

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取り出して、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) とその activating enzyme 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 enzyme

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っていない。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-factor ;

低分子の co-factor 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。

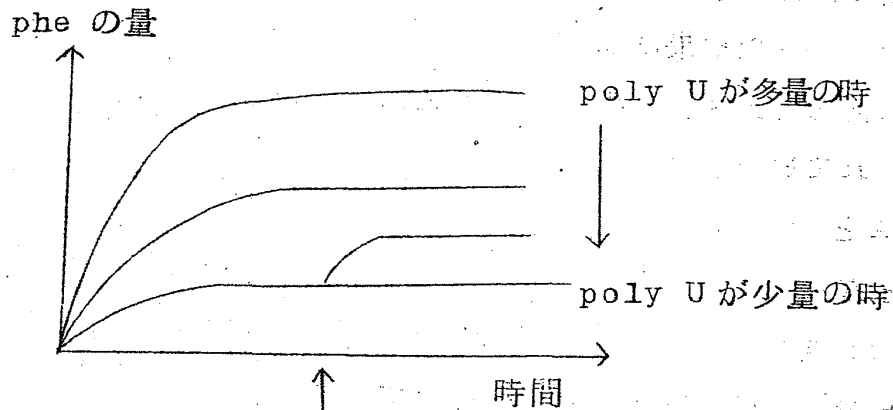
Mg^{++} ; Mg^{++} の濃度をあまり下げると ribosome が解離してしまい更に下げれば ribosome 自身が蛋白と RNA に分離してしまう。又核酸の 2 次構造を維持するためにも必要である。(核酸の phosphate が負にイオン化しやすい為 2 価の陽イオンでこれを防ぎ 2 次構造を維持する)

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っ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っている。又、図の中で矢印は既に合成が止つている時点である

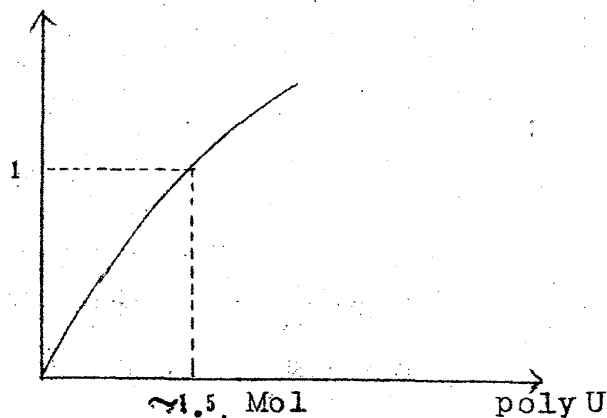


(各曲線のパラメータは入れる。 poly U の量)

第 8 3 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 8 4 phe (Mol)



(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)

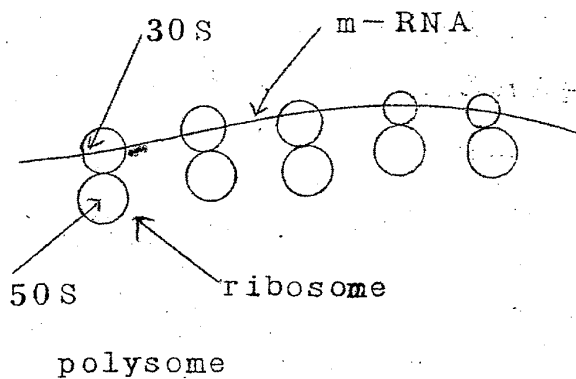
第 8 4 図

福留秀雄

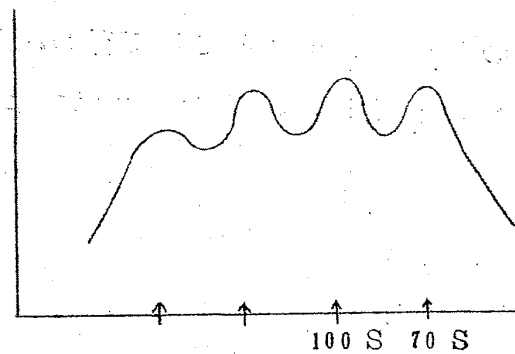
図の如くなる。これは poly U が蛋白合成 (今は poly phe) に際して、何回位使われるかというめやすを提供する。つまり今、核酸の code が triplet 構造を持つとすれば 3 U に対して少くとも 1 つの phe が対応する。若し poly U が messenger として 1 回だけ使われてつぶれてしまうものとすれば poly U の濃度 3 Mol に対し 1 Mol の poly phe が出来るような勾配を示す殆だが実験によれば $\times 1.5$ Mol に対し 1 Mol の合成が行われているらしい。このことから poly U は 2 乃至 3 回は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ったが、実験条件がよくなって来て、上のような結果になった。) 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 の上にやってきて、どのように complex を作り template として働くかということである。それを見る為に合成核酸と 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 がちゃんとした 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 poly A 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。poly A 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-poly A-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った。又 poly A-poly U complex はきちんとした double helix を持つが、これも ribosome にはくつつかないことが知られている。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れられた。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った。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 8 5 図



