บทที่ 4
การสังเคราะห์โปรตีน
(Biosynthesis of Proteins)

วัตถุประสงค์ เมื่ออ่านบทนี้ตลอดจนทำแบบฝึกหัดแล้ว นักศึกษาจะต้อง

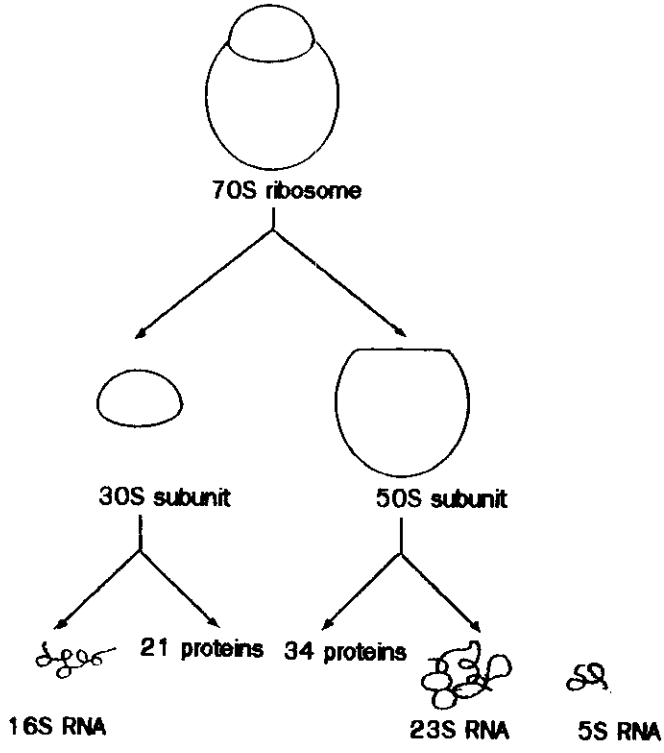
1. อธิบายลักษณะทั่วๆไปของรหัสพันธุกรรมได้
2. ทำนายได้ว่า กรดอมิโนชนิดใด จะถูกนำเข้ามาต่อในสายโพลีเปปไทด์ โดยดูจากตารางแสดงรหัสพันธุกรรม
3. ใช้ความรู้เกี่ยวกับ สมมติฐาน wobble ไปอธิบายถึงการจับคู่อย่างไม่เฉพาะเจาะจง ระหว่างโคดอนและแอนไทโคดอนได้
4. เปรียบเทียบความแตกต่างของรหัส ที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนที่เกิดในไมโตคอนเดรียและไซโตปลาสมได้
5. ระบุบทบาทของ tRNA ในขบวนการทรานสเลชั่นได้
6. เขียนปฏิกริยาการเกิดฟอร์มิลเมไธโอนิล-tRNA (fMet-tRNA) ได้
7. บอกความสัมพันธ์ระหว่าง 30S,50Sและ70S ไรโบโซมตลอดจนความสำคัญของ GTP และแฟคเตอร์เริ่มต้นทั้งหลายได้
8. ระบุสถานที่และหน้าที่ของ Shine-Dalgarno sequence ได้
9. อธิบายบทบาทและการทำงานของ EF-T_u และ EF-G ได้
10. เขียนปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ได้
11. เปรียบเทียบความแตกต่างในการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase เมื่อทำหน้าที่ในขั้นตอนที่ต่างกัน ของขบวนการ

CM 352 123

ทรานสเลชั่นได้

12. อธิบาย wobble base, release factor และ polysome ได้
13. แยกแยะความแตกต่างของทรานสเลชั่น ที่เกิดในโปรคาริโอท และยูคาริโอทได้
14. ยกตัวอย่างการดัดแปลงสายโพลีเปปไทด์ ที่ได้จากขบวนการทรานสเลชั่นได้
15. ยกตัวอย่างยาปฏิชีวนะ หรือสารพิษ ที่ยับยั้งทรานสเลชั่นได้
16. อธิบายการใช้ recombinant DNA เพื่อสังเคราะห์โปรตีนที่ต้องการได้

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′ end)	*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

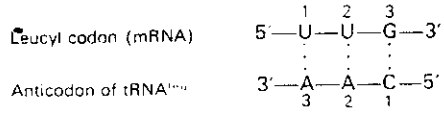
สมมติฐาน wobble (wobble hypothesis)

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

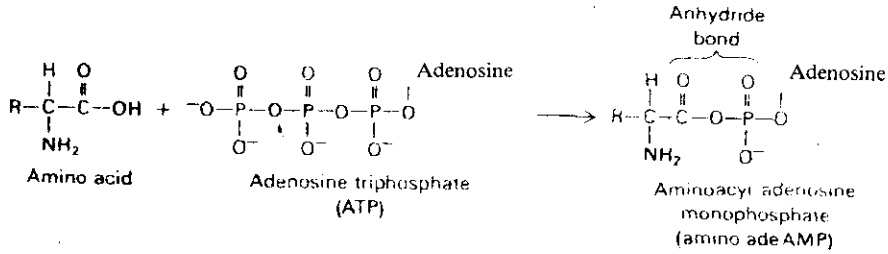
โปรคาริโอทที่ถูกศึกษามากได้แก่ E. coli ซึ่งจะมีขั้นตอนในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนี้ คือ

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

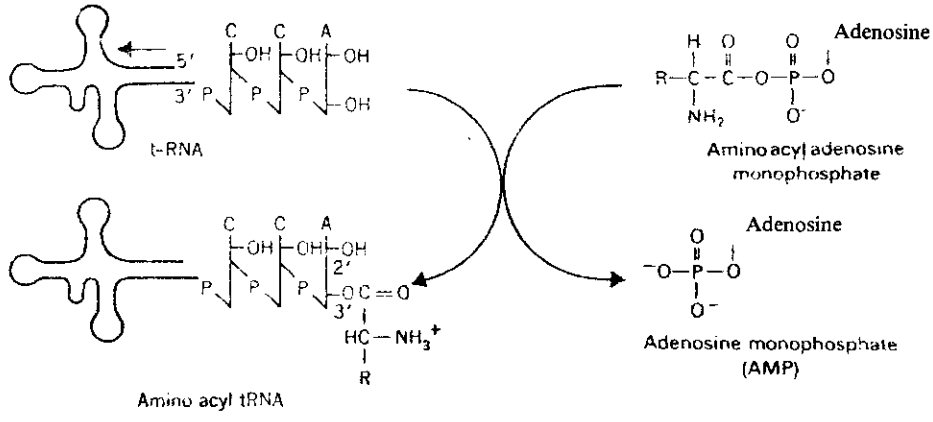
การนำกรดอมิโนมาสร้างโปรตีน

กรดอมิโนจะถูก tRNA นำไปยังไรโบโซมเพื่อสร้างสายของโปรตีน โดยใช้ปฏิกริยา 2 ขั้นตอนดังนี้

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



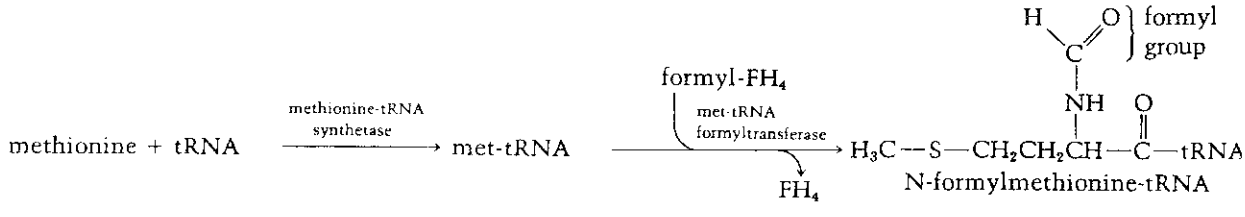
(ii) พันธะ anhydride ผสมในโมเลกุลของอมิโนเอซิล -AMP มีพลังงานสูงมาก ดังนั้นจะทำปฏิกริยาต่อทันทีกับหมู่ 3'–ไฮดรอกซิลของวงแหวนไรโบสที่ปลาย 3' ของ tRNA เพื่อทำให้เกิดเอสเทอร์



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

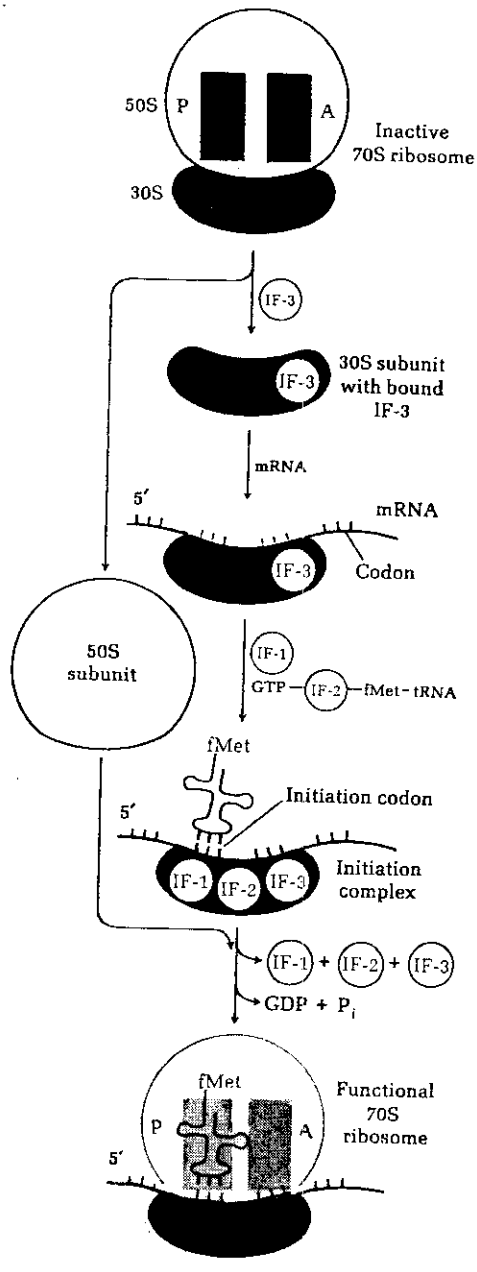
การเกิดฟอร์มิลเมไธโอนิล - tRNA (fMet - tRNA)

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



การเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์

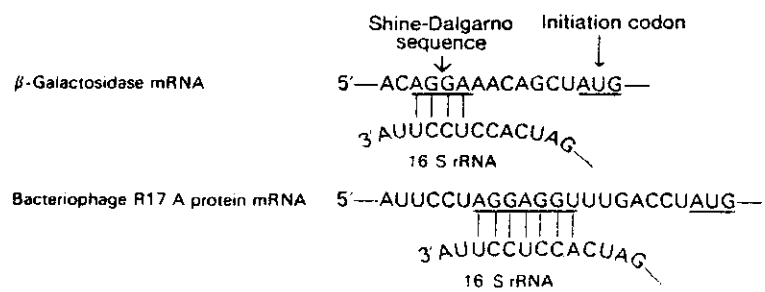
เมื่อจะเริ่มสังเคราะห์โปรตีนใน E. coli นั้น 70 S ไรโบโซมจะต้องแยกออกเป็นหน่วยย่อย 50 S และ 30 S ก่อน (รูปที่ 4 - 2) จากนั้นหน่วยย่อย 30 S จะทำปฏิกริยากับแฟคเตอร์เริ่มต้น (initiation factor, IF) ตัวหนึ่งคือ IF - 3 แล้วจึงจับตัวกับ mRNA และ IF - 1



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

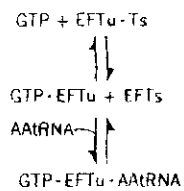


ขั้นตอนการเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์นี้ เป็นขบวนการที่ทำให้ fMet - tRNA ถูกวางลงที่ตำแหน่งเปปทิดิล (peptidyl site, P site) ในส่วน 50 S ไรโบโซม และอยู่ที่รหัสเริ่มต้น AUG เพื่อที่ไรโบโซมจะได้เริ่มสร้างสายโปรตีน ณ จุดที่ถูกต้องบน mRNA โดยทิศทางการแปลรหัสจะเป็นในทิศ 5′⟶3′

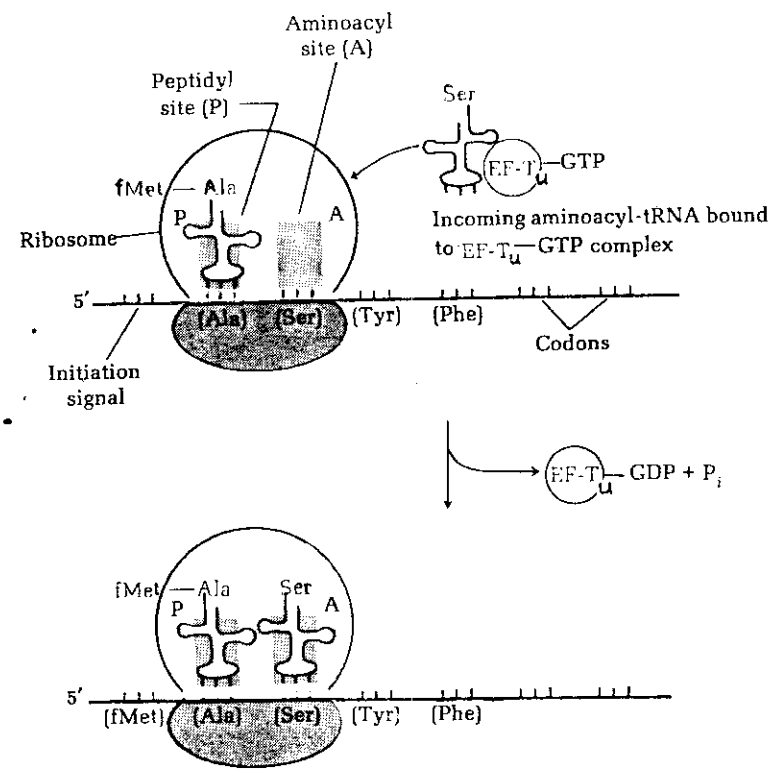
การต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป

