グルコースアミン転位反応に対するポリオキシンDの阻害機構を解析した(1969)。高橋甫らは、ペプチドグリカン生成に対するグリシンの阻害機構(1970)、*Selenomonas ruminantium* のリボ多糖の構造(1972)を調べ、また、同菌の表層糖脂質が β -グルコースアミニル-1,6-グルコースアミンを骨格とすること(1972)を、いずれも ^{14}C 標識糖などの活用により明らかにした。外村健三らは、メタノール 資化性酵母 *Candida* について、 ^{14}C 標識メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸などの取込みを解析し、メタノール資化が6炭糖リン酸を中間体とすることを、*in vivo*, *in vitro* の双方で証明した(1973~75)。

全身オートラジオグラフィの技術は、 ^{14}C -グルコース、 α -ミオイノシトールなどからの ^{14}C 全身分布に対する一酸化炭素やフッ化水素の影響を調べた渡辺征二らの研究で利用されている(1975~79)。

多糖の生合成に関しては、松橋通生らの細菌細胞壁ペプチドグリカン生成過程におけるリビド中間体サイクルの発見と、ペニシリン感受性酵素の研究が、1966年以降、 ^{14}C 標識糖ならびにこれに由来する中間体を基質とする解析、 ^{14}C -ベンジルペニシリン結合タンパク質の遺伝学的および酵素学的研究により進展し、他方、田村学造、高月昭らにより発見された抗ウイルス抗生物質ツニカマイシン(1971)が、多くの研究者による複合糖質の生合成と機能の解析に重要な貢献をしている。田村らは、これが糖タンパク質生合成に関与するリビド中間体生成の選択的阻害剤であることを明らかにしたが、この作用を利用した糖タンパク糖鎖の機能や、発生、分化の領域にまでおよぶ広範な研究が現在も国内外で活発に行われ、多糖の生合成と機能に関する理解が進んでいる。

5・3 核酸・タンパク質†

水 野 重 樹

東京理科大学理工学部応用生物科学科
278 千葉県野田市山崎東亀山2641

この分野における過去30年間の RI 利用研究の歴史は世界的にみても、またわが国においてもそのまま分子生物学の誕生と発展の経過の中心を占めるもので、メッセンジャー RNA (mRNA) の発見、遺伝暗号の解明、DNA 依存性 RNA 合成や DNA 複製の機構、タンパク質生合成の酵素機構から最近の DNA, RNA の塩基配列の決定法や制限酵素の利用、サーザンプロット法、ニックトランスレーション法などを組み合わせた真核生物遺伝子の研究法の開発に至るまで、遺伝情報の構造、複製、発現に関して、現在われわれが得ている基本的に重要な知識や研究法のどれ一つとして、RI の利用なくしては達成され得なかったものであるという過言ではないであろう。

世界的にみて、核酸・タンパク質の研究分野に RI の

使用が広まり始めたのは1950年代の前半であるが、このころまでに、すでに核酸構成成分の分析法はほぼ確立されており(J.N. Davidson, 1950), E. Chargaff ら(1950~53)の多くの DNA についての塩基組成分析の結果は、J.D. Watson, F.H.C. Crick (1953)の DNA の二重らせん構造解明の根拠の一つとなった。タンパク質の一次構造研究についても、1945年に F. Sanger のDNP 法、1950年に Edman 分解法が提出され、1951年には Sanger らによってインスリンの全構造が決定された。遺伝子としての DNA の機能については、O.T. Avery ら(1944)から1950年代前半の R.D. Hotchkiss らの肺炎双球菌の形質転換の研究からほぼ確立されていた。1952年には A.D. Hershey と M. Chase が、オークリッジ国立研究所から供給された ^{32}P -無機リン酸(^{32}Pi)や ^{35}S -硫酸を培地に加えて大腸菌を培養し、これに T_2 -ファージを感染増殖させて、DNA 部分を ^{32}P で標識したファージとタンパク質部分を ^{35}S で標識したファージを別々に調製、これら大腸菌に再感染さ

† Nucleic Acid and Protein. Shigeki MIZUNO: Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641, Higashikameyama, Yama-zaki, Noda-shi, Chiba Pref. 278.

