

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

枯草菌細胞膜による α -Amylase
の *in vitro* 合成

二 宮 保 男

ま え が き

現在、微生物の工業的利用は歴史的に積み上げられた経験に基づきものが中心的役割を果たしており、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。一え、急速に進歩しつつある生物学は多くの醗酵現象の科学的な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 Bacillus amyloliquefaciens より無細胞蛋白合成系を調製し、膜画分において α -amylase が合成されることを証明するのを目的とし、同時に膜結合ホリソームにおける蛋白合成の特徴を明らかにすることを試みた。ここに省みるとき、まだ解明されねばならない問題を多分に残しており、今後その究明に努力する所存である。

1975年 12月

著者

目 次

頁

	結 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性質	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ける蛋白合成	20
第 1 節	緒 言	20
第 2 節	実験材料および方法	21
第 3 節	実 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	膜結合ポリソームにおける α -amylase合成	37
第1節	緒言	37
第2節	実験材料および方法	38
第3節	実験結果	41
1	Fusidic acid による分泌酵素生産阻害	41
2	α -Amylase 低生産株の性質	44
3	α -Amylase の免疫学的性質	46
4	膜結合ポリソームにおける α -amylase合成	49
第4節	考察	50
第5節	要約	52
	総括および結論	54
	文献	57

緒 論

微生物の生産する分泌酵素、 α -amylase は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、古くから研究されてきた。他の細胞外酵素と共通してシスチン含量が少く¹⁾、この蛋白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。

またこれら細胞外酵素生産様式がいずれも増殖非運動型、すなわち増殖速度が低下した後も活発に酵素が生産され、一般の蛋白合成、すなわち細胞増殖量に比例する酵素合成とは異った型を示す点で特徴的である。この様な酵素合成の様式は Aspergillus niger の glucamylase²⁾、acid proteinase³⁾、Bacillus amyloliquefaciens の α -amylase⁴⁾ 生産において顕著である。B. amyloliquefaciens KA 63 による α -amylase 生産機構に関しては actinomycin D による阻害実験、アミノ酸・ポリミン塩基飢餓実験⁵⁾、速度論的解析⁴⁾ などにより、このような生産型を示す主要因が研究され、 α -amylase に特異的な mRNA の安定性によるものと推定された。また Both 等⁶⁾ は B. amyloliquefaciens の proteinase の mRNA が安定であることを示唆している。

一方、野村等⁷⁾ は α -amylase の分泌機構は α -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いる。

B. amyloliquefaciens の研究においても、細胞外酵素は細胞内にその活性が認められず^{8,9,10)}、酵素は膜で合成され 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、Bacillus licheniformis における penicillinase の分泌機構の仮説¹¹⁾とも一致する。

以上の推定から細胞外酵素である α -amylase 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 α -amylase 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る。

細胞から酵素を分泌する現象は環境因子により一時的に影響を受ける微生物が、その環境を自らの力によって変える唯一の手段であり、運動と並んで重要な役割を持つものである。細胞外酵素が分泌という目的からみて、外からの影響に最も敏感な膜において合成されるという考えは合理的で受け入れやすいものである。

このような考えは高等動物の分泌組織細胞においては一般的となっている¹²⁻¹⁵⁾。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¹⁶⁾、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¹⁷⁾。Andrews 等¹²⁾ は分泌細胞の膜結合ポリソームは遊離ポリソーム、あるいは非分泌細胞の

膜結合ポリソームに比べ、安定かつ高活性の蛋白合成能を持つと報告している。また Bylioni 等¹⁸⁾は immunoglobulin のみを生産するネズミの myeloma 細胞を用いリボソームの 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 と 40s 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。

細菌においても膜結合リボソームの存在は電子顕微鏡観察によっても確認されており¹⁹⁻²¹⁾、それらの生化学的性質もある程度明らかにされている²²⁾。

本論文においては、B. amylobliquefaciens KA63 株を用い、 α -amylase 合成が細胞膜で行われていることを明らかにするために、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、 α -amylase の形成を α -amylase に特異的な抗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 B. amylobliquefaciens KA63 より、低温 lysozyme 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、膜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

成が停止してからも有効であることを示し、膜面分での
蛋白合成系において 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いて 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、 α -
amylase が合成されていることを免疫学的方法により明らか
にした。 α -amylase 生産量の低下した変異株 AL 222
から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 α -amylase の生産が認められ
ないことより、この免疫学的方法は α -amylase の検出に有
効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

1961年、Nirenberg と Matthaei^{23,24)} によって Escherichia coli から高活性かつ安定な蛋白合成系が調製されて以来、in vitro における蛋白合成の研究は E. coli の系において発展し、その詳細が明らかにされてきた。この系では mRNA として RNA phage MS2 などの RNA を用いることが可能であり、その RNA は3種類の蛋白しかコードされていないという利点がある²⁵⁾。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な蛋白を合成させる系も Zubay 等によって開発されている^{26,27)}。

一方、蛋白合成における個々の段階の研究の他に、細胞内における蛋白合成場に関しても研究がなされてきた。1963年、Schlessinger は Bacillus megaterium を用い、細胞膜部位において、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ら、細菌の膜結合ホリソームに関して研究がなされて来た。Bacillus 属についての研究を表示すると Table 1 の通りである。

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

Reference	RNA in membrane (%)	Strain	Condition of preparation
1953 Weibull ²⁸⁾	15	<u>B. megaterium</u> KM	
1961 Godson et al ²⁹⁾	50	<u>B. megaterium</u> KM	early log phase cells, lysozyme treatment at 30°C
1963 Schlessinger ²²⁾	33 - 50	<u>B. megaterium</u> KM	log phase cells, grinding with alumina or lysozyme-DNase treatment
1965 Yudkin and Davis ³⁰⁾	25	<u>B. megaterium</u> KM	lysozyme-DNase treatment at room temperature
1965 Schlessinger et al ²¹⁾	60	<u>B. megaterium</u> KM	log phase cells, lysozyme-DNase treatment at 20°C
1966 Aronson ³¹⁾	42	<u>B. megaterium</u> KM	lysozyme-DNase treatment at room temperature
1968 Gonzalez ³²⁾	late log 70	<u>B. stearothermo-</u>	lysozyme-DNase-DOC treat-
	late stationary 10	<u>philus</u> 1503-4R	ment
1969 Coleman ³³⁾	37	<u>B. amylolique-</u> <u>faciens</u>	log phase cells, lysozyme-DNase treatment in N ₂ gas at 30°C
1970 van Dijk-Salkinoja et al ³⁴⁾	96	<u>B. licheniformis</u>	log phase cells, lysozyme-Brij 58 treatment at 0°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。

本章においては、B. amyloliquefaciens KA 63 株より、蛋白合成活性を損ねないような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 実験材料および方法

使用菌株： 当教室にて純粋分離された B. amyloliquefaciens KA 63 株を用いた。

細菌の培養： 基本培地は、可溶性澱粉 50g、ポプトン 5g、酵母エキス 2g、 KH_2PO_4 1.3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1g を1ℓ水道水に溶かし、2N KOHによってpH 7.0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。

前培養は100 ml基本培地を容れた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基本培地を容れた5 ℓ Marubishi jar fermentorに前培養100 ml を植菌し30℃にて攪拌300 rpm 通気1vvmで行った。菌体量はHitachi spectrophotometer 101で5 mm のセルを用い660 nmでの濁度をもって表わした。

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 (A_{660} : 1.0、約3時間培養) を氷で急冷し、連続遠心分離機 12,000×g で集菌し、標準緩衝液I (10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.6, 10 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 60 mM NH_4Cl) にて洗浄した。洗浄菌体 (4.3 g 湿重量) を10%ショ糖を含む緩衝液Iに懸濁し lysozyme 35 mg を添加し、懸濁液をゆるやかに60分間マグネチック・スターラーで攪拌した。処理菌体を12,000×g 10分の遠心分離によって回収し、10%ショ糖、6 mM β -mercaptoethanol を含む緩衝液I 50 ml で洗浄した。洗浄処理菌体を25 ml の標準緩衝液II (100 mM Tris-HCl

緩衝液, pH 7.6, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 60 mM NH₄Cl, 6 mM β -mercaptoethanol) に徐々に懸濁して浸透圧的に破碎した。細胞破碎液を 12,000 \times g 10 分遠心分離し、再度、上清に沈澱を懸濁し破碎を完全にした後、30,000 \times g 10 分の遠心分離を行った。

ここで得られた沈澱を粗膜画分とした。一方、上清は 30,000 \times g 20 分、再び遠心分離し、その上清を S-30 画分とした。粗膜画分は 25 ml の緩衝液 II に再懸濁した。緩衝液 I で調製した 60%, 20% ショ糖溶液を各 10 ml ずつ Sorvall RC-5 の HB 4 swinging bucket ロータ-遠心分離管に重層し、その上に 10 ml の粗膜画分懸濁液をのせ 10,000 \times g 60 分遠心分離した。60% と 20% ショ糖界面の密度層を抽出し、緩衝液 II に懸濁し、30,000 \times g 20 分遠心分離し、精製膜画分を沈澱として回収した。一方、S-30 は Hitachi 55P 超遠心分離機で 105,000 \times g 60 分遠心分離しその上清画分を S-105 画分として用いた。

in vitro におけるア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は Matthaei と Nirenberg^{23,24)} の方法に準じて調製した。特記しないかぎり完全反応混液 (最終容量 500 μ l または 1 ml) の組成は以下の通りであった。100 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.6, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 60 mM NH₄Cl, 6 mM β -mercaptoethanol, 2 mM ATP, 0.4 mM GTP, 10 mM phosphocreatine, 0.05 mM 各アミノ酸 20 種, 2 μ Ci/ml ¹⁴C アミノ酸混液

(クロレラ蛋白加水分解物で比活性は炭素原子 1 mg 当り 40 mCi), 40 μ g/ml phosphocreatine kinase, 0.13~0.25 mg 蛋白/ml 精製膜画分, 1.3~1.5 mg 蛋白/ml S-105 画分より成り、反応は 30℃で行った。1 分間 14 C アミノ酸混液を、さらに 30 秒後に phosphocreatine kinase を加え反応を開始させた。適当な反応時間後、10 ml の冷水中に試料を 100 ml ずつ採取し、30% trichloroacetic acid (TCA) 2 ml を加え反応を停止させた。90℃ 10 分加熱し冷却後、ガラスファイバーフィルターで分離し、フィルターを 80℃ 30 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 (Beckman 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: 粗膜画分は 0.5% Brij 58 または sodium deoxycholate (DOC) で可溶化した。細胞の全量については lysozyme 処理後、0.5% DOC にて可溶化した。DNA, RNA, 蛋白の分画は Schmidt-Thamhauser-Schneider 法³⁵⁾ によった。RNA の定量は酵母 RNA (半井化学 K.K.) を標準に orcinol 法³⁶⁾ 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³⁷⁾ によった。

実験材料: lysozyme は近畿ヤクルト K.K 製、 14 C ア

ミノ酸混液および *glycerol* は第一化学薬品 *KK* 製、ガラスファイバーフィルターは *Millipore QTY 25* 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、他のものは市販の特級試薬を用いた。

第3節 実験結果

1. 精製膜画分の分離.

