

家蚕の変態過程における中腸組織の機能的解析(III) ：中腸よりのリボソームの単離・精製法の確立並び にタンパク質合成調節機構の*in vitro*での解析

藤井, 博
九州大学農学部蚕学教室

<https://doi.org/10.15017/23278>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 33 (2/3), pp.147-154, 1979-01. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

家蚕の変態過程における中腸組織の機能的解析

Ⅲ. 中腸よりのリボソームの単離・精製法の確立並びに タンパク質合成調節機構の *in vitro* での解析

藤 井 博

九州大学農学部蚕学教室

(1978年10月13日受理)

Studies on Functional and Structural Conversion of the Midgut during Larval-Pupal Transition in the Silkworm, *Bombyx mori*

III. Isolation and Characterization of Ribosome from the Midgut and Their Capacity for *in vitro* Protein Synthesis

HIROSHI FUJII

Laboratory of Sericulture, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

緒 言

カイコの5令幼虫の発育過程に伴う中腸組織のrRNAとtRNAの量的変化と合成能の変化を調べた結果、5令食桑期にはrRNAとtRNAのいずれも多量に存在するが、食桑しなくなった熟蚕期で急速に減少すること、またrRNAとtRNA合成能は両RNAの量的変動とは逆に前蛹期に高くなること、さらに中腸のタンパク質量は熟蚕に入ると急激に減少していったが、この時期には著しいタンパク質の質的变化がみられ、新しいタンパク質の合成が行なわれていることを明らかにした(前報I, II)。これらのことは中腸組織におけるタンパク質合成がrRNAとtRNAとによる翻訳段階で調節されている可能性を示唆している。それ故に、変態過程でタンパク質合成の調節が翻訳のどの段階で行なわれているのかを探るために調節因子の働きを調べた。

そこで無細胞タンパク質合成系を用いて、この合成系で最も重要な因子と考えられるリボソームとpH 5酵素(アミノアシル tRNA 合成酵素)に焦点をしばり、これらの活性の発育に伴う変動を調べることにした。まずカイコからリボソームを単離精製し、pH 5酵素を用いた無細胞タンパク質合成系を確立し、翻訳

段階であるこの系にそれぞれ起源を異にするリボソームとpH 5酵素を相互交換するという方法を用い、これらの因子が調節作用に如何なる役割を果しているかを明らかにしようとした。

材料および方法

供試材料

九大農学部保存の正常系p22の5令3日目(盛食期)と7日目(前蛹期)の幼虫および化蛹3日目の蛹を用いた。これらのうちリボソーム単離法の確立のためには蛹を用いた。また発育に伴うリボソームとpH 5酵素(アミノアシル tRNA 合成酵素)のタンパク質合成能の変化を調べるためには、5令3日目と7日目の中腸組織を用いた。

緩衝液および無細胞タンパク質合成系

リボソーム単離用緩衝液にはIlan (1968)とKaulenas (1970)とによるものを用いたが、原報通りの緩衝液を用いてカイコの蛹からリボソームを単離した場合、リボソームは低速で沈澱するので単離することが困難であつた。そこで緩衝液からMg²⁺を除き、KCl濃度を高くしたところ、リボソームの単離が可能になつた。Ilan (1968)やKaulenas (1970)が用

いた緩衝液の組成 (A) と改良した緩衝液の組成 (B) は次のとおりである。

緩衝液 A: 0.035 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.025 M 蔗糖, 0.025 M 塩化カリウム, 0.01 M 塩化マグネシウム, 0.04 M 2-メルカプトエタノール。

緩衝液 B: 0.035 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.025 M 蔗糖, 0.025 M 塩化カリウム, 0.04 M 2-メルカプトエタノール。

デオキシコロール酸 (DOC) は使用直前に緩衝液にとかし、最終的には1%の濃度で使用した。また Triton X-100 は緩衝液 B と A とに溶かし、冷蔵庫に保存し、使用に際しては最終濃度1%のものを用いた。

無細胞タンパク質合成系は福留ら (1968) の方法にしたがって作成した。その組成は Table 1 に示すとおりである。

Table 1. Cell-free incorporation system.

