講議ノート

分子生物学（V）

福　留　秀　雄（京大基研）

§6　蛋白合成系の諸問題　1　kinetics & mechanism

蛋白合成は前にも述べた如く、細胞から必要な成分だけをとり出して、それ等を混合し incubate することによつて試験管の中で行う事ができる。（synthesis in vitro）

蛋白合成に必要な素材を次に列挙すると

1) amino acid charged s－RNA；

これはアミノ酸をくつつけたs－RNAでこれをもつと素材に分けてみればアミノ酸（以下a，aと略記することがある）とそれの activating enzgme 及びs－RNAで、それ等を適当な条件の下に混ぜ合せれば出来る。

2) transfer enzyme ；　activating enzgme とは違つた enzyme で、これは今のところ部分的には purity されているが結晶化迄にはいたつていない。Transfer enzyme は a，a．charged s－RNAが ribosome と相互作用して peptide 合成を行う反応を catalyse する。

3) Co－facter ；

低分子の co－facter としてGTP，これは今のところどういう働きをしているかわからない。

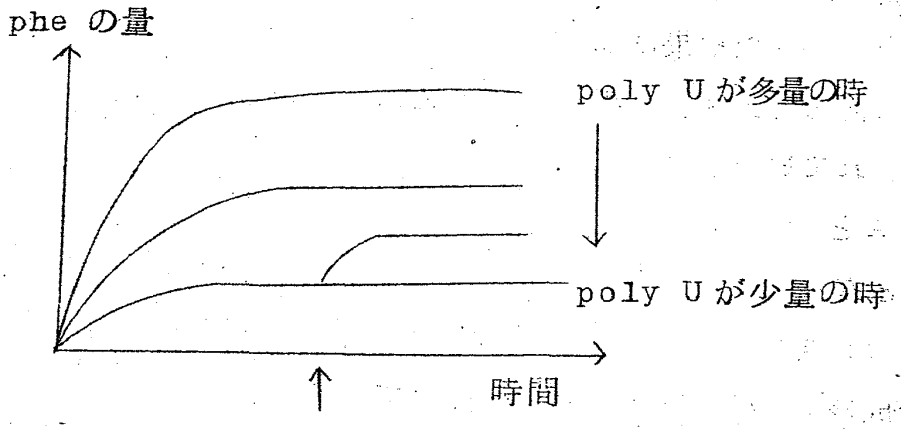
M_g^{++}；M_g^{++} の濃度をあまり下げると ribosomeが解離してしまい更に下げれば ribosome 自身が蛋白とRNAに分離してしまう。又核酸の2次構造を維持するためにも必要である。（核酸の phosphate が負にイオン化しやすい為2価の陽イオンでこれを防ぎ2次構造を維持する）

5) ribosome

6) m－RNA

これ等を混ぜ合わせる事により蛋白合成を行わせることが出来るがその時入れるm－RNAが異なれば、polypeptide にとりこまれるアミノ酸が 異

なり合成される蛋白が違つてくるということになる。m－RNAとして Nierenberg の発見した poly U或いは poly A等の合成核酸を使うことが可能になり研究は一段とやりやすくなりそして進歩した。次にこれ等の系での合成の kinetice を眺めてみる。m－RNAとして poly Uを用いて poly phe (phenyl alanine) を合成する場合、横軸に時間を縦軸に出来る poly phe の量 (C^{14} phe の count) をとると第８３図の如くなる。或る時間たてば phe の合成は飽和する。そしてその飽和の値は poly U の濃度が多い程多くなつている。又、図の中で矢印は既に合成が止つている時点である

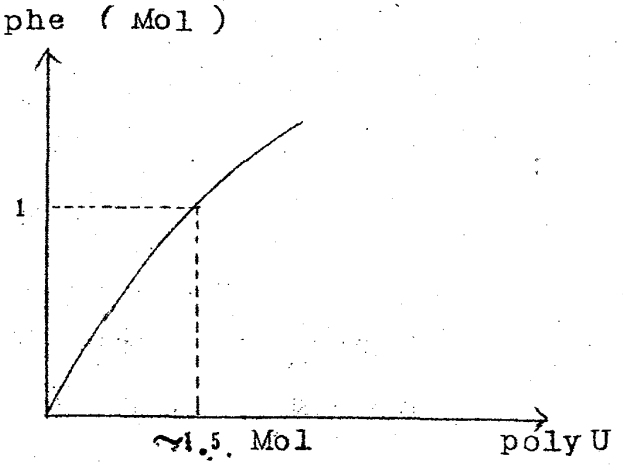


(各曲線のパラメータは入れる。 poly Uの量)

