

Title	無細胞系における卵白アルブミン合成について
Author(s)	中山, 建男
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30707
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	中 山 建 男
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 2 7 3 4 号
学位授与の日付	昭 和 4 8 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	無細胞系における卵白アルブミン合成について
論文審査委員	(主査) 教 授 成 田 耕 造
	(副査) 教 授 倉 橋 潔 教 授 鈴 木 友 二

論 文 内 容 の 要 旨

ニワトリの輸卵管のホモジェネートの12,000×g沈澱分画をDOC処理し、その上清の非連続的シヨ糖密度勾配の超遠心によってポリソームが得られた。このように調整したポリソームが卵白アルブミンのメッセンジャー活性を持つことは、次の実験によって確かめられた。すなわちポリソームと cell sap よりなる無細胞系 (system C) に、³H-ロイシンを加えて合成した放射活性 soluble ovalbumin のCM-cellulose カラムによるクロマトグラフィーの溶出パターンが標準の蛋白質と同一であることが示された。しかもこのことは卵白アルブミン分子に含まれている2モルのリン酸基もこの系で取り込まれることを示唆する。

system C では免疫学的に得た soluble ovalbumin 量は nascent ovalbumin の約 $\frac{1}{6}$ であった。この系で得られた nascent ovalbumin は minces で合成された標準卵白アルブミンとほぼ同一物質であることは、それぞれのトリプシンペプチドのDowex 1 カラムの溶出パターンを比較して確かめた。

以上のことから、この系ではポリソームに含まれている卵白アルブミンのメッセンジャーは、C-末端アミノ酸まで読み取られるが、合成された分子の多くはリボソームに結合した状態の nascent ovalbumin として存在することが示唆された。これは pH 5 処理によって cell sap に含まれている releasing factors が欠如したためと考えられる。

しかもこの無細胞系では卵白アルブミン合成の開始は認められない。これはこの系には蛋白合成の開始反応に必要なリボソーム亜粒子が含まれないためと思われる。

輸卵管のホモジェネートの12,000×g沈澱分画をDOC処理し、その上清から直接、超遠心して得られるペレットは大小のリボソーム亜粒子を含み、これを仮に ribosomal fraction と名付けた。

このように調整した ribosomal fraction と cell sap からなる無細胞系 (system A) で合成された total nascent peptides のプロナーゼ消化物から、卵白アルブミンのN-末端ペプチドである Ac·Gly

あるいは Ac·Gly·Ser には、添加した放射性的酢酸とグリシンが取り込まれていた。しかし、total hot TCA insoluble proteins と、精製した soluble ovalbumin から得られる Ac·Gly あるいは Ac·Gly·Ser には両者の放射活性は取り込まれなかった。

このことは system A では卵白アルブミン合成の開始反応は起っているけれども、N-末端から合成された分子はリボソームに結合した状態の nascent peptides として存在し、ペプチド鎖は余り伸長しなかったことを示している。同時にこのことは卵白アルブミンの N-末端アセチル基は蛋白合成が完了した後で取り込まれるのではなく、蛋白合成の初期段階に取り込まれることを示す。このことは N-末端アセチル基は蛋白合成の開始機構に関与していることを示唆している。

³H-プロリンを加えた system C で合成される nascent ovalbumin と system A で合成される soluble ovalbumin の C-末端にはそれぞれ放射性プロリンが検出されたが、system A で得られる nascent ovalbumin の C-末端には放射性プロリンはほとんど取り込まれなかった。

以上の結果は、system A では C-末端まで合成が完了した分子のほとんどは releasing factors の働きでリボソームから遊離されることを示す。しかし、system C では pH 5 処理によってこの factors が欠如しているため C-末端まで合成された分子はリボソームから遊離することができずに結合した状態の nascent ovalbumin として存在することを物語っている。

卵白アルブミンに含まれる N-acetylglucosamine と mannose はいずれも nascent ovalbumin には取り込まれず、soluble ovalbumin に取り込まれることが in vivo 及び in vitro の系で示された。

