— 原 著 —

肝臓ミトコンドリア蛋白質合成系の 試験管的再構成*

猪口 孝一

日本医科大学第1生化学教室 (主任: 宿谷良一教授)

An *in vitro* system of protein synthesis from the liver
mitochondria of tadpole, *Rana catesbeiana*

Koichi Inokuchi

The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School

An *in vitro* system of mitochondrial protein synthesis was studied. The system was reconstructed with pH 5 and polyribosomal fractions, both of which were prepared from the isolated liver mitochondria of tadpole, *Rana catesbeiana*. The activity of the reconstructed system was assayed by incorporation of L-[4,5-³H] leucine into hot trichloroacetic acid insoluble fraction and by immunochemical determination of cytochrome c oxidase subunit I.

The results obtained are as follows:

1) The activity which is measured in the presence of cycloheximide is inhibited by puromycin, chloramphenicol and erythromycin. The pH and temperature for full activity of the system are 7.1 and 27°, respectively.

2) The system prepared from the liver mitochondria of tadpole at metamorphic climax has higher activity than that from the tadpole at premetamorphic stage.

3) Cytochrome c oxidase subunit I is synthesized by the reconstructed system. The relative rate of synthesis is higher in the system from the tadpole at metamorphic climax than that from the tadpole at premetamorphosis. A high capability of the system to synthesize cytochrome c oxidase subunit I is ascribed at least in part to an increase in the amount of mRNA coding for the subunit I.

Key words : cytochrome c oxidase, mitochondrial protein synthesis, tadpole (*Rana catesbeiana*), metamorphosis, polyribosomal fraction

緒 言

今日までに得られたミトコンドリア形成に関する知見は、主として *Saccharomyces cerevisiae* や *Neurospora crassa* など、下等な真核細胞を用いた研究から得られたものである。これらの結果に従えば、ミト

コンドリアの形成はミトコンドリアおよび細胞質の両者の蛋白質合成系の協調のもとに行われるが、ミトコンドリアを構成する蛋白質のうちミトコンドリア蛋白質合成系に由来するものは極めて少なく、およそ 10 種類にすぎない。大部分は細胞質蛋白質合成系に由来する蛋白質であるとされている¹⁻⁴⁾。最近の知見によ

Present address : The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

本文中の省略記号

HEPES : N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulfonic acid, EDTA : ethylen diamine tetraacetic acid, SDS : sodium dodecyl sulfate, TCA : trichloroacetic acid, IgG : immunoglobulin G, ATP : adenosine triphosphate, GTP : guanosine triphosphate, mRNA : messenger ribonucleic acid, RNase : ribonuclease

れば、ミトコンドリア固有の蛋白質合成系は細胞質由来の蛋白質によって調節されていることを示唆しているが、ミトコンドリアおよび細胞質両蛋白質合成系の協調の機構については明らかでない⁵⁻⁹⁾。特に動物細胞におけるミトコンドリア形成機構についてはほとんど知見がないのが現状である。

cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1. ferrocytochrome c : oxygen oxidoreductase) は、ミトコンドリアおよび細胞質両蛋白質合成系由来のポリペプチドによって構成されているから^{1-3, 10-12)}両蛋白質合成系の協調を知る上で極めて有用な酵素である。Goto ら¹⁰⁾はウシカエル (*Rana catesbeiana*) 幼生肝臓では変態期にミトコンドリア形成が著しく盛んになること、またその際に cytochrome c oxidase の合成と分解が特異的に促進されることを明らかにした。

著者はこの事実に注目し、幼生肝ミトコンドリアを用いて試験管的ミトコンドリア蛋白質合成系を再構成し、変態期間中に観察されるミトコンドリア蛋白質、特に cytochrome c oxidase の合成促進に関する分子生物学的な機序について検討を試みた。

実験材料および方法

(1) 材料

ウシカエルの幼生は松本実験動物研究所より、またウサギ (日本白色在来種) は日本生物材料センターより購入した。試薬類は下に示す各社の製品を使用した。

cytochrome c (horse heart) (Boehinger Mannheim 社), sodium cholate (Sigma 社), sodium deoxycholate (Difco 社), HEPES および cycloheximide (和光純薬), Protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia 社), DEAE Affi Gel Blue (Bio-Rad 社), L[4,5-³H] leucine (150 Ci/mmol) (RCC Amersham 社), leupeptin, chymostatin, pepstatin および antipin (Protein Research Foundation), その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