第８３図

が、そこでもう一度 poly Uを入れてやると又合成が行われることを示している。これらの結果から poly Uは catarytic には使われてはいないことがわかる。若しそうすると poly Uの 濃度によりこれ程変化するとは考えにくい。

次に或る時刻での poly Uの濃度と pheの量との関係を調べると第８４



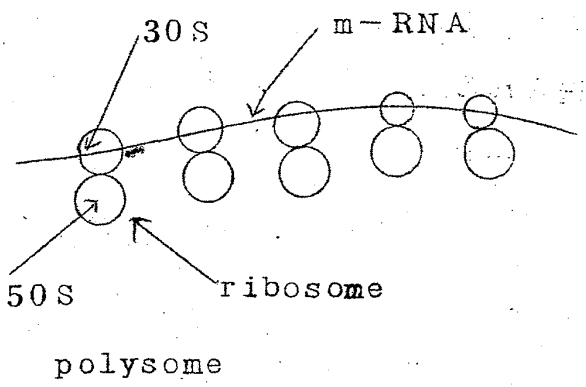
(poly Uの分子量は一定していないので U－residue の数を横軸にとる。
~1.5 Mol については本文参照)

第８４図

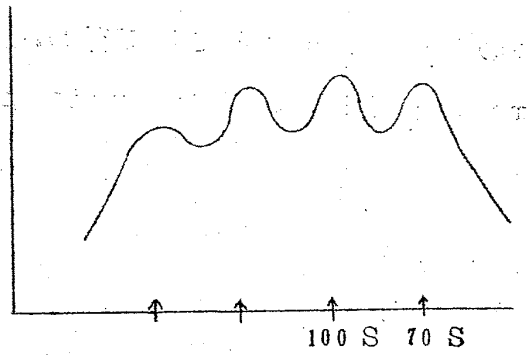
図の如くなる。これは polyUが蛋白合成（今は poly phe ）に際して、何回位使われるかというめやすを提供する。つまり今、核酸の code が triplet 構造を持つとすれば３Ｕに対して少くとも１つの phe が対応する。若し polyUが messenger として１回だけ使われてつぶれてしまうものとすれば polyUの濃度 3Mol に対し１Mol の poly phe が出来るような勾配を示す殆だが実験によればほゞ 1.5Mol に対し１Mol の合成が行われているらしい。このことから polyUは２乃至３回は使われている事がわかる。（初期の実験でははつきりした結果が得られなかつたが、実験条件がよくなつて来て、上のような結果になつた。）勿論生体の中でこのように働いているかどうかは何とも云えない現状で、例えば hemoglobine の messenger は何回も使われているのであろうと云われる。

(2) m－RNAと ribosome の相互作用

次に問題となるのは、m－RNAが ribosome の上にやつてきて、どのように complex を作り template として働くかということである。それをみる為に合成核酸と ribosome とを混ぜてやると、(i) m－RNAは３０Ｓ ribosome と結合するが５０Ｓの粒子とはつかない。(ii) m－RNA がちやんとした２次構造を持つていると ribosome にはくつつかない。つまり RNA の base に遊んでいるものがあることが必要らしい。例えば polyA は可成りきちんとした２次構造を時つているのでつきにくいが polyAのかわりにUの量を色々変えてAと混ぜたAとUの copolymer を messenger としてやるとこの co－polyA－UはA：Uの ratio が大きいものほど２次構造がきちんとしており、それに平行して ribosome に結合しにくいことがわかつた。又 polyA－polyU complex はきちんとした double belix を持つが、これも ribosome にはくつつかないことが知られ いる。だから恐らく m－RNAの遊んでいる base が３０S－ribosome と結合するのであろうと推測される。(iii) １つのm－RNAは１つの ribosome にくつつくだけでなしに多数の ribosome とひつついていることがみつけられた。これは最初赤血球の細胞をおだやか (mild) につぶしたものの電子顕微鏡写真で明らかになつた。それによると第８５図の如く ribosome が珠数つなぎになつている。又密度勾配中の超遠心の様子は第８６図の如く、普通７０Ｓ



