

ウェブチャプター23C 核 酸

目 次

- 23C.1 ヌクレオシドとヌクレオチド
 - 23C.1.1 ヌクレオシドとヌクレオチドの構造
 - 23C.1.2 いくつかの重要なヌクレオシドの誘導體
トピックス 抗ウィルス薬
 - 23C.2 核酸
 - 23C.2.1 核酸の構造
 - 23C.2.2 DNA の塩基対
 - 23C.2.3 DNA の二重らせん
 - 23C.2.4 DNA の複製
 - 23C.2.5 RNA
 - 23C.3 遺伝暗号と遺伝のしくみ
 - 23C.3.1 遺伝暗号
 - 23C.3.2 遺伝のしくみ
トピックス DNA のピリミジン塩基がシトシンとチミンである理由
 - 23C.4 DNA の塩基配列決定
 - 23C.4.1 制限酵素
 - 23C.4.2 化学的配列決定法
 - 23C.5 DNA 鎖の化学合成
トピックス PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)
 - 23C.6 組替え DNA
- まとめ

生命体の細胞は多様な働きをもっており、組織的に制御されている、そのためには膨大な情報が必要であり、それらは細胞が増殖するたびに引き継がれていく。これらの遺伝情報は核酸（DNA）に保存されており、次世代に伝達される。細胞内の染色体にある遺伝情報の構成単位が**遺伝子**（gene）とよばれ、その実体は長くつながったDNAの二重らせんである。

核酸（nucleic acid）には**デオキシリボ核酸**（deoxyribonucleic acid: **DNA**）と**リボ核酸**（ribonucleic acid: **RNA**）がある。生物のすべての遺伝情報はDNAに保存されており、RNAに転写され、タンパク質の合成のために翻訳される。



すなわち、DNA は細胞における遺伝情報の貯蔵庫であり、RNA はその転写と翻訳にかかわり、タンパク質の合成によって遺伝情報が発現される。この考え方はセントラルドグマ (central dogma) といわれ、F. Crick が 1958 年に提唱したものである。

この章では核酸とその構成要素となるヌクレオシドとヌクレオチドについて述べ、遺伝情報が DNA 分子に暗号化されている様式、そしてその遺伝暗号がタンパク質にどのように発現されるのかを説明する。また、DNA 分子の合成法や一次構造の決定法についても述べる。

23C.1 ヌクレオシドとヌクレオチド

23C.1.1 ヌクレオシドとヌクレオチドの構造

核酸を加水分解すると、その構成単位であるヘテロ環塩基と単糖、それにリン酸イオンが得られる。RNA から得られる単糖はペントースの D-リボース (ribose) であり、DNA から得られるのは 2-デオキシ-D-リボースである。これらの単糖は含窒素ヘテロ環塩基と β -N-グリコシドを形成している (ウェブチャプター23A の 23A.4 節参照)。これを**ヌクレオシド** (nucleoside) という。

ヌクレオシドの 5'-リン酸エステルが**ヌクレオチド** (nucleotide) であり、このリン酸エステルを介して別のヌクレオチドの 3'-ヒドロキシ基でつながっていくとポリマーになり、核酸を形成する (図 23C.1)。ヌクレオシドにおいて糖の位置番号にはプライム (') をつけて塩基部分の位置番号と区別する。

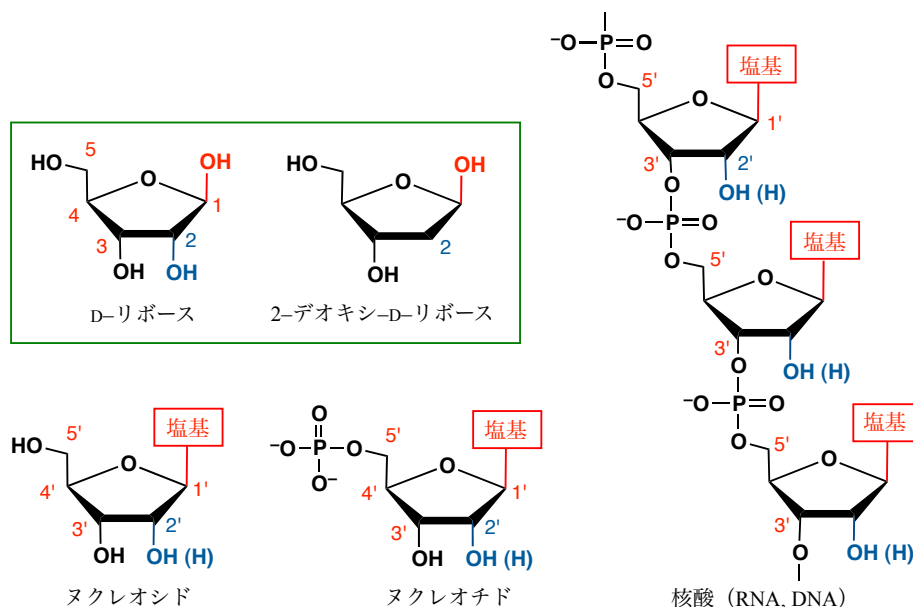


図 23C.1 ヌクレオシド、ヌクレオチドと核酸の構造

糖部分がリボースのものがリボ核酸 (RNA)、デオキシリボース (2 位の O が無い) のものがデオキシリボ核酸 (DNA) である (次節参照)。図中で“塩基”と書いた部分が核酸塩基であり、その構造は図 23C.2 に示すような芳香族ヘテロ環である。核酸塩基は 5 種類あり、それらは二環性のプリン環をもつアデニン (adenine: A) とグアニ

ン (guanine: G), ピリミジン環をもつシトシン (cytosine: C) とウラシル (uracil: U), チミン (thymine: T) である (図 23C.2). ピリミジン塩基のうちウラシルとシトシンは, 5 位にメチル基が置換しているかどうかの違いがあり, 前者は RNA に, 後者は DNA にのみ見られる. すなわち, 4 種類のリボヌクレオシド (A, G, C, U を含む) が RNA に, 4 種類のデオキシリボヌクレオシド (A, G, C, T を含む) が DNA に存在することになり, そのうちの 3 個の塩基の並び方で遺伝暗号をつくっている (後述).

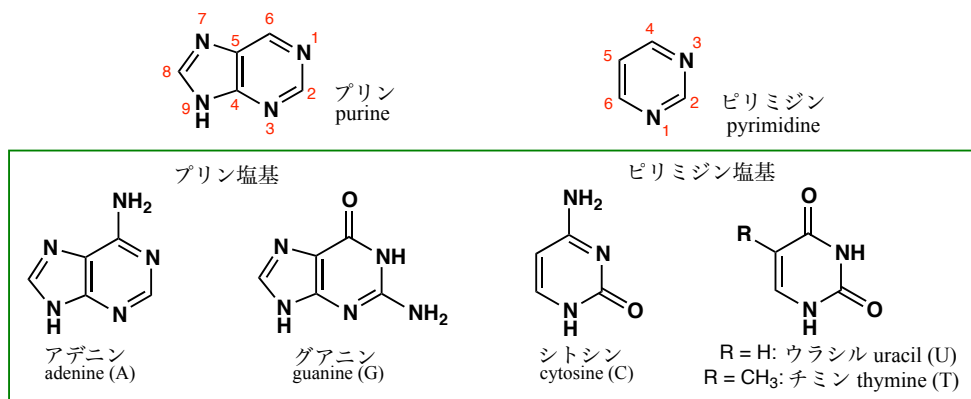
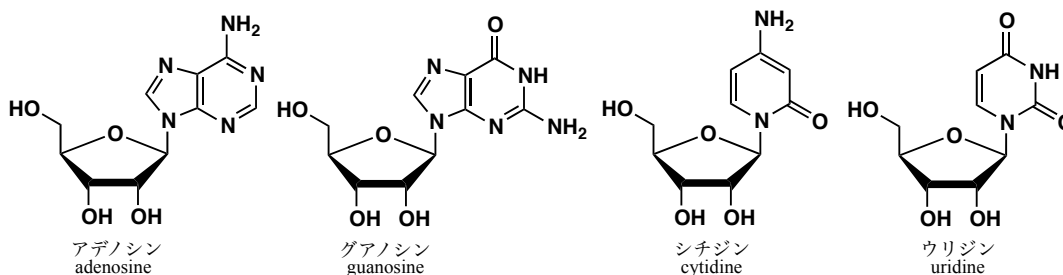


図 23C.2 核酸塩基の構造

RNA と DNA にみられる 4 種類のヌクレオシドの構造と名称を図 23C.3 にまとめておく. ヌクレオチドはアデノシンーリン酸 (通常 5'-リン酸) のようによばれることが多いが, アデニル酸, グアニル酸, シチジル酸, ウリジル酸, デオキシアデニル酸, デオキシグアニル酸, デオキシシチジル酸, デオキシチミジル酸の名称もある.

