



生化学講座

細胞顆粒の生化学



14

生化学講座

14

編 集

赤 堀 四 郎
伊 勢 村 寿 三
市 原 稔
浮 田 忠 之 進
内 野 仙 治
江 上 不 二 夫
片 桐 英 郎
佐 橋 佳 一
島 蘭 順 雄
鈴 木 友 二
田 中 正 三
広 畑 竜 造
牧 野 堅
森 高 次 郎

細胞顆粒の生化学



共立出版株式会社

編集担当者

京都大学理学部 田中正三

執筆者

京都大学理学部 石田政弘
金沢大学医学部 石川大刀雄
金沢大学医学部 倉田自章
名古屋大学理学部 大沢省三
大阪市立大学理学部 福本寿一郎
大阪大学理学部 赤堀四郎

(執筆順)

序

光学顕微鏡と組織染色法を主要武器としていた戦前の研究法では、細胞の微細構造はおもに細胞形態学的研究の対象にされていたにすぎず、核や葉緑体などを除いてはその機能もはっきりしない状態であった。

電子顕微鏡の発明とその急速な発達によって、細胞内には数多くの種類の異なる微小顆粒が存在することが次第に明らかになり、解像力の増大は顆粒の微細構造までをはっきりさせるようになった。時を同じうして高性能の遠心機が続々とつくられ、これの活用によって生化学的研究の材料としての細胞顆粒の分離が可能になってきた。それまではおもに組織化学的、分光分析化学的な方法によって行われてきていた顆粒の化学組成の検索は超遠心機の使用で飛躍的に進展し、それぞれの顆粒に局在する酵素や補助因子などまでが単離確認されるようになった。そしてミトコンドリアには TCA 回路に関係する酵素類や末端呼吸系酵素が、いわゆる多酵素系をつくって共働していることや、ミクロソームは蛋白質の生合成の場であることなど、それぞれの顆粒の営む役割や相互の間の機能的なつながりがつきつぎに判明してきた。

いのちのいない手である遺伝子や酵素などの主成分であり、これなくては生命はありえないとまでいわれている蛋白質の生合成の機構は、生命現象の謎をとく鍵として生物学に関係する研究者にとってもっとも関心をもたれる問題であるが、最近になってやっとそれがミクロソームに局在する核酸や上澄に含まれている酵素などの共働によって行われていることが明らかになりつつある。

この巻は細胞顆粒に関する生化学的事象をあつかったもので、第1章から第3章までには顆粒別にその生化学的知見がとりまとめられており、特に第3章は蛋白質の生合成問題に焦点がしぼられている。

遺伝現象とは生物の種によってそれぞれ特異の蛋白質が合成される現象とも考えることができるから、遺伝子のある細胞核とミクロソームとの間にはつながりがあるはずである。しかし核と細胞質との交流についての生化学的研究は

漸く緒についたばかりであり、この巻に収録することができなかったが、この問題と関係して本講座第12巻に遺伝の生化学の章があるから参照されたい。

蛋白質の生成に関する他の一つの問題は適応酵素の生成である。これの生成機構の解明は生物の特徴的性質の一つである適応現象の説明の手がかりを与えるものであり、この領域の研究ではわが国は世界のトップレベルを行くので別に1章を設けた。

また無機物からの非生物的なアミノ酸、蛋白質などの生成に関する研究は、原始時代の地球における生物の誕生を論ずる重要な資料となるものであり、第5章には赤堀教授の生命起原概論を集録してそのアウトラインを伝えることにした。

昭和35年12月

編集担当 田中正三

目 次

第 1 章 細胞核の生化学

1.1 細胞核の化学組成	1
A. 研究方法の概略	1
B. 核の一般的化学組成	6
C. 精子核の特殊性	22
D. 染色体の化学組成	25
E. 仁の化学組成	29
F. 核液	32
G. 核分裂装置	33
1.2 細胞核における核酸と蛋白質の代謝	36
A. DNA の代謝	36
B. 細胞分裂と DNA 生合成	39
C. RNA の代謝	43
D. 蛋白質の代謝	49
E. 核酸と蛋白合成機構	55
1.3 染色体と DNA の増殖	58
A. DNA の分子模型	58
B. Watson-Crick の DNA 模型とその活性部位	62
C. DNA 分子と塩基性蛋白との関係	63
D. DNA 分子の複製的増殖	65
E. 細胞のレベルでの倍加現象	71
F. 増殖機構の生化学的研究	75
参考文献	77

