絹フィブロインの生合成

志 村 憲 助*

1. はじめに

天然高分子の代表的なものの一つである絹糸タンパク質は、蚕の絹糸腺と呼ばれている特異的に分化発達した器官で合成されている。卵からかえった蚕の幼虫は、ご承知のとおり、桑葉を食べては眠り、起きてはまた桑を食うという生活をくり返えしながら次第に大きくなり、4回眠って5回目に起き上がると（5令期の蚕という）、いよいよ繭つくりの最終コースに入る。5令起蚕の生体重はせいぜい1g程度であるが、見る見るうちに大きくなって6～7日目には約3倍になる。この際特に増大の激しいのが絹糸腺組織で、最初わずか20～30mg前後のものが、7日目には実に1.0～1.2gにも達し、合成された絹タンパク質が絹糸腺内に充満している。5令期の絹タンパク質の合成速度は蚕1頭あたり1.1～1.3mg/hrで、短時間に特定のタンパク質をこんなにすみやかに合成する動物組織はちょっと他には見当たらない。なお蚕での絹タンパク質の合成は、冬ごもりのしたく（サナギから蛾となり、タマゴの形で冬を越す）の一過程であって、変態現象の一部でもある。

上のような現象は、われわれ生化学に携わる者にとつていろいろの角度から興味をそそられる。幸いにして、わが国では古くから蚕と絹糸タンパク質の科学の伝統があり、ある意味では日本特有の研究領域といってもよい。おもしろい問題はたくさんあるが、ここでは絹フィブロインの生合成について、合成の出発物であるアミノ酸が、どのようにしてフィブロイン分子にまで合成されていくかの概要を、反応経路に従って展望してみることにしよう。

2. フィブロイン合成反応

微生物から高等動物にいたるまで、すべての生物はタンパク質の合成材料としてまづアミノ酸を用いていることはいまさら申上げるまでもない。絹フィブロインのアミノ酸組成は、グリシン43%、アラニン32%、セリン15%、チロシン12%などが主要部分を占め、

通常のタンパク質とは著しく異なり、もちろん桑葉タンパク質のアミノ酸組成とも違っているが、フィブロイン合成に必要なこれらのアミノ酸は、蚕の体内では適当な生化学反応によって絶えず合成の場に供給されていると考えてよい。

さて遊離アミノ酸から始まりフィブロインまでの反応を、現在までに明らかにされた事実を総合すると、次の4段階に分けることができる（いきなり見なれない符号などが出てお目ざわりと思うが、追々に説明するのでお許し願いたい）。

a) アミノ酸の活性化

遊離アミノ酸(aa) + ATP + アミノ酸活性化酵素 →

[aa-AMP] 酵素 + ピロリン酸(PP)

b) 活性化されたアミノ酸と sRNA の結合

[aa-AMP] 酵素 + sRNA → aa-sRNA + 酵素 + AMP

c) aa-sRNA とポリソーム(タンパク質の合成の場)の結合

aa₁-sRNA + aa₂-sRNA + ポリソーム

→ $\left. \begin{matrix} \text{aa}_1\text{-sRNA} \\ \text{aa}_2\text{-sRNA} \end{matrix} \right\}$ ポリソーム複合体

d) ポリソーム上でのポリペプチド鎖の形成

$\left. \begin{matrix} \text{aa}_1\text{-sRNA} \\ \text{aa}_2\text{-sRNA} \end{matrix} \right\}$ ポリソーム → aa₁-aa₂ + ポリソーム
(ペプチド) + 2 sRNA

各段階についてもう少し説明を付加しよう

a) アミノ酸の活性化

タンパク質を合成する場合には、まず原料となるアミノ酸を活性化しなければならないことは、生体でも有機合成反応でもまったく同じである。細胞内では、アミノ酸活性化酵素の触媒で、高エネルギー化合物であるATPとアミノ酸が反応してアミノアシル-AMPとなる。この化合物はアミノ酸の活性化されたもので、遊離の状態