第 8 6 図

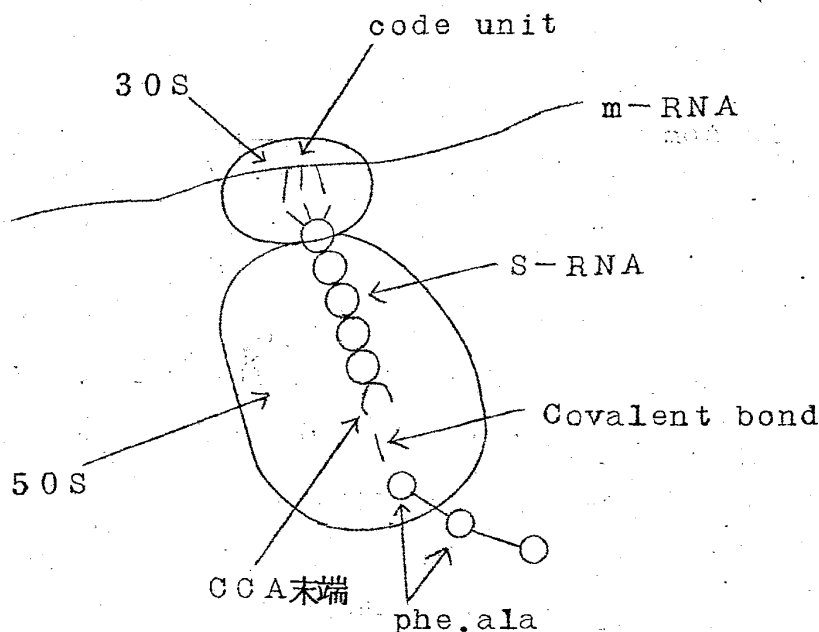
、100Sの外に今のようにおだやかに処理されたものには、それ以上の沈降定数を持つ。つまり、70Sが2つ或いはそれ以上ひつついたものに相当する peak が現れた。この様に messenger によりつながった ribosome のことを polysome (polyribosome) と呼んでいる。更に想像をたくましくした話では第85図に於て30Sと結合しているm-RNAがすべつてゆきながら、peptide chainを作つてゆくというのがある。

(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 poly U 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った。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った。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 をのぼすのは別のS-RNAがやってきて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ってきたS-RNAに結合しているアミノ酸が peptide に結合されて

福留秀雄

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 からなっ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 helix をつくった時の 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 hemoglobine (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

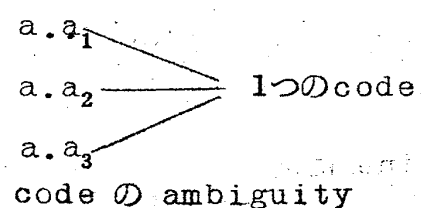
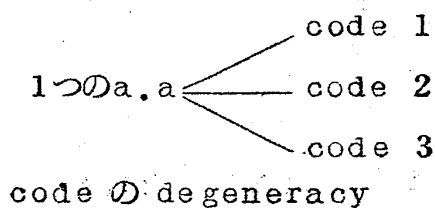
を調べてみる。もしN端からのびるのであるとすると C^{14} Valine を入れるその時期にはHb は既に途中の段階までchain としてのびて来ているものの方が、これから始まって作られるものよりも多いであろうから、 C^{14} Valine のいる場所はHb peptide chain の中程にいるものの方が、末端にいるものよりも多いと考えられる。実際Hb の放射能によるlabel のされ方にgradient が出来る事が見出された。このような事実からpeptide chain はN端からC端へと伸びてゆくと考えられる。

§ 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っているので色々のbase ratio を持つ合成RNA (base は random につながった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ヶ以上のcode が存在しているものがある。

(第88図)



