

分子生物学 (II)

福留 秀雄 (基 研)

II 蛋白質の構造と機能

§ 1.

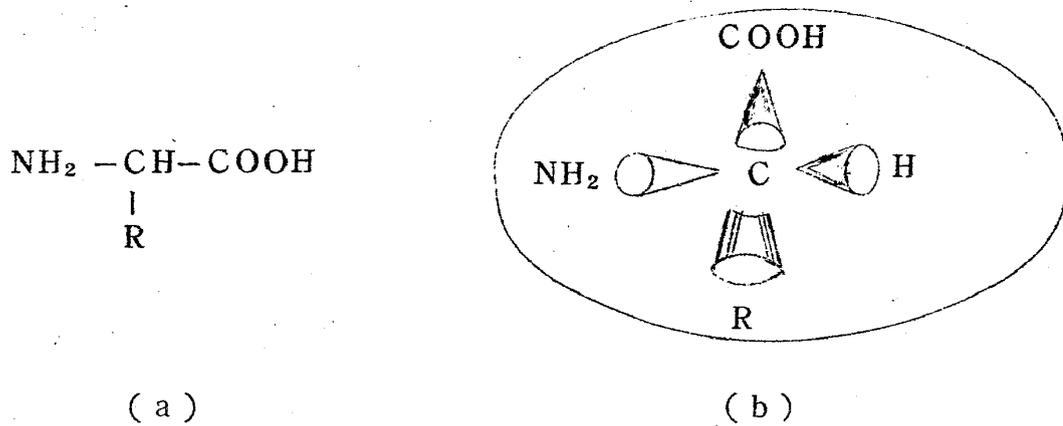
触媒となる酵素がなしでは生体反応は進まない。そして反応の各 step に対して、それぞれ特異な酵素が存在し、それら酵素はすべて蛋白質であるということが分っている。生物のすべての性質が細胞内で行われている化学反応を総合的に反映しているのであるとすると、生物の形質の一番 elementary な level には、酵素があるということになる。そしてある生物にどのような酵素が存在しているかということが、その生物の特異性を決定しているのだと考えることができる。蛋白質は必ずしも酵素とは限らないが、酵素は必ず蛋白質である。従つて酵素の機能を知るためには、先づ蛋白質の構造を知らねばならない。それで以下蛋白質とはどのようなものであるかを述べることにしよう。

§ 2. 蛋白質の分子構造

(1) アミノ酸と蛋白質

蛋白質は 20 種類のアミノ酸 (a . a ,) が鎖状に重合したものであつて、その monomer であるアミノ酸は第 12 図 (a) に示されているような構造をもつ。地球上のほとんどすべての生物の蛋白質から見出されるアミノ酸は 20 種類に限られていて、その違いはアルキル基 R の種類の違いにある。

アミノ酸には立体異性体があるが、地上の生物からとれるすべてのアミノ酸は、第 12 図 (b) であらわされるような L-form のものである。蛋白質は非常に多くの種類があるが、その違いはアミノ酸の並び方の違いから生

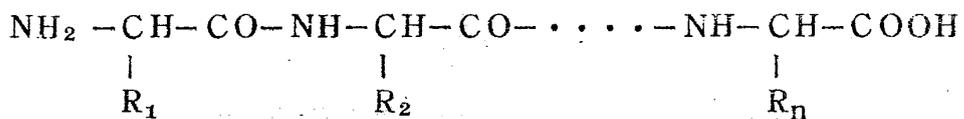


第12図

ずる。1つの蛋白質に含まれるアミノ酸の数は約数十ないし数百個，これを分子量になおすと $10^4 \sim 10^6$ の程度になる。

(2) 蛋白質の1次構造

蛋白質は第13図の様な1次構造をもつ。図のように隣り合うアミノ酸をつないでいる $\text{CO} - \text{NH}$ なる結合は peptide bond とよばれ， NH_2 を



第13図

もつ左端はN端 (N terminal)， COOH をもつ端はC端 (C terminal) とよばれる。蛋白質は本質的には1次元であるが，第14図 (a) に示される cystein のように SH 基をもつ蛋白質 chain においては，第14図 (b) のように，SH 基同志の結合を通じて2本の chain が連らなることがある。

ところで，蛋白質のうち，その1次構造が完全に知られているものには牛のインシュリンがある。これは化学的に決定された。その構造のあらましを要所要所のアミノ酸を明示してかきあらわしたものが第15図である。この他，蛋白質の1次構造が分っている例としては，人のヘモクロビン，RNA

福 留 秀 雄

とによつて、酵素活性を調節する information を一つの部分から他の部分へ伝送しているのではないかと最近いわれている。

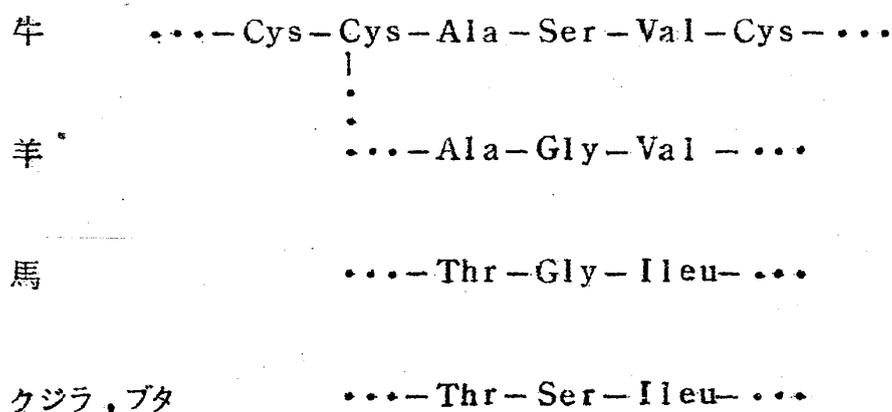
特定の蛋白酵素は特定の物質にしか作用しないという特異性をもっている。active site は反応の触媒をする対象をえらび出す部分 (specificity site とよばれる) と、化学反応を起す部分 (catalytic site とよばれる) とから成つていると考えられている。

蛋白質のアミノ酸を端から1つづつとつていく場合、どこまでとると活性がなくなるかを調べる実験は、partial degradation の実験とよばれている。この実験の結果の例を第3表に示す。これらは酵素活性には酵素蛋白

第 3 表

酵 素 名	切り取る端	取り去つたアミノ酸数	結 果
RNase	C 端	3 個	失活せず
◦	◦	4 個又はそれ以上	失 活
ACTH (脳下垂体ホルモン)	C 端	3 個	失活せず
◦	N 端	1 個又は 2 個	失 活
Papain		120 個	失活せず

◦ パパイヤの実の中にあるタンパク質分解酵素で、180個のアミノ酸から成る。



第 17 図

の全体が必ずしも必要ではないことを示している。

active site という考えを支持する他のデータとしては、種間変異がある。例えばインシュリンをとつてみると、第17図に示すように、アミノ酸の配列が種によつて多少ちがっている。このことは、アミノ酸配列の異なる部分はインシュリンの活性に対して支配的でないことを示している。

§ 4. 蛋白質の1次構造の遺伝による決定

蛋白質の1次構造が遺伝によつて決定されているということが遺伝生化学や、人の血液型の遺伝の研究から分つてきた。

人の赤血球は正常では丸い形をしているが、赤血球の形がカマ型になる遺伝的な貧血症がある。カマ型貧血症の患者の血液からとれるヘモグロビンと正常のヘモグロビンとを比較すると、アミノ酸配列の一ヶ所だけが異なっていることがわかつた。又同様のことがヘモグロビンC症という貧血症のヘモグロビンについてもいえる。それらの1次構造を第18図に示しておく。こ

正常なヘモグロビン Hb^A

...-His-Val-Leu-Leu-Thr-Pro- Glu -Glu-Lys-...

