

Title	枯草菌細胞膜によるα-Amylaseのin vitro合成
Author(s)	二宮, 保男
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2775
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

# 枯草菌細胞膜による α-Amylase の in vitre 合成

二首保男

#### まえがき

現在、微生物の工業的利用は歴史的に積斗上かられた 経験に基づくものが中心的役割を果しており、これら知識 の蓄積の上に醗酵工業は飛躍的に拡大してきた。 一方、 急速に進歩しつっある生物学は多くの醗酵現象の料学的た 把握を可能ならしめ、将来への論理的発展が期待される。 しかしながら、微生物の細胞外酵素合成に関しては、細胞 膜において合成され分泌されるという考えが一般に諒解さ れてはいるが、実験的に確認されるには至っていない。 著者はここに<u>Bacillus</u> <u>amyloliguefaciens</u> より無細胞 蛋白合成系を調製し、膜画分において み amylase が合成え れることを証明するのを目的とし、同時に膜結合ポリソー ムにおける蛋白合成の特徴を明ちかにすることを試みた。 ここに省みるとき、まだ解明されるばなちない問題を多分 に残しており、今後去その究明に努力する所存である。

1995年 12月

#### 著者

	目 次	頁
	緒 論	1
第1章	細胞膜による無細胞蛋白合成系の調製並	
	びに諸姓質	5
第1節	緒言	5
第2節	実験材料および方法	6
第3節	実 験 結 果	10
1	精製膜画分の分離	10
2	膜系における蛋白合成の特性	11
3	膜画分における蛋白合成の制限因子	15
第4節	考察	17
第5節	要約	19
第2章	膜結合ポリソームにおりる蛋白合成	20
第1節	緒言	20
第2節	実験材料および方法	21
第3節	实験結果	22
1	膜系に対するリボソームの影響	22
2	膜系での蛋白合成の開始反応	25
3	膜結合ポリソームによる蛋白合成	29
第4節	考察	33
第5節	要 約	35
	•	

.

第3章	膜紋	吉合オ	ペリソ	- 4	いたす	543	i d am	ylase f	2
	成							v	37
第1首	節赭	言							37
第2首	庐 実馬	就挑	およ	びラ	古法				38
第了韵	萨 実	験	結	果					41
	1 Fue	sidic	acid	にも	る方	沙西	孝素生?	産阻害	41
: <b>(</b>	2 d-1	Imyl	lase	低当	主產大	朱の於	主質		44
· ,	3 d-1	Amyl	as-e	のタ	已疫生	<b>幹的</b> 本	生質		46
	4 膜系	吉合 才	やリン	) - 2	もにす	がりき	s d-am	nylase f	2
	成							v	49
第4番	帝 考	察							50
第5首	市里	約							52
	統	抬	ぉ	F	1ד	結	論		54
	文	献						<b>5</b>	57

# 緒 論

微生物の生産する分泌酵素、d-amylase ロ工業的に生産利用されている加水分解酵素の一つであり、古くかろ研究されてきた。他の細胞外酵素と共通してシスケン含量が少く<sup>り</sup>、この蛋日質の特異的な構造が分泌と強く関連していると考えられる。

またこれる細胞外酵素生産様式がいずれも増殖非連動 重、可ためち増殖速度が低下した後も活発に酵素が生産之 れ、一般の蛋白合成、可たわち細胞増殖量に比例する酵素 合成とは異った型を示可点で特徴的である。 この様な酵 素合成の様式は <u>Aspergillus</u> niger Oglucamylase<sup>20</sup>、 acid proteinase<sup>30</sup>、<u>Bacillus</u> amyloliguefaciens の d-amylase<sup>40</sup> 生産におりて顕著である。 <u>B. amyloligue-</u> faciens KA 63 によるd-amylase 生産機構に関しては actinomycin Dによる阻害実験、アミノ酸・ 00 = 50 法 基飢餓実験<sup>50</sup>、速度論的解析<sup>40</sup>存どにより、このよう存生 産型を示可主要因が研究され、d-amylase に特異的な nRNA の安定性によるものと推定された。 またBoth 等<sup>60</sup> は <u>B. amyloliguefaciens</u> の proteinase の mRNA が安定であ ることを示唆してりる。

ー方、野村等<sup>D</sup>ロイamylaseの分泌機構はd-amylase 生産期すなわち対数増殖期以降に生産される自己消化酵素 による細胞膜の弱体化と関連があるとしてりる。

<u>B</u> amylolique faciens での研究におりても、細胞外酵素は細胞内にその活性が認められず<sup>8,9,10</sup>、酵素は腹で合成 され nascent の状態で細胞外に分泌された後、高次構造を 取り活性を示すという考えが支持されている。 これは、 <u>Bacillus licheniformis</u>における penicillinaseの分泌 機構の仮説<sup>11</sup>とも一致する。

以上の推定かる細胞外酵素であるdamylaseのmRNA は膜結合ポリソームとして存在することにより安定化され るとともに、生産されたdamylase 蛋白が細胞外へ分泌さ れるに必須な部位を占めているという作業仮説は妥当なも のであろう。

細胞か了酵素を分泌する現象は環境因子により一方的に影響を受ける微生物が、その環境を目うの力によって変えうる唯一の今段であり、運動と並んで重要を役割を持っ ものである。細胞外酵素が分泌という目的かるみて、外かるの影響に最も敏感な腹において合成されるという考え に合理的で受け入れやすいものである。

このようた考えは高等動物の分泌組織細胞におりては 一般的となっている<sup>12-15)</sup>。 すなわち、リボソームの多くは 細胞内膜組織である小胞体 (endoplasmic reticulum)に 結合しており<sup>16)</sup>、分泌蛋白は小胞体に結合したポリソーム で合成され、小胞体中の腔(cavity) へ方向性をもって移 行するという考えである<sup>17)</sup>。 Andrews等<sup>12)</sup> 日分泌細胞の膜 結合ポリソーム日遊離ポリソーム、あるいて非分泌細胞の

膜結合ポリソームに比べ、安定かっ高活性の蛋白合成能を 持っと報告している。 またBylioni等<sup>18)</sup>日 immunoglobulin のみを生産するネズミの myeloma 細胞を用い リボソームの605サブエニット日小胞体膜に直接結合して おり、これにmRNAと405サブユニットが結合して膜結合 ポリソームが形成されると報告している。

細菌にかいても膜結合りボソームの存在口電う顕微鏡 観察によっても確認されており<sup>19-212</sup>、それらの生化学的性 質もある程度明らかにされている<sup>22)</sup>。

本論文においては、<u>B</u>anyloliquefaciens KA63株を用い、& anylase 合成が細胞膜で行われていることを明う 力にするために、膜結合ポリソームによる高活性かつ安定 な無細胞蛋白合成系を調製し、膜における蛋白合成を解析 し、& anylaseの形成をd-anylase に特異的店杭体との免 疫反応によって検出した。

第1章では、対数増殖期の豆amyloliquefaciens KA63 より、位温しysozyme 処理法により膜画分を精製分離する 方法を示し、膜画分を主体とする蛋白合成系を調製すると ともに、それが完全な無細胞系であることを確認した。 またこの系において合成速度、並びに最大合成量に影響す る因子の安定性をもあわせて検討した。

第2章では、脱結合ポリソームにおいて蛋白合成が行 われる事を明らかにした。 リボソームを添加することに より、その蛋白合成が促進され、それは膜画分での蛋白合

成が停止してからでも有効であることを示し、膜画分での 蛋白合成系におりてmRNA は比較的安定である知見を得た。 また30s サブユニットのみでも蛋白合成に促進的に働くこ とを示し、膜結合ポリソームにおりて50s サブユニットが 直接膜と結合している可能性を示唆した。

第3章では、実際に膜結合ポリソームにおいて、danylaseが合成されていることを免疫学的方法により明5 かにした。 & anylase 生産量の低下した変異株AL222 か3調製された無細胞系では、膜結合ポリソーム、遊離ポ リソームのいずれにおいてもdamylase の生産が認められ たいことより、この免疫学的方法はd-anylaseの検出に有 勃であることを示した。

# 第1章 細胞膜による無細胞蛋白合成系の調製並びに諸性質

#### 第1節緒言

23,24)

1961年、Nirenberg とMatthaei によって<u>Esherichia</u> <u>coli</u>かう高活性かっ安定店蛋白合成系が調製されて以来、 in vitroにおりる蛋白合成の研究何<u>E.</u><u>coli</u>の系におりて 発展し、その詳細が明らかにされてきた。 この系で何 mRNA としてRNA phage MS 2 店どのRNA を用りる ことが可能であり、そのRNA 何3種類の蛋白しかコード されてり存りとりう利点がある<sup>25)</sup>。 また specialized transduction を行う phage を利用し、特定の DNA を抽出 しDNA からtranscription をへて、その遺伝子に特異的 店蛋白を合成させる糸も Zubay 等にすって開発されてり 3<sup>26,28)</sup>

ー方、蛋白合成におりる個々の段階の研究の他に、細胞内におりる蛋白合成場に関しても研究が存されてきた。 1963年、Schlessinger は<u>Bacillus megaterium</u> を用り、 細胞膜部位におりて、蛋白合成活性があり、全RNAの50 %以上が膜に結合している事を示している。 以来、蛋白 合成場という観点かる、細菌の膜結合ポリソームに関して 研究が存されて来た。 <u>Bacillus</u> 属にっいての研究を表 示叉るとTable F1の通りである。

Table 1-1.	Distribution	of	RNA	in	membrane	fraction.