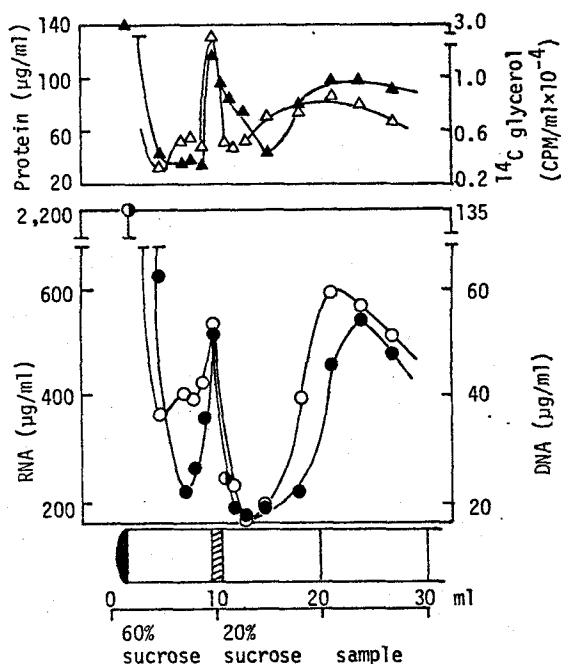


Fig. 1-1. Fractionation of crude membrane fraction by discontinuous sucrose gradient centrifugation. One ml fractions were collected by aspirating the liquid from the bottom of the rotor tube after centrifugation at 10,000 $\times g$ for 60 min. The figure of rotor tube shows the positions of the top,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

●, DNA; ○, RNA; Δ, protein; ▲, ^{14}C glycerol.

$4^{\circ}C$ 60分の *lysozyme* 処理によって *B. amylobliquefaciens* KA 63株の対数増殖期細胞は、光学顕微鏡下におけ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%が5-30画分に回収された。粗膜画分中の膜

結合 RNA および DNA は全細胞のそれぞれ 12~16%、14~17% であった。緩衝液 I で粗膜画分を洗浄しても、やはり RNA の遊離は認められなかった。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す。実験材料および方法に示すように、粗膜画分の懸濁液を 60%、20% ショ糖密度層上に重層し、 $10,000 \times g$ 60分遠心分離し、各分画について 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 4C glycerol (最終濃度 $2 \mu g/ml$, 比活性 $0.1 \mu Ci/\mu g$) で $30^\circ C$ 10分パルスラベルした菌体から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、放射能の鋭いピークが 60%、20% ショ糖界面に認められた。

この操作により界面に回収される膜画分を以後、精製膜画分または単に膜画分とする。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 $10^3/ml$ 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られなかった。

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 に示す。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。膜画分なしでも 5-30 自身、アミノ酸取り込み活性を示したが、

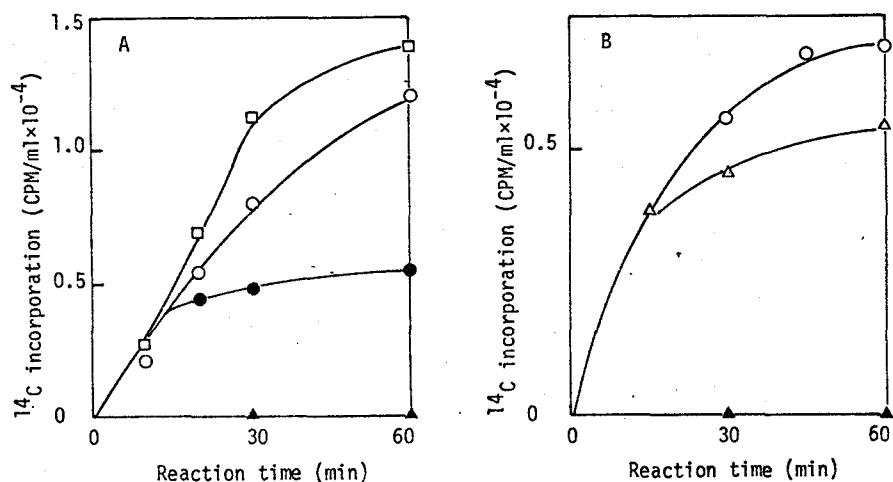


Fig. 1-2. Activities of crude and purified membrane fractions in incorporating ^{14}C amino acids into hot TCA-insoluble fraction. A, concentrations of crude membrane fraction, purified membrane fraction and s-30 in the reaction mixture were 1 mg, 0.2 mg and 1.4 mg protein/ml, respectively. □, crude membrane fraction and s-30; ○, purified membrane fraction and s-30; ▲, crude membrane fraction without supernatant fraction; ●, 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. ○, purified membrane fraction and s-30; Δ, purified membrane fraction and s-105; ▲, s-105 without membrane fraction. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

最終取込み量は低く、20分で反応は停止した。一方、s-105は膜画分が共存しない状態では蛋白合成活性を示さなかったが、膜画分とs-105の系においては十分な活性を示した。

Table 1-2. Characteristics of ^{14}C amino acids incorporation by cell-free system.

Addition or deletion	Incorp. (%)	
	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
+ puromycin (50 μg per ml)	14	
+ rifampicin (10 μg per ml)	85	
+ actinomycin D (10 μg per ml)	77	97

Complete reaction mixture contained s-30 in Exp. I and s-105 in Exp. II. Reaction mixtures were incubated at 30°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。
cytoplasm 区分である s-30 または s-105 とエネルギー供給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 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の KCN によって完全に阻害されるのに対し、無細胞系によるアミノ酸の取り込みは KCN に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 によって阻害されず、puromycin, chloramphenicol によって強く阻害された。これらの結果は、この系における反応は既存の mRNA 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 s-105 の系を用いた。

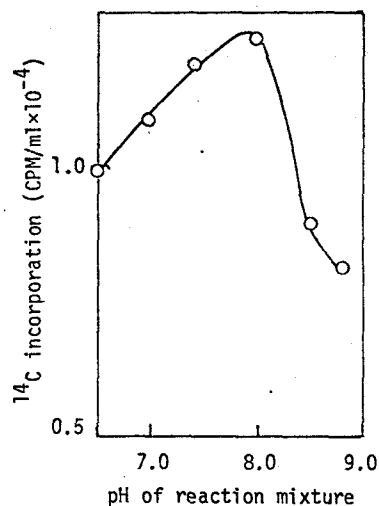


Fig. 1-3. Effect of pH on ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction. Protein contents of purified membrane fraction and s-105 in the reaction mixture were 1 mg/ml and 1.6 mg/ml, respectively. Incubation was conducted for 60 min. For details see Fig. 1-2.

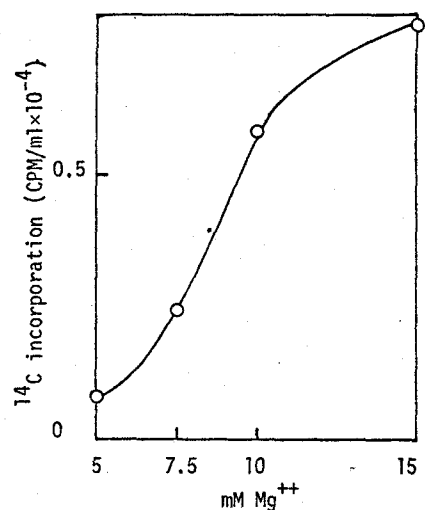


Fig. 1-4. Effect of Mg^{++} concentration on the activity of ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction. Incubation was conducted for 60 min. For details see Fig. 1-2.

