

氏名・(本籍)	なぎ た ゆう じ 杉 田 雄 二
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 5 4 6 号
学位授与年月日	昭和 5 2 年 3 月 2 5 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	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻
学位論文題目	マウス B16 メラノーマのチロシナーゼに 関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 樋 渡 宏 一 教 授 小 西 和 彦 助 教 授 竹 内 拓 司

## 論 文 目 次

〔はじめに〕

### 第 1 部 膜付着型チロシナーゼの精製

〔要 旨〕

〔序 論〕

〔材料と方法〕

〔結果と考察〕

〔文 献〕

〔図の説明〕

〔図 表〕

### 第 2 部 チロシナーゼ合成リボゾームの免疫沈降

〔要 旨〕

〔序 論〕

〔材料と方法〕

〔結 果〕

〔考 察〕

〔文 献〕

〔図の説明〕

〔図 表〕

### 第3部 Cell-free系での放射性アミノ酸のチロシナーゼへの取り込み

〔要 旨〕

〔序 論〕

〔材料と方法〕

〔結 果〕

〔考 察〕

〔文 献〕

〔図の説明〕

〔図 表〕

〔総合論議〕

〔謝 辞〕

〔総合要旨〕

## 論文内容要旨

B16 マウスメラノーマ細胞は、マウスメラニン産生細胞のガン化した細胞であり、形質発現（メラニン合成）をしつつ、さかんに増殖する。メラニンは、チロシナーゼにより、メラノソーム内で合成される。現在までに、メラノーマ細胞チロシナーゼについて、酵素化学的性質が報告されてきたが、その生合成に関する報告は、なかった。チロシナーゼ生合成に関する知識は、分化の鍵酵素としてのチロシナーゼに対する理解を深め、メラニン生産に関する多くの問題を考える際、役立つと考えられる。

本論文において、著者は、まずチロシナーゼを精製し、精製酵素を抗原としてウサギを免疫し、抗チロシナーゼ抗血清を調製した。そして抗チロシナーゼ抗血清を用いた免疫化学的手法により、メラノーマ細胞におけるチロシナーゼの合成過程を実験的にとらえる事を目標に、実験を進めた。すなわち、チロシナーゼを合成しているリボゾームの存在を確認するため、合成途中のチロシナーゼの抗原性を利用して、チロシナーゼ合成リボゾームの免疫沈降を試みた。さらにメラノーマ細胞リボゾームを用いてCell free系でのチロシナーゼ合成を試みた。一方、チロシナーゼ活性の90%以上が膜分画に存在する（Seiji ら、1963）というチロシナーゼの細胞内分布を見た時、遊離型、膜付着型のいずれのリボゾームで主にチロシナーゼが合成されているか明らかにする事は、これら2型のリボゾームの役割り、又、チロシナーゼの細胞内輸送の問題等を考える際、意味のある示唆を与えるであろうと考え、この点についても実験を行なった。

### 第1部 膜付着型チロシナーゼの精製

- 1) メラノーマ細胞の crude homogenate を、78,000g 1時間遠心し、生じたペレットを、トリプシン処理して得た crude extract から、硫酸塩析、SephadexG-100、DEAE-Sephadex、DEAE-セルロース クロマトグラフィーにより、チロシナーゼを約800倍まで精製した。
- 2) メラノーマ細胞湿重量90gから約3mgの精製チロシナーゼを得た。
- 3) 精製チロシナーゼは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、ほぼ単一なタンパク質バンドとして染色された。
- 4) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、精製標品を一夜、SDS処理した場合は2本、さらに泳動前に熱処理した場合は1本のタンパク質バンドが染色された。
- 5) 精製チロシナーゼは活性測定の際の温度が活性に大きく影響し、45℃での活性は30℃でのその5倍であった。
- 6) 精製チロシナーゼは、比較的・熱に安定であり、60℃で10分間、処理しても活性の90%が、残った。

## 第2部 チロシナーゼ合成リボゾームの免疫沈降

- 1) 第1部のとおり精製したチロシナーゼを抗原として、ウサギを免疫し、抗チロシナーゼ抗血清を得た。本抗血清は、チロシナーゼのみと、免疫反応を起こす、特異性の高いものであった。又、本抗血清 0.1 ml は、精製チロシナーゼ約 70  $\mu$ g と当量であった。
- 2) マウス B16 メラノーマ細胞リボゾームから、チロシナーゼ合成リボゾームを直接法（リボゾーム＋抗チロシナーゼ抗血清＋精製チロシナーゼ）、間接法（リボゾーム＋抗チロシナーゼ抗血清＋抗ウサギ  $\gamma$  グロブリン－ヤギ血清）により、特異的に免疫沈降させた。
- 3) メラノーマ細胞に含まれる全リボゾームの約 10% が、チロシナーゼ合成リボゾームであると推定された。
- 4) 遊離型リボゾームにも膜付着型リボゾームにも同程度にチロシナーゼ合成リボゾームが含まれていた。

