

②

原核生物型リボソームの蛋白質構成に  
於ける不均一性

京都大学大学院理学研究科植物学教室

1999 年度 学位申請論文

牧 泰史

# 目次

序論	1
第一部要旨	11
第一部材料と方法	13
第一部結果	17
第一部考察	22
第二部要旨	27
第二部材料と方法	29
第二部結果	32
第二部考察	36
引用文献	41
図表	
謝辞	

# 序論

## 1、これまでのリボソーム研究について

リボソーム及び翻訳機構に関する研究が現在の分子生物学の確立に果たしてきた役割は大きい。19世紀に遺伝子の概念がメンデルによって提唱され、20世紀前半にその概念が広く受け入れられるようになってからも、生体内で実際に働く機能分子のほとんどがタンパク質であることから、遺伝子の正体とともに、遺伝情報とタンパク質との間をつなぐ要素が長い間の謎であった。ラベルしたアミノ酸をタンパク質に取り込ませる活性が、ラット肝細胞のミクロソーム画分にある ribonucleoprotein particle にあることが見いだされた1955年の Littlefield らによる報告から、リボソーム及び翻訳機構の研究が始まったと言える。リボソームそのものの研究でタンパク質構成やRNA構成を解明する努力が為されていくのと平行して、翻訳機構の研究で tRNA (Hoagland et al., 1958) や mRNA (Brenner et al., 1961)が発見されてきた。分子生物学の基礎となる遺伝暗号の解読(例、Nirenberg and Matta, 1961; Nirenberg and Leder, 1964)は、in vitro 翻訳系の開発無くしては為しえなかった成果である。

リボソームや翻訳機構の解明が生命活動の研究にとって基本的かつ重要であることから、真核生物、原核生物を問わず、これまで多くの研究が為されてきた。しかし全貌の解明にはいまだほど遠い地点にある。リボソーム研究が最も進んでいる大腸菌リボソームに関しても、以下にあげるように未解明な部分や新たな発見が最近でも少なくない。まず、リボソームタンパク質の機能に対する知見は、僅かなものに限られている(総説、Green and Noller, 1997)。翻訳終結のメカニズムとそこに働く因子に関して、次々と新事実が明らかにされている(例、梶, 1999; Ito and Nakamura, 2000)。また、最近新たに二つの翻訳因子が報告された(Aoki et al., 1997; Lu et al., 1999)。翻訳における最も重要な機能である、ペプチド結合伸長反応を触媒(peptidyltransferase: PTase)する活性中心(PTC)の位置や構成についても、結論は得られていない。さらに基礎的な、リボソームのタンパク質構成でさえ、この数年で塗り替えられているのが現状である(Wada, 1998)。

本論文では実験材料としてオオムギプラスチドリボソーム及び大腸菌リボソームを用いた。これまでの原核生物型リボソーム研究の流れと現在の知見から、今後の議論を進める上で必要と思われる大腸菌リボソームの構造及びリボソームタンパク質に関するものを中心に以下に記述する。

### 1) リボソームの分類と分子構成

今まで判っているリボソームはすべて、大小 2 つの亜粒子からなる分子量数百万の巨大なタンパク質-RNA 超複合体である。A、P 及び E という 3 つの tRNA 結合部位を持ち、mRNA を鋳型としてタンパク質合成をおこなうが、実際の働きは、様々な翻訳因子の助けを借りて、アミノアシル tRNA を A 部位に結合し、P 部位に結合しているペプチジル tRNA のペプチド鎖を A 部位のアミノ酸に結合させるペプチド鎖転位反応を触媒することにより (peptidyl transferase; PTase)、ペプチド鎖を伸長させることである。原核生物も真核生物も、翻訳の諸過程は共通している部分が多いが、鋳型となる mRNA の構造や、リボソームの大きさ、使われる翻訳因子やリボソームによる mRNA の認識機構など、細かな点は異なっている。

リボソームはその分子構成、大きさなどの点から原核生物型と真核生物型に大別される。典型的な原核生物型リボソームである大腸菌リボソームは、沈降係数約 70S の粒子で、現在までに、小亜粒子 (30S) に 16S rRNA と 22 種のリボソームタンパク質、大亜粒子 (50S) に 5S 及び 23S rRNA と 33 種のリボソームタンパク質を含む事が判っている。原核生物のリボソームはすべてこれに含まれる。また共生説によれば、ミトコンドリア及び葉緑体は進化的にそれぞれ、ある種の  $\alpha$  紅色細菌及び藍色細菌が祖先と考えられるようになっており、これらオルガネラ内に含まれるリボソームも、その大きさ、バクテリアリボソームとのサブユニット互換性、抗生物質による特異的阻害効果などの古くからの観察に基づき、バクテリアタイプとして認識されていた。これに対し、代表的な真核生物型リボソームは約 80S の沈降係数を持つ。ラット肝細胞の細胞質リボソームでは、小亜粒子が 18S rRNA と 33 種のリボソームタンパク質、大亜粒子が 5S、5.8S、28S rRNA と 47 種のリボソームタンパク質から構成されているとされ、酵母に於いてもほぼ同じような構成であることが示されている (総説、Wool et al., 1995)。真核生物の細胞質に存在するリボソームがこれに属する。

## 2) リボソームの構造と機能

電子顕微鏡による観察により、リボソームの漠然とした外観が 100Å の解像度で Lake 等によって初めて観察されたのは 1972 年であった (Lake and Slayter, 1972)。4 年後には解像度を上げて大腸菌のリボソームについても報告された (1976)。それ以降、より高い解像度での全体像の解明が進み、好熱菌のリボソームではあるが、現在では X 線結晶解析によって 5-8Å での詳細な立体構造が明らかにされている (Cate et al., 1999; Clemons Jr et al., 1999; Ban et al., 1999)。また、リボソームに結合させた抗体を電子顕微鏡によって観察し、リボソーム表面のタンパク質の位置を直接同定する方法も使われてきた (例、Stöffler-Meilicke and Stöffler, 1987)。これらとは別に、次にあげる、リボソームまたは翻

訳機構に関する二つの大きな進展が、より詳細なリボソーム研究を可能にした。一つは、大腸菌の cell-free extracts を用いたタンパク質生合成系が確立したことである (Lamborg and Zamecnik, 1960; Tissieres et al., 1960)、さらにその後、合成した poly(U) を鋳型として polyphenylalanine を合成する系が開発された (Nirenberg and Matthaei, 1961; Gilbert, 1963a)。この手法は、遺伝暗号表の完成に大きく貢献したこと以外に、リボソーム及び翻訳段階の研究そのものをも発展させるものであった。例えば、tRNA の結合部位が 50S 側にあること (Gilbert, 1963b)、mRNA が 30S に結合すること (Takanami and Okamoto, 1963) など、翻訳機構に関する多くの知見が、この系を応用した研究によって、短期間に次々と明らかになった。現在でもこの poly(U)-polyphenylalanine の系は、リボソームの活性を調べる assay 系としてよく使われている。もう一つは、リボソームを個々のタンパク質と rRNA に分離した後、in vitro でリボソームとして活性のある粒子に再構成する方法が、30S 亜粒子については Nomura 等のグループにより (Traub and Nomura, 1968; Mizushima and Nomura, 1970; Nomura and Held, 1974)、50S 亜粒子については Nierhaus 等のグループにより (Nierhaus and Dohme, 1974; Rohl and Nierhaus, 1982) 確立され、リボソームの assembly map が完成したことである。タンパク質の組み込み順序が判ることで、リボソーム構成に対する各タンパク質の寄与が判り、また断片化した rRNA を用いた再構成実験の結果からは、タンパク質-rRNA 間の相互作用と、大まかではあるが結合領域が判った。さらに、この再構成の技術は、中性子散乱法 (neutron scattering) を用いたリボソームタンパク質間の相対的な位置決定も可能にした。これは特定の 2 種のリボソームタンパク質の距離を調べる方法である。多くのリボソームタンパク質の組み合わせで得られたデータを統合して、リボソーム上における各タンパク質間の相対的な位置が推定された (例、Capel et al., 1987)。リボソーム上でのタンパク質の位置と機能を調べる方法には、他にも分子間架橋 (crosslinking) や親和標識 (affinity labeling) がある。これらは、隣接するタンパク質-タンパク質間、またはタンパク質-RNA 間の関係を調べる方法であり、リボソームタンパク質と翻訳因子、mRNA、tRNA、rRNA などとの相互作用の解明に使用されてきた。

翻訳機能に関するこれらの実験がタンパク質に対して精力的に進められた背景には、酵素活性をタンパク質成分に帰属させる考え方が常識だったことがある。しかし、mutant の解析から、リボソームタンパク質を欠損していても生存可能な mutant がいくつか得られてきたこと (総説、Dabbs, 1991)、Cech 等による ribozyme の発見 (Kruger et al., 1982) などから、1980 年代を境に rRNA が活性部位の候補としてあがるようになった。ほとんどのタンパク質を排除、または失活させた状態で、PTase 活性が見られたとする Noller 等による報告 (1992) が、PTase 活性部位が rRNA にある決定的な証拠に見られた時期もあったが、現在は

再び混沌としている。理由の一つには、Noller 等の実験が、実際は強固に結合したリボソームタンパク質が残った rRNA での活性を見ていたもので、以後 rRNA だけによる PTase 活性が確認されていないことがあり、もう一つには、リボソームタンパク質 L2 の His 残基を 1 カ所 Ala に変えるだけで PTase 活性が失われるとした報告など (Cooperman et al., 1995)、タンパク質の重要性を示すデータも出ているからである。この件に関する議論はまだしばらく続くと考えられる。しかし、たとえ最終的に PTase の活性中心 (PTC) が rRNA であると判明したとしても、リボソームタンパク質の研究が今後も重要であることに変わりはない。現在様々な細菌で進められている全ゲノム解析の結果から、多くのリボソームタンパク質が、細菌の種を越えて高く保存されていることが明らかになっており、ほとんどのリボソームタンパク質が生物にとって欠かせない機能を担っている証拠と考えられるからである。

個々のタンパク質の機能に対する興味は持たれてきたが、現在までのところ上述の L2 など、ごく一部のリボソームタンパク質についてしか機能的な知見は得られていない。これは、リボソームが担う一連の反応経路や、リボソームそのものの構造が、きわめて複雑であることが理由になっている。rRNA、tRNA、リボソームタンパク質、翻訳因子、アミノアシル tRNA 合成酵素など、翻訳段階にかかわる要素は大腸菌でも 120 近く存在し、これらが複合的に働いて初めて翻訳反応が進む。中でもリボソームタンパク質は、リボソームという超多分子複合体の中で働くものであり、機能解析が最もむずかしい対象の一つと考えられる。

### 3) リボソームタンパク質構成の研究手法

これまで述べたように、リボソームに多種のタンパク質が含まれていることは、大腸菌リボソームを対象とした初期の研究からわかっていた (Waller, 1961)。当時はクロマトグラフィーや一次元電気泳動法による分離技術を用いて進められたが、どちらもすべてのリボソームタンパク質を十分に分離できていたとは言えず、同定技術にも限界があったため、研究グループごとに異なった命名法が取られていた (例、Traut et al, 1967; Moore et al., 1968; Hardy et al., 1969)。全構成タンパク質の解明には、タンパク質の分離技術と、同定技術の向上を待たざるを得なかった。現在の一次元電気泳動法の標準となっている、Laemmli による高分解能の 1 次元 SDS-PAGE 法が報告されたのと同じ 1970 年、Kaltschmidt と Wittmann は、リボソームタンパク質の分離分析を目的として、2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (K-W 法) を開発した (Kaltschmidt and Wittmann, 1970)。この方法は、単一画面上で 50 種以上のリボソームタンパク質を分離する画期的な技術であり、分離能に関しては 1 次元電気泳動を遙かに凌駕するも

のであった。以後この方法に基づいて大腸菌リボソームタンパク質が統一的に命名され、その結果定義されたリボソームタンパク質は L7/L12 を同種のタンパク質と数えると 52 種となった (Wittmann et al., 1971)。他の生物のリボソーム研究に於いても、分離技術としてこの K-W 法もしくはその改良法が用いられ、例えば大腸菌やラット細胞質のリボソームタンパク質の定義は終わったことになっていた。しかしこの方法にも実は、泳動中の還元性が保たれていないためにサンプルの人為的な修飾が起こることや、低分子量のタンパク質を十分に分離できていないことなどの限界があった。1986 年、和田はこれらの点を改良した radical-free and highly reducing (RFHR) 法を開発し (Wada, 1986a)、同時に、新たな 3 種の大腸菌リボソームタンパク質 L35、L36、S22 とリボソーム結合因子 RMF を報告した (Wada, 1986b; Wada et al., 1990)。さらに最近、このうちの 1 つ S22 が、大腸菌で定常期特異的にリボソームに結合することも報告された (Wada, 1998)。これにより現在、大腸菌リボソーム 1 粒子中には、L7/L12 を同種、4 分子と数えて、55 種 58 分子のタンパク質が結合していることが判明している。

今わかっている大腸菌リボソームタンパク質は、分子量約 4,400 から約 61,000、pI は約 4.5 から約 13.5 である。リボソームには、細胞に含まれる全タンパク質の中でも、最も酸性の部類のタンパク質、最も塩基性の部類のタンパク質、そして最も低分子の部類のタンパク質が含まれていることになる。これらの多種多様なタンパク質の分離技術は、いまだ発展途上であると言える。高い分離能を誇るタンパク質泳動法として、1975 年に O'Farrell によって報告された 2 次元電気泳動法がある (1975)。これは 1 次元目に等電点電気泳動法、2 次元目に SDS 電気泳動法を用いたもので、これを改良した方法が近年普及している。しかし pI10 以上の強塩基性領域はこの方法の適応範囲外である。大腸菌リボソームタンパク質の 80% 以上はこの領域に含まれるもので (表 1)、大多数のものが分離できないことになる。また等電点電気泳動は、pI5.0 以下の酸性タンパク質も十分な分離能を保証していない。今のところ、リボソームタンパク質の分離能力は RFHR 法が最も高いと考えられ、この方法による探索が、リボソームのタンパク質構成の最終決定を可能にするものと思われる。さらにこの方法は、O'Farrell による方法が弱点としている定量性の点でも信頼性が高く、細胞内の全タンパク質を一度に分離分析する方法として、現在最も優れている方法と考えられる。

以上あげたように、最も研究の進んでいる原核生物型リボソームでさえ、いまだ基本的な研究が必要とされている状況である。

## 2、葉緑体リボソームのこれまでの研究の問題点と本論文第一部の目的

植物は、細胞質に真核生物型リボソームを、ミトコンドリアと葉緑体にはそれぞれに別々の原核生物型リボソームをもっている。真核生物型リボソームとしてラット肝細胞やYeast細胞質のものが詳細に研究されているのとは対照的に、植物細胞質リボソームに対しては、いくつかの報告があるものの、網羅的な研究は為されていない。ミトコンドリアリボソームのタンパク質構成に至っては、ほとんど報告がない。ラットや酵母、大腸菌などでリボソームの研究が進んでいる理由として、ラットに関してはリボソーム研究の歴史的バックグラウンドが、酵母に関しては扱い易さが寄与していると考えられるが、植物でリボソーム研究が遅れている理由にはこれらとは別に、葉緑体の存在によって、細胞質リボソームと葉緑体リボソームが精製過程で相互に混入しやすいことも一つの原因と考えられる。植物の持つ最も大きな特徴の一つである光合成を行う緑葉は、特に活発にタンパク質合成をしていると考えられるが、緑葉の細胞質リボソームを精製するとき、葉緑体リボソームの混入を完全に排除することは非常に困難である。また逆に、葉緑体リボソームの混入を避けるために、根など色素体の発達していない組織を選んだのでは、植物を材料に用いた意味は少ない。単離精製のむずかしい植物細胞質リボソームをあえて研究対象に選ぶ利点は無かったと思われる。

これに対し、葉緑体リボソームに関する研究は比較的進んでいる。その理由には以下の点が考えられる。まず、無傷葉緑体を単離することで、細胞質リボソームの混入を避けることが比較的容易に出来ること、および植物特有のオルガネラである葉緑体は、進化学的な観点からも研究対象として興味をもたれたことがある。さらに、細胞内オルガネラとして独自に遺伝子発現をする葉緑体の翻訳機構を調べることは、植物の研究だけでなく、真核生物の細胞内における核及びオルガネラ間の遺伝子発現調節を調べる上で重要であったこともあげられる。以上のような理由に加えて、1986年にゼニゴケとタバコの葉緑体ゲノムの全遺伝子配列が明らかにされたことも研究を進める上で重要であった(Ohyama et al., 1986; Shinozaki et al., 1986)。これら葉緑体ゲノム上には、20個のリボソームタンパク質が見つかっている。

葉緑体リボソームの研究は、1962年のLyttletonによる葉緑体リボソームの単離以後すぐに始められ、その大きさや翻訳因子などの性質から葉緑体リボソームが大腸菌などの原核生物リボソームと類似性が高いことが報告された(Rawson and Stutz, 1969; Schwartz et al., 1967)。またユーグレナの30Sリボソーム亜粒子と大腸菌の50Sリボソーム亜粒子で構成された異種構成の70Sリボソ



ームが翻訳活性を有することも観察されている (Lee and Evans, 1971)。葉緑体リボソームのタンパク質構成に関してはこれまで、ユーグレナ (Freyssinet and Schiff, 1974)、ホウレンソウ (Mache et al., 1980; Dorne et al., 1984)、タバコ (Capel and Bourque, 1982)、エンドウ (Eneas-Filho et al., 1981)、ライムギ (Feierabend et al., 1988) などで報告されており、いずれも大腸菌で定義されている数と大きな隔たりはない。これらの知見に加えて、葉緑体ゲノム上に見られたリボソームタンパク質もそれぞれバクテリアリボソームタンパク質と相同性があり (総説、Subramanian, 1993)、葉緑体の起源がある種のバクテリアの共生だとする説と矛盾しないものであった。

このような背景から、これまでの葉緑体リボソームの研究は、大腸菌のそれとの比較研究が中心であった。リボソームの調製法や、使用されるタンパク質の分離技術も、大腸菌で行われてきた方法を踏襲するように、かつてはカラムクロマトグラフィーや1次元電気泳動法、その後は2次元電気泳動法としてK-W法、またはその改良法が使われていた。このため分離能、定量性とも不十分で、各タンパク質間の量比について論じることは不可能であった。

また、植物リボソームの研究はほとんどが緑葉 (ユーグレナは明所培養細胞) を用いたものであった。暗所芽生えの植物体は、光照射によって細胞内のタンパク質構成を劇的に変化させ、これに伴い葉緑体を発達させる。しかし、葉緑体リボソームのタンパク質構成について、光照射による影響を調べたものはこれまで無かった。

葉緑体リボソームは基本的には大腸菌などのバクテリアリボソームに近いものであるが、葉緑体に特異的なリボソームタンパク質も、これまでエンドウで2つ (Gantt, 1988)、ホウレンソウで3つ (Zhou et al., 1989; Carol et al., 1991; Wada et al., 1993)、合計5つ報告されている。葉緑体の進化や、葉緑体内におけるタンパク質合成の研究にとって重要な発見であるが、これらのタンパク質が単子葉植物の葉緑体リボソーム上にも存在していることを直接確認した報告はなかった。

以上の問題点を解決するため、本論文第一部ではオオムギ黄化葉を材料に用い、従来の葉緑体リボソーム研究の様々な点に改良を施して、プラスチドリボソームのタンパク質構成について調べた。まず、リボソームの調製に先立ち、無傷プラスチドを単離した。また、従来の方法に比べてリボソームの精製に要する時間を大幅に短縮した。さらに、リボソームタンパク質の分離分析に、K-W法を改良した、RFHR法を用いた。これらの改良の結果、泳動像は安定し、信頼できる結果を得ることが出来るようになった。本研究では、プラスチドリボソームに特徴的と思われるいくつかのタンパク質について、N末端アミノ酸

配列も決定し、これらと相同なタンパク質との比較から、機能に関する考察も試みた。またこの定量性と再現性の高い電気泳動法を用いて、リボソームタンパク質間の量比の推定とその光照射による影響についても調べ、プラスチドリボソームがタンパク質構成に関して均一ではない可能性を示す興味深い結果を得た。

### 3、大腸菌リボソーム研究のこれまでの問題点と本論文第二部の目的

大腸菌に関する今日の知見の多くが、主に対数増殖期の菌体を用いた研究から得られたものである。リボソームや翻訳機構についての研究もその例外ではない。しかし、大腸菌に限らず、自然界に存在するバクテリアの生育環境は、実験室で与えられるように、栄養や温度などの理想的な状態が保証されたものではない。現実には様々なストレスに対応して増殖速度を制御しながら活動していると考えべきで、例えば栄養源の枯渇など、生育に不適當な環境になると、バクテリアは一般にすぐには死なず、増殖は止めてもその環境でしばらく生き続けている。実験室における培養条件では、指数関数的に増殖している時期が対数増殖期と呼ばれるのに対し、このように長期培養によって増殖を止めた時期は定常期と呼ばれる。これまで定常期のバクテリアに焦点を置いた研究が少なかった大きな理由として、この時期の菌体が一見静的な状態にあると誤解されてきたことがあげられる。定常期 (stationary phase) といわれてきたゆえんでもある。しかし、比較的最近の研究で、この定常期の間に対数増殖期には見られない多くの生理的、形態的变化を示すことが判ってきた (例、Matin, 1991; 総説、Kolter et al., 1993; Huisman et al., 1996; Hengge-Aronis, 1996)。遺伝子発現に関した変化に限っても、以下の様な例が挙げられる。例えば、大腸菌の核様体 (nucleoid) における DNA 結合タンパク質の構成が大きく変化し、それが遺伝子の発現に関与していると考えられている。実際、対数増殖期で Fis、HU、Hfq が主要成分だったのに対し、定常期には Dps が主要成分になっていることが報告されている (Ali-Azam et al., 1999)。RNA ポリメラーゼの構成にも変化が見られる。RNA ポリメラーゼのホロ酵素は、 $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットからなるコア酵素と、プロモーターを認識する  $\sigma$  ファクターからなる。現在大腸菌で 7 種の  $\sigma$  ファクターが確認されており、このうち  $\sigma 70$  が対数増殖期の主要な  $\sigma$  因子として、その時期の大部分の転写開始に関与していると考えられている。しかし定常期になると、この比率が下がると共に  $\sigma 38$  または  $\sigma S$  と呼ばれる  $\sigma$  因子が増加する事が観察され得ている (Jishage and Ishihama, 1995)。この  $\sigma$  因子は多くの定常期特異的なタンパク質の発現に関与していることが判っている (Lange and