Refer	ence	RNA	in	membrane	(%)	Strain	Condition of preparation
1953	Weibull <sup>28)</sup>				15	B. megaterium KM	,
1961	Godson et al <sup>29)</sup>				50	B. megaterium KM	early log phase cells,
							lysozyme treatment at 30°C
1963	Schlessinger <sup>22)</sup>			33 -	50	B. megaterium KM	log phase cells, grinding
		•	•				with alumina or lysozyme-
							DNase treatment
1965	Yudkin and Davis <sup>30</sup>	)			25	B. megaterium KM	lysozyme-DNase treatment
							at room temperature
1965	Schlessinger et al	21)			60	B. megaterium KM	log phase cells, lysozyme-
							DNase treatment at 20°C
1966	Aronson <sup>31)</sup>				42	<u>B. megaterium</u> KM	lysozyme-DNase treatment
							at room temperature
1968	Gonzalez <sup>32)</sup> 1	ate lo	g		70	B. stearothermo-	lysozyme-DNase-DOC treat-
÷	1	ate st	at	ionary	10	<u>philus</u> 1503-4R	ment
1969	Coleman <sup>33)</sup>				<b>3</b> 7	B. amylolique-	log phase cells, lysozyme-
						faciens	DNase treatment in N <sub>2</sub> gas
							at 30°C
1970	van Dijk-Salkinoja	et al	L <sup>34)</sup>	)	96	B. licheniformis	log phase cells, lysozyme-
							Brij 58 treatment at O°C

DOC: sodium deoxycholate

このように増殖相、調製法によって膜結合ポリソームの割合が大きく変わる事が判る。

本章におりては、B. anyloliquefaciens KA 63 株より、蛋白合成治性を損いなりよう存条件下で細胞膜を 分画し、無細胞蛋白合成系を調製することを目的とした。

第2節 実験材料ずきび方法

使用菌株: 当教室にて純料分離された<u>B. anuyloligue-</u> faciens KA 63株を用いた。

細菌の培養: 基本培地は、可溶性澱粉 50g~、ペプ トン ちg、酵母エキス 2g、 KH2PO4 1.3g、 MgSO4 スH2O 0.5g、 CaCl2·H2O 0.1g を1 2水道水に溶かし、 2N KOHによって pH スロにしたものを用いた。 寒天 培地はこれに寒天15gを加えたものを用いた。

前培養日100 ml基本培地を溶れた500 ml マイヤーフ ラスコに寒天斜面培養より1日金耳植菌し、30℃にて1分 間100 ストロークの往復振盪機で16時間行った。本培養 は2.5 L 基本培地を溶れた5 L Marubishi jar fermenton に前培養100 ml を植菌し30℃にて撹拌300 rpm 通気1 WM で行った。 菌体量はHitachi spectrophotometer 10/で5 mm のセルを用11660 nm での濁度をそって表り した。

細胞膜調製法: 調製中すべての処理は0~4℃の間 で行った。 対数増殖期の菌体(Abbo: 1.0、約3時間培 養)を水で急冷し、連続遠心分離機 /2,000xg ご集菌し、 標準緩衝液I(10mM Tris-HCL緩衝液, pH F,b,10mM Mg (CH3 COO)2,60mM NH4Cl) にて洗浄した。 洗浄菌 体(4.3 g 理重量)を10%ショ糖を含む後衝液Iに懸濁し Jy50gyme 35 mgを添加し、懸濁液をゆるやかに60分間マケ ネチック、スターラーご撹拌した。 処理菌体を /2,000×g 10分の遠心分離によって回収し、10%ショ糖、6 mM pmercapto ethanol を含む緩衝液I 50ml で洗浄した。 洗 浄処理菌体を25ml の標準緩衝液I (100 m M Tris-HCl

緩衝液, pH 7.b、10m M Mg (CH3 COO)2, 60m M NH4 (l, 6m M β-mercaptoethanol)に徐々に懸濁して浸遙圧的 に破碎した。 細胞破砕液を12,000 × g 10分遠心分離 (、 再度、上清に沈澱を懸濁し破砕を完全に(た後、30,000×g 10分の遠心分離を行った。

*in vitroにおける* Jミノ酸の蛋白 区分への取込み: 使用した無細胞蛋白合成系にMatthaei とNirenberg<sup>23,24)</sup> の方法に準じて調製した。 特記しないかぎり完全反応混 夜(最終容量 500 ml 手たは 1 ml) の組成 (吸入下の通り) であった。 100 m M Tris-HCL 後衡液, pH F. 6, 10 m M Mg (CH3 COO)<sub>2</sub>, 60 m M NH4Cl, 6 m M β-mercapto ethanol, 2 m M ATP, 0.4 m M GTP, 10 m M phosphocreatine, 0,05 m M 名 T ミノ酸 20 種, 2 m Ci/ml<sup>14</sup> C T ミノ酸 混成

(クロレラ蛋白加水分解物で比活性日炭素原子 | mg 当) 40 m Gi)、40 µg/wl phosphocneatine kinase, 0,13~ 0,25 mg蛋白/ml精製膜画分、13~15 mg 蛋白/ml s-105 画分より成り、反応日30℃で行った。 1分間7°L1 ンキュベーションした後、14 C T ミノ酸混液を、ころに30 秒後に phosphocneatine kinase 芝加え反応を開始させた。 適当存反応時間後、10 ml の冷水中に試料を100 ml ずつ校 取し、30% trichloroacetic acid (TCA) 2 ml 芝加え反 応を停止させた。 90℃ 10分加熱し冷却後、グラスフィ 1 バーフィルターで分離し、フィルターを80 230分乾燥後そ の放射能を液体シンチレーションカウンター (Beckeman SL-250)で測定し、アミノ酸の蛋白区分への取込みとし た。

DNA, RNA, 蛋白の定量: 祖膜画分回の5% Brij 58またはsodium deoxycholate (DOC) で可溶化 した。 細胞の全量についてはJysozyme処理後、の5% DOCにて可溶化した。 DNA、RNA、蛋白の分画は Schmidt-Thamhauser-Schneider法<sup>35)</sup>によった。 RNA の定量は酵母RNA (半井化学KK.) を標準に or cinol 其<sup>30</sup>によった。 DNA はSalmon Sperm DNA (半井化 学K.K.) を標準に 260 nm の吸光により定量した。 蛋白 の定量は bovine serum albumin (Sigma)を標準に Lowry等の方法<sup>320</sup>によった。

実験材料: lysozyme 日近畿ヤクルトK.K製、HCア

ミノ酸混液オオびやglycerolは第一化学薬品KK製、グラスファイバーフィルターはMillipore QTY25を用いた。 ショ糖は半井化学薬品KKの平衡密度勾配遠心用特製試薬 を用い、他のものは京販の特級試薬を用いた。

第3節実驗結果

1、精製膜画分の分離.



Fig. 1-1. Fractionation of crude membrane fraction by discontinuous sucrose gradient centrifugation. One ml fractions were collected by aspirating the liquid from the bottom of the rotor tube after centrifugation at 10,000 ×g for 60 min. The figure of rotor tube shows the positions of the top, bottom and interphase.

●, DNA; O, RNA; △, protein;
 ▲, <sup>14</sup>C glycerol.

4℃ 60分のよいのzyme処理によって<u>B. amylolique faciens</u> KA 63株の対数増殖期細胞は、光学顕微鏡下におサる外見 上の変化は認められなかったが、浸透圧処理によって細胞 RNA の60% グS-30画分に回收された。 粗膜画分中の膜 結合 RNA および DNA 10 全細胞の これでれ/2~/6%、19 ~18 だ あった。 縦衝 液 I で粗膜 画 分 を 洗净 して そ、 そ はや RNAの遊離 10 認め られ たかった。 Fig. 1-1 に不連 続ショ 糖密度 重層 遠心分離によ る粗膜 画分の分析結果 を示 了。 実験材料 および う 法に示 了ように、粗膜 画分の 懸濁 液を 60%, 20% ショ 糖密度 層上 に 重層 し、 10,000×g 60分 遠心分離 し、 各分画 にっ い て DNA、 RNA、 蛋白の 分布 を調べ た。

脂質の分布を検討するため上記のLysozyme処理直前に HC glycerol (最終濃度 Zug/ml, 比治性 0.1/u Ci/ug) ご30℃ん分パルスラベル(大菌体力3得られた粗膜画分に ついて同様の操作を行った。 DNA、RNA、蛋白、液 射能の鋭いビークガん%、20%ショ糖界面に認めるれた。

この操作により界面に回収される膜画分を以後、精製 膜画分子を日単に膜画分とする。 生菌体の精製膜画分中 への混入は、直接プレートによる測定で10<sup>3</sup>/mlをこえる ことはなかった。 また顕微鏡下の直接観察でも桿状の菌 体様物は認めるれなかった。

2、膜系における蛋白合成の特性.

種々の反応系における蛋白合成の経時変化をFig、1-2 に示了。 粗膜系と精製膜系との活性を比較した時、膜画 分蛋白当りの活性は精製膜においては3~4倍に増加した。 膜画分存しでもら30目身、了ミノ酸取込み活性を示したが、



Fig. 1-2. Activities of crede and purified membrane fractions in incorporating <sup>14</sup>C amino acids into hot TCA-insoluble fraction. A, concentrations of crude membrane fraction, purified membrane fraction and s-30 in the reaction mixture were 1 mg, 0.2 mg and 1.4 mg protein/ml, respectively.  $\Box$ , crude membrane fraction and s-30; O, purified membrane fraction and s-30;  $\blacktriangle$ , crude membrane fraction without supernatant fraction;  $\oplus$ , s-30. B, concentrations of purified membrane fraction, s-30 and s-105 in the reaction mixture were 0.25 mg, 2.5 mg and 1.3 mg protein /ml,respectively. O, purified membrane fraction and s-30;  $\bigstar$ , purified membrane fraction and s-105;  $\bigstar$ , s-105 without membrane fraction. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

最終取込計量日低く、20分で反応は停止した。 一方、5-105 日膜画分が艾存しない状態で日蛋日合成治性を示さな かったが、膜画分と5-105の糸においては十分な活性を示 した。

		Addition or deletion	Inco	rp. (%)
			Exp. I	Exp. II
Complete			100	100
	-	membranes		0
- · · ·	-	s-105 or s-30	0	0
	-	ATP,GTP,PC* and PC*kinase	0	0
	+	KCN (100 µg per ml)	86	108
	+	chloramphenicol (100 µg per ml)	13	15
	+	g per ml) پ puromycin (50 µg per ml)	14	
	+	rifampicin (10µg per ml)	85	
	+	actinomycin D (10 µg per m1)	77	97

Table 1-2. Characteristics of <sup>14</sup>C amino acids incorporation by cell-free system.

