

豚及び T₁ RNase 消化によるマウス腹水肝癌 5 S リボソーム RNA の塩基配列に関する研究

岡山大学医学部 微生物学教室 (指導: 俵 寿太郎 教授: 金政 泰弘 教授)

高 井 研 一

(昭和49年11月18日受稿)

緒 言

5 S リボソーム RNA (以下 5 S RNA と略す)は、細菌から高等動物に至るすべての生物種のリボソームに含まれる鎖長約120の RNA であり、その塩基組成は、アデニン グアニン、シトシン、ウラシルの四つの塩基をもつヌクレオチドのみより成るのが特徴とされている。この 5 S RNA は、リボソームの大サブユニット一個に一分子存在しているが、その役割については現在のところ、リボソームが蛋白合成の場であるところから、蛋白合成に何らかの役割を演じていることが示唆されつつも¹⁾確証は得られていない。一方現在まで数種の生物においてその一次構造が決定され²⁾⁻⁶⁾そして動物細胞ではその一次構造に差がないと言われている⁷⁾⁻⁸⁾しかしながら Hatlen らは HeLa 細胞の 5 RNA の豚 RNA ase 消化物の分析から異なった塩基配列をもつ 5 S RNA の存在を見出しているし⁹⁾、一方最近、アフリカツメガエルでその発生過程での 5 S RNA の差が明らか¹⁰⁾

そこで著者は動物細胞の 5 S RNA の一次構造を再検討するため、マウス腹水肝癌より³²P でラベルされた 5 S RNA を精製して、常法に従って豚及び T₁ RNase を用いてその消化物を高圧二次元濾紙電気泳動法 (Sanger 法) にかき、塩基配列を検討した。その結果、その塩基配列は現在一次構造が確定されている KB 細胞のそれとの間に差を見出すことができず動物細胞の 5 S RNA の一次構造は全く同一であることが強く示唆され、さらに 5' 末端に ppGp の存在が見出されたので 5 S RNA の生合成についてある程度解明することができた。

脚 注

* 本論文で使用した略語は次のとおりである。

A: アデノシン, G: グアノシン,

C: シチジン, U: ウリジン,

φ: プソイドウリジン, T: チミジン,

RNA: リボ核酸, tRNA: 転移 RNA,

RNase: リボ核酸消化酵素,

PDase: phosphodiesterase.

PMase: phosphomonoesterase.

ヌクレオチドについてのハイフォンまたは p はリン酸基を示す。p がヌクレオチドの右にあるときは 3'-ヌクレオチド, 左にあるときは 5'-ヌクレオチドを示す。

実験材料

腫瘍細胞として C 3 H/He 系成熟マウス (25-30 g) に継代移植してきた腹水肝癌細胞 (MH 134) を用いた。

実験方法

リボソーム RNA を³²P でラベルするため、マウス腹水肝癌摘出前々日に一匹当り腹腔内に 10mCi の³²P ラベルのリン酸を注射し、前日同様に 10mCi 注射、18時間 chase の後肝癌細胞を摘出した。

1: リボソームの分離、精製

肝癌細胞を破壊後一度マイクロソームを分離し、DOC 処理後さらに超遠心分離法でリボソームを精製した^{11) 12)}

2: リボソーム RNA の抽出および 5 S RNA の精製。

分離したリボソームから SDS-フェノール法¹¹⁾によりリボソーム RNA を抽出した。得られた RNA は 10-30% の蔗糖密度勾配遠心により 28 S, 18 S および低分子部分に分離し、低分子部分を集めた後、それに carrier として酵母 tRNA を 0.5mg 加え、-20℃にて一昼夜エタノール沈殿した。さらに 5 S RNA 精製のため、得られた低分子 RNA は Sephadex G-

100カラムクロマトグラフィー (0.1M NaCl にて溶出) を行い、各フラクションは260nmの吸光度と³²Pのカウンタから分析し、tRNA および壊れたと考えられる高分子リボソーム RNA とを分離した。

3: 豚およびT₁ RNase 消化物の分離

RNA約100 μgを10mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA (以下 buffer I と略す) 10 μl に溶解し 5 μg の豚又は T₁ RNase を 37°C, 1 時間作用させて完全分解し消化物を高圧二次元紙電気泳動法¹³⁾により分離した。又 T₁ RNase と PMase との混合消化の場合には、RNA 約100 μgに対して T₁ RNase 5 μgと PMase 10 μgを加えて、37°C, 70分消化の後同様の方法でオリゴヌクレオチドを分離した。電気泳動は一次元をセルロースアセテート膜 (7M尿素, 5% 酢酸, pH 3.5の溶媒で4.5KV, 1.5時間の泳動), 二次元は DEAE ペーパー (7%ギ酸溶媒で, 1.5KV, 8時間の泳動)を支持体として用いた。分離したオリゴヌクレオチドはオートラジオグラフィーで位置を知り、各スポットを切り出してチェレンコフ効果により、液体シンチレーションカウンターにてカウントして定量した。各スポットは2MのTriethylammonium bicarbonate にて抽出し以後の分析に供した。

4: オリゴヌクレオチドの塩基配列の決定

a: 豚 RNase 消化により得られたオリゴヌクレオチドの分析

抽出したオリゴヌクレオチドは、0.05mg/mlの T₁ RNase を含む buffer I, 5 μl に溶解し、37°C 1時間消化後 DEAE ペーパーを支持体とした電気泳動を行い消化物を分離した。また U₂ RNase 消化は、carrierとして0.05mgの tRNA を加え25unit/mlの U₂ RNase を含む0.05M酢酸 buffer (以下 buffer II と略す) 5 μl に溶解し37°C, 1時間消化後、同様にして電気泳動により消化物を分離した。分離したオリゴヌクレオチドはオートラジオグラフィー後、各スポットの塩基組成を決定した。塩基組成の決定は、T₂ RNase 消化後、Dowex-1カラムクロマトグラフィーにより決定した¹⁴⁾

b: T₁ RNase 又は T₁ RNase と PMase との混合消化により得られたオリゴヌクレオチドの分析。

抽出したオリゴヌクレオチドは0.05mg/mlの豚 RNase を含む buffer I, 5 μl 中で37°C, 1時間消化後、又 U₂ RNase 消化は、buffer IIでaと同様に行い、DEAE ペーパーを支持体とした電気泳動を行って消化物を分離し、さらに T₂ RNase 消化によりその塩基組成を決定した。

5: spleen PDase および snake venom PDase による消化。

4-a, bのみでは塩基配列の決定ができないオリゴヌクレオチドには、spleen PDase および snake venom PDase を用いた。spleen PDase 消化は、抽出したオリゴヌクレオチドを18~90unit/mlの酵素を含む0.15M酢酸 buffer (pH 4.8) 10 μl に溶解し、37°C, 30分から180分種々時間と酵素量を変化して部分分解物を得た。snake venom PDase による消化は、0.1mg/mlの酵素量を含む0.01M Tris-HCl (pH 8.5) 2 mM MgCl₂ buffer 10 μl 中にて37°C, 90分行ったが、3'末端にリン酸のあるオリゴヌクレオチドの場合は、酵素量を10倍にして消化を行った。これらの消化により得られたヌクレオチドは、DEAE ペーパーの一次元電気泳動法により分離し、その塩基組成を決定した。

