生体内に於ける蛋白質の合成機作に関する研究 (第2報)

絹糸腺による蛋白質生成反応

小出 英興, 板橋 宏子, 志村 憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 27 年 2 月 2 日 受理

Studies on the Protein Synthesis. Part 2. Protein Formation by Silk Gland.

By Fusaoki KOIDE, Hiroko ITABASHI and Kensuke SHIMURA

(Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)

緒 言 生体内に於ける蛋白質合成機作の研究は、いわゆる光合成の研究に比較して著しく立遅れている。その理由の1つとして考えられる事は、適当な研究材料が見出されていない事、即ち photosynthesis に於ける *Chlorella* に相当する如き生物が利用し難い点にある。或る化合物が蛋白質の生成に有効であるか否かを知る為に従来用いられて来た方法としては、培養微生物の増殖度を測定する方法、動物の体重増加を比較する方法等があるが、何れの場合もかなり間接的で蛋白質の合成反応のみを取出す事は困難であつた。

著者等は蚕の絹糸腺が蛋白質を生成する目的の為に特異的に発達した器官であることに注目し、絹糸腺を利用して生体内に於ける蛋白質の合成反応の機作を研究しようと試みた。即ち絹糸腺を蚕の体外に取り出して、内側に充填されている内容物(液状絹)を除去し、これを人工培養液中に incubate すると、内部に再び蛋白質が合成されて来る。培養中に加えた各種化合物と合成された蛋白質量との関係から、蛋白質合成反応に及ぼす諸種化合物の影響を実験的に求めようと試みたわけである。多くの実験を繰返し行つた結果、この方法は1つの新しい研究手段となり得る可能性が認められ、本法による実験結果中蛋白質合成機作に関係すると推定される二、三の事実を明らかにすることが出来たので、茲に報告する次第である。

実 験 方 法

蚕 蚕は時期的に春蚕、夏秋蚕、秋蚕及び晩秋蚕に分けられているが、本研究では蚕児を連続的に得る必要があるので、蚕種を浸酸冷蔵又は冷蔵浸酸して1週間毎に掃立を行い1週間に1回の割合で五齢の蚕児が得られるように飼育した。品種は二化性のものを用い、品種名は日115号×支108号(旧)で、宮城県立蚕業試験場の好意により分譲を受けたものである。実験に供する適期は五齢4~6日目目の絹糸腺の発育が最も旺盛な時期である。五齢初期のものでは絹糸腺が小さ過ぎて実験操作が困難であり、又6日目以後熟蚕に近くなると絹糸腺は急速に弾力性を失い、同時に実験結果は甚しく乱れてくる。

実験操作 Table 1 に示した組成の生理的塩類溶液 (physiological solution) 中で蚕を背面より開いて中部絹糸腺をとり出し、絹糸腺に損傷を与えないように注意しつつ寒天状内容物を静かに除去してゴム管状の絹糸腺を得る。この一端をガラス毛细管に接続し、毛细管の上端より生理的塩類溶液を注入して絹糸腺内壁を充分に洗滌する。然る後絹糸腺の他端をセメダインにて封じ、これを Fig. 1 の如く培養液を満した小試験管中に浸し、30° の恒温器中に保つ。

Fig. 1 Diagram of Silk Gland incubated.

一定時間後 絹糸腺を取出し、末端を切断し内容物を小試験管 (4 mm × 65 mm) に洗い込み、全液を 0.2 ml とする。これに末吉の試薬を加えてよく混和し、1時間後に予め作製しておいた標準液と比濁法により比較して絹糸腺内に生成した蛋白質の量を知る。標準液としては各種濃度の新鮮卵白液(蛋白質含量 0~1000 γ の範囲) 0.2 ml を上と同型の小試験管にとり、末吉の試薬⁽¹⁾を 0.2 ml 加えたものを密封して用いた。