Complete reaction mixture contained s-30 in Exp. I and s-105 in Exp. II. Reaction mixtures were incubated at  $30^{\circ}$ C for 60 min. The amounts of  $^{14}$ C amino acids incorporated into the hot TCA-insoluble fraction in complete reaction mixtures of Exp. I and Exp.II were 9,500 cpm per mL and 5,440 cpm per ml, respectively. \*Phosphocreatine

Table 1-2に無細胞蛋白合成系の主な特性を示す。 cytoplasma、区分であるS-30またはS-105とエネルギー依 結系が蛋白合成には必須であった。 生菌体における蛋白 合成は100 Jg/mlのKCNによって完全に阻害されるのに 対し、無細胞系による下ミノ酸の取込みはKCNK対して 不感受性であった。 またこの系における蛋白合成は、 actinomycin D, rifampicin にまって阻害されず、puromycin, chloramphenicolによって強く阻害された。 こ れるの結果は、この系における反応は既存のm RNA によ るde novo 蛋白合成である事を示す。 以後の実験においては、膜画分の蛋白合成能のみを調べるため膜画分とら105の系を用いた。



Fig. 1-3. Effect of pH on <sup>14</sup>C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction. Protein contents of purified membrane fraction and s-105 in the reaction mixture were 1 mg/ml and 1.6 mg/ml, respectively. Incubation was conducted for 60 min. For details see Fig. 1-2.



Fig. 1-4. Effect of Mg<sup>++</sup> concentration on the activity of <sup>14</sup>C amino acids incorporation into hot TCAinsoluble fraction. Incubation was conducted for 60 min. For details see Fig. 1-2.

Fig. 13日反応系のpHと蛋白合成活性の関係を示す。 pH R.4 と R.8 の間で最大活性を示した。 またMg#濃度

に対する依存性をFig. トチに示す。 蛋白合成活性はMg# 濃度の増加に従って増加した。

3. 膜画分における蛋白合成の制限因子



Fig. 1-5. Dependence of  $^{14}$ C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction on the amount of s-105. Reaction mixtures contained 750 µg protein /ml of purified membrane fraction and 3.4(O), 0.85(□), 0.43( $\Delta$ ) mg protein/ml of s-105. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

膜系におりる蛋白合成の速度並びに最大合成量を制限 している因子を解析するために以下の実験を行った。 Fig、1-5 に下ミノ酸尿込み変度と反応系の5-105の量の関 係を示す。 アミノ酸取込みの初発速度に反応系に添加された5-105の量の増加に伴い増大した。 反応速度は時間の経過とともに位下するが、少くとも60分は持続した。

Fig. 16 はアミノ酸の取込み量と反応系に加えられた 膜画分の量との関係を示す。 この系において合成された 蛋白の最終量は膜画分の量に比例して増加したが、一方取 込みの初発速度はほとんど影響されたか。た。

Fig. トヌに示すように、蛋白合成が停止した時期の反



Fig. 1-6. Dependence of  ${}^{14}$ C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction on the amount of membrane fraction. Reaction mixtures contained 2.5 mg protein/ml of s-105 and 500(O), 250( $\bullet$ ), 125( $\Box$ ) and 65( $\triangle$ ) µg protein/ml of purified membrane fraction. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

応系に新たに膜画分を添加したとき、蛋白合成の再開が認められた。 再開された蛋白合成の初発速度は0 time にお りるものとほぼ同じであった。 そして再添加された膜画 分の量に相当するだりの蛋白が新たに合成された。 これ は反応系中の膜画分の量によって最終的存蛋白合成量が決 定されるというFig. 1-6 の結果と一致し、5-105の活性は 実験条件下では少くとも60分は安定であった。



Fig. 1-7. Protein synthesis resumed by the addition of purified membrane fraction. Reaction was started with 650  $\mu$ g and 2.5 mg protein/ml of purified membrane fraction and s-105, respectively ( $\bullet$ ). After 35 min of incubation, 1.2 mg protein/ml of purified membrane fraction were added (O). Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

#### 第4節 考察

Table 1-2の結果ガネすように、この系での蛋白合成は 現入した生菌体の影響によるものではないことは次のよう な実験結果かる明ちかである。 i> 膜画分もしくはらいの 単独ではてミノ酸の取込み活性が全く認められたかった。 そして、両画分が蛋白合成には必要であった。 ii> ATP, GTP, ATP補給系が存在したい系においても活性は全 く認められず、エネルギー供給系を要求した。 iii> 無細 肥糸はKCN の存在下でも蛋白合成活性が損われることは なかった。

以上の結果より、<u>B</u> amyloliguefaciens KA63株から 精製分離された膜画分は cytoplasma 画分であるら105, エネルギー補給系より成る無細胞蛋白合成系におりて十分 店活性を有することが示された。 そして、この系におり る蛋白合成は膜画分に結合した既存のmRNAによるde novo 合成であると結論された。

活性のある膜画分を調製するため以下の点に留意した。 1) protease, ribonuclease の作用かる腹を保護するた め、すべての処理を4℃以下で行った。 22 物理的存破 壊を少くするため、膜の懸濁に温和存条件で行った。 32 再現性の点からも、高倍性存蛋白合成系を再構成するため、 種々の成分が稀釈されたいように細胞の浸透圧的破砕にお いても高濃度の細胞懸濁液のままで行った。

この系での最適pHia Matthaed とNirenberg の系 とほぼ同じえ8を示した。また、Mgt に対して顕著な依 存性を示したが、他の報告されている系<sup>27,38,39)</sup>に比べ低 いものであった。 5-105の濃度を増大させることによっ て蛋白合成速度が増加した。また、Fig. 1-2 にかりて膜 画分を含まない5-30のみでも10分間のアミノ酸取込み量は 膜画分を添加した系とほぼ同じ値を示し、cytoplasma 画 分によって反応速度が制限されるという結論に矛盾しなり。 一方、5-105の活性は長時間安定であり、最終的存蛋 白合成量は膜画分の量に比例した。 このことは膜画分を

反応初発時に加えても、30分後に加えた場合にも成立した。 以上の結果から、反応の経了は腹画分中の有効なーつ以上の成分の失活にまるものであるう。

## 第5節 要 約

1.) <u>B. amylolique faciens</u> KA 63 株の対教増殖期菌体 より分画した膜画分に cytoplasma 画分(S-105), エネ ルギー供給系、アミノ酸混液を添加することにより高活性 かつ安定した in vitro 蛋白合成系を調製した。

2) この系での蛋白合成日膜画方中の既存のmRNAによるde novo 合成と結論された。

3.) 蛋白合成速度は5-105濃度に依存し、取込まれた了 ミノ酸の最大量は膜画分の量によって制限された。

4.) S-105の4Cアミノ酸取込み活性は30℃60分間安定であった。

# 第2章 膜結合ホリソームにおける 蛋白合成

#### 第1節緒 言

高等動物分泌細胞において、リボソームの大多数が endo plasmic veticula と呼ばれる細胞内膜に結合してい ることが示され、無細胞系においてミクロソームとして回 収される<sup>40</sup>。 そして、膜結合リボソームにおける蛋白合 成は遊離リボソームに比べにるかに治性が高く重要である 事が in vitro<sup>42)</sup> において示された。

細菌におりても、1959年、Nisman<sup>43)</sup>、1961年Godson 等<sup>29)</sup>によって細胞膜の蛋白合成におりる重要性が示された。 また、細胞膜はDNAの複製の場としても重視され<sup>44,45)</sup>、 mRNAの合成も膜に近り所で行われる可能性が考えられ る。 Ganesan等<sup>44)</sup>は、25~30%のmRNAが腹区分に存 在することを示唆している。 Yudkin等<sup>30)</sup>は、ほとんど の細胞膜結合RNA ほりボソームRNAであるが、<sup>32</sup> $PO_4^{2}$ によるRNAの急速店ラベルは腹におりてより形然であり、 ラベルされたRNA ほDNAの塩基配列と類似している事 を示している。

本章におりては、膜結合ポリソームによる蛋白合成の 諸性質を明らかにし、膜とりボソームとの結合に関して検 討した。

# 第2節 実験材料および方法

りボソームの調製: 杉浦の方法<sup>400</sup> に準じて行った。 S-30画分を105,000 × g 60分遠心分離し、沈澱物を10m M Mg Cl2,500 mM NH4 Cl,6 mM β-mercaptoethanol 含有10 mM Tris-HCl 緩衝液,pH R,6 k 懸濁 し、4°C にこ一夜放置した。20,000 × g 20分の遠心分 離で凝集物を除去後、105,000 × g 90分遠心分離してり ボソームを再沈澱させた。 上清を捨て少量の同緩衝液で 沈澱の表面を靜分に洗い流してから(以下同様)、りボソ ームを同緩衝液に懸濁し、20,000 × g 20分, ずけひ" 105,000 × g 90分の遠心分離によって決浮した。 この 操作を3 回線返した。 10 mM Mg Cl2, 60 mM KCl, 6 mM β-mercapto ethanol 含有10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH R,6 の最少量にりボソームを懸濁(凍結保存した。

リボソームサブユニットの調製: 上で得られたりボ ソーム懸濁液を200 倍量の低Mg<sup>+</sup>殺衝液(10mM Tris-HU 殺衝液,pH R.6,0.1 m M Mg Cl<sub>2</sub>, 6 m M β-mercaptoethanol)に対して一夜遥析した。 Hitachi R P S 40 ローター遠心分離管に同後衝液で 5 ~ 20% ショ糖密度勾配 を作り(全容 4.5 ml)、これに遥析内液を重層し、25,000 rpm で 5.6 時間遠心分離した。 遠心分離管の底より 3 滴 ずっ分画し、260 mm での吸光を測定し、各ビーク区分を 集め 105,000×g 8時間遠心分離して得た沈澱を、 10m M Mg Cl2 含有 10m M Tris-HCl 緩衝液, pH 3,6 の 最少量に懸濁(凍結保存した。