Hengge-Sronis, 1991; Hengge-Aronis, 1993)。

これら定常期特異的に見られる変化は、リボソームに関しても知られている。まずリボソームそのものの合成速度が、rRNA、リボソームタンパク質ともに減速する。rRNA 合成制御については、緊縮制御の鍵を握るシグナル物質、ppGpp が関与することが判っており、またリボソームタンパク質の合成制御には、過剰なリボソームタンパク質による翻訳レベルでの発現の自己抑制によることが判っている（総説、Zengel and Lindahl, 1994、Gourse et al., 1996）。タンパク質構成の変化では、L12 遺伝子産物と、同じ遺伝子産物の N 末端がアセチル化された L7 との量比の変化が知られている。これらはリボソーム 1 粒子中、合わせて 4 コピー存在するが、対数増殖期では L12 が多いのに対し、定常期ではほとんどが、アセチル化された L7 になる (Ramagopal, S & Subramanian, 1975 Ramagopal 1976)。L7/L12 は、翻訳における伸長因子との関与が知られているが (例、Traut et al., 1993)、L7/L12 の量比がリボソームの翻訳活性に影響を及ぼすかどうかについてはまだ明確にされていない。これらの変化とは別に、リボソームタンパク質 S22 の定常期特異的発現が最近報告されたことは前述の通りである。

リボソームの構造的な変化も知られている。増殖速度が落ちて定常期にさしかかった細胞内では、読まれるべき mRNA の量が減少して、翻訳に関与していない遊離の 70S リボソームが増加する。大腸菌では、これらの一時的に不要になったリボソームを殆ど消化せず、保存する形を取ることが判っている。これには、塩基性低分子タンパク質であるリボソーム ribosome modulation factor; RMF が関与している (Wada et al., 1990)。定常期特異的に発現された RMF はリボソームに結合し、それに伴って 2 つの 70S リボソーム粒子を二量体化する。この時のリボソームは翻訳活性を失っている (Wada et al., 1995)。二量体化したリボソームはおよそ 100S の沈降係数を持つことから、100S リボソームと呼ばれる。定常期の大腸菌を新鮮な培地に移し替えると、数分以内という非常に早い期間に二量体化が解消されて 100S リボソームが見られなくなり、再び 70S リボソームとして翻訳を開始する。これらのことから、100S リボソームの形成は、栄養条件が回復したときのために、可逆的にリボソームを失活させて保存しておくのに必要であると考えられている。

このように大腸菌の定常期に於ける変化に関して、断片的な証拠は蓄積されては来たものの、この時期の包括的研究は遅れている。近年、細胞内のタンパク質の量やその変動を網羅的に観察することで、試料となる生物の全体像の把握を目指す研究が、プロテオームという新しい学問分野として発達してきた。これまで大腸菌のプロテオームでは、O'Farrell らの開発した等電点電気泳動法を用いた研究が、Neidhardt 等のグループ (例、VanBogelen et al., 1999) や、Church

等のグループ (Link et al., 1997) によって精力的に行われており、これにより多くのタンパク質スポットが 2 次元電気泳動画面上に同定され、様々な生理的条件下における相対量の変化も調べられてきた。しかし、使用している電気泳動法の能力的限界から、調べられてきたのは主に弱酸性タンパク質だったこと、しかも低分子量のタンパク質がよく分離できていなかったこと、そして対象とした大腸菌が対数増殖期を基準にしてきたものであったことなどから、定常期における網羅的な研究はされてこなかった。

そこで本研究第二部では、まず長期培養下の大腸菌タンパク質の包括的分析を目指して、培養開始直後の対数増殖期から、培養開始後 8 日目まで、全部で 12 の時点で集菌し、不溶性画分、リボソーム画分、リボソームを除いた可溶性画分に分けて、それぞれの画分に含まれるタンパク質を分離した。分離には第一部で用いた RFHR 法を採用し、タンパク質を 2 次元電気泳動によって展開し、検出されるスポットの濃さの経時変化を追った。次に、定常期初期から長期培養下において蓄積量の変動を示す数多くのタンパク質の中で、リボソーム画分で蓄積量を増す二つの弱酸性タンパク質 F、G に注目した。N 末端アミノ酸配列の分析結果から、これらはハウレンソウでやオオムギで見つかった葉緑体特異的リボソームタンパク質と、アミノ酸配列上相関の見られるタンパク質であった。これらのタンパク質の生理的役割を調べるため、大腸菌 F、G と、大腸菌リボソームとのさらに詳細な関連を調べ、これまでにない挙動を示すタンパク質であることが明らかとなり、バクテリア型リボソームが定常期に於いてタンパク質構成をいくつかのパターンに変化させて環境に適応していく、新たな機構を示唆する結果が得られた。

以上、本研究では、第一部、第二部とも、方法の工夫と改善によって、リボソームのタンパク質構成が、条件によっては不均一性を獲得しうるものであることを示した。このことは、均一で一定であると考えられてきたこれまでの原核生物型リボソーム観に反するものであり、研究分野としては始まったばかりである。リボソームの不均一性をもたらすタンパク質の今後の詳細な機能解析は、原核生物や葉緑体の新たな生理現象の解明に道を拓くものであると考えている。

## 第一部

# オオムギプラスチドリボソームの蛋白質構成

## 第一部要旨

葉緑体リボソームのタンパク質を調べることを目的とし、これまでの方法をいくつかの点で改善した。まず材料として、これまで使われることの少なかった単子葉植物であるオオムギのプラスチドを用い、そこに含まれるプラスチドリボソームのタンパク質構成を調べることにした。リボソームは無傷葉緑体から調製することで細胞質リボソームが混入する可能性を排除し、操作時間も出来る限り短時間で済ませ、リボソームへの傷害の可能性を軽減した。リボソームの生理活性は poly(U) を鋳型とした *in vitro* における polyphenylalanine 合成活性が高く保たれていたことと、大小両重粒子の 70S 粒子への再会合能を保持していることで確認した。また、得られたリボソームタンパク質は、従来の K-W 法に比べて分解能、再現性、定量性いずれにも優れた RFHR 法を用いた。

以上の改良を施すことにより、オオムギプラスチドリボソームタンパク質の泳動像から、小重粒子に 23 個、大重粒子に 36 個、合計 59 個のスポットを確認し、それぞれを PBRS1-BPRS23、BPRL1-BPRL36 と名付けた。これらの数は、葉緑体リボソームが原核生物型と言われていることと矛盾しない結果であった。上記の 59 個のタンパク質とは別のもので、低塩濃度条件ではリボソームに 1 コピー結合していながら、高塩濃度処理によって完全にリボソームから解離する酸性タンパク質を 1 つ見いだし、これを BPRA1 と名付けた。

全体として原核生物型リボソームタンパク質の性質が観られたものの、部分的に特徴的な性質もみられた。それは、酸性領域に移動するタンパク質が多く含まれていることであった。そこで、大腸菌リボソームタンパク質にはみられない、強い酸性または弱塩基性低分子タンパク質 4 つと、高塩濃度処理ではがれるタンパク質 BPRA1 の N 末端アミノ酸配列を分析し、得られた結果を他の生物のタンパク質と比較した。これにより、これまで双子葉植物の葉緑体リボソームにのみ存在が確認されていたタンパク質 5 種のうち、相関をもつタンパク質を 3 つまで単子葉植物のプラスチドリボソーム上に初めて確認した。このうちの 1 つに BPRA1 が含まれていた。

電気泳動による定量性が増したことから、各構成タンパク質の相対量の比、つまりコピー数を調べた。その結果は、常に安定して低いコピー数を示すタンパク質の存在を示していた。このことは、原核生物型リボソームのタンパク質構成が均一であるとするこれまでの見方と異なるものであった。

材料に用いた黄化葉に光を照射し、緑化していく過程でのプラスチドリボソームタンパク質構成の変化を調べたが、光照射の影響は観察されず、コピー数の低いタンパク質もそのコピー数のままで安定に維持されていた。

本研究で使われた方法は、リボソーム及びその構成タンパク質の扱いに関して今まで以上に注意を払ったものであり、今後のリボソーム研究への応用価値は高いと考えられた。また得られた知見は、葉緑体リボソームに関する基礎的なものであり、葉緑体における翻訳機構を研究していく上で重要な土台となると考えられた。さらに、オオムギプラスチドリボソームに結合していた酸性タンパク質の一つは、以前葉緑体特異的リボソームタンパク質とされていたが、最近他の原核生物型リボソームにも見つかっており、その特徴的な性質から、原核生物型リボソーム全般に関して、あらたな理解を深めることに繋がると考えられた。また本研究では、プラスチドリボソームのタンパク質構成が安定して不均一性を維持していることがわかった。これは、異なったタンパク質構成のリボソームの存在と、それぞれの役割の違いを検証する必要性を提示するものであり、今後の研究に重要な示唆を与えるものと考えられた。

## 第一部材料と方法

### 植物材料

オオムギ黄化葉を用いた。暗所 4°C で 5 時間吸水させたオオムギ (*Hordum vulgare* L. cv. Amaginijo) の種子をアンチホルミンで 30 分間処理し、良く水洗した後、バーミキュライト上に播種した。さらにバーミキュライトで薄く覆い、ハイポネックス 2000 倍希釈液を与え、暗所下、28°C で発芽させ、適宜水を補給した。播種後 5.5 日の芽生えの第一葉を暗所にて刈り取り、以下の実験に用いた。黄化葉に対する光照射実験は、播種後 5.5 日の芽生えに対して行った。照射条件は 28°C、連続光とし、照射後の第一葉を刈り取って実験に用いた。

### オオムギプラスチドリボソームの単離

以下の操作はすべて 4°C または氷冷下で行った。植物の破碎には、葉緑体の破壊をおさえるために、ミキサーに剃刀の刃を取り付けたものを使用した (Kannangara et al., 1977)。オオムギの葉を buffer A (0.4 M sorbitol, 6 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) 中でブレンダーにより 10–20 秒破碎し、ナイロンメッシュで濾過した。濾液を 3,000 x g で 10 分間遠心して得たペレットを buffer A に懸濁した。懸濁液を 25% Ludox-AM に上層し、5,000 x g で 10 分間遠心して、無傷プラスチドをペレットとして得た。Ludox-AM を除く目的でペレットを buffer A に懸濁し、3,000 x g で 10 分間遠心して再びペレットにした。ここに 2 倍量の buffer B (25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) を加えて懸濁し、さらにグラスホモジナイザーを使用して 1 分間ホモジナイズした後、7,000 x g で 5 分間遠心した。得られたペレットを再び buffer B に懸濁して同じ処理をし、遠心した。この 2 回の遠心で得られた上清を合わせてストロマ画分とした。これを buffer B で調製した 10–40% ショ糖密度勾配に上層し、12,500 x g で 1.5 時間遠心した後、遠心管の底より 1.5 ml ずつ順次分画し、各画分の 260 nm の吸収を測定した。70S モノソームにあたる画分を回収し、buffer B で調製した 1.0 ml の 40% ショ糖クッションに上層して、110,000 x g で 5 時間遠心して得たペレットをプラスチドリボソームとした。また、リボソームの高塩濃度処理は、ショ糖密度勾配遠心後、70S モノソームに当たる画分に対して行った。KCl を終濃度 0.5 M になるように加え 30 分間室温で攪拌した後、10,000 x g で 10 分間遠心した上清を buffer C (0.5 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) で調製した 1.0 ml の 40% ショ糖クッションに上層し、110,000 x g で 5 時間遠心して、高塩濃度処理したリボソームをペレットとして得た。

プラスチドリボソームを亜粒子に解離させる場合には、上述のストロマ画

分に対して KCl を終濃度 0.5 M になるように加えて 30 分間 4°C で攪拌した後、10,000 x g で 10 分間遠心した上清を、buffer C で調製した 10–40% ショ糖密度勾配に上層し、12,500 x g で 2 時間遠心した後、70S モノソームの場合と同様に分画した。大小各亜粒子を含む画分を別々に回収し、それぞれを buffer B で調製した 1.0 ml の 40% ショ糖クッションに上層し、110,000 x g で 5 時間遠心してペレットにしたものを、プラスチドリボソームの亜粒子とした。

#### 大腸菌リボソームの単離

大腸菌の W3110 株を用いて、放射性同位元素で標識した菌体を得た。培地は、最少培地 medium E に 2% polypeptone と 0.4% glucose を加えたものを用いた (Wada, 1986a)。リボソームを放射性同位元素で標識するため、ここに 5.7 MBq の  $^{14}\text{C}$  でラベルした glucose を加えた。菌体は 10,000 x g、10 分間の遠心によりペレットとして得た。この菌体をほぼ等量の石英砂とともに乳鉢で 2 分間すりつぶした。ここに buffer C (100 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 、10 mM  $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 、10 mM Tris-HCl、6 mM 2-mercaptoethanol、pH 7.5) を加え、10,000 x g、10 分間の遠心により上清を得た。この時のペレットは buffer C に懸濁後、同じ操作によってすりつぶしと遠心を行った。合計 3 回の操作によって得た上清をあわせて大腸菌可溶性画分とした。この画分を 130,000 x g、2 時間遠心し、ペレットを大腸菌の粗リボソーム画分とした。後述の翻訳活性に用いる大腸菌リボソームは、放射性同位元素を含まない培地で調製した菌体から上述と同じ操作で粗リボソーム画分を得て、高塩濃度 buffer (1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 、10 mM  $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 、10 mM Tris-HCl、6 mM 2-mercaptoethanol、pH 7.5) に懸濁し、4°C、30 分間攪拌した後、10,000 x g、10 分間かけ、得られた上清を 130,000 x g、2 時間遠心してペレットとして得たりボソームを用いた。

#### poly(U)を鋳型とした翻訳活性の測定

翻訳活性の測定は基本的に Igarashi らの方法に従った (1981)。翻訳因子などリボソーム以外のものは、大腸菌 Q13 株の可溶性画分から以下の方法によって得た。Q13 株は上述の 2% polypeptone と 0.4% glucose を含む medium E で培養した。上述の操作で大腸菌可溶性画分を調製し、100,000 x g の遠心に掛けた時に得られた上清を centricon 3 (amicon) を用いて濃縮し、S100 画分として活性測定の実験液に加えた。反応液 (50  $\mu\text{l}$ ) は、30 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM KCl、14 mM  $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 、1 mM dithiothreitol、1 mM ATP、0.4 mM GTP、4 mM phosphoenolpyruvate、5  $\mu\text{g}$  pyruvate kinase (Boehringer-Mannheim)、5  $\mu\text{g}$  of poly(U)、0.24 A260 nm unit の大腸菌リボソームまたはプラスチドリボソーム、およそ 40  $\mu\text{g}$  のタンパク質を含む S100 画分、5 nM phenylalanine、 $^{14}\text{C}$  でラベルされた 1.85 kBq



の phenylalanine を入れた。反応は 30°C で 15 分間行った。反応終了後、poly-phenylalanine としてペプチドに取り込まれた放射活性は、Igarashi らの方法に従って測定した (1978)。

#### リボソームタンパク質の抽出

リボソーム画分、粗リボソーム画分、リボソーム亜粒子からのタンパク質の抽出には、酢酸法を用いた (Hardy et al., 1969)。抽出液は 2% の酢酸で透析した後、凍結乾燥し、使用時まで -20 °C で保存した。

#### タンパク質の電気泳動

酢酸法によって得られたタンパク質は、RFHR 法によって分離した。基本的に Wada の方法 (1986a) に従ったが、尿素の濃度を 6 M から 8M に上げた。電気泳動終了後、ゲルは Amido Black 10B によって染色し、1% 酢酸中で電気脱色した。

#### タンパク質の N 末アミノ酸配列の分析

RFHR 法による電気泳動後、ゲル中のタンパク質を染色せずに、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に electroblot し、この膜を Coomassie Brilliant Blue G250 により染色した。目的のスポットを切り抜き、Applied Biosystems 社の 470A gas-phase protein sequencer により分析した。操作、データ解析はマニュアルに従った。

#### オオムギリボソームタンパク質の平均電荷量と分子量の推定

分子量一万当たりの平均電荷量は、大腸菌リボソームタンパク質の 1 次元目の易動度をその平均電荷量に対してプロットしたグラフ (図 6) の回帰曲線に、同時に電気泳動したオオムギリボソームタンパク質の 1 次元目の易動度をあてはめ、推定した。

分子量の推定は、大腸菌リボソームタンパク質の 2 次元目の易動度を基準に推定したが、この場合はそれぞれの電氣的性質の影響を受けやすいので、泳動像を酸性領域、中間領域、塩基性領域の 3 つの領域に分け、それぞれに対して補正曲線を作成し、対応する領域に含まれるタンパク質の分子量推定に用いた (図 7A、B、C)。具体的には、酸性領域のタンパク質として大腸菌リボソームタンパク質 S1、2、6 と L12 を用いて BPRS1、2、3、4、7、と L1、2、4、6、7、9、10、22、28 と BPRA1 の分子量を、中間領域のタンパク質として大腸菌リボソームタンパク質 S3、4、7、8、9、10、11、13、14、15、16、17、18、19 と L1、2、3、4、5、6、10、11、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、

25、27、29、30 を用いて BPRS5、6、8、9、11、14、16、17、18、19、20、22、23 と L3、5、8、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、26、27、29、30 の分子量を、塩基性領域のタンパク質として大腸菌リボソームタンパク質 S12、20、21 と L20、28、32、33、34、35、36 を用いて BPRS10、12、13、15、21 と L25、31、32、33、34、35、36 の分子量を推定した。

#### リボソームタンパク質の量比の推定

リボソームタンパク質の量比は、電気泳動像上で各タンパク質が形成しているスポットの濃さから推定した。このとき、色素による各タンパク質の染色され易さは、それぞれの電氣的性質の影響を受けると予想されたので、まず大腸菌リボソームタンパク質を用いて、タンパク質の平均電荷量と染色され易さとの相関を調べた。上述の方法により  $^{14}\text{C}$  で標識した粗リボソーム画分を大腸菌から調製し、タンパク質を抽出した後、RFHR 法により分離した。Amido Black 10B によって染色した後、デンスitomーター PD110 (Molecular Dynamics Co.) によりリボソームタンパク質のスポットの濃さ (ID) を測定した。その後、測定したスポットにあたる領域を剃刀でゲル片として切り出し、0.5 ml のゲル溶解液 (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{NH}_4$  99vol. and conc.  $\text{NH}_4\text{OH}$  1vol.) に入れて  $70^\circ\text{C}$  で3時間処理した後、さらに 0.5 ml のゲル溶解液を加え、 $70^\circ\text{C}$  で一晩処理した。ゲル片が完全に溶解していることを確認した後、10 ml の液体シンチレーションカクテルを加え、取り込まれていた放射活性 (R) を測定した。測定した放射活性はスポットに含まれていた全タンパク質重量に比例しているはずなので、単位タンパク質重量当たりのスポットの濃さを、ID/R によって求めた。この値を、各リボソームタンパク質の平均電荷量に対してプロットし、平均電荷量と染色され易さとの関係を調べた (図 11)。相関が見られたので、このプロットの回帰曲線をオオムギプラスチドリボソームタンパク質の量比の推定に用いることとした。オオムギプラスチドリボソームタンパク質を RFHR 法で分離し、Amido Black 10B によって染色した後、デンスitomーター PD110 で各スポットの濃さ (ID) を測定した。予め推定してあった平均電荷量 (表 2) を用いて、上述の回帰曲線により目的タンパク質の ID/R に相当する値を求め、この値でスポットの濃さを割り、電氣的性質による染まり易さの違いを補正した。こうして得られた、R に相当する値を、予め推定してあった分子量 (表 2) で割り、相対的な量比を求めた。コピー数の算出には、BPRL10、22、28 を除くすべての値の平均を 1 として補正した。

## 第一部結果

### オオムギプラスチドリボソームの単離

リボソームを迅速にしかも高度に精製して得るため、従来の方法に二つの改良を加えた。まず一つは無傷プラスチドの単離である。これにより、従来の粗葉緑体画分からの精製に比べ、細胞質リボソームの混入を完全に排除できるものと考えた。材料と方法に示したように、細胞破碎液から得た粗葉緑体画分を buffer A に懸濁後、Rudox-AM 25%を含む buffer A に上層して遠心し、無傷プラスチドを得た。もう一つの改良点は、リボソーム精製過程の時間を短縮したことである。従来の方法では、ストロマ画分を長時間、時には一晩の超遠心にかけて粗リボソーム画分を調製した後、ショ糖クッション、またはショ糖密度勾配に上層して再び遠心し、リボソームを精製していた。しかしこれらの方法では最終的に 2 日近くかかり、複合体の崩壊が始まる可能性も考えられた。そこで本研究では、プラスチドのストロマ画分を直接ショ糖密度勾配に上層して遠心する事にした。この方法は収率は悪いものの、プラスチド破碎から 2 時間以内にリボソーム画分を得ることが可能である。波長 260 nm での rRNA の吸収で調べた遠心後のフラクションパターンが図 1 である。ここに示すように単一の屹立したピークが得られ、リボソームの崩壊は避けられていると判断した。またこの幅の狭いピークには細胞質に大量に存在する細胞質リボソームの約 80S のピークは含まれておらず、このことから細胞質由来の混入の可能性も低いものと考えられた。プラスチド内における大きな複合体である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase は 20S 以下と言われており、今回の方法による 70S リボソームの単離は、この混入も防ぐことが出来たと考えられた。ピークのフラクションは回収し、buffer C で調製した 40%ショ糖クッションに上層して遠心し、70S リボソームはペレットとして得た。リボソームに比較的ゆるく結合している翻訳因子などは、高いモノカチオン濃度の buffer で処理することでリボソームから解離することが知られており、この操作は高塩濃度処理と言われている。オオムギプラスチドリボソームを高塩濃度処理する場合は、70S リボソームを含むショ糖密度勾のフラクションに直接 KCl を終濃度 500 mM になるように加え 30 分間攪拌した後、遠心して高塩濃度処理リボソームをペレットとして得た。従来のように、一度ペレットにしてから高塩濃度処理する操作に比べて時間が短縮でき、リボソームに対するダメージが少なく済むと考えた。

### In vitro 翻訳活性

高塩濃度処理によって得られたリボソームの翻訳活性を poly(U)を鋳型とした poly-phenylalanine 合成活性により調べた。基質として  $^{14}\text{C}$  で標識した phenylalanine を与え、poly-phenylalanine への取り込みにより活性を測定した。反応液にはリボソームを遠心によって取り除いた大腸菌由来の細胞抽出液を添加

した。このままでは  $^{14}\text{C}$ -phenylalanine の取り込み活性は見られなかったが (- Rb)、ここに大腸菌リボソーム (+ Ecoli Rb)、またはオオムギプラスチドリボソーム (+ plastid Rb) を加えると、十分な取り込み活性が観察された (図 2)。このことから、得たりボソームは高い翻訳活性を維持していると判断した。