ขั้นตอนนี้แบ่งเป็นขั้นตอนย่อยได้สามขั้นด้วยกันคือ

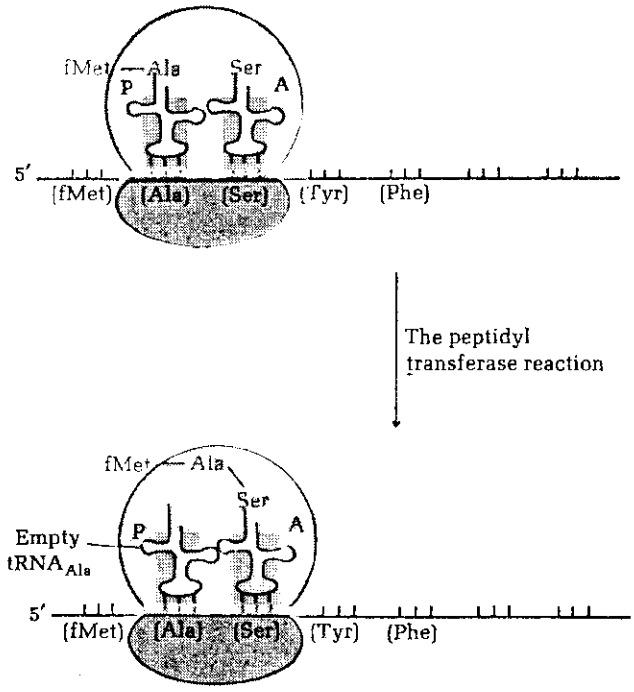
ก. เมื่อ fMet - tRNA เข้าไปอยู่ที่ P site ของไรโบโซมแล้ว ก็จะมี tRNA ตัวใหม่นำเอากรดอมิโนตัวต่อไปเข้ามาที่ตำแหน่งอมิโนเอซิล (aminoacyl site, A site) ของไรโบโซม โดยที่อมิโนเอซิล-tRNA (aminoacyl-tRNA, AA-tRNA) ตัวใหม่นี้ต้องจับกับ GTP และโปรตีนตัวหนึ่งก่อนคือ elongation factor T (EF-T) EF-T ประกอบด้วย 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



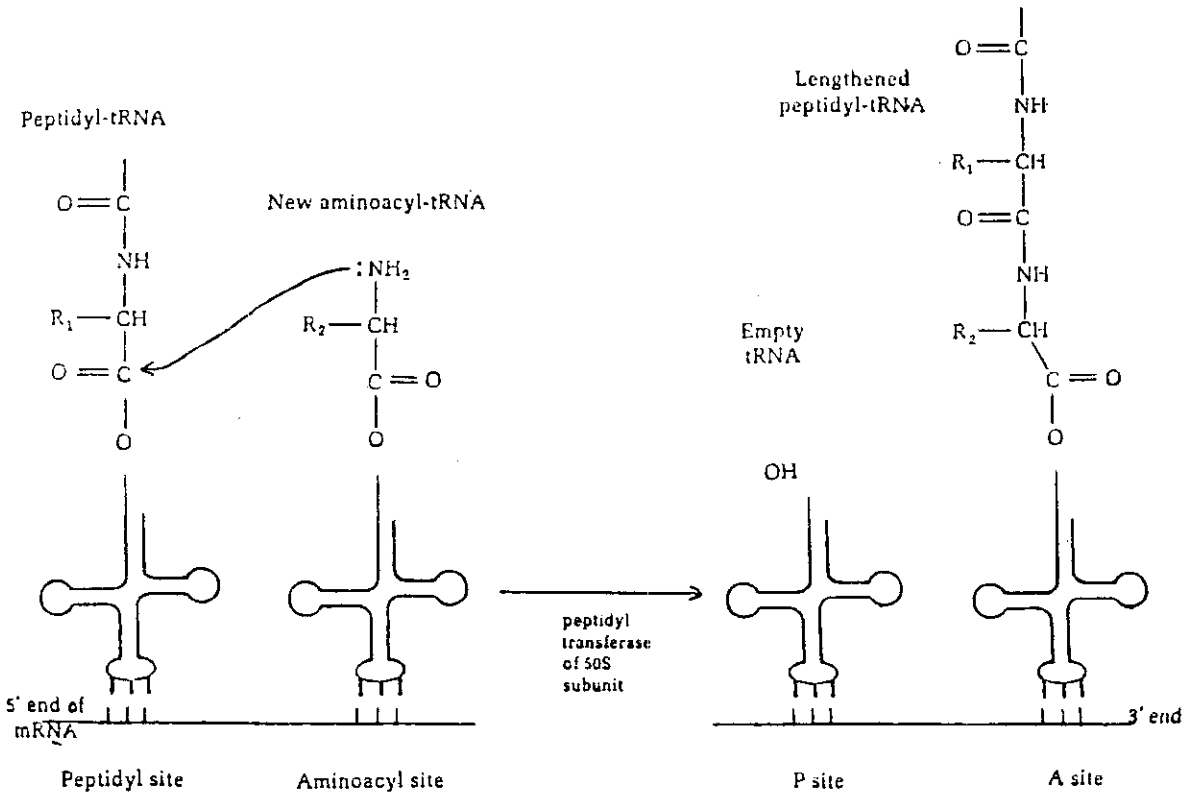
GTP - EFT_u - AAtRNA คอมเพล็กซ์จะเข้าไปวางตัวที่ A site ของไรโบโซมโดยใช้พลังงานจากการสลาย GTP แล้ว GDP จะหลุดออกจากไรโบโซมในรูปของ EFT_u - GDP



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



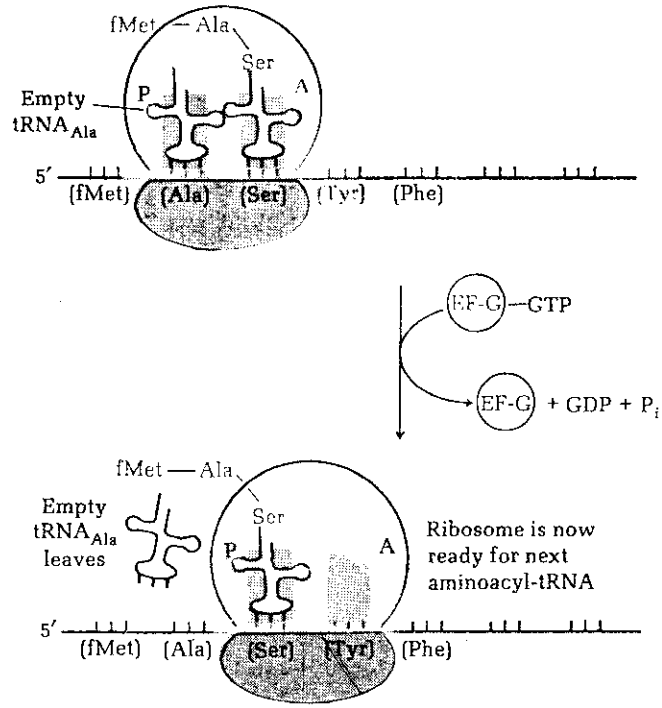
การสร้างพันธะเปปไทด์เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ซึ่งอยู่ในหน่วยย่อย 50S ไรโบโซม โดยจะเกิดปฏิกริยา nucleophilic attack ระหว่างหมู่อมิโนของ AA-tRNA บน A site กับคาร์บอกซิลคาร์บอนตัวที่เกิดพันธะเอสเทอร์อยู่กับ tRNA บน P site (รูปที่ 4-3) การเกิดพันธะเปปไทด์นี้ไม่ต้องการใช้พลังงานจาก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



รูปที่ 4 – 3 กลไกการสร้างพันธะเปปไทด์ จากการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase

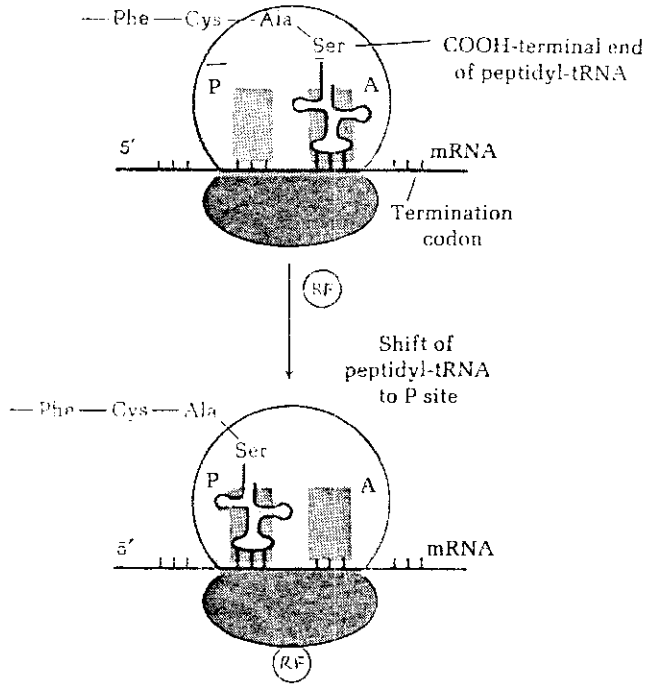
ค. หลังจากเกิดพันธะเปปไทด์แล้ว ก็จะมาถึงขั้นตอนของการย้ายที่ (translocation) ซึ่งต้องการโปรตีนตัวหนึ่งคือ EF - G และ GTP โดย GTP จะรวมตัวกับ EF - G ได้เป็นคอมเพล็กซ์แล้วจึงเข้าไปจับที่ไรโบโซม จากนั้น GTP จะถูกไฮโดรไลซ์ทำให้ได้พลังงานสำหรับการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (conformational change) ซึ่งจะเคลื่อนไรโบโซมไปยังรหัสถัดไปทางปลาย 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

CM 352 137

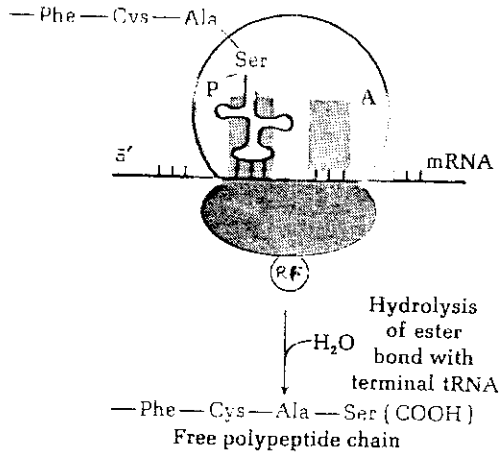


การหยุดสร้างสายโพลีเปปไทด์

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

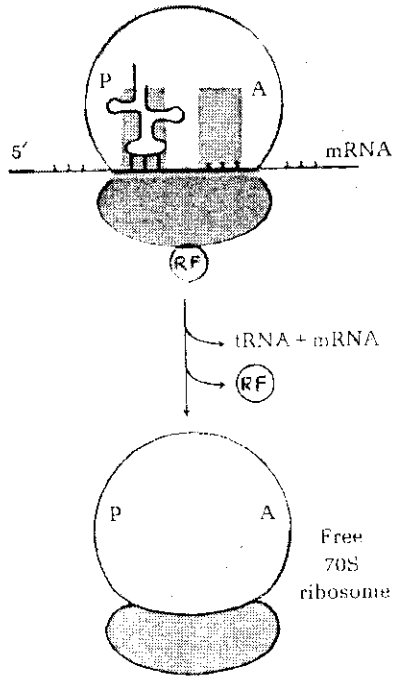


จากนั้นพันธะเอสเทอร์ระหว่างสายโพลีเปปไทด์และ tRNA ตัวสุดท้ายก็จะถูกไฮโดรไลซ์ออกด้วยเอนไซม์ peptidyl transferase ซึ่งความเฉพาะเจาะจงและความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตัวนี้ในขณะนี้ได้เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากอิทธิพลของโปรตีนปลดปล่อยที่จับอยู่ที่ไรโบโซม

