

フィブロイン産生量の異なる蚕のtRNAとtRNA遺伝子のクローニング

誌名	蠶絲試験場報告 = Bulletin of the Imperial Sericultural Experiment Station
ISSN	03712931
著者	松崎, 慶子
巻/号	30巻5号
掲載ページ	p. 739-752
発行年月	1988年9月

フィブロイン産生量の異なる蚕の tRNA と tRNA 遺伝子のクローニング

松 崎 慶 子

緒 言

一般的に蛋白質の合成量は RNA の生成量に比例することは広く知られている。また蛋白合成において重要な役割を演じている tRNA や rRNA の研究が原核細胞や真核細胞において精力的に進められてきた。特に著者らはフィブロイン合成との関連における正常蚕の後部絹糸腺の特異性について tRNA のアミノ酸の受容活性、各種クロマトグラフィの溶出パターンと比較、化学構造等の諸性質について明らかにしてきた (Matsuzaki, 1966, 1970; Miura & Matsuzaki, 1964, 松崎, 1970; Garel ら, 1970)。これら一連の研究をさらに進めるため、本研究ではフィブロイン合成能の極めて低い突然変異蚕の後部絹糸腺の tRNA と正常にフィブロインを産生するがその量を異にする三眠性蚕品種、多糸量系蚕品種の蚕の後部絹糸腺の tRNA について電気泳動像及び tRNA 量を比較し、フィブロイン産生量と後部絹糸腺の tRNA 量との関係を明らかにした。さらに、突然変異蚕 (Nd 及び Nd-s) の後部絹糸腺の tRNA の合成が遺伝子のレベルでどのように制御されているか究明するための手始めとして長鎖の tRNA 遺伝子のクローニングを行った。

本文に入るに先立ち遺伝子組換え技術を指導された米国オレゴン大学 Karen U. Sprague 博士に感謝します。また *in vitro packaging* に使用する菌株を提供された東京大学医科学研究所池田日出夫博士並びにサブクローニングに使用する菌株を提供された予防衛生研究所前川秀彰博士に謝意を表するとともに、実験に協力された宮崎せい子氏に感謝する。

1 後部絹糸腺 tRNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動像

正常蚕は後部絹糸腺でフィブロインを分泌し中部絹糸腺でセリシンを分泌するが、Nd と Nd-s 突然変異蚕では、後部絹糸腺におけるフィブロインの分泌量は極めて少なく中部絹糸腺ではセリシンのみを分泌する (堀内・筑紫, 1969)。既に報告したように、正常蚕の後部絹糸腺の tRNA のアミノ酸受容活性はフィブロインのアミノ酸組成を反映したアミノ酸のとりこみを示したが、突然変異蚕 (Nd, Nd-s) の場合はそのような傾向は示さなかった (Matsuzaki & Funabashi, 1981, Mastuzaki, 1983)。また 5 齢の正常蚕の後部絹糸腺の tRNA には後部絹糸腺に特異的な tRNA と各組織に共通的な tRNA の存在が認められて

いる (Matsuzaki, 1970, Matsuzaki & Funabashi, 1981, Sprague ら1979, 1980)。そこで、フィブロイン産生量のことなる正常系統3品種とくにフィブロイン産生量の少量である三眠蚕と多量である大鷲 (多糸量系) について後部絹糸腺 tRNA を電気泳動によりその性状を調べ、Nd 及び Nd-s との比較を試みた。本研究は後部絹糸腺 tRNA の二次元電気泳動による Garel ら (1977) の結果を比較しながらなされた。

材料及び方法

蚕の tRNA の調製

後部絹糸腺の tRNA は既述 (Matsuzaki, 1970) のように調製した。後部絹糸腺は突然変異系統の Nd 蚕と正常系統の N134号×C135号, 日150号×中150号 (いずれも四眠蚕), 旭光 (三眠蚕) より摘出した。なお日150号×中150号 (以下大鷲と記す) はフィブロイン合成能が高い多糸量系品種, 旭光はフィブロイン合成が少ない少糸量系品種として供試した。

ARSase の調製

後部絹糸腺の ARSase は部分的な改良を除いて既述 (Lagerkvist & Waldenström, 1967; Miura & Matsuzaki, 1964, Matsuzaki & Funabashi, 1981) のように調製した。すなわち後部絹糸腺の抽出液より 4°C で超遠心法 (105,000×g) により上清を集めた後, ストレプトマイシンにより RNA を除去した。遠心後硫酸アンモンの最終濃度を80%にして ARSase を含有する分画を回収し, セファデックス G-25カラムより40%グリセリン-磷酸緩衝液を用いて脱塩し ARSase として使用した。