Mg-acetate	10.0 mM
NH ₄ -acetate	90.0 mM
Tris-HCl (pH 7.6)	50.0 mM
Spermine	0.2 mM
2-mercaptoethanol	6.0 mM
GTP	0.3 μM
ATP	1.0 μM
Phosphoenolpyruvate	5.0 μM
Phosphoenolpyruvate kinase	30.0 μg
³ H-phenylalanine (or ¹⁴ C-amino acids)	0.1 μCi
Aminoacyl-tRNA synthetase (crude pH 5 enzyme or 105,000 g supernatant fraction)	1~2 mg
tRNA	A ₂₆₀ =2 units
Poly U	10.0 μg
Ribosome	1.0 mg
Total volume 0.2 ml	

放射能の測定

無細胞タンパク質合成系における合成量を求めるために ¹⁴C-アミノ酸のタンパク質へのとりこみを調べた。この場合タンパク質合成系で反応を行なわせた後、冷トリクロ酢酸 (TCA) を反応液に10倍量加え、0°C に30分間放置し、遠心分離により沈澱を集める。この沈澱を TCA, さらにエタノール・エチルエーテル (1:1 v/v) で順次洗っていく。その後沈澱をガラスファイバーフィルター上に集め、そのフィルターを乾燥して、液シン用バイアルに取り、ジフェニルオキサザール (PPO) トルエン系溶媒を加えて Beckman LS-230/3 型液体シンチレーションスペクトロフォトメーターを用いて放射能を測定した。

リボソームの単離精製法

蛹からリボソームの単離に当つてはまず大腸菌や哺乳動物の場合に用いられている方法にならつて行なつたが、これらの材料で得られるように十分にきれいなリボソームの単離ができなかつたので、次に昆虫を対象にした Kaulenas (1970) の方法に準じて行なつたがそれでも十分に満足のいく結果は得られなかつた。そこでこれに若干の変更を加えたところ、十分に純度の高いリボソームを単離することが出た。その方法の概略を Fig. 1 に示す。すなわち、試料蛹にその重量の3倍量の緩衝液を加え、テフロンガラスホモジナイザーで摩砕し、この摩砕液を4重のガーゼで濾過する。この濾液を 3,000 × g で15分間遠心分離を行ない、核や細胞片を除き、さらにこの上清を 30,000 × g で15分間遠心分離を行ない、ミトコンドリアを含む分画を除いた上清を得る。この上清をミトコンドリアを除いた後の上清、すなわち post-mitochondria (PM) 分画とする。この PM 分画に界面活性剤 (DOC 又は Triton X-100) を最終濃度1%となるように加え、15分間攪拌した後、105,000 × g で150分間遠心分離を行なうとリボソームが沈澱してくる。この沈澱分画に緩衝液を少量加え、十分にリボソームを分散させた懸濁液を 10,000 × g で30分間遠心を行ない、会合物を除いた。このリボソーム液を緩衝液から蔗糖を除いたもので十分に緩衝化した Sephadex G-200 カラムに通した。そして素通りの乳白色を呈する部分を集め、最終的なリボソーム分画とした。

pH 5 酵素 (アミノアシル tRNA 合成酵素) 分画の調製法

大腸菌からアミノアシル tRNA 合成酵素を調製する方法は林・岡本 (1968) の方法に準じて行なつた。大腸菌 10 g を3倍量の洗浄すみの石英粉末と混合して乳鉢で十分に摩りつぶし、これに菌体量の5倍量の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-5 mM 塩化マグネシウム-5 mM 2-メルカプトエタノール (TMM) 緩衝液を加えて抽出を行なつた。抽出液を 7,000 × g で20分間遠心分離を行ない上清を得る。さらにこの上清を 105,000 × g で150分間遠心を行ない、遠心管の上部 2/3 の上清部分を集め、この上清部分を TMM 緩衝液に対し3時間透析し、ついで TMM 緩衝液で十分に緩衝化した DEAE-セルロースカラムに吸着させた。このカラムを TMM 緩衝液で十分に洗つた後、0.25 M 塩化カリウムを含む TMM 緩衝液で溶出した。溶出液を 10 ml ずつ集め、260 nm と 280 nm における吸光度を測定し、280 nm の吸光度が 260 nm

