[農化 第37巻, 第3号, p.163~166, 1963]

絹フィブロインの化学構造より見た
生合成機作に関する研究 (第1報)*C¹⁴-フィブロインの部分加水分解物の検討

岡本 奨, 岡田鶴子, 姜 砂男 (東京農工大学工学部)

昭和37年10月8日受理

緒 言

蚕の絹糸腺においてフィブロインがいかなる機作で合成されるかという問題については、志村、三浦をはじめ主としてわが国の生化学者により詳細に追究されており、一步一步解明されつつある^(1,2)。フィブロイン生合成のアミノ酸からフィブロインへの段階においての一つの問題点は、フィブロインが絹糸腺内においてアミノ酸から stepwise に合成されるものか、あるいは simultaneous な縮合によるかということである。家蚕フィブロインはその約43%がグリシンよりなるので、蚕に C¹⁴-グリシンを摂取させ、生成したフィブロイン分子中の C¹⁴-グリシンおよび生体内変化によってグリシンから転換して生成した他の C¹⁴-アミノ酸の分布をしらべ、それが uniform に分布しているか否かによってその判定の一助にすることができる。すでに志村⁽³⁾は注射後一定時間のフィブロイン分子の末端グリシンと末端以外のグリシンとの比放射能を比較し、C¹⁴-グリシンがN末端グリシンに偏在している傾向があることから、stepwise に生成するものであろうと推定している。

Uniform か non-uniform かをしらべる他の手段として、ラベルした蛋白質の部分加水分解物からペプチドを分離して、それらの放射能を測定し各ペプチドに均等にラベルされているか否かによって判定する方法があり、諸学者によって種々の蛋白質についてしらべられているが、その結果は蛋白質の種類により区々である。たとえば卵白アルブミン⁽⁴⁾、インシュリン、リボスクレアーゼ⁽⁵⁾では non-uniform、羊カゼイン、β-ラクトグロブリン⁽⁶⁾、ヘモグロビン⁽⁷⁾、筋肉アルドラーゼ、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase⁽⁸⁾ では uniform labeling であったと報告されている。これらの報告が正しいとすれば蛋白質には stepwise に生成するものと、そうでないものと2種類があることになる。フィブロインについてはこの方法による証明がまだ適用されていないので、私どもは上記志村の推定の裏づけができるかどうかをこの方法によって試みた。

実 験 方 法

(1) C¹⁴-フィブロインの調製 5令4日の家蚕を用い1頭当りグリシン-1-C¹⁴を1μc注射し、注射後2時間して後部絹糸腺内容物を5%トリクロル酢酸溶液中で腺より分離し、0.25M蔗糖溶液中に保存して供試した。乾物の放射能は6,500 c.p.m./mgである。

(2) 部分加水分解 部分加水分解には酵素法と塩酸法とがあるが、ここでは塩酸法によった。試料に対し50倍量の濃塩酸を加え、封管中にて40°, 18時間処理し減圧蒸留で脱塩酸後一定量に濃縮した。

(3) ペプチドの分離 ペプチドの分離は操作を簡単にするためペーパークロマトグラフィーをくりかえすことによった。一例をのべると大型濾紙(縦50cm, 横60cm)を用い、試料18.4mgに相当する量を濾紙の下端辺から5cmの線上にサンプリングし、まずブタノール・酢酸・水(4:1:5)(以下BAW)で同一方向に2回上昇法で展開し、その一部をニンヒドリンで発色させ、分離した9個のペプチド帯を水で抽出し、一定量に濃縮後この各々を再び濾紙に同様にサンプリングし、フェノールで2重展開し、2以上の帯に分離したものについてはまたこれを抽出分離し、これらすべてをさらにそれぞれBAWおよびフェノールで同方向に二重に展開し、単一の帯であることを確認した後、単一ペプチドと見なされるもの17個を抽出分離することができた。これらはBAWとフェノールの二次元展開によってもただ1つの斑点を示すだけである。なお分離したペプチドの合計量は供試フィブロイン量に比しかなり増加している(第1表)が、これは微量の溶媒その他の夾雑物の混入と夾雑

* Studies on the Mechanism of Fibroin Biosynthesis based on its Chemical Structure. Part I.
On the Partial Hydrolysates of C¹⁴-Labeled Fibroin.