(2) 方法

幼生は Taylor and Kollros¹⁷⁾ に従って分類し, stage X のものを変態前期幼生, stage XXII のものを変態極期幼生として実験に供した。また, 実験器具, 試薬ならびに緩衝液などは, すべて高温高压消毒処置し化学的に清浄なものを用いた。

1) ミトコンドリアの調製

ウシカエル幼生の肝臓を3倍量の Buffer A (2 mM HEPES, pH 7.4, 220 mM mannitol, 70 mM sucrose,

10 mM mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 0.1 mM diethylpyrocarbonate) を用いてホモジナイズした。ミトコンドリアの分離には Bustamante ら¹⁸⁾の方法を用いた。ミトコンドリアを Buffer B (10 mM Tris-maleate, pH 6.7, 1 mM EDTA, 0.5 M sorbitol) を用いて, EDTA が低濃度になるように3回洗浄してから, Buffer C (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NH₄Cl, 10 mM Mg acetate, 5 mM mercaptoethanol, 100 μg/ml heparin sulfate) に蛋白質濃度 12.5 mg/ml になるように懸濁した。通常, 幼生肝 45 g からミトコンドリア蛋白質 200 mg が得られた。

2) ポリゾーム分画および pH 5 分画の調製

ミトコンドリア懸濁液 (12.5 mg/ml) に新しく調製した 5% sodium deoxycholate を 1/10 容, および 10 mg/ml の heparin sodium を 1/100 容添加し, 5 分間静かに攪拌し, その後 18,000×g で 20 分間遠心し mitochondrial lysate を調製した。

Buffer C を用いて 1.2 M に調製した RNase-free sucrose 3 ml を cushion とし, mitochondrial lysate を静かに重層し, 95,000×g, 16 時間遠心した。上清の pH を 1 M acetic acid を用いて pH 5.0 に調整し 18,000×g, 30 分遠心し, その沈殿物を 2 ml の Buffer D (40 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM Mg acetate, 30 mM NH₄Cl, 5 mM mercaptoethanol) に懸濁した。ついで, 懸濁液の pH を 0.1 M KOH を用いて pH 7.8 とし, 5,000×g, 20 分間遠心後の透明な上清を pH 5 分画とした。沈殿物は蒸留水でよく洗浄してから, 少量の Buffer D に懸濁し, 新しく調製した 5% sodium deoxycholate を 1/10 容添加した。この懸濁液を 1,000×g, 5 分間遠心後, その上清をポリゾーム分画として用いた。このポリゾーム分画は通常 A 260/280 比が 1.3~1.5 であった。

3) 蛋白質合成活性の測定

蛋白質合成活性は次の組成の反応液 (0.1 ml) 中で測定した。40 mM Tris-acetate, pH 7.8, 10 mM Mg acetate, 100 mM NH₄Cl, 2 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, 16 mM creatine phosphate, 3.2 μg creatine kinase, 20 μM GTP, 0.72 mM cycloheximide, 20 μCi L-[4,5-³H]leucine (150 Ci/mmol) と他の 19 種のアミノ酸をそれぞれ 40 μM を含み, これにポリゾーム分画および pH 5 分画を所定の量だけ加えた。incubation は 27°C, 5 分間行った。反応は 0.5% leucine を含んだ 10% trichloroacetic acid 1 ml を加え

て停止した。その後 20 分間沸騰温浴中で加熱し、生じた沈殿を遠心によって集めた。沈殿は 1 M NaOH 0.1 ml で溶解し、さらに 1 M HCl 0.1 ml を添加後 0.5% cold leucine を含む 10% trichloroacetic acid 1.0 ml を加えて再沈殿した。30 分間氷冷した後沈殿物を Whatmann glass microfiber disc GF/C 上に集め、filter disc の上で 25 ml の 5% (W/V) trichloroacetic acid で洗浄後乾燥させ放射活性を測定した。