RNAに見られるヌクレオシド:



DNAに見られるヌクレオシド:

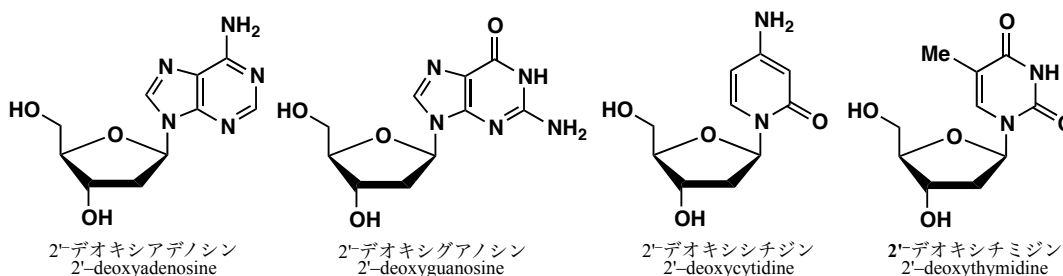
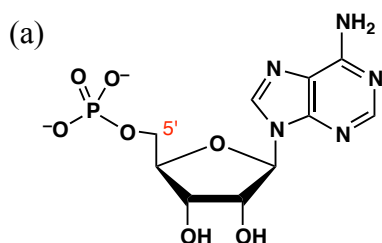


図 23C.3 ヌクレオシドの構造と名称

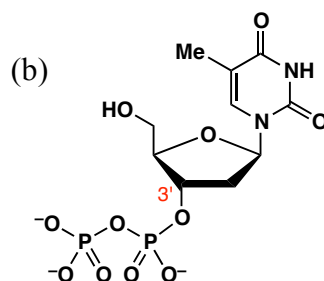
例題 23C.1 次のヌクレオチドの構造式を書け.

(a) アデノシン 5'-リン酸 (b) 2'-デオキシチミジン 3'-二リン酸

解答 (a) はアデノシンの 5'-OH がリン酸化されている. (b) は 2'-デオキシチミジンの 3'-OH が二リン酸のエステルになっている.



アデノシン 5'-リン酸



2'-デオキシチミジン 3'-二リン酸

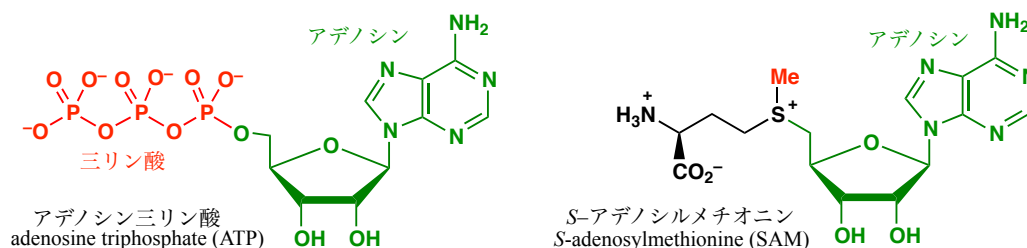
問題 23C.1 次のヌクレオチドの構造式を書け.

(a) 2'-デオキシアデノシン 3'-リン酸 (b) ウリジン 5'-リン酸

23C.1.2 いくつかの重要なヌクレオシドの誘導體

ヌクレオシドやヌクレオチドは、核酸の構成要素になるだけでなく、生体の化学エネルギー輸送に関係するものや補酵素として働くものもある.

アデノシン三リン酸 (ATP) は、構造的には標準的な RNA ヌクレオチドにすぎないが、ウェブチャプター 23E で詳しく説明するように、生化学反応におけるエネルギー輸送体として重要である. この機能は、酸無水物の構造をもつ三リン酸部分の加水分解と関係している (ATP の加水分解は発熱反応として $-\Delta H$ がとくに大きい).

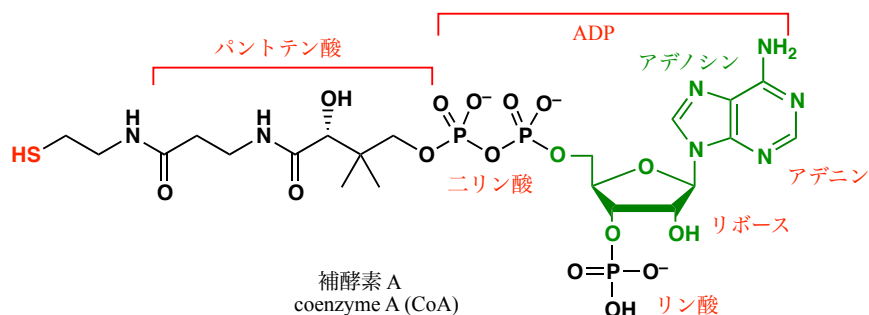


アデノシン三リン酸
adenosine triphosphate (ATP)

S-アデノシルメチオニン
S-adenosylmethionine (SAM)

S-アデノシルメチオニン (SAM) は、生体におけるメチル化剤であり、 S_N2 反応の例としてノート 12.1 で取り上げた. SAM は、ヌクレオチドであり、メチオニンのスルフィド部位が ATP を求核攻撃することによってつくられる. メチル化剤として働くときには、SAM のメチル基での S_N2 反応において S-アデノシルホモシステインが優れた脱離基になる.

補酵素 A (CoA) の重要な反応活性中心は、このヌクレオチド分子末端のチオール基であり、**CoASH** と略されることも多い。CoASH はアシル化合物とチオエステルを形成することによって種々の生化学反応を促進している (ノート 17.3 参照)。チオエステルは通常のエステルよりも反応性が高いからである (14.7 節参照)。



天然の酸化剤の一つは NAD^+ や NADP^+ であり、還元剤は NADH や NADPH である。これは補酵素としてアルコール脱水素酵素などにかかわっている。**NAD** はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの略号であり、図 23C.4 に示すような構造をもつジヌクレオチド誘導体である。ここでは核酸塩基の代わりに**ニコチンアミド**が使われており、これが酸化の反応中心になっている。このピリジニウム環は、ヒドリドイオンを受け入れることができる (ノート 10.3 参照)。

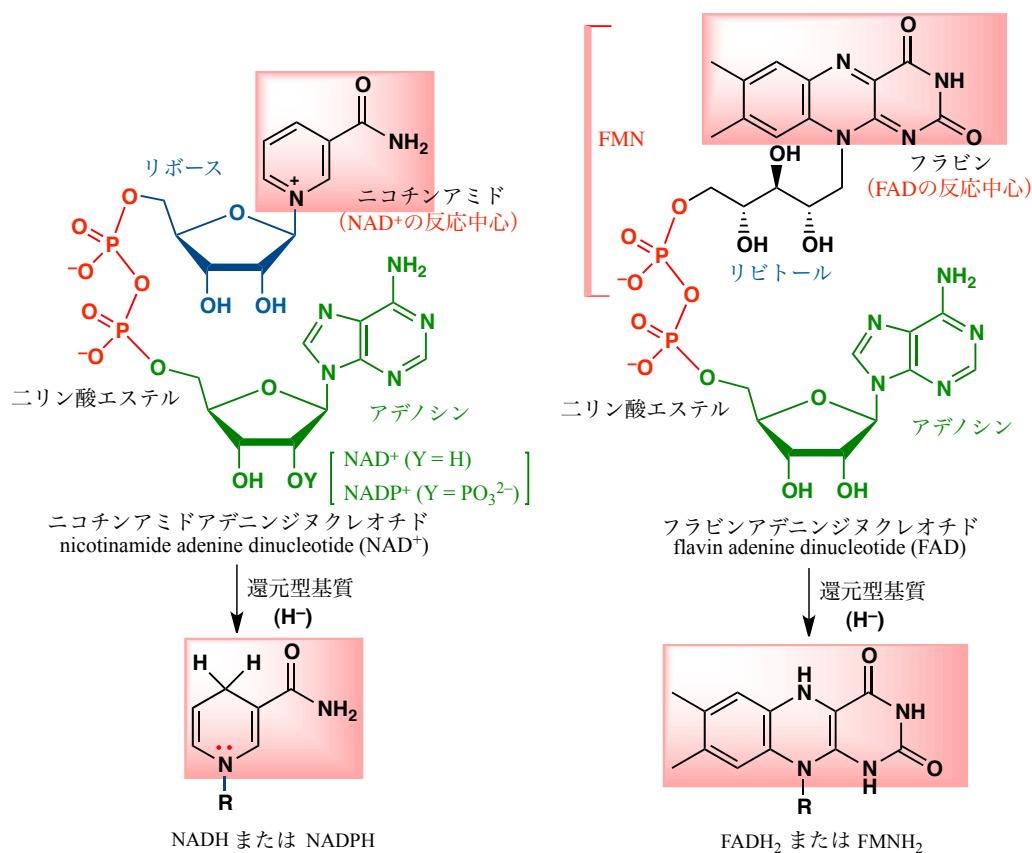


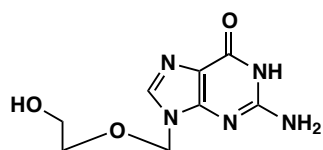
図 23C.4 補酵素 NAD と FAD の酸化型と還元型構造

酸化反応の補酵素となるもう 1 種類のヌクレオチドはフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) とフラビンモノヌクレオチド (FMN) である。反応中心はいずれも三環性芳香族ヘテロ環のフラビンであるが、FMN 部分の糖はリビトールとよばれるポリオールでカルボニル基をもたないので環状構造をとれない。NAD⁺や NADP⁺が主としてカルボニル化合物が関係する酸化還元補酵素であるのに対して、FAD や FMN は別のタイプの酸化反応にかかわっている。たとえば、FAD はジチオールをジスルフィドに、アミンをイミンに、飽和炭化水素を不飽和炭化水素に還元する。