#### リボソーム粒子の亜粒子への解離における塩濃度依存性

会合した状態の 70S リボソームを解離させ、大小各亜粒子のタンパク質構成を調べる為に、オオムギプラスチドリボソームの解離条件を調べた。従来の研究から、原核生物型リボソームも真核生物型リボソームも、 $\text{Mg}^{2+}$ 存在下で  $\text{K}^+$ 濃度が上昇すると解離することが知られている (Zitomer and Flaks, 1972; Sperrazza et al., 1980)。オオムギプラスチドリボソームの解離における KCl 濃度の影響を調べるため、 $\text{Mg}^{2+}$ の濃度を 70S リボソームが安定して存在する 10 mM に固定し、KCl の濃度を 25 mM から図 3A に示した様々な濃度に上昇させて buffer を調製し、シヨ糖密度勾配遠心によって解離状況を調べた。図には波長 260 nm の吸収によって測定した遠心後のリボソーム粒子の分布パターンを示した。ここにあらわれているように、KCl が 100 mM 以下では 70S リボソームは安定に存在し、解離していなかった。KCl が 200 mM から 300 mM では、リボソームの部分的解離が見られた。KCl が 400 mM 以上含まれると、ほとんどのリボソームはサブユニットに解離していた。今回得られたプラスチドリボソームに対するカチオンの解離への影響は、Zitomer and Flaks が大腸菌リボソームを用いて観察したものと似たものとなった。

リボソームの解離が、リボソーム粒子の崩壊によるものではないことを調べるため、500 mM の KCl と 10 mM の  $\text{MgCl}_2$  を含む buffer で調製した大小両亜粒子の 70S リボソームへの再会合能を調べた。シヨ糖密度勾配遠心によって得た大小両サブユニットを含むフラクションを一本の遠心管にいれ、遠心してペレットにしたあと、これを buffer B に懸濁し、懸濁液を等分して buffer B または 500 mM の KCl を含む buffer C で調製したシヨ糖密度勾配遠心に上層して遠心した。その結果、図 3B に示すように、buffer B では小サブユニットのピークが完全に消失し、新たに 70S リボソームのピークがあらわれ、それとは別に過剰量の 50S 亜粒子のピークが見られた。KCl を 500 mM にした buffer では、図 5A で示したように解離したパターンが得られた。これらの結果から、500 mM の KCl と 10 mM の  $\text{MgCl}_2$  を含む buffer で調製したプラスチドリボソームの亜粒子は、会合活性を維持しているものと判断し、解離 buffer には 500 mM の KCl と 10 mM の  $\text{MgCl}_2$  を含むバッファー (buffer C) を用いることにした。

#### オオムギプラスチドリボソームタンパク質の決定

プラスチドリボソームを buffer B で調製した後、リボソームタンパク質を酢酸法によって抽出して、RFHR 法によって分離すると、58 個のスポットが確認された (図 4A)。データは示さないが、オオムギ細胞質リボソームのタンパ

ク質を同じ RFHR 法によって分離したパターンと比較した結果、得られたプラスチドリボソームは細胞質リボソームの混入を完全に排除できていることが判った。高塩濃度処理したプラスチドリボソームからタンパク質を抽出して RFHR 法によって分離した場合、高塩濃度処理をしていないリボソームの泳動像と比較すると、ただ1つ酸性領域に観察されていたスポットが完全に消失していた他は、変化がなかった(図 4B)。高塩濃度処理によってリボソームから解離した酸性タンパク質は以後 BPA1 と呼ぶことにした。

リボソームの大小両サブユニットは buffer C によって精製し、それぞれのタンパク質を酢酸法で抽出した後 RFHR 法で分離した。泳動像には、小サブユニットに 23 個、大サブユニットに 36 個のスポットが確認された(それぞれ図 5A、B に示す)。BPA1 は高塩濃度処理によってリボソームから解離するタンパク質であり、今回の解離 buffer C によって大小どちらの亜粒子に属するタンパク質かを決定することは出来なかった。大小両亜粒子に含まれるスポットの数が合計 59 個となり、高塩濃度処理後の 70S リボソームに確認された 57 個よりも 2 つ数が多くなった。この理由は、BPA7 と BPRS14 がそれぞれ BPRL9、BPRL24 とほぼ同じ位置にスポットを形成し、それぞれ 1 ずつのスポットに見えているからであった。大小両サブユニットに確認された 59 個のタンパク質をオオムギプラスチドリボソームタンパク質として定義し、これらのスポットをそれぞれ、BPRS1-23、BPRL1-36 と名付けた(図 5C)。これら以外に、小さいスポットが 4 つ確認されたが、高塩濃度処理によって完全に解離した BPA1 とともに、今回の定義からは除外した。

#### リボソームタンパク質の平均電荷量と分子量の推定

RFHR 法の特徴として、一次元目は主に分子量あたりの平均電荷量、二次元目は主に分子量の違いでタンパク質を分離する。本研究ではアミノ酸組成の判っていないプラスチドリボソームタンパク質を扱うため、電気泳動像からそれぞれの平均電荷量と分子量を推定した。平均電荷量は、既にアミノ酸組成の判っている大腸菌リボソームタンパク質の一次元目の泳動距離を用いて検量線を作成し(図 6)、これにプラスチドリボソームタンパク質の一次元目の泳動距離を当てはめて導いた。二次元目の易動度は SDS-PAGE と異なり、RFHR 法の二次元目の buffer (pH3.6) における各タンパク質のチャージの影響を受けるため、酸性タンパク質と塩基性タンパク質では大きく異なる。そこで大腸菌リボソームタンパク質を用いて酸性領域、中間領域、そして塩基性領域に含まれるタンパク質についての分子量検量線を作成し(それぞれ図 7A、B、C)、これらによって得られたプラスチドリボソームタンパク質の分子量を推定した。得られた分子量一万当たりの平均電荷量と分子量を表 2 に示す。分子量は 3,200 から 54,300、平均分子量は 17,500 となった。これは大腸菌リボソームタンパク質の平均分子量 14,100 よりも大きな値であった。分子量一万当たりの平均電荷量は -12.2 から 26.2 まで広がっており、大腸菌の -10.0 から 25.0 に比べると、より酸

性側に広がっていることを示していた。

#### N 末端アミノ酸配列の決定

BPRL10 と BPRL22 は強い酸性領域にそのスポットが見られた。また BPRL28 は弱酸性、PBR23 は弱塩基性だが、どちらも非常に低分子量の領域にそのスポットが見られた。以上あげた 4 つのタンパク質は、大腸菌リボソームタンパク質を RFHR 法で分離したときには見られない領域にスポットを形成しており、オオムギプラスチドリボソームに特徴的なタンパク質であると判断して、その N 末端アミノ酸配列の決定を試みた。また、高塩濃度処理によって完全に消失した BPRA1 についても、その特徴的な挙動から興味を持ち、N 末端アミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列は、PVDV 膜上に転写したタンパク質をアミノ酸シーケンサーにかけて分析した。BPRL10 の N 末端アミノ酸配列は、ライムギプラスチドリボソームタンパク質 L12 (Schmidt et al., 1993) と同じものであった (図 8 A)。このタンパク質はバクテリアリボソームに含まれる酸性タンパク質の L12 と相同なものである。BPRL22 と BPRL28 はそれぞれ、大腸菌リボソームタンパク質 L31 (Brosius, 1978) とエンドウのプラスチドリボソームタンパク質 PsCL25 (Gantt, 1988) と相同なアミノ酸配列をもっていた (それぞれ図 8 B、C)。PBR23 の N 末端はホウレンソウの葉緑体リボソームタンパク質 SCS23 の N 末端と相同なアミノ酸配列をもっていた (図 8 D)。BPRA1 はホウレンソウ葉緑体リボソームタンパク質 S22 と相同な N 末端アミノ酸配列をもっていた (図 8 E)。エンドウの PsCL25、ホウレンソウの SCS23 と S22 は葉緑体リボソーム特異的タンパク質として報告されたものである。

#### リボソームタンパク質の量比分析

様々なタンパク質の量比の分析は、大腸菌などの単細胞生物であれば放射性同位元素を培地に入れ、各タンパク質への取り込みから推定する方法が最良である。しかしオオムギの芽生えを用いる場合、プラスチドリボソームタンパク質すべてを均一に標識することは困難である。そこで本研究では、リボソームタンパク質を RFHR 法で分離して染色した後、それぞれのスポットの濃さから量比を推定する方法を試みた。Tal 等の報告によれば、大腸菌の大部分のリボソームタンパク質は Coomassie Brilliant Blue R250 (以下 CBB) の結合容量とタンパク質のプラスの電荷量の間に関連を示す (1990)。本研究でタンパク質の染色に用いている色素は Amido Black 10B であり、この分子もマイナスの電荷をもっているため、CBB の場合と同じ様に、タンパク質のプラスの電荷量に依存して結合するものと考えた。またオオムギプラスチドリボソームタンパク質のアミノ酸組成は判っていないため、プラスの電荷の代わりに、各タンパク質の平均電荷量を用いてコピー数を推定する方法を確立することにした。まず大腸菌を  $^{14}\text{C}$ -glucose 存在下で培養し、粗リボソーム画分を得た後、タンパク質を抽出し、RFHR 法によって分離した。Amido Black 10B によって染色、脱色後、各

スポットの濃さ (ID) を測定した後、スポットを切り出して、 $^{14}\text{C}$  の取り込みによる放射活性 (R) を測定した。ここで、R の値は、スポットに含まれていた全タンパク質質量に比例するはずである。そこで、スポットの濃さ (ID) を、取り込まれていた放射線量 (R) で割った値 (ID/R) と、平均電荷量との間の相関を調べた。その結果、図 9 に示すように強い相関が見られたので、この回帰曲線をオオムギリボソームタンパク質に当てはめた。まず表 2 に示した平均電荷量の値と図 9 に示した回帰曲線から、ID/R に相当する値を計算し、予め測定してあった各スポットの濃さ (ID) を用いて R に相当する全タンパク質質量の比を求めた。さらに表 2 に示した分子量の値を用いて相対的な分子数の比を求め、その平均を基準にしてリボソーム当たりのコピー数を推定した。このとき、BPRL10、BPRL22、BPRL28 は非常に大きい値を示したが、これらは、大腸菌リボソームタンパク質を用いて作成した回帰曲線が覆うことのできない領域にスポットを形成するタンパク質だったので、本研究ではこれらのコピー数を論じることは避けた。また同じ位置にスポットを形成した BPRS14 と BPRL24 は亜粒子中の泳動像に見られたスポットの濃さがほぼ同じことから、値を 2 等分してそれぞれのコピー数としたが、BPRS7/L9 の値は分けず、合計の値をコピー数とした。以上のようにして、高塩濃度処理していないプラスチドリボソームについて、その構成タンパク質のコピー数を計算した (表 3)。その結果、約 8 割のリボソームタンパク質がコピー数 0.5 から 1.5 に収まった。BPRS1、BPRL12、BPRL15 はいずれもコピー数が 0.3 を下回ったが、高塩濃度処理によっても同程度のコピー数が維持されていた。BPRA1 のコピー数は 1 以上の値を示したが、高塩濃度処理によって検出できなくなっていた。

#### 緑化過程におけるリボソームタンパク質構成

光照射による緑化が、プラスチドのリボソームタンパク質構成に及ぼす影響を調べるため、黄化葉と、光照射後 3 時間、6 時間、12 時間の葉からプラスチドリボソームを精製し、その構成タンパク質を RFHR 法によって分離した (図 10)。また、これらについて、表 2 と同じ方法で各タンパク質のコピー数を計算し、棒グラフで表した (図 11)。その結果、プラスチドリボソームのタンパク質構成は光照射後も変化は見られず安定していた。各タンパク質のコピー数にも大きな変化は認められなかった。

## 第一部考察

### オオムギプラスチドリボソームタンパク質の特徴

本研究では、リボソームの単離方法に改良を施したことで、プラスチドリボソームを迅速かつ高純度に精製することに成功した。このリボソームの活性は poly(U) を鋳型とした翻訳反応と、解離した亜粒子の再会合能によって確認した。また構成タンパク質の分離には RFHR 法を用いた。この電気泳動法によって、これまでに大腸菌で 3 種の塩基性低分子リボソームタンパク質と 1 種のリボソーム結合タンパク質、ホウレンソウで 1 種の塩基性低分子リボソームタンパク質が新規に発見されている。本研究により、プラスチドリボソームには、小亜粒子に 23 種、大亜粒子に 36 種、合計 59 種のリボソームタンパク質を確認した。この数字は、他の植物葉緑体リボソームに報告されている数よりもやや多いものであった。

一般に、リボソームタンパク質には強い塩基性のものが多い。大腸菌リボソームでは、現在判っているもののうち 8 割以上が pI10 以上の等電点を持つ。オオムギプラスチドリボソームタンパク質も、多くのものが RFHR 法によって塩基性領域にスポットを形成し、典型的なりボソームのタンパク質構成を示していた。しかし泳動像の酸性領域に特徴が見られた。大腸菌リボソームには酸性領域にスポットを形成するタンパク質が 5 つ存在する。S1、S2、S6、L9、L7/L12 である。これに対しプラスチドリボソームには 10 種以上の酸性タンパク質が結合していた (図 5C、表 2)。同じ RFHR 法によって、これまでホウレンソウ葉緑体 (Wada et al., 1993)、ユーグレナ (田中氏、私信)、及び *Anabaena* (Sato et al., 1997) のリボソームタンパク質が分析されている。このいずれもが、大腸菌よりも多くのスポットを酸性領域に形成していた。酸性タンパク質を多く含むことは、葉緑体リボソームの特徴なのかもしれない。

### 特徴的性質を示したタンパク質に関する考察

強い酸性領域にスポットを形成する BPRL10 は、原核生物型リボソームの L7/L12 と関連したアミノ酸配列をもっていた。大腸菌のリボソームタンパク質の中では L7/L12 が最も酸性のタンパク質である。リボソーム 1 分子中に合計 4 分子存在し、これらが束になって L10 に結合し、リボソーム大亜粒子の「stalk」と呼ばれる構造を形成する。この部位は、翻訳因子と結合してペプチド結合の伸長反応に重要な役割を果たすことが判っている。図 4 のスポットの濃さからも判るように、BPRL10 も多コピー存在すると考えられ、存在様式も他のリボソ



ームと同じであることが示唆された。この構造と機能は真核生物でも保存されており、真核生物リボソームタンパク質の場合、L7/L12と相同な酸性タンパク質P1とP2がP0に多コピー結合してリボソーム上に存在していることが判っている。P0、P1、P2 関してはリン酸化を受けることが判っているが、リン酸化の役割は不明である。

BPRL22は、大腸菌L7/L12や、それと相同なBPRL10よりもさらに酸性側にスポットを形成した。大腸菌リボソームタンパク質にはこの領域にスポットを形成するタンパク質は存在しない。N末端アミノ酸配列分析の結果から、このタンパク質が原核生物型リボソームタンパク質L31に関連したタンパク質であることが示唆された。しかしBPRL22とは対照的に、大腸菌L31は塩基性タンパク質である。BPRL22の少なくともN末端の十数残基には、特に強い酸性ドメインは見られなかった。データは示さないが、データベース上にはクリプト藻類L31のアミノ酸配列が登録されており、このN末端とより強い関連性を示したが、クリプト藻類L31のアミノ酸配列から予想される等電点を調べると、弱い塩基性になっていた。ホウレンソウの葉緑体リボソームタンパク質をRFHR法によって分離しても、BPRL22と同じ様な強い酸性領域にスポットを形成するものは見つからない(Wada et al., 1993)。L31の酸性化をもたらした構造変化や、その酸性化の意味を知る手がかりを得る為にも、今後BPRL22の全一次構造の決定が必要である。

BPRS23とBPRL28のN末端アミノ酸配列はそれぞれ、SCS23、PsCL25と相同性を示した。SCS23はホウレンソウ葉緑体リボソームの構成タンパク質中にRFHR法で発見したWada等による報告と、それとは独立に別のグループが見つけた報告があり(Wada et al., 1993; Schmidt et al., 1993)、PsCL25は、エンドウ葉緑体リボソーム中に見つかったタンパク質である(Gantt, 1988)。いずれも大腸菌リボソーム中のいかなるタンパク質とも配列上の相同性が見られない、葉緑体特異的リボソームタンパク質として報告されている。しかしその他の生物ではこれまで存在が報告されておらず、機能も判っていない。これらに関連したタンパク質が単子葉植物であるオオムギにも見つかったことから、どちらも高等植物に共通して存在する可能性がある。しかしRFHR法によるSCS23のスポットは、強い塩基性領域に形成される。またホウレンソウのリボソームタンパク質のRFHR法による泳動像には、BPRL28の近くにスポットを形成するものがない。これらの葉緑体特異的タンパク質は、広く共通して葉緑体リボソーム中に存在しながら、タンパク質の電気的な性質はN末端以外の部分で変化しているのかもしれない。さらに多くの植物について、これらと相同なタンパク

質の有無とその構造を調べることにより、葉緑体特異的リボソームタンパク質の普遍性と、機能的な知見が得られるものと考えられる。

BPRA1はプラスチドリボソーム中に、他のリボソームタンパク質と同程度かそれ以上のコピー数で存在していたが、高塩濃度処理によって完全に解離していた。大腸菌では、高塩濃度処理によってはがれないものがリボソームタンパク質として定義されていることから、本研究でもBPRA1をリボソームタンパク質とすることは避けた。しかし、大腸菌の翻訳因子の中に、リボソーム画分に1コピー存在するものは見つかっていない。このタンパク質の機能はまだ未知であるが、高塩濃度処理したプラスチドリボソームがpoly(U)を鋳型とした翻訳活性を示したことから、BPRA1はこの反応に関与していないものと推察された。また、BPRA1のN末端アミノ酸配列はホウレンソウ葉緑体のS22と相同性を示した。ホウレンソウ葉緑体S22は、大腸菌リボソームタンパク質のいずれとも相同性が検出されず、上述のSCS23、PsCL25と同様に、葉緑体特異的リボソームタンパク質として報告されたものである(Zhou and Mache, 1989; Johnson et al., 1990)。ホウレンソウS22の性質については、これまでいくつかの知見が得られている。まず、このタンパク質は葉緑体リボソームの小亜粒子上に、他のリボソームタンパク質と同程度存在しているにもかかわらず、リボソームに結合していない状態でもストロマ画分に大量に存在している(Zhou and Mache, 1989)。このことから著者らはその報告の中で、S22がリボソームに結合しているだけでなく、葉緑体の発生過程に於いて、特別な機能を持っている可能性を論じている。また、このタンパク質を大腸菌内で発現させると、大腸菌リボソームに組み込まれ、その時大腸菌の生育には観察できる影響はあらわれないことが報告されている(Bubunencko and Subramanian, 1994)。さらに、核にコードされているこの遺伝子のプロモーターは、光合成組織及び分裂組織で強い活性を示すことも判っている(Li et al., 1995)。ホウレンソウS22とオオムギBPRA1が同じ働きを持つとはまだ言えないが、このタンパク質の不在が*in vitro*での翻訳活性に影響を与えないこと、比較的弱くリボソームに結合していることなど、本研究から明らかになった性質は、機能を考える上で重要な知見となるはずである。このタンパク質のリボソーム上での機能を考えると併に、ZhouとMacheの提案するリボソームから離れた場所での機能も、今後考えていく必要がある。

#### プラスチドリボソームタンパク質の構成とその量比に関する考察

本研究では、各リボソームタンパク質の量比の計算も試みた。これは、高い活性を保持したリボソームを精製したことと、タンパク質の分離分析に新た

な電気泳動法である RFHR 法を用いたことで初めて可能になった研究である。量比の計算には、 $^{14}\text{C}$  で標識した大腸菌リボソームタンパク質を用いてつくった補正曲線を使用した。多くのタンパク質が1近くのコピー数を示し、本研究で採った方法が量比の測定に有効であることを示した。極端に大きなコピー数を示した BPRL10、BPRL22、BPRL28 のうち、BPRL10 は先に述べたように原核生物型リボソームタンパク質 L7/L12 と相同なものであり、本来多コピーのタンパク質であると考えられる。しかし他のタンパク質についてはコピー数を論じることは出来なかった。いずれも大腸菌リボソームに見られない電気泳動上の振る舞いをするタンパク質であり、本研究で用いた補正曲線では対応できなかったためである。これらについての正確なコピー数の推定は、今後の課題である。

コピー数が小さく計算されたいくつかのタンパク質のうち、BPRS1 は、プラスチドリボソームの中で最も大きな、分子量約 54kD と推定されるタンパク質であった。大腸菌では、やはりリボソームタンパク質の中で最も大きなタンパク質である S1 (分子量約 61kD) が、翻訳開始因子的に働き、リボソームに対して生理的に着脱していること (Boni et al., 1991)、リボソームの精製中に失われやすいこと (Hardy, 1975) が報告されている。BPRS1 が大腸菌の S1 と機能的に相同なタンパク質なのかどうかは今のところ判っていない。葉緑体の S1 相同タンパク質に関しては、現在も議論のある問題である。葉緑体リボソームに S1 タンパク質は見つかっていなかったが、1992 年、核コードの S1 様タンパク質 (CS1) がホウレンソウからクローニングされた (Franzetti et al.)。このタンパク質の成熟型は大腸菌 S1 に比べると小さい分子量 (約 40kD) であるが、mRNA 結合領域を持ち、葉緑体の翻訳開始に働いているらしいことが確かめられた。今のところ葉緑体の S1 相同タンパク質についての知見は限られており、オオムギの BPRS1 の一次構造も判っていないが、このタンパク質が小さいコピー数を示したことは、リボソームとの生理的着脱など、生体内での働きを反映しているのかもしれない。

BPRL12 と BPRL15 は、大腸菌リボソームタンパク質を用いた補正曲線が覆う範囲であるにもかかわらず、BPRS1 以外でコピー数が少なく計算されたタンパク質である。これらのタンパク質は、光照射によっても、その少ないコピー数を安定に維持していた。またこれらは高塩濃度処理をしてもはがれないことから (図 4A、B)、リボソームとの結合力が弱いために精製中に失われやすいものであったり、非特異的な結合によってリボソームと挙動をともにしているものではないと考えられた。大腸菌リボソームタンパク質に対して報告されている量比に関する研究では、L7/L12 以外のタンパク質はすべてリボソーム上

に1コピー存在するという結論に達しており (Hardy, 1975; Tal et al., 1990)、これが原核生物型リボソームは均一である (homogeneous) とする、現在常識になっているリボソーム像の根拠となっている。第二章で議論するが、確かに対数増殖期の大腸菌では薄い小さなスポットを形成するタンパク質は少ない。しかし、オオムギプラスチドリボソームタンパク質のいくつかは明らかに少ないコピー数を安定に維持していた。この結果は、葉緑体リボソームがそのタンパク質構成に関して均一でない (heterogeneous) 可能性があることを意味している。コピー数の少ないタンパク質の機能解析が求められる一方、これらを含むリボソームと含まないリボソームが同一細胞内に存在しているのか、異なった組織で見られるのか、といった個体内の分布にも興味を持たれる。