## 第3部 Cell-free 系での放射性アミノ酸のチロシナーゼへの取り込み

- 1) マウス B16 メラノーマ細胞リボゾーム、ATP、GTP、エネルギー再生系、ラット肝臓 cell sap からなる cell-free 系で  $^{14}$ C-アミノ酸の取り込みを指標としてチロシナーゼの合成を観察した。
- 2) この cell-free 系でタンパク質（トリクロル酢酸不溶性物質）に取り込まれた全  $^{14}$ C-アミノ酸の 7～8% が、免疫化学的に分離されたチロシナーゼに取り込まれた。
- 3) 遊離型リボゾーム、膜付着型リボゾームの何れを用いても、 $^{14}$ C-アミノ酸がチロシナーゼに取り込まれた。
- 4) ラット肝臓 cell sap のかわりにメラノーマ細胞 cell sap を用いた系では、 $^{14}$ C-アミノ酸のチロシナーゼへの取り込みは、50% 以下であった。

## まとめ

メラノーマ細胞リボゾーム上で合成されつつあるチロシナーゼの存在の確認に加えて、分離されたリボゾームにより、cell-free のタンパク質合成系でチロシナーゼに、 $^{14}$ C-アミノ酸が取り込まれたことは、メラノーマ細胞リボゾームで活発にチロシナーゼが合成されていることを示すのに十分な証拠となろう。

Cell-free 系でのタンパク質合成、リボゾームの免疫沈降の両方の実験から、遊離型、膜付着型リボゾーム共に同程度、チロシナーゼを、合成していることが明らかになった。しかしながら膜付着型リボゾームの一部分は、分離操作中に、膜から離れ遊離型として回収される可能性もあるであろう。又、遊離型リボゾームで、合成されているチロシナーゼが、可溶性分画に認められるチロシナーゼに相当するかもしれない。これらの可能性を考えれば、in vivo で実際に遊

離型リボゾームで合成されているチロシナーゼは、著者が本論文で示した割合よりも少ないかもしれない。今後の重要な研究課題となろう。

著者は、チロシナーゼ合成リボゾームを免疫沈降させることができたが、現在までにリボゾームの特異的免疫沈降法により、カタラーゼ (Sakamotoら, 1974),  $\gamma$ -グロブリン (De-lovitchら, 1972), 卵白アルブミン (Shapiroら, 1975) 等の mRNA が分離され, cell-free タンパク質合成系で翻訳されている。おそらくチロシナーゼ mRNA も, この方法により, 分離できるであろう。又, cell-free タンパク質合成系で, 合成されたチロシナーゼの分析を進める事により, チロシナーゼの3つの分子形 ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ) の相互の関係について, 重要な知見を得ることができると期待される。

## 論文審査の結果の要旨

ある形質をもった細胞における遺伝子の発現を研究するためには、遺伝子の直接の産物であるRNAとその後のタンパク合成の過程を把握しなければならない。この論文はマウスメラノーマ細胞におけるメラニン産生の鍵酵素であるチロシナーゼの生合成を理解するために、メラノーマ細胞からチロシナーゼ合成に関与する因子をとり出し試験管内での合成を行ったものである。第1部ではメラノーマ細胞のホモジェネートから、トリプシン処理、硫酸塩析、クロマトグラフィーなどにより、ゲル電気泳動でほぼ単一のタンパク質としてみられるチロシナーゼを分離精製した。このチロシナーゼはすでに報告されているT<sub>1</sub>と呼ばれる型とゲル電気泳動で同じ位置にあり、分子量は約70,000と推定された。第2部では精製したチロシナーゼをウサギに注射して抗チロシナーゼ抗血清を得、この抗血清を用いてメラノーマ細胞リボゾームからチロシナーゼを合成しているリボゾームを特異的に免疫沈降させた。その結果メラノーマ細胞の全リボゾームの約10%がチロシナーゼ合成リボゾームであると推定された。第3部では上で得られたリボゾームを用いて、試験管内で放射性アミノ酸のとりこみを指標としてチロシナーゼの合成を行い、この実験系では全アミノ酸の7~8%がチロシナーゼにとりこまれることを観察した。一方細胞内の遊離型リボゾームも膜付着型リボゾームと同様にチロシナーゼ合成能を有することが明らかになった。この結果はメラノーマ細胞からチロシナーゼのメッセンジャーRNAを含むポリリボゾームを分離したことを示し、チロシナーゼタンパク質の合成に関する新しい知見であり、哺乳類細胞における遺伝子発現の研究に大きい寄与をなすものである。したがってこの論文は著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって、杉田雄二提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。