第 2 章 細胞質顆粒の化学

2.1 ミトコンドリア	85
-------------	----

A. ミトコンドリアの形態	85
B. ヤーヌスグリーン染色	90
C. 化学組成	91
D. リソソームについて	97
E. クエン酸回路とリピド代謝	98
F. 酸化的リン酸化	100
G. 誘導顆粒と電子伝達単位	104
2.2 ミクロソーム	108
A. 小胞体の形態	108
B. ミクロソームについて	110
C. 化学組成	112
D. 電子伝達系	116
E. 蛋白合成	119
F. リピド代謝	124
2.3 ゴルジ体	127
A. ゴルジ体の構造	127
B. 化学組成	130
2.4 その他の顆粒	132
A. Mast cell 顆粒	132
B. ポリリン酸顆粒	134
C. 細菌の細胞質顆粒	136
D. 腎細尿管の蛋白顆粒	139
E. チモーゲン顆粒 (脾臓分泌顆粒)	140
F. 表皮細胞の顆粒	142
G. 副腎髄質細胞の顆粒	142
H. グリコーゲン顆粒	143
I. メラニン顆粒	144
J. 葉緑体	145
参考文献	147

第 3 章 細胞構成要素と蛋白質の生合成

3-1 ま え が き	165
A. 蛋白質の定量の場合	167
B. 同位元素でラベルしたアミノ酸の蛋白質へのとり込みの場合	167
C. 特異蛋白質の出現または増加で蛋白質合成をしらべる方法	169
3-2 生細胞系における蛋白質合成	169
3-3 無細胞系における蛋白質合成の研究	176
A. 概 論	176
B. ミクロソームにおける蛋白質合成	177
C. ミトコンドリアにおける蛋白質合成	191
D. 核における蛋白質合成	193
3-4 む す び	194
参考文献	195

第 4 章 酵素の生成機構

4-1 結 論	199
4-2 適応酵素と構成酵素	200
4-3 逐次適応現象	202
4-4 Inducer と酵素生成	204
4-5 グルコースによる酵素生成阻害	208
4-6 蛋白合成と核酸との関係	214
A. 蛋白合成と DNA との関係	214
B. RNA と蛋白合成との関係	216
C. 核酸合成に対する蛋白合成の関与	224
4-7 Precursor の問題と蛋白質の turnover について	229
A. 蛋白質の生成過程に Precursor が存在するかどうかについて	229
B. 細胞内における蛋白質の turnover	238
4-8 Subcellular 系による蛋白生合成およびアミノ酸活性化反応について	240

A. 微生物から得られた subcellular 系による蛋白合成	240
B. 動物組織から得られた subcellular 系による蛋白合成	245
参考文献	254

第 5 章 生命の起源

5.1 結 論	265
5.2 原子有機物	267
A. 炭化水素の生成	267
B. 青酸およびアミノ酸の生成	269
C. 蛋白質の生成	272
D. アミノ酸の熱重縮合説	279
E. 糖類の原発生	280
F. 核酸の原発生	281
5.3 代謝系の進化	284
5.4 コアセルベート	287
5.5 自己増殖	289
5.6 結 語	290
和 文 索 引	1~5
欧 文 索 引	6~7

第 1 章 細胞核の生化学

1.1 細胞核の化学組成

A. 研究方法の概略

生体細胞には形態学的に非常に重要な種々の顆粒が含まれている。これらのものがいかなる化学組成をもち、またそれらの化学組成が細胞の生理的状态の変化に伴って、量的に、また組成的にどのように変動するかをしらべることは、生物学的にも生化学的にも非常に重要な課題である。この種の研究には、今まで主として二つの方法、すなわち組織化学的な方法と、生化学的方法とがとられてきた。このうち組織化学的な方法では、主として顕微鏡下において細胞内の形態学的な要素を、それらに含まれている化学成分といっしょに定性的にしらべることができるのであるが、定量はむずかしい。また生化学的方法では、これらのいろいろな成分の定量が可能であるということにおいては大きな特徴があるが、形態的な要素におけるそれらの化学成分の分布を知ることは困難である。

