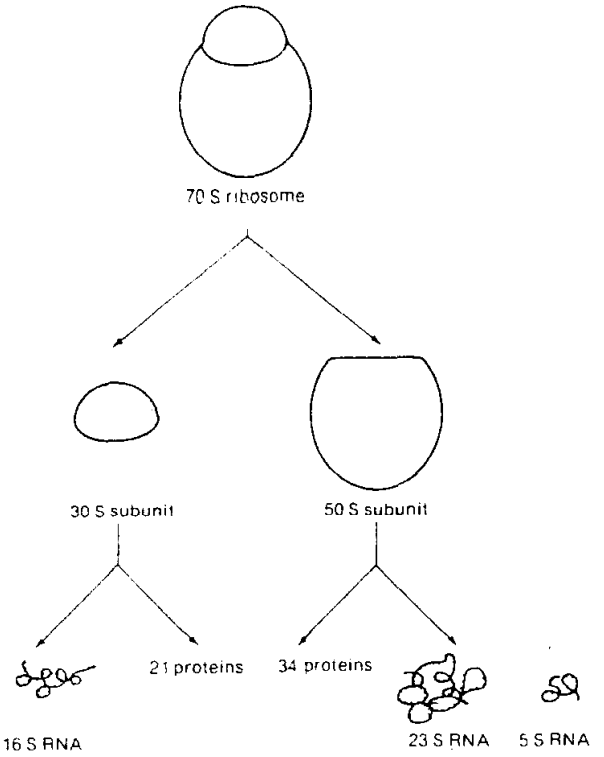
บทที่ 4
การสังเคราะห์โปรตีน
(Biosynthesis of Proteins)

การสังเคราะห์โปรตีนหรือทรานสเลชั่น (translation) คือการที่ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ใน mRNA ถูกแปลรหัสไปเป็นลำดับของกรดอมิโนในสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน ขบวนการนี้จะเกิดที่ไรโบโซม อันประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) และหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) โปรคาริโอท เช่น E.coli จะมีไรโบโซมชนิด 70S (รูปที่ 4-1) ซึ่งเมื่อแยกออกแล้ว จะได้เป็นหน่วยย่อย 50S และ 30S สำหรับหน่วยย่อย 30S



รูปที่ 4-1 รูปแสดงส่วนประกอบของ 70S ไรโบโซมของ E.coli

จะมี 16S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 21 ชนิด ส่วนหน่วยย่อย 50S จะมี rRNA สองชนิดคือ 5S และ 23S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 34 ชนิด ยูคาริโอท จะมีไรโบโซมชนิด 80S ซึ่งแยกออกได้เป็นหน่วยย่อย 40S และ 60S อย่างไรก็ดีในสัตว์ชั้นสูงจะมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนมากกว่าสัตว์ชั้นต่ำ กล่าวคือ จะมีโปรตีน 30 ถึง 40 ชนิดอยู่ในส่วน 40S และ 60S ตามลำดับ นอกจากนี้ในหน่วยย่อยใหญ่คือ 60S จะมี 5.8S rRNA เพิ่มขึ้นมาอีกชนิดหนึ่งด้วย

กลไกการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่แล้วจะคล้ายคลึงกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด คือ tRNA จะไปจับเอากรดอมิโนตามรหัสที่มีอยู่บน mRNA มายังไรโบโซม จากนั้นจะมีการสร้างพันธะเปปไทด์ขึ้นโดยใช้เอนไซม์ที่มีอยู่ในไรโบโซมนี้ ทำให้เกิดเป็นสายของโปรตีนขึ้น

รหัสพันธุกรรม (Genetic Code)

รหัสพันธุกรรมคือความสัมพันธ์ระหว่างลำดับของเบสใน DNA หรือ RNA ที่ได้จากทรานสคริปชั่นโดยใช้ DNA นั้นเป็นแม่พิมพ์กับลำดับของกรดอมิโนในสายโปรตีน ลักษณะทั่ว ๆ ไปของรหัสพันธุกรรมมีดังนี้คือ

1. รหัสทั้งหมดมี 64 รหัส (ตารางที่ 4 - 1) แต่ละรหัสประกอบด้วยเบส 3 ตัวจึงเรียกว่ารหัสตติยะ (triplet code) หรืออาจเรียกว่าโคดอน (codon) รหัสเหล่านี้อยู่บน mRNA และจะเข้าคู่กับแอนไทโคดอน (anticodon) ซึ่งอยู่บน tRNA

2. รหัสทั้ง 64 รหัสนั้น จะมีเพียง 61 รหัสที่สัมพันธ์กับกรดอมิโน ส่วนอีก 3 รหัสจะใช้บอกการหยุดสร้างสายของโปรตีน เรียกรหัสพวกนี้ว่ารหัสหยุด (termination codon) ซึ่งได้แก่ UAA, UAG และ UGA (การอ่านรหัสจะอ่านจากทิศ 5′⟶3′)

3. รหัสพันธุกรรมนี้เป็นสากล คือทั้งในยูคาริโอทและโปรคาริโอททุกชนิด จะใช้รหัสที่เหมือนกันสำหรับกรดอมิโนตัวเดียวกัน

First position (5' ehd)	Second position				Third position (3' end)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	stop	Stop	A
	Leu	Ser	stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	c
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

ตารางที่ 4 – 1 ตารางแสดงรหัสพันธุกรรม

4. รหัสจะไม่คาบเกี่ยว (overlap) กัน เช่นถ้าลำดับของเบสบน mRNA เป็น

5' A B C D E F G H I 3'

ABC ก็จะเป็นรหัสที่หนึ่ง DEF เป็นรหัสที่สอง และ GHI เป็นรหัสที่สาม นั่นคือ เบสแต่ละตัวจะถูกใช้เป็นรหัสได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น

5. การแปลรหัสจะเป็นแบบต่อเนื่องกันไป (commaless) คือเบสจะถูกอ่านเรียงตามลำดับจากจุดเริ่มต้นจุดหนึ่งทางทิศ 5' แล้วอ่านรหัสไปเรื่อย ๆ ทางทิศ 3' โดยไม่มีการข้ามเบสตัวใดไปเลย นั่นคือเบสทุกตัวจะต้องถูกใช้เป็นรหัส

6. กรดอมิโนแต่ละตัวจะมีรหัสมากกว่า 1 รหัส ยกเว้นทริปโทเฟนและเมไธโอนีนซึ่งจะมีเพียงตัวละ 1 รหัสเท่านั้น

7. เบสตัวที่สาม (ทางปลาย 3') ของรหัส จะมีความเฉพาะเจาะจงน้อยกว่าสองตัวแรก ตัวอย่างเช่นซีรีน จะมีเบสสองตัวแรกของรหัสเป็น UC เหมือนกันหมด ส่วนเบสตัวที่สามจะเป็น A, G, C หรือ U ก็ได้ทั้งสิ้น

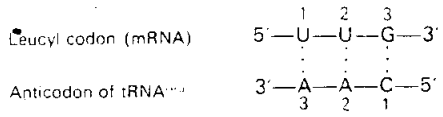
สมมติฐาน wobble (wobble hypothesis)

ในขบวนการทรานสเลชั่น ปฏิกริยาระหว่างแอนไทโคดอนของ tRNA กับโคดอนของ mRNA เกิดได้โดยใช้พันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่กันที่สวนทางกัน ทำนองเดียวกับที่เกิดระหว่างสายทั้งสองของ DNA แต่การจับคู่ของเบสบนโคดอนและแอนไทโคดอนจะมีความยืดหยุ่นกว่า Francis Crick ได้ศึกษาถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนแบบต่าง ๆ ระหว่างคู่เบส แล้วสรุปได้ตามตารางที่ 4-2 ซึ่งเขาได้เสนอเป็นสมมติฐาน wobble อันมีใจความว่า

Anticodon of tRNA position 1 (5′-terminus)	Codon of mRNA position 3 (3′-terminus)
A	U
C	G
U	A or G
G	u or c
I	U. C, or A

ตารางที่ 4–2 การจับคู่ระหว่างเบสตัวแรกของแอนไทโคดอนกับเบสตัวที่สามของโคดอนในสมมติฐาน wobble

การจับคู่ของเบสที่ตำแหน่ง 1 และ 2 ของโคดอนจะมีความเที่ยงตรงมาก ในขณะที่ตำแหน่งที่ 3 นั้นจะมีการผ่อนปรนได้บ้าง กล่าวคือเบสบางตัวเมื่ออยู่ที่ตำแหน่ง 1 ทางปลาย 5′ ของแอนไทโคดอนแล้ว จะสามารถจับคู่กับเบสที่ตำแหน่ง 3 ของโคดอนได้ไม่เฉพาะเจาะจงเหมือนเดิม เรียกตำแหน่ง 1 ทางปลาย 5′ ของแอนไทโคดอนนี้ว่า "ตำแหน่ง wobble" และเรียกเบสตัวแรกทางปลาย 5′ บนแอนไทโคดอนที่มีลักษณะการจับคู่เปลี่ยนแปลงไปนี้ว่า wobble base