tRNA のアミノアシル化

蚕の tRNA はアミノアシル化し, ディスク法 (Kelmer, 1966) によりアミノ酸の受容活性を測定した。アミノアシル化の条件としては1 OD の tRNA, 0.05 μ M ATP, 2 μ M Tris (H7.5), 抽出酵素液3 μ l と放射性のアミノ酸を37°C で反応させ, 反応液40 μ l をろ紙にとり TCA 溶液で処理し Beckman シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Garel ら (1977) 及び (Fradin & Feldman, 1975) の方法を改良した。すなわち, 後部絹糸腺のポリアクリルアミド電気泳動では一次元の場合, 20%アクリルアミドとメチレンビスアクリルアミド (19:1) と0.3%ジメチルアミノプロピオニトリルと0.12%過硫酸アムモニウムを用いて, 89mM Tris (pH8.0) と89mM EDTA 含有の4 M尿素溶液中で重合させたものを使用した。二次元の場合はその一次元に対しては7 M尿素中の10%アクリルアミドを用い, その二次元には4 M尿素中での20%アクリルアミドを用いた。一次元泳動後のゲル断片は0.1%トルイヂンブルーで染色し, ギルフォードのゲルスキャンナーを用いて560nm で測定した。

結 果

第1図に示すように, ポリアクリルアミドの一次元電気泳動像については5齢のNd蚕の

第 1 図 突然変異蚕の後部絹糸腺の tRNA の一次元ポリアクリルアミド電気泳動像

Nd 蚕 (5 齢) の絹糸腺 tRNA (a), 正常蚕 (N134×C135, 5 齢) の絹糸腺 tRNA (b).

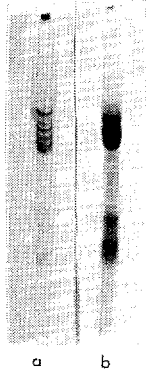
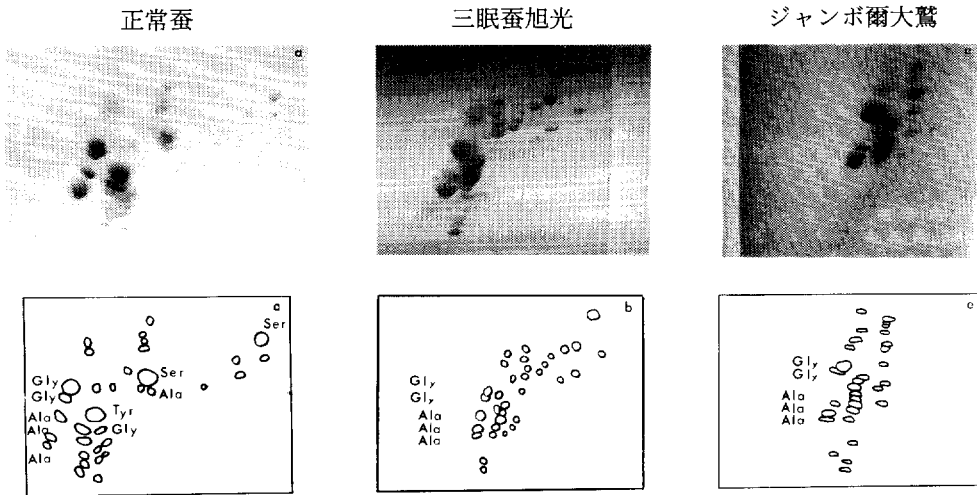


Fig. 1 One - dimensional polyacrylamide gel electrophoretic patterns of tRNAs from posterior silk gland of Mutant silkworms. Silk gland tRNA of Nd silkworm (5th instar) (a), Silk gland tRNA of normal silkworm (N134×C135, 5th instar) (b).



第 2 図 フィブロイン産生量の異なる蚕の後部絹糸腺の tRNA の二次元ポリアクリルアミド電気泳動像。

正常蚕 (対照, N134×C135, 5 齢) の絹糸腺 tRNA (a), 三眠蚕 (旭光 4 齢) の後部絹糸腺の tRNA (b), ジャンボ爾 (大わし 5 齢) の後部絹糸腺の tRNA (c).

Fig. 2 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic patterns of tRNAs from posterior silk gland of silkworm producing different amount of fibroin.

Silk gland tRNA of normal silkworm (N134×C135, 5th instar) (a), Silk gland tRNA of trimolt silkworm (Kyokukou, 4th instar) (b), Silk gland tRNA of jiant silkworm (Ohwashi, 5th instar) (d).