そこでこの両者のおのおの特徴を生かして、生化学的分析法の分野においては“分画遠心分離法”が、組織化学の分野からは“顕微分光測光法”がそれぞれ独立的に考案され、いろいろと改良されながら発達してきた。

もともと組織化学的な方法は、主として色素を用いて細胞内の化学成分を染色することによって、細胞内構造を形態学的に研究する方法であるが、しかし細胞内構造に含まれているある特定の化学成分を定性的に検出しようとする場合には、従来形態学的な研究に使われてきた染色法にのみよっては、十分満足すべき結果を得ることはむずかしい。このことはある特定の化学成分に対する色素の特異性が非常に低いことに原因していて、従来から使われている種々の染色法のうち、その特異性のうえからみて、この目的に使用することのできるものには限界がある。そこで染色法以外の種々な方法が組織化学の分野に導

入され広く応用されている。たとえば酵素による消化法，溶媒抽出法，紫外線吸収法，ラジオオートグラフ法などである。これらの方法は単独で使われる場合もあるが，より高度の特異性をうるために二つの方法を適当に組み合わせて使われる場合もある。

現在細胞核の化学組成をしらべるため一般に広く使われている組織化学的染色法の二，三について，特にその特異性のうえからの考察を試みてみよう。まず DNA の検出に広く使われる Feulgen 反応¹⁾ について述べる。この方法は，まず組織切片を酸で加水分解 (N-HCl, 60°C, 3~15 min) したのち Schiff 試薬で処理すると，DNA の存在する部分が赤紫色に呈色するのを応用するものである。すなわち DNA の加水分解によりデオキシペントースにアルデヒド基ができ，これが Schiff 試薬と反応して赤紫色の呈色をするらしいのであるが，反応の機構は十分わかっていない。この場合，加水分解によってプリン塩基が遊離した残りの核酸部分は，Tamm ら²⁾ や Chargaff³⁾ のいっているアプリン酸に相当するものであり，なお分子量の大きい物質のまま染色体の基本構造と結合して残っているのであるが，より加水分解が進むと Stacey ら⁴⁾ や Overend⁵⁾ らのいう ω -hydroxylevulinic aldehyde* のようなものとなって染色体から遊離してしまう。このように加水分解が進むと，核は Feulgen 反応によって呈色しなくなる。それで個々の組織や細胞に応じた加水分解時間を決めなければならないことになる。またこの染色反応に用いられる Schiff 試薬は，もともと一般のアルデヒドに対して非常に鋭敏に呈色するから必ずしも DNA の加水分解物にのみ特異的なものではない。細胞の中には DNA 以外にもこの試薬に対して呈色反応する物質が存在している。たとえば，Feulgen⁶⁾ が動物細胞中に発見した一種のリピドの Plasmal も，いわゆる Feulgen 陽性物質である。また Hillary⁷⁾ も植物細胞に多くの高分子炭水化物で，Feulgen 陽性のものがあることを報告している。このような DNA 以外のものの Schiff 試薬による呈色反応は“Plasmal 反応”あるいは“Pseudo reaction (偽反応)”と呼ばれている。またもう一つ考慮しておかなければならないことは，ある種の藻類では Feulgen 反

* $\text{HOCH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHO}$

応陰性でありながら、逆に生化学的方法では相当量の DNA が抽出されてくる場合がある。この場合は Feulgen 反応を抑制する因子が働いていることもわかって⁹⁾いる。以上のようなことは、Feulgen 反応によって DNA を検出するとき特に注意しなければならない場合である。しかしながら、十分検討された条件のもとにおいてはこの Feulgen 反応は DNA に対して非常に特異的な反応として使うことができる。しかも呈色の強さは、ある範囲の DNA 量に対して比例的関係が成立するので、この反応を使って細胞核を染色し顕微分光測光法によって単一核あたりの DNA 量の測定に使うこともできる。