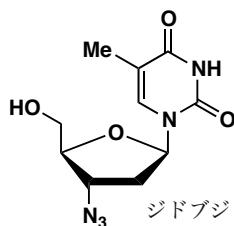
抗ウイルス薬

ウイルスは多くの病気の原因になっているが、その構造は細菌よりも単純で、ほとんど核酸 (DNA か RNA) がタンパク質膜に覆われただけのものにすぎない。ウイルスはそれ自身の代謝系をもたず、宿主細菌の代謝系に依存しているために、抗ウイルス薬の開発がむずかしいものになっている。薬を探索するには通常ウイルスが依存している代謝過程を標的とする必要があるからである。また、ほとんどの抗ウイルス薬は、ウイルスの複製が進んでいる間だけ有効で、病気が発症する頃にはあまり効かない。これが大きな難点になって、有効な抗ウイルス薬は数少ない。

アシクロビル (acyclovir) は、ヘルペスウイルスが引き起こす感染症に有効であり、2'-デオキシグアノシンの構造に似ている。ウイルスのもっている酵素によって、アシクロビルの第一級アルコールがリン酸化され、さらに宿主細菌の酵素によって三リン酸になる。このように活性化されたアシクロビル三リン酸はウイルスの DNA ポリメラーゼに取り込まれて、酵素・基質複合体を形成するが 3'-OH がないために DNA 複製は進まない。そのためウイルスの複製が阻害され、ウイルスは死滅する。



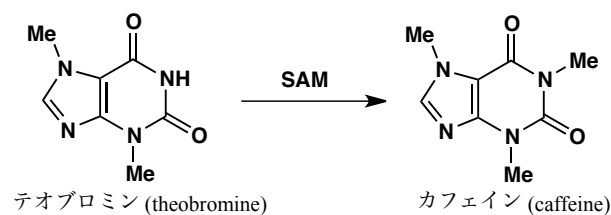
アシクロビル (acyclovir)



ジドブジン (zidovudine, AZT)

ジドブジン (zidovudine, AZT) は、抗 HIV 代謝拮抗薬であり、抗 AIDS 薬 AZT として知られている。構造はデオキシチミジンの 3'-OH がアジド基に置き換わった形になっている。AZT は AIDS を引き起こすレトロウイルスに対して有効であり、細胞酵素によって 5'-三リン酸に変換されると、ウイルスの RNA 依存 DNA ポリメラーゼ (逆転写酵素) によってデオキシチミジン 5'-三リン酸として認識され、伸長している DNA 鎖に取り込まれ、伸長を止める。3'-OH がないために次のヌクレオチドが結合できないからである。

興奮性物質のカフェインとテオブロミンはメチル化されたプリン塩基であり、前者はお茶やコーヒーに含まれ、後者はチョコレートに含まれる。テオブロミンを SAM でメチル化するとカフェインになる。



23C.2 核酸

23C.2.1 核酸の構造

核酸は、ヌクレオチドをモノマー単位とする長鎖のポリマーで分枝をもたない。ヌクレオチドがリン酸エステルとしてつながっており（ヌクレオチドはリン酸エステル部を含めるとヌクレオチドになる）、その結合部は通常リン酸ジエステル結合（phosphodiester bond）とよばれる。リン酸ジエステル結合は二つのリボース（またはデオキシリボース）を 5'位と 3'位でつないでいる。図 23C.1 に示した核酸の部分構造からその様子がわかる。

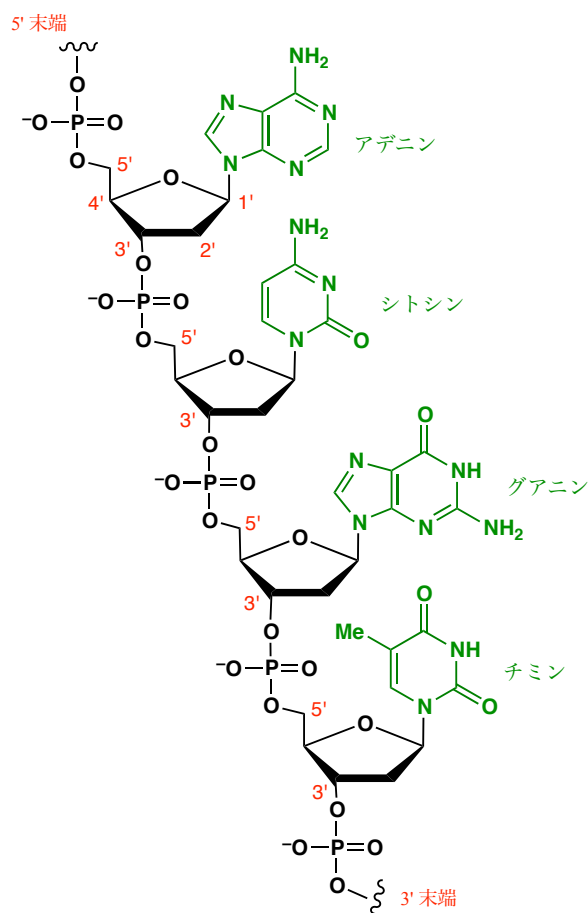
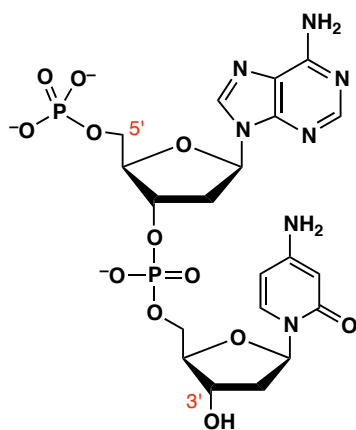


図 23C.5 四つのヌクレオチド単位-ACGT- からなる DNA 分子の部分構造

すなわち、核酸鎖は単糖とリン酸エステル基が交互に結合した構造になっており、核酸塩基が単糖のアノマー炭素に結合した側鎖となっている。そして、核酸鎖の両末端は 5'末端と 3'末端である。核酸の機能を発現するためにはその塩基配列 (base sequence) が重要であり、それを簡便に表すことが必要になる。共通の構造部分 (糖とリン酸ジエステル結合) は省略し、左に 5'末端をおき右に 3'末端がくるように塩基の略号を並べることによって塩基配列を表す。たとえば、図 23C.5 に示す DNA の部分構造の塩基鎖は-ACGT-と表す。核酸の末端 5'-OH と 3'-OH はさらに別のヌクレオチドと結合して鎖を伸ばすことができる。

例題 23C.2 DNA のジヌクレオチド AC の構造を示せ。

解答



問題 23C.2 DNA のジヌクレオチド GT の構造を示せ。

ウイルス (virus) は、他の生物の細胞を利用して、自己を複製できる微小な構造体であり、一本鎖の DNA あるいは RNA をもっている。水疱瘡、天然痘、ヘルペスなどを起こすのは DNA ウィルスであり、インフルエンザ、はしか、おたふくかぜ、脳膜炎、小児まひ、HIV、エボラ出血熱などは RNA ウィルスによって発症する。細菌やウィルスの中では DNA 鎖の両端がつながって環を形成していることもある。

23C.2.2 DNA の塩基対

かつて 4 種の核酸塩基は細胞内に同じ比率で存在し、規則的に核酸鎖に現れると考えられていた。しかし、1950 年に Erwin Chargaff (シャルガフ: 1905~2002, オーストリア出身. 1935 年にアメリカに移住) は、DNA の組成を正確に決定し、核酸塩基が同じ比率で存在するわけではないことを発見した (表 23C.1)。この結果は、実験誤差

範囲内で、塩基組成が生物に固有のものであり、同じ生物ではすべての細胞で一定であること、そしてアデニン (A) とチミン (T)、グアニン (G) とシトシン (C) のモル分率がそれぞれ等しいことを示している。

表 23C.1 DNA 塩基組成の比較 (モル分率)

生物	プリン		ピリミジン		A/T	G/C
	A	G	C	T		
ヒト	34.5	19.9	19.9	30.1	1.01	1.00
ヒツジ	29.3	21.4	21.0	28.3	1.04	1.02
酵母	31.7	18.3	17.4	32.6	0.97	1.05
大腸菌	26.0	24.9	25.2	23.9	1.09	0.99

このことは、図 23C.6 に示すように、アデニンとチミン (A-T) [RNA ではウラシル (A-U)], グアニンとシトシン (G-C) がそれぞれ特異的な対をつくるということによって説明できる。これらの組合せで、N-H...NあるいはN-H...Oの水素結合を互いに二つあるいは三つづつすることができるので、特異的な組合せになっている。しかも、N-H...NあるいはN-H...Oの長さはほぼ等しい [290 (±10) pm] ので、これらの水素結合による塩基対は、次項で述べる DNA の二重らせんの構造もうまく説明できる。

