アミノ酸を指定する遺伝暗号の構造の解明

国立がんセンター
研究所ウイルス部

西 村

暹[※]

遺伝情報の問題は最近目ざましい発展をしたが、本稿では過去2年間にわたって、ウイスコンシン大学、Enzyme Institute の Dr.H.G.Khorana の研究室で行なったわれわれの仕事を中心として、主として生化学的な研究からのアミノ酸暗号の問題における最近の発展をとりあげたい。

1. 無細胞のタンパク合成系

タンパク質合成の解明、なかんづく、アミノ酸暗号 (code) の問題に、1961年以降大いに貢献したのが、Nirenberg Matthaei¹⁾ によって発展させられた大腸菌の無細胞系のタンパク合成である。かれらは、Mg²⁺, KCl, それに β -mercaptoethanol を加えることにより、系を安定化することに成功した。無細胞系はリボゾーム、種々の酵素類を含む 105,000×g の上清、転移 RNA (sRNA), 0.01M Mg²⁺, 0.06 M KCl, 0.006M β -mercaptoethanol, GTP, tris 緩衝液、それにエネルギー源として ATP, phosphoenolpyruvate, phosphoenolpyruvate kinase を含み、これに ¹⁴C-アミノ酸を加えてやると、それはタンパク質分画にとりこまれる。かれらの画期的発見は、系に polyU を加えると、ただ1種類のアミノ酸、フェニルアラニンのタンパクへの取り込みが異常に促進されることをみつけたこと²⁾で、しかもこれはポリフェニルアラニンが合成されていること。またフェニルアラニンは、天然のタンパク質の合成経路、すなわちフェニルアラニン-sRNA を中間体としてポリフェニルアラニンになることがたしかめられた。³⁾

2. code の組成の決定

この発見は、当時ようやくメッセンジャー RNA (mRNA) の概念が確立してきたのと相まって、おそらく人工的な mRNA として polyU が働いて、ポリフェニルアラニンが合成されたので、polyU の UUU という塩基配列がフェニルアラニンに相当するのだと解釈された。またこれは、それまで遺伝学的方法で主にあつかわれていた code の問題を生化学的実験手段で解明する糸口を与えたもので、直ちに Nirenberg⁴⁾ と Matthaei⁵⁾ 及び Ochoa の研究グループによって、この系が応用され、polyU のかわりに他の塩基の混ったランダム copolymer を使った実験がおこなわれた。その結果、他の塩基がポリマーに入ると、フェニルアラニン以外のアミノ酸のとり込みも促進されることがわかった。たとえば poly UG ではフェニルアラニン以外に、システイン、ロイシン、バリンがとり込まれる。そしてフェニルアラニンのとり込みに対する他のアミノ酸のとり込みの割合と、UUU の配列に対して、Gを含んだ塩基組成、すなわち UUG, UGG, GGG のおこる確率を比較することにより、他のアミノ酸に対応する code の組成を決めたわけである。同様な実験を他の塩基を含んだポリマーを使っておこない、全アミノ酸に対する code の組成は1962年までに決められてしまった。^{*,**)}

Elucidation of the structure of genetic code specifying amino acids;

※ Susumu NISHIMURA: Division of Virus Research, National Cancer Center Research Institute.

* 当初はUの含量が多くないとアミノ酸の取り込みが促進されなかった。その後、リジンの含量の多いポリペプチドは酸に可溶なため、見のがしていたことがわかり、poly A でポリリジンの合成がおこることがみつけれ^{6a)}れた。プロリンの code も CCC と決められたが、これも polyC を高濃度に加えることにより始めて検出された。^{6b)}

** この項について、詳しくは以下の総説を参照

次田皓, 情報伝達について (code の問題) 蛋白質核酸酵素, Vol 7, No 10, p1. (1962)

Crick, F.H.C., The Recent Excitement in the Coding Problem, in J.N. Davidson and W.E. Cohn (eds.), Progress in Nucleic Acid Research, Academic Press, New York, 1963, Vol.1, p.164.

その実験の過程, すなわちポリマーの合成及び, そのポリマーによるタンパク合成について, すこし詳しく説明を加えたい。

一般的にいて, DCC 法によるヌクレオチドからオリゴヌクレオチドの合成は, デオキシヌクレオチドの方がリボヌクレオチドより合成しやすい。なぜならば, リボヌクレオチドは 2'-OH があるために, 反応中にリン酸結合が 3' から 2' に移動したり, あるいは 2' で枝分れしたものができる可能性があり, ヌクレオチド鎖を 3 個以上のばすことはなかなかむづかしい。それに比較すれば, デオキシオリゴヌクレオチドの合成は比較的容易でヌクレオチド鎖が 15 個程度のものを, 任意の塩基配列順序で合成することができる。しかしながら, いずれにせよ, 有機合成の方法だけでは人工 mRNA として使用できるに十分な長さ, すなわちヌクレオチド鎖が 100 程度のポリヌクレオチドを合成することは不可能である。それで次に述べるような方法がとられた。