第1図 アミノアシル-AMP

* Kensuke SHIMURA 東北大学教授・農博
Biosynthesis of Silk Fibroin

では存在せず酵素と結合した形で次のb)反応に入る。なお天然タンパク質分子中には20種のアミノ酸が含まれているが、各アミノ酸はそれぞれ特異性を有する酵素によって活性化される。絹糸腺では、フィブロインに多く含まれるグリシン、アラニン、セリンなどのアミノ酸活性化酵素は、やはり他の動物組織などに比すると著しく活性が高く、フィブロイン合成の初発反応としての機能を暗示している。

b) 活性化されたアミノ酸と sRNA の結合

sRNA というのは、細胞質の部分に溶解して存在する可溶性リボ核酸 (soluble RNA) の略称である。a) で生じたアミノアシル-AMP-酵素複合体は、次に sRNA と反応し、アミノ酸残基は sRNA の方にわたされてアミノアシル-sRNA 化合物が生成する。

sRNA は核酸としてはいちばん小さく分子量約25,000の1本のポリヌクレオチド鎖からなる物質で、各アミノ酸に対しそれぞれの sRNA が存在する。したがって、個々のものはそれぞれグリシン sRNA、アラニン sRNA などと呼んでいる。しかし今まで知られたかぎりではすべての sRNA は比較的類似した構造を有し、分子鎖の一方の末端のヌクレオチド構造は-C-C-A、他方の末端は G である (A...adenylic acid, G...guanylic acid, C...cytidylic acid, U...uridylic acid)。アミノ酸残基は、前者の末端部の A のリボースの OH 部分にエステル型で結合する。エステル結合ではあるが、この化合物もかなりの高エネルギー化合物であって、 ΔF は約 7 kcal/mol と推定されている。pH 9.5 以上のアルカリ性では、室温で 30 分で完全に加水分解してしまう。最近 Holley らによってアラニン sRNA のヌクレオチド配列が決定され注目を集めている。

c) aa-sRNA とポリソームとの結合

上のようにして生成した aa-sRNA は、次にタンパク合成の場である Endoplasmic Reticulum (ER、小胞体という) と呼ばれる層状構造体の部分に向かって移動し、そこに存在するリボソームと結合する。第2図で黒丸の

小点で示したものがリボソームである。

リボソームは、タンパク質とリボ核酸がほぼ半々からなる一種の核タンパク質であって、300 万ぐらいの重さの顆粒である (さらに 30s と 50s の2個の subunit からなる)。この顆粒は、細胞内では、脂質タンパク質を主成分とする膜構造の表面にずらっと配列してタンパク合成の場を形成している。

さてここで、もう一つタンパク合成に不可欠な核酸を持出さなければならない。それは messenger RNA (mRNA と略記する、情報 RNA ともいう) である。生物の行なっているすべての反応は、煎じつめると結局は細胞内に含まれる遺伝子の指令によって規定されていることはいまさら述べるまでもないことであるが、その指令を伝達する物質が mRNA なのである。絹糸腺に例をとると、細胞の核の中にある遺伝子、つまり DNA 中にフィブロインの構造に関する情報が存在し、その情報に応じた mRNA がつくられる (第2図)。おそらく蚕が5令期に入った2~4日目ぐらいに、フィブロインに対する mRNA がもっとも盛んに合成されるであろう。このようにして合成された mRNA は、核から離れて移動し小胞体のリボソームと特異的に結合する。mRNA と結合したリボソームがタンパク合成の場として活性であって、mRNA を有しないリボソームは、potency は持つがタンパク合成の場としては不完全なものである。どんなタンパク質を合成するのか指令がなくては活動しえないのは当然で、プログラムを与えられない電子計算機のようなものである。

さて上述のような構成の活性なタンパク合成の場に、先に述べた aa-sRNA がさらに結合する。この結合は mRNA と aa-sRNA の特異的な相互作用によるもので、mRNA 中に含まれている情報 (核酸塩基3個の組み合わせで1個のアミノ酸の情報となる。後で説明) に従って、aa-sRNA が mRNA 上に配列する。フィブロイン分子の結晶部分には、-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-といった特徴的なアミノ酸配列が存在するが、このような規則性は mRNA の塩基配列そのものに起因するのである (3-2. 参照)。

d) リボソーム上でのポリペプチド鎖の形成

c) で述べたリボソーム-mRNA-aa-sRNA の複合体だけではまだペプチド結合の生成には不十分で、さらに次の段階としてアミノ酸縮合酵素と GTP (guanosine triphosphate) が関係する。GTP の作用は非常に特異的で、反応の進行に伴い GDP と Pi に分解するので、その際生ずるエネルギーがペプチド結合生成のエネルギーとして補足的に用いられているのではないかと推定されているが、確かなことは不明である。またアミノ酸縮合酵素の方も決して単純なものではなく、絹糸腺の場合には少なくとも2種の因子にさらに分かれ、どちらか一