การจับคู่ของเบสบนแอนไทโคดอนของ tRNA กับโคดอนของ mRNA

ดังนั้นถ้าดูจากตารางที่ 4-2 จะพบว่า U, G และ I เมื่ออยู่ที่ตำแหน่ง 1 ทางปลาย 5′ ของแอนไทโคดอน จะเป็น wobble base โดย U ซึ่งตามปกติจะจับคู่เฉพาะกับ A ในกรณีนี้อาจจะจับคู่กับ G ได้ด้วย ในทำนองเดียวกัน G ซึ่งตามปกติจะจับคู่เฉพาะกับ C ในกรณีนี้อาจจะจับคู่กับ U ได้ด้วย สำหรับ I จะแปลกกว่าตัวอื่น กล่าวคือ I นี้จะพบเฉพาะใน tRNA (I เป็นอักษรย่อของ inosine ซึ่งเป็นนิวคลีโอไซด์ที่ประกอบขึ้นจากเบสไฮโปแซนธีนเชื่อมต่ออยู่กับน้ำตาลไรโบส) โดยที่ I สามารถจับคู่ได้กับ U หรือ C หรือ A

สมมติฐานอันนี้ในเวลาต่อมาได้มีผู้พิสูจน์ว่าถูกต้อง เช่น Holley ได้พบว่า tRNA สำหรับอลานีนซึ่งมีแอนไทโคดอนเป็น 3′-C-G-I-5′ นั้นจะจับคู่กับโคดอนสำหรับอลานีนได้ถึง 3 โคดอน ตามรูป

Three alanyl codons (mRNA)	5′—G—C—U—3′	**5 - G - C - A - 3**	5′—G—C—C—3
Anticodon of yeast tRNA^{Ala}	3′—C—G—I—5	3—C—G—I—5′	**3 - C - G - I - 5**

ส่วน tRNA สำหรับเฟนิลอลานีน ซึ่งมีแอนไทโคดอนเป็น 3′-A-A-G-5′ จะจับกับโคดอนสำหรับเฟนิลอลานีนได้ 2 โคดอนตามรูป ที่เป็นเช่นนี้เพราะที่ตำแหน่ง 1 ของแอนไทโคดอนเป็นเบสกัวนีนนั่นเอง

Phenylalanyl codons (mRNA)	5′—U—U—U—3′	5′—U—U—C—3′
Anticodon of tRNA^{Phe}	3′—A—A—G—5′	3′—A—A—G—5′

ถ้าจะกล่าวเป็นหลักง่าย ๆ จะได้ว่า ถ้าทราบว่าที่ตำแหน่ง 1 ของแอนไทโคดอนเป็นเบสตัวใดแล้ว ก็จะสามารถทำนายจำนวนโคดอนที่ tRNA ตัวนั้นจะเข้าคู่ด้วยได้ กล่าวคือ 3 โคดอนสำหรับ I 2 โคดอนสำหรับเบส U หรือ G และ 1 โคดอนสำหรับเบส A หรือ C

รหัสพันธุกรรมของไมโตคอนเดรีย

ตามที่ได้กล่าวแล้วว่า รหัสพันธุกรรมเป็นสากล แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาทางชีวเคมีในระดับโมเลกุลของไมโตคอนเดรียในปัจจุบัน ทำให้ทราบว่า รหัสที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนของไมโตคอนเดรีย จะแตกต่างไปจากรหัสที่ใช้ในไซโตปลาสม ดังตารางที่ 4-3 กล่าวคือ ในขณะที่รหัสสำหรับเมไธโอนีนในไซโตปลาสมมีเพียงรหัสเดียวคือ AUG ในไมโตคอนเดรียจะมีสองรหัสคือ AUG และ AUA ซึ่ง AUA นี้ถ้าเป็นในไซโตปลาสมจะเป็นรหัสสำหรับไอโซลิวซีน สำหรับทริปโทเฟนก็เช่นกันคือ จะมีสองรหัสในไมโตคอนเดรียได้แก่ UGA และ UGG ซึ่งใน

Codon (5′ → 3′)	Cytoplasmic code	Mitochondrial code
AUU	Ile	Ile
AUC	Ile	Ile
AUA	Ile	Met
AUG	Met	Met
UGA	Term	Trp
UGG	Trp	Trp
AGA	Arg	Term.
AGG	Arg	Term

ตารางที่ 4–3 ตารางแสดงความแตกต่างระหว่างรหัสพันธุกรรมในไซโตปลาสมและไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ไซโตปลาสม UGA จะเป็นรหัสหยุดคือไม่เฉพาะเจาะจงกับกรดอมิโนตัวใดเลย ข้อควรสังเกตก็คือ กรดอมิโนที่มีสามรหัสคือไอโซลิวซีน และมีหนึ่งรหัสคือ เมไธโอนีนและทริปโทเฟนในไซโตปลาสมนั้น เมื่อเกิดในไมโตคอนเดรีย ต่างก็จะมีตัวละสองรหัสทั้งสิ้น ข้อแตกต่างอีกประการก็คือในกรณีของอาร์จินีนซึ่งมี 6 รหัสในไซโตปลาสมเมื่อเป็นในไมโตคอนเดรีย 2 ใน 6 รหัสนั้นได้แก่ AGA และ AGG จะกลายเป็นรหัสหยุดไป

นักวิทยาศาสตร์บางส่วน เชื่อว่าความแตกต่างระหว่างรหัสในไมโตคอนเดรียและไซโตปลาสมนี้ เป็นผลเนื่องมาจากวิวัฒนาการ ทั้งนี้เพราะโครโมโซมของไมโตคอนเดรียมีขนาดเล็กคือน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1×10^7 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโครโมโซมของ E.coli ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลถึง 2×10^9 ดาลตัน เมื่อเป็นเช่นนี้ ยีนในไมโตคอนเดรียก็จะต้องมีจำนวนจำกัดไปด้วยคือมีทั้งหมดประมาณ 35 ยีน โดยที่ในจำนวนนี้ จะต้องมียีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ rRNA และ tRNA ซึ่งใช้ในขบวนการสร้างโปรตีนของไมโตคอนเดรียรวมอยู่ด้วย ดังนั้น ถ้ายังคงใช้รหัสเหมือนในไซโตปลาสม ยีนจะไม่พอ ทั้งนี้เพราะ เพียงเฉพาะ tRNA ที่จะต้องถูกสังเคราะห์ก็มีถึง 32 ชนิดเป็นอย่างต่ำแล้ว ได้มีการพบว่า รหัสและ tRNA ที่ถูกดัดแปลงของไมโตคอนเดรียจะทำให้โคดอนทั้งหมดของกรดอมิโนทั้ง 20 ชนิด เข้าคู่กับแอนไทโคดอนของ tRNA เพียง 22 ชนิดเท่านั้น โดยที่โคดอนจะถูกอ่านรหัสอย่างง่าย ๆ ผิดกับที่พบในไซโตปลาสม กล่าวคือ ในไมโตคอนเดรีย tRNA แต่ละตัวจะเข้าคู่กับระบบของรหัส 2 หรือ 4 รหัส ตัวอย่างเช่น แวลีนจะมี 4 รหัส คือ 5′-G-U-X-3′ X จะเป็นนิวคลีโอไทด์ตัวใดก็ได้ ส่วน valyl-tRNA

จะมีเพียงตัวเดียว และแอนไทโคดอนของ tRNA นี้ก็เข้าคู่ได้กับโคดอนทั้ง 4 ชนิด สำหรับไอโซลิวซีนและเมไธโอนีนมีตัวละ 2 รหัส คือ 5′-A-U-ไพริมิดีน-3′ ของไอโซลิวซีน และ 5′-A-U-เพียวรีน-3′ ของเมไธโอนีน ดังนั้น isoleucyl-tRNA ก็จะมีแอนไทโคดอนที่เข้าคู่กับรหัสที่มีตัวสุดท้าย (ทางปลาย 3′) เป็นไพริมิดีน ส่วน methionyl-tRNA ก็จะมีแอนไทโคดอนที่เข้าคู่กับรหัสที่มีตัวสุดท้าย (ทางปลาย 3′) เป็นเพียวรีน การจับคู่ในทำนองนี้ พบในระบบการอ่านรหัสของไซโตปลาสมด้วย แต่อย่างไรก็ตาม จะไม่เข้มงวดเหมือนในไมโตคอนเดรีย ด้วยเหตุที่มีการดัดแปลงรหัส และ tRNA ก็เข้าคู่กับโคดอนได้มากถึง 4 รหัสเช่นนี้ (ในไซโตปลาสม tRNA จะเข้าคู่กับโคดอนได้อย่างมากที่สุดเพียง 1 แอนไทโคดอนต่อ 3 โคดอนเท่านั้น) ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนในไมโตคอนเดรีย ใช้ tRNA น้อยกว่าในไซโตปลาสมถึง 10 ตัว ดังนั้นความต้องการยีนในไมโตคอนเดรียก็จะลดจำนวนลงไปได้ถึง 10 ยีน

การสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

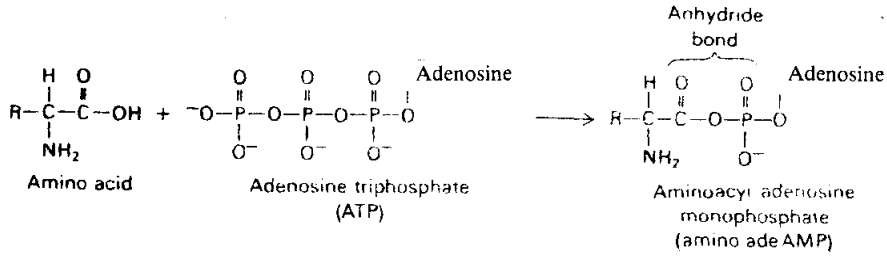
โปรคาริโอทที่ถูกศึกษามากได้แก่ E. coli ซึ่งจะมีขั้นตอนในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนี้ คือ

1. การนำกรดอมิโนมาสร้างโปรตีน
2. การเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์ (initiation of the polypeptide chain)
3. การต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป (chain elongation)
4. การหยุดสร้างสายโพลีเปปไทด์ (chain termination)

