一つの見方としては、FMet-tRNA の結合という形以外に、MRNA の存在に依存した蛋白合成を成しえるという形でみてもよいわけである。

さて以上にも述べた理由により、天然の MRNA として RNA を含むファージの一種である R17-ファ

ージよりえた RNA と、同じく細胞内における蛋白合成の開始に関与していると思われるリボゾームである、native リボゾームの系を用いて、蛋白合成の開始機構を研究してみたわけである。

まず、このような系そのものは active で、R17-RNA の添加により FMet-tRNA をリボゾームに結合しえる。

出発は native 30S と native 50S のリボゾームで、これに H³ で標識された R17-RNA、C¹⁴ で標識されたメチオニンをつけた tRNA と共にかなり高い温度 (37° または我々の実験では多くは 45°) でインキュベートすると、蔗糖密度勾配遠心法からみて、H³ および C¹⁴ の標識をもつことから、R17-RNA および FMet-tRNA を結合していると推測される 70S リボゾームの生成が確認される。因みにこのような 70S リボゾームの生成は FMet-tRNA の存在を必要とするわけで、逆にいえばこのような形でできた 70S リボゾームは非特異的なものではなく、すべて蛋白合成に関与する形で MRNA が結合したものであるとみることができよう。

このように native リボゾームの関与する系が active であることをみておいた上で、native 30S リボゾームにのみ話を限定してみる。30S リボゾームのみについてミリポアフィルター法でみると、実験によっていくらか差があるが、いずれにしても 50S リボゾームをも加えた場合に比べていくらか少ない量であるが、確かに結合していることを見出すことができる (表1)。一方、分析を蔗糖密度勾配遠心法で行なってみると、

表1. ミリポアフィルター法でみた FMet-tRNA のリボゾームへの結合

native 30S	リボゾーム	0.61 μmoles
"	50S	0.38 "
native(30S+50S)	"	2.08 "

この場合には FMet-tRNA の結合が 30S、70S 両方の場所を通じてほとんど見出すことができない。(図2) 先ず 70S の部分にあまり見出すことのできないのは、この 30S リボゾームの preparation 中には 50S リボゾームを contaminant として含んでいないことを示す。なぜなら 50S と 30S 両方のリボゾームが同時に存在すれば 70S リボゾームが形成されるはずだからである。このことは同時に、ミリポア法のときのみ見出された少量ながらの FMet-tRNA の結合は、50S リボゾームの contamination によるもの

図2. native 30S リボゾーム単独 (○—○), native 50S リボゾームをそれに加えた場合 (●—●) における FMet-tRNA の結合を蔗糖密度勾配遠心法で示したものの

ではなく、30S リボゾームの固有の性質に基づくものであると考えることができよう。30S の場所に見出せないことは、技術的なものでなく、先にも述べた derived 30S リボゾームを用いた場合に蔗糖密度勾配遠心で確かに 30S にあたる所に FMet-tRNA の結合が認められることから支持される。これらのことからまとめると、native 30S リボゾームへの FMet-tRNA の結合は蔗糖密度勾配遠心法ではげおち、ミリポアフィルター法では部分的に検出されるような結合の仕方であると考えてよさそうである。このことは恐らく開始因子群の不足に基づくものではないであろうということは、まず使ったリボゾームを 1M ないし 2M といった高濃度の塩化アンモニウムで洗ってこのような因子を除くといった処理をせず、蔗糖密度勾配遠心法でのみの精製であること、改めて開始因子を加えた場合にも、量的にはやや促進効果がみとめられるとはいえ、上に述べたようなリボゾームに対する FMet-tRNA の結合様式についてはほぼ同じであると考えてよさそうであるというようなことからいえる。いわゆる derived 30S リボゾームでは、明らかに蔗糖密度勾配遠心法によっても FMet-tRNA の完全な結合がみとめられるので、この両者には何か根本的な違いが考えられるわけである。このことについてはまた後に論ずる予定である。50S リボゾームについては、この亜粒子の方は M-RNA をつける能力がないので、単独では FMet-tRNA を結合しえない。いくらかつくようにみえるときもあるが、これは 30S リボゾームが除かれきっていないとか、あるいはダイマーを作っているとかの理由で説明した方がよいであ