第2図 後部絹糸腺細胞構造の模型図

第3図 ポリソーム上でのペプチド結合の生成

方のみではペプチド結合の合成は進行しない。第3図にタンパク合成機構を図解的に現わして見た。

以上のような種々の因子が全部そろってはじめてアミノ酸間の縮合が始まるわけであるが、その基本反応形式は、次のように、一つのアミノ酸残基 aa_1 -sRNA と隣接するアミノ酸残基 aa_2 -sRNA との間に一種のアシル転移が行なわれるものと推定されている。この反応が次々と続いて、ちょうど鎖が一つずつ伸びるようにしてペプチドが長くなる。第3図の反応形式でペプチドが伸びていくとすると、ペプチド鎖は、アミノ基末端部 (図では R_1 アミノ酸残基) から始まってカルボキシル基末端部 (図では R_4 アミノ酸残基) に終ることになる。また生成途上のペプチドは、細胞内では sRNA と結合した形で全部のアミノ酸が結合するまでリボソーム上に固定されていることも特に重要な点である。

3. フィブロイン生合成の特徴

以上にタンパク質生合成反応の基本的な事項を説明したが、実際には、生物の種類や細胞の特殊性などによってかなり異なった形で表われる場合がしばしばある。この章では、フィブロインの場合に焦点をあてて見ることにしよう。

3-1. フィブロイン合成の場合

2. ではタンパク合成の場合はリボソームであるとしたが、ショ糖密度勾配遠心法^{*1}によって絹糸腺リボソームをさらに細分し、リボソーム顆粒の大きさとフィブロイン合成の関係を比較すると、単ーリボソーム (76s) よりいはるかに大きい顆粒 (420s 前後) の区分がタンパク合成能が高いことが明らかになった。このような分子量の大きいリボソームをポリリボソーム (polyribosome) またはポリソーム (polysome) と呼ぶ。単ーリボソ

*1 遠心分離用のチューブに、あらかじめショ糖濃度 5~30% の連続的な濃度勾配をつくって置いて、これにリボソーム液をのせて長時間遠心する方法。

第4図 絹糸腺ポリソームの電子顕微鏡写真

ム (single ribosome) が何個か集合したものである。第4図は絹糸腺ポリソームの電子顕微鏡写真で、1個1個のリボソームの他に、いくつかのリボソームが並んでいる像が見られる。ポリソームの大きさはリボソーム10個ぐらいから30個ぐらいまで各種の集団が混在しているが、試料の調製操作中の崩壊がかなり起こったためと思われ、本来はリボソーム30個ぐらいからなるポリソームがフィブロイン合成の場ではないかと推定されるわけである。

このポリソームは、単ーポリソームの機械的な集合体ではなく、1本の長い mRNA 分子にリボソームが結合した mRNA-リボソーム複合体であって、その大きさは mRNA の大きさによって決まってくる。先にも述べたように、リボソームの直径は大体 200Å で、これが mRNA 上に配列した場合には、リボソーム相互間の間隔を 100Å とすると、1個のリボソームの占有する幅は 300Å である。したがって、600Å の mRNA には2個のリボソームが、1200Å の mRNA には4個のリボソームが……、という工合に結合して一応安定なポリソームが形成されることになる。それでは、フィブロインに対応する mRNA はいったいどの程度の長さになるであろうか？

3-2. フィブロインの mRNA

フィブロインの分子量については、岡本の総説²⁾でも指摘しているように、正しくはまだ決定されていないといつてよい。Lucas らの総説で³⁾、この間の事情が詳細に論議されているが、結論として、フィブロインの分子量は6万~15万のかんりの幅があると考えられ、平均値として 84,000 を提案している。今かりにこの値を採用して mRNA の大きさを推定してみよう。

フィブロインを構成するアミノ酸残基の平均分子量は 78 であるから、1分子中には $84,000/78=1,100$ 個のアミノ酸残基が存在することになる。これらのアミノ酸のフィブロイン分子中における配列順序を決定するのが mRNA の役割で、mRNA 自身もフィブロインに対応した構造を有しているわけであるが、mRNA 中の情報は、3個のヌクレオチド残基を1組として1個のアミノ酸の情報を形成しているので、フィブロイン分子中の 1,100 個のアミノ酸の情報を構成するには、1,100 個×

3 = 3,300 個のヌクレオチドが必要である。RNA 中で

の 1 個のヌクレオチドあたりの長さは 3.4Å, 平均残基量は 335 であるから, 結局フィブリンの mRNA の大体の推定分子量と長さは,

$$3.4\text{\AA} \times 3,300 = 11,200\text{\AA} \text{ (長さ)}$$

$$335 \times 3,300 = 1.1 \times 10^6 \text{ (分子量)}$$

ということになる。

このような mRNA にリボソームが結合しうる数をちょっと考えてみると, リボソーム 1 個の占有する幅は 300Å であるから, $11,200\text{\AA}/300\text{\AA} = 38$ (個) となり, この値は, 絹糸腺細胞から密度勾配遠心法によって分離したポリソームの大きさ (リボソーム 30 個ぐらい) とそれほどかけ離れたものではない。

