

ポリアミンにより特異的に合成促進を
受ける蛋白質の精製と機能

三井和浩

1984・2

ポリアミンにより 特異的に合成促進
を受ける蛋白質の精製と機能

千葉大学大学院薬学研究科

三井 和浩

目次

第I章 緒論	3
第II章 大腸菌ポリアミン要求株においてポリアミンによって 合成促進される蛋白質とその精製	
II-1. 緒言	8
II-2. 実験材料と方法	10
II-3 結果	19
II-4 考察	38
II-5 要約	40
第III章 ポリアミンによって特異的に合成促進を受ける蛋白質 蛋白質の性質と機能	
III-1 緒言	41
III-2 実験材料と方法	42
III-3 結果	57
III-4 考察	80
III-5 要約	85

第IV章 大腸菌ポリアミン要求株におけるポリアミンによる
RNAポリメラーゼの合成促進

IV-1	緒言	87
IV-2	実験材料と方法	88
IV-3	結果	91
IV-4	考察	97
IV-5	要約	100

第V章 ポリアミンによる特異的なmRNAの合成促進

V-1	緒言	101
V-2	実験材料と方法	103
V-3	結果	110
V-4	考察	127
V-5	要約	129

第VI章 総合的考察 130

第VII章 結論 132

謝辞 134

文献 135

第I章 緒論

ポリアミンとは、ウイルスからヒトに至るまで広く生物界に存在する塩基性物質であり、複数個のアミノ基を有する直鎖脂肪族炭化水素の総称である。天然に存在するポリアミンの中で、生体内に広く分布し、細胞内含量の高いものにアトレッシン、スperlミジン、スperlミンがある^(1~3) (Fig. I-1)。

ポリアミンの生合成は Tabor²⁾らによって調べられ、Fig. I-2に示した経路で合成される。すなわちオルニチンを前駆体としてオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) によってアトレッシンが合成され、さらにアトレッシンにアミノプロピル基が転移することによりスperlミジン、スperlミンが合成される。細菌においてはODCによるアトレッシンの生合成とは別に、アグマチンからアグマチンウレオヒドロラーゼ (AUH) によってアトレッシンを合成する経路も存在する。各ポリアミンの存在比は細胞種によって大きく異なり、大腸菌ではアトレッシンが最も多く、スperlミンは存在しない。一方動物細胞ではスperlミジンが最も多く、次にスperlミンでアトレッシンは非常に少ない²⁾。また増殖の盛んな組織中では、ポリアミン合成酵素群およびポリアミン含量が高くなっていることから、ポリアミンが細胞の増殖、分化に關与する因子として注目されている^(1~3)。

ポリアミンは生体内においては多価のカチオンとして存在し、非常に簡単な構造を有する化合物でありながら、DNA、RNA、蛋白質合成の促進、種々の酵素の活性の調節など種々の重要な生物学的

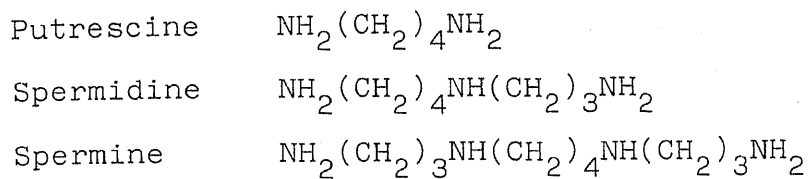


Fig.I-1 Structure of typical polyamines.

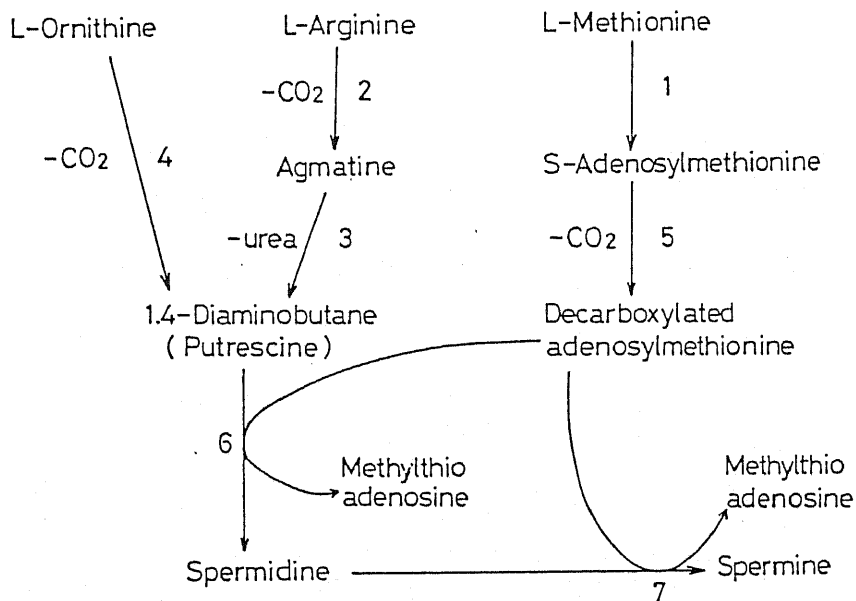


Fig.I-2 Biosynthesis of polyamines.

1;S-Adenosylmethionine synthetase 2;Arginase
 3;Agmatine ureohydrolase 4;Ornithine decarboxylase
 5;S-Adenosylmethionine decarboxylase 6;Spermidine
 synthetase 7;Spermine synthetase

機能も有している。^{1)~3)}また増殖の盛んな組織中でポリアミン含量が高く、そのレベルが状況に応じて調節され、DNA合成、RNA合成に先立って細胞内レベルが上昇することから細胞の増殖と密接に関与している^{1)~3)}と主張されている。

細胞増殖とポリアミンの機能に関する研究は Herbst と Snell⁴⁾ による *Hemophilus parainfluenzae* の研究が「最初で」、彼らはプロレツシン、1.3-ジアミノプロパン、スペルミジンが生長因子であることをみいだした。その後 Raina らは、ラット胎児組織のスペルミジン量が年取った組織のスペルミジン量よりも数段高いこと⁵⁾、また細胞内ポリアミン分布とRNA分布がよく一致していること⁶⁾を報告している。原核細胞での研究は、大腸菌のポリアミン要求株を用いての研究を中心として行われ^{7)~10)}、ポリアミンが細胞の増殖因子として必須であることが示された。

蛋白質合成に関するポリアミンの研究は Nathans と Lipmann¹¹⁾ によるポリペプチド合成の促進の報告が「最初で」ある。その後、大腸菌ポリアミン要求株が分離され^{7),8)}、増殖促進因子としてのポリアミンの機能が詳細に研究された。ポリアミン要求株は、培地中にポリアミンを添加しついで増殖速度が遅くなり、これにポリアミンを加えると増殖が回復するものである。Young^{12),13)} らは、大腸菌ポリアミン要求株 (*speA mutant*) を用い、ポリアミン添加による増殖促進は蛋白質合成が最初に促進されるためであると報告している。

一方ポリアミン非存在下で培養した菌から調製した蛋白質合成系

は、ポリアミン存在下で培養した菌からのものより poly U を鋳型とするポリフェニルアラニン合成で約 $1/2$, MS2 RNA を鋳型とする蛋白質合成で約 $1/4$ の活性しか見られなかった。この原因はリボソームの活性低下であり、¹⁵⁾ リボソーム中の 30S 亜粒子に原因があることが示された。¹⁶⁾¹⁷⁾ 無細胞蛋白質合成系におけるポリアミンの作用に関しては多くの研究がなされており、リボソームの会合促進、^{18~20)} リボソームの活性促進と安定化、²¹⁾²²⁾ Ile-tRNA の合成促進、^{23)24~27)} 開始複合体の形成促進、^{27~30)} mistranslation の低下、^{31~34)} mistermination の抑制、^{35~39)} elongation の促進など数多くの機能を有することが知られている。^{40~43)}

筆者らの研究室においても以前より蛋白質合成、RNA 分解におけるポリアミンの効果も研究しており、poly U を鋳型とするポリフェニルアラニン合成において至適 Mg^{2+} 濃度を低下させるだけで約 2 倍の合成促進をすること、またこの促進がアミノアシル-tRNA がリボソームに結合するレベルでおこることを報告している。⁴⁴⁾ また大腸菌無細胞系においてポリアミンによる蛋白質合成の促進は鋳型としてもちいる mRNA のフラシル残基に依存していて、その原因はリボソームの 30S 亜粒子の 16S RNA にあることを報告した。⁴⁵⁾ さらに MS2 ファージ RNA, T7 ファージ DNA, λ rif^d 18 DNA を鋳型とした大腸菌無細胞系で、ポリアミンを添加することによりある種の蛋白質 (MS2 ファージ RNA レプリカゼ, T7 RNA ポリメラーゼ, RNA ポリメラーゼ $\beta\beta$ サブユニット

ット)の合成が特に大きく促進されることを報告した。⁴⁶⁾⁴⁷⁾また大腸菌を用いた *in vivo* の実験で、ポリアミンが対数増殖期の初期に急激に増加し以後減少することも報告している。⁴⁸⁾

筆者はこれらの知見をひきまえて、ポリアミンと細胞増殖の関係を知るために、大腸菌ポリアミン要求株を用いて、*in vivo* におけるポリアミンの作用機序に関して検討を行なった。その結果、ポリアミンが *in vivo* において特異的タンパク質と mRNA を合成促進することをみだし、ポリアミンによって特異的に合成促進されるタンパク質の性質と機能について若干の検討を行なった。

第II章 大腸菌ポリアミン要求株においてポリアミンによって合成促進される蛋白質とその精製

II-1. 緒言

ポリアミンが増殖の整った細胞中に多く含まれることから、細胞の増殖との関係が注目されている。^{1)~3)}しかし、どのようなメカニズムによって細胞増殖に関与しているかはまだわかっていない。

in vitro におけるポリアミンの作用に関しては多くの研究がなされている。蛋白質合成に関するポリアミンの効果としては、蛋白質合成の促進²⁾³⁾、fidelityの上昇^{31~34)}、30Sリボソーム粒子の形成の促進¹⁶⁾¹⁷⁾²¹⁾²²⁾が知られている。

当研究室においても、蛋白質合成でポリアミンは単にマグネシウムの代りをするだけでなく促進効果も有し、その促進効果は主として開始段階でおこなっていることを報告している。⁴⁴⁾さらに最近、フェージRNA、フェージDNAを鋳型とする蛋白質合成系において、1 mM スパルミジンによって、増殖に関与する蛋白質 (RNAレポリカーゼ、T₇RNAポリメラーゼ、E. coli RNAポリメラーゼの β β' サブユニット) の合成が著しく促進されることを報告している。⁴⁶⁾⁴⁷⁾

一方 *in vivo* におけるポリアミンの作用に関する研究は、大腸菌ポリアミン要求株を用いたものが中心である。¹²⁾¹³⁾ Youngらはポリアミンの添加によって最初に促進を受けるのは蛋白質合成の段階であると報告している。³⁴⁾ GoldembergとAlgranatiはポリアミンの欠乏によって、高分子蛋白質の合成量が減少していることを

示し、これは翻訳の fidelity が減少していることが原因と
なっていると報告している。 Tabor & Tabor³⁹⁾ は T7 バクテリオファ
ージの Amber mutant を大腸菌ポリアミン要求株に感染させ、
ファージの増殖にポリアミンが必要であること、Amber codon
の効果的な翻訳にポリアミンが必要であることを報告している。

しかし大腸菌を用いた *in vivo* の実験においてポリアミンが
特異的に蛋白質の合成を促進するという報告はまだみられない。

そこで、*in vivo* におけるポリアミンの生理作用を解明するた
めに、大腸菌ポリアミン要求株を用いてポリアミンによって合成促
進を受ける蛋白質が存在するか否かを検討した。

本章においてポリアミンによって分子量 62000 の蛋白質の合成
が優先的に促進されることを示し、さらにその蛋白質を均一に精製
したことを示す。

II-2 実験材料と方法

II-2-1. 使用菌株

実験に使用した大腸菌ポリアミン要求株はTable I-1. に示した。E. coli MA 261はW. K. Maars 博士より供与された。またE. coli EWH 319はH. Tabor博士より供与された。

Table II-1: strain used

strain	genotype
E. coli MA261	serA, thr, leu, thi, speB, speC
E. coli EWH319	F ⁻ , (speA, speB) (speC, glc) speD thr-1, proA2, thi-1, lacY1, galk2, mtc-1, xyl-5, ara-14, str-25, supE44 ⁻

II-2-2. 培養条件

E. coli MA 261はMaars⁽¹⁰⁾らによつて分離されたポリアミン要求株で、ポリアミンの生合成に必要なアグマチンウレオヒドロラーゼ(AUH)とオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)が欠損している(第I章Fig. I-2参照)。

培養はAlgranati⁽⁴⁹⁾らの方法により行つた。菌体内のポリアミンを枯渇させるためにポリアミンを含む培地で一夜培養した菌液をポリアミンを含まない培地に入れ希釈し、37℃で24時間静置培養した。こうして調製した菌をポリアミンを含む合成培地(Medium A), およびポリアミンを含まない培地(Medium B)中で37

℃で通気培養した。Medium A, B を以下に示した。

Medium A (1ℓ中に次のものを含む)

KH ₂ PO ₄	7g
K ₂ HPO ₄	3g
クエン酸ナトリウム	0.5g
硫酸アンモニウム	1g
硫酸マグネシウム	0.1g
チアミン	2mg
ピオチン	10mg
ロイシン	0.1g
スレオニン	0.1g
メチオニン	0.1g
セリン	0.1g
グリシン	0.1g
オルニチン	0.1g
プトレッツシン	0.1g
グルコース	4g

Medium B

Medium A よりプトレッツシンを除いたもの。

A 540nm が 0.5 に達するまで通気培養した培養液を 15,000×g, 15 分間遠心して菌体を集めた。菌体はさらに Buffer I [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM Mg(OAc)₂, 60mM NH₄Cl, 6mM β-キルカプトエタノール] で洗浄した後使用するまで -80℃ に凍結保存した。Medium A および B での培養時間はそれぞれ 8 時間, 20 時間であった。

E. coli EWH319 は Tabor らに⁵⁰⁾よって分離されたポリアミン要求株で, ポリアミンの生合成に必要なアルギニンデカルボキシラーゼ, アグマチンウレオヒドロラーゼ, オルニチンデカルボキシラ

一ゼ, S-アデノシルメチオニンデカルボキシルーゼが欠損している(第I章 Fig. I-1 参照)。

培養は Tabor らの方法⁵⁰⁾に従って行った。対数増殖期にある培養液をポリアミンを含む培地に入れ 37 °C で 24 時間静置培養し、菌体内ポリアミンを枯竭させた菌を調製した。この菌をポリアミンを含む培地 (Medium C) およびポリアミンを含む培地 (Medium D) で 37 °C で通気培養した。Medium C, D を以下に示した。

Medium C (1 l 中に次のものを含む)

KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
硫酸マグネシウム	250 mg
塩化カルシウム	13 mg
プロリン	0.1 g
スレオニン	0.1 g
チアミン	2 mg
プロトレツシン	0.1 g
グルコース	4 g

Medium D

Medium C よりプロトレツシンを除いたもの。

A 540 nm が 0.5 に達するまで通気培養し、15,000 × g, 15 分間遠し集菌した。菌体はさらに Buffer I で洗浄し、使用するまで -80 °C に凍結保存した。Medium C および D における培養時間は、それぞれ 9 時間、36 時間であった。

II-2-3. DNA, RNA, 蛋白質への放射能の取り込みの測定⁽²⁾

大腸菌ポリアミン要求株 (MA 261) をポリアミンを含まない培地 (Medium B) で培養し (30 mL), A540 nm が 0.1 に達した時 5 mL ずつ 6 本の L-tube に分注し, うち 3 本にプロトレツシンを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とするように加え, 他の 3 本にはプロトレツシンを加えなかった。その後 37°C で振盪培養した。A540 nm が 0.2 に達した時, プロトレツシン存在下および非存在下で培養した菌液にそれぞれ $[^3\text{H}]$ チミジン, $[^3\text{H}]$ ウリジン を 10 μCi , $[^{14}\text{C}]$ リジンを 10 μCi 加えて 37°C で振盪培養した。適当な時間ごとに 0.7 mL ずつ取り出し, 2 mL の 5% TCA (トリクロロ酢酸) に入れた。氷冷後 RNA, DNA への取り込みの場合にはそのまま冷 TCA 不溶性画分を Whatman GF/C 土に集め 20 mL の 5% TCA で洗浄した。蛋白質への取り込みの測定には, 氷冷後に 90°C, 30 分間加熱した後 Whatman GF/C 土に集めた。どちらも 90°C, 30 分間乾燥後 トルエン・シンチレーターに入れて液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。

II-2-4. ポリアミン存在下および非存在下で培養した菌からの全蛋白質の調製

プロトレツシンを含まない培地 (Medium B) で A540 nm が 0.1 まで培養した *E. coli* MA 261 (50 mL) を 5 mL ずつ 8 本に分注後, 4 本ずつプロトレツシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えるものと, 加

えびいものに分けた。その後37℃で振盪培養し、指示した時間に20 μCi の $[^{14}\text{C}]$ リジン(292 mCi/m mole)を加え5分間振盪した。5分間ラベルした菌液を直ちに等容量の10%冷TCAを加えて水中30分間放置した後、3000 rpm, 10分間遠心してTCA不溶性の沈殿を集めた。沈殿をさらに90%アセトン-0.05N HClで洗浄してTCAを充分除いた後乾燥して100 μl のGel Sample Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 10%グリセリン, 5% β -メルカプトエタノール, 0.006%ブロモフェノールブルー(BPB)]に溶解し、SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動のサンプルとした。

II-2-5. SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動による蛋白質の分離とフルオログラフィー

SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動はLaemmliの⁵¹⁾方法に従って行った。ゲルは5%と12%の不連続スラブゲルを用いた。使用したゲルの組成は次のとおりである。

5%ゲル

5% Acrylamide
 0.13% Methylene bisacrylamide
 0.1% SDS
 0.17% 過硫酸アンモニウム
 0.05% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
 125mM Tris-HCl (pH 6.8)

12%ゲル

12% Acrylamide
 0.32% Methylenebisacrylamide
 0.1% SDS
 0.17% 過硫酸アモニウム
 0.05% TEMED
 325mM Tris-HCl (pH 7.5)

電解液 (1ℓ中に次のものを含む)

3.1 g Tris
 14.4 g Glycin
 1 g SDS

pH 8.3

泳動用サンプルは、泳動前に90℃、2分間加熱したものを用了。泳動は10mAで1時間、25mAで3時間行い、泳動終了後0.4%クマリーブリリアントブルー-R-250、50%メタノール、7.5%酢酸を含む染色液で60℃、30分間加熱し染色した。脱色は10%メタノール、7.5%酢酸を含む液で行った。

フィルオログラフィは、Bonner & Lasky ⁵²⁾⁵³⁾の方法に従って行い、減圧下70℃で乾燥したゲルをFuji XRsフィルムに密着させて-80℃中で感光させた。

II-2-6. S-100蛋白質の調製.

E. coli MA 261 は II-2-2. に示した方法に従って培養し、
 得られた菌体から Nierenberg と Matthaei の方法⁵⁴⁾に従って、
 S-100蛋白質を調製した。E. coli MA 261 を菌体湿重量の15
 倍量の冷アルミナで充分すりつぶしたのち、2倍量の Buffer I に
 懸濁した。懸濁液を $10000 \times g$, 15分間遠心してその上清に3
 mg の DNase I (Worthington) を加え水中で15分間放置し、
 $10000 \times g$, 15分間遠心して沈殿を除いた。上清を30℃, 20
 分間インキュベーションした後 $105,000 \times g$, 2.5時間超遠心し、
 上清の3/4 を S-100, 沈殿をリボソームとした。

II-2-7. 粗開始因子の調製。²¹⁾⁴⁴⁾

II-2-6. で調製したリボソームを Buffer II [100 mM
 Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Mg(OAc)₂, 6 mM β -Xil
 カリトエタノール, 1 M NH₄Cl] に懸濁し、水中1時間攪拌した
 後 $100,000 \times g$, 4時間、超遠心した。上清を0-75%蔗糖分画
 して沈殿を Buffer III [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM
 NH₄Cl, 2 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM Mg(OAc)₂,
 5%グリセリン] に溶解した。これを粗開始因子とした。

II-2-8. 二次元電気泳動⁵⁵⁾

大腸菌ポリアミン要求株 (MA261) を II-2-4. に示した方法で 10 ml 培養した。ただし, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の \times チオニンを含む培地にかえて 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の \times チオニンを含む培地を用いた。培養液の $A_{540\text{nm}}$ が 0.1 に達したとき 5 ml づつ 27 に分けてプロテイン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えるものと加えないものに分けた。さらに 37 $^{\circ}\text{C}$ で振盪培養して $A_{540\text{nm}}$ が 0.2 に達したとき 20 μCi の [³⁵S] \times チオニン (1013 Ci/mole) を加えて 5 分間ラベルを行なった。ラベル終了後の菌液に 1/10 容量の Buffer IV [100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 50 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 100 mM アジ化ナトリウム, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコール] を加えて水中 15 分間放置し, 10000 $\times g$, 15 分間遠心して菌を集めた。菌体は 0.2 ml の Sonication Buffer [5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A) に懸濁し, Blanson Sonifier Model 185 を用いて Sonication した。Sonication した液に DNase I (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて 0 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間氷冷したのち 10000 $\times g$, 15 分間遠心して氷殿を除き, 上清を凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を Lysis Buffer⁵⁵⁾ (以下に組成を記載) に溶かして O'Farrell による二次元電気泳動を行った。以下に使用したゲルの組成と電解液を示した。

Lysis Buffer

9.5 M Urea
 2% NP-40 (Nonidet P-40)
 1.6% Ampholine (LKB, pH 5~7)
 0.4% Ampholine (LKB, pH 3~10)
 5% β -XILカプトイン-ル

1st Dimension gel (10 mL)

5.5 g Urea
 1.33 mL 30% Acrylamide
 2 mL 10% NP-40
 0.4 mL 40% Ampholine (LKB, pH 5~7)
 0.1 mL 40% Ampholine (LKB, pH 3~10)
 1.97 mL H₂O
 10 μ l 過硫酸アモニウム
 7 μ l TEMED

1st Dimension Running Buffer

upper 0.02 N NaOH
 Lower 0.01 N H₃PO₄

2nd Dimension

Laemmli の方法に従った。

II-2-9. アミノ酸分析.