Polyuridylic acid (poly(U))による蛋白白成系: 膜画分のかわりに 30 A260 U リボソーム、0.1 mg/ml poly(U) を用い、4C アミノ酸混液のかわりに 0.5 mG /ml <sup>14</sup>C phenylalanine(比珍姓: 3 82 mGi/mmole) を用いた。 他の成分、20種のアミノ酸ドATP,GTP. S-105の濃度にすべて前記の完全反応系のものと同一であ った。

反応系のショ糖密度勾配遠心分離による分析: Hitachi RPS 40ローター遠心分離管に緩衝液Iで調製した60%の0,5 ml 層上に30~15%ショ糖密度勾配を作り( 全容 4.5 ml), これに0,2 ml の反応液を重層し、4℃ で20,000 rpm 4時間遠心分離した。 遠心分離管の遮よ り名3滴ずつ分画し3 ml に木で稀软した。 260 nmの 吸光を測定し、マ5に/ml 中の熱TCA不溶性区分中の 放射後を前記の才法により測定した。

実験材料: poly(U) はSigma製, 它 phenylalanine は第一化学薬品 K. K. のものを用いた。他のものは市販の 特赦試薬を用いた。

#### 第3節 実 競 結 果

1、膜系に対するりボソームの影響



Fig. 2-1 A. Sedimentation pattern of ribosome and its subunits. Ribosomal suspension was centrifuged through a 5 -20 % linear sucrose gradient made up in standard buffer I at 25,000 rpm for 4 hr. Fractions of three drops were collected from the bottom and absorbance at 260 nm was measured after dilution to 3 ml. B. Stimulation of polyuridylic acid directed <sup>14</sup>C phenylalanine incorporation by ribosomes. O, reaction mixture with ribosomes and polyuridylic acid;  $\bullet$ , reaction mixture without polyuridylic acid;  $\Box$ , reaction mixture with 30 A<sub>260</sub> U of s-30 instead of ribosomes and polyuridylic acid. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 2.

精製リボソームのショ糖密度勾配中の沈降パターンを Fig. 2-1 A に示す。  $70 \le 0 = 1 < -1, 50 \le , 30 \le 0 = 77$ ユ=ットのセークに分れ、その他の成分は認められたかっ た。 またFig 2-1 B は poly (U) をかんれんとし AC phenylalanine の取込みでリボソーム活性を測定したも のである。 poly (U), リボソーム, Shot を含む系では 取込みが認められ、リボソームは十分な活性を示した。 ー方、poly(U)を除いた系では取込みかみろれないことから、リボソーム画分、S105画分ともにmRNAの現入は認めるれたかった。



Fig. 2-2. Stimulatory action of ribosomes on  ${}^{14}$ C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction. O, complete reaction mixture; 100 (D) and 20 ( $\triangle$ ) A<sub>260</sub> U of ribosomes were added to the complete reaction mixture. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

このりボソームを膜画分、S-105 を含む血 ひか 蛋白 成系に添加するとFig. 2-2 に示すように蛋白合成量の増加 がみられた。 添加りボソームの飽和曲線をFig. 2-3 に示



- くの紀知 曲線をFig. 2-3 に示 Fig. 2-3. Dependence of <sup>14</sup>C amino acids incorporation into hot TCAinaoluble fraction on the amount of ribosomes. Reaction mixture containing various amounts of ribosomes indicated was incubated for 60 min. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

了。 50 A260 U の添加で飽和しており、それ以上の量で 日顕著な増加はなかった。 以後りボソームの添加量は 100 A260 ひとした。

反応糸での蛋日合成が最終レベルに達した時期にりボ ソームを添加すると、蛋日合成の再開が認めるれた(Fig. 2-4)。 しかし、反応開始時に添加した場合に比べ、途 中添加した場合の方が最終合成量が低下した。



Fig. 2-4. Effect of ribosomes added to the complete reaction mixture on the  $^{14}$ C amino acids incorporation. O, complete reaction mixture;  $\Box$ , complete reaction mixture added with 100  $A_{260}$  U ribosomes at 0 time of reaction;  $\bullet$ , complete reaction mixture added with 100  $A_{260}$  U ribosomes after 30 min of incubation.

Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

#### 2、膜系での蛋白合成の開始反応

Trimethoprim (TMP) IF Met-tRNAf にformyl 基を供給するformyltetra-hydrofolate(fTHFA)の生 成を阻害する事により蛋白合成開始反応を阻害することが 知るれている<sup>49.48)</sup>。 TMP(50 μg/ml)を生菌体に対 して加えるとFig. 2-5 に示すようにアミノ酸の蛋白を分へ



Fig. 2-5(left). Effect of TMP on <sup>14</sup>C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction by intact cells. Reaction mixture containing 40 mg wet weight/ml of exponentially growing cells, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 10mM Mg( $CH_3COO$ )<sub>2</sub>, 60 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.05 mM each of 20 unlabeled amino acids, 2 µCi/ml of <sup>14</sup>C amino acids mixture was incubated at 30°C and radioactivity in hot TCA-insoluble fraction was measured as described in the Materials and Methods of Chapter 1. O, absence of TMP; •, presence of 50 µg/ml TMP at 0 time.

Fig. 2-6(right). Effect of TMP on <sup>14</sup>C amino acids incorporation. O, complete reaction mixture;  $\Delta$ , presence of 50 µg/ml TMP and 500 µg/ml fTHFA;  $\blacktriangle$ , presence of 50 µg/ml TMP. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

の取込みが阻害された。 しかし、 加 いたい蛋白合成系ご はFig. 2-6 に示すように、ほとんど変化かみるれなかった。 さらに、この系にリボソームを添加した場合(Fig. 2-ス, 10 m M Mg#)にも阻害は認めるれなかった。 以上の結果 は反応糸のMg#濃度が10mMの場合であった。 種々のMg#

# 濃度におけるTMPの効果をTable 2-1に示す。 Fig.14

Table 2-1. Effect of TMP and fTHFA on  $^{14}$ C amino acids incorporation by membrane fraction at different concentration of Mg<sup>++</sup>.

Mg <sup>++</sup> (	(mM)	<sup>14</sup> C ami	ino acids incorporated	during 60 m	in incubation (CPM/ml)		
		membrar TMP uni	nes plus s-105 from treated cells	membranes plus s-105 from TMP treated cells*			
		none	presence of TMP	none	presence of fTHFA		
5.0		800	200	480	1,000		
7.5		2,400	2,700				
10.0		5,750	6,500	3,750	4,660		
15.0		7,780	. •	•			

\* Cells were incubated with 500  $\mu g/ml$  of TMP at 30°C for 5 min just before lysozyme treatment, then s-105 was prepared as described in the Materials and Methods.

Concentrations of TMP and fTHFA in the reaction mixture were 50  $\mu\text{g/ml}$  and 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

の結果にみられたように、Mg<sup>#</sup> 濃度の位下にともない蛋白 合成量は減少したが、ケルMMg<sup>#</sup> 濃度におりてTMPによ 3阻害が認められ、fTHFAの添加によって回復した。 この現象はリボソームを添加した系におりても認められ、 取込み量は10mM Mg<sup>#</sup>の場合に比べ1/5に位下したが、 TMPによる阻害はfTHFAによってもとのレベルにまで回 復した(Fig. 2-7, 5mM Mg<sup>#</sup>)。

TMPによる阻害のMg+濃度に対する依存性は、S-30 画分によるふっだい蛋白合成系においても認められた。 膜系とS-30系での比較をTable 2-2に示す。 S-30系では 10mMMg+濃度で「THFAの添加により約50%の蛋白合成 阻害が認めるれたが、膜系では認めるれたかった。 また





Fig. 2-7. Dependence of  ${}^{14}$ C amino acids incorporation on formyl donor at different concentration of Mg<sup>++</sup>.

•, complete reaction mixture; O, presence of 100  $A_{260}$  U ribosomes;  $\Box$ , presence of 100  $A_{260}$  U ribosomes, 50 µg/ml TMP and 500 µg/ml fTHFA;  $\Delta$ , presence of 100  $A_{260}$  U ribosomes and 50 µg/ml TMP. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

Table 2-2. Effect of TMP and fTHFA on  $^{14}$ C amino acids incorporation by membrane fraction and s-105 or by s-30 at different concentration of Mg<sup>++</sup>.

System	Mg <sup>++</sup> (mM)	<sup>14</sup> C amino a	acids incorporated dur:	ing 60 min (CPM/ml)
		none	TMP	fthfa+tmp
Membranes	10	5,750	6,550	5,000
+ s-105	5	800	480	1,000
s-30	10	75,030	77,010	40,730
	5	5,390	3,070	5,700

Concentrations of TMP and fTHFA in the reaction mixture were 50  $\mu$ g/ml and 500  $\mu$ g/ml, respectively.



Fig. 2-8. Sedimentation analysis of the cell-free system of Reaction mixtures were incubated at 30°C protein synthesis. for 30 min under various conditions indicated below and were centrifuged through a 15 - 30 % linear sucrose gradient on a 60 % sucrose shelf at 20,000 rpm for 4 hr. Fractions of three drops were collected from the bottom and absorbance at 260 nm and radioactivity in hot TCA-insoluble fraction were measured. Reaction mixture used for 0 time control did not contain ATP, GTP, phosphocreatine and phosphocreatine kinase to prevent the starting of the protein synthesis. A, 0 min reaction; B, 30 min reaction; C, 30 min reaction with 100  $A_{260}$  U ribosomes; D, 30 min reaction with 100  $\mu$ g/ml chloramphenicol; E, 30 min reaction with 50  $\mu$ g/ml puromycin. Sedimentation is from right to left and the arrow shows the position of 70s ribosomes. O, A260; O, <sup>14</sup>C amino acids incorporated.