後部絹糸腺の tRNA の泳動像 (a) は正常蚕 (Matsuzaki & Funabashi, 1981) の場合よりバンドは少数であり, 4 齢の正常蚕の後部絹糸腺や 5 齢の中腸の tRNA に類似していた。第 2 図に正常蚕 (a) 三眠蚕 (b) 及び大鷲 (c) のポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動像を示す。このフィブロイン合成時の三眠蚕の 4 齢後部絹糸腺の tRNA の場合は突然変異蚕の場合と異なり, 正常蚕の 5 齢の後部絹糸腺のアラニン tRNA やグリシン tRNA と同様に各組織に共通な tRNA のアイソアクセプターだけでなく, 後部絹糸腺に特異的な tRNA のアイソアクセプターの存在が認められた。第 2 図 c に示されているように, 大鷲の後部絹糸腺の tRNA の泳動像は正常蚕の場合と類似していた。後部絹糸腺に特異的な tRNA のアイソアクセプターについて, Nd 蚕や Nd-s 蚕では 4 齢後部絹糸腺, 中腸の tRNA と同様な泳動像を示し, フィブロインを産生する正常蚕, 三眠蚕, 大鷲の tRNA の電気泳動像と異なっていた。上述のようにフィブロインを合成している組織と合成していない組織の tRNA の電気泳動像はアラニン tRNA とグリシン tRNA のアイソアクセプターについては各々類似していたが, アラニン tRNA とグリシン tRNA 以外のスポットでは三眠蚕と大鷲では正常蚕と相違していた。

考 察

一次元電気泳動像のスキャンニングパターンは Nd 蚕と Nd-s 蚕の後部絹糸腺の tRNA では 5 齢の正常蚕の後部絹糸腺で見出されたグリシン tRNA やアラニン tRNA に由来する二番目の付加的なピークは認められず, 4 齢の後部絹糸腺や 5 齢の中腸の tRNA と同様なピークを示したことが報告されている (Matsuzaki & Funabashi, 1981; Matsuzaki, 1983)。これらの突然変異蚕の tRNA には正常蚕の 5 齢の後部絹糸腺の tRNA に見出される絹糸腺に特異的に存在するグリシン tRNA やアラニン tRNA のアイソアクセプターは認められなかった。Nd 蚕と Nd-s 蚕の tRNA の電気泳動像は類似しているが, Nd 蚕と Nd-s 蚕の tRNA は各種組織の細胞に共通に存在する tRNA に属するものと考えられる。さらにこれらの突然変異蚕の泳動像は 4 齢の後部絹糸腺の tRNA や中腸の tRNA の泳動像に類似して 5 齢の後部絹糸腺の tRNA の泳動像とは相異していた (Matsuzaki & Funabashi, 1981; Matsuzaki, 1983)。正常蚕の 5 齢の後部絹糸腺の tRNA はフィブロインのアミノ酸組成を反映して, ^{14}C アラニンや ^{14}C グリシンを多量にとりこむだけでなく, 5 齢の後部絹糸腺に特異的な tRNA のアイソアクセプターの存在を示している。正常蚕の 4 齢の眠の後部絹糸腺に比し, 5 齢の期間に後部絹糸腺のグリシン tRNA の量が増加することがあきらかにされた (Mazima ら, 1975; Dalaney & Siddiqui, 1975)。Suzuki & Suzuki (1974) によると Nd や Nd-s 蚕の場合後部絹糸腺において極めて少量の rRNA や mRNA の存在しか認められなかった。一方, Nd 蚕と Nd-s 蚕では遺伝子のローカスは相違しているが, Nd と Nd-s 蚕の後部絹糸腺の tRNA にはこのように特異的な tRNA のアイソアクセプターは認められないほど僅少である。このことは Kobayashi (1980) がフィブロイン合成系へ Nd 蚕の tRNA を添加しても ^{14}C グリシンのとりこみが正常蚕 tRNA の添加の場合より減少した事実より理解できる。これらの事実と tRNA のアミノ酸受容活性及びポリアクリルアミドの電気泳動像から Nd 蚕や Nd-s 蚕の場合は正常蚕, 三眠蚕及び大鷲と異なりフィ

プロイン合成に関与している核酸の合成は抑制されていると考えられる。Gage (1974) はフィブロイン遺伝子と同様に tRNA 遺伝子にも増幅がないとしているが、正常蚕とこれらの突然変異蚕の tRNA 遺伝子の相違に興味もたれる。

2 フィブロイン産生量の異なる蚕の後部絹糸腺に特異的な tRNA 量の比較

先にフィブロイン産生量の異なる蚕の後部絹糸腺 tRNA の電気泳動像を示したが、高速薄層クロマトスキャンナーの使用によりポリアクリルアミドゲル上の tRNA のアイソアクセプターの定量を可能にした。後部絹糸腺の tRNA のアイソアクセプターには、後部絹糸腺に特異的な tRNA と組織に共通な tRNA が存在している。繭層重はフィブロイン産生量に比例すると考えられるので、後部絹糸腺に特異的な tRNA と組織に共通している tRNA のアイソアクセプターの量比を突然変異蚕とフィブロインを産生する蚕の間で比較することにより、フィブロイン産生量と tRNA 量の関係を明らかにした。

材料及び方法

tRNA の調製

前述のような材料及び方法を用いて調製した。

ポリアクリルアミド電気泳動

前述のように分析した。

tRNA 量の測定

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲル上のスポットを島津社製の高速薄層クロマトスキャンナー CS920 を用いて 560nm で測定した。

