

氏 名 (本籍)	お 小 山 文 隆
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 3 3 3 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 6 0 年 3 月 2 6 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	絹 フ イ ブ ロ イ ン サ ブ ユ ニ ッ ト の 免 疫 学 的 性 質 と 生 合 成 に 関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教 授 水 野 重 樹 教 授 松 田 和 雄

助 教 授 伊 藤 敏 敏

論文内容要旨

第1章 序 論

真核生物の細胞内で合成されるタンパク質は、合成後細胞内に存在するものと、細胞外へ分泌される分泌タンパク質の2種に大別される。分泌タンパク質は、生合成後、数種の細胞内膜系を経て細胞外へ分泌される。

絹フィブロインは、グリシン、アラニン、セリンなど側鎖の小さいアミノ酸に富む典型的な繊維状タンパク質であり、組成的に単純な分泌タンパク質である。5令のカイコ後部絹糸腺ではフィブロインが特異的に合成、分泌されることから、真核細胞におけるタンパク質生合成研究に適した系として多くの研究が進められて来たが、その細胞内運搬や分泌の機構については不明の点が多い。

フィブロインは、これまで1本のポリペプチド鎖よりなると考えられて来たが、最近の研究で、分子量約350kdと約25kdの大小2本のポリペプチド鎖がジスルフィド結合で結合したサブユニット構造をとることが明らかとなった。すなわち、Fig. 1に示すように還元しないフィブロインには低分子成分は認めら

れないが、2-メルカプトエタノールで還元すると低分子成分が認められる。

ここでは、高分子成分をH鎖、低分子成分をL鎖と呼び、サブユニットに分け

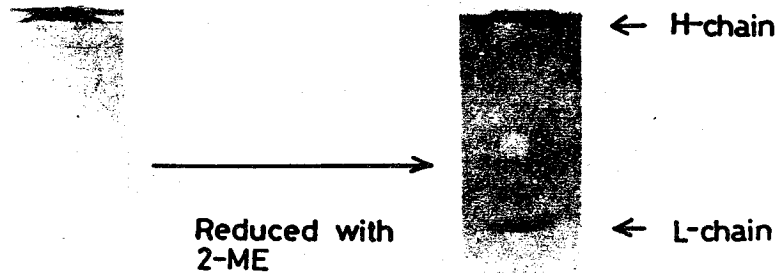


Fig.1 SDS-PAGE of whole fibroin

る前のフィブロインを全フィブロインと呼ぶ。H鎖は、いわゆる「フィブロイン型」のアミノ酸組成をもつ繊維状タンパク質であるが、L鎖にはそのような特徴は認められない。繊維状タンパク質のH鎖にL鎖がジスルフィド結合で結合することによって、全フィブロインが分泌に適した高次構造をとることも考えられ、L鎖の機能に興味を持たれる。しかし、L鎖の遺伝子構造は不明であり、また、これまでのフィブロイン生合成をめぐる研究では、そのサブユニット構造を考慮に入れて行なわれていなかった。

本研究は、後部絹糸腺細胞におけるフィブロインH鎖、L鎖の生合成の場と生合成過程におけるサブユニット結合形成段階を明らかにすることを目的として行なわれたものである。

第Ⅱ章 フィブロインH鎖, L鎖の免疫学的性質

後部絹糸腺細胞で合成された, H鎖, L鎖を抗血清を用いて同定するため, H鎖, L鎖の免疫学的性質を調べた。

抗原として用いた全フィブロイン, H鎖, およびL鎖は, 後部絹糸腺の腺腔内より分離, 精製した。H鎖, L鎖の相互の混入のないことを確認した後, ウサギに免疫した。抗血清の特異性は, ^{125}I -protein Aを用いる固相ラジオイムノアッセイ法で検討した。

全フィブロインで免疫した血清は, 全フィブロイン, H鎖, L鎖のいずれとも反応したことから, H鎖, L鎖が共に抗原性を有することが推定された。

H鎖で免疫した血清は, Fig.2に示すようにH鎖と反応したことからH鎖に抗原性があることが確認された。抗H鎖血清は, 全フィブロインと反応したが, L鎖との反応は認められなかった。