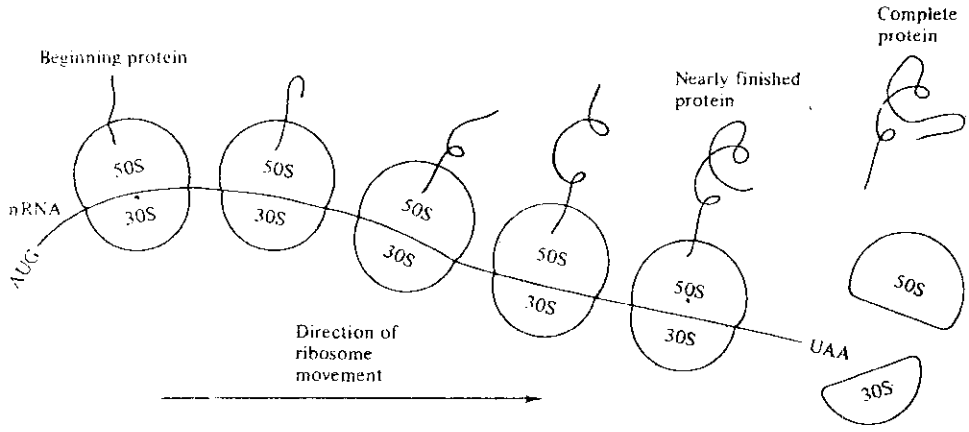


เมื่อสายโพลีเปปไทด์ถูกปล่อยออกเป็นอิสระแล้ว ต่อไป tRNA ตัวสุดท้ายและ mRNA รวมทั้งโปรตีนปลดปล่อยก็จะหลุดออกไปด้วย ทำให้ได้ 70 S ไรโบโซม ซึ่งพร้อมที่จะแยกตัว

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

CM 352 141

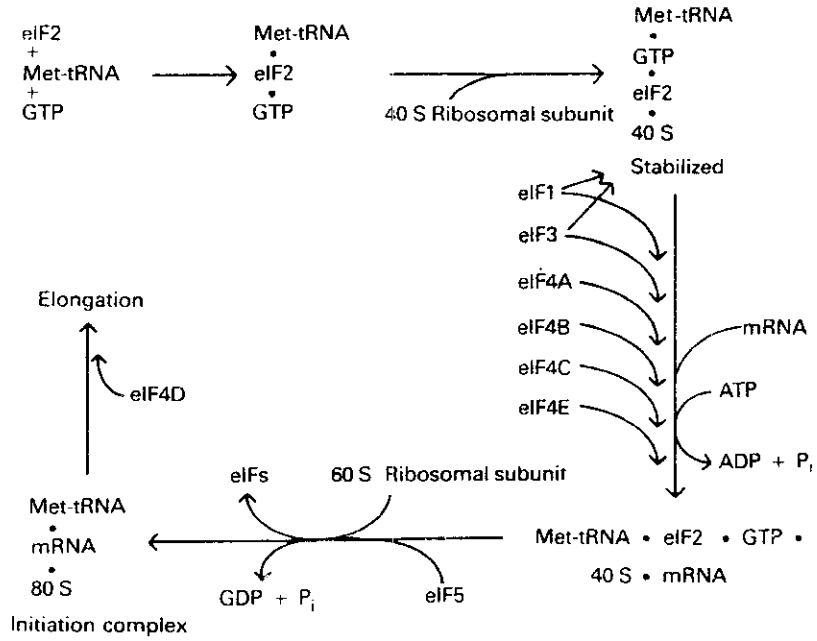
เมไธโอนีน และหน่วยย่อยของไรโบโซมที่ใช้ในขั้นตอนต้น ๆ ของการเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์ ก็จะเป็น 40S สำหรับในขั้นตอนการต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไปนั้น พบว่าโปรตีนพิเศษที่ใช้ในกรณีของยูคาริโอทคือ EF-1 และ EF-2 ส่วนในขั้นตอนการหยุดสร้างสายโพลีเปปไทด์ จะใช้แฟคเตอร์ปลดปล่อยเพียงตัวเดียว คือ RF-1 ซึ่งจะเฉพาะเจาะจงกับรหัสหยุดทั้ง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

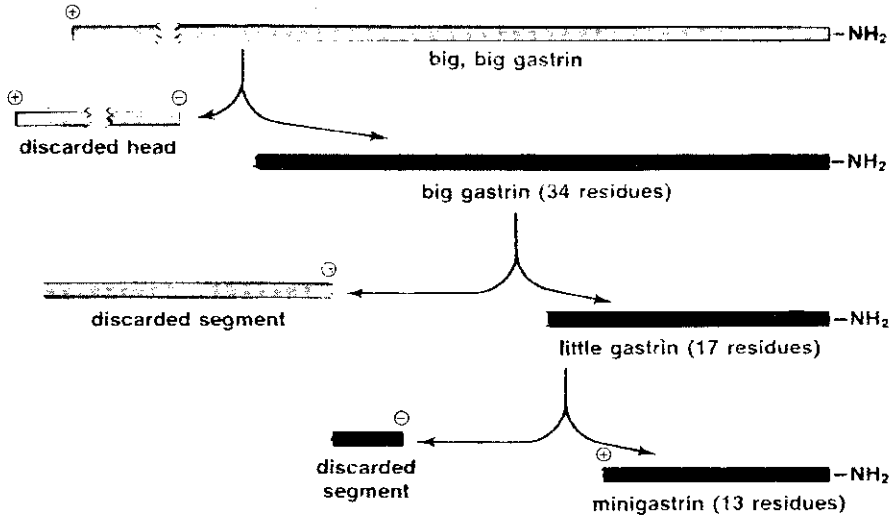
การดัดแปลงโปรตีนซึ่งได้จากทรานสเลชั่น

ในทำนองเดียวกับทรานสคริปชั่น สายของโพลีเปปไทด์ที่ได้จากทรานสเลชั่นนี้ มักจะไม่ใช่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่จะถูกนำไปใช้ได้ทันที แต่จะต้องถูกดัดแปลงเสียก่อน ซึ่งทำได้หลายวิธีคือ

1. ในกรณีของแบคทีเรีย หมู่ฟอร์มิลที่ปลายอมิโนของสายโปรตีนจะถูกไฮโดรไลซ์ออกด้วยเอนไซม์ deformylase และกรดอมิโนอีก 1 หรือหลายตัวทางปลายนี้ก็สามารถที่จะถูกตัดทิ้งได้ด้วยเอนไซม์ aminopeptidase

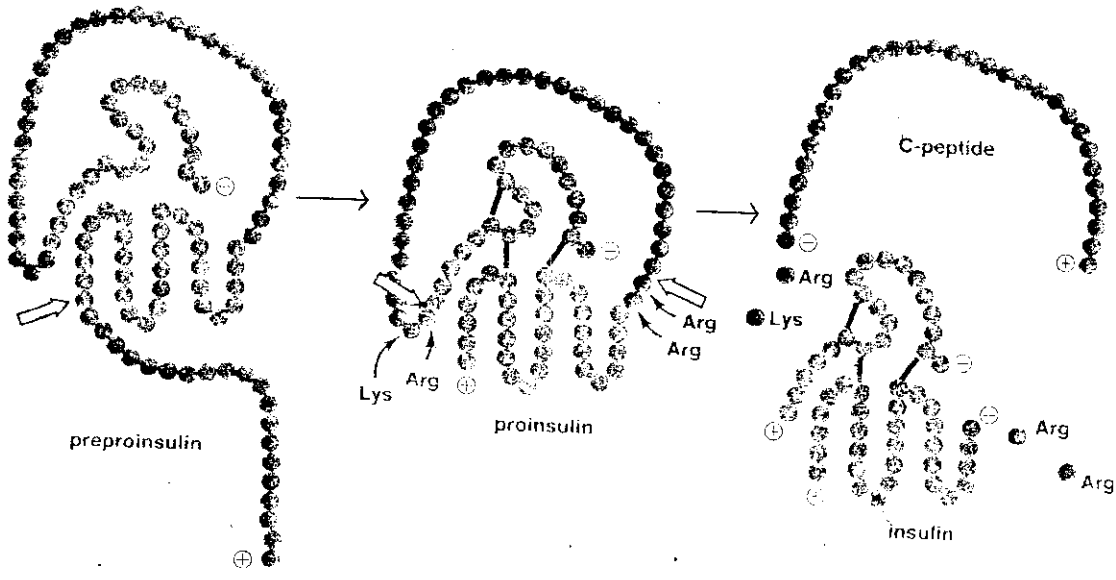
2. การดัดแปลงโดยไฮโดรไลซ์เอาบางส่วนของสายโพลีเปปไทด์ออก (partial hydrolysis) เช่นในกรณีของแกสตริน (gastrins) ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์ฮอร์โมนที่ช่วยเร่งการปล่อยกรดออก

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

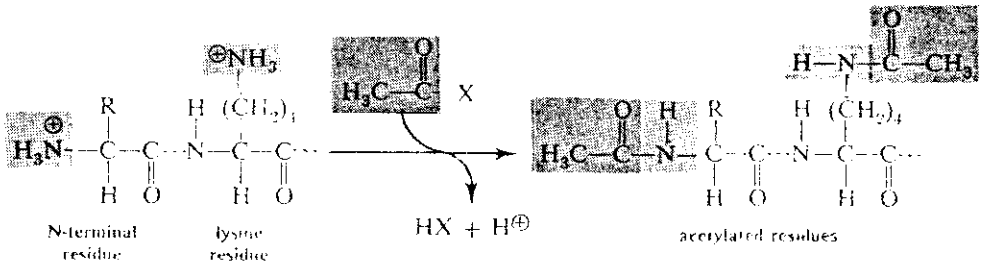
3. การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ การดัดแปลงวิธีนี้จะเกิดในโปรตีนที่มีซิสเตอีนหลายโมเลกุลเป็นส่วนประกอบ ตัวอย่างเช่นอินสุลิน (insulin) ซึ่งขณะที่ได้ออกมาจากทรานสเลชั่นนั้นจะอยู่ในรูปของพรีโพรอินสุลิน (preproinsulin) อันเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (รูปที่ 4 - 7) จากนั้นจะมีการตัดกรดอมิโนออก 23 ตัวได้โพรอินสุลิน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



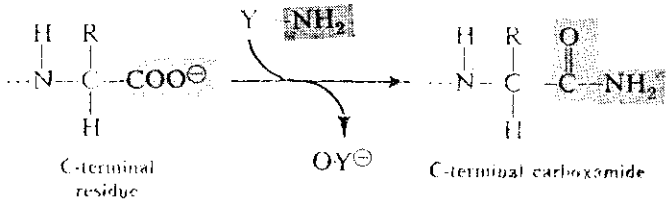
รูปที่ 4 – 7 การเกิดอินสุลินจากพรีโพรอินสุลิน

4. การเปลี่ยนแปลงประจุบนสายโพลีเปปไทด์ การดัดแปลงชนิดนี้คาดว่าจะมีประโยชน์ในบางกรณีเช่น เพื่อความสะดวกในการขนส่งโปรตีน หรือเพื่อให้โปรตีนสามารถรวมตัวกับโมเลกุลอื่น ๆ ได้ การเปลี่ยนแปลงประจุมี 2 แบบย่อยคือ

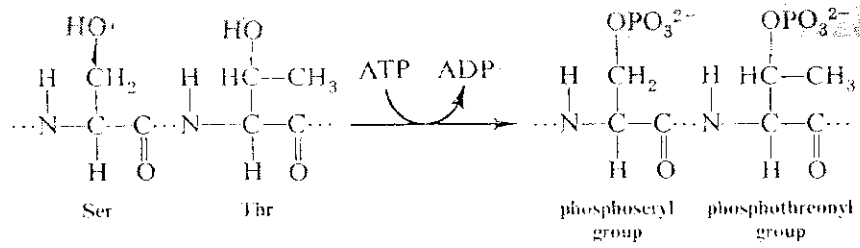
ก. การสูญเสียประจุไป ทำได้โดยเติมหมู่อเซทิลให้กับหมู่แอมโมเนียมที่มีประจุในสายโพลีเปปไทด์



หรือเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลที่ปลายสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็น amide



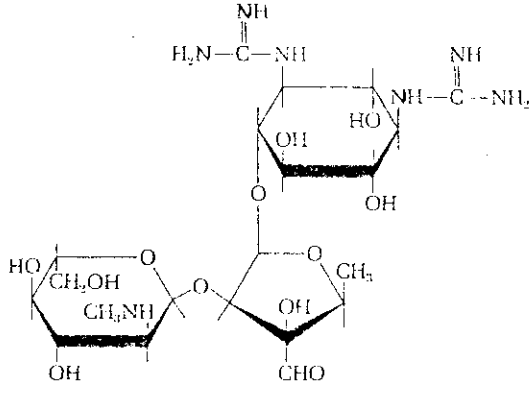
ข. การเติมประจุเข้ามาในสายโปรตีน เช่นเติมหมู่ฟอสเฟทให้กับซีรีนหรือธรีโอนีน เป็นต้น



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

ตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

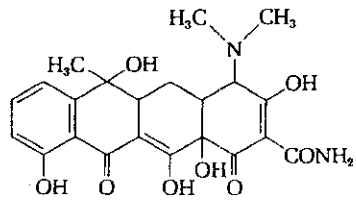
1. **สเตรปโตมัยซิน (streptomycin)** เป็นยาปฏิชีวนะที่จะเข้าไปแทรกแซงการวางตัวของ fMet - tRNA บนไรโบโซม ดังนั้นจึงยับยั้งขั้นตอนการเริ่มต้นสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการอ่านรหัสบน mRNA ผิดไปด้วย เช่นถ้ารหัสบน mRNA เป็น UUU ไอโซลิวซีน (รหัส AUU) จะถูกนำมาที่ไรโบโซมแทนที่จะเป็นเฟนิลอลานีน (รหัส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