3-3. フィブリンの mRNA の分離

フィブリンの mRNA の問題をさらに追求するには, 絹糸腺から実際に mRNA を分離することができたならばいっばんははっきりする。しかし一般には mRNA は非常に不安定な物質とされていて, これまでに細胞からはっきりした mRNA を分離した例はほとんどない。ところが, 絹糸腺ではかなり安定な mRNA が存在するのではないかと思われる事実がいくつか見出されて来たので, 後部絹糸腺から mRNA の分離を試みた。

絹糸腺から核酸区分を抽出し, 抽出液をさらにカラムクロマトグラフィーやゲルろ過法で分別していくと, ある核酸区分に mRNA 活性が認められた。mRNA 活性を試験する方法は, 通常大腸菌のリボソームや酵素を含む試験管内でのタンパク質合成系を使用する。大腸菌の mRNA は不安定なので, 37°C で 15 分も保つと分解してしまい, したがってタンパク合成能はほとんど失われてしまう。このような系に, 絹糸腺から分離した核酸区分を添加すると, その区分に mRNA が含まれている場合には, タンパク合成反応が促進されることになる。第 1 表は, 第 5 図のようにカラムで分離した核酸画分の促進効果を比較したものである。ピーク I 区分の核酸は, 無添加の場合に比して明らかに促進効果が認められるが, 特に顕著な事実, ヒマ蚕 (野蚕の一種) から分離した核酸の効果である。ヒマ蚕のフィブリンの結晶部はポリアラニンという特殊な構造であるが, ヒマ蚕のピーク I RNA がアラニンのタンパク質中へのとり込を特に著しく促進していることに注意されたい。この RNA 区分にフィブリンの mRNA が含まれていると判定してはば間違いないであろう。

ここに得たフィブリンの mRNA を含む核酸は, ゲルろ過法や超遠心分析法での分析結果から判断すると, その分子量はせいぜい 5 ~ 6 万程度と推定され, 前節でフィブリンの分子量 84,000 から計算した mRNA の

第 5 図 家蚕後部絹糸腺 RNA のメチル化アルブミンカラムによる分画

第 1 表 絹糸腺ポリソーム RNA の各画分のタンパク合成促進能の比較

添加した RNA	家蚕 RNA 画分による ^{14}C -グリシンのとり込み*	ヒマ蚕 RNA 画分による ^{14}C -アラニンのとり込み*
無 添 加	49	31
全 RNA	129	155
ピーク-I RNA	80	445
ピーク-II RNA	40	43
ピーク-III RNA	55	30
ピーク-IV RNA	81	53

* ^{14}C -アミノ酸がタンパク質中にとり込まれた量を比放射能で示した

大きさ約 100 万とはだいぶかけ離れている。実験をくり返しても同じ結果で, 現在のところ大きい mRNA を分離するまでには至っていない。おそらく大きい mRNA は存在するのであろうが, 不安定で分離の途中で 6 万ぐらいの subunit に分裂したと考えられる。この subunit の大きさは, おもしろいことに, フィブリンの subunit (結晶部あるいは非結晶部) の mRNA に相当する大きさである。偶然ということももちろん考えねばならないが, ヒマ蚕から分離した mRNA と推定される核酸が, 結晶部を構成するアラニンのフィブリンへのとり込みを特に強く促進する事実を考慮すると, この mRNA 中には, 結晶部に相当する mRNA がより多く含まれているのではないかと推定されるわけである。

4. これからの問題点

フィブリンという比較的単純と思われているタンパク質を一つとりあげて見ても, これが生体内で合成される反応が進行するためには, いろいろの道具立が必要であることがご理解いただけたかと思う。これで必要因子の全部が出そろったという証明はまったくなく, おそらくいくつかの未知の因子がさらに将来追加されるであろうが, さしあたり上述した因子だけを考えて見ても, なかなか複雑な問題が残されている。

ポリソーム上でフィブリンが合成される場合, われ

われは少なくとも6種(2分子以上の aa-sRNA, リボソーム(30個), 1分子の mRNA, 2種のアミノ酸縮合酵素, GTP)のそれぞれ異なった道具を同時に考慮しなければならない。これらの因子が, 相互に一定の規則のもとに立体的に正しい配位をとった時に初めて, ペプチド結合の生成が始められることになるのであろう。しかし現在のところ, その配位の様子についてはまったく不明であり, また解析方法についても今後の研究にまたなければならない状態である。