カマ型症のヘモグロビン Hb^S

...- Val -...

ヘモグロビンC症のヘモグロビン Hb^C

...- Lys -...

第 18 図

の図に見られるようなアミノ酸配列で一箇所だけで異なっているヘモグロビンの異常は、Mendelの法則にしたがつて遺伝される。その際、人のヘモグロビン異常の遺伝的な型として第4表に示すような組合せがある。このことは、高等生物においても蛋白質の1次構造が、

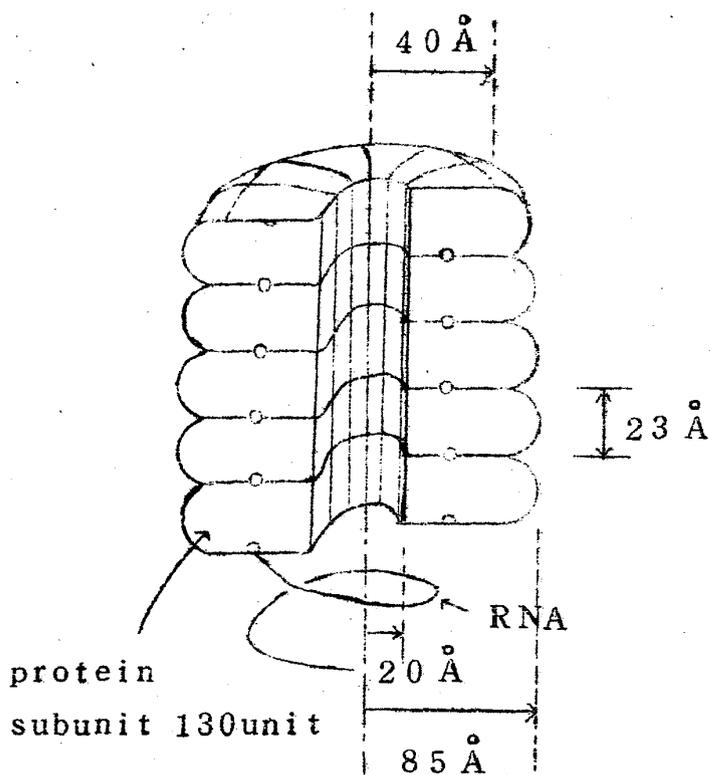
	homo		hetero
正 常	Hb ^A Hb ^A	カマ型素質	Hb ^A Hb ^S
カマ型	Hb ^S Hb ^S	ヘモグロビン C 素質	Hb ^A Hb ^C
ヘモグロビン C	Hb ^C Hb ^C	カマ型ヘモグロビン C 病	Hb ^S Hb ^C

註： Hb^A は Hb^S Hb^C に対して優性。

遺伝的に決定されていることを示している。そしてこの Hb^A から Hb^S, 又は Hb^C への変異が 1 回の突然変異で起ることも分つている。

TMV (タバコモザイクウイルス) の coat protein は 1 種類しかなく、この protein の 1 ケ所のアミノ酸が 1 回の突然変異で変ることが知られている。ウイルスは核酸と蛋白質とから成つており、X 線解析から分つたその構造を示せば、第 19 図のようである。

以上のことから、蛋白質の 1 次構造は遺伝的に決定されていることが結論される。そして 1 つの種の中の蛋白質の 1 次構造は遺伝的に非常に精密にき



第 19 図

まつていることが分る。

ところでアミノ酸配列が遺伝的に矛盾なく決定されるためには，蛋白質合成の際の反応にアミノ酸配列を決定する”鑄型”(template)が存在していて，その鑄型に従って重合反応が起つているのでなければならないと考えられる。

IV 遺伝決定物質としての核酸

§ 1.

蛋白質のアミノ酸配列をきめる情報をになつている遺伝決定物質は，核の中にある染色体に含まれていて，かつ多くの情報を蓄積出来るような高分子でなければならない。このことから遺伝決定物質の候補者はDNA, RNA, 蛋白質のどれかにしぼられる。遺伝決定物質は組織によらず一定量含まれていて，代謝的に安定なものでなければならない。その結果，遺伝決定物質はDNA か塩基性核蛋白質 histon のどちらかであることになる。1940年代の終り頃になつて，核酸が遺伝決定物質であることが分つてきた。

(I) 間接的証拠

イ) DNA は核にだけ存在し，かつ代謝的に安定である。

ロ) DNA は組織によらず，細胞当り一定量存在する。正確に云えば，染色体の1 set当り一定量存在する。

たとえば，イースト (yeast) の場合，染色体を1, 2, 3, 4 対もつているものがあつて，それぞれ

1 対しかもたないものを	haploid
2 対もつものを	diploid
3 対もつものを	triploid
4 対もつものを	tetraploid

という。これらの yeast 1ヶ当りの DNA の量比は

$$\begin{aligned} \text{haploid} & : \text{diploid} : \text{triploid} : \text{tetraploid} \\ & = 1 : 2 : 3 : 4 \end{aligned}$$

である。

ハ) UV (紫外線) による mutation の誘起頻度は, DNA の UV の吸収スペクトルに非常によく一致している。

ニ) 蛋白質には反応しないが, 核酸にはよく反応する物質 (例えば DBU 等) を細胞の培養液の中に入れて, 突然変異を起す頻度が增大する。

以上の事実は遺伝物質が DNAらしいことを示している。

(II) 直接証拠

イ) 形質変換 (transformation) :

肺炎双球菌には第5表に示したような形質 (遺伝される性質) の異なる II 型菌と III 型菌とがある。そこで II 型菌の DNA を III 型菌の培地に入れると, III

