

遺伝コードが導く最小生命分子系

清水 幹夫

宇宙科学研究所 (現宇宙航空研究開発機構, 宇宙科学研究本部) 名誉教授

E-mail: mshimizu55@ybb.ne.jp

(Received October 18, 2007; Accepted October 26, 2007)

1. 序

生命の三大特徴は代謝、遺伝、進化とされる。生命分子自身とエネルギーを再生産する代謝は酵素(触媒)としてのタンパク質(アミノ酸ポリマー)によっておこなわれ、世代間の遺伝情報の伝達は核酸(DNA, RNA というヌクレオチドポリマー)によって担われる。核酸塩基の置換による遺伝型の変化は表現型の変化へとつながって進化を引き起こす。現存生命系の根幹をなすのが核酸上の遺伝情報(ヌクレオチドシーケンス)を遺伝暗号を手がかりにしてタンパク質酵素へと具現化するタンパク質合成系である。

生命を分子レベルで解明する学問が生化学であり、分子生物学であるが、ここではやや視点を変え、“物事”の“物”に重点を置くこれらの分野にたいして、事からアプローチする物理(物のことわり学)的解析を試みたい。物理では基本的要素(ここではアミノ酸とヌクレオチド、それに反応基質)の間の基本的相互作用(それは生命の最大の特徴である特異性をもっている)が研究の中心になる。最も有名な特異的相互作用は核酸塩基間の水素結合による対合 G—C と A—U であろう。遺伝暗号表は三塩基と一アミノ酸の対合を指定するから、これも両者の特異的相互作用によるのではないかとするのが遺伝暗号の立体化学説であり、対応は偶然に決まったとする偶然凍結説(したがって分子機構には全く触れない)に対立する。また、酵素はタンパク質上に基質を特異的にキッチリと受容する穴をもち、いくつかのアミノ酸側鎖の作用で反応を促進させる触媒だからアミノ酸と基質の間の特異的相互作用の一例だとも考えられる。リボザイム(核酸酵素)の存在もこれまたヌクレオチドと基質間の特異的相互作用を予想させる。

2. 弱い特異的な赤ん坊酵素

特異的塩基対について考えよう。G—C とする塩基の対合は三本の水素結合のよってなされている。一方、生命分子の反応は水溶液中においておこなわれる。そして水分子も水素結合を非常に作りやすい物質である。水中の G と C が結合しようとしても、沢山ある水分子が G と C にくっついているのでそれをかき分けて結合をしなければならぬ。したがって水中の G—C 結合は極めて弱い。そこで G の水への溶解度が 5 mM と小さいのも原因でその親和性常数は $1 M^{-1}$ (G、C が 1 M の濃度の時半分位 G—C 形成)くらいと推定されているだけで、いまだ決定されていないのである。しかし、生命は現実にはこれらの弱い結合を使いこなしている。それは現在の生命の用いている分子は皆ポリマー(100 マー以上)で、必ずその上に疎水的環境(疎水的な触媒のクロロフォルム中では G と C の親和性常数は $10^5 M$ と極めて強くなる)のポケットをもち、これを使うからである。DNA の二重らせん構造をかんがえればわかるようにラセン内部はコンパクトで水が入る余地がない。こういったラセン内部では G

—C 結合はとても強い。

次に酵素と基質間の関係に議論を移そう。核酸酵素が最近発見されたが、それまではすべての酵素はタンパク質と考えられ、これまでに 2500 種くらい見出されている。代謝の各反応毎に基質特異的な酵素が一種類あるとされる。酵素の活性部分には基質をピッタリと食べ込む(しかもその時に基質間の反応部位がちょうど向い合い、溶液中でランダムに衝突してたまたま反応するよりもはるかに高い確率で反応を促進する)穴があいている。そしてこの穴の中に突き出すいくつかのアミノ酸側鎖が基質と中間体を形成し、活性化エネルギーを下げ触媒効果を示す。実は 1950 年代から、多くの酵素活性部位にヒスチジンが含まれていることが判ってきたので、このアミノ酸の酵素活性(厳密に言えば酵素であることは完全には証明されていない。反応促進活性と言った方が正しい)を求めてたくさんの研究がなされてきた。Katchalski たち[1]はパラニトロフェニルアセテートが加水分解により黄色のイオンと酢酸になることを利用してヒスチジンの側鎖であるイミダゾール(この化合物が酸塩基触媒活性をもっていることが知られていた)が自発的加水分解速度を遥かに越えて反応を進ませることを見出した。この時期にはアミノ酸をつなげるペプチド合成が盛んに行われたので、いろいろな酵素に含まれるヒスチジンを含む 5 マー、7 マーのペプチド、もっと長いポリマーなどについて多くの論文が発表された。極めつけは Stewart [2]が電子計算機を駆使して加水分解酵素キモトリプシンの活性部位を模した 73 マーペプチドを合成しキモトリプシンの 4 分の 1 にせまる活性を得たことであろう。一方、リボザイムについても同じ様なことが考えられる。例えば、アデニン塩基分子は化学構造がイミダゾールに似ているので同じようなことがないだろうか考えた Maurel ら[3]はイミダゾールよりはずっと弱いながらも加水分解活性があることを報告している。(ただし厳密に言えばヒスチジンもアデニンも加水分解活性ベストのシステインに比べ活性は極めて弱い特異性もなく良い例ではない。)

