真核細胞のポリペプチド鎖延長反応機構†

(昭和 45 年度農芸化学奨励賞受賞)

江 尻 慎 一 郎

(岩手大学農学部農芸化学科)

I. はじめに

ポリペプチド鎖延長反応は、リボソーム上で遺伝情報が翻訳される過程の中核となる反応であり、その分子機構ならびに調節機構を知ることは、生物科学の基礎としてきわめて重要な課題である。

ここ 20 年にもおよぶ膨大な研究の結果、大腸菌の系を中心としたポリペプチド鎖延長反応の機構がほぼ確立され (図 8 参照)^(1,2), 混乱していた真核細胞のポリペプチド鎖延長反応の機構⁽³⁾も、カイク絹糸腺やブタ肝延長因子⁽⁴⁾の解析などにより、ようやく統一に向かいつつある (表 1 および図 8 参照). 各種生物の延長反応に関する知見を、カイク絹糸腺の延長因子を中心に整理し、今後のタンパク質合成研究の展望に役立てたい。

II. ポリペプチド鎖延長反応に関する研究の流れ

1954 年から 1958 年にかけて Hoagland および Zamecnik ら⁽⁵⁾は、ラット肝無細胞系で、アミノアシル-tRNA (aa-tRNA) を基質としたリボソーム上でのタンパク質合成には、GTP と細胞の可溶性画分を必要とすることを発見した。可溶性画分は転移酵素 (transfer enzyme) と名付けられ、1960 年に諸外国と時を同じくして、わが国でも高浪および岡本⁽⁶⁾がラット肝、鈴鹿および志村⁽⁷⁾がカイク絹糸腺中に見出した。1963 年に Fresenden および Moldave⁽⁸⁾はラット肝、Arlinghaus ら⁽⁹⁾はウサギ網状赤血球の転移酵素を相補的な画分、すなわち転移酵素 I および II に分離することに成功した。前者は aa-tRNA をリボソームの A 部位に結合する因子であり、現在の EF (ポリペプチド鎖延長因子, elongation factor)-1 である⁽¹⁰⁾。後者はペプチド結合合成酵素⁽⁹⁾と考えられたが、後に大腸菌の EF-G と同様にペプチジ

ル-tRNA の転移 (トランスロケーション) に関する因子であることが明らかにされ EF-2 と命名された⁽¹⁰⁾。

以上のように、タンパク質合成研究の重要な発見が真核細胞で成されたが、1961 年の Nirenberg および Matthaei⁽¹¹⁾による poly (U) 依存性ポリフェニルアラニン合成系の発見を契機として、研究の主流が前核細胞の系に移っていった。前核細胞延長因子の初期の研究は Lipmann らに負うところが大きい。彼らは大腸菌より、EF-1 に相当する EF-T と EF-2 に相当する EF-G を得た⁽¹²⁾。さらに、EF-T を熱に不安定な EF-Tu と安定な EF-Ts に分離した⁽¹³⁾。EF-Tu は GTP 存在下に aa-tRNA をリボソームの A 部位に結合させる因子であり (図 8 参照), EF-Ts は結合反応により生じた EF-Tu·GDP から EF-Tu·GTP を再生する次のヌクレオチド交換反応を触媒する^(1,2,14,15)。

以上のように、前核細胞の aa-tRNA 結合反応には、EF-Tu および EF-Ts の 2 種類の可溶性タンパク因子が関与することが明らかにされた。一方、EF-1 は前核細胞に先がけて発見されたにもかかわらず解析が遅れた。そのおもな原因は、1) 真核細胞の EF-1 には種々の分子量の多形が存在し^(16,32-35)、精製が著しく困難であったこと、2) 高分子量の EF-1 (EF-1_H, 分子量約 130,000 以上) と低分子量の EF-1 (EF-1_L, 約 50,000) の関連性、EF-1_H のサブユニット組成などが不明であったこと、3) EF-Ts に相当する因子が発見されておらず、ヌクレオチド交換の機構が不明であったことである。これらの難関は、カイク絹糸腺延長因子の約 5 年にわたる解析から突破口が見出された。すなわち、カイク絹糸腺

† Polypeptide Chain Elongation in Eukaryotes.
Shin-ichiro EJIRI (Department of Agricultural
Chemistry, Iwate University, Morioka 020)

表 1 ポリペプチド鎖延長因子 1 の分類

<i>E. coli</i> (27)	カイコ絹糸腺 (18, 19)	ブタ肝臓 (4)	<i>Artemia salina</i> (24)	コムギ胚 (28)	腹水細胞 (25)	酵母 (29, 30)	ウサギ網状赤血球 (31)	その他 (32-35)
EF-Tu (47K)	EF-1a (51K)	EF-1 α (53K)	eEF-Tu, A (53K)	A (52K)	EF-1 α (~50K)	EF-1	EF-1 $_L$ (62K)	EF-1 $_L$
EF-Ts (36K)	EF-1b (26K)	EF-1 β (30K)	eEF-Ts, C (26K)	C (27K)	EF-1 β (~30K)	[EF-3] ?	熱安定性 EF-1 $_H$	?
?	EF-1c (46K)	EF-1 γ (55K)	B (51K)	B (47K)	?		?	?
EF-Tu·EF-Ts (EF-1 $_H$ ·EF-1 α ·EF-1 β ·EF-1c)		EF-1 $_H$ (EF-1 $\alpha\beta\gamma$)	EF-1 $_H$ (A·B·C)	EF-1 $_H$ (A·B·C)			EF-1 $_H$ (EF-1 $_L$ ×3)	EF-1 $_H$ (EF-1 $_L$ ×3>)