ろう。50S リボゾームは、ペプチド結合合成酵素の存在場所とされており、50S リボゾームを使って極めて人工的な条件ではあるが、FMet-tRNA の断片と、アミノアシル tRNA の類似体である所のピュロマイシンとを反応させることができる。またリボゾーム上で合成されたポリフェニルアラニル tRNA をもった 50S リボゾームをえることができる。しかしながら、これから予想される FMet-tRNA を結合した 50S リボゾームというものは、どうも見出しえないようである。ミリポアフィルターを使っている場合には M-RNA を加えない 50S リボゾーム単独の場合がこれにあたるはずで、確かにゼロではないわけであるが、直ちにこれを 50S リボゾームへの結合とみてよいかについては疑問が残るし一般的に量的にも少なすぎる。蔗糖密度勾配遠心法では全然 50S 部分の FMet-tRNA の存在はみられない。今の所、50S リボゾームを使って普通の条件で FMet-tRNA がついているといった積極的な証拠は見出だされていないようである。50S リボゾームにあるペプチド合成酵素を使って、たとえばピュロマイシンと反応してペプチド結合を形成するには、その前に GTP を加水分解する過程が必要である。さらにその前の過程としては、AUG というトリプレットを含む M-RNA に依存して、グアニンヌクレオチドとして、GTP のアナログであり、GTP のように γ 位のりん酸基を加水分解の結果としてはずしえないような、いわゆる GMP-PCP によっても部分的に GTP にかわりえるような、すなわちおそらく GTP またはそのアナログがある種の allosteric effector として働くような過程で、FMet-tRNA がリボゾームに結合する。この過程は 30S リボゾームを必要とする段階である。一方 30S リボゾームと 50S リボゾームが M-RNA と共に合わさって 70S リボゾームが形成される過程には tRNA の存在、その中でも FMet-tRNA の存在が必要欠くべからざるものであることが分かっているわけである。その際、後にも述べるように、生成した 70S リボゾーム-M-RNA の複合体を蔗糖密度勾配遠心法により単離したとき条件によっては FMet-tRNA を結合していないようなときもあるが、この場合にでもこの反応にとって FMet-tRNA の存在は必要とされる。これはどのようなことを意味するかといえば、FMet-tRNA がこの反応のどこかの段階でリボゾームに関与結合するが、これはある条件の所では、(実際には後に述べるように開始因子の一つ F₂ のないときには)、蔗糖密度勾配遠心にお

いてはがれてしまう形で存在しているということと考えられる。今まで述べたことを考えあわせて最も妥当と思われる考えを提示すると、native リボゾームの系においては M-RNA はまず 30S リボゾームに結合する。その結合の仕方もよく分かってはいないが、RNA フェージの RNA の場合、まずつくべき 5' 末端の塩基配列が GGP₃³⁾ であり、AUG でないこともあるが、逆に M-RNA の内部に無数にあると考えられる AUG という塩基配列を出発点に選ばないということも考え合わせて、少なくとも 5' 末端にモノリン酸、恐らく多くの場合トリリン酸の形でついている所をリボゾームが認識し、そこから最初に出会う AUG という塩基配列の所を出発点に選ぶというように考えるのがよさそうである。その認識がリボゾームによって行なわれるか、その上にくる FMet-tRNA によって行なわれるかは別として、FMet-tRNA が上述の如く、ミリポアフィルター法では部分的にひっかかり、蔗糖密度勾配遠心法では完全にはがれるといったような形で 30S リボゾームに結合するものと思われる。このあとの段階として 50S リボゾームがつき、GTP 加水分解が行なわれ、最初のパプチド結合の形成が行なえるようになるものと思われる。

さて次に問題になるのは native 30S リボゾームと derived 30S リボゾームにおける結合様式のちがいである。最もこのちがいがはっきりとあらわれてくるのは蔗糖密度勾配遠心法においてである。この点に関して次に別の角度から追跡を試みてみたい。