Fig. 1-3 は反応系の pH と蛋白合成活性の関係を示す。pH 7.4 と 7.8 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. 1-4 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

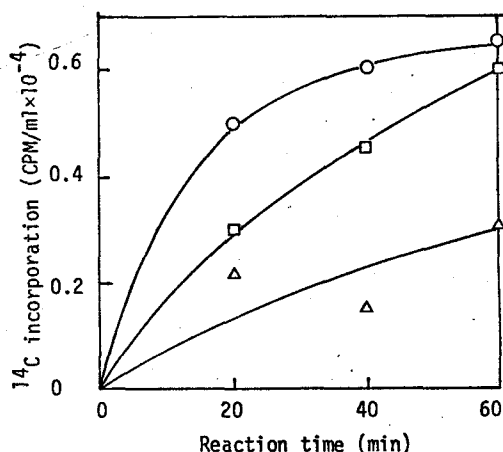


Fig. 1-5. Dependence of ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction on the amount of s-105. Reaction mixtures contained 750 μg protein/ml of purified membrane fraction and 3.4(O), 0.85(□), 0.43(Δ) mg protein/ml of s-105. Other experimental conditions were as described in the Materials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

膜系におけ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 にアミノ酸取込み速度と反応系の s-105 の量の関係を示す。アミノ酸取込みの初発速度は反応系に添加された s-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低下するが、少くとも 60 分は持続した。

Fig. 1-6 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なかった。

Fig. 1-7 に示すように、蛋白合成が停止した時期の反

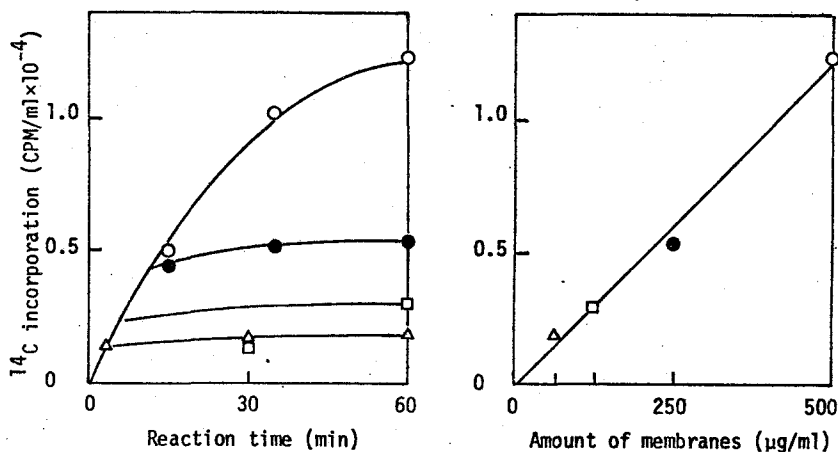


Fig. 1-6. Dependence of ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction on the amount of membrane fraction. Reaction mixtures contained 2.5 mg protein/ml of s-105 and 500(O), 250(●), 125(□) and 65(Δ) μg protein/ml of purified membrane fraction. Other experimental conditions were as described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

反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 におけるものとはほぼ同じであった。そして再添加された膜画分の量に相当するだけ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な蛋白合成量が決定されるという Fig. 1-6 の結果と一致し、s-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。

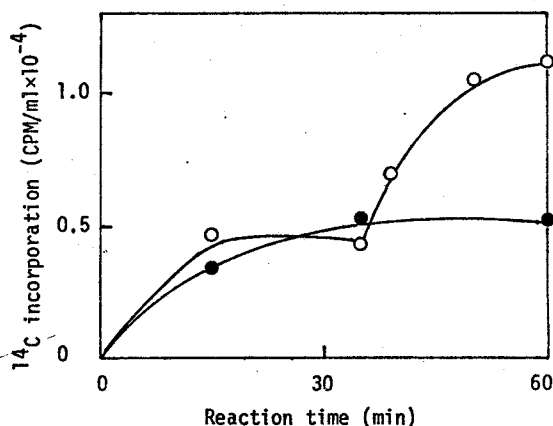


Fig. 1-7. Protein synthesis resumed by the addition of purified membrane fraction. Reaction was started with 650 μg and 2.5 mg protein/ml of purified membrane fraction and s-105, respectively (●). After 35 min of incubation, 1.2 mg protein/ml of purified membrane fraction were added (○). Other experimental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

第4節 考 察

Table 1-2の結果が示すように、この系での蛋白合成は混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ら明らかである。 i) 膜画分もしくはs-105単独ではアミノ酸の取込み活性が全く認められなかった。そして、両画分が蛋白合成には必要であった。 ii) ATP, GTP, ATP補給系が存在しな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) 無細胞系は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、*B. amyloliquefaciens* KA63株から精製分離された膜画分は cytoplasm 画分である S-105、エネルギー補給系より成る無細胞蛋白合成系において十分な活性を有することが示された。そして、この系におけ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 の作用から膜を保護するため、すべての処理を4℃以下で行った。2) 物理的な破壊を少なくするため、膜の懸濁は温和な条件で行った。3) 再現性の点からも、高活性な蛋白合成系を再構成するため、種々の成分が稀釈されな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手で行った。

この系での最適 pH は Matthaei と Nirenberg²³⁾ の系とほぼ同じ 7.8 を示した。また、 Mg^{++} 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^{27, 38, 39)} に比べ低いものであった。S-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 において膜画分を含まない S-30 のみでも10分間のアミノ酸取り込み量は膜画分を添加した系とほぼ同じ値を示し、cytoplasm 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い。

一方、S-105 の活性は長時間安定であり、最終的な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、反応の終了は膜画分中の有効な一つ以上の成分の失活によるものであるう。

第5節 要 約

- 1.) B. amyloliquefaciens KA 63株の対数増殖期菌体より分画した膜画分に cytoplasm 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は膜画分中の既存の mRNA による *de novo* 合成と結論された。
- 3.) 蛋白合成速度は S-105 濃度に依存し、取込まれたア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 ^{14}C アミノ酸取り込み活性は 30°C 60分間安定であった。

第 2 章 膜結合ポリソームにおける 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 *endoplasmic reticula* 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⁴⁰⁾。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はるかに活性が高く重要である事が *in vivo*⁴¹⁾、*in vitro*⁴²⁾ において示された。

細菌においても、1959年、Nisman⁴³⁾、1961年 Godson 等²⁹⁾ によつて細胞膜の蛋白合成におけ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^{44, 45)}、*mRNA*の合成も膜に近い所で行われる可能性が考えられる。Ganesan等⁴⁴⁾は、25~30%の*mRNA*が膜区分に存在することを示唆している。Yudkin等³⁰⁾は、ほとんどの細胞膜結合RNAはリボソームRNAであるが、 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ によるRNAの急速なラベルは膜においてより活発であり、ラベルされたRNAはDNAの塩基配列と類似している事を示している。

本章においては、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、膜とリ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

リボソームの調製： 杉浦の方法^{4b)} に準じて行った。
S-30画分を $105,000 \times g$ 60分遠心分離し、沈澱物を 10 mM MgCl_2 , $500 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$, $6 \text{ mM } \beta\text{-mercapto-ethanol}$ 含有 10 mM Tris-HCl 緩衝液, $\text{pH } 7.6$ に懸濁し、 4°C にて一夜放置した。 $20,000 \times g$ 20分の遠心分離で凝集物を除去後、 $105,000 \times g$ 90分遠心分離してリ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静かに洗い流してから (以下同様)、リボソームを同緩衝液に懸濁し、 $20,000 \times g$ 20分、および $105,000 \times g$ 90分の遠心分離によって洗浄した。この操作を3回繰返した。 10 mM MgCl_2 , 60 mM KCl , $6 \text{ mM } \beta\text{-mercapto-ethanol}$ 含有 10 mM Tris-HCl 緩衝液, $\text{pH } 7.6$ の最少量にリボソームを懸濁し凍結保存した。

リボソームサブユニットの調製： 上で得られたリボソーム懸濁液を200倍量の低 Mg^{++} 緩衝液 (10 mM Tris-HCl 緩衝液, $\text{pH } 7.6$, 0.1 mM MgCl_2 , $6 \text{ mM } \beta\text{-mercapto-ethanol}$) に対して一夜透析した。Hitachi RPS40ローター遠心分離管に同緩衝液で5~20% ショ糖密度勾配を作り (全容 4.5 ml)、これに透析内液を重層し、 $25,000 \text{ rpm}$ で5.6時間遠心分離した。遠心分離管の底より3滴ずつ分画し、 260 nm での吸光を測定し、各ピーク区分を集め $105,000 \times g$ 8時間遠心分離して得た沈澱を、

10 mM $MgCl_2$ 含有 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.6 の最少量に懸濁し凍結保存した。

Polyuridylic acid (poly(U)) による蛋白合成系:
膜画分のかわりに 30 A260 ユリボソーム, 0.1 mg/ml poly(U) を用い, ^{14}C アミノ酸混液のかわりに 0.5 μCi /ml ^{14}C phenylalanine (比活性: 382 mCi/m mole) を用いた。他の成分, 20 種のアミノ酸や ATP, GTP, S-105 の濃度は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 40D-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 の反応液を重ねし, 4°C で 20,000 rpm 4 時間遠心分離した。遠心分離管の底より各 3 滴ずつ分画し 3 ml に水で稀釈した。260 nm の吸光を測定し, さらに 1 ml 中の熱 TCA 不溶性区分中の放射能を前記の方法により測定した。

実験材料: poly(U) は Sigma 製, ^{14}C 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級試薬を用いた。

第3節 実験結果

1. 膜系に対するリボソームの影響

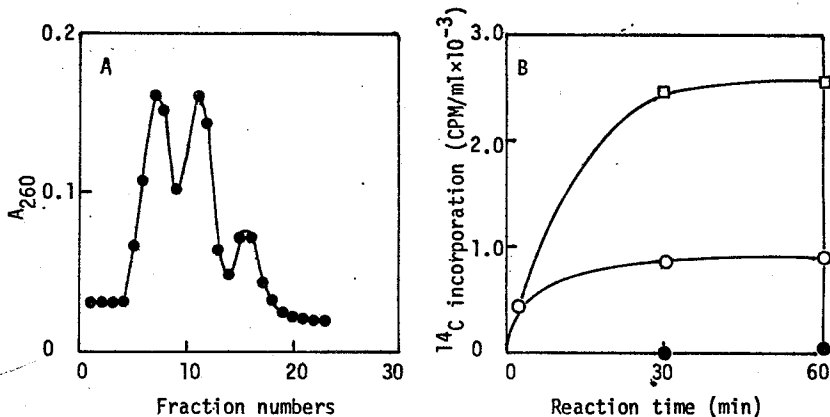


Fig. 2-1 A. Sedimentation pattern of ribosome and its subunits. Ribosomal suspension was centrifuged through a 5 - 20 % linear sucrose gradient made up in standard buffer I at 25,000 rpm for 4 hr. Fractions of three drops were collected from the bottom and absorbance at 260 nm was measured after dilution to 3 ml. B. Stimulation of polyuridylic acid directed ^{14}C phenylalanine incorporation by ribosomes. O, reaction mixture with ribosomes and polyuridylic acid; ●, reaction mixture without polyuridylic acid; □, reaction mixture with 30 A_{260} 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。70S のモノマー, 50S, 30S のサブユニットのピークに分れ、その他の成分は認められなかった。また Fig 2-1 B は poly(U) を mRNA とし ^{14}C 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, S-105 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。