精製した蛋白質 0.2 mg を 10 mM トリエチルアミン-酢酸 (pH 7.5) に透析し、密閉したチューブの中、熱 HCl で 24 時間加水分解し、Speckmann らの方法⁵⁶⁾に従って、アミノ酸分析器 (日本電子, JEOL, GAH) を用いて行った。

II-3. 結果

II-3-1. 細菌の増殖, RNA合成, DNA合成および蛋白質合成に対するポリアミンの影響.

実験に用いた大腸菌ポリアミン要求株(MA261)をII-2-3. に示した方法で培養した増殖曲線をFig. I-1. に示した。E. coli MA261はODC, AUHを欠損しているためにポリアミンを培地に加えなければ増殖が遅いが, 培地中に100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプロレスシンを添加することにより約30分のlag 期間を経て増殖速度が2倍に上昇した。

大腸菌にはポリアミンに対する特異的な膜輸送系が存在するので³⁾ 培地中にポリアミンを添加することにより容易に菌体内ポリアミンレベルを高めることが可能である。そこでE. coli MA261を用いて, 培地中にプロレスシン(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を加えたとき, 細胞中での全体的なDNA, RNA, 蛋白質の合成にどのような変化がみられるかを $[^3\text{H}]$ チミジン, $[^3\text{H}]$ ウリジン, $[^{14}\text{C}]$ リジンの取り込みのTime course で調べた(Fig. II-2)。その結果, $[^3\text{H}]$ チミジン, $[^3\text{H}]$ ウリジンの冷TCA不溶性画分への取り込みは, 培地中に100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプロレスシンを加えることにより約15倍の促進を受けた。また $[^{14}\text{C}]$ リジンの熱TCA不溶性画分への取り込みは約2倍の促進を受けた。

このとき, プロレスシン存在下および非存在下で中期対数増殖期まで培養したE. coli MA261の菌体内ポリアミン含量はTable

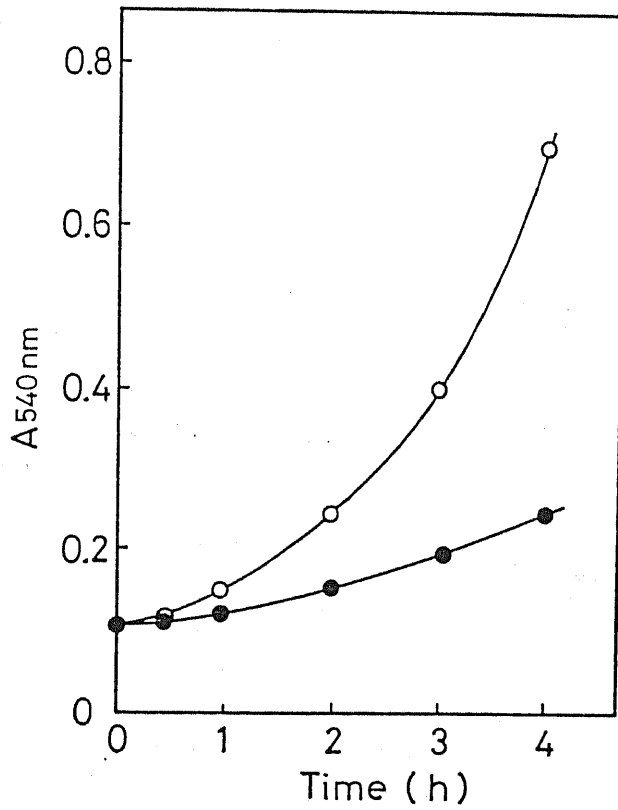


Fig.II-1: Growth of a polyamine-requiring mutant (MA261) in the presence and absence of putrescine. \circ — \circ , 100 $\mu\text{g/ml}$ putrescine; \bullet — \bullet , no putrescine.

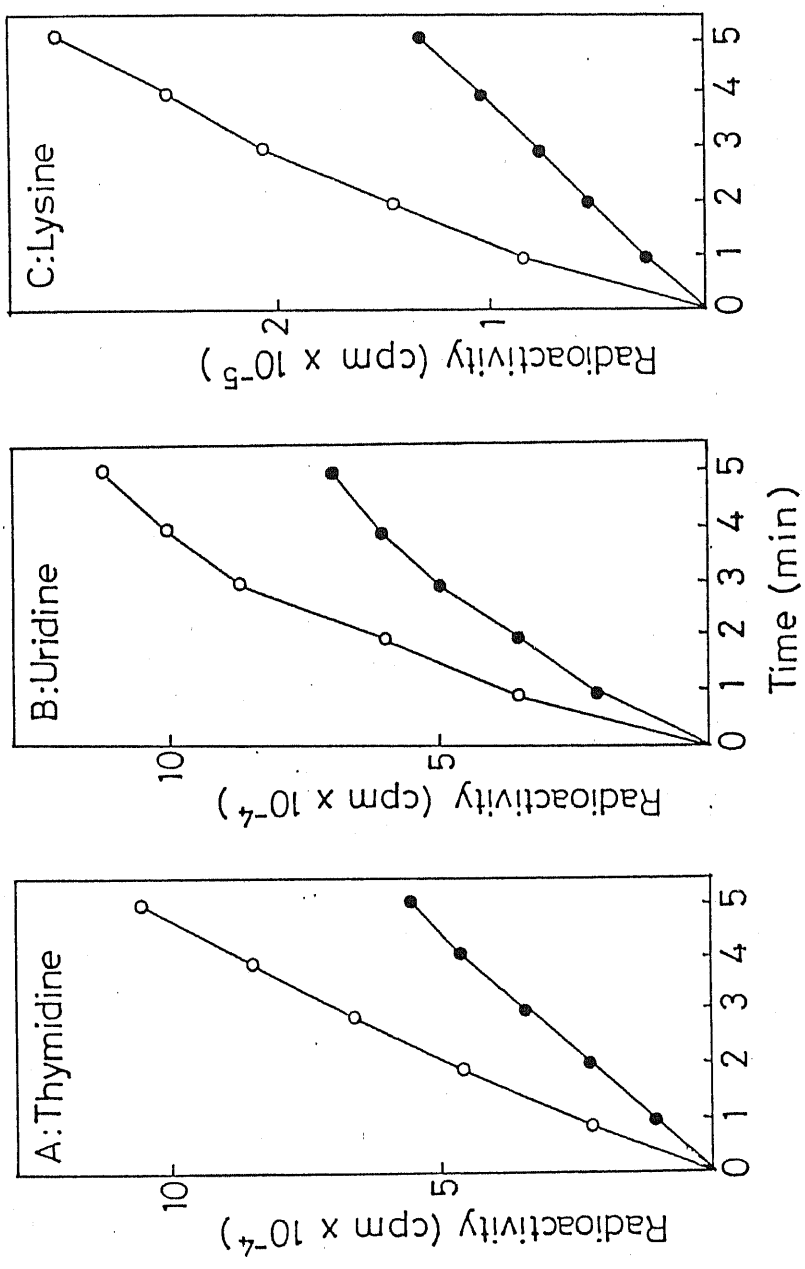


Fig. II-2: Effect of putrescine on the rates of DNA, RNA, protein syntheses.
 putrescine; ○—○, no putrescine; ●—●, 100 µg/ml putrescine.

Table II-2. Polyamine content in polyamine requiring mutant.

Strain	Growth Condition	μmole/wet g cell	
		PUT	SPD
MA261	-polyamine	0.068	0.422
	+100 μg/ml putrescine	7.687	1.025
EWH319	-polyamine	0.378	0.042
	+100 μg/ml putrescine	14.533	0.063

* PUT; Putrescine, SPD; Spermidine, SP; Spermine

II-2. 示したようにアトレッシンを加えて培養した菌で明らかに高くなっていて細菌の増殖 (Fig. II-1) とよく一致していた。以上のことから、菌の増殖と菌体内ポリアミンレベルおよび *in vivo* における DNA, RNA, 蛋白質合成は密接に関連していることが確かめられた。Young らは、他のポリアミン要求株である *E. coli* MA135 (*argE*, *his*, *pro*, *try*, *thi*, F^- , *SpeB*, *CanR*) を用いて培地中にアトレッシンを加えることにより、直ちに蛋白質合成が促進され、つづいて RNA 合成が促進された後 DNA が合成促進されて細胞の増殖がおこると報告している。この事実と今回筆者が得た結果とを考え合わせると、*in vivo* においてポリアミンが最初に効果を示すところは蛋白質合成の促進が mRNA の合成促進あるいは安定化であると考えられる。

II-3-2. 大腸菌ポリアミン要求株におけるポリアミンによる特異的蛋白質の合成促進⁵⁷⁾

大腸菌ポリアミン要求株(MA 261)をポリアミン欠乏下で培養し、初期対数増殖期においてポリアミンを添加することによって特異的蛋白質の合成が促進されるか否かを検討した。

E. coli MA 261をII-2-4. に示した方法で培養し、ラベルした菌から調製した全蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とフルオログラフィーによって解析したパターンをFig. II-3. に示した。その結果、アトレツシン添加と同時にラベルしたものである、starved bacteria (ポリアミン非存在下で培養した菌)とunstarved bacteria (ポリアミン存在下で培養した菌)から調製した全蛋白質のパターンには変化がみられなかった(Fig. II-3, lane 1Sと1U)。しかし、A540nmが0.1でアトレツシンを添加した後A540nmが0.15あるいは0.25まで培養したものである、unstarved bacteriaにおいて数種の蛋白質(72k, 62k, 57k)の合成が促進されていた。その中で特に分子量62000の蛋白質の合成が著しく促進されていた(lane 3Sと3U, 4Sと4U)。この分子量62000の蛋白質の合成促進は、培地中にアトレツシン(100μg/mL)を加えた後10分ですでに認められていた(lane 2Sと2U)。このとき分子量62000の蛋白質以外の蛋白質の合成には変化が認められなかった。また、unstarved bacteriaの全蛋白質への¹⁴Cリジンの取り込みの

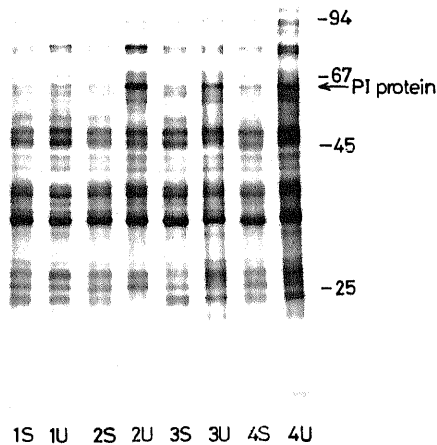


Fig.II-3: Stimulation of the synthesis of PI-protein by putrescine. Bacterial culture, electrophoresis and fluorography were performed as described under Materials and Methods. Equal amounts of radioactivity (50 000 cpm) were applied to all lanes. 1S, [^{14}C]lysine were added at $A_{540} = 0.10$; 1U, putrescine and [^{14}C]lysine were added at $A_{540} = 0.10$; 2S, [^{14}C]lysine was added at 10 min after $A_{540} = 0.10$; 2U, putrescine was added at $A_{540} = 0.10$ and [^{14}C]lysine was added at 10 min after A_{540} reached 0.10; 3S, [^{14}C]lysine was added when A_{540} reached 0.15; 3U, putrescine was added at $A_{540} = 0.10$ and [^{14}C]lysine was added when A_{540} reached 0.15; 4S, [^{14}C]lysine was added when A_{540} reached 0.20; 4U, putrescine was added at $A_{540} = 0.10$ and [^{14}C]lysine was added when A_{540} reached 0.20. Numbers on the right represent $\text{Mr} \times 10^{-3}$. PI-protein, polyamine induced protein.

促進は1.2倍であった。一方 A_{540nm} が0.2まで培養してラベルした unstarved bacteria の全蛋白質への $[^{14}C]$ リジンの取り込みは約2倍であった。このことから分子量62000の蛋白質は、アトレツシン添加後、約10分で現われて他の蛋白質に対して優先的に合成促進されるものと考えられる。そこでポリアミンによって合成促進される分子量62000の蛋白質を Polyamine Induced protein, 略してPI-proteinと呼ぶことにした。

データは示さないが、アトレツシンのかわりにスパールミジン(50 $\mu g / mL$) を加えたものでもPI-proteinの合成促進が確認された。また、他のポリアミン要求株(EWH319)を用いた実験でも、アトレツシンあるいはスパールミジンの添加によりPI-proteinの合成促進がみとめられた。

E. coli MA26 I をII-2-8. に従って $[^{35}S]$ メチオニンでラベルした菌の全蛋白質をO'Farrellの二次元電気泳動にかけたもののフルオログラフィーをFig. II-4に示した。AはStarved bacteria, BはUnstarved bacteriaからのものである。その結果Fig. II-4の矢印で示した蛋白質の合成がUnstarved bacteriaで著しく高かった。この蛋白質の分子量は62000で、Fig. II-3で見られたPI-proteinのものに一致した。さらにPI-proteinは塩基性蛋白質であり、 $[^{14}C]$ リジンに代り $[^{35}S]$ メチオニンでラベルされにくいことが明らかとなった。その他PI-proteinのすぐ下にみられる分子量57000の蛋白質もわずかに促

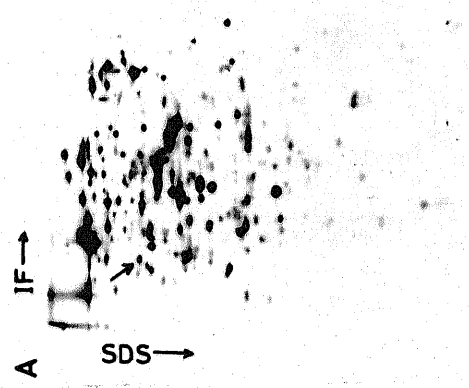
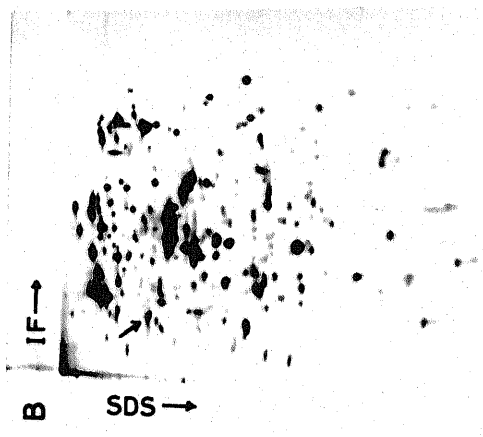


Fig.II-4: Identification of polyamine stimulation of the synthesis of PI-protein by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis and fluorography were performed as described under

Materials and Methods. A, protein from starved bacteria; B, protein from unstarved bacteria.

The same amounts of radioactivity (300 000 cpm) were used in A and B. Arrows indicate PI-protein.

進されていた。またホリアミン添加によって合成が減少する蛋白質もみとめられた。

II-3-3. P I - protein の細胞内分布

II-3-2. で述べたように P I - protein がポリアミンの添加によって他の蛋白質に優先して合成促進されることが明らかとなった。そこで P I - protein がポリアミンによる細胞の増殖に関与している蛋白質ではないかと考え、この蛋白質の精製を計画した。精製に先立って、まず P I - protein の細胞内分布を調べるために S-100 分画と粗開始因子分画中の P I - protein の存在量を比較した。E. coli MA261 を II-2-2. に従って培養して、得られた菌体から S-100 分画と粗開始因子分画を調製し、それぞれ DEAE-Sephadex A-50 カラムにかけて得られた 50 mM KCl フラクションと 300 mM KCl フラクションを SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動によって蛋白質を分離して、P I - protein の挙動を検討した (Fig. II-5 A と B)。その結果、P I - protein はフルオログラフィーだけでなくクマシーブルー染色によっても確認することができ、ポリアミン存在下で細胞内含量が多いことが示された (Fig. II-5 A, lane 1 と 2)。また、P I - protein は S-100, 粗開始因子の両分画に存在して 50 mM KCl を含む Buffer で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 には吸着せず、素通りするフラクションの主蛋白質として存在することが明らかとなった (Fig. II-5 A, lane 5 と 6, B, lane 3 と 4)。

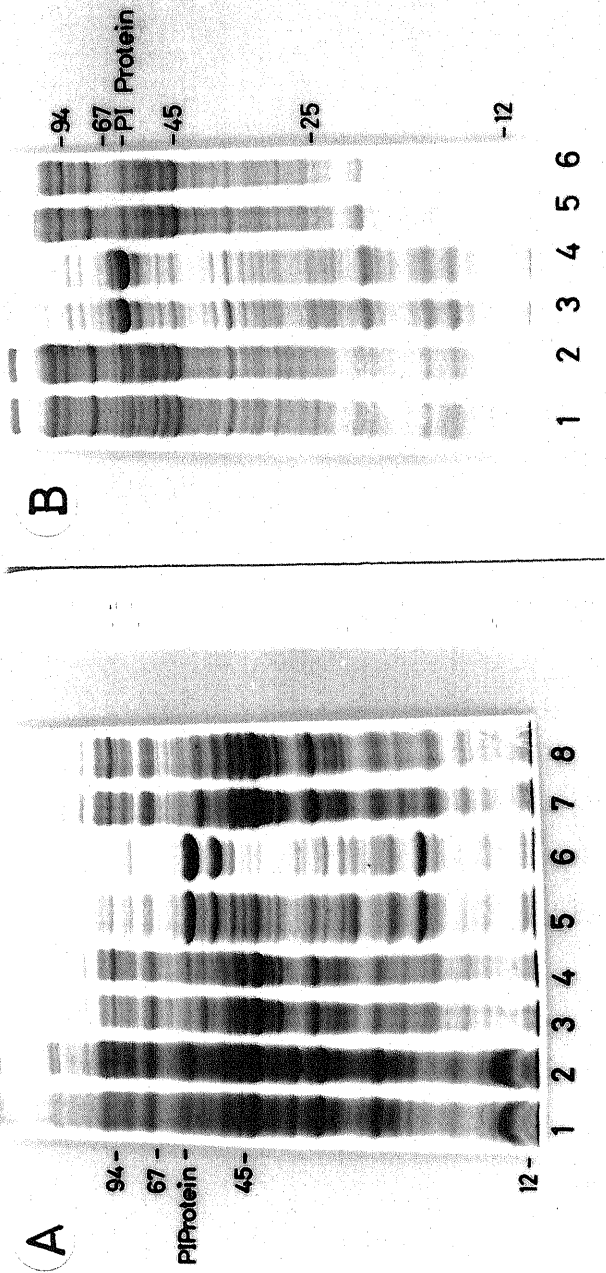


Fig.II-5: Intra-cellular localization and chromatographic behavior of PI-protein. Electrophoresis was carried out as described under Materials and Methods. Crude initiation factors were prepared as described previously (29).

A: 1, total protein from starved bacteria (S); 2, total protein from unstarved bacteria (U); 3, 100 000 g supernatant (S-100) from S; 4, S-100 from U; 5, 50 mM KCl eluate of DEAE Sephadex A-50 column chromatography (DEAE-chromato.) of S-100 from S; 6, 50 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of S-100 from U; 7, 300 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of S-100 from S; 8, 300 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of S-100 from U. B: 1, crude initiation factors (IF) from S; 2, IF from U; 3, 50 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of IF from S; 4, 50 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of IF from U; 5, 300 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of IF from S; 6, 300 mM KCl eluate of DEAE-chromato. of IF from U.

II-3-4. PI-proteinの精製.

精製の出発材料としてポリアミン存在下で培養したE. coli MA 261のS-100分画を用いた。操作はすべて4℃で行なった。

1) DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー.

2340 mgのS-100蛋白質をBuffer A [20 mM Tris HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 6 mM β -Xilカプトエタール, 50 mM KCl, 10%グリセリン]で透析し, $\frac{1}{3}$ (780 mg蛋白質)に分けてあらかじめBuffer Aで平衡化しておいたDEAE-Sephadex A-50 カラム (4 x 20 cm) にのせて, Buffer A および300 mM, 1 M KClを含むBuffer Aで順次溶出した。各ピークフラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析してPI-proteinを含むフラクションを決定した。PI-proteinは素通りしたフラクションに存在していたので, このフラクションを集め限外浮過によって濃縮し, Buffer Aで透析した。残り $\frac{2}{3}$ についても780 mgづつ2回この操作を行ない, 合計160 mgの蛋白質を得た。

2) Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー

得られたPI-proteinを含むフラクション (160 mg蛋白質) を32 mgづつ5回に分けて, あらかじめBuffer Aで平衡化したSephadex G-100 カラム (2 x 100 cm) にのせて同じBufferで溶出した。溶出は3 mL/tube, 0.3 mL/min.で行なった。PI-proteinを含むフラクションをSDS-ポリ

アクリルアミドゲル電気泳動によって同定し、限外浮遊によって濃縮した後、Buffer B [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 6 mM β -メルカプトエタノール, 20 mM KCl, 10% グリセリン] で透析した。5回の操作を繰返し、合計72 mgの蛋白質を得た。

3) DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー。

Sephadex G-100 フラクション (72 mg 蛋白質) を、あらかじめ Buffer B で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (2.5 x 12 cm) にのせた。溶出は 20 mM KCl と 150 mM KCl を含む Buffer B (おのおの 200 mL) の linear gradient で行なった。PI-protein を含むフラクションを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で同定した後、限外浮遊で濃縮し Buffer A で透析して、合計 12 mg の蛋白質を得た。

4) Affi-gel Blue カラムクロマトグラフィー

上記操作で得られた蛋白質 (12 mg) を、あらかじめ Buffer A で平衡化した Affi-gel Blue カラム (2 x 15 cm, Bio-Rad) にかけた。溶出は 50 mM と 200 mM KCl を含む Buffer A (おのおの 100 mL) の linear gradient で行なった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、PI-protein は 80 mM KCl を含むフラクションに溶出された。このフラクションを集め限外浮遊によって濃縮し最終的に 4 mg の蛋白質を得た。Table II-3. に精製表を示し、Fig. II-6 に各精製段階にお

Table II-3. Purification of PI-protein^a

Steps	Total protein (mg)
1. <u>E. coli</u> S-100	2330
2. DEAE Sephadex A-50 (I)	160
3. Sephadex G-100	72
4. DEAE Sephadex A-50 (II)	12
5. Affi-Gel Blue	4

^a For details, see text.