6: 5'末端ヌクレオチドの決定

³²Pでラベルした精製 5S RNA (約0.05mg) を0.1 unitの T₂ RNase を含む0.01M酢酸 buffer (pH 4.6) 10 μl 中で37°C, 1時間消化後、0.1 N HCl にて環状リン酸を開裂した。中和後、分解物を、あらかじめ tRNA の豚 RNase 消化物を charge していた DEAE セルロースカラムに charge して7M尿素存在下、pH 7.6で食塩の直線の濃度勾配によりヌクレオチド数に従って溶出し、260nmの吸光度と³²Pのカウンタにより分析し、テトラヌクレオチドに相当する部分をさらに Dowex-1カラムクロマトグラフィーにより分離、分析した。

結 果

1: 5S RNA の精製

Fig. 1 に Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーによる 5S RNA の精製の溶出パターンを示した。5S RNA はマーカーとした tRNA および高分子 RNA の degrade したものと考えられる RNA とは、きれいに分離している。比活性は 3~4 × 10⁶ c. p. m/mg RNA であった。

2: 豚 RNase 消化によるオリゴヌクレオチドの分離および分析。

5S RNA の豚 RNase 消化物の高圧二次元紙電気泳動法によるオリゴヌクレオチドの分離パターンを Fig. 2-a に示した。Fig. 2-b はその diagram である。Table 1 に豚 RNase 消化により得られたオリゴヌクレオチドの塩基組成、T₁ RNase, および U₂ RNase 消化物の分析結果を示した。スポット 23

図 1

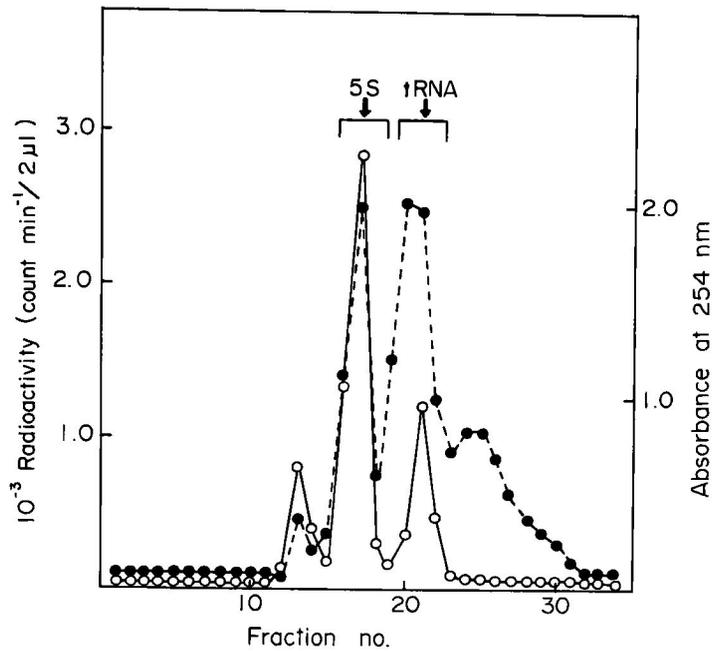


Fig. 1. Purification of ³²P-labeled 5 S RNA of MH 134 cells by gel filtration through Sephadex G-100. Low molecular weight ribosomal RNA with 0.5mg tRNA as a carrier was passed through a Sephadex G-100 column equilibrated with 0.1M NaCl. The fractions indicated were pooled and used for structural analysis. (······) Absorbance at 254 nm ; (◦ — ◦) radioactivity.

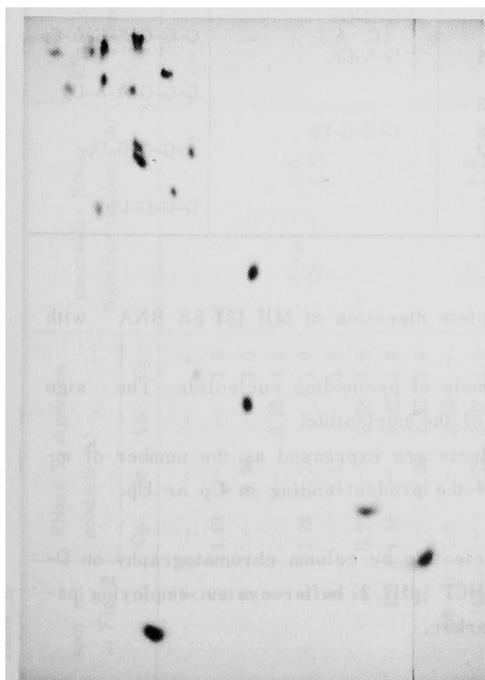


図 2(a)

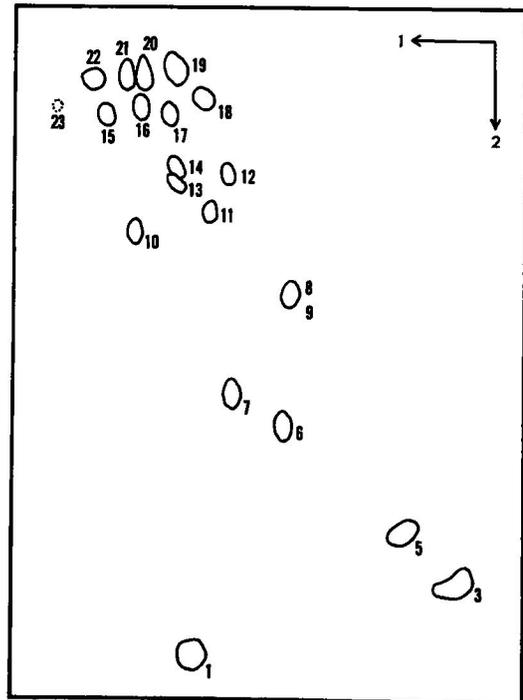


図 2(b)