L鎖で免疫した血清は, L鎖と反応したことからL鎖に抗原性があることが確認された。抗L鎖血清は, 全フィブロ

インと反応したが, H鎖との反応は認められなかった。

以上の結果から, H鎖, L鎖は, それぞれ抗原性を有するが, H鎖とL鎖は, 互いに異なる抗原決定基を含み, 両鎖間には免疫学的な相同性は存在しないことがわかった。

H鎖, L鎖の免疫学的な性質が異なると分かったので, マユを0.05 N塩酸あるいは1%オレイン酸

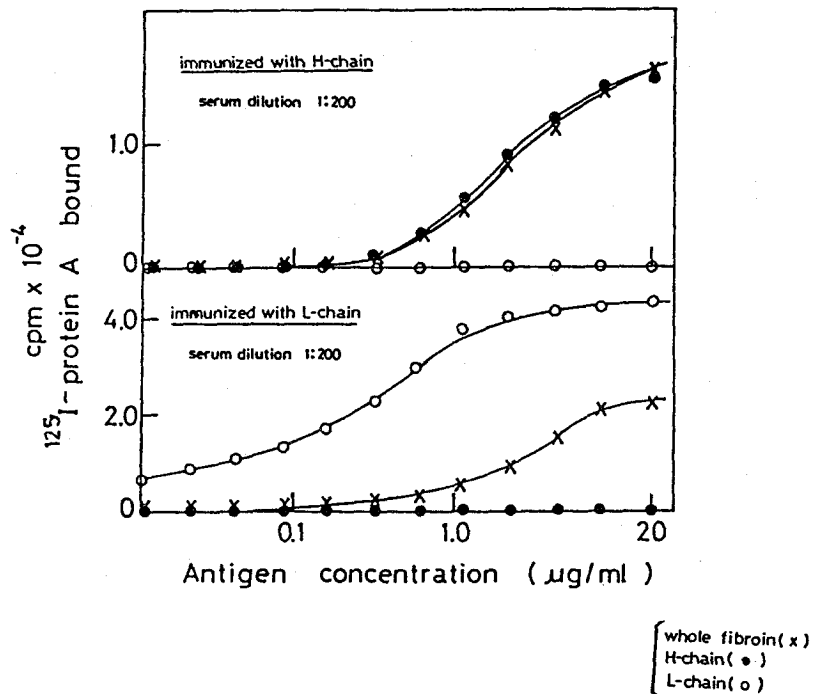


Fig.2 Immunological properties of purified H- and L-chains

ナトリウム水溶液中100℃, 1時間の過激な条件で処理し, セリシンを除き調製したフィブロインがH鎖, L鎖より構成されているかどうか免疫学的手段で調べた。その結果, 過激な除セリシン操

作を経て調製されたフィブロインにも後部絹糸腺より穏やかに調製された全フィブロインと量的にはほぼ等しいH鎖, L鎖が存在し, このサブユニット結合がこれらの処理に対して安定であることがわかった。

第三章 カイコ後部絹糸腺の膜結合性ポリソームを含む *in vitro* 系によるフィブロインH鎖, L鎖の特異的な合成

これまでのフィブロインの生合成をめぐる研究では, サブユニット構造を考慮に入れて行なわれていなかった。L鎖は, H鎖とジスルフィド結合することで生合成以後の全フィブロインの分泌を促進することが推定されることから, H鎖, L鎖の生合成とその後のサブユニット結合の形成段階について *in vitro* と *in vivo* の系で解析した。

まず, *in vitro* でH鎖, L鎖の合成を検討するため, 後部絹糸腺よりポリソームの分画を試みた。

5令4~5日目の後部絹糸腺を摩砕し, 17,000×g, 30分の遠心で, 沈殿(17,000×g-沈殿ポリソーム)と上清に分け, 上清はさらに105,000×g, 90分の遠心を行い沈殿(105,000×g-沈殿ポリソーム)画分を集めた。

両画分に後部絹糸腺の可溶性画分を加えて構成した *in vitro* 系におけるタンパク質合成活性および両画分のRNA含量をTable Iに示した。RNAの88%, ¹⁴C-グリシンの取り込み活性の98%, ¹⁴C-ロイシンの

取り込み活性の83%が17,000×g-沈殿ポリソーム画分に認められた。この画分が主要なポリソーム画分

TABLE I. [¹⁴C]Amino acid incorporating activity and RNA content of the polysome fractions.