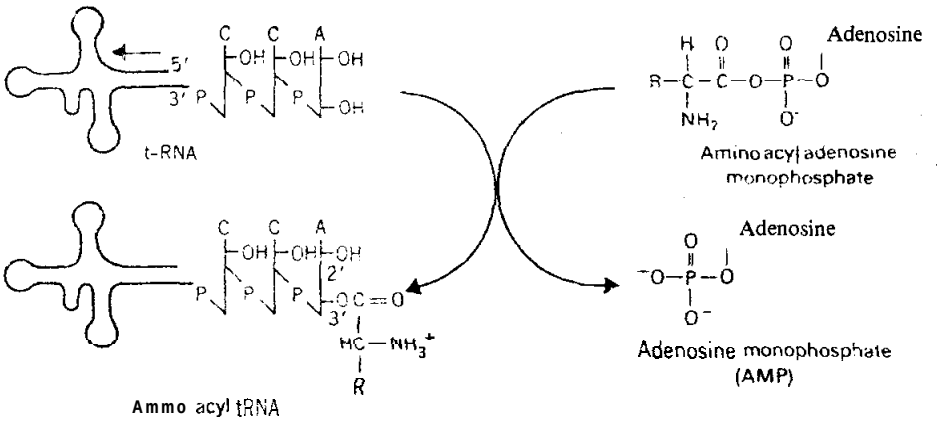
การนำกรดอมิโนมาสร้างโปรตีน

กรดอมิโนจะถูก tRNA นำไปยังไรโบโซมเพื่อสร้างสายของโปรตีน โดยใช้ปฏิกริยา 2 ขั้นตอนดังนี้

(i) กรดอมิโนจะทำปฏิกริยากับ ATP ได้อมิโนเอซิล - AMP (aminoacyl - AMP) ซึ่งในโมเลกุลนี้จะมีพันธะ anhydride ผสมของกรดคาร์บอกซีลิคและฟอสฟอริคอยู่ด้วย



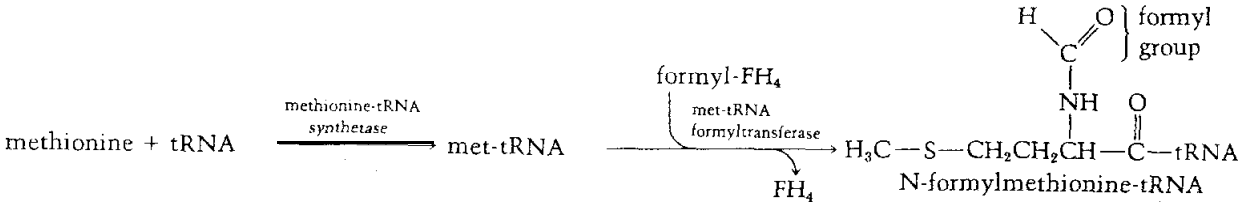
(ii) พันธะ anhydride ผสมในโมเลกุลของอมิโนเอซิล -AMP มีพลังงานสูงมาก ดังนั้นจะทำปฏิกริยาต่อทันทีกับหมู่ 3'–ไฮดรอกซิลของวงแหวนไรโบสที่ปลาย 3' ของ tRNA เพื่อทำให้เกิดเอสเทอร์



ขบวนการต่อกรดอมิโนเข้ากับ tRNA นี้จะถูกคะตะไลซ์โดยเอนไซม์ aminoacyl - tRNA synthetase ซึ่งจะมีอย่างน้อย 1 ชนิดต่อกรดอมิโน 1 ตัว เอนไซม์เหล่านี้จะแตกต่างกันที่ขนาด, โครงสร้างของหน่วยย่อย และกรดอมิโนที่เป็นส่วนประกอบ ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปแล้ว เอนไซม์ aminoacyl - tRNA synthetase จะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 ดาลตัน

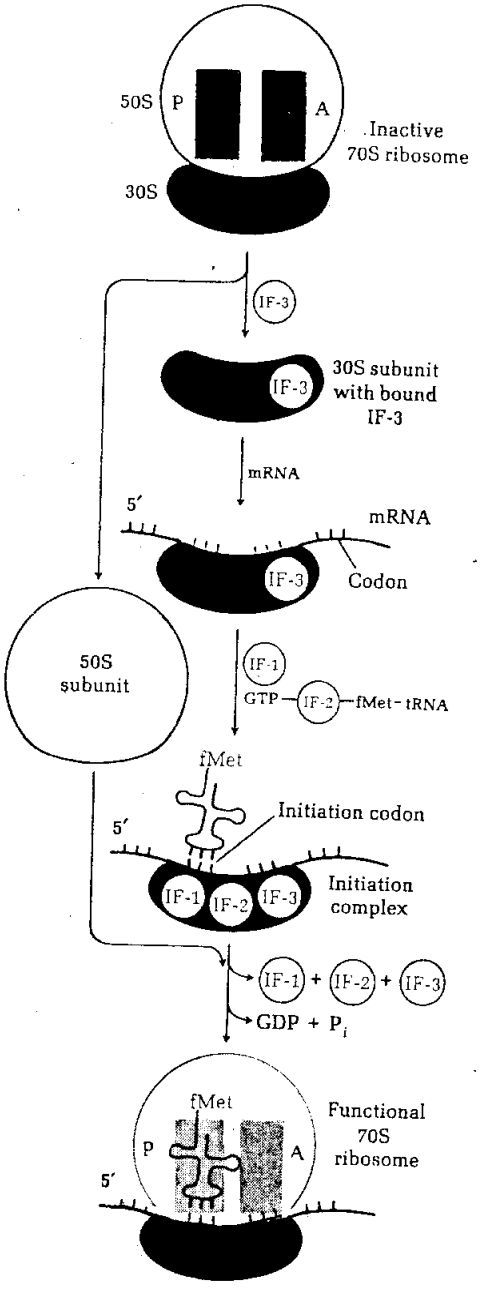
การเกิดฟอร์มิลเมไธโอนิล - tRNA (fMet - tRNA)

โปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในทิศทางจากปลายอมิโนไปยังปลายคาร์บอกซิล โดยถ้าเป็นใน E. coli และโปรคาริโอทอื่น ๆ แล้ว กรดอมิโนตัวแรกที่จะถูก tRNA นำไปยังไรโบโซมได้แก่ เมไธโอนีน ซึ่งจะเข้าสู่ขบวนการทรานสเลชั่นในรูปของฟอร์มิลเมไธโอนิล - tRNA โดย N^{10} - formyltetrahydrofolate จะเป็นตัวมาให้หมู่ฟอร์มิลแก่เมไธโอนิล - tRNA ดังปฏิกริยา



การเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์

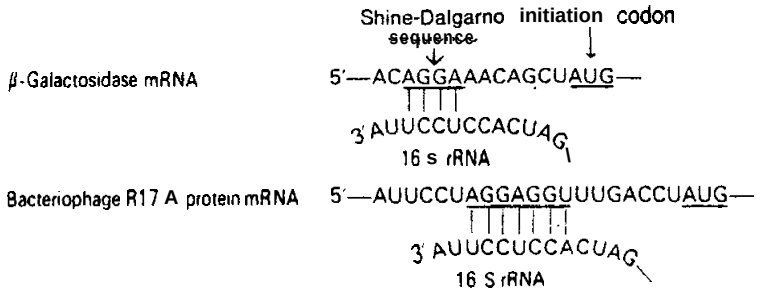
เมื่อจะเริ่มสังเคราะห์โปรตีนใน E. coli นั้น 70 S ไรโบโซมจะต้องแยกออกเป็นหน่วยย่อย 50 S และ 30 S ก่อน (รูปที่ 4 - 2) จากนั้นหน่วยย่อย 30 S จะทำปฏิกริยากับแฟคเตอร์เริ่มต้น (initiation factor, IF) ตัวหนึ่งคือ IF - 3 แล้วจึงจับตัวกับ mRNA และ IF - 1



รูปที่ 4 – 2 ขั้นตอนการเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์ในขบวนการสังเคราะห์โปรตีนใน E. coli

ต่อไป fMet - tRNA จะเข้ามาที่ไรโบโซมในรูปของ GTP - IF 2 - fMet tRNA คอมเพล็กซ์ได้เป็นคอมเพล็กซ์เริ่มต้น (initiation complex) เกิดขึ้น แล้วส่วน 50 S ไรโบโซมจะเข้ามารวมตัวอีกครั้ง ทำให้ได้เป็น 70 S ไรโบโซมที่สมบูรณ์กลับคืนมา ในขั้นตอนนี้ GTP จะถูกไฮโดรไลซ์เป็น GDP+P_i และแฟคเตอร์เริ่มต้นทั้งสามก็จะถูกแยกออกไปจากไรโบโซมด้วย ซึ่งแฟคเตอร์เหล่านี้จะถูกนำกลับไปใช้ได้อีกในการเริ่มต้นสร้างโปรตีนสายใหม่

สถานที่บน 30S ไรโบโซมที่ mRNA จะจับตัวด้วย เพื่อเกิดเป็นคอมเพล็กซ์เริ่มต้นนั้น คือที่ปลาย 3′ ของ 16S rRNA ซึ่งมีไพริมิดีนเบสอยู่มาก บริเวณนี้จะทำพันธะไฮโดรเจนกับเพียวรีนเบสทางปลาย 5′ ของ m RNA โดยที่บน m RNA จะมี Shine-Dalgarno sequence คือ AGGA เรียงลำดับอยู่ก่อนถึงโคดอนเริ่มต้น AUG ประมาณ 8-13 เบส บริเวณนี้จะเป็นแหล่งที่เกิดปฏิกริยาการจับตัวขึ้น