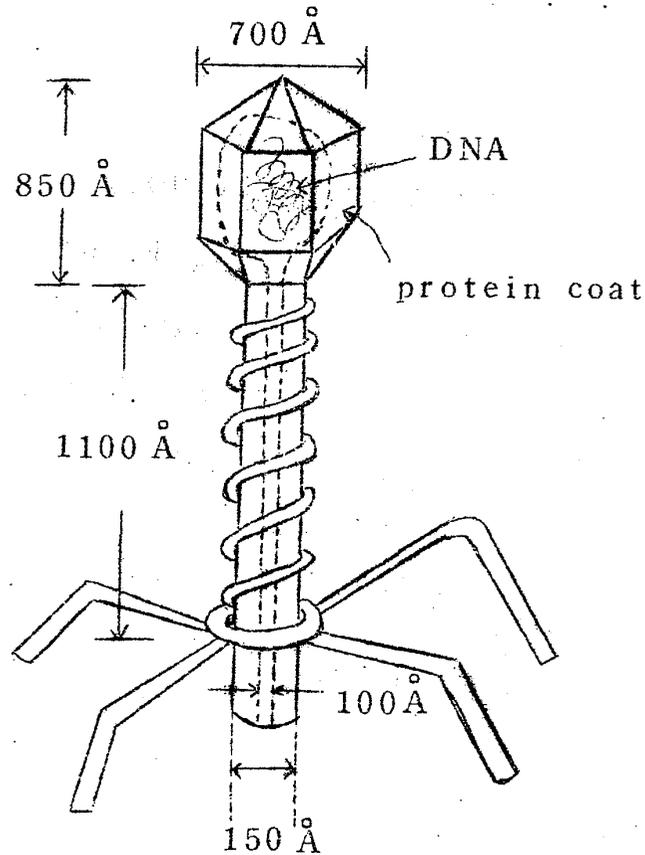
第 5 表

II 型 菌	III 型 菌
smooth colony をつくる。	rough colony をつくる。
から (capsule) をつくる。	からをつくらない。
病原性をもつ。	病原性はない。

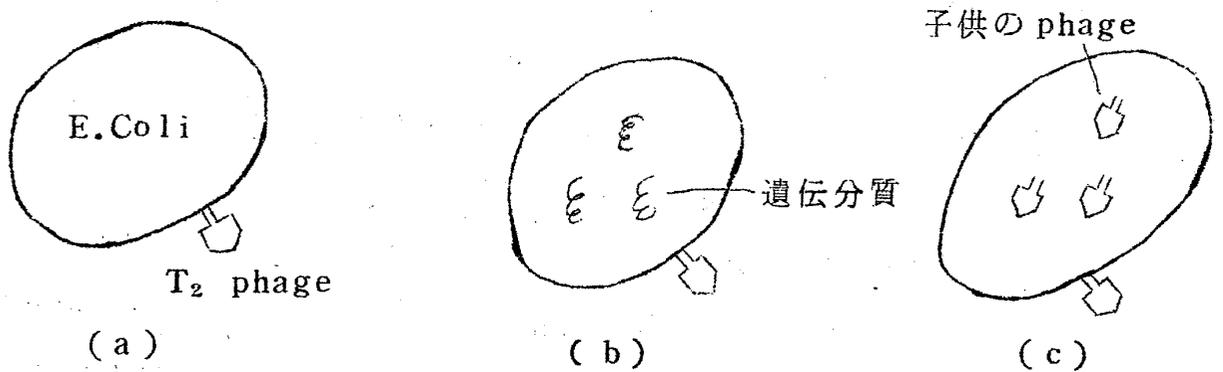
型菌の子孫に II 型菌が現われる。この際, II 型菌が DNA にまじって入ったのではないかという実験に対する不信は, II 型菌の DNA に DNA 分解酵素を作用させると, II 型菌はでてこないことから解消することができる。このような実験の他の例として, streptomycin sensitive bacteria の中に streptomycin resistant bacteria の DNA を入れると, streptomycin resistant bacteria が現われることが知られている。

ロ) 大腸菌 (E.Coli) に寄生する Teven ファージの感染実験

参考のために Teven ファージの電子顕微鏡像を模型的に示すと、第 20 図の様になる。ところでファージはバクテリアに感染して、これをとかし、増殖する。このファージの感染増殖過程を調べると、第 21 図 (a) の様に、



第 20 図



第 21 図

先づ T_2 ファージは *E. Coli* に吸着する。次に同図 (b) の様に吸着した部分を通して、*E. Coli* の中にファージの遺伝決定物質が入つてゆく。このことは吸着の直後、ワーリング・ブレンダーで *E. Coli* とファージとを分離しても、*E. Coli* の中にファージの子供ができることから分る。最後に第 21 図 (c) に示すように、*E. Coli* の中に入った遺伝決定物質は子供ファージをつくり、その子供ファージは *E. Coli* をとかしてでてくる。

そこで DNA が遺伝決定物質であることを示す実験について述べる。大腸菌 (*E. Coli*) を ^{32}P を含む培地で培養し、これに T_2 ファージを感染させると、ファージの DNA を ^{32}P で label することができる。この label されたファージを普通の培地で育つた *E. Coli* に感染させ、吸着直後ワーリングブレンダーで攪拌しファージと菌とを分離して、その放射能を調べてみると、 ^{32}P の放射能の 95% が感染を受けた菌体内から検出された。次に同じ方法でファージの蛋白を ^{35}S で label し、そのファージを *E. Coli* に感染させて同様の処理をして調べてみると、 ^{35}S の放射能のほとんどはぬけがら (ghost) の中から見つかった。この事実は T_2 ファージの遺伝決定物質は DNA であることを示している。

ハ) タバコモザイクウイルス (TMV) の遺伝決定物質が RNA であることの証明

ウイルス (Virus) においては、RNA が遺伝決定物質である場合がある。実際今までに知られているすべての植物に寄生するウイルスと、動物ウイルスのあるもの、例えばポリオ ウイルス (polio Virus)、インフルエンザ ウイルス (influenza Virus) 等は、遺伝決定物質として RNA をもつ。ところで TMV (タバコモザイクウイルス) のコート蛋白質と RNA をばらばらにしてその蛋白質を処理しても、増殖に関して何の変化も起らない。ところが核酸 (この場合は RNA) を HNO_2 で処理すると、突然変異を起すほか、RNase で処理すれば、感染性がなくなる。更に積極的に RNA だけで感染増殖させ