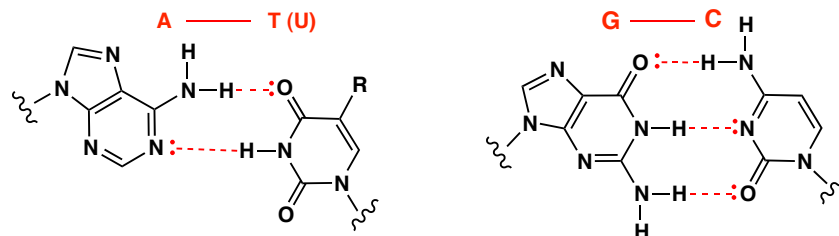


図 23C.6 水素結合による特異的な核酸塩基対

例題 23C.3 DNA 鎖 5'-TGCAAGTCCA-3' の相補的な DNA 鎖を示せ。

解答 相補鎖はもとの DNA 鎖と逆平行になっているが、塩基配列は常に 5'末端から 3'末端に向かって書く必要がある。

もとの DNA 鎖： 5'-T-G-C-A-A-G-T-C-C-A-3' の

相補鎖は： 3'-A-C-G-T-T-C-A-G-G-T-5' となる。

したがって、相補鎖は 5'末端から書くと、5'-TGGACTTGCA-3' である。

問題 23C.3 DNA 鎖 5'-AACTGTACGT-3' の相補的な DNA 鎖を示せ.

23C.2.3 DNA の二重らせん

1953 年にアメリカの生物学者 James D. Watson とイギリスの物理学者 Francis H.C. Crick は、Rosalind Franklin と Maurice Wilkins によって測定された DNA 結晶の X 線回折像の解析から、DNA 分子の二次構造を提案した。DNA が異なる生物から得られ、異なる塩基組成をもっているにもかかわらず、DNA 分子はほぼ同じ太さ（外径約 2 nm）であり、回折パターンは 3.4 nm ごとに繰り返されていた。塩基の存在比率にかかわらず、なぜ DNA の構造に一定の規則性があるのかを説明するモデルとして、二重らせん構造が提案されたのである。

DNA のポリマー鎖はコイル状に巻いて右巻きらせんを形成しており、この特異的塩基対によって二重らせん（double helix）を形成している。（図 23C.7）。上で述べたように、プリン塩基とピリミジン塩基の間の水素結合はほぼ同じ長さであり、塩基対の大きさもほぼ等しい。その結果として、二重らせんの太さもほぼ一定になることが説明できる。

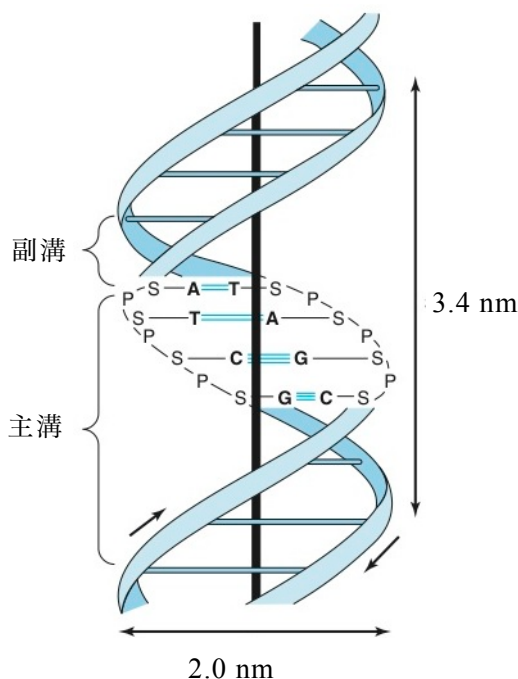


図 23C.7 DNA 二重らせんの模式図

[清水孝雄ら訳，イラストレイテッド ハーパー・生化学 原書 29 版（丸善出版），p. 398]

すなわち、二重らせんをつくる二つの DNA 分子の塩基配列は、特異的な塩基対（A-T と G-C）によって互いに都合よい関係（相補的 complementary であるという）になっている。一つの DNA 鎖にアデニンがあれば、それと結合できるようにもう一つの DNA

鎖にチミンがなければならない。他の塩基についても同様である。

DNA 二重らせんの二本鎖はそれぞれ共通の軸回りにらせんをつくっており、核酸塩基はその内側に向けて配列され水素結合をつくる。芳香族性の核酸塩基は平面状なので、水素結合も含めて塩基対全体が平面構造になる必要がある。この平面はらせん軸に垂直になってらせん階段のステップのようになっている。らせんは 10 塩基対で 1 回転し、その長さは 3.4 nm になる（回折パターンの繰り返し単位に相当する）。二本鎖は相補的な塩基対で結ばれているが、両者は逆平行になっている。すなわち、一つの DNA 鎖が 5'末端から 3'末端に向いていれば、対になっている DNA 鎖は 3'から 5'末端に向いている。

この二重らせん構造にはもう一つの特徴がある。塩基対をつくっている核酸塩基とグリコシド結合している糖は直線状に並んでいるわけではない（図 23C.8）ので、二重らせんに大きい溝（major groove：主溝といい、約 2.2 nm 幅）と小さい溝（minor groove：副溝といい、約 1.2 nm 幅）ができてくる（図 23C.7 および図 23C.8）。この溝の部分には塩基のアミノ基やカルボニル基と相互作用をもって多くの水分子が存在しており、DNA と結合する抗がん剤のような分子を区別できる。

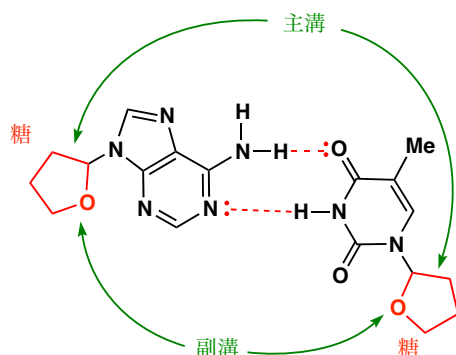


図 23C.8 塩基対 A-T における主溝と副溝の関係

問題 23C.4 塩基対 C-G における主溝と副溝の関係も塩基対 A-T の場合と全く同じように表せる。この関係を図 23C.8 にならって示せ。

この相補的な塩基対は、DNA の複製と貯蔵されている遺伝情報の伝達の基本原理に深くかかわっている。

[相補的な塩基対の組合せ：A-T と C-G の覚え方の一つは、直線的な文字どうしと曲線的な文字どうしが対になっているということである。]

23C.2.4 DNA の複製

細胞分裂が起きるときに、DNA 分子が複製され、新しい細胞に同じ DNA が組み込まれる。DNA の複製 (replication：複写ともいう) は、二重らせんの 2 本鎖がほどけ、

それぞれの DNA 鎖が鋳型 (template) になって新しい DNA 鎖をつくっていく。その際、塩基対をつかって新しい DNA 鎖の塩基配列を制御するので、できてくるのは鋳型に対して相補的なものになる。その様子を図 23C.9 に示している。こうしてできてくる新しい二重らせんは、鋳型となった DNA 鎖と新しく合成された DNA 鎖からなる。

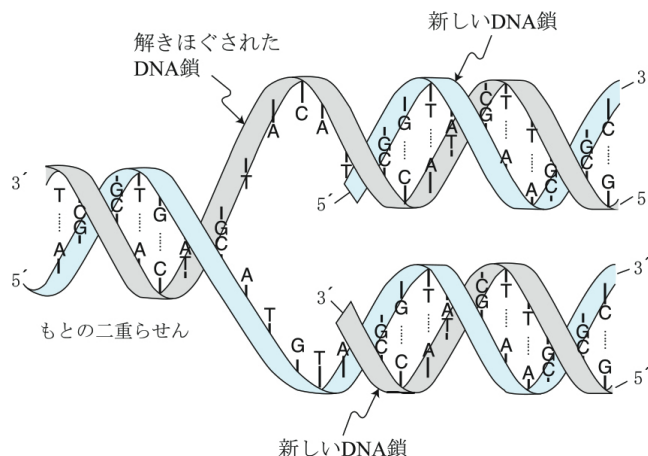
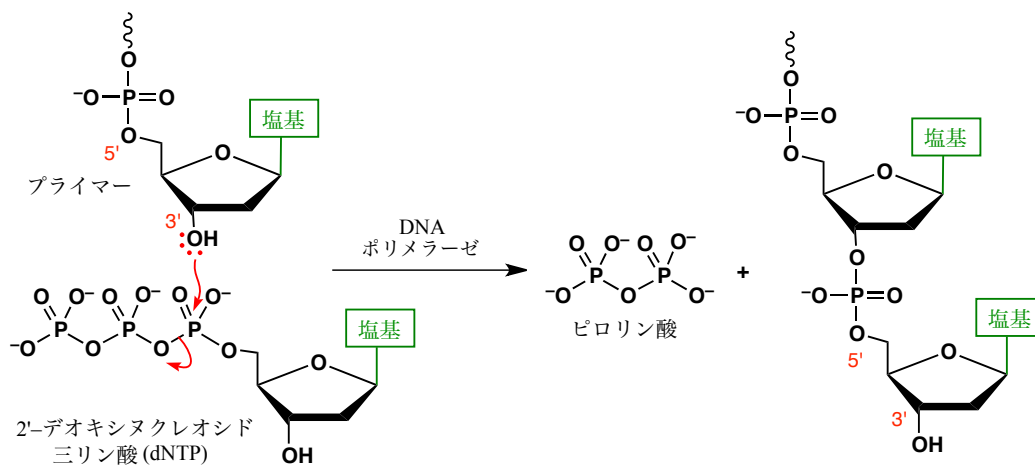