4) ミトコンドリアポリゾームの沈降分析

変態前期および変態極期の幼生に cycloheximide (50 $\mu\text{g/g}$ of body weight) を腹腔内に注射し、細胞質蛋白質合成を阻害させ、その 1 時間後 L-[4,5- ^3H] leucine (0.25 $\mu\text{Ci/g}$ of body weight) を腹腔内に注射した。L-[4,5- ^3H] leucine 投与 1 時間後に、1) の方法にてミトコンドリアを採取し mitochondrial lysate を調製した。この lysate を 20,000 $\times g$, 20 分間遠心し、その上清 1 ml (10 unit₅₀₀) を heparin sodium (100 $\mu\text{g/ml}$) と 100 mM mercaptoethanol を含む Buffer C で調製した 20~60% (W/V) のショ糖密度勾配上に重層し、日立 RPS 27 swinging bucket rotor にて 90,000 $\times g$, 15 時間遠心した。遠心後、遠心管底より 10 滴ずつ分画した。各分画の密度は屈折計を用いて測定した。ミトコンドリアのポリペプチドの放射活性は 10% トリクロル酢酸にて沈殿させ、3) に記載したごとく測定した。

5) Cytochrome c oxidase の subunit I 抗体の調製

cytochrome c oxidase は Nagasawa ら¹⁹⁾ の方法に準じてカエル肝臓より精製した。精製酵素を SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動によって九つの subunit に分離し、ゲルより subunit I を切り出し、蟻酸 0.2 M 中で溶出した。この subunit I (1 mg) に Freund's complete adjuvant を等量加え乳濁液を作り、これを雌白色ウサギの背部皮内に数カ所に分けて注射した。毎週 1 回 6 週間免疫した。最終注射後 1 週間目に耳静脈より採血し血清を分離した。50% 硫酸による分画を 3 回繰り返したのち、DEAE-Affi-Gel Blue の column により、IgG 分画を精製した。また、免疫前のウサギより精製した IgG 分画を対照抗体として使用した。subunit I 抗体は subunit I と強く反応したが、cytochrome c oxidase との反応はわずかであった。

6) Cytochrome c oxidase subunit I の合成速度の測定

反応液は全量を 2.0 ml とし、その組成は 3) 項の

蛋白質合成反応系にポリゾーム (4.2 unit₅₀₀) と、pH 5 分画 (12 mg 蛋白質) を加えた。27°C で 6 分間 incubate し、反応は 40 μmol EDTA を加えて停止し、反応生成物より cytochrome c oxidase を免疫化学的に分離するために次の操作を行った。反応停止後反応液に Buffer E (100 mM potassium phosphate, pH 7.4, 4 mM EDTA, 1% Non-Idet P-40, 400 mM NaCl) を 0.7 ml 加え、精製した cytochrome c oxidase 10 μg を抗原抗体反応のキャリアーとして加えた。抗体と subunit I の反応に先立って、非特異的吸着物を除去するために、免疫前のウサギより精製した対照 (3 mg 蛋白質) を加えて 4°C で 15 時間放置し、Ivarie ら²⁰⁾の方法に準じ *Staphylococcus aureus* Cowan type II の 10 V/V% 懸濁液を加え室温で 1 時間おだやかに振盪し、非特異的吸着物を *Staphylococcus aureus* Cowan type II に吸着させ、遠心によって除去した。この上清に 3 mg の anti-cytochrome c oxidase subunit I-IgG を加えて 4°C, 15 時間放置し、抗原抗体反応を行った。反応後、反応液に 50 mg の protein A-sepharose CL 4 B を加えて、抗原抗体反応生成物を吸着させた。この吸着した抗原抗体反応物を Buffer F (60 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM EDTA, 10% (W/V) ficol, 6% SDS) に溶解し、5 mM dithiothreitol で還元し、ついで 10 mM iodoacetamide で SH 基を alkyl 化した。遠心操作により protein A-sepharose CL 4 B を除去し、上清中の cytochrome c oxidase について Laemmli²¹⁾の方法に準じて SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動を行い subunit I を分離した。泳動後ゲルを 0.1% coomassie brilliant blue R-250, 40% メタノール, 20% 酢酸溶液で染色し、続いて 25% メタノール, 7.5% 酢酸溶液により脱色した。脱色後、島津 2 波長クロマトスキャナー 910 型を用い 560 nm でスキャンし、2 mm の間隔でゲルを切り出した。subunit I に相当するゲル切片に 0.5 ml の 35% H₂O₂ を加え 80°C に加温しゲルを溶融した。冷却後、放射活性を測定した。