の吸光度よりも高くなる部分を集め、粗酵素液とした。

中腸組織からの pH 5 酵素の調製法は高浪 (1965) の方法を少し改変して行なった。すなわち前に述べたリボソーム単離法に基づき PM 分画を得、これに界面活性剤を加えないで、105,000 × g で 150 分間遠心を行ない、上清の上部 2/3 の部分を集めた。この上清に 1 M 酢酸を加え、pH を 5.0 に調整した。これによつて生じた沈澱を低速遠心分離で集め、この沈澱に氷冷した蒸留水を加え、懸濁し、再び遠心分離を行なつて得られる沈澱に少量の氷冷蒸留水を加え、ホモジナイザーで十分に分散させてから、1 N KOH を加えて pH を 7.5 に調整した。この pH を調整した溶液に 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を最終的に 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) になるように加え、0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)-0.01 M 酢酸マグネシウム-0.09 M 酢酸アンモニウム-0.006 M 2-メルカプトエタノール緩衝液で緩衝化した DEAE-セルロースカラム に吸着させ、0.3 M 塩化カリウムを含む同緩衝液で溶出した。この溶出液の各分画の 260 nm と 280 nm における吸光度を測定し、吸光度が 260 nm よりも 280 nm において高い分画を集め、これを pH 5 酵素 (アミノアシル tRNA 合成酵素) 分画とした。

リボソームの電子顕微鏡観察

精製リボソームを白金パラジウムでシャドーイングし、JEM-3 A 型電子顕微鏡で観察を行なった。

蔗糖密度勾配遠心分析

精製リボソームの蔗糖密度勾配遠心分離は Kaulenas and Fairbairn (1966) の方法に基づき、10~40 % の濃度勾配で Spinco SW 50 ローターを使用し、50,000 rpm, 60 分間遠心分離を行なった。

結 果

1. リボソームの単離と精製

リボソームの単離には緩衝液 A と B との 2 つのものを、Fig. 1 に示す操作で単離を行なった。分離結果を Table 2 に示す。リボソームは多量の RNA を含むので 260 nm に吸収極大、235 nm に吸収極小をもつが、リボソームの構成タンパク質以外のタンパク質の混入があるときは、極小値が長波長側にずれるので、極大値対極小値の比率が小さくなる。このことから 260 nm の吸光度に対する 235 nm の吸光度の比 (吸収比) と、リボソーム含有 RNA の比率 (%), および蛹の単位体重単りの 260 nm における吸光度 (O. D._{260nm}) などによつて、抽出単離されたリボソームの純度を表わした。Table 2 に示すように、緩衝液 A でリボソームを単離した場合ホモジネート (H) に DOC を加えたものよりも、PM 分画に DOC を加えた方が RNA 含有量 (1 %), O. D._{260nm} 値ともに優れていた。しかしリボソーム単離におよぼす DOC と Triton X-100 との界面活性剤の影響

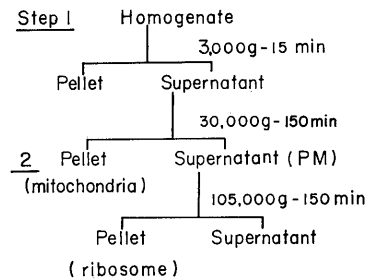


Fig. 1. Outline of the method of ribosome from the pupae.

Table 2. Effects of various isolation media on the yield and purity of ribosomes from the pupae and the midgut.

			A ₂₆₀ : A ₂₃₅	RNA (%)	Yield OD ₂₆₀	Units/g
Buffer A	H	DOC	0.76	3.5	25.1	
Buffer A	PM	DOC	0.71	6.1	80.1	
Buffer A	H	Triton X-100	0.78	8.9	26.0	
Buffer A	PM	Triton X-100	0.72	9.7	23.2	
Buffer A		Bentonite	0.46	5.2	4.2	
Buffer B	H	Triton X-100	1.12	8.9	11.2	
Buffer B	PM	Triton X-100	1.12	12.0	62.1	

Buffer A: 0.035 M Tris-HCl (pH 7.6), 0.25 M Sucrose, 0.01 M MgCl₂, 0.025 M KCl, 0.004 M Mercaptoethanol.

Buffer B: 0.035 M Tris-HCl (pH 7.6) 0.25 M Sucrose, 0.25 M KCl, 0.004 M Mercaptoethanol.

H: Homogenate. PM: Post mitochondrial supernatant.

