

氏 名 (本籍) かわ 川 かみ 上 まこと 實 (愛知県)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 1 3 3 号

学位授与年月日 昭和 4 8 年 1 2 月 1 3 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農芸化学専攻

学位論文題目 家蚕後部絹糸腺のアミノ酸転移
RNAに関する研究
- Isoaccepting tRNAの分離
精製とその意義 -

(主 査)
論文審査委員 教授 志村 憲助 教授 玉利 勤治郎
教授 高橋 甫

論文内容要旨

第1章 序 論

蛋白質生合成機構の大綱は、ほぼ明らかにされてきたが、Isoaccepting tRNA (1種類のアミノ酸に対応する2成分以上のtRNA) が生体内でいかなる役割を演じているのかについては、ほとんど知られていない。したがって、著者は Isoaccepting tRNA の生理的意義を解明することを研究目的とした。

Isoaccepting tRNA の多様性の意義として、

- (1) 各々の tRNA のコード認知が異なる、即ちアンチコードンが異なる場合、
- (2) 種々の tRNA が、異なった蛋白質の生合成 (あるいは他の化合物の生合成) に関与する場合、
- (3) Isoaccepting tRNA に対し、各々特異的なアミノアシル tRNA 合成酵素が存在する場合、

(4) artifact あるいは生理的にあまり意味をもたない場合、などの可能性が考えられる。したがって、これらの点を解明していく計画をたてた。

実験材料としては、蚕の後部絹糸腺を用いた。その理由は、フィブロイン合成をめぐる種々の反応が明らかになっていることと、著者の所属する教室において、フィブロイン生合成機構が研究されており、その一環として tRNA の立場から参加することによる。

本論文は、8章からなる。第2章においては、本研究を進行させていく上で重要な実験技術としての液体シンチレーション測定法について記載した。第3章において、蚕の後部絹糸腺のアミノアシル tRNA プールを検討し、tRNA の分離精製について第4章に述べた。分離した Isoaccepting tRNA とフィブロイン合成への関与、および Isoaccepting tRNA^{Gly} のコード認知様式を第5～6章において明らかにした。第7章では、フィブロイン合成における Isoaccepting tRNA^{Gly} の役割を追求し、第8章において、以上の結果を総合的に考察した。

第2章 液体シンチレーション測定のための試料調製法

本研究を進行させていく上で最も重要な実験技術の一つは、放射能の測定である。 ^{14}C および ^3H で標識された試料を正確に測定する方法として、新しく、ノニルフェノールポリエトキシエタノールを用いるシンチレーターの開発および簡便な試料の可溶化法を確立した。

第3章 蚕の後部絹糸腺のtRNAのアミノ酸受容活性

Isoaccepting tRNAの分離精製に先立ち、後部絹糸腺tRNAの各種アミノ酸に対する受容活性を ^{14}C -クロレラ蛋白質分解物などを用いて検討した。活性の程度は、後部絹糸腺組織蛋白の構成アミノ酸より、フィブロインの構成アミノ酸に類似してグリシン、アラニンおよびセリンに対応するtRNAの活性が大きかった。このことは、フィブロイン合成に好都合といえることができる。

Table 1. Amino acid acceptor activity of posterior silk gland tRNA.

Amino Acid	Expt. 1 [*]	Expt. 2 ^{**}	Amino Acid Composition	
			Fibroin	Tissue Protein
	(p mole/mg of tRNA)		(μ mole/mg of protein)	
Gly	706	6200	44.0	12.3
Ala	677	5200	30.1	10.9
Ser	469	2700	11.4	6.5
Val	253	—	2.0	5.9
Asp	219	—	1.8	9.3
Lys	57	—	1.4	8.2
Glu	56	—	1.2	10.1
Leu	31	—	0.6	7.8
Thr	22	—	0.7	5.0
Phe	61	—	0.7	3.4
Arg	170	—	0.6	5.2
Ile	20	—	0.6	4.2
Pro	92	—	0.4	4.6

* Amino acid acceptor activity was examined using ^{14}C -chlorela protein hydrolysate.