7) 蛋白質の定量

蛋白質は Lowry ら²²⁾および Bradford²³⁾の方法に従い定量した。

結 果

1. 再構成ミトコンドリア蛋白質合成系の活性

まず初めに変態前期幼生肝ミトコンドリアから調製したポリゾーム分画および pH 5 分画のミトコンドリ

Fig. 1 Time course of L-[4,5-³H] leucine incorporation into hot trichloroacetic acid-insoluble fraction in the mitochondrial protein synthesis system

Polysomal and pH5 fractions were prepared from the liver mitochondria of tadpole at premetamorphic stage. The reaction mixture was composed of 1.5 unit₂₆₀ of polysomal fraction and 1.1 mg of pH5 fraction. When temperature and pH dependencies were determined, the polysomal fraction was prepared as follows. The mitochondrial lysate was centrifuged at 20,000 × g for 20 min. The clear and mitochondrial membrane free supernatant (8 ml) was layered on a discontinuous sucrose gradient which was prepared from 2 ml of 2.5 M sucrose and 5 ml of 1.2 M sucrose, and centrifuged at 75,000 × g for 15 h with a Hitachi RPS-27 swinging bucket rotor. The opalescent polysomes which banded at the interface of the two sucrose solutions, were collected in 0.5 to 0.7 ml each by puncturing the side of the tubes with a sterile syringe at the right below the band. The reaction mixture consisted of 0.288 unit₂₆₀ of polysomal fraction and 13.2 μg of pH5 fraction. The medium was adjusted to the indicated pH with 40 mM Tris acetate.

ア蛋白質合成能を検討した。

L-[4,5-³H] leucine および leucine を除いた 19 種のアミノ酸, ATP およびその産生系と, 細胞質蛋白質合成阻害剤である cycloheximide の存在下にポリ

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of the translation product

The incubation mixture (1 ml) was composed of 8.95 unit₂₆₀ of polysomal fraction and 4.8 mg of pH5 fraction which were prepared from the liver mitochondria of tadpole at premetamorphic stage. The reaction was stopped by addition of 2% SDS and 70 μl of mercaptoethanol. The reaction mixture was boiled for 3 min, and dialysed against 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 0.1% SDS and 10 mM mercaptoethanol to remove L-[4,5-³H] leucine. Then it was concentrated to 0.4 ml with solid sucrose. One volume of buffer was added to the sample and incubated for 90 min at 37°C. The sample (0.2 ml) was alkylated with 20 mM iodoacetamide and was subjected to a gel electrophoresis as described in Methods. The radioactivity in the gel was determined after slicing at every 2 mm interval. Arrow indicates the position of tracking dye.

ゾーム分画と pH5 分画を混和し incubate した。

Fig. 1 は hot-trichloroacetic acid 不溶性画分に取り込まれた放射活性を反応時間に対して作図したものである。取り込まれた放射活性はおよそ 3 分間直線的に増加し、6~8 分間で極大に達した。Fig. 1 は放射活性の取り込みに対する pH, 温度の影響を示したものである。この図から明らかなように [³H]-leucine 取り込み活性の至適 pH は 7.1 であり、至適温度は約 27°C である。

Table 1 は放射活性取り込み能に対する各種抗生物質の効果を示したものである。この放射活性の取り込みはペプチド鎖の延長過程を阻害する puromycin に

Table 1 Inhibition of activity of submitochondrial translation system by antibiotics

	Radioactivity cpm/unit ₂₆₀ /min	Inhibition %
Control	1,530	0
Puromycin	470	69
Chloramphenicol	480	69
Erythromycin	340	78

The reaction mixture (1 ml) contained 0.9 unit₂₆₀ of polysomal fraction and 0.4 mg of pH 5 fraction. Cycloheximide was contained at a concentration of 0.7 mM in all the incubation mixtures. Inhibitors for mitochondrial protein synthesis examined were added at the following concentrations. Puromycin; 0.5 mg/ml, chloramphenicol; 2 mg/ml and erythromycin; 2 mg/ml.