を比較すると、RNA含有率(%)についてはTriton X-100による方がDOCによる場合よりも多く、また吸収比ではほとんど差がなかった。緩衝液Bを用いPM分画にTriton X-100を加えてリボソームを単離した場合には、他のいずれの方法によるものよりも吸収比、RNA含有量(%), O. D._{260nm}値ともに高く、吸収比、RNA含有量(%), O. D._{260nm}値を総合すると、緩衝液Bを用い、PM分画にTriton X-100を加えてリボソームを単離する方法が最も優れていることがわかった。蛹全体からリボソームを単離した場合、その発育時期の違い、雌雄による違い、蛹を-20°Cに保存する期間の長短などにより、同じ単離法を用いてもリボソームの純度に影響がみられた。特に卵巣が発育した時期の雌ではKaulenas(1970)が*Acheta domesticus*(コオロギ)の場合に指摘しているように、リボソームの単離は非常に困難であった。しかしながら単一組織として中腸組織を用いた時には、他の条件により余り影響を受けずに、再現性よくリボソームを単離することができた。

次に単離したリボソームの紫外線吸収スペクトルをFig. 2に示す。蛹体から緩衝液Aを用いPM分画にDOCを加えて単離したリボソームでは極小値が極端に長波長(250nm)側にずれ、しかも極大値がはつきりしないカーブを示した。一方DOCの代わりにTriton X-100を用いた場合、極小値は245nmと長波長側にずれているが、前者ほどでなく、また極大値が260nmにみられた。またRNaseの作用をお

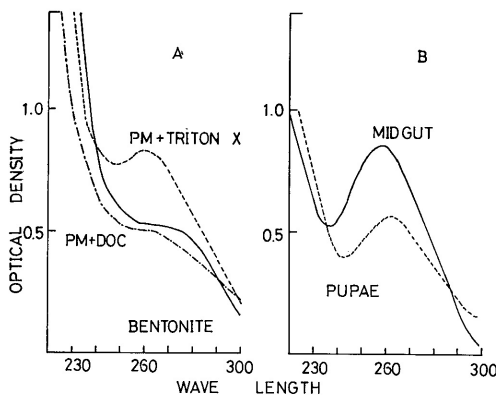


Fig. 2. Absorption spectra of ribosomes isolated from the whole body pupae and from the midgut of the 3-day-old fifth instar larvae. A: Ribosomes were isolated from the pupae with buffer A, B: Ribosomes were isolated from the pupae and the midgut with buffer B (PM+Triton X-100).

さえるためにベントナイトを用いた場合、DOCの場合とほとんど同じカーブを示し、良好な結果は得られなかった。

他方蛹体から緩衝液Bを用い、Triton X-100をPM分画に加え、リボソームを単離した場合、Fig. 2Bに示すように、いく分極小値が長波長側(240nm)にずれてはいるが、極大値に対する極小値の比は高くなっていた。しかしながら中腸組織から同じ方法で単離したリボソーム分画は、リボソームに特有な235nmに吸収極小、260nmを吸収極大をもつパターンと同じパターンを示した。このリボソームは260nmと235nmの吸収比が約1.9であり、RNA含量が55%となりネズミ肝臓リボソーム標品におけるRNA含量50%、吸収比1.6のものと比較してもかなり純度の高いものである。このようにして得られた高純度のリボソームについて蔗糖密度勾配遠心を行なった結果、Fig. 3に示すように、第22分画附近にピークが

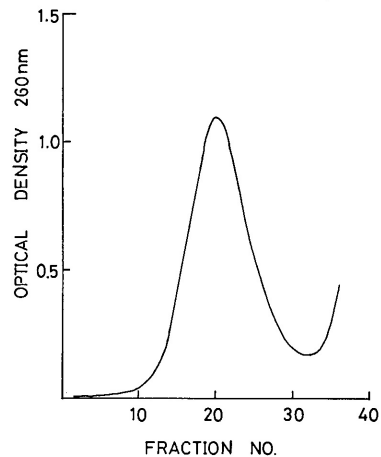


Fig. 3. Sucrose density gradient centrifugation analysis of ribosomes from the midgut of *Bombyx mori*.

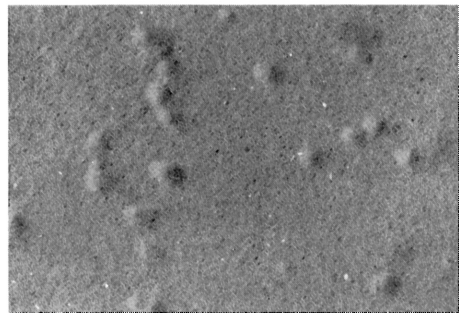


Fig. 4. Electron micrograph of ribosomes isolated from the midgut of *Bombyx mori*.