第８５図



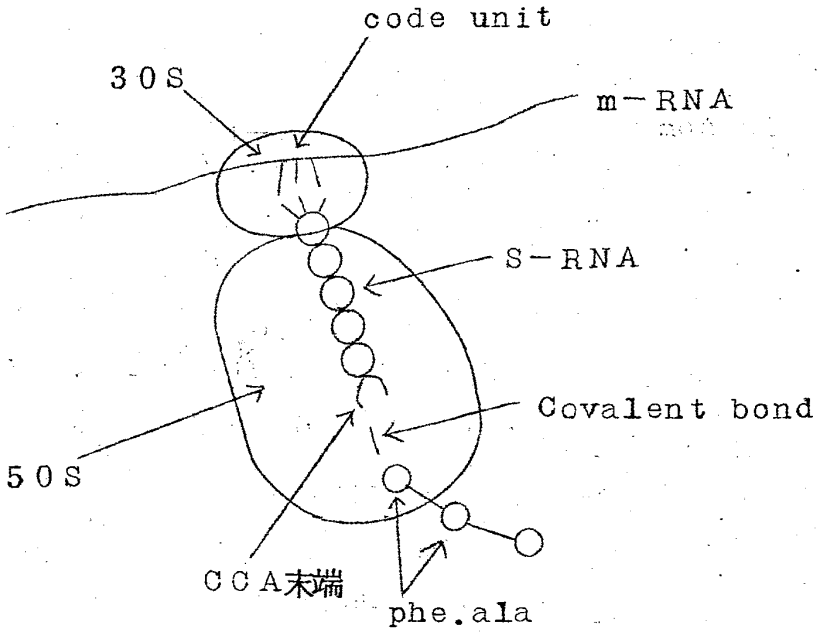
第８６図

，１００Ｓの外に今のようにおだやかに処理されたものには、それ以上の沈降定数を持つ。つまり、７０Ｓが２つ或いはそれ以上ひつついたものに相当する peak が現れた。この様に messenger によりつながつた ribosome のことを polysome (polyribosome)と呼んでいる。更に想像をたくましくした話では第８５図に於て３０Ｓと結合しているｍ－ＲＮＡがすべつてゆきながら、peptide chain を作つてゆくというのがある。

(3) peptide chain の形成の場

次に蛋白はどんな場所で出来るかが問題となる。これもやはり polyU dependent poly phe 合成で調べられている。つまり phe を label しておいて ribosome が２つの subunit に分かれるように遠心にかければ３０Ｓか或は５０Ｓの何れに放射能があるかを知ることが出来る。(i)そうすると peptid (poly phe) は５０Ｓの ribosome の方についていることがわかつた。又 (ii)合成の途中の段階では出来てきた poly phe にＳ－ＲＮＡが１つくつついていることもわかつた。以上のことから ribosome の上での peptide の合成の様子は第８７図のようであろうと考えられる。Ｓ－ＲＮＡのＣＣＡ末端と合成中の peptide の phe 結合は covalent bond であろう。ｍＲＮＡ遺伝情報は３０Ｓの上にあるＳ－ＲＮＡの他の端で読みとられる。次に更に peptide chain をのばすのは別のＳ－ＲＮＡがやつてきてｍ－ＲＮＡのその隣の code unit の遺伝情報を読みとり transfer enzyme の働きでもとのＳ－ＲＮＡと peptide の結合が切れると共に新しくやつてきたＳ－ＲＮＡに結合しているアミノ酸が peptideに結合されて

一つのびるというようにして行われるのであろう。その時m－RNAは ribosome の上で1つの code unit だけ送られることになる。



第 8 7 図

もう少し想像をたくましくすると ribosome が二つの subunit からなつていることは送りの機構に関係があるように思われる。S－RNAは約70個の base からなり、それが第87図のようにdouble helix をつくると35個の base pair になる。double helex をつくつた時の base pair の距離からみてこの時S－RNAの長さは約100Aとなり大体 ribosome の大きさと合うこともこのモデルに都合がよろしい。

(4) peptide ののび方

次にアミノ酸が蛋白にとりこまれてpeptide chainが作られる時N端或はC端の何れから始まるかという問題がある。今のところN端から、C端へのびてゆくと考えられている。これは次に述べる hemoglabine (Hb) 合成の場合について確かめられた。Hb のN端はValine というアミノ酸である。又chain の中程にも valine がある。そこでHb 合成を行う時 途中の或る時間に放射能を持つC^{14} Valine を pulse 状に入れてやり、出来るHb の中でC^{14}－ Valine が末端にいる割合と中程にいる割合とでどちらが多いか