Streptomycin

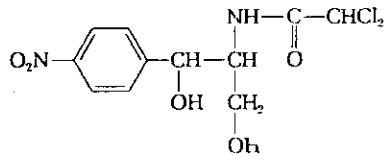
2. **เตตราซัยคลิน (tetracyclines)** จะจับกับส่วน 30S ไรโบโซมของโปรคาริโอท และยับยั้งการเข้ามาวางตัวของ AA - tRNA ตัวใหม่ที่ A site ในขั้นตอนย่อยอันแรกของการต่อ

สายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป



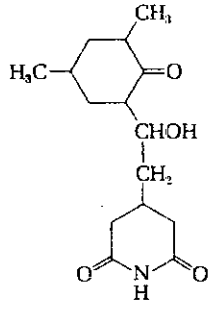
Tetracycline

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



Chloramphenicol

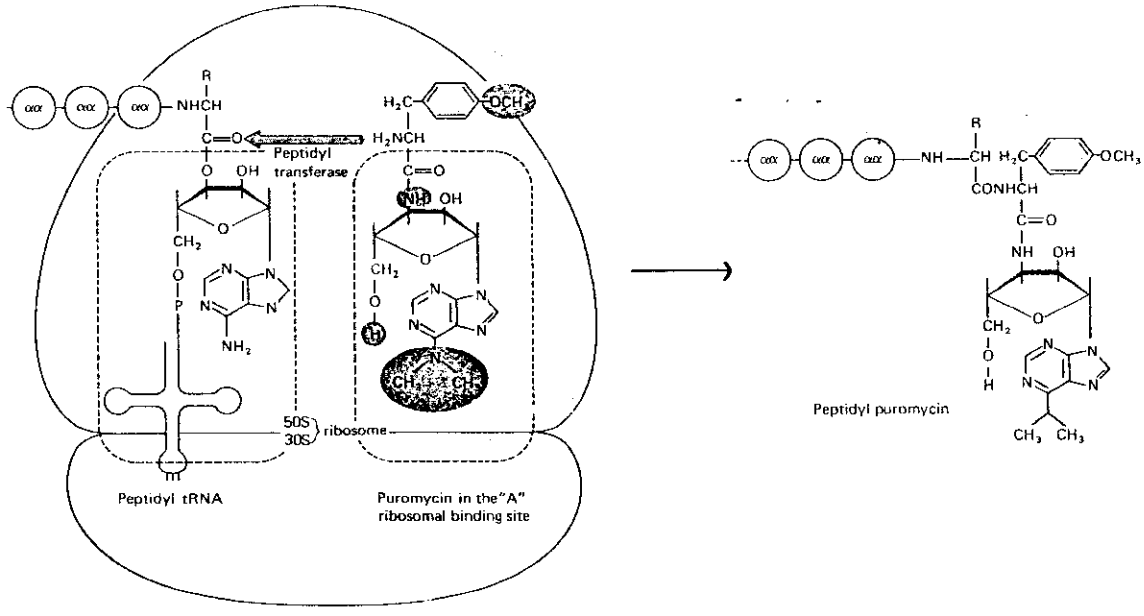
(4) **ไซโคลเฮกซิไมด์** (cycloheximide) จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ในส่วน 60S ไรโบโซมของยูคาริโอท



Cycloheximide

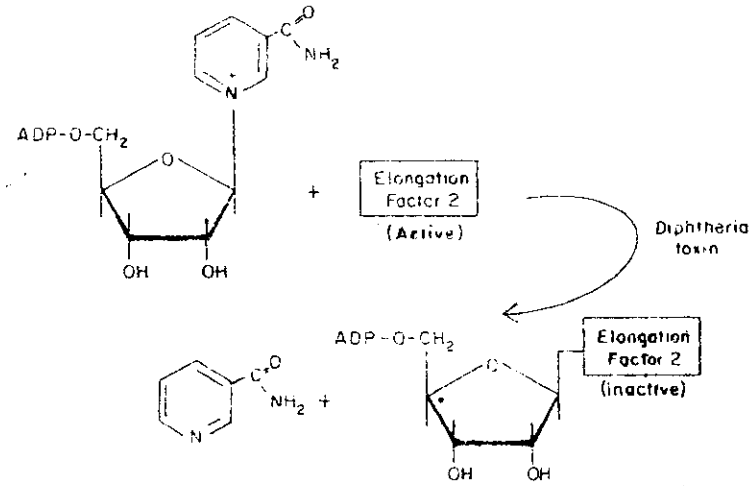
5. **เพียวโรมัยซิน** (puromycin) จะขัดขวางขั้นตอนการต่อสายโพลีเปปไทด์ให้ยาวออกไป โดยทำให้เกิดการหยุดสร้างสายโปรตีนก่อนที่จะถึงรหัสหยุดที่แท้จริง ทั้งนี้เพราะยาปฏิชีวนะตัวนี้มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ AA - tRNA ดังนั้นก็สามารถเข้าไปวางตัวที่ A site ของไรโบโซมได้ (รูปที่ 4 - 8) จากนั้นจะเกิดการสร้างพันธะเปปไทด์ได้สายของโปรตีนมาต่ออยู่กับ

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

สรุปเนื้อหาสาระสำคัญ

ทรานสเลชั่น คือ การแปลข้อความจาก mRNA ออกเป็นสายโพลีเปปไทด์ อันเป็นขั้นตอนสุดท้าย ของขบวนการส่งผ่านข้อความทางพันธุกรรม การที่จะเกิดทรานสเลชั่นอย่างแน่แท้เที่ยงตรง จะต้องอาศัยการทำงานของ RNA และ โปรตีนหลายชนิด อันได้แก่ tRNA, mRNA, rRNA, ribosomal proteins ตลอดจน initiation factor และ elongation factor ทั้งหลาย

tRNA จะทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวกลางระหว่าง mRNA และโปรตีน กล่าวคือ tRNA แต่ละตัวจะทำปฏิกริยากับกรดอมิโนที่เฉพาะเจาะจง แล้วนำกรดอมิโนมายังโคดอนบน mRNA ที่เข้าคู่กับแอนไทโคดอนของ tRNA และเมื่อกรดอมิโนตัวต่อไปถูกนำมายังโคดอนถัดไป ด้วยวิธีการเดียวกัน เอนไซม์ peptidyl transferase ก็จะสร้างพันธะเปปไทด์เชื่อมต่อกรดอมิโนทั้งสองนั้น ในที่สุด ก็จะได้สายโพลีเปปไทด์ที่ยาวขึ้นเรื่อยๆ

การเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์บน mRNA ที่จะเป็นตัวกำหนดการเรียงลำดับของกรดอมิโนในสายเปปไทด์นั้น เราเรียกว่า รหัสพันธุกรรม ซึ่งลักษณะทั่วๆไปก็คือ รหัสจะเป็นสากล, ไม่คาบเกี่ยว และแปลต่อเนื่องกันไป รหัสพันธุกรรมแต่ละรหัส ประกอบขึ้นจากนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว ซึ่งถ้าเราทราบนิวคลีโอไทด์เพียง 2 ตัวแรก (ทางปลาย $5'$)ก็เพียงพอที่จะบอกได้แล้วว่า รหัสนี้สัมพันธ์กับกรดอมิโนตัวใด นอกจากนี้ ยังมีโคดอนพิเศษที่เป็นรหัสเริ่มต้น และรหัสหยุดด้วย

การที่รหัสตัวที่ 3 ของโคดอนนับจากปลาย $5'$ (หรือคือตัวที่ 1 ทางปลาย $3'$) ไม่ค่อยมีความเฉพาะเจาะจง ในการจับคู่กับแอนไทโคดอน ทำให้เราเรียกตำแหน่งที่ 1 ทางปลาย $5'$ ของแอนไทโคดอนว่า ตำแหน่ง wobble ซึ่งเบสบางตัวเมื่อมาอยู่ที่ตำแหน่งนี้แล้ว จะประพฤติตัวเป็น wobble base คือจะจับได้กับเบสอื่นมากกว่า 1 ตัวขึ้นไป ตัวอย่างเช่น wobble base G จะจับคู่กับเบสตัวแรกทางปลาย $3'$ บนโคดอนที่เป็น C หรือ U ก็ได้ สมมติฐานที่อธิบายเหตุการณ์ดังกล่าวนี้ก็คือ สมมติฐาน wobble

ดังที่กล่าวแล้วว่า ความเที่ยงตรงของทรานสเลชั่นจะเกิดได้ต้องอาศัยการทำงานของสารหลายๆชนิด หนึ่งในจำนวนนั้นได้แก่เอนไซม์ aminoacyl-tRNA synthetase ซึ่งคะตะไลซ์ปฏิกริยาการเชื่อมต่อกรดอมิโน เข้าที่ปลาย 3' ของ tRNA ความแม่นยำในการจับคู่กรดอมิโนเข้ากับ tRNA ที่ถูกต้อง จะเป็นประเด็นหนึ่งในการทำให้ทรานสเลชั่นดำเนินไปอย่างไม่ผิดพลาด

ไรโบโซม จะเป็นสถานที่เกิดขบวนการทรานสเลชั่น ไรโบโซมประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย 2 ส่วน โดยในโปรคาริโอทจะพบ 70S ไรโบโซม ซึ่งประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย 30Sและ50S และในยูคาริโอทจะพบ 80S ไรโบโซมซึ่งประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย 40S และ60S ในไรโบโซมจะมีบริเวณที่ให้ aminoacyl-tRNA มาจับตัว 2 ที่ด้วยกันคือ P site และ A site, P site จะเป็นสถานที่ที่ peptidyl-tRNA จับตัวอยู่ ส่วน A site จะเป็นสถานที่ให้ aminoacyl-tRNA นำกรดอมิโนตัวใหม่เข้ามา เพื่อจะต่อกับสายเปปไทด์บน P site ให้ยาวขึ้นไปอีกเรื่อยๆ

ขบวนการทรานสเลชั่นที่เกิดขึ้นที่ไรโบโซม แบ่งได้เป็น 3 ขั้น คือ ขั้นตอนเริ่มต้น, ต่อสายให้ยาวออกไป และขั้นตอนสิ้นสุดขบวนการ ในขั้นตอนเริ่มต้นจะมีการสร้าง initiation complex ซึ่งประกอบด้วย aminoacyl-tRNA ตัวแรก, แม่พิมพ์ mRNA, หน่วยย่อยเล็กของไรโบโซม และ แฟคเตอร์เริ่มต้นทั้งหลาย โดยในโปรคาริโอทนั้น โคดอนเริ่มต้นทรานสเลชั่นจะอยู่ถัดมาจากบริเวณที่เรียกว่า Shine-Dalgarno sequence

ขั้นตอนต่อสายเปปไทด์ให้ยาวออกไป ประกอบขึ้นจาก 3 ขั้นตอนย่อย คือ (i) การวางตัวของ aminoacyl-tRNA ตัวใหม่บนA site (ii) การสร้างพันธะเปปไทด์ และ (iii)การเคลื่อนที่ (translocation) ของไรโบโซมบน mRNA ไปยังโคดอนตัวถัดไป สำหรับขั้นตอนสิ้นสุดการสร้างสายเปปไทด์ จะมีแฟคเตอร์ปลดปล่อยเข้ามาช่วย โดยแฟคเตอร์นี้จะเข้าจับกับไรโบโซม แล้วทำให้เกิดการตัดพันธะเอสเทอร์ ระหว่างสายโพลีเปปไทด์และ tRNA ตัวสุดท้าย ทำให้ได้โพลีเปปไทด์ใหม่ 1 สาย ซึ่งจะต้องถูกดัดแปลงเสียก่อน โดยอาจจะมีการตัดสายให้สั้นลง หรือสร้างพันธะไดซัลไฟด์ หรือเปลี่ยนแปลงประจุบนสาย ตลอดจนเติมหมู่ต่างๆ เช่น โคแฟคเตอร์, โคเอนไซม์ เข้าไปในสาย จากนี้แล้วจึงจะนำไปใช้งานต่อไปได้

คำถามท้ายบท

1. เมื่อกล่าวถึง 30S, 50S, 60S ไรโบโซม ตัว S หมายถึงอะไร
2. ไรโบโซมเป็นโมเลกุลชนิดใด
3. จงบอกหน้าที่ของ IF-3
4. ในยูคาริโอท เมื่อใดที่หน่วยย่อย 60S และ 40S ไรโบโซมจะเข้ารวมตัวกัน
5. สารใดที่เป็นตัวให้พลังงาน ในการจับกรดอมิโนเข้าต่อกับ tRNA
6. mRNA สายหนึ่ง มีโคดอนที่เข้าคู่กับกรดอมิโนได้ทุกโคดอน อย่างละ 1 โคดอน อยู่บนสาย (คือไม่มีโคดอนที่เป็นรหัสหยุดปนอยู่เลย) ถ้าไม่มีปรากฏการณ์ wobble เกิดขึ้น ถามว่า ในการแปลข้อความบนสาย mRNA นี้ ออกเป็นสายโพลีเปปไทด์ จะต้องใช้ tRNA อย่างน้อยที่สุดจำนวนกี่ชนิด ในการจับกรดอมิโนมาที่โคดอนเหล่านี้? เพราะเหตุใด?
7. นอกจากเปปไทด์และโปรตีนแล้ว ยังมีสารชนิดใดอีกบ้าง ที่ในขณะที่สังเคราะห์ออกมาใหม่นั้น จะอยู่ในรูปที่ยังนำไปใช้งานไม่ได้ จนกว่าจะต้องถูกดัดแปลงเสียก่อน
8. จงอธิบายการวางตัวของ mRNA บนหน่วยย่อย 30S ไรโบโซม
9. ในขบวนการทรานสเลชั่น ไรโบโซมจะเคลื่อนที่ไปบน mRNA จากปลาย $5' \rightarrow 3'$ ในขณะที่ไรโบโซมนี้ยังอ่าน mRNA ไปไม่จบ เป็นไปได้หรือไม่ว่าจะมีการเริ่มต้นสร้างสายโพลีเปปไทด์อีกสายหนึ่งขึ้นมาในเวลาไล่เลี่ยกัน
10. ถ้าท่านดูในตารางแสดงรหัสพันธุกรรม จะพบว่า ไม่มีโคดอนสำหรับไฮดรอกซีโพรลีนและไฮดรอกซีไลซีน ทั้งๆที่กรดอมิโนทั้งสองนี้ ก็พบเป็นส่วนประกอบในโปรตีนบางชนิด ทำไมจึงเป็นเช่นนั้น
11. จงเขียนการเรียงลำดับของกรดอมิโน ที่จะได้จากแม่พิมพ์ mRNA ที่มีรหัสพันธุกรรมดังต่อไปนี้

