

Trichomonas foetus における ribosome 分離法の比較検討

岡 好 万 林 弘 三 林 宣 子

徳島大学養護教諭養成所

古 谷 正 人 伊 藤 義 博

柳 生 正 見 尾 崎 文 雄

徳島大学医学部寄生虫学教室

(昭和48年4月13日 受領)

緒 言

マウス対 *Trichomonas foetus* (Tf) の組み合わせによる実験トリコモナス症の免疫の研究から防御抗原性は Tf-ribosomal fraction に局在することをたびたび公表してきた(岡ら, 1967a, b および1970)。しかし, 回収した ribosome の構造が不完全であることと, なにほどこかの他の細胞成分の混入という2点が未解決のまま残り, これが ribosome 抗原の効果判定に影響を与えていることが考えられる。Tf-ribosome の回収は *Escherichia coli* (Fogel & Sypherd, 1968; Itoh *et al.*, 1968) のそれに比して至難であることは常に経験したが, この原因はおそらく次のことのように思われる。Tf-ribosome を構成する protein 相互の会合力が著しく不安定であり, 分画過程の最初である細胞破壊が過激な場合は, いかにも Mg イオン濃度, RNase 活性の抑制および protein SH 基の保護に配慮が加えられようと無効に等しいことである。

そこで, 可及的 intact な ribosome を取り出すことを目的として細胞の物理的破壊に改良を加えた上で, 硫酸分画法 (Kurland, 1966) と従来われわれが用いた ribosome 回収法 (岡ら, 1970) とを比較した。

実験材料と実験方法

Cell homogenate の調製: 10%牛血清加 F-bouillon に発育対数中期にある Tf を3,000rpm 10分の遠心で集め, 0.01M MgCl₂-saline で3~4回洗浄後, 湿潤重量を測定した。次いで TMKDS 液 (0.01M Tris-HCl buffer pH 7.2, 0.01M MgCl₂, 0.06M KCl, DNase 2

μg/ml および0.001M spermidine)で20~30% (w/v) に懸濁し, 細胞を膨潤させるため約30分水中に放置した。その後, 0.125mm の clearance をもつ Teflon pestle で1,000 rpm 12 strokes で homogenize し, TMKDS 液を加えて最終的には10~15%の homogenate にした。光学顕微鏡下で観察した細胞破壊率は93~97%であった。

硫酸分画法による ribosome の分離: 上記の homogenate を12,000×g 20分遠心し, その上清をもとの容量 (90ml) に TMKDS 液で補正し, それに5% Brij 58を0.5%になるよう添加, 時々振盪しながら約20分間水中に放置した。次いで硫酸21gを加え約3分間 agitate した後25,000×g 10分遠心して上清 (Sup I) と沈渣 (Sed I) に分けた。Sup Iは硫酸21gを加え, 同様の操作によつて上清 (Sup II) と沈渣 (Sed II) に分けた。Sed IIは100ml の TMK 液 (0.01M Tris-HCl buffer pH 7.2, 0.01M MgCl₂ および 0.06M KCl) に懸濁し, 硫酸18gを加え, 上記のように操作して上清 (Sup III) と沈渣 (Sed III) を得た。Sup IIIはさらに硫酸40gを加えて同様に上清 (Sup IV) と沈渣 (Sed IV) に, Sed IVは100ml の0.7M 硫酸-TMK 液に懸濁して45,000×g 45分の遠心で Sup V と Sed V にそれぞれ分画した。最終的には Sup V を144,000×g 2.5時間遠心して ribosome と Sup VI に分けた。

従来の分画法による ribosome の分離: cell homogenate の最初の遠心上清に0.5%の割合に Brij 58を添加して硫酸分画法とまったく同様に処理し, その後 45,000×g 45分の遠心によつて上清 (Sup I) と沈渣

(Sed I) に分け、Sup I はさらに $144,000 \times g$ 2.5 時間の遠心により沈渣 (ribosome) と上清 (Sup II) に分画した。