結果と考察

第 1 表は突然変異蚕と繭層重の異なる蚕の後部絹糸腺の tRNA 量の比較を示す。この場合アラニン tRNA1 は組織に共通な tRNA に属し、アラニン tRNA2 は後部絹糸腺に特異的に存在する tRNA のアイソアクセプターである。これら 2 種類の tRNA のアイソアクセプターの比は繭層重に同調していた。繭層重はフィブロイン産生量に比例すると考えられるので、この tRNA のアイソアクセプターの比はフィブロイン産生量に比例していると考えられる。アラニン tRNA2/アラニン tRNA1 は大鷲で最も大きく、次いで N134×C135 (正常蚕) で旭光は最も低い値を示した。Nd 蚕には tRNA2 は存在しない為、この比は 0 になり、フィブロインの産生がなされない現象とよく一致する。またグリシン tRNA2/アラニン tRNA1 の場合も同様な傾向を示した。

グリシン tRNA2/グリシン tRNA1 も同様な結果を示すものと考えられる。

第1表 後部絹糸腺 tRNA 量 (相対面積量) と絹糸蛋白質産生量との関係

	正常蚕	大鷲	旭光	Nd-s 蚕	Nd 蚕
Alanine tRNA ₁ (1)*	78.609	75.654	77.357	78.111	73.044
Alanine tRNA ₂ (2)*	158.056	166.488	144.628	0	0
(2)/(1)	2.01	2.20	1.86	0	0
繭層重 (cg)	56.80	65.30	28.30	—	—
練減り率	25.00	25.20	27.50	—	—

(1)* 組織に共通な tRNA のアイソアクセプター

(2)* 後部絹糸腺に特異的な tRNA のアイソアクセプター

繭層重及び練減り率は技術資料より引用した。

正常蚕はN134XC135を使用

3 突然変異蚕の tRNA 遺伝子のクローニング

フィブロインは後部絹糸腺のみで合成されることから5齢の後部絹糸腺のみで特異的に発現し、他の細胞では発現しない遺伝子の存在が予測される。後部絹糸腺の遺伝子の発現機構を解明することはフィブロインの産生の研究にとり重要であるばかりでなく、細胞の分化の面の研究にとっても重要であると考えられる。

蚕の後部絹糸腺の tRNA の研究から明らかにされたように、正常蚕の後部絹糸腺にはフィブロインのアミノ酸組成を反映してアラニン tRNA とグリシン tRNA が特に多量に蓄積されていることが明らかにされている (Matsuzaki, 1963, 1966, 松崎, 1970)。これら二種類の tRNA は細胞に共通に存在する tRNA のアイソアクセプターと5齢の後部絹糸腺に特異的に存在する tRNA のアイソアクセプターから構成されている (Sprague ら, 1977, 1980)。このようなアラニン tRNA やグリシン tRNA のアイソアクセプターの存在を反映してアラニン tRNA 遺伝子やグリシン tRNA 遺伝子も細胞に共通して発現する tRNA 遺伝子と5齢の後部絹糸腺のみで発現する tRNA 遺伝子が存在していると考えられる (Sprague ら, 1979)。正常蚕は後部絹糸腺でフィブロインを分泌し、中部絹糸腺ではセリシンを分泌する。一方 Nd や Nd-s 突然変異蚕では中部絹糸腺でセリシンを分泌するが後部絹糸腺におけるフィブロインの分泌は認められないほど僅少である (堀内・筑紫, 1969; Machida, 1960)。前述したように、二次元ポリアクリルアミドゲルの電気泳動像において5齢の後部絹糸腺で認められているアラニン tRNA やグリシン tRNA のアイソアクセプターは Nd 蚕や Nd-s 蚕の後部絹糸腺では認められない程僅少である。これらのアラニン tRNA やグリシン tRNA のアイソアクセプターが遺伝子のレベルで制御されている機構を調べるための手始めとして、Sprague ら (1980) により Nd 及び Nd-s 突然変異蚕のアラニン tRNA 遺伝子のクローニングを試みた。ここではとくに、5'末端を含んでいる長いアラニン tRNA 遺伝子のクローニングについて報告する。

材料と方法

ハイブリダイゼーションの実験のためのプローブの調製

正常蚕の後部絹糸腺のアラニン tRNA はポリアクリルアミドゲルの 2-D 電気泳動によって前述のように調製した (Matsuzaki & Funabashi, 1981, Matsuzaki, 1983)。アラニン tRNA は脱リン酸後、 γ -32P-ATP によりリン酸化し、ハイブリダイゼーション実験のプローブとして使用した。