By Susumu OKAMOTO, Tsuruko OKADA and Sunao KYO (Department of Industrial Chemistry,
Tokyo University of Agriculture and Technology)

物およびペプチドの著しい吸湿性によるもので、秤量の際に非常に注意して操作してもこれをさけることができなかった。

(4) 放射能の測定 分離した各ペプチド水溶液を蒸発皿にいれて 1 ml 程度に濃縮し、これをニッケル製試料皿に移し赤外線ランプで静かに蒸発乾固し、真空デシケーター中で十分乾燥した後ガスフロー式 G. M. 計数装置で測定し c. p. m. を求めた。

(5) 各ペプチドの完全加水分解 放射能測定後の試料皿は蒸発皿中で水でペプチドを洗い落とし、この洗液を蒸発乾固して 6 N 塩酸と共に封管に移し 103~108° で 12~15 時間加熱して完全加水分解した。分解液は蒸発乾固をくりかえして脱塩酸し、小試験管に移して各 1 ml にした。

(6) 完全加水分解物の展開 各ペプチドのアミノ酸組成を比較するため、濾紙上への供試量は各ペプチドの重量に対応して調節し、一定量について比較しうるようにした。BAW による二重または三重展開により、あるいはフェノールとの組合せによる二重または三重展開により、標準アミノ酸と比較しつつアミノ酸を同定した。

(7) ラジオオートグラフィー 完全加水分解物の展開濾紙はエーテルで脱溶媒した後、X線用フィルムを密着させ冷暗所で 20~30 日間放置し、常法により現像定着し特に著しい放射性アミノ酸を確認した。

実 験 結 果

第1図 各ペプチドの比放射能

第1表 各ペプチドの回収量、放射能およびアミノ酸組成の関係

ペプチド番号	回収量 (mg)	比放射能の大小	アミノ酸組成				全斑点数
			セリン	グリシン	アラニン	チロシン	
1	7.0	なし	+	—	+	—	3
2	3.7	小	—	+	+	—	3
3	2.3	中	+	+	+	—	5
4	1.9	大	+	++**	+	—	4
5	2.4	大	+	++**	++	—	7
6	4.0	大	+++	+++	++	+	9
7	1.5	中	—	++*	—	—	2
8	1.6	小	—	+	+	—	2
9	3.0	なし	—	+	+	—	4
10	4.7	小	—	++	+	—	5
11	1.7	小	—	+	+	—	3
12	1.1	小	—	+	+	—	4
13	1.0	中	—	+	++	—	4
14	1.8	中	+	++*	++	+	9
15	5.4	中	—	++**	++	+	5
16	3.2	小	—	+	+	—	4
17	5.8	なし	—	+	+	—	6

* 放射能弱い

** 放射能中位

*** 放射能強い

(1) 各ペプチドの比放射能 実験はほぼ同様な手順で6回くりかえした。その都度分離ペプチドの数およびそれらの比放射能に若干の増減が見られたが、全実験にわたって同じ傾向が見られた。第1図は試料 18.4 mg を用いて分離できたペプチド数 17 個の場合の各ペプチドの比放射能 (c. p. m./mg) を図示したものである。ペプチド番号はペーパークロマトグラフィーで展開の際の R_F 値の小さなものから順につけてある。図の如く各ペプチドについて比放射能は大差があることを認めた。各ペプチド量 (第1表) から考えて夾雑物が最も多いと思われる No. 1 と 17 を除けば、No. 2, 6, 9, 10, 15, 16 がフィブロインの主要構成成分をなすペプチドと判断されるが、このうち比放射能の著しく高いものは No. 6 のみである。No. 4~6 間に大きなピークおよび No. 13~15 間に小さなピークがあるが、この傾向は多少のずれはあっても各回の実験毎に必ず再現された。