それではヒスチジンやアデニンの加水分解活性以外にも弱いながらも特異的な酵素活性作用をもつアミノ酸やヌクレオチドがあるのではなかろうか。例えば、アミノ酸なら、その側鎖以外に比較的活性の高いペプチド結合位にあるアミノ基なども使うのではなかろうか。たとえ対応する酵素の百万分の一の弱さであっても、特異性が有れば意味が有る。現在の酵素の反応のタイムコンスタントは 10 msec くらい、基質との結合の強さはマイクロ M 程度である。水素結合の強さが 1 M 程度だったことを考えて逆算すると、赤ん坊酵素のタイムコンスタントは 1 分から 10 分のオーダーになる。一方生命の発生のタイムコンスタントは 1 万年はあるだろうから、これにくらべると赤ん坊酵素のそれは無視できる程短い。

そもそも生命の起源と進化にかんしては、単純で認識力の粗い低分子から、複雑で精密な高分子へという流れを考える見方が正統的だった。最近流行の RNA ワールドは原始の海で RNA ポリマーが形成でき(これは最近珪素の同位体データから原始海水温度が 80–90 °C と高温なことが強く示唆されて[4]、排除される可能性が高くなった)機能による選択を経てリボザイムが出現、後により機能的なタンパク質に置き換えられる(これも未証明)と考えるからむしろ異端である。しかし、これまで誰もオリゴマー酵素(正確には反応促進分子というべき)の存在をチェックしていない。そこでまずはモノマー酵素などの実験的検出を行う必要がある。

ところで、現在知られている酵素は各々の基質に対して特異的である。アミノ酸の総数は 20、ヌクレオチドは、ヌクレオシドや塩基をいれても 4×3 で 12、ジペプチドは 400、ジヌクレオチドが 16。とてもたりない。したがって赤ん坊酵素の特異性は基質特異的というよりむしろ反応特異的(同質の反応群は皆一つの赤ん坊酵素が処理する)であろう。酵素はあとで述べるように機能によって 6 種に分類される。しかしこれは反応形式だけで分類したので、われわれの議論にはくくりすぎである。例えば加水分解酵素にはセリンプロテアーゼというセリンを使うキモトリプシンなど、システインを使うパパイニンなど、アスパラギン酸を使うトリプシンなどがあり、使うアミノ酸が違う。(さらに金属を使うものもあるが、この議論の中では広がり過ぎをさけるため修飾アミノ酸、修飾ヌクレオチドと共に対象からのぞく。)したがって反応特異性というときの反応の数は 6 をかなり越えるかもしれないが縮重(あるアミノ酸が別の反応にも関与する)を考慮して 15–20 を期待しよう。なによりもするべきことは 6 大分類に属する反応群に対しモノマー、ダイマーのすべて(ジペプチドだけは 400 もやれないから一部だけになる)の可能性をサーベイすることである。実際後でやるように現存の代謝系をいじってみると、もっと長いオリゴマーを考慮して基質特異的もっていく必要はないことが判る。

3. アミノ酸酵素のシステムチックな実験サーベイ

タンパク質酵素はその反応性から 6 つに分類される。(1) 基質の酸化や還元を触媒するオキシドレダクターゼ、(2) ある基質の特定の基を他の基質に転移するトランスフェラーゼ (3) 加水分解にかかわるヒドロラーゼ (4) 基質を分解するリアーゼ (5) 分子内の原子配置を変化させるイソメラーゼ (6) ATP を使って物質合成を触媒するリガーゼがある。どの分類でタンパク質アミノ酸 (20 種) が酵素として反応促進性をもつかを実験で追うことにする。さらに有機化学に基くもっと大ざっぱな分類としては酸化還元酵素のように最終的に電子(または水素原子)が転移する場合と基が動く酸-塩基型酵素(オキシドレダクターゼ以外の 5 種は皆これに属する)の二つにくくることができる。