3. 蛋白合成開始反応に関するクロランフエニユール (CAP) の効果

CAP は蛋白合成の阻害剤として知られているが、具体的な阻害機構については何一つ知られていない。M-RNA のリボゾームへの結合を阻害するという面からの説明もあるが、その吟味は十分ではない。R-17 RNA をテンプレートにする無細胞蛋白合成系は、最初にコート蛋白を作り、次いでヒスチジンを含むいわゆる maturation 蛋白、RNA レプリカーゼと進むということはすでに知られており¹⁰⁾、我々の系においても確認されている所である。そのコート蛋白においても¹¹⁾ アミノ酸の配列順序は完全に解明されていて、蛋白合成に対するこのような薬剤の作用機作を知る上にも便利な系であるといえる。実際に CAP を系に加えて、コート蛋白のアミノ酸の配列表を眺めながら、種々の放射性同位元素で標識されたアミノ酸を使

ってアミノ酸のとりこみをみでみる。

この際、普通ならいわゆるトリクロル酢酸(TCA)不溶性という形でとりこまれたものをしらべてゆくわけだが、このような阻害剤存在下でできたものをしらべるのにはこのような方法ではできたものが全部 TCA に可溶性でありあまり適当ではないので、生成物がコート蛋白として完成されるまではペプチジル tRNA としてリボゾームに結合していることを利用し、また完成されてリボゾームから遊離したのもミリポアフィルターに残ることも考え合わせ、反応液をミリポアフィルターで濾過して調べする方法を採用した。この結果明らかにされたことは、比較的コート蛋白の前の方にあるアミノ酸について調べた所では CAP の濃度を高くしてゆくと共にペプチド合成の速度が減少してゆくということである。分布がかなり広範囲にわたるアミノ酸については速度の減少としてあらわれてくるし、500 μ g/ml というかなり高濃度の CAP では、コート蛋白内部にあるメチオン、チロシン、二番目以降のアラニンのとりこみは実際には見出しえない。それにもかかわらず、FMet-tRNA のみを結合させた R17-RNA と複合体を形成した 70S リボゾームを単離して、これに対して最初のパプチド結合を形成すべき相手であるアラニンを反応させるという形でしらべてみると、適当な時間さえおいてやれば、初めあった FMet-tRNA はこのような条件下でも完全に反応して、ペーパークロマトグラフィーでしらべた範囲内では元の形の FMet-tRNA はなくなって、すべてアラニンを含んだペプチジル-tRNA の中に組み込まれてくることが分かる。この場合には CAP の効果は見かけ上速度にのみあつて、ペプチド結合を形成すること自身の上にはないのである。しかしながら、いま述べた実験は GTP 存在下で行なったのであるが、これを GDP にかえて、FMet-tRNA を結合したりリボゾームでの反応をみでみると、明らかにペプチド結合の合成そのものが阻害を受けているようである。(図3) 結合している FMet-tRNA はすでにグアニンヌクレオチドに無関係にピュロマイシンに反応しえる状態になっており、そちらの方側からのペプチド結合形成能力にはさして大きな問題はなく、むしろ新たにリボゾームに結合してペプチド結合形成に関する アミノアシル tRNA の方に問題があるといえる。アミノアシル tRNA のリボゾームへの結合には GTP のようなグアニンヌクレオチド¹²⁾ の存在を要する。普通考えられている図式に従えば、FMet-tRNA はこのように結合し

図3. FMet-tRNA を結合したリボゾームへの C^{14} アラニンのとりこみ

○—○ GTP ●—● GTP, CAP
△—△ GDP ▲—▲ GDP, CAP

たアミノアシル tRNA とペプチド結合を形成し、そのままではさらに次のペプチド結合を形成しえない形になっている。次にペプチド結合を形成しえるようになるには、GTP の加水分解のエネルギーを利用してトランスロカーゼと称される酵素によってペプチジル tRNA が動くことが必要とされている。なおちなみに先にアミノアシル tRNA をリボゾームに結合させる酵素がいわゆる T 酵素、あとのトランスロカーゼと書いたものが、いわゆる G 酵素にあたるものと思われる。