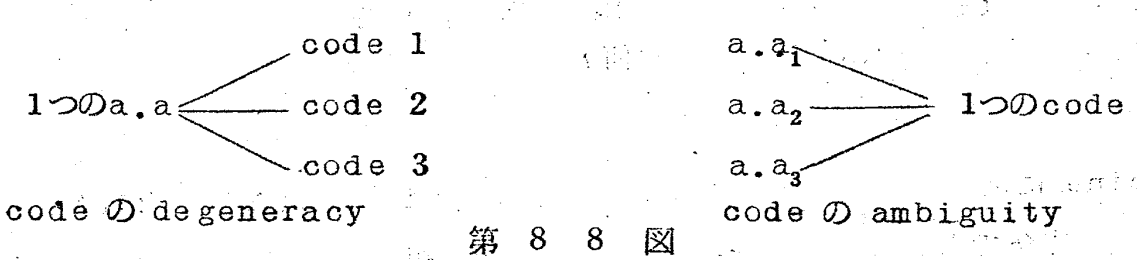
を調べてみる。もしN端からのびるのであるとするとC^{14} Valine を入れるその時期にはHb は既に途中の段階までchain としてのびて来ているものの方が、これから始まつて作られるものよりも多いであろうから、C^{14} Valine のいる場所はHb peptide chain の中程にいるものの方が、末端にいるものよりも多いと考えられる。実際Hb の放射能によるlabel のされ方にgradient が出来る事が見出された。このような事実からpeptide chain はN端からC端へとのびてゆくと考えられる。

§7 蛋白合成系の諸問題 II Coding

(1) Coding の問題

最後に蛋白にとりこまれるアミノ酸に核酸のどういう情報が伝えられるかという所謂Coding の問題を考えよう。これには前に述べた様に合成核酸がm－RNAとして有効に働くことがわかつているので色々のbase ratio を持つ合成RNA（base は random につながつたpolymer）を用いてこれとribosome 及び放射能でlabel した種々のアミノ酸を一緒にして、所謂cell free system で蛋白にとり込まれるアミノ酸のcode を推定することが出来る。その際triplet code だとして例えばUUU或はUUAという配列に対応するアミノ酸がどれだけとり込まれるかは、最初に入れる合成核酸のそのような配列をした組の数（これはbase ratio とそれがrandom sequence という仮定から計算可能）に比例するのであろう。このようにして、種々のアミノ酸のcode が実験的に研究された。現在殆んどのアミノ酸についてcode がわかついてる。その一部を第8表に挙げる。ところでこのようにしてわかつたアミノ酸のcoding を眺めると、次のような特徴を見出すことが出来る。 (i) code は大巾にdegenerate している。つまり1つのアミノ酸に対して2ケ以上のcode が存在しているものがある。

（第88図）



code の degeneracy　　code の ambiguity

第 8 8 図

第 8 表　アミノ酸の codes

degeneracy		ambiguity	
アミノ酸	triplet code	triplet code	アミノ酸
alanine	2C1G (1U1C1G)	3A	lys
arginine	2C1G, 2A1G	3C	pro
asparagine	2A1C, 2A1U	3G	
asparatic acid	1G1U1A,	3U	phe
cystine	2U1G or 2G1U	2A1C	asn, thr
glutamic acid	2A1G (1A1G1U)	2A1G	arg, glu, gln, (lys)
glutamine	2A1C, 2A1G (1A1G1U)	2A1U	asn, ileu, (lys)
glycine	2G1U, 2G1A	2C1A	his, thr, (pro)
histidine	2C1A	2C1G	ala, arg, (pro)
isoleucine	2U1A, 2A1U	2C1U	ser, (pro)
leucine	2U1G, 2U1C・2U1A, 3U	2G1A	gly
lysine	3A, (2A1G) (2A1U)	2G1C	
methionine	(1U1G1A)	2G1U	cys, gly, try
pherylalanine	3U	2U1A	ileu, lew, tyr
proline	3C, (2C1U) (2C1A) (2C1G)	2U1C	leu, ser
serine	2U1C, 2C1U, 1U1C1G	2U1G	cys, leu, val
threonine	2C1A, 2A1C	1A1C1G	
tryptophan	2G1U,	1A1C1U	
tyrosine	2U1A	1A1G1U	asp, (met) (glu), (gln)
valine	2U1G	1C1G1U	ser, (ala)

（注１）under line は略記号で、右表はそれが用いてある。
（注２）gln, asn は夫々 glu−NH_2, asp−NH_2 とも書かれる。
（注３）例えば 2C1G は CCG, CGC, GCC の何れ

例えば leucine には 2U1G, 2U1C, 2U1A の３つ、glycine には 2G1U, 2G1A の２つと云つた具合である。このことはＤＮＡの base 組成が例えば bacteria