Ribosome の遠心分析：上記 2 法によつて分画した ribosomal pellet は Teflon pestle を用いて TM_2K 液 ($0.01M$ Tris-HCl buffer pH 7.2, $0.002M$ $MgCl_2$ および $0.06M$ KCl) に懸濁し、日立 UCA-I 型超遠心分析機で設定回転数 $37,290rpm$, $12.8 \sim 13.1^\circ C$ で測定し $S_{20,w}$ を算定した。

Ribosome の蔗糖密度勾配遠心：各分画法で得た ribosomal pellet を $4ml$ の TM_2K 液に懸濁し、一部はそのまま $5 \sim 20\%$ 蔗糖勾配 (TM_2K 液にて作製) の上にのせた。その他の部分は $RNase$ $1mg/ml$ を含む TM_2K 液と等量に混じ、 $37^\circ C$ 30分処理後 $5 \sim 20\%$ 蔗糖勾配の上にのせた。SW-25 rotor を用いて $25,000rpm$ 150分遠心の後、遠心管底に細孔をあげ fraction collector に接続し、遠心内容を 70 等分した。各分画は $3ml$ になるように TM_2K 液を加え、 $260m\mu$ における OD を測定した。

紫外外部吸収測定：cell homogenate から ribosome 分離の各過程をチェックする目的で $220 \sim 300m\mu$ にわたる吸光パターンを日立 124 型 spectrophotometer で測定した。

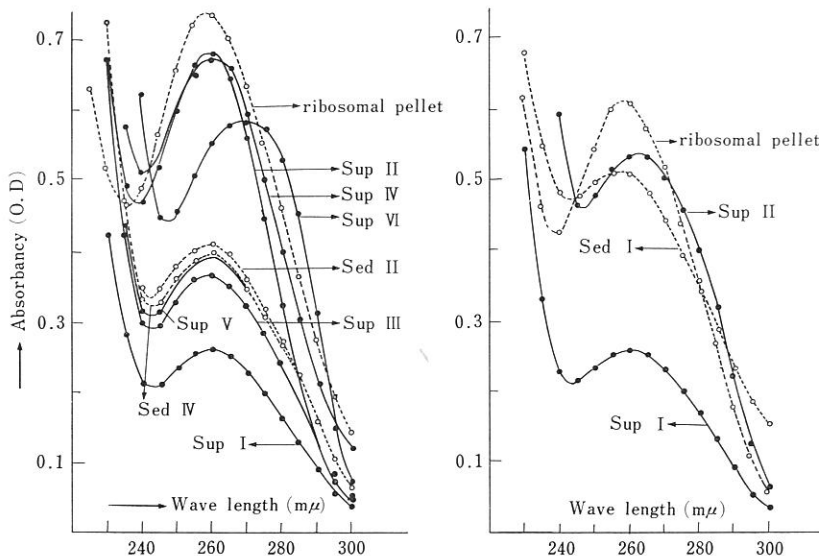
RNA および protein の定量：各分画法で得られた ribosomal pellet は一定濃度に懸濁し、RNA 含量は $260m\mu$ 吸光により、また protein は microbiuret 法によつて測定した。