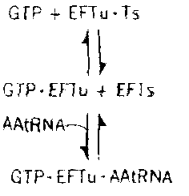


ขั้นตอนการเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์นี้ เป็นขบวนการที่ทำให้ fMet - tRNA ถูกวางลงที่ตำแหน่งเปปทิดิล (peptidyl site, P site) ในส่วน 50 S ไรโบโซม และอยู่ที่รหัสเริ่มต้น AUG เพื่อที่ไรโบโซมจะได้เริ่มสร้างสายโปรตีน ณ จุดที่ถูกต้องบน mRNA โดยทิศทางการแปลรหัสจะเป็นในทิศ 5′⟶3′

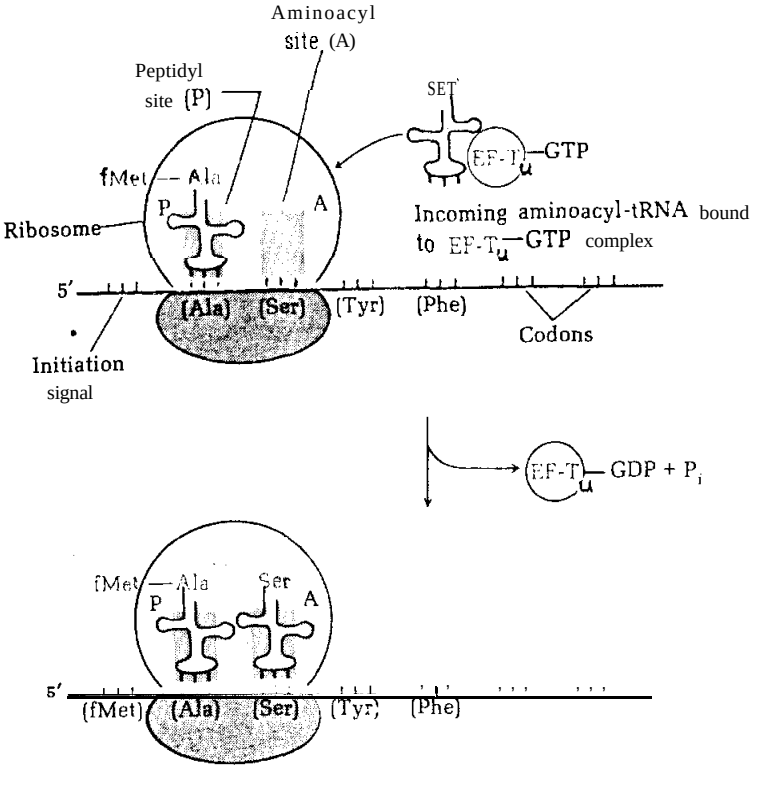
การต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป

ขั้นตอนนี้แบ่งเป็นขั้นตอนย่อยได้สามขั้นด้วยกันคือ

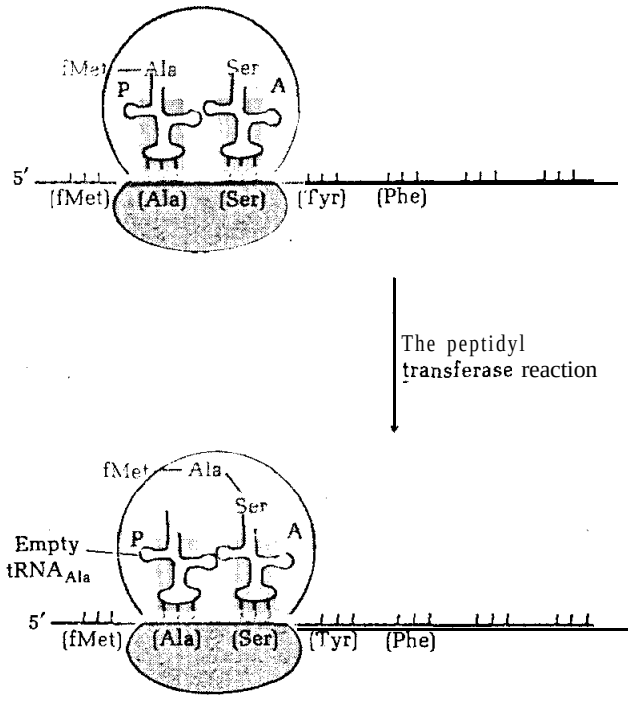
ก. เมื่อ fMet - tRNA เข้าไปอยู่ที่ P site ของไรโบโซมแล้ว ก็จะมี tRNA ตัวใหม่นำเอากรดอมิโนตัวต่อไปเข้ามาที่ตำแหน่งอมิโนเอซิล (aminoacyl site, A site) ของไรโบโซม โดยที่อมิโนเอซิล-tRNA (aminoacyl-tRNA, AA-tRNA) ตัวใหม่นี้ต้องจับกับ GTP และโปรตีนตัวหนึ่งก่อนคือ elongation factor T (EF-T) EF-T ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ EF - T_u และ EF - T_s EF - T จะรวมตัวกับ GTP ก่อนได้เป็น GTP - EFT_u ส่วน EF - T_s จะถูกตัดทิ้งไป จากนั้น GTP - EFT_u ก็จะเกิดรวมตัวต่อไปกับ AA - tRNA ได้เป็น GTP - EF T_u - AA tRNA คอมเพล็กซ์



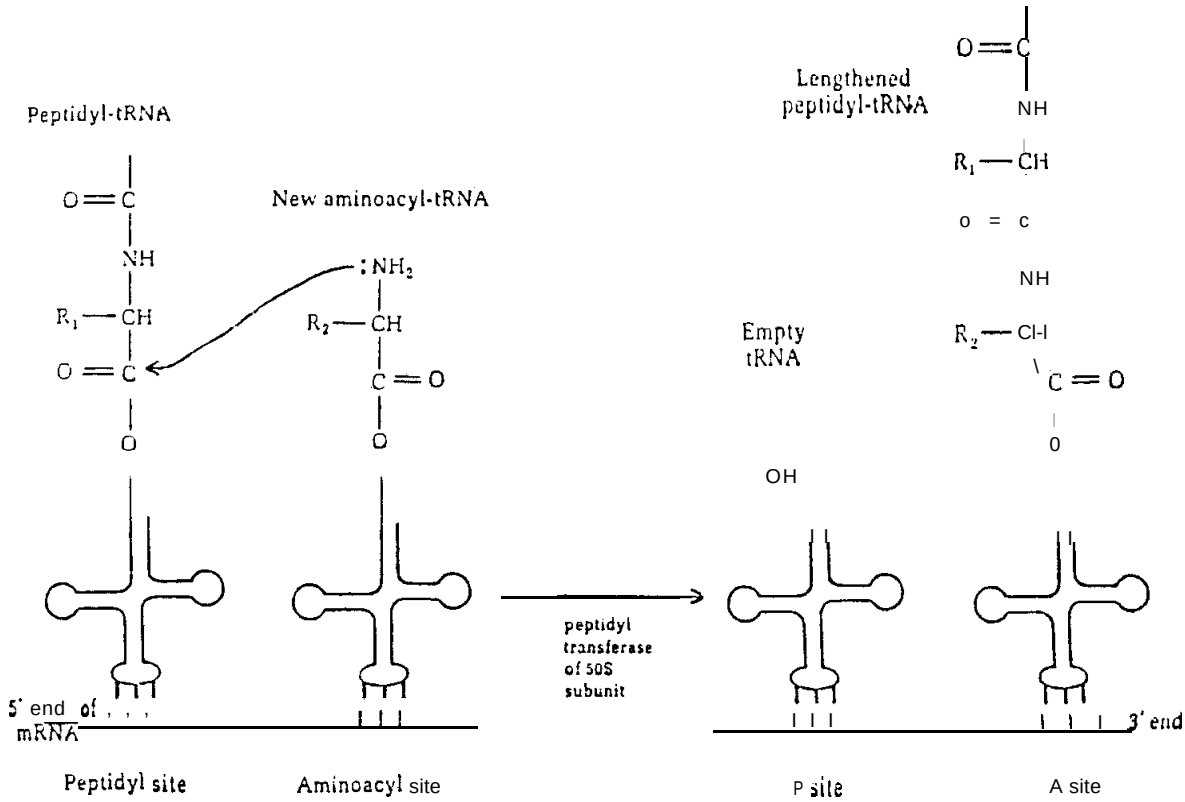
GTP - EFT_u - AAtRNA คอมเพล็กซ์จะเข้าไปวางตัวที่ A site ของไรโบโซมโดยใช้พลังงานจากการสลาย GTP แล้ว GDP จะหลุดออกจากไรโบโซมในรูปของ EFT_u - GDP



ข. เมื่อมีกรดอมิโนอยู่ทั้งที่ A site และ P site แล้ว ก็จะเกิดการสร้างพันธะเปปไทด์ขึ้น ทำให้ได้สายโปรตีนไปต่ออยู่กับ tRNA ที่ A site ส่วน tRNA ที่ P site ก็จะเป็นอิสระพร้อมที่จะหลุดออกจากไรโบโซม