** Amino acid acceptor activity was examined using ^{14}C -labeled amino acid.

第4章 グリシン、アラニンおよびセリン tRNA の分離精製

絹糸腺の tRNA には、グリシン、アラニンおよびセリンの受容活性が高く、これらの tRNA のフィブリン合成への寄与も大きいと考えられる。したがって、Isoaccepting tRNA の意義を明らかにする上で有利であると考え、これらのアミノ酸に対応する tRNA の分離精製を試みた。方法として、西村らの DEAE-Sephadex A-50 カラムを用いる方法、Kelmers らの逆相クロマト法および新しく開発したハイアミン-クロホルムを用いた逆相クロマトを組合せて精製を進めた結果、グリシン tRNA を 3 成分、アラニン tRNA を 6 成分、セリン tRNA を 5 成分に分別することが出来た。特にグリシン tRNA については高純度に精製することが出来たので以後の研究はグリシン tRNA を中心に進めた。

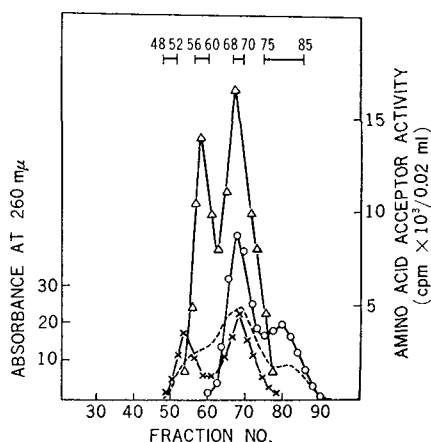


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 column chromatographic profile of posterior silk gland tRNA. A column (3.2×150 cm) was equilibrated with 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.0086 M MgCl₂ and 0.39 M NaCl. 1.2 g of tRNA dissolved in 20 ml of the above buffer was loaded onto the column. Linear gradient elution was carried out using 2 liters of the above buffer in the mixing chamber and 2 liters of 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.0133 M MgCl₂ and 0.475 M NaCl in the reservoir. The flow rate was about 30 ml/hr. Each fraction contained 20 ml of eluate. The recovery of tRNA from the column was: glycine, 95%; alanine, 90%; serine, 90%. ----, absorbance at 260 mμ; ×, alanine acceptor activity; Δ, glycine acceptor activity; ○, serine acceptor activity.

TABLE II. Summary of the purities of glycine, alanine, and serine tRNAs isolated from the posterior silk gland of *Bombyx mori*.

tRNA fraction	Fig. No.	Fraction No.	Approximate purity (%)†
tRNA ^{Gly} ₁	4	15-16	70
tRNA ^{Gly} ₂₋₁	6 a	40-46	81
tRNA ^{Gly} ₂₋₂	6 b	48-52	88
tRNA ^{Ala} ₁₋₁	3	117-118	92
tRNA ^{Ala} ₁₋₂	3	124-126	80
tRNA ^{Ala} ₁₋₃	3	129-130	73
tRNA ^{Ala} ₁₋₄	3	143-145	90
tRNA ^{Ala} ₂₋₁	5	31	21
tRNA ^{Ala} ₂₋₂	5	46	27
tRNA ^{Ser} ₁₋₁	5	32	17
tRNA ^{Ser} ₁₋₂	5	39-40	28
tRNA ^{Ser} ₂₋₁	7	40-43	51
tRNA ^{Ser} ₂₋₂	7	51-55	22
tRNA ^{Ser} ₂₋₃	7	65-70	25

† The purities were calculated from ¹⁴C-amino acid acceptor activities, assuming that 1 A₂₆₀ unit of tRNA in aqueous solution corresponds to 1.65 mμmoles.

第 5 章 アミノアシル-tRNA からフィブロインへのアミノ酸のとりこみ

5 令期 5 日目の蚕の後部絹糸腺より調製した蛋白合成系がフィブロイン合成であることを ^{14}C -クロレラ蛋白質分解物を用いて証明した上で、グリシン、アラニンおよびセリンの各々の Isoaccepting tRNA がフィブロイン合成に関与するの否かを検討した。すべての Isoacceptor は基質として、アミノ酸転移活性を有することが明らかになった。しかし、その転移活性に Isoaccepting tRNA 間で差異があることが観察された。