このような図式でいえば、CAP はアミノアシル tRNA のリボゾームへの結合には何らえいきょうはないとして、GDP と CAP 存在下に FMet-tRNA とアラニンの結合が阻害されているときにも、FMet-tRNA と並んでアラニール-tRNA が独立に結合していなければ具合が悪いわけであるが、実際にはそうではない。これは一つにはこの実験で使ったミリポアフィルター法ではこのようなアラニール tRNA の結合を検出しえないためかも知れない。ただ GDP 存在下でできるペプチドはやはり、ピューロマイシンとも反応しえるなど先に述べた図式そのままに考えると、いさ

さか合わない面もある。もう一つの考え方としては、結合したアミノアシル tRNA はそのまま直ちに FMet-tRNA のある所まで動いてペプチド結合を形成してしまうというのである。後者の考えでは、ペプチジル tRNA はいかなる場合といえどもピューロマイシンに反応性をもつということである。リボゾームに結合したポリフェニルアラニール tRNA は GTP をいれると完全にピューロマイシンと反応し、いれないと約半分しか反応しないといったデータはこのような考え方¹³⁾には合致しないが、先にも述べたように、トランスロカーゼと考えられている G 酵素の阻害剤である GDP の存在下にペプチドがかなりのびていたり、ピューロマイシンと反応したりすることは、また逆にこのような考え方に合致するわけである。

つまり、トランスロケーションといってリボゾームに結合した tRNA の移動と、それに伴う M-RNA の動きが、ペプチド結合形成の後に起こるか、前に起こるかのことで、まだ本当にはとけていないと思う。我々の系においては加えた酵素は精製されてはいないが、アミノアシル tRNA の結合を与えるようなグアニンヌクレオチドが含まれていないことは確かである。しかしながら少量のエネルギー再生系を含んでいる可能性は否定できない。確かなことは CAP が GTP と GDP を、CAP がペプチド結合の段階で区別していることである。アミノアシル tRNA がペプチド結合を形成するに至るまでには、allosteric effector としてまたはエネルギー供与体としての GTP またはそのアナログを必要としている。これに対してピューロマイシンとのペプチド結合の形成にあたってはこのようなものは本来的にいらぬ。このようなピューロマイシン反応はまた完全に高濃度の CAP で阻害される。以上は普通のペプチド結合形成に対する CAP の阻害効果の概説である。次に開始反応に対する効果について述べる。

先ほども述べたようなミリポアフィルター法により CAP のメチオニンとりこみに対する効果をしらべてみると、CAP のない場合、あるいは濃度のうすい場合に比べてみて、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という比較的高濃度の場合においてはとりこみにかなりのおくれが見出される。この場合二番目にくるアラニンにも同じようなおくれがありアラニンはメチオニンよりも前にくることはない(図4)。またリボゾームにこのようにして結合したメチオニンはホルミル化されたものであり、おくれにはいつているメチオニンは、蛋白の内部にあ

図4. CAP なし (○—○) 100 $\mu\text{g/ml}$ (▽—▽) 500 $\mu\text{g/ml}$ (△—△) 存在下におけるメチオニン、アラニンのとりこみ時間的経過

るものではない。このようなメチオニン、ないしは蛋白合成の開始反応のおくれはどのようなことによって起こるのであろうか。まずホルミルメチオニル-tRNA 合成が CAP によって阻害されないことは明らかである。次に M-RNA の結合についてであるが、これは H^3 で標識された R17 の RNA の 70S リボゾーム分画へのとりこみを追跡する形でしらべられた。結果は CAP によりメチオニンのリボゾームへの結合に差のみられる 37° で 3 分という時間においても、R17-RNA の 70S リボゾームへの結合には何の差異もみとめられず、これよりもっと早い時期に M-RNA の結合は完全に行なわれていることが認められた (図 5)。したがって CAP の阻害効果は MRNA の結合に対するものではなく、FMet-tRNA に対するものであることが分かる。次に、この FMet-tRNA に対する効果の内容であるが、先にも述べたように、30S および 50S リボゾームに M-RNA が加わって 70S リボゾーム-M-RNA 複合体の生成には、FMet-tRNA 存在が必要である。この場合、開始因子の一つである F_2 が

図5. 70S リボゾームに結合した H^3 R17-RNA 量の CAP なし (○—○) CAP 500 $\mu\text{g/ml}$ (●—●) のときの時間的变化