弱い反応促進性を検出するためにはアミノ酸や基質濃度を数 10 mM から数 100 mM 程度と濃くしなければならない。このため低可溶性の疎水性アミノ酸の場合には後述のようにそのメ

チルエステルやエチルエステルを用いた。それに応じて水素イオン濃度 (pH) を一定にするため緩衝液濃度も濃くする。反応の動きの測定には直接関与する基質が可視紫外光吸収などで検出できれば良いが、さもなければ反応後の物質を他の酵素反応とカップルさせて検出することも行なった。また薄層クロマト法や高速液体クロマト法、質量分析法なども使った。これらの手法は主な酵素反応にたいしては昔から確立している。ただ光学的検出法を用いるためには或種のアミノ酸が紫外域で強い吸収をもつことを考慮して近紫外、可視域のアミノ酸の窓で観測しなければならない。NADH, NADPH のような 340 nm の吸収、カルボニル基の 340 nm のそれ、FAD の 448 nm のそれなどが便利な道具になる。

例えばヒスチジンによるピルビン酸からオキザル酢酸を作る反応のタイムシーケンスを Fig. 1 にあげる。さらにいろいろな反応に対するアミノ酸酵素(さらに他の小さなオリゴマー酵素)をあげたのが Table 1 である。現実の酵素系との対応は後回しにして一般論からいうと、実験結果の第一の特徴は殆どの場合 1 反応毎に 1 アミノ酸酵素のみが見出されたことである。も一つ気がつくことは、酸化還元反応はシステイン、酸塩基反応(特に中枢代謝系ではリアーゼ、リガーゼが大部分)ではヒスチジンが支配していることである。しかし別の反応では他のアミノ酸(グルタミン酸、リシン、チロシンなど)しか活性がみられない。基質のアミノ酸に対する結合常数 (K_m) は 100 mM のオーダー、一方タイムコンスタントは数分位となっている。したがって対応する酵素に比べ K_m で 2–3、 k_{cat} で 2–3 桁弱い。アミノ酸の代わりに水を加えた自発的反應の速度に比べ触媒効果は 100 倍から 1000 倍と反応毎にかなり違う^{5,6)}。ただこれらは 25 °C で測っているから 85 °C では更に 1–2 桁反応速度が上がる。生命の発生に要する地質学的時間は十分に長いので、自然反応と蛋白質酵素反応の中間の値は起源を論じるのに十分であろう。

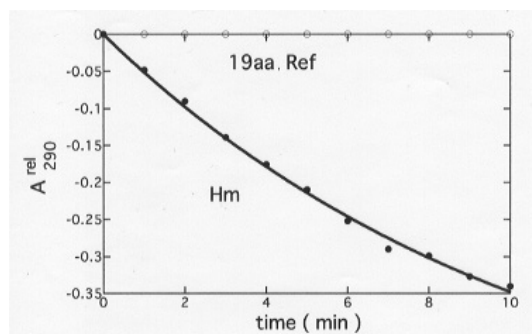


Figure 1. An example of UV experiments (details are shown in the text).

4. 現実の中核酵素系との関係

われわれを含め、大半の生物は中枢代謝系においていわゆる EMP 経路によりリン酸を使いながら葡萄糖をまずピルビン酸に開裂し、次に TCA サイクルを使って NADH、その H を O_2 にわたして H_2O にする。その間 CO_2 を放出するとともに AMP より ATP をつくるのである。しかしアミノ酸は実は好熱菌に残っている古い昔の中核

Table 1. Rate-enhancers of amino acids, di- and trinucleotides for various enzymatic reactions.

enzyme	amino acid rate-enhancers	dinucleotide rate-enhancers	trinucleotide rate-enhancers	trinucleotide non rate enhancers
lactate dehydrogenase	cysteine	none	ApCpA	CpApC
				GpCpA
malate dehydrogenase	cysteine	none	ApCpA	GpCpA
				tryptophan
ketoglutarate dehydrogenase	cysteine	none	ApCpA	GpU [Ⓢ] A
				tyrosine
chymotrypsin	cysteine	none	none	many
acetylCoA carboxylase	histidine	UpG	GpUpG	I [Ⓢ] pUpG
				GpUp [Ⓢ] A
pyruvate carboxylase	histidine	UpG	GpUpG	tyrosine
				GpUp [Ⓢ] A
citrate synthase	histidine	none	GpUpG	GpUp [Ⓢ] A
				tyrosine
2-keto-3-deoxy aldolase	histidine	none	GpUpG	CpUpG
				glutamine