一方、poly(U)を除いた系では取り込みがみられないことから、リボソーム画分、S105画分ともにmRNAの混入は認められなかった。

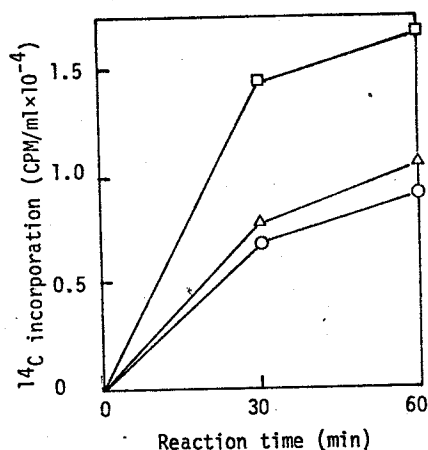


Fig. 2-2. Stimulatory action of ribosomes on ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction. O, complete reaction mixture; 100 (□) and 20 (Δ) A_{260} U of ribosomes were added to the complete reaction mixture. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods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

このリボソームを膜画分、S105を含む *in vitro* 蛋白合成系に添加すると Fig. 2-2 に示すように蛋白合成量の増加がみられた。添加リボソームの飽和曲線を Fig. 2-3 に示

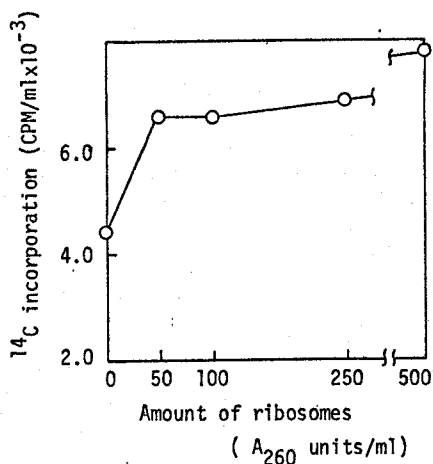


Fig. 2-3. Dependence of ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction on the amount of ribosomes. Reaction mixture containing various amounts of ribosomes indicated was incubated for 60 min. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

す。50 A₂₆₀ U の添加で飽和しており、それ以上の量では顕著な増加はなかった。以後リボソームの添加量は100 A₂₆₀ U とした。

反応系での蛋白合成が最終レベルに達した時期にリボソームを添加すると、蛋白合成の再開が認められた (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。

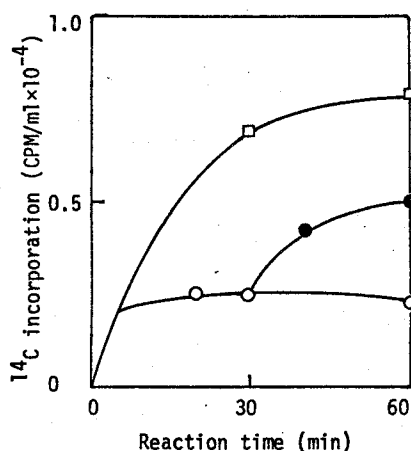


Fig. 2-4. Effect of ribosomes added to the complete reaction mixture on the ¹⁴C amino acids incorporation. O, complete reaction mixture; □, complete reaction mixture added with 100 A₂₆₀ U ribosomes at 0 time of reaction; ●, complete reaction mixture added with 100 A₂₆₀ U ribosomes after 30 min of incubation.

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) は Met-tRNA_f に formyl 基を供給する formyltetrahydrofolate (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られている^{47, 48)}。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区分へ

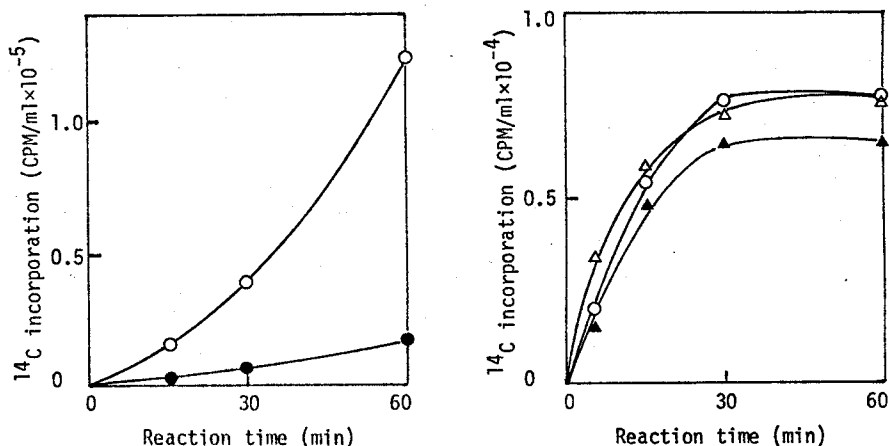


Fig. 2-5(left). Effect of TMP on ^{14}C amino acids incorporation into hot TCA-insoluble fraction by intact cells. Reaction mixture containing 40 mg wet weight/ml of exponentially growing cells, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 10mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 60 mM NH_4Cl , 0.05 mM each of 20 unlabeled amino acids, 2 $\mu\text{Ci/ml}$ of ^{14}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 $\mu\text{g/ml}$ TMP at 0 time.

Fig. 2-6(right). Effect of TMP on ^{14}C amino acids incorporation. O, complete reaction mixture; Δ, presence of 50 $\mu\text{g/ml}$ TMP and 500 $\mu\text{g/ml}$ fTHFA; ▲, presence of 50 $\mu\text{g/ml}$ 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、*in vitro* 蛋白合成系では Fig. 2-6 に示すように、ほとんど変化がみられなかった。さらに、この系にリボソームを添加した場合 (Fig. 2-7, 10 mM Mg^{++}) にも阻害は認められなかった。以上の結果は反応系の Mg^{++} 濃度が 10 mM の場合であった。種々の Mg^{++}

濃度におけるTMPの効果は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^{++} .

Mg^{++} (mM)	^{14}C amino acids incorporated during 60 min incubation (CPM/ml)			
	membranes plus s-105 from TMP untreated 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

の結果にみられたように、 Mg^{++} 濃度の低下にともない蛋白合成量は減少したが、5 mM Mg^{++} 濃度においてTMPによる障害が認められ、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いても認められ、取込み量は10 mM Mg^{++} の場合に比べ1/5に低下したが、TMPによる障害はfTHFAによってもとのレベルにまで回復した(Fig. 2-7, 5 mM Mg^{++})。

TMPによる障害の Mg^{++} 濃度に対する依存性は、S-30画分による*in vitro*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10 mM Mg^{++} 濃度でfTHFAの添加により約50%の蛋白合成障害が認められたが、膜系では認められなかった。また

膜系はs30系に比べ Mg^{++} 濃度に対する依存度が少なかった。

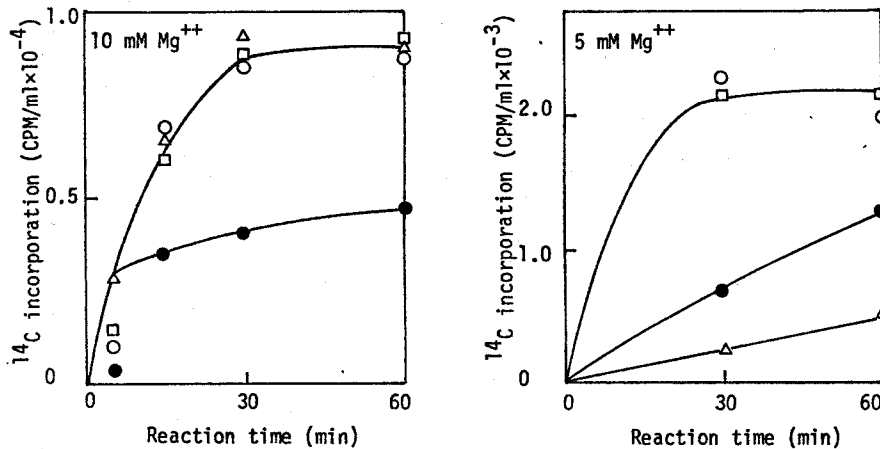


Fig. 2-7. Dependence of ^{14}C amino acids incorporation on formyl donor at different concentration of Mg^{++} .

●, complete reaction mixture; O, presence of 100 A_{260} U ribosomes; □, presence of 100 A_{260} U ribosomes, 50 $\mu g/ml$ TMP and 500 $\mu g/ml$ fTHFA; Δ, presence of 100 A_{260} U ribosomes and 50 $\mu g/ml$ 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^{++} .

System	Mg^{++} (mM)	^{14}C amino acids incorporated during 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.