5. poly AAG の合成

$dT_6 \sim dT_{11}$ ($dT_6 = TpTpTpTpTpT$) を鋳型として

第2図 オリゴデオキシヌクレオチドの有機合成

RNA ポリメラーゼの反応により, ヌクレオチド鎖が 100 以上の poly A が合成されることは以前からわかって⁸⁾いた。また $TpCpTpCpTpCpTpCpTpC$ ($(TC)_5$) を鋳型とすると, やはり高分子の poly AG ($AGAGAG \dots$) が合成される⁹⁾。従ってトリヌクレオチドが連続しているオリゴデオキシヌクレオチドからも, それと相補的な塩基配列をもつポリヌクレオチドが合成されることが予想された。

まず塩基の配列が AAG と相補的な, TTC の配列をもった, ノナデオキシヌクレオチドを第2図 a) に示したように, ヌクレオチド結合を 1 個ずつ DCC 法でのばしてゆくことにより合成する。第2図 a) の反応を順次くり返して, 最後に trytyl 基と anisoyl 基をはずし, $TpTpCpTpTpCpTpTpC$, すなわち triplet が 3 回くり返している $(TTC)_3$ が合成される¹⁰⁾。反応の際, オリゴデオキシヌクレオチドに対して, 添加するモノヌクレオチドを, モル比にして 10—20 倍加えることにより, 最終段階まで収量を 60—80% に保つことができる。ただ反応 1 回ごとに, 約 2m の DEAE-セルロースのカラムを使って目的物を分離同定しなければならず, かつヌクレオチド鎖が長くなるにつれ, 出

発物質と生成物との分離が不十分になるので、大体ヌクレオチド鎖15ぐらいが、現在では有機合成の限界である。

次に、この (TTC)₃ を鋳型として、大腸菌から、Chamberlin と Berg の方法¹¹⁾によって調製した RNA ポリメラーゼを作用させると、ATP と GTP から塩基の配列が TTC に相補的な poly AAG が合成される¹²⁾。この反応で重要な点は、使用した鋳型の RNA 鎖に比して、合成された DNA がやはり分子量約2万以上の高分子であることである。すなわち合成された poly AAG は人工 mRNA として十分使用し得るということである。なお正しい塩基配列をもった poly AAG をつくるためには、酵素反応を 14~20°C の低温でおこない、かつ ATP と GTP の量を 2:1 に加えることが必要で、かりに反応を 37°C でおこなうと正確な読みとりがおこなわれない。合成された poly AAG が正しく AAG のくり返しの配列をもっていることは、poly AAG をリボヌクレアーゼ T₁ で消化した後、生成物の 95% 以上が ApApGp であることから確かめられた。このことはまた第1表に示すように nearest-neighbor frequency analysis から確認さ

うな triplet が完結していないオリゴデオキシヌクレオチドを鋳型として用いると、triplet が正確に連続している poly AAG は合成されない。

6. 2種の塩基が交互に配列したポリマーの合成

第2図bに示すように、まずジヌクレオチドを DC C を使って合成し、次にそれを DCC で縮合させることにより塩基が交互に配列したオリゴデオキシヌクレオチドを合成する¹³⁾。この場合も反応生成物から、目的とする (AG)₅ を DEAE-セルロースのカラム、又はペーパークロマトグラフィーで分離精製しなければならない。同様な方法で (TC)₅、(TG)₅、(AC)₅ を合成する。次に (AG)₅ と (TC)₅ を等量混ぜて、これをプライマーとして大腸菌からとった DN A ポリメラーゼ (fraction VII)¹⁴⁾ を作用させると、d-ATP、d-CTP、d-GTP、TTP を基質として、高分子の polydeoxy-TC:AG が合成される。このデオキシポリヌクレオチドは、二重らせん構造で、分子量は約100万、その一本の鎖は A と G が交互に配列しており、もう一本の鎖は T と C が交互に配列していて、両

表1 polyAAG の nearest-neighbor frequency analysis

基 質	2'(3')-ヌクレオチドの放射能		転位の率 (%)	
	2'(3')-AMP	2'(3')-GMP	実 験 値	理 論 値
α - ³² P-ATP+GTP	1973	1793	48	50
α - ³² P-GTP+ATP	924	26	97	100

れた。 α -³²P-ATP 又は α -³²P-GTP をつかって poly AAG を合成し、これを 0.3 M NaOH で分解して、生成した 2'(3')-ヌクレオチドへの ³²P の転位量を測定するわけである。