から、EF-1 依存性の aa-tRNA 結合反応を促進する因子 (EF-1b) が発見され^(17,18)、カイコ絹糸腺 EF-1 $_H$ が 3 種類のサブユニット、EF-1a, EF-1b, EF-1c (発見当時の α , γ , β) より構成されることが明らかになった^(18,19)。以下の各項で EF-1a が EF-Tu, EF-1b が EF-Ts に相当する因子であること⁽¹⁷⁻²⁰⁾、EF-1 $_H$ と EF-1 $_L$ の性質の相違などについて概説する。

EF-1b に相当する因子はその後ブタ肝⁽²¹⁻²³⁾、*Artemia salina*⁽²⁴⁾、Krebs II 腹水細胞⁽²⁵⁾、ウサギ網状赤血球⁽²⁶⁾などでも発見された。EF-1 $_H$ が 3 種類のサブユニットを持つことも多くの生物で明らかになり、各サブユニットの対応関係も明確になりつつある (表 1)。真核細胞間での EF-1 の多様性は、異なる命名法による見かけの多様性ほどではない。

ペプチド結合生成に関与する peptidyl transferase は、リボソームの大亜粒子中に存在すると考えられており、P 部位のペプチジル-tRNA のペプチド部分を A 部位に結合した aa-tRNA のアミノ基に転移する (ペプチジルトランスファー)。アミノ酸が 1 個延長した A 部位のペプチジル-tRNA は EF-2 (EF-G) および GTP が関与して P 部位に転移 (トランスロケーション) して延長のサイクルが完成する (図 8)。peptidyl transferase の本体は全く不明である。EF-2 (EF-G) に関しては、各生物で統一的な理解が得られているので簡単に触れる。

III. ポリペプチド鎖延長因子の精製

EF-2 は精製段階に大きな障害もなく、カイコ絹糸腺⁽³⁶⁾、コムギ胚⁽³⁷⁾、ブタ肝⁽³⁸⁾などから純化されている。一方、EF-1 の精製は、多形の存在^(18,32-35)などによりきわめて困難であった。McKeehan および Hardesty⁽³¹⁾ は、ウサギ網状赤血球より真核細胞で初めて EF-1 (EF-1 $_H$) を精製した。分子量は 186,000 で、分子量 62,000 の同一サブユニット 3 個より成ると報告している。EF-

図 1 ポリペプチド鎖延長因子の amino 酸組成

各アミノ酸はモル%で表わしてある (1% が 2mm に相当する)。分析値は、EF-Tu⁽²⁷⁾、EF-Ts⁽²⁷⁾、EF-G⁽³⁸⁾、EF-2 (カイコ絹糸腺)⁽³⁹⁾、EF-1b⁽²⁰⁾、ブタ肝 EF-1 α ⁽⁴⁰⁾、EF-1 β ⁽²³⁾ の各文献から引用した。EF-1a は未発表データによる。

1 $_H$ が同一サブユニットの重合体であるとする見解は、仔ウシ脳⁽³²⁾、コムギ胚^(33,34)、ラット肝⁽³⁵⁾、などでも得られた。一方、筆者らは、カイコ絹糸腺 EF-1 $_H$ が異なるサブユニットから成ることを明らかにした^(18,19,42)。絹糸腺の EF-1 は、Sephacrose 6B カラムで 3 つのピークに分離し、分子量は $>3 \times 10^5$ 、 1.5×10^5 、 5.1×10^4 であった。前 2 者を EF-1 $_H$ 、後者を EF-1 $_L$ とした。以下の解析には分子量 1.5×10^5 の EF-1 $_H$ を使用した。EF-1 $_L$ は 0°C で一夜放置すると 90% 以上失活する。15% (v/v) 以上のグリセリン存在下で精製が可能となる⁽¹⁸⁾。精製した EF-1 $_H$ は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において 3 種類のサブユニット、EF-1a, EF-1b, EF-1c を等モル含み、EF-1 $_L$ は EF-1a に相当

することが明らかとなった^(18,42) (図 5). EF-1a は未変性条件下で精製できるが、他のサブユニットは EF-1_H を 6M 尿素処理後、尿素存在下での各種カラムクロマトグラフィーで精製する⁽¹⁸⁾. EF-1b は尿素を透析で除くことにより活性を回復する。ブタ肝 EF-1_H の各サブユニットも純化されている⁽⁴⁾. 他の生物では、EF-1a 以外の因子の均一性は十分ではない。図 1 に均一になった EF のアミノ酸組成を示した。EF-Ts は EF-1b およびブタ肝 EF-1β と、EF-G は EF-2 と非常によく似ている。