なく、 F_1 と F_3 のみを使用した系においては確かに 70S リボゾームの生成がみられるが、蔗糖密度勾配遠心の結果からはそのようにしてできた 70S リボゾームには FMet-tRNA が結合していない⁹⁾。このことは、FMet-tRNA は F_2 のない状態では蔗糖密度勾配遠心中にはがれる形に結合していると考えてよさそうである。これは先ほど述べた native 30S リボゾームの場合とか、CAP 存在下の初期の段階ときわめてよく類似している。開始因子の一つ、 F_2 というのは、先にも述べたいわゆる G 酵素と同じように GTP を加水分解してトランスロケーションを行なう役割をになっている¹⁷⁾。したがってトランスロケーションを受ける前の状態というものは、リボゾームに結合とそしているが、ミリポアフィルターで濾過する際にも割合弱く、蔗糖密度勾配遠心法ではがれるようなものであると考えられよう。

こう考えると native 30S リボゾームにはトランスロケーションの機構がない、あるいは F_2 が無いということかも知れない。G 酵素は 50S リボゾームにつくものといわれているが、 F_2 については知られていないようである。derived 30S リボゾームがこれとやや性格を異にすることについては二通りの解釈が可能である。derived リボゾームというのは 70S リボゾームを、マグネシウム濃度を下げて人為的に割ったものであり、その割れ方が本来の 30S とはちがっているという考え方と、もう一つは native リボゾームが合一して 70S リボゾームになり、蛋白合成を開始すると共に、native 30S 型から derived 30S 型にかわるという考え方である。このことについては後になって論じたい。CAP もこういう意味で F_2 によるトラ

ンスロケーションをおさえているように表面的にはみえる。しかしながら、ここで CAP は F_2 とか G 酵素に対する阻害剤として考えているのではない。あくまでペプチド結合合成酵素に対する tRNA の親和性にいきよるを及ぼすものであり、ただそれに tRNA が送り込まれるときのエネルギーによって、ある程度その阻害が克服されるという考え方をしているのである。

4. 二番目以下のシストロンにおける蛋白合成の開始

今まで述べてきた所のことは、native リボゾームの亜粒子と遊離の M-RNA から、最初のシストロンの蛋白合成の開始についてであった。それでは二番目のシストロンについては、やはり同じような機構が働らくのであろうかという疑問が生ずる。70S リボゾームとなったものが M-RNA の上に沿って蛋白合成を行なってきて、終止点にきた所で完成されたペプチドが遊離するわけであるが、実験のやりやすさを考慮して、ピュロマイシンでペプチドを遊離させるやり方でもって、シストロンの終ったときのリボゾームの状態を知り、次のシストロンの蛋白合成の開始機構を知ろうとするわけである。この系においては最初のシストロンの産物であるコート蛋白中にはヒスチジンが含まれていないので、ヒスチジンのとりこみの有無を以って、二番目のシストロンの蛋白合成を知ることができる。さて、ヒスチジンを含まない、コート蛋白と思われるものの合成を途中でピュロマイシンで止めてペプチドを遊離させた場合、リボゾームは M-RNA をつけたまま元の 70S の状態にとどまっている。これはたとえばマグネシウム濃度を下げていつた場合に(図6)

図6. ピュロマイシン処理 (△-△) および未処理 (○-○)