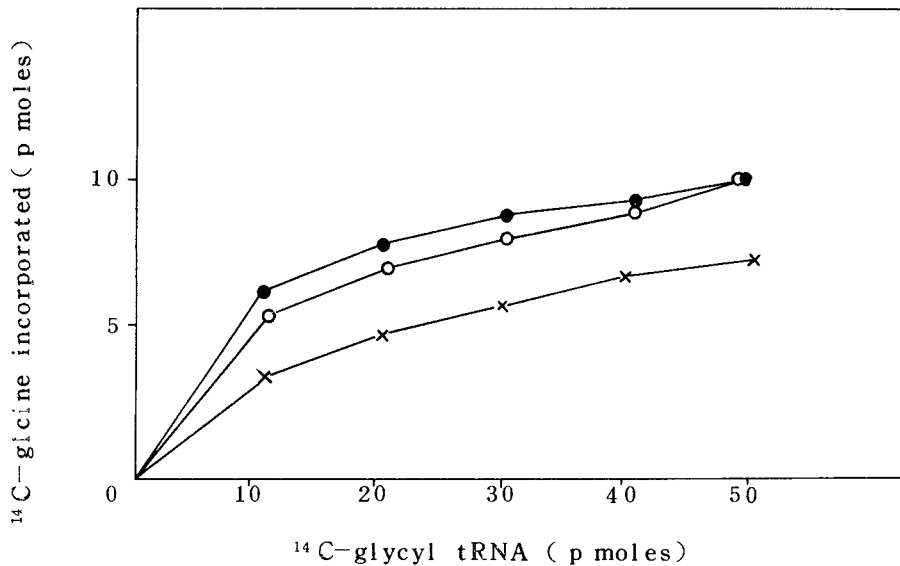


Fig 2. Incorporation of ^{14}C -glycine from glycyl tRNA into fibroin
 \times ^{14}C -glycyl-tRNA $_{1}^{\text{Gly}}$, \circ ^{14}C -glycyl-tRNA $_{2-1}^{\text{Gly}}$,
 \bullet ^{14}C -glycyl-tRNA $_{2-2}^{\text{Gly}}$.

第 6 章 Isoaccepting tRNA^{Gly} のコード認知

分離精製した 3 種類のグリシル- tRNA のコード認知を Nirenberg らの大腸菌のリボソーム系で調べた。すなわち、グリシンコードを含む種々のテンプレートを経験的に調製することから検討し、調製した PolyAG およびトリプレットを用いてリボソームへの ¹⁴C-グリシル- tRNA の結合を調べた。その結果、tRNA^{Gly}₁ は GGG、GGA を、tRNA^{Gly}₂₋₁ と tRNA^{Gly}₂₋₂ は GGU、GGC のコードを特異的に認知することが判明した。

Table III Specificity in template-stimulated binding to ribosomes of various glycyl-t RNA

Expt. 1

Template	Glycy1- tRNA ^{Gly} ₁	Glycy1- tRNA ^{Gly} ₂₋₁ (Δp moles)	Glycy1- tRNA ^{Gly} ₂₋₂
GpGpU 0.1 A	-0.120	<u>2.750</u>	<u>1.990</u>
GpGpC 0.1 A	-0.110	<u>1.620</u>	<u>1.110</u>
PolyAG (1:4) 0.2 A	<u>0.560</u>	-0.220	-0.140
PolyAG (3:2) 0.2 A	<u>0.180</u>	0.040	0.030
No template	(0.450)	(1.490)	(1.345)

Expt. 2

Template	Glycy1- tRNA ^{Gly} ₁	Glycy1- tRNA ^{Gly} ₂₋₁ (Δp moles)	Glycy1- tRNA ^{Gly} ₂₋₂
pGpGpG 0.2 A	<u>0.142</u>	-0.090	-0.430
p(GpGpA) mixture 0.2 A	<u>1.040</u>	-0.093	-0.100
No template	(0.702)	(0.320)	(2.220)

第 7 章 Isoaccepting tRNA^{Gly} のフィブロイン合成における役割

本章ではコード認知の異なるグリシル- tRNA^{Gly}₁ とグリシル- tRNA^{Gly}₂₋₁ のフィブロイン合成での役割を³H-グリシンおよび¹⁴C-グリシンを用いた二重標識法で明らかにする計画をたてた。

tRNA^{Gly}₁ を³H-グリシンで、また tRNA^{Gly}₂₋₁ を¹⁴C-グリシンでアミノアシル化し、これらのグリシル- tRNA をフィブロイン合成系に加えた。生成したフィブロインにおける³H-グリシンと¹⁴C-グリシンのとりこみ様式をフィブロインの結晶部、非結晶部において調べた。

即ち、³H-グリシンおよび¹⁴C-グリシンで標識したフィブロインをキモトリプシン処理し、沈澱してくる結晶部と上清に分画し、非結晶部をセファデックス G-25 のゲルろ過により、A 1 画分と A 2 画分に分け、各画分での³H-グリシンと¹⁴C-グリシンの分布を求めた。

Table IV から明らかなように³H-グリシンと¹⁴C-グリシンの分布に明確な偏りがあることが判明した。このことより、フィブロインの mRNA のグリシンコードの分布 (GGA と GGG のコードおよび GGU と GGC のコードの分布) に偏りがあり、2 成分の Isoaccepting tRNA^{Gly} の使い分けがあるものと推論した。

Table IV

Distribution of labeled glycine in crystalline part and amorphous part of silk fibroin synthesized in vitro.