Table 1. Composition of Physiological Solution

Constituent	Concentration	Constituent	Concentration
NaCl	11.20 g/l	NaHCO ₃	0.02g/l
KCl	0.24//	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.50//
MnCl ₂	0.14//	Glucose	1.50//
MgCl ₂	0.14//	Adjusted to pH 8.0	

基本培養液: 生体からとり出した絹糸腺を incubate する基本培養液は、前述の生理的塩類溶液にアミノ酸を加えたもので、その組成は Table 2 に示す如くである。このアミノ酸組成はセリシンの組成に近いもので、別にフィブロインのアミノ酸組成に近い培養液を用いて比較したが、前者の方が結果がやや良好であつたので、

以後の実験では全く Table 2 の組成のものを使用した。

Table 2. Composition of Basal Medium*

Substance	Concentration	Substance	Concentration	Substance	Concentration
NaCl	11.20 g/l	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.50 g/l	L-Aspartic acid	0.58 g/l
KCl	0.24 //	Glucose	1.50 //	L-Na-Glutamate	0.58 //
MnCl ₂	0.14 //	Glycine	0.58 //	DL-Serine	0.58 //
MgCl ₂	0.14 //	DL-Alanine	1.16 //	L-Arginine·HCl	0.58 //
NaHCO ₃	0.02 //	L-Leucine	0.58 //	L-Tyrosine	0.34 //

* Adjusted to pH 8.0

実 験 結 果

上述の如き実験方法に従つて種々の組成の培養液中に絹糸腺を incubate し、絹糸腺 1 本中に生成した蛋白質量を γ 単位で表した。以下に示す数値は絹糸腺 10~30 本の平均値である。しかし蚕の個体差及び実験操作の不均一の為、同一条件を与えた場合でも尚 $\pm 10\%$ 程度の誤差をまぬがれない。又絹糸腺の大小、五齢後の日数、春夏秋の時期等により絶対値は多少変動する。従つて吾々は常に実験を blank と平行して行い、結果の判定に誤謬のないよう極力注意した。

1) 磷酸塩の影響 培養液中に磷酸塩を添加すると、然らざる場合に比し常に多量の蛋白質を生成する。即ち蛋白質合成反応には磷酸塩の存在が必要と推定される (Table 3)。

Table 3. Effect of Phosphate on Formation of Protein by Silk Gland
(Incubated 2 hrs. at 30°, pH 7.8)

Substrate	Protein formed
Basal Medium*, no phosphate†	50 γ
Basal Medium, with phosphate	150 //
Basal Medium**+Pyruvate***, no phosphate	200 //
Basal Medium+Pyruvate, with phosphate	500 //

* Conditions, same as Table 2. except that phosphate was omitted.

** Glucose 1.0 g per litre *** " 0.5 g per litre,

† " 1.5 g per litre.

る。尚 12 時間又はそれ以上時間を長く incubate して見たが、蛋白質の生成量を増加させることは出来なかつた。

Fig. 2. Effect of Time of Incubation on Protein Formation

—□— Basal medium
—△— Physiological Solution + 0.003 M Pyruvate
—○— Basal medium + 0.003 M Pyruvate

Fig. 3. Effect of Time of Incubation on Protein Formation.

3) 反応の最適水素イオン濃度： 基本培養液 (Table 2) 中の glucose を 1.0 g/l とし、これに

0.5 g/l の pyruvic acid を添加した培養液に就て pH 5.5~9.0 の範囲にわたつて実験を行つた。pH と蛋白質生成量との関係は Fig. 4 及び Fig. 5 に示す如くで、反応の最適 pH は 8.0 附近に存在する事が知られる。蚕兒血液の pH は 6.3~6.8 とされているが、吾々の実験によつて示された蛋白質生成反応の最適水素イオン濃度と明らかに相違することは注目すべき現象である。

Fig. 4. Effect of pH on Protein Formation by Silk Gland.