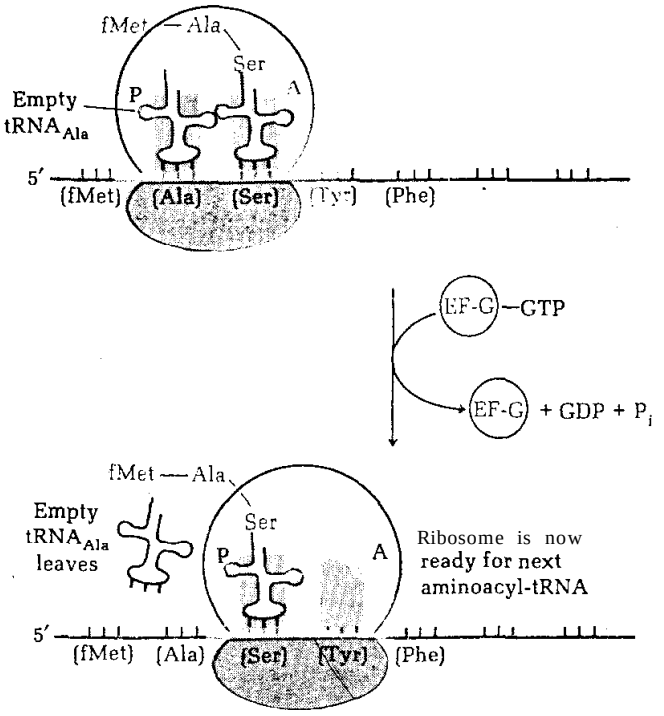


การสร้างพันธะเปปไทด์เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ซึ่งอยู่ในหน่วยย่อย 50S ไรโบโซม โดยจะเกิดปฏิกริยา nucleophilic attack ระหว่างหมู่อมิโนของ AA-tRNA บน A site กับคาร์บอกซิลคาร์บอนตัวที่เกิดพันธะเอสเทอร์อยู่กับ tRNA บน P site (รูปที่ 4-3) การเกิดพันธะเปปไทด์นี้ไม่ต้องการใช้พลังงานจาก ATP หรือ GTP แต่คิดว่าอาจจะใช้พลังงานจากการสลายพันธะเอสเทอร์ของ AA-tRNA บน P site นั่นเอง ขบวนการสร้างพันธะเปปไทด์นี้จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ อยู่ตลอดในช่วงของการต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวขึ้น



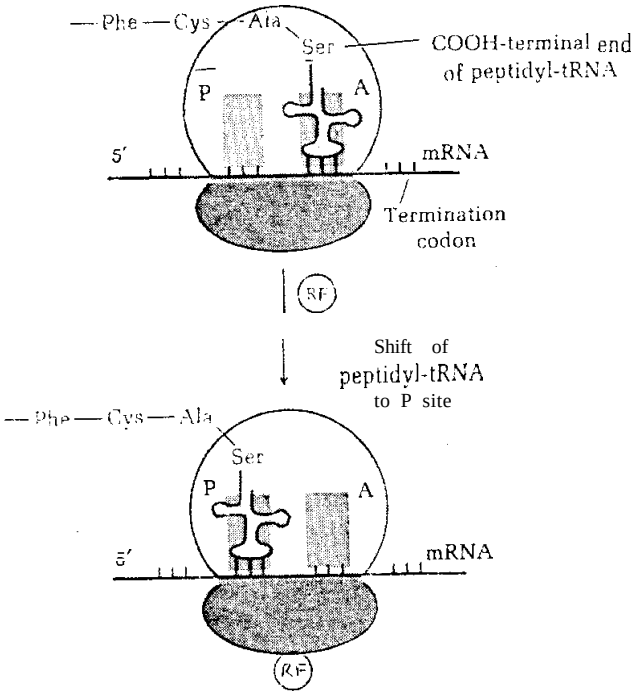
รูปที่ 4 – 3 กลไกการสร้างพันธะเปปไทด์ จากการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase

ค. หลังจากเกิดพันธะเปปไทด์แล้ว ก็จะมาถึงขั้นตอนของการย้ายที่ (translocation) ซึ่งต้องการโปรตีนตัวหนึ่งคือ EF - G และ GTP โดย GTP จะรวมตัวกับ EF - G ได้เป็นคอมเพล็กซ์แล้วจึงเข้าไปจับที่ไรโบโซม จากนั้น GTP จะถูกไฮโดรไลซ์ทำให้ได้พลังงานสำหรับการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (conformational change) ซึ่งจะเคลื่อนไรโบโซมไปยังรหัสถัดไปทางปลาย 3' ของ mRNA ในการนี้จะทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่ต่ออยู่กับ tRNA (peptidyl-tRNA) บน A site เคลื่อนไปอยู่ที่ P site ด้วย และ tRNA อิสระที่อยู่บน P site เดิมก็จะหลุดออกไปจากไรโบโซม ดังนั้น A site ก็จะว่างลง และพร้อมที่จะรับ AA-tRNA ตัวใหม่เข้ามา ซึ่งก็คือเริ่มต้นขั้นตอนการต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไปอีกครั้งหนึ่ง สำหรับ EF - G เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการย้ายที่แล้ว ก็จะถูกแยกออกไปจากไรโบโซม

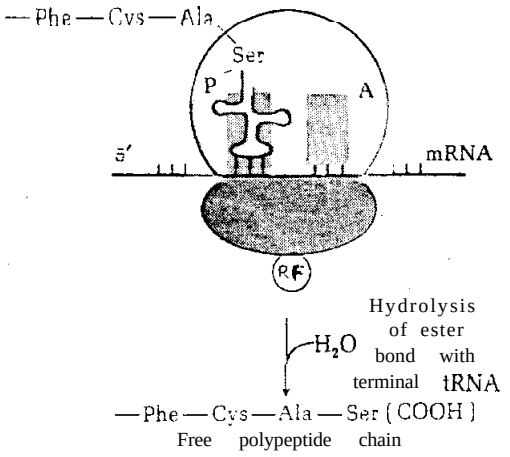


การหยุดสร้างสายโพลีเปปไทด์

เมื่อทรานสเลชั่นดำเนินมาจนกระทั่งกรดอมิโนตัวสุดท้ายถูกต่อเข้าไปในสายโพลีเปปไทด์บนไรโบโซม โดยที่ปลายคาร์บอกซิลของสายโพลีเปปไทด์นั้นก็ยังคงติดอยู่กับ tRNA ซึ่งอยู่ที่ A site แล้ว ก็จะมีโปรตีนปลดปล่อย (release factor, RF)เข้ามาช่วยในการทำให้เปปทิดิล-tRNA หลุดออกจากไรโบโซม โปรตีนปลดปล่อยมีสองชนิดด้วยกันคือ RF-1 และ RF-2 โดยที่ RF-1 จะเฉพาะเจาะจงกับรหัสหยุด UAA หรือ UAG ส่วน RF-2 เฉพาะเจาะจงกับ UAA หรือ UGA โปรตีนปลดปล่อยจะไปจับกับไรโบโซม แล้วทำให้เปปทิดิล-tRNA เกิดการเคลื่อนที่จาก A site ไปอยู่ที่ P site

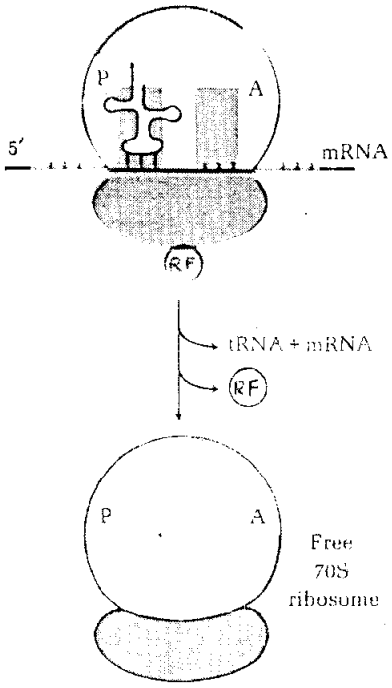


จากนั้นพันธะเอสเทอร์ระหว่างสายโพลีเปปไทด์และ tRNA ตัวสุดท้ายก็จะถูกไฮโดรไลซ์ออกด้วยเอนไซม์ peptidyl transferase ซึ่งความเฉพาะเจาะจงและความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตัวนี้ในขณะนี้ได้เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากอิทธิพลของโปรตีนปลดปล่อยที่จับอยู่ที่ไรโบโซม

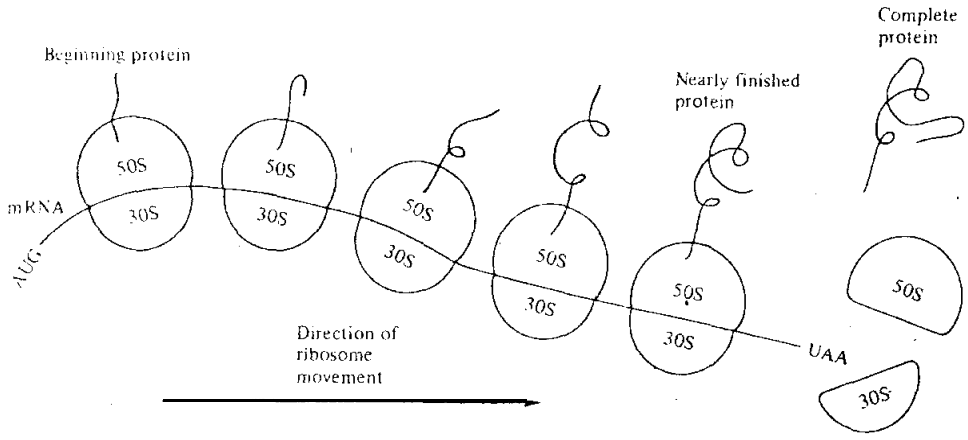


เมื่อสายโพลีเปปไทด์ถูกปล่อยออกเป็นอิสระแล้ว ต่อไป tRNA ตัวสุดท้ายและ mRNA รวมทั้งโปรตีนปลดปล่อยก็จะหลุดออกไปด้วย ทำให้ได้ 70 S ไรโบโซม ซึ่งพร้อมที่จะแยกตัว