よって 69% 阻害される。また、ミトコンドリア蛋白質合成を特異的に阻害する chloramphenicol,あるいは erythromycin によってそれぞれ 69, 78% 阻害される。この反応系から ATP およびその産生系を除くと、放射活性の取り込みは対照の 16% に低下した。

反応生成物の分析は SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動によって行った。Fig. 2 に示したように放射活性の高い3本の蛋白質の band を認めた。その移動度から3本の band は、それぞれ分子量 42,000, 26,000, 15,000 dalton の分子量を有する polypeptide と推定された。

以上のように cycloheximide 存在下における放射活性の取り込みが ATP に依存し、ミトコンドリア蛋白質合成阻害剤である各種の抗生物質によって阻害されること、および SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動の結果から、取り込まれた放射活性はミトコンドリアの蛋白質合成系による蛋白質合成能を反映するものと考えられる。

2. 再構成ミトコンドリア蛋白質合成系活性と変態との関連

再構成したミトコンドリア蛋白質合成系の活性が生体内におけるミトコンドリア蛋白質合成能、すなわちミトコンドリア形成能を反映しているかどうかを知るため、変態期の幼生肝ミトコンドリアより蛋白質合成系を再構成し変態前期のものと比較することを試みた。

変態前期および変態極期の幼生肝のミトコンドリアより、それぞれのポリゾームおよび pH 5 分画を調製した。これらの分画を組み合わせて蛋白質合成系を再構成した。Table 2 は再構成した蛋白質合成系の活性である。pH 5 分画だけでは放射活性の蛋白質への取り込み活性は認められなかった。他方、ポリゾーム分画だけでは放射活性の若干の取り込みが観察された。pH 5 とポリゾーム両分画を組み合わせると放射活性の増加が認められ、特に変態極期幼生肝ミトコンドリアから調製した pH 5, ポリゾームの両分画を組み合わせた場合に最も高い活性が観察された。この結果は取り込み活性の増加を支配する要因が変態極期のミトコンドリアの pH 5 およびポリゾーム両分画にあることを示唆している。

3. ポリゾームパターンの変化

変態極期の幼生肝ミトコンドリアの pH 5, ポリゾーム分画よりなる蛋白質合成系の活性は著明に高かったが、活性上昇の要因の一つとして変態極期の幼生肝ミトコンドリアポリゾーム分画には mRNA が増加していることが予想される。この点を検討するために、変態前期および変態極期の幼生肝ミトコンドリアより

Table 2 The activities of submitochondrial translation system

Polysomal fraction	pH 5 fraction	Radioactivity incorporated cpm/unit ₂₆₀ /min
—	Premetamorphic stage	N.D.
—	Metamorphic climax	N.D.
Premetamorphic stage	—	272
Metamorphic climax	—	232
Premetamorphic stage	Premetamorphic stage	552
Premetamorphic stage	Metamorphic climax	490
Metamorphic climax	Premetamorphic stage	471
Metamorphic climax	Metamorphic climax	1,124

N.D.: not detected

Polysomal and pH 5 fractions from tadpoles at premetamorphic stage and metamorphic climax were homologously and heterologously combined. Polysomal (0.05 unit₂₆₀) and pH 5 (0.1 mg) fractions were used.

Fig. 3 Sedimentation profile of polysome in the mitochondrial lysate from the liver of tadpoles at premetamorphosis (A) and at metamorphic climax (B)

Tadpoles at premetamorphosis and metamorphic climax were pretreated with cycloheximide (50 $\mu\text{g/g}$ of body weight) for one hour and then injected with 0.25 μCi of L-[4, 5- ^3H] leucine per g of body weight. Mitochondria were prepared from the livers of tadpoles at one hour after the injection of L-[4, 5- ^3H] leucine. The mitochondria (12.5 mg/ml) were lysed with 0.5% deoxycholate. The lysate was centrifuged at $20,000\times g$ for 20 min. One ml of the supernatant ($=10\text{unit}_{260}$) was layered on a sucrose gradient (20 to 60 W/V%) which was prepared in Buffer C containing 100 $\mu\text{g/ml}$ of heparin and 100 mM mercaptoethanol. After centrifugation at $90,000\times g$ for 15 h by using a Hitachi RPS 27 swinging bucket rotor, every ten droprets were fractionated from the bottom of the tube. The arrow indicates the region at where monosome of the mitochondria was equilibrated (the density= 1.120).