鋳型として (TTC)₃ の代りに (TTC)₄ を用いても同様に poly AAG が合成されるが、(TTC)₂ では全く効果がない。又 (TTC)₃T、(TTC)₃TT のよ

うで二重鎖をつくるという特異な構造の DNA である¹⁵⁾。同様に (TG)₅、(AC)₅ をプライマーとすると polydeoxy-TG:AC が合成される^{16)*}。次いでこれ等の DNA を鋳型として、RNA ポリメラーゼと相当するリボヌクレオシド三リン酸を加えると、第3図に示すように、それぞれ塩基が交互に配列した4種類の一本鎖

第3図 Copolyribonucleotide の合成

* (TG)₅ と (AC)₅ をプライマーとして使っても、poly d-TG:AC は合成される。(TG)₅ と (AC)₅ でも、反応を低温でおこなえば poly d-TG:AC が合成できる。

表2 poly UC, poly AG, poly UG, poly AC の nearest-neighbor frequency analysis

鋳 型	基 質	生成物	アルカリ分解後とり出された 2'(3')-ヌクレオチドの放射能				転位の率 (%)	
			2'(3')-UMP	2'(3')-CMP	2'(3')-AMP	2'(3')-GMP	測定値	理論値
poly d-TC:AG	α - ³² P-UTP+CTP	poly UC	70	6229	—	—	99	100
poly d-TC:AG	α - ³² P-ATP+GTP	poly AG	—	—	357	47880	99.3	100
poly d-TG:AC	α - ³² P-UTP+GTP	poly UG	13	—	—	3921	99.7	100
poly d-TG:AC	α - ³² P-ATP+CTP	poly AC	—	20601	214	—	99	100

¹⁷⁾
RNA が合成される。すなわち、加える基質によって、RNA ポリメラーゼはいずれか片側の DNA 鎖を読みとることもできるし、又両方の鎖を同時に読むこともできる。RNA の合成量はポリマーの種類によって異なるし、又片側の鎖を合成する場合と、両方の鎖を同時に合成する場合でも変わってくる。又加えた DNA と RNA ポリメラーゼの比によっても変化するが、とにかく常に加えた DNA に対して、その3-10倍程度の RNA が合成される。合成された各ポリマーの塩基配列が、ほぼ完全に交互に配列していることは、第2表に示すように Nearest-neighbor frequency analysis で確かめられた。

1. 一定の塩基配列をもったポリマーの遺伝情報伝達

以上述べたような方法で、目的とする人工 mRNA が合成できた。ではこれらのポリヌクレオチドによって、どんなポリペプチドが合成されるであろうか。次はこれ等人工 mRNA を大腸菌の cell-free のタンパク合成系に加えて、放射性アミノ酸のとりこみをみるわけである。只この際、予想されるポリペプチドは、種々のアミノ酸から成るランダムなポリペプチドでなく、homopolypeptide や copolypeptide である。特定のアミノ酸から成る、或る種のポリペプチドは一般のタンパク質とは非常に異なった性質を示すので、もしトリクロル酢酸不溶性分画のみを調べていれば、或る種のポリペプチド合成をとり逃すおそれがある。それで、トリクロル酢酸によるタンパク質の沈でん法以外に、種々の溶媒系を用いたペーパークロマトグラムを併用して分析の確実を期した。又合成されたポリヌクレオチドは非常に少量(大体 1mg 程度)なので、普通反応は0.1ml でおこない、そこから0.01乃至0.02 ml をとって測定するような微量定量がおこなわれた。

a) poly AAG による homopolypeptide の合成

RNA ポリメラーゼによって、(TTC)₃ を鋳型として合成した poly AAG は (TTC)₃ と複合体(hybrid)を形成していて、そのままではリボソームと結合せず活性がない。従って0.02Mの希酢酸で処理して poly AAG を (TTC)₃ から分離してから、cell-free 系に加える必要がある。その結果、poly AAG では3種類の homopolypeptide, ポリリジン, ポリアルギニン, ポリグルタミン酸が合成された。^{18)*} 第4図に示すように、タングステン酸で沈でんする ¹⁴C-リジンのとり込みは、poly AAG の添加によって顕著に促進さ

第4図 poly AAG によるポリリジンの合成

れ、しかもその効果は poly A の場合よりも大きい。この ¹⁴C-リジンのとり込みが、リジンポリペプチドであることは、反応生成物をトリプシンで消化して、mono-, di-, tri-lysine が生成することから確認された。poly AAG によるポリリジンの合成は、反応温度に敏感で、反応を45℃でおこなうと合成はさらに促進され、20℃にするとポリリジンの合成はほとんどお