代謝系、リン酸を使わないED経路を使いピルビン酸を作ることが実験的に判った(2007年3月の学会での発表: 清水、山岸、大島)。TCA サイクルはリン酸を使わないからそのまま使える[7]。とくに前者は意外な結果でこのため長い間だれもアミノ酸酵素の本質に迫れなかったのである。

アミノ酸酵素はエネルギー代謝に限らずアミノ酸合成系やリピッド合成系でも働く。前者ではアラニンピルビン酸に変えるアラニンアミノ転移酵素、後者ではアセチル CoA とコハク酸 CoA からブチル CoA を2コをつくる脂肪酸酸化酵素などが、それぞれリシンとヒスチジンによって代行されることがわかった。こうして見るとアミノ酸酵素は原始生命にとっての触媒そのものであったと思われる。

5. ジペプチド酵素

アミノ酸 A と B からジペプチド AB を作るとその総数は 400 種に達する。アミノ酸 20 種なら全部活性をチェックできるが、この場合は組み合わせが多すぎる。そこで現在の酵素に関する情報を使ってチェックする数を減らすことを試みざるを得ない。かなりの酵素に対し X 線回折法で立体構造が決められている。活性中心においてはどのアミノ酸が基質のどの部分を捕え反応を進めるかと言う機構もかなり判明している。こういった知識を考慮にいれて、有効そうな1つのアミノ酸を少し範囲を広げながら(例えばグルタミン酸ならアスパラギン酸も、リジンならアルギニンも含める)組み合わせで数十の候補を選び酵素活性を拾うことにする。結果は Table 1 にのせてある。

実は筆者の最終目標は後述する遺伝暗号の問題にある。そこで初めの対象は(原始)タンパク質合成系でのアミノアシル tRNA 合成酵素(特にアミノアシルアデニレートから tRNA にアミノ酸を転移する反応)と RNA 鋳型上に並んだアミノアシル tRNA 間のペプチド転移反応に選んだ。まず原始アミノ酸といわれる小さなアミ

ノ酸群、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、バリン間の16種を試すと、バリン-アスパラギン酸VDの組み合わせだけに原始tRNA間の特異的アミノ酸転移が観測された[8]。次にペプチド転移反応ではアラニン-ヒスチジンAHが見つかった[9]。なお、シーケンスを逆転させたジペプチド群DV、HAは反応を促進させないから特異性は明瞭である。ジペプチドになると、酵素活性はアミノ酸の時より当量あたりで増加する。

6. ヌクレオチド酵素と遺伝暗号

前述のようにモノヌクレオチドでは酵素としてあまりはかばかしい活性が見出されなかった。しかし、二塩基がジ燐酸エステル結合で繋がるとうずと可溶性になり、酵素活性を試し易く

Table 2. Table of genetic code (indicated as anti-codon).

Amino acids are shown as 3 letters. First anti-codon are almost determined whether it is a purine (A or G) or a pyrimidin (U or C) except for the cases of (Term, Try) and (Ile, Met).

		3rd				1st
		A	G	U	C	
2nd	A	Phe	Ser	Tyr	Cys	AG
		Leu	Ser	Term	(Term, Try)	UC
	G	Leu	Pro	His	Arg	AG
		Leu	Pro	Gln	Arg	UC
	U	Ile	Thr	Asn	Ser	AG
		(Ile, Met)	The	Lys	Arg	UC
C	Val	Ala	Asp	Gly	AG	
	Val	Ala	Glu	Gly	UC	

なる。そこで 4 個の塩基の組み合わせで出来る 16 個のジヌクレオチドモノリン酸を使い 6 種の酵素分類について活性を調べた。その結果予期しなかったアミノ酸酵素とジヌクレオチド酵素のあいだの関係がうかびあがった。Table 1 の第二列に実験の結果得られた(これも一分類について一つの)ジヌクレオチド酵素の名前が挙げられているが、これを対応するアミノ酸と比べると驚くべきことに遺伝暗号表でのコード(アンチコドンとアミノ酸の対応関係 ; Table2) そのものになった。ジヌクレオチドはいつも働くわけでないがトリヌクレオチドでは常に対応関係がみられた (Table1 の右端)。またアンチコドン以外の 3 塩基は全く働かないことも多くの例で確かめてある。