IV. EF-1_H の各サブユニットの機能

EF-1 は aa-tRNA をリボソームに結合する因子であり、先に示したように、種々の分子量の多形が存在する。真核細胞の延長機構を理解するためには、EF-1 の多形 EF-1_H と EF-1a の性質の相違を明らかにする必要がある。純化した EF-1_H の各サブユニットの示す諸性質について考察したうえで、EF-1_H および多形の機能について論じたい。

1) EF-1a の機能^(18,20)

EF-1_H の 3 つのサブユニット、EF-1a、EF-1b、EF-1c のうち、EF-1a のみが EF-2 と組み合わせたときにポリフェニルアラニン合成活性を示す。EF-1a は aa-tRNA 結合活性を有しており、非加水分解性の GTP アナログ GMP-P(CH₂)P を用いた場合、1 モル (分子量 5.1×10⁴) の EF-1a あたり約 1 モルの aa-tRNA がリボソームに結合する。このことは、EF-1a が再利用されないことを示す。GTP を用いた場合は EF-1a 1 モルあたり数モルの aa-tRNA が結合し、反応が触媒的に進行することを示す。EF-1a は GTP または GDP と二重複合体を形成し、EF-1a·GTP 複合体のみが aa-tRNA と反応して、aa-tRNA·EF-1a·GTP 三重複合体 (1:1:1) を形成する。三重複合体はゲル濾過法で単離できる。三重複合体はリボソームと反応して aa-tRNA をリボソームに結合し、GTP は GDP と Pi に分解する。これらの結果から EF-1a は EF-Tu に相当する因子といえる。ブタ肝 EF-1α も同様の性質を有する^(4,41)。

2) EF-1b および EF-1c, EF-1b·EF-1c の機能

EF-1b は単独では何らの活性も示さないが、EF-1a を制限量 (触媒量) 用いた場合のポリフェニルアラニン合成を顕著に促進する^(17~20) (図 2). EF-1b は GTP を用いた場合の phe-tRNA 結合反応も促進する^(17~20). しかし、GMP-P(CH₂)P を用いた場合は促進効果は全く認

図 2 ポリフェニルアラニン合成に対する EF-1b の影響

EF-1a 0.4 μg, EF-2 4.3 μg を用いて、30°C, 40 分間反応した。—○—, EF-1a, EF-2, EF-1b; —●—, EF-2, EF-1b.

められない (図 4). これらの結果から EF-1b は aa-tRNA 結合反応における EF-1a のリサイクリングに関与する GDP-GTP 交換反応 (反応 (2)) を促進するものと考えられた。

図 3 に示したように、EF-1b または EF-1b·EF-1c は、EF-1a にあらかじめ結合しておいた GDP と外部から加えた GTP の間の交換反応を顕著に促進する^(18,20). この反応で EF-1b と EF-1b·EF-1c の間で比活性に全く差が認められなかった。ポリフェニルアラニン合成反応、phe-tRNA 結合反応、EF-1a 依存性非共軛 GTPase (後述) でも同様に差は認められなかった。これらの結果から EF-1c は上記の諸反応において特別な活性を持たないといえる。IV-2) で述べるように EF-1a と EF-1b·EF-1c から、反応 (2) の中間体 EF-1a·EF-1b·EF-1c 複合体が生成することもゲル濾過法で確認されている⁽⁴²⁾. 以上の結果から、EF-1b または EF-1b·EF-1c は EF-Ts と同一の機能を有する因子であると結論でき

図3 GDP-GTP 交換反応に対する EF-1b または EF-1b·EF-1c の影響

EF-1a 0.25 μg と ^3H -GDP 15 pmole より EF-1a· ^3H -GDP 複合体を形成後 GTP 50 pmole と EF-1b または EF-1b·EF-1c を添加し、 ^3H -GDP の減少量を測定した。—○—, EF-1b; —●—, EF-1b·EF-1c.

る。EF-1_H は GTP の存在下で EF-1a と EF-1b·EF-1c に解離するが、EF-1b·EF-1c は変性条件下でのみ解離する⁽¹⁸⁾。これらの理由から、EF-Ts に相当する真核細胞の因子は EF-1b·EF-1c 複合体と考えられる。EF-1b はそれ自体で重合しやすく⁽¹⁸⁾、EF-1b·EF-1c の形で重合体の形成を防いでいる可能性がある。

GDP-GTP 交換反応を促進する活性は、ブタ肝 EF-1β (または EF-1β_r)^(4,23,43,44)、*Artemia salina* eEF-Ts⁽²⁴⁾、Krebs II 腹水細胞⁽²⁹⁾、などでも得られている。EF-1c に相当するブタ肝 EF-1γ の機能は EF-1c と同様全くわかっておらず、これらの機能を明らかにすることが、真核細胞 EF-1 に関する今後の課題の一つである。

V. EF-1_H の機能

EF-1_H が、EF-Tu および EF-Ts に相当する EF-1a および EF-1b·EF-1c の複合体であることを明らかにしてきた。そこで EF-1_H と EF-1a の示す各種の活性を比較することにより、EF-1_H および EF-1 の多形の機能を明確にしたい。