突然変異蚕の DNA から遺伝子ライブラリーの調製

制限酵素 *Eco*RI は Bio. Lab. Co Ltd. (U.S.A.) から、また、*Hind* III と T_4 の DNA リガーゼは Bethesda Lab. (U.S.A.) から購入した。突然変異蚕のアラニン tRNA 遺伝子は Hagenbüchle ら (1979) と Maniatis ら (1982) に従ってクローニングした。突然変異蚕の DNA と λ gt λ B の DNA は *Eco*RI で分解し、これら両者の分解物は、 T_4 DNA リガーゼで結合した。*In vitro packaging* (Ikeda & Kobayashi, 1977; Ikeda & Matsumoto, 1979; Kobayashi & Ikeda, 1978; Ikeda ら, 1980) によりファージ中に上記の結合した DNA を封入後プレート上でプラークを増殖した。アラニン tRNA 遺伝子を含むプラークは、5 齢の正常蚕の後部絹糸腺から調製した 5^{32} P-tRNA をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。

増殖されたプラークから分離した突然変異蚕の DNA 断片は *Eco*RI と *Hind* III で分解し、pBR322 に形質転換によりサブクローニングした (Sprague ら, 1977, 1980)。

アガロースゲル電気泳動と Southern Blotting

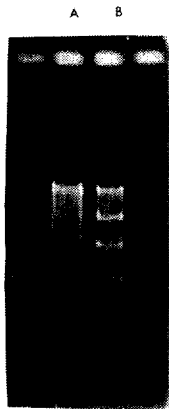
DNA 断片を 0.6% アガロース (Seakem) で電気泳動にかけ、エチジウムブロミド ($2 \mu\text{g}/\text{mg}$) で染色した。アガロースゲルの突然変異蚕の DNA 断片を 0.5M NaOH と 1.5M NaCl で変性後ニトロセルロース膜へ移行した。 5^{32} P-アラニン tRNA をプローブとしてハイブリダイゼーション後オートラジオグラフを試みた。

結 果

前述したように二次元ポリアクリルアミドの電気泳動像の結果は、5 齢の正常蚕の後部絹糸腺 tRNA に存在するアラニン tRNA やグリシン tRNA の各一種類のアイソアクセプターは 5 齢の Nd 蚕や Nd-s 蚕の後部絹糸腺の tRNA にはほとんど認められない。

第 3 図はベクターとして λ gt λ B の DNA と Nd-s 蚕の DNA の両者の *Eco*RI 分解物のアガロース電気泳動像を示す。第 4 図はこれらの制限酵素分解物の T_4 の DNA リガーゼの存在下で生成した組換え体のアガロース電気泳動像である。*In vitro packaging* により得られたファージをプレート上で増殖し、プローブとして 5^{32} P-アラニン tRNA を用いたプラークハイブリダイゼーションを試みた。組換えた DNA $1 \mu\text{g}$ から約 100 プラークが得られた。このプラークハイブリダイゼーションの結果から 10,000 個のプラークの中で 1 個のプラークが、5 齢正常蚕の後部絹糸腺の 5^{32} P-アラニン tRNA と相補鎖を形成し、アラニン tRNA 遺伝子を含むことが推定された。さらにこのファージを増殖後、精製した DNA を *Eco*RI 単独及び *Eco*RI と *Hind* III で分解し、pBR322 にサブクローニングした。5 齢の正常蚕の後

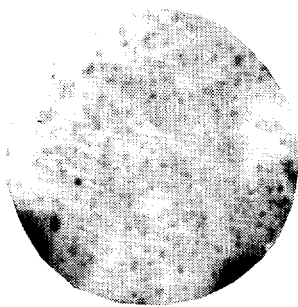
部絹糸腺の 5^{32}P -アラニン tRNA と相補鎖を形成したコロニーを増殖し、DNA を抽出後 *Hind* III と *Eco* RI で分解した。DNA 断片をアガロースゲルで泳動後 Southern blotting を試みた結果を第5図に示す。この結果から、既報 (Matsuzaki, 1986) の *Eco* RI と *Hind* III で分解した場合の短鎖 (2.4kb) の DNA 断片の他に、*Eco* RI で分解した場合には、長鎖 (26kb) の DNA 断片にもアラニン tRNA 遺伝子が含まれることが明らかとなった。



第3図 突然変異蚕の DNA とベクター DNA の *Eco* RI 分解物の T_4 DNA リガーゼによる生成物の電気泳動像。
A : Nd-s 蚕の DNA と λ gt λ B-DNA の *Eco* RI 分解物の T_4 DNA リガーゼ反応生成物, B : λ -DNA の *Hind* III 分解物 (マーカー)。

Fig. 3 Electrophoretic pattern of ligated product of *Eco* RI digest of mutant DNA and vector DNA

A : ligated product of *Eco* RI digest of Nd-s DNA and λ gt λ B-DNA
B : *Hind* III digest of λ -DNA (Markwer).



第4図 突然変異蚕のアラニン tRNA 遺伝子のブランク ハイブリダイゼーション。

Fig. 4 Plaque hybridization of alanine tRNA gene from Nd-s mutant silkworm.