この事実の一番素直な解釈は遺伝暗号表の実体が塩基群とアミノ酸の間の立体化学的關係にあるとすることである。Fig. 2 でしめすようにこの関係が存在すれば三塩基とアミノ酸の構造関係が 3 塩基およびアミノ酸酵素群と基質群の立体化学関係に転化できることになり、まさに構造と機能の対応が一挙に引き出せるのである。

遺伝暗号が立体化学的關係にもとづいているという見方が唱えられてから久しいが、最近までこの説を支持する実験事実は殆ど提出されてこなかった。遺伝暗号表(アンチコドンで書かれる)を特と眺めると、いろいろなことが議論できる。例えばアンチコドンでかかれた暗号表で言う一番大切な二番目が A のアミノ酸の場合は皆疎水性が高く、U の場合は逆に親水性が強いものばかりである。塩基の内でもっとも疎水的なのが A、最も親水的なのが U であるから、アンチコドンをとると何か化学的關係があるようなところがある。

さて遺伝暗号の分子論的解明には、とに

かくタンパク質合成系において tRNA のアンチコドン (と識別位塩基) が ARS のアイデンティティ位 (識別点) になっているかどうかが問われる。Uhlenbeck [10] は T7RNA ポリメラーゼを用いて任意の tRNA を合成する遺伝子工学的手法を考案し、フェニルアラニン tRNA のアンチコドンと識別位塩基、それに 20 番目の U 塩基などがアイデンティティ位を担っていることを証明した。そのほかにも多くの人々がこの手法でいろいろな tRNA を調べたが、我々のグループはアンチコドンと識別位塩基に限って大腸菌の 20 種の tRNA をすべて調べることにし、早くも 1992 年にはアンチコドンがセリン、アラニン、ロイシンをのぞくすべて、識別位塩基はセリンとトレオニンを除くすべてでアイデンティティ位になっていることをしめした[8]。これはアンチコドンと識別位塩基の組み合わせが対応するアミノ酸を受容するという C4N 説を裏うちするものである。

そこで、現在の tRNA の最も本質的な部分を引き抜いて短い (原始) tRNA を作り、そこにオリゴペプチド (実際には上記のようにバリン-アスパラギン酸というジペプチドが見つかった) を触媒にいれ、活性アミノ酸 (アミノアシルアデニレート : アミノ酸とアデノシンモノリン酸 AMP の脱水化合物。ARS はこの化合物をアミノ酸と ATP から作る役目もしている。アミノアシルアデニレートから tRNA にアミノ酸を転移するのがもう一つの役目である) からアミノ酸をこの RNA に移すことに成功した。我々はこれまでに作り易い 16 種のアミノアシルアデニレートに対しアミノ酸が原始 tRNA に転移することを確かめている。ここでいろいろな実験事実が一つに統合化された。

遺伝コードワールド (アンチコドン-アミノ酸ワールド)

生命の基本要素間の
基本的相互作用 黄金の三角関係 (生命マンダラ)

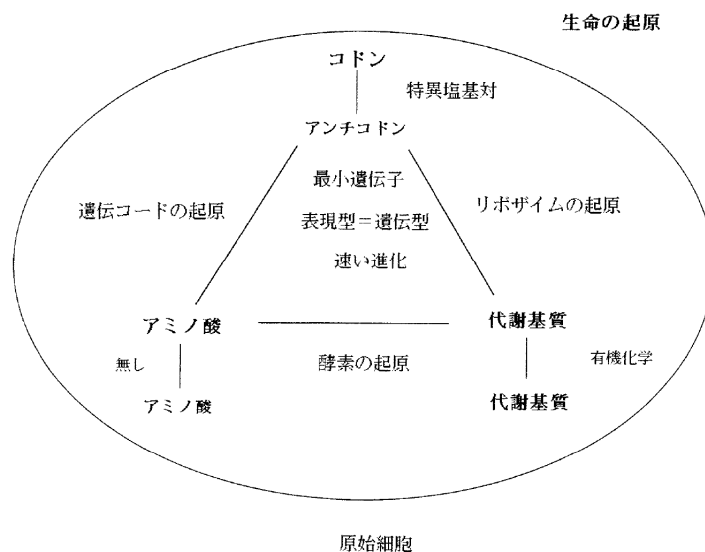


Figure 2. Genetic code world.