UAAUAGUGAUAA

12. จากการเรียงลำดับของเบสบน mRNA เป็น AAUUAUGUUUCCAUGUCCACCU จงหาจุดเริ่มต้นที่เป็นไปได้ของขบวนการทรานสเลชั่น จำนวน 2 จุด
13. ทำไม tRNA ทุกตัวจึงต้องมีขนาดของรูปร่างภายนอกเหมือนๆกันทั้งหมด
14. เป็นไปได้หรือไม่ที่จะมี tRNA เพียงชนิดเดียว ที่ใช้สำหรับจับกรดอมิโนลิวซีน? เพราะเหตุใด?
15. leader sequence ของโปรคาริโอติค mRNA คืออะไร
16. ในการต่อกรดอมิโนแต่ละตัวเข้าไปในสายเปปไทด์ จะต้องใช้พลังงานมากน้อยเท่าใด (ให้ตอบในรูปของการสลาย high-energy phosphate bond)
17. ในขั้นตอน translocation, peptidyl-tRNA จะต้องเลื่อนจาก A site มาอยู่ที่ P site ของไรโบโซม จงอธิบายว่า จะเกิดอะไรขึ้นกับปฏิกิริยาระหว่างโคดอนกับแอนไทโคดอนของ peptidyl-tRNA นั้น
18. ถ้าไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยกรดที่อุณหภูมิสูงๆ โปรตีนจะถูกย่อยสลายออกเป็นกรดอมิโนชนิดต่างๆ โดยทั่วไปแล้วมักจะพบซิสตีนเป็นหนึ่งในจำนวนเหล่านั้นด้วย ทั้งๆที่ซิสตีนเป็นกรดอมิโนที่ไม่มีรหัสพันธุกรรมของตัวเองเลย ทำไมจึงเป็นเช่นนั้น จงอธิบาย
19. ในโปรคาริโอท ทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นจะเกิดควบคู่กันไปได้ ถามว่าในยูคาริโอท ขบวนการทั้งสองจะเกิดควบคู่กันไปได้ด้วยหรือไม่
20. เพียวโรมัยซินยับยั้งทรานสเลชั่นในโปรคาริโอทหรือยูคาริโอท? อธิบายเหตุผลประกอบด้วย
21. จงอธิบายว่าทำไมเมื่อใช้คลอแรมเฟนิคอลเป็นยาปฏิชีวนะสำหรับยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์แล้ว สัตว์นั้นจะได้รับผลข้างเคียงด้วย

คำถามข้อ 22-25 ให้เลือกข้อย่อยที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อย่อยเดียว

22. ในการสังเคราะห์โปรตีน
    ก. กรดอมิโนแต่ละตัวจะเข้าคู่กับโคดอนของตัวเองบน mRNA ได้ เนื่องมาจากความเฉพาะเจาะจงของโครงสร้างของกรดอมิโนนั้น
    ข. DNA ในไรโบโซม จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดความเที่ยงตรงในขบวนการทรานสเลชั่น
    ค. กรดอมิโนแต่ละตัว จะจับกับแอนไทโคดอนที่เฉพาะเจาะจงกับกรดอมิโน

ชนิดนั้นๆ

ง. คู่ของโคดอนและแอนไทโคดอนที่จับกัน จะต้องมีการเรียงลำดับของเบสเหมือนกันทุกประการ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความผิดพลาดในขบวนการทรานสเลชั่น

จ. กรดอมิโนแต่ละตัวจะเข้าคู่กับโคดอนของตัวเองได้ โดยผ่านทางแอนไทโคดอนที่อยู่บน tRNA ที่เฉพาะเจาะจง

23. แต่ละโคดอนประกอบขึ้นจาก

ก. aminoacyl-tRNA 1 โมเลกุล

ข. คู่เบสที่เข้าคู่กันจำนวน 2 คู่

ค. เบส 3 ตัวที่เรียงกันอยู่

ง. ไรโบโซมอิสระ 1 ไรโบโซม

จ. นิวคลีโอไทด์อิสระ 4 โมเลกุล

24. tRNA ทุกตัวจะมี

ก. CCA ที่ปลาย $3'$

ข. CCA ที่ปลาย $5'$

ค. 7-methyl-G ที่ปลาย $3'$

ง. 7-methyl-G ที่ปลาย $5'$

จ. poly A ที่ปลาย $3'$

25. อัลฟาอะมานิทินเป็นรีเอเจนท์ที่มีประโยชน์ในการศึกษาทางชีววิทยาของเซลล์ เนื่องมาจากว่า สารนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์

ก. DNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

ข. DNA ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase

ค. r RNA ง. mRNA จ. โปรตีนในไมโตคอนเดรีย

ข้อ 26-30 ให้เลือกข้อย่อยต่อไปนี้เพียงข้อเดียวไปเป็นคำตอบ

ก. การเกิดคอมเพล็กซ์เริ่มต้น

ข. การเกิด aminoacyl-tRNA

ค. การปลดปล่อยสายโพลีเปปไทด์

ง. การเกิดพันธะเปปไทด์

จ. การรวมตัวกันของหน่วยย่อยทั้ง 2 ของไรโบโซม

26. ขั้นแรกของทรานสเลชั่น ได้แก่.....

27. ขั้นที่สองของทรานสเลชั่น ได้แก่.....

28. ขั้นที่สามของทรานสเลชั่น ได้แก่.....

29. ขั้นที่สี่ของทรานสเลชั่น ได้แก่.....

30. ขั้นที่ห้าของทรานสเลชั่น ได้แก่.....

ข้อ 31-35 ให้เลือกข้อย่อยต่อไปนี้เพียงข้อเดียวไปเป็นคำตอบ

ก. เพียวโรมัยซิน

ข. เตตราซัยคลิน

ค. สเตรปโตมัยซิน

ง. ไซโคลเฮกซิไมด์

จ. อีริทโธรมัยซิน

31. ยับยั้ง aminoacyl-tRNA (A) site ในไรโบโซมของแบคทีเรีย.....

32. จับกับ 60S ไรโบโซมของยูคาริโอท.....

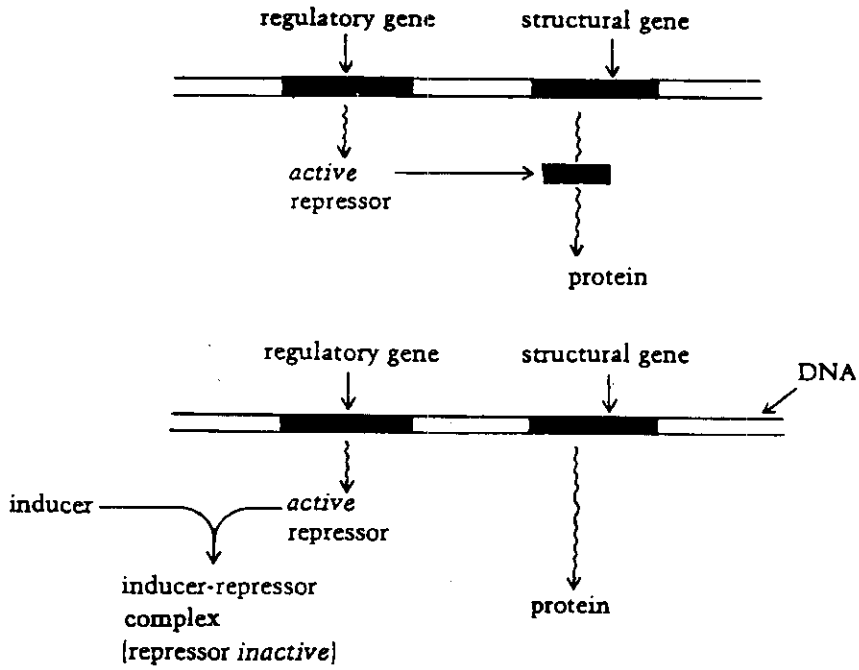
33. รบกวนการเกิดพันธะเปปไทด์ในแบคทีเรีย.....

34. จับกับ 30S ไรโบโซมของโปรคาริโอท.....

35. ทำให้เกิดการสิ้นสุดการสร้างสายเปปไทด์ก่อนจะถึงจุดสิ้นสุดที่แท้จริง.....

ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุข้อความทางพันธุกรรมสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ว่า จะทำงานภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม (regulatory gene, R หรือ i) โดยผ่านทางโปรตีนกดดัน (repressor protein) คือถ้าไม่มีตัวเหนี่ยวนำมาเกี่ยวข้อง โปรตีนกดดันที่ได้จากยีนควบคุมจะมีความว่องไว (active) สามารถไปขัดขวางการสร้างโปรตีนของยีนโครงสร้างได้ (รูปที่ 5 - 1) แต่ถ้าเมื่อไรที่มีตัวเหนี่ยวนำ ตัวเหนี่ยวนำนี้จะไปจับกับโปรตีนกดดัน ทำให้เกิดคอมเพล็กซ์ระหว่างสารทั้งสองขึ้น ทำให้โปรตีนกดดันหมดความว่องไว และไม่สามารถไปขัดขวางการทำงานของยีนโครงสร้างได้

จากการศึกษาต่อมาพบว่า โปรตีนกดดันในสภาวะที่มีความว่องไวนั้น จะทำงานโดยไปจับกับส่วนของ DNA ที่เรียกว่าบริเวณดำเนินการ (operator site, O) แล้วทำให้เอนไซม์ RNA โพลีเมอเรสไม่สามารถจับตัวที่บริเวณส่งเสริม (promoter site, P) ได้ รูปที่ 5-2 แสดงถึงการเรียงลำดับบน DNA ของบริเวณส่งเสริม บริเวณดำเนินการ และยีนโครงสร้าง ซึ่งทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า โอเปอรอน (operon) จะเห็นว่าส่วนทั้งสามในโอเปอรอนจะเรียงลำดับอย่าง

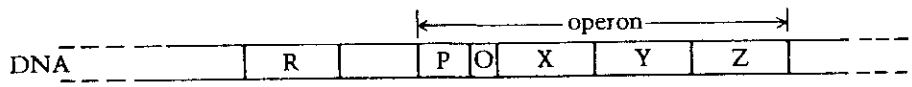


รูปที่ 5 – 1 การควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างโดยโปรตีนกดดัน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนควบคุม

ต่อเนื่องกันไป โดยในแต่ละโอเปอรอนสามารถที่จะมียีนโครงสร้างมากกว่าหนึ่งยีนได้ ส่วนยีน

CM 352 159

ควบคุมนั้นจะไม่อยู่ติดกับโอเปอรอนที่จะถูกควบคุม แต่จะอยู่ห่างออกไปอีกที่หนึ่งต่างหากบนสาย DNA นั้น โอเปอรอนประเภทที่มียีนโครงสร้างมากกว่า 1 ยีนนี้ เมื่อเกิดทรานสคริปชั่นจะได้สายของ mRNA ที่มีข้อความทางพันธุกรรมสำหรับโปรตีนหลายชนิด เรียก mRNA แบบนี้ว่า polycistronic mRNA



รูปที่ 5 – 2 รูปแสดงส่วนประกอบของโอเปอรอน

การควบคุมการทำงานของยีนในระดับทรานสคริปชั่นที่จะกล่าวถึงในที่นี้ มี 4 แบบด้วยกัน คือ การควบคุมแบบเนกาทีฟ (negative control) แบบโพซิทีฟ (positive control) แบบ attenuation และแบบเข้มงวด (stringent control)

การควบคุมแบบเนกาทีฟ

การควบคุมแบบนี้คือ ถ้ามีตัวควบคุมไปจับที่บริเวณดำเนินการ จะทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างเกิดไม่ได้ ตัวอย่างของการควบคุมแบบเนกาทีฟ ได้แก่

1. **การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์** (enzyme induction) ตัวอย่างที่จะยกในกรณีนี้ได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ 3 ตัวที่จะใช้ในการย่อยสลายและนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ประโยชน์ ซึ่งได้แก่เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำหน้าที่ย่อยสลายแลคโตสให้กลายเป็นกาแลคโตสและกลูโคส เอนไซม์กาแลคโตไซด์เพอมีเอส (galactoside permease) ทำหน้าที่ควบคุมอัตราเร็วของการขนส่งแลคโตสเข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ตัวสุดท้ายคือ กาแลคโต-ไซด์อเซทิลเลส (galactoside acetylase) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่