本研究では、プラスチドリボソームのタンパク質構成に対し、光照射による明らかな影響は観察されなかった。しかし、環境要因や発生段階の違いにおけるリボソームタンパク質の構成変化が他の生物でこれまでにいくつか報告されている。和田等は、大腸菌の生育段階が対数増殖期から定常期に移り変わるのに伴って、塩基性低分子タンパク質 ribosome modulation factor; RMF が 70S リボソームに結合して二量体化させ、翻訳活性を失わせることを発見した (1990; 1995)。同じく和田は、新たに見つかった大腸菌リボソームタンパク質 S22 が定常期特異的にリボソームに結合していることを報告した (1998)。トウモロコシの芽生えが低酸素ストレスにさらされると、リボソームタンパク質の電気泳動上の易動度に変化が見られたとの報告もある (Bailey-Serres and Freeling, 1990)。シアノバクテリアの S21 は、低温刺激に対応して誘導されることが報告されている (Sato et al., 1997)。これらの結果は、本研究でオオムギプラスチドリボソームに観察されたものと異なっているが、光以外の要因に対して、オオムギプラスチドリボソームのタンパク質構成に変化を示す可能性は否定できない。様々な刺激や、発生段階の違いによるリボソームのタンパク質構成の様子を調べることが、植物の翻訳機構における調節の解明に重要であると考えられる。

## 第二部

# 定常期に於ける大腸菌リボソーム蛋白質構成の変化

## 第二部要旨

大腸菌リボソームのタンパク質構成に関しては既に多くの研究が為されてきたが、分裂を止めた定常期の大腸菌に関する研究は、リボソームを対象とするものに限らず非常に少なかった。また全タンパク質の分析技術も不十分なものが使われてきた。

そこで本研究第二部では、定常期を維持している大腸菌の生理的变化を具体的に明らかにすることを目的として、以下の研究を進めた。まず、長期間の定常期に於ける細胞内蛋白質構成の変化を網羅的に観察するために、培養開始後 8 日目までという、これまで詳細に調べられることの無かった長期にわたる培養課程の菌体を材料に、全タンパク質の分離と、個々の蓄積量の変化を包括的に追った。その結果、定常期初期だけでなく、長期培養下においてさえ、大腸菌は数々のタンパク質を新たに発現していることが判った。次に、これら定常期特異的タンパク質の中の、特にリボソーム画分に含まれる二つの弱酸性タンパク質 F、G に注目した。N 末端アミノ酸配列によってそれぞれの構造遺伝子を同定したところ、これらは互いに関連したアミノ酸配列を持つタンパク質であり、さらに、ホウレンソウで葉緑体特異的リボソームタンパク質として報告された S22 ともアミノ酸配列の相関がみられた。このホウレンソウ S22 は、筆者がオオムギプラスチドリボソーム上に確認したタンパク質とも相同なものである。そこで原核生物型リボソームに結合するこれらのタンパク質の生理的役割を知るため、第二部の研究対象を大腸菌 F、G にしぼり、これらと大腸菌リボソームとの関係をさらに詳細に調べた。大腸菌リボソームの調整法には、オオムギプラスチドリボソームの場合とほぼ同じ方法を使用し、迅速に高純度のリボソームを得た。菌体抽出液を細かく分画し、それぞれへの蓄積を調べた結果、F、G はこれまでのどのタンパク質にも知られていない細胞内分布と生理的挙動を示すタンパク質であることが判った。またこれらのタンパク質により、定常期のリボソームは大腸菌に於いても均一ではなく、組成的にも構造的にも、いくつかの種類が混在していることが示された。

本研究の結果は、定常期における大腸菌の新たな捉え方を提示するものであった。またリボソーム研究の観点からは、環境に適応した細胞のリボソームが、構成と構造を変化させることの新たな証拠を見出した。とくに 100S リボソームに特異的に結合する G の発見は、長期にわたる定常期にある大腸菌の生理的变化を研究する上で、非常に重要な意味を持つと考えられた。この G または F の構造遺伝子に関連した遺伝子は、大腸菌に限らず、多くのバクテリアゲノム中にも存在するものだった。さらに、葉緑体では、遺伝子を核コードに移しながらも、関連した遺伝子産物を葉緑体リボソームに結合させていることが分かった。これは発見した蛋白質の機能的重要性を物語っており、また原核生物型リボソームが均一であるというこれまでのリボソーム像を見直し、正しく理解していく上で重要な知見であった。

長期培養下の大腸菌の研究は始まったばかりであり、解明されていることは少ない。大腸菌の生活の中で、最も長期をしめると考えられる定常期がこれまでは一括して定常期とされてきたからである。本研究によって初めて、長期培養下に増減を示す蛋白質の存在が具体的に明らかになってきた。F、G も含めて、定常期に増減を示すタンパク質の解析が、バクテリアや葉緑体の新たな環境適応機構の発見を促すことが期待される。

## 第二部材料と方法

### 大腸菌株

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、AD202 株[ $\Delta ompT$ ]を用いた。細胞は 0.5%の glucose と 2%の polypeptone を含む液体培地 Medium E で一晩 37°C で浸透培養し、この 0.5 ml を 100 ml の同じ液体培地に植え継いで、37°C で浸透培養を開始した (Wada, 1986a)。様々な時間で培養を止め、培養液を 4°C で遠心して菌体をペレットとして得た。

### 細胞の分画とタンパク質の調製

対数増殖期の細胞は 660 nm の吸収がおよそ 0.5 になったところで培養を止め、100 ml の培養液から得た菌体をすべて用いた。植え継ぎ後 3 時間の菌体は、100 ml の培地から得た菌体をすべて用いた。植え継ぎ後 10 時間、1 日 (24 時間)、3 日 (72 時間) の細胞は、50 ml の培地から得た菌体を用いた。菌体のペレットを 0.5 ml の buffer I (6 mM 2-mercaptoethanol、100 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ 、15 mM  $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 、20 mM Tris-HCl pH7.4) に懸濁し、約 0.7 g のガラスビーズ (直径約 0.3 mm) と共に、4°C で 5 分間、激しく攪拌した。この懸濁液を 15,000 rpm、4°C、10 分間遠心した。上清を回収した後、再び 0.5 ml の buffer I に懸濁し、上述の攪拌、遠心をしたのち、上清を回収した。この操作を合計 3 回行った。最終的にペレットとなった画分を不溶性画分 (CD 画分)、回収した上清を合わせたものを細胞抽出液画分 (CE 画分) とした。細胞抽出液画分は、buffer I で調製した 40% ショ糖クッションに上層し、Beckman TLA-100.3 ローターで 50,000 rpm、3 時間、4°C で遠心した後、約 1.2 ml の上清を回収し、リボソームを除いた可溶性画分 (PRS 画分) とした。また、ペレット画分は 0.2 ml の buffer I に懸濁し、粗リボソーム画分 (CR) 画分とした。

70S および 100S リボソームの調製は以下の方法で得た。上述の CE 画分を、buffer I で調製した 10-40% ショ糖密度勾配に上層し、Beckman 45Ti ローターで 40,000 rpm、1.5 時間、4°C で遠心したのち、遠心管の底から順に分画し、260 nm の吸収を測定した。70S 及び 100S リボソームを含む画分を別々に回収し、それぞれを buffer I で調製した 40% ショ糖クッションに上層した後、Beckman 90 Ti ローターで 50,000 rpm、3 時間、4°C で遠心し、含まれていたリボソームをペレットとして得た。CD、PRS、CR のタンパク質と、70S 及び 100S リボソームのタンパク質は、いずれも酢酸法により抽出し、2%の酢酸に透析した後、凍結乾燥して、使用時まで -80°C で保存した。

### 電気泳動

粗リボソーム、70S と 100S リボソーム、ダイソーム、ポリソームの画分のタンパク質は、RFHR 法によって分離したが (1986a)、以下の点を変更した。尿素の濃度を 6M から 8M に上げ、0次元ゲルと 1次元ゲルの濃度を 8% から 7.2% に下げ、ゲルの厚みを 3 mm から 2 mm に変えた。CD と PRS の画分のタンパク質の分離にも同じ方法を用いたが、さらに以下の点を変更した。1次元と 2次元の泳動 buffer の濃度を 1.5 倍に上げ、2次元ゲルの濃度を 18% から 14% に下げ、1次元と 2次元の泳動時間を 1.5 倍に延長した。

#### N 末端アミノ酸配列の決定

基本的に第一部に記述した方法と同じ方法を用いた。ただし、分析には Hewlett Packard 社の protein sequencer G1005、または Shimadzu 社の PPSQ を使用した。

#### リボソーム上の F と G のコピー数の推定

F と G の 70S または 100S リボソーム上のコピー数は、リボソームタンパク質 S2 と L9 をコピー数のマーカータンパク質に用いて推定した。これらは二つとも、RFHR 法による 1次元目の泳動位置が F、G と近く、分子量当たりの平均電荷量も近いと予想されるものであり、かつ以前リボソーム上でユニットコピー、つまり 1モルのリボソーム当たり約 1モルの分子が結合しているタンパク質として報告されたものである (Tal et al., 1990)。まず、リボソームタンパク質を二次元に展開したのち、染色されたスポットの濃さ (ID) を personal densitometer PD110 (Molecular Dynamics 社) で測定した。次に、電気的性質が同じであれば染色され易さも同じであると考え、S2、L9、F、G について、それぞれの ID を分子量 (Mr) で割った値 (ID/Mr) を求めた。さらに、S2 と L9 の ID/Mr の値の平均値 (Ave(ID/Mr)) で、F、G の ID/Mr の値を割り、その値をそれぞれ F、G のコピー数とした。データは示さないが、Ave(ID/Mr) で S2、L9 それぞれの ID/Mr の値を割ると、殆どの値が 0.9 から 1.1 の範囲に収まり、S2 と L9 をユニットコピーマーカーとして用いたことは妥当であったと判断した。

#### 高塩濃度処理したリボソームの調製

細胞抽出液から上述の方法でシヨ糖密度勾配遠心によって 70S と 100S リボソーム画分を得た後、それぞれに濃縮高塩濃度 buffer (5M NH<sub>4</sub>Ac、15 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>、20 mM Tris-HCl (pH7.4)) を加え、NH<sub>4</sub>Ac を終濃度 1 M とした。30 分 4°C で攪拌した後、これらを 15,000 rpm、10 分間遠心し、上清を得た。予め buffer I で調製した 40%シヨ糖クッションの上に高塩濃度 buffer (1M NH<sub>4</sub>Ac、15 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>、20 mM Tris-HCl (pH7.4)) で調製した 20%シヨ糖クッションを載せた段



階的シヨ糖密度勾配を用意し、そこに先の上清をのせ、Beckman 90 Ti ローターで 50,000 rpm、4 時間、4°C で遠心し、高塩濃度処理した 70S、100S リボソームをペレットとして得た。タンパク質はこのペレットから酢酸法により抽出した。

#### ポリソーム画分の調製

ポリソーム画分の調製は、定常期の細胞を新鮮な培地に移して 30 分後のものから調製した。上述の条件で菌体を 24 時間培養した後、得た菌体を同じ組成の新鮮な培地 200 ml に移し、37°C で 30 分間振盪培養した。集菌、及び CE 画分の調製は基本的に上述の方法に従って行ったが、変更点として、作業はすべて 100 µg/ml の chloramphenicol 存在下で行い、グラスビーズとの攪拌、遠心の操作は、上述では 3 回のところを 1 回にした。得た CE 画分は、buffer I で調製した 7-47% のシヨ糖密度勾配に上層し、Beckman 40SwTi ローターで 40,000 rpm、2.5 時間、4°C で遠心したのち、260 nm の吸収を測定しながら分画した。70S リボソーム、ダイソーム、ポリソームを含む画分を別々に回収し、それぞれを buffer I で調製した 47% シヨ糖クッションに上層した後、Beckman 90 Ti ローターで 50,000 rpm、5 時間、4°C で遠心し、含まれていたりボソームをペレットとして得た。タンパク質は酢酸法によって抽出した。

## 第二部結果

### 大腸菌の寿命と定常期のタンパク質発現

大腸菌は、2% polypeptone、0.5% glucose を含む medium E で培養すると、6 日以上寿命を持つ (図 12)。対数増殖期は数時間で終わることから考えると、それ以降の定常期が大腸菌の寿命の大半を占めることになる。この長期培養下での定常期において、大腸菌体内に存在するタンパク質の構成を調べるため、大腸菌を対数増殖期、植え継ぎ 3 時間、5 時間、10 時間、そして 1 日から 8 日まで 24 時間おき、合計 12 の時点で集菌し、それぞれの菌体を不溶性画分 (CD)、リボソームを除いた可溶性画分 (PRS)、粗リボソーム画分 (CR) の 3 つに分画し、各画分から酢酸法で抽出したタンパク質を RFHR 法により分離した (図 13A、B、C)。対数増殖期から定常期への遷移期である 3 時間から 10 時間におけるスポットの増減だけでなく、定常期に入った 1 日から 8 日までの間にもスポットの増減が確認された。これら変化しているスポットの中で、本研究では粗リボソーム画分に含まれる二つの弱酸性タンパク質に注目した。これらは対数増殖期にも存在するものの、定常期にさしかかると急激にそのスポットの濃さを増していた。これらのスポットを形成しているタンパク質を同定するため、それぞれの N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果これらのうち一方は (TMNITSKQME---) という配列を、もう一方は (MQLNITGNNV---) という配列をもっていた。大腸菌のデータベースを検索した結果、これらはそれぞれ *yfiA*、*yhbH* と呼ばれる、互いに関連したアミノ酸配列を持つ遺伝子産物であることが判った。また、これらは以前、和田等によって、大腸菌リボソームに結合している微量構成タンパク質 F、G と名付けられていたものと同じ配列であった (私信)。また、*yfiA* 遺伝子産物は、ごく最近 Agafonov 等によって、大腸菌リボソームの 30S 亜粒子に結合するタンパク質であること、結合位置が両亜粒子の境界面に位置することが報告された (1999)。しかし G については報告されておらず、またこれらがりボソーム上で定常期に存在量を増すタンパク質であることは、これまで知られていなかった。そこで本研究ではこの 2 つのタンパク質を F、G と呼ぶことにし、これらの性質をより詳細に調べることにした。図 14 にこの二つの遺伝子産物の予想アミノ酸配列と、F、G の N 末端アミノ酸配列を並べて示した。F は分子量約 13,000 のタンパク質と予想された。アミノ酸配列の分析では、N 末端の Met が除かれ Thr から始まっていた。G は分子量約 11,000 のタンパク質であった。F はその C 末端に酸性アミノ酸に富む 18 アミノ酸残基を持っていた。F と G は、互いの N 末端 91 残基中、およそ 40% のアミノ酸残基が一致していた。大腸菌ゲノム上の位置は、*yfiA* が phenylalanine 合成系遺伝子のオペロンに属する *pheA* 遺伝子上流に、*yhbH* が窒素代謝関連遺伝子の発

現に必要な  $\sigma^N$  をコードする *rpoN* 遺伝子の下流に位置していた。

#### F、G の 70S と 100S リボソームへの局在性

対数増殖期には 70S の状態を取っているリボソームが、定常期に移ると二量体化して 100S リボソームを形成することが知られている (Wada et al., 1990)。F、G が定常期のリボソームで蓄積していたことから、70S、100S リボソームへの結合に興味を持たれた。そこで、細胞抽出液を buffer I で調製した 10-40% ショ糖密度勾配に上層して遠心することで、70S と 100S リボソームを分離し、各々の画分に含まれるタンパク質を RFHR 法により分析した (図 15)。用いた菌体は、植え継ぎ後 3 時間 (a)、10 時間 (b と e)、1 日 (c と f)、3 日 (d と g) の培養液から集菌したものをを用いた。植え継ぎ後 3 時間では、まだ細胞内に 100S リボソームの形成は認められないため、その画分は得られなかった。この図から判るように、F と G との間に異なった性質が認められた。F が主に 70S リボソームに結合して、定常期にそのスポットを大きくするのに対し、G はほとんど 100S リボソームのみに結合する状態で、定常期に蓄積していた。G の 100S リボソームに対する特異性は高く、70S 画分に見られる G のスポットは、たとえ見えていても非常に薄いものだった。図中には RMF と S22 の位置も示した。RMF は 100S 形成に関与するタンパク質で、定常期に 100S リボソーム画分に見られるのに対し、S22 は 70S、100S どちらの画分でも、定常期で蓄積しており、これまで報告されているそれぞれの性質と矛盾しないものだった (Wada, 1998)。

F、G が 70S と 100S それぞれのリボソーム中にどれくらいの割合で含まれているのかを知るため、それぞれのスポットの濃さから、コピー数の推定を試みた。泳動の 1 次元目の易動度が近い S2 と L9 は、F、G と電気的性質が似ているために色素による染まり易さも近いものと考えた。また S2 も L9 も、リボソーム 1 モル当たり 1 分子ずつ存在していると報告されたタンパク質である。そこでこれら 2 つのリボソームタンパク質の平均を基準にして、F、G のコピー数を推定した。計算に用いたそれぞれの分子量は、それぞれの構造遺伝子から導いたアミノ酸配列から推定した。図 16 に示す結果から明らかなように、F は主に 70S リボソームに存在し、植え継ぎ後 3 日の時点で約 0.8 コピーに達していた。これは、他のリボソームタンパク質と遜色のない量であり、ほとんどの 70S リボソームがこのタンパク質を結合していることを意味していた。これに対し G は 100S リボソームのみに存在し、70S リボソームへの結合は無視できる値であった。100S リボソーム中での G のコピー数は植え継ぎ後 3 日の時点で約 0.6 コピーに達し、過半数の 100S リボソームが G を結合していることが明らかとなった。100S リボソームには F も少ないながら結合していたが、このコピー数は培養が長期化するに従って減少していた。100S リボソーム中の F と G のコピー数

を足した値は 0.8 コピー以下に留まり、1 コピーを越えることは無かった。

#### F と G のリボソームへの安定した結合

S22 と RMF は、どちらも定常期特異的に発現し、既存のリボソームに結合することが示されているが、S22 が高塩濃度処理後も安定してリボソームに結合しているのに対し、RMF は同じ処理によってはがれることが判っている (Wada, 1998)。そこで、F と G のリボソームへの結合の強さを調べるため、植え継ぎ後 1 日目の菌体から調製した 70S と 100S リボソームを高塩濃度処理し、含まれるタンパク質をそれぞれの処理前のものと比較した (図 17)。その結果、F、G は高塩濃度処理後も安定してリボソームに結合していることが判った。高塩濃度処理が有効に行われたことは、100S リボソーム中の RMF が解離していることで確認できた。

#### リボソーム以外の画分への F と G の蓄積

F と G の細胞内分布を調べるため、図 13 に示したリボソーム以外の画分での蓄積量の変化を調べた。F と G の近傍に来るタンパク質の N 末アミノ酸配列を調べた結果、F のスポットのみを両画分に同定し、このスポットがどちらの画分でも定常期 4 日から 5 日目くらいまで濃くなっていくことを確認した。CD 画分には、多くのリボソームタンパク質の存在が認められ、1 日目になると、RMF や S22 も蓄積していたが、G はほとんど存在していなかった。

#### 定常期から対数増殖期への移行期におけるリボソームと、F と G との関係

長期培養により定常期に入った大腸菌を新鮮な培地に植え替えると、100S リボソームとして存在していた二量体の構造は数分間に解消されて単量体の 70S リボソームとなる (Wada et al., 1990)。この環境の変化が F と G のリボソームへの結合に対して与える影響を調べるため、培養開始後 1 日目の菌体を新鮮な培地に移して、37°C 30 分間培養した。原核生物の翻訳伸長反応の阻害剤である chloramphenicol を添加し、ポリソームのパターンをショ糖密度勾配遠心によって観察した (図 18)。結果は示さないが、chloramphenicol を添加しなかった場合は Bottom 側の吸収が減少し、逆に 70S 画分の吸収が大きくなることから、図中の 70S リボソームより S 値の大きい部分の連続したピークが、阻害剤によって翻訳を止められたポリソームであることを確認した。これらのピークのうち、図に示してあるように 70S リボソーム、ダイソーム、ポリソームの画分をそれぞれ回収し、含まれるリボソームを超遠心によってペレットにした (材料と方法を参照)。抽出したタンパク質の泳動像を比較したところ、70S リボソーム画分には F、G がみられたものの、ポリソーム画分にはこれらが観察されな

った（図 19）。図には示さないが、ダイソーム画分の泳動像にもポリソーム画分と同じく F、G は観察されなかった。またここには RMF も存在せず、基本的にポリソームの泳動パターンと同じだったことから、この画分が定常期の 100S とは異なり、ポリソーム画分の一部であることが確認された。

## 第二部考察

本研究では、二つの互いに関連したタンパク質が、定常期のリボソームに結合していることを発見した。これらのコピー数は対数増殖期では非常に少なかったが、定常期に移行する時期に劇的に増加していた。以前は、定常期に特異的に発現するリボソームタンパク質として S22 が、また定常期特異的な ribosome modulation protein として RMF が知られていたが、本研究により新たな定常期特異的リボソーム結合タンパク質の存在が判ったことになる。これらの事実、大腸菌の、とくに定常期のリボソームのタンパク質構成が、必ずしも均一では無いことを示している。定常期から対数増殖期への移行期に掛けての観察から、F、G に関しては翻訳開始時にリボソームから解離することが示唆され、同じ条件でポリソーム画分にみられた S22 とは、異なった働きを持つタンパク質と考えられた。

本研究により、大腸菌リボソームのタンパク質構成に関して、これまで以上に詳しい知見が得られた。これらをまとめて、リボソームの構成と構造に関する概略モデルを図 20 に示した。ここに示すように、対数増殖期にはほとんどのリボソームが F、G、S22、RMF を持たない「対数増殖期型」リボソームとして存在している (1)。菌体が対数増殖期から定常期に移行する、植え継ぎ後 3 時間から 10 時間後では、まず F がリボソームに結合するが、構造は 70S モノマーの状態を保っている (2)。定常期にはいると、リボソームはいくつかの「定常期型」リボソームになる。すなわち、F が結合したものと G が結合したものである。このうち G が結合したリボソームの殆どは、RMF の結合とともに二量体、すなわち 100S リボソームを形成する。F が結合したものも 100S になりうるが、これはすべてではなく、70S 状態を維持しているものもある (3)。今回の結果から、定常期の大腸菌体内は少なくとも、F の結合した 70S リボソーム、F が結合した 100S リボソーム、G が結合した 100S リボソームが存在していることが判った。これまでに定常期特異的にリボソームに結合すると報告されていた S22 は、70S、100S、どちらの画分にも存在していることが判っており、異なった局在性を示すタンパク質 F、G の発見によって、定常期リボソームのタンパク質構成の多様性がこれまで以上に強く示唆されることになった。図中では省略してあるが、実際には L7/L12 の存在比率の変化も起こり、こうしたことも考えると、「定常期型」リボソームの種類は、より多くなる可能性がある。定常期が長くなるにつれて「定常期型」リボソームは増加を続けるが、F、G、S22 などのコピー数から考えると、定常期中期にあたる培養 3 日目のものでも、リボソームは僅かながら「対数増殖期型」として存在しているようであった。定常期の菌体を新鮮な培地に移して 30 分後、対数増殖期への移行期では、70S リ