1) EF-1_H と EF-1a の phe-tRNA 結合活性の比較

1 モルの EF-1 は GMP-P(CH₂)P 存在下に 1 モルの aa-tRNA をリボソームに結合する。そこで、EF-1_H と EF-1a を等モル用い、GTP または GMP-P(CH₂)P を

図4 Phe-tRNA 結合反応に対する EF-1b の影響

EF-1a 0.1 μg, EF-1_H 0.25 μg, EF-1b 0.05 μg, EF-1b·EF-1c 0.15 μg を使用し、GTP または GMP-P(CH₂)P 存在下での ^{14}C -phe-tRNA のリボソームへの結合量を測定した。—●—, EF-1a, GTP; —△—, EF-1_H, GTP; —○—, EF-1a, GMP-P(CH₂)P; —▲—, EF-1_H, GMP-P(CH₂)P; —□—, EF-1a, EF-1b, GTP; —■—, EF-1a, EF-1b·EF-1c, GTP.

用いた場合の phe-tRNA の結合量を比較した(図4)。その結果、GMP-P(CH₂)P を用いた場合は EF-1_H と EF-1a とでは結合活性に差は認められなかった。しかし、GTP を用いた場合は EF-1_H の方が高い活性を示した。また、EF-1a に EF-1b (または EF-1b·EF-1c) をモル比で約 1:1 に加えると、EF-1a の活性は EF-1_H のレベルまで回復した。これらの結果は、EF-1_H の活性は、3 種類のタンパク因子のみで完全に説明され、脂質など⁽⁴⁸⁾他の成分は関与しないことを示している。

2) EF-1_H の再構成⁽⁴²⁾

EF-1_H の活性は各サブユニットの活性から説明できるので、各サブユニットからの EF-1_H の再構成を試みた。EF-1a と EF-1b·EF-1c を 0°C で 30 分間反応後、反応液を Sephadex G-150 で解析した。EF-1_H (分子量 150,000) の位置に aa-tRNA 結合活性が認められ、EF-1_H が生成したことを示している。図5に、再構成した EF-1_H の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動図を示した。EF-1a, EF-1b, EF-1c がほぼ 1:1:1 のモル比で含まれ、EF-1_H が生成したことが確認された。再構成 EF-1_H は native EF-1_H の 70~80% の活性を示した。EF-1_H は反応(2)による GDP-GTP 交換反応の中間体と考えられるので、各サブユニットから EF-1_H が生

図5 再構成したEF-1_Hとnative EF-1_HのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動図

(A) EF-1a, (B) EF-1b-EF-1c, (C) 再構成EF-1_H, (D) native EF-1_H.

成されたことは興味深い。ブタ肝でも各サブユニットからEF-1_Hが再構成されている⁽⁴⁴⁾。脂質がEF-1_Hの構造形成に関与する可能性も示されているが⁽⁴⁵⁾、上記の実験は脂質の関与なしにEF-1_Hが生成することを明確に示している。

3) EF-1_HとEF-1aのGTPase活性⁽⁴⁶⁾

EF-1_Hがaa-tRNAおよびリボソーム依存性のGTPase活性を示すことはMcKeehan and Hardesty⁽³¹⁾によりウサギ網状赤血球の系で発見された。カイク絹糸腺のEF-1_Hも同様のGTPase活性を示した。ところがEF-1aはaa-tRNAを加えなくても高いGTPase活性を示した。EF-1_Hはaa-tRNAを加えないときはGTPase活性が著しく低いので、EF-1aにEF-1bまたはEF-1b-EF-1cを加えて、EF-1_Hの性質の再現を試みた(図6)。EF-1bまたはEF-1b-EF-1cはEF-1aおよびリボソーム依存性GTPase活性をEF-1_Hのレベルまで低下させることが明らかとなった。この低下したGTPase活性はaa-tRNAを加えることによりEF-1_Hと同様に強い活性を示した。これらの結果から、EF-1_HおよびEF-1aの機能について2, 3考察してみたい。EF-1aが遊離の状態で存在することは、上記のように非共価GTPase活性を現わすのでGTPが浪費される。EF-1_H ⇌ EF-1a + EF-1b-EF-1cの平衡は左に片寄り、生体内では、遊離のEF-1aがリボソームと

図6 EF-1aおよびリボソーム依存性GTPaseに対するaa-tRNAとEF-1bの影響

EF-1a 1μgと異なる量のaa-tRNAおよびEF-1bの存在下にリボソーム依存性GTPase活性を測定した。加えたEF-1bの量は、—○—, 0μg; —△—, 2.2μg; —●—, 4.4μg.