Polysome fraction	[¹⁴ C]Amino acid incorporated into protein		RNA in the polysome fraction (mg)
	Glycine dpm × 10 ⁻³ /polysome fraction	Leucine	
17,000×g-sedimentable polysome	23,400 (98%)	4,475 (83%)	122 (88%)
105,000×g-sedimentable polysome	400 (2%)	900 (17%)	26 (12%)

であり, ロイシンに比べグリシンを多く取り込む活性が認められたことから, 17,000×g-沈殿ポリソーム画分にフィブロインを合成するポリソームが存在するものと推定し, この画分からポリソームをさらに分画することを試みた。

得られたポリソーム画分のショ糖密度勾配での沈降パターンをFig. 3に示した。¹⁴C-グリシンの取り込み活性, A₂₆₀の核酸の吸収, 小胞体膜の存在を示すNADPH-cytochrome c reductase活性のピークは一致した。このことから, この画分に小胞体膜成分を有するポリソームがきているものと考えた。このことをさらに示すため, 1%デオキシコール酸ナトリウム(DOC)で膜を溶

解し、同様に分析すると、取り込み活性と膜の指標酵素活性のピークは分離した。DOC処理前のピーク画分を電子顕微鏡で観察すると、Fig. 4に示すように、リボソームが膜様構造に結合した構造が認められ、DOC処理すると膜様構造は認められず、50~80個のリボソームが連ったポリソームが認められた。

以上の結果より、DOC処理前に認められたピーク画分を膜結合性ポリソームと考え、以後の実験に供した。

この膜結合性ポリソームに後部網糸腺の可溶性画分を加え、*in vitro* タンパク合成系を作成した。この系では、ポリペプチド鎖の伸長反応が行なわれ、開始反応は殆ど行なわれないことが示された。

この膜結合性ポリソーム上で合成されたポリペプチドにフィブリンが含まれるかどうか、そのアミノ酸組成の特徴やキモトリプシン分解で得られるペプチドの特徴を利用して検討した。³H-グリシンで標識されたポリペプチドをキモトリプシンで消化すると、Table IIに示すように、放射能の約60%が結晶部に認められ、40%が非結晶部に認められた。³H-ロイシンで標識した場合、キモトリプシン消化後その放射能のほとんどが非結晶部に認められた。

次に、結晶部を Sephadex G-50に、

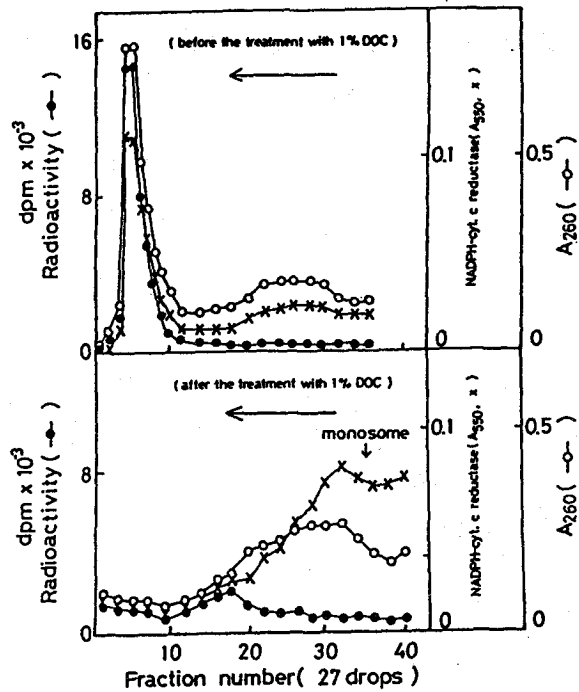
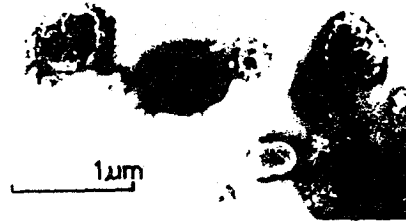