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
<u>alanine</u>	2C1G (1U1C1G)	3A	lys
<u>arginine</u>	2C1G, 2A1G	3C	pro
<u>asparagine</u>	2A1C, 2A1U	3G	
<u>asparatic acid</u>	1G1U1A,	3U	phe
<u>cystine</u>	2U1G or 2G1U	2A1C	asn, thr
<u>glutamic acid</u>	2A1G (1A1G1U)	2A1G	arg, glu, gln, (lys)
<u>glutamine</u>	2A1C, 2A1G (1A1G1U)	2A1U	asn, ileu, (lys)
<u>glycine</u>	2G1U, 2G1A	2C1A	his, thr, (pro)
<u>histidine</u>	2C1A	2C1G	ala, arg, (pro)
<u>isoleucine</u>	2U1A, 2A1U	2C1U	ser, (pro)
<u>leucine</u>	2U1G, 2U1C, 2U1A, 3U	2G1A	gly
<u>lysine</u>	3A, (2A1G) (2A1U)	2G1C	
<u>methionine</u>	(1U1G1A)	2G1U	cys, gly, try
<u>pherylalanine</u>	3U	2U1A	ileu, leu, tyr
<u>proline</u>	3C, (2C1U) (2C1A) (2C1G)	2U1C	leu, ser
<u>serine</u>	2U1G, 2C1U, 1U1C1G	2U1G	cys, leu, val
<u>threonine</u>	2C1A, 2A1C	1A1C1G	
<u>tryptophan</u>	2G1U,	1A1C1U	
<u>tyrosine</u>	2U1A	1A1G1U	asp, (met) (glu), (gln)
<u>valine</u>	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-NH₂, asp-NH₂ 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 universal つまり種によつては変わ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 3 U (E-coli の場合には 3 U 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けば universal ではないが、今迄調べられた範囲では多分 universal らしい。実験的には蛋白合成の成分である m-RNA を例えば poly U 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 ambiguous 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 phenylalanine 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っているかよくわからない。この点は今後の問題であろう。

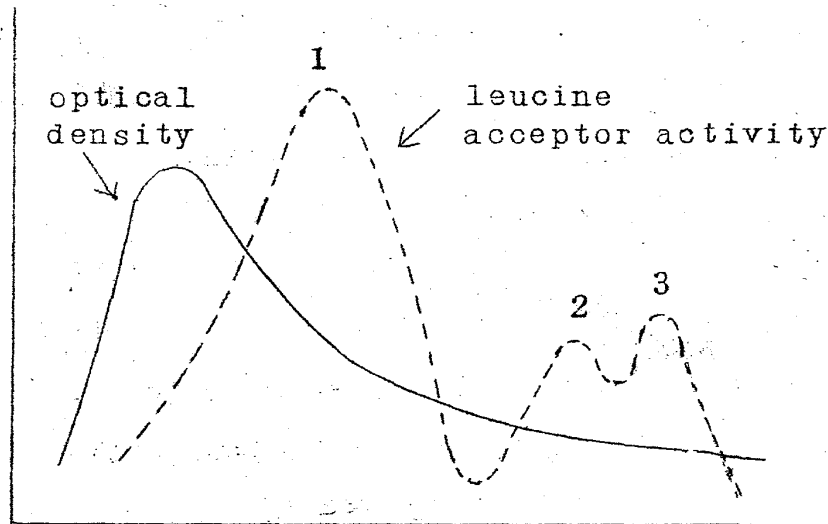
(iv) 最後の問題として、non sense code があるかということ。つまり 20 種のアミノ酸に対し核酸の 4 種の base から考えられる triplet の数は 64、その中には多くの degeneracy があるが(例えば 3 つ位いつつの degeneracy があれば 20 種のアミノ酸にほぼ対応するけれど)その中の或る code はどのアミノ酸にも対応しないというような non sense code があるかという問題は、今のところ未だよくわかつていない。