せて ^{32}P -DNA のみが細胞内に取り込まれ、その放射能の一部がふたたび子ファージ中に回収されることなどを示した。

1950年代における RI の利用は、主として細菌やファージ感染系における核酸・タンパク質の生合成機構の研究に向けられており、わが国でも RNA やタンパク質を活発に合成する無細胞系の開発をめざす研究が始められた。無細胞系といっても、E.F. Gale (1955) や S. Spiegelman ら (1958) の方法に準じて細菌のスフェロプラストを Mg^{2+} イオン存在下に穏やかな方法で破壊して得られる細胞質膜系が主たる材料で、東大応微研の赤堀研究室（のちに丸尾研究室）から供給されるクロレラの ^{14}C -タンパク質の加水分解物や ^{32}P i を前駆体として用い、W.C. Schneider (1946) の方法に従って分画された RNA やタンパク質画分の放射能を GM 管で計測していた（吉田恵津子、水野重樹、三井宏美、高橋甫、丸尾文治、1960, 61）。1953年に F.N. Hayes らによって利用され始めた液体シンチレーションカウンタによる計測は、現在ではごくふつうの測定方法となっているが、わが国では1950年代末ごろから輸入され始め、一般的な利用は1960年代中ごろからであったように思う。筆者ら (1961) も、当時ようやく入手できるようになった RCC の ^3H -アデノシンを細胞質膜系に与えて RNA 合成をみていたが、測定はウインドレスガスフローカウンタを用い、無限厚さの条件で行っていた。

1961年には S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson や F. Gros らが、その当時開発されたばかりのショ糖密度勾配沈降法による高分子 RNA の分画法や、CsCl 密度平衡沈降法による DNA-RNA ハイブリッドの分離法を利用して、 T_2 -ファージ感染後の大腸菌中で合成される ^{32}P i や ^{14}C -ウラシルで標識された RNA の性質を詳細に調べて、初めて mRNA の概念とその実像を明らかにした。同じ年に M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei によって、大腸菌から mRNA 依存性の無細胞タンパク質合成系が得られ、この系を用いてアミノ酸コードの決定やポリペプチド鎖合成の開始や終了の分子機構がさかんに研究されるようになった。J. Hurwitz や S.B. Weiss らによって、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼが大腸菌やマイクロコッカスから発見されたのも1960, 61年のことである。このころわが国でも亀山忠典ら (1961) が、大腸菌を用いて RNA ポリメラーゼの研究を行っていたが、反応基質として用いる α - ^{32}P -ヌクレオシド三リン酸を調製するために、まず ^{32}P i を含む培地中で大腸菌を増殖させて ^{32}P -RNA を分離

し、これを蛇毒のホスフォジエステラーゼで分解後、酵母の 5'-ヌクレオチドキナーゼでリン酸化して、さらに Dowex-1 カラムで分離、精製するという方法をとっていた。現在、毎週のように比放射能の高い α - ^{32}P -ヌクレオシド三リン酸が出荷されている状況と比べると今昔の感に堪えない。1960年代の前半は主としてアメリカやイギリス、フランスの研究者によって遺伝情報の転写と翻訳の分子機構が精力的に解明され、わが国の研究者は毎月の Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.A.) 誌や Cold Spring Harbor シンポジウムの論文集を貪り読んで、新しい概念と知識の吸収と実験技術の獲得に追われていたような有様であった。

1960年代後半になると、世界の第一線の研究室で研究の経験を積んだ研究者たちが帰国して、日本人の日本における研究がしだいに定着し始め、1970年代に入って、いくつかの世界をリードするような研究成果がわが国の研究室からも生まれるようになって、現在に至っている。これらの研究のうちからいくつかの例を紹介すると、1966～68年に岡崎令治らは、大腸菌や枯草菌に ^3H -チミジンを 2～30秒与えて DNA 複製部位を標識後、アルカリ性ショ糖密度勾配沈降法で調べると、新たに合成された ^3H -DNA の一部は1,000ヌクレオチド程度の断片 (Okazaki fragment) として存在し、これらは多量の非放射性チミジンを与えて chase すると速やかに高分子 DNA に移行すること、DNA-リガーゼの働かない条件下ではこの断片が蓄積することを見出し、DNA 複製の不連続機構を提出した。1972年には、 ^3H -チミジンで標識された DNA 断片の比重が通常の DNA 断片の比重より重いこと、RNase やアルカリ処理を行うと通常の比重に変わることから、DNA の複製点ではまず短い RNA プライマーが合成され、これに連続して DNA 断片が合成されるという重要な発見を行った。