Fig. 3 Sedimentation profiles of polysomes prepared from the 17,000.xg-sedimentable fraction

before the treatment with 1% DOC



after the treatment with 1% DOC



Fig. 4 Electron micrographs of the polysomes stained with uranylacetate

非結晶部を Sephadex G-15 にそれぞれ添加し、キャリアの全フィブロイン由来の結晶部、非結晶部の溶出パターンとペプチドの溶出パターンを比較した。

Fig.5に示すように、全フィブロインのアミノ酸の約50%を占めるグリシンで標識されたポリペプチドの結晶部、非結晶部の溶出パターンは、キャリアの全フィブロインの結晶部、非結晶部の溶出パターンとはほぼ同様であった。一方、 ^3H -ロイシンで標識した場合、結晶部に放射能は殆ど認められず、非結晶部の放射能の溶出パターンは、全フィブロインよりむしろL鎖のキモトリプシン分解物の溶出パターンに近いものであった。 ^3H -ロイシンで標識した場合、結晶部に殆ど放射能が認められなかったことは、結晶部のロイシン含量が著しく低いという知見と一致する。

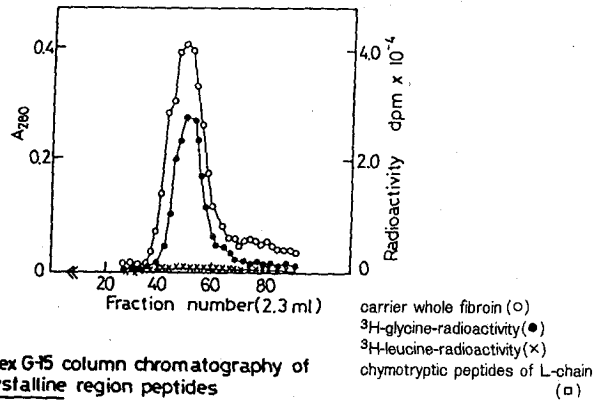
以上の結果から、合成されたポリペプチドに全フィブロインとしての性質が認められる。さらに、全フィブロインの約93%がH鎖であることを考えるとその大部分がH鎖であろうと考えられた。また、L鎖の合成の可能性については、H鎖に殆ど認められず、L鎖に比較的多く含まれるロイシンで標識した場合、放射能の溶出パターンが、L鎖のキモトリプシン分解物に近かったことからその可能性が考えられた。

そこで標識アミノ酸が、H鎖、L鎖に取り込まれたかどうかを検討するため、ポリペプチドをS

TABLE II. Distribution of radioactivity of nascent polypeptides after the chymotryptic digestion.

Labeled amino acid added	Radioactivity in the nascent polypeptide fraction (dpm)	Distribution of radioactivity after the chymotryptic digestion	
		Precipitate (dpm) (crystalline-region) (% of total)	Supernatant (dpm) (noncrystalline-region) (% of total)
[^3H]Glycine	3,394,000	1,957,000 (57%)	1,269,000 (37%)
[^3H]Leucine	207,000	18,000 (8.7%)	193,000 (93%)

Sephadex G-50 column chromatography of crystalline region peptides



Sephadex G-15 column chromatography of non-crystalline region peptides

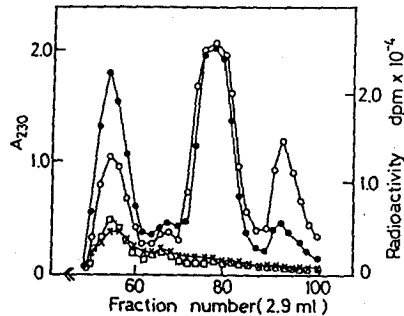


Fig.5 Gel filtration chromatography of crystalline and non-crystalline region peptides