—●— Basal medium + 0.003 M Pyruvate
 - - -○- Basal medium

Fig. 5. Effect of pH on Protein Formation by Silk Gland

4) 各種化合物の影響：アミノ酸より蛋白質の合成は明らかに自由エネルギー増加の反応であり，如何なる反応から必要とするエネルギーが供給されるかは，蛋白質合成反応に於ける重要な問題の1つである．前述の如くエネルギー源として glucose のみを与えた場合には，絹糸腺による蛋白質生成量は僅かであるが，これに pyruvic acid を加えると著しく増加したので，更に吾々は糖代謝に於ける各種中間生成物を添加してその影響を比較した．各添加物物質の濃度は 0.003 M/l で glucose 1.0 g/l を常に共存させた (Table 4)．実験の結果炭水化物源としては pyruvic acid, phosphoenol pyruvic acid, oxaloacetic acid, α -ketoglutaric acid, lactic acid が特に有効であることが明らかとなった．これらは何れも α -ケト酸又は容易に α -ケト酸に移行す

る物質であることは注目すべきである．又 ATP も反応を著明に促進する．

基本培養液にはビタミンが加えられていないが，絹糸腺の蛋白質合成反応に対してビタミンを必要とするであろうことは推定に難くないので，各種ビタミン類を添加して見た．B₁, B₂, B₆ を同時に与えて見たが殆んど影響なく，ascorbic acid 及び pantothenic acid が明らかに有効であつた．又 B₁₂ はやや有効であつたが，常に pantothenic acid より低い値を示した．

上述の如く磷酸塩の存在が反応を著しく促進するが磷酸の関与する酵素系を特に阻害すると考えられている dinitrophenol は絹糸腺の蛋白質生成反応を殆んど阻害する．又 NaF (1×10^{-3} M) によつても反応はほぼ完全に阻害され，本実験に於ける blank と見做し得る physiological solution 中での値に近くなる．このように微量の阻害剤の添加によつて blank 以上の蛋白質の生成が殆んど行われなことは，本実験方法により蛋白質合成反応に有効なる物質を探索し得る可能性を示すものと考ええる．

生成した蛋白質の性質：生成した蛋白質はビュレット反応陽性，ESBACH 試薬，末吉の試薬，CCl₃·COOH, Conc.HNO₃, alcohol 等により沈殿，Na₂SO₄ で塩析される．

考 察

先ず第一に問題となることは，本実験方法によつて

Table 4. Effect of Various Substances on Protein Formation by Silk Gland. (Incubated 1 hr. at 30°, pH 8.0)

Substrate	Concentration	Amounts of Protein formed (average)*
Physiological Solution		140
Basal Medium		180
Basal Medium** + Pyruvic acid	0.003 M	480
" + Lactic acid	"	490
" + Oxalacetic acid	"	460
" + Malic acid	"	380
" + Fumaric acid	"	300
" + Succinic acid	"	400
" + α -Ketoglutaric acid	"	480
" + Citric acid	"	400
" + Phosphoenol pyruvic acid	"	460
" + Phenylpyruvic acid	"	160
" + Glucose-1-phosphate	"	340
" + ATP	"	460
" + Vitamin B ₁ , B ₂ , B ₆ ***		250
" + Ascorbic acid	0.01 M	400
" + Pantothenic acid	0.002	460
" + Cholin-HCl	0.003	200
" + B ₁₂	50 γ per litre	350
" + pyruvic acid + 2, 4-Dinitrophenol	0.0008 M	180
" + Oxalacetic acid + 2, 4-Dinitrophenol	0.0008 M	210
" + Pyruvic acid + NaF	0.001 M	150

* Each value is the average of about twenty determinations.