3. 膜結合ホリソームによる蛋白合成

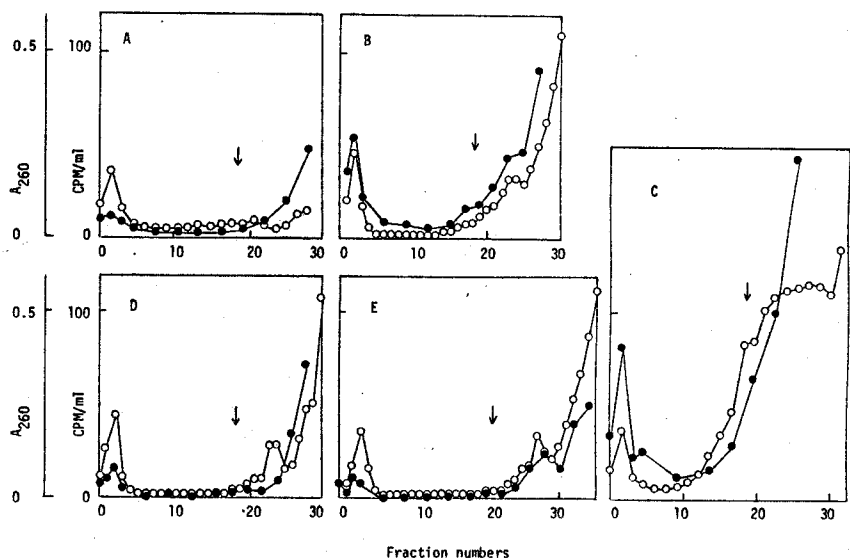


Fig. 2-8. Sedimentation analysis of the cell-free system of protein synthesis. Reaction mixtures were incubated at 30°C for 30 min under various conditions indicated below and were centrifuged through a 15 - 30 % linear sucrose gradient on a 60 % sucrose shelf at 20,000 rpm for 4 hr. Fractions of three 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 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol; E, 30 min reaction with 50 $\mu\text{g/ml}$ puromycin. Sedimentation is from right to left and the arrow shows the position of 70S ribosomes. \circ , A_{260} ; \bullet , ^{14}C amino acids incorporated.

膜系での蛋白合成が膜結合ポリソームで行な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Fig. 2-8に示す。30%と60%ショ糖界面に膜画分が回収され、膜画分(分画番号1-7)に30分の反応で放射能の増加が認められた。さらに膜画分と70s リボソーム画分の間、すなわち遊離ポリソームに相当する画分(分画番号7-17)には放射能の増加はほとんどみられなかった。なおリボソームモノマーおよびサブユニット画分にも放射能の増加がみられた(Fig. 2-8 B)。リボソームを添加した場合、

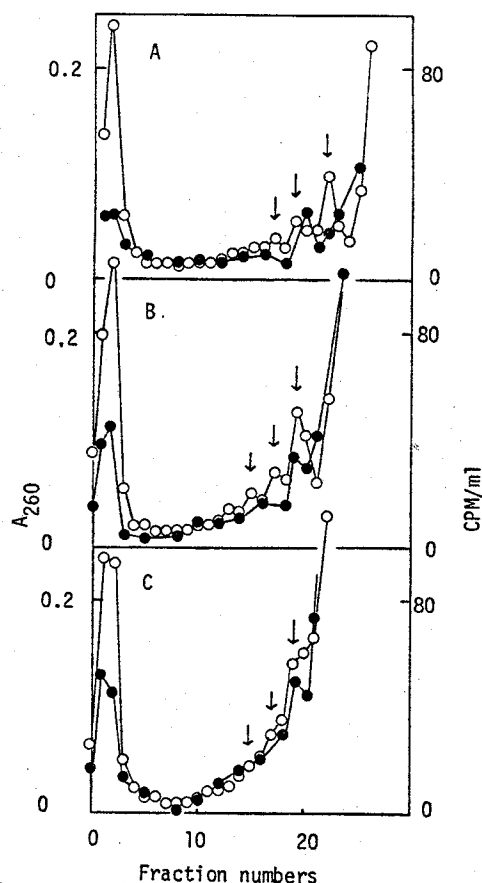


Fig. 2-9. Sedimentation pattern of reaction mixture incubated for various periods indicated below. Centrifugation and fractionation procedures were as described in Fig. 2-8.

A, 5 min; B, 15 min; C, 30 min; the amounts of ^{14}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} ; ●, ^{14}C amino acids incorporated.

その結果としての A_{260} 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 ちと同じ結果であった (Fig. 2-8 C)。また chloramphenicol や puromycin の添加によって膜画分における蛋白合成は完全に阻害された。

Fig. 2-9 に経時変化を示す。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ける放射能と A_{260} も同時に増加した。

高等動物細胞においては、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リソームを形成している可能性が示唆されている⁽¹⁸⁾。細菌においても同様のことが想定されるか以下の実験を行った。

低 Mg^{++} 緩衝液に対して一夜透析したリ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。

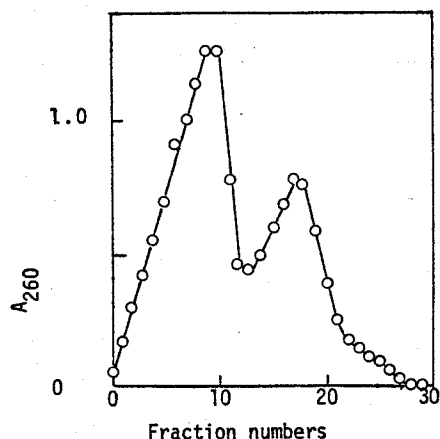


Fig. 2-10. Sedimentation pattern of dissociated ribosomes. Suspension of ribosomal subunits was centrifuged through a 5 - 20 % linear sucrose gradient made up in the low Mg^{++} buffer at 25,000 rpm for 5.6 hr. Fractions of three drops were collected from the bottom and absorbance at 260 nm was measured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

50s, 30s サブユニットに完全に解離してゐる事が認められた。 Fig. 2-11 に単離した各サブユニットの沈降パターンを示す。 50s, 30s サブユニットとも単一のピークを示し、50s サブユニットへの30s サブユニットの混入がわづか認められたが、各サブユニットとも分離された。 Fig. 2-12 にこれらのサブユニットを反応系に添加したときの取込みを示す。 30s サブユニットのみを添加したとき、取込みの促進が認められた。 50s サブユニ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。 50s, 30s サブユニットを1:1の量になるように添加したときは、

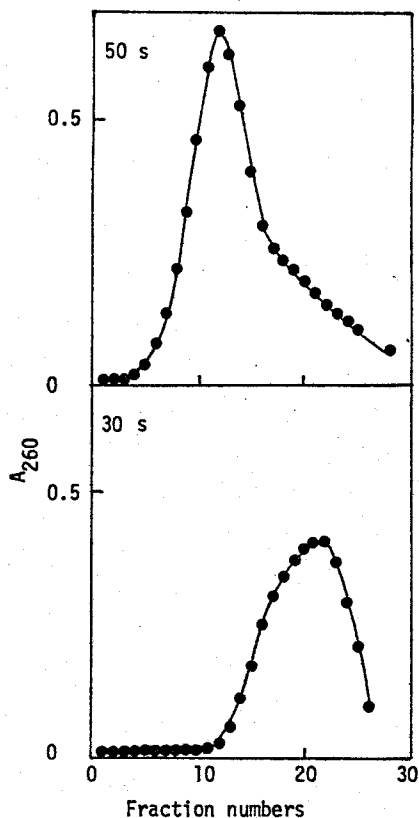


Fig. 2-11. Sedimentation pattern of fractionated ribosomal subunits. Centrifugation and fractionation procedures were as described in Fig. 2-10.

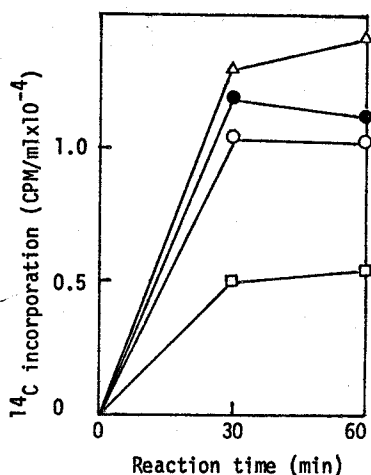


Fig. 2-12. Effect of ribosomal subunits on the cell-free protein synthesis. ○, complete reaction mixture; △, presence of 64 A₂₆₀ U 30s subunits; □, presence of 150 A₂₆₀ U 50s subunits; ●, presence of 32 A₂₆₀ U 30s and 75 A₂₆₀ U 50s subunits. Other experimental conditions were as described in the Materials and Methods of Chapter 1.

わずかながらあるが促進的に働いた。これより、膜結合ポリソームによる蛋白合成の促進において、リボソ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章において用いた無細胞蛋白合成系において、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例することが示され、cytoplasm 由来の S-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。すなわち、反応の進行にともなう膜からのリボソームの遊離、または mRNA の崩壊などが想定される。リボソームの添加によって蛋白合成活性が回復

されることが、前者の可能性が強く、多量のリボソームの添加によってリ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。しかしながら、蛋白合成停止後（反応時間30分）にリボソームを加えた場合にも反応初期（0分）から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 を含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。しかしながら S-30系にみられるような cytoplasm 中での蛋白合成^{27, 37, 39)} 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 10 mM Mg^{++} 濃度において fTHFA によって阻害されなかった。しかし開始反応が蛋白合成を律速する現象は S-30系、膜系ともに 5 mM Mg^{++} 濃度においてみられ、TMP による阻害率は同程度であり、fTHFA で回復した。10 mM Mg^{++} 濃度においては蛋白合成の開始に必ずしも fMet-tRNA を必須とせず、*E. coli* の系と同様の結果^{38, 43, 48)} 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いて膜画分での放射能の増加がみられた。この増加は chloramphenicol や puromycin によって阻害され、膜結合ポリソームにおける de novo 蛋白合成を示すものと思われる。遊離のポリソームを含むと考えられるマ〜18画分においては放射能、 A_{260} ともに増

加はみられなかった。このことは反応中に膜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画分において、放射能、 A_{260} ともに増加がみられるが、これは膜結合ポリソームにおいて合成されたポリペプチドが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、遊離リボソーム画分中において30s サブユニットが多くを占めるような洗降パターンを示し、これはポリソームの膜への結合が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、50s サブユニットが膜と結合した状態で mRNA とも結合しているならば30s サブユニットのみで蛋白合成は進行するものと思われる。すなわち、膜結合ポリソームの蛋白合成促進には30s 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の結果は30s サブユニ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、50s 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らかでない。