3、膜結合ポリソームによる蛋白合成

膜系での蛋白合成が膜結合ポリソームで行ちわれてい る事を明らかにするため、反応系の沈降分析の結果を下決 2-8 に示可。 30%と60%ショ糖界面に腹面分が回収され、 膜画分(分画番号 1-又)に30分の反応で放射能の増加が認 められた。 えるに腹画分と705 リボソーム画分の間、可 たわち遊離ポリソームに相当する画分(分画番号 ヌー 尿) には放射能の増加けほとんどみるれたかった。 たおりボ ソームモノマー およびサブニニット画分にも放射能の増加 がみられた(Fig. 2-8 B)。 りボソームを添加した場合、



リボソームを添加した場合、 Fig. 2-9. Sedimentation pattern of reaction mixture incubated for various periods indicated below. Centrifugation and fractionation procedures were as described in Fig. 2-8. A, 5 min; B, 15 min; c, 30 min; the amounts of <sup>14</sup>C amino acids incorporation were 5,500, 9,530 and 9,540 CPM/ml, respectively. The arrows show the positions of 70s, 50s and 30s ribosome and its subunits from the bottom. O,  $A_{260}$ ; •, <sup>14</sup>C amino acids incorporated.

その結果としてのA260の増加および膜画分での合成量の増加がみられたが、Fig. 2-8 Bと同じ結果であった(Fig. 2-8 C)。 またchloramphenical ド puro mycin の添加によって膜画分におチマ蛋白合成は完全に阻害された。

Fig. 2-9 に経時変化を示了。 5分, 15分と膜画分での放射能は全体の取込みに応じて増加した。 リボソーム モノマーおよびサブユニット画分におりる放射能とA260 も 同時に増加した。

高等動物細胞におりこは、60sサブユニットは小胞体膜に直接結合しており、これにmRNA、40sサブユニットが結合して膜結合ポッソームを形成している可能性が示唆されている<sup>(10)</sup>。細菌におりこも同様のことが想定されうるか以下の実験を行った。

但Mg<sup>+</sup>殺衝液に対して一夜流析したりボソーム懸濁液 のショ糖密度勾配中での沈降パターンをFig.2-10に示す。



Fig. 2-10. Sedimentation pattern of dissociated ribosomes. Suspension of ribosomal subunits was centrifuged through a 5 - 20 % linear sucrose gradient made up in the low Mg<sup>++</sup> buffer at 25,000 rpm for 5.6 hr. Fractions of three drops were collected from the bottom and absorbance at 260 nm was measured after dilution to 3 ml.

3/

505,305 カブユ=ットと完全に解離してりる事が認められた。 Fig. 2-11 に単離した各サブユ=ットの沈降パター ンを示す。 505,305 サブユ=ットとも単一のピークを示 し、505 サブユ=ットへの305 サブユ=ットの混入がわず か認められたが、各サブユ=ットとも分離された。 Fig. 2-12 にこれらのサブユ=ットを反応系に添加したときの 取込みを示す。 305 サブユ=ットのみを添加したとき、 取込みの促進が認められた。 505 サブユ=ットを単独で 添加した場合は、逆に取込みの抑制がみられた。 505, 305 サブユ=ットを1:10量になるようた添加したときは、

32



Fig. 2-11. Sedimentation pattern of fractionated ribosomal subunits. Centrifugation and fractionation procedures were as described in Fig. 2-10.



Fig. 2-12. Effect of ribosomal subunits on the cell-free protein synthesis. O, complete reaction mixture;  $\triangle$ , presence of 64  $A_{260}$  U 30s subunits;  $\Box$ , presence of 150  $A_{260}$  U 50s subunits;  $\bullet$ , presence of 32  $A_{260}$  U 30s and 75  $A_{260}$  U 50s subunits. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

わずかではあるガ促進的に働いた。 これより、膜結合や リソームによる蛋白合成の促進におりて、リボリームがモ ノマーの形で添加される必要はなく、30s サブユニットの みでその効果を現わすことが示された。

#### 第4節考察

第1章におりて用いた無細胞蛋白合成糸におりて、最終的に取込まれるアミノ酸の量は添加された膜画分の量に 比創することが示され、aytoplasma由来の5-105 画分の 活性は実験時間内では安定であった。したがって、反応 の停止は膜画分中の蛋白合成に関与する成分に原因するも のと考えられる。 すたわち、反応の進行にともたう膜か ろのりボリームの遊離、またはmRNAの崩壊などが想定 される。 りボリームの添加によって蛋白合成活性が回復 されることから、前者の可能性が強く、多量のりボソーム の添加によってりボソームは膜画分に部分的に取込まれ、 蛋白合成が進行するものと考えられる。 しかし存がる、 蛋白合成停止後(反応時間30分)にりボソームを加えた場 合にも反応初期(0分)かる添加したときと同様に蛋白合 成促進効果を示した。 このことからmRNA を令む蛋白 合成の因子は少くとも30分間の蛋白合成反応後も保存され たことを示す。

この系での蛋白合成の開始反応はMg+濃度が大きく影響することが示された。しかしたがうら30条にみるれる ようないたのplasma中での蛋白合成<sup>257,39)</sup>に比べ、膜画分 での蛋白合成はMg+濃度に対する依存度が低く、また10mM Mg+濃度において「THFAによって阻害されたかった。 しかし開始反応が蛋白合成を律速する現象はら30条、膜系 ともにちmMMg+濃度においてみるれ、TMPによる阻害 率は同程度であり、「THFAで回復した。」0mMMg+ 濃度においては蛋白合成の開始に必ずしも「Met-tRNA を必須とせず、<u>E. colic</u>の系と同様の結果<sup>38,47,48)</sup>を得た。

反応系のショ糖密度勾配中での沈降分析(Fig. 2-8) により、30分の蛋白合成反応におりて膜画分での放射能の 増加がみられた。 この増加はchloramphenicalやpuronuycin によって阻害され、膜結合ポッリソームにおけるde novの蛋 白合成を示すものと思われる。 遊離のポッソームを含む と考えるれるヌ~/2画分においてに放射能、A260ともに増 加はみちれなかった。 このことは反応中に腹からポリソームの遊離はほとんどなく、遊離ポリソームによる蛋白合成は無視出来るものと思われる。

モ)リボソームとサブユニットを含む18~25画分にお りて、放射能、A260ともに増加がみろれるが、これ日膜結 合ポリソームにおりて合成されたポリペアタイドガリボソ ームまたはそのサブユニットと結合した状態で遊離したこ とによると思われる。 また、遊離りボソーム画分中にお いて30sサブユニットが多く支占めるような沈降パターン を示し、これはポリソームの腹への結合が50sサブユニッ トを介してなされている可能性を示唆するものである。 もし、505サブユニットが腹と結合した状態でmRNAと も結合しているなろば30sサブユニットのりサイクルのみ で蛋白合成は進行するものと思われる。 すちわち、腹結 合ポリソームの蛋白合成促進には305 サブユニットのみの 添加で十分効果を示す事が期待される。 Fig. 2-12の結果 13.30s サブコ=ット単独で促進効果を示し、上記の仮説を 支持するものであった。 しかし、50, サブユニット単独 では阻害的に作用したがこの理由については明うかでない、

## 第5節 要 約

1.) 膜画分を含む無細胞蛋白合成系にりボソームを添加することにより最大蛋白合成量の増加が認めるれた。 り

ボソームを蛋白合成停止後に加えた場合でも蛋白合成の再開が認められたか、最終蛋白合成量回反応初期に加えた場合に比べ低下した。 また30s サブユニットのみをリボソ ームのかわりに添加しても同様の効果が認められた。 2、) 膜結合ポリソームと遊離ポリソームとでにMg\*濃度

に対する依存度において差が認められ、遊離ボリソームで 顕著であった。 何れの実験系においてもちかMMg\*濃度 では trimethoprimにより阻害されformugltetrahydrofolat により回復された。 10mMMg\*濃度ではtrimethoprim による阻害はみろれたかった。 リボソームを添加した膜 系においても同様の結果が得られた。

3.) 反応進行中の膜面分を含む蛋白合成系をショ糖密度 勾配遠心分離法によって分析した。 腹沈隣位置にA260の 吸光、14Cアミン酸に由来する放射能の極大が見られたが、 この放射能の取込み何反応系からATP、GTP、phosphocreatine, phosphocreatine & in aseの除去、また日 puromy cin & chloramphenicolの添加によって阻害された。

# 第3章 膜結合ポリソームにおける d-amylase自成

## 第1節緒言

高等動物分泌細胞を用いた研究で、特定の分泌蛋白が 主に小胞体の腹結合ポリソームにおいて合成される事が示 されている<sup>12-15)</sup>。 同様の事が細菌の細胞外酸素の合成に おいても考えられる。 最近、Cancedda とSchlesinger<sup>41)</sup> ほ<u>こoli</u>において periplasmic 酸素である alkaline phosphatase 合成中のポリソーム Gytoplasma 中に比べ 膜区分に多く含まれる事を示し、分泌酵素合成の場が膜に 局在することを示唆している。 しかし、 需細胞蛋白合成 系において既存のmRNA による特定の蛋白合成の証明ね、 mRNA の不安定性のため成功例 (ロ少()<sup>50,57)</sup>。 一方、安 定ちmRNA の存在の可能性が分泌酵素系において示唆さ れている。 Hirashima等<sup>52)</sup> (1<u>E. coli</u>の外膜に特異的な リポ蛋白を精製mRNA を用い無細胞系での合成に成功し た。 このmRNA の寿命(1).5分であった。

本章におりては、著者が使用した腹結合ポッソームを 含む無細胞蛋白合成系でd-amylastが合成される事を免疫 学的方法により明らかにした。

第2節 実験材料および方法

d-Amylase 低生産秩の分離: KA 63株の対数増殖期 の培養に streptonycin を 1 mg/ml になるよう加え一夜 30℃で培養後、同濃度の streptomycin を含む寒天培地に プレートし生育したコロ=-かるd amylase 生産の高いも のを選択し、streptomycin 耐性株(KA 63 str R)を得 た。

a-Amylase 低生産株はKA b3str R 支親株とし Adelberg 等の方法<sup>53)</sup>に準じ、N-methyl-N-mitro-N-mitrosoguanidine (NTG)犯理することにより得た。