みられ、さらにこのリボソームを電子顕微鏡で観察したところ、Fig. 4 に示すように、ほとんど均一な直径 200 Å の顆粒であった。

以上を総括して、蛹と中腸とからリボソームを単離する方法としては、緩衝液 B を用い Triton X-100 を PM 分画に加えて抽出する方法が最も優れていることになる。

2. リボソームと pH 5 酵素によるタンパク質合成の調節機構

中腸組織からかなり純度の高いリボソームを単離することができたので、このリボソームと大腸菌のアミノアシル tRNA 合成酵素分画とを用いて、無細胞タンパク質合成系をつくり、¹⁴C-アミノ酸のとりこみを調べた。Table 3 に示すように、単離リボソームを用いた完全なタンパク質合成では、他の種々の要素を除いた区に比して、¹⁴C-アミノ酸のとりこみが最も高かった。また対照区におけるバックグラウンドのとりこみは極めて低いので、完全区においては高効率にタンパク質が合成されることを示している。発育に伴う中腸組織の機能的変化に並行して、タンパク質合成も変化する。タンパク質合成は翻訳レベルにおける種々の要因によって影響をうけている。そこでこの合成系から種々の要素を除き、アミノ酸のとりこみをみたところ、

Table 3. Effects of factors on protein synthesis with crude aminoacyl-tRNA synthetase of *E. coli* and ribosomes from the midgut of *Bombyx mori*.

Reaction mixture	Incorporation (cpm/mg RNA)
Complete	26, 678
Without ribosome	17, 582
Without aminoacyl-tRNA synthetase	20, 242
Without poly U	20, 739
Without ATP regeneration system	19, 444
Control	449

ろ、アミノ酸のとりこみはリボソームを除いた場合に最も低下した。

さらに詳細に翻訳レベルでの調節について調べた。すなわち pH 5 酵素とリボソームに注目し、5 令 3 日目の最も盛んに食桑を行なっている幼虫（盛食期）と食桑しなくなり、中腸組織が崩壊の様相を示しつつある 7 日目（前蛹期）の中腸組織からリボソームと pH 5 酵素を調製し、ついで 3 日目のリボソームと pH 5 酵素とから無細胞タンパク質合成系、3 日目のリボソームと 7 日目の pH 5 酵素とからなる無細胞タンパク質合成系、7 日目のリボソームと pH 5 酵素、さらに 7 日目のリボソームと 3 日目の pH 5 酵素の組み合わせという 4 通りの合成系をつくった。Table 4 に示すように、リボソームと pH 5 酵素とをともに 7 日目のもの同志で組み合わせた系のアミノ酸のとりこみは、両者を 3 日目からとつたもの同志の組み合わせのものよりも高かった。すなわち 7 日目の中腸組織におけるタンパク質合成能は 3 日目のものよりも高い、また 3 日目のリボソームに対して同じ 3 日目の pH 5 酵素と組み合わせてつくったタンパク質合成系の場合よりも、7 日目の pH 5 酵素とを組み合わせたときの方がアミノ酸のとりこみが高かった。また 7 日目のリボソームに対して 3 日目の pH 5 酵素を組み合わせた場合よりも、7 日目の pH 5 酵素とを組み合わせた方がアミノ酸のとりこみが高かった。すなわち、pH 5 酵素についていえば、3 日目のものよりも 7 日目のものの方が効率よくアミノ酸をとりこむし、さらに 3 日目の pH 5 酵素を 3 日目のリボソームと組み合わせて作つたタンパク質合成系の場合よりも、7 日目のリボソームと組み合わせた方がアミノ酸のとりこみが高かった。また 7 日目の pH 5 酵素を 3 日目のリボソームと組み合わせた場合よりも、7 日目のリボソームと組み合わせた方がアミノ酸のとりこみが高かった。すなわち、リボソームに関しては 3 日目のものよりも 7 日目のものの方がアミノ酸とりこみ

Table 4. Comparison between homologous and heterologous cell-free incorporation system as stimulating factor in protein synthesis.

Ribosome	pH 5 fraction		
	3 day old (fully grown stage of fifth instar)	7 day old (prepupa)	<i>E. coli</i> (105, 000 g sup.)
3-day-old (fully grown stage of fifth instar)	902 cpm	1604 cpm	1791 cpm
7-day-old (prepupal stage)	1036	1706	2632

の効率は高い。以上の結果から、タンパク質合成能はリボソームおよび pH 5 酵素 (アミノアシル tRNA 合成酵素) によつて調節をうけており、両者ともに 7 日目の前蛹期のものの方が盛食期のものよりもタンパク質合成能を高める効果が顕著であることが明瞭である。