* 厳密にいうなら、いずれの場合も、di, tri, tetra, 及びそれより高次の homopolypeptide の混合物が合成される。

表3 poly AAG によるポリグルタミン酸とポリアルギニンの合成

	¹⁴ C-アミノ酸のとり込み (μ mmole/ml)		
	リジン	アルギニン	グルタミン酸
Exp.1			
-poly AAG+ ¹⁴ C-グルタミン酸			30
+poly AAG+ ¹⁴ C-グルタミン酸			156
+poly AAG+ ¹⁴ C-グルタミン酸+ ¹² C-リジン			199
+poly AAG+ ¹⁴ C-リジン	640		
Exp.2			
-poly AAG+ ¹⁴ C-アルギニン		26	
+poly AAG+ ¹⁴ C-アルギニン		104	
+poly AAG+ ¹⁴ C-アルギニン+ ¹² C-リジン		110	
+poly AAG+ ¹⁴ C-リジン	1070		

こらなくなる。poly A によるポリリジンの合成では、このような現象は認められず、これはおそらく、poly AAG内のグアニンによる分子の二次構造の変化のためと考えられる。

poly AAG によるポリアルギニン、ポリグルタミン酸の合成は、共にペーパークロマトグラムによって確認されたが、それらの合成量は第3表に示すように、ポリリジンの生成に対して、ポリグルタミン酸は約 $\frac{1}{3}$ 、ポリアルギニンは約 $\frac{1}{10}$ の効率で合成される。興味ある点は、3種の homopolypeptide の合成は、それぞれ独立に進行していることで、ポリリジンの合成は、その際、他の19種のアミノ酸を加えても変化しないし、又第3表に示したように、ポリグルタミン酸の合成は、そのとき、同時にリジンを加えてポリリジンの合成をおこなわしても、それ程影響をうけない。同様のことはポリアルギニンの合成の場合についても云える。

以上の結果は、始めに設定した仮定である、code が triplet で non-overlapping であることを示唆するが、ではどうして3種の homopolypeptide の合成量に差があるのだろうか？もし code の読みが polynucleotide の末端から読まれ、かつ polynucleotide が均一な末端をもっているなら、code の読みの可能性は3通りあっても、ただ1種類の homopolypeptide しか合成されないはずである。我々の用いた cell-free 系では核酸分解酵素が完全に除去されていないので、次の2つの可能性が考えられる。①合成された poly AAG は均一な末端をもっているにもかかわらず、cell-free 系に加えた後で、5'OH 側から、核

酸分解酵素でヌクレオチドがはずれ、その結果、code は末端から読まれるにしても、3種類の code の読みが可能となる。従って3種の homopolypeptide の合成量の差は、ポリヌクレオチドの末端塩基の分布の比によって決まる。②このような人工的タンパク合成系では、code の読み始めの点についての制御の機構が働いておらず、任意の点から読みが始まってしまう。いずれにせよ、この点に関しては今後の研究が必要である。

b) poly UC, poly AC, poly UG, poly AG による copolypeptide の合成

次に第二の分類に属する2個の塩基が交互に配列したポリマーのもつ遺伝情報はなんであろうか。結論を先にいうと、第4表に示すように、poly UC ではセリンとロイシンが交互に配列した copolypeptide, poly AC ではトレオニンとヒスチジン、poly UG ではバリンとシステイン、poly AG ではアルギニンとグルタミン酸の copolypeptide が合成された。^{17,19)}

表4 copolynucleotide によるアミノ酸のとり込み

copolymer	とり込まれたアミノ酸
poly UC CUC UCU CUC	ロイシン, セリン
poly AC ACA CAC ACA	トレオニン, ヒスチジン
poly UG UGU GUG UGU	システイン, バリン
poly AG AGA GAG AGA	アルギニン, グルタミン酸

第5図 poly UCによるロイシンとセリンの copolypeptide の合成

poly UC の場合を例にして、どのようにして合成された copolypeptide の同定をしたか、すこし詳しく説明すると、第5図に示したように、 ^{14}C -ロイシンのとり込みは poly UC を加え、しかもセリンを添加してやらないとおこらず、又逆に ^{14}C -セリンのとり込みは poly UC とロイシンを加えてやらないと進行しない。^{*}しかもロイシンとセリンのとり込みは1対1の割合である。又他のアミノ酸のとり込みを調べたところ、(それぞれ20種類のアミノ酸のうち、1つだけを放射性炭素で標識したのをを用いる。)ロイシン、セリン以外のアミノ酸のとり込みは全く poly UC によって促進されなかった。以上の結果はロイシンとセリンの copolypeptide の合成を強く示唆する。しかし、例えば、Ser-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Leu-Leu...