実験成績

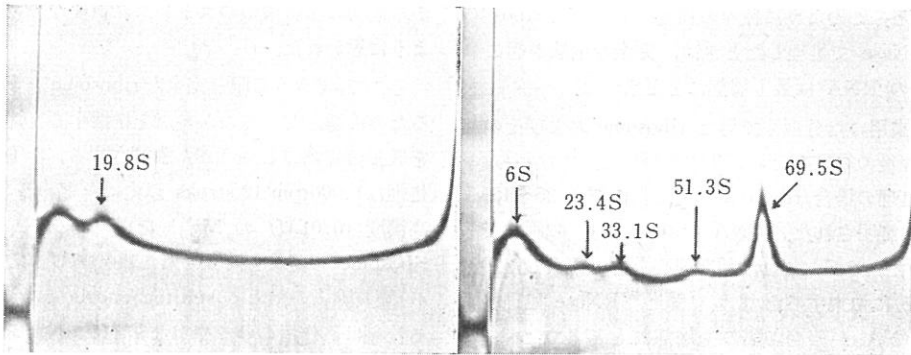
Ribosome を分離する際の各分画過程で ribosome の移動とそのおよその精度を推定する根拠を、 $240m\mu$ を軸とする RNA 最低吸収と、 $258m\mu$ を軸とする最高吸収がどちらにずれるか、最高吸収/最低吸収がどの程度か……の 2 点においた。

硫酸分画法：この方法において ribosome は Sup I, Sed II, Sup III, Sed IV および Sup V の順に回収されるはずである。

Fig. 1 (left) のとおりすべての ribosome は Sup I に移動した。その後の過程において ribosome 構成成分である RNA の多量が Sup II と Sup IV で証明された。また過程の終りに近い Sup V の最低吸収は $242m\mu$ を示し、 $260m\mu$ 以後の吸収曲線にも ribosome 構成以外の protein を含む傾向を示した。ところが終局の ribosomal pellet は ribosome 特有のパターンを示し、最高吸収/最低吸収 = 1.59 であつた。また Sup VI には硫酸可溶性 protein の無視できない量を認めた (Fig. 1-left)。



left: ammonium sulfate fractionation method
right: usual differential centrifugation method
Fig. 1 Ultraviolet absorption curves of cell fractions



left: ammonium sulfate fractionation method
 right: usual differential centrifugation method
 sedimentation: at 37,290rpm for 24 min

Fig. 2 Analytical centrifugation patterns of ribosomal pellets

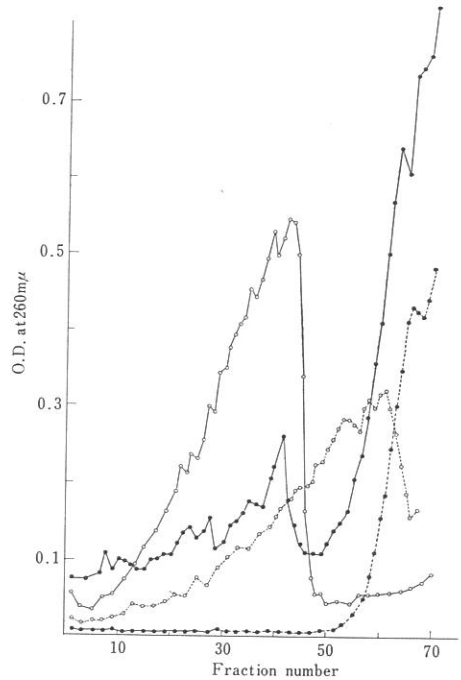
従来の ribosome 分画法: 45,000×g 遠心処理から生じた Sed I は上下2層からなり, 下層は乳白色稠密な glycogen 顆粒であり, 上層は淡褐色の軽い沈殿でわずかに RNA の吸収がみられ多分 polyribosome の存在も考えられる. 多くの ribosome は Sup I に回収されたが他の成分の混入も多く, 最高吸収/最低吸収=1.26 であつた. Sup I から得た ribosomal pellet の吸収パターンはかなり特有のもので最高吸収/最低吸収=1.44 に上昇した. しかし, Sup II にも RNA と可溶性 protein の存在を表わすパターンが認められた. これは mRNA 以外に, ribosome 由来 RNA のいくらかの損失を示すものと思われる (以上 Fig. 1-right).

Ribosomal pellet の沈殿恒数の測定: 両分画法によつて分離した ribosomal pellet を, 比較的高濃度に TM_2K 液に懸濁し, ただちに遠心分析を実施した.