ポリゾーム分画を調製し、そのショ糖密度勾配遠心法によって、ポリゾームパターンを比較検討した。Fig. 3A は変態前期、Fig. 3B は変態極期のミトコンドリアポリゾームパターンを示したものである。なお、試料調製に当たってミトコンドリア蛋白質合成系による [^3H]-leucine の取り込みをより特異的にかつ明瞭にするために、肝摘出2時間前に cycloheximide (50 $\mu\text{g/g}$ body weight) を腹腔内に投与し細胞質蛋白質合成を停止させ、その1時間後に1匹当たり 5 μCi の [^3H]-leucine を腹腔内に投与した。このようにして調製した mitochondrial lysate では全体の放射活性のレベルは変態前期のほうがむしろ高かった。これはすでに報告したように肝臓内の leucine pool が変態極期に増大していることによると考えられる¹⁰⁾。Fig. 3の矢印はモノゾームの位置を示している。Fig. 3A に示すように変態前期では 260 nm の吸光度曲線が No. 33 で単一のピークを示し、比較的単純な沈降像を示したが、変態極期では Fig. 3B に示すように 260

nm の吸光度曲線は複雑で No. 15, 26 および 33 の三つの分画にピークを示した。また放射活性はいずれの場合も 260 nm 吸光度曲線に一致して分布していた。したがって変態前期と比べて変態極期では、蛋白質合成を行っているポリゾームはその大きさがより多様であることが分かる。前項で述べた変態極期の幼生より調製した再構成ミトコンドリア蛋白質合成系が高い活性を示す事実と、ここで観察した複雑なポリゾームパターンの結果から、変態極期の幼生肝ミトコンドリアでは変態前期の場合より mRNA が増加し、ポリゾームのサイズが多様化しているものと推察される。

4. Cytochrome c oxidase subunit I の合成

前項で観察した変態極期におけるミトコンドリア mRNA 増加を示唆する結果と、Goto ら¹⁰⁾がすでに報告している変態極期における cytochrome c oxidase の *in vivo* での合成促進との関連を知るために、再構成したミトコンドリア蛋白質合成系による cytochromo-

Table 3 Relative rate of synthesis of cytochrome c oxidase subunit I

	Total radioactivity for subunit I (A) cpm/unit ₂₆₀	Radioactivity (B) cpm/unit ₂₆₀	Relative rate (B/A)
Premetamorphic stage	1,124	40	3.6×10^{-2}
Metamorphic climax	1,672	122	7.2×10^{-2}

Each (4.2 unit₂₆₀) of two polysomal fractions which were prepared from tadpoles at premetamorphic stage and at metamorphic climax was combined with pH 5 fraction (11.9 mg) prepared from tadpole at metamorphic climax to reconstruct the systems.

me c oxidase subunit I の合成速度を、変態前期と変態極期の幼生肝ミトコンドリアについて比較検討した。Table 3 はその結果である。二つの再構成ミトコンドリア蛋白質合成系を調製するに当たって、いずれの場合も pH 5 分画は変態極期の幼生肝ミトコンドリアより調製したものをを用いた。これは、変態の進展に伴った pH 5 分画の質的、量的変化の活性への影響を除外するためである。ポリゾーム分画は変態前期および変態極期の幼生ミトコンドリアより調製したものをを用いた。これらの系によってポリペプチドに取り込まれたすべての放射活性を Table 3 (B) に記載した。subunit I の合成速度は両者の比 (B/A)、すなわち相対速度として表した。Table 3 に示したように subunit I の相対的合成速度は、変態前期では 3.6×10^{-2} 、変態極期では 7.2×10^{-2} であった。すなわち、変態極期の幼生肝ミトコンドリアポリゾーム分画中には、subunit I に対する mRNA が変態前期の約 2 倍に増加していると推察される。これは同時に Fig. 3 の結果を支持している。

考 察

変態の経過に伴って、ウシカエル幼生肝臓では、各種のミトコンドリア酵素の合成が誘導促進される²⁴⁻²⁸⁾。一方、この時期にはミトコンドリアの形成も盛んで、新しいミトコンドリアは幼若なまま分裂することが知られているから、合成が促進されたミトコンドリア酵素は、ミトコンドリアの成熟とともにミトコンドリア内に輸送され増加すると考えられる¹⁶⁻²⁰⁾。すなわち、この時期のミトコンドリア形成は特有の機序によって調節されていると考えられる^{29,30)}。このような調節機構を明らかにするためには、まず細胞質およびミトコンドリア両蛋白質合成系それぞれの特徴を知ることが重要である。通常、ウシカエル幼生肝臓から