7. 現代の生命分子系へ

太古、生命がどう出現したかといっても、地球上のどの海で、どんな形で生まれたかといった歴史的起源は化石を求めることが無理で追うことができない。しかし分子論的起源なら生命分子の物理化学的特性を調べることで推論できる。これまで議論したようにこういった分子過程のタイムコンスタントは赤ん坊酵素で数分である。(上記実験が 25 °Cで行われ、原始海水温度が 85 °Cである事から更に反応速度は1-2桁速い。)一方原始海水中ないし熱水噴火孔にアミノ酸、いろいろな基質等が存在した事は判っている。目下、炭素質隕石中にはヒスチジンなどの高級アミノ酸は見つかっていないが、これは検出に十分な量の隕石が手にはいらなただけの話である。そこで酵素反応は原始時初めからあったし、生命サイクルの流れはもっと速く数時間-数日に一回転するほどであったろう。

生命の本質はその主体性、環境の変化に対するオートノミーにあるとすれば、遺伝の最小単位であるトリヌクレオチド系が必要になる。これも酵素であるから表現型に遺伝型が一致したことになり、進化は物凄く速くなる。38 億年前の岩石中での炭素 12 と炭素 13 の比から炭酸同化作用はその頃発生し終わったという議論がある。一方、月からアポロが持ち返った岩の年代測定から月(したがってその近くにある地球)の表面が惑星形成過程の残りである隕石による爆撃を終えたのが 38 - 39 億年とされる。爆撃中は生命が生き残れないとすると生命の形成は 1 億年より短い時代の内に起きた。そして上記モデルのように遺伝型と表現型の連携が強ければ短い間にも生命系は動けたであろう。

現在の生命の本質に至るには酵素としてのタンパク質を合成する系、つまり遺伝暗号の形成が必要である。これも歴史的起源などは解明出来そうにないから、分子論で押さえるしかない。遺伝暗号が解読された三十数年前にはオリゴペプチド、オリゴヌクレオチドそれに活性度の高い基質などは簡単に大量には作れず、検出手段にしてもイメージングアナライザーとか僅少量測定可能のスペクトロメーターなど存在しなかった。今では事情が変わった。基礎分子生物学の研究はこのところないがしろにされてきたが、じつは今

こそが展開できる時期なのである。

とにかくアミノ酸(アンチコドン)酵素により葡萄糖が水と CO₂に分解され ATP ができる[7]。また原始 tRNA の特異的アミノアシル化がジペプチド酵素によっておこなわれる。現代生化学の基礎的相互作用が小さな生命のビルディングブロックで支えることが原始生命分子系の構築という手段によって判ってきた(遺伝コードワールド)。曙光は見えつつあるのか。なお、もう少し詳しくはこの辺の話を纏めた http://www.geocities.jp/mshimizu55/new_index.htm をご覧下さい。

引用文献

1. E. Katchalski, G. D. Fasman, E. Simons, E. R. Blout, F. R. N. Gurd and W. L. Koltun, Synthetic histidine-containing polypeptides as catalysts for the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate, *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 361-365 (1960).
2. K. W. Hahn, W. A. Klis and J. M. Stewart, Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin-like esterase activity, *Science* 248, 1544-1547 (1990).
3. M. C. Maurel and J. Ninio, Catalysis by a prebiotic nucleotide analog of histidine, *Biochemie* 69, 551-553 (1987).
4. F. Robert and M. Chaussidon, A paleotemperature curve for the Precambrian oceans based on the silicate isotope in cherts, *Nature* 443, 969-972 (2006).
5. M. Shimizu, Histidine and its Anticodon GpUpG are similar metabolic reaction rate enhancers: molecular origin of the genetic code, *J. Phys. Soc. Jpn.* 73, 323-326 (2004).
6. M. Shimizu, Amino acid and anticodon enhance metabolic reaction rates weakly but specifically: Genetic code world, *J. Phys. Soc. Jpn.* 76, 053801 (article number) (2007)
7. M. Shimizu, Histidine and cysteine can enhance the metabolic reaction rates in the TCA cycle and some autotrophic processes: Genetic code world, *Viva Origino* 35, 73-78 (2007).
8. M. Shimizu, Specific aminoacylation of C4N hairpin RNAs with the cognate aminoacyladenylates in the presence of a dipeptide: Origin of the genetic code, *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 23-29 (1995).
9. M. Shimizu, Detection of the peptidyltransferase activity of a dipeptide, alanylhistidine, in the absence of ribosomes, *J. Biochem.* 119, 832-834 (1995).
10. J. R. Sampson and O. C. Uhlenbeck, Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1033-37 (1988).