ピュロマイシン処理をしていない場合にくらべて特にマグネシウム濃度の低い所でいくらか解離しやすいということもあるが、すでに極性効果のみられるようなマグネシウム濃度の所では特に解離しやすいということ¹⁴⁾はなくやはり元のままであるといった方がよいように思われる。このようなリボゾームを蛋白合成系にいれると、第二シストロンの蛋白合成をしよう。現在のところ最初に M-RNA にとりついたリボゾームがそのまま第二のシストロンの蛋白合成に用いられているといった直接的な証拠はえられていないが、上記の事実はそのままはいるという考えには反しない。こう考えて具合の悪いこととして、70S リボゾームでは蛋白合成を開始しえないことがあるが、70S リボゾームというのは本来 MRNA 断片をもっているものとも考えられるので、FMet-tRNA の結合ができないということではなく、新たに加えた M-RNA の結合ができないということにすぎないともいえる。また開始因子の粗分画を加えることにより 70S リボゾームは加えた M-RNA に依存する FMet-tRNA の結合をしようようになるが、これには先に述べた解離因子による以外に、たとえばリボゾームにすでにについて、新たな tRNA の結合を妨げる tRNA を除くようなものも含まれているかも分からない。なぜこのようなことを考えるかといえば、70S リボゾームというのは一応蛋白合成の途中にあると考えられ、そうすればペプチジル-tRNA をもっているといえる。一応蛋白を作りおえてペプチドを遊離したあとに残っていることが十分予想される tRNA を次の FMet-tRNA の結合のために当然必要とする場所をあけるための因子が元来粗開始因子に含まれていることが考えられ、そのものがこのような 70S リボゾームより tRNA を除く働きをしているかも分からない。要するに、シストロン間をこえてリボゾームが 70S のままきても、次の開始反応には別に差し支えないということである。もう一つ問題にしたいことは、蛋白合成の進行と共に、70S リボゾームの中の 30S 部分と 50S 部分とが次第に他のと交換されてゆくということについてである。このことがもたらされるのは MRNA を完全によみ切って脱落したリボゾームが、最終的に 30S と 50S の両方の単位に分かれて、新たなサイクルにはいってゆくために起こる現象と考えられ、このことはシストロン間のこととは無関係であってよい。以上のべたように 70S リボゾームのまま、最初のシストロンをよみ終えて第二のにはいるとして、問題にしたいこと

は、この間を蛋白合成なしでどのように M-RNA がリボゾーム上を動いてゆくのかということである。このことの解答はおそらくポリゾームを考えることによって与えられると思う。R17-RNA をもった 70S リボゾームを単りしても、そのままでは最初のシストロンのみ完成できても第二のシストロンには進めず、そのためには新たにリボゾームを加えてやる必要がある (図 7)。¹ このことについては二つの説明が可

図 7. 70S リボゾームへのヒスチジン及びトレオニンのとりこみに対するリボゾーム添加 (○—○) の効果 ●—● はコントロールでリボゾームを加えないとき

能である。一つはやはり二番目のシストロンに進む際にはリボゾームが新しくいれかわる必要があるということである。もう一つは、リボゾームが MRNA の上の蛋白合成に関与しない部分、すなわち終止点と二番目の開始点の上をそのまますべってゆく際には、もう一つ 5' 末端からはいて第一のシストロン上で蛋白合成しつつありリボゾームによるエネルギーの供給を間接的に受けているという考え方である。現在のと

ころ直接的にどちらとも決める実験が行われていないが、リボゾーム添加の効果は、第二シストロンへの移行のみではなく、第一のシストロンによる蛋白合成の速度の上にもみられること、リボゾームを加えずに始発因子を加えた場合に特に促進効果がみとめられないことなどから、第一の考えを支持したい。もう一つ問題にしたいことは、リボゾームがそのまま転がってゆくとすると、30S リボゾームが derived 30S 型になっていることである。native 型と derived 型の 30S リボゾームについては先にも述べたように FMet-tRNA の結合の仕方に差がみられる。このことはリボゾーム調整の仕方に基づく人工的なことも分らないが、蛋白合成の開始、または終結によってリボゾームの上にもたらされる変化かも分らない。以下のことは具体的な実験事実に基づく根拠のあることではないが、先にも述べた FMet-tRNA をまだ結合していない CAP 存在下にできた 70S リボゾームも一応正常の蛋白合成をなしえてしかもメチオニンを先頭にしたものではないこと、今まで知られている限りでは、第一のシストロンの産物である RNA フェージのコート蛋白、ラクトースオペロンの β ガラクトシダーゼがその N 末端にメチオニンをもっていないこと、少なくとも第一シストロンに関しては native 30S リボゾームが関与すること、その native 30S リボゾームは、50S リボゾームの関与なしには FMet-tRNA を結合はするが他のことから考えて多分、ペプチド結合をなしえる形にはついていないであろうこと、などから第一のシストロンと二番目以下のシストロンはそれに使われる native リボゾームのちがいを反映して、蛋白合成の開始機構がいくらか異なっているのではないかということを考えてみたいということである。具体的な実験事実なしに想像を述べることを許してもらうとすれば、以上のことを論理的にさらに一貫するには、² native 50S リボゾームはその調整過程ですでに修飾を受けていて、native 30S リボゾーム上の FMet-tRNA をペプチド結合形成可能な形 (これは F_2 を要する反応であるが) にするようになっていて、本来の 50S リボゾームはそうではないということ、無細胞系において、本来メチオニンを N 末端にもたない RNA フェージのコート蛋白が N 末端にメチオニンをもって出てくるのは無細胞系においてのアーチファクトであるという仮定を含むことになる。いろいろの努力にもかかわらずできた蛋白から特異的な形でメチオニンを切断し去る酵素がまだ見付かっていないのは、このよう