Table I

spot no. in Fig. 2	RNase T ₂ digestion products (a)				RNase T ₁ digestion products (b)	RNase U ₂ partial digestion products (c)	sequence deduced
	Cp	Ap	Up	Gp			
1	—	—	+	—			Up
3	+	—	—	—			Cp
5	1.0	1.08	—	—			A-Cp
6	1.0	—	—	1.04			G-Cp
7	—	0.99	1.0	—			A-Up
8, 9(d)	1.0	2.45	—	0.97	A-A-Gp : 0.72 Cp : 1.00 A-A-Cp : 1.0 Gp : 1.40		A-A-G-Cp G-A-A-Cp
10	—	—	1.0	1.04			G-Up
11	1.0	—	—	1.69			G-G-Cp
12	1.0	0.83	—	1.63	A-Gp : 0.62 Gp : 0.61 Cp : 1.0	G-Gp G-Cp	A-G-G-Cp
13	—	0.91	1.0	0.96	A-Up : 1.0 Cp : 1.09		G-A-Up
14	—	0.89	1.0	0.84	A-Gp : 0.94 Up : 1.0		A-G-Up
15	—	—	1.0	1.62			G-G-Up
16	—	1.19	1.0	1.68	A-Up : 1.0 Gp : 1.81		G-G-A-Up
17	1.0	—	—	2.47			G-G-G-Cp
18	1.0	2.24	—	2.91	A-A-Gp : 0.75 Gp : 1.56 Cp : 1.0	A-G-Cp	G-G-A-A-G-Cp
19	1.0	1.63	—	3.57	A-Gp : 1.11 A-Cp : 1.0 Gp : 3.15	G-G-Gp (G, A ₂) G-A-Cp	G-G-G-A-G-A-Cp
20	—	2.18	1.0	2.55	A-A-Up : 1.0 Gp : 3.02		G-G-G-A-A-Up
21	—	1.31	1.0	2.91	A-Gp : 0.88 Gp : 1.82 Up : 1.0	G-G-G-Up	A-G-G-G-Up
22	—	—	1.0	2.53			G-G-G-Up

Table I Analysis of oligonucleotides obtained by complete digestion of MH 134 5S RNA with pancreatic RNase.

- a) The results are expressed relative to 1 mole of pyrimidine nucleotide. The sign + or - indicates the presence or absence of the nucleotide.
- b) The yields of the RNase T₁ digestion products are expressed as the number of moles of each product relative to 1 mole of the product ending in Cp or Up.
- c) Only major products are shown.
- d) Chain lengths were determined as tetranucleotide by column chromatography on D-EAE-cellulose with 7M urea-0.01M Tris-HCl (pH 7.2) buffer system employing pancreatic digest of tRNA as an internal marker.

Table II

spot no. in Fig. 2	RNase T ₂ digestion products (a)			pancreatic RNase digestion products (b)	RNase U ₂ digestion products (c)	snake venom phosphodiesterase digestion products (d)			spleen phosphodiesterase partial digestion products (e)	deduced sequence
	Cp	Ap	Up Gp			pC	pA	pU		
1	-	-	- +							Gp
2	1.01	-	- 1.0							C-Gp
3	-	0.96	- 1.0							A-Gp
4	-	-	0.92 1.0							U-Gp
6	1.28	1.27	- 1.0	A-Gp : 1.0 Cp : 1.15						C-A-Gp
8	-	2.11	- 1.0							A-A-Gp
9	0.93	-	1.38 1.0							U-C-Gp
10	1.16	-	1.22 1.0							C-U-Gp
11	-	1.06	1.33 1.0		U-Ap : 1.0 Gp : 0.53					U-A-Gp
50-B	1.0	-	2.10 -							C-U-U-Uoh
13	-	1.15	0.97 1.0	Gp : 1.0 A-Up : 1.14						A-U-Gp
14	2.61	-	- 1.0							C-C-C-Gp
17	2.28	1.15	- 1.0		C-C-Gp : 0.98 Ap : 1.0					A-C-C-Gp
20	1.12	2.12	- 1.0	Gp : 1.0 A-A-Cp : 1.03						A-A-C-Gp
24	1.61	-	1.12 1.0							C-C-U-Gp
51	1.16	1.84	1.28 1.0	A-A-Gp : 1.0 Cp : 1.41 Up : 1.06						C-U-A-A-Gp
52	0.81	0.89	2.56 1.0	Gp : 1.0 Up : 3.24 A-Cp : 1.0	U-Ap : 1.0 (C, U ₂) Gp : 1.19					U-A-C-U-Gp
54	2.02	3.04	1.10 1.0	Gp : 1.0 Cp : 0.96 A-Cp : 1.01 A-A-Up : 0.86	Ap : 2.12 U-Ap : 1.0 C-C-Gp : 0.80					A-A-U-A-C-C-Gp
50-A	1.09	-	1.0 -							C-U-Uoh
55	7.16	3.42	2.20 1.0	Gp : 1.0 Up : 5.55 A-Cp : 2.39 A-Up : 1.46	C-C-Ap : 1.85 U-Ap : 1.0 (C ₃ , U) Gp : 0.65					((C-C-A), U-A) C-C-C-U-Gp

C-U-Gp

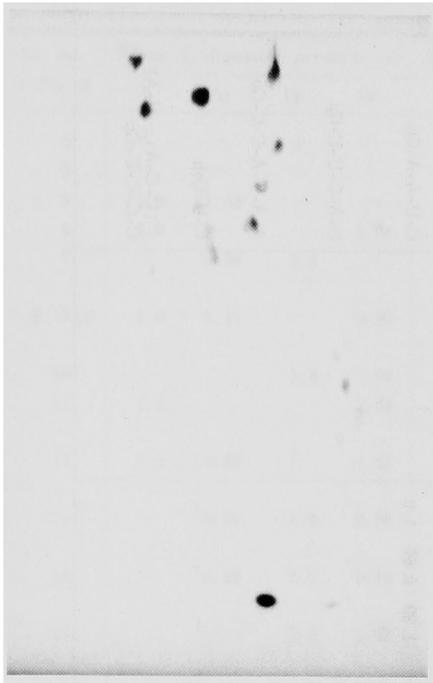


図 2(c)

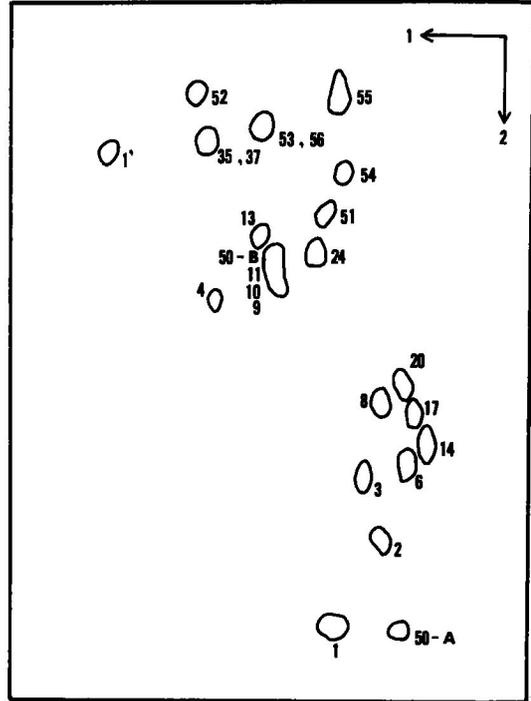


図 2(d)

Fig. 2. Typical autoradiographs of two-dimensional electrophoresis of pancreatic RNase (a) and RNase T₁ (c) digests of ³²P-labeled 5 S RNA from MH 134 cells: Electrophoresis was from right to left on cellulose acetate at pH 3.5, and from top to bottom on DEAE-cellulose paper at pH 1.9. Diagrams of autoradiographs of pancreatic RNase (b) and RNase T₁ (d) digests of ³²P-labeled 5 S RNA from MH 134 cells on the two dimensional system. The numbers correspond to the oligonucleotides whose sequences are given in Table I and II.