DS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、フルオログラフィーを行って解析した。

Fig.6に示すように、 ^3H -グリシンで標識されたポリペプチドは、H鎖の位置から低分子側まで認められ、L鎖の位置には弱いバンドが認められた。 ^3H -ロイシンで標識した場合、バンドは、H鎖の位置に認められ、弱い

バンドがL鎖の位置に認められた。2-メルカプトエタノールによって還元後に電気泳動を行うと、 ^3H -グリシン、 ^3H -ロイシンのいずれの場合もL鎖の位置のバンドが強くなった。このバンドがL鎖に相当することは、還元後の試料に抗L鎖血清を反応させ、電気泳動に供すると、L鎖の位置のバンドが認められ、非免疫血清では認められないことから確認した。このことから合成されたL鎖の主要部分がH鎖とジスルフィド結合で結合していたものと考えられた。

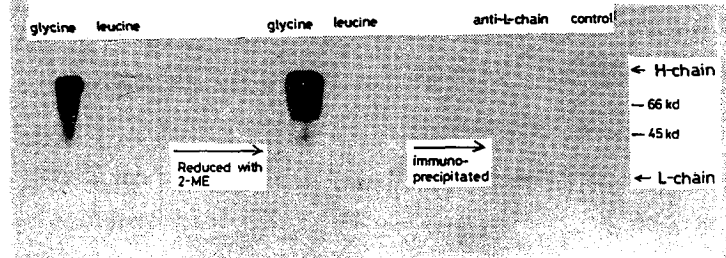


Fig.6 SDS-PAGE and fluorograms of ^3H -labeled polypeptides synthesized on the membrane-bound polysomes

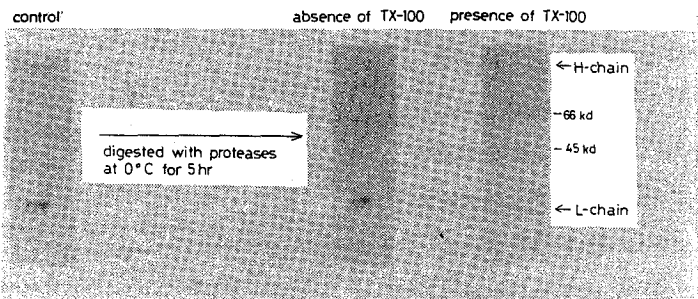


Fig.7 Effect of trypsin and chymotrypsin digestion on the ^3H -leucine-labeled polypeptides synthesized on the membrane-bound polysomes

次に合成されたH鎖、L鎖が、膜小胞内に存在するかどうかを ^3H -ロイシンを取り込ませた膜結合性ポリソームにプロテアーゼ（トリプシン+キモトリプシン）をおだやかに作用させる方法で検討した。

Fig.7に示すように、プロテアーゼ処理後も、H鎖、L鎖は残存しており、プロテアーゼ消化から保護された構造体内に存在することが示唆された。次に Triton X-100 で膜を溶解してからプロテアーゼを作用させるとH鎖、L鎖は共に消失した。この結果から合成されたH鎖、L鎖は、膜小胞内に存在するものと考えられた。

一方、 $105,000 \times g$ -沈殿ポリソーム上では不均一なポリペプチド成分が合成され、これらの大部分は Triton X-100 非存在下でもプロテアーゼ消化を受けることが示された。

以上の結果より、後部糸糸腺の主要な $17,000 \times g$ -沈殿ポリソーム画分より得られた膜結合性ポリソーム上では、H鎖、L鎖が特異的に合成され、合成されたL鎖の主要部分はH鎖とジスルフィ

D結合で結合し、両鎖は膜小胞内に存在することが示された。

第IV章 カイコ後部絹糸腺の器官培養系におけるフィブロインH鎖、L鎖の特異的な合成

次に *in vivo* の系によるH鎖、L鎖の生合成について検討した。

5令4日目のカイコから摘出した後部絹糸腺の器官培養系に対して³H-グリシンあるいは³H-ロイシンを加え、3分間パルスラベルして新たに合成されるポリペプチドの標識を行った。場合によっては未標識のグリシンを含む培養液中でその後17分間チェースした。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、フルオログラフィーを行って合成されたポリペプチドを分析した。