ることができることから，タバコモザイクウイルスの遺伝決定物質は RNA であることが分る。

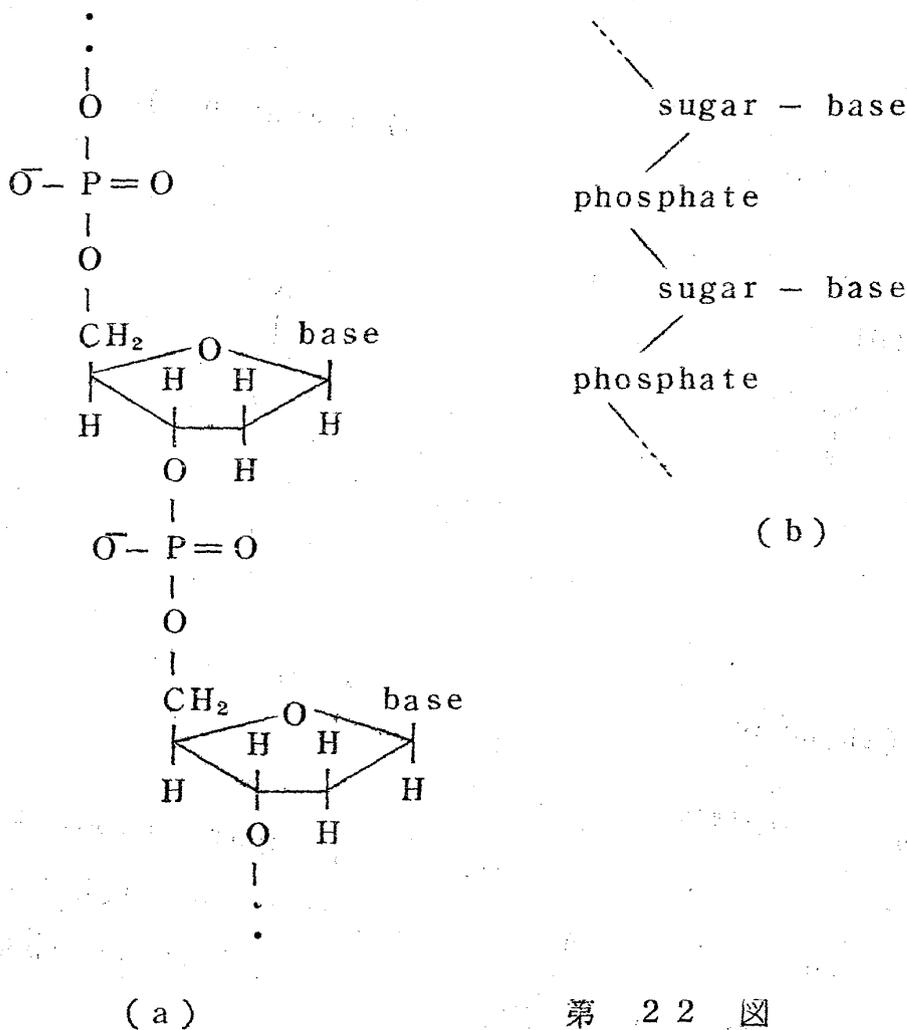
§ 2. 核酸の化学構造

核酸には DNA (deoxyribonucleic acid) と RNA (ribonucleic acid) とがある。

先づ DNA から説明する。

(1) DNA の化学構造：

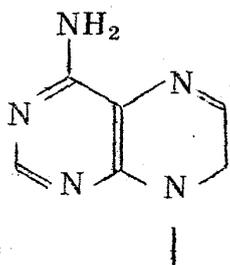
DNA は第 22 図 (a) に示すような構造式をもつ高分子 (polymer) で，同図 (b) で示されるように，塩基 (base) のついた五炭糖 (sugar) がリン酸基によつて結ばれている。DNA の base は 4 種類あつて，それ



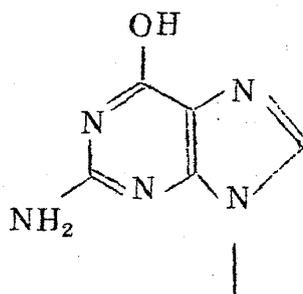
第 22 図

福留秀雄

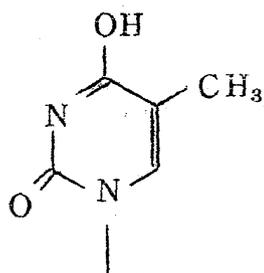
らは purine である A (adenine) と G (guanine), それに pyrimidine である T (thymine) と C (cytosine) とである。それらの構造式を第 23 図に示す。



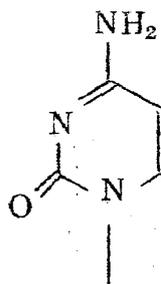
A (adenine)



G (guanine)



T (thymine)

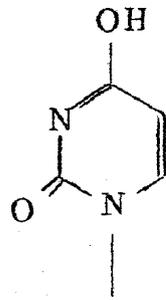


C (cytosine)

第 23 図

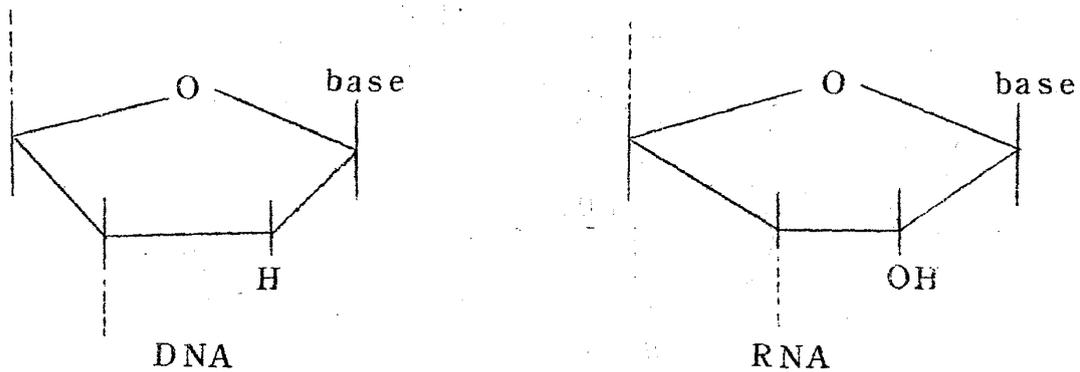
(2) RNA の化学構造

RNA はほとんど DNA と同じ構造をもつが, sugar の構造が 1ヶ所異なることのほか sugar につく base として, thymine の代りに, 第 24 図に示すような構造をもつ U (uracil) が入るところだけが DNA と異なる。sugar の構造の違いを示すと第 25 図の様である。



第 24 図

U (uracil)



第 25 図

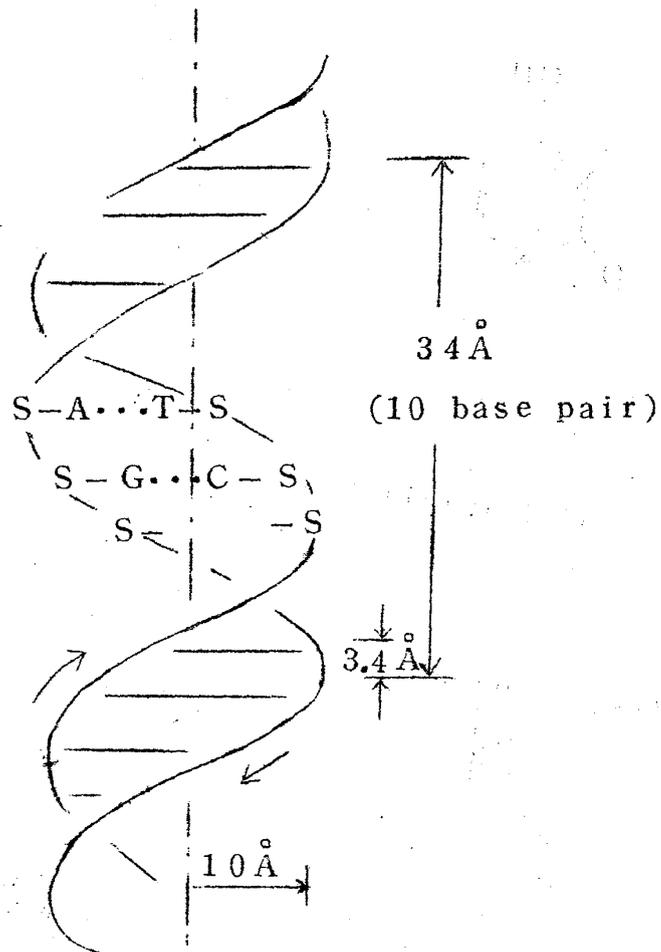
§ 3. DNA の立体構造

(1) DNA の Watson Crick Model (1953)