第5節 要約

1.) 膜画分を含む無細胞蛋白合成系にリ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られた。リ

ホ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が、最終蛋白合成量は反応初期に加えた場合と比べ低下した。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.) 膜結合ホリソームと遊離ホリソームとでは Mg^{++} 濃度に対する依存度において差が認められ、遊離ホリソームで顕著であった。何れの実験系においても $5\text{ mM } Mg^{++}$ 濃度では trimethoprim により阻害され formyltetrahydrofolate により回復された。 $10\text{ mM } Mg^{++}$ 濃度では trimethoprim による阻害はみられなかった。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.) 反応進行中の膜画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。膜沈降位置に A_{260} の吸光、 ^{14}C (アミノ) 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は反応系から ATP、GTP、phosphocreatine、phosphocreatine kinase の除去、または puromycin や 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 α -amylase 合成

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膜結合ポリソームにおいて合成される事が示されている⁽¹²⁻¹⁵⁾。同様の事が細菌の細胞外酵素の合成においても考えられる。最近、Cancedda と Schlesinger⁽⁴⁹⁾ は E. coli において periplasmic 酵素である alkaline phosphatase 合成中のポリソームは cytoplasm 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、無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は、mRNA の不安定性のため成功例は少い^(50, 51)。一斉、安定な 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⁽⁵²⁾ は E. coli の外膜に特異的なリボ蛋白を精製 mRNA を用い無細胞系での合成に成功した。この mRNA の寿命は 11.5 分であった。

本章においては、著者が使用した膜結合ポリソームを含む無細胞蛋白合成系で α -amylase 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

α -Amylase 低生産株の分離: KA 63株の対数増殖期の培養に streptomycin を 1 mg/ml にするよう加え一夜 30°C 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ニーから α amylase 生産の高いものを選択し、streptomycin 耐性株 (KA 63 str R) を得た。

α -Amylase 低生産株は KA 63 str R を親株とし Adelberg 等の方法⁵³⁾に準じ、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso guanidine (NTG) 処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め $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ の NTG を含む無菌水に懸濁し 30°C で30分処理し、洗浄後新鮮な基本培地に移し 30°C で5~20時間培養後、適当に希釈して寒天培地にプレートした。このプレートを 30°C で一夜培養して生育したコロニーからハロー (生産された α -amylase で培地中の澱粉が分解されコロニーの周囲に生じる透明部分) の小さいかまたはないものを選択した。分離された株は streptomycin 耐性がある事により KA 63株の変異株であることを確認した。

抗原抗体反応: 抗血清 (阪大癌研 北川教授供与) は bacterial α -amylase (長瀬 K.K., *B. subtilis* の液化型結晶 α -amylase) を抗原にし、うさぎから調製した血清を10倍希釈したものであった。

拡散法⁵⁴⁾はスライドガラス上に寒天層を作り、所定の位置に穴をあけ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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せ、0.85% NaCl 溶液にて稀釈、反応を停止させた。一夜水洗し乾燥後、沈降物をアミドブラックで染色した。

定量沈降反応⁵⁵⁾はスベッツ遠心分離管中で行い遠心分離操作は 1,000 $\times g$ 10分で行った。抗血清 0.5 ml に種々の濃度の α -amylase 溶液 0.5 ml を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ 60分反応させ、4 $^{\circ}\text{C}$ 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回洗浄し、0.1 N NaOH で 30分加熱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 α -amylase 免疫沈降反応：反応液の 105,000 $\times g$ 40分遠心分離上清液 0.25 ml および精製 α -amylase 溶液 (0.5 mg/ml) 0.25 ml を 0.5 ml の抗血清と混合する。37 $^{\circ}\text{C}$ 60分反応後、4 $^{\circ}\text{C}$ で数日間放置し、沈降反応を完了させた。沈降物を遠心分離にて回収し、280 nm 吸光物が遊離しなくなるまで 0.85% NaCl 溶液で少くとも 3回洗浄した。この沈澱物の蛋白量と放射能を測定した。

α -Amylase の精製：Hagihara⁵⁷⁾, 辻阪⁵⁸⁾の方法によった。KA 63株の培養濾液 1 l に対し 2 M 酢酸カルシウム溶液 50 ml を加え 2 N NaOH で pH を 6.5 に保ち、20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で 2 時間放置した。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°C 30 分加熱処理した。濾過後、酵素液は 400 U/ml 程度に希釈し 0.3 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え吸着用澱粉（とうもろこし澱粉：可溶性澱粉：ハイフロス－パーセル = 8：7：2）1 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液で洗浄後、最少量の 0.02 M Na_2HPO_4 溶液に 40°C にて α -amylase を溶出させた。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 Duolite 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 0.7 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で塩析し、沈澱を 0.02 M 酢酸カルシウム溶液に溶かし 0.02 M 酢酸カルシウム含有 0.1 M 酢酸緩衝液，pH 6.0 に対し透析し、沈澱物を除去し精製 α -amylase 溶液を得た。

各プロセスでの比活性、回収率を Table 3-1 に示す。精製 α -amylase 1 mg. は 12,500 U に相当し、bacterial α -amylase の値と一致した。

Table 3-1. Purification of α -amylase

Process	Total activity (units $\times 10^{-4}$)	Total volume (ml)	Specific activity (units/ A_{280})	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
Duolite A-2	29.3	900	1,670	48.9
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and dialysis	15.4	10	5,360	25.7

α -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℃ に保ち、これに酵素液 1 ml を加え、この時を 0 分とし経時的に 0.2 ml 採取し 0.5 mM I_2 -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 $A_{610}: 0.8$ とし終点到達時間を t 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 活性の測定: Hammarstein ミルクカゼインを 0.1 N NaOH で煮沸溶解し、0.1 N HCl で pH 7.6 に調整後、10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.6 で最終濃度 1% としたものを基質として用いた。その他は全て Shimmyo 等⁵⁸⁾の方法に従った。

実験材料: 抗 α -amylase 血清とその抗原として用いた bacterial α -amylase (長瀬 K.K.) は阪大癌研、北川教授より供与された。Fusidic acid は三共 K.K. より供与された。酵素測定用の可溶性澱粉、Hammarstein ミルクカゼインは 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 は蛋白合成の elongation factor G を

阻害する薬剤である⁵¹⁾が、低濃度では酵素の分泌を特異的に阻害することが知られている⁶⁾。Fig. 3-1 にKA63株に対する *in vivo* および *in vitro* における薬剤の効果を示す。

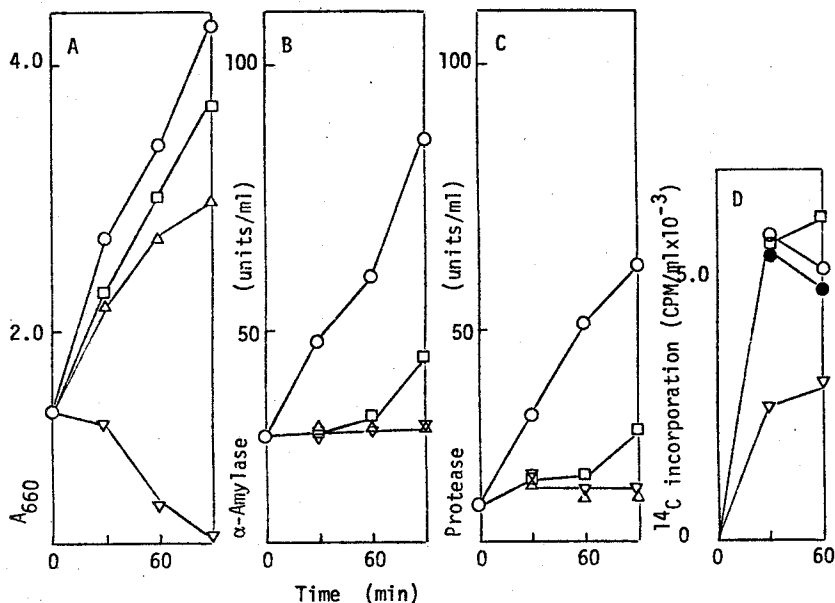


Fig. 3-1. Effect of fusidic acid on enzymes formation and protein synthesis. To the culture of 5 hr age in the basal medium, various amounts of fusidic acid were added and incubation was continued. Samples were taken at intervals of 30 min and cell growth (A), α -amylase formation (B) and protease formation (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 ^{14}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 $\mu\text{g/ml}$; □, 10 $\mu\text{g/ml}$; △, 50 $\mu\text{g/ml}$; ▽, 150 $\mu\text{g/ml}$ fusidic acid.

10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では増殖はそれ程阻害されな
 いが α -amylase, protease の生産は少くとも 60 分間ほぼ完
 全に阻害された。しかし *in vitro* 蛋白合成は 5 $\mu\text{g/ml}$,
 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では全く阻害されず、生菌体に致死的に
 働く 150 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではじめて約 50% の阻害が認めら
 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
 き、10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ の fusidic acid 存在下で、遊離
 ホリソームが対応する 7 ~ 17 画分に放射能のピークが認め
 られた。

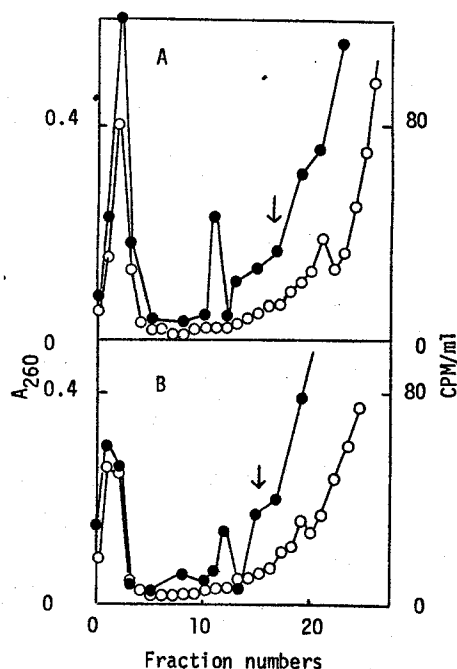


Fig. 3-2. Effect of fusidic acid on sedimentation pattern of the cell-free system of protein synthesis. Reaction mixtures were centrifuged through a 15 - 30 % linear sucrose gradient on a 60 % sucrose shelf at 20,000 rpm for 4 hr and fractionated as described in the Materials and Methods of Chapter 2. A, 15 min reaction with 10 $\mu\text{g/ml}$ fusidic acid; B, 15 min reaction with 50 $\mu\text{g/ml}$ fusidic acid; the amounts of ^{14}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. α -Amylase 低生産株の性質.