細胞質分画の蛋白質合成系を調製することは、リボヌクレアーゼ活性が極めて高いので非常に困難とされている³¹⁾。今回著者は、幼生肝ミトコンドリアからミトコンドリア蛋白質合成系を再構成することに成功したが、その理由として細胞質成分の混入を除くことができたこと、および変態極期にはミトコンドリアポリゾームが蛋白質と aggregate しており、リボヌクレアーゼに対する抵抗性が著しく高くなっていること³²⁾の 2 点を挙げることができる。再構成した試験管的ミトコンドリア蛋白質合成系の活性の至適条件を設定し、しかもその系により cytochrome c oxidase subunit 合成を可能にしたこと、さらにこの活性が *in vivo* で観察されるミトコンドリア形成能を反映していることを確かめることができたことは、今後ミトコンドリア形成、すなわち細胞質およびミトコンドリア両蛋白質合成系の協調を知る上で重要な足掛かりになると期待される。

変態の二つの stage (変態前期、変態極期) の幼生肝ミトコンドリア中のポリゾームのショ糖密度勾配遠心像は著明に相違した。後者ではポリゾームと蛋白質との結合体が少なくとも 3 種類観察されるのに対して前者では 1 種類を認めるのみである。この相違は① mRNA と結合したリボソームの数が相違する場合、② ポリゾームと結合した蛋白質の量の相違による場合の 2 点が考えられるが、現在のところ明らかでない。

Amuro ら³⁰⁾は単離したミトコンドリアによる試験管的 cytochrome c oxidase の合成を観察して、この酵素合成が半減期の短い細胞質由来の蛋白質によって調節されていることを示唆する結果を得た。著者が再構成した試験管的ミトコンドリア蛋白質合成系には、このような細胞質由来の調節因子は含まれていない。したがって著者の系は調節因子の調製、同定に今後十分活用できるものと考えられる。

cytochrome c oxidase subunit I の試験管的合成速度が変態極期では変態前期と比べて約 2 倍増加している結果を得た。これは subunit I を code している mRNA が増加しているためと考えられる。他方、Amuro らによれば生体内における cytochrome c oxidase の合成速度は変態極期では変態前期の 5.3 倍である³⁰⁾。*in vivo* における cytochrome c oxidase 合成速度が試験管的に観察した速度よりはるかに高い値であることから、cytochrome c oxidase 合成の調節には、翻訳の段階のみならず転写段階でも促進的に調節されていることが推察される。

結 論

1) ウシカエル幼生肝臓のミトコンドリアから調製したポリゾーム分画と pH 5 分画を用いて試験管的蛋白質合成系を再構成した。

2) この系の蛋白質合成は puromycin, chloramphenicol, erythromycin によって抑制された。また、この系の最適 pH は 7.1, 最適温度は 27°C であった。

3) 試験管的ミトコンドリア蛋白質合成系の活性は生体内のミトコンドリア蛋白質合成活性とよく対応した。

4) 試験管的 cytochrome c oxidase subunit I の合成の相対速度は変態前期よりも変態極期幼生肝ミトコンドリアより調製した合成系のほうが高かった。

稿を終わるにあたり、直接の御指導を頂いた第1生化学教室後藤至孝講師、御協力頂いた安室尚樹助手ならびに同教室員各位に深く謝意を表します。また、研究の機会を与えて下さった日本医科大学第3内科教室常岡健二教授に深く謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第 55 回日本生化学会大会 (1982 年 10 月、大阪) において発表した。