DNA の立体構造は Watson - Crick により, DNA 結晶の X線解析における pattern をもとにして考え出された。

DNA 分子結晶のとりうる configuration には, A, B, C の 3 態あつて, 相対湿度 75% の時は, A configuration (単斜晶系) をとり, 相対湿度 92% の時は B configuration (六方晶系) を, 相対湿度 44% の時は C configuration (斜方晶系) をとる。そして溶液中で DNA 分子のとりうる configuration は B configuration に対応する。

Watson と Crick の考えた DNA 分子のモデルは, 第 26 図に示すよ



第 26 図

うなものであつて、

- (イ) 2本のラセンが同軸状にあり、
- (ロ) 右巻きで、各分子鎖は反平行にはしつている。
- (ハ) 2本の鎖は軸に垂直な塩基対 (base pair) の水素結合 (hydrogen bond) で結ばれ、A-T, G-C 対のみが許される。
- (ニ) base pair はラセンの内側、リン酸基は外側にあつて、sugar は base にほぼ垂直になつている。

A (adenine) と T (thymine), G (guanine) と C (cytosine) のつくる hydrogen bond の様子を第 27 図に示す。

このような Watson Crick のモデルの出る以前に、例えば Pauling 等が別の DNA モデルを提唱している。Pauling は、3本の strand がリ

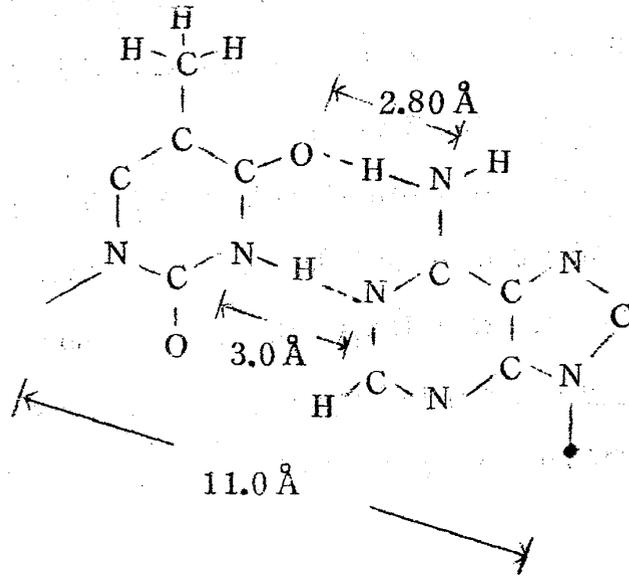
ン酸基の酸素を通じて水素結合をつくつていて、base は外側に向つてつき出ているというモデルを考えたが、Watson Crick モデルではリン酸基が外側にきていて、base は内側に入っている。

Watson Crick が考えたモデルの根拠は、X ray pattern とすべての生物の種についての base 組成の比が

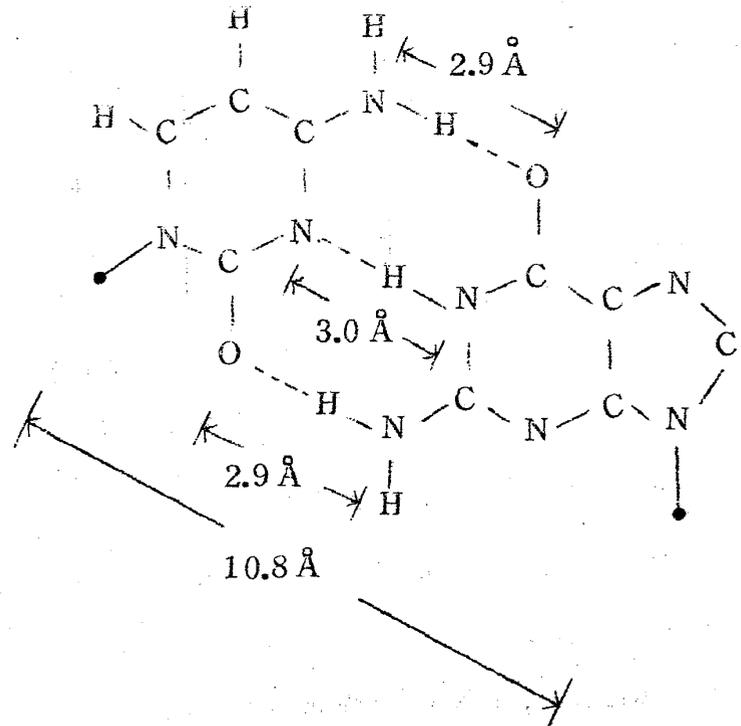
$$A : T = 1 : 1,$$

$$G : C = 1 : 1$$

であることにある。又 base pair が chain の内側にある事の証拠は、electrometric な titration data である。水素結合の水素を取り去れるかどうかということを、溶液の PHを変えて調べた実験によると、base はイオン化しにくく、リン酸基の酸素はイオン化しやすい。こ



T...A 対

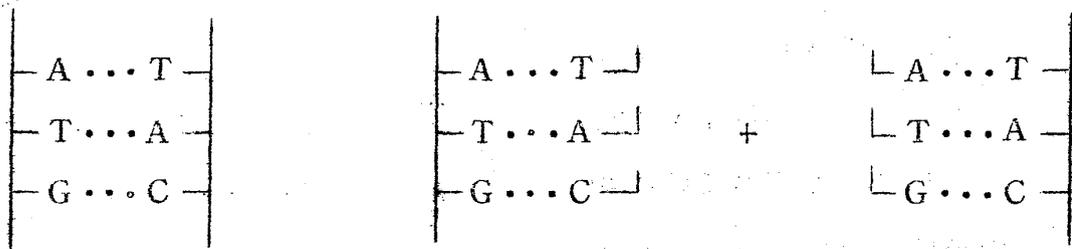


C...G 対

これは Pauling のモデルでは説明出来ないが, Watson Crick モデルでは当然考えられる性質である。このことは Watson Crick モデルの方が正しいことを示している。