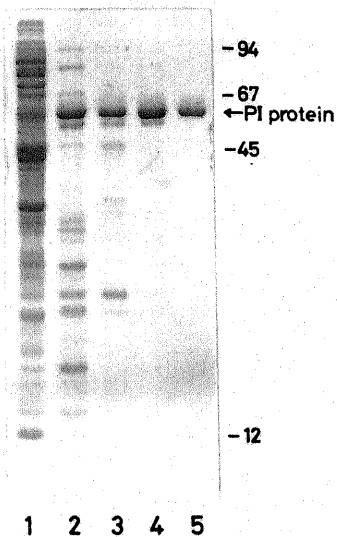


Fig.II-6: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide slab gel electrophoresis of proteins in each purification step. Electrophoresis was carried out as described in Materials and Methods. 1, 100 000 g supernatant; 2, DEAE-Sephadex A-50 (I) fraction; 3, Sephadex G-100 fraction; 4, DEAE-Sephadex A-50 (II) fraction; 5, Affi-gel Blue fraction.

ける SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンを示した。この結果、Affi-gel Blueカラムクロマトグラフィーによって均一な蛋白質を得た。

精製した蛋白質を O'Farrell の二次元電気泳動⁵⁵⁾ につけ、その均一性と等電点について検討を加えた (Fig. II-7)。分子量、等電点の対照としてリボソーム蛋白質 S1 (分子量 68000, 等電点 4.6) を用いた。この結果、精製した蛋白質は二次電気泳動によっても均一であることが確かめられ、分子量 62000 の塩基性蛋白質であることが明らかとなった。データは示さなかったが、この精製した蛋白質を [³⁵S]メチオニンでパルスラベルした E. coli MAZ61 の全蛋白質とともに O'Farrell の二次元電気泳動にかけたところ、Fig. II-4. で見られた PI-protein と同じ位置にスポットを形成した。このことから、精製した蛋白質は PI-protein と同一のものであることが確かめられた。

II-3-5. PI-protein のアミノ酸組成。

精製した PI-protein を II-2-9 に示した方法で加水分解してアミノ酸組成を調べた。Table II-4. に示したように、PI-protein はシステインをまったく含まない蛋白質であることが明らかとなった。



Fig.II-7: Two-dimensional gel electrophoresis of PI-protein. Two-dimensional gel electrophoresis of purified PI-protein and ribosomal S1 protein was performed as described under Materials and Methods.

Table II-4. Amino acid composition of 62000-Mr protein
(polyamine induced protein).

Amino acid analysis was carried out as described in
Materials and Methods.

Amino acid	Mole	Residues per molecule	Nearest integer
	%		
Lysine	7.37	41.40	41
Histidine	2.73	15.30	15
Arginine	2.97	16.65	17
Aspartic acid	14.43	81.00	81
Threonine	7.01	39.45	39
Serine	8.02	45.00	45
Glutamic acid	10.69	60.00	60
Proline	6.84	36.45	36
Glycine	8.67	48.75	49
Alanine	9.09	51.00	51
Cysteine	0	0	0
Valine	5.47	30.75	31
Methionine	1.07	6.00	6
Isoleucine	2.26	12.75	13
Leucine	6.65	37.35	37
Tyrosine	4.40	24.75	25
Phenylalanine	2.67	15.00	15
Total residues			561

II-4. 考察.

本章において、筆者は大腸菌ポリアミン要求株(MA261)を用いた *in vivo* の実験で、培地中にポリアミンを添加することによって分子量62,000の蛋白質(PI-protein)の合成が他の蛋白質に先立って著しく促進されることを明らかとした。また、PI-proteinは培地中にポリアミンを添加したのち約10分と非常に早い時期に発現し、引きつづいて全体の蛋白質の合成が促進されることも明らかとした。このことから、PI-proteinはポリアミンによる細胞の増殖に密接に関与している蛋白質であると考えられる。またPI-proteinのポリアミンによる合成促進は、他の大腸菌ポリアミン要求株EWH319を用いた場合でもポリアミンの添加によって著しく合成促進され、アトレツシンのかわりにスパールミジンを用いた場合でも同じ結果と示すことを示した。さらにPI-proteinは大腸菌ポリアミン要求株だけでなく、野生株のS-100おまびりボソームフラクションに存在するので、PI-proteinはある種のポリアミン要求株にのみ存在するのではなく、広く一般の大腸菌に存在し、菌体内のMacromoleculeの合成に関与し、細胞の増殖を調節していると考えられる。

Youngら⁽¹²⁾⁽¹³⁾は、他の大腸菌ポリアミン要求株を用いた実験から、ポリアミンが最初に蛋白質合成を促進すると報告しているが、この結果は筆者の結果、つまりポリアミン添加したのち約10分ですでに全体の蛋白質の合成が約1.2倍に促進されていることとよく一致

していた。

PI-proteinの合成促進メカニズムについては不明であるが、PI-proteinがポリアミン添加後、約10分と非常に早い時期に発現すること、おまび菌の増殖(A 540nmでの測定値)に差があらわれていないことから、蛋白合成の段階かあるいはmRNAの合成段階で促進がかかっているのではまいかと考えられる。

Goldemberg³⁴⁾らは、他のポリアミン要求株を用いた*in vivo*の実験で、ポリアミン欠乏下では premature な termination があこり、高分子の蛋白質が減少することを報告している。PI-proteinがポリアミンによる pre-terminationの抑制の結果、増加したという可能性も考えられるが、ポリアミンの有無によって、より高分子の蛋白質のパターンに変化がみられないことから (Fig. II-3, II-4), PI-proteinは pre-terminationの抑制の結果生じたものではまいと思われ。しかし、PI-proteinよりも低分子の蛋白質の中にポリアミンによって減少しているものも認められることから、このことに関してはさらに詳細な研究が必要と思われる。

II-5. 要約

ポリアミンが *in vivo* において特異的な蛋白質の合成を促進するかどうかを大腸菌ポリアミン要求株を用いて検討した。

1) アトレツシン存在下, 非存在下で培養した大腸菌ポリアミン要求株を [^{14}C] リジンで5分間ラベルし, 生成した蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とフルオログラフィによって解析した結果, アトレツシン存在下で培養した菌で数種類の蛋白質(57K, 62K, 72K)の合成が促進されていた。特に分子量62,000の蛋白質(PI-protein)の合成が著しく促進を受けていた。この効果は培地中にポリアミンを添加したのち約10分で現れ, 他の蛋白質に優先して合成促進を受けることから, PI-proteinが細胞増殖に対するポリアミンの効果に関与している可能性が示唆された。

2) PI-proteinは, S-100 および粗開始因子分画中に分かれる塩基性蛋白質で, DEAE-Sephadex A-50(I), Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50(II), Affi-gel Blue カラムクロマトグラフィによって均一に精製された。

第IV章 ポリアミンによって特異的に合成促進を受ける蛋白質の性質と機能。

IV-1. 緒言

第II章において、*in vivo*でポリアミンによって分子量62000の蛋白質 (PI-protein) が他の蛋白質に先立って優先的に合成促進されること、またこの蛋白質は、培地中にポリアミンを添加したのち約10分後ですでに発現していることを示した。PI-protein はS-100おまびりゴソーム分画に存在していることも明らかとし、S-100分画から均一に精製した。

そこで本章においては、PI-protein の生理的役割を明らかとする目的で、PI-protein の性質と機能を調べた。

Ⅲ-2. 実験材料と方法.

Ⅲ-2-1. 使用菌株

大腸菌無細胞系の調製のために *E. coli* Q13 を用いた。 *E. coli* Q13 は千葉大学薬学部微生物薬品化学教室澤井哲夫教授より供与された。

Ⅲ-2-2. 培養条件.

大腸菌無細胞蛋白質合成系に使用する菌 (*E. coli* Q13) は、ペプトン培地 (以下に記載) で培養し、Middle logarithmic phase まで通気培養後、連続遠心して集菌した。菌体は Buffer I で洗浄後、使用するまで -80°C に保存した。

ペプトン培地 (1ℓ中に次のものを含む)

ポリペプトン	8g
Yeast Extract	2g
KH_2PO_4	3g
K_2HPO_4	17g
グルコース	1g

Ⅲ-2-3. MS2ファージ粒子の調製.

MS2ファージ粒子の調製は Loeb と Zinder の方法⁵⁸⁾ に従って行った。MS2ファージは大阪大学微生物病研究所の竹田義文博士により供与された。また宿主菌 *E. coli* S26 は微生物化学研究所上原至雅博士より供与された。

宿主菌である *E. coli* S26 を L-Broth (2ℓ) で振盪培養し、

$A_{600\text{nm}}$ が $0.1 \sim 0.15$ の時 (2×10^8 cells/ml) ファージを
 m.o.i. (multiplicity of infection), 0.1 で感染させ培養
 するまで振盪培養を続けた。宿主菌が完全に培養したら $2\text{ mL} / \text{L}$
 とするようによくホルムを加え、 37°C , 10 分間放置し EDTA
 とリゾチム (Sigma, Egg White Type V) をそれぞれ最終
 濃度 10 mM , $100\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$ とするように加え、室温で 1 時間
 放置した。これに $320\text{ g} / \text{L}$ とするようによく硫酸を加えて 0°C , 30
 分間攪拌後、遠心して沈殿を集めた。沈殿を 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$),
 10 mM 酢酸マグネシウムで洗浄してファージの抽出を
 繰返し、 $105,000 \times \text{g}$, 90 分間超遠心してファージ粒子を沈殿さ
 せた。ファージ粒子を 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$), 10 mM
 酢酸マグネシウムで懸濁後、懸濁液 10 mL に対し 6.2 g の塩化セ
 シウムを加えて $38,000\text{ rpm}$, 18 時間 (日立 RP65T ロータ
 ー) 平衡密度遠心してファージ粒子を精製した。

III-2-4. MS2 ファージ RNA の抽出。

塩化セシウム平衡密度遠心によって精製した MS2 ファージを、
 10 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$), 10 mM 酢酸マグネシウムで透
 析した後 Gierer と Schramm の方法に従ってフェノール抽出⁵⁹⁾
 アルコール沈殿を行って MS2 ファージ RNA を調製した。

Ⅲ-2-5. リボソームと S-100 蛋白質分画の調製.

MS2 RNA を鋳型とする大腸菌無細胞蛋白質合成系に用いる、
0.3 M NH₄Cl で洗浄したリボソームと S-100 の DEAE-cellulose
0.25 M NH₄Cl フラクシオン 調製は Watanabe らの方法⁴⁶⁾に従っ
た。

Ⅲ-2-2. に示した方法で培養した E. coli Q13 を菌湿重量の
1.5 倍量のアルミナですりつぶした後、菌湿重量の 2 倍量の Buffer
I に懸濁した。これを 10,000 × g, 15 分間遠心した上清を 30
℃, 15 分間インキュベートし, 30,000 × g, 20 分間遠心して
IS-30 (Incubated S-30) を得た。IS-30 を 100,000 × g,
4 時間超遠心してリボソームと S-100 に分離した。リボソームは
さらに Bryan らの方法⁶⁰⁾に従って 0.3 M NH₄Cl で洗浄して 50%
グリセリンを含む Buffer I に懸濁した (0.3 M NH₄Cl で洗浄し
たリボソーム)。S-100 は Fuchs⁶¹⁾らの方法に従って, DEAE-
cellulose (Whatman DE 52) カラムにかけて必要は酵素群を
含むフラクシオンを 0.25 M NH₄Cl で溶出したものを用いた。

Ⅲ-2-6. PI-protein の合成ホモポリマーに対する結合性の 測定.

1) [³H]poly A に対する結合性.

PI-protein の poly A に対する結合性は、Leffler と Szer
の方法⁶²⁾に従って IF-3 (Initiation Factor 3) を対照に用い
て行った。50 μl 中に 20 mM Na-Phosphate (pH 7.2),

15 mM KCl, 1.5 μ g [3 H] poly A (10,000 cpm), 種々の濃度の IF-3, PI-protein を含む反応液を 0 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベーションし, 反応終了後 2 mL の 20 mM Na-Phosphate (pH 7.2) を加え, アルカリ処理 (0.5 N KOH 中に室温で 45 分間ひたし, 蒸留水で洗浄後の 1 M Tris-HCl (pH 7.5) に 30 分間ひたしたものを) した Millipore filter に吸着するものを集め, 乾燥後液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

2). [3 H] poly U に対する結合性.

PI-protein の poly U に対する結合性は, Smolarsky と Tal の方法⁶³⁾で行った。対照としてはリボソーム蛋白質 S1 を用いた。50 μ l 中に 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 20 mM 酢酸マグネシウム, [3 H] poly U (15,000 cpm), 種々の濃度の PI-protein, リボソームタンパク質 S1 を含む反応液を 0 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベーションし, 反応終了後に 1 mL の Buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NH₄Cl, 10 mM 酢酸マグネシウム] を加えてアルカリ処理した Millipore filter (前項参照) に吸着するものを集め乾燥後、液体シンチレーションカウンターによって放射能を測定した。

Ⅲ-2-7. 活性化仔牛胸腺DNAを鋳型とするDNA合成.

活性化仔牛胸腺DNAを鋳型とするDNA合成はRichardsonら⁶⁴⁾の方法に従って行った。0.1 mL中に67 mM Tris-AcOH (pH 8.2), 6.7 mM 塩化マグネシウム, 1 mM β -Xilカプトエタノール, 各33 μ MのdTTP, dCTP, dGTP, dATP, μ M [³H]dTTP (6.7 Ci/mole), 0.2 Az60 unit 活性化仔牛胸腺DNA, 0.5 Unit DNA polymerase, 1 mM スパルミジン, 種々の濃度のPI-protein を含む反応液を37°C, 20分間インキュベーションし, 0.2 mLのINPCA(過塩素酸)を加えて反応を停止し, 酸不溶性の沈殿をGF/C filter (Whatman) 上に集めて乾燥後, 液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

仔牛胸腺DNAの活性化は, Aposhian & Kornberg⁶⁵⁾の方法に従い, 大腸菌のDNase I (Worthington) を用いて行った。1 mL中に50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM 塩化マグネシウム; 0.5 mg BSA, 0.5 ng DNase I, 0.25 mg 仔牛胸腺DNA (Sigma, Type V) を含む反応液を37°C, 15分間インキュベーションした後77°C, 15分間加熱してDNase Iを不活化した。

Ⅲ-2-8. T7 DNA を鋳型とする RNA 合成⁴⁷⁾

反応液 50 μ l 中に 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 6 mM β -Xilカプトエタノール, 100 μ g BSA, 1 μ g T7 DNA, 各 137.5 μ M の ATP, UTP, CTP, 37.5 μ M GTP, 10 μ Ci [³H]GTP (12.5 μ Ci/mole), 60 μ g E. coli RNA polymerase (Burgess らの方法により部分精製したもの), 2 mM スパルミジン, 種々の濃度の酢酸マグネシウム, PI-protein を含むものを 37 °C, 10 分間 インキュベーションし, 5% TCA - 0.01 M ペロリン酸ナトリウムを 3 ml 加えて反応を停止して酸不溶性のものを GF/C filter 上にあつめ, 乾燥したのち液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

Ⅲ-2-9. 蛋白質合成途中のリボソームの調製。

蛋白質合成途中のリボソームの調製は, Watanabe らの方法⁴⁶⁾による MS2 RNA を鋳型とする蛋白質合成系を用いて行った。

2 ml 中に 40 mM Tris-AcOH (pH 8.2), 60 mM 酢酸カリウム, 30 mM 塩化アモニウム, 3% ポリエチレングリコール 6000, 1.5 mM DTT (ジチオスレイトール), 2 mM ATP, 0.5 mM GTP, 20 mM Phosphoenolpyruvate, 0.8 μ g Pyruvate Kinase, 12 μ g ホリ=>酸, 40 μ g 大腸菌 tRNA, 40 μ g MS2 RNA, 6 A260 units の 0.3 M NH₄Cl で洗浄したリボソーム, 200 μ g 蛋白質を含む S-100-DEAE Cellulose

0.25 M NH₄Cl フラクシオン, 20 μ Ci [³H] ロイシン (132 Ci/mmole), 各 200 μ M 19 種類のアミノ酸 (ロイシンは含まない), 6 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM スパルミジンを含む反応液を 37°C, 7 分間 インキュベーションして Sparsomycin を最終濃度 25 μ M とするように加え反応を停止した。反応終了後の液を 10 - 30% の蔗糖密度勾配 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM 酢酸マグネシウム, 100 mM NH₄Cl, 6 mM β -メルカプトエタノールを含む] 32 mL に積層し 7,000 rpm, 6 時間 (日立 SRP28SA ローター) 超遠心し、チューブの底部から 30 滴ずつ集めて分画した。各フラクシオンから 80 μ L ずつとり、Whatman paper disk (直径 25 mm) に吹き付けて、Hot-TCA 不溶性の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。また各フラクシオンの A_{260nm} は、水で 80 倍に希釈して測定した。この条件下で nascent な β チヂルト RNA と結合していないリボソームは 30 S 亜粒子と 50 S 亜粒子に分離している。

Ⅲ-ス-10. 30Sリボソーム粒子の調製と活性化.

30Sリボソーム粒子は Igarashi と Kaji ⁶⁶⁾ の方法に従って調製した。Ⅲ-ス-5. に従って調製した E. coli Q13 リボソーム (100000×g, 4時間超遠心した沈殿) 100 mg を 5-20% の蔗糖密度勾配 [10 mM Tris-HCl (PH 7.5), 0.5 mM 酢酸マグネシウム, 60 mM KCl, 6 mM β-ヒルカプトエタノールを含む) に積層し, 日立 RP28 48 トローターで 40,000 rpm, 5時間超遠心して 30S 粒子と 50S 粒子に分離した。30S 粒子フラクションは最終濃度 20 mM 酢酸マグネシウム存在下で, 0.6 容量の Cold エタノールを加えてアルコール沈殿して集めて, Buffer I に溶かした。調製した 30S 粒子からできるだけ PI-protein を除くために, 30S 粒子を再度 10-30% の蔗糖密度勾配 (上記と同じものを含む) 3 ml にのせ, 日立 SRP28 SA ローターで 27,000 rpm, 6時間超遠心してアルコール沈殿を行った。

30S 粒子の活性化は Samir ⁶⁷⁾ らの方法に従って 20 mM Tris-HCl (PH 7.5), 20 mM 酢酸マグネシウム, 200 mM 塩化アンモニウム存在下で 40℃, 20 分間インキュベーションして行った。

Ⅲ-ス-11. 30Sリボソーム亜粒子の再構成

16SリボソームRNAの調製, 30Sリボソーム亜粒子total proteinの調製はNomuraらの方法⁶⁸⁾に従って行った。30S亜粒子の再構成はTraubらの方法⁶⁹⁾を若干変更して行った⁷⁰⁾。

16SリボソームRNA (18 A260 units) を42℃, 7分間アインキュベーションし, 450 μgの30Sリボソーム亜粒子total proteinを加え, 反応液を30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM 酢酸マグネシウム, 330 mM KCl, 6 mM β-キリカプトエタノールとして42℃, 20分間インキュベーションした後, 1時間氷冷した。50000 rpm, 3.5時間超速心(日立RPS50ローター)した沈殿を10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 mM 塩化アンモニウム, 0.3 mM 酢酸マグネシウムに溶かし, 25,000 × g, 10分間遠心後10 mM 酢酸マグネシウムになるように調製し, 再構成30S亜粒子とした。

Ⅲ-ス-12. f [³H] Methionyl-tRNAの調製.

ホルミル- [³H] メチオニル-tRNAはNakamoto と Kolakofskyの方法⁷¹⁾に従って調製した。

全量2 mL中に50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 mM 塩化アンモニウム, 3 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM ATP, 3 mg 粗アミノアシルtRNA合成酵素, 0.15 mM ホリニン酸, [³H]メチオニン (3.3 Ci/mole) を含む反応液を30℃, 20

5分間インキュベーションし、反応終了後0.2mlの5M酢酸-酢酸ナトリウムBuffer (PH 5.0)、反応液と等容量の90%フェノールを加えて抽出を行なった。水層はエーテルによってフェノールを除き、アルコール沈殿を行なり、5mM酢酸-酢酸ナトリウム (PH 5.0)、5mMβ-メルカプトエタノールを含むBufferで透析することにより $f[{}^3\text{H}]$ メチオニル-tRNAを合成した。

Ⅲ-2-13. $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNAの30Sリボソーム粒子への結合

0.1 ml 中に50 mM Tris-HCl (PH 7.5), 120 mM 塩化カリウム, 5 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM スペルミジン, 1 mM GTP, 1 mM DTT, 24,000 cpm $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNA, 0.75 A260 units 活性化30S 粒子(又amirらの方法に従って調製した)⁶⁷⁾, 0.2 A260 units MS-RNA, 各2mgのIF-1, IF-2, IF-3, を含む反応液を30℃, 5分間インキュベーションした後, NierenbergとLederの方法によつて30S 粒子に結合した $f[{}^3\text{H}]$ Met-tRNAをMillipore filter に吸着させ, 乾燥した後, 液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

Ⅲ-2-14. 抗PI-protein抗体調製.

Polyamine Induced protein (PI-protein) は均一に精製したものを使用した(第二章参照)。PI-protein 1.5 mg を 0.1% 瘡液として等容量の Freund's Complete Adjuvant と混合し充分乳化したのち、雄ウサギ(体重2.5 kg)の背部3ヶ所に皮下注射した。1回目の注射後2週間目に2度目の注射を行った。最初の注射から4週間後に耳静脈より採血し、遠心によって血清を得た。得られた血清を 56℃, 30分間インキュベーションして非働化することにより抗血清を得た。抗PI-protein 抗体は、Sober らの方法⁷³⁾に従い、抗血清を硫酸分画したのち DEAE-Cellulose (Serva SH) にかけて部分精製し、さらに Patrik と Virella の方法⁷⁴⁾に従って Protein A-Sepharose 4B カラムクロマトグラフィーを行って精製した。

Ⅲ-2-15. MS2 RNA を鋳型とする蛋白質合成.