以外は Table I の結果の如く塩基配列が決定された。U₂ RNase はプリンを 3' 末端としてもつヌクレオチドに切断するが酵素量および消化時間等により、容易に部分分解物を作る。そのため、生じた部分分解物の分析から大きなオリゴヌクレオチドの塩基配列が決定できることがある。スポット 12, 18, 19, 21 は U₂ RNase 部分分解によりえられたオリゴヌクレオチドの分析結果からその塩基配列が決定された。これら部分分解物は電気泳動の移動度および T₂ RNase 消化による塩基組成分析からその塩基配列を決定した。スポット 23 を T₂ RNase 消化後 Dowex-1 カラムで溶出したパターンを Fig. 3 に示した。すなわち二つの放射活性のピークを認め、一つはマーカールの Up と完全に一致して、もう一つはマーカールの GTP

のすぐ後に溶出されている。Hatlen らにより報告された ppGp と一致する⁹⁾二つの放射活性の比は Up: ppGp=1.0:0.7 であった。スポット 23 は 5' 末端のオリゴヌクレオチドであり、その塩基配列は ppG-Up と決定された。

3: T₁ RNase 消化によるオリゴヌクレオチドの分離および分析。

Fig. 2-c, d に T₁ RNase 消化によるオリゴヌクレオチドの分離パターンとその diagram を示した。しかし T₁ RNase 消化だけ行ったものでの電気泳動では、三組の重なり合うスポットが存在した (spot 9, 10, 11 と 50-B, spot 35 と 37, spot 53 と 56)。これらのスポットは再電気泳動あるいは T₁ RNase と PMase との混合消化により分離できた。スポッ

Table II Analysis of oligonucleotides obtained by complete digestion of MH 134 5 S RNA with RNase T₁.

- a) The base composition are expressed as the number of moles of each nucleotide relative to 1 mole of Gp. The sign + or - indicates the presence or absence of nucleotide.
- b) The yields of the pancreatic RNase digestion products are expressed as the number of moles of each product relative 1 mole of the product ending in Gp.
- c) The yields of the RNase U₂ digestion products are expressed as the number of moles of each product relative to 1 mole of the product ending in Ap.
- d) The yields of the snake venom phosphodiesterase digestion products are expressed as the number of moles of each product relative to 1 mole of pGp, except for the 3'-terminal nucleotide. The sign + or - indicates the presence or absence of the nucleotide.
- e) Only major product is shown.
- f) pGp is identified by its electrophoretic mobility and also by Dowex-1 column chromatography.

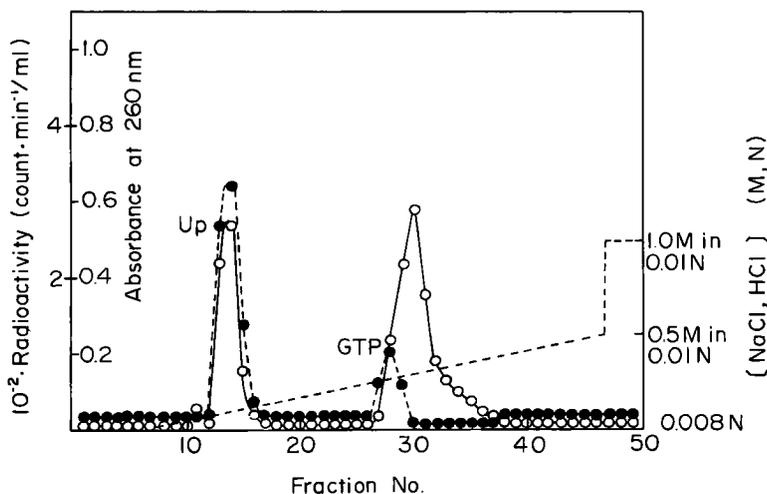


Fig. 3. Chromatography of RNase T₂ hydrolysate of spot 23 derived from pancreatic RNase digest of ³²P-labeled MH 134 5 S RNA on Dowex-1 column. Spot 23 obtained in Fig. 2. was eluted from DEAE-cellulose paper and incubated with 0.1 unit of RNase T₂ in 10 μl 0.01 M sodium acetate buffer pH 4.5. The digest was loaded on a Dowex-1 column (0.3x20cm) with 0.5-1 A₂₆₀ unit of Up and GTP markers. The column was equilibrated with 0.008 N HCl and eluted with a linear gradient of 0 M NaCl, 0.008 N HCl-0.5 M NaCl, 0.01 N HCl (20 ml each). The absorbance at 260 nm was measured and 1 ml of each fraction was counted. (······) Absorbance at 260 nm ; (—○—) radioactivity ; (- - - -) NaCl concentration.

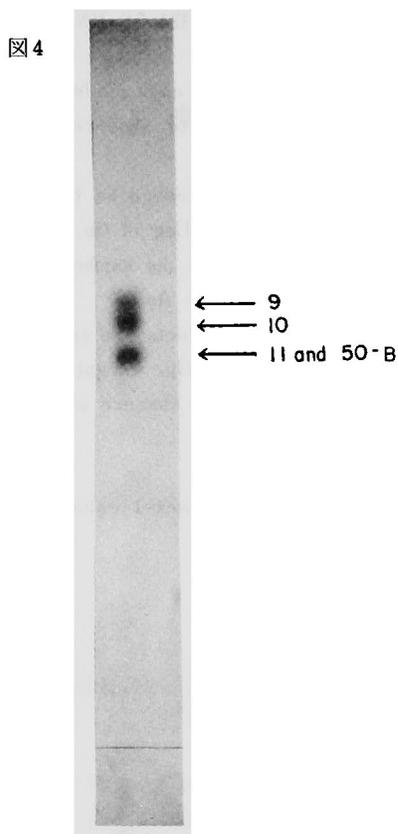


Fig. 4. Autoradiograph of re-electrophoresis of an overlapping spot obtained from RNase T_1 digestion of ^{32}P -labeled MH 134 5 S RNA (Fig. 2-c,d). Electrophoresis was from bottom to top on DEAE-cellulose paper at 1.9.