結合してGTPを分解することは少ないと考えられる。EF-1_Hはリボソームとは相互作用を持たず、aa-tRNA-EF-1a-GTP三重複合体の形でのみリボソームと反応し、aa-tRNAのリボソームへの結合と共転してGTPが加水分解されるものと推定できる。この機構によれば、GTPの無駄な分解は防げる。

EF-1_HおよびEF-1a依存性のaa-tRNAのリボソームへの結合はGMP-P(CH₂)Pでも起こるので、aa-tRNAの結合反応そのものにはGTPのエネルギーは必要ではない。GTPの加水分解は、EF-Tuの場合^(1,2)と同様、EF-1がリボソームから遊離するために必要とされる⁽⁴⁾。

VI. EF-1_HのEF-1_L(EF-1a)への変換

EF-1_Hは分子量が約13万以上であり、これまでも述べたようにEF-1_Hが直接リボソームと結合することは考え難い。EF-1_HはEF-1の貯蔵形と考えられており、EF-1_HからEF-1_Lへの変換過程でEF-1の活性が調節される可能性がある。

1) in vitro での変換

Weissbachらは、仔ウシ脳^(42,47)、仔ウシ肝⁽³⁵⁾、など多くの生物あるいは組織のEF-1_HがGTPの存在下で、EF-1_L-GTP二重複合体を形成し低分子化すること、二

重複合体は aa-tRNA と反応して aa-tRNA·EF-1_L·GTP 三重複合体を形成すること、などを明らかにしていた。しかし、上記の系の EF-1_H は、単一ポリペプチドから構成されると考えられるので、3種類の異なるサブユニットから構成されるカイコ絹糸腺 EF-1_H を用い再検討を行った。得られた結果は、GTP のみでは前者より低分子化し難い傾向が認められたが、aa-tRNA 存在下に aa-tRNA·EF-1_a·GTP 三重複合体 (1:1:1) を形成して低分子化した。これらの事実は、すべての生物において三重複合体形成時に EF-1_H → EF-1_L の変換が行われることを示しており、三重複合体が aa-tRNA 結合反応の中間体であると結論できる。

ラット肝⁽⁴⁸⁾の EF-1_H に cholesteryl-14-methylhexadecanoate、仔ウシ脳⁽³²⁾、仔ウシ肝⁽³⁴⁾ など多くの EF-1_H に cholesterol や phospholipid などの脂質が含まれることが報告されている。これらの EF-1_H が phospholipase^(49,52,50,51) や elastase⁽⁵⁰⁻⁵²⁾, carboxypeptidase A⁽⁵³⁾ で EF-1_L に変換することも知られている。しかし、これらの脂質や酵素の生理的意義は明らかではない。Lanzani ら⁽⁵⁴⁾ は、cGMP がコムギ胚 EF-1_H を部分的に EF-1_L に変換することを明らかにした。筆者らも、カイコ絹糸腺で同様の結果を得ている。しかし、cGMP はポリフェニルアラニン合成反応を促進しないので生理的役割は不明のままである。

2) in vivo での変換

EF-1_H および EF-1_L の量比が、生物の発生・分化などの段階でどのように変化するかを知ることは、それぞれの機能を知る上で重要である。

Artemia salina の卵 (cyst) では EF-1_H が大部分を占めるが、孵化後には EF-1_L のみが観察された⁽⁵⁵⁾。EF-1_L は EF-1_H の活性型と考えられるので、この発見は興味深い。アカマツ花粉でも、花粉の発芽に伴い、EF-1_H が EF-1_L に変換することが観察された⁽⁵⁶⁾。しかし、発芽過程で増加してくるプロテアーゼなどによる人工産物である可能性を否定できない。*Artemia salina* の結果についても同じことが言えるので、EF-1_H から EF-1_L への変換の生理的意義を現段階で強調することは危険である。

VII. EF-1 の各サブユニットの種特異性

これまで、リボソームと EF-1_H は異なる真核細胞間でも組み合わせることが広く認められていた。しかし、EF-

図 7 Phe-tRNA 結合反応におけるカイコ絹糸腺 EF-1b とブタ肝 EF-1β との互換性

—●—, EF-1a 1.3 μg および EF-1b; —○—, EF-1a およびブタ肝 EF-1β; —△—, EF-1a 1.3 μg および EF-1β; —▲—, EF-1a および EF-1b; —□—, EF-1b; —■—, EF-1β.

1_H のサブユニットレベルでの検討は行われていなかった。個別的データに基づき分類した表 1 の対応関係をより完全にするため、各サブユニットを相互に変換し、ポリフェニルアラニン合成反応、phe-tRNA 結合反応、GDP-GTP 交換反応における種特異性を検討した。図 7 にその一例である phe-tRNA 結合反応における EF-1a とブタ肝 EF-1α, EF-1b とブタ肝 EF-1β の互換性を示した。すなわち、EF-1b は EF-1α 依存性の結合反応を、EF-1a と組み合わせた場合と同程度に促進した。他の 2 つの反応においても両生物間の因子は完全に交換可能であった。アカマツ花粉およびコムギ胚の EF-1b もカイコ絹糸腺 EF-1b またはブタ肝 EF-1β と交換できた。その他、*Artemia salina* の eEF-Ts は、腹水細胞 EF-1α の活性も促進することが確かめられている⁽⁵⁷⁾。以上のように、種が大きくかけ離れた真核細胞間においても EF-1_H の各サブユニットは交換可能であり、EF-1b に相当する因子はすべての生物に存在するものと推定できる。検討の余地は残されているが、EF-Ts と EF-1b, EF-Tu と EF-1a は交換できなかった。