MS2 RNA を鋳型とする大腸菌無細胞蛋白質合成は Watanabe らの方法⁴⁶⁾に従って行った。50 μ L 中に 40 mM Tris-AcOH (pH 8.2), 60 mM 酢酸カリウム, 30 mM 塩化アモニウム, 3% (w/v) ポリエチレングリコール 6000, 1.5 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, 0.5 mM GTP, 20 mM Phosphoenolpyruvate, 0.2 μ g Pyruvate kinase, 3 μ g ホリニ>酸, 10 μ g E. coli tRNA, 10 μ g MS2 RNA, 1.5 A260 units Q3M 塩化ア

ンモニウムで洗浄したりボソーム, 50 μ g 蛋白質を含む S-100 の 2.5 M 塩化アンモニウムフラクション, 0.3 μ Ci [³⁵S] X チオニン (1013 Ci/mole), 各 200 μ M の 19 種類のアミノ酸 (X チオニンは含まない), 種々の濃度の酢酸マグネシウム, スアルミンジン, PI-protein を含む反応液を 37 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベーションしたのち, 5 μ l を Whatman 3MM filter disk (直径 25 mm) に吹そつて, 5% Hot-TCA 不溶性のものの放射能を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS 5800) により測定した。反応液の残りに 0.2 N 水酸化ナトリウム 1 ml を加え 37 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベーションした後, 10% TCA を 1 ml 加えて放射性蛋白質を沈殿させた。沈殿はさらに 90% アセトン-0.05 N HCl で洗浄したのち, Gel Sample Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% グリセリン, 5% β -メルカプトエタノール, 0.01% BPB] 40 μ l 加えて完全に溶解した。これを 90 $^{\circ}$ C, 2 分間加熱した後, Laemmli の方法⁵¹⁾による SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動によって放射性蛋白質の分離を行った。

フルオログラフィーは, Laskey らの方法^{52), 53)}に従ってジメチルスルフォキシド-ジフェニルオキサゾール処理した後, -70 $^{\circ}$ C 中で Fuji RXs フィルムに密着させ感光したのちに現象した。

MS2 RNA 由来の蛋白質のバンドにとりこまれた [³⁵S] X チオニンの放射能は, 相当するゲル部分を切りとり 30% 過酸化水素,

0.5 ml を加えて溶解したバイアルゼン中で60℃, 2時間あるいは室温で24時間インキュベーションを行って脱色したのち、5ml の Triton X-100-トルエンシンチレーター [1.5ℓ 中に4g ジフェニルオキサゾール, 0.1g *o*,*o*'-*p*-フェニレンビス(5-フェニルオキサゾール), 500g Triton X-100, 1ℓ トルエンを含む] を加えて液体シンチレーションカウンターで測定した。

III-2-16. PI-protein のポリアミンに対する結合性の測定

PI-protein とポリアミンの結合は, Hummel と Dreyer⁷⁵⁾ および Mizumoto⁷⁶⁾ による Bio-Gel P-10 を用いたゲル透過法を用いて行った。Bio-Gel P-10 カラム (1.1 × 10cm) をあらかじめ 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM 塩化アンモニウム, 20 μM [3H] スパルミンを含む Buffer で平衡化し, PI-protein 100 μg を含む Sample (上記 Buffer に PI-protein を溶解したもの) 0.2 ml を loading した。250 μl ずつフラクションを集めて, 各の中から 200 μl を 5 ml の Triton X-100-toluene シンチレーターに溶かし液体シンチレーションカウンターで測定した。

Ⅲ-2-17. T7ファージ粒子の調製⁷⁷⁾

T7Lファージと宿主菌 E. coli R11 は、新潟大学歯学部高橋徳也博士より供与された。

宿主菌 E. coli R11 を M9-0.02% カガミ) 酸培地中、37°C で通気培養し、A540 nm が 0.2 のときに M.O.I. 0.01 で T7 ファージを感染させた。感染後、宿主菌が完全に培養するまで通気培養を続け、遠心 (10,000 × g, 10 分間) により cell debris を除いた。上清を最終濃度 0.5 M NaCl-5% ポリエチレングリコールとし、一晚 4°C に放置する。10,000 × g, 10 分間遠心して沈殿を集め、Buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.002% ゼラチン] に懸濁後、低速遠心 (10,000 × g, 10 分間) と高速遠心 (100,000 × g, 1 時間) を数回繰返してファージ粒子を精製濃縮した。最終的に塩化セシラムの block gradient にかけることにより (日立 SKP 28 SA, 27,000 rpm, 2 時間) 均一なファージバンドを得た。

Ⅲ-2-18. T7 ファージ DNA の抽出

塩化セシラムの block gradient によって均一に精製されたファージ粒子からの DNA の抽出は、ファージを Buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 2 mM EDTA] で透析後、1% SDS 存在下、90% フェノールで抽出し、同じ Buffer で透析して、4°C に保存した。

Ⅱ-2-19 . その他の実験材料

リボソーム蛋白質 S1 は, Tal⁷⁸⁾らおよび Carmichael⁷⁹⁾の方法に従って, Igarashi⁸⁰⁾らが行った方法で調製した。粗アミノアシル tRNA 合成酵素は, E. coli Q 13 の S-100 分画から Takeda と Igarashi⁷⁰⁾の方法に従って調製した。大腸菌 tRNA は E. coli Q 13 の S-100 分画から Zubay⁸¹⁾の方法に従って行った。部分精製 Initiation factors は Benne⁸²⁾らの方法を若干変更して, Igarashi²⁹⁾らの方法に従って Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーを行って調製した。IF-2 は, Hershey⁸³⁾らの方法によって Phosphocellulose (Whatman P11) にかけて調製したものを用了。部分精製 Elongation factor Tu-Ts は, Arai⁸⁴⁾らの方法に従って E. coli Q 13 の S-100 分画から調製し, Elongation factor G の毒性を除いたものを使用した。

III-3. 結果

III-3-1. 合成ホモポリマーに対するPI-proteinの結合性

精製したPI-proteinがどのような生理的機能を有しているかを研究するにあたり, PI-proteinが塩基性蛋白質であったことから(第II章), リボソーム蛋白質の如く核酸に結合するのではないかと考えた。そこで一本鎖合成ホモポリマーである poly U および poly A に対するPI-proteinの結合性をミリポアフィルターを使用した方法によって測定した。

まず, $[^3\text{H}]$ poly U に対する結合性の測定を行った。 $[^3\text{H}]$ poly U に対する結合性の測定には, リボソーム蛋白質S1を対照に使用した。Table III-1. に示したように, リボソーム蛋白質S1は強く poly U に結合したにもかかわらず, PI-proteinは加える量を増加しても poly U に対する結合がみとめられなかった。一方, $[^3\text{H}]$ poly A に対する結合性の測定は, 大腸菌のInitiation factor 3を対照として用いて行った。この場合もInitiation factor 3が強く poly A と結合したのに対し, PI-proteinは poly A にまったく結合しなかった。なお, リボソーム蛋白質S1の poly U に対する結合性は, Smolarsky と Tal⁽⁶³⁾ によって, またInitiation factor 3の poly A に対する結合性は, Leffler と Szer⁽⁶²⁾ によってすでに報告されている。

データは示さなかったが, PI-protein は Poly C-Cellulose カラムクロマトグラフィーにおいても, リボソーム蛋白質S1が結

Table III-1: Binding Capacity of Polyamine Induced Protein to Poly(U) and Poly(A).

Binding to Poly(U)			Binding to Poly(A)				
PI-protein (μg)	$[^3\text{H}]\text{Poly(U)}$ (cpm)	S1protein (μg)	$[^3\text{H}]\text{Poly(U)}$ (cpm)	PI-protein (μg)	$[^3\text{H}]\text{Poly(A)}$ (cpm)	IF 3 (μg)	$[^3\text{H}]\text{Poly(A)}$ (cpm)
0	71			0	54		
5	72	5	337	5	80	5	5630
10	75	10	448	10	76	10	9604

合する条件で素通りするフラクションに存在していて、poly C に対する結合性もみとめられなかった。

以上のことから、P E - protein は筆者が行った実験条件では一本鎖合成ホモポリマーに対する結合性はやはりと結論づけられた。

III-3-2. 活性化仔牛胸腺DNAを鋳型とするDNA合成に対するPI-proteinの影響.

DNA合成に対するPI-proteinの影響は, Aposhianと Kornbergの方法⁶⁵⁾によってDNase Iで処理した仔牛胸腺DNAを鋳型とする大腸菌DNA polymerase IによるDNA合成系を用いて行った。この系は、仔牛胸腺DNAをDNase Iで処理することによってDNAの二本鎖のうち一方の鎖に切れ目(nick)を入れ、その切断点から大腸菌のDNA polymerase Iによる伸長反応を利用してDNAを合成するものである⁸⁵⁾。従って、この系においては正確なDNAの複製反応をみる事ができる。

Table III-2. に示したように、PI-proteinはDNA合成に対してまったく影響を与えなかった。このことから、今回筆者の行った条件下では、PI-proteinはDNA合成に対してまったく影響を与えないと結論づけられた。しかし、大腸菌クロモソームの複製およびそれに関係する酵素群とPI-proteinとの関係については未検討であり、この点についてはさらに詳細な研究が必要であると考えている。

Table III-2: Effect of Polyamine Induced Protein on DNA and RNA Synthesis.

PI-Protein (μg)	Nicked Calf Thymus DNA Directed DNA Synthesis $[^3\text{H}]\text{dTTP}$ incorporated (cpm)	T7 DNA Directed RNA Synthesis $[^3\text{H}]\text{GTP}$ incorporated (cpm)
0	7305	9072
1	7800	10702
2	7867	10375
3	7682	9702
4	8176	10502

Ⅲ-3-3. T7ファージDNAを鋳型とするRNA合成系に対するPI-proteinの影響.

PI-proteinのRNA合成に対する影響は、バクテリオファージT7のDNAを鋳型とする大腸菌RNA polymeraseによる転写系を用いて行った。T7ファージDNAは分子量 2.5×10^6 ダルトン (39,936 base pairs) の二本鎖直線状DNAで、大きく3つのクラスター (Class I, II, III) に分けることができる。Class Iはearly region (map position 20.2%) で、宿主菌 (E. coli) のRNA polymerase によって転写される。Class II, IIIはT7 RNA polymerase (Class Iのgeneによってコードされる)^{86) 87)} によって転写される。従って筆者が用いた実験系では、T7 DNAのClass I gene のみの転写をみていることによる。

Table III-2. に示したように、この系においてPI-proteinは $[^3H]$ GTPのとりこみに対してほとんど影響を与えなかった。

Ⅲ-3-4. 蛋白質合成途中のリボソームにおけるPI-proteinの挙動.

これまでの結果から, PI-proteinはDNA合成およびRNA合成に対して影響を及ぼさぬものと考えられたので, 次に蛋白質合成に対するPI-proteinの影響について検討した。

まず, PI-proteinが蛋白質合成のどの段階に作用するかを調べた。Ⅲ-2-8. に示した方法で蛋白質合成途中のリボソームを調製し, 蔗糖密度勾配遠心によってオリゴマー, ダイマーおよびトリマー, 70Sモノマー, 30S亜粒子のフラクションに分け(Fig. Ⅲ-1), 各フラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した(Fig. Ⅲ-2)。その結果, Fig. Ⅲ-2に示したように, PI-proteinは蛋白質合成途中のオリゴマー, ダイマー, および70Sモノマーには存在せず⁸⁸⁾に30S亜粒子にのみ認められた(lane 3)。またこのときInitiation factor α , β (分子量 118K, 90K)も30S亜粒子にのみ存在し, オリゴマー, 70Sモノマーには存在していなかった。

PI-proteinが30S亜粒子中⁸⁸⁾にのみ認められ, しかもこの挙動がInitiation factorと同じであることから, PI-proteinが30S開始複合体形成に関与し, 30S亜粒子に結合していることが示唆された。

すべてのInitiation factorは蛋白質合成の開始段階が完成するとリボソームから離れることが知られている。従って、70S

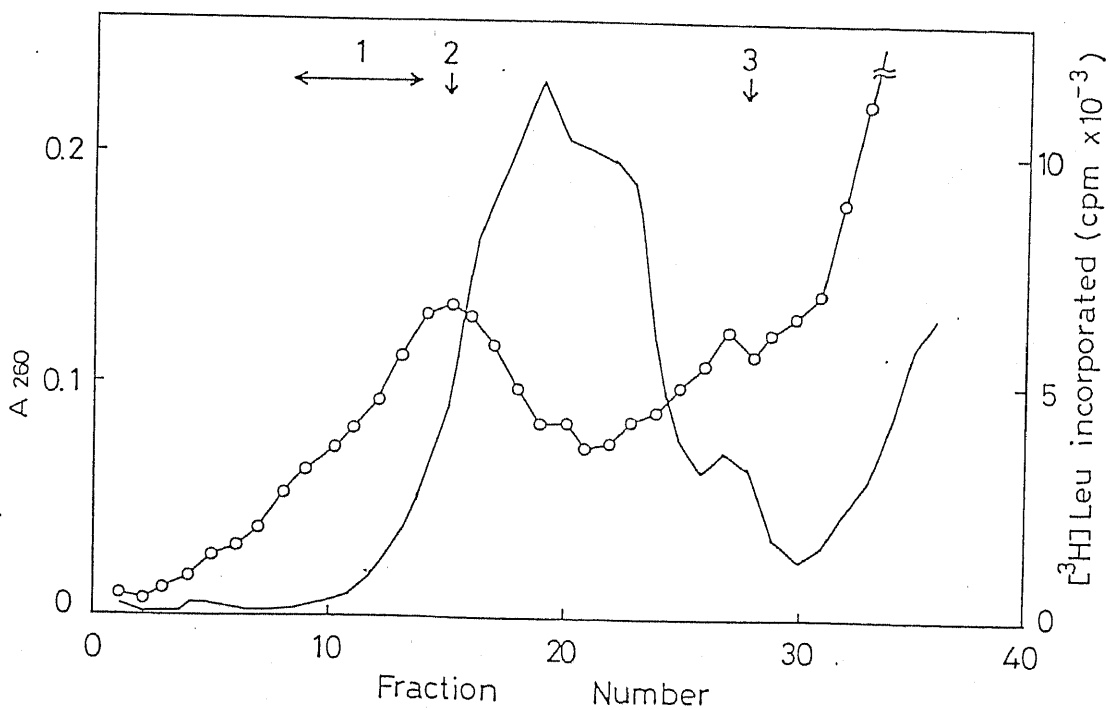


Fig.III-1: Separation of protein synthesizing ribosomes by sucrose density gradient centrifugation. — , A₂₆₀; ○—○ , the amounts of [³H]leucine incorporated into hot trichloroacetic acid insoluble materials.

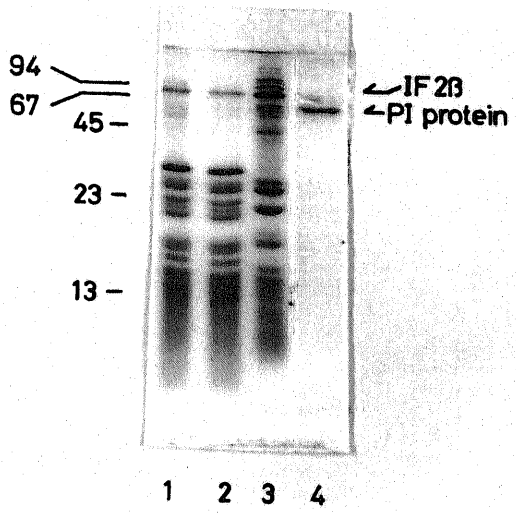


Fig.III-2: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide slab gel electrophoresis of ribosomes.
lane 1. protein synthesizing ribosomes (Fr.8-14 of Fig.III-1); lane 2. protein synthesizing ribosomes (Fr.15 of Fig. III-1); 30S ribosomal subunits (Fr.28 of Fig. III-1).
Number on the right present Mr x 10⁻³.

モノマーに PI-protein が存在していれば、この蛋白質が、蛋白質合成の Initiation factor に似た挙動をすることも強く示唆するものである。

Ⅲ-3-5. 30S 亜粒子再構成におけるPI-proteinの影響と再構成30S 亜粒子の活性

上記の結果よりPI-protein が30S 亜粒子に結合することが示唆されたので、*in vitro* において16S リボソームRNAと30S total 蛋白質からの30S 亜粒子完全再構成系にPI-protein を加えてその挙動と効果を検討した。Fig. Ⅲ-3 に示すように、25 μ g PI-protein を再構成系に加えると、30S 亜粒子にとりこまれれることが示された (lane 2), また加えるPI-protein の量を増加する (50 μ g) と30S 亜粒子に結合したPI-protein の量も増加することが明らかとなった (lane 3)。データは示さなかったが、PI-protein が30S 亜粒子の再構成を促進することはみとめられなかった。

次にPI-protein をとり込んだ再構成30S 亜粒子の活性をMS2 RNA依存の30S 開始複合体形成能とpoly Uを鋳型とするポリフェニルアラニン合成能で調べた。Table Ⅲ-3. に示したように、再構成30S 亜粒子の30S 開始複合体形成能は、再構成の際に加えたPI-protein 量に依存して上昇した。16S リボソームRNAに対するPI-protein の量比を8とした場合の再構成30S 亜粒子の開始複合体形成能は約1.5倍に上昇した。poly U を鋳型としたポリフェニルアラニン合成系においても同様の結果が得られた。

以上のことから、PI-protein が30S 亜粒子に結合するこ

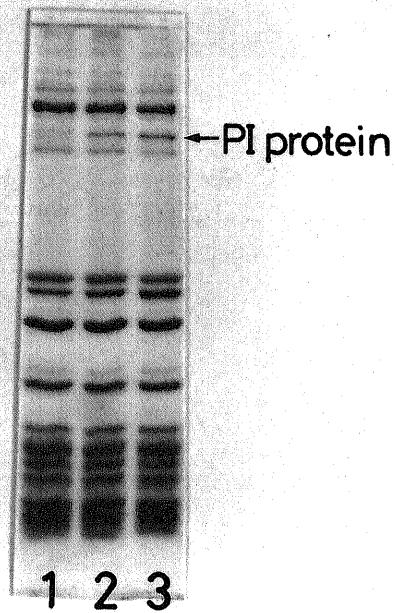


Fig.III-3: Reconstitution of 30S ribosomal subunits with or without PI-protein. 18 A_{260} units 16S RNA and 450 μg total protein of 30S ribosomal subunit was used. lane 1. without PI-protein; lane 2. 25 μg of PI-protein; lane 3, 50 μg PI-protein.

Table III-3: Effect of PI-protein on fMet-tRNA binding and polyphenylalanine synthesis.

Content of PI-protein during the reconstitution of 30S ribosomal particles (μ g PI-protein / A_{260} 16S rRNA)	MS2 RNA dependent f[35 S]Met-tRNA binding (cpm)	Poly-[14 C]- phenylalanine synthesis (cpm)
0	2532	2790
1.4	3630	-
2.8	3916	3947

と、また PI-protein の結合した再構成 30 S 粒子の 30 S 開始複合体形成能および poly U を鋳型とするポリフェニルアラニン合成能は、PI-protein を添加しなかったものに比べ高いことが明らかとなった。

Ⅲ-3-6. native 及び 30S 亜粒子を用いた 30S 開始複合体形成に対する PI-protein の影響.

30S 亜粒子の再構成実験から, PI-protein が再構成 30S 亜粒子に結合し, さらに 30S 開始複合体形成を促進することが明らかとなった。そこで, 大腸菌から Ⅲ-2-10. に従って調製した native 及び 30S 亜粒子を用いた 30S 開始複合体形成に対して PI-protein がどのような影響を与えるかを調べた。

Fig. Ⅲ-4. に示したように, native 及び 30S 亜粒子を用いた実験でも, PI-protein を $1\mu\text{g}$ 加えることにより 30S 開始複合体形成は約 1.2 倍促進した。この促進効果は, 再構成 30S 亜粒子を用いた場合より低いから, これは native 及び 30S 亜粒子にわずかに PI-protein が結合しているためと考えられる。またこの実験系に 0.4 mM カスカマイシンを加えると 30S 亜粒子に結合した ^3H -Met-tRNA の量は約 35% 減少したが, $1\mu\text{g}$ の PI-protein を加えることにより ^3H -Met-tRNA の 30S 亜粒子への結合は約 1.5 倍促進された。カスカマイシンは, ^3H -Met-tRNA が 30S 亜粒子へ結合する段階を阻害する抗生物質である⁸⁹⁾。したがってカスカマイシン存在下で PI-protein の促進効果が大きいことは, PI-protein が ^3H -Met-tRNA の 30S 亜粒子への結合過程に作用していることを示唆するものである。

次に PI-protein に対する抗体を 30S 開始複合体形成反応系に加えた場合, Fig. Ⅲ-5 に示したように, 抗 PI-protein

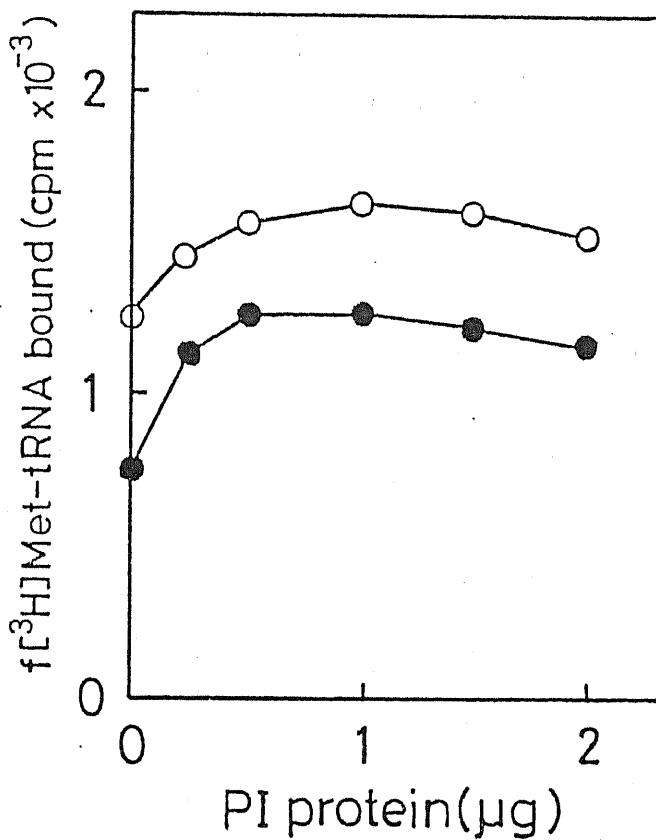


Fig.III-4; Effect of PI-protein on MS2 RNA-directed f[³H]Met-tRNA binding to native 30S ribosomal subunits. PI-protein was added to the reaction mixture as specified in the figure. ○—○, Without kasugamycin; ●—●, With 0.4 mM kasugamycin.