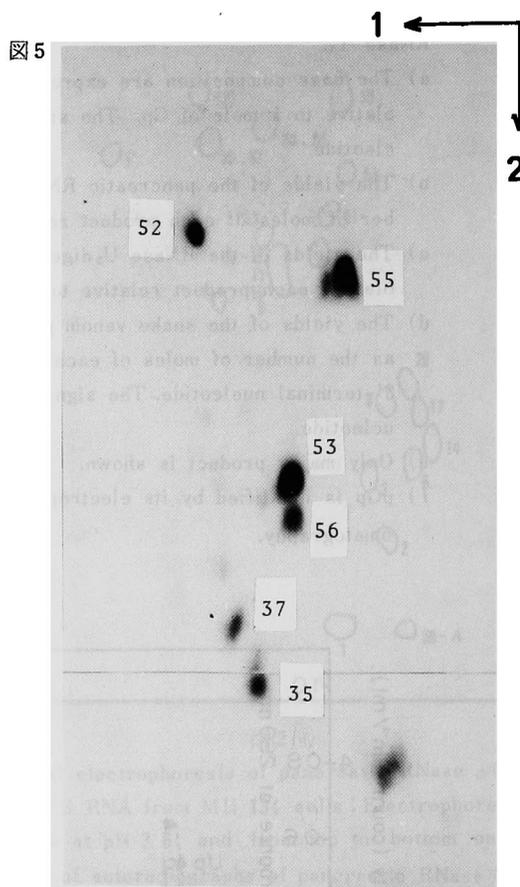


Fig. 5. Radioautograph of two-dimensional electrophoresis of simultaneous digestion of ^{32}P -labeled MH 134 5 S RNA with RNase T_1 and alkaline phosphatase. Electrophoresis was from right to left on cellulose acetate at pH 3.5, and from top to bottom on DEAE-cellulose paper at pH 1.9. The numbers correspond to the oligonucleotides whose sequences are given in Table II and VI.

ト 9, 10, 11 と 50-B は DEAE ペーパーの再電気泳動にて三つの band に別れた (Fig. 4). スポット 11 は U_2 RNase 消化により三つのスポットに分離され, そのうちの二つは G_p と $U-A_p$ で残りはスポット 11 と同じ電気移動度を示し, T_2 RNase 消化により $C_p : U_p$ がそれぞれ 1.0 : 2.1 であった. また snake venom PDase 消化によっては pU のみが得られた. それ故このスポットは 3' 末端のうちの一つで, $C-U-U-Uoh$ の塩基配列であると決定された. 他の

3' 末端のスポットは 50-A で, T_2 RNase および snake venom PDase 消化物の分析結果から $C-U-Uoh$ と決定された. Table II に T_1 RNase 消化により得られたオリゴヌクレオチド (スポット 35, 37, 53, 56 を含まず) の隣 RNase, U_2 RNase, snake venom PDase および spleen PDase 消化物の分析結果を示した.

他の二組の重なり合うスポット (スポット 35 と 37, スポット 53 と 56) は, T_1 RNase と PMase との混

合消化により分離できた。Fig. — 5 にそのパターンを示した。Table III はそれらのスポットの塩基組成、豚 RNase および snake venom PDase 消化物の分析結果である。しかし Table III だけではこれらのスポットの塩基配列は決定できないので、U₂RNase 消化を行い DEAE ペーパーの電気泳動により消化物を分離し (Fig. — 6) さらに spleen PDase 部分分解により分析した。(Table IV), Table III および IV の結果よりスポット 35, 37, 53, 56 の塩基配列はそれぞれ、U-C-U-Gp, U-U-A-Gp, A-U-C-U-C-Gp, U-C-U-A-C-Gp と決定された。スポット 55 はひじょうに長い鎖長をもったオリゴヌクレオチドであるため、spleen PDase の部分消化を必要とした。酵素量、消化時間を種々かえて検討した結果、Fig. — 7 に示す如く多数の部分分解物を得た。これらを

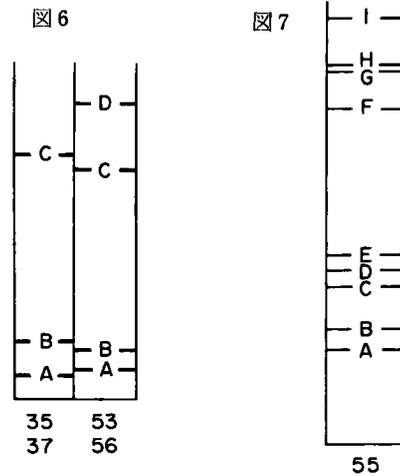


Fig. 6. Diagram showing the positions of the split products of RNase U₂ digestion of certain overlapping spots obtained from the RNase T₁ digest of MH 134 5 S RNA. Fractionation was carried out with electrophoresis on DEAE-cellulose paper at 1.9, from bottom to top.

Fig. 7. Diagram showing the position of the split products of partial spleen phosphodiesterase digestion of spot 55 obtained from the RNase T₁ digest of MH 134 5 S RNA. Fractionation was by one dimensional electrophoresis on DEAE-cellulose paper at 1.9, from bottom to top.

Table III

spot no. in Fig. 5	RNase T ₂ digestion products (a)				snake venom phosphodiesterase digestion products (b)				pancreatic RNase digestion products (c)	sequence deduced
	Cp	Ap	Up	Gp	pC	pA	pU	pG		
35	1.0	—	1.63	—	0.77	—	0.98	1.0	Cp : 1.75 Up : 1.01 A-Up : 1.0 Cp : 0.92 Up : 1.98 A-Cp : 1.0	U (C, U) Goh
37	—	1.0	2.44	—	—	1.47	1.42	1.0		U (U, A) Goh
53	1.79	1.0	2.21	—	2.36	—	2.14	1.0		A-U (C ₂ , U) Goh
56	1.90	1.0	2.09	—	2.26	1.18	1.27	1.0		U (A-C, U, C) Goh

Table III Analysis of dephosphorylated oligonucleotides obtained by simultaneous digestion of M H 134 5S RNA with RNase T₁ plus alkaline phosphatase.

- a) The base composition are expressed as the number of moles of each nucleotide relative to 1 mole of the nucleotide present in the lowest yield. The sign—indicates the absence of corresponding nucleotide.
- b) The yields of snake venom phosphodiesterase digestion products are expressed as the number of moles of each nucleotide relative to 1 mole of pG.
- c) The yields of pancreatic RNase digestion products are expressed as the number of moles of each nucleotide product relative to 1 mole of the product ending in Cp or Up.

Table IV

spot no. in Fig. 6	RNase T ₂ digestion products (a)				spleen phosphodiesterase partial digestion products (b)	sequence deduced
	Cp	Ap	Up	Gp		
35, 37 A	1.18	—	2.42	1.0	C-U-Gp	U-C-U-Gp
B	—	1.0	2.77	—		U-U-Ap
C	—	—	—	+		Gp
53, 56 A	2.16	—	1.75	1.0	U-C-Gp (C ₂ , U) Gp	U-C-U-C-Gp
B	1.24	1.0	2.19	—	U-Ap (C, U) Ap	U-C-U-Ap
C	1.26	—	—	1.0		C-Gp
D	—	+	—	—		Ap

Table IV Analysis of products obtained by RNase U₂ digestion of certain overlapping spots derived from complete RNase T₁ digestion of MH 134 5S RNA.