VIII. EF-2 の諸性質^(36-38,58)

真核細胞の EF-2 は分子量約 100,000 の単一ポリペプチド鎖より成る。EF-G と同様 A 部位のペプチジル-tRNA の P 部位への転移に関与する。この反応に共駆して GTP が GDP と Pi に分解し、EF-2·GDP·リボソーム三重複合体を経て、EF-2·GDP がリボソームより遊離する。興味ある発見は、転移反応自体は GTP の加水分解を必要としないことで、GTP の加水分解は aa-tRNA

図 8 ポリペプチド鎖延長反応における各延長因子の作用機作
() 内に大腸菌の系を示した。P: ペプチジル-tRNA 部分, A: アミノアシル-tRNA 部位。

結合反応の場合と同様に延長因子がリボソームから遊離するために必要である⁽⁴⁾。EF-2-GTP および EF-2-GDP の解離定数 (ブタ肝) は、それぞれ 1.4×10^{-5} および $4.1 \times 10^{-7} M$ である⁽⁵⁹⁾。GTP の存在下に EF-2-GDP より EF-2-GTP が生成し、EF-2 に関するサイクルが完成する (図 8)。

EF-2 と EF-G で性質が大きく異なる点は、NAD 存在下に、前者のみがジフテリア毒素で阻害されることである^(58, 60)。阻害の機構はトキシンが EF-2 を ADP-リボシル化することである⁽⁶¹⁾。最近、やけどへの感染などで問題となる *Pseudomonas aeruginosa* の exotoxin A も EF-2 を ADP-リボシル化することが明らかにされた⁽⁶²⁾。正常細胞内での ADP-リボシル化による EF-2 活性の調節の可能性については解答が得られていない。

EF-2 と EF-G のリボソームに対する親和性も厳密に異なる⁽⁵⁸⁾。すなわち、真核細胞の EF-2 は真核細胞のリボソームとは組み合わせるが、前核細胞のリボソームとは全く組み合わせない。また EF-G は真核細胞リボソームには結合しない。この種特異性が発現される原因をさぐることは、タンパク質合成のより詳細な機構を明らかにしていく手懸りとなる。

IX. ポリペプチド鎖延長反応の全体像

以上、各延長因子の示す部分反応や諸性質をカイコ絹糸腺の系を中心に考察してきた。それらを総合した前核細胞と真核細胞に共通したポリペプチド鎖延長反応の機構を図 8 に示した。すなわち、カイコ絹糸腺で EF-Ts に相当する EF-1b が発見されたことにより、今まで混乱していた aa-tRNA 結合反応における EF-1a のリサ

イクリングの系が確立された。

EF-1b に相当する因子は他の真核細胞でも相次いで発見されており、図 8 の aa-tRNA 結合反応機構が一般化されつつある。前項で簡単に述べたようにトランスロケーションの機構も前核細胞と真核細胞で同一であると結論できる。ペプチド結合生成反応そのものには、前核、真核細胞とも可溶性の因子を加える必要がなく、リボソーム大亜粒子中に存在すると考えられ

る peptidyl transferase が関与する。このように前核細胞と真核細胞はおもな 3 つの反応において本質的な差異は認められなかった。

次に、延長反応の全体像をより明確にするため、解決されないで残っている両細胞間のおもな相違点を上げる。1) 真核細胞 EF-1_H には、前核細胞には認められない機能の不明な EF-1c が存在する、2) 真核細胞には前核細胞には認められない EF-1 の多形が存在し、EF-1_H から EF-1_L への変換が EF-1 の活性調節にとって重要であると考えられる、3) EF-Tu および EF-Ts は Q β フェージの RNA レプリカーゼの構成成分として RNA 合成の調節に関与する、などである。延長因子の性質に関し、真核細胞間で見解が一致しない問題、あるいは生物固有の結果もいくつかある。仔ウシ脳、ラット脳などの EF-1_H が単一サブユニットから成るとする結果の解釈である。組織による違いであれば興味深い。しかし、最近ニワトリヒナの脳から EF-1b が発見されたので⁽⁶³⁾その可能性は少ないものと思われる。表 1 に示したように酵母では phe-tRNA 結合反応を促進する EF-3 なる因子が発見されている⁽⁶⁴⁾。しかし、EF-3 は強いリボソーム依存性 GTPase 活性を示すことなど、性質が EF-1b と異なる。EF-3 の作用機作の解明が注目されるとともに、酵母は EF-1b 捜しの最後の系(?)としても興味深い。

ポリフェニルアラニンを合成中の EF-1 と EF-2 の挙動に関しても意見が分かれている。Collins ら⁽⁶⁵⁾、Nombela および Ochoa は⁽⁶⁶⁾、EF-1 および EF-2 は同時にリボソームに結合しないことを見出し、ペプチド鎖延長反応において、EF-1 と EF-2 が交互にリボソ-