Fig.8に示すように、パルスラベルしたポリペプチドを還元しないで泳動した場合、³H-グリシンで標識されたペプチドは、H鎖の位置から低分子側まで連続的に認められたが、L鎖の位置のバンドは弱かった。³H-ロイシンで標識した場合、バンドはH鎖の位置に認められ、L鎖の位置のバンドは弱かった。次に2-

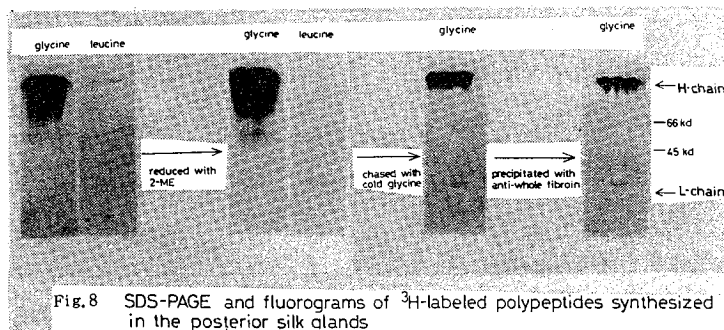
メルカプトエタノールで還元後、電気泳動を行うと、いずれの場合もL鎖の位置のバンドが強くなった。³H-グリシンで標識した場合に認められる低分子側のバンドは、チェースすると高分子側に移行することから

H鎖の伸長途上のペプチドと考えられた。これらのバンドが、H鎖、L鎖に相当することは、還元後の試料にH鎖、L鎖と反応する抗全フィブロイン血清を反応させ、沈降物を電気泳動に供すると、H鎖、L鎖の位置のバンドが認められることから確認した。

以上の結果より、5令4日目の後部絹糸腺でパルスラベルされたポリペプチドの大部分はフィブロインH鎖、L鎖であり、合成されたL鎖の主要部分は、H鎖とジスルフィド結合で結合していることが示された。

第V章 フィブロインH鎖、L鎖の生合成過程におけるサブユニット結合形成段階の解析

後部絹糸腺の *in vitro* タンパク合成系と器官培養系で得られた結果より、H鎖、L鎖のジスルフィド結合が膜結合性ポリソーム上での両鎖の合成過程、または、合成直後に形成される可能性が考えら



れた。そこでこの結合がポリソーム上で伸長しつつある鎖の間で形成されるのか、それとも鎖が完成してから形成されるのかについて、抗H鎖、抗L鎖血清および¹²⁵I-protein Aを用いたプロテイントランスフェーラジオイムノアッセイ法で検討した。

パルスラベルした器官培養系より得られたポリペプチドをSDS-2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ニトロセルロースメンブランフィルターにトランスファー後、抗H鎖血清、続いて¹²⁵I-protein Aと反応した。

Fig.9に示すように抗H鎖血清と反応したポリペプチドは、H鎖の位置から連続的にL鎖の分子量付近まで認められた。このH鎖より低分子側で反応したポリペプチドは、伸長途上のH鎖と考えられる。

次に伸長途上のH鎖にL鎖が結合しているかどうか抗L鎖血清ならびに¹²⁵I-protein Aを用いて検討した。Fig.10に示すように、抗L鎖血清と反応したポリペプチドは、H鎖の位置からL鎖の分子量付近まで連続的に認められた。このことから伸長途上のH鎖にL鎖が結合していることが考えられた。そ

こで、1次元目を泳動後、2-メルカプトエタノールで還元し、2次元目の泳動を行い、抗L鎖血清ならびに¹²⁵I-protein Aを反応させた。抗L鎖血清と反応したポリペプチドは、2次元目で分子量約25 kdのL鎖の泳動位置に認められた。