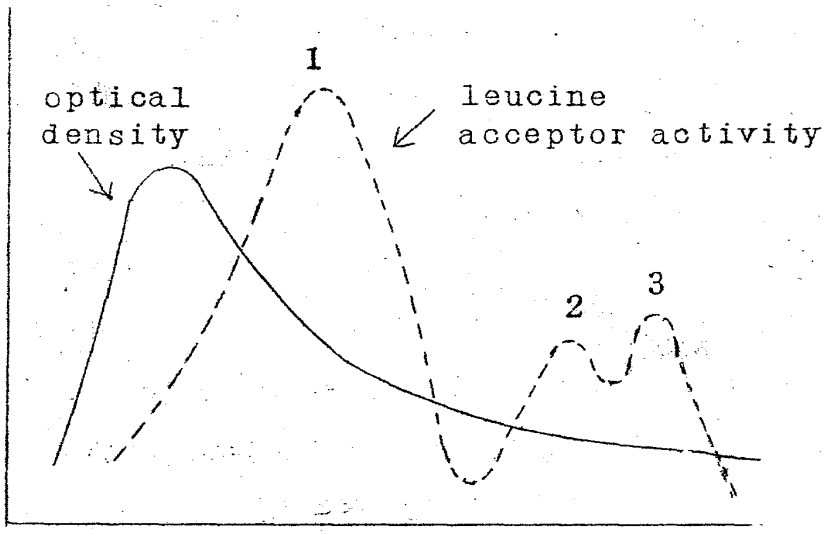
の種類によつて広範囲に変化しているのに、それらの蛋白のアミノ酸の組成はあまり変化していないという事実と関係があるように思われる。 (ii)次にcodeは多分unversalつまり種によつては変らないということである。色々な生物の種から蛋白をとり出し その中のあるアミノ酸、例えばphenylalanineがある種では3U(E-coliの場合には3Uである) 又違う種では何か他のtriplet baseというふうになつていればunversalではないが、今迄調べられた範囲では多分unversalらしい。実験的には蛋白合成の成分であるm-RNAを例えばpolyUそれからS-RNAを色々違う種からとつて来て合成を行なわせる時、一方でm-RNAの情報を読み他方でアミノ酸をchargeするS-RNAが色々異なる種からもつてきたものであつても 大体に於いて同じアミノ酸をとりこむことが示されている。勿論多少の変動はあるのではあるがそれは少ないであろう。 (iii) 次にambigous codeというのが今迄調べられたところではあるということ。これは(i)で述べたdegeneracyとは逆に1つのcodeが2つ以上のアミノ酸を決定するということで(第88図) 例えばUUUはphenyalanineをcodeするが、どうもleucineをも作るらしいことがわかつている。これは試験管内での実験で生体の中ではどうなつているかよくわからない。この点は今後の問題であろう。

(iv) 最後の問題として、non sense codeがあるかということ。つまり20種のアミノ酸に対し核酸の4種のbaseから考えられるtripletの数は64，そこの中には多くのdegeneracyがあるが(例えば3つ位いづつのdegeneracyがあれば20種のアミノ酸にほぼ対応するけれど)その中の或るcodeはどのアミノ酸にも対応しないというようなnon sence codeがあるかという問題は、今のところ未だよくわかつていない。

(2) codeのdegeneracyとS-RNAのdegeneracy

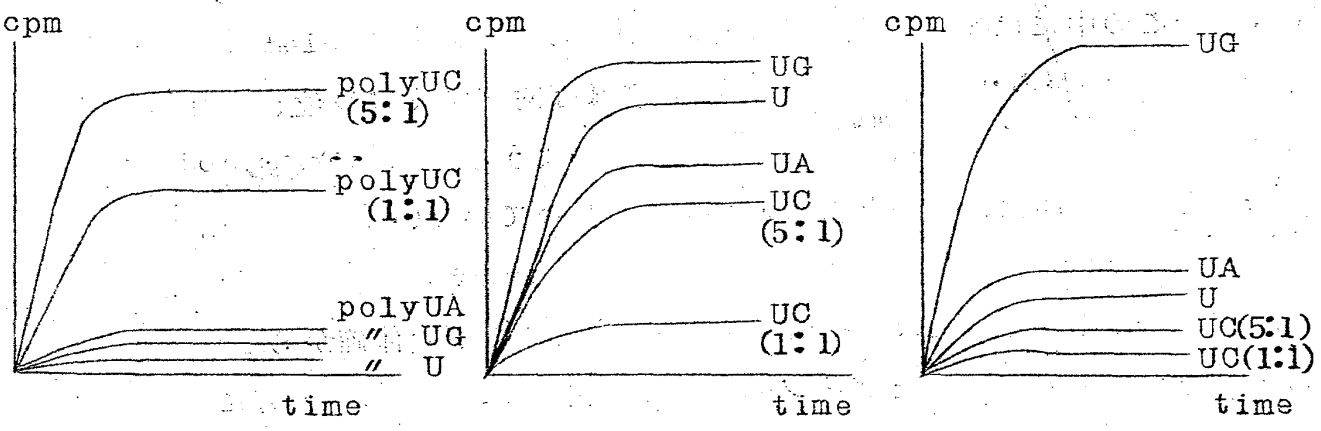
今も述べた如くcodeにはdegeneracyがあることが大体確からしいとすると、それではm-RNAとアミノ酸の間に介在するS-RNAの方にもdegeneracyがあるかということが問題になるが、これは、leucineの場合にそうであることが確かめられた。(唯特定のアミノ酸に対応するS-RNAだけをpurityするということは非常にむつかしいことで10%の程