(2) 各ペプチドのアミノ酸組成 各ペプチドのアミノ酸組成は供試量微量のため定量は困難であるので、同一量を展開したペーパークロマトグラムから定性的に比較した。その結果を第2図に示す。また前記比放射能の大小、ペプチド量などをとり入れて概括的にあらわしたのが第1表である。図および表の示すようにフィブロイン構成の主要アミノ酸であるグリシンおよびアラニンはほとんどすべてのペプチドに相当量含まれている。グリシンの呈色範囲の面積からいえば No. 6 は特に大きい。No. 4, 5, 10, 14, 15 の5つのペプチドはほとんど差

第 2 図 各ペプチドの完全加水分解物のクロマトグラム

陰影部はラジオオートグラフで検出した放射性を示す。

S: セリン G: グリシン A: アラニン T: チロシン

異がない。またラジオオートグラフの示す如くグリシン、セリン以外のアミノ酸にはほとんど C^{14} が入っていないと考えられる。しかるに各ペプチドの比放射能は前記の如くそれぞれの間に大差があり、特に No. 10 にはほとんど放射能がない。すなわち各ペプチドのグリシン含量と比放射能との間に比例的関係がないことは明瞭である。このことは C^{14} -グリシンがフィブロイン分子中で non-uniform に分布していることを示すものと考えられる。

考 察

蚕体にとりいれられたグリシンの一部はセリン⁽⁹⁾、あるいはセリン、アラニン、スレオニン⁽¹⁰⁾に変化することが知られているが、大部分はグリシンの形のままでフィブロインの形成にあずかるものである。本実験でもフィブロインの完全加水分解物および各ペプチドの完全加水分解物のペーパークロマトグラムのラジオオートグラフによると、グリシンのほかセリンにかなりの放射能があることを認めたが、その他のアミノ酸にはほとんど認められなかった。フィブロインは緩和な化学的操作によって結晶領域と非結晶領域の2つのフラクションに分けられ、両領域はアミノ酸組成を異にし、結晶領域はグリシン、アラニン、セリンを主体とする比較的簡単なアミノ酸組成を有し、その主要部は $-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ala}-$ の如く規則的なアミノ酸配列をなしている。また非結晶領域はこれらのアミノ酸のほか、チロシンをはじめフィブロインを構成するすべてのアミノ酸よりなる複雑な組成を有するものである。しかしこの両部分がフィブロインの2つの独立した成分として存在しているものか、あるいは両部分がブロックポリマー状に連結してただ1種の蛋白質分子を形成しているものかは、まだ明らかにされていない。また両部分が別々の蛋白質としてそれぞれ生合成の場が異なるものか、1つの蛋白質分子として同じ場で連続的な機作で合成されるものかについても、まだ報告されていない。本実験では一まず両領域に区分することなく全フィブロインを部分加水分解したので、分離されたペプチドはすべて両領域のいずれからかに由来するものである。各ペプチドの比放射能は著しい差異があるのであるが、この差異が各ペプチドのグリシン、セリン含量と比例しているかどうかをしらべることによってはいじめて uniform labeling か non-uniform labeling かを決定しうるわけである。試料が微量で定量が困難なために含量は定性的にみるよりほかなかったのであるが、一方各ペプチドの比放射能は著しい相異があるので、両者の間に比例的な関係がないことは一見して明らかであり、その判断を誤まることはないと考えられた。その上比放射能の大きなペプチドはすべてグリシンまたはセリンの斑点の少くとも1つはラジオオートグラフで放射能を感じている。このこととグリシン、セリンでも全く放射能が認められぬ斑点が多数あることを考え合せば、 C^{14} が特定のペプチド鎖に偏在しており、non-uniform

labeling であること, すなわちフィブロイン形成はアミノ酸が1個ずつ順次に結合して高分子ポリペプチドを形成するか, あるいは小ペプチド群がまずできてこれらが連結してフィブロイン分子を形成するか, いずれにしても stepwise mechanism で生成されることを推定させるものである。