...のような polypeptide が合成されていても同様な結果が得られるわけで、このような可能性を除くため、塩酸による生成物の部分分解を試みた。30℃で10規定塩酸で処理することにより、タンパク質は、セリン又はトレオニンのような水酸基を側鎖にもつアミノ酸のところで特異的に切断されることが知られている。²⁰⁾(第5図参照)従ってセリンとロイシンの copolypeptide からは、di-peptide, $(\text{NH}_2)\text{Ser}\cdot\text{Leu}(\text{COOH})$ が生成するはずである。実際に ^{14}C -セリンと ^{14}C -ロイシンからの生成物を、10規定塩酸で5日間、30℃にすると、全部を定量的に di-peptide, $(\text{NH}_2)\text{Ser}\cdot\text{Leu}(\text{COOH})$ に分解することができた。すなわち、塩酸で加水分解した後で、得られたペプチドは、ペーパークロマトグ

第6図 塩酸によるセリンのペプチド結合の特異的分解

* アミノ酸のとり込みをみる場合、先ず RNA ポリメラーゼと相当するヌクレオシド三リン酸を加えて、ポリマーを合成し、反応液から、ポリマーを分離することなく、全部をタンパク合成系に加えて実験をおこなった。いったんフェノール法でポリマーを分離してから使用すると、もはやアミノ酸のとり込みを促進しない。分離操作中に、ポリマーが分解してしまうのかもしれないが、その機構については不明である。

** ^{14}C -ロイシンのとり込みはセリンを加えなくとも、約15パーセント程度あるが、これはタンパク合成系内にすでに含まれている遊離アミノ酸のセリンを利用しているためだと考えられる。すなわち、塩酸による部分分解によって、同じく Ser-Leu が検出された。

ラフで単一なピークを示し、これをDNFBでDNP化した後で完全に加水分解すると、ロイシンとDNP-セリンのみを検出することができた。従ってもとのポリペプチドはセリンとロイシンが交互に結合した copolypeptide ということになる。

polyAC, polyUG, polyAGを加えた実験についても、各アミノ酸のとり込みについて polyUC の場合と全く同様な結果が得られた。すなわち、 ^{14}C -アミノ酸のとり込みは、それぞれ相手側のアミノ酸を加えないとおこらず、かつ相方のアミノ酸のとり込みは 1:1 の割合である。トレオニンとヒスチジンの copolypeptide は、やはり塩酸による部分加水分解で $(\text{NH}_2)\text{Thr-His}(\text{COOH})$ を同定することにより確認し、システインとバリンの copolypeptide は、反応生成物を過マンガン酸酸化してから、塩酸で部分分解し、 $(\text{NH}_2)\text{Val-Cys-COOH}$ を分離同定することにより確認した。又アルギニンとグルタミン酸の copolypeptide はトリプシン分解によるペプチドの分析により固定した。

以上から明らかな如く、どの copolynucleotide も、それぞれ2種のアミノ酸が交互に配列したポリペプチドを合成する。しかもいずれの場合も、それ以外のアミノ酸のとり込みは全くおこらない。すなわち、この現象が、単に特定な場合に例外的におこるのではなく、copolynucleotide のもつ mRNA の活性として、一般的な性質であると云える。そして、この結果は、やはり polyAAG の場合と同じく、code が triplet で non-overlapping という始めの設定を完全に満足するわけである*。

8. code の配列順序

以上これまで述べた実験の結果から、code が triplet であることが決められた。しかしながら、どのアミノ酸がどの code の配列に相当するかは、我々の実験からだけでは不明である。すなわち、たとえば、poly AAG の場合、その分子内にくみ込まれている3種の code の配列、AAG, AGA, GAA に対して、リジン、アルギニン、グルタミン酸をそれぞれ対応させることはできない。同様に polyUC についても UCU と CUC の code のどちらがロイシン、どちらがセリンに対応するかは決められないわけである。

* 厳密に云えば、poly AAG の結果は code が3乃至は3の倍数ということを証明し、copolypeptide の結果は code は奇数ということを証明したわけで、2つの結果を合すると、code は3, 9, 15, …, $3 \times (1+2n)$, $n=0, 1, 2, \dots$ ということになるが、これまでに明らかにされた結果から考えて、9以上は code の数と考えられない。

2種の塩基が交互に配列しているポリマー、すなわち poly UC, polyUG, polyAC, polyAG の場合は、すでに定められているアミノ酸の code の組成のデータを利用すれば、理論的には対応が可能である。例えば polyAC によるトレオニンとヒスチジンの copolypeptide の合成の場合、ヒスチジンの code の組成として 2C1A が報告されているので、CAC がヒスチジン、従って ACA がトレオニンの code の配列ということになる。polyUC の場合はロイシンに対して 2U1C と 1U2C, セリンについても 2U1C と 1U2C の2つの code があるので、配列を対応させることはできない。polyAG, polyUG については code の組成のデータが不正確なので対応を求めることはむづかしい。polyAAG の場合、AAG, AGA, GAA の code のいずれも、その組成は 2A1G なので、やはり駄目である。