度迄しか行われていない。最近になつ serine を決めるS－RNAは purity できたということである。）カラムのクロマトグラフ法（counter current 法）による leucine S－RNAの分離をすると第８９図の如くなる。横軸は流出液の分画を示す実線は全体のＲＮＡについての紫外吸収量（opticaldensity），点線は leucine に対する結合能でそれは３つの peak を示す。各 peak に対応する分画のS－RNAをとり出してアミノ酸のとりこみの実験をすると次の如くなる。先づpeak１の場合には、m－RNA として



第８９図

polyＵＣを用いＵ．ＣがＵ：Ｃ＝５：１の場合が leucine のとり込みが一番よくＵ：Ｃ＝１：１のものがその次によく polyＵＡ，polyＵＧ，polyＵ 等を用いたのでは非常に悪いことがわかつた（第９０図 peak １）



peak 1　　peak 2　　peak 3

第９０図

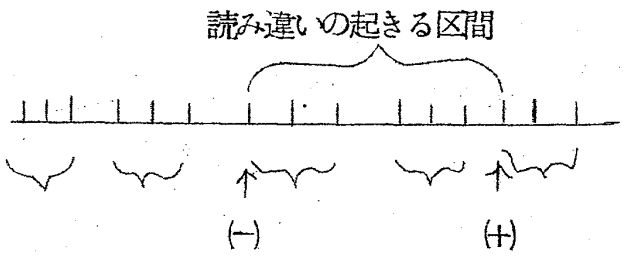
従つてpeak 1のS－RNAはcodeとしてUUCに対応するleucineに活性を示すものであると考えられる。同様にpeak 2及びpeak 3に対して得られた結果は第90図の如くなつた。この図から先づpeak 3の場合にはpoly UGが圧倒的にとりこみが多く、その他のものでは非常に悪いことがわかる。従つてこれはUUGのleucine codeに対応したS－RNAであろうと考えられる。peak 2の場合ははつきり決め難いが、第89図にみるようにpeak 2と3ははつきり分離していないことから第89図のpeakに於けるpoly UGのとりこみがよいようにみえるのはpeak 3の方の成分が働いていると考えられる。それを別にすればpeak 2に対応するS－RNAはUUA或はUUUのlencine codeに対応するものと考えてよい。

今迄はin votroでの話であつたが、次には少し変つてcodingの問題に対して遺伝学的手法を用いたapproachの話を述べる。

(3) messenger codeの読み方

今迄の議論から明らかな様にm－RNAはDNAからのcodeをそれ自身の上に持つている。それはpoly phenylalanineの合成のKineticsから知られるようにtripletで而もnon-overlappingであることは、今迄のところ確からしい。今DNAの上で何かある特定の蛋白を決めるところのcistronを考えよう。その際問題はm－RNAがどのようにしてそのsistronからcodeを読みとるかということである。どこから読み始めるか、例えばcistronの端には何かmarkがあるのだろうか。commaとかperiodに対応するcodeがあるということも考えられるが、こういうcodeの問題は未だ結着がついていない。 Crick等はアミノ酸codeがどのように読みとられるかについての遺伝学的実験を行つた。彼等はproflavin（acridine色素の1つ）によるT_4 phageのrII変異株を用いた。proflavinの作用は前に述べた如く（VIの§4参照）baseを1つぬいたり（1つの欠点が出来た場合をdeletionと呼ぶことにする）1つふやしたり（insertion）すると考えられている。若しmessengerに移し取られたcodeがcistronの端から3つづつ読み取られるとするならばこのrII変異株の場合にはbaseが1つぬけたところ（或はふえたところ）から後はbase 1つづれたcodeを読むことになる。従つてこういう変異は