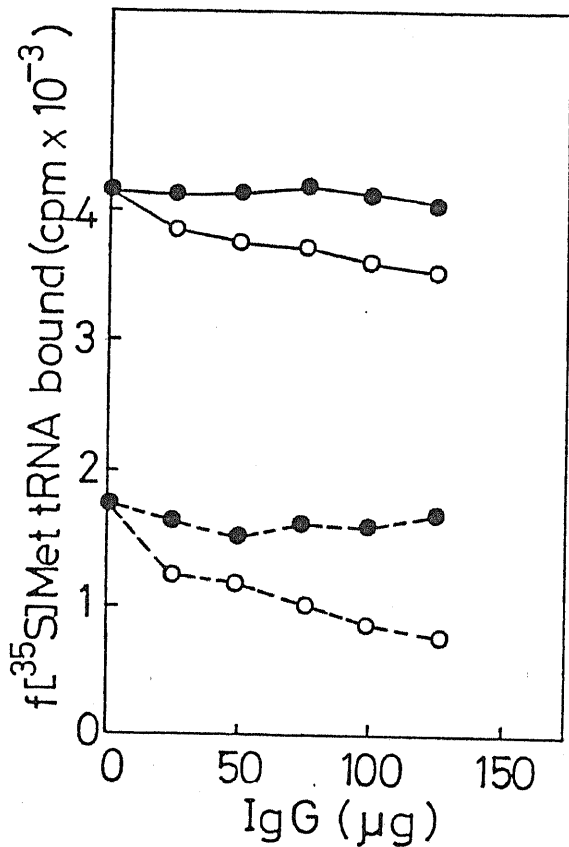


Fig. III-5; Effect of Anti-PI-protein IgG on MS2 RNA-directed $f[^{35}\text{S}]\text{Met-tRNA}$ binding to native 30S ribosomal subunits. The reaction mixture (0.1 ml) without $f\text{Met-tRNA}$ was preincubated with various amounts of IgG at 30°C for 10 min, and the incubation was then carried out at 30°C for 5 min by addition of $5\ \mu\text{l}$ of 50,000 cpm of $f[^{35}\text{S}]\text{Met-tRNA}$ (10 Ci/mole). ●, Normal IgG was added; ○ Anti-PI-protein IgG was added. — Without kasugamycin; ---- With 0.4 mM Kasugamycin.

抗体によって30S開始複合体形成は阻害された。特に0.4 mMカスガマイシン存在下で強い阻害が認められた。この実験系では外からPI-protein を加えていなくてもかかわらず、抗PI-protein 抗体で阻害作用が認められたことから、nativeの30S亜粒子に含まれているPI-protein に抗PI-protein 抗体が結合して阻害がおこったものと考えられる。このことを確かめるために、nativeの30S亜粒子をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析したところ、nativeの30S亜粒子には、多くのPI-protein が存在していた。データは示さなかったが、蔗糖密度勾配遠心によって調製した30S亜粒子を再度蔗糖密度勾配遠心にかけたものでも少量のPI-protein が30S亜粒子に存在していることがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって認められた。しかし、nativeの30S亜粒子に対して加えた抗体量をさらに増加しても30S開始複合体形成能は完全に阻害されなかった(データは示していない)。

Ⅲ-3-7. MSスRNAを鋳型とする蛋白質合成に対するPI-proteinの効果.

MSスRNAは、3659ヌクレオチドからなるRNAでA蛋白質(分子量44000), コート蛋白質(分子量14000), RNAレプリカーゼ(分子量65,000)の3つの蛋白質をpolycistronicにコードしている(90)91) (Fig. Ⅲ-6)。

MSスRNAを鋳型とする蛋白質合成に対するポリアミンの効果に関する研究はWatanabeらによって行なわれており、1mMスパールミジンによって全体のアミノ酸の取り込み, A蛋白質, コート蛋白質の合成量はほとんど変化を受けないが, RNAレプリカーゼの合成のみが約3倍の促進を受けていた。

筆者は, Watanabeらの蛋白質合成系を用いて, PI-proteinとスパールミジンの効果を検討したが, S-100蛋白質はDEAE-CelluloseカラムクロマトグラフィーによりPI-proteinを除いたものを使用した。また, 0.3M塩化アンモニウムで洗浄したりボソームは, 10mM Tri's-HCl (pH 7.5), 60mM塩化アンモニウム, 0.1mM酢酸マグネシウム, 6mMβ-メルカプトエタノールを含むBufferで透析することによりできるだけPI-proteinを除いたものを使用した。Fig. Ⅲ-7. に反応生成物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンを示した。またフアーゼRNA由来のタンパク質のバンド部分を切りとり各蛋白質中にとりこまれた³⁵S-メチオニンの放射能を測定したものを

Fig. III-6 Structure of MS2 RNA Genome

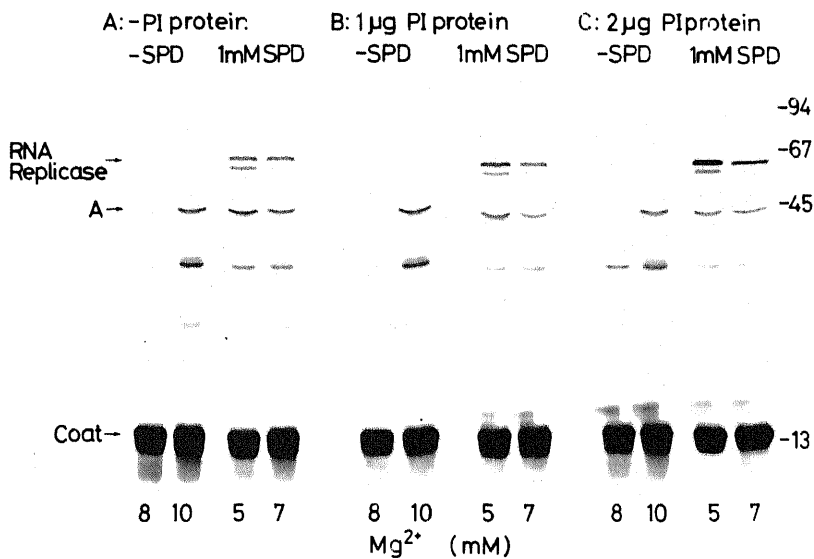
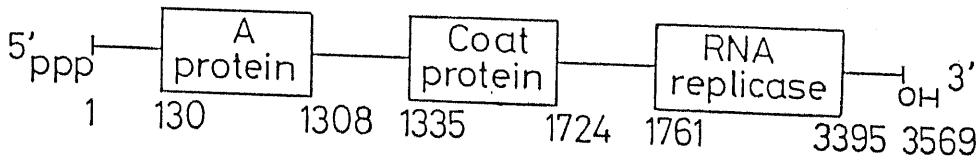


Fig. III-7: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide slab gel electrophoresis of [³⁵S]Methionine labeled product of MS2 RNA-directed protein synthesis A; Without PI-protein. B; With 1 μ g PI-protein. C; With 2 μ g PI-protein; Number on the right present Mr x 10⁻³. Phage specific protein were indicated on the left.

Table III-4. に示した。その結果, 1 mM スパルミジン を系に加えると, 全体のアミノ酸の取り込み, A蛋白質, コート蛋白質の合成量はほとんど影響を受けなかったが, RNAレプリカーゼのみが約5倍の促進を受けていた。PI-protein (1 μ g あるいは2 μ g) のみを系に加えた場合も, 全体のアミノ酸の取り込み, A蛋白質, コート蛋白質の合成促進は全く, RNAレプリカーゼの合成のみが促進されていた。しかし, その促進効果は1 mM スパルミジンのみの場合に比べ弱くて2 μ g のPI-protein を系に加えた場合で約1.5倍の促進にとどまった。ところが, 1 mM スパルミジンと2 μ g のPI-proteinを同時に加えると, RNAレプリカーゼの合成は何も加えていない場合に比べ約8倍の促進を受け, スパルミジンのみを加えたものにも比べて約2.5倍促進されていた。このときも全体のアミノ酸の取り込み, A蛋白質, コート蛋白質の合成量にはほとんど影響を受けなかった。

データは示さなかったが, T7 DNA依存の蛋白質合成系におけるPI-proteinの効果を検討したところ, 1 mM スパルミジンの存在下でT7 RNAポリメラーゼの合成が特に著しく促進されていた。また, λ nif^d18 DNAを鋳型とする蛋白質合成系においてもPI-proteinを加えることにより, E. coli RNAポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニットの合成がスパルミジン存在下で著しく合成促進された。

Table III-4: Effect of Polyamine Induced Protein on MS2
RNA-directed Protein Synthesis with or without Spermidine.

PI- protein (μ g)	SPD (mM)	[35 S]Methionine incorporated (cpm)		
		Coat protein	A protein	RNA replicase
-	0	80374	4496	669
	1	81731	4600	3164
1	0	80203	4269	751
	1	81348	4559	4886
2	0	82745	4185	891
	1	82799	4409	7010

Ⅲ-3-8. PI-proteinのスパルミンに対する結合性

PI-proteinとポリアミンの結合は、Hummel & Dreyer⁷⁵⁾ および Mizumoto⁷⁶⁾らによるBio-Gel P-10カラムを用いたゲル透過法を用いて行った。この方法で、蛋白質とスパルミンが結合すると流出曲線が2相性を示すことが知られているが、今回筆者が行った実験ではbase lineがまったく変化が無く、PI-proteinは10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM 塩化アンモニウム存在下ではスパルミンとまったく結合しなかった。二価のカチオンをまったく含まない条件でPI-proteinとスパルミンの結合がまったく見られなかったことから、生理的条件下(6 mM Mg²⁺, 150~200 mM K⁺)ではPI-proteinとポリアミンの結合はおこりえないと考えられる。

Ⅲ-4. 考察

第Ⅱ章において、大腸菌ポリアミン要求株を用いた実験で、培地中にポリアミンを添加することにより分子量62000の蛋白質(PI-protein)が他の蛋白質に先立って特異的に合成促進されることを示した。このことからPI-proteinがポリアミンによる蛋白質合成の促進において特に重要な存在である可能性が示唆された。

そこで精製したPI-proteinを種々の実験系に加えてその作用を検討した。PI-proteinをMS2 RNAを鋳型とする蛋白質合成系に加えると、RNAレプリカゼの合成のを促進し、全体のアミノ酸の取り込みおよびA蛋白質、コート蛋白質の合成にはほとんど影響しなかった。その促進効果は1 mM スパルミジンの存在下でさらに大きくなった。この結果はPI-proteinがポリアミンと協力してRNAレプリカゼの合成促進を行うことを示している。またT7 DNA, λ rit^d18 DNAを鋳型とした場合でも、PI-proteinによりT7 RNAポリメラーゼ, E. coli RNAポリメラーゼ $\beta\beta'$ サブユニットの合成が強く促進されていた。従ってポリアミンがまずPI-proteinの合成を促進し、生成したPI-proteinがポリアミンと相乗的に作用して他の特定の蛋白質の合成を促進する機構が示唆される。

MS2 RNA依存の蛋白質合成系において、2 μ gのPI-proteinと1 mM スパルミジンの存在下でRNAレプリカゼの合成量は、コート蛋白質の約8.5%であり、PI-proteinとスパルミジンを

加えたりする場合(1%以下)に比べてRNAレプリカーゼの合成比率が増加している。一方MS2ファージ感染後30分間に合成されるRNAレプリカーゼの量はコート蛋白質の合成量の約30%であった。⁹²⁾従って*in vivo*においては、PI-proteinとスパルミジンがRNAレプリカーゼの効率的な合成に関与しているが、最高の合成に対しては、PI-proteinとスパルミジン以外の要因も関係しているであろうと考えられる。また、コート蛋白質がRNAレプリカーゼの合成を*in vivo*よりも*in vitro*で強く阻害しているのかもしれない。

Rosanoらは最近、大腸菌のS-100フラクションに、poly Uを鋳型とするポリフェニルアラニン合成に対するポリアミンの促進効果をもさらに強める蛋白性因子が存在することも報告している。⁹³⁾この蛋白性因子は精製されているので詳しいことは不明であるが、リボソーム蛋白質S1, EF-Tu, アミノアシルtRNA合成酵素ではないことが調べられている。⁹³⁾この蛋白性因子とPI-proteinの異同は大変興味深いところである。

本章において筆者はPI-proteinが30S亜粒子に結合していることを示し(Fig. III-5), また30S亜粒子の再構成の際に30S亜粒子中にとりこまれて(Fig. III-3)その活性を土封させることを示した(Table III-3)。さらに蛋白質合成途中のリボソーム土での挙動を検討した結果(Fig. III-1とIII-2), PI-proteinが30S亜粒子はいし30S開始複合体中にものみ存在し、この点で

IF- α , β の行動を共にすることを示した。また PI-protein が Met-tRNA の 30S 亜粒子への結合を促進し、その効果はカスカマイシン存在下でさらに大きくなること (Fig. III-4) を示した。

カスカマイシンは RNA レプリカゼ合成に対する開始複合体形成よりも A 蛋白質およびコート蛋白質の開始複合体形成をより強く阻害するという選択的な阻害作用をもっている (当研究室未発表データ)。上に述べた結果は、MS2 RNA を鋳型とする蛋白質合成系において PI-protein が 30S 亜粒子と interact することによって RNA レプリカゼの合成を開始段階で促進することを示唆するものである。

Watanabe らは同じく MS2 RNA を鋳型とする蛋白質合成系において、1 mM スペルミジンによって RNA レプリカゼの合成が促進され、その促進機構はポリアミンによって mRNA の立体構造が変化して RNA レプリカゼの開始複合体形成が容易になるためであろうと述べている。⁴⁶⁾ 一方筆者の実験結果から、PI-protein はポリアミンと直接結合しないものと考えられるので、ポリアミンと PI-protein の蛋白質合成における作用部位は異なるものと考えられる。蛋白質合成の開始段階におけるスペルミジンと PI-protein の作用メカニズムとしては、スペルミジンが mRNA と結合してその立体構造を変化させることにより RNA レプリカゼの開始複合体形成を促進し、また PI-protein は 30S 亜粒子に結合するこ

とによって30S亜粒子とmRNAのinteractionに影響を与えRNAレプリカーゼ合成のための30S開始複合体形成を促進することが考えられる。したがってTable III-4. に示したPI-proteinとスぺルミジンによるRNAレプリカーゼの合成促進は、両者の促進作用が相乗的に作用した結果と推察できる。ここでTable III-4. に示したようなRNAレプリカーゼの促進効果、すなわち2μgのPI-proteinによって1.3倍、1mMスぺルミジンによって4.7倍、両者によって10倍の促進効果（両者のどちらか加えたりものを対照として）が得られたことから、RNAレプリカーゼ 成のための30S開始複合体形成促進において、スぺルミジンとPI-proteinは相乗効果の中でも単なるかけ算以上の協調的な増幅効果を発揮するとみねすべきであり今後興味ある事柄である。

Fig. III-2で示したように、30S亜粒子上には未知の因子が多く存在しているので、IF-1, 2, 3に加えてPI-protein, ポリアミンを含む他の因子が大腸菌における蛋白質合成の開始段階の調節に関与する可能性を考慮しなければならぬであろう。

Fig. III-7で見られるように、スぺルミジンの添加によって中間物質が減少していることを考えると、コート蛋白質とRNAレプリカーゼの分子量の差による伸長段階の速度の差についても検討しなければならぬと思われる。

筆者が使用したリボソームは完全にPI-proteinが除去されておらず、PI-proteinが未知の開始因子であるかどうかも含めて

PI-protein が必須因子であるのかあるいは促進因子であるのかの結論は今後の詳細な研究を待たねばならない。

MS2 RNA を鋳型とする RNA レプリカーゼ合成に対する PI-protein の最適量は $2 \mu\text{g}$ [PI-protein : ribosome = 1 : 1 (Molar ratio)] であるのに対し, +Met-tRNA の 30S 亜粒子への結合の最適量は $0.5 \mu\text{g}$ [PI-protein : 30S 亜粒子 = 1 : 6 (Molar ratio)] とはなっているが, これは調製段階における 30S 亜粒子の失活が原因であると考えられる。

また, RNA レプリカーゼの合成系に PI-protein を $3 \mu\text{g}$ 以上加えると, RNA レプリカーゼの合成量が $2 \mu\text{g}$ の PI-protein の場合より若干減少した (データは示していない)。何故過剰の PI-protein によって RNA レプリカーゼの合成, +Met-tRNA の 30S 亜粒子への結合が減少するのは不明であり今後の研究がまたれる。

Ⅲ-5. 要約

精製した PI-protein の生理的役割を明らかにする目的で、PI-protein の性質や機能について種々の検討を行った。その結果、以下の事実が明らかとなった。

- 1) PI-protein は、一本鎖合成ホモポリマーである poly U poly A に対する結合能力はもたなかった。
- 2) 活性化仔牛胸腺 DNA を鋳型とする DNA 合成および T7 ファージ DNA を鋳型とする RNA 合成で、PI-protein は全体の DNA 合成、RNA 合成にはほとんど影響を与えなかった。
- 3) 蛋白質合成途中のリボソームを蔗糖密度勾配遠心と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した結果、PI-protein はポリソーム、70S モノマーに存在せず、30S 亜粒子にのみ認められ、IF-2α、2β と行動を共にした。
- 4) 16S リボソーム RNA と 30S 亜粒子 total 蛋白質からの 30S 亜粒子の再構成系に PI-protein を加えると、PI-protein は 30S 亜粒子に取りこまれた。PI-protein を取り込んだ 30S 再構成 30S 亜粒子は、PI-protein を加えないで再構成した 30S 亜粒子に比べて 30S 開始複合体形成能と poly U を鋳型とするポリフェニルアラニン合成能を 1.5 倍促進した。
- 6) native な 30S 亜粒子を用いた 30S 開始複合体形成能は、0.4 mM カスガマイシン存在下で、1 μg の PI-protein により 1.5 倍促進された。

7) native 30S 粒子を用いた 30S 開始複合体形成能は、抗 PI-protein 抗体によって阻害され、native 30S 粒子中に PI-protein が存在していることが示された。このことは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認された。

8) MSZ RNA を鋳型とする蛋白質合成系に PI-protein を加えると、全体の [35S]メチオニンの取り込みにはほとんど変化がないが、その翻訳生成物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析すると、PI-protein のみを系に加えたものでは RNA レプリカーゼの合成が約 1.2 倍促進を受けていた。このとき A 蛋白質とコート蛋白質の合成量には変化がみられなかった。また 1 mM スパルミジンと PI-protein を共に加えると、RNA レプリカーゼの合成は約 8 倍の促進を受けていて、1 mM スパルミジンのみを系に加えた場合と比べても約 2.2 倍の促進が認められた。

以上の結果から、*in vivo* でポリアミンによって特異的に合成促進を受ける PI-protein は、MSZ RNA 依存の蛋白質合成系において、ポリアミンと相乗的に働いて RNA レプリカーゼの合成を促進し、その促進機構は主として蛋白質合成の開始段階において Initiation factor に似た挙動をすることによるものであることが明らかとなった。

第IV章 大腸菌ポリアミン要求株におけるRNAポリメラーゼの ポリアミンによる合成促進

IV-1. 緒言

Watanabe らは、 λ rif^d 18 DNA を鋳型とする大腸菌無細胞系において、1 mM スパルミジンの添加によって Elongation factor Tu とリボソーム蛋白質の合成は影響を受けなかったが、RNA ポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニットの合成が約4倍の促進を受けること、また T7 DNA を鋳型とした場合も同様に 1 mM スパルミジンによって T7 RNA ポリメラーゼの合成が約10倍促進されることを報告した。⁴⁷⁾

Tabor らは T7 amber mutant を用いた *in vivo* の実験で、amber codon の効果的な翻訳にポリアミンが必要であると報告している。³⁹⁾

筆者は第II章で述べたように、*in vivo* でポリアミンによって分子量 62000 の蛋白質 (PI-protein) の合成が促進されることを示し、第III章において、PI-protein がポリアミンと相乗的に作用して他の蛋白質の合成を促進することを示した。

そこで *in vivo* においてもポリアミンが RNA ポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニットの合成を促進するのではいかと考え、大腸菌ポリアミン要求株を用いてポリアミンの有無によって RNA ポリメラーゼの合成が影響を受けるかどうかを検討した。

IV-2 実験材料と方法.

IV-2-1. 使用菌株

実験には大腸菌ポリアミン要求株(MAZ61)を使用した。

IV-2-2. 培養条件.

大腸菌ポリアミン要求株(MAZ61)をポリアミン存在下および非存在下で培養し(おのおの2つずつ), $A_{540\text{nm}}$ が0.4のときおのおのの培養液を1つずつずつに分けて, 一方に $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のリファンピシンを加えて12分間振盪培養する。 $10,000 \times g$, 15分間遠心して集菌し, 菌体はさらに2回 Buffer I [$10\ \text{mM}$ Tris-HCl (pH 7.5), $60\ \text{mM}$ 塩化アンモニウム, $10\ \text{mM}$ 酢酸マグネシウム, $6\ \text{mM}$ β -メルカプトエタノール]で洗浄して使用するまで -80°C に保存した。

IV-2-3. [^{35}S]メチオニン標識蛋白質の調製.

E. coli MAZ61をIV-2-4. に示した方法で培養した。ただし $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ メチオニンのかわりに $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のメチオニンを含む培地を用いた。 $A_{540\text{nm}}$ が0.15のとき $10\ \text{mL}$ ずつずつに分けてトレツシン($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$)を加えるものと加えないものに分けた。37°Cで培養を続け $A_{540\text{nm}}$ が0.25に達した時, さらに $5\ \text{mL}$ ずつずつに分けてリファンピシン($15\ \mu\text{g}/\text{mL}$)を加えるものと加えないものに分けた。その条件下で5分間振盪後,

[³⁵S]メチオニン $20 \mu\text{Ci}$ を加えて7分間ラベルした後、直ちに等容量の10%冷TCA中に入れて氷中30分間放置した。3000 rpm, 10分間遠心してTCA不溶性の沈殿を集め、沈殿はさらに90%アセトン-0.05N HClで洗浄し70 μl の Gel Sample Buffer に溶かし SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のサンプルとした。

IV-2-4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動⁵¹⁾ とフルオログラフィー^{52), 53)}。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とフルオログラフィーは、IV-2-5. と同様の方法で行った。ただし分離ゲルに10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

IV-2-5. 大腸菌の Lysate の調製

IV-2-2. に示した方法で培養した菌体を菌湿重量の2倍量の Buffer I に懸濁し、Branson Sonifier Model 185 を用いて超音波処理を行ひ、 $10,000 \times g$, 10分間遠心して残渣を除いた。上清を Buffer I で透析して RNA ポリメラーゼ⁹⁴⁾ の活性測定に用いた。蛋白質濃度の測定は Lowry らの方法⁹⁴⁾ によつて行った。

IV-2-6. RNAポリメラーゼの活性測定.