KA 63 str R 株の対数増殖菌体を滅菌遠心分離管に集 の 200 Mg/mlのNTGを含む無菌水に懸濁し30℃で30分 処理し、洗浄後執鮮存基本培地に移し30℃で5~20時間培 養後、適当に綿紋して寒天培地にプレートした。 このプ レートを30℃で一夜培養して生育したコロ=一かろハロー (生産されたみamylase で培地中の澱粉が分解されコロ= 一の周囲に生じる透明部分)の小さいかきたになりまのを 選択した。 分離された株になたのかいでい耐性がある事に より KA 63株の変異様であることを確認した。

抗原抗体反応: 抗血清(阪大瘟研 北川教授供与) 17 bacterial d-amylase (長瀬 K.K., <u>B. subtilis</u> の液化 型結晶 d-amylase)を抗原にし、うさざかう調製した血清 を10倍稀釈したものであった。 拡散法<sup>540</sup>はスライドグラス上に塞天層を作り、所定の 位置に穴をあり 50~g/ml以上の抗原を含む溶液と抗血清 をそれぞれ 4~5 μl入れ一夜拡散沈降反応を行わしめ、 の8% Na Cl溶液にて稀釈、反応を停止させた。 一夜水 光し乾燥後、沈降物を了ミドブラックで染色した。

定量沈降反応557 はスセッツ遠心分離管中で行い遠心分離操作は1,000×g し分で行った。 抗血清の5 ml に種 々の濃度のd-amylast溶液の5 ml を加え37℃ 60分反応 させ、4℃で数日間放置し、沈降反応を完了させた。 遠 心分離後、沈澱を 0.85% NaCl 溶液で2~3回洗汗し、Q1 NNa OHで30分加款可溶化したものについて蛋白量を測定 した。

無細胞系での合成d-amylase 免疫沈降反応: 反応液 の105,000×g 40分遠心分離上清液 0.25 mlかけび精製damylase溶液(0.5 mg/ml) 0.25 ml を 0.5 ml の抗血 清と混合する。 37℃ 60 分反応後,4℃で数日間放置(、 沈降反応を完了させた。 沈降物を遠心分離にて回收し、 280 mm吸光物が遊離しなくなるまで、0.85% Nacl 溶液で、 少くとも3回院浄した。 この沈澱物の蛋白量と放射能を 測定した。

d-Amylaseの精製: Hagihara<sup>57)</sup> 社限<sup>58)</sup>の方法によった。 KA 63禄の培養濾液/ Lに対し 2M酢酸カルシウム溶液50ml を加え 2N Na OHで pH を6.5 に保ち、2022 以下で2時間液置した。 遠心分離により沈澱物を除去後、

1 M酢酸溶液で pHを6.2 にし、67℃ 30 分加熱処理した。 濾過後、酵素液は 400 U/ml程度に稀釈 C 0.3 飽知 (NH4) S04 を加え吸着用澱粉(とうも3 こし澱粉:可溶性澱粉: ハイフロスーパーセル=8:7:2)/g当り30,000 Uの 酵素を吸着させた。 澱粉層を大過剰の 0.3 飽和 (NH4) S04 溶液で洗浄後、最少量の 0.02 M Na2 H POy 溶液と40℃ にて 4 amylase 志溶出 させた。 溶出液に 0.01 Mになるように 酢酸カルシウムを加え 0.01 M酢酸カルシウム溶液に対し 透析 し Duo しな A-2 カラム (0.1 M 酢酸緩衝液, pH 6.0 で調製) を通過させた。 通過液を 0.8 飽和 (NH4) S04 で塩析 C. 沈澱を 0.02 M酢酸カルシウム溶液に溶力 C 0.02 M酢酸カルシウム 6 有 0.1 M酢酸緩衝液, pH 6.0 に対し 透析 (, 沈澱物 を除去し精製 4 amylase 溶液を得た。

名アロセスでの比活性、回収率をTable 3-1 に示す。 精製& amylase 1 mg. 12,500 ひに相当し、bacterial & amylase の値と一致した。

Process	Total activity (units $\times 10^{-4}$ )	Total volume (ml)	Specific activity (units/A <sub>280</sub> )	Yield (%)
Culture filtrate	60.0	500	47.6	100
Heat treatment	55.5	500	47.0	92.5
Starch adsorption and dialysis	39.7	800	400.0	66.2
Duoleit A-2	29.3	900	1,670	48.9
(NH,) SO, precipi	tation			
and dialysis	15.4	10	5,360	25.7

Table 3-1. Purification of  $\alpha$ -amylase

d Amylase 活性の測定: 1%可溶性澱粉 5 ml と. 0.1 M リン酸緩衝液, pH 6.0 2 ml を40 C に保ち、これ に酵素液/ml を加え、この時を 0 分とし経時的に 0.2 ml 採取 6 0.5 m M IS-KI 溶液 5 ml に加え Hitachi spectrophotometer 101 の 0.5 cm セルで 610 nm での吸光を 測定した。 反応の終点を A610:0.8 とし終点到達時間を オ分(2~10分になるようにする)、酵素稀釈倍数をfと した時、酵素活性(U/ml) = 150 f/t で表わした。

Protease 語性の測定: Hammarstein ミルクカゼ インをのハ N Na OH で満沛溶解し、のハ H U で p H ヌ.6 に調整後、10 m M Tris-HCL 緩衝液, p H ヌ.6 で 最終濃度 ノ % としたものを基質として用いた。 その他は全てShimmyo 等<sup>50)</sup>の方法に従った。

実験材料: 抗日 amylase 血清とその抗原として用い た bactenial of amylase (長瀬 K.K.) 旧阪大藤研, 北川教 授より供与された。 Fusidic acid 日三共 K.K.より供与さ れた。 酵素測定用の可溶性澱粉、Hammarstein ミルク カセインロMerck製の分析用試薬であった。 他のものは 市販の特級試薬を用いた。

#### 第3節実験結果

1、Fusidic acid による分泌酵素生産阻害。 Fusidic acid 旧蛋白合成のelongation factor G E 阻害する薬剤であるが、低濃度では酵素の分泌を特異的に阻害することが知るれているか。 Fig. 3-1 にKA 63株 K対するふひの かまびかひだかの よす多薬剤の効果を示 ア、



Fig. 3-1. Effect of fusidic acid on enzymes formation and protein synthesis. To the culture of 5 hr age in the basal medium, various amounts of fusidic acid were added and incubation was continued. Samples were yaken at intervals of 30 min and cell growth (A),  $\alpha$ -amylase formation (B) and protease formation (C) were analyzed. To the cell-free system of protein synthesis containing membrane fraction and s-105, various amounts of fusidic acid were added and radioactivity of <sup>14</sup>C amino acids incorporated into hot TCA-insoluble fraction was measured as described in the Materials and Methods of Chapter 1 (D). O, absence of fusidic acid;•, 5 µg/ml; □, 10 µg/ml;  $\Delta$ , 50 µg/ml;  $\nabla$ , 150 µg/ml fusidic acid.

10 μg/ml, 50 μg/ml の濃度では増殖はそれ程阻害されたり がみ amylase, protease の生産は少くともの分間はぼ完 全に阻害された。 しかしか かけい 蛋白合成肉 5 μg/ml, んしい /ml の濃度では全く阻害されず、生菌体に致死的に 働く 150 μg/ml の濃度ではじめて約50%の阻害が認める れた。 無細胞反応系のショ糖密度勾配中での沈降パター ンをFig. 3-2に示す。 Fig. 2-8, Fig. 2-9と比較したと え、んしい /ml, 50 μg/ml のfusidic acid 存在下で、遊離 ポリソームが対応するメ~18 画方に放射能のじ-2が認め ろれた。



Fig. 3-2. Effect of fusidic acid on sedimentation pattern of the cell-free system of protein synthesis. Reaction mixtures were centrifuged through a 15 - 30 % linear sucrose gradient on a 60 % sucrose shelf at 20,000 rpm for 4 hr and fractionated as described in the Materials and Methods of Chapter 2. A, 15 min reaction with 10  $\mu$ g/ml fusidic acid; B, 15 min reaction with 50  $\mu$ g/ml fusidic acid; the amounts of <sup>14</sup>C amino acids incorporated into hot TCA-insoluble fraction were 1,600 and 1,400 CPM/ml,

respectively. Sedimentation is from right to left and the arrow shows the position of 70s ribosomes. O,  $A_{260}$ ; •,  ${}^{14}C$  amino acids incorporated.

2. a Amylase低生産株の性質.

d-Amylase が腹におりて合成されることを比較検討す るためd-Amylase 生産の値下した変異株を分離した。 これろのうちd-amylase, proteaseの生産が同時上値下し た株の中には分泌機構あるりは腹の変異様の存在が期待されるが、Table 3-2 にその諸性質を示す。 AL 222,

Table 3-2. Characteristics of mutants.

Cells were cultivated at 30°C for 24 hr in the basal medium and enzyme formation and cell growth were measured. Halo formation and resistance to environmental stress were observed after 24 hr of plateculture.

Strain	KA63strR	AL222	AL233	AL267	AN 302	AN 801
Cell growth (A <sub>660</sub> )	6.6	4.3	7.2	3.0	3.0	3.0
Enzyme formation						
α-Amylase (U/ml)	460	26	ND	ND	ND	ND
Protease (U/ml)	82.3	418	373	158	487	
Halo formation	++	+	+	+	-	-
Resistance to enviromental stress	k				5	
DOC (0.05 %)	-	+	+	+	. +	
edta (3×10 <sup>-3</sup> m)	+	±	Ŧ	-	-	-
pH 4	+	+	-	-	-	

ND: not detectable.

\* Cell growth was checked after 24 hr of culture on agar plate containing the basal medium added with DOC or EDTA as indicated or HCl to pH 4; +, well growth; +, variable; -, no growth. Other experimental methods were as described in the Materials and Methods.