図 23C.9 DNA の複製

このとき、DNA 鎖の合成は DNA ポリメラーゼという酵素によって触媒され、次式に示すように 5'末端から 3'末端に向かって伸びていく。



DNA ポリメラーゼは、試験管の中でも、一本鎖 DNA の相補鎖となるオリゴヌクレオチド[これをプライマー (primer) という]とデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP) があれば、一本鎖 DNA を鋳型として伸長し、二本鎖 DNA を生成することができる (図 23C.10)。



図 23C.10 DNA ポリメラーゼによる相補的な DNA 鎖の合成

相補的な塩基対をもつプライマーが合成の出発点になり、一本鎖 DNA が鋳型になってデオキシヌクレオシド三リン酸 dATP, dTTP, dCTP, dGTP...を順に使って A, T, C, G...が連結されていく。

23C.2.5 RNA

RNA の構造は、DNA と次の 3 点で異なる。まず、RNA の糖はリボースであり、チミンの代わりにウラシル(チミンと比べてメチル基がない)を使っていることである。それに、RNA は基本的には一本鎖として存在し、二重らせんをつくることがあったとしても部分的なものであり、それも 1 分子内で二重らせん部位を形成しているにすぎない。

RNA は、その糖成分がリボースであるために不安定で分解されやすい。図 23C.11 に示すように、リボースの 2'位の OH 基による分子内求核反応が起こり、容易に加水分解される。その速さは DNA に比べると約 3×10^9 倍にもなると推算されている。DNA は 2'-OH がないことによって安定であり、遺伝情報の貯蔵庫として適している。RNA は必要に応じて合成され、役割を果たすと分解される。

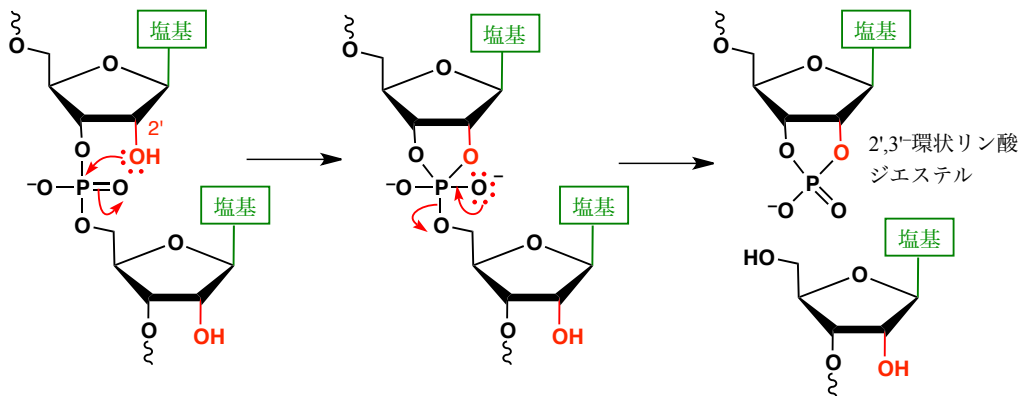


図 23C.11 RNA の加水分解：不安定性の原因

DNA は細胞の遺伝情報を貯蔵しているが、RNA はこの情報を使うときに関与するので、その機能と細胞内の存在位置によって分類されている。

- **メッセンジャー RNA** (messenger RNA, mRNA) は、DNA から遺伝情報をタンパク質合成の部位であるリボソームに運ぶ。
- **リボソーム RNA** (ribosomal RNA, rRNA) は、細胞内のタンパク質合成部位であるリボソームに存在する。

- ・ **転移 RNA** (transfer RNA, tRNA) は、タンパク質合成の際にペプチド鎖に結合すべきアミノ酸残基を運ぶ。

23C.3 遺伝暗号と遺伝のしくみ

23C.3.1 遺伝暗号

DNA の塩基配列によって貯えられている遺伝情報は、メッセンジャーRNA に転写されてリボソームに運ばれ、その情報に基づいてタンパク質の合成が行われる。タンパク質のアミノ酸残基は三つのヌクレオチドの配列 (**トリプレットコード triplet code**) によって指定され、**コドン (codon)** とよばれる。表 23C.2 には mRNA におけるコドンをまとめている。DNA でもコドンは同じであるが、ウラシル (U) がチミン (T) になっている。

表 23C.2 メッセンジャーRNA におけるコドン

第一塩基 (5'末端)	第二塩基								第三塩基 (3'末端)
	U	C	A	G	U	C	A	G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	停止	UGA	停止	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	停止	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG*	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

アミノ酸の略号は 23 章 (表 23.1) を参照すること。

* AUG は開始暗号にもなる。

4 種類の核酸塩基から三つの塩基の配列をつくる組合せは $4^3 = 64$ 通り可能であり、64 個のトリプレットコードのうち 3 個はペプチド鎖合成の停止命令 (停止) になっており、残りの 61 個がタンパク質に見られる 20 種類のアミノ酸を暗号化している。したがって、複数のトリプレットコードが多くの同じアミノ酸の暗号になっている。合

成開始の暗号はメチオニン (Met) のものと同じなので、すべてのタンパク質合成はメチオニンから始まる。この暗号はすべての生物に、ウイルス、細菌からヒトにまで共通である。

問題 23C.5 次のような塩基配列をもつ mRNA 鎖について下の問に答えよ。

5'-AUG-UAC-GGU-GGA-UUU-CUU-UAA-3'

- (a) この mRNA 鎖を与える DNA 鎖の塩基配列を書け。
- (b) この mRNA 鎖から得られるポリペプチド鎖の一次構造を書け。

問題 23C.6 ペプチドホルモンのバソプレッシンは、次のようなアミノ酸配列をもつノナペプチドである。このペプチドをコードする mRNA 鎖の塩基配列と対応する DNA 鎖の塩基配列を示せ。

バソプレッシン： Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly

23C.3.2 遺伝のしくみ

DNA のコドン (遺伝暗号) を用いて mRNA が合成される。すなわち、DNA のコドンが mRNA に転写 (transcription) される。この配列がタンパク質のアミノ酸配列に翻訳 (translation) される。[転写は DNA → RNA へヌクレオチドの同じ言語をコピーすることを意味するが、翻訳は RNA → タンパク質のアミノ酸の別の言語に言い換えることを意味している。]

mRNA 遺伝子に相当する二重らせん部分がほどかれ、DNA の複製のときと同じように、DNA の情報を用いて新しい核酸鎖が合成される (図 23C.12)。このとき 1 本は情報 DNA 鎖とよばれ、もう 1 本の DNA 鎖の鋳型 DNA 鎖とよばれるものが RNA 鎖の複製に使われる。鋳型 DNA 鎖は 3'末端のほうから読まれ、RNA が合成される。結果的に、合成された RNA 鎖の塩基配列は、(T の代わりに U になっているが) 情報 DNA 鎖の配列と同じであるといつてよい。リボヌクレオチドの連結は RNA ポリメラーゼによって促進される。

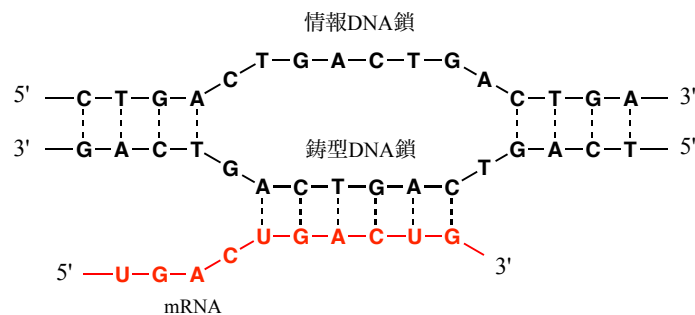


図 23C.12 DNA の mRNA への転写

mRNA の合成は細胞核の中で行われるが，細胞質を通過してリボソーム (ribosome) で，タンパク質の生合成にかかわる．リボソームは約 40% のタンパク質と 60% の RNA で構成された複合体である．RNA の大部分はリボソーム RNA (rRNA) だが，ここで mRNA と転移 RNA (tRNA) がつながれる．遺伝情報をもつ mRNA 分子の大きさは合成すべきタンパク質の大きさによるが 1000 個余りのヌクレオチドからなるのに対して，アミノ酸を運ぶ tRNA 分子は小さく 100 個以下のヌクレオチドからなる．rRNA の存在量が最も多く，大きさも幅広く約 75 から 3700 個のヌクレオチドからなる．

tRNA 1 本鎖の tRNA は，相補的な塩基対をもつ領域が少なくとも四つあって，クローバーの葉の形のように表される特徴的な構造をもっている (図 23C.13)．すべての 3' 末端は CCA 配列になっており，この末端アデノシンの 3'-OH がアミノ酸とエステルをつくるのに使われる．この反応は tRNA とアミノ酸に特異的な酵素によって触媒される．tRNA 分子のループはアンチコドン (anticodon) とよばれる特異的な塩基配列をもっており，ここで相補的な mRNA のコドンと結合することが可能になる．

