

報告番号 * 甲 第 897 号

主論文の要旨

主論文題目

大腸菌リボゾーム 50S サブユニット
の新前駆体

氏名 徳田元

主論文の要旨

報告番号 ※甲第897号 氏名 徳田 元

大腸菌リボゾムの形成は段階的に起こり、50Sサブユニットの前駆体としては、32S及び43S粒子が知られている。これらの粒子は、いくつかのリボゾム蛋白を欠き、含まれているRNAは前駆体型であることがわかっている。また、これらの粒子は蔗糖勾配遠心で、それぞれ32S及び43Sの位置に存在する。50Sサブユニットの形成は、32S粒子から43S粒子ができ、43S粒子にいくつかのリボゾム蛋白が結合し、リボゾムRNAが修飾(RNAのメチル化及び余分のヌクレオチド鎖の切断)されて起こると考えられている。

著者は、大腸菌リボゾム及びその前駆体の細胞内分布の研究過程で50Sサブユニットの新らしい型の前駆体粒子を見出した。この粒子は、通常蔗糖勾配遠心の50Sの位置に現われたが、塩で処理した後は40Sの位置に移動した。この塩に不安定な粒子(以下 salt-unstable particle と呼び SUP と略す。)の性質を検討した結果、この粒子は50Sサブユニットの新らしい型の前駆体であると考えるに至った。

本論文は、このSUPの性質を以下の項目に分けて論じたものである。以下に本論文の要旨を述べる。

第一章 EDTA-リゾチーム処理によるスフェロプラストからの salt-unstable particle

大腸菌を対数増殖期に2分間、³H-ウラシルでパルスラベルし、集菌後 EDTA-リゾチームで30°C 1時間、コロラムフェニールの存在下で処理し、スフェロプラストを形成した。スフェロ

プラストを溶菌した後、細胞質分画と膜分画に分け、両分画へのリボソーム及びその前駆体の分布を蔗糖勾配遠心により調べた。膜結合リボソームの調製は、膜を *Brij*-DOC あるいは、 $0.5\text{M NH}_4\text{Cl}$ で処理して行った。 ^3H のピークは、細胞質リボソームでは 50S と 30S に存在した。一方、膜結合リボソームでは 40S と 30S に存在した。この違いが、膜結合リボソームの調製に用いた *Brij*-DOC あるいは NH_4Cl によるものかどうか細胞質リボソームで調べた。これらの処理で細胞質リボソームの ^3H ピークも 50S 部分が消失し、新たに 40S にピークが現われた。したがって、膜結合リボソームの 40S の ^3H ピークは、塩または *Brij*-DOC 処理により、 50S から移動したものと考えられ、大腸菌リボソーム分画中には、塩処理により 50S から 40S に S 値が変化する、 50S サブユニットの前駆体粒子が存在するのではないかと考えた。この粒子の性質を細胞質中に存在する SUP について検討した。この粒子は、非放射性ウラシルで chase すると 40S 部分から消失した。この粒子は、アルミナ磨砕処理による細胞質リボソーム分画中にも存在した。この粒子は、 10mM Mg^{2+} 中での蔗糖勾配遠心で特異的に 50S 部分に存在し、この部分を分離することにより SUP を濃縮することができた。分離した SUP の RNA 組成をポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べたところ、 23S RNA は、前駆体 23S RNA とは異なる位置に現われ、*mature* 23S RNA とは同じ位置に存在した。この結果から、SUP の 23S RNA は *mature* 23S RNA であると考えた。この粒子を *in vitro* でリボソーム蛋白と共に、RNA のメチル化が起きる条件下で反応したところ、 50S サブユニットと同様の塩に安定な粒子が形成された。これらの結果から、SUP は 50S サブユニットの新しい型の前駆体であると考えた。

第二章 アルミナ磨砕による細胞抽出液からの salt-unstable particle

第一章で述べた SUP が、70 μ M フェニール存在下での、30 $^{\circ}$ C 1時間のリゾチーム処理の過程で生じた artefact でないことを確かめるため、また SUP の性質をさらに詳細に検討するため、アルミナ磨砕処理で得た細胞抽出液からの SUP の分離精製を試みた。SUP が 10mM Mg²⁺ 中の蔗糖勾配遠心で、50S 部分に特異的に存在し、30S サブユニットと結合して 70S 複合体を形成できないことを利用して、50S サブユニットから SUP を分離精製した。得られた SUP 分画には、塩に安定な 50S サブユニットはほとんど存在せず、50S 粒子は、ほとんどすべて塩に不安定な粒子であった。SUP の RNA 組成を調べたところ、mature 23S RNA が含まれていた。分離した SUP を、リボゾーム蛋白と反応させると、塩に安定な粒子が得られ、また一部の SUP が新たに 30S サブユニットと結合し 70S 複合体を形成できるようになった。さらに、リボゾーム蛋白との反応によって、poly U 依存の ¹⁴C-フェニルアラニンの取り込み活性が増加した。これらの結果から、50S リボゾーム蛋白との反応によって新しく形成された粒子は、細胞内で起こると同じ過程で *in vitro* での maturation が起き形成されたものと考えた。SUP の蛋白組成をポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた結果、SUP はかくと一個の蛋白を欠いていた。これらの結果から、SUP は 50S サブユニット形成の最終段階に位置づけられるべき、新前駆体であり、50S サブユニットは 43S 粒子から salt-unstable particle を経て形成されると考えた。