transition とか transuersion （VIの§4参照）というような変異にくらべて非常に甚だしい影響を持つことになる。つまり base analogue による変異である transition とか transversion 型の変異では1箇所の code が間違つているだけであるから影響は1箇所に止る。だから proflavin による突然変異と5BU或は2AP等のような base analogue によるものとでは非常な差があることになる。そして base analogue による時の様に1箇所にだけ変異が起きる transition 或は transversion 型の場合には、それが属している cistron の機能には、あまり影響せず、突然変異が起つても wild 型の機能を可成りそなえた変異株が相当に現われることが期待出来る。このように突然変異は起つているけれどもあまり性質の変つていない変異株のことを"leaky"だと呼ぶ。これに反し proflavin による deletion 或は insersion という突然変異に対しては上述の如く読み方が全然変つてしまうのでこの場合には leaky なものは期待できない。実際 proflavin の場合には全ての single mutant は non-leaky であることがわかつている。ところでこの proflavin による突然変異に対する色々の実験を行つているのに同一 cistron での suppressor という現象がみつけられた。これは proflavin による変異株の中で wild 型に戻るものの内、最初に1つの変異を起してその場所にもう一度変異が起きて wild 型になるのではなく、同1 cistion 内で最初の変異位置に可成近いが少し離れた別の場所に起きる時、つまり double mutant となつて wild 型に戻る現象である。これは次のように理解される。今一つの cistron 内で第91図の如く deletion（



double mutant による suppressor

第 9 1 図

これを(−)で示す）と insertion (+)が起きたとする。左端から triplet づ

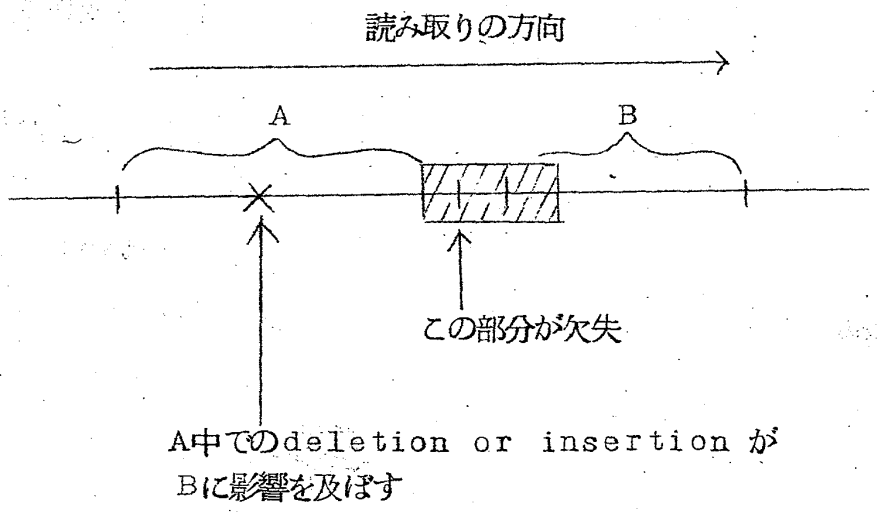
つ読んでゆくと考えるとdeletionのある場所から、読み違いが起きるが、insertionのある位置迄来るとその読み方は又元の何も起きてない場合のものに変る。だから2つの変異(−)(+)の間だけで読み違いが生ずることになるが、この領域が比較的せまくてこのcistron内であまり重要な機能を持つのでなければこの変異株はwild型として振舞うだろうと考えられる。つまり1番目の変異を2番目の変異がsuppressしたわけである。このような解釈をsuppressorに対してつけるとすると、proflavinによる変異株に＋，−の符合をつけることができる。それは標準にとつた1つの変異を仮に(+)とすればそれをsupress出来るか出来ないかということで、別に起きる変異に対し(−)或は(+)（つまりdeletionかinsertionか）と付けるわけである、これをどうしてやるかというと夫々違つた位置に変異を起こしている2つの変異株の間でrecombinationを起こしてdouble mutantを作ればよい。この様にして多くの変異株に符合をつけた時、（＋，−）或は−，＋）の型のものはwild型の性質を示し得るものだが、（++）或は（−−）のものはwild型にはならなかつたものである。つまりこれらはnon−leakyである。

ところで若しcodeのunitがtripletであり而も端から読み出すとするとtrple mutantを作つてそれが（+++）或は(−−−)であればこれ等はこの変異区間を過ぎた所から正常なcodingに変る。唯、この区間に対応するpeptide chainではアミノ酸が1つ増したり減つたりはするが、その先は正常なsequenceに戻る。この様なtriple mutantの中からはwild型になり得るものがあるわけで実際実験的に確かめられた。

このことから、coding ratio（codeのunitとなるbaseの数）はproflavinの作用が1ケのbaseを“ぬいたり”，“つけたり”するものとすれば“3”であると結論できる。又最初の仮定つまり端から読んでゆくことも（この端がどんなふうになつているかわからないが）確からしいということが出来る。