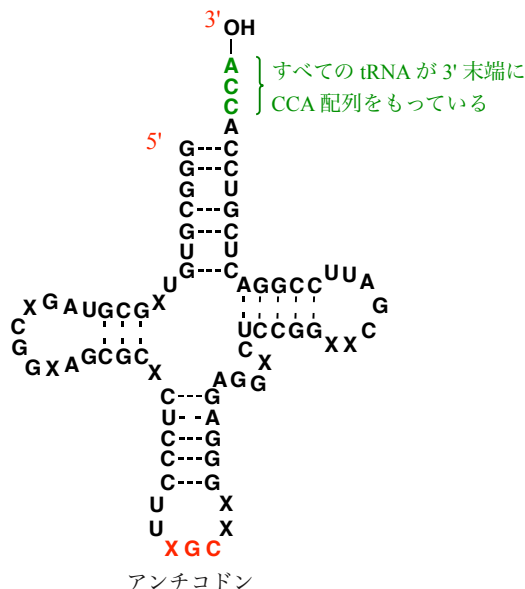
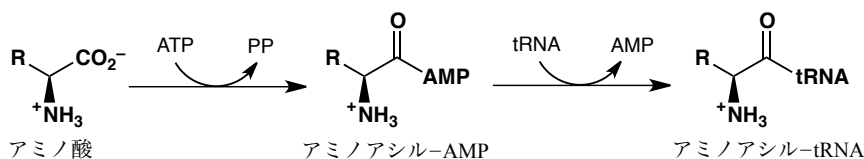


図 23C.13 tRNA の例：アラニンを運ぶ tRNA (X は修飾塩基を示す.)

タンパク質合成 mRNA が運んできた情報によるタンパク質の生合成は翻訳といわれる．その反応は次のように進む．まずアミノ酸は ATP との反応でアミノアシル-AMP となるが，これは混合酸無水物として活性化されているので，tRNA の末端アデノシンの 3'-OH と反応してアミノアシル-tRNA (エステル) になる．



mRNA のコドンに従って、相補的なアンチコドンをもつアミノアシル-tRNA が結合し、その順にアミノ酸が結合してタンパク質を合成する。合成は *N*-ホルミルメチオニン（対応するコドン Met と同じ）から始まる。それに次のアミノアシル基が求核的に反応する。すなわち、ホルミルメチオニンがペプチド構造の代わりにして合成をスタートするのである。あとは成長していくペプチド部位（P site）に mRNA で指定されたアミノアシル基（A site）が酵素触媒アシル置換反応を起こし、ペプチド鎖に順に取り込まれていく。

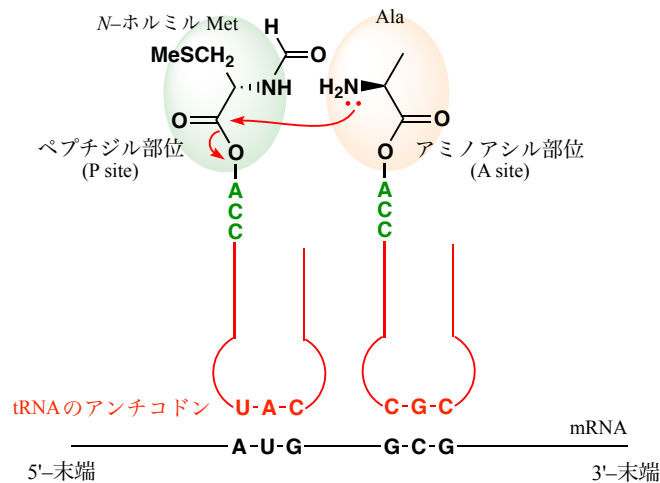
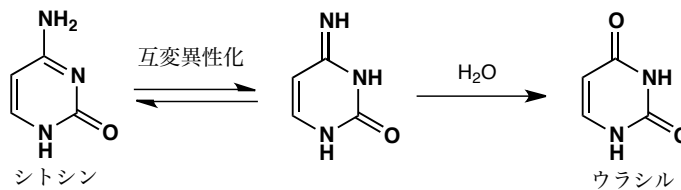


図 23C.14 mRNA の翻訳：タンパク質合成

DNA のピリミジン塩基がシトシンとチミンである理由

RNA は、シトシンとウラシルを使って組み立てられているが、DNA はウラシルの代わりにメチル基を余分にもつチミンを使っている。それには理由がある。シトシンは互変異性化してイミンになり、加水分解されるとウラシルを生じる。すなわち、核酸塩基の変換 $C \rightarrow U$ が起こってしまう。



DNA が塩基として U を使っていると、このような塩基の変換は遺伝情報の保存に混乱を起こしてしまう。すなわち、DNA の複製過程で正しく情報が伝わらないことになる。実際には DNA が正しい塩基として U でなく T を使っているの、複製過程で U は“誤り”と認識されて、複製は止まってしまう。したがって、塩基の変換が全体として DNA の自己複製に影響を及ぼすことはない。

一方、RNA は経済的にメチル基のない U を使っているが、DNA のように自己複製することはないので、誤りが長くとどまることはない。RNA は短寿命であり、DNA を鋳型として再合成されるので問題を起こすことはない。

23C.4 DNAの塩基配列決定

23C.4.1 制限酵素

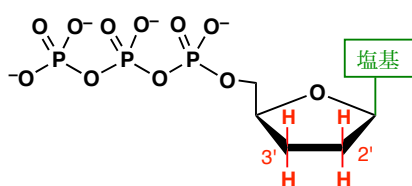
天然の DNA 分子は、非常に長いので、まず分析に適当な長さに切ってやる必要がある。化学的に分解することもできるが、一般的に制限酵素 (restriction enzyme または restriction endonuclease) とよばれる酵素を使って行う。おもに細菌から取り出された制限酵素が数百種類知られており (これらの酵素はもともと外来の、とくにウイルスの、DNA を分解するためにできてきたものと考えられる)、適当な酵素を使って DNA 断片 (制限断片とよばれる) をつくる。そうしてできた制限断片の配列を調べる。

制限酵素は一定の (3~6 単位の) 塩基配列を認識し、その特定の位置で DNA を切断する。たとえば、大腸菌から得られた *EcoRI* は GAATTC 配列の G と A の間で切断する。制限酵素は二重らせんの DNA 鎖を両方切断する。すなわち、逆方向からも認識して *EcoRI* は相補鎖である CTTAAG 配列も切断する。いくつかの異なる制限酵素を使って生成した制限断片の配列をそれぞれ決め、(タンパク質の配列決定の場合と同じように) 配列の重なる部分を見つけて、再構成して全体の配列を決めていくことができる。

23C.4.2 化学的配列決定法

制限断片の配列を決定する方法として、1977~78年に二つの方法が提案された。一つは Maxam-Gilbert 法とよばれ、塩基選択的な化学的切断を利用するものであり、 Me_2SO_4 や H_2NNH_2 を使って特定の塩基を開環させていく。もう一つは Frederick Sanger によって開発された方法であり、ジデオキシ法 (dideoxy method) あるいはチェーンターミネーション (chain termination) 法とよばれている。この方法は、DNA ポリメラーゼによる DNA の合成を阻害することに基づいている。現在ではジデオキシ法のほうがより一般的に使われているので、ここではこの方法について説明する。[Sanger と Gilbert は 1980 年度ノーベル化学賞を受賞した。Sanger はタンパク質のアミノ酸配列決定法を開発したことで 1958 年度ノーベル化学賞を受賞している (ウェブチャプター 23B 参照).]