code の配列順序の最終的決定のためには、昨年夏にニューヨークの国際生化学会で Nirenberg によって発表された、たぐみな方法、すなわち、リボゾームへの各アミノ酸 sRNA のトリヌクレオチドによる特異的結合の実験を利用しないわけにはゆかない。この方法については前々号 (Vol.5, No.6, 1965) に梶氏等による詳しい綜説があるので省略するが、Nirenberg の研究室では、ポリヌクレオチドのリボヌクレアーゼ分解と、リボヌクレアーゼ S による cyclic ヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドの合成を利用して、約50のトリヌクレオチドを合成し、又 Khorana の研究室では DCC による有機化学的合成法によって全64個の可能なトリヌクレオチドが合成され、それらを使って sRNA のリボゾームへの結合が調べられ、本年6月までには、第5表に示すように、ほとんどの code の²¹⁾²²⁾²³⁾配列に対して、対応するアミノ酸が決められた。

この表から明らかなように、全く別の分析方法から求められた code の配列が、homopolypeptide や copolypeptide の cell-free 合成の結果から推定される code の配列の可能性と完全に一致している。(第5表の注参照) なお Brenner や Garen によって chain terminator と定められた UAA と UAG については、相当するトリヌクレオチド、UpApA, UpApG はどのアミノ酸 sRNA のリボゾームへの結合をも促進しなかった。

表5 アミノ酸の code の配列

第1	U	C	A	G	第3
U	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	<u>Cys</u>	U
	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	<u>Cys</u>	C
		<u>Ser</u>	Δ		A
	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	Δ	<u>Try</u>	G
U	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>His</u>		U
		<u>Pro</u>	<u>His</u>	<u>Arg</u>	C
		<u>Pro</u>	<u>Gln</u>	<u>Arg</u>	A
	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>Gln</u>	<u>Arg</u>	G
C	<u>Ileu</u>	<u>Thr</u>	<u>Asn</u>	<u>Ser</u>	U
	<u>Ileu</u>	<u>Thr</u>	<u>Asn</u>	<u>Ser</u>	C
		<u>Thr</u>	<u>Lys</u>	<u>Arg</u>	A
	<u>Met</u>	<u>Thr</u>	<u>Lys</u>		G
A	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	U
	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	C
	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	A
	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	G

表は F.H.C.Crick の書き方に従う。読み方は、たとえば最上段、右のシステインの code は、第一の塩基がU、第2がG、第3の塩基がUを意味する。したがって、システインの1つの code の配列は UpGpU。

空白のところはまだ結果がはっきりしていない。

Δ 印のところ、UAA,UAG は chain terminator.

2重にアンダーラインがあるところは、ポリペプチドの合成と、リボゾームへの sRNA の結合の両方で確認されたもの。

1重にアンダーラインのあるところは、リボゾームへの sRNA の結合からは判定できなかったが、ポリペプチドの合成の結果から推定されたもの。

以上決定された code の配列から明らかにされた第一の点は、ほとんどすべてのアミノ酸の code が degenerate していることである。(すなわち一つのアミノ酸に対して、すくなくとも2つ以上の code がある。) さらにこの code の degeneracy には規則性があることがわかる。^{21, 23)} 3番目の塩基, 3'-OH 側の塩基はプリン同志、又はピリミジン同志置換が可能である。又3番目の塩基は何であってよい場合もある。(バリン, セリン, アラニン, プロリン, トレオニン, グリシン, アルギニンの場合) さらに、ロイシンやアルギニンの場合の如く、第1番目の塩基が変わってよい場合もある。この様な規則性が何を意味するのか、今後の研究にまたねばならないが、生物の進化と code の universality の関係、又は mRNA と sRNA との相互作用などの点から考えて興味ある問題である。

9. *in vivo* における code の読み

sRNA のリボゾームへの結合によって決められた code の配列は遺伝的変異による、ヘモグロビン、トリプトファン合成酵素、TMV タンパク等のアミノ酸の replacement の結果ともよく一致する。又最近次田²⁵⁾ 皓や Streisinger によっておこなわれた T₄ フェージ変異株のリゾチームのアミノ酸配列の変化を十分満足以に説明する。くわしい解説は著者の専門とするところでないので省略するが、プロフラビンによって塩基の附加、欠損がおこったと考えられる変異株のリゾチームのアミノ酸配列の一部は、野生型に対して第7図の如く変化する。このアミノ酸配列の部分的おきかえは、リゾチームのアミノ酸配列を定めている DNA 鎖に塩基の附加、欠損がおこり、code の読みがづれたと考えて、変異株リゾチームのアミノ酸配列のおきかえを十分満足するように、各アミノ酸に対してその code の配列の中から、適当なものを撰び出すことができる。(第7図参照)。すなわち、この結果は、一面において、*in vitro* の実験による code の配列決定が十分信頼するに足ることを示すものと云えよう。