ポリソーム上に F、G が残存していたものの、翻訳課程にあるポリソーム画分に確認されなかったことから、これらのタンパク質は翻訳開始時までにはリボソームから解離するものと考えられた。また、S22 は 70S リボソーム画分にもポリソーム画分にもみられ、L7/L12 の比率も定常期のそれに近かった。これらのことから、「定常期型」リボソームのタンパク質構成は、菌体が盛んな増殖を再開するときに、いくつかの定常期特異的タンパク質の解離や、新たに生合成されたリボソームによって希釈される形で、再び「対数増殖期型」リボソームに収束していくものと考えられた。

このように定常期特異的なリボソームタンパク質構成の変化は判ってきたものの、その生理的意義はいまだ不明である。F に関しては、ごく最近 Agafonov 等が Protein Y と名付けて報告した (1999)。著者らは、このタンパク質が 30S リボソーム亜粒子に結合すること、その結合位置が 50S リボソーム亜粒子との接触面であることを、独自の新しい方法によって明らかにした。この方法は、hot tritium bombardment technique と呼ばれる方法で、熱トリチウムをタンゲステンコイルから放出し、リボソーム粒子に衝突させることで、粒子表面にあるタンパク質を標識して、粒子内部のタンパク質と区別する技術である。これをリボソーム粒子の表在タンパク質決定に用いたのは彼らが始めてであった。また、著者らは、このタンパク質が、低  $Mg^{2+}$  イオン濃度条件下でリボソームを安定化させて亜粒子への解離を防ぐことも、*in vitro* の実験で示した。今回の研究によって新たに、F が定常期にそのコピー数を増やすタンパク質であること、ポリソーム画分には含まれないタンパク質であることが示された。Agafonov 等の観察した *in vitro* でのリボソームに対する影響が、菌体内でも認められるものであれば、本研究の結果は、次のように解釈することが可能である。すなわち、F は定常期に於いて、翻訳に関与していないリボソームに結合し、これを安定化させる働きを持つが、菌体が再び盛んな増殖を始めるときには、このタンパク質はリボソームから解離し、その役目を終える、というものである。G に関しては、これまで細胞内でその存在が確認されたことはなく、リボソーム上の結合位置に関する知見は全く得られていない。しかしアミノ酸配列が F のものと相関を示すことから考えて、F と同じ場所に位置する可能性は高い。このことは、100S リボソーム中での F と G のコピー数の和が 1 を越えなかったことと矛盾しない。定常期にさしかかったときの G の蓄積は、F の蓄積よりも遅い時期に始まっており、より増殖率の低い細胞内で存在していることになる。このことから、G の機能も、翻訳していないリボソームの安定化への関与が予想される。

以前の研究から、100S 形成を担う塩基性低分子タンパク質 RMF がリボソームに結合すると、リボソームの翻訳活性が翻訳開始の段階で失われることが示されており (Wada et al., 1995)、100S リボソームは、可逆的に失活させた 70S

リボソームの貯蔵型であると考えられている。また RMF の構造遺伝子を破壊すると、大腸菌は定常期における生存率が低下することが判っていた (Yamagishi et al., 1993)。これらのことから、100S リボソームの形成は、増殖を停止せざるを得ない環境にある細胞にとって、生存に必要なものであると考えられている。100S リボソーム特異的に結合する G や、これと関連したアミノ酸配列を持つ F もまた定常期にその蓄積量を飛躍的に増大させることから、どちらも定常期における細胞の生存に重要な役割をもっている可能性がある。

F や G と関連のあるタンパク質を Swiss Prot のデータベース上で検索すると、 $\sigma 54$  modulation protein family に属するタンパク質として、様々なバクテリアの遺伝子産物のなかに見つかった。これらは  $\sigma 54$  構造遺伝子 (*rpoN*) の直下流に位置して供転写される遺伝子である。この family name は、この ORF を破壊した株の表現型を調べたところ、 $\sigma 54$  依存性のプロモーターからの発現の上昇が観察された、とする 1989 年の *Klebsiella pneumoniae* を用いた研究結果に由来する (Merrick and Coppard)。大腸菌の場合、*yhbH* が *Klebsiella pneumoniae* で破壊された遺伝子と相同であり、またゲノム上の位置も保存され、大腸菌の *rpoN* と供転写されることが報告されている (Powell et al., 1995)。しかし、*yhbH* の遺伝子産物である G は生体内に確認されていなかった。これまでの殆どの研究が対数増殖期の細胞を用いていたことが最も大きな原因と考えられ、当然リボソーム画分に局在することも知られていなかった。また、*yhbH* 遺伝子の破壊が、大腸菌内に於いても  $\sigma 54$  依存性のプロモーターからの発現に影響を与えるかどうかは、調べられていない。大腸菌におけるこの遺伝子とその産物の働きは、今後本研究を継続する上で、最も大きな課題である。

葉緑体のタンパク質の中に、F と弱く、G とはさらに弱い関連を示すものが見つかった。これは、ホウレンソウにおいて、葉緑体リボソーム特異的タンパク質として報告されていた S22 である。ホウレンソウ S22 と関連を示すタンパク質は、オオムギ葉緑体リボソームと弱く結合しているタンパク質 BPRA1 として本研究第一部で議論したタンパク質である (図 8E)。ホウレンソウでは前述のようにリボソームに結合しない状態でも存在していること、組織特異的に発現されている可能性があること、が示されている。本研究第一部のオオムギを使った研究では、*in vitro* 翻訳系でのリボソームの活性に必要とされなかったことも観察してある。これらの性質はいずれも、本研究に於いて F に似た性質、すなわち、F はリボソーム画分以外にも蓄積が認められたこと、定常期に蓄積量を増していたこと、及びポリソーム画分に存在しなかったことと、矛盾していなかった。アミノ酸配列上弱い関連しか持たず、蓄積する組織の性質も異なるが、F が大腸菌リボソーム上に確認された現在、このタンパク質と関連をもつホウレンソウ S22 やオオムギに見つかった BPRA1 は、葉緑体特異的リボソームタ



ンパク質というよりも、原核生物型リボソームに広く存在する、リボソーム結合タンパク質のファミリーの一つと考えるべきものなのかもしれない。ハウレンソウ S22 の機能はまだ判っていないが、大腸菌における F、またはこれと関連したタンパク質である G の機能の解明が、葉緑体 S22 や BPRA1 の植物における機能解析の参考になることが期待される。

強い相関を示したリボソームタンパク質 F と G が、どちらもリボソームに結合し、同じように定常期にその蓄積量を増していたにもかかわらず、F が主に 70S リボソームに結合していたのに対して G が 100S リボソームのみに結合していたことは、驚くべきことであった。これらのタンパク質はいかにしてリボソームに結合し、またそれぞれの 70S、100S リボソームへの分配の違いは何によって決められているのか、判っていない。一つの可能性は、F、G がリボソームに結合してそれを安定化した後、RMF が後から結合して 70S リボソームを 100S リボソームに変化させるというものである。この場合、F、G の分配の様子から考えると、100S リボソームになる効率は、G が結合したリボソームが最も高く、F が結合したリボソームはその次になる。対数増殖期由来のリボソームより、定常期由来のリボソームの方が、精製した RMF による 100S 形成の効率が高かった、とする以前の Wada 等の報告は、この仮説に矛盾しない (1995)。しかし、RMF によってすでに形成された 100S リボソームに、G が選択的に結合していくというもう一つの可能性も現在のところ排除できない。培養開始後 1 日目、定常期の CD 画分には、殆どすべてのリボソームタンパク質だけでなく、S22 や RMF も他のリボソームタンパク質に匹敵する蓄積量が観察されたにもかかわらず、G の蓄積が殆どみられなかった (図 13A)。同じ 1 日目の菌体内では、細胞質にある 100S リボソーム中の G のコピー数が 0.5 を越えていた (図 16B)。このことは、G がこれまで知られているいかなるタンパク質よりも、細胞質 100S リボソームに対する選択性が高いことを示している。CD 画分に観られたリボソームタンパク質や RMF が、70S や 100S のリボソーム粒子の存在を意味しているのかどうかはまだ判らないが、G と 100S リボソームとの結合様式の解明は、100S リボソームに対するさらに深い構造的知見をもたらすものと考えられる。

以上のように、大腸菌リボソームは対数増殖期と定常期で、そのタンパク質構成や構造が変化する新たな証拠を示した。さらに、定常期のリボソームだけを見ても、そのタンパク質構成が不均一であること (heterogeneity) を示した。これらは、これまでの大腸菌リボソーム、またそれを基準にしてきた原核生物型リボソームに対する常識的なとらえかたを変えるものである。今後様々な環境に対してのリボソーム研究が必要なことを提示している。また、本研究により定常期特異的にリボソームに結合することが見つかったタンパク質の機能を解析することは、本研究の次に来る最も大きな課題である。具体的には、リボ

ソームとの関係を調べる上で、リボソーム上での F や G の正確な結合位置を生化学的に決めることが必要である。また遺伝学的手法を用いて、これらの蛋白質を過剰発現させたりゲノムから欠損させた場合、大腸菌の生育、特に定常期の viability に対して与える影響を調べる必要もある。こうした研究から、これらの蛋白質の機能を知る手がかりが得られると考えている。さらに大腸菌で得られた知見を土台にして、バクテリアや葉緑体に見つかった関連蛋白質の機能に迫ることで、これらの生物の新たな環境適応機構が解明されることが期待される。

## 引用文献

### 邦文引用文献

梶昭、広川剛、新健治 (1999) リボソームリサイクリング因子 RRF。蛋白質核酸酵素 44: 831-844。

### 英文引用文献

Agafonov, D.E., Kolb, V.A., Nazimov, I.V. & Spirin, A.S. (1999) A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12345-12349.

Ali-Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. and Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181: 6361-6370.

Aoki, H., Dekany, K., Adams, S.L. and Ganoza, M.C. (1997) The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 272: 32254-32259.

Bailey-Serres, J. and Freeling, M. (1990) Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol.* 94: 1237-1243.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 400: 841-847.

Boni, I.V., Isaeva, D.M., Musychenko, M.L. and Tzareva, N.V. (1991) Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* 19: 155-162.

Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature (London)*, 190:

576-581.

Brosius, J. (1978) Primary structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L31. *Biochemistry*. 17: 501-508.

Bubunencko, M.G. and Subramanian, A.R. (1994) Recognition of novel and divergent higher plant chloroplast ribosomal proteins by *Escherichia coli* ribosome during *in vivo* assembly. *J. Biol. Chem.* 269: 18223-18231.

Capel, M.S. and Bourque, D.P. (1982) Characterization of *Nicotiana tabacum* chloroplast and cytoplasmic ribosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 257: 7746-7755.

Capel, M.S., Engelman, D.M., Freeborn, B.R., Kjeldgaard, M., Langer, J.A., Ramakrishnan, V., Schindler, D.G., Schneider, D.K., Schoenborn, B.P., Sillers, I.Y., et al . (1987) A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Science* 238: 1403-1406.

Carol, P., Li, Y.F. and Mache, R. (1991) Conservation and evolution of the nucleus-encoded chloroplast-specific ribosomal proteins in pea and spinach. *Gene* 103: 139-145.

Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N., and Noller, H.F. (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285: 2095-2104.

Clemons Jr, W.M., May, J.L., Wimberly, B.T., McCutcheon, J.P., Capel, M.S., and Ramakrishnan, V. (1999) Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400: 833-840.

Cooperman, B.S., Wooten, T., Romero, D.P., and Traut, R.R. (1995) Histidine 229 in protein L2 is apparently essential for 50S peptidyl transferase activity. *Biochem. Cell. Biol.* 73: 1087-1094.

Dabbs, E.R. (1991) Mutants lacking individual ribosomal proteins as a tool to investigate ribosomal properties. *Biochimie* 73: 639-645.

Dorne, A.M., Eneas-Filho, J., Heizmann, P. and Mache, R. (1984) Comparison of ribosomal proteins of chloroplast from spinach and of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 193:

129-134.

Eneas-Filho, J., Hartley, M.R. and Mache, R. (1981) Pea chloroplast ribosomal proteins: Characterization and site of synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 184: 484-488.

Feierabend, J., Schlüter, W. and Tebartz, K. (1988) Unassembled polypeptides of the plastidic ribosomes in heat-treated 70S-ribosome-deficient rye leaves. *Planta* 174: 542-550.

Franzetti, B., Zhou, D.X. and Mache, R. (1992) Structure and expression of the nuclear gene coding for the plastid CS1 ribosomal protein from spinach. *Nucleic Acids Res.* 20: 4153-4157.

Freyssinet, G. and Schiff, J.A. (1974) The chloroplast and cytoplasmic ribosomes of *Euglena* II. Characterization of ribosomal proteins. *Plant Physiol.* 53: 543-554.

Gantt, J.S. (1988) Nucleotide sequences of cDNAs encoding four complete nuclear-encoded plastid ribosomal proteins. *Curr. Genet.* 14: 519-528.

Gilbert, W. (1963a) polypeptide synthesis in *E. coli*. I. Ribosomes and the active complex. *J. Mol. Biol.* 6:374-388.

Gilbert, W. (1963b) polypeptide synthesis in *E. coli*. II. The polypeptide chain and S-RNA.. *J. Mol. Biol.* 6:389-403.

Gourse, R.L., Gaal, T., Bartlett, M.S., Appleman, J.A. & Ross, W. (1996) rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 645-677.

Green, R and Noller, H.F. (1997) Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 679-716.

Hardy, S.J.S. (1975) The stoichiometry of the ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 140: 253-274.

Hardy, S.J., Kurland, C.G., Voynow, P., and Mora, G. (1969) The ribosomal proteins

of *Escherichia coli*. I. Purification of the 30S ribosomal proteins. *Biochemistry* 8: 2897-2905.

Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in the stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell* 72: 165-168.

Hengge-Aronis, R. (1996) Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 1 (eds F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & Umberger, H.E.), pp. 1497-1512. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Hoagland, M.B., Stephenson, M.L., Scott, J.F. et al. (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 231: 241-257.

Huisman, G.W., Siegele, D.A., Zambrano, M.M. & Kolter, R. (1996) Morphological and physiological changes during stationary phase. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 2 (eds F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & Umberger, H.E.), pp. 1672-1682. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kakegawa, T., Aoki, R. and Hirose, S. (1981) Increase of degree of spermidine stimulation of polypeptide synthesis in the presence of phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 207: 128-134.

Igarashi, K., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kojima, M., Fujiki, Y. and Hirose, S. (1978) Effect of spermidine on N-formylmethionyl-tRNA binding to 30S ribosomal subunits and on N-formylmethionyl-tRNA dependent polypeptide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 806-813.

Ito, K. and Nakamura, Y. (2000) A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* 403: 680-684.

Jishage, M & Ishihama, A. (1995) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J. Bacteriol.*

177: 6832-6835.

Johnson, C.H., Kruff, V. and Subramanian, A.R. (1990) Identification of a plastid-specific ribosomal protein in the 30S subunit of chloroplast ribosomes and isolation of the cDNA clone encoding its cytoplasmic precursor. *J. Biol. Chem.* 265: 12790-12795.

Kaltschmidt, E., and Wittmann, H.G. (1970) Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal. Biochem.* 36: 401-412.

Kannangara, C.G., Gough, S.P., Hansen, B., Rasmussen, J.N. and Simpson, J.D. (1977) A homogenizer with replaceable razor blades for bulk isolation of active barley plastids. *Carlsberg Res. Commun.* 42: 431-439.

Kolter, R., Siegele, D.A. & Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-74.

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., and Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31: 147-157.

Lake, J.A. (1976) Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J. Mol. Biol.* 105: 131-9.

Lake, J.A., and Slayter, H.S. (1972) Three-dimensional structure of the chromatoid body helix of *Entamoeba invadens*. *J. Mol. Biol.* 66: 271-282.

Lamborg, M.R., and Zamecnik, P.C. (1960) Amino acid incorporation into protein by extracts of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 42:206-211.

Lee, S.G., and Evans, W.R. (1971) Hybrid ribosome formation from *Escherichia coli* and chloroplast ribosome subunits. *Science* 173: 241-242.

Li, Y.F., Zhou, D.X., Clabault, G., Bisanz-Seyer, C. and Mache, R. (1995) *Cis*-acting elements and expression pattern of the spinach *rps22* gene coding for a plastid-specific ribosomal protein. *Plant. Mol. Biol.* 28: 595-604.

Link, A.J., Robison, K., and Church, G.M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 18: 1259-1313.

Littlefield, J.W., Keller, E.B., Gros, J., and Zamecnik, P.C. (1955) Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* 217: 111-123.

Lu, J., Aoki, H., and Ganoza, M.C. (1999) Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31: 215-229.

Lyttleton, J.W. (1962) Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts. *Exp. Cell Res.* 26: 312-317.

Mache, R., Dorne, A.M., and Battle, R.M. (1980) Characterization of spinach plastid ribosomal proteins by two dimensional gel electrophoresis. *Mol. Gen. Genet.* 177:333-338.

Matin, A. (1991) The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5: 3-10.

Merrick, M.J. & Coppard, J.R. (1989) Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 3: 1765-1775.

Mizushima, S., and Nomura, M. (1970) Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature* 226: 1214.

Moore, P.B., Traut, R.R., Noller, H., Pearson, P., and Delius, H. (1968) Ribosomal proteins of *Escherichia coli*. II. Proteins from the 30 s subunit. *J. Mol. Biol.* 31: 441-461.

Nierhaus, K.H., and Dohme, F. (1974) Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4713-4717.



Nirenberg, M.W. and Leder, P. (1964) RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399-1407.

Nirenberg, M.W. and Mattaei, H.M. (1961) The dependence of cell free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthesis in polyribonucleic acids. *Proc. Natl. Sci. USA* 47: 1588-1602.

Noller, H.F., Hoffarth, V. and Zimniak, L. (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 5: 1396-1397.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, H., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.

Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H.Jr. & Reizer, J. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIA<sup>Ntr</sup> affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *era*<sup>ts</sup> mutant. *J. Biol. Chem.* 270, 4822-4839.

Ramagopal, S. (1976) Accumulation of free ribosomal proteins S1, L7, and L12 in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 69: 289-297.

Ramagopal, S & Subramanian, A.R. (1975) Growth-dependent regulation in production and utilization of acetylated ribosomal protein L7. *J. Mol. Biol.* 94: 633-641.

Rawson, J.R., and Stutz, E. (1969) Isolation and characterization of *Euglena gracilis* cytoplasmic and chloroplast ribosomes and their ribosomal RNA components. *Biochim. Biophys. Acta.* 190: 368-380.

Rohl, R., and Nierhaus, K.H. (1982) Assembly map of the large subunit (50S) of

*Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 729-733.

Sato, N., Tachikawa, T., Wada, A. and Tanaka, A. (1997) Temperature-dependent regulation of the ribosomal small-subunit protein S21 in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. *J. Bacteriol.* 179: 7063-7071.

Schmidt, J., Srinivasa, B., Weglohner, W., and Subramanian, A.R. (1993) A small novel chloroplast ribosomal protein (S31) that has no apparent counterpart in the *E. coli* ribosome. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29: 25-31.

Schmidt, M., Pichl, L., Lepper, M. and Feierabend, J. (1993) Identification of the nuclear-encoded chloroplast ribosomal protein L12 of the monocotyledonous plant *Secale cereale* and sequencing of two different cDNAs with strong codon bias. *Biochim Biophys Acta.* 1172: 349-352.

Schwartz, J.H., Meyer, R., Eisenstadt, J.M., and Brawerman, G. (1967) Involvement of N-formylmethionine in initiation of protein synthesis in cell-free extracts of *Euglena gracilis*. *J. Mol. Biol.* 25: 571-574.

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, T., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chuwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi, Shimosaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J.* 5: 2043-2049.

Sperrazza, J.M., Russell, D.W., and Spremulli, L.L. (1980) Reversible dissociation of wheat germ ribosomal subunits: Cation-dependent equilibria and thermodynamic parameters. *Biochemistry.* 19: 1053-1058.

Stöffler-Meilicke, M., and Stöffler, G. (1987) The topography of ribosomal proteins on the surface of the 30S subunit of *Escherichia coli*. *Biochimie* 69: 1049-1064.

Subramanian, A.R. (1993) Molecular genetics of chloroplast ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 177-181.

Takanami, M., and Okamoto, T. (1963) Interactions of ribosomes and synthetic polynucleotides. *J. Mol. Biol.* 7:323-333.

Tal, M., Weissman, I. and Silberstein, A. (1990) A new method for stoichiometric analysis of proteins in complex mixture--Reevaluation of the stoichiometry of *E. coli* ribosomal proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 21: 247-266.

Tissieres, A., Schlessinger, D., and Gros, F. (1960) Amino acid incorporation into proteins by *E. coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:1450-1463.

Traub, P., and Nomura, M. (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 777-784.

Traut, R.R., Moore, P.B., Delius, H., Noller, H., and Tissieres, A. (1967) Ribosomal proteins of *Escherichia coli*. I. Demonstration of different primary structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57: 1294-1301.

Traut, R.R., Oleinikov, A.V., Makarov, E., Jokhadze, G., Perroud, B. and Wang, B. (1993) Structure and function of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12: Effect of cross-links and deletions. In *The Translational Apparatus: Structure, Function, Regulation, Evolution*. Edited by K.H. Nierhaus, F. Franceschi, A.R. Subramanian, V.A. Erdmann and B. Wittmann-Liebold. Plenum Press, New York. pp. 521-532.

VanBogelen, R.A., Schiller, E.E., Thomas, J.D., and Neidhardt, F.C. (1999) Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* 20: 2149-2159.

Wada, A., Igarashi, K., Yoshimura, S., Aimoto, S. and Ishihama, A. (1995) Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 410-417.

Wada, A. (1986a) Analysis of *Escherichia coli* ribosomal proteins by an improved two dimensional gel electrophoresis. I. Detection of four new proteins. *J. Biochem.* 100: 1583-1594.