ジデオキシ法の名称の由来は、2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) を使うことにある。ddNTP をポリヌクレオチド鎖の末端に結合させると、3'-OH がいないために次のヌクレオチドを受け入れて伸長することができなくなる。したがって、ddNTP が導入された位置で鎖伸長が止まるのでチェーンターミネーション (chain termination) 法ともよばれるのである。



2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸
2',3'-dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP)

この方法では、まず配列を決めたい制限断片（一本鎖 DNA）に 5'末端のリン酸基を放射性的 ^{32}P で標識したプライマー（図 23C.10 参照）を加え、その混合液を四つに分ける。それぞれに 4 種のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）を加える。最後に、各反応液にごく少量の 4 種の ddNTP の一つずつと DNA ポリメラーゼを加えて、DNA の合成を進める。この過程において、ddNTP の導入が可能な位置で合成が停止する（図 23C.15）。すなわち、プライマーから始まって相補鎖がつくられていく過程で ddNTP が取り込まれると、そこで合成が終わり、3'末端が ddNTP になっている。（ ^{32}P 標識は ddNTP につけてもよいし、標識に蛍光を用いる方法もある。）

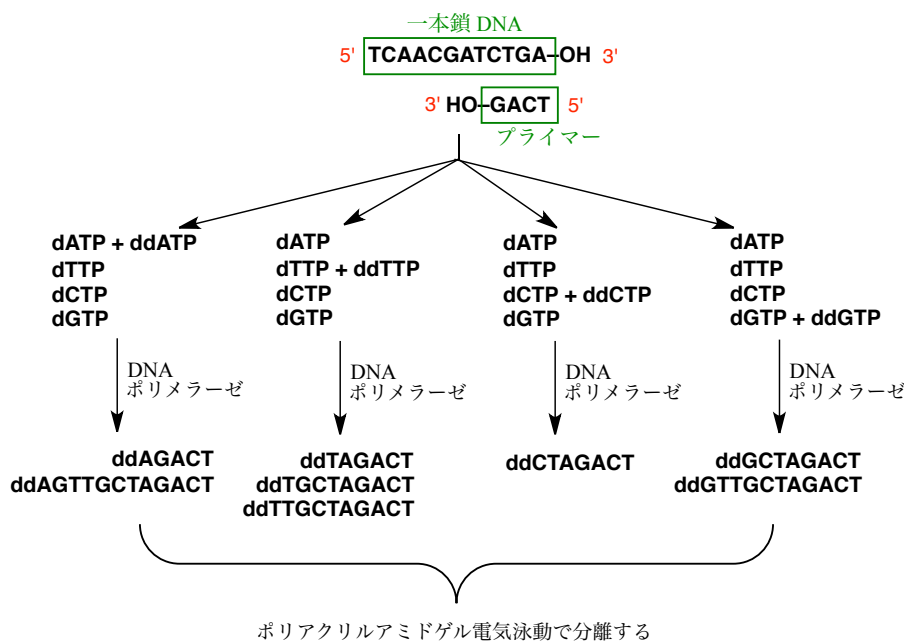


図 23C.15 ジデオキシ法による DNA 配列の決定

それぞれの反応液をゲル電気泳動で分離し、X 線フィルムをそのゲル上に載せると ^{32}P の放射線（ γ 線）によってフィルムが感光し、オリゴヌクレオチドの解析パターンが出現する。オリゴヌクレオチドはその長さによって分離できるので、短いものから順に 3'末端の ddNTP の種類がわかれば、それは相補鎖の 5'末端に近いヌクレオチド単位に相当する。その結果から、プライマーから始まる相補鎖の配列を決めることができる。図 23C.15 に示した例で断片を短い順に並べると図 23C.16 のようになるので、相補鎖はプライマーから始まり 5'-TCAGATCGTTGA-3'となる。したがって、元の配列は 5'-TCAACGATCTGA-3'であることがわかる。

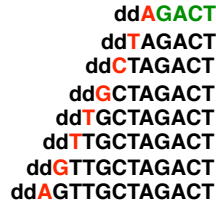


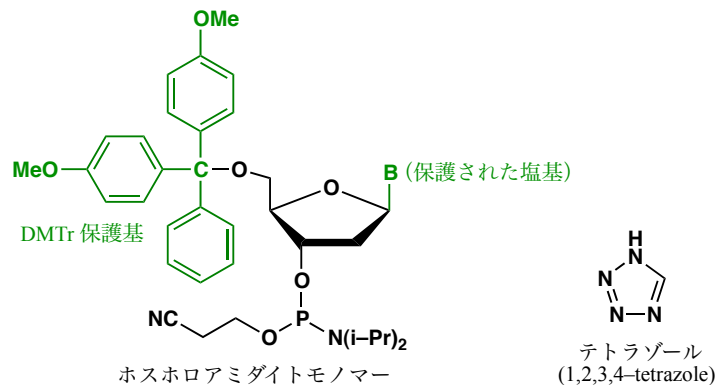
図 23C.16 ジデオキシ法で得られたオリゴヌクレオチド

23C.5 DNA 鎖の化学合成

特定の塩基配列をもつオリゴヌクレオチド（短い DNA 鎖）が化学的に合成され、種々の目的に用いられる。前節でのべた核酸の配列決定に用いられるプライマーもその一つである。合成 DNA は PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 法によって増幅することもできる。それを微生物に導入することによって、微生物に望みのタンパク質をつくらせることができる。

また、アンチセンス核酸法は病気治療の重要な方法となり、遺伝子治療ともいわれている。アンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotide) は DNA 鎖や mRNA 鎖 (センス鎖という) の相補的な DNA 鎖であり、ウイルス、細菌や他の病因となる細胞の DNA や mRNA に結合してこれらの標的タンパク質合成を阻害することによりウイルスや細菌を死滅させるのである。このようにして特定の遺伝子を不活性化する方法は非常に有望な治療法になる。これまで治療法がなかったようなウイルス病 (AIDS など) やがんの治療を目的として、ヒトの細胞の中でウイルスを見つけてその重要な DNA や RNA に結合し、ウイルスを破壊できるようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する研究が活発に行われている。

DNA 鎖の合成はタンパク質の固相自動合成に似た固相法で行われている。代表的な合成反応ではホスホロアミダイト (phosphoramidite) モノマーが用いられる。ホスホロアミダイトの 5'-OH はジメトキシトリチル基で保護され、核酸塩基の NH₂ 基も求核性を抑えるためにアシル化して保護してある。反応は図 23C.17 に示すように進む。



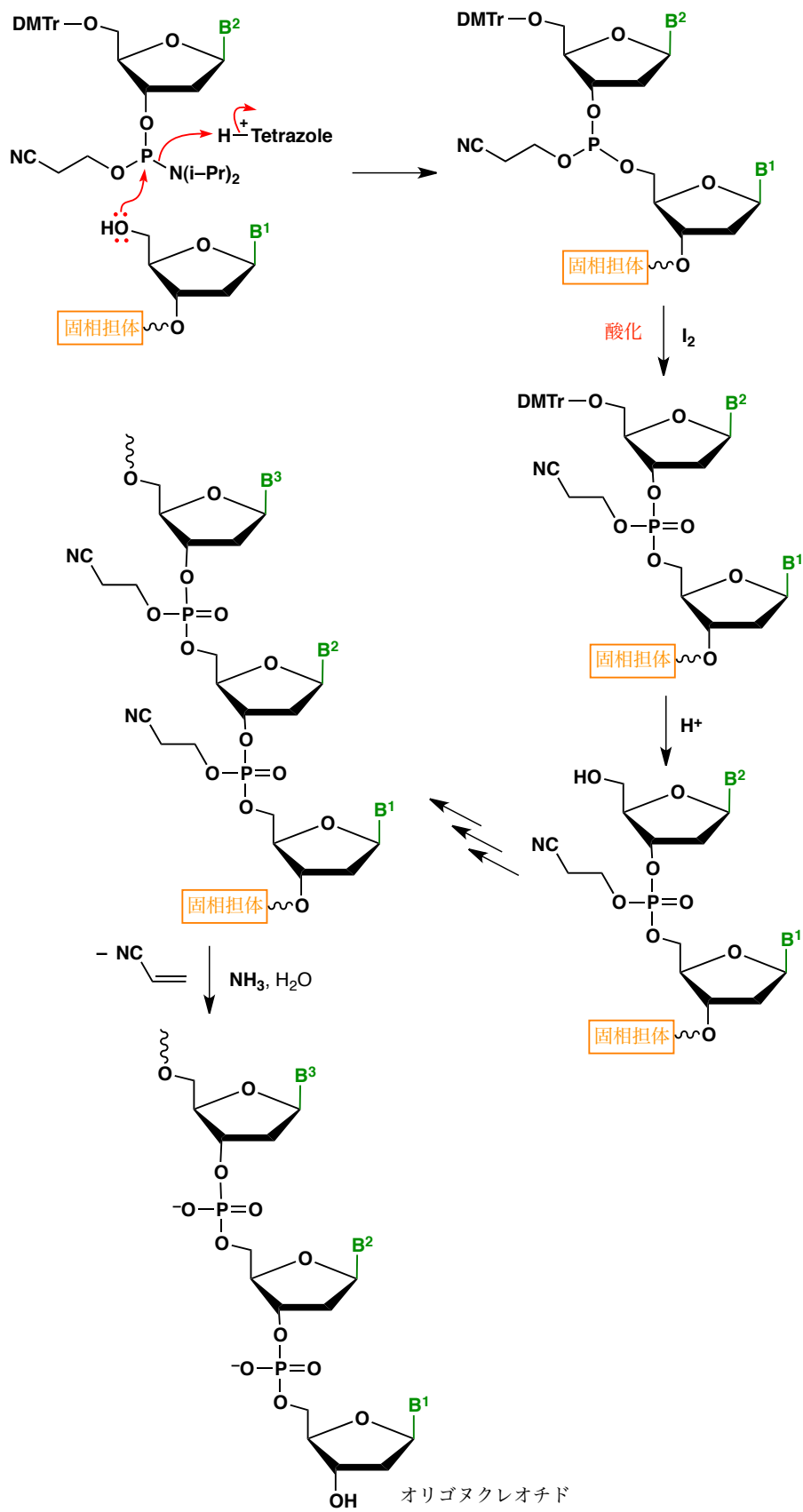


図 23C.17 DNA 鎖の化学合成：ホスホロアミダイト法

まず、ホスホロアミダイトモノマーと固相担体に結合したヌクレオシドのカップリングがテトラゾールの共役酸による酸触媒反応としておこり、亜リン酸エステル（ホスファイト）を生成する。これはヨウ素酸化でリン酸エステルに変換され、5'-OH の保護基（トリチル基）が酸によって脱保護される。適当な塩基をもつホスホロアミダイトモノマーを使って、この反応を繰り返す、オリゴヌクレオチドの誘導体が得られる。最後にアンモニア水溶液を用いてリン酸エステル部のアルキル基をプロペンニトリル（アクリロニトリル）として脱離するとともに固相担体からオリゴヌクレオチドを外すことができる。