ムに結合するものと推定している。一つの部位を異なる2つの因子が交互に占有する機構は、遺伝情報の翻訳を正確に進行させる手法として興味深い。これに対し、Grasmuk ら⁽⁶⁷⁾は、EF-1 はリボソームに結合したまま、EF-2 のみがトランスロケーションごとリボソームから離れるとする新しい機構を提出している。しかし、これら、リボソームと延長因子の相互作用の解析は、各延長因子の性質が明確になってきた現時点で再検討する必要がある。GTPまたはGDPを結合した延長因子のコンフォメーションの相違、その違いを aa-tRNA やリボソームが識別する機構、さらにはトランスロケーションやペプチジルトランスフェーの過程でのリボソームの運動の分子機構、などの解析も今後に残された困難な課題である。これらの問題が解決して初めて、延長反応の全体像が完全に理解されたといえよう。

残されたもう一つの重要な課題は、延長段階でのタンパク質合成の調節機構を明らかにすることであろう。

2, 3 その可能性を述べたが、まだ重要な発見はない。予備的知見であるが、EF-1 がラット肝細胞の核に含まれること⁽⁶⁸⁾、各種 RNA と結合すること⁽⁶⁹⁾、mRNA のキャップアナログヌクレオチドに結合すること⁽⁷⁰⁾、などの結果も得られている。延長因子の延長反応以外での働きにも目を向けていく必要がある。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただきました志村憲助教授、適切なご助言をいただきました勝又悌三教授、長山英男助教に深甚の謝意を表します。また、実験をともにした、平 秀晴、村上一行、直木葉造の各氏をはじめ多数の方々に感謝いたします。

- (1) D. L. Miller and H. Weissbach : "Molecular Mechanisms of Protein Synthesis," ed. by H. Weissbach and S. Pestka, Academic Press, Inc., New York, N. Y., 1977, p. 323.
- (2) 新井賢一 : 生化学, **49**, 509 (1977).
- (3) H. Weissbach and S. Ochoa : *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 191 (1976).
- (4) 岩崎憲太郎 : 生化学, **51**, 1 (1979).
- (5) M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht and P. C. Zamecnik : *J. Biol. Chem.*, **231**, 241 (1958).
- (6) M. Takanami and T. Okamoto : *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 379 (1960).
- (7) I. Suzuka, S. Tanaka and K. Shimura : *J. Biochem.*, **48**, 774 (1960).
- (8) J. M. Fessenden and K. Moldave : *J. Biol.*

- Chem.*, **238**, 1479 (1963).
- (9) R. Arlinghaus, G. Favelukes and R. Schweet : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 92 (1963).
- (10) T. Caskey, P. Leder, K. Moldave and D. Schlessinger : *Science*, **176**, 195 (1972).
- (11) M.-W. Nirenberg and J. H. Matthaei : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 1588 (1961).
- (12) Y. Nishizuka and F. Lipmann : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 109 (1966).
- (13) J. Lucas-Lenard and F. Lipmann : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 1562 (1966).
- (14) H. Weissbach, D. L. Miller and J. Hachmann : *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 262 (1970).
- (15) K. Arai, M. Kawakita and Y. Kaziro : *J. Biol. Chem.*, **247**, 7029 (1972).
- (16) M. Schneir and K. Moldave : *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 58 (1968).
- (17) S. Ejiri, H. Taira and K. Shimura : *J. Biochem.*, **74**, 195 (1973).
- (18) S. Ejiri, K. Murakami and T. Katsumata : *FEBS Lett.*, **82**, 111 (1977).
- (19) K. Shimura, S. Ejiri and H. Taira : Abstract of Papers 9th International Congress of Biochemistry, 191 (1973).
- (20) S. Ejiri, Y. Naoki, K. Murakami and T. Katsumata : *FEBS Lett.*, **95**, 277 (1978).
- (21) K. Iwasaki, K. Mizumoto, M. Tanaka and Y. Kaziro : *J. Biochem.*, **74**, 849 (1973).
- (22) K. Motoyoshi, K. Iwasaki and Y. Kaziro : *J. Biochem.*, **82**, 145 (1977).
- (23) K. Motoyoshi and K. Iwasaki : *J. Biochem.*, **82**, 703 (1977).
- (24) L. I. Slobin and W. Möller : *Eur. J. Biochem.*, **84**, 69 (1978).
- (25) R. D. Nolan, H. Grasmuk and J. Drews : "Methods in Enzymology," Vol. LX, ed. by K. Moldave and L. Grossman, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1979, p. 649.
- (26) N. Prather, J. M. Ravel, B. Hardesty and W. Shive : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 578 (1974).
- (27) K. Arai, M. Kawakita, Y. Kaziro, T. Kondo and N. Ui : *J. Biochem.*, **73**, 1095 (1973).
- (28) R. Bollini, A. N. Soffientini, A. Bertani and G. A. Lanzani : *Biochemistry*, **13**, 5421 (1974).
- (29) W. M. Kemper and W. C. Merrick : "Methods in Enzymology," Vol. LX, ed. by K. Moldave and L. Grossman, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1979, p. 638.
- (30) L. Skogerson and D. Engelhardt : *J. Biol. Chem.*, **252**, 1471 (1977).
- (31) W. L. McKeehan and B. Hardesty : *J. Biol.*