またメチルグリン・ピロニン染色法は、Brachet ら⁹⁾によって盛んに用いられている染色法であって、DNA はメチルグリンによって緑色に、RNA はピロニンによって赤色に染色されるのを利用したものである。この染めわけは二つの核酸の重合度の相異によるものといわれている。Brachet¹⁰⁾はこの染色法と、とくに nuclease (DNase, RNase と)による消化法を組み合わせることで両核酸の細胞内分布を研究している。また Ris¹¹⁾はこの染色法を利用して、顕微分光測光的に単一核あたりの DNA, RNA の含量を定量している。その他二、三の核酸に対する染色法が知られているが、それらは特異性のうえからみて、上に述べた二つの方法よりもすぐれた方法ではないようである。

次に紫外線による核酸の検出法について述べる。これは核酸の構成成分のプリン、ピリミジンが 2600 Å の紫外線を特異的に強く吸収する性質を利用して、核酸の検出を行う方法である。Caspersson¹²⁾は特にこの方法によって広範囲にわたって核酸類の種々の組織や細胞中での分布、挙動を観察し、また、非常に精巧な紫外線顕微分光測光装置を考案して、単一細胞中の核酸含量を測定している。もちろん DNA, RNA はともに 2600 Å の紫外線を非常に強く吸収するので、それぞれの核酸を区別してしらべるためには、リボヌクレアーゼか、デオキシリボヌクレアーゼのどちらかの酵素を用いて、その一方を分解するのが普通である。またこのような酵素による消化法を使うかわりに、Ogur ら¹³⁾によって考え出された過塩素酸によって DNA, RNA をおのおの分別抽出するような方法もある。

また核中に存在している塩基性蛋白質や残余蛋白質、アミノ酸類、酵素類に対しても種々な呈色反応がある。

たとえば、核中に存在する非ヒストン型の蛋白質は“硫酸・Millon 法”による呈色反応でしらべることができるし、全蛋白質は“トリクロル酢酸・Millon 法”によって検出することができる。これらの方法は主として Pollister ら¹⁴⁾によって考え出されたもので、彼らはこの方法によって顕微分光測光的に蛋白質の定量を行っている。ヒストンの含量については、全蛋白量から非ヒストン型の蛋白質の量をさし引いて求められる。またヒストン型の蛋白質は一般的にアルギニンが多く含まれているので、Serra^{15,16)}は、アルギニン反応を利用して、核中のヒストン量を測定している。その他酵素や脂質、無機塩類に対するいろいろな検出方法を使って、核の化学組成がしらべられている。

以上は組織化学的方法の二、三の例をごく概略的に述べたのであるが、組織化学的方法は前にも述べたように、細胞の構造と化学組成を同時に顕微鏡下においてしらべるためには非常に有力な方法であるが、すべての細胞内成分についての定量的な結果をうることは期待できない。現在の段階ではすべての成分についての定量的呈色反応の方法自体が、いまだ完成されていない状態であり、この方法によってはある特定の物質しか測定は不可能である。

それで細胞核の化学組成の定量的な研究は、主として生化学的分析法によって行われている。このためにまず細胞核のみ分離してとり出さなければならない。細胞核にかぎらず、染色体、仁についての化学組成の量的な研究にも、それらを単離しなければならないのはもちろんであるが、このような目的のために最も有力な方法は遠心分離による分画法である。この分画遠心分離法は、Behrens¹⁷⁾が初めて高等動物の凍結組織をベンゼンと四塩化炭素混液中ですりつぶし、核を分離するのに使ったのにはじまる。

その後目的によって種々の溶媒が考案されているから代表的な二、三の溶媒を用いたときの特徴を述べる。

a. ベンゼン・四塩化炭素 前述のように Behrens¹⁷⁾によって考え出されたもので、組織をいちど凍結乾燥して粉末にし、この粉末を脱脂してのち、ベン

ゼン・四塩化炭素混液に分散させ、遠心沈殿にかける。そして次第に四塩化炭素の量を増して比重を大にした溶媒混液に順次入れかえ、遠心沈殿を繰り返して核を分離、採集する。この方法によれば核の脂質は失われるが、核酸類、蛋白質、水溶性物質などは残存するのが特徴である。