硫酸分画で回収した ribosomal pellet は典型的な ribosome 紫外吸収パターンを示したにもかかわらず 19.8S とそれ以下の S 値をもつ peak を示したにすぎない (Fig. 2-left). これは ribosome の著しい崩壊を意味している. また従来の分画法による ribosomal pellet には Fig. 2-right のように 69.5S の大きな peak に続いて, 小さな 51.3, 33.1, 23.4 および 6S が証明された.

蔗糖密度勾配遠心による ribosomal pellet の性状: 硫酸分画法で得た ribosome は, その構造が著しく崩壊していることが遠心分析以外に蔗糖密度勾配遠心からも明らかに立証できた.

Fig. 3 に示したように 260m μ 吸収は, 蔗糖勾配の上層部に向かつて—20%から5%の方—漸次増大し, No. 61画分を主峰に No. 45~65画分の間に大半の RNA



○—○ : by usual differential centrifugation method
 ○····○ : by ammonium sulfate fractionation method
 ●—● : ribosomal pellet (○—○) treated with RNase
 ●····● : ribosomal pellet (○····○) treated with RNase

Fig. 3 Sucrose density gradient profiles of ribosomal pellets

が証明された。このように種々の程度に崩壊した ribosome を RNase で処理したときは、完全な崩壊が起こり、すべての RNA は最上層部にとどまつた。

また、従来用いた分画法で得た ribosome およびその RNase 処理後の結果も Fig. 3 に表わした。すなわち、RNase 未処理の場合 ribosome の大半は No. 25~45 画分の間で証明された。RNA peak は No. 42 画分で最高を示しているが、これは前記遠心分析で観察した 70 S ribosome に由来すると思う。また、RNase 処理後は大量の RNA が蔗糖勾配の上層部にとどまつたが、硫酸分画法と異なり、一部の RNA は RNase 処理後もこれに耐えて ribosome の構造にとどまつた。

RNA および protein の定量：両分画法から得た ribosomal pellet は沈殿恒数と蔗糖勾配遠心の結果で著しい相違を表わしたにもかかわらず、RNA および protein の定量ではほぼ同様の成績を示した。すなわち、硫酸分画由来のものも、従来の分画法によるそれも、RNA 量が protein 量にいくぶんまさり、その比率 (RNA/protein) はそれぞれ 1.07 および 1.09 であつた。

総括および考案

Ribosome は in vivo において RNA 合成の刺激や ribosome 自体の合成を調節できるが (Nomura, 1970)、明らかに説明された機能は protein 合成である。しかし、ribosome 構成の個々の protein 分子がどのような役割を持つかは明らかでない。このような ribosome の分離にあつては、多くの場合細胞にかなり過激な物理力が加えられ、結果的に RNase 活性環境を生じ、ribosome 構造のすみやかな崩壊が起こる (Takanami, 1967)。又 Franklin & Godfrey (1966)、木方 (1969)、は polyribosome の安定性が細胞破壊時の物理力自体に強く依存していることを示した。Morgan ら (1968) は *Entamoeba invadens* からの分離を試み、非常に困難であるが bentonite および 2 価の cation (Ca^{++} , Mg^{++} および Mn^{++}) の使用により 75S ribosome とその subunit (32 および 51S) を得た。Tf ribosome の S 値はいまだじゅうぶん確認されていない。われわれは Teflon pestle を用いて、高密度 Tf 細胞をほぼ完全に破壊した後、RNase 活性を抑圧する目的で塩化アンモニウム分画を、他方では RNase inhibitor として polyvinyl sulfate あるいは spermidine, ribosomal protein SH 基保護剤として 2-mercaptoethanol の添加も試みたが、伊藤 (1968) の慎重な実験以外は失敗した。これらの経験