- Chem.*, **244**, 4330 (1969).
- (32) H. M. Moon, B. Redfield, S. Millard, F. Vane and H. Weissbach : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3282 (1973).
 - (33) B. Golińska and A. Legocki : *Biochim. Biophys. Acta.*, **324**, 156 (1973).
 - (34) A. Tarragó, J. E. Allende, B. Redfield and H. Weissbach : *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 353 (1973).
 - (35) C. K. Liu, A. B. Legocki and H. Weissbach : "Lipmann Symposium, Energy, Regulation and Biosynthesis in Molecular Biology," ed. by D. Richter, Walter deGruyer, Berlin, New York, 1974, p. 384.
 - (36) H. Taira, S. Ejiri and K. Shimura : *J. Biochem.*, **72**, 1527 (1972).
 - (37) T. Twardowski and A. B. Legocki : *Biochim. Biophys. Acta.*, **324**, 171 (1973).
K. Iwasaki and Y. Kaziro : *Methods Enzymol.*, **60**, 657 (1979).
 - (38) Y. Kaziro, N. Inoue-Yokosawa and M. Kawakita : *J. Biochem.*, **72**, 853 (1972).
 - (39) 江尻慎一郎, 平 秀晴, 志村憲助 : 生化学実験講座 Vol. 7, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1975, p. 281.
 - (40) S. Nagata, K. Iwasaki and Y. Kaziro : *J. Biochem.*, **82**, 1633 (1977).
 - (41) S. Nagata, K. Iwasaki and Y. Kaziro : *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 168 (1976).
 - (42) S. Ejiri, K. Murakami and T. Katsumata : *FEBS Lett.*, **92**, 251 (1978).
 - (43) S. Nagata, K. Motoyoshi and K. Iwasaki : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 933 (1976).
 - (44) S. Nagata, K. Motoyoshi and K. Iwasaki : *J. Biochem.*, **83**, 423 (1978).
 - (45) B. Redfield, A. Legocki and H. Weissbach : *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 358 (1975).
 - (46) K. Murakami, S. Ejiri and T. Katsumata : *FEBS Lett.*, **92**, 255 (1978).
 - (47) H. Moon, B. Redfield and H. Weissbach : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 1249 (1972).
 - (48) J. Hradec, Z. Dušek, E. Bermek and H. Matthaei : *Biochem. J.*, **123**, 959 (1971).
 - (49) R. Bolla, H. Weissbach and N. Brot : *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 683 (1975).
 - (50) C. Nombela, B. Redfield, S. Ochoa and H. Weissbach : *Eur. J. Biochem.*, **65**, 395 (1976).
 - (51) A. B. Legocki, B. Redfield, C. K. Liu and H. Weissbach : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 2179 (1974).
 - (52) W. M. Kemper, W. C. Merrick, B. Redfield, C. K. Liu and H. Weissbach : *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 603 (1976).
 - (53) T. Twardowski, J. M. Hill and H. Weissbach : *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 444 (1977).
 - (54) G. A. Lanzani, M. Giannattasio, L. A. Manzocchi, R. Bollini, A. N. Soffientini and V. Macchia : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 172 (1974).
 - (55) L. I. Slobin and W. Möller : *Nature*, **258**, 452 (1975).
 - (56) S. Ejiri, M. Nunomiya and T. Katsumata : *Argic. Biol. Chem.*, **40**, 1227 (1976).
 - (57) H. Grasmuk, R. D. Nolan and J. Drews : *Eur. J. Biochem.*, **79**, 93 (1977).
 - (58) H. Taira, S. Ejiri and K. Shimura : *J. Biochem.*, **76**, 949 (1974).
 - (59) K. Mizumoto, K. Iwasaki and Y. Kaziro : *J. Biochem.*, **76**, 1269 (1974).
 - (60) S. Raeburn, J. F. Collins, H. M. Moon and E. S. Maxwell : *J. Biol. Chem.*, **246**, 1041 (1971).
 - (61) T. Honjo, Y. Nishizuka, I. Kato and O. Hayaishi : *J. Biol. Chem.*, **246**, 4251 (1971).
 - (62) B. H. Iglewski and D. Kabat : *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, **72**, 2284 (1975).
 - (63) K. Murakami and K. Miyamoto : Abstract of Papers 7th Meeting of International Neurochemistry, 496 (1979).
 - (64) L. Skogerson and D. Engelhardt : *J. Biol. Chem.*, **252**, 1471 (1977).
 - (65) J. F. Collins, H. M. Moon and E. S. Maxwell : *Biochemistry*, **11**, 4187 (1972).
 - (66) C. Nombela and S. Ochoa : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3556 (1973).
 - (67) H. Grasmuk, R. Nolan and J. Drews : *Eur. J. Biochem.*, **71**, 271 (1976).
 - (68) M. S. Rao, L. I. Rothblum and H. Busch : *Cell Biology International Reports*, **2**, 25 (1978).
 - (69) A. J. Kolb, B. Redfield, T. Twardowski and H. Weissbach : *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 398 (1978).
 - (70) J. E. Allende, A. Tarragó and A. J. Shatkin : *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 335 (1978).