(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づかしいことで 10% の程

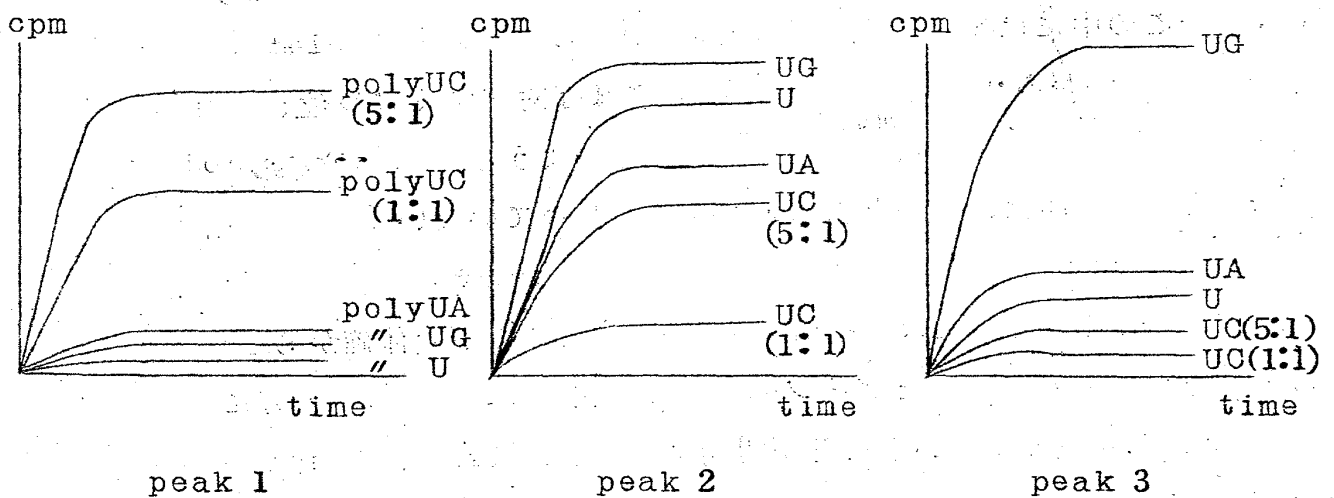
福留秀雄

度迄しか行われていない。最近になつて 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 (optical density), 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 peak 1 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った (第 90 図 peak 1)



第 90 図

従つて peak 1 の S-RNA は code として UUG 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 peak³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見えるのは 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 leucine code に対応するものと考えてよい。

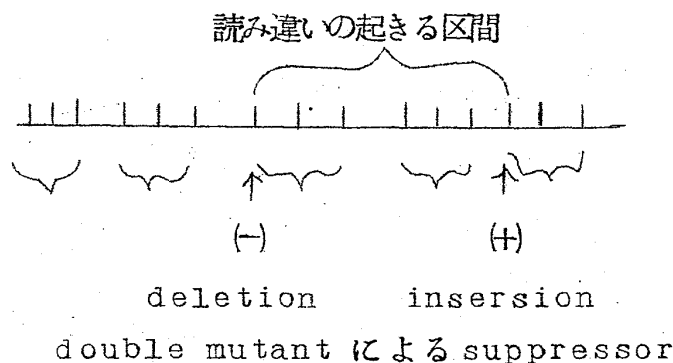
今迄は in vitro での話であつたが、次には少し變つて coding の問題に対して遺伝学的手法を用いた approach の話を述べる。

(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 cistron 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 T₄ 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 つず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

福留 秀雄

transition とか transversion (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 が間違っ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 5 BU 或は 2 AF 等のような base analogue によるものと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っ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 insertion という突然変異に対しては上述の如く読み方が全然変っ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 9 1 図の如く deletion (



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なる。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 suppress 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。

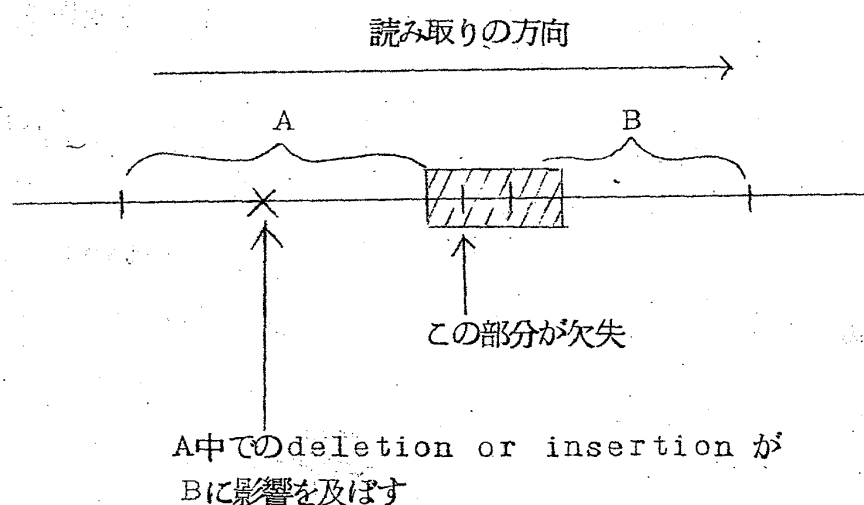
ところで若し code の unit が triplet であり而も端から読み出すとすると triple mutant を作つてそれが (+++) 或は(---) であればこれ等はこの変異区間を過ぎた所から正常な coding になる。唯、この区間に対応する peptide chain ではアミノ酸が 1 つ増したり減つたりはするが、その先は正常な sequence に戻る。この様な triple mutant の中からは wild 型になり得るものがあるわけで実際実験的に確かめられた。

このことから、coding ratio (code の unit となる base の数) は proflavin の作用が 1 ヶの 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 polypeptide 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

福留秀雄

cistron の継ぎ目はどうなっ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ゐるのに B の機能は末だ残つてゐ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 9 2 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 cistron と B cistron 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 cistron と cistron 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、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っ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定する特異性を時つた部分がS-RNAのどこかにあるはずで(a, a selector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の仕方は変わるわけである。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	- "

福留 秀雄

の如くなっている。つまり A 36 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 tryptophane 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 A 36 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ゐる。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 を作る殆どの 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)