問題 23C.7 ベンゾイル化によって保護されたシトシンとアデニンの構造式を書け。

問題 23C.8 図 23C.17 に示した DNA 鎖の化学合成の最終段階で、塩基によりアクリロニトリルが脱離する反応の機構を書け。

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）

かつて遺伝子の研究は、DNA が少量しか得られないという制約のために多くの困難があった。しかし、1983 年に Kary B. Mullis（マリス）によって、DNA 鎖を効率よく複製する方法としてポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction: PCR）が発見され（Mullis は 1993 年ノーベル化学賞を受賞した）、任意の DNA 断片を大量につくることができるようになった。

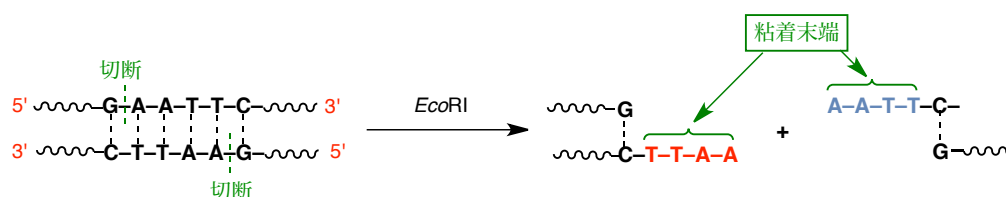
この方法では、二本鎖 DNA を 90~95°C に加熱して一本鎖 DNA にし（鋳型鎖と相補鎖が 2 本でき、それぞれが二本鎖に複製される）、それに対応する相補的なプライマー（合成オリゴヌクレオチド）を加え、DNA ポリメラーゼで複製を開始する。この複製反応は約 70°C で行われ、もともと二本鎖 DNA が二つできてくる。もう一度加熱して一本鎖をつくることから操作を繰り返す。1 回のサイクルは数分で終わり、1 サイクルごとに DNA 断片の数は倍増していく。n 回のサイクルで DNA の数は 2^n 倍になる。ここで問題になるのは、加熱して一本鎖をつくる過程で通常の DNA ポリメラーゼ酵素は変性してしまうことである。PCR では（温泉に生育する）好熱性細菌の DNA ポリメラーゼを使うことで、この問題を解決している。この耐熱性ポリメラーゼは高温にも耐え、最初に加えた酵素が最後まではたらくので、数千万の DNA 断片を容易につくることができる。現在ではこの方法は自動化され、増幅された DNA 断片は分子遺伝学の研究だけでなく、生理学や分類学の研究にも使われ、DNA 鑑定による犯罪捜査や診断にも用いられている。

23C.6 組換え DNA

二つ以上の DNA 断片を結びつけてつくった天然には存在しない DNA を **組換え DNA** (recombinant DNA) という。その DNA がもつ新しい情報を用いて生体機能を制御する作業を遺伝子工学という。ある種の生物の DNA を切断し、別の種の生物の DNA に結合させて組換え DNA をつくり、細菌（バクテリア）の細胞に挿入すると、その細菌が宿主となって新しい遺伝情報を発現する。

細菌は **プラスミド** (plasmid) とよばれる小さな環状の二本鎖 DNA 分子をもっている。プラスミドはきわめて容易に分離でき、取り扱いやすいので、これに望みの DNA 鎖を組み込むことができる。細菌の増殖は速いので、望み通りの組換え DNA とタンパク質を細菌で生産することができるようになる。

外来遺伝子を組み込むことのできるプラスミドは、制限酵素を使って DNA 分子の特定の配列位置で切断して開環してつくる。23C.4.1 項で述べたように、たとえば、制限酵素 *EcoRI* は GAATTC 配列を認識して G と A の間で切断するが、二本鎖 DNA を逆から読んで相補鎖の CTTAAG 配列の G と A の間でも切断する。その結果、相補鎖の DNA 断片にずれが生じ、両方の末端に対をつくらぬ塩基が数個残ることになる。これらの対にならない末端塩基は **粘着末端** (sticky end) とよばれ、キメラ DNA 分子の作成などに用いられる。



同じ制限酵素を用いて別の遺伝子を切断すれば同じ粘着末端をもった DNA 断片ができる。これらの粘着末端は互いに相補的な塩基配列をもつのでそれらを結合して組換えプラスミドをつくることができる。ヒト DNA を切り出した遺伝子断片を細菌のプラスミドに組み込むことを考えてみよう。遺伝子とプラスミドを同じ制限酵素で切り出すと、両方に同じ粘着末端ができてくる。そこで、DNA リガーゼ存在下に、両者を混合すると互いに相補的な配列になっている粘着末端どうしで結合させることができる。できてきたものは組換えプラスミドである。

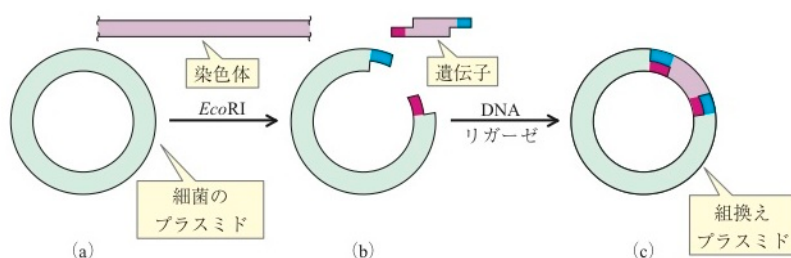


図 23C.18 組換えプラスミドの作成

[菅原二三男ら訳，第 4 版（原著 7 版）マクマリー生物有機化学：生化学編（丸善出版），p. 292]

こうして作成した組換えプラスミドを細菌の細胞に戻すと、その改変プラスミドをもった細菌が増殖し、組み込まれた遺伝子によってコードされたタンパク質が合成される。増殖してできた膨大な数の細菌はタンパク質工場としてはたらくことになる。

まとめ

- 核酸には **RNA**（リボ核酸）と **DNA**（デオキシリボ核酸）があり、RNA をつくる糖は **D-リボース**、DNA をつくる糖は **2-デオキシ D-リボース** である。
- 核酸はリボース（またはデオキシリボース）と核酸塩基の β -*N*-グリコシドであるヌクレオシドがリン酸ジエステル結合でつながったポリマーであり、ヌクレオシドの 5'-リン酸エステルはヌクレオチドとよばれる。
- **核酸塩基** は 5 種類あり、それらは二環性のプリン環をもつアデニン（A）とグアニン（G）、ピリミジン環をもつシトシン（C）とウラシル（U：RNA だけにある）、チミン（T：DNA だけにある）である
- 核酸塩基は水素結合により **A-T**（または U）、**G-C** の特異的な塩基対をつくり、核酸の二重らせんを形成する。二重らせんは主溝と副溝をもつ。
- 特異的塩基対をつくる DNA 鎖の塩基配列は**相補的**であるという。
- DNA の複製は、二重らせんがほどけ、それぞれの一本鎖が鋳型になって新しい相補鎖をつくっていく。
- **RNA** は基本的に一本鎖であり、リボースの 2'-OH のために不安定である。
- RNA には、その役割に応じて**メッセンジャー RNA**（mRNA）、**リボソーム RNA**（rRNA）、**転移 RNA**（tRNA）がある。
- **遺伝暗号** は三つのヌクレチドの配列（トリプレットコード）によって指定され、**コドン**とよばれる。
- DNA のコドンが mRNA に**転写**され、mRNA はリボソームで tRNA のアンチコドンを読み、その末端にエステル結合したアミノ酸がタンパク質合成（**翻訳**）に使われる。
- DNA の**塩基配列**を決定するために、まず**制限酵素**を使って DNA を特定の位置で切断し、制限断片をつくる。その DNA 断片の配列を**ジデオキシ法**などの化学的方法で決定し、それをつなぎあわせて全体の配列を決める。
- DNA 鎖の化学合成は、**ホスホロアミダイトモノマー**を用いて固相合成法で行われる。
- **組換え DNA** は、細菌の環状二本鎖 DNA であるプラスミドに外来遺伝子を組み込むことによって得られる**組換えプラスミド**としてつくられる。