なことを示唆するのかもしれない。

以上のべてきた所のことは、なるべく細心の考慮を計って細胞内の蛋白合成の真の姿に似せる努力の一つであったわけであるが、無細胞系と細胞内とのギャップはいまだに存在していることを同時に示唆したわけで、このような努力は今後ともつづけられることによって、単に情報伝達機構、遺伝子レベルにおける調節機構を解明するだけのものとしての蛋白合成の研究だけでなく、構造の形成、ひろい意味での調節の問題にも手がかりをつかみうるものであると信じて、拙稿を終りたい。

文 献

- 1) T. A. Sundarajan, R. E. Thach, *J. Mol. Biol.*, 19 74 (1966)
- 2) M. Salas, M. B. Hille, J. A. Last, A. J. Wahba, S. Ochoa, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 57 387 (1969)
- 3) R. Roblin, *J. Mol. Biol.*, 36 125 (1968)
- 4) R. E. Kohler, E. Z. Ron and B. D. Davies, *J. Mol. Biol.*, 36, 71 (1968)
- 5) G. N. Godson, R. L. Sinsheimer, *J. Mol. Biol.*, 23 495 (1967)
- 6) M. Nomura, C. V. Lowry, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58 946 (1967)
- 7) T. Ohta, S. Sarkar, R. E. Thach, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58 1638 (1967)
- 8) M. Nirenberg, P. Leder, *Science*, 145 1399 (1964)
- 9) K. Iwasaki, S. Sabol, A. J. Wahba, S. Ochoa, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 542 (1968)
- 10) Y. Ohtaka, S. Spiegelman, *Science*, 142 493 (1963)
- 11) K. Weber, *Biochemistry*, 6 3144 (1967)
- 12) J. M. Ravel, R. L. Thorey, S. Froehner, W. Shive, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 514 (1968)
- 13) R. R. Traut, R. E. Monro, *J. Mol. Biol.*, 10 63 (1964)
- 14) D. L. Engelhardt, R. E. Webster, N. D. Zinder, *J. Mol. Biol.*, 29 45 (1967)
- 15) R. O. P. Kaempfer, M. Meselson, H. J. Raskas, *J. Mol. Biol.*, 31 277 (1968)
- 16) R. E. Monro, K. A. Marker, *J. Mol. Biol.*, 25 347 (1967)
- 17) D. Kolakofsky, K. F. Dewey, J. W. B. Hershey, R. E. Thach, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 61 1066 (1969)

実験・技術編
統生物物理学講座 全12巻
生物物理学会編集

生物科学者待望の実験シリーズ

第10・11巻 細胞生物物理研究法 I・II

編集担当 江橋節郎 神谷宣郎

I・価 2,800円 II・価 2,400円

多彩な生命現象には、現在の物理的思考によっては処理しきれない魅惑的な問題が際限もなく続いている。生物らしい高次の機能から物理学の解析方法が効果的に適用できるようなデータを抽出することは、生物物理学にとって重要な課題である。

第10巻ではまず光学的手段による観察・記録・測定等、一般的な技術からはじめて、生きた細胞の実験的処理法、さらに細胞の諸物理量の測定法を取り扱った。

第11巻には細胞レベルにおける生理的活性の研究法を、各執筆者の貴重な体験に基づいて記述されている。

発売元 丸善 東京 日本橋

発 行 京都市左京区田中門前町 吉岡書店
郵便番号606 振替京都4624