考 察

リボソームについては大腸菌やネズミ肝臓などで詳細に研究が行なわれている。バクテリアや哺乳類を材料としてリボソームの単離に用いられている方法をカイコの蛹に応用して、リボソームの単離を試みたところ、良好な結果は得られなかつた。リボソームの単離は既に数種の昆虫において試みられている (Fox *et al.*, 1965; Ilan, 1968; Kaulenas, 1970; Ahmed *et al.*, 1970) で、これらの方法を用いて、カイコの蛹からリボソームの単離を行なつても、RNA 含量、収量共に低く、かつ実験的再現性が低く、さらに紫外線吸収スペクトルも大腸菌から得たリボソーム標品に比して満足いく結果を得ることができなかつた。ただ Kaulenas (1970) の 0.25 M 蔗糖, 0.025 M 塩化カリウム, 0.01 M 塩化マグネシウム, 0.04 M 2-メルカプトエタノール, 0.035 M Tris-HCl (pH 7.8) 緩衝液を用いた場合には、他のいずれのものよりも良い結果が得られた。そこで Kaulenas のこの緩衝液を基にして、更に詳細な検討を加えた。すなわち、緩衝液中の Mg イオン、塩化カリウム濃度、ベントナイト、界面活性剤や摩砕時の組織重と緩衝液量との比などを検討した結果、Mg イオンを除いて、塩化カリウムを 0.25 M に、組織重: 緩衝液量を 1:3(W/V) にし、さらに PM 分画に Triton X-100 を最終濃度 1% に加えるように変えた方法で行なうと、最も純度の高いリボソームが得られることを確認した。またこのリボソームは Sephadex G-200 カラムを通すことにより、さらに純度を高めることができる。この方法によつて得られたリボソームでは紫外線吸収スペクトル (Fig. 2, B) は典型的なリボソームのカーブを示し、260 nm の吸収極大、235 nm に吸収極小があり、その比が 1.9 で、RNA 含量は 55% である。蔗糖密度勾配遠心分析で単一のピークを示し、Kaulenas (1970) により示されたコオロギのリボソーム (80 S) と同じ位置にあることから 80 S のモノマーである。このことはさらに電子顕微鏡観察からほぼ 200 Å の直径をもつ均一な顆粒からなること、その上リボソームの主要な性質の 1 つであるタンパク質合成能を保持

していることもわかつた。特に他の材料を用いた場合、Mg イオンはリボソームの構造の安定化に必要であり、それ故に抽出緩衝液には欠くことができないものとされ、また林 (1965) はカイコを用いた場合 Mg イオンがリボソームに強く結合している可能性を指摘している。さらに前に述べたように RNA 抽出の際に Mg²⁺ を欠いた緩衝液を用いて良い結果が得られたことは、リボソームの安定化に Mg²⁺ が必要であるにもかかわらず、カイコの場合は細胞内に Mg²⁺ がすでに十分に (0.084 mg/中腸) 存在しているために、緩衝液に Mg イオンを加えない方が良好な結果をもたらしたと思われる。

Table 3 に示すように、中腸組織から単離精製したリボソームは大腸菌アミノアシル tRNA 合成酵素を用いた無細胞タンパク質合成系で顕著なタンパク質合成を行なつた。またこの合成系からアミノアシル tRNA 合成酵素, Poly U, ATP 再生系を除いた場合のアミノ酸のとりこみはリボソームを除いたものよりも高かつた。このことは単離精製したリボソームはかなり高純度であつたにもかかわらず、リボソームに mRNA (もともと細胞内でリボソームについていたもの) の断片や他の成分を含んでいる可能性を示す。したがつてピュロマイシン処理や run-off (タンパク質合成系からラベルされたアミノ酸を除いた系でプレインキュベーションを行ない、リボソームについている mRNA を除く) によりリボソームについている mRNA を除くことなど検討すべき点が残っている。真のリボソームを用いてタンパク質合成系をつくることが必要となる。

タンパク質合成は転写ならびに翻訳レベルで種々の因子により調節をうけている。特に後者については mRNA の高次構造, tRNA 量, tRNA の分子種, mRNA のマスクング, リボソームによる homologous な mRNA と heterologous な mRNA の識別など種々の段階で調節が行なわれていることが知られている。そこで著者はリボソームと pH 5 酵素 (アミノアシル tRNA 合成酵素) に注目し、発育期の異なる中腸組織から調節したこれらの要素におけるタンパク質合成能について調べた。Table 4 に示すように、pH 5 酵素を一定にして、リボソームを 3 日目と 7 日目の 2 つを用い、タンパク質合成能をみると、3 日目のリボソームのタンパク質合成能に比して 7 日目のものの方が高かつた。このようなタンパク質合成能の違いをもたらす要因として、リボソームに内在している mRNA の量の差が考えられるが、Table 4 に