A L 233, A L 267 の3禄は少量のみ amylase を生産した が、AN 302、AN 801 の2株は全く生産が認めるれなか った。 菌体当りの protease生産量もAN 302 を除き同時 に低下がみられた。

膜の変要に対して影響する事が知るれているDOC。

EDTA<sup>60</sup>, pH4<sup>62</sup> に対する耐性を調べたが、DOCに関 して反DOCが培地中の澱粉と結合することによってその 初果が失われる事がわかっており、dramylaseの生産量の 高いKA 63秩以外白増殖可能となった。 EDTA, pH 4に対する耐性もdramylaseの生産量と相関した結果を示 し、これるが膜の変異を反映するものかどうか旧マらに検 討を要する。 しかし、Fig. 3-3 に示すようにAL 222 株 でdramylaseは 1/20, protease ほ 1/3 K生産量が同時に 近下した。



Fig. 3-3. Time course of  $\alpha$ -amylase and protease production by KA63 and AL222. Cells were cultivated at 30°C with shaking and cell density and enzyme activities were measured periodically. O, cell density;  $\Delta$ ,  $\alpha$ -amylase activity;  $\Box$ , protease activity; open symbols, KA63; closed symbols, AL222.

3、 d-Amylaseの免疫学的性質

市販結晶d amylase (bacterial d amylase)を抗原と して調製された抗amylase 四清に対するKA63d amylase の抗原性を検討した。



Fig. 3-4. Double diffusion test for anti-amylase serum. Four ml of 1.5 % agar in 50 mM veronal buffer, pH 8.6 was charged on a microscopic slide. Four to five  $\mu$ l of antiserum was placed in the center well, and same volume of various solutions indicated below was placed in other wells. Diffusion was carried out overnight to form arcs of specific precipitates. The slide was washed with 0.85 % NaCl solution for 24 hr to remove the remaining soluble protein, then dried and stained with amido black. 1,3,5, 100 µg/ml of KA63 α-amylase; 2,4, 100 µg/ml of bacterial α-amylase; 6, lysate of KA63 cells by osmotical disruption after lysozyme treatment as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

Fig. 3-4にbacterial a-amylase とKA 63 a-amylase の拡散沈降試験を示す。 この抗 amylase血清日西 aamylase K対し単一の連続した沈降線を形成したが、 KA63株の細胞破砕液に対しては沈降反応を示さたかった。



Fig. 3-5. Quantitative precipitation curves for anti-amylase serum. A 0.5 ml of  $\alpha$ -amylase solution was mixed with the same volume of antiserum, then incubated at 37°C for 60 min and stored at 4°C for a few days. The amount of protein in immuno-precipitates was determined. <sup>O</sup>, KA63  $\alpha$ -amylase;  $\Delta$ , bacterial  $\alpha$ -amylase.

Fig. 3-5 に定量沈降及応を示す。 Bacterial d- amylase, KA b3 d- amylase ともに同様の沈降線が得 3 れ、抗原が120  $\mu g/m l$  のとき沈降量日最大値を示した。 抗体過剰の領 域(抗原が120 $\mu g/m l$  以下)でほずべての抗原は免疫沈降 物中に回収されるはずである。

この抗 anylase血清はFig. 3-6 に示 すように AL 222 によって生産これる d anylase とも正常に沈降反応を起 した。 ただし、この時の酵素溶液」は22時間培養の濾液を



Fig. 3-6. Double diffusion test for AL222  $\alpha$ -amylase. Method was as described in Fig. 3-4. 1,3,5, 50. $\mu$ g/ml of KA63  $\alpha$ amylase; 2,4,6, AL222  $\alpha$ -amylase solution, as 20 times concentrated as that in culture filtrate of 24 hr age by 0.7 saturating (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation after heat treatment according to procedures in the Materials and Methods of Chapter 3.

20倍濃縮したものを用いた。 Fig. 3-7に抗原過剰領域( 抗原ガ120,ug/ml以上)におチョKA63,AL222 丙.



Fig. 3-7. Neutralization of  $\alpha$ amylase with anti-amylase serum. A 0.5 ml aliquot of enzyme solution containing 250 U was incubated with various amounts of the antiserum at 40°C for 60 min. The remaining activity was determined. Both enzyme solutions were same as used in Fig. 3-6. O, KA63; O, AL222.

damylaseの抗amylase血清による中知曲線を示す。同 (「勾配で治性は中和された。以上の結果は両酵素間に抗 原性、抗原構造当りの酵素活性に差異はなり事を示してい る。

4、膜結合かりツームにおけるd-amylase合成

これろの事実をもとに、無細胞系において合成された 蛋白区分中のdramylase量を免疫学的に測定した。特異

Table 3-3. In vitro synthesis of a-amylase.

The amount of radioactivity in hot trichloroacetic acid-insoluble material was measured after 60 min incubation at 30°C in complete reaction mixture. Reaction mixture of s-30 cell-free system contained 1.4 - 1.5 mg protein per ml of s-30 extract instead of membranes and s-105 extract.

The amount of radio-

Strain	Ехр.		activity in hot tri- chloroacetic acid- insoluble material (A) (cpm/ml)	The amount of radio- activity in immuno- precipitate (B) (cpm/ml)	Recovery (B/A) (%)
KA63	. 1	membrane	15,080	2,600	17.2
		s-30	49,810	360	0.7
	2	membrane	9,890	1,600	16.2
		membrane*	4,050	2,560	63.2
		s-30	35,780	600	1.7
AL222	3	membrane	18,100	ND**	-
		s-30	59,360	ND**	-

\* Membranes from 6 hr culture cells in maximal producing phase of  $\alpha$ -amylase.

\*\* Not detectable.

的店免疫沈降物中への不溶性物質の混入を防ぐために、反応終了後、反応混液を105,000×g 40分の遠心分離を行いその上清区分を試験に用いた。熱TCA不溶性区分並 いた免疫沈降物中への放射能の取込みをTable 3-3 に示す。 遊離ポリソームによる蛋白合成系として、 膜画分と 5-105 の代りに 5-30を用いた条を用いた。

KA 63株か3の膜画分を含む無細胞系においては相当 量の放射能が免疫沈降物中に認めるれ、熱TCA不溶性区 介への全取込みの16、2~17、2%に達した。 さらに danylase 比生産速度最高期(6時間培養)の菌体か3の 膜画分を用いた時、免疫沈降物中への放射能の回收に反取 込みの63、2%に達した。 しかし、S-30系においてに反取 込みの0.7~1×8%程度の放射能しか免疫沈降物中に認め られたかった。

ー方、AL222の対数期の菌体から調製した系においては、膜画分を含む蛋白合成系、S-30系ともに十分な蛋白 合成活性を持っにもかかわらず、免疫沈降物中への放射能の取込みは認められなかった。

#### 第4節 考 察

低濃度のfusidic acid によりd-Amylase, protease の生産は阻害されたが、montho での蛋白合成は阻害され たかった。 しかし、ショ糖密度勾配中での沈隣分析にお いて、遊離ポリシーム画分に放射能の分布が認められた。 これがいいのでの分泌阻害の直接原因かどうかは明らか でなり。

of Amylase 生産の変異株としては、d- amylase の 構造遺伝子と隣接し、生産量のみを支配する遺伝子による ものかと、構造遺伝子との連環がなくof annylase, protease の生産量を同時に変化させるものが存在することが知られ ているちんんなう、後者のようなものが分泌に関する変異株で ある可能性がある。 一方、KA63株とAL222株の生産 するof amylaseは免疫学的に同じであり、抗 amylase 血 清による中和反応においても同一の抗原性を示し、両酵素 ともに比治性は変らないものと考えられる。 これより、 AL222 株ifd anylase の構造遺伝子が変要したものでは なく、protease の生産量も同時に低下することかろ、膜 の分泌機構が変異したものと考えられる。 同様の変異日 他にも報告されており、oramylase, proteaseのみなら ず鞭毛の合成も同時に腹の変異にまって変化している(4)。 习卡 of anylaseとproteaseの生産を同時に促進する pap変 要においては sodium dodecyl sulfate サル電気泳動で膜 蛋白の一っか欠損していることが示されている500。

無細胞反応系でのみannylase 合成の免疫学的測定法においても、KA 63株か3調製した膜系において日合成之れた蛋白の15%以上がみannylase であり、S-30系においては 1%程度でしかながった。 このことはみannylase

合成の場が腹に局在している事を示している。 また530 画分中への腹画分の混入の可能性を考慮すると、530系で のみ amylase 合成は無視出来るものと思われる。 えら にみ amylase 高生産期の菌体より調製した腹画分におり こね合成蛋白の60%以上ガム amylase 起源のものであっ た。 このこと(Q 増殖過程におり)てみ amylase のmRNA は崩壊から保護され、腹画分に蓄積される傾向にあるもの と考えられる。 またAL222株からの無細胞系におり における表現型と矛盾したい結果を得た。 免疫学的方法 による無細胞系での生産物中のみ amylase 測定法に十分 信頼性のあるものと考えられる。

# 第5節 要 約

1.) en vitro での蛋白合成には影響しない濃度のfusidic acid (loug/ml)にまって of anylase, protease の生産 が阻害された。

2.) dAmylase生産量の近下した変異株AL 222 にかり こ proteaseの生産量も同時に近下していることが認められ た。 AL 222 練の生産するdamylase 日免疫学的にも KA 63株のdamylaseと変化は認められなかった。

3.) 腹画分支含克蛋白合成系を用りて14Cアミノ酸を取 込ませその生成物を抗amylase 血清を用りて分析した。

全放射能取込みの16~178が抗amylase血清ご沈澱した。 さろに6時間培養の菌体力ら得た腹画分を含む合成系では 全取込みのかが抗血清によって沈澱した。 & Amylase 生産の低下したAL 222 株か3調製した膜系、KA 63株ま たねAL 222 株か3の5-30系ごはともに抗amylase 血清 反応性の放射能はみ3れなかった。 以上の結果かる、A amylase が膜結合ポリソームにおりて合成されてりると 結論した。

#### 総括および結論

細菌の生産する細胞外酵素合成に関する研究は多くを これており、腹結合ポリソームにおいて合成されると考え られている。 しかし単離された細胞腹を用いた無細胞系 での研究はなく、高等動物分泌細胞での研究結果があるに すぎない。 著者がここに取上サた<u>B</u> anyloliguefaciens KA 63棟 la 4 anylase を多量に生産し、当研究室でその 生産機構に関し研究されたものであり、そのmRNA は安 定であるとの一応の結論を得ている。 そこで、単離細胞 腹による無細胞蛋白合成系を調製し、 d- anylase が腹結 合ポリソームにおいて合成されることを明ちかにしたのが 本論文であり、ここで得られた結果は次のように総括結論 される。