RNA の生合成や構造研究の分野では、西村暹らは1967年に大腸菌の tRNA^{Pyl} のアンチコドン1字目に存在する微量塩基成分Qを発見し、1975年に構造決定を行ったが、その生合成経路の研究で、QまたはQ前駆体が tRNA -グアニン-トランスグリコンダーゼによって、既成の tRNA 前駆体中の特定位置のグアニン残基と置換されるという興味深い結果を得ている (1976)。小関治男、志村令郎ら (1974) は、大腸菌で高温下に tRNA 前駆体が蓄積する変異株を分離し、 ^{32}P で標識した tRNA 前駆体が、RNase O, P, Q などの作用で順次切断されて、 tRNA 分子として完成されていく酵素過程を研究している。三浦謹一郎ら (1972～74) はカ

イコ多角体ウイルスの二本鎖 RNA の構造と生合成について研究を行ったが、RNA の 5'-末端については β - ^{32}P -ATP の取込みで、3'-末端については過ヨウ素酸化後、 ^3H -ボロハイドライドで還元する方法を適用して構造決定を行った。高浪満らは1978年に、大腸菌の fd ファージ DNA の約 6,400 塩基について全配列を決定した。これは制限酵素による DNA の分解、 γ - ^{32}P -ATP と T_4 -ファージの ポリヌクレオチドキナーゼによる 5'-末端の標識、Maxam-Gilbert 法 (1977) による塩基配列決定法などを駆使したもので、高浪 (1967) が滯米中に大腸菌リボゾーム RNA の 5'-末端数個の塩基配列を決定して、J. Mol. Biol. 誌に発表した当時と比べると、いかにこの分野の実験技術が進歩したかがわかる。

タンパク質合成関係では、上代淑人ら (1972~75) が大腸菌やブタ肝臓の ^{14}C -phe-tRNA からポリフェニルアラニンを合成する *in vitro* 系での活性を指標として、ポリペプチド鎖延長因子 (EF-Tu, -Ts, EF-1, -2) の精製を行い、 ^3H -GDP との結合性や因子間の結合などを調べた。この研究はその後 EF-Tu の遺伝子解析、生合成とその調節機構などの興味深い方向に進展している。野村真康は1968年に、米国で大腸菌の活性ある 30 S リボゾーム粒子の *in vitro* 再構成に初めて成功したが、50 S 粒子の再構成は、日本で水野伝一らによって、1971年に ^{35}S で標識したリボゾーム・タンパク質を用いたり、 ^{14}C -リジン、 ^{14}C -フェニルアラニンなどのタンパク質への取込み活性を指標として行われた。この場合、30 S 粒子の存在または同時再構成が必要であることが注目された。大沢省三のグループは、1966年

ごろから ^3H - や ^{14}C -リジンで標識された大腸菌や枯草菌のリボゾーム・タンパク質の分画を、CM-セルロースカラムなどを用いて行っており、抗生物質耐性変異の解析や遺伝子座位の決定、種特異性の研究などに発展させている。酵素化学的研究も数多く行われているが、安楽泰宏らは、1968年以来大腸菌のアミノ酸透過に関与する酵素を、 ^{14}C -アミノ酸との特異的結合性を指標として精製している。

また石浜明らは、1972年以来大腸菌 RNA ポリメラーゼ生合成におけるサブユニットの結合過程を研究しているが、 ^3H -ロイシンによる短時間標識や、合成中間体を蓄積する温度感受性変異株を用いた *in vivo* 系の研究 (1975) が興味深い。真核生物遺伝子のクローニングによる構造研究の分野でも、中西重忠、沼正作ら (1976) のウシの脳下垂体に含まれる副腎皮質刺激ホルモン、 β -リポトロピン、色素細胞刺激ホルモンなどの遺伝子暗号配列を同時に含む前駆体 mRNA の構造決定や、本庶佑ら (1979) のマウスの免疫グロブリン H 鎖遺伝子の染色体 DNA 上の配列状態の決定など、みごとな成果が得られている。

また、この分野で忘れてならない RI の利用法として、 ^{125}I による高分子核酸やタンパク質の標識法がある。この方法は、生合成過程を利用した標識が困難な材料について適用することができ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、分画後のタンパク質をゲル上で標識することも可能である。また ^3H に準じたオートラジオグラフィも可能で、*in situ* ハイブリッド形成法にも利用されることが多い。

5・4 光 合 成†

宮 地 重 遠

東京大学応用微生物研究所

113 東京都文京区弥生1-1-1

戦後、原子炉で作られた RI が日本に初めて到着し、文部省科学研究費による“人工放射性同位元素の

応用に関する研究”の総合研究班が結成されたのが1950年である。1951年には、東大内にアイソトープ専用の実験室が建設され、ついで京大、そのほかの大学にも同様な施設が作られた。私事にわたるが、当時、東大理学部植物学教室の教授をしておられた田宮博先

† Photosynthesis. Shigetoh MIYACHI: Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113.