ปกติ E. coli จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานโดยไม่ต้องอาศัยแลคโตสด้วย ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสามที่กล่าวข้างต้นนั้นก็จะถูกสร้างขึ้นในเซลล์น้อยมากหรือแทบไม่มีเลย แต่ถ้าเปลี่ยนน้ำเลี้ยง

ยีน (gene) คือส่วนของ DNA ที่มีข้อความทางพันธุกรรมสำหรับสังเคราะห์โปรตีนแต่ละตัว เนื่องจากในเซลล์สิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนอยู่มากมายหลายชนิด และจำนวนของโปรตีนเหล่านั้นก็มากน้อยต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมการแสดงออก (expression) ของยีน ซึ่งก็คือควบคุมการทำงานของยีนในการสร้าง mRNA และโปรตีนแต่ละชนิดนั่นเอง การควบคุมนี้จะทำได้ที่สองระดับคือ ที่ระดับของการสังเคราะห์ RNA (transcriptional level) และที่ระดับของการสังเคราะห์โปรตีน (translational level) แต่การควบคุมที่ระดับทรานสคริปชั่นจะเกิดมากกว่าที่ระดับทรานสเลชั่น เพราะเป็นการประหยัดทั้งพลังงาน และวัสดุที่จะต้องสูญเสียไปในการสร้างผลิตภัณฑ์ซึ่งจะไม่ถูกใช้ต่อไป

การควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชั่นของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

ได้มีผู้ศึกษาถึงกลไกการควบคุมการทำงานของยีนคือ F.Jacob และ J.Monod โดยในปี ค.ศ. 1961 ทั้งสองท่านได้ตั้งทฤษฎีการเหนี่ยวนำและการกดดัน (induction - repression theory) ขึ้น สำหรับทฤษฎีการเหนี่ยวนำนั้น ใช้อธิบายวิธีการที่ E. coli ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (lactose) ให้เป็นกาแลคโตส (galactose) และกลูโคส (glucose) โดยเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β - galactosidase) เพื่อใช้เป็นแหล่งให้คาร์บอนและพลังงาน เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสนี้จะถูกสร้างขึ้นมาเฉพาะเมื่อมีแลคโตสอยู่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียเท่านั้น และเมื่อไม่มีแลคโตสแล้วก็จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ขึ้น ดังนั้นจึงเรียกเบต้ากาแลคโตซิเดสว่าเป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำ (inducible enzyme) และเรียกแลคโตสว่าตัวเหนี่ยวนำ (inducer)

Jacob และ Monod ยังได้อธิบายถึงการทำงานของยีนโครงสร้าง (structural gene)

บทที่ 5
การควบคุมการแสดงออกของยีน
(Regulation of Gene Expression)

วัตถุประสงค์ เมื่ออ่านบทนี้ตลอดจนทำแบบฝึกหัดแล้ว นักศึกษาจะต้อง

1. อธิบายได้ว่ายีนคืออะไร
2. ระบุได้ว่าการแสดงออกของยีนในโปรคาริโอทถูกควบคุมได้ที่ระดับใดบ้าง
3. แจกแจง และ อธิบายรูปแบบของการควบคุมการแสดงออกของยีนในโปรคาริโอทที่ระดับต่างๆได้
4. อธิบายความหมายของคำว่าโอเปอรอนได้
5. ระบุบทบาทของ cAMP และ CRP ที่มีต่อแลคโตสโอเปอรอนได้
6. อธิบายกลไกการควบคุมแบบ attenuation ที่พบใน trp operon ได้
7. ยกตัวอย่างการควบคุมการแสดงออกของยีน ที่เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ rRNA ได้
8. อธิบายโมเดลการควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอทได้

14. ข้อมูลใดที่ไม่พบในการควบคุมการแสดงออกของยูคาริโอทยีน

ก. ไม่มีโอเปอรอน

ข. รูปแบบหลักในการควบคุมจะเป็นแบบโพซิทีฟ

ค. มีฮอร์โมนเข้ามาเกี่ยวข้องในการควบคุม

ง. ยีนโครงสร้างจะไม่มาอยู่ต่อเนื่องกันบน DNA สายเดียวกัน

จ. sensor gene จะอยู่หน้ายีนโครงสร้าง

15. β-galactosidase เป็น

ก. constitutive enzyme

ข. repressible enzyme

ค. inducible enzyme

ง. activator enzyme

จ. zymogen

16. การควบคุมการแสดงออกของยีนในข้อย่อยใดข้างล่างนี้ที่เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ rRNA

ก. attenuator

ข. การควบคุมแบบเนกาทีฟ

ค. การควบคุมแบบโพซิทีฟ

ง. stringent control

จ. Britten-Davidson model

ค. มีทริปโทเฟนไม่มากนักในเซลล์ ง. มีทริปโทเฟนเป็นจำนวนมากในเซลล์

จ. เซลล์มีทริปซินใช้อย่างเพียงพอ

9. ถ้าซับสเตรทของเอนไซม์ตัวใดกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวนั้นด้วย เราจะเรียกซับสเตรทนั้นว่าเป็น

ก. inducer ข. repressor ค. corepressor ง. activator จ. excitant

10. ความว่องไวของโปรตีนกดดันขึ้นอยู่กับว่า

ก. โปรตีนกดดันนั้นถูกวางตำแหน่งอยู่หน้าโอเปอรอนหรือไม่

ข. โปรตีนกดดันนั้นถูกวางตำแหน่งอยู่หน้าบริเวณส่งเสริมหรือไม่

ค. โปรตีนกดดันนั้นถูกวางตำแหน่งอยู่หน้าบริเวณดำเนินการหรือไม่

ง. มี RNA polymerase อยู่เพียงพอหรือไม่

จ. มีสารตัวสำคัญ (key substance) ของวิถีเมตาบอลิสมนั้นอยู่หรือไม่

11. ถ้าผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถีเมตาบอลิสม สามารถกระตุ้นโปรตีนกดดันของโอเปอรอนนั้น ให้สามารถผลิตเอนไซม์สำหรับใช้ในวิถีได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายตัวนั้นจะถูกเรียกว่า

ก. corepressor ข. operator ค. promoter ง. suppressor จ. regulator

12. cAMP จะจับตัวกับบริเวณใดได้

ก. ยีนควบคุม ข. ยีนโครงสร้าง

ค. บริเวณส่งเสริม ง. บริเวณดำเนินการ

จ. leader peptide

13. เราจะพบ attenuator อยู่ ณ บริเวณใด

ก. ในบริเวณส่งเสริม

ข. ระหว่างรหัสหยุดของบริเวณส่งเสริมกับจุดเริ่มต้นของบริเวณดำเนินการ

ค. ในบริเวณดำเนินการ

ง. ระหว่างรหัสหยุดสำหรับ leader peptide กับจุดเริ่มต้นของยีนโครงสร้างยีนแรก

จ. ในยีนโครงสร้างยีนแรก

คำถามท้ายบท

1. ความเสถียร (stability) ของ mRNA มีผลเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนอย่างไร
2. repressor และ corepressor แตกต่างกันอย่างไร
3. โอเปอรอนคืออะไร พบที่ไหน ประกอบขึ้นจากส่วนใดบ้าง และถูกควบคุมได้อย่างไร
4. จงบอกหน้าที่ของส่วนต่างๆในโอเปอรอน
5. การควบคุมแบบเนกาทีฟ และแบบโพซิทีฟ แตกต่างกันอย่างไร

คำถามจากข้อ 6-16 ให้เลือกข้อย่อยที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อย่อยเดียวเป็นคำตอบ

6. ปรากฏการณ์ในเรื่องของการเหนี่ยวนำและการกดดันการเกิดเอนไซม์ ทำให้เราทราบว่า
   ก. เอนไซม์ประจำจะตกอยู่ภายใต้อิทธิพลของตัวเหนี่ยวนำ
   ข. ยีนโครงสร้างและยีนควบคุมต่างก็อยู่บนสาย DNA
   ค. ในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดก็ตาม เอนไซม์ตัวนั้นจะมีตัวเหนี่ยวนำเฉพาะตัว ที่ช่วยเร่งขบวนการสังเคราะห์ให้เกิดเร็วขึ้น
   ง. ยีนโครงสร้างที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ จะถูกผลิตขึ้นมากน้อย ตามความต้องการของเซลล์นั้นๆ
   จ. การกดดันเอนไซม์จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน zymogen ให้กลายเป็นเอนไซม์ที่ว่องไว
7. แลคโตสโอเปอรอนจะเกิดทรานสคริปชั่นขึ้น เมื่อ
   ก. เซลล์ต้องการแลคโตส
   ข. เซลล์มีแลคโตสใช้อย่างเพียงพอ
   ค. เซลล์ต้องการกรดแลคติค
   ง. เซลล์มีกรดแลคติคใช้อย่างเพียงพอ
   จ. เซลล์ต้องการกลูโคส
8. ทริปโทเฟนโอเปอรอน จะถูกควบคุมในทางที่ตรงกันข้ามกับแลคโตสโอเปอรอน กล่าวคือ ทริปโทเฟนโอเปอรอนจะเกิดทรานสคริปชั่นขึ้นเมื่อ
   ก. เซลล์ต้องการทริปซิน
   ข. เซลล์มีทริปซิโนเจนใช้อย่างเพียงพอ

ว่าจะเป็นแบบใดนั้น ได้แก่ ระดับของกรดอมิโนตัวที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถี ตัวอย่างเช่น ถ้าเป็นการควบคุมแบบ attenuation ที่พบใน trp operon กรดอมิโนตัวที่จะเป็นตัวควบคุมโครงสร้างทุติยภูมิก็จะได้แก่ทริปโทเฟน (iv) การควบคุมแบบเข้มงวด (stringent control) เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ rRNA (ในขณะที่ทั้ง 3 ประเภทที่กล่าวมาแล้ว เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ทั้งสิ้น) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียขาดกรดอมิโนที่จะใช้ในขบวนการทรานสเลชั่น โดยในสภาวะของการขาดกรดอมิโนนี้ จะพบว่าแบคทีเรียจะสร้างนิวคลีโอไทด์พิเศษขึ้นมา 2 ชนิด คือ ppGpp และ pppGpp สำหรับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสเลชั่น จะทำได้โดย (i) ควบคุมการเริ่มต้นสร้างสายโปรตีน หรือ (ii) ควบคุมปริมาณโปรตีนโดยการหลุดของไรโบโซมออกจากสาย mRNA ก่อนที่จะถึงจุดสิ้นสุดทรานสเลชั่น

การควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอท ได้มีการศึกษาพบว่าจะเป็นการควบคุมแบบโพซิทีฟ, มีฮอร์โมนเป็นตัวควบคุม และไม่มีโอเปอรอน จากข้อมูลต่างๆ เหล่านี้ Roy Britten และ Eric Davidson จึงได้รวบรวมและสร้างเป็นสมมติฐาน Britten-Davidson ซึ่งอธิบายว่ายีนโครงสร้างแต่ละยีนจะแสดงออก(คือสร้างโปรตีน) ได้ ก็ต่อเมื่อจะต้องมีตัวควบคุมคือ activator protein มาจับที่บริเวณที่เรียกว่า receptor sequence ซึ่งอยู่หน้ายีนโครงสร้าง โดยที่ activator protein เกิดมาจากทรานสเลชั่นจาก integrator gene set ซึ่งจะทำงานได้ก็ต่อเมื่อจะต้องมีฮอร์โมน-รีเซปเทอร์คอมเพล็กซ์มาจับกับบริเวณที่เรียกว่า sensor gene ซึ่งอยู่หน้า integrator gene set อีกทอดหนึ่ง ดังนั้นจะเห็นว่า การควบคุมนี้จะเป็นลำดับขั้นตอนต่อๆกันมา แบบที่เรียกว่า cascading effect นั่นเอง

สรุปเนื้อหาสาระสำคัญ

ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการแสดงออกของยีน ก็คือโปรตีนและเอนไซม์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำงานและการคะตะไลซ์ปฏิกริยาต่างๆทั้งในโปรคาริโอทและยูคาริโอท ดังนั้นการผลิตโปรตีนและเอนไซม์จะต้องถูกควบคุมอย่างรัดกุม โดยถ้าเป็นในโปรคาริโอท จะควบคุมได้ที่ระดับทรานสคริปชั่นหรือระดับทรานสเลชั่น ส่วนในยูคาริโอทจะใช้ฮอร์โมนมาเป็นตัวควบคุมขบวนการสังเคราะห์โปรตีน