10. リボゾームへの sRNA 結合による code の配列決定の弱点

トリヌクレオチドによる sRNA のリボゾーム結合による code の配列決定は、種々の結果を総合判断すると、それが実際にタンパク合成を観察しているのではないにせよ、十分に信頼するにたるものであると考えられる。

しかし、mRNA のような高分子とトリヌクレオチドでは、当然その作用機作も異なることが考えられるわけで、code の degeneracy 等についての結論を評価する場合、次に述べるような点を考慮する必要がある。

①まずすべてのトリヌクレオチドが効果があるわけでない。例えば CUC はロイシンの code, AGA はアルギニンの code と、ポリペプチドの合成の結果から推定されるにもかかわらず、CpUpC, ApGpA は共に全く活性がない。又他の多くのトリヌクレオチドも、UpUpU 程効果がなくて、コントロールに比し、わずかに数10パーセント、sRNA の結合を促進する程度のものが多い。② code と考えられないアミノ酸

第7図 T₄ ファージのリゾチームのアミノ酸配列

野 生 型	アミノ酸配列	Lys	Ser	Pro	Ser	Leu	Asp	Ala
	code の配列	AGU	CCA	UCA	CUU	AAU		
	code の配列	GUC	CAU	CAC	UUA	UUG		
変 異 株 (eJ ₄₄ eJ ₄₂)	アミノ酸配列	Lys	Val	His	His	Leu	Met	Ala

第8図 グルタミン酸 sRNA の GpApA によるリボゾームへの結合

sRNA の結合を促進するものもある。例えば第8図に示すように、普通の条件下ではグルタミン酸 sRNA のリボゾームへの結合は GpApA によって促進されるが、反応を低温でおこなったり、 Mg^{2+} の濃度を高めると、ApGpA や ApApG でもグルタミン酸 sRNA のリボゾームへの結合は促進されるようになる。しかし poly AAG による homopolypeptide の合成の結果からは、GAA だけがグルタミン酸の code と考えられる。又アスパラギン酸 sRNA のリボゾームへの結合は poly AAG や GpApA によって促進されるが、cell-free のタンパク合成系では、poly AAG によってポリアスパラギン酸の合成は認められない。普通 sRNA のリボゾームへの結合の効率を高めるため、0.03M の Mg^{2+} を用い、低温で反応させることがおこなわれているが、このような反応条件は code に ambiguity をもたらすことは、すでに知られた事実である。²⁶⁾

要するに、得られた結果を、適当に他の実験結果、例えばアミノ酸の replacement の結果や、ポリペプチドの合成の結果を参照して、取捨選択しなければいけないわけで、このことは、一面この方法の限界点を示すものと云えよう。

11. 終りに

過去10年間問題となっていた核酸の情報伝達のユニ

ットについて、それがトリプレットであることは、もはや以上述べた実験事実によって、最終的に決定されたと考えてよいであろう。今後この様な実験の延長としては、たとえば、code の配列が sRNA のリボゾームへの結合でははっきりしないものについて、塩基配列の定まったポリマーを使ってタンパク合成の段階で調べることや、chain terminator の意義を *in vitro* の系で確かめるような問題がある。遺伝情報の問題に関しては、ほかに今年の Federation Meeting で、mRNA の code の読みとりの方向について、それが 5'-OH から 3'-OH へと読まれることが、Wahba らによって示され、^{7b,7c)} しかもその結論は、T₄ ファージ変異株のリゾチームのアミノ酸配列の結果とも一致するなど、²⁵⁾ もはやタンパク合成の基本的なメカニズムについては、大体が明らかになったと云える。しかしながらこの今までにわかったメカニズムを、より高次の問題、すなわち、タンパク合成の制御、或いは細胞の分化の問題にもちこんだ時には、我々はいぜんとして未知の分野にいるわけで、今後の発展のためには、タンパク合成に関与する基本的諸反応について、例えば coding に関しては、リボゾームの構造、sRNA の構造、sRNA、リボゾーム、mRNA の相互作用、アミノ酸の transfer に関する反応の解析等について、より詳細な研究が必要であろう。