- Wada, A. (1986b) Analysis of *Escherichia coli* ribosomal proteins by an improved two dimensional gel electrophoresis. II. Characterization of four new proteins. *J. Biochem.* 100: 1595-1605.
- Wada, A. (1998) Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells* 3: 203-208.
- Wada, A., Koyama, K., Maki, Y., Shimoi, Y., Tanaka, A. and Tsuji, H. (1993) A 5 kDa protein (SCS23) from the 30 S subunit of the spinach chloroplast ribosome. *FEBS Lett.* 319: 115-118.
- Wada, A. and Sako, T. (1987) Primary structures of and genes for new ribosomal proteins A and B in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 101: 817-820.
- Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N. and Ishihama, A. (1990) Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* 87: 2657-2661.
- Waller, J.P., and Harris, J.I. (1961) Studies on the composition of the proteins from *E. coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 18-23.
- Wittmann, H.G., Stöfflet, G., Hindennach, I., Kurland, C.G., Birge, E.A., Randall-Hazelbauer, L., Nomura, M., Kaltschmidt, E., Mizushima, S., Traut, R.R., and Bickle, T.A. (1971) Correlation of 30S ribosomal proteins of *Escherichia coli* isolated in different laboratories. *Mol. Gen. Genet.* 111: 327-333.
- Wool, I.G., Chan, Y.L. and Glück, A. (1995) Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. 'Frontiers in Translation.' (An International Conference on the Structure and Function of the Ribosome. Edited by Matheson, A.T., Davies, J.E., Dennis, P.P. and Hill, W.E.) *Biochem. Cell Biol.* 73: 933-947.
- Yamagishi, M., Matsushima, H., Wada, A., Sakagami, M., Fujita, N. & Ishihama, A. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J.* 12: 625-630.
- Zhou, D.X. and Mache, R. (1989) Presence in the stroma of chloroplasts of a large pool of

a ribosomal protein not structurally related to any *Escherichia coli* ribosomal protein. *Mol. Gen. Genet.* 219: 204-208 and Erratum (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223: 167.

Zengel, J.M. & Lindahl, L. (1994) Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 47, 331-370.

Zitomer, R.S. and Flaks, J.G. (1972) Magnesium dependence and equilibrium of the *Escherichia coli* ribosomal subunit association. *J. Mol. Biol.* 71: 263-279.

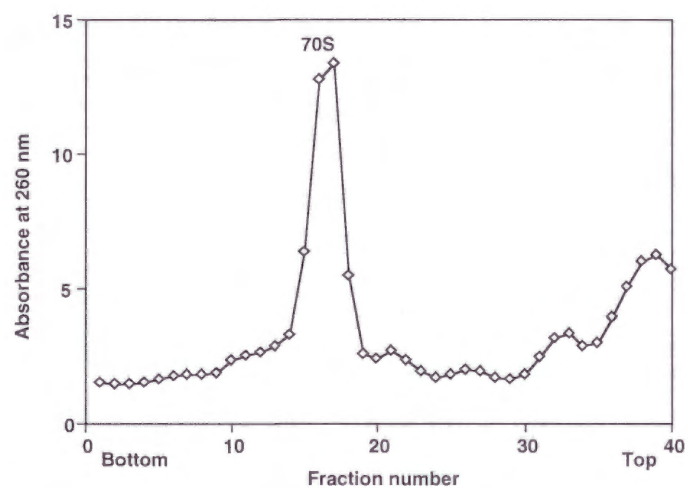


図1 ショ糖密度勾配遠心によるプラスチドリボソムの精製。  
 オオムギ無傷プラスチドのストロマ画分は、buffer Bで調製した10-40%の  
 ショ糖密度勾配に上層し、日立RT42ローターで1.5時間12,500 x g で遠心  
 した。遠心後の勾配を遠心管の底から1.5 mlずつ分画し、それぞれの画分  
 の260 nmの吸収を測定した。

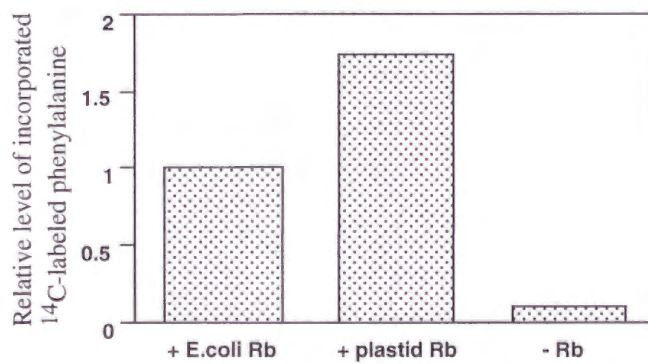


図2 Poly(U)を鋳型に用いたin vitro翻訳活性測定。  
<sup>14</sup>Cで標識されたアミノ酸を基質として加え、この取り込みによりプラスチドリボソムの翻訳活性を測定した。反応液には大腸菌の細胞抽出液からリボソームを除いたものを加えた。プラスチドリボソームのラベル取り込み活性 (中; + plastid Rb)は、大腸菌リボソームの活性(左; + E.coli Rb)に対する比活性で示した。リボソームを入れなかったときの比活性 (右; - Rb) は、0.1以下であった。

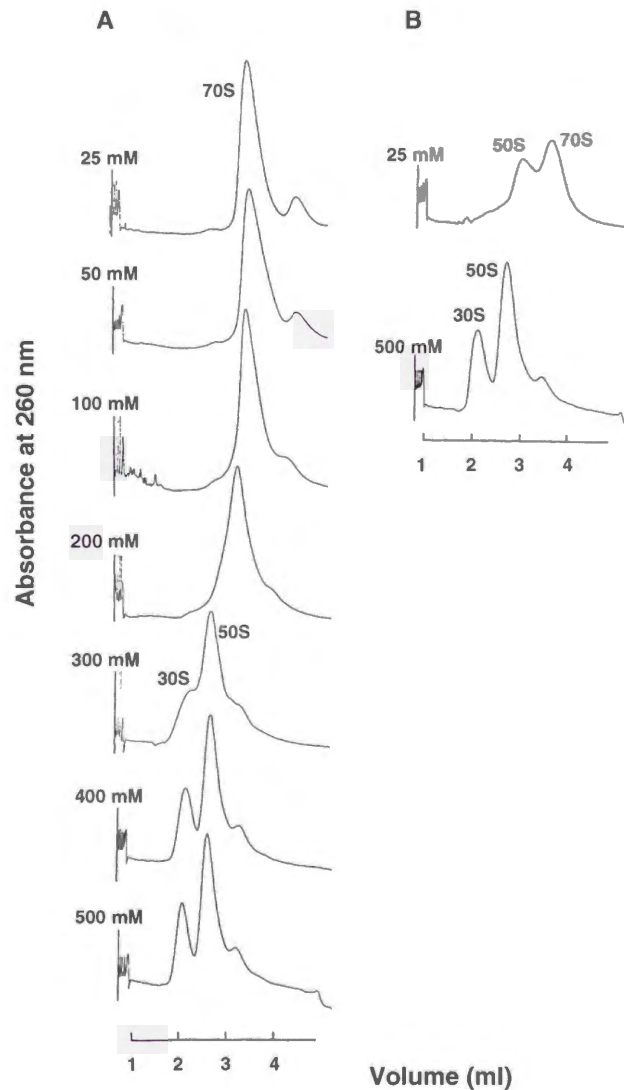


図3 リボソームの大小亜粒子への解離と再会合。  
 (A)精製したリボソームはbuffer Bの組成のKClを図に示す濃度に変えたbufferで調製した5-20%のショ糖密度勾配に上層した。遠心した後、260 nmの吸収によって解離会合の様子をモニターした。(B)プラスチドのストロマ画分を解離条件のショ糖密度勾配に上層して遠心し、大、小両サブユニットの画分を別々に得た後、混ぜ合わせて一つのペレットにした。これをbuffer B、または500 mMのKClを含むbufferで調製したショ糖密度勾配に上層し、(A)と同じように260 nmの吸収でモニターした。



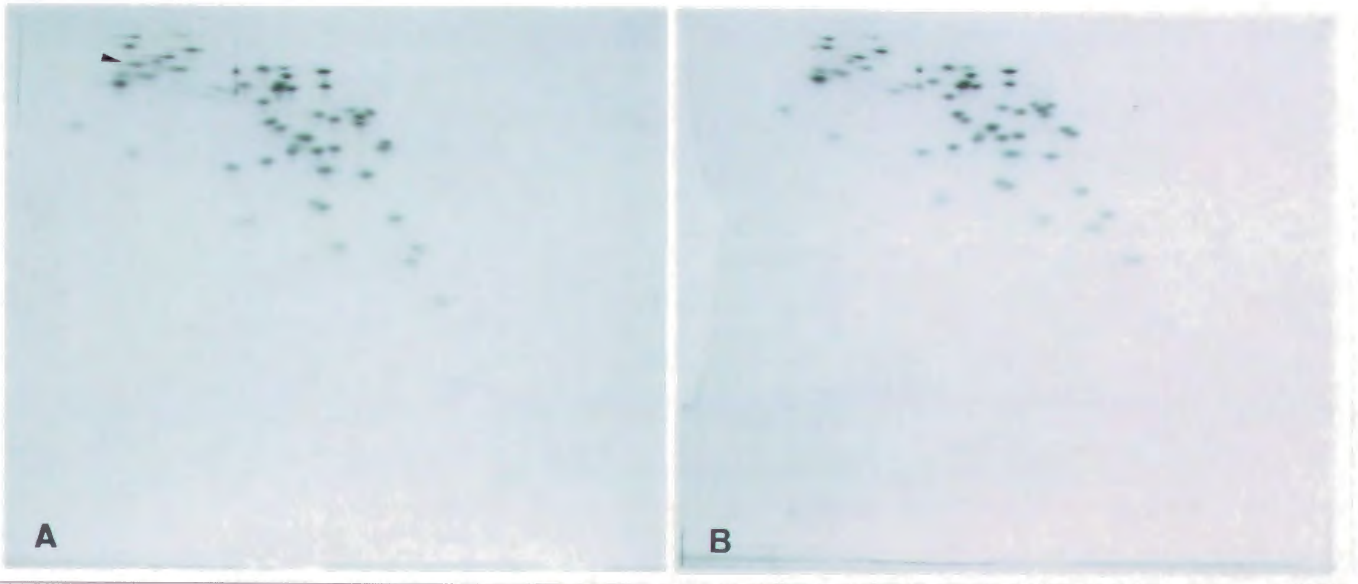


図4 オオムギプラスチドリボソームタンパク質のRFHR法による泳動パターン。

無傷プラスチドのストロマ画分から、図1と同じように70Sリボソーム画分を調製した。リボソームをペレットにした後、酢酸法でタンパク質を抽出し、RFHR法によって分析した。ゲルの左側が酸性領域、右側が塩基性領域。(A)高塩濃度処理をしていないリボソームから抽出したタンパク質の泳動像。短時間の精製で高純度なリボソームが得られた。(B)高塩濃度処理したプラスチドリボソームから抽出したタンパク質の泳動像。酸性領域のスポットが一つ消失したほかは、変化がみられない。

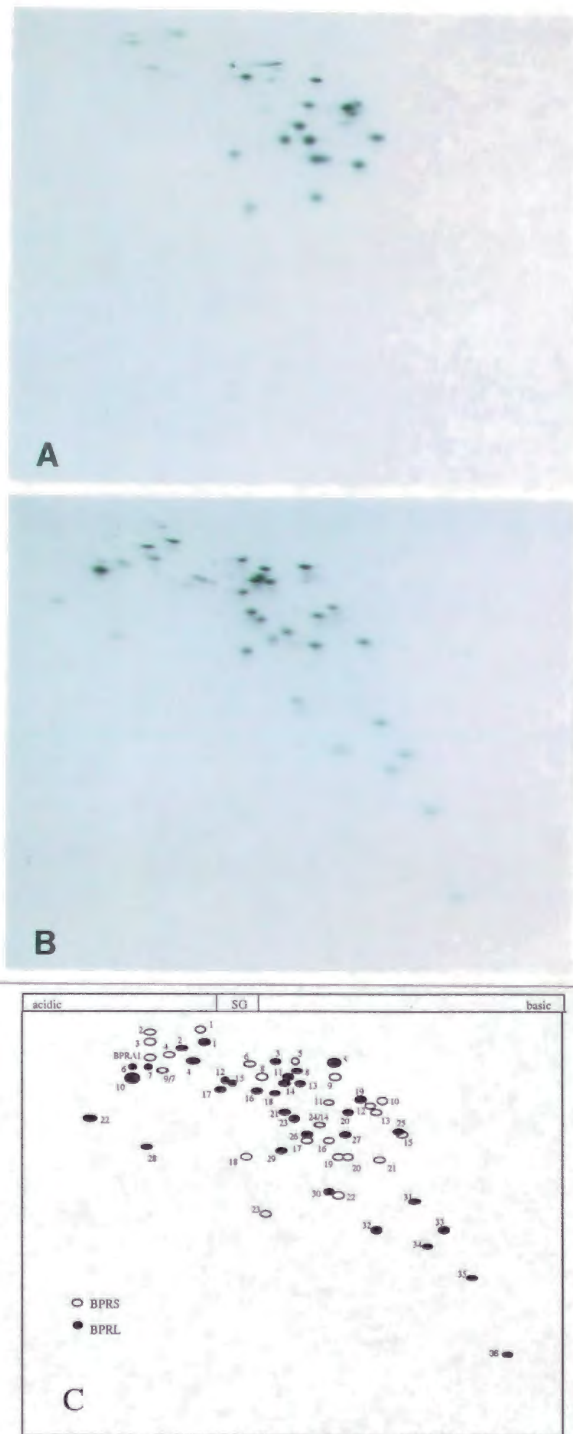


図5 プラスチドリボソームの小亜粒子、大亜粒子の構成タンパク質の泳動像と、スポットの位置の概略図。ストロマ画分を、buffer Cで調製したショ糖密度勾配遠心により分画し、小亜粒子と大亜粒子を得た。それぞれから抽出したタンパク質の泳動パターンをA(小亜粒子)、B(大亜粒子)に示す。(C) 大小両亜粒子のスポットの位置を比較して、全スポットの位置関係を模式的にあらわした。白丸が小亜粒子由来、黒丸が大亜粒子由来のスポット。

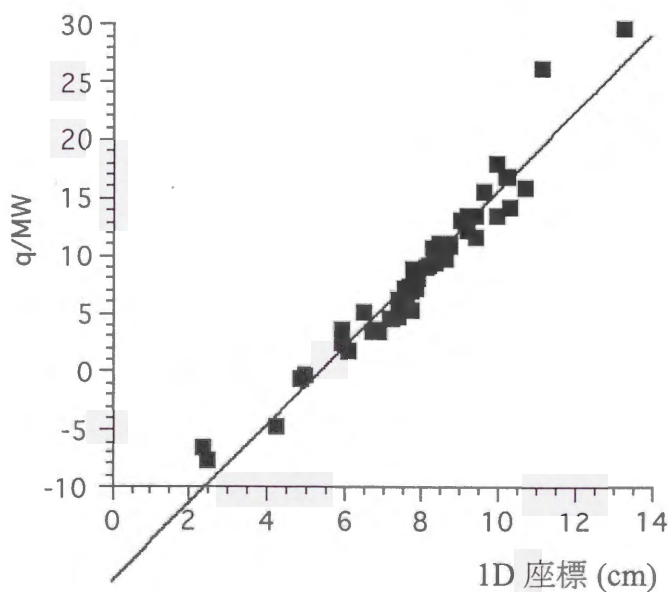
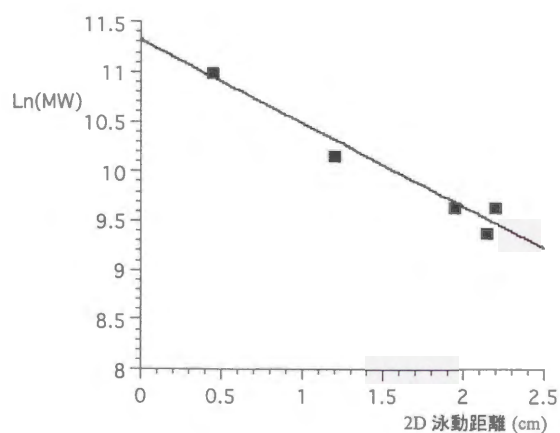


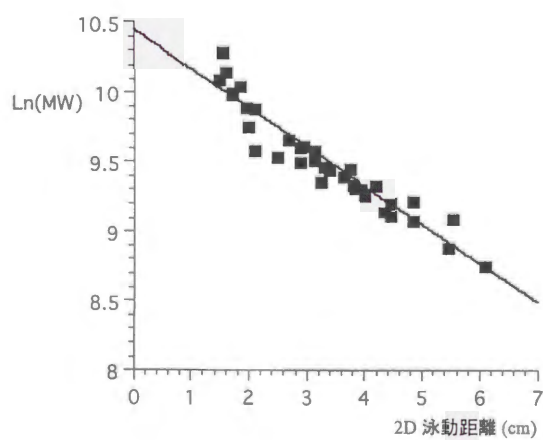
図6 平均電荷量推定のための検量線

大腸菌のリボソームタンパク質について、アミノ酸配列から推定されるpH8.2における分子量一万当たりの電荷量を計算し、ゲル上に形成された各タンパク質のスポットの1次元目の座標（1D座標）に対してプロットした。この回帰曲線を、同時に泳動したオオムギプラスチドリボソームタンパク質の平均電荷量推定に用いた。

### A 酸性領域



### B 中間領域



### C 塩基性領域

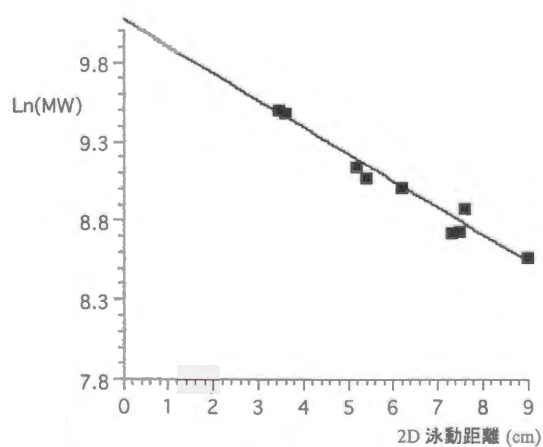


図7 分子量推定のための検量線。  
大腸菌とプラスチドのリボソームタンパク質を同時に泳動したゲルを、酸性、中間、塩基性の3つの領域に分けた。それぞれの領域に含まれる大腸菌リボソームタンパク質の分子量の対数 (Ln(MW)) を、2次元目の泳動距離 (2D 泳動距離) に対してプロットし、得られた回帰曲線をプラスチドリボソームタンパク質の分子量推定に用いた。各領域に含まれる大腸菌、プラスチドのリボソームタンパク質の種類については、材料と方法を参照。

A

BPRL10 1' STATESPKVLELGDAI  
 ::::::::::::::::::::  
 RyeL12 44' STATESPKVLELGDAI

B

BPRL22 1' XKKGLHPEIFEDAKVY  
 ::::: . . . . .  
 EcoL31 1' MKKDIHPK-YEEITAS

C

BPRL28 1' XSPQKKGTKH  
 : : : : : :  
 PsCL25 41' SSRPQKSTAH

D

BPRS23 1' GRGDRKTNXGGRFRXQYGNA  
 ::::: : : : . . . :  
 SCS23 1' GRGDRKTAKGKRFNHSFGNA

E

BPRA1 1' AXDGPLXSARXIMQ  
 :::: . . . : :  
 SpS22 67' SWDGPLSSVKLILQ

図8 オオムギプラスチドリボソームタンパク質と、相同なタンパク質とのアラインメント。  
 BPRL10(A)、BPRL22(B)、BPRL28(C)、BPRS23(D)、BPRA1(E)はそれぞれ、L12(rye plastid)、L31(*E. coli*)、PsCL25(pea plastid)、SCS23(spinach plastid)、SpS22(spinach plastid)とアラインメントした。一致したアミノ酸をコロン(:)で示した。

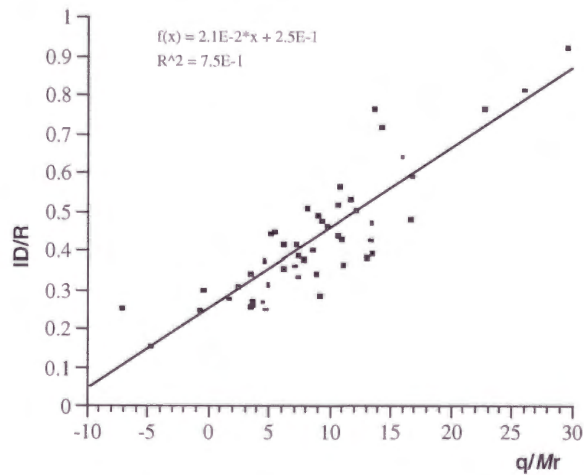


図9 リボソームタンパク質の平均電荷量と染色に用いた色素Amido Black 10Bの結合力との相関。  
 $^{14}C$ で標識した大腸菌リボソームタンパク質は、RFHR法で分離し、Amido Black 10Bで染色した後、デンストメーター(PD110)でスポットの濃さ(ID)を測定した。それぞれのスポットに含まれる放射活性(R)を測定した後、 $ID/R$ の値を計算して $q/Mr$ に対してプロットした。得られた回帰曲線はプラスチドリボソームのコピー数の推定に用いた。