- a) The base compositions are expressed as the number of moles of each nucleotide relative to 1 mole of Ap or Gp. The sign + or — indicates the presence or absence of the corresponding nucleotide.
- b) Only large products are shown.

Table V

spot no. in Fig. 7	RNase T ₂ digestion products (a)				snake venom phosphodiesterase digestion products (b)				sequence deduced
	Cp	Ap	Up	Gp	pC	pA	pU	pGp	
55 A	4.60	2.33	0.84	1.0					(C ₃ , U, A ₂) Gp
B	3.46	1.03	0.98	1.0					(C ₃ , U, A) Gp
C	3.34	—	0.65	1.0					(C ₃ , U) Gp
D	1.71	—	0.98	1.0					(C ₂ , U) Gp
E	1.14	—	1.12	1.0	—	—	1.41	1.0	C-U-Gp
F	—	—	—	+					Gp
G	—	+	—	—					Ap
H	+	—	—	—					Cp
I	—	—	+	—					Up

Table V Analysis of products obtained by partial spleen phosphodiesterase digestion of spot 55 derived from complete RNase T₁ digestion of MH 134 5S RNA.

- a) The base compositions are expressed as the number of moles of each nucleotide relative to 1 mole of Gp. The sign + or — indicates the presence or absence of the corresponding nucleotide. The plus sign indicates the nucleotides detected by visual inspection of autoradiography.
- b) See Table II, Footnote g.

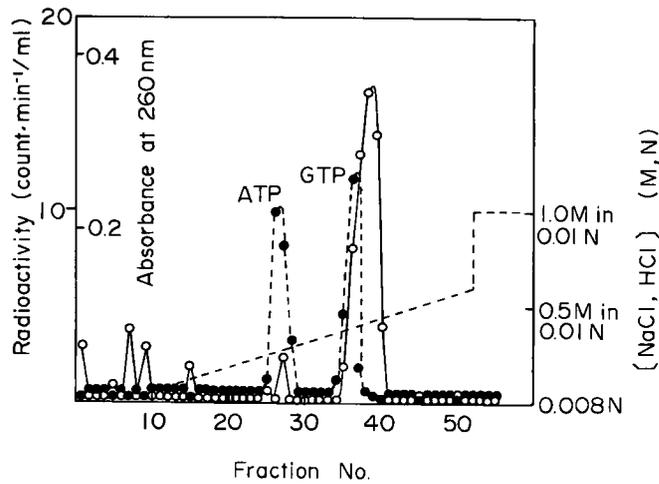


Fig. 8. Dowex-1 column chromatography of RNase T₂ hydrolysate of spot 1' derived from RNase T₁ digest of ³²P-labeled MH 134 5 S RNA. Spot 1' was eluted from DEAE-cellulose paper and incubated with 0.1 unit of RNase T₂ in 10 μl of 0.01 M sodium acetate buffer pH 4.5. The digest was loaded on a Dowex-1 column (0.3x20cm) with 0.5-1 A₂₆₀ unit of ATP and GTP as markers. Elution system was the same as described in Fig. 3. (· · · · ·) Absorbance at 260 nm ; (○ — ○) radioactivity.

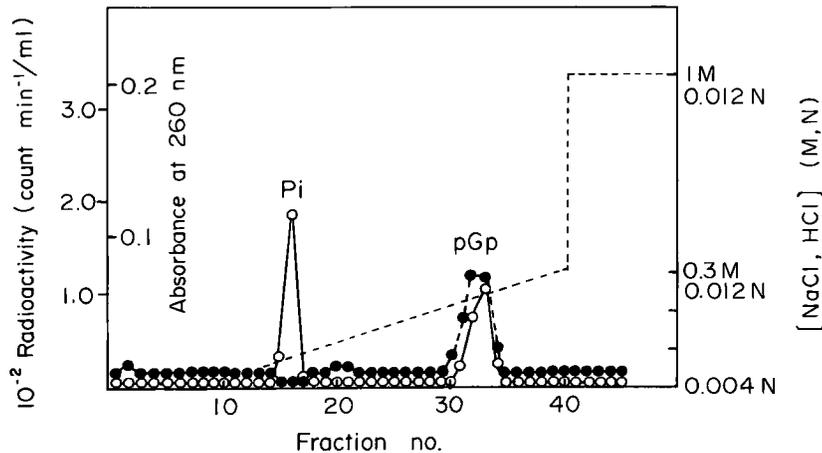


Fig. 9. Dowex-1 column chromatography of snake venom phosphodiesterase digest of spot 1' derived from RNase T₁ digest of ³²P-labeled MH 134 5 S RNA. Spot 1' was eluted from DEAE-cellulose paper and incubated with 2 μl of 10 mg/ml of snake venom phosphodiesterase in 5 μl of 0.01 M Tris-HCl, pH 8.5 at 37°C for 1 h. The digest was loaded on a Dowex-1 column (0.3x20cm) with about 0.2 A₂₆₀ unit of pGp as the marker. The column was equilibrated with 0.004 N HCl and eluted with a linear gradient from 0.004 N HCl to 0.3 M NaCl, 0.012 N HCl (20ml each). The absorbance at 260 nm was measured and 1 ml of each fraction was counted. (· · · · ·) Absorbance at 260 nm ; (○ — ○) radioactivity ; (-----) NaCl concentration.

更に T_2 RNase, snake venom PDase 消化により分析した結果 (Table V) スポット 55 は 13 の鎖長をもったオリゴヌクレオチドでその塩基配列は C-C-A-U-A-C-C-A-C-C-C-U-Gp と決定された。

スポット 1' の T_2 RNase 消化の Dowex-1 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを Fig. 8 に示した。放射活性は GTP のすぐ後に溶出されていて ppGp の位置に一致する。Fig. 9 にスポット 1' の snake venom PDase 消化の Dowex-1 カラムクロマトグラフィーを示した。マーカー pGp と一致した放射活性ピークと無機リンに一致した放射活性ピークとを認めることができる。snake venom PDase はヌクレオチド 5' - リン酸の α と β リン酸結合を切ることが知られているので、¹⁵以上の結果からスポット 1' は ppGp と決定された。

4: 5' 末端ヌクレオチドの決定

上記の如く 5' 末端は ppGp と決定されたが、5S RNA の T_2 RNase 消化物の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる溶出パターンの分析からも検討し、Fig. 10 にその溶出パターンを示した。