から最初の細胞破壊のストレスに重要なカギが存在するように思われた。

そこで、できうる限り完全な ribosome を多量に回収するために選んだいくつかの点を総括すると、1) Tf 細胞を低張溶媒内でじゅうぶん膨潤させる、2) Teflon pestle 処理は 1,000rpm 12 strokes 以内にとどめる、3) かなり高濃度 (0.01M) の Mg^{++} を用いたので、これによる ribosome の凝集を防止するため 0.06M KCl を用いる、4) 膜質除去のため postmitochondria extract に添加する洗剤は、作用のゆるやかな非イオン性 (Brij 58) のものを採用する。以上の配慮から 2 種の分画法を比較検討した。

硫酸分画法を実施した際、その過程 (Sup II, IV および VI) でかなりの RNA の損失をみたが、ribosomal pellet 自身は紫外外部吸収 ($258\text{m}\mu/235\text{m}\mu=1.59$)、RNA と protein の定量 (ribosomal pellet の懸濁液 1 ml 中の RNA/protein=1.07) の両者において典型的 ribosome の特性を表わした。しかし、これが見かけ上であることは遠心分析と蔗糖勾配遠心の結果から明らかに説明できる。すなわち、遠心分析で認めた 2 つの peak は 19.8S とそれ以下であり、蔗糖勾配遠心でも RNA の大半は勾配の比較的上層部で証明され、さらに RNase 処理を施すとほとんどの RNA は最上層部にとどまつた。これらの結果より硫酸分画法では ribosome は多くの fragment に破壊され、これに微量の RNase の添加は完全な崩壊に導くと考えられる。

前述の cell homogenate に、従来の分画法を適用した場合、一部の ribosome (おそらく membrane-bound ribosome) は Sed I に移動したが、ほとんどは ribosomal pellet として回収され、 $258\text{m}\mu/238\text{m}\mu=1.44$ を示した。これの遠心分析の結果 51, 33 および 23S も痕跡的には認められたが、ほとんどは 70S peak として示された。この結果は蔗糖勾配遠心の成績ともよく一致した。Subunit の分離が顕著でなかつた理由としては、高濃度 Mg^{++} (0.01M) を用い、またこれによる ribosome 凝集防止のため 0.06M KCl を添加したことがあげられる。70S particle は Fig. 3 に示したように、RNase に部分的な抵抗を示した。また定量分析においても RNA/protein=1.09 であつたことから損傷度の少ない、かなり安定な ribosome と思われる。

以上の成績から推測できることは、Tf ribosome は細胞破壊時のストレスに著しく敏感であると同時に、硫酸処理のような過激な protein 除去法も適していない。

おそらく ribosome を構成する protein 相互の会合性が, bacterial ribosome よりもはるかに弱いためと考えられる。現在, 共同研究者の林は, さらにストレスの少ない滲透圧と凍結融解から出発して70S よりも大きいS値の ribosome 分離に成功した。この成績は別に公表したい。

結 論

発育対数期の *Trichomonas foetus* を集め, その洗浄細胞を低張溶媒内で膨潤させ, 次いで Teflon pestle を用い1,000rpm 12 strokes 以内で cell homogenate を調製した。これを素材として硫酸分画法および従来われわれが用いた遠心分画法により ribosome の分離を比較検討し次の結論を得た。

1. *Trichomonas foetus* ribosome は物理的ストレスに著しく鋭敏であるが, ここに記録した homogenate 調製に従うと比較的安定であつた。
2. 硫酸処理による ribosome の分離は, ribosome 構造に著しい損傷を与え, 19S 以下の fragment にこわれ, これらは RNase 処理によつて完全に崩壊した。
3. 従来の遠心分画法から得た ribosome は, ほとんど70S であり, RNA/protein=1.09であつた。これらの ribosome の一部は RNase に抵抗を示した。

