

## 野村 隆臣・八森 章

目的別テーマ：バイオファイバー生合成機構の解明

17 年度研究テーマ

15-2-17：蚕タンパク質合成系の生化学的解析とその応用

### ABSTRACT

*Silkworm (Bombyx mori) has an efficient translation system because silkworm can synthesize numerous silk proteins (fibroin) in a short period of time. By analyses of its "Ribosome" that plays a central role of protein biosynthesis in the cell, two unique base exchanges (U1094C and A1098G; E. coli numbering) were detected in the GTPase domain (1070 region), which is universal conserved ribosomal RNA (rRNA) domain related with translational factors dependent GTP hydrolysis linked translational speed and accuracy. We tried to detect and purify the specific binding components for 1070 region of silkworm from the cell extract. The detection was performed by Gel retardation assays using <sup>32</sup>P-labeled RNA fragment containing 1070 region. Resultly, it was demonstrated that there were the cohesive components in the S200 fraction of the proterior silk gland. Fractionated by anion-exchange column chromatography with DEAE cellulose and DEAE-5PW, it was inferred that the components were about 50 kDa of protein. Interstingly, the specific binding protein was phosphorylated, and this might suggest that the protein was related to translational control through the binding to 1070 region.*

### 研究目的

蚕は短期間に大量の絹タンパク質（フィブロイン）を合成することから、極めて効率的な生体内タンパク質合成系を保有すると考えられる。この特徴は、生体内タンパク質合成反応（翻訳）の中核を担う“リボソーム”の性質に強く依存すると推測され、その中でも翻訳の速度に直結する GTP 加水分解反応に深く関与する部位（28S rRNA 中の GTPase ドメイン：1070 領域；大腸菌の塩基番号に従う）が注目すべき領域であると考えられる。1070 領域は全生物を通じて高度に保存されているが、蚕において二つの特異的な変異（U1094C と A1098G）が検出されている。この塩基置換が蚕の効率的なタンパク質合成能を導く要因の一つであると考え、その生物学のおよび機能的意味を探ることを目的とする。本研究の最終目標は、蚕リボソームの生化学的緒性質を明確にすることにより、得られた知見を考慮して効率性の高い新規無細胞タンパク質合成系を確立することである。

### 一年間の研究内容と成果

蚕において検出された特異的塩基置換の意味を探るため、蚕の 1070 領域に特異的に結合する因子の探索を行った。5 齢 5 日目の家蚕から摘出した後部絹糸腺の細胞抽出液を材料とし、蚕の 1070 領域を含む <sup>32</sup>P 標識 RNA 断片に対する結合性をゲルシフトアッセイにて分析することにより検出を試みた。蚕特異的であることをスクリーニングの条件とするため、ラットの 1070 領域を比較対象とした。その結果、細胞抽出液の 200,000 × g 上清（S200 画分）に蚕特異的に結合する成分が確認された。さらに S200 画分を DEAE カラムクロマトグラフィーにて分画し、0.2 M KCl にて溶出された画分に結合成分が存在することが確認された。この成分を SDS-PAGE にて分析したところ、数十種のタンパク質成分が存在し、結合性タンパク質を同定するのは困難であった。そこで DEAE-5PW を用いた HPLC により再分画を行ったところ、分子量約 50 kDa のタンパク質が結合性タンパク質であると推測された。結合様式は現在のところ不明であるが、蚕の特異的塩基配列もしくはそれに起因する RNA 高次構造を認識していると考えられる。また、このタンパク質はリン酸化修飾が施されていることが明らかとなり、1070 領域への結合を介して翻訳の制御に関連している可能性が示唆された。

### 展望

今回検出された 50 kDa の蚕 1070 領域結合性タンパク質の同定を行い、蚕型配列との機能的関連性を明確化する予定である。解析結果をふまえ、蚕が保有する効率的タンパク質合成能のからくりを分子レベルで解き明かした暁には、高効率性タンパク質合成系の構築が可能であると思われる。