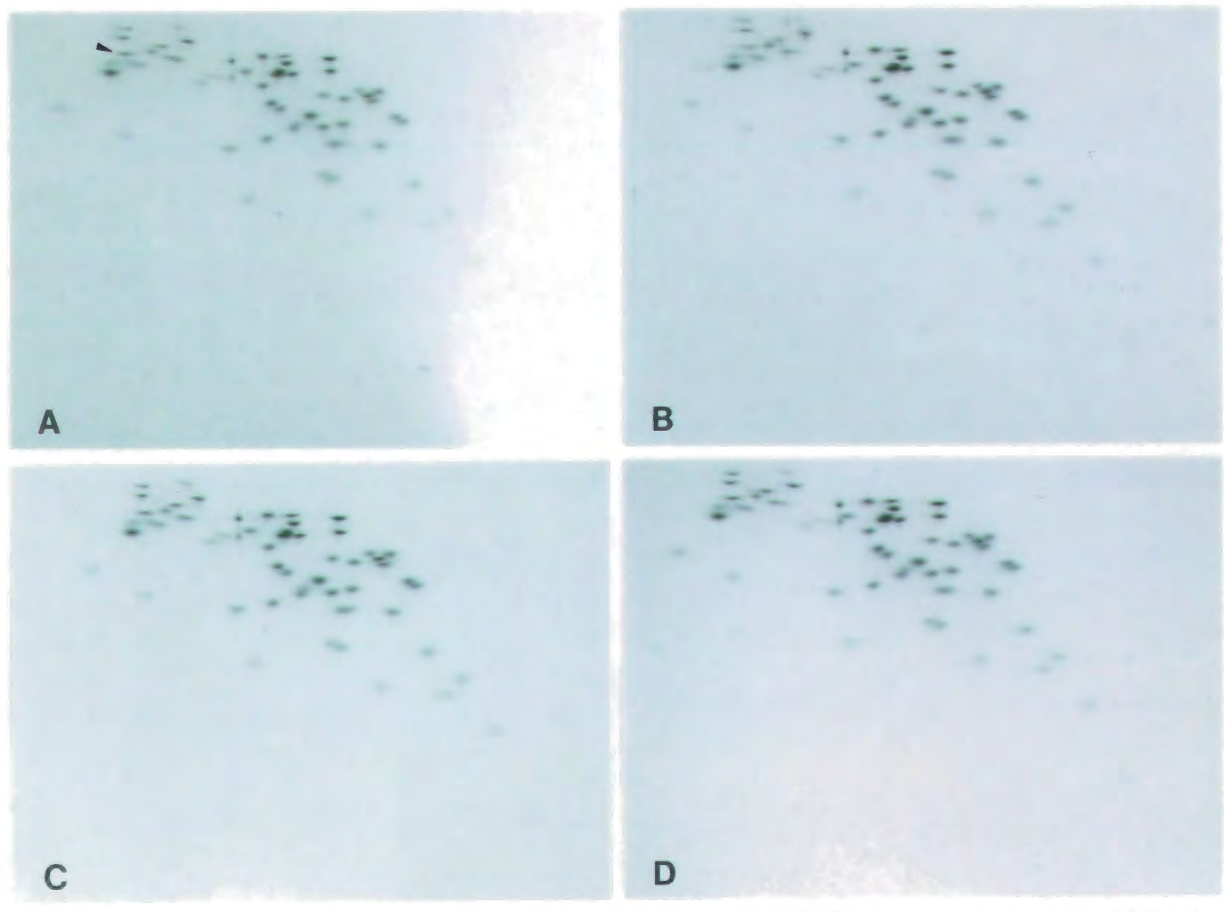


図10 プラスチドリボソームのタンパク質構成に対する光照射の影響。

暗所芽生え(A)に光を当てて3(B)、6(C)、12(D)時間後のオオムギの葉から得た無傷プラスチドからリボソームを調製し、含まれるタンパク質の組成を比較した。リボソームは高塩濃度処理をしていないので、BPR1が結合している (A、矢印)。

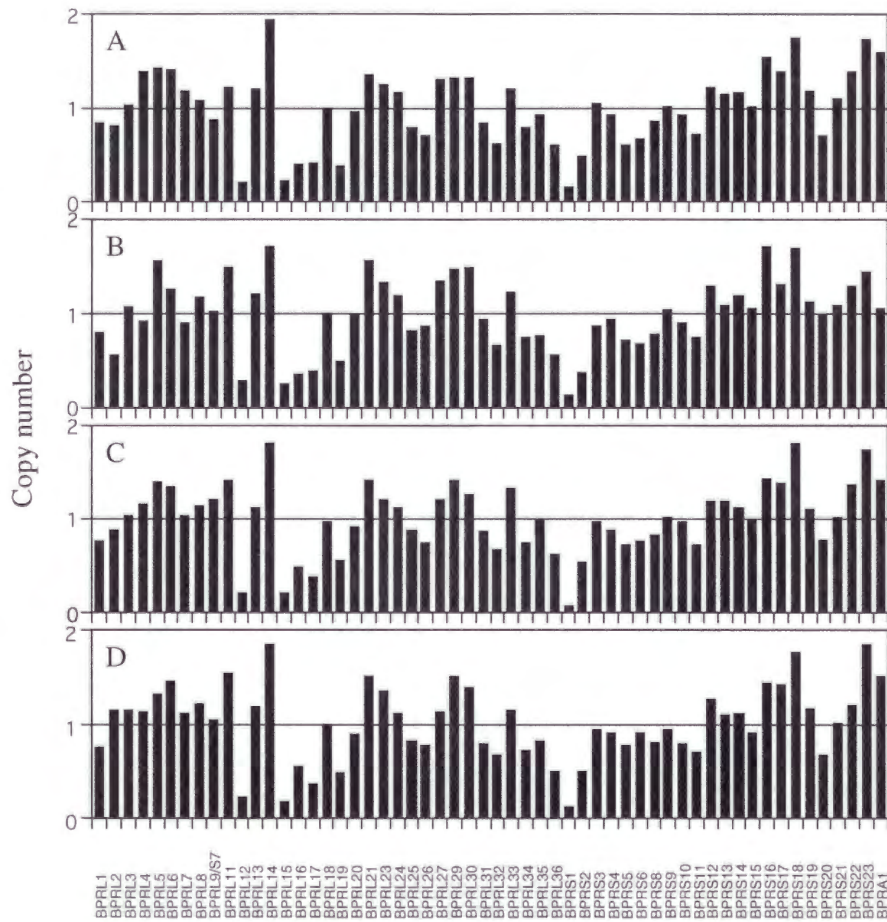


図11 光照射したときのプラスチドリボソームタンパク質のコピー数の変動。

プラスチドリボソームタンパク質のコピー数は棒の高さで示してある。暗所芽生え(A)、光照射3時間(B)、6時間(C)、12時間(D)の結果を並べた。算出方法は表3と同じ。



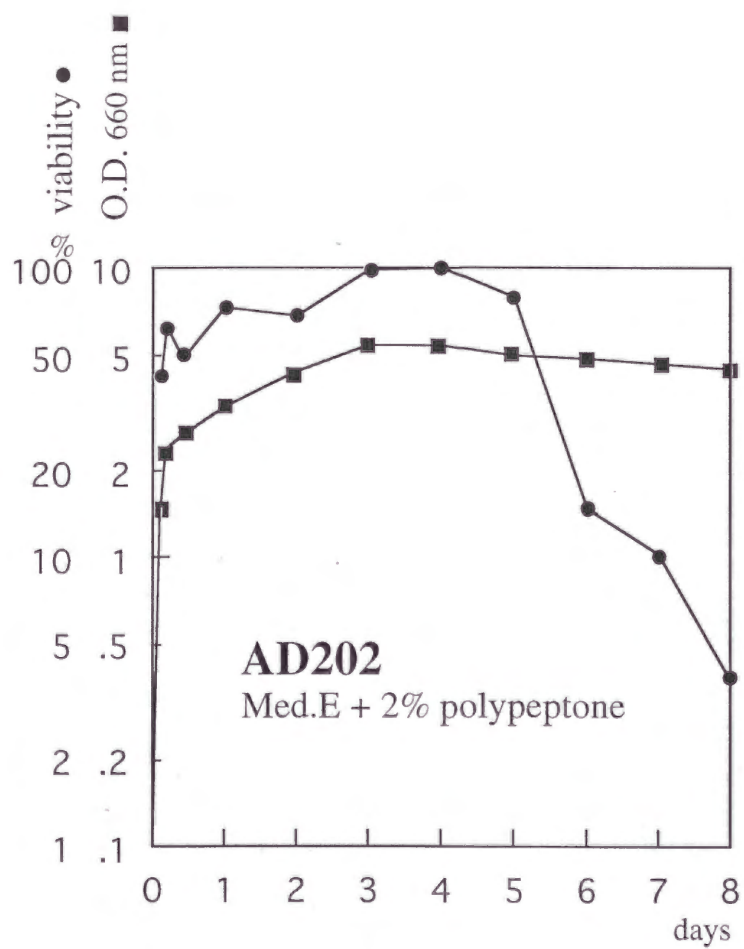


図12 大腸菌 (AD202) の長期培養下での寿命。  
 大腸菌を0.5% glucoseと2% polypeptoneを含むMedium Eで培養すると、6日目前後でviabilityが急激に下がり、10%を下回るようになる。

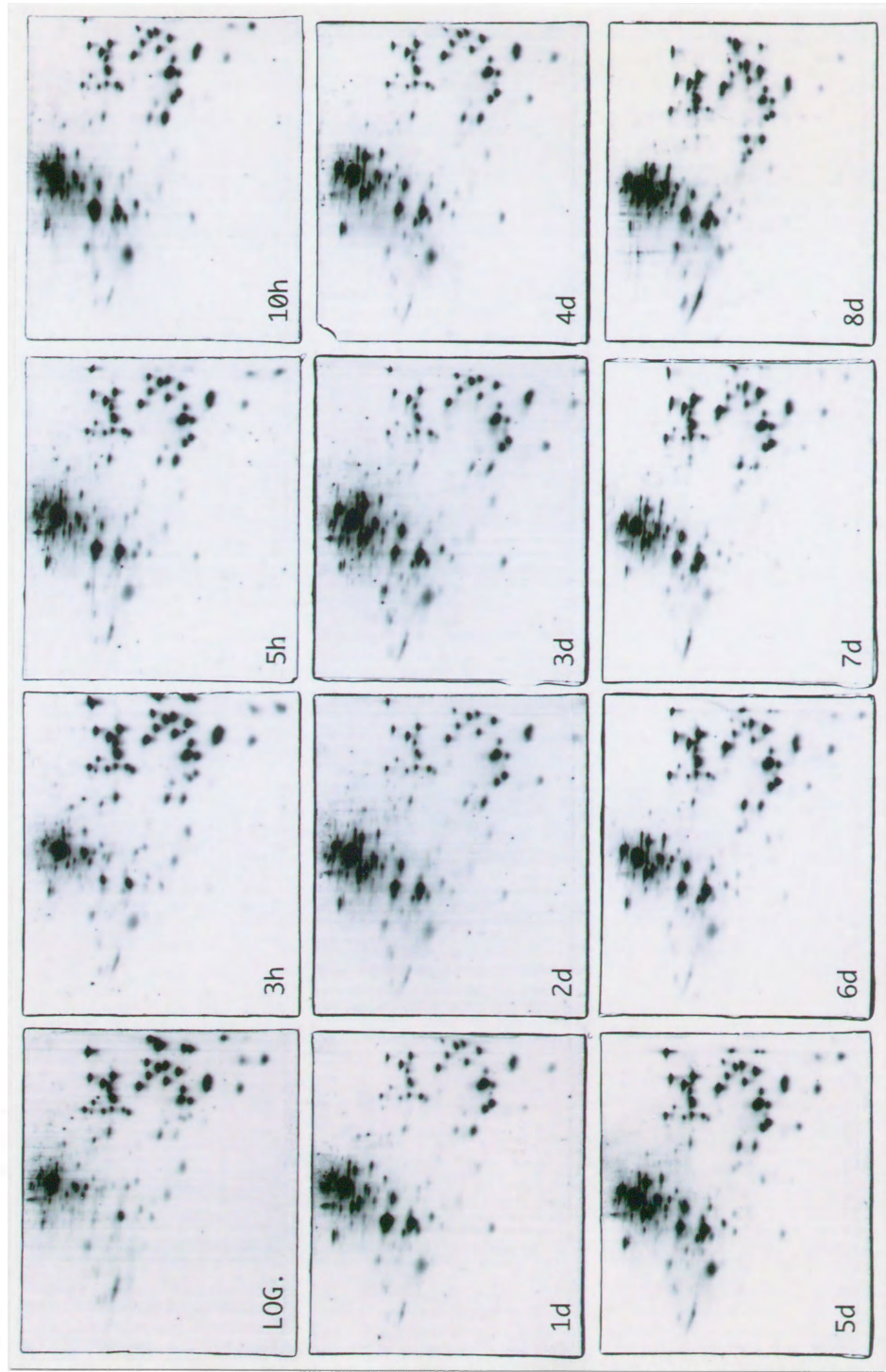


図13A 大腸菌長期培養下の蓄積タンパク質の変動 (CD)。

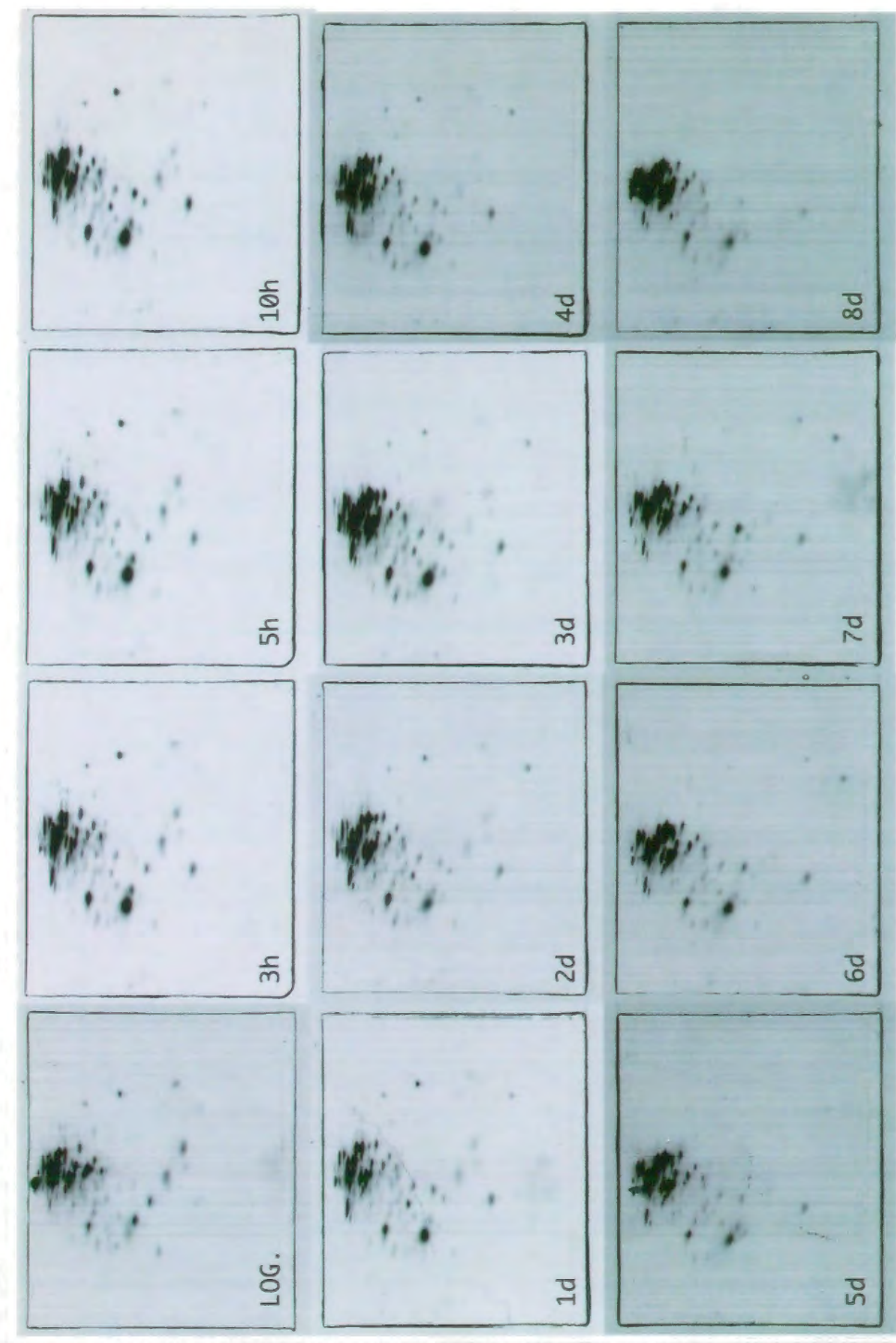


図13B 大腸菌長期培養下の蓄積タンパク質の変動 (PRS)。

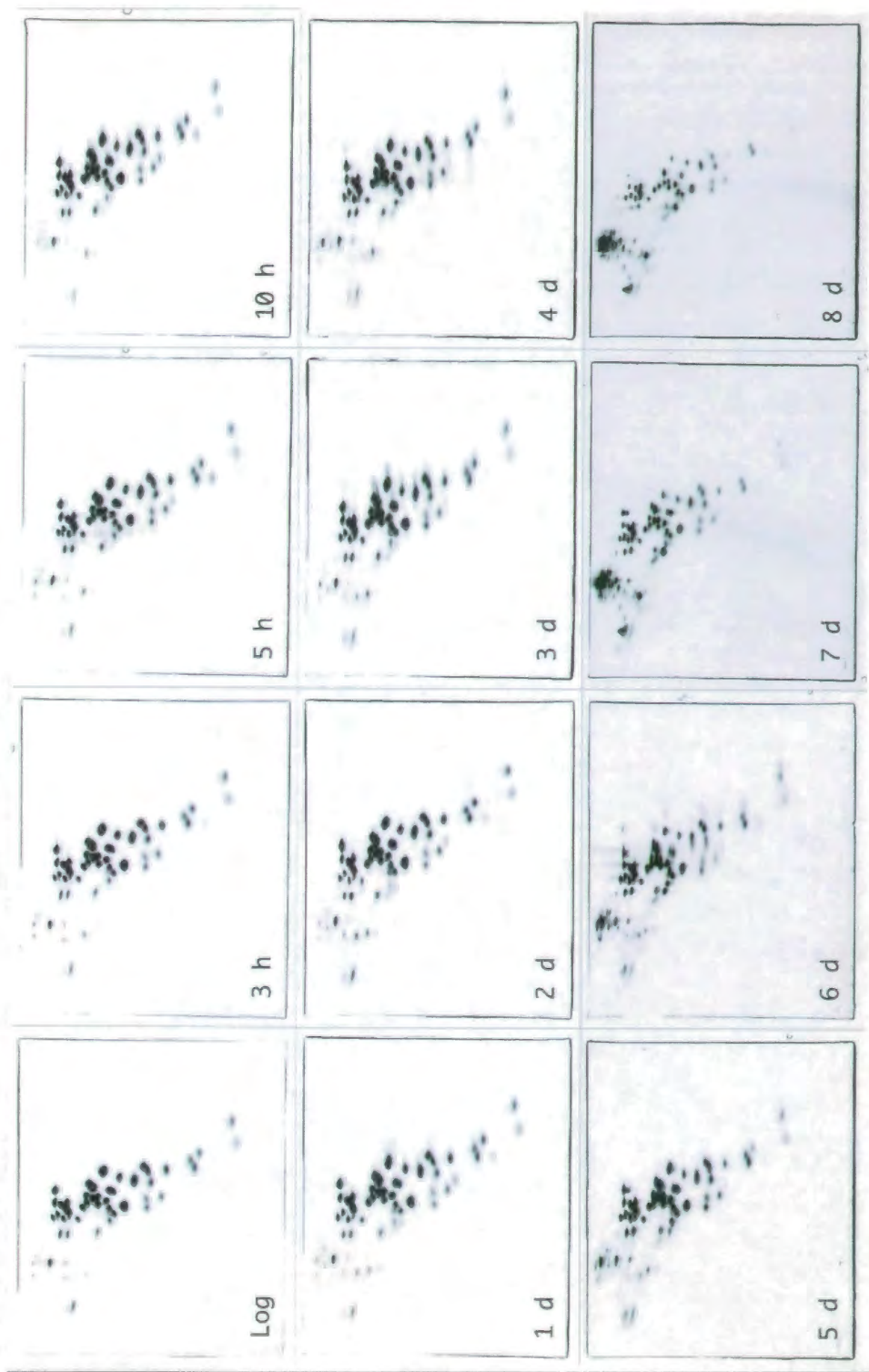


図13C 大腸菌長期培養下の蓄積タンパク質の変動 (CR)。

```

          TMNITSKQMEIT (← N-terminal amino acid sequence of protein F)
          |||
YFIA 1' MTM NITSKQMEITPAIRQHVADRLAKLEKWQTHLINPHIILSKEPQGFVADATINTPNGV
          .***. . . . *** * . * . * . . . . ****. . . . . * . * . . . ***. . . . *
YHBH 1" MQLNITGNNVEITEALREFVTAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKVTHTSDATLHVNGGE
          |||
          MQLNITGNNVEI (← N-terminal amino acid sequence of protein G)

YFIA 61' LVASGKHEDMYTAINELINKLERQLNKLQHKGEARRAATSVKDANFVEEVEEEE
          . ** . . . ***. ** . ** . ** . ***. * . . *
YHBH 61" IHASAEQGDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKQH

```

図14 予想されるFとGのアミノ酸配列の相関。  
 N末端アミノ酸配列分析の結果、Fは*yfiA*遺伝子産物、Gは*yhbH*遺伝子産物のものと一致した。これら二つの遺伝子産物のアミノ酸配列には、互いに相関がみられた。一致したアミノ酸を\*で示した。

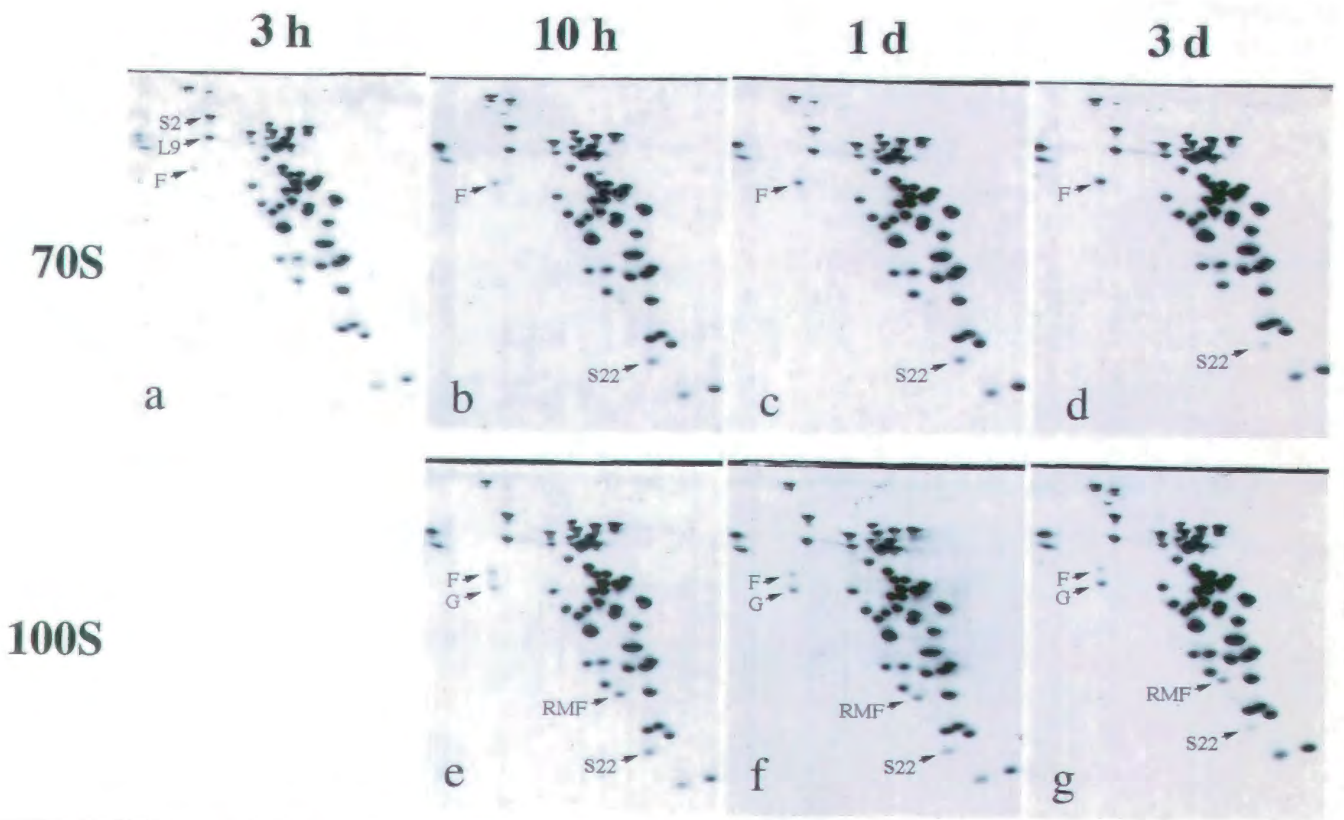


図15 F、G、S22、S2、L9、RMFの70S、100Sリボソーム上への局在性。

培養開始後3時間 (a)、10時間 (b, e)、1日 (c, f)、3日 (d, g) の菌体から70S、100Sリボソーム画分を調製し、含まれるタンパク質をRFHR法で分析した。F、G、S22、S2、L9、RMFのスポットの位置を矢印で示す。F、S22、S2、L9が70S (a, b, c, d)、100S (e, f, g) どちらの画分にも存在しているのに対して、G、RMFは100S画分のみに見いだされ、局在性に違いがみられる。