** The composition was given in Table 1, except that 1.0 g of glucose per litre were added.

*** B₁ · HCl 18 mg per 100 ml ; B₂ 1.5 mg, B₆ 60 mg.

得られた蛋白質が絹糸腺の正常の代謝を人工培養液中で営んだ結果として合成されたものであるか、或は予め絹糸腺中に存在していた蛋白質が単に自己崩壊的に排泄されたものであるかと云う点である。今実験結果を総括的に検討して見ると、physiological solution のみで incubate した場合、或は酵素反応の阻害剤と考えられる物質を添加した場合等に比較し、従来の知識から判断して明らかに代謝に有効と考えられる各種の物質を添加した場合には 2~3 倍の蛋白質の生成が観察される。これらの事実は、培養液の条件が絹糸腺の生理化学的狀態に適した場合に蛋白質の生成が増加するのであつて、絹糸腺組織の単なる autolyse に由来するものではない事を暗示するものと見做してよいであろう。

又前述の如く *in vitro* の絹糸腺による蛋白質生成反応は 約 2 時間にわたつて行われるが、この間に於ける組織の呼吸の狀態は Fig. 6 に示す如くで、組織は最初の 1 時間はかなり活潑に酸素を吸収するが、それ以後は次第に減弱する傾向を示している。しかしここで注意すべき事は、pH 7.2 の培養液中での Q_{O_2} 値*が、同一組成の pH 8.0 の培養液中での値に比し明らかに大きい事である。これに対し蛋白質の合成の最適 pH は Fig. 4 に示した如く pH 8.0 附近に存在し、pH 7.2 では蛋白質の生成は著しく少い。これらの事実から、本実験法による蛋白質の生成は、単に組織の機能全体が充進した結果、蛋白質の生成量も増加したと云うだけではなく、蛋白質の合成に関係する一連の酵素系が特に活性化されて、pH 8.0 に於て最も多くの蛋白質を生成したものと解釈することが出来るであろう。但し絹糸腺に於ける蛋白質の合成には当然 O_2 を必要とするものであつて、この事は、Fig. 6 に於て同一 pH の培養液では、glucose のみの場合より、これに pyruvic acid を添加した場合の方が O_2 の吸収が多い事実から知られる。実際に蚕児の絹糸腺には多数の

Fig. 6. Effect of pH on O_2 Uptake by Silk Gland

—△— Basal Medium, pH 7.2
 —○— " pH 7.8
 —□— " pH 8.0
 —●— " + 0.003 M Pyruvate, pH 7.8

気管が網目の如く張廻らされており、気門を閉塞すると絹物質の生成が著しく阻害されることはよく知られている所である。

次に Table 3 の結果から α -ケト酸が特に有効であることが明らかとなつた。 α -ケト酸は transaminase の存在で容易にそれぞれ相当するアミノ酸を生成し、又他のアミノ酸の合成に際してアミノ基譲渡の仲立として蛋白質代謝に重要な役を演じていることは衆知の如くであるが、蛋白質の合成反応に対しても又特別の意義を有するのではないかと推定される。勿論これらの α -ケト酸は tricarboxylic acid cycle に於ける重要なメンバーであるから、これらを与えれば組織のエネルギー代謝は促進されるであろう。しかし同じ cycle のメンバーである citric acid, malic acid, succinic acid, fumaric acid 等に比して明らかに α -ケト酸の方が高い値を示していることは、 α -ケト酸が単にエネルギー源としてのみ役立つ以外に、蛋白質合成の素材として直接反応に関与しているのではないかと推定される。

磷酸塩が蛋白質の生成を促進することも明らかである (Table 4)。一般に磷酸化合物が生体内に於ける蛋白質合成に関与しているのではないかと云うことは、LIPMANN^(2,3,4), CHANTRENNE^(5,6) 等により推定されているが、未だ直接には証明されておらなかつた。この点吾々の得た実験結果は、両者の関係を示す具体的な一つの証明となるであろう。尚磷酸が如何なる機作によつて蛋白質合成と関係するかに就ては不明であるが、絹糸腺に於て蛋白質が旺に合成されている時期に於て、体液又は絹糸腺中の磷酸含量や phosphatase 作用に或る関連性が認められた。これらに関しては次報告に譲る。