第一章では、対数増殖菌体を低温りゾチーム処理、ショ糖密度重層遠心分離法により、蛋白合成活性を有する腹 画分を得た。 この腹画分は cytoplasma 画分, エネルギー補給糸、アミノ酸混液を添加することにより安定存 *in vitro*蛋白合成活性を示した。 この糸での蛋白合成石、 ATP、GTP、phosphocreatineを要求し、腹画分また はS-105単弦では活性を示えず、KCN によって阻害され なりことから、完全な無細胞糸であると結論された。 こ の蛋白合成は trans Lation の阻害剤である chloramphenicd puromycin によって阻害され、transcription の阻害

削であるactinomycinD、rifampicinにまって影響され たいことまり、系に既存のmRNAにまるde novo 合成 であると結論した。 さらにこの系での蛋白合成速度は5-んち濃度に秩存し、合成された蛋白量は膜画分の量にま。 て制限されることが明らかとなった。

第2章では、この無細胞蛋白合成系にリボソームを追加することによって蛋白合成が促進される事を示し、合成が停止した後に加えても効果がある事を明ちかにした。 この結果から、蛋白合成停止後もmRNA 日比較的安定に保存されるとの結論を得た。 反応系のショ糖密度勾配速 心分離分析より、蛋白合成旧主に腹結合ポリソームにおり て存されることが認められ、らいち中にmRNAを含まな い事実から、この系に酸結合ポリソームによる無細胞蛋白 合成系であることが明ちかになった。 反応系に単離した 305 リボソームカブユ=ットを添加することにより蛋白合 成量 同増大したが、505 サブユ=ットで、 切磨害的に作用し た。

第3章では、膜結合ホッリソーム系による全合成蛋白の ル~18%が抗amylase 血清と反応したが、S-30を用りた 遊離ホッリソーム系ではのマ~人又%しか反応せず、ひ Amylase合成が腹で行われる事を示した。 みた、ロー amylase 高生産期の菌体から調製した膜面分におりて は全合成蛋白の60%以上が抗amylase 血清と反応したこ とから、of Amylase のmRNA は細胞の増殖の過程に

おいても崩壊より保護され腹に蓄積されるものと思われた。 また、A-Amylase 生産の位下したAL 222 株かるの無細 胞蛋白合成系においては、抗 amylase四清との免疫沈降 物中への放射能の取込みが検出されず、 in vivo におり る表現型と一致し、免疫反応による in vitro合成 d-Amylase の測定法な信頼されつると判断した。

1) Pollock, M.R.: "The Bacteria" Academic Press, 4, 121 (1962).

2) 岡崎, 照井: 醗工, 45, 1147 (1967)

献

え

3) 岡崎, 新名, 照井: 酸工, 也, 1000 (1968)

4) 木下, 岡田, 照井: 酸工, 45, 50% (1967)

5) 木下, 岡田, 照书: 醗工, 4b, 42x (1968).

- 6) Both, G.W., Mclnnes, J.L., Hanlon, J.E., May, B.K., Elliott, W.H.: J. Mol. Biol., <u>67</u>, 199 (1972).
- 7) Nomura, M., Hosoda, J., Yoshikawa, H.: J. Biochem. (Tokyo) , <u>45</u>, 737 (1958).
- 8) Coleman, G., Elliott, W.H.: Biochem. J., <u>95</u>, 699 (1962)
- 9) May, B.K., Elliott, W.H.: Biochim. Biophys. Acta, <u>157</u>, 607 (1968).
- 10) Smeaton, J.R., Elliott, W.H.: Biochim. Biophys, Acta, <u>145</u>, 547 (1967).
- 11) Sargent, M.G., Lampen, J.O.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., <u>65</u>, 962 (1970).
- 12) Andrews, T.M., Tata, J.R.: Biochem. J., <u>121</u>, 683 (1970).
- 13) Cioli, D., Lennox, E.S.: Biochemistry, <u>12</u>, 3211 (1973).
- 14) Resman, C.M.: J. Biol. Chem., <u>244</u>, 4308 (1969).
- 15) Takagi, M., Tanaka, T., Ogata, K.: Biochim. Biophys. Acta, <u>217</u>, 148\_(1970).
- 16) Palade, G.E., Siekevitz, P.: J. Biophys. Biochem. Cytol., <u>2</u>, 171 (1956).
- 17) Redman, C.M., Sabatini, D.D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. , <u>56</u>, 608 (1966).
- 18) Bylioni, C., Bleiberg, J., Zanderer, M.: Nature New Biol. , <u>232</u>, 8 (1971).

- 19) Hendler, R.W., Banfield, W.G., Tani, J., Fuff, E.L.: Biochim. Biophys. Acta, 80, 307 (1964).
- Abrams, A., Nielsen, L., Thacmert, J.: Biochim. Biophys. Acta, <u>80</u>, 325 (1964).
- 21) Schlessinger, D., Marchesi, V.T., Kwan, B.C.K.: J. Bacteriol., <u>90</u>, 456 (1965).
- 22) Schlessinger, D.: J. Mol. Biol., 7, 569 (1963).
- 23) Matthaei, J.H., Nirenberg, M.W.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 1581 (1961).
- 24) Nirenberg, M.W., Matthaei, J.H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., <u>47</u>, 1588 (1961).
- 25) Kozak, M., Nathans, D.: Bacteriol. Rev., <u>36</u>, 109 (1972).
- 26) Zubay, G., Chambers, D.A.: Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., <u>34</u>, 753 (1969).
- 27) Schweiger, M., Gold, L.M.: Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., <u>34</u>, 763 (1969).
- 28) Weibull, C.: J. Bacteriol., <u>66</u>, 696 (1953).
- 29) Godson, G.N., Hunter, G.D., Buther, J.A.V.: Biochem. J., <u>81</u>, 59 (1961).
- 30) Yudkin, M.D., Davis, B.: J. Mol. Biol., <u>12</u>, 193 (1965).
- 31) Aronson, A.: J. Mol. Biol., <u>15</u>, 505 (1966).
- 32) Gonzalez, N.S., Goldenberg, S.H., Algranti, I.D.: Biochim. Biophys. Acta, <u>166</u>, 760 (1968).
- 33) Coleman, G.: Biochem. J., <u>112</u>, 533 (1969).
- 34) van Dijk-Salkinoja, M.S., Stoof, T.J., Planta, R.J.: Eur. J. Biochem., <u>12</u>, 474 (1970).
- 35) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., <u>164</u>, 747 (1946).
- 36) Mejbaum, W.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., <u>258</u>, 117 (1939).

÷

- 37) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forrs, A.L., Randall,
  R.J.: J. Biol. Chem., <u>193</u>, 265 (1951).
- 38) Eisenstadt, J., Lengyel, P.: Science, <u>154</u>, 524 (1966).
- 39) Salas, M., Miller, M.J., Wahba, A.J., Ochoa, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., <u>57</u>, 1865 (1967).
- 40) Palade, G.E., Siekevitz, P.: J. Biophys. Biochem. Cytol., <u>2</u>, 671 (1956).
- 41) Siekevitz, P., Palade, G.E.: J. Biophys. Biochem. Cytol., <u>7</u>, 619 (1960).
- 42) Henshaw, E.C., Bjarski, T.B., Hiall, H.H.: J. Mol. Biol., <u>7</u>, 122 (1963).
- 43) Nisman, B.: Biochim. Biophys. Acta, <u>32</u>, 18 (1959).
- 44) Ganesan, A.T., Lederberg, J.: Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>18</u>, 824 (1965).
- 45) Smith, D.W., Hanawalt, P.: Biochim. Biophys. Acta, <u>149</u>, 519 (1967).
- 46) 杉浦: "細胞分画法" 岩波著店 , 288 (1932).
- 47) Shih, A.Y., Eisenstadt, J., Lengyel, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., <u>56</u>, 1599 (1966).
- 48) Horikoshi, K., Doi, R.H.: Arch. Biochem. Biophys., <u>122</u>, 685 (1967).
- 49) Cancedda, R., Schlesinger, M.J.: J. Bacteriol., <u>117</u>, 290 (1974).
- 50) Klagsbrum, M., Rich, A.: J. Mol. Biol., <u>48</u>, 421 (1970).
- 51) Bashar, S.A.M.K., Parish, J.H., Brown, M.: Biochem. J., <u>123</u>, 355 (1971).
- 52) Hirashima, A., Wang, S., Inouye, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., <u>71</u>, 4149 (1974).
- 53) Adelberg, E.A., Mandel, M., Chen, G.C.C.: Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>18</u>, 788 (1965).

- 54) Ouchterlony, O.: Acta. Path. Microbiol. Scand., <u>26</u>, 507 (1949).
- 55) Kabat, E.A., Mayer, M.M.: "Experimental Immunochemistry" Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 2nd Edition, 22 (1961).
- 56) Yoneda, Y., Yamane, K., Maruo, B.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 765 (1973).
- 57) Hagihara, B.: Ann. Rep. Scient. Works Fac. Sci. Osaka Univ., <u>2</u>, 35 (1950).
- 58) Shinmyo, A., Okazaki, M., Terui, G.: J. Ferment. Technol., <u>46</u>, 733 (1968).
- 59) Tanaka, N., Kinoshita, T., Masukawa, H.: Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>30</u>, 278 (1968).
- 60) de Zweig, R.N., Luria, S.E.: J. Bacteriol., <u>94</u>, 1112 (1967).
- 61) Hirota, Y., Mordoh, J., Jacob, F.: J. Mol. Biol., <u>53</u>, 369 (1970).
- 62) Kent, C., Lennarz, W.J.: Biochim. Biophys. Acta, <u>288</u>, 225 (1972).
- 63) Yuki, S.: Biochem. Biophys. Res. Comm., <u>31</u>, 182 (1968).

60

54) Sekiguchi, J., Takada, N., Okada, H.: J. Bacteriol., <u>121</u>,
 688 (1975).