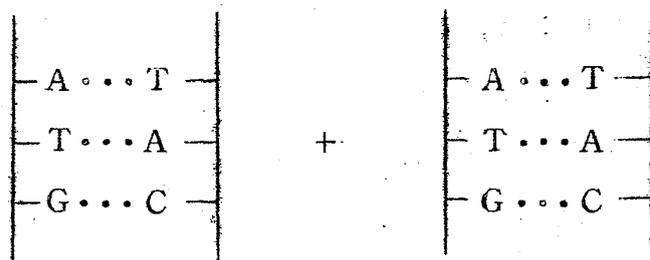
(2) Watson Crick モデルの生物学的な意義:

Watson - Crick モデルから直ちに説明される生物学的機能を述べると, 第一に 2 本の DNA chain は complementary であるので, DNA は自己複製 (replication) し得る。即ち第 28 図 (a) のような 2 本の chain から成る DNA 分子が, 図 (b) のように別々の chain に分れ,



(a)

(b)



(c)

第 28 図

その各々の chain が図 (c) の様に, 新しい対を形成して 2 組の DNA 分子に増殖する可能性をもつ。実際 DNA は適当な酵素の存在の下で, 自己複製を行う。

第二に, DNA の特異性をきめるものは, 四つの bases の並び方しかない。このことは, 遺伝情報 genetic information は 4 bases の並び方で表現されているということの意味する。従つて, このモデルにより形質

発現の問題を、分子のレベルで次の様に定式化することができる。即ち遺伝情報に従って生物の形質が発現してくる過程は、この四つの核酸の base でかかれた暗号が、アミノ酸の 20 種の文字で書かれた蛋白質の構造に翻訳される過程としてとらえることができ、形質発現の問題はこの翻訳の物質的過程を明らかにすることにあるといえる。

第三に、4 bases で書かれた遺伝暗号が増殖の際、何らかの原因で誤読されるということによつて、mutation が説明できる。

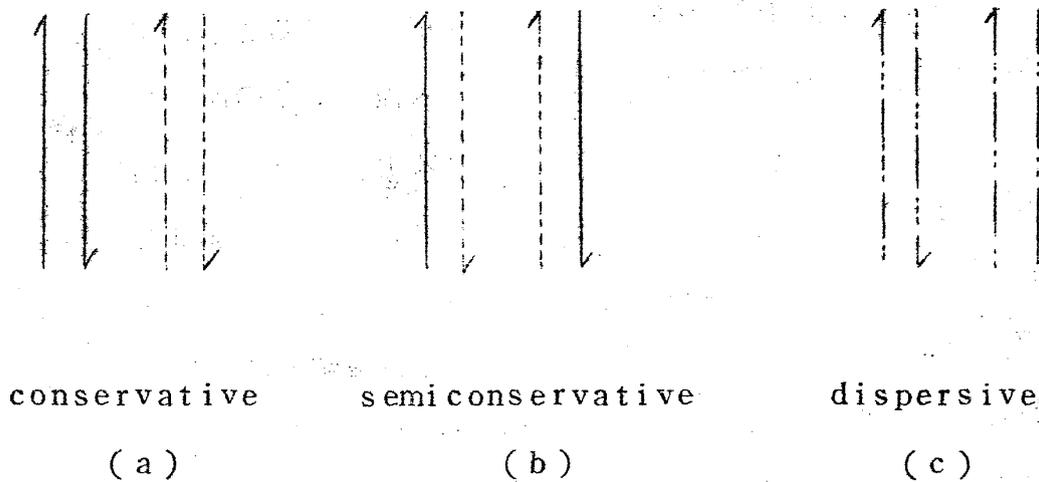
(3) 単位細胞 (又は 1 個の virus) 当り、DNA がどれだけ含まれているかをいろいろの種について示すと第 6 表の様になる。

第 6 表

種	塩基対 (base pair) の数
minute phage & RNA virus	~ 6×10^3 (1分子)
T phage	~ 2×10^5 (1分子)
bacteria	~ 10^7 (1分子?)
カビ	~ 4×10^7
シヨージョーバエ	~ 8×10^7
マウス	~ 5×10^9
トウモロコシ	~ 7×10^9
人間	~ 10^{10}

§ 4. DNA の自己複製 (replication)

DNA が自己増殖をする際、親の DNA が子供の DNA の中にどのように分布するかを考えると、その可能性として第 29 図に示すような 3 通りの場



conservative

semiconservative

dispersive

(a)

(b)

(c)

—————→ 親の DNA chain

-----→ 新たに合成された DNA chain

第 29 図

合が考えられる。第29図の(a), (b), (c)のような分布になるDNAの増殖をそれぞれ conservative, semiconservative, dispersive であるという。

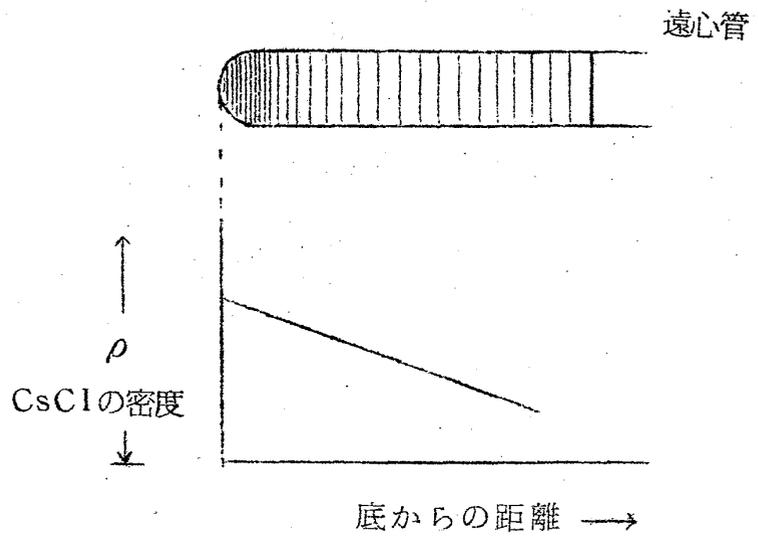
Watson Crick モデルからは semiconservative な増殖が結論されるが、直接実験によつても、はたして実際の増殖は semiconservative に行われていることが示された。

(1) Meselson - Stahl の実験:

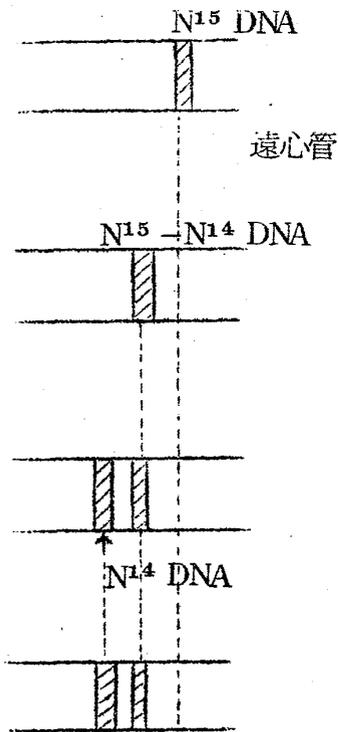
E. Coli(大腸菌)を $N^{15}H_4Cl$ を含んだ培地で育てると、 N^{15} DNA (重い DNA) をもつた E. Coliが出てくる。この N^{15} で labelされた E. Coliを親とし、これを $N^{14}H_4Cl$ 培地で1回増殖させた子供を第1代とする。2回目の増殖を行つてできたものを第2代、3回目の増殖を行つてできたものを第3代等とする。このようにして増殖させた E. Coliの各世代の DNAをとつてきて purify し、これを第30図に示されるような Cs Cl の密度勾配をもつ遠心管の中で約10万gの遠心力で遠沈させる。DNA分子は自分の密度と等しい Cs Cl の密度のところで止るので、各世