マーカーテトラヌクレオチドに一致して放射活性が認められ、このピークの Dowex-1 による再クロマトは GTP マーカーのすぐ後に溶出された。5S RNA には 2'-O-メチル化ヌクレオチドは存在しないので、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーでテトラヌクレオチドに一致して溶出されたピークは 5' 末端の ppGp であると決定された。

以上の結果より Table VI に示した如く、マウス腹水肝癌 5S RNA の豚 RNase および T_1 RNase 消化物の塩基配列と、モル比が決定された。豚 RNase 消化により 21 個、 T_1 RNase 消化により 25 個のオリゴヌクレオチドが得られ、各モル比はきれいな整数比となっている。KB 細胞のそれと比較して理論的モル比を示してあるが、その値から計算して鎖長は 120-121 であることがわかった。

考 察

動物細胞の 5S RNA の一次構造が完全に決定されているのは、現在のところ KB 細胞だけである。¹⁾そ

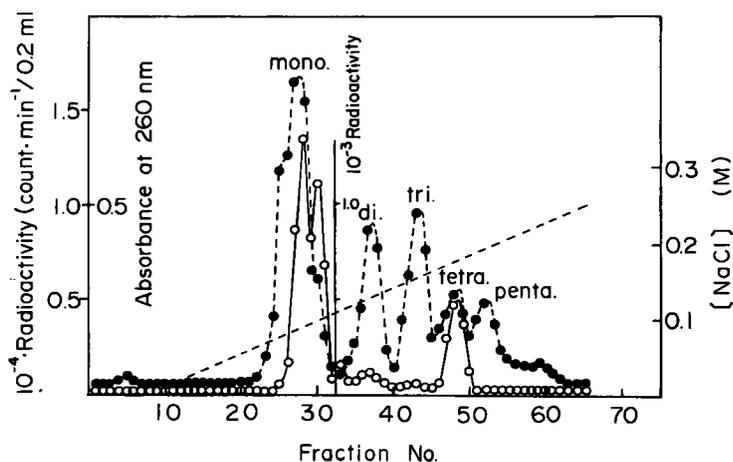


Fig. 10. DEAE-cellulose column chromatography of RNase T_2 digest of ^{32}P -labeled 5S RNA from MH 134 cells. About 0.05mg of the digest was neutralized, diluted with 0.01M Tris-HCl pH 7.6, containing 7M urea and loaded on a column (0.3x30cm) equilibrated with the same buffer. After applying approximately 10 O.D. units of tRNA pancreatic digest as a marker, elution was performed with a linear gradient of 0-0.25M NaCl formed in the same buffer (30ml each). The absorbance at 260nm was measured and 0.2ml of each fraction was counted. (•-----•) Absorbance at 260nm; (○——○) radioactivity; (-----) NaCl concentration.

Table VI

spot no. in Fig. 2	pancreatic RNase digestion products (A)			spot no. in Fig. 2	RNase T ₁ digestion products (B)		
	sequence	molar yield Exp. (a)	yield Theor.		sequence	molar yield Exp. (b)	yield Theor.
1	Up	11.53	13-14	1	Gp	14.98	15
3	Cp	14.00	17	2	C-Gp	1.16	1
5	A-Cp	5.40	5	3	A-Gp	1.07	1
6	G-Cp	4.37	4	4	U-Gp	1.04	1
7	A-Up	1.17	1	6	C-A-Gp	1.05	1
8	A-A-G-Cp	0.83	1	8	A-A-Gp	1.02	1
9	G-A-A-Cp	1.21	1	9	U-C-Gp	0.90	1
10	G-Up	2.53	2	10	C-U-Gp	1.14	1
11	G-G-Cp	1.00	1	11	U-A-Gp	0.95	1
12	A-G-G-Cp	0.97	1	50-B	C-U-U-Uoh	0.38	0.5
13	G-A-Up	2.18	2	13	A-U-Gp	1.13	1
14	A-G-Up	1.07	1	14	C-C-C-Gp	0.97	1
15	G-G-Up	0.96	1	17	A-C-C-Gp	1.01	1
16	G-G-A-Up	1.04	1	20	A-A-C-Gp	0.92	1
17	G-G-G-Cp	0.94	1	24	C-C-U-Gp	2.00	2
18	G-G-A-A-G-Cp	0.98	1	35	U-C-U-Gp	1.10	1
19	G-G-G-A-G-A-Cp	0.84	1	37	U-U-A-Gp	1.06	1
20	G-G-G-A-A-Up	1.03	1	51	C-U-A-A-Gp	1.07	1
21	A-G-G-G-Up	0.86	1	52	U-A-C-U-U-Gp	1.15	1
22	G-G-G-Up	1.15	1	53	A-U-C-U-C-Gp	1.92	2
23 (c)	ppG-Up	0.17	1	54	A-A-U-A-C-C-Gp	0.97	1
				55	C-C-A-U-A-C-C-A-C-C-U-Cp	0.91	1
				56	U-C-U-A-C-Gp	0.92	1
				50-A	C-U-Uoh	0.42	0.5
				1' (c)	ppGp	0.19	1

Table VI Digestion products of MH 134 5S RNA.

(A) pancreatic and (B) T₁RNase digestion products of MH 134 5S RNA. Experimental molar yield (Exp.) was obtained by counting the radioactivity in the area of the paper. (a, b); averages of 3 experiments, (c); averages of 2 experiments. Theoretical molar yields (Theor.) are calculated from the sequence of 5S rRNA according to Forget and Weissman (1969).

して完成はされていないがマウスの組織培養細胞⁷⁾や rat kangaroo¹⁶⁾の 5S RNA の豚 RNase や T₁ RNase による消化物の分析結果からの推論では、動物細胞の 5S RNA はすべて同一であるらしいと言われている。一方 HeLa 細胞やアフリカツメガエルでは 5S RNA に異種の配列 (sequence heterogeneity) の存在が見出されている。⁹⁾¹⁰⁾動物細胞の 5S RNA の遺伝子は数万の繰り返し (redundancy) があり¹⁷⁾¹⁸⁾ 5S 遺伝子が全く同一の配列をもったものから成っているよりもむしろその内には異った配列をもった遺伝子を含んでいると考えるのが自然であるかも知れない。そうすると、数万の redundancy をもった

遺伝子から転写された 5S RNA が heterogeneous であると考えられる。

著者は動物細胞の 5S RNA の一次構造を決定し、それより推定しうる 5S 遺伝子の転写機構や生合成等を再検討する目的で実験を行った。標品とした 5S RNA は Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーにより精製され tRNA 等の低分子 RNA や他の低分子 RNA (これはリボソーム RNA の degrade したものと考えられる) の混入を除外しているし、その T₂ RNase 消化の薄層クロマトグラフィーで、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルの塩基をもつ四つのヌクレオチド以外は見出すことができず (こ

こでは示していない), 5 S RNA としてきれいな標品であると考えられる.