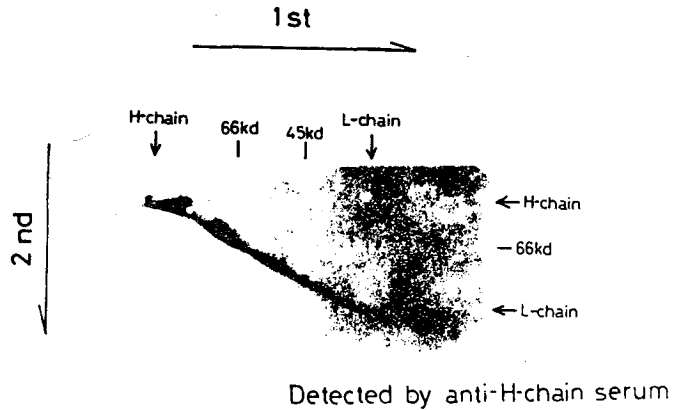


Fig.9 Immunological detection of growing-H-chain in the nascent peptides from posterior silk glands

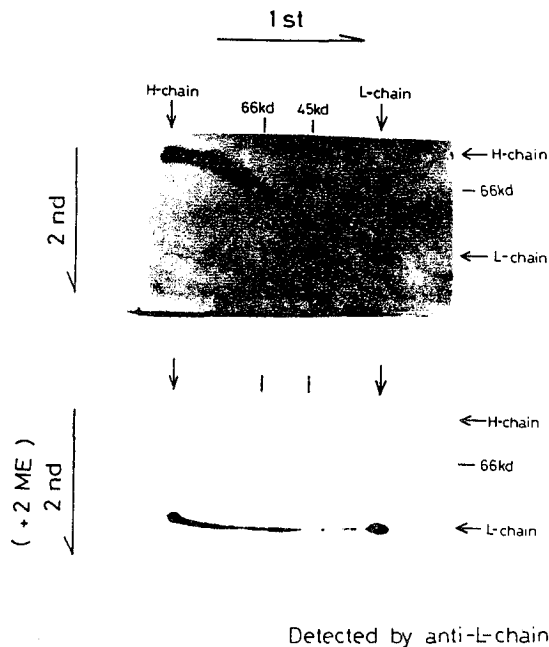


Fig.10 Immunological detection of L-chain in the nascent peptides from posterior silk glands

以上の結果より還元後、L鎖の泳動位置に泳動されたバンドは、還元前に伸長途上のH鎖とジスルフィド結合で結合していたL鎖と考えられた。還元前後で泳動度に変化のないL鎖は、遊離のL鎖と考えられる。このL鎖の結合していたH鎖の分子量は、約30 kd以上と推定された。

この結果は、ポリソーム上で伸長しつつあるH鎖に完成されたL鎖が結合する可能性を示唆する。

そこで、その可能性をさらに検討するため、膜結合性ポリソームを含む *in vitro* 系から分離した合成途上のポリペプチドについて同様の実験を行ったところ、ほぼ同様の結果が得られた。

以上、後部絹糸腺の器官培養系ならびに膜結合性ポリソームを含む *in vitro* タンパク合成系についての分析結果を合せて考察すると、ポリソーム上で伸長しつつあるH鎖に完成されたL鎖がジスルフィド結合で結合する可能性が強く示唆された。その結合の部位は、分子量約350 kdのH鎖全体で考えると、N末端に近い領域であるものと推定された。

第VI章 総 合 考 察

5令4～5日目のカイコ後部絹糸腺細胞では、フィブロインのH鎖、L鎖が膜結合性ポリソーム上で特異的に合成され、合成されたL鎖の主要部分はH鎖とジスルフィド結合で結合し、両鎖は膜小胞内に存在することが示され、両鎖間のサブユニット結合はポリソーム上での生合成段階で形成される可能性が考えられた。そこで、その可能性についてさらに検討したところ、H鎖の合成の初期にL鎖がジスルフィド結合で結合することを示唆する結果が得られた。これらのことから、繊維状タンパク質のH鎖の合成の初期にL鎖とのジスルフィド結合が形成されることで、全フィブロインの高次構造が影響を受け、膜結合性ポリソーム上でのH鎖の完成や、その後の細胞内運搬および分泌に有利な全フィブロインの分子構造が形成される可能性が考えられた。