0.2 mL 中に 50 mM Tris - HCl (pH 7.5), 150 mM 塩化アンモニウム, 20 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM DTT, 150 μ M ATP, GTP, CTP, 50 μ M UTP, 1 μ Ci [3 H]UTP (16 Ci/mole), 500 μ g 蛋白質を含む Lysate, 場合によって 10 μ M リファンピシン, を含む反応液を 37 $^{\circ}$ C, 20 分間インキュベートし, 2 mL の 5% TCA - 0.01 M ピロリン酸ナトリウムを加えて反応を停止する。氷冷後 TCA 不溶性の沈殿を GF/C filter (Whatman) 上に集め, 2% TCA - 0.01% ピロリン酸ナトリウムで充分洗浄し, 乾燥後液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

IV-3. 結果

IV-3-1. *In vivo* におけるRNAポリメラーゼ $\beta\beta'$ サブユニットの合成促進.

IV-2-3. に示した方法で調製した $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識された*E. coli* MA 261の全蛋白質をSDS-10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離したもののフルオログラフをFig. IV-1. に示した。その結果、初期対数増殖期におけるポリアミンの添加によって、RNAポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニット(分子量155,000, 165,000)の合成が促進されていた(lane 1と3)。しかし全蛋白質中に占める $\beta\beta'$ サブユニットの存在量はごくわずかであり、フィルムを長時間感光させたものでも、非常に薄いバンドとしか認められなかった。

Tittawella & Hayward は、RNAポリメラーゼの β サブユニットに結合してRNAポリメラーゼ活性を阻害するリファンピシンが、*in vivo*において一時的にRNAポリメラーゼ $\beta\beta'$ サブユニットの合成を誘導すること(リファンピシン誘導)を報告している。^{95),96)}そこで筆者は、このリファンピシン誘導を*E. coli* MA 261 について行った場合のポリアミンの有無によるRNAポリメラーゼの合成が変化するか否かを検討した。

15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のリファンピシンを培地中に加えて5分間振盪することによってリファンピシン誘導を行った*E. coli* MA 261ではポリアミンの有無に関係なく $\beta\beta'$ サブユニットの合成量は増加し

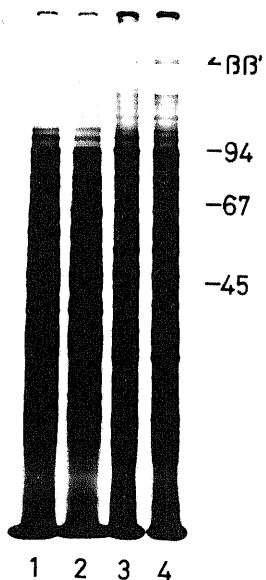


Fig.IV-1: Effect of Polyamine on in vivo RNA polymerase synthesis 1. starved bacteria, without rifampicin; 2, unstarved bacteria, without rifampicin; 3, starved bacteria with 15 μ g/ml rifampicin, 4; unstarved bacteria with 15 μ g/ml rifampicin.

ていてリファンピシン誘導が認められた。このとき、ポリアミンを培地中に添加した菌で $\beta\beta'$ の合成が促進されていた (lane 2と4)。

Fig. IV-1の $\beta\beta'$ バンドを切りとり、 $\beta\beta'$ に γ にまかれた ^{35}S メチオニンの放射能を測定した結果をTable IV-1.に示した。

その結果、リファンピシン誘導を行っていないE. coli MA 261の場合、 $\beta\beta'$ の合成量は非常にわずかでありポリアミンによる合成促進も1.2倍と少なかった。しかし、リファンピシン誘導を行ったE. coli MA 261の場合では、ポリアミン存在下及び非存在で培養した菌のどちらも $\beta\beta'$ サブユニットの合成量は増加しており、ポリアミンによって約2倍の促進が見られた。

Table IV-1. Effect of Polyamine on the synthesis RNA polymerase in vivo.

Condition		[³⁵ S]Methionine incorporated (cpm)
Starved	-rif	36
Starved	15 μg/ml rif	41
Unstarved	-rif	125
Unstarved	15 μg/ml rif	263

IV-3-2. 培地中へのポリアミン添加によるRNAポリメラーゼの活性上昇

IV-2-5. に示した方法で調製した Lysate は DNase, RNase 処理を行っていないために多量の DNA と RNA を含んでいる。したがって, この Lysate を用いた *in vitro* の反応系は外から DNA を加えなくても, *endogenous* の DNA を鋳型とする RNA 合成を行うことができた。Table IV-2 に示すように, Lysate に含まれる RNA ポリメラーゼの活性は, 培地中でポリアミンを添加した菌で高く, ポリアミンを加えないものに比べ約 1.4 倍の促進が認められた。この場合もリファンピシン誘導をかけた菌で, ポリアミンの効果が強く現われた。

さらに, *exogenous* の T7 DNA を加えて反応を行おうと, RNA の合成量は *endogenous* DNA のみを利用した場合に比べ若干高かった。この系においてもポリアミン存在下で培養した菌で RNA ポリメラーゼの活性が高かった (データは示していない)。

Table IV-2. Effect of Polyamine on the Activity of RNA polymerase.

Growth condition	Rifampicin (15 μ g/ml)	[³ H]UTP incorporated (p mole)
Starved	-	0.82
Starved	+	1.12
Unstarved	-	1.34
Unstarved	+	2.50

IV-4. 考察

最近 Watanabe らは、DNA を鋳型とする大腸菌無細胞系において、 1mM スアルミジンによって T7 RNA ポリメラーゼ⁴⁷⁾ および E. coli RNA ポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニットの合成が顕著に促進されること、またポリアミンによる促進効果は主として翻訳段階でおこることを報告した。そこで筆者は、大腸菌ポリアミン要求株を用いて *in vivo* におけるポリアミンの RNA ポリメラーゼ合成に関する研究を行い、ポリアミンが RNA ポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニットの合成を促進することも明らかとした。この結果は *in vitro* におけるポリアミンによる特異的な蛋白質の合成促進が細胞内においても起っていることを強く示唆するものであり、*in vivo* における重要な機能の一つとして、細胞増殖に関する蛋白質の合成を促進することがあることを示している。

筆者は第二章においてポリアミンが PI-protein の合成を促進することを明らかとし、第三章において天然の鋳型を用いた大腸菌無細胞系において、PI-protein がある種の蛋白質 (MS2 RNA レプリカーゼ, T7 RNA ポリメラーゼ, E. coli RNA ポリメラーゼ $\beta\beta'$ サブユニット) の合成を促進することを明らかとした。このことから、ポリアミンが PI-protein の合成を促進し、PI-protein はポリアミンと相乗的に作用して他のある種の蛋白質の合成を促進するというメカニズムを示した。

本章に示した結果は、*in vivo* においても、このメカニズムに

よってRNAポリメラーゼの合成が促進されている可能性を示すものであるが、*in vivo* においてPI-proteinが $\beta\beta'$ の合成に関与しているかどうかは不明であり、PI-proteinとRNAポリメラーゼ合成促進の関係については大変興味深い問題である。

in vitro におけるポリアミンの効果は転写と翻訳の両段階で認められるが、翻訳段階で、より強い効果がみられる⁴⁷⁾。*in vivo* においてポリアミンがRNAポリメラーゼの合成を促進するメカニズムについては不明であるが、*in vitro* においてポリアミンが核酸と強く結合することが知られているので、おそらくポリアミンが鎖型と作るDNAあるいは生成したmRNAと結合することによってその立体構造を変化させ、転写、翻訳の促進をするものであろうかと考えられる。

入り方418 DNAはFig. 7-3に示したように、大腸菌染色体の79分領域のクラスターを組込んだ⁹⁷⁾もので、大腸菌染色体由来のDNA上に6ヶ所のプロモーターが存在していることが知られている^{98), 99)}。従って転写されたmRNAの量比がポリアミンの添加によって変化している可能性も考えられる(Promoter selectionの変化)。また $\beta\beta'$ 遺伝子の前にAttenuator^{100~103)}とRNase IIIの切断点¹⁰²⁾が存在することも知られており、Attenuation機構およびRNase IIIによるmRNAの切断とポリアミンの関係についても興味深い問題であり今後の研究がまたれるものである。

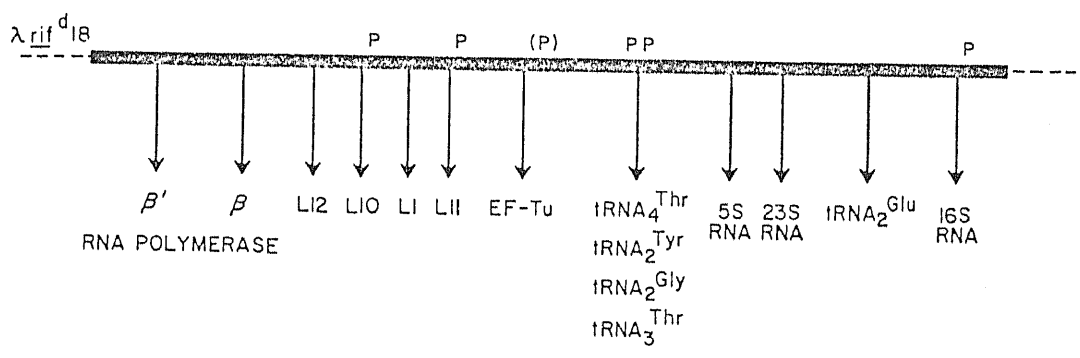


Fig.IV-3 Genetic map of λ $\text{rif}^{\text{d}18}$ transducing phage.

IV-5 要約

大腸菌ポリアミン要求株 *E. coli* MA261 を用いた *in vivo* の実験で、ポリアミンによって *E. coli* RNAポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニットの合成が促進された。この促進効果はリファンセシン誘導を行った *E. coli* MA261 においても認められた。

また、ポリアミン存在下、非存在下で培養した菌から調製した Lysate 中の RNAポリメラーゼ活性も、ポリアミンを添加した菌で高くなっていて $\beta\beta'$ サブユニットの合成量と一致していた。

以上のことから *E. coli* RNAポリメラーゼが *in vivo* でポリアミンによって合成促進されることが明らかとなった。

第V章 ポリアミンによる特異的なmRNAの合成促進

V-1. 緒言.

ポリアミンは、多価のカチオンとしての構造上の特徴からDNA, RNA, リン脂質に結合することによって多くの生物反応に関与していることが知られている。^{1)~3)} 筆者らの研究室においても、ポリアミンが核酸と結合することによってmRNAのアミノアシル化を促進すること、^{26), 105)} RNaseの塩基特異性が変化することも報告している。^{106), 107)}

また、合成ポリヌクレオチドを鋳型とした大腸菌無細胞蛋白質合成系において、ポリアミンによるポリペプチド合成の促進が鋳型として用いるmRNAのウラシル含量に依存していることも明らかとした。¹⁰⁸⁾

さらにIgarashiらは、種々の核酸に対するポリアミンの結合性を比較して、スアルミンがGC含量の高いDNAに対してより強く結合すること、 2 mM Mg^{2+} , 100 mM K^{+} 以上の条件下では、スアルミンがDNAよりRNAに対してより強い結合性をもつことを明らかとした。¹⁰²⁾

また一本鎖合成ポリマーを用いた実験からマグネシウムがpoly Aに対して強く結合することに対して、ポリアミンはpoly U, poly Cに強く結合することも明らかとした。¹⁰⁹⁾

一方、*in vivo* におけるRNA合成に関する研究は少なく、Cohenら、¹¹⁰⁾ おまびRainaらによって、RNAの合成がポリアミンによって促進されることが報告されている。しかし、これらはすべてstable RNAについての研究であり、mRNAの合成についての研究はない。

そこで筆者は、*in vivo* におけるポリアミンの作用に関する研究の一つとして特異的な mRNA の合成が促進されるか否かを検討した。本章において、ポリアミンによってシトシン残基に属した mRNA の合成が促進されることを示し、ポリアミンがシトシンに属した mRNA の合成を促進することによって PI-protein の合成を促進する可能性について検討した。

V-2. 実験材料と方法.

V-2-1. 使用菌株.

大腸菌ポリアミン要求株 MA 261 と EWH 319 を用いた。

V-2-2. 培養条件

E. coli MA 261 と EWH 319 の培養は II-2-2. に従って行った。

V-2-3. ³²P-mRNA の調製¹¹⁾.

³²P-mRNA の調製にあたり、[³²P]H₃PO₄ の菌体内への取り込みを効率よくするために、E. coli MA 261 の場合は Medium B の 7g KH₂PO₄, 3g K₂HPO₄ にかえて 3g Tris, 5g KCl, 2mg KH₂PO₄ を加え、1N HCl で pH 7.2 に調節したものをを用いた。また E. coli EWH 319 の場合は、Medium D の 3g KH₂PO₄, 6g K₂HPO₄ にかえて 1.21g Tris, 5g KCl, 5g クエン酸ナトリウム, 1g 硫酸アンモニウム, 各 100mg のグリシン, メチオニン, オルニチンを加え 1N HCl で pH を 7.0 に調節したものをを用いた。E. coli MA 261, E. coli EWH 319 ともポリアミン欠乏下で 800ml 培養し、A_{540nm} が 0.15 のとき、培養液をスフに分け (400ml づつ)、一方にアトレツシンを 100 μg/ml 加えた。おのおのの培養液の A_{540nm} が 0.25 に達したとき、あらかじめ 0.01N HCl で 90℃, 30 分間加水分解した

$[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ 400 μCi を加えて20秒間または3分間振盪培
 した。パルスラベルした菌液を直ちに360 gの水と40 mLの
 Buffer V [100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 50 mM 酢酸マ
 グネシウム, 100 mM アジ化ナトリウム, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クロラム
 フェニール, 10 mg/mL KH_2PO_4] 中に注ぎこみ, 15,000
 \times g, 15分間遠心して菌体を集めた。菌体はさらに10倍希釈し
 た Buffer V に懸濁し, 15,000 \times g, 10分間遠心し洗浄した。
 得られた菌体は菌湿重量の5倍量の Buffer VI [10 mM Tris-
 HCl (pH 7.3), 5 mM 酢酸マグネシウム, 10 mM アジ化ナト
 リウム, 1 mg/mL KH_2PO_4] に懸濁し, リゾチーム (Sigma
 Egg white) と DNase I (Sigma) をそれぞれ最終濃度が
 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とするように加えたのち, 凍結-融
 解を繰返して菌体を破壊した。さらに最終濃度の3% とするよう
 にマカロイドと SDS を加え, 10 mM Tris-HCl (pH 7.3), 5 mM
 酢酸マグネシウムで飽和したフェニールで抽出し, 水層に2% 酢酸
 カリウムを加えた後, 2倍量の Cold エタノールを加えてアルコー
 ル沈殿を行った。得られた ^{32}P -RNAは, 遊離 $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ を除
 くために30 mM, 10 mM, 1 mMのリン酸カリウム Buffer
 (pH 7.0) に透析した後, 蒸留水で透析した。

Ⅴ-2-4. ^{32}P -RNAの蔗糖密度勾配遠心による分画

$[\text{}^{32}\text{P}] \text{H}_3\text{PO}_4$ でラベルしたRNAを蔗糖密度勾配遠心により23S RNA, 16S RNA, mRNAに分画した。¹¹¹⁾ 3分間ラベルした ^{32}P -RNA (50~60 A₂₆₀ units) を5~20%の蔗糖密度勾配29 mL (150 mM NaCl, 15 mM フェニ酸ナトリウム, 10 mM EDTAを含む) にのせ, 日立RPS 25ローターで23,000 rpm; 22時間超遠心し, 底部より25滴ずつ分取した。各フラクションのRNA濃度はA_{260nm}によって測定し, $[\text{}^{32}\text{P}] \text{H}_3\text{PO}_4$ の放射能は各フラクションから30 μL をとり, Whatman 3MM paper disk に吹き付けて液体シンチレーションカウンターによって測定した。16Sと4Sの間のフラクションはCarrierとして10 mgのYeast RNAを加えたのち, アルコール沈殿を行った(mRNA分画)。23S, 16S RNAを含むフラクションもアルコール沈殿を行って集めたが, この場合Yeast RNAは加えなかった(16S RNA, 23S RNA分画)。

Ⅴ-2-5. Dowex 1x2 (Cl⁻) カラムによるヌクレオチドの分離

Ⅴ-2-4. で得られたRNAの塩基組成の決定は, Dowex 1x2 (Cl⁻) カラムクロマトグラフィーによってヌクレオチドを分離し, 各ピークに含まれる ^{32}P のカウントから求めた。¹¹¹⁾

まず, ^{32}P -RNA (1.5~2 mg) を0.3N KOH (0.2 mL) で37°C, 18時間インキュベートしてRNAを完全に加水分解し

たのち、10%PCAで中和した後氷冷し、3000 rpm, 10分間
 遠心して不溶化した塩を除き、上清を0.004NHClで平衡化した
 Dowex 1 x 2 (Cl⁻)カラムにかけ、ヌクレオシド2'-あるいは3'-
 モノリン酸を分離した (Fig. V-1)。CMP と AMP は
 0.004 NHCl (140 mL) で溶出し、UMP と GMP は 0.004 N
 HCl - 50 mM NaCl で溶出した。各フラクション (0.2 mL) に
 ついて A_{260 nm} を測定した。溶出したヌクレオシドのモル濃度は
 分子吸光係数から算出した。³²P-ヌクレオシドの放射能は、それ
 らを 20 mg 粉末活性炭に吸着させ、活性炭を Whatman Glass
 fiber filter (GF/C) 上に集めて 10 mL の 0.004 N
 HCl で洗淨したのち乾燥して液体シンチレーションカウンターで測
 定した。

V-2-6. ヌクレオシドプールの測定.

E. coli MA 261 をポリアミン欠乏で 400 mL 培養して、
 A_{540 nm} が 0.15 に達したとき 200 mL ずつ、
 一方に プトレysin (100 μg/mL) を加え、あらかじめ 0.01 N
 HCl で 90°C, 30 分間加水分解しておいた [³²P]H₃PO₄ を、
 200 μCi ずつ加えて 37°C で培養を続けた。ポリアミンを加えた
 ものおよび加えないものの A_{540 nm} が 0.25 に達したとき、180
 g の氷と 20 mL の Buffer V の入った容器に注ぎこむ。氷冷後
 15,000 x g, 10 分間遠心して集菌した。菌体はさらに 10 倍に

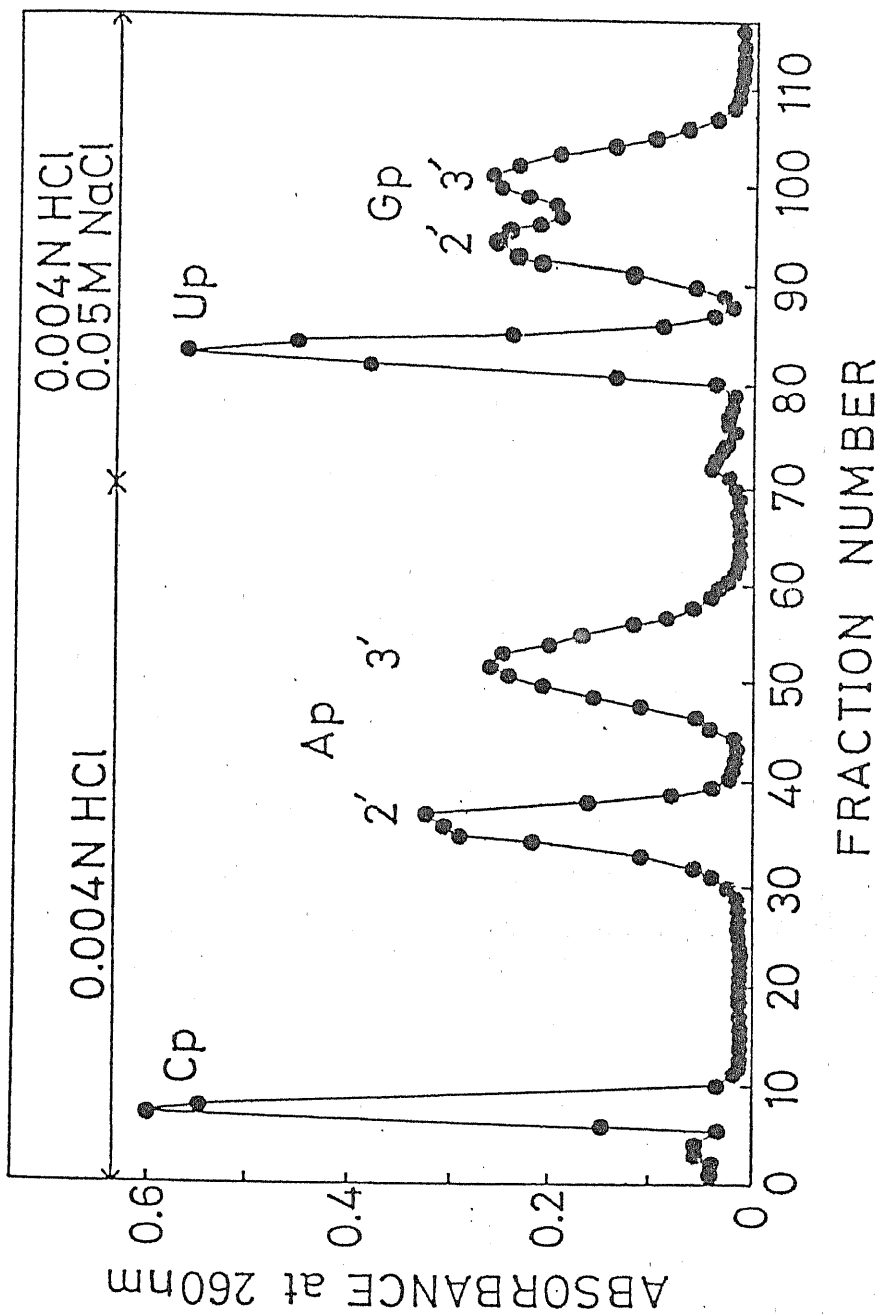


Fig. V-1: Chromatographic separation of nucleotides on Dowex 1 x 2 (Cl⁻) Column.