文 献

- Schatz, G., and Mason, T.L.: The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 51~87, 1974.
- Tzagoloff, A., and Macino, G.: Mitochondrial genes and translation products. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 419~441, 1979.
- Poyton, R.O.: Cooperative interaction between mitochondria and nuclear genomes. "Current topics in cellular regulation" (Horecker, B.L., and Stadtman, E.R. eds.), Vol. 17, p. 231~295, Academic Press, New York, 1980.
- Pfisterer, J., and Buetow, D.E.: *In vitro* reconstruction of the mitochondrial translation system of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4917~4921, 1981.
- Ohasi, A., and Schatz, G.: Stimulation *in vitro* mitochondrial protein synthesis by yeast cytoplasmic extracts is caused by guanyl nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **255**, 7740~7745, 1980.
- Finzi, E., and Beattie, D.S.: Partial purification of postpolysomal factors essential for optimal rates of yeast mitochondrial protein synthesis. "The organization and expression of the mitochondrial genom" (Kroon, A.M., and Saccone, C. eds.), p. 315~318, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1980.
- Finzi, E., Sperling, M., and Beattie, D.S.: Partial purification of cytosolic proteins which control yeast mitochondrial protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11917~11922, 1981.
- Kumar, C.C., and Padmanabam, G.: Evidence for the involvement of a rapidly turning over protease in the degradation of cytochrome oxidase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 576~583, 1981.
- Lapolla, R.J., and Lambowitz, A.M.: Mitochondrial ribosome assembly in *Neurospora*; Structural analysis of mature and partially assembled ribosomal subunits by equilibrium centrifugation in CsCl gradients. *J. Cell Biol.*, **95**, 267~277, 1982.
- Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C., and Schatz, G.: Cytochrome c oxidase from Bakers' yeast; Isolation and properties. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1346~1354, 1973.
- Weiss, H., Sebald, W., and Bücher, T.: Cycloheximide resistant incorporation of amino acids into a polypeptide of the cytochrome oxidase of *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem. (Tokyo)*, **22**, 19~26, 1971.
- Rubin, M.S., and Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system; Purification, characterization, and subunit structure of yeast and beef cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4269~4274, 1973.
- Werner, S.: Preparation of polypeptide subunits of cytochrome oxidase from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.*, **79**, 103~110, 1977.
- Malmström, B.G.: Cytochrome c oxidase; Structure and catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 281~303, 1979.
- Merle, P., and Kadenbach, B.: The subunit composition of mammalian cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.*, **105**, 499~507, 1980.
- Goto, Y., Amuro, N., and Shukuya, R.: Cytochrome c oxidase from the liver of bullfrog, *Rana catesbeiana* and change in its turnover rate during metamorphosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 102~109, 1982.
- Taylor, A.C., and Kollros, J.J.: Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.*, **94**, 2~23, 1946.
- Bustamante, E., Soper, J.W., and Pedersen, P.L.: A high yield preparation method for isolation of rat liver mitochondria. *Anal. Biochem.*, **80**, 401~408, 1977.
- Nagasawa, T., Nagasawa-Fujimori, H., and Heinrich, P.C.: Hydrophobic interactions of cytochrome c oxidase; Application to the purification of the enzyme from rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **94**, 31~39, 1979.
- Ivarie, R.D., and Jones, P.P.: A rapid sensitive assay for specific protein synthesis in cells and in cell-free translations; Use of *Staphylococcus aureus* as an adsorbent for immune complexes. *Anal. Biochem.*, **97**, 24~35, 1979.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680~685, 1970.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin

- phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265~275, 1951.
- 23) Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248~254, 1976.
 - 24) Cohen, P.P. : Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis; Thyroxine affects liver cytology, transcription, translation, and mitochondrial level. Science, **168**, 533~543, 1970.
 - 25) Cohen, P.P., Bruker, R.F., and Morris, S.M. : Cellular and molecular aspects of thyroid hormone action during amphibian metamorphosis. "Hormonal proteins and peptides" (Haoli, C. ed.), **6**, 273~381, Academic Press, New York, 1976.
 - 26) Bennett, T.P., Glenn, J.S., and Sheldon, H. : Changes in the fine structure of Tadpole (*Rana catesbeiana*) liver during thyroxineinduced metamorphosis. Dev. Biol., **22**, 232~248, 1970.
 - 27) Bennett, T.P., and Glenn, J.S. : Fine structural changes in liver cells of *Rana catesbeiana* during natural metamorphosis. Dev. Biol., **22**, 535~560, 1970.
 - 28) Kim, K.H., and Cohen, P.P. : Modification of tadpole liver chromatin by thyroxine treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55**, 1251~1255, 1966.
 - 29) Goto, Y., Amuro, N., Ohki, Y., and Shukuya, R. : Heterogeneity in the liver mitochondria of the tadpole, *Rana catesbeiana*. Comp. Biochem. Physiol., **72 B**, 637~640, 1982.
 - 30) Amuro, N., Goto, Y., and Shukuya, R. : Biosynthesis of cytochrome c oxidase by isolated liver mitochondria of the tadpole, *Rana catesbeiana*. FEBS Lett., **148**, 59~62, 1982.
 - 31) Tomita, Y., Goto, Y., Okazaki, T., and Shukuya, R. : Liver ribonucleases from the bullfrog, *Rana catesbeiana*; Purification, properties and changes in activity during metamorphosis. Biochim. Biophys. Acta, **562**, 504~514, 1979.
 - 32) Goto, Y. : Personal communication. 1983.

(受付 : 1983 年 5 月 10 日)