代の DNA 分子のとまる位置の違いから、それら分子の密度に違いがあれば、それを定量的に比較することができる。各世代の DNA の遠沈の結果を第 31 図 (a) に示す。但し、ここでは右方向に遠心力の方向をとつてある。

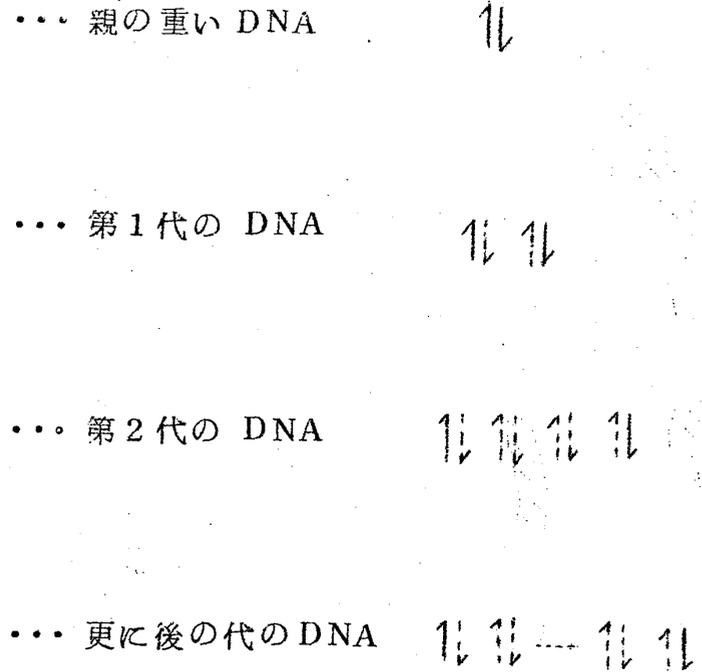
この実験から、第 1 代の DNA は重い DNA と軽い DNA が半分づつ合わさつ



第 30 図



(a)



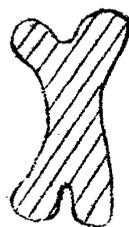
(b)

第 31 図

てできた DNA でなければならない。従つて増殖は conservative ではない。第 2 代以後は重たい DNA と軽い DNA とが半分づつ合わさつてできた DNA が第 1 代の場合と同じ程度である他は、軽い DNA ばかりであるから、増殖は dispersive でもないことを示している。実際第 31 図 (b) に示す様に、semiconservative な増殖を考えれば、実験結果は直ちに説明出来る。即ち、増殖は semiconservative であることが分つた。この事実は Watson Crick モデルを支持している。

(2) Taylor の実験：

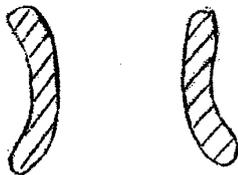
H^1 の代りに、tritium H^3 の入つた H^3 -thymine を含んだ培地で、ソラマメの根端細胞を増殖させ、12本の染色体を H^3 で label する。第 31 図 (b) から分るように、第 2 代以後には thymine として H^3 -thymine をもつ 2 本の strand から成る DNA ができてくる。それを H^1 thymine の培地へ移しかえて、染色体だけ分裂させ、細胞は分裂させない物質 (コルヒチン) を加え、その分裂する染色体を写真乾板の上において H^3 の放射能で写真をとる。このようにしてとつた写真の中から、染色体が semi-conservative な増殖をしていると思われる第 32 図 (a) の様な



(1)



(1)



(2)

(2)'

(a)



(2)



(2)'

(b)

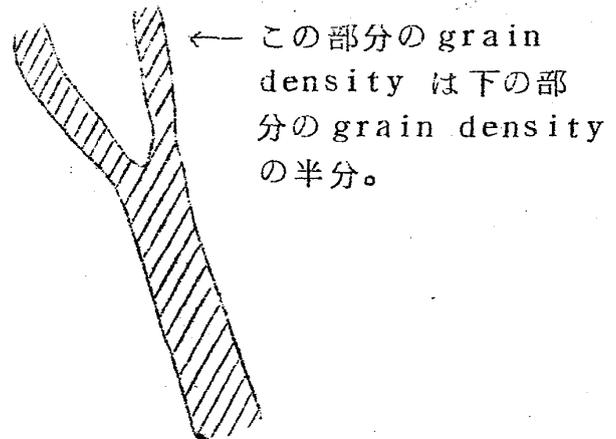
第 32 図

写真がみつかった。第32図(a)の(1)は、第32図(b)の(1)のように、 H^3 -thymine をとり入れる増殖をしている最中であり、第32図(a)の(2)、(2)' は、(b)図の(2)、(2)' のように第1代がまた増殖をくり返しているものと解釈される。そうすると、 H^1 -thymine しかないので、放射能が半分にしかならないということがよく説明される。

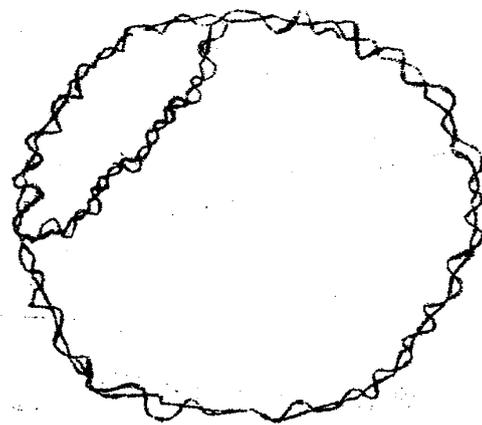
同じように DNA の semiconservative な増殖を示す他の例を示そう。大腸菌を H^3 -thymine で label し、その大腸菌を普通の培地に移して育て、生長のいろんな段階でとり出してつぶし、DNA の鎖をきれないようにとり出して、写真かん板の上において写真をとると、その中から第33図のような写真がみつかった。この

写真においては、フォーク状をした DNA の枝の部分は、枝分れする前の半分の大きさになっている。これは H^1 -thymine は新しい strand にだけ入ってゆき、増殖された DNA は半分だけが放射能をもっていることを示している。即ちこのことは、増殖が semiconservative であることの直接的証明になっていると考えられる。その際、大腸菌の DNA がリングになっていると思われる第34図のような写真もとれた。