ออกเป็นหน่วยย่อย 50 S และ 30 S เพื่อเริ่มต้นขบวนการสร้างโพลีเปปไทด์สายใหม่ได้ต่อไป



ในการแปลรหัสบน mRNA ให้ได้สายโพลีเปปไทด์ของโปรตีนนั้น ไรโบโซมหลาย ๆ อันสามารถที่จะมาทำงานไปพร้อม ๆ กันได้ ซึ่งวิธีนี้จะช่วยให้การใช้ mRNA มีประสิทธิภาพมากขึ้น ไรโบโซมกลุ่มนี้เรียกว่าโพลีไรโบโซม (polyribosome) หรือโพลีโซม (polysome) แต่ละไรโบโซมจะทำงานเป็นอิสระไม่ขึ้นแก่กัน (รูปที่ 4 - 4) คือแต่ละอันก็จะทำให้เกิดสายโพลีเปปไทด์ที่สมบูรณ์ได้ 1 สาย โดยไรโบโซมที่อยู่ใกล้ปลาย 5′ ของ mRNA มากที่สุดจะมีสายโพลีเปปไทด์ที่สั้นที่สุด ส่วนไรโบโซมที่ใกล้กับปลาย 3′ ก็จะมีสายโพลีเปปไทด์ซึ่งใกล้จะเสร็จสมบูรณ์ และเมื่อการทำงานได้สิ้นสุดลงแล้ว ไรโบโซมแต่ละอันก็จะหลุดออกจาก mRNA และแยกตัวออกเป็นหน่วยย่อย 50 S และ 30 S ต่อไป



รูปที่ 4 – 4 การทำงานของโพลีไรโบโซม

บทบาทของ GTP ในขบวนการทรานสเลชั่น

จากขั้นตอนทั้งสี่ที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่า ATP ถูกใช้ในการกระตุ้นกรดอมิโนเท่านั้น ส่วนอีกสามขั้นตอนซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์จะใช้นิวคลีโอไซด์ไทรฟอสเฟทอีกตัวหนึ่งคือ GTP ได้มีข้อสงสัยว่า การสลาย GTP ในขบวนการทรานสเลชั่น จะทำให้ได้พลังงานเพื่อใช้ทำให้เกิดปฏิกริยาหรือไม่ ทั้งนี้เพราะเมื่อสลายนิวคลีโอไทด์ตัวนี้แล้ว ไม่มีพันธะโควาเลนท์เกิดขึ้น คำอธิบายก็คือ พบว่าหน้าที่หลักของ GTP เกี่ยวข้องกับการจับตัวอย่างน็อนโควาเลนท์ระหว่างแฟคเตอร์ต่าง ๆ เช่น elongation factors และแฟคเตอร์ปลดปล่อยกับไรโบโซม โดย GTP จะทำให้การจับตัวระหว่างแฟคเตอร์ต่าง ๆ กับไรโบโซมเกิดได้อย่างเฉพาะเจาะจง และเมื่อสลาย GTP เป็น GDP + P_i ก็จะทำให้แฟคเตอร์ที่จับตัวอยู่นั้นหลุดออกจากไรโบโซมเป็นอิสระสามารถกลับไปใช้ในขบวนการสังเคราะห์โปรตีนรอบใหม่ต่อไปได้

การสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

ขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนในยูคาริโอทนี้ จะเหมือนกับที่เกิดในโปรคาริโอทแต่สิ่งที่แตกต่างกันคือ กรดอมิโนตัวเริ่มต้นในการสร้างสายโพลีเปปไทด์ จะเป็นเมไธโอนีน มิใช่ฟอร์มิล

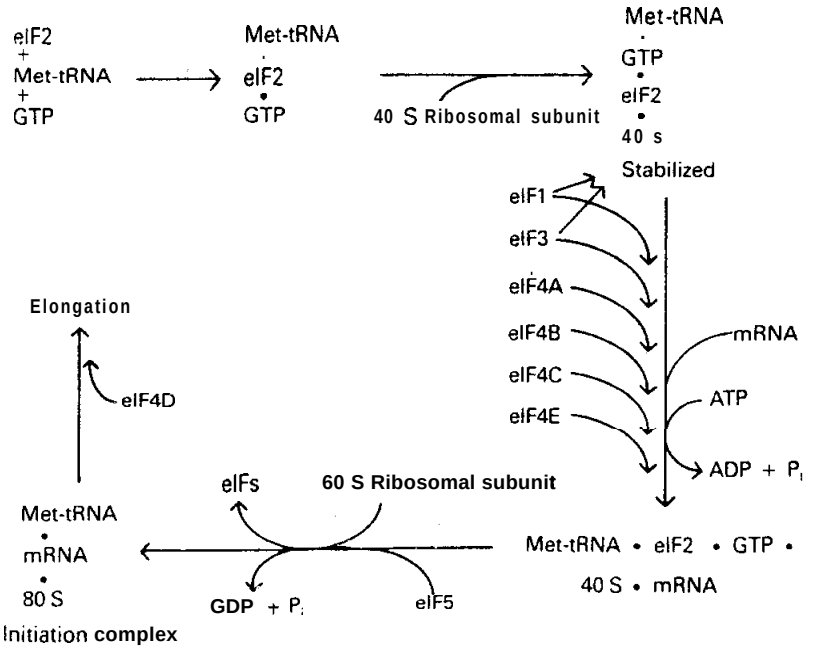
เมไธโอนีน และหน่วยย่อยของไรโบโซมที่ใช้ในขั้นตอนต้น ๆ ของการเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์ ก็จะเป็น 40S สำหรับในขั้นตอนการต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไปนั้น พบว่าโปรตีนพิเศษที่ใช้ในกรณีของยูคาริโอทคือ EF-1 และ EF-2 ส่วนในขั้นตอนการหยุดสร้างสายโพลีเปปไทด์ จะใช้แฟคเตอร์ปลดปล่อยเพียงตัวเดียว คือ RF-1 ซึ่งจะเฉพาะเจาะจงกับรหัสหยุดทั้ง 3 รหัส

สิ่งที่แตกต่างกันอย่างมากเท่าที่ทราบในปัจจุบัน ก็คือจำนวนแฟคเตอร์เริ่มต้นที่ยูคาริโอทต้องการ ในการเกิดคอมเพล็กซ์เริ่มต้น โดยในขณะที่ E.coli ใช้เพียง 3 ตัวได้แก่ IF-1, IF-2 และ IF-3 นั้น ยูคาริโอทต้องการอย่างน้อยถึง 9 ตัว ตามตารางที่ 4-4

Factor	Molecular weight
eIF1	15,000
eIf2	≈ 150,000 (3 protomers)
eIF3	≈700,000 (9 protomers)
eIF4A	50.000
eIF4B	80,000
eIF4C	18,000
eIF4D	17.000
eIF4E	24,000
eIF5	≈ 150,000

ตารางที่ 4–4 แฟคเตอร์เริ่มต้นของยูคาริโอท เท่าที่แยกได้จากเม็ดโลหิตแดงที่ยังไม่โตเต็มที่ (reticulocytes) ของกระต่าย

ตารางนี้ยังมิได้รวมแฟคเตอร์ที่ช่วยส่งเสริมความว่องไวของ eIF_2 (คือ Co-eIF_2 แฟคเตอร์) และแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่ช่วยให้ 80S ไรโบโซมแตกตัวออกเป็นหน่วยย่อย (คือ ribosome-dissociation factors) จากตารางจะเห็นได้ว่า 2 ใน 9 แฟคเตอร์จะเป็น oligomeric proteins สำหรับแผนผังการเกิดเป็นคอมเพล็กซ์เริ่มต้นของยูคาริโอท แสดงในรูปที่ 4-5 ซึ่งมีขั้นตอนคล้ายคลึงกับใน E.coli กล่าวคือ จะมีการเกิดเป็นคอมเพล็กซ์ของ tRNA เริ่มต้นก่อน แล้วจึงรวมตัวต่อไปกับหน่วยย่อยเล็กของไรโบโซม, mRNA และท้ายสุดคือหน่วยย่อยใหญ่ของไรโบโซม ขั้นตอนที่ยุ่งยากที่สุด คือขั้นตอนการรวมตัวของ mRNA เข้าไปในคอมเพล็กซ์ ซึ่งต้องอาศัยแฟคเตอร์เริ่มต้นถึง 6 ใน 9 ตัว นอกจากนี้ ขั้นตอนนี้ยังต้องใช้พลังงานจากการสลาย ATP ด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ถ้าเป็นระบบของยูคาริโอท จะต้องใช้ทั้ง ATP และ GTP ในขณะที่ E.coli ใช้เฉพาะ GTP เท่านั้น สำหรับรายละเอียดอื่น ๆ ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัย



รูปที่ 4–5 แผนผังแสดงการรวมตัวเป็นคอมเพล็กซ์เริ่มต้น ในการสังเคราะห์โพลีเปปไทด์ของยูคาริโอท