希釈した Buffer V に懸濁して 15000 x g, 10 分間遠心して洗淨した後, Buffer I [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 酢酸マグネシウム, 60 mM 塩化アンモニウム, 6 mM β -メルカプトエタノール] で再度洗淨した。得られた菌体を菌湿重量の 5 倍量の 10% PCA で homogenize して 3000 rpm, 10 分間遠心して PCA 不溶性の残渣を除いた。上清は 1N KOH で中和し, 氷冷後に不溶化した塩を遠心 (3000 rpm, 10 分間) して除き, 残りの上清をヌクレオチドの測定用とした。

ヌクレオチドの分離は Dowex 1x2 (Cl⁻) カラムで行った。Sample は [³²P]H₃PO₄ でラベルした菌から調製した PCA 可溶性分画 (1500000 ~ 2000000 cpm) に各 5 mM のヌクレオチドを混合したもの (1 mL) を用いた。これを Dowex 1x2 (Cl⁻) (1.5 x 15 cm) にのせ, 50 mM, 150 mM, 300 mM NaCl を含む 0.004 N HCl で順次溶出した。この条件で各ヌクレオチドは完全に分離され, CMP と AMP は 0.004 N HCl で, UMP, GMP, CDP, ADP は 0.004 N HCl - 50 mM NaCl で, UDP, GDP, CTP, ATP は 0.004 N HCl - 150 mM NaCl で, UTP と GTP は 0.004 N HCl - 300 mM NaCl で溶出された。

溶出した ³²P - ヌクレオチドの放射能は, それらを 20 mg の粉末活性炭に吸着させ, Whatman GF/C filter 上に集めて 40 mL の 0.004 N HCl で洗淨したのち乾燥し, 液体シンチレーションカウンターで測定した。

V-2-7. ^{14}C -アミノ酸の蛋白質への取り込み.

プロレツシン存在下および非存在下で培養した菌への種々のアミノ酸の取り込みを測定した。大腸菌ポリアミン要求株(MA 261)ポリアミン欠乏下で培養し、A540nmが0.15のとき5mLずつ分注し、プロレツシン(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を加えるものと加えないものに分けてさらに振盪を続けた。A540nmが0.25に達したとき15 μCi の種々の ^{14}C -アミノ酸を加え、指示した時間ごとに、0.7mLずつ取り2mLの5%TCA中に入れた。Carrierとして250 μg のBSAを加えて90 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間加熱した後、酸不溶性のものをWhatman GF/C filter上に集め、20mLの5%TCAで洗浄したのち乾燥し、液体シンチレーションカウンターによって蛋白質中にとりこまれた ^{14}C -アミノ酸の放射能を測定した。

V-3. 結果.

V-3-1. ポリアミンによるシトシンに富んだ mRNA の合成促進.

in vivo における mRNA に対するポリアミンの影響を調べるために, E. coli MA 261 をポリアミン欠乏下で培養し, A_{540nm} が 0.15 のとき培養液をスフに分け, 一方に $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプロテツシンを加えた。おのおのの培養液の A_{540nm} が 0.25 に達した時, $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ で 20 秒間パルスラベルして V-2-3. に従って ^{32}P -mRNA を調製した。このとき, ポリアミンを添加した菌への $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ の取り込みは, ポリアミンを加えなかったものの約 1.3 倍であった。Gros らによれば, 20 秒間パルスラベルした RNA は, 大部分 turn over の速い mRNA であつた。⁽¹²⁾ 筆者の結果でも, 20 秒パルスラベルして得た RNA の蔗糖密度勾配遠心のパターンは, Fig. V-2 に示したように $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ の放射能の大部分が 4S ~ 9S の間にみられた。このことから 20 秒パルスラベルで得られた RNA は mRNA であると考えられた。また 16S RNA 付近にも ^{32}P のカウントが認められたが, これは長い mRNA であると考えられる。

このようにして得られた ^{32}P -mRNA の塩基組成は V-2-5. に示した方法によって調べた。Table V-1. に示したように, 培地中にポリアミンを添加した菌 (unstarved bacteria) から調製した mRNA は, ポリアミンを加えないうで培養した菌 (starved

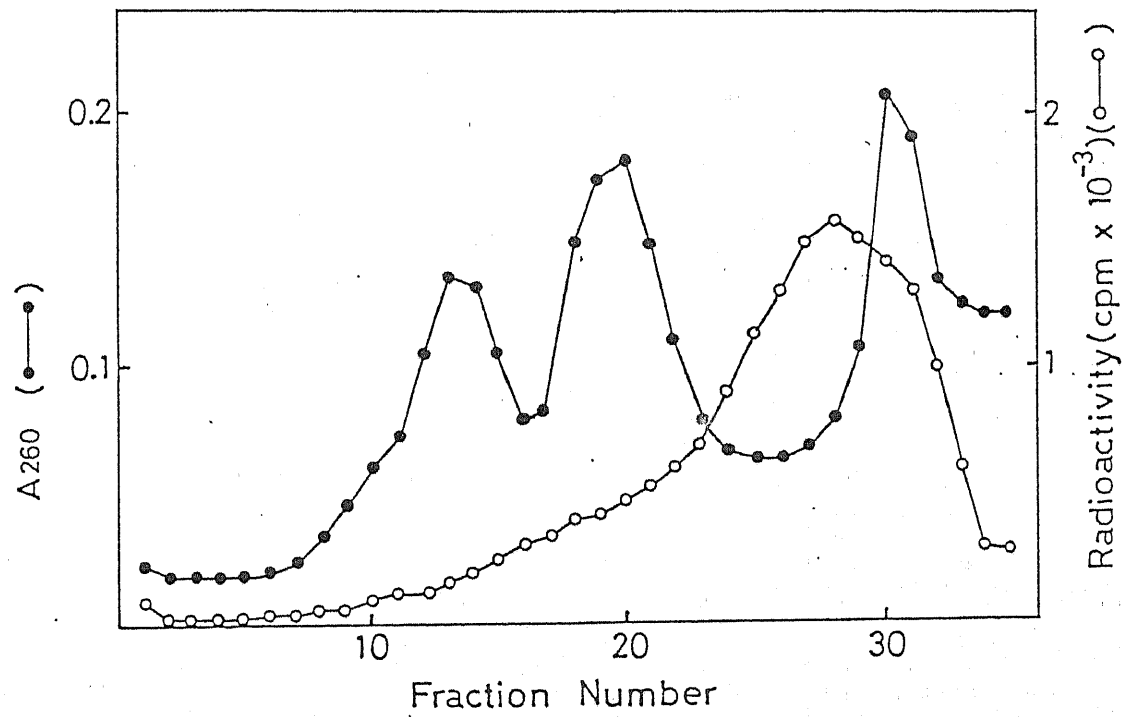


Fig.V-2: Sucrose gradient pattern of 20sec. pulse-labeled ³²P-RNA of a polyamine requiring mutant of E.coli MA261.

Table V-1. Base Composition of Pulse-labeled RNA and Total RNA of a Polyamine Requiring Mutant of a Escherichia coli MA261 grown in the Presence or Absence of Putrescine.

Growth condition	RNA	Percentage of base composition			
		Ap	Cp	Gp	Up
Starved	Pulse-labeled	23.6	19.2	25.3	31.9
Starved	Total	25.2	24.3	26.5	24.0
Unstarved	Pulse-labeled	26.6	26.1	24.3	23.0
Unstarved	Total	26.0	23.3	27.4	23.3

bacteria) から調製した mRNA に比べて シトシン含量が増加し、ウラシル含量が減少していた。またアデニンが多少増加し、グアニン含量は変化がみられなかった。一方、各ヌクレオチドの A_{260nm} から算出した total RNA の塩基組成は Unstarved bacteria, Starved bacteria で変化が認められなかった。

他のポリアミン要求株である E. coli EWH 319 を用いて同様な実験を行なったところ (Table V-2), MAZ 61 と同様に E. coli EWH 319 の場合も Unstarved bacteria から調製した mRNA でシトシン含量が増加し、ウラシル含量が減少していた。

次に同様な方法を用いて、3分間 $[^{32}P] H_3PO_4$ でラベルした ^{32}P -RNA を調製し、5-20% の蔗糖密度勾配遠心を行った (Fig. V-3)。3分間ラベルの ^{32}P -RNA では 20 秒パルスラベルの場合と異なり、23S および 16S RNA 分画にも ^{32}P の放射能が取り込まれていた。7 ラクシオン 8~18 を 23S RNA, 19~25 を 16S RNA, 26~30 を mRNA 分画として集め、おののおのをアルカリ加水分解して塩基組成を調べた (Table V-3)。

その結果 mRNA 分画においては、Unstarved bacteria からの mRNA でシトシン含量が増加し、ウラシル含量が減少していた。このことは、Table V-1, V-2 に示した 20 秒パルスラベルした ^{32}P -mRNA の結果とよく一致していた。これに對して 23S, 16S RNA 分画では、Unstarved bacteria, Starved bacteria でほとんど違いが認められなかった。なお、3分間ラベ

Table V-2. Base Composition of Pulse-labeled RNA and Total RNA of a Polyamine Requiring Mutant of Escherichia coli EWH 319 grown in the Presence or Absence of Putrescine.

Growth condition	RNA	Percentage of base composition			
		Ap	Cp	Gp	Up
Starved	Pulse-labeled	23.3	18.1	33.9	24.7
Starved	Total	24.4	22.2	33.1	20.3
Unstarved	Pulse-labeled	25.0	26.1	30.5	18.3
Unstarved	Total	25.0	22.9	31.3	20.9

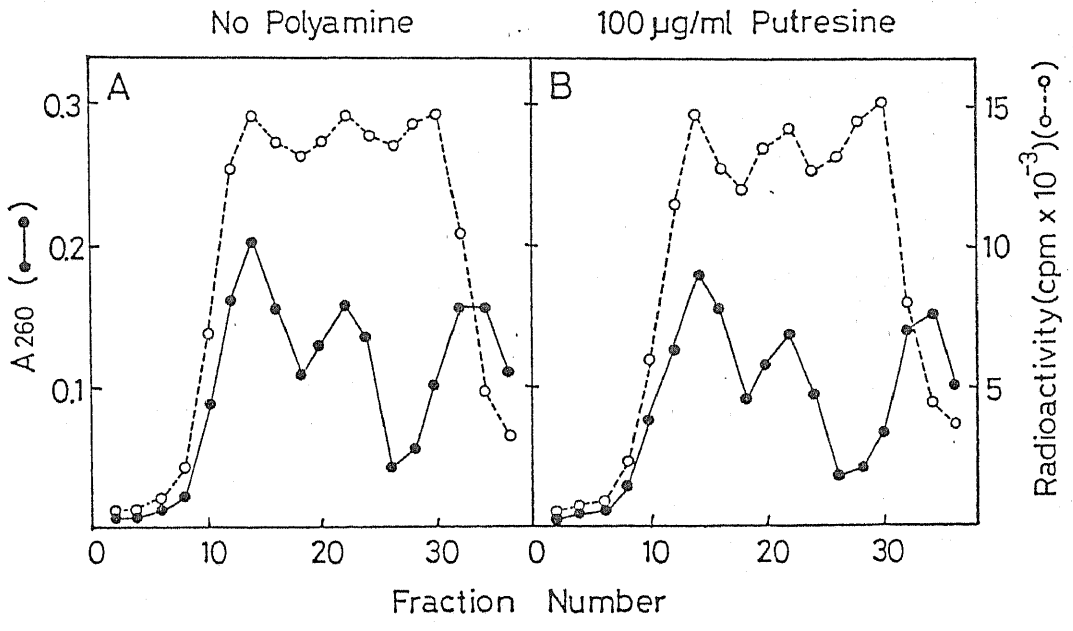


Fig.V-3: Sucrose gradient pattern of 3 min labeled ³²P-RNA of a polyamine requiring mutant of E.coli MA261. A: starved bacteria. B: unstarved bacteria.

Table V-3. Base Composition of mRNA and Ribosomal RNA
 Fraction of Polyamine Requiring Mutant of Escherichia coli
 (MA261) labeled by [^{32}P]H₃PO₄ for 3 min.

Growth Condition	RNA	Percentage of Base Composition			
		Ap	Cp	Gp	Up
Starved	23S RNA	25.8	22.6	25.6	26.0
Starved	16S RNA	25.4	23.2	25.8	25.6
Starved	m RNA	24.5	22.1	24.9	28.5
Unstarved	23S RNA	26.2	23.5	25.3	25.0
Unstarved	16S RNA	26.0	23.7	25.0	25.3
Unstarved	mRNA	25.4	25.1	24.6	24.9

ルの場合 Unstarved bacteria への $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ の取り込みは Starved bacteria の 1.3 倍であった。

20 秒パルスラベルの場合 (Table V-1, V-2) に比べて 3 分間ラベルした場合の mRNA では, Unstarved と Starved での シトシン含量, ウラシル含量の差が小さくなってゐるが, これはおそらく 3 分間ラベルの場合, mRNA 分画中に 16 S RNA が多少混在してゐるためか, あるいは シトシンに富んだ mRNA の Turn Over が速いためであると考へられる。

以上のことより, 初期対数増殖期において培地中にポリアミンを添加することによって, シトシン含量の多い特異的な mRNA (Cytosine-rich mRNA) の合成が促進されてゐることが示された。

Ⅶ-3-2. ポリアミンの菌体内ヌクレオチドプールに対する影響.

プロテシの有無による mRNA の塩基組成の変化が RNA 合成段階でのちがいに基づくものであるかどうかを検討するために、菌体内のヌクレオチドプールを測定した。もし菌体内ヌクレオチドプールがポリアミンの添加によって変化してゐるならば、mRNA の塩基組成の変化は、RNA 合成の際の基質濃度がちがうことによつておこる可能性が考えられる。

そこでⅦ-2-6. に従つて、ポリアミンの有無で培養した *E. coli* MA 261 の菌体内遊離ヌクレオチドを測定した。Table Ⅶ-4. に示したように、菌体内の遊離ヌクレオチドはポリアミンの有無でまったく変化しなかった。データは示さなかったが、RNA ポリメラーゼの基質となる ATP, GTP, CTP, UTP についても、まったく変化が認められなかった。このことから、ポリアミンの添加による mRNA の塩基組成の変化が、菌体内の遊離ヌクレオチドの変化に基づくものではなく、RNA 合成レベルでの変化を反映してゐることが明らかとなつた。

Table V-4. Nucleotide Pools in E.coli MA261 Cells
Cultured with or without Putrescine.

Growth condition	Percentage of Nucleotides			
	A	G	C	U
Starved bacteria	24.7	16.8	32.6	25.8
Unstarved bacteria	25.4	16.8	31.5	26.3

V-3-3. ^{14}C -アミノ酸の取り込みに対するポリアミンの効果.

もし mRNA の塩基組成に変化があるならば、それによってコードされる蛋白質のアミノ酸組成を変化することが考えられる。そこで、アミノ酸のコドン利用率から、主としてシトシンを利用するプロリン、アデニンを利用するリジン、グアニンを利用するグリシン、ウラシルを利用するフェニルアラニンを用いて、ポリアミンの添加によって、これらのアミノ酸の取り込みがどのように変化するかを調べた。

Fig. V-4. に示したように、すべてのアミノ酸のとりこみは、ポリアミンの添加により促進されていたが、アミノ酸の種類によってポリアミン添加によるとりこみの促進に異いが認められた。その促進効果の大きい方からプロリン、リジン、フェニルアラニン、グリシンであった。主としてシトシンによってコードされるプロリンの取り込みが約3倍、ついでアデニンでコードされるリジンの取り込みが約2倍、グアニンでコードされるグリシンの取り込みが約1.5倍促進されていた。フェニルアラニンを除いたこれらの3種類のアミノ酸に関しては、V-3-1. に示したポリアミンの添加による mRNA の塩基組成の変化とよく一致していた。一方、ポリアミンを添加した菌からの mRNA でウラシル含量が減少していたにもかかわらず、フェニルアラニンの取り込みがポリアミンの添加によって約2倍の促進をうけていた。この点に関しては、さらに詳細な検討を要するか、この現象の原因はおそらく、大腸菌において合成

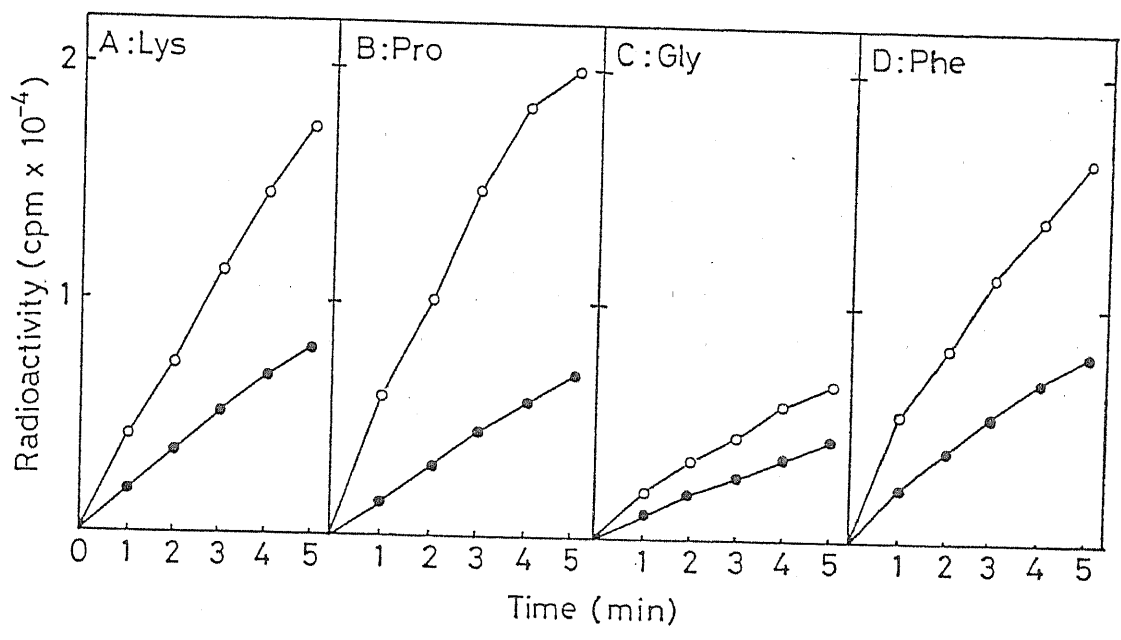


Fig.V-4: Incorporation of various ¹⁴C-amino acids into proteins from starved and unstarved bacteria.

●—● ; starved.bacteria. ○—○ ; unstarved bacteria.

されたタンパク質のアミノ末端(塩基性アミノ酸)にリボソーム、
mRNAに依存してフェニルアラニンの取り込みが見られること、
いわゆる“Soluble incorporation system”によるものである^{113, 114)}
と思われる。これらの結果から、ポリアミンを培地中に加えるこ
とによって大腸菌ポリアミン要求株においてシトシン残基に富んだ
mRNA “Cytosine rich mRNA” の合成が促進されている
ことが明らかとなった。

V-3-4. PI-protein が Cytosine rich mRNA によってコードされている可能性。

第II章および第IV章で明らかにしたポリアミンによって特異的に合成促進を受ける分子量62000の蛋白質 (PI-protein) の合成が転写段階, 翻訳段階のいずれかで調節されているかは大変興味深いところである。一方上記の如く, ポリアミンの添加によってシトシン残基に富んだ mRNA (Cytosine rich mRNA) の合成が促進されていることが明らかとなった。そこで, PI-protein と Cytosine rich mRNA の関係について若干の検討を行った。

IV-3-5. 示した PI-protein のアミノ酸分析の結果とアミノ酸組成が知られている数種の蛋白質のコードン利用率 (lac I¹¹⁵ protein, trp A protein¹¹⁶, ribosomal protein L1, L11, L10, L7/12¹⁰¹ を用いた) から, 期待される PI-protein mRNA の塩基組成を求めた。Table V-5. に示したように, 予想される PI-protein の mRNA の塩基組成ではシトシン含量が高く, ウラシル含量が低くあった。また大腸菌ポリアミン要求株をポリアミンの有無で [¹⁴C] アルギニン, [¹⁴C] ロイシン, [¹⁴C] プロリンを加えて培養し, 菌体中の全蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した (Fig. V-4)。

II-3-2. 示した [¹⁴C] リジンでラベルを行った場合 (Fig. II-3. lane 4S と 4U) に比べ, [¹⁴C] ロイシン, [¹⁴C] アルギニン, [¹⁴C] プロリンでラベルした場合, 全体のラベルされた蛋白質

Table V-5. Expected base composition of mRNA for 62000-Mr protein (polyamine induced protein).

Expected base composition was calculated from the amino acid composition of 62000-Mr protein and the frequency of the codon usage for each amino acid in lacI, trpA, and ribosomal protein.

Expected base composition			
Ap	Cp	Gp	Up
%			
27.8	28.1	24.9	19.2

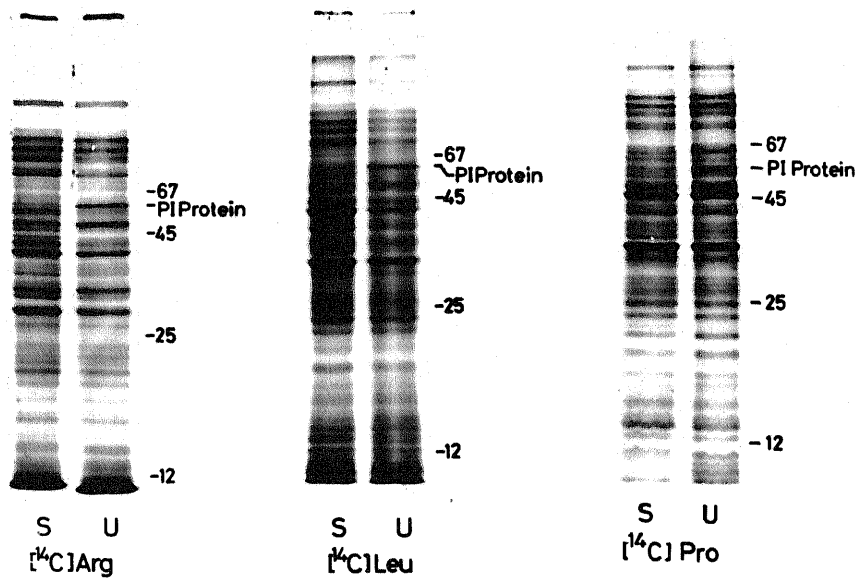


Fig.V-5: Fluorogram of ^{14}C -labeled protein by various amino acids from starved and unstarved bacteria. S: starved bacteria. U: unstarved bacteria.