このことから、これらの糖は卵白アルブミンのペプチド鎖の合成が完了した後で分子中に取り込まれるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

微生物のような無核細胞におけるタンパク合成の機構は可成り解明され、合成反応に関与する酵素や必須因子の精製とその性状も明らかにされてきた。しかし高等生物の有核細胞細胞質におけるタンパク合成の機構は無核細胞系に比して解明が遅れている。特にタンパク合成の開始機構に関しては統一的な知見はえられていない。網状赤血球内でのヘモグロビン合成の開始には Met-tRNA が関与することが報告されているが、すべてのタンパク合成がこの機構で進行するか否か明らかでない。

一方、成田は高等生物の細胞質で合成されるタンパク質の中には、末端アミノ基がアセチル化されているものが多いことに着目し、細胞質におけるタンパク合成の開始にはアセチルアミノアシル-tRNA が関与するという仮説を提出し、ニワトリ輸卵管を用いる卵白アルブミン(Ac-Gly-Ser-Gly-Ile-Ala-……Val-Ser-Pro-OH の構造をもつ 1 本のポリペプチド鎖からなる)合成では、Ac-Gly-tRNA がその開始に関与することを示した。

中山建男君はニワトリ輸卵管からの無細胞卵的アルブミン合成系を調製し、果して Ac-Gly-tRNA が卵白アルブミン合成の開始に関与するか否か、もし関与しないとすれば、末端アミノ基のアセチル化は如何なる段階でおこなうか明らかにする目的で本研究を行なった。さらに卵白アルブミン中に結合

している3個のアセケルグリコサミン、5個のマンノースおよび2個のリン酸基が結合する段階も明らかにしようとした。

輸卵管ホモジネートから卵白アルブミンの mRNA 活性をもつ画分としてリボゾーム画分（ポリゾーム、モノゾーム、サブユニットを含む）およびポリゾーム（リボゾーム画分から調整）を調製し、一方必要な酵素や tRNA 画分として cell sap および pH5 画分（cell sap から調製）を調製し、これらの組合わせで3種の無細胞系を作り、放射性物質を添加して卵白アルブミン合成を研究した。いずれの場合にも無細胞系で合成された可溶性アルブミン（クロマトグラフィーで精製）とリボゾームに結合した卵白アルブミン（DNase、EDTA 処理後抗卵白アルブミン抗体で精製）の N および C 末端基の分析を行ない、次の如き結果をえた。いずれの場合でも合成された卵白アルブミンは、無細胞系調製前に輸卵管で既に合成が開始されていた不完全な卵白アルブミンのポリペプチド鎖が *in vitro* で完了したに過ぎないこと、pH 5 画分を用いた場合には、合成が完了した卵白アルブミンはリボゾームに結合したままで、可溶性な形に移行しないが、cell sap を用いれば可溶性形に移行することから cell sap 中に遊離因子が存在することを明らかにした。また放射性酢酸、放射性プロリンを加えた実験では、プロリンは C 末端基にとり込まれるが酢酸は N 末端にとり込まれないことから、末端アセケル化は卵白アルブミン合成の完了後におこるのではなく、合成開始期あるいは開始直後におこる可能性を示した。一方リボゾームに結合している種々な長さのペプチド混合物の N 末端基をしらべたところ、僅かではあるが加えた放射性酢酸が Ac-Gly-結合の形でとり込まれていることを示し、卵白アルブミン合成は Ac-Gly-tRNA 関与のもとに開始されることを暗示する結果をえた。さらに卵白アルブミン中の補欠分子団は卵白アルブミン合成が完了し、可溶性形になった後にアセケルグリコサミン、ついでマンノースが結合し、さらにリン酸が付加することを暗示する結果をえた。

以上の中山君の研究は高等生物におけるタンパク合成の機構に新知見を加えたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと判定した。