文 献

- 1) Fogel, S. and Sypherd, P. S. (1968) : Extraction and isolation of individual ribosomal proteins from *Escherichia coli*. J. Bact., 96, 358-364.
- 2) Franklin, T. J. and Godfrey, A. (1966) : Polyribosomes in rat-liver preparation. Biochem. J., 98, 513-521.
- 3) Itoh, T., Otaka, E. and Osawa, S. (1968) : Release of ribosomal proteins from *E. coli* ribosomes with high concentration of lithium chloride. J. mol. Biol., 33, 109-122.
- 4) 伊藤義博(1968) : 遠心分画法による *Trichomonas foetus* 細胞構造物の分離と化学的性状. 寄生虫誌, 17, 494-508.
- 5) 木方行郎(1969) : ポリゾームのとり方. 蛋白質核酸酵素, 14, 506-516.
- 6) Kurland, C. G. (1966) : The requirements for specific sRNA binding by ribosomes. J. mol. Biol., 18, 90-108.
- 7) Morgan, R. S., Slayter, H. S. and Weller, D. L. (1968) : Isolation of ribosomes from cyst of *Entamoeba invadens*. J. Cell. Biol., 36, 45-51.
- 8) Nomura, M. (1970) : Bacterial ribosomes. Bacteriol. Rev., 34, 228-277.
- 9) 岡好万・伊藤義博・尾崎文雄(1967a) : 原虫細胞の免疫原性の解析(19) *Trichomonas foetus* の大粒子と microsome の防御抗原性. 医学と生物学, 74, 333-336.
- 10) 岡好万・伊藤義博・新里仁達・尾崎文雄(1967b) : 原虫細胞の免疫原性の解析(20) *Trichomonas foetus* の microsome から分離した膜構造と ribosome の防御抗原性. 医学と生物学, 75, 17-20.
- 11) 岡好万・新里仁達・尾崎文雄(1970) : 原虫細胞の免疫原性の解析(26) *Trichomonas foetus* の ribosomal protein および membrane structure の抗原的役割と complete adjuvant 添加の意義. 寄生虫誌, 19, 182-188.
- 12) Takanami, M. (1967) : Preparation of ribosomes and their subunits from *Escherichia coli* cells. Method in Enzymology (Grossman, L. and Moldave, K., editor), Vol. 12, Academic Press, N.Y., 491-494.

Abstract

COMPARATIVE STUDIES ON THE ISOLATION OF
RIBOSOMES IN *TRICHOMONAS FOETUS*

Yoshikazu OKA, Hiromi HAYASHI and Noriko HAYASHI

(*Training School for Nurse Teachers, Tokushima University, Tokushima*)

Masato FURUYA, Yoshihiro ITO, Masami YAGYU and Humio OSAKI

(*Department of Parasitology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima*)

Cultured harvest cells of *Trichomonas foetus* were suspended in 0.002 M magnesium saline and were washed and centrifugated four to five times. Then the cells were resuspended in a low osmotic solution (0.01 M Tris-HCl pH 7.2, 0.01 M MgCl₂, 0.06 M KCl, 0.001 M spermidine and 2 μg of DNase per ml) and were left to stand for 30 minutes for swelling before they were homogenized by teflon homogenizer at 1,000 rpm within 12 strokes.

Comparative studies of ammonium sulfate fractionation method and differential centrifugation method which the authors have usually employed were performed with the homogenate by examinations of ultraviolet absorption spectra and sedimentation patterns and by sucrose gradient analyses and determinations of the content of RNA and protein.

The results obtained were as follows;

1 The structure of ribosomes of *T. foetus* is so fragile that it is extremely sensitive to even minute quantity of RNase and is easily broken by mechanical stresses. However, the above mentioned technique for homogenization was found to be better than those which were usually undertaken.

2 Isolation procedure of ribosomes using ammonium sulfate fractionation gave a considerable damage to the structure of ribosomes and they were broken into fragments of smaller than 19S. They were further broken down completely by treatment with RNase.

3 The majority of ribosomes isolated by the usual differential centrifugation method were of 70S and the RNA/protein ratio was 1.09. Those ribosomes were resistant to the treatment with RNase to some extent.