次にやはりcistronの端についてのもう1つの実験的事実を挙げる。前にも述べたように1つのcistronが1つの蛋白のpnlypeptide chainを決める機能を有していると考えられているが、それではcistronと

cistron の継ぎ目はどうなつているかということが問題になるが、この実験はそれに対して或る程度答えている。今、或る変異株（１５８９－mutant で行われた）でＡ cistron と Ｂ cistron との境界部に deletion があるものを調べてみると、Ａの機能はだめになつているのにＢの機能は未だ残つつているものがあることがわかつた。これはＢ cistron の deletion にかかつた部分はＢ cistron の機能に対してあまり重要でなく反対にＡにと



第　９２　図

つてはその deletion は機能的に重要な部分と考えられる。ところで更に proflavin によりＡ cistron 内にもう一つの変異を（先に存在する deletion から離れた場所に）起させてやると、今度はＢ cistron の機能迄だめになることがわかつた。このことは、次の様な解釈を可能にする。それはこの mutant ではＡ cistion と Ｂ cistion の切れ目が欠失したため二つの cistron が融合してしまい code の読み取りがＡ cistron の端からＢの方へもおよんでいてＡ内での deletion 或には insertion による読み取りのずれがＢに迄及びＢの機能に迄影響を及ぼすものと考えられる。だから cistion と cistion の間には読み方がそこで切れる場所があり、それがなくなると二つの cistron は一つのものに融合してしまうと考えられる。

(4)　coding の変化

coding の仕方は一定不変かというと、そうではなく、それも突然変異を

受けるということが最近になつてわかつて来た。これは生物の進化にとつて重要なことである。その変り方にはいくつかの可能性がある。第一の可能性としてS－RNAに於いてアミノ酸を附ける側には変化はなくて、むしろm－RNAのcode を読み取る部分（ここをcode reader と呼ぶ。第74図参照）に突然変異を受ける場合が考えられる。現在ではS－RNA も DNA を template として（適当な酵素の働きにより）造られることがわかつているから丁度S－RNAの今問題にしているcode reader の構造を決めるDNAのその部分に突然変異があればそれから造られるS－RNAにもその変化は伝わり、その結果S－RNAのアミノ酸code に対する対応の仕方に 変異をきたすことになる。もう一つの可能性は、どういうアミノ酸をつけるかを決める特異性を時つた部分がS－RNAのどこかにあるはづで（a, a selecter と呼ぶ。第74図参照）その特異的部分が変異を受ければ、やはりcoding の仕方は変るわけである。或は他の可能性としてS－RNA は 何ら変化を受けないが、アミノ酸活性化酵素の構造のうちS－RNAに対して特異的な部分が変化を受けることがあれば、これもやはりcoding を変えることになる。

このような変異によるcoding の変化の可能性は実際実験的に確かめられた。それはbacteria内での蛋白合成に於いて、或る株で変化を起さし、それをその変異とは別のはなれた位置に変異を持つ別の株に持ちこむと前の株では機能を失なつていたものが、又機能を回復するという場合がある。これは初めの株に於いて起きた突然変異によりそのDNAの或るcistron が機能を失なつたものが別の株（そのDNAは先のとは少し異つている）に入ることにより機能を回復すると考えられる。この意味でこの第二の変異をsupressor mutation と呼ぶことができる。（前記の同一cistron 内supressor とは異なる）

実験はE coli の tryptophane 合成酵素 について行われた。これは2つの蛋白のchain からなつており、その1つのchain をA－protein と呼ぶ。これのwild 型及びA－36 変異株のアミノ酸構造はわかつており

wild　A_{SP}－ala－ala－pro－pro－leu－glu－[gly]－phe.
A 36　〃　－[arg]－ 〃

の如くなつている。つまりA36変異株はwild型に於けるglycineがarginineに変つたものである。ところでこのtryptophame合成酵素に対する遺伝地図はよく調べられており、実験によるとこのA36株に対してもう一度起きた変異がこのA−proteinに対するA−cistronとは、可成り離れた場所に起きることがわかつた。その際それらの変異株の中からA−proteinの構造が少し変つて又wild型に戻るものも現われることもわかつている。この変異株（A−36 suppressor mutantと呼ぶ）は凡てがwild型というのではなく、つまり問題のアミノ酸が−gly−の蛋白ばかりを作るのではなく−arg−のものも作り、それ等が共存していることも明らかになつた。

以上の事実は先に述べたように、何か蛋白の合成機構に関連した、即ちS−RNA或はactivating enzymeの構造に変化が起きたことによるものと考えられる。上の例で云えば−arg−を作る殆のcodeが何か別の所で起きた変異により−gly−になつてしまつたということは前述の意味のcodingの変化を示していると思われる。

（山田一雄．吉森昭夫　記）