において、3日目と7日目との値がほぼ同じであることは、生体内でのリボソームについて mRNA は3日目でも7日目でも同じ量であると思われる。それ故にこの違いをもたらす原因としては、次の可能性が考えられる。すなわちタンパク質性の因子（開始因子）がリボソームに結合することによつて、引きおこされるリボソームの mRNA の翻訳能の変化ということである。この可能性についてはインターフェロンが細胞のリボソームについて、ウイルス RNA の翻訳を不可能にすること、およびこのようなリボソームの機能変化は宿主細胞の RNA 合成に依存する（塩川, 1970, Salb and Marcus, 1965）ということから十分に考えられる。

つぎにリボソームを一定にして、pH 5 酵素を3日目のものと7日目のものと変えて、各々のタンパク質合成能をみると、7日目の pH 5 酵素を用いた方が3日目のものを用いた場合よりもタンパク質合成能が高かった。すなわち pH 5 酵素中に存在するそれぞれのアミノ酸に対応するアミノアシル tRNA 合成酵素の質的なちがい（分子種の相違）か、量的なちがいを生じたことによつてタンパク質合成が調節をうけていると思われる。このことは Ilan (1968), Fristrom (1970), Grigliatti *et al.* (1973) によつて示されているように、組織分化が tRNA の分子種のちがいにより調節をうけているという事実と符合し、非常に興味あることである。

さらに3日目と7日目との中腸組織から調製したリボソームや pH 5 酵素のタンパク質合成能における差異は、中腸組織を構成する細胞の種類の違い、すなわち中腸組織の機能の違いを反映していることが考えられる。事実3日目の中腸組織では旺盛な分泌や吸収の機能をもつ円筒細胞や盞状細胞からなっているのに対し、7日目にはこれらの細胞の機能は低下し、細胞的にも退化消失の方向に向かつており、また未分化で分裂増殖を行なっている新生細胞が大部分を占め、新しい皮膚組織を形成しつつある（辻田, 1943; 赤井, 1970; Waku and Sumimoto, 1970）。このようにリボソームや pH 5 酵素が細胞の種類の違いによつてタンパク質合成能を異にしていることは、とりもなおさずそれぞれの細胞においてリボソームや pH 5 酵素の機能を調節する作用、換言すれば、遺伝子発現における翻訳レベルでの調節が行なわれていることを示唆している。総括的に言えば、本来の消化吸收機能が低下する7日目において、中腸組織におけるタンパク質合成がえつて高いということは、この時期に新し

い機能的変化を生じつつあることを意味していると思われる。

摘 要

Mg イオンを除き、塩化カリウム濃度を高くする改良を施した緩衝液 (B) を用いて蛹を摩砕し、ミトコンドリアを除いた上清分画に Triton X-100 を加えることにより、蛹から純度の高いリボソームを単離することができた。この方法を用いて中腸から単離したリボソームは 260 nm/235 nm の吸収比が約 1.9 であり、約 55% の RNA を含む。このリボソームは 80 S の大きさで、直径 200 Å の粒子である。このリボソームを大腸菌から調製した無細胞タンパク質合成系に加え、タンパク質合成能を調べたところ、アミノ酸をとりこむ能力をもっていることが判明した。

盛食期 (3日目幼虫) と熟蚕期 (7日目幼虫) との中腸組織からリボソームと pH 5 酵素を調製し無細胞タンパク質合成系をつくり、両時期のタンパク質合成を調べたところ、盛食期よりも熟蚕期の方が高かった。さらにリボソームと pH 5 酵素とを相互に交絡する方法、例えば盛食期のリボソームと盛食期の pH 5 酵素との組み合わせ、盛食期のリボソームと熟蚕期の pH 5 酵素との組み合わせなどの合成系をつくり、タンパク質合成実験を行なつた結果、熟蚕のリボソームを用いた系は盛食期のものよりもタンパク質合成能が高く、また pH 5 酵素の場合も同様であつた。タンパク質合成能はリボソームおよび pH 5 酵素による調節をうけており、リボソームと pH 5 酵素とはともに幼虫期に比べ熟蚕期の方がタンパク質合成能を高める効果が大きであつたことから、熟蚕期のリボソームと pH 5 酵素は幼虫期とは異なる質的变化をしている可能性が考えられる。