การควบคุมการแสดงออกของยีนในโปรคาริโอทนั้น ที่ระดับทรานสคริปชั่นจะสำคัญกว่าที่ระดับทรานสเลชั่น เพราะถ้าปริมาณโปรตีนและเอนไซม์ในเซลล์เพียงพอแล้ว โปรคาริโอทจะหยุดขบวนการทรานสคริปชั่นทันที เพื่อเป็นการประหยัดทั้งพลังงานและสารที่จะต้องใช้เป็นวัตถุดิบ สำหรับรูปแบบของการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชั่น แบ่งได้เป็น 4 รูปแบบด้วยกัน คือ (i) การควบคุมแบบเนกาทีฟ ซึ่งจะเกิดเมื่อมีตัวควบคุมไปจับที่บริเวณดำเนินการ แล้วทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างเกิดไม่ได้ ตัวอย่างได้แก่ การทำงานของแลคโตสโอเปอรอน เมื่อให้น้ำตาลแลคโตสเพียงตัวเดียวเพื่อเป็นแหล่งพลังงานของอีโคไล การควบคุมแบบนี้จะเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ และอีกตัวอย่างหนึ่งคือการทำงานของฮิสทีดีนโอเปอรอน ซึ่งจะเป็นการควบคุมแบบกดดันการสร้างเอนไซม์ (ii) การควบคุมแบบโพซิทีฟ จะเกิดเมื่อมีตัวควบคุมไปจับที่บริเวณส่งเสริมแล้วทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างเกิดได้มากขึ้น ตัวอย่างของการควบคุมประเภทนี้ได้แก่ catabolite repression ของแลคโตสโอเปอรอน ซึ่งจะมี cAMP อันเป็นนิวคลีโอไทด์วงปิดตัวหนึ่ง เข้ามาเกี่ยวข้องในการควบคุมด้วย และในกรณีนี้จะต้องมีทั้งน้ำตาลกลูโคสและแลคโตส ให้เป็นแหล่งพลังงานแก่อีโคไลในเวลาเดียวกัน (iii) การควบคุมแบบ attenuation ซึ่งพบในโอเปอรอนของอีโคไลที่มียีนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอมิโน หลักการของการควบคุมแบบนี้ คือ โครงสร้างทุติยภูมิของทรานสคริปชั่น ที่เป็นผลมาจากทรานสเลชั่นบริเวณ leader sequence จะเป็นตัวกำหนดว่า ทรานสคริปชั่นนั้นควรจะสิ้นสุดลงที่ปลาย leader sequence หรือดำเนินต่อไปจนถึงยีนโครงสร้างของโอเปอรอน โดยตัวที่จะควบคุมโครงสร้างทุติยภูมิ

ซึ่งควบคุมขบวนการทรานสคริปชั่นของกลุ่ม integrator genes (I^{α}) ที่อยู่บน DNA สายเดียวกับ sensor gene นั้น ทำให้เกิดการสร้างสาย RNA ชนิด polycistronic ขึ้นได้ สาย RNA จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ต่อไปในการสร้างโปรตีนควบคุมประเภทที่สอง คือ activator proteins จากนี้จะเข้าสู่ระดับที่สองของการควบคุม คือ activator protein จะเข้าทำปฏิกริยากับส่วนของ DNA ที่เรียกว่า receptor sequence ที่เฉพาะเจาะจง แล้วทำให้ยีนโครงสร้างทำงานได้ คือ เกิดการสร้างสาย RNA และโปรตีนขึ้น สำหรับการเรียกชื่อ activator protein (PA) ทำได้โดยใช้สัญญลักษณ์ 2 ตัว ตัวหนึ่งอยู่ทางบนขวา บอกถึงที่มาของโปรตีนนี้ว่าเกิดขึ้นมาจาก integrator gene กลุ่มไหน อีกตัวหนึ่งอยู่ทางล่างขวา ตัวนี้บอกว่า activator protein จะจับตัวกับ receptor sequence อันไหน ตัวอย่างเช่น PA_b^{α} ก็คือ activator protein ที่เกิดมาจาก integrator genes กลุ่ม I^{α} และจะจับตัวกับ receptor sequence R_b ซึ่งควบคุมการทำงานของยีนโครงสร้าง SG_2 และ SG_3 ถ้าจะสรุปจากรูป 5-11 เป็นข้อ ๆ แล้ว จะได้ดังนี้

1. effector แต่ละตัวจะรับผิดชอบเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนโครงสร้างมากกว่า 1 ตัว กล่าวคือ effector α ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง SG_1 ถึง SG_5 ในขณะที่ effector β ควบคุมการแสดงออกของ SG_2 ถึง SG_6

2. ยีนโครงสร้าง (SG_2 ถึง SG_5) อาจมีมากกว่า 1 receptor sequence เรียงกันอยู่ข้างหน้า ทำให้ยีนโครงสร้างตัวนั้นสามารถที่จะถูกกระตุ้นได้จาก effector หลายตัว

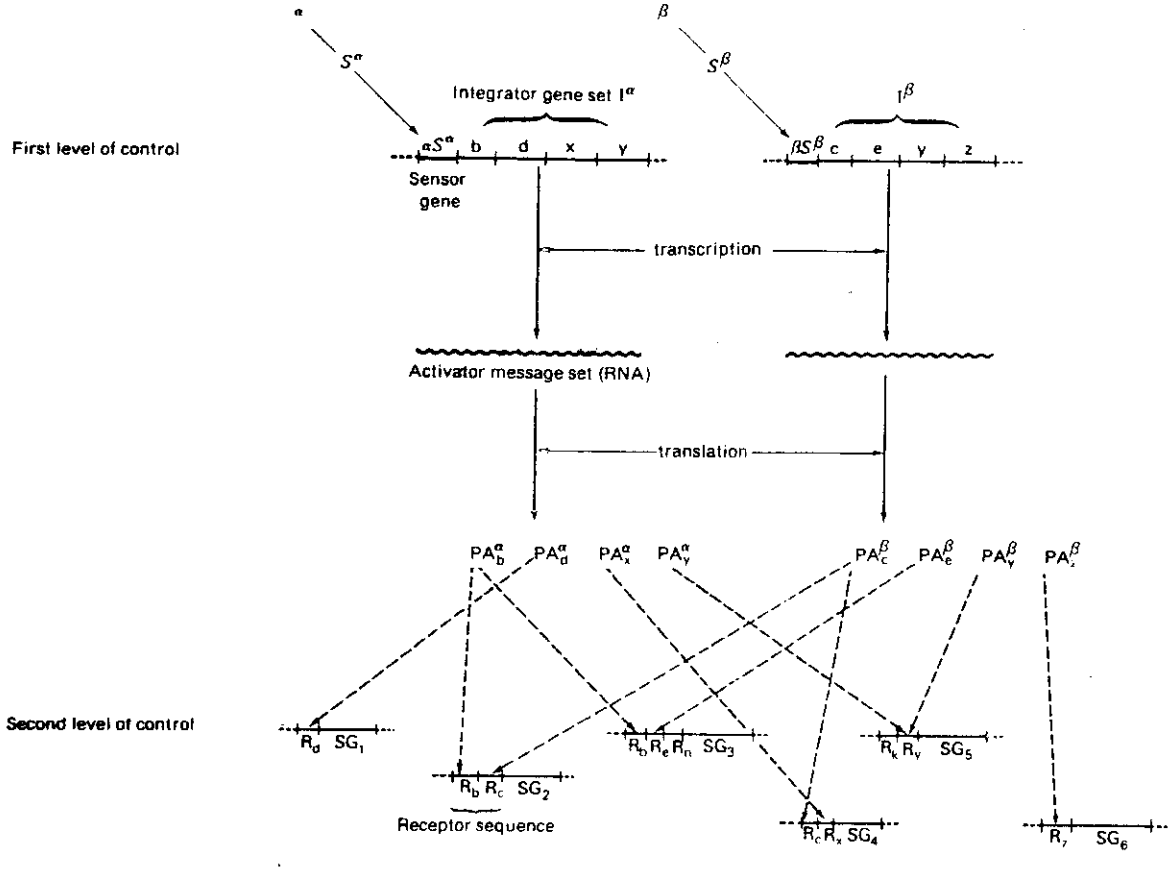
3. activator proteins ที่เกิดขึ้นมาจากทรานสคริปชั่นของ integrator gene กลุ่มที่ต่างกัน (PA_Y^{α} และ PA_Y^{β}) สามารถที่จะจับตัวกับ receptor sequence อันเดียวกันได้ (R_Y)

4. receptor sequence แต่ละอัน สามารถรวมตัวได้กับยีนโครงสร้างมากกว่า 1 ชนิด ตัวอย่างเช่น R_b จะรวมตัวได้กับ SG_2 และ SG_3

จากที่กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่า Britten-Davidson model เป็นรูปแบบของการควบคุมยีนโครงสร้างอย่างกว้าง ๆ ที่อธิบายถึงการที่ effector เพียงตัวเดียวสามารถทำให้เกิดผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน เป็นลำดับขั้นตอนต่อ ๆ กันมาได้ (cascading effect)

Britten-Davidson Model

สมมติฐานนี้ได้รวมเอาการควบคุมแบบโพซิทีฟ 2 ระบบเข้าด้วยกัน และต้องใช้โปรตีนควบคุม 2 ประเภท (รูปที่ 5-11) โดยที่ในระดับแรกของการควบคุมเกิดขึ้นเมื่อ effector (α) ซึ่งได้แก่ฮอร์โมน เข้าจับตัวกับโปรตีนควบคุมประเภทแรก คือ sensor protein (S^{α}) ซึ่งได้แก่รีเซปเทอร์โปรตีนที่อยู่ในไซโตปลาสม จากนั้นคอมเพล็กซ์ที่ได้จะไปกระตุ้น sensor gene



รูปที่ 5–11 แผนผัง Britten-Davidson model ที่ใช้อธิบายการควบคุมของยูคาริโอทยีน

ตัวย่อที่ใช้ในรูป : α และ β คือ effectors

S^{α} และ S^{β} คือ sensor proteins

PA คือ activator protein

SG คือ ยีนโครงสร้าง (structural gene)

การควบคุมในระดับนี้อาจทำได้โดย

1. ควบคุมการเริ่มต้นสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์

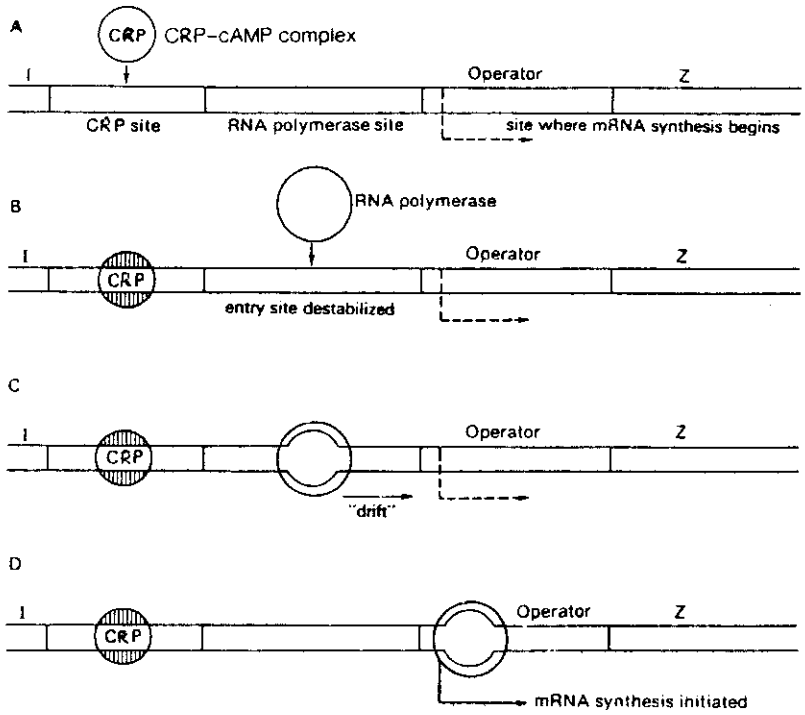
2. ควบคุมปริมาณของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่จะถูกสังเคราะห์ขึ้น ในบางโอเปอรอน ผลิตภัณฑ์ของยีนต่าง ๆ คือโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างชนิดกันนั้น ไม่จำเป็นที่จะต้องถูกสร้างขึ้นในจำนวนเท่า ๆ กัน ซึ่งการควบคุมปริมาณของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านี้ จะทำได้โดยการหลุด (drop) ของไรโบโซมออกจากสาย mRNA ก่อนที่ทรานสเลชั่นจะเสร็จสมบูรณ์ตลอดสายของ mRNA นั้น

การควบคุมการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

การแสดงออกของยูคาริโอทยีนศึกษาได้ยากกว่าใน E.coli ทั้งนี้เพราะโครโมโซมของยูคาริโอทมีความยาวและซับซ้อนมากกว่าในโปรคาริโอท คือจะมีโปรตีนพวกฮิสโตนรวมอยู่กับ DNA ด้วย และเมื่อศึกษาดูแล้วจะพบว่ารูปแบบของการควบคุมก็จะแตกต่างไปจากที่พบใน E.coli ตัวอย่างเช่น ในยูคาริโอทคิดว่าอาจไม่มีโอเปอรอน ซึ่งคือกลุ่มของยีนโครงสร้างที่มีความสัมพันธ์กันและมาอยู่ต่อเนื่องกัน เพื่อที่จะถูกควบคุมได้พร้อม ๆ กัน นอกจากนี้ยังพบว่า รูปแบบที่เป็นหลักของการควบคุมในยูคาริโอทจะเป็นแบบโพซิทีฟ โดยที่มักจะมีตัวควบคุมเพียงตัวเดียว ได้แก่สเตียรอยด์ฮอร์โมนเป็นตัวไปกระตุ้นให้ยีนโครงสร้างหลาย ๆ ชนิดทำงานในการสร้างโปรตีนได้