A B C



第 5 図 Southern blottingにより、5'-³²P-アラニン tRNA と相補鎖を形成したサブクローンの突然変異蚕 DNA のオートラジオグラム。

A : Nd-s 蚕 DNA サブクローンの *EcoR* I 分解物, B : Nd-s 蚕 DNA サブクローンの *Hind*III 分解物, C : λ-DNA の *Hind*III 分解物 (マーカー)。

Fig. 5 Autoradiogram of the subcloned mutant DNA hybridized with 5'-³²P-alanine tRNA after Southern blotting.

A : *EcoR* I digest of Nd-s mutant DNA subclone, A : *Hind*III digest of Nd-s mutant DNA subclone. C : *Hind*III digest of λDNA. (labeled with ³²P).

考 察

前述したように 5 齢正常蚕の後部絹糸腺の tRNA は各組織に共通なアラニン tRNA やグリシン tRNA と後部絹糸腺に特異的に存在するアラニン tRNA やグリシン tRNA から成り立っている。これら 2 種類の tRNA の存在に応じてアラニン tRNA 遺伝子やグリシン tRNA 遺伝子も 2 種類存在するものと考えられている。蚕の組織に共通的に存在するアラニン tRNA と絹糸腺に特異的なアラニン tRNA の塩基配列上の差異は一塩基配列しかないことから、アラニン tRNA 遺伝子が組織共通の tRNA 遺伝子であるか、絹糸腺に特異的な遺伝子であるか決定するためには、これら両者の遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列の決定が必要であると考えられる。

4 総合考察

従来から蚕の後部絹糸腺の tRNA の特異性について tRNA のアミノ酸受容活性、クロマトグラフィ溶出曲線、ポリアクリルアミドの電気泳動像が蚕の絹糸腺以外の他の組織から抽出した tRNA と相違することを報告してきた (Matsuzaki, 1963, 1970 ; 松崎, 1970 ; Matsuzaki & Funabasi, 1981 ; Matsuzaki, 1983)。

この後部絹糸腺の tRNA が蚕の他の組織由来の tRNA と相違しているのは、後部絹糸腺がフィブロインの合成の場であり、後部絹糸腺の tRNA がフィブロイン合成に関与しているためと考えられる。

後部絹糸腺の tRNA が示す特異性の一例としてはアミノ酸受容活性である。即ち後部絹

糸腺の tRNA はフィブロインのアミノ酸組成を反映して¹⁴C-グリシンと¹⁴C-アラニンを多量にとりこんだが、¹⁴C-ロイシンや¹⁴C-リジンのとりこみは極めて少量である。一方後部絹糸腺以外の組織より抽出した tRNA はこのような傾向は示さず、多くの¹⁴C-アミノ酸のとりこみは大きな相違を示さなかった (Matsuzaki, 1963; 1966; 松崎, 1970)。また、5 齢の正常蚕の後部絹糸腺のグリシン tRNA やアラニン tRNA は後部絹糸腺に特異的に存在する tRNA と他の組織にも共通的に存在する 2 種類の tRNA から成り立っている (Matsuzaki, 1971; Sprague et al., 1977)。このことは今回のポリアクリルアミドゲルの電気泳動像により証明された。

これらの後部絹糸腺の tRNA の特異性を考慮して、フィブロイン合成の極めて低い Nd と Nd-s 突然変異蚕の 5 齢の後部絹糸腺の tRNA を抽出し、アミノ酸受容活性を測定した結果、正常蚕の tRNA の場合のように¹⁴C-グリシンと¹⁴C-アラニンを特に多量にとりこみは示さなかった (Matsuzaki & Funabashi, 1981; Matsuzaki, 1983)。

今回のポリアクリルアミドゲル電気泳動像では 5 齢の正常蚕の後部絹糸腺にみいだされた後部絹糸腺に特異的なアラニン tRNA やグリシン tRNA は 5 齢の Nd や Nd-s 突然変異蚕の後部絹糸腺の tRNA では認められない程僅少であった。この結果によりフィブロイン合成は後部絹糸腺に特異的な tRNA の生成に基づいて成されることが明らかとなった。

三眠蚕の 4 齢の後部絹糸腺 tRNA では、アラニン及びグリシン tRNA について 5 齢の正常蚕の場合と同様な電気泳動像を示した。

ジャンボ繭を作る多糸量系品種の大鷲の場合は後部絹糸腺に特異的な tRNA のスポットが増加していた。繭層重から考慮してフィブロイン合成と後部絹糸腺に特異的な tRNA は定量的比例関係にあることが解明された。

さらに Nd や Nd-s 突然変異蚕の後部絹糸腺の tRNA で正常蚕の後部絹糸腺に特異的な tRNA が抑制されている機構を遺伝子のレベルから解明することはフィブロイン合成との関連において重要であるばかりでなく、tRNA 遺伝子の発現機構の解明にとっても重要であるとの観点から、Nd-s 蚕のアラニン tRNA 遺伝子のクローニングを試みた (Matsuzaki, 1986)。他に現在のところ 5'末端の短い 2.4Kb の遺伝子と 5'末端の長い 26Kb の遺伝子をクローニングし分析を実施している。