文 献

- Ahmed, I. G., W. Kilgor and R. R. Painter
1970 Isolation and identification of egg ribosomes of the house-fly, *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.*, 16: 1245-1248
- 赤井 弘 1970 家蚕の消化管の電子顕微鏡的研究
1. 中腸皮膚組織の微細構造 蚕試報, 24: 303-344
- Fox, A. S., J. Kan, S. H. Kang and B. Wallis
1965 Protein synthesis in cell-free preparations from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 240: 2059-2065
- Fristrom, J. W. 1970 The developmental biology of *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.*, 4: 325-346

- 福留秀男・香川晴男・池村淑道 1968 リボソーム。核酸蛋白質研究法 I, 日本生物物理学会編集, 吉岡書店, 513-557 頁
- Grigliatti, T. A., B. N. White, G. M. Tener, T. C. Kaufman, J. J. Holden and D. T. Suzuki 1973 Studies on the transfer RNA genes of *Drosophila*. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **38**: 461-474
- 林 博司・岡本利雄 1968 タンパク合成系—転移 RNA の活性—。核酸蛋白質研究法 I., 日本生物物理学会編集, 吉岡書店, 京都, 237-252 頁
- 林 幸正 1965 カイコのリボソームについて。生物物理, **5**: 289-299
- Kaulenas, M. S. 1970 Factors affecting ribosomes isolation from adult crickets *Acketa domestica*. *J. Insect Physiol.*, **16**: 813-824
- Kaulenas, M. S. and D. Fairbairn 1966 Ribonuclease-stable polysomes in the egg of *Ascaris lumbricoides*. *Develop. Biol.*, **14**: 481-494
- Ilan, J. 1968 Amino acid incorporation and aminoacyl-transfer in an insect pupal system. *J. Biol. Chem.*, **243**: 5859-5866
- Salb J. M. and P. I. Marcus 1965 Molecular basis of interferon action: Inhibition of viral RNA translation. *Virology*, **30**: 502-516
- 塩川光一郎 1970 インターフェロン作用の細胞生物学的基礎。蛋白質核酸酵素, **15**: 1452-1462
- 高浪 満 1966 リボソームおよび sRNA の調製法。蛋白質核酸酵素, **11**: 490-500
- 辻田光雄 1943 家蚕腸皮膜の組織学的並びに細胞学的研究 蚕試報, **11**: 211-293
- Waku, Y. and K. Sumimoto 1970 Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm, *Bombyx mori*, with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm I. Lightmicroscopy. *Tissue and Cell*, **3**: 127-136

Summary

Isolation and characterization of ribosome from the midgut of *Bombyx mori*, and their capacity for *in vivo* protein synthesis at different stages of development were studied.

Conventional procedures for ribosome isolation were ineffective when applied to *Bombyx mori*. The preparation of ribosomes from this material depended upon the elimination of Mg ion from the homogenizing medium, the presence of a moderately high KCl concentration in the homogenizing medium, and the addition of Triton X-100 rather than deoxycholate to post-mitochondrial fraction.

The ribosomes prepared in this manner had a RNA content of 55 per cent, $A_{260} : A_{235}$ ratio of 1.9, with absorption maxima and minima at 260 and 235 nm, respectively, and were given 80S by sucrose density gradient centrifugation analysis. The ribosome had a particle of diameter of 200 Å by electron microscopic observation. The ribosomes prepared in this manner had a capacity for *in vitro* protein synthesis. Addition of this ribosome to *E. coli* cell-free system stimulated amino acid incorporation into protein. By the use of *in vitro* protein synthesizing system with ribosomal and supernatant fractions from different stages of the development (glutinous and maturation stages), their capacity for *in vitro* protein synthesis was studied at different stages of the development. The level of amino acid incorporation exhibited higher by ribosomal and supernatant fractions from maturation stage than that from glutinous stage. Endogenous capacity for protein synthesis of ribosomal fraction from maturation stage exhibited higher than that from glutinous stage, and also it is true of endogenous capacity for protein synthesis of supernatant fraction from maturation stage. The activity of protein synthesis is higher at the stage of maturation than at the stage of feeding.

Results obtained by the use of *in vitro* protein synthesizing system suggest that the nature of ribosomal and supernatant fraction from the stage of maturation is different from that of the glutinous stage and control of protein synthesis takes place at each of the levels of ribosome and supernatant.