マウス肝癌細胞の 5 S RNA の臍および T₁ RNase 消化物のモル比をまとめ, 塩基配列を考慮に入れた KB 細胞の同一消化物のモル比と比較して, 同一であることが認められたし, また, 塩基配列の同一性を考慮して, 全一次構造も全く同一であることが強く示唆された.

また著者は同系のマウスの肝から 5 S RNA を精製して, その臍および T₁ RNase 消化物の電気泳動パターンと各オリゴヌクレオチドのモル比が全く肝癌細胞 (MH 134) のそれと同一であることを見出し, Hatlen らが指摘した HeLa 細胞の 5 S RNA の heterogeneity は分離操作中における人工産物らしいことを指摘した¹⁹⁾動物細胞の 5 S 遺伝子すべてが全く同一であるかどうかは実際に DNA を分析する必要があり, 現段階ではかなり困難である. しかし, 5 S 遺伝子の転写としての 5 S RNA は, 著者の実験結果から推論できる様に (モル比がきれいな整数となっていること) homogeneous であると考えられる.

また 5' 末端に ppGp が見出されたのは非常に興味あることである. 細菌の 5 S RNA はその 5' 末端は monophosphate であることから^{21) 20)}その生合成過程で 5' 末端に leader sequence をもった前駆体の存在を示唆している.^{21) 22)}一方酵母や動物細胞では 5' 末端に mono, di, triphosphate の存在が見出されている.^{5) 20) 23)}このことは 5 S RNA が leader sequence なしに 5' 末端から転写されている可能性が示唆されるが, 一方転写後にリン酸化が起ることも否定でき

ない. 著者も 5' 末端に diphosphate の存在を見出したが, triphosphate は見出すことができなかった. これは分離操作中での phosphatase の作用によるものかどうか不明であるが, 5 S RNA の生合成について更に検討の余地があると思われる.

現在のところ 5 S RNA がいかなる役割を担っているのか判明していないが, 西川らは酵母の 5 S RNA はリボソーム RNA の大サブユニットの中にあって, tRNA がリボソームに結合するのに寄与するらしいことを二次構造モデルから示唆した²⁾すなわち 5 S RNA に -G-A-U-C- の配列がループ部分に存在し, これが tRNA の共通配列の -G-T-ψ-C- と相補的であり, tRNA がリボソームに結合するさいに重要な役割を果しているのではないかと推定している. マウス腹水肝癌 5 S RNA が, もし, KB 細胞と一次構造が同一であると考えられた場合に, とりうる二次構造モデル³⁾から推定すると, -G-A-U-C- の配列がやはりループ部分に存在し, 西川らのモデルと考え合わせて興味あることと思われる.

謝 辞

稿を終わるに当り U₂ RNase を分与下さった三菱生命科学研究所の内田庸子博士, また spleen PDase を供与下さった名古屋大学理学部の河田氏に感謝致します. 又本研究の推進にあたり, 絶えず種々御援助, 御助力下さった徳島大学医学部, 村松正実教授以下教室員の皆様様に深く感謝致します.

尚, 御懇篤なる校閲を頂いた俵教授, 金政教授に謝意を捧げます.

以 上

REFERENCES

- 1) Raacke, I. D. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **31**, 528-533, 1968.
- 2) Brownlee, G. G., Sanger, F. and Barrel, B. G. : J. Mol. Biol., **34**, 379-412, 1968.
- 3) Forget, B. G. and Weissman, S. M. : J. Biol. Chem., **244**, 3148-3165, 1969.
- 4) Dubuy, B. and Weissman, S. M. : J. Biol. Chem., **246**, 747-761, 1971.
- 5) Hindley, J. and Page, S. M. : FEBS Letters, **26**, 157-160, 1972.
- 6) Nishikawa, K. and Takemura, S. : FEBS Letters, **40**, 106-109, 1974.
- 7) Williamson, R. and Brownlee, G. G. : FEBS Letters, **3**, 306-308, 1969.
- 8) Labrie, F. and Sanger, F. : Biochem. J., **114**, 29p, 1969.
- 9) Hatlen, L. E., Amaldi, F. and Attardi, G. : Biochemistry, **12**, 4989-5005, 1969.
- 10) Brownlee, G. G., Cartwright, E., McShane, T. and Williamson, R. : FEBS Letters, **25**, 8-12, 1972
- 11) Hashimoto, S. and Muramatsu, M. : Eur. J. Biochem., **33**, 446-458, 1973.

- 12) Takai, K., Hashimoto, S. and Muramatsu, M. : *Amino acid and Nucleic acid*, **27**, 101-109, 1973
- 13) Sanger, F., Brownlee, G. G. and Barrel, B. G. : *J. Mol. Biol.*, **13**, 373-398, 1965.
- 14) Takemura, S., Mizutani, T. and Miyazaki, M. : *J. Biochem.*, **64**, 827-848, 1968.
- 15) Zeller, E. A. : *Arch. Biochem.*, **28**, 138-139, 1950.
- 16) Averner, M. J. and Pace, N. R. : *J. Biol. Chem.*, **247**, 4491-4493, 1972.
- 17) Brown, D. D. and Weber, C. S. : *J. Mol. Biol.*, **34**, 661-680, 1968.
- 18) Hatlen, L. E. and Attardi, G. : *J. Mol. Biol.*, **56**, 535-553, 1971.
- 19) Takai, K., Hashimoto, S. and Muramatsu, M. : *Biochemistry*, in press.
- 20) Soave, C., Nusca, R., Sala, E., Viotti, A. and Galante, E. : *Eur. J. Biochem.*, **32**, 392-400, 1973
- 21) Monier, R., Feuteun, J., Forget, B., Jordan, B., Reynier, M. and Varricchio, F. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 139-148, 1969.
- 22) Pace, N. R., Pato, M. L., McKibbin, J. and Radcliffe, C. W. : *J. Mol. Biol.*, **75**, 619-631, 1973.
- 23) Wegnez, M., Monier, R. and Denis, H. : *FEBS Letters*, **25**, 13-20, 1972.

COMPLETE DIGESTION OF 5S RIBOSOMAL RNA
FROM A MOUSE HEPATOMA CELL
WITH SPECIFIC RIBONUCLEASES

Kenichi TAKAI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Directors : Prof. Jutarō TAWARA and Prof. Yasuhiro KANEMASA)

ABSTRACT :

Ribosomal 5S RNA was purified from a hepatoma (MH134) of C3H/He mice labeled with ³²P. The purified 5S RNA was digested with pancreatic RNase and RNase T₁, and their endproducts were separated with two dimensional electrophoresis to determine their nucleotide sequences. The molecule had uridine at its 3'-terminus and guanylic acid its 5'-terminus. Except for the presence of a 5'-terminal diphosphate, these nucleotide sequences were identical with those of KB cells, confirming the identity of the primary structure of 5S ribosomal RNA between them.

The significance of 5'-terminal diphosphate in relation to the biosynthesis of 5S ribosomal RNA was also discussed.