ところで、大腸菌の DNA がリングになっているのではない



第 33 図

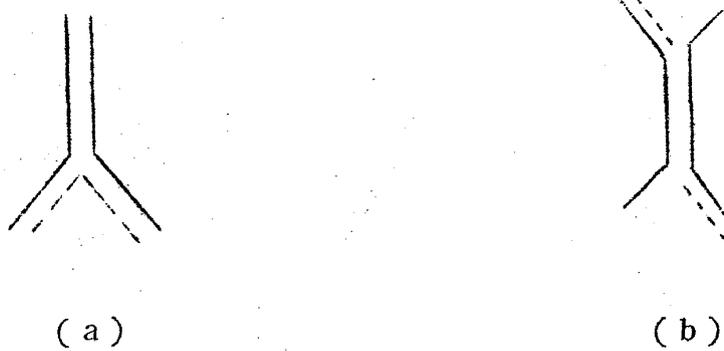


第 34 図

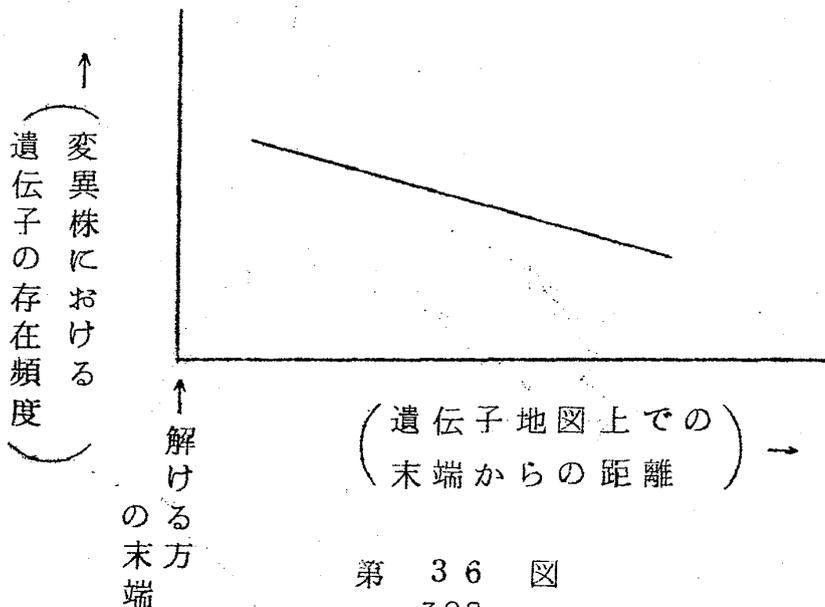
かと思わせる現象は遺伝学的な解析からも分つていた。実際、大腸菌のいろんな mutant について遺伝子地図をつくつてみると、非常に離れた2つのマークは再び linkする。これは DNAがリングになつていてと考えることによりはじめて説明される。

最近、大腸菌に寄生する phage $\phi \times 174$ の DNA はすべての種の DNA と異り、single strand で、かつリング状になつていてと考えられる写真がとれた。これは DNA 分子がリングになつていてを示す一つの直接的な証拠である。

DNA は semiconservative な増殖をすることが分つたが、そのような増殖における DNA のほどけ方の可能性としては、第 35 図 (a), (b) のような二通りが考えられる。第 33 図に示した増殖の際の写真からは、増

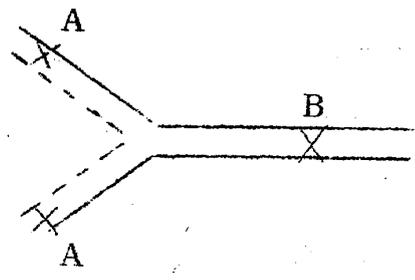


第 35 図



第 36 図

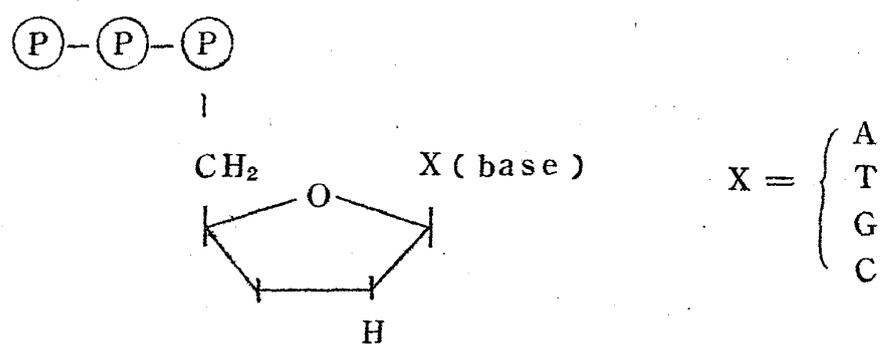
殖は一方向に進行しているものと思われる。一方向の増殖を支持する他のデータとして、形質変換における mutant genetic marker の存在頻度に遺伝子地図上で第36図に示すような gradient が存在する事実がある。高等動物では DNA 増殖は階段的に行われるが、大腸菌ではただらと増殖が行われる。増殖のある段階でマークAが図のように2つ存在する確率は、第37図からも分るように、早くから2組の double strand に枝分れしている先の方ほど、大きい頻度でおこるはずである。このことから上記の事実が説明される。



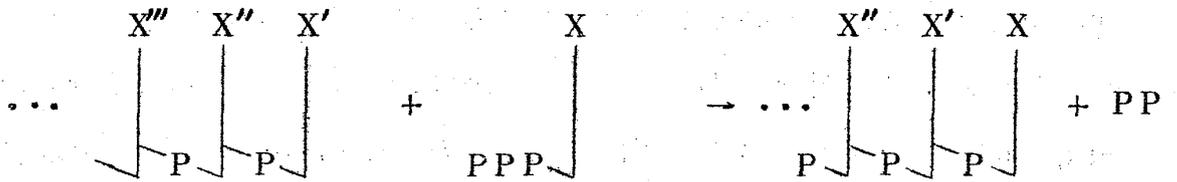
第 37 図

(3) 最後に、DNA が上のような semiconservative な増殖を行っているもう1つの決定的な証拠を述べておく。

DNA polymerase (Kornberg が E.Coli から、はじめてとり出した DNA を増殖させる酵素) と、第38図のような構造をもつた4種類の deoxy X Tri-phosphate (dXTP) と、primer DNA とをまぜてやると、in vitro に(試験管内で) DNA の合成が行われる。その反応式を第39図に示す。その際、double strand の DNA を



第 38 図



第 39 図

primer とすると, primer と同じ base 組成の DNA ができてくる。それに対し, ϕ X174 の single strand の DNA を primer に用いると, それに complementary な組成をもつ DNA ができてくる。このことも増殖の過程が semiconservative であることを示す。

これまでに挙げた semiconservative な増殖の data から, Watson Crick モデルによる増殖のスキームは大体正しいということが結論される。(ノート記録. 谷川義昭・中野藤生)