中に占める P I - protein の割合が多くなって来た。ここで用いた 3 種のアミノ酸はすべてリジンよりもシトシンの利用度が高く、特にアロリンは主としてシトシンによってコードされるアミノ酸である。従って、この結果からも P I - protein がシトシン含量の高い mRNA によってコードされている可能性が示された。

以上のことから、ポリアミンによって特異的に合成促進される P I - protein は、同じくポリアミンによって合成促進される Cytosin rich mRNA によってコードされている可能性が示された。

V-4. 考察

大腸菌ポリアミン要求株を用いた *in vivo* の実験で、培地中にポリアミンを加えることにより、シトリン残基に富んだ mRNA (Cytosine-rich mRNA) の合成が促進されることを明らかにした。さらに第 II 章において示した PI-protein が Cytosine-rich mRNA によってコードされる可能性を示した。

ポリアミンによる蛋白質合成に関する研究は数多くなされているが、mRNA の合成に関する研究は少なく、特に *in vivo* における研究はほとんどなされていない。本章において筆者が示した結果は、ポリアミンが *in vivo* において特異的な蛋白質だけでなく特異的な mRNA の合成をも促進することを示したものであり、ポリアミンは生体内において特異的な蛋白質および mRNA の合成を促進することによって細胞の増殖に関与しているものと考えられる。

大腸菌 RNase II⁽¹⁷⁾ による poly C の分解がポリアミンによって促進されること⁽¹⁸⁾が知られているので、Cytosine-rich mRNA は合成だけでなく分解もポリアミンによって調節されているのかもしれない。

PI-protein のアミノ酸組成 (第 II 章) から期待される PI-protein の mRNA の塩基組成は、シトリン含量が高く、ウラシル含量が低くついていた。このことから PI-protein が Cytosine-rich mRNA によってコードされる可能性が考えられる。このことを明確にするためには、大腸菌からポリソームを調製し、抗 PI-

protein 抗体を用いてPI-protein mRNAを精製し、その塩基組成を検討しなければならぬと考えている。

Cytosine-rich mRNAの合成促進メカニズムとして、いくつかの可能性を挙げる事ができる。第1は、ポリアミンがDNAと結合することによってDNAの構造が変化し、Cytosine-rich mRNAのプロモーター部位がRNAポリメラーゼによって認識されやすくなる。第2に、RNA合成のelongationにポリアミンが作用してシトシンに富んだRNAの合成速度が速くなる。つまり、G≡Cペアの強い水素結合をポリアミンが切れやすくすること。第3に、その両者が関与している可能性も挙げる事ができるが、現在のところ、Cytosine-rich mRNAの合成促進メカニズムは不明であり、ポリアミンのRNA合成に対する影響とともに興味深い問題である。

V-5. 要約

大腸菌ポリアミン要求株を用いた *in vivo* の実験で、培地中にポリアミンを添加することによってシトシン残基に富んだ mRNA (Cytosine rich mRNA) の合成が促進された。

ポリアミン存在下および非存在下で培養した大腸菌ポリアミン要求株の菌体内遊離ヌクレオチドは、ポリアミンの添加によって変化しなかった。さらに各種のアミノ酸（プロリン、リジン、フェニルアラニン、グリシン）の菌体内蛋白質への取り込みは、ポリアミンの添加によって異なった促進を受け、その順序はプロリン > リジン > フェニルアラニン > グリジンであった。

以上の結果は、ポリアミンによる "Cytosine rich mRNA" の合成促進は RNA 合成段階で調節されていることを示唆するものである。

ポリアミンによって合成促進された蛋白質 (PI-protein) のアミノ酸組成から、期待される PI-protein mRNA の塩基組成を求めたところ、PI-protein mRNA はシトシン残基に富んでいることが示された。また、プロリン、アルギニン、ロイシンでラベルした菌の全蛋白質のフルオログラフィーの結果から、プロリンでラベルした場合、ラベルされた全蛋白質中に占める PI-protein の比率が高くなっていった。これらの結果は、ポリアミンによって合成促進を受けた蛋白質 (PI-protein) が "Cytosine rich mRNA" から翻訳される可能性を示唆するものである。

第VI章 総合的考察

本研究において、筆者は大腸菌ポリアミン要求株を用いて、菌体内での蛋白質合成、RNA合成に対するポリアミンの影響を研究した結果、*in vivo* においてポリアミンがまず特異的なmRNAの合成を促進し、そのmRNAによってコードされた蛋白質が増殖に密接に関与するある種の蛋白質の合成を翻訳段階で促進するというメカニズムを示した。このメカニズムは、ポリアミンがその直接の効果とは別に蛋白質因子を介して蛋白質合成の調節を行うことを示すものであり、この点に関していままでに明らかとされてきたポリアミンの機能発現に対し新しいメカニズムも提唱するものである。また従来よりポリアミンが蛋白質合成やRNA合成を促進することは知られていたが、これらの促進作用の相互関係についてはまったく研究がなされていなかった。この点においても筆者の結果は、ポリアミンによるRNA合成の促進と蛋白質合成の促進が互いに関連している可能性を示している。

今後、大腸菌からポリヨームを調製し、抗PI-protein抗体を用いてPI-protein mRNAを調製し、その塩基組成を検討することによって、PI-proteinとCytosine-rich mRNAとの関係を明確にしなければならぬと考えている。また、PI-proteinを完全に除いた蛋白質合成系を調製し、PI-proteinの蛋白質合成における機能が再びPI-proteinとポリアミンの関係を、より明らかにする必要がある。

現在までのところ、*in vivo*における蛋白質合成に対するポリアミンの効果を調べる研究は、*in vitro*での研究に比べてあまり進んでいない。Youngらは、*S. typhimurium*の増殖がポリアミンによって促進され、この促進の原因はポリアミンによる蛋白質合成の促進にあることを報告している。またHartnerらはT7ファージ、 λ ファージの感染による増殖時間がポリアミンの添加によって短縮され、Burst sizeも大きくなることを報告した。また、TaborらはT7ファージのamber mutantを大腸菌ポリアミン要求株に感染させ、ポリアミンの添加によってファージの増殖が促進され、その促進効果はポリアミンによってamber codonの効率的な翻訳がおこるためであることを報告している。これらの実験と筆者の実験結果との関係に興味をもたれる。

Rosanoらは大腸菌のS-100分画中に、Poly Uを鋳型とするポリフェニルアラニン合成におけるポリアミンの促進作用を強める蛋白性因子が存在することを報告した。この蛋白性因子と筆者のPI-proteinとの異同は大変興味深い問題である。

RNA合成に対するポリアミンの促進効果に関しては不明な部分が多く、ポリアミンによるDNAの立体構造の変化およびそれに伴うプロモーター認識の変化、伸長段階のスピードの変化など興味深い問題が多い。筆者が示したポリアミンによるRNAポリメラーゼの合成促進が、RNA合成に対するポリアミンの上記作用の可能性といかなる関係にあるかも興味ある事柄である。

第VII章 結論

大腸菌ポリアミン要求株を用い培地中にポリアミンを添加することによる菌体内での高分子(蛋白質, 核酸)合成に対するポリアミンの影響を検討した。その結果, 培地中にポリアミンを添加することにより分子量62000の蛋白質(PI-protein)が他の蛋白質に先立って合成促進された。この蛋白質は培地中にポリアミンを添加したのち約10分で現われた。PI-proteinは、大腸菌のS-100および粗開始因子分画に存在する塩基性蛋白質で、S-100分画からDEAE-Sephadex A-50(I), Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50(II), Affi-gel Blue カラムクロマトグラフィーにより均一に精製された。

次にPI-proteinの生理的役割を明らかにするために、PI-proteinの性質や機能について検討を行った。PI-proteinは蛋白質合成途中のリボソームでは、30S亜粒子にのみ認められ、IF-2 α , β の挙動と似ていた。またPI-proteinは30S亜粒子の再構成の際に30S亜粒子に取り込まれ、30S開始複合体形成能を1.5倍促進した。さらにnativeな30S亜粒子中にもPI-proteinが存在し、その30S開始複合体形成能はカスガマイシンの存在下でPI-proteinによって、より強く促進された。このことからPI-proteinは、f-Met-tRNAの30S亜粒子への結合段階に作用している可能性が示された。

MS2RNAを鋳型とする蛋白質合成系において、PI-protein

はポリアミンと相乗的に作用してRNAレアリカーゼの合成を特異的に促進し、その促進機構は、主として蛋白質合成の開始段階で、Initiation factor様の挙動をすることによるものであることが示唆された。このことからPI-proteinとポリアミンが相乗的に作用してある種の蛋白質の合成を促進するという機構が考えられた。そこで *in vivo* においてもポリアミンがある種の蛋白質の合成を促進するのではないかと考え、大腸菌ポリアミン要求株を用いて、ポリアミンがRNAポリメラーゼの合成を促進するか否かを検討した。その結果 *in vivo* においてもポリアミンがRNAポリメラーゼの合成を促進することを見出した。

一方、PI-proteinの合成促進機構を調べるために、ポリアミンの添加によってmRNAの合成がどのように変化するかを調べた。その結果、培地中にポリアミンを添加することによりシトシンに富んだmRNA (Cytosine rich mRNA) の合成が促進されることが明らかとなった。またPI-proteinのアミノ酸組成から算出した期待されるPI-protein mRNAの塩基組成が、Cytosine rich mRNAとよく一致したことから、ポリアミンはCytosine rich mRNAの合成促進を通じてPI-proteinの合成を促進するという可能性が示された。

謝辞

本研究を行うにあたり終始御指導、御助言を賜わりました千葉大学薬学部廣瀬聖雄教授、五十嵐一衛助教授、熊谷宏助手に心より感謝申し上げます。

また、アミノ酸分析をお願いいたしました星薬科大学入江昌親教授に深く感謝いたします。

また、本研究に対し、多大なる御協力をいただきました千葉大学薬学部生化学研究室の卒業生並びに在学生の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Cohen, S.S. (1971) Introduction to the Polyamines, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- 2) Tabor, C.W., and Tabor, H. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 285-306.
- 3) Morris, D.R., and Marton, L.J., eds. (1981) Polyamines in Biology and Medicine, Dekker, N.Y.
- 4) Herbst, E.J., and Snell, E.E. (1949) J. Biol. Chem. 181, 47-54.
- 5) Jänne, J., Raina, A., Siimes, M. (1964) Acta. Physiol. Scand. 62, 352-358.
- 6) Raina, A., and Telaranta, T. (1967) Biochim. Biophys. Acta. 138, 200-207.
- 7) Hirshfield, I.N., Rosenfeld, H., Leifer, Z., and Maas, W.K. (1970) J. Bacteriol. 101, 725-730.
- 8) Morris, D.R., and Jorstad, C.M. (1970) J. Bacteriol. 101, 731-737.
- 9) Morris, D.R., and Jorstad, C.M. (1973) J. Bacteriol. 113, 271-277.
- 10) Cunningham-Rundles, S., and Maas, W.K. (1975) J. Bacteriol. 124, 791-799.
- 11) Nathans, D., and Lipmann, F. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 497-504.
- 12) Young, D.V., and Srinivasan, P.R. (1972) J. Bacteriol. 712, 30-39.
- 13) Young, D.V., and Srinivasan, P.R. (1974) J. Bacteriol. 117, 1280-1288.
- 14) Echandi, G., and Algranati, I.D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 313-319.
- 15) Echandi, G., and Algranati, I.D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1185-1191.
- 16) Algranati, I.D., and Goldemberg, S.H. (1977) Trends in Biochemical Sciences 2, 272-274.

- 17) Algranati, I.D., and Goldemberg, S.H. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 1045-1051.
- 18) Cohen, S.S., and Lichtenstein, J. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2112-2116.
- 19) Norton, J.W., Erdmann, V.A., and Herbst, E.J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 155, 293-295.
- 20) Silman, N., Artmann, M., and Engelberg, H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 103, 231-240.
- 21) Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kishida, K., Watanabe, Y., Kogo, A., and Hirose, S. (1979) *Eur. J. Biochem.* 93, 345-353.
- 22) Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kishida, K., Kakegawa, T., and Hirose, S. (1981) *Eur. J. Biochem.* 114, 127-131.
- 23) Igarashi, K., Kakegawa, T., and Hirose, S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 697, 185-192.
- 24) Igarashi, K., Takahashi, K., and Hirose, S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 234-240.
- 25) Igarashi, K., Eguchi, K., Tanaka, M., and Hirose, S. (1978) *Eur. J. Biochem.* 82, 301-307.
- 26) Igarashi, K., Eguchi, K., Tanaka, M., and Hirose, S. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 13-19.
- 27) Igarashi, K., Kojima, M., Watanabe, Y., Maeda, K., and Hirose, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 480-486.
- 28) Igarashi, K., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kojima, M., Fujiki, Y., and Hirose, S. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 806-812.
- 29) Igarashi, K., Matsuo, Y., Mitsui, K., and Hirose, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 360-368.
- 30) Igarashi, K., Yabuki, M., Yoshida, Y., Eguchi, K., and Hirose, S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 163-171.
- 31) Igarashi, K., Kashiwagi, K., Aoki, R., Kojima, M., and Hirose, S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 440-448.
- 32) Abraham, A.K., Olsens, S., and Pihl, A. (1979) *FEBS Lett.* 101, 93-96.

- 33) Jelenc, C., and Kurland, C.G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 64-68.
- 34) Goldemberg, S.H., and Algranati, I.D. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 251-255.
- 35) Hirashima, A., Harigai, H., and Watanabe, I. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 1046-1051.
- 36) Morch, M.D., and Bonicourt, C. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 445-451.
- 37) Hryniewicz, M.K., Vonder Haar, R.A. (1983) Mol. Gen. Genet. 190, 336-343.
- 38) Pelham, HRB (1978) Nature 272, 469-471.
- 39) Tabor, H., and Tabor, C.W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7087-7091.
- 40) Atkins, J.F., Lewis, J.B., Anderson, C.W., and Gesteland, R.F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5688-5695.
- 41) Konecki, D., Kramer, G., Pinphanichakarn, P., and Herdesty, B. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169, 192-198.
- 42) Hunter, A.R., Farrell, P.J., Jackson, R.J., and Hunt, T. (1977) Eur. J. Biochem. 75, 149-157.
- 43) Abraham, A.K., and Pihl, A. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 257-262.
- 44) Igarashi, K., Sugawara, K., Izumi, I., Nagayama, C., and Hirose, S. (1974) Eur. J. Biochem. 48, 495-502.
- 45) Igarashi, K., Watanabe, Y., and Hirose, S. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 407-413.
- 46) Watanabe, Y., Igarashi, K., and Hirose, S. (1981) Biochem. Biophys. Acta 656, 134-139.
- 47) Watanabe, Y., Igarashi, K., Mitsui, K., and Hirose, S. (1983) Biochim. Biophys. Acta 740, 362-368.
- 48) Igarashi, K., Hara, K., Watanabe, Y., Hirose, S., and Takeda, Y. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 897-904.
- 49) Algranati, I.D., Echandi, G., Goldemberg, S.H., Cunningham-Rundles, S., and Maars, W.K. (1975) J. Bacteriol. 124, 1122-1127.

- 50) Hafner, E.W., Tabor, C.W., and Tabor, H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 12419-12426.
- 51) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
- 52) Bonner, W.M., and Laskey, R.A. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83-88.
- 53) Laskey, R.A., and Mills, A.D. (1975) Eur. J. Biochem. 56, 335-341.
- 54) Nierenberg, M.W., and Matthaei, J.H. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1588-1602.
- 55) O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- 56) Speckmann, D.H., Stain, W.H., and Moore, S. (1958) Anal. Chem. 30, 1190-1206.
- 57) Mitsui, K., Igarashi, K., Kakegawa, T., and Hirose, S. (1984) Biochemistry in press.
- 58) Loeb, T., and Zinder, N.D. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 282-289.
- 59) Gierer, A., and Schram, G. (1956) Nature 177, 702-703.
- 60) Bryan, R.N., Sugiura, M., and Hayashi, M. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62, 483-489.
- 61) Fuchs, E. (1976) Eur. J. Biochem. 63, 15-22.
- 62) Leffler, S., and Szer, W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1458-1464.
- 63) Smolarsky, M., and Tal, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 199, 447-452.
- 64) Richardson, C.C., Schildkraut, C.C., Aposhian, H.V., and Kornberg, A. (1964) J. Biol. Chem. 239, 222-232.
- 65) Aposhian, H.V., and Kornberg, A. (1962) J. Biol. Chem. 237, 519-
- 66) Igarashi, K., and Kaji, A. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62, 498-505.
- 67) Zamir, A., Miskin, R., and Elson, D. (1971) J. Mol. Biol. 60, 347-364.
- 68) Nomura, M., Traub, P., and Beckmann, M. (1968) Nature 219, 793-799.

- 69) Traub, P., Mizushima, S., Lowry, C.W., and Nomura, M. (1971) *Methods in Enzymology* 20, 391-407.
- 70) Igarashi, K., Watanabe, Y., Matsumoto, E., Kogo, A., Yabuki, M., and Hirose, S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 18-25.
- 71) Nakamoto, T., and Kolakofsky, D. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55, 606-613.
- 72) Niereberg, M., and Leder, P. (1964) *Science* 145, 1399-1407.
- 73) Sober, H.A., Cutter, E.J., Wycoff, M.M., and Peterson, E.A. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 756-763.
- 74) Patrik, C.C., and Virella, G. (1978) *Immunochemistry* 15, 137-139.
- 75) Hummel, J.P., and Dreyer, W.J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 63, 530-532.
- 76) Mizumoto, K., Iwasaki, K., and Kaziro, Y. (1974) *J Biochem.* 76, 1269-1280.
- 77) Stydier, F.W. (1969) *Virology* 39, 562-574.
- 78) Tal, M., Aviram, M., Kanarek, A., and Weiss, A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 281, 381-392.
- 79) Carmichael, G.G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6160-6167.
- 80) Takeda, Y., and Igarashi, K. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 917-924.
- 81) Zubay, G. (1962) *J. Mol. Biol.* 4, 347-356.
- 82) Benne, R., Naaktgeboren, N., Gubbens, J., and Voorma, H.O. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32, 372-380.
- 83) Hershey, J.W., Yanor, J., Johnston, K., and Fukunding, J.L. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 626-638.
- 84) Arai, K., Kawakita, M., and Kaziro, Y. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7029-7037.
- 85) Kornberg, A. (1980) *DNA replication*
- 86) Lewin, B. (1977) *Gene Expression* vol. 3, 682-723.
- 87) Studier, F.W. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 477-535.
- 88) Grunberg-Manago, M., and Gros, F. (1977) *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 20, 209-284.

- 89) Okuyama, A., Machiyama, T., and Kinoshita, N. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 196-
- 90) Fiers, W., Contreras, R., Duerink, F., Haegeman, G., Merregaert, J., MinJou, W., Raeymaekers, A., Volckaert, G., Ysebaert, M., Vandekerckhove, J., Nolf, F., and VanMontagu, M. (1975)
Nature 256, 273-
- 91) Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iseventant, D., Merregaert, J., MinJou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Vandenberghe, A., Volckaert, G., and Ysebaert, M. Nature (1976) 260, 500-
- 92) Vinñuela, E., Algranati, I. D., and Ochoa, S. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 3-11.
- 93) Rosano, C. L., Bunce, S. C., and Hurwitz, C. (1983) J. Bacteriol. 153, 326-334.
- 94) Lowry, O. H., Rosenbrough, N., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1955) J. Biol. Chem. 193, 265-
- 95) Tittawella, I. P. B., and Hayward, R. S. (1974) Mol. Gen. Gene. 134, 181-186.
- 96) Hayward, R. S., Tittawella, I. P. B., and Scaife, J. G. (1973) Nature New Biol. 243, 6-9.
- 97) Kirshbaum, J. B., and Konrad, E. B. (1973) J. Bacteriol. 116, 517-526.
- 98) Yamamoto, M., and Nomura, M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3891-3895.
- 99) Linn, T., Scaife, J. (1978) Nature 276, 33-37.
- 100) Dennis, P. P. (1977) J. Mol. Biol. 115, 603-625.
- 101) Post, L. E., Strycharz, G. D., Nomura, M., Lewis, H., and Denis, P. P., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1697-1701.
- 102) Barry, G., Squires, C., and Squires, C. L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4922-4926.
- 103) Barry, G., Squires, C., and Squires, C. L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 3331-3335.
- 104) Igarashi, K., Sakamoto, I., Goto, N., Kashiwagi, K., Honma, R., and Hirose, S. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 219, 438-443.

- 105) Igarashi, K., and Takeda, Y. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* 213, 240-243.
- 106) Igarashi, K., Kumagai, H., Yoshikawa, M., Mikami, T., and Hirose, S. (1979) *Eur. J. Biochem.* 93, 345-353.
- 107) Hirose, S., Kumagai, H., Yoshikawa, M., Mikami, T., and Igarashi, K. (1977) *J. Biochem.* 82, 1605-1612.
- 108) Igarashi, K., Watanabe, Y., and Hirose, S. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 407-413.
- 109) Igarashi, K., Aoki, Y., and Hirose, S., (1977) *J. Biochem.* 81, 1091-1096.
- 110) Cohen, S.S., Hoffner, N., Jansen, M., Moor, M., and Raina, A. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 721-728.
- 111) Igarashi, K., Kumagai, H., Watanabe, Y., and Hirose, S., (1978) *Advances in Polyamine Research vol.1* 267-276.
- 112) Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Jurland, C.G., Risebrough, R.W., and Watson, J.D. (1961) *Nature* 190, 581-585.
- 113) Kaji, A., Kaji, H., and Novelli, G.D. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1185-1191.
- 114) Ceibowitz, M.J., and Soffer, R.L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2066-2073.
- 115) Farabaugh (1978) *Nature* 274, 765-769.
- 116) Nichols, B.P., and Yanofsky, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 5244-
- 117) Alok, K.D., and Salil, K.N. (1976) *Progress in Nucleic Acid Res.* 271-
- 118) Kumagai, H., Igarashi, K., Yoshikawa, M., and Hirose, S. (1977) *J. Biochem.* 81, 381-388.