リボソームを中心とする高分子物質の相互作用の問題は, 静的な状態ばかりでなく, 動的にも解析しなければならない必要に迫られている。タンパク質のようにアミノ酸が何百と鎖状に結合した分子がつくられる反応では, 反応の場と生成物との間に相対的な運動を仮定しないわけにはいかない。たとえて見れば, テープにタイプで文字を打っていくようなものであって, ペプチド鎖が1個伸びるごとに, なんらかの機械的な送りの運動を必要とする。このようなマイクロの世界の運動のエネルギーはどのようにして供給され, 機械的な動きに変換されているのか非常に興味深い問題である。

さらにフィブロインに特有の問題とし, 結晶性部と非結晶性部の交互のくり返しから成る長い分子が, 末端から順次合成されるのか, あるいは結晶部と非結晶部とが別々に合成され, 次に両者が共重合的に反応して長鎖状分子になるのかという問題は, 以前からの疑問点であるにもかかわらず未だ明確にされていない(この問題についてはまた別の機会に論じてみたいと思うので, 今回はいっさいふれなかった)。

また生化学的な立場からは, 同じ絹糸腺組織でありながら, 後部絹糸腺ではフィブロインのみが, 中部絹糸腺ではセリシンのみが選択的に合成されている現象は, 細胞の発生分化の機構と関連して今後の重要な課題の一つである。

文 献

- 1) 志村憲助: 生化学, **36**, 301 (1964)
- 2) 岡本 奨: 高分子, **14**, 33 (1965)
- 3) F. Lucas, J. T. B. Shaw, S. G. Smith: *Advances in Protein Chem.*, **13**, 108 (1958)

会誌「高分子」への投稿歓迎

会誌「高分子」の内容について下記の欄が設けてございますが, 広く会員諸君から, すべての欄への投稿を受けることになっております。大いにご投稿くださいますようお願いいたします。なお, 掲載の選定は編集委員会におまかせねがいます。

素 拙: 高分子を中心に広く 科学技術あるいは学界, 業界に関する時局的な問題や抱負を適宜とりあげて論じていただく。

展 望: 高分子の化学および物理ならびに工業の領域において一課題について広い立場でやさしく専門外の方々にもわかるように解説していただく(参考論文は引用しなくてもよい)。

講 座: 高分子の化学および物理ならびに工業に関する専門的な講義。

総 説: 最近の高分子の化学および物理ならびに工業の領域において, 一課題について総括的な解説をしていただく。首題に関係する最近の論文はできるだけ参考論文として引用していただく。

高分子教室: 高分子の化学および物理ならびに工業を工業高校卒業程度の方々にもわかるように解説した高分子入門講座。

Poly Mood: 高分子科学を高分子の分野の人々だけでなく, 異なった分野の人々の目をも通して, 総括的かつダイナミックなタッチで書いていただく。

人物評伝: 高分子の発展に活躍された人について書いていただく。

私の歩んだ道: どのようなことをやったかを中心に苦心談, 経験談など書いていただく。あるいは, その

研究者の一連の仕事を書いていただくのもよい。

研究から生産まで: 高分子の新製品の創出や, それに伴うプロセスや装置の開発に際して, その企画または, 研究からはじまって生産に至るまでの苦心談, 経験談, 問題点の処理などについて, 写真などをに入れて書いていただく。

紙 上 討 論: ある一つのテーマに関するその分野の第一線の研究者または技術者の討論。

私の仮説: スペキュレーションを含むある問題に対する自由な提案。

会 社 訪 問: 研究室訪問など。

問題点シリーズ: 大学における科学教育, 会社における技術者育成, 研究の自由とその限界, 特許, 給与, 研究者の流出, アブストラクト, 奨学金, 研究サービス他。

わが師・わが友: 研究の, 企業の, 内外を問わず。

大きな夢, 小さな夢: 研究や企業の将来に対する夢や希望を思うぞんぶん書いていただく。

会 員 の 窓: 会員相互の建設的な意見の交換, 紹介記事, 経験談, 誌上討論, 物資交換等々

求 人・求 職: (要領は本号の929ページをごらん下さい)

学界うちと: 関連学協会などの催しものについて速報する。

▶ お問合せは編集部あてに 東京都中央区銀座東 5-2-4 本州ビル4階 電話 東京 (03) 543-3771 (代表)