摘 要

1. 正常蚕の後部絹糸腺はフィブロインを生成するが、Nd と Nd-s 蚕ではフィブロイン生成能が極度に低下している。後部絹糸腺の tRNA の電気泳動像に関して、Nd 蚕の場合も Nd-s 蚕と同じく、正常蚕、三眠蚕、大鷲の場合に見いだされたグリシン tRNA とアラニン tRNA の後部絹糸腺のみに存在するアイソアクセプターは認められなかった。
2. 高速薄層クロマトスキャナーの使用により tRNA のアイソアクセプターの定量が可能になったので、突然変異蚕と繭層重の異なる蚕の間で後部絹糸腺に特異的な tRNA と組織に共通な tRNA の比が繭層重に比例することを明らかにした。
3. フィブロイン産生能を欠いている突然変異蚕 (Nd-s) の場合、正常蚕の後部絹糸腺に特異的に存在するアラニン tRNA やグリシン tRNA のアイソアクセプターの生成が制御さ

れている理由を遺伝子レベルから解明するため、Nd-s 蚕のアラニン tRNA 遺伝子のクローニングを試みた。既報の2.4Kbのアラニン tRNA 遺伝子は5'末端を欠いているため、特に26Kbの5'末端を含む長いアラニン tRNA 遺伝子をクローニングし、Southernの方法によりアラニン tRNA 遺伝子であることを同定した。

引用文献

- 1) DALANEY, P. and SIDDIQUI, M. A. Q. 1975. Changes in in vivo levels of charged transfer RNA species during development of the Posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Develop. Biol.*, 44 : 54~62.
- 2) FRADIN, A., GRUHL, H. and FELDMANN, H. 1975. Mapping of yeast tRNAs by two-dimensional electrophoresis on polyacrylamide gels. *FEBS Letters*, 50 : 185~189.
- 3) GAREL, J. P., GARBER, R. L. and SIDDIQUI, M. A. Q. 1977. Transfer RNA in posterior silk gland of *Bombyx mori* : Polyacrylamide gel mapping of mature transfer RNA, identification and partial structural characterization of major isoacceptor species. *Biochem.*, 3618~3624.
- 4) GAREL, J. P., MANDEL, P., CHAVANCLY, C. and DAILLIE. 1970. Functional adaptation of tRNAs to fibroin biosynthesis in the silk gland of *Bombyx mori*. *FEBS Letters*, 7 : 327~329.
- 5) GAGE, L. P. 1974. Polyploidization of the silk gland of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 86 : 97~108.
- 6) HAGENBUCHLE, O., LARSON, D., HALL, G. I. and SPRAGUE, K. U. 1979. The primary transcription product of a silkworm alanine tRNA gene : Identification of in vitro sites of initiation, termination and processing. *Cell*, 18 : 1217~1229.
- 7) 堀内彬明・筑紫春生 1969. Thanghpren-S 系セリシン遺伝子の所属連関群について. 日本蚕糸学会講演要旨. 39 : 29.
- 8) IKEDA, H. and KOBAYASHI, I. 1977. Involvement of DNA-dependent RNA polymerase in a recA-independent pathway of genetic recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 74 : 3932~3936.
- 9) IKEDA, H. and MATSUMOTO, T. 1979. Transcription promotes recA-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 76 : 4571~4575.
- 10) IKEDA, H., MORIYA, K. and MATSUMOTO, T. 1980. In vitro study of illegitimate recombination : Involvement of DNA gyrase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45 : 399.
- 11) KELMER, A. D. 1966. Preparation of a highly purified phenylalanine transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 241 : 3540~3545.
- 12) KOBAYASHI, I. and IKEDA, H., 1978. On the role of recA gene product in genetic recombination : An analysis by in vitro packaging of recombinant DNA molecules