b. クエン酸 Dounce^{18,19)} によって用いられた方法で、クエン酸の濃度はそれぞれの研究者によって大きな違いがある。この方法によって集めた核は、水溶性物質はもちろん、ビタミン、コエンチーム類も失われている欠点がある。またこのときの媒液の pH も、核内含有物質の損失に対して大きな影響を与える。たとえば、pH 3.0 より低いものを用いたときにはヒストンが失われ、pH 6.0~6.2 のときは少量の RNA と蛋白質の一部が失われるようである。しかし、クエン酸自身 DNase の阻害剤であるから、DNA の酵素分解を阻止することにおいては有効である。またこの方法でとり出した核は細胞質の汚染が少ないことも特徴の一つである。

c. ショ糖 Hogeboom²⁰⁾ は 0.88 M, Schneider²¹⁾ は 0.25 M のショ糖液を用いて核を分離している。ショ糖法によって分離した核は、一般にクエン酸法で分離した核に比べると細胞質の汚染が多いのが欠点である。そこでこのような汚染を除くために、Webb²²⁾ は分離核を飽和の硫酸アンモニウムで洗っているし、Hogeboom ら²³⁾, Schneider ら²⁴⁾ は分離するときの媒液にショ糖液と塩化カルシウム液の混液を使っている。その他、このショ糖を用いる法には種々な改良法がある。たとえば、ショ糖とグリセロール、グリセロリン酸カリウム混液 (Philot ら²⁵⁾), ショ糖と希クエン酸混液 (Emery ら²⁶⁾) などがこれで、実験の目的や材料によっていろいろとくふうされた媒液が使われている。いずれにしてもショ糖法によってえた核からは水溶性物質が相当量失われるのが、この方法の弱点であろう。しかし各種成分の変性を防ぐうえからいってこの方法は非常に温和な方法である。

核の分離には以上の三つの方法が広く使われているが、これらのほかに 0.85% NaCl²⁷⁾, 希酢酸²⁸⁾, 2% アラビアゴム溶液²⁹⁾, 70% グリセロール³⁰⁾, 10% グルコース³¹⁾ などを用いる方法が報告されており、また実際分画遠心分離す

る場合の遠心力は、用いる媒液の種類と濃度、細胞核の比重などによって決定しなければならない。

B. 核の一般的化学組成

通常一つの細胞の中には 1 個の核が存在している。核はその周囲は核膜によって包まれていて細胞質と区別され、核の中には核液が満たされていて、その中には休止期(中間期)の細胞であれば非常に細い糸状の染色糸と 1 個ないし数個の仁が存在している。また分裂期の核では染色糸は染色体の形をとり、仁は光学顕微鏡的には消失してみえなくなる。このように核は種々な形態学的な要素からできていて、またそれらは細胞の生活環とともに種々な形態変化を示す。ここではこのような個々の要素がどのような化学組成をもっているかを順次述べようと思うが、最初に核全体の一般的化学組成について記述しよう。Davidson³²⁾によると次のようなものが細胞核のおもな構成要素としてあげられている。

- a. DNA
- b. RNA
- c. 塩基性蛋白質(プロタミンまたはヒストン)
- d. 高級蛋白質類、酵素を含む
- e. 脂質類
- f. ヌクレオチド、ヌクレオシド類のような比較的 low molecular weight のリン酸化合物
- g. 無機成分(カリウム、カルシウム、マグネシウムなど)

a. DNA DNA はそのほとんどが染色体中に含まれていて、普通塩基性蛋白質と結合して核蛋白質の形で存在している。この物質は、遺伝子を構成している基礎的な物質であることが最近の多くの研究の結果から明らかにされている。DNA は普通プリンとして adenine と guanine、ピリミジンとして cytosine と thymine と、そして糖として deoxyribose、それからリン酸とからできているポリヌクレオチドである。またある種の DNA は、これら 4 種のヌクレオチド以外に少量の 5-methylcytosine を含むものもあれば、全部の cytosine が 5-hydroxymethylcytosine におきかわっているものもある。のちに詳しく述べる