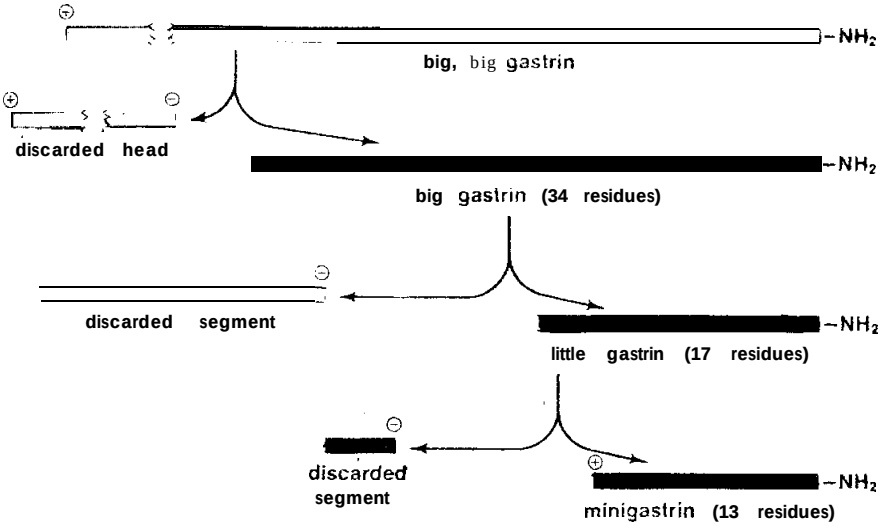
การดัดแปลงโปรตีนซึ่งได้จากทรานสเลชั่น

ในทำนองเดียวกับทรานสคริปชั่น สายของโพลีเปปไทด์ที่ได้จากทรานสเลชั่นนี้ มักจะไม่ใช่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่จะถูกนำไปใช้ได้ทันที แต่จะต้องถูกดัดแปลงเสียก่อน ซึ่งทำได้หลายวิธีคือ

1. ในกรณีของแบคทีเรีย หมู่ฟอร์มิลที่ปลายอมิโนของสายโปรตีนจะถูกไฮโดรไลซ์ออกด้วยเอนไซม์ deformylase และกรดอมิโนอีก 1 หรือหลายตัวทางปลายนี้ก็สามารถที่จะถูกตัดทิ้งได้ด้วยเอนไซม์ aminopeptidase

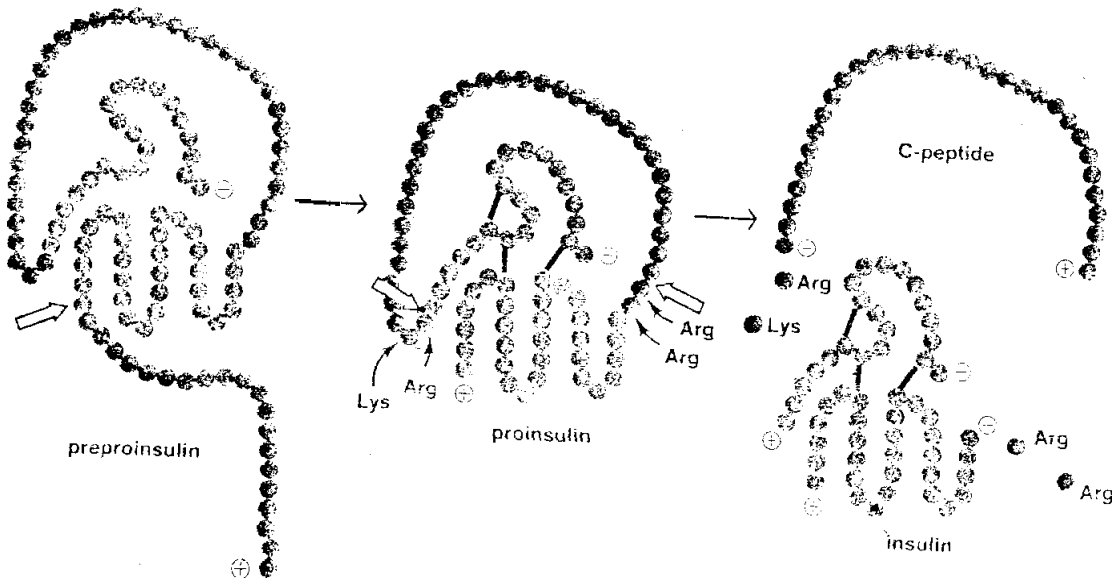
2. การดัดแปลงโดยไฮโดรไลซ์เอาบางส่วนของสายโพลีเปปไทด์ออก (partial hydrolysis) เช่นในกรณีของแกสตริน (gastrins) ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์ฮอร์โมนที่ช่วยเร่งการปล่อยกรดออก

มาจากกระเพาะอาหาร จะมี 2 ชนิดที่สามารถสกัดออกมาได้คือ ชนิดที่มีกรดอมิโน 17 ตัว และชนิดที่มีกรดอมิโน 13 ตัวต่อกัน ซึ่งแกสตรินทั้งสองชนิดนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า (รูปที่ 4 - 6) คือมีกรดอมิโนมากกว่า 34 ตัวมาต่อกัน สำหรับการเรียงลำดับของกรดอมิโนในสารตั้งต้นนี้ยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัด



รูปที่ 4–6 การเกิดแกสตรินชนิดที่มีกรดอมิโน 13 ตัว และ 17 ตัว จากสารตั้งต้นซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า

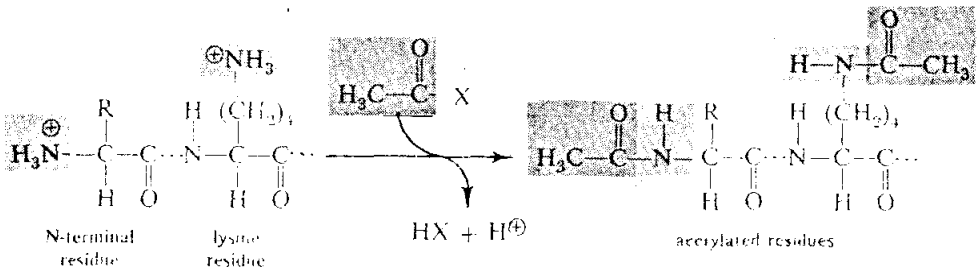
3. การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ การดัดแปลงวิธีนี้จะเกิดในโปรตีนที่มีซิสเตอีนหลายโมเลกุลเป็นส่วนประกอบ ตัวอย่างเช่นอินสุลิน (insulin) ซึ่งขณะที่ได้ออกมาจากทรานสเลชั่นนั้นจะอยู่ในรูปของพรีโพรอินสุลิน (preproinsulin) อันเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (รูปที่ 4 - 7) จากนั้นจะมีการตัดกรดอมิโนออก 23 ตัวได้โพรอินสุลิน (proinsulin) ซึ่งจะเกิดการขดตัว แล้วมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ขึ้น 3 พันธะระหว่างคู่ของซิสเตอีนซึ่งถูกทำให้มาอยู่ใกล้กันเนื่องจากการขดตัวนั้น ต่อไปบางส่วนของโพรอินสุลินจะถูกตัดออกอีก ได้อินสุลินเกิดขึ้น



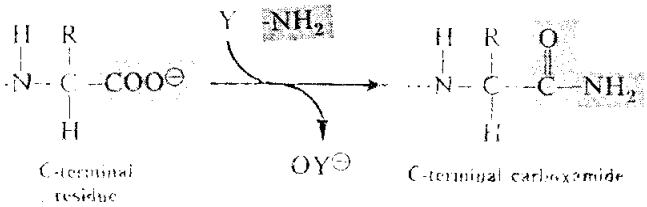
รูปที่ 4 – 7 การเกิดอินสุลินจากพรีโพรอินสุลิน

4. การเปลี่ยนแปลงประจุบนสายโพลีเปปไทด์ การดัดแปลงชนิดนี้คาดว่าจะมีประโยชน์ในบางกรณีเช่น เพื่อความสะดวกในการขนส่งโปรตีน หรือเพื่อให้โปรตีนสามารถรวมตัวกับโมเลกุลอื่น ๆ ได้ การเปลี่ยนแปลงประจุมี 2 แบบย่อยคือ

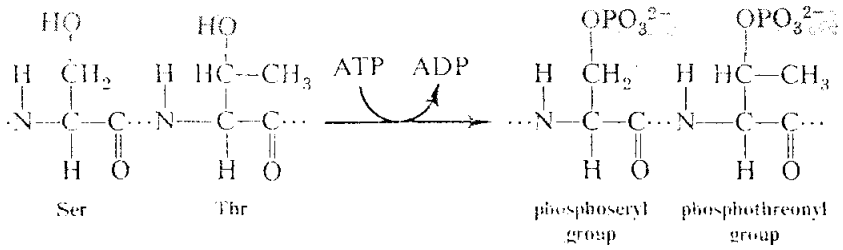
ก. การสูญเสียประจุไป ทำได้โดยเติมหมู่อเซทิลให้กับหมู่แอมโมเนียมที่มีประจุในสายโพลีเปปไทด์



หรือเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่ปลายสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็น amide



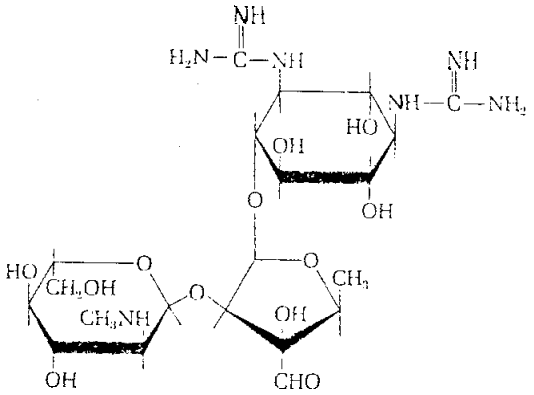
ข. การเติมประจุเข้ามาในสายโปรตีน เช่นเติมหมู่ฟอสเฟทให้กับซีรีนหรือธรีโอนีน เป็นต้น