- formed in the absence of protein synthesis. *Molec. Gen. Genet.*, 166 : 25~29.
- 13) KOBAYASI, T. 1980. Quantities and activities of ribosomes in posterior silkglands of the normal and Nd silkworms. *Agricult. Chem.*, 44 : 545~546.
 - 14) LAGERKVIST, U. and WALDENSTROM, J. 1967. Purification and some properties of valyl ribonucleic acid synthetase from yeast. *J. Biol. Chem.*, 242 : 3021~3025.
 - 15) MACHIDA, Y. 1960. Studies on the silkglands of silkworms, *Bombyx mori* L, II The singularity of the silkglands in hereditary trait, Naked pupa (Nd), in the silkworm (1). *Fukuoka Woman's Junior College, Studies*, 3 : 1~21.
 - 16) MANIATIS, T., FRITSH, E. F. and SAMBROOK, J. 1982. "Molecular Cloning " edited by Cold Spring Harbar Lab., pp. 399~407.
 - 17) MATSUZAKI, K. 1963. The incorporation of ^{14}C -glycine into the soluble RNA of the posterior silkgland. *J. Biochem. (Tokyo)*, 53 : 326~327.
 - 18) MATSUZAKI, K. 1966. Fractionation of amino acid specific s-RNA from silkgland by methylated albumin column chromatography. *Biophys. Acta* 114 : 224~226.
 - 19) MATSUZAKI, K. 1970. Comparison of the amino-acyl termini of the transfer RNA's from the silkgland and midgut of the silkworm. *J. Biochem., (Tokyo)* 67 : 851~855.
 - 20) 松崎慶子 1970. 蚕の絹糸腺の転移RNAの特異性に関する研究. 蚕試報, 24 : 443~478.
 - 21) MATSUZAKI, K. and FUNABASHI, H. 1981. Isoaccepting tRNAs of posterior silkgland of mutant *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100 : 1272~1277.
 - 22) MATSUZAKI, K. 1983. Isoacceptors of silkgland tRNA in mutant *Bombyx mori*. 日蚕雑, 52 : 166~172.
 - 23) MATSUZAKI, K. 1986. Cloning of alanine tRNA gene from mutant silkworm, *Bombyx mori*. 日蚕雑, 55 : 447~450. (1986) *J. Seric. Jpn.*
 - 24) MAZIMA, R., KAWAKAMI, M. and SHIMURA, K. 1975. The biosynthesis of transfer RNA in insects, I Increase of amino acid acceptor activity of specific tRNA's utilized silk protein in silkgland of *Bombyx mori*. *J. Biochem., (Tokyo)* 78 : 391~400.
 - 25) MIURA, K. and MATSUZAKI, K. 1964. Nucleotide composition and arrangement of soluble RNA in posterior silkgland. *Biochem. Biophys. Acta*, 91 : 427~432.
 - 26) SPRAGUE, K. U., HAGENBUCHLE, O. and ZUNIGA, M. C. 1977. The Nucleotide sequence of two silk gland alanine tRNAs : Implications for fibroin synthesis and for initiator tRNA structure. *Cell*, 11 : 561~570.
 - 27) SPRAGUE, K. U., MANNING, M. B. and GAGE, L. P. 1979. Alleles of the fibroin gene coding for proteins of different lengths. *Cell*, 17 : 409~413.
 - 28) SPRAGUE, K. U., LARSON, D., and MORTON, D. 1980. 5' Flanking Sequence signals are required for activity of silkworm alanine tRNA genes in homologous in vitro transcription systems. *Cell*, 22 : 171~177.
 - 29) SUZUKI, Y. and SUZUKI, E. 1974. Quantitative measurements of fibroin messenger

RNA synthesis in the posterior silkglang of normal and mutant *Bombyx mori*. J. Mol. Biol., 88 : 393~407.

Summary

Characterization of Silk gland tRNA from the Mutant Silkworm and Cloning of its tRNA Gene

By

Keiko MATSUZAKI

Silk fibroin is synthesized in the posterior silk gland of the normal silkworm at the third day of the fifth instar. Therefore, studies on tRNA from the posterior silk gland of the silkworm have been advanced.

As shown in previous paper, compared with tRNAs from the other tissues of the silkworm, tRNA from the posterior silk gland is specific as to the amino acid acceptor activity, the elution patterns of column chromatography, and the electrophoretic patterns on polyacrylamide gel. Because, the posterior silk gland is the site of fibroin synthesis, while tRNA of the posterior silk gland contributes to fibroin synthesis.

The normal silkworm secretes sericin in the middle silk gland and fibroin in the posterior silk gland. On the other hand, the mutants symbolized as Nd and Nd-s secrete sericine in the middle silk gland and little fibroin in the posterior silk gland. The amino acid acceptor activity of the posterior silk gland from the normal silkworm reflects the amino acid composition of fibroin, this was not observed in the case of Nd as well as Nd-s.

Furthermore, tRNA of the posterior silk gland consists of a specific one to the posterior silk gland and another constitutive to the cell. Similarly to Nd-s tRNA, the electrophoretic pattern of Nd tRNA did not indicate the presence of large amounts of the silk gland specific tRNA, which appeared abundantly in tRNAs, such as glycine tRNA and alanine tRNA, of the posterior silk gland from the normal silkworm.

It is expected that an amount of fibroin produced in the posterior silk gland is proportional to the amount of specific tRNA to the posterior silk gland. With reference to the normal silkworm such as N134 X C135, trimolt silkworm (kyokukou) and giant silkworm (ohwashi) and Nd or Nd-s mutant, every ratio of silk gland specific tRNA to constitutive tRNA corresponded to cocoon shell weight implying amount of fibroin.

As the first step of study aiming at understanding how alanine-tRNA and glycine tRNA are controlled at the level of gene, genomic DNA extracted from Nd-s mutant was cloned by *in vitro* packaging and the subcloned by transformation. Southern hybridization experiments suggested that a subcloned DNA fragment from Nd-s mutant contained alanine tRNA sequence.

(*Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan*)