เมื่อมีข้อมูลเกี่ยวกับยูคาริโอทยีนและการควบคุมในระดับโมเลกุลบ้างเช่นนี้ Roy Britten และ Eric Davidson จึงได้สร้างสมมติฐานขึ้นเพื่ออธิบายถึงการแสดงออกของยูคาริโอทยีน ปรากฏว่าสมมติฐานของเขาได้เป็นที่ยอมรับในวงการวิจัยยีนสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่นเดียวกับที่สมมติฐานของ Jacob-Monod เป็นที่ตื่นเต้นแก่วงการวิจัยยีนสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเมื่อ ค.ศ. 1961 แต่เมื่อมีการวิจัยระยะหลัง ๆ ต่อมา สมมติฐาน Britten-Davidson ก็ชักจะเสื่อมถอยลง อย่างไรก็ดีสมมติฐานนี้ก็ยังคงเป็นแนวคิดทางวิทยาศาสตร์ที่บุกเบิกช่องทางอันจะนำไปสู่ความเข้าใจถึงการควบคุมของยูคาริโอทยีน แม้ว่ายังคงมีรายละเอียดบางประการที่สมมติฐานนี้ให้ความกระจ่างไม่ได้มาก ในปัจจุบันได้มีการวิจัยทางรีคอมบิแนนท์ DNA และการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสบน DNA ซึ่งให้ข้อมูลใหม่ ๆ เกี่ยวกับยูคาริโอทยีนเพิ่มขึ้นอยู่เรื่อย ๆ

อยู่เป็นจำนวนมากนั้น มีเสถียรภาพลดน้อยลง สภาพการณ์นี้จึงเอื้ออำนวยต่อการเข้าจับตัวของ RNA โพลีเมอเรสมากขึ้น (รูปที่ 5-10) เมื่อจับตัวเรียบร้อยแล้ว เชื่อว่าเอนไซม์นี้จะเลื่อนตัว (drift) ไปจนถึงจุดเริ่มต้นทรานสคริปชั่น แล้วเกาะติดอยู่ที่นี่อย่างแน่นหนา เพื่อเกิดการสังเคราะห์ mRNA ต่อไป

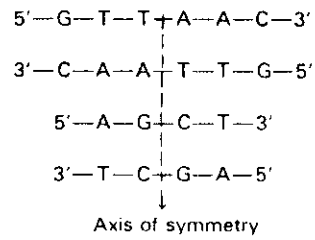


รูปที่ 5–10 แผนผังการเริ่มต้นขบวนการทรานสคริปชั่นของ lac operon

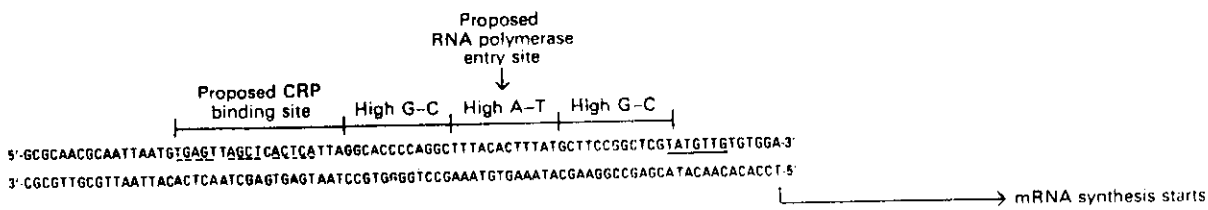
การควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสเลชั่นของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

การควบคุมในระดับทรานสเลชั่น จะไม่ค่อยมีความสำคัญเท่าที่เกิดในระดับทรานสคริปชั่น เนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาแล้วคือ จะเป็นการสูญเสียพลังงานและวัสดุไปโดยเปล่าประโยชน์

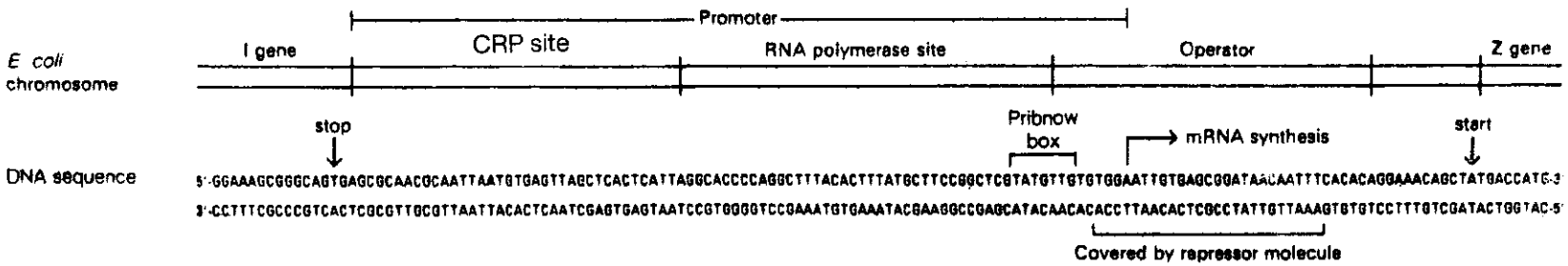
การเรียงตัวของเบสแบบที่เรียกว่าพาลินโดรม จะมีความสมมาตร (symmetry) ระหว่างด้านซ้ายและขวาของแกนกลาง ดังรูป



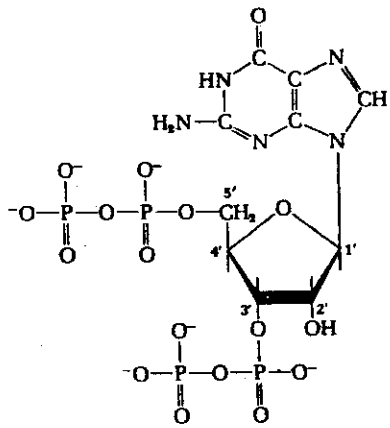
สำหรับการเรียงลำดับของคู่เบส 85 คู่ในบริเวณส่งเสริมนั้น (รูปที่ 5-9) พบว่าบริเวณที่ cAMP-CRP คอมเพล็กซ์จับตัวจะเป็นลักษณะพาลินโดรมเช่นกัน ถัดไปก็จะเป็นช่วงที่มี G-C มาก แล้วจึงถึง "entry site" คือที่ที่ RNA โพลีเมอเรสจับตัวซึ่งจะมี A-T สูง ถัดจากนี้ไปก็จะถึงช่วงที่มี G-C มากอีก การที่ RNA โพลีเมอเรสเลือกจับตัวบริเวณที่มี A-T สูงก็เพราะว่าสายคู่ของ DNA บริเวณนี้จะแยกออกจากกันได้ง่ายกว่าและบ่อยกว่าบริเวณที่มี G-C มาก สำหรับเรื่องที่ว่าการจับตัวของ cAMP-CRP คอมเพล็กซ์จะช่วยทำให้ RNA โพลีเมอเรสจับตัวได้ดีขึ้นนั้น ยังไม่ทราบว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร แต่มีผู้เสนอแนะว่าอาจเกิดจากการจับตัวของคอมเพล็กซ์ไปทำให้โครงรูปเกลียวคู่ของ DNA ที่ "entry site" อันมี A-T



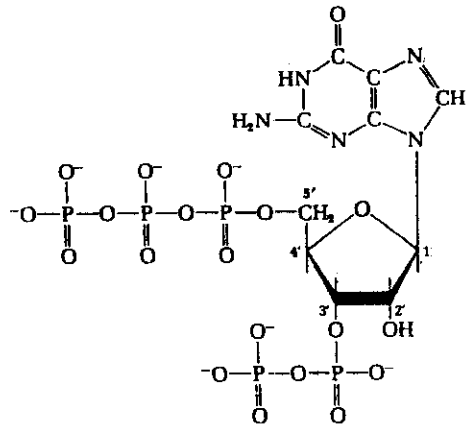
รูปที่ 5–9 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณส่งเสริมของ lac operon ของ E. coli **เส้นไข่ปลาคือส่วนที่เป็นพาลินโดรมของบริเวณที่ CRP จับตัวและที่ขีดเส้นใต้คือ Pribnow box**



รูปที่ 5-8 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ใน lac operon ของ E. coli



ppGpp
Guanosine 5′-diphosphate 2′(3′)-diphosphate
(also called guanosine tetraphosphate)



pppGpp
Guanosine 5′-triphosphate 2′(3′)-diphosphate

การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณส่งเสริมและบริเวณดำเนินการ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาโดยใช้ lac operon ทำให้ทราบว่าส่วนของบริเวณส่งเสริมและบริเวณดำเนินการนั้นคาบเกี่ยว (overlap) กันอยู่ ตามรูปที่ 5-8 ทั้งนี้เพราะสถานที่เริ่มต้นขบวนการทรานสคริปชั่นภายในบริเวณดำเนินการนั้น เป็นส่วนหนึ่งที่อยู่ในช่วงที่โปรตีนกดดันจะมาจับตัว ซึ่งช่วงนี้จะคาบเกี่ยวเข้าไปในบริเวณส่งเสริม ความรู้นี้จึงเป็นข้อพิสูจน์ข้อเสนอแนะที่ว่าโปรตีนกดดันบดบังไม่ให้เกิดทรานสคริปชั่นด้วย สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งก็คือ การเริ่มต้นสร้างสาย mRNA นั้นเกิดก่อนที่จะถึงจุดเริ่มต้นของยีนโครงสร้างยีนแรก (ยีน Z) นอกจากนี้ยังพบว่าการเรียงลำดับของคู่เบส 21 คู่ ในส่วนที่เป็นบริเวณจับตัวของโปรตีนกดดันในบริเวณดำเนินการนั้นเป็นแบบพาลินโดรม (palindrome)

จากที่กล่าวมานี้จะเห็นว่า สมมติฐาน attenuation เป็นระบบการควบคุมที่ซับซ้อน มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างทรานสคริปชั่นกับทรานสเลชั่น มีรหัสบน leader sequence ที่ส่งผลกับอัตราเร็วของทรานสเลชั่น และมีการเกิดรูปแบบของโครงสร้างทุติยภูมิที่เหมาะสม เพื่อใช้ให้ถูกต้องตามเป้าหมายที่ต้องการ ประเด็นที่เป็นหัวใจของ attenuation ก็คือ การที่บางบริเวณบน attenuator สามารถจับคู่กับบริเวณที่อยู่ก่อนหน้า หรือบริเวณที่อยู่ตามหลังได้ สำหรับกรดอมิโนที่เกิดจากรหัสใน leader sequence ที่จะเป็นตัวทำให้ทรานสเลชั่นหยุดชะงักนั้น จะแตกต่างกันไปในระบบ attenuation ของโอเปอรอนอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น ถ้าเป็น his operon บน leader peptide จะมีฮิสทีดีน 7 ตัวเรียงต่อกัน ส่วนใน leu operon บน leader peptide จะมีลิวซีน 4 ตัวเรียงต่อกัน นั่นก็คือโอเปอรอนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอมิโนตัวใด กรดอมิโนตัวนั้นจะเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนระดับทรานสคริปชั่น

การควบคุมแบบเข้มงวด

การควบคุมทั้ง 3 แบบที่กล่าวมานี้ จะเห็นว่าเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA มีการควบคุมในระดับทรานสคริปชั่นอีกแบบหนึ่งที่เป็นการควบคุมการสังเคราะห์ rRNA เรียกว่า stringent control ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของแบคทีเรียขาดกรดอมิโนที่จะใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน การควบคุมชนิดนี้เป็นการประหยัดพลังงาน กล่าวคือ แบคทีเรียจะไม่สร้างไรโบโซม (ซึ่งประกอบด้วย rRNA) ขึ้นมา เนื่องจากถ้าสร้างขึ้นมาแล้ว ไรโบโซมนั้นก็จะไม่ได้ถูกนำไปใช้ต่อ เพราะไม่มีกรดอมิโนที่จะใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ในสภาวะของการขาดกรดอมิโนนี้ พบว่าเซลล์จะสร้างนิวคลีโอไทด์พิเศษขึ้นมาสองตัวคือ กัวโนซีน 5′-ไดฟอสเฟท 2′(3′) - ไดฟอสเฟท (ppGpp) และ กัวโนซีน 5′ - ไทรฟอสเฟท 2′(3′) - ไดฟอสเฟท (pppGpp) ซึ่งจะทำหน้าที่ขัดขวางการสังเคราะห์ rRNA แต่กลไกการทำงานของนิวคลีโอไทด์สองตัวนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด

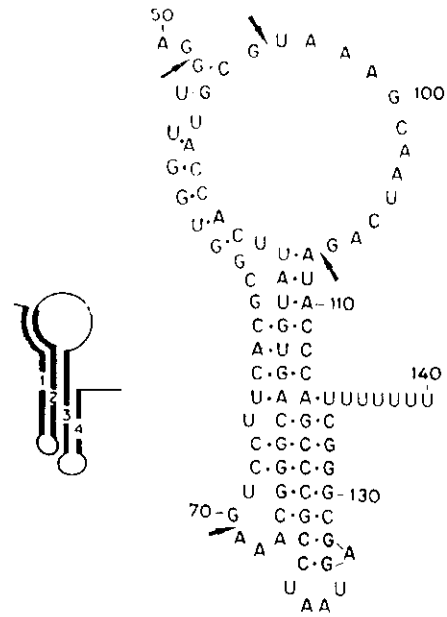
ที่ควบคุมขบวนการทรานสคริปชั่นได้ โดยโครงสร้างเหล่านี้เกิดจากการทำพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่เข้าคู่กันภายในสาย mRNA ซึ่งบริเวณที่เกิดปฏิกริยานี้ได้จะเรียกว่าบริเวณ 1, 2, 3 และ 