	³ H-Glycine from tRNA ^{Gly} ₁ (p mole)	¹⁴ C-Glycine from tRNA ^{Gly} ₂₋₁ (p mole)	³ H-Glycine (p mole) : ¹⁴ C-Glycine (p mole)
Crystalline part	10	10	1 : 1
Amorphous part A1	1.9	2.6	1 : 1.4
Amorphous part A2	4.8	2.1	2.3 : 1

総 括

1. 液体シンチレーション測定における新しいシンチレーターの開発および測定試料の可溶化法を確立した。
2. 蚕の後部絹糸腺の各種アミノ酸のアミノアシル-tRNAプール、絹糸腺の組織蛋白質の構成アミノ酸およびフィブロインの構成アミノ酸およびフィブロインの構成アミノ酸とを比較検討した結果、tRNAはフィブロインの構成アミノ酸に対応するtRNAの活性が高いことを明らかにした。
3. DEAE-Sephadex A-50 カラム、逆相クロマトおよび新しく考案した逆相クロマトを組み合わせることによりグリシン(3成分)、アラニン(6成分)およびセリン(5成分)のtRNAを分離精製することに成功した。
4. 分離したすべての Isoaccepting tRNA 成分がフィブロイン合成に関与していることを明らかにした。
5. $tRNA_{1-1}^{Gly}$ はグリシンコードのうちGGAおよびGGGを、 $tRNA_{2-1}^{Gly}$ および $tRNA_{2-2}^{Gly}$ は GGG および GGC を特異的に認知する。
6. フィブロイン-mRNA のグリシンコード翻訳を、Isoaccepting $tRNA^{Gly}$ が機能的に分担していることを直接的に証明した。またフィブロイン-mRNA 中のグリシンコードの分布に偏りがあることを推定した。
7. これらの諸知見は、Isoaccepting tRNA の意義を解明したにとどまらずフィブロイン合成における調節機構および細胞の分化の問題に新しい知見を提供するものと考えられる。

審査結果の要旨

蛋白質合成反応における tRNA の機能の重要性についてはよく知られているが、isoaccepting tRNA が生体内でいかなる役割を演じているかについては、ほとんど明らかにされていない。本研究は、isoaccepting tRNA の生理的意義を解明することを目的として行われたものである。

研究材料としては家蚕後部絹糸腺を用い、フィブロイン生成との関連において tRNA の研究を進めた。先づ著者は、後部絹糸腺に含まれる tRNA の各種アミノ酸に対する受容活性を比較した。その結果、グリシン、アラニンおよびセリンに対応する tRNA の活性が特に高く、フィブロインの構成アミノ酸の含量比に対応した関係にあることが明らかにされた。このように、特定の組織において、そこで合成される蛋白質のアミノ酸組成と、tRNA の受容活性のアミノ酸分布との関連性が明瞭に示されたのは本研究がはじめてである。

ついで著者は、絹糸腺よりグリシン、アラニンおよびセリン tRNA の分離・精製の研究に入った、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを組合せて注意深く isoaccepting tRNA の分別を行った。この過程において、著者が新しく開発したハイアミンクロロホルムを用いる逆相クロマトグラフィーは、性質の類似した isoaccepting tRNA の分別には特に有効であった。その結果、後部絹糸腺から、3 成分のグリシン tRNA、6 成分のグリシン tRNA および 5 成分のセリン tRNA を分離することができた、特にグリシン tRNA については高純度に精製することができたので、以後の研究は、グリシン tRNA を中心に進めた。

上のようにして得た isoaccepting グリシン tRNA がフィブロイン生成に基質として *in vitro* で使用され得ることを確かめた後、3 種のグリシン tRNA のコード認知を調べた。その結果、tRNA₁^{Gly} は GGG, GGA を、tRNA₂₋₁^{Gly} と tRNA₂₋₂^{Gly} は GGU, GGC のコードを特異的に認知することを明らかにした。

この事実に基づいて、コード認知の異なる tRNA₁^{Gly} および tRNA₂₋₁^{Gly} をそれぞれ 3 H-グリシンおよび ¹⁴C-グリシンでラベルし、これらのグリシル-tRNA をフィブロイン合成系に加えて、合成されたフィブロイン中における 3 H-グリシンと ¹⁴C-グリシンのとりこみ様式を検討した。フィブロインの結晶部と非結晶部において、両 tRNA よりの放射性アミノ酸のとりこみには差異の存在することが認められ、isoaccepting tRNA の生理的意義の一つとして、蛋白質合成反応における調節的役割について論述した。

以上の研究結果は、isoaccepting tRNA の分離・精製法については新しい方法を開発したのみならず、isoaccepting tRNA の蛋白質合成における役割についても新しい知見を与えるものであり、本論文は、著者に農学博士の学位を与えるに充分の価値あるものと認める。