5. การเติมหมู่ต่าง ๆ เข้ามาในสายโปรตีน เช่นเติมหมู่คาร์โบไฮเดรททำให้ได้กลัยโคโปรตีน (glycoprotein) หรืออาจเติมพวกโคแฟคเตอร์ โคเอนไซม์ เป็นต้น

ตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

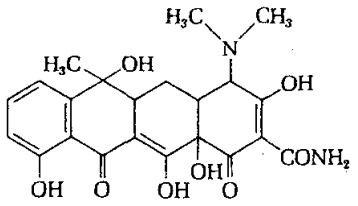
1. **สเตรปโตมัยซิน** (streptomycin) เป็นยาปฏิชีวนะที่จะเข้าไปแทรกแซงการวางตัวของ fMet - tRNA บนไรโบโซม ดังนั้นจึงยับยั้งขั้นตอนการเริ่มต้นสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการอ่านรหัสบน mRNA ผิดไปด้วย เช่นถ้ารหัสบน mRNA เป็น UUU ไอโซลิวซีน (รหัส AUU) จะถูกนำมาที่ไรโบโซมแทนที่จะเป็นเฟนิลอลานีน (รหัส UUU)



Streptomycin

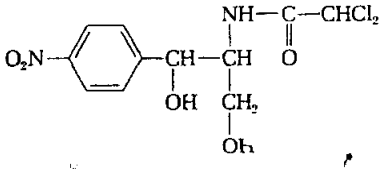
2. **เตตราซัยคลิน** (tetracyclines) จะจับกับส่วน 30S ไรโบโซมของโปรคาริโอท และยับยั้งการเข้ามาวางตัวของ AA - tRNA ตัวใหม่ที่ A site ในขั้นตอนย่อยอันแรกของการต่อ

สายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป



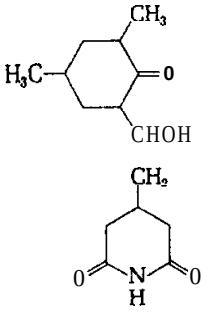
Tetracycline

(3) **คลอแรมเฟนิคอล** (chloramphenicol) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ในส่วน 50S ไรโบโซมของโปรคาริโอท



Chloramphenicol

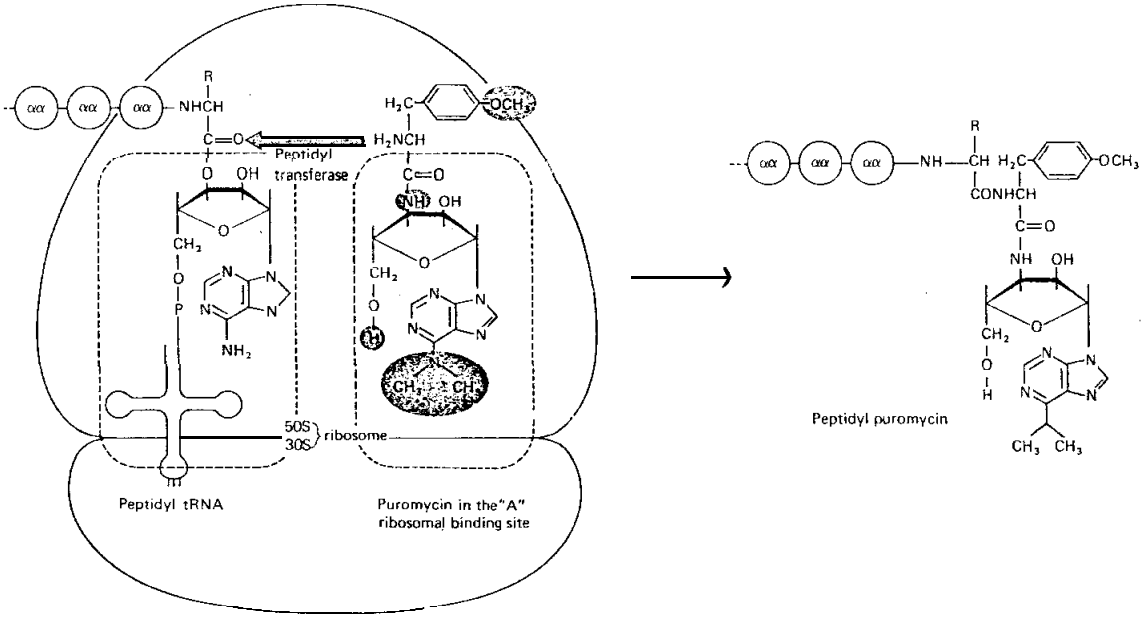
(4) **ไซโคลเฮกซิไมด์** (cycloheximide) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ในส่วน 60S ไรโบโซมของยูคาริโอท



Cycloheximide

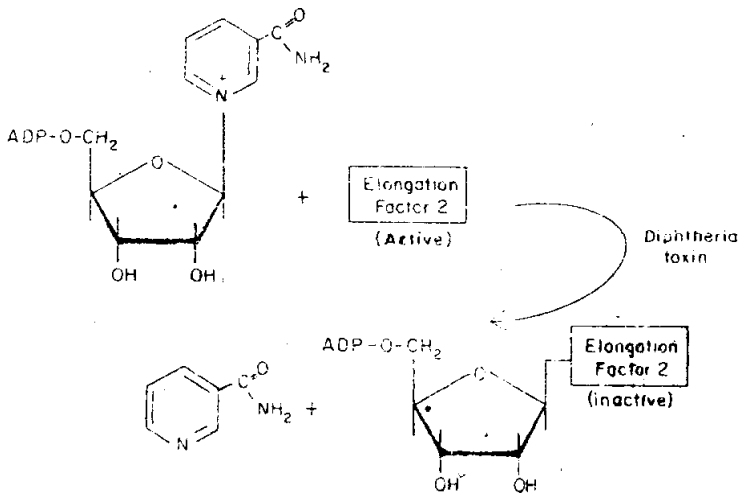
5. **เพียวโรมัยซิน** (puromycin) จะขัดขวางขั้นตอนการต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป โดยทำให้เกิดการหยุดสร้างสายโปรตีนก่อนที่จะถึงรหัสหยุดที่แท้จริง ทั้งนี้เพราะยาปฏิชีวนะตัวนี้มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ AA - tRNA ดังนั้นก็สามารถเข้าไปวางตัวที่ A site ของไรโบโซมได้ (รูปที่ 4 - 8) จากนั้นจะเกิดการสร้างพันธะเปปไทด์ได้สายของโปรตีนมาต่ออยู่กับ

เพียวโรมัยซิน แต่เนื่องจากเพียวโรมัยซินนี้จับตัวอยู่ที่ A site อย่างไม่แข็งแรงนัก จึงทำให้เปปทิดิล - เพียวโรมัยซินหลุดออกจากไรโบโซมทำให้ได้สายของโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์เกิดขึ้น



รูปที่ 4 – 8 การยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีนโดยเพียวโรมัยซิน ซึ่งจะทำให้ได้สายโพลีเปปไทด์ที่ไม่สมบูรณ์เกิดขึ้น

6. เชื้อคอตีบ (diphtheria toxin) เป็นสารพิษที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในแบคทีเรีย ดังนั้นจะไม่มีผลกับแบคทีเรียเลย สารพิษตัวนี้เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการคะตะไลซ์ปฏิกริยาการนำเอาบางส่วนของ NAD^+ มาต่อกับ EF - 2 ของยูคาริโอท (รูปที่ 4 - 9) ทำให้ EF - 2 หมดความว่องไวในการทำงาน



รูปที่ 4-9 การยับยั้งสมรรถภาพในการทำงานของ EF-2 ของยูคาริโอท โดยเชื้อคอตีบ

วิวัฒนาการของการสังเคราะห์โปรตีนในปัจจุบัน

ในปัจจุบัน ได้มีวิวัฒนาการสังเคราะห์โปรตีนวิธีใหม่ขึ้นอย่างหนึ่ง โดยอาศัยเทคนิคของรีคอมบิแนนท์ DNA (recombinant DNA) ซึ่งทำได้โดยนำเอาส่วนของ DNA จากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง มาเชื่อมต่อกับ DNA ของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดยมากมักจะนำเอา DNA ของสัตว์ชั้นสูงเชื่อมกับ DNA ของแบคทีเรีย จากนั้นใส่รีคอมบิแนนท์ DNA นี้กลับเข้าไปในตัวแบคทีเรียชนิดเดิม แล้วเลี้ยงให้เจริญเติบโต แบคทีเรียก็จะสามารถผลิตโปรตีนของสัตว์ชั้นสูงออกมาได้ วิธีนี้ทำให้สามารถผลิตโปรตีนที่ใช้ในการรักษาโรคบางชนิดได้โดยใช้เวลาสั้นลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็มีจำนวนมากขึ้น ทำให้ราคาถูกลง และข้อสำคัญก็คือสารที่ได้นี้จะให้ความปลอดภัยแก่ชีวิตได้มากขึ้น คือมนุษย์สามารถใช้สารเหล่านี้ได้โดยปราศจากผลข้างเคียง (side effect) เช่นในกรณีของอินสุลินซึ่งใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และอินเทอเฟียรอน (interferon) ซึ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เป็นต้น