* Warburg 検圧装置を用い常法により測定。

要 旨

- 1) 蚕の中部絹糸腺をアミノ酸及びその他の種々の物質を含む人工培養液中に incubate して蛋白質を合成せしめ、蛋白質の生成に及ぼす各種物質の影響を比較した。
- 2) 蛋白質生成の最適 pH は 7.8~8.5 の範囲にあり、pH 8.0 に於て最高値を示した。
- 3) この反応は無機磷酸塩の添加で著しく促進され、又 Mg^{++} 及び Mn^{++} の存在は反応に好い結果を与えた。
- 4) 試験した多数の物質中蛋白質の生成を著しく促進したものは、 α -keto acids (pyruvate, oxalacetate, α -ketoglutarate), lactate, ATP, pantothenic acid 及び ascorbic acid 等であつた。
- 5) 2,4-Dinitrophenol 及び NaF によつて蛋白質の生成は殆んど阻害された。

終りに臨み、蚕の飼育その他に関して多大の御援助を戴いた宮城県立蚕業試験場野口活也場長をはじめ試験場の各位に深く感謝いたします。又実験に御協力下された菊地愛子氏に感謝します。尙本研究の費用の一部は文部省科学研究費によるものである。

- (1) SUEYOSHI : *Memoir of the College of Med., Tokyo Imp. Univ.*, 14, 441 (1915).
- (2) LIPMANN, F., *et al* : *J. Biol. Chem.*, 167, 869 (1947).
- (3) SOODAH, M. and LIPMANN, F. : *ibid*, 175, 999 (1948).
- (4) NOVELLI, E. G. and LIPMANN, F. : *J. Biol. Chem.*, 182, 213 (1950).
- (5) CHANTRENNE, H. : *Nature*, 160, 603 (1947).
- (6) CHANTERNNE, H. : *Biochem. et Biophys. Acta.*, 2, 286 (1948) ; 4, 484 (1950).

Summary

The middle silk gland of a mature silkworm (*Bombyx mori* L.) was cut off from the live body and freed carefully from its jellylike contents. It was connected to a glass capillary and sealed with synthetic resin at the other end. After filling it with the physiological solution, the gland was incubated in the culture medium containing amino acids and other substances at 30°.

After one or two hours of incubation the content of the gland cavity was transferred into a small test-tube. The amount of protein formed was determined by adding an equal volume of SUEYOSHI's reagent and comparing nephelometrically with a series of standard solutions which contained known amounts of egg white.

- 1) The reaction of protein formation was optimum between pH 7.8~8.5, with a peak at pH 8.0.
- 2) The reaction was stimulated by addition of inorganic phosphate.
- 3) The effect of various substances has been studied. A marked stimulation was observed with α -keto acids (such as pyruvate, oxalacetate, α -ketoglutarate), lactate, pantothenic acid and ascorbic acid.
- 4) NaF and 2,4-dinitrophenol were found to inhibit the reaction.
- 5) The protein formed gave a purple biuret reaction and was precipitated by mercuric chloride, trichloroacetic acid, picric acid and alcohol.

生体内に於ける蛋白質の合成機作に関する研究 (第 3 報)

蚕兒五齡中の蛋白質合成作用と磷酸代謝との関係

板橋 宏子, 小出 英興, 志村 憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 27 年 2 月 2 日 受理

Studies on the Protein Synthesis. Part 3. Phosphorus Contents in Blood and Silk Glands of Silkworm in the Relation to Protein Synthesis.

By Hiroko ITABASHI, Fusaoki KOIDE, and Kensuke SHIMURA
(Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

緒 言 炭水化物の生体内に於る合成反応に際して、磷酸が重要な役割を演じていることは既によく知られ