文 献

- 1) J.H. Matthaei and M.W. Nirenberg : Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 47, 1580 (1962)
- 2) M.W. Nirenberg and J.H. Matthaei : Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 47, 1588 (1962)
- 3) M.W. Nirenberg, J.H. Matthaei and O.W. Jones: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 104 (1962)
- 4) J.H. Matthaei, O.W. Jones, R.G. Martin and M. W. Nirenberg : Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 662 (1962)
- 5) J.F. Speyer, P. Lengyel, C. Basilio and S. Ochoa: Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 63 (1962)
- 6a) R.S. Gardner, A.J. Wahba, C. Basilio, R.S. Miller, P. Lengyel and J.F. Speyer: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 2087 (1962)
- 6b) A.J. Wahba, R.S. Gardner, C. Basilio, R.S. Miller, J.F. Speyer and P. Lengyel: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 49, 116 (1963)
- 7a) A.J. Wahba, C. Basilio, J.F. Speyer, P. Lengyel, R.S. Miller and S. Ochoa: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 1683 (1962)
- 7b) M.A. Smith, M. Salas, W.M. Stanley, Jr. and A.J. Wahba : Federation Proc., 24, 409 (1965)
- 7c) M. Salas, M.A. Smith, W.M. Stanley, Jr., A. J. Wahba and S. Ochoa: J. Biol. Chem., in press
- 8) A. Falaschi, J. Adler and H.G. Khorana: J. Biol. Chem., 238, 3080 (1963)
- 9) H.G. Khorana : Federation Proc., (1965), in press
- 10) T.M. Jacob and H.G. Khorana : J. Am. Chem. Soc., in press
- 11) M. Chamberlin and P. Berg: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 48, 81 (1962)
- 12) S. Nishimura, T.M. Jacob and H.G. Khorana : Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 52, 1494 (1964)
- 13) E. Ohtsuka, M.W. Moon and H.G. Khorana: J. Am. Chem. Soc., in press
- 14) C.C. Richardson, C.L. Schildkraut, H.V. Aposhian and A. Kornberg : J. Biol. Chem., 239, 222 (1964)
- 15) C. Byrd, E. Ohtsuka, M.W. Moon and H.G. Khorana: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 53, 79 (1965)
- 16) R.D. Wells, E. Ohtsuka and H.G. Khorana : J. Mol. Biol., in press
- 17) S. Nishimura, D.S. Jones and H.G. Khorana: J. Mol. Biol., 13, 302 (1965)
- 18) S. Nishimura, D.S. Jones, E. Ohtsuka, H. Hayatsu, T.M. Jacob and H.G. Khorana: J. Mol. Biol., 13, 283 (1965)
- 19) D.S. Jones, S. Nishimura and H.G. Khorana : J. Mol. Biol., in press
- 20) P. Desnuelle and A. Casel : Biochim. Biophys. Acta, 2, 64 (1948)
- 21) M. Nirenberg, P. Leder, M. Bernfield, R. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman and C. O' Neal: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 53, 1161 (1965)
- 22) R. Brimacombe, J. Trupin, M. Nirenberg, P. Leder, M. Bernfield and T. Jaouni : Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 54, 954 (1965)
- 23) D. Söll, E. Ohtsuka, D.S. Jones, R. Lohrmann, H. Hayatsu, S. Nishimura and H.G. Khorana: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., in press
- 24) M.G. Weigert, A. Garen: Nature, 206, 992 (1965)
- 24) S. Brenner, A.O.W. Stretton, S. Kaplan : Nature, 206, 994 (1965)
- 25) 岡田吉美, E. Terazaghi, G. Streisinger, 次田皓, 井上正順 : 第38回日本生化学会 (1965)
- 26) W. Szer and S. Ochoa: J. Mol. Biol. : 8, 823 (1964)

(38頁よりつづく)

文 献

- 1) P. Doty et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. 45 (1959) 482
- I. Tinoco ; J. Amer. Chem. Soc. 82 (1960) 4785
- 2) J. Marmur et al; J. Mol. Biol. 5 (1962) 109
- 3) たとえば文献 1) で用いられているもの。
- 4) W. Szybalski et al.; Analyt. Biochem. 3 (1962) 267
- 5) Northeast Science, P. O. Box Y, Durham, New Hampshire でだしている Temperature Programmer というのは, 温度変化が時間にリニアになっている。記録計は別。
- 6) アメリカ Gilford 社の Gilford 2000 と称する多チャンネル自動吸光度記録装置。これに温度プログラムがついていて, ある時間間隔で打点記録できるようになってい

る。縦軸は吸光度でできるようになっている。これはアメリカンコマーシャル株式会社(東京都千代田区飯田町2-13 TEL (261) 8276) という代理店で扱っている。文献 4) が製品化されたものらしい。

- 7) 日本生物物理学会学術講演会予稿集 (昭和39年12月)
- 8) 小松電子工業 K.K. 試作品
- 9) 放医研化学部鈴木堅之博士のご好意による。
- 10) 名大・分子生物・三浦謹一郎博士との共同研究 : 発表準備中
- 11) 発表準備中
- 12) T₂ phage DNA について, かなり顕著な微細構造がみられ, 検討中である。
- 13) 株式会社, 小松電子工業 (東京都港区芝田村町2-12 TEL (591) 3256)