分離したペプチドの完全加水分解物のアミノ酸組成をみると, No. 6, 14 の如くチロシンその他をふくむ組成複雑なものと, グリシン, アラニンを主体とする比較的組成簡単なものとの両方がみられる。得られたペプチドの鎖長には長短種々あるであろうが, 少なくとも組成複雑なペプチドは組成簡単な結晶領域から由来したペプチドとは考えられず, 非結晶領域の一部と見なすのが妥当である。No. 6 は放射能が最も強いので, C^{14} の一部は非結晶領域に入っていくものと考えて差支えない。また No. 14 は C^{14} のとりこみが極めて少いので, 非結晶領域に限定して考えても non-uniform labeling であるといいうる。No. 4, 5, 7 も高い比放射能をもつが, これらは No. 6, 14 と比べてはるかに組成が簡単である。組成簡単なペプチドについては鎖長の短いものはいずれの領域とも断定しがたいので, その長短を度外視することはできないのであるが, フィブロイン中の結晶領域の占む割合から考えて, これらのペプチドは比放射能の小さな No. 2, 9, 10 その他と共に少なくともその一半は結晶領域に由来するペプチドである可能性が大きい。従って結晶領域についても non-uniform と推定しうる。これらの結果を総合すると, C^{14} は結晶領域, 非結晶領域の両方に入っていくことが考えられるが, 両領域の合成の場が異なるか否かについては, さらに経時的な追究が必要であって, これだけでは判定しがたく今後の研究にまたねばならない。

要 約

放射性アミノ酸を注射して生成させたフィブロインを部分加水分解して, ペプチドを分離しその比放射能の強さからフィブロインのラベリングが uniform であるか non-uniform であるかしらべ, アミノ酸からフィブロインへの段階での生成機構を考察した。

グリシン- $1-C^{14}$ を蚕1頭当たり $1\mu c$ 注射して C^{14} -フィブロインを調製し, 濃塩酸によって部分加水分解後, ペーパークロマトグラフィーをくりかえして 17 個のペプチドを分離抽出し, ガスフロー式 G.M. カウンターで測定後, 分離ペプチドはさらに完全加水分解して, アミノ酸組成をしらべ, ラジオオートグラフで各アミノ酸の放射能の強さを確めた。

その結果各ペプチドの比放射能は互に著しい差異があり, しかもその差異はペプチド中の全グリシン, セリン量に比例せず, 放射性アミノ酸は数種のペプチドに偏在していた。これは明らかに non-uniform labeling であることを示し, フィブロインは stepwise mechanism で生成されるであろうと考察した。また各ペプチドのアミノ酸組成と比放射能の大小との関係から, C^{14} は結晶および非結晶の両領域にとりこまれる可能性があると推定した。

本研究は文部省科学研究費によって行なった。本研究実施に当り千葉大学三浦義彰教授, 東北大学志村憲助教授の御懇篤な御教示を得た。またラジオアイソトープ実験については本学木暮研究室の皆様の多大の御援助をいただいた。共に記して深甚の謝意を表する。

(1) 志村憲助 : 生化学, 28 , 197 (1956).	(6) B. A. Askonas, P. N. Cumpell, C. Godin, T. S. Work : <i>Biochem. J.</i> , 61 , 105 (1955).
(2) 鈴鹿 巖 : 蛋白質 核酸 酵素, 6 (11), 98 (1961).	(7) H. M. Muir, A. Neuberger, J. C. Perrone : <i>ibid.</i> , 52 , 87 (1952).
(3) K. Shimura, H. Kobayashi, R. Hoshi, J. Sato : <i>J. Biochem.</i> , 46 , 849 (1959).	(8) M. V. Simpson : <i>J. Biol. Chem.</i> , 216 , 179 (1955).
(4) D. Steinberg, C. B. Anfinsen : <i>J. Biol. Chem.</i> , 199 , 25 (1952).	(9) T. Fukuda : <i>J. Biochem.</i> , 47 , 720 (1960).
(5) M. Vanghan, C. B. Anfinsen : <i>ibid.</i> , 211 , 367 (1954).	(10) K. Shimura, H. Fukai, S. Suto, R. Hoshi : <i>ibid.</i> , 45 , 481 (1958).