要 約

絹フィブロインは、H鎖とL鎖がジスルフィド結合で結合したサブユニット構成をとるという最近の知見に基づいて、両鎖の免疫学的性質と後部絹糸腺における生合成の場ならびにサブユニット結合形成段階を明らかにするための研究を進め、以下の結果が得られた。

1) H鎖、L鎖は、いずれも抗原性を有するが、互いに異なる抗原決定基を有し、両鎖間には免疫学的な相同性が存在しないことが分った。

2) H鎖、L鎖のサブユニット結合が過激な除セリシン操作に対して安定であることが分った。

3) H鎖、L鎖の後部絹糸腺細胞内における生合成の場について、*in vitro* タンパク合成系を

用いて検討した。後部絹糸腺より分離した膜結合性ポリソームを含む *in vitro* タンパク合成系では、H鎖、L鎖が特異的に合成され、合成されたL鎖の主要部分は、H鎖とジスルフィド結合で結合していた。新たに合成されたH鎖、L鎖は共にプロテアーゼに対して抵抗性を示し膜小胞内に存在するものと考えられた。一方、 $105,000 \times g$ -沈殿性の遊離ポリソーム上では不均一なポリペプチド成分が合成され、大部分がプロテアーゼ感受性であった。

4) H鎖、L鎖のジスルフィド結合の形成段階を後部絹糸腺の器官培養系ならびに膜結合性ポリソームを含む *in vitro* タンパク合成系を用いて検討した。新生ポリペプチドに対する抗H鎖、抗L鎖血清の反応を調べたところ、伸長途上のH鎖に完成されたL鎖が結合することが強く示唆された。またL鎖の結合部位は、H鎖のN末端領域に近いところであるものと推定された。

審査結果の要旨

フィブロインは分子量約 350 kd (H鎖)と約25 kd (L鎖)の大小2本のポリペプチド鎖がジスルフィド結合で結合したサブユニット構造をとることが最近の研究で明らかとなった。

本研究は5令期のカイコの後部絹糸腺細胞におけるフィブロインH鎖、L鎖の生合成の場と生合成過程におけるサブユニット結合形成段階を明らかにすることを目的として行われたものである。

まず、生合成されたH鎖、L鎖を抗血清を用いて同定するため、全フィブロイン、H鎖、L鎖を後部絹糸腺腺腔内より分離、精製し、これらをウサギに免疫し、得られた抗血清の特異性を¹²⁵I-プロテインAを用いる固相ラジオイムノアッセイ法で検討した。その結果、H鎖とL鎖はそれぞれ抗原性を有すること、H鎖、L鎖は互いに異なる抗原決定基を有し、両鎖間には免疫学的相同性は認められないことが明らかにされた。一方、5令4～5日目の後部絹糸腺から膜結合型ポリソームと遊離型ポリソームを分画し、これらに後部絹糸腺由来の可溶性画分を組み合わせ、*in vitro* タンパク質合成系を調製して検討したところ、H鎖、L鎖ともに膜結合型ポリソーム上で特異的に合成されること、合成された両鎖は1% Triton X-100 処理後にプロテアーゼ感受性となることから、膜小胞内に直ちに移行するものと考えられた。膜結合型ポリソームを含む*in vitro*系ならびに後部絹糸腺の器官培養系から合成途上のH鎖を単離し、2-メルカプトエタノールによる還元前後で2次元電気泳動、プロテイントランスファーラジオイムノアッセイ法で調べた結果、伸長途上のH鎖に完成されたL鎖が結合することを強く示唆する結果を得た。

以上、本論文は、フィブロインH鎖、L鎖が異なる免疫学的性質を有することを明らかにした上、これらの抗血清を利用して、両鎖が膜結合型ポリソーム上で合成されることを示し、伸長途上のH鎖にL鎖が結合することを強く示唆する新知見を示したもので、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与されるに十分な資格を有すると判定した。