α -Amylase が膜において合成されることを比較検討するため α -Amylase 生産の低下した変異株を分離した。これらのうち α -amylase, protease の生産が同時に低下した株の中には分泌機構あるいは膜の変異株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 plate culture.

Strain	KA63strR	AL222	AL233	AL267	AN302	AN801
Cell growth (A_{660})	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)	823	418	373	158	487	
Halo formation	++	+	+	+	-	-
Resistance to environmental stress*						
DOC (0.05 %)	-	+	+	+	+	
EDTA (3×10^{-3} M)	+	±	±	-	-	-
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.

AL 233, AL 267 の3株は少量の α -amylase を生産したが、AN 302、AN 801 の2株は全く生産が認められなかった。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。

膜の変異に対して影響する事が知られている DOC^{60,60},

EDTA⁶⁰⁾, pH 4⁶²⁾ に対する耐性を調べたが、 30°C に関しては DOC が培地中の澱粉と結合することによってその効果が失われる事がわかっており、 α -amylase の生産量の高い KA 63 株以外は増殖可能となった。EDTA, pH 4 に対する耐性も α -amylase の生産量と相関した結果を示し、これらが膜の変異を反映するものかどうかはさらに検討を要する。しかし、Fig. 3-3 に示すように AL 222 株で α -amylase は $1/20$, protease は $1/3$ に生産量が同時に低下した。

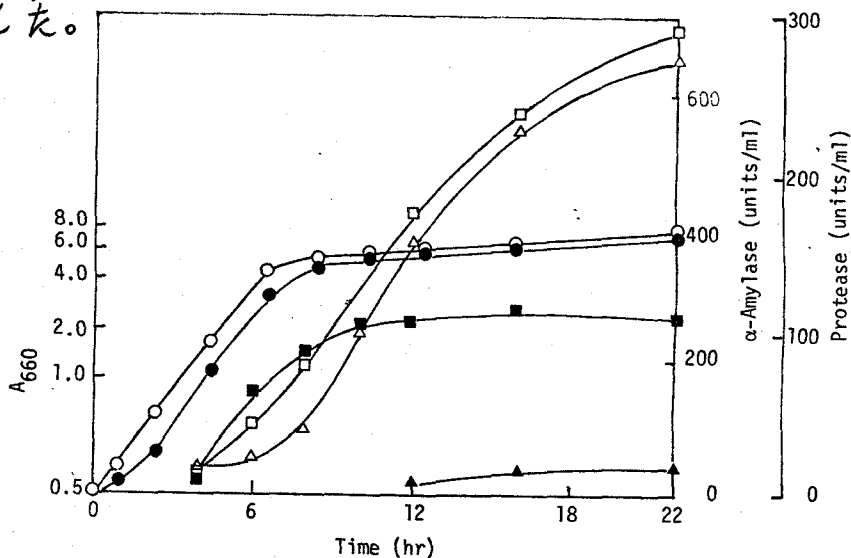


Fig. 3-3. Time course of α -amylase and protease production by KA63 and AL222. Cells were cultivated at 30°C with shaking and cell density and enzyme activities were measured periodically. O, cell density; Δ , α -amylase activity; \square , protease activity; open symbols, KA63; closed symbols, AL222.

3. α -Amylase の免疫学的性質

市販結晶 α -amylase (bacterial α -amylase) を抗原として調製された抗 amylase 血清に対する KA 63 α -amylase の抗原性を検討した。

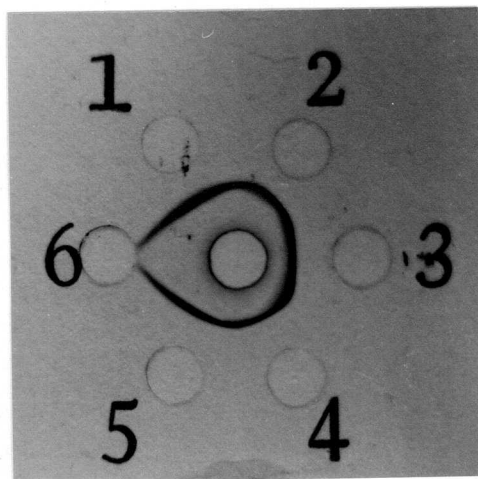


Fig. 3-4. Double diffusion test for anti-amylase serum. Four ml of 1.5 % agar in 50 mM veronal buffer, pH 8.6 was charged on a microscopical slide. Four to five μ l of antiserum was placed in the center well, and same volume of various solutions indicated below was placed in other wells. Diffusion was 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 μ g/ml of KA63 α -amylase; 2,4, 100 μ g/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 α -amylase と KA 63 α -amylase の拡散沈降試験を示す。この抗 amylase 血清は両 α -

amylase に対し単一の連続した沈降線を形成したが、KA 63 株の細胞破砕液に対しこれは沈降反応を示さなかった。

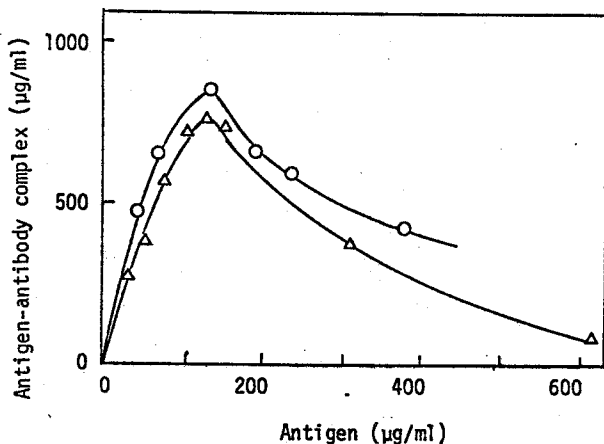


Fig. 3-5. Quantitative precipitation curves for anti-amylase serum. A 0.5 ml of α -amylase solution was mixed with the same volume of antiserum, then incubated at 37°C for 60 min and stored at 4°C for a few days. The amount of protein in immunoprecipitates was determined. \circ , KA63 α -amylase; Δ , bacterial α -amylase.

Fig. 3-5 に定量沈降反応を示す。Bacterial α -amylase, KA 63 α -amylase とともに同様の沈降線が得られ、抗原が 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき沈降量は最大値を示した。抗体過剰の領域（抗原が 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下）ではす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 amylase 血清は Fig. 3-6 に示すように AL 222 によって生産される α -amylase とともに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

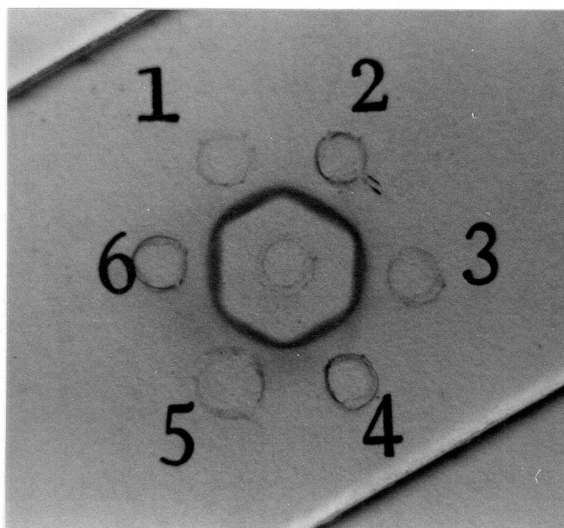


Fig. 3-6. Double diffusion test for AL222 α -amylase. Method was as described in Fig. 3-4. 1,3,5, 50. μ g/ml of KA63 α -amylase; 2,4,6, AL222 α -amylase solution, as 20 times concentrated as that in culture filtrate of 24 hr age by 0.7 saturating $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation after heat 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（抗原が120 μ g/ml以上）におけるKA63, AL222 両。

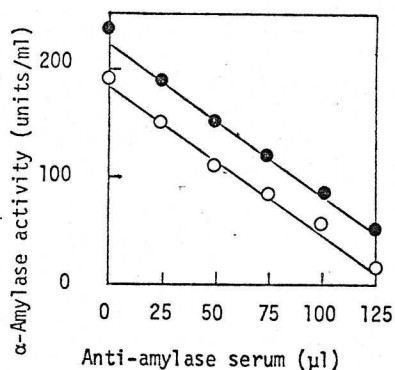


Fig. 3-7. Neutralization of α -amylase with anti-amylase serum. A 0.5 ml aliquot of enzyme solution containing 250 U was incubated with various amounts of the antiserum at 40°C for 60 min. The remaining activity was determined. Both enzyme solutions were same as used in Fig. 3-6.

O, KA63; ●, AL222.

α -amylase の抗 amylase 血清による中和曲線を示す。同じ勾配で活性は中和された。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有り事を示している。

4. 膜結合ポリソームにおける α -amylase 合成

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

Table 3-3. *In vitro* synthesis of α -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.

Strain	Exp.		The amount of radio- activity in hot tri- chloroacetic acid- insoluble material	The amount of radio- activity in immuno- precipitate	Recovery
			(A)	(B)	(B/A)
			(cpm/ml)	(cpm/ml)	(%)
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 α -amylase.