が、これらのプリン、ピリミジン塩基のモル比は、同じ生物種であれば器官が異なっても同じであるが、種が異なればその種に特有なモル比を示す³³⁾。しかしある特定の種からとり出された全 DNA 塩基のモル比は、いわばその生物についての平均値的なものである。それで遺伝学的にみて個々の遺伝子の特異性と DNA の分子構造との関係については、たとえば、DNA の分子種* のオーダーで、あるいは、塩基配列の特異性のうえから論じなければならぬと思われる。それで同一種からえた DNA を物理化学的に種々な面分に分けようとする試みがなされている。たとえば Bendich ら³⁴⁾ や Chargaff ら³⁵⁾ はコウジ胸腺には性質を異にした 2 種類の DNA があることを示したし、最近ではカラムクロマトグラフ法によってさらに多くの面分に分別されている³⁶⁾。しかし個々の遺伝子の分子構造の解析にはまだまだほど速いものがある。しかし一方では、X線回折を利用して DNA の分子構造が非常にはっきりと理解されるようになってきたし³⁷⁾、個々の遺伝子の分子構造の解析も急速な進展が期待されるようになってきた。

さて1個の核に含まれている DNA の含有比は種によって異なっていて、た

表 1.1 細胞核の平均 DNA 含量 ($\times 10^{-12}$ g) (Davidson³⁸⁾)

	ネズミ	ニワトリ	ウシ	カエル	ガマ	コイ
肝臓	9.4	2.6	6.4	15.7	—	3.3
腎臓	6.7	2.3	6.3	—	—	—
脾臓	6.5	2.6	—	—	—	—
肺	6.7	—	—	—	—	—
白血球	6.6	—	—	—	—	—
赤血球	—	2.6	—	15.0	7.3	3.5
心臓	6.5	2.5	—	—	—	—
脾臓	7.3	2.7	—	—	—	—
脳	—	2.3*	—	—	—	—
筋肉	—	2.5*	—	—	—	—
精子	—	1.3	2.8	—	3.7	1.6

* ニワトリの胚の場合

* molecular species

たとえば Stern ら³⁸⁾によると、ベンゼン・四塩化炭素法で分離したコウシの肝細胞核では約 12%, またウマの肝臓でもほぼ同じ値がえられているが、同じ哺乳動物の肝細胞核でも Dounce ら³⁹⁾が同じ方法で分離したネズミでは 4~5% という値になっている。表 1.1 は脊椎動物の種々の細胞の 1 個の核に含まれている DNA の絶対量をあらわしたものである³²⁾。この表からわかるように、同一種の器官や組織では 1 個の核に含まれている DNA 量はほぼ一定である。また精子の場合は体細胞の核に比べて DNA 量は約半分である。このことは精子で染色体数が体細胞核 ($2n$) の半数 (n) あることから肯定できる。また種が異なれば DNA 含量にかなりの差があることもわかる。

しかしこれらの値はすべてある一つの細胞集団についての生化学的な分析法によってえた値で、いわば個々の核の DNA 含量の平均値としてあらわされて

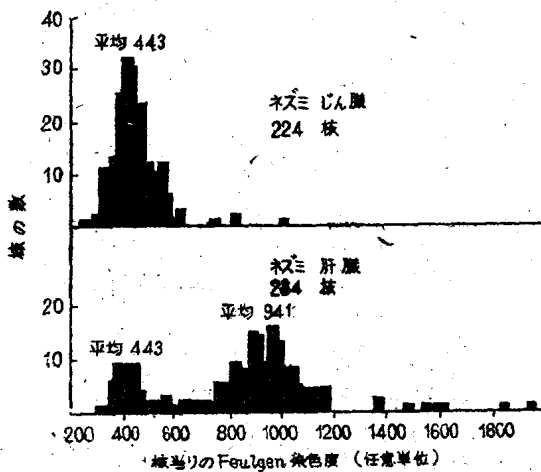


図 1.1 Feulgen 染色後、顕微分光測光法で測定したネズミ腎臓と肝の核あたりの DNA 相対量 (Davidson³²⁾)

いるものである。したがって、たとえ同一組織であっても、その中に存在する個々の核の間にある含量の変動は、このような分析方法からはうることはできない。個々の細胞核中に含まれる DNA 量を測定するには、さきに述べた顕微分光測光法によらなければならない。しかしこの方法では絶対量の測定は非常にむずかしいが、常に個々の核に

についての相対的な値を比較する場合には非常に有効である。図 1.1 はその一例を示したものである。この図はネズミの腎臓と肝臓の核あたりの DNA 量の相対値を示したものであって、両器官とも DNA 量にある範囲の変動が認められる。腎臓の場合 224 個の核についての平均値は 443 であって、この値を中