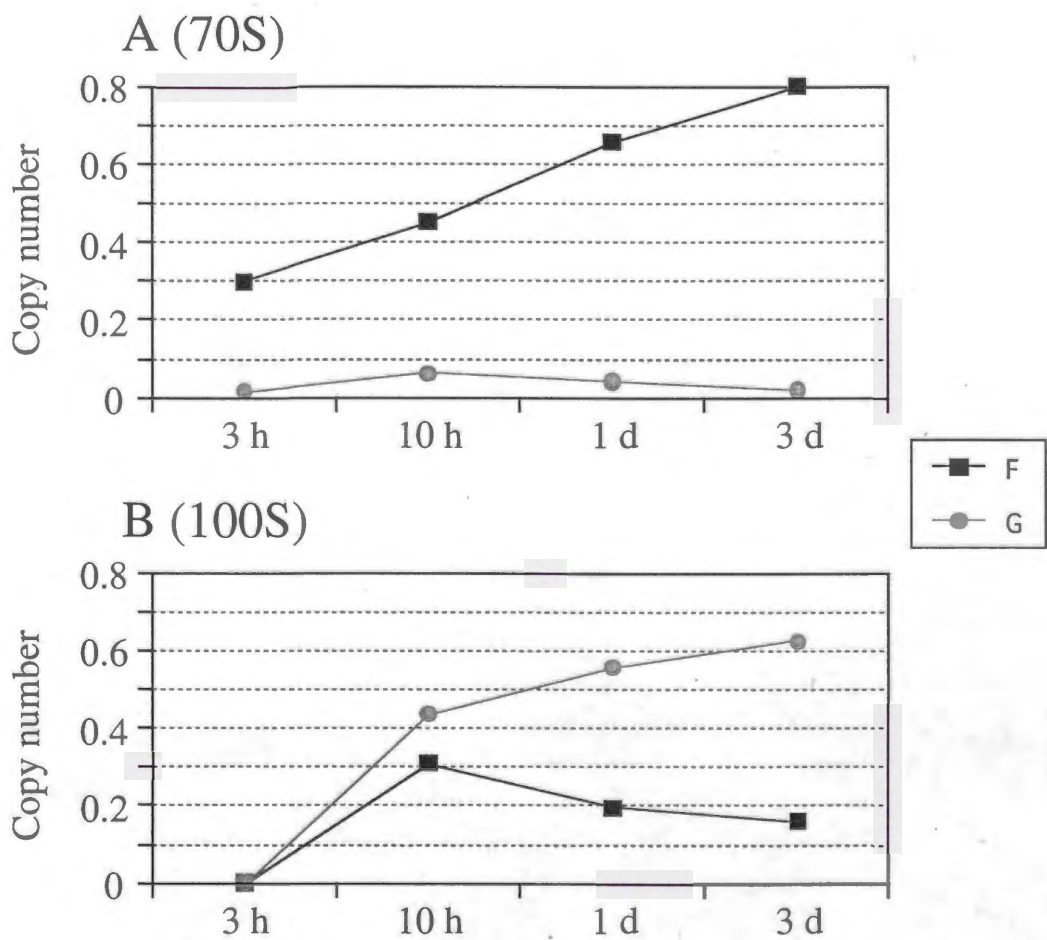


図16 70S、100Sリボソーム画分における、F、Gのコピー数の変化。F、Gのコピー数は、S2とL9を基準にして推定した。Fを黒丸、Gを黒四角で示す。A、Bともに、培養開始からの時間を横軸に示してある。培養開始から3時間の時点では100Sリボソームは存在しないので (B, 3 h)、ここにはF、G共に0 (ゼロ) を代入した。

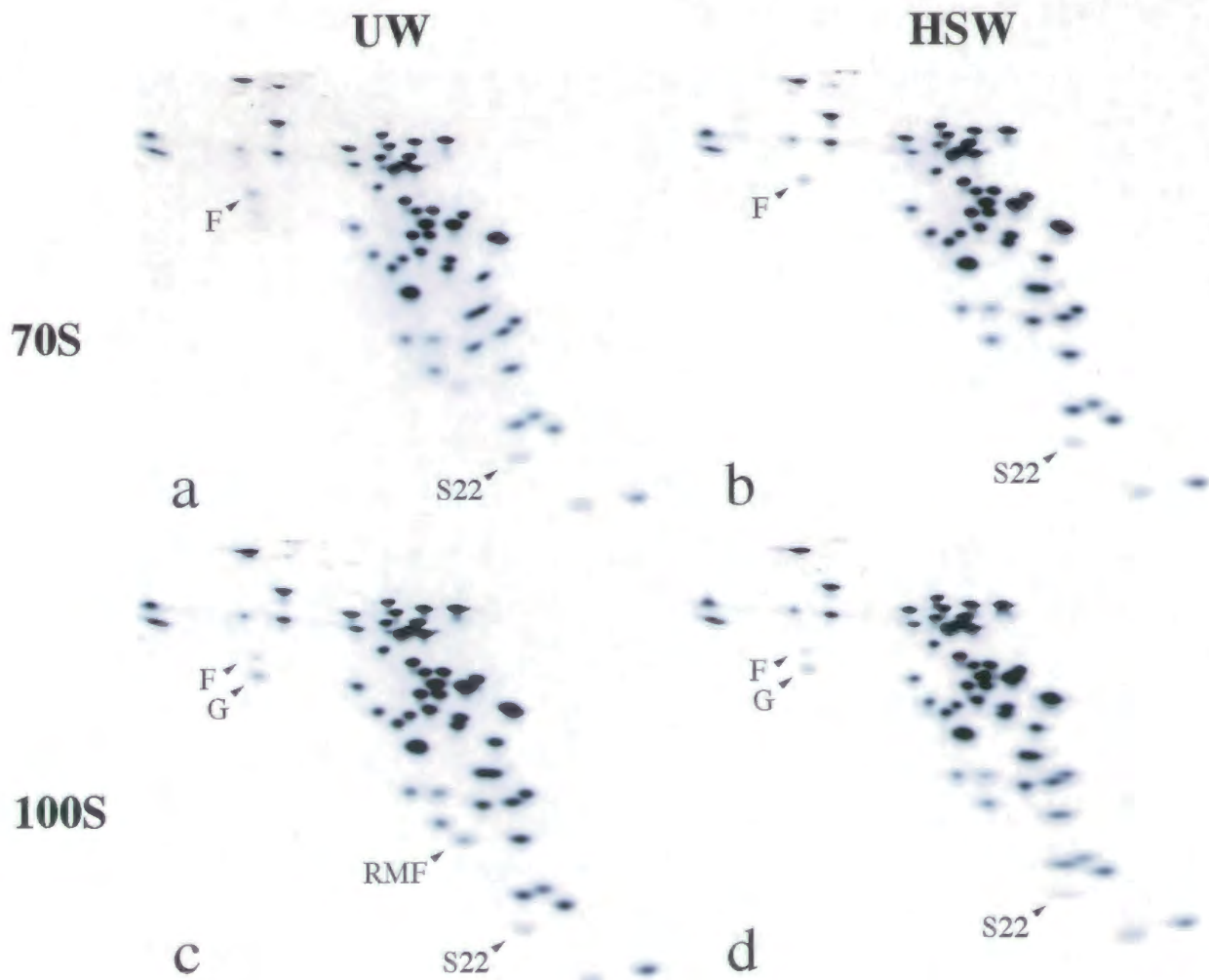


図17 リボソームとF、Gの結合に対する高塩濃度処理の影響。

Buffer Iで調製した70S(a)、100S(b)リボソーム (UW; Unwashed) を、1M NH<sub>4</sub>(Ac)で高塩濃度処理 (HSW, High Salt Wash) したもの (70S, c; 100S, d) と比較した。F、G、RMF、S22の位置を矢印で示す。F、G、S22は高塩濃度処理前後で変化を示さないが、RMFは高塩濃度処理後の100Sリボソームでみられなくなる。



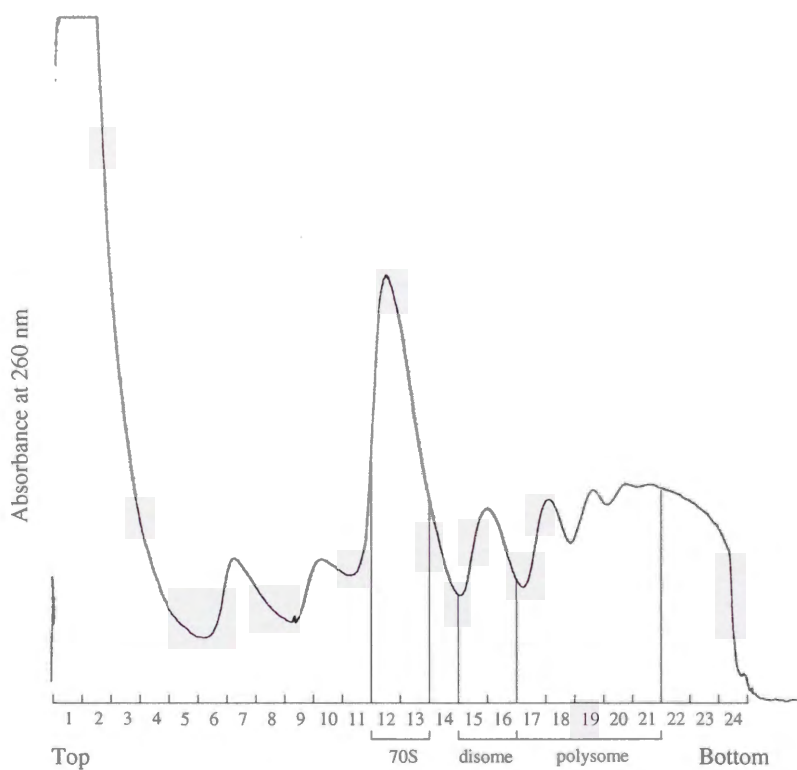


図18 定常期から対数増殖期への移行期のポリソーム画分。

定常期の細胞を新鮮な培地に移して30分後に翻訳反応をchloramphenicolで阻害した。この時の細胞抽出液を4-47%のショ糖密度勾配に上層して遠心し、260 nmの吸収を測定しながら分画した。図に示す70Sリボソーム、ダイソーム、ポリソーム画分は、別々に遠心し、含まれるリボソームを回収した。



図19 70Sリボソームとポリソームのタンパク質構成の違い。

図18で得られた70Sリボソーム画分とポリソーム画分から抽出したタンパク質をRFHR法で分析した。70Sリボソーム画分にはF、Gが確認できるが、ポリソーム画分にはどちらもみられない。

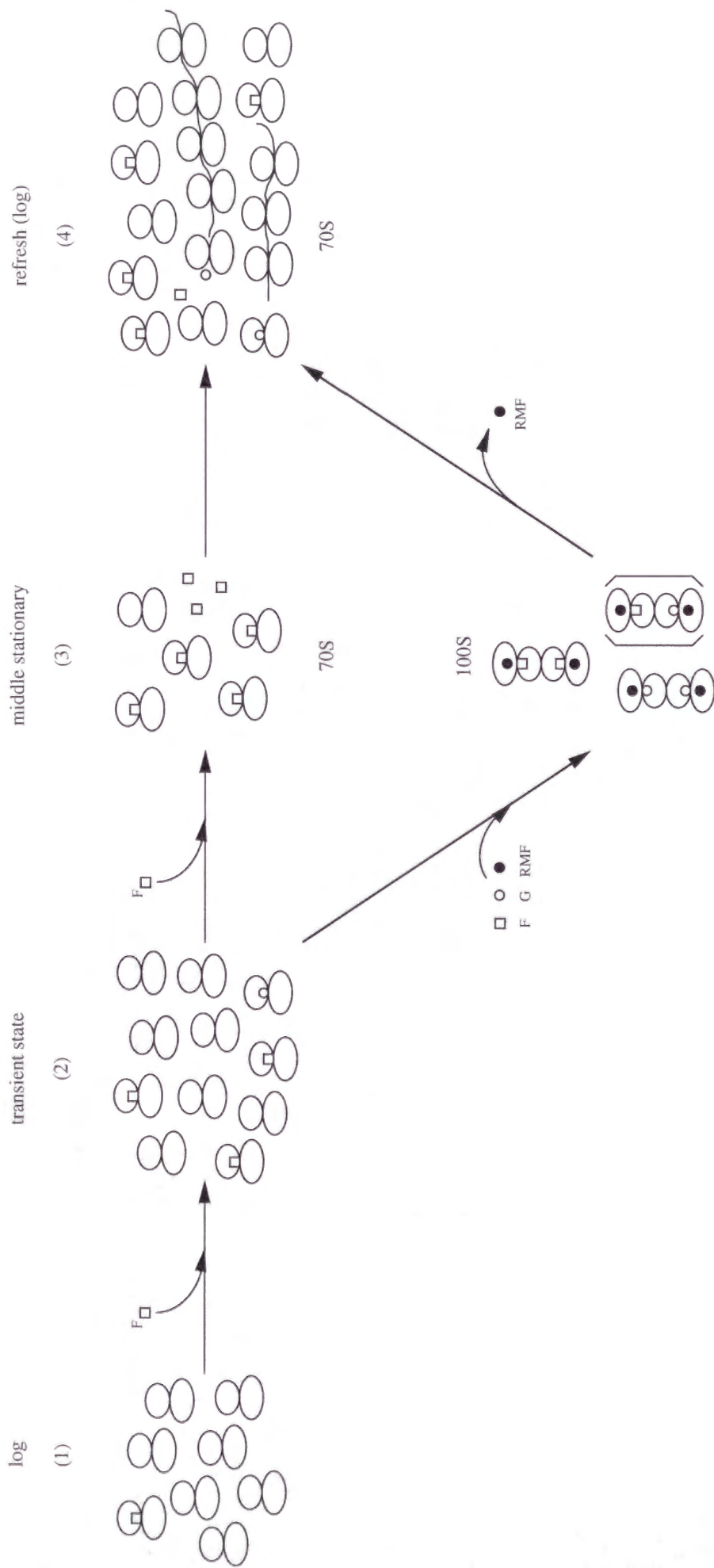


図20 大腸菌リボソームの構造と構成の変化のモデル。  
 (1) は対数増殖期のリボソームをあらわした。(2) は対数増殖期から定常期への移行変り変りの時期で、(3) が定常期であり、再び増殖が始まる環境になった時期を (4) として、全体を模式的にあらわした。この図の中には、F、G、RMFのみを白四角、白丸、黒丸でそれぞれ表した。大、小両リボソーム重粒子は、大きい精円と小さい精円であらわした。詳細は本文中に記述してある。

表1 大腸菌リボソームタンパク質のpI

	pI		pI
L01	10.12	S01	4.74
L02	11.4	S02	6.73
L03	10.39	S03	10.73
L04	10.19	S04	10.45
L05	9.9	S05	10.58
L06	10.1	S06	4.76
L07		S07	10.84
L08		S08	9.84
L09	6.18	S09	11.4
L10	9.52	S10	10.15
L11	10.11	S11	11.82
L12	4.45	S12	11.33
L13	10.29	S13	11.26
L14	10.9	S14	11.66
L15	11.68	S15	10.83
L16	11.71	S16	11.01
L17	11.53	S17	10.05
L18	10.85	S18	10.96
L19	11.08	S19	11.05
L20	11.96	S20	11.68
L21	10.29	S21	11.65
L22	10.71	S22	11.55
L23	10.42	RMF	11.3
L24	10.73		
L25	10.03		
L26			
L27	11.09		
L28	11.92		
L29	10.5		
L30	11.47		
L31	9.71		
L32	11.5		
L33	10.72		
L34	13.5		
L35	12.28		
L36	11.18		

表2 オオムギプラスチドリボソームタンパク質の平均電荷量と分子量

NAME	$q/M_r$ ( $\times 10^4$ )	$M_r$	NAME	$q/M_r$ ( $\times 10^4$ )	$M_r$
BPRL1	-0.9	38,800	BPRS1	-1.8	54,300
BPRL2	-3.4	32,800	BPRS2	-6.1	53,300
BPRL3	5.7	23,300	BPRS3	-6.5	42,200
BPRL4	-2.4	24,500	BPRS4	-4.5	28,900
BPRL5	11.2	22,300	BPRS5	7.7	23,000
BPRL6	-6.1	21,600	BPRS6	3.1	22,200
BPRL7	-8.0	21,600	BPRS7	-5.0	20,700
BPRL8	7.7	21,700	BPRS8	4.3	20,500
BPRL9	-5.0	20,700	BPRS9	11.4	20,000
BPRL10	-8.2	16,800	BPRS10	15.3	15,200
BPRL11	7.3	20,300	BPRS11	10.6	16,200
BPRL12	1.1	20,000	BPRS12	14.3	14,800
BPRL13	7.0	19,200	BPRS13	14.9	14,200
BPRL14	8.2	19,200	BPRS14	9.7	13,500
BPRL15	1.8	19,200	BPRS15	17.3	12,900
BPRL16	3.3	18,900	BPRS16	10.6	11,900
BPRL17	0.4	18,600	BPRS17	8.4	11,900
BPRL18	5.7	17,600	BPRS18	2.6	10,500
BPRL19	13.8	16,700	BPRS19	11.2	10,300
BPRL20	12.4	15,300	BPRS20	12.4	10,300
BPRL21	6.5	15,100	BPRS21	15.4	11,300
BPRL22	-12.2	6,400	BPRS22	11.4	7,500
BPRL23	7.3	14,300	BPRS23	4.5	6,500
BPRL24	9.7	13,500			
BPRL25	16.6	13,300	BPRA1	-6.1	22,800
BPRL26	8.4	12,400			
BPRL27	12.2	12,200			
BPRL28	-6.8	3,200			
BPRL29	6.2	11,100			
BPRL30	10.7	7,900			
BPRL31	18.3	9,800			
BPRL32	20.5	8,100			
BPRL33	14.8	8,000			
BPRL34	19.3	7,500			
BPRL35	23.2	6,300			
BPRL36	26.2	4,300			

平均電荷量と分子量は、大腸菌リボソームタンパク質をマーカーとして、電気泳動画像の1次元目と2次元目の易動度から推定した。詳細は材料と方法を参照。

表3 オオムギプラスチックドリボソームタンパク質のコピー数

NAME	copy no	NAME	copy no
BPRL1	0.84	BPRS1	0.16
BPRL2	0.80	BPRS2	0.48
BPRL3	1.03	BPRS3	1.05
BPRL4	1.39	BPRS4	0.94
BPRL5	1.43	BPRS5	0.61
BPRL6	1.41	BPRS6	0.67
BPRL7	1.19	BPRS7+L9	0.88 <sup>a</sup>
BPRL8	1.09	BPRS8	0.86
BPRL9+S7	0.88 <sup>a</sup>	BPRS9	1.02
BPRL10	N.D. <sup>b</sup>	BPRS10	0.92
BPRL11	1.22	BPRS11	0.73
BPRL12	0.21	BPRS12	1.21
BPRL13	1.20	BPRS13	1.14
BPRL14	1.93	BPRS14	1.17
BPRL15	0.23	BPRS15	1.01
BPRL16	0.40	BPRS16	1.54
BPRL17	0.41	BPRS17	1.38
BPRL18	1.01	BPRS18	1.75
BPRL19	0.39	BPRS19	1.19
BPRL20	0.97	BPRS20	0.71
BPRL21	1.35	BPRS21	1.10
BPRL22	N.D. <sup>b</sup>	BPRS22	1.39
BPRL23	1.25	BPRS23	1.74
BPRL24	1.17		
BPRL25	0.79	BPRA1	1.60
BPRL26	0.70		
BPRL27	1.31		
BPRL28	N.D. <sup>b</sup>		
BPRL29	1.33		
BPRL30	1.32		
BPRL31	0.85		
BPRL32	0.63		
BPRL33	1.20		
BPRL34	0.79		
BPRL35	0.92		
BPRL36	0.60		

各タンパク質の量比は、それぞれの ID、 $q/M_r$ 、 $M_r$  の値を使い、図 9 に示した補正曲線を用いて推定した。導いた値は、BPRL10、BPRL22、BPRL28 を除くすべてのデータの平均値を 1 として補正した。

<sup>a</sup> BPRL9 と BPRS7 は二つの値の合計で示してある（詳細は本文）。

<sup>b</sup> Not determined.

## 謝辞

本研究をすすめるにあたって、生化学的な実験の初歩からリボソームの専門知識まで、非常に多くのことを教えて下さり、研究開始当初からご指導いただきました、現在大阪医科大学医学部物理学教室の和田明博士に感謝いたします。現在北海道大学低温科学研究所の田中歩教授には、やはり研究開始当初からご指導いただき、在学中だけでなく、その後も大変お世話になりました。感謝いたします。京都大学大学院理学研究科植物学教室の岡田清孝教授には、温かく見守って頂きました。感謝いたします。

本研究第一部は、京都大学大学院理学研究科植物学教室の植物分子遺伝学分野研究室において、研究室の皆様の助力のもとに行われました。皆様に感謝いたします。本研究第二部は大阪医科大学医学部物理学教室において行われました。研究環境を提供していただき、数々の助言、助力もいただきました。また議論にもお付き合いいただきました。同研究室の先生方に感謝いたします。その他、支えて下さった皆様方に心から感謝いたします。