** Not detectable.

的な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 $105,000 \times g$ 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不溶性区分並に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S-105の代りにS-30を用いた系を用いた。

KA 63株から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られ、熱TCA不溶性区分への全取込みの16.2~17.2%に達した。さらに α -amylase 比生産速度最高期(6時間培養)の菌体からの膜画分を用いた時、免疫沈降物中への放射能の回収は全取込みの63.2%に達した。しかし、S-30系においては全取込みの0.7~1.8%程度の放射能しか免疫沈降物中に認められなかった。

一方、AL 222 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つにもかかわらず、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 α -amylase, protease の生産は阻害されたが、*in vitro* での蛋白合成は阻害されなかった。しかし、ショ糖密度勾配中での沈降分析にお

いて、遊離ホリソーム画分に放射能の分布が認められた。
これが *in vivo* での分泌阻害の直接原因かどうかは明らかでない。

α -Amylase 生産の変異株としては、 α -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⁶³⁾と、構造遺伝子との連環がなく α -amylase, 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^{56, 64)}。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。一オ、KA63株とAL222株の生産する α -amylase は免疫学的に同じであり、抗 α -amylase 血清による中和反応においても同一の抗原性を示し、両酵素ともに比活性は変わらないものと考えられる。これより、AL222株は α -amylase の構造遺伝子の変異したものではなく、protease の生産量も同時に低下することから、膜の分泌機構が変異したものと考えられる。同様の変異は他にも報告されており、 α -amylase, protease のみならず鞭毛の合成も同時に膜の変異によって変化している⁶⁴⁾。また α -amylase と protease の生産を同時に促進する pap 変異においては sodium dodecyl sulfate ゲル電気泳動で膜蛋白の一つが欠損していることが示されている⁵⁶⁾。

無細胞反応系での α -amylase 合成の免疫学的測定法においても、KA63株から調製した膜系においては合成された蛋白の15%以上が α -amylase であり、S30系においては1%程度でしかなかった。このことは α -amylase

合成の場が膜に局在している事を示している。また S30 画分中への膜画分の混入の可能性を考慮すると、S30系での α -amylase 合成は無視出来るものと思われる。さらに α -amylase 高生産期の菌体より調製した膜画分においては合成蛋白の 60%以上が α -amylase 起源のものであった。このことは増殖過程において α -amylase の mRNA は崩壊から保護され、膜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いては免疫沈降物中への放射能の取込みが検出されず、*in vivo* における表現型と矛盾しない結果を得た。免疫学的方法による無細胞系での生産物中の α -amylase 測定法は十分信頼性のあるものと考えられる。

第5節 要 約

- 1.) *In vitro* での蛋白合成には影響しない濃度の fusidic acid (10 μ g/ml) によって α -amylase, protease の生産が阻害された。
- 2.) α -Amylase 生産量の低下した変異株 AL222 において protease の生産量も同時に低下していることが認められた。AL222 株の生産する α -amylase は免疫学的にも KA63 株の α -amylase と変化は認められなかった。
- 3.) 膜画分を含む蛋白合成系を用いて 14 C (アミノ) 酸を取込ませその生成物を抗 amylase 血清を用いて分析した。

全放射能取込みの 16~17% が抗 *amylase* 血清で沈澱した。
さらに 6 時間培養の菌体から得た膜画分を含む合成系では
全取込みの 60% が抗血清によって沈澱した。 α -*Amylase*
生産の低下した AL 222 株から調製した膜系、KA 63 株ま
たは AL 222 株からの S-30 系ではともに抗 *amylase* 血清
反応性の放射能はみられなかった。以上の結果から、 α -
amylase が膜結合ポリソームにおいて合成されていると
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存在しており、膜結合ホリソームにおいて合成されと考えられている。しかし単離された細胞膜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。著者がここに取上げた B. amyloliquefaciens KA 63 株は α -amylase 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、単離細胞膜による無細胞蛋白合成系を調製し、 α -amylase が膜結合ホリソームにおいて合成されることを明ら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1章では、対数増殖菌体を低温リゾチーム処理、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膜画分を得た。この膜画分は cytoplasmic 画分、エネルギー補給系、アミノ酸混液を添加することにより安定な *in vitro* 蛋白合成活性を示した。この系での蛋白合成は、ATP、GTP、phosphocreatine を要求し、膜画分または S-105 単独では活性を示さず、KCN によって阻害されることから、完全な無細胞系であると結論された。この蛋白合成は translation の阻害剤である chloramphenicol、puromycin によって阻害され、transcription の阻害

剤である actinomycin D, rifampicin によって影響されないことより、系に既存の mRNA による 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 S-105 濃度に依存し、合成された蛋白量は膜画分の量によっ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らかにした。この結果から、蛋白合成停止後も mRNA は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遠心分離分析より、蛋白合成は主に膜結合ポリソームにおいて行われることが認められ、S-105 中に mRNA を含まない事実から、この系は膜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らかになった。反応系に単離した 30S リボソームサブユニットを添加することにより蛋白合成量は増大したが、50S サブユニットでは阻害的に作用した。

第3章では、膜結合ポリソーム系による全合成蛋白の 16~17% が抗 amylase 血清と反応したが、S-30 を用いた遊離ポリソーム系では 0.7~1.7% しか反応せず、 α -amylase 合成が膜で行われる事を示した。また、 α -amylase 高生産期の菌体から調製した膜画分においては全合成蛋白の 60% 以上が抗 amylase 血清と反応したことから、 α -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膜に蓄積されるものと思われた。
また、 α -amylase 生産の低下した AL 222 株からの無細胞
蛋白合成系においては、抗 amylase 血清との免疫沈降
物中への放射能の取込みが検出されず、*in vivo* におけ
る表現型と一致し、免疫反応による *in vitro* 合成 α -
amylase の測定法は信頼されうると判断した。

文 献

- 1) Pollock, M.R.: "The Bacteria" Academic Press, 4, 121 (1962).
- 2) 岡崎, 照井: 醗工, 45, 1147 (1967).
- 3) 岡崎, 新名, 照井: 醗工, 46, 1000 (1968).
- 4) 木下, 岡田, 照井: 醗工, 45, 504 (1967).
- 5) 木下, 岡田, 照井: 醗工, 46, 427 (1968).
- 6) Both, G.W., McInnes, J.L., Hanlon, J.E., May, B.K., Elliott, W.H.: J. Mol. Biol., 67, 199 (1972).
- 7) Nomura, M., Hosoda, J., Yoshikawa, H.: J. Biochem. (Tokyo), 45, 737 (1958).
- 8) Coleman, G., Elliott, W.H.: Biochem. J., 95, 699 (1962).
- 9) May, B.K., Elliott, W.H.: Biochim. Biophys. Acta, 157, 607 (1968).
- 10) Smeaton, J.R., Elliott, W.H.: Biochim. Biophys. Acta, 145, 547 (1967).
- 11) Sargent, M.G., Lampen, J.O.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 65, 962 (1970).
- 12) Andrews, T.M., Tata, J.R.: Biochem. J., 121, 683 (1970).
- 13) Cioli, D., Lennox, E.S.: Biochemistry, 12, 3211 (1973).
- 14) Resman, C.M.: J. Biol. Chem., 244, 4308 (1969).
- 15) Takagi, M., Tanaka, T., Ogata, K.: Biochim. Biophys. Acta, 217, 148 (1970).
- 16) Palade, G.E., Siekevitz, P.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 171 (1956).
- 17) Redman, C.M., Sabatini, D.D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 608 (1966).
- 18) Bylioni, C., Bleiberg, J., Zanderer, M.: Nature New Biol., 232, 8 (1971).

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

- 37) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forrs, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 38) Eisenstadt, J., Lengyel, P.: Science, 154, 524 (1966).
- 39) Salas, M., Miller, M.J., Wahba, A.J., Ochoa, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1865 (1967).
- 40) Palade, G.E., Siekevitz, P.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 671 (1956).
- 41) Siekevitz, P., Palade, G.E.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 7, 619 (1960).
- 42) Henshaw, E.C., Bjarski, T.B., Hiall, H.H.: J. Mol. Biol., 7, 122 (1963).
- 43) Nisman, B.: Biochim. Biophys. Acta, 32, 18 (1959).
- 44) Ganesan, A.T., Lederberg, J.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 824 (1965).
- 45) Smith, D.W., Hanawalt, P.: Biochim. Biophys. Acta, 149, 519 (1967).
- 46) 杉浦: "細胞分画法" 岩波書店, 288 (1972).
- 47) Shih, A.Y., Eisenstadt, J., Lengyel, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 1599 (1966).
- 48) Horikoshi, K., Doi, R.H.: Arch. Biochem. Biophys., 122, 685 (1967).
- 49) Cancedda, R., Schlesinger, M.J.: J. Bacteriol., 117, 290 (1974).
- 50) Klagsbrum, M., Rich, A.: J. Mol. Biol., 48, 421 (1970).
- 51) Bashar, S.A.M.K., Parish, J.H., Brown, M.: Biochem. J., 123, 355 (1971).
- 52) Hirashima, A., Wang, S., Inouye, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 4149 (1974).
- 53) Adelberg, E.A., Mandel, M., Chen, G.C.C.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 788 (1965).

- 54) Ouchterlony, O.: Acta. Path. Microbiol. Scand., 26, 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., 2, 35 (1950).
 - 58) Shinmyo, A., Okazaki, M., Terui, G.: J. Ferment. Technol., 46, 733 (1968).
 - 59) Tanaka, N., Kinoshita, T., Masukawa, H.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 30, 278 (1968).
 - 60) de Zweig, R.N., Luria, S.E.: J. Bacteriol., 94, 1112 (1967).
 - 61) Hirota, Y., Mordoh, J., Jacob, F.: J. Mol. Biol., 53, 369 (1970).
 - 62) Kent, C., Lennarz, W.J.: Biochim. Biophys. Acta, 288, 225 (1972).
 - 63) Yuki, S.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 31, 182 (1968).
 - 64) Sekiguchi, J., Takada, N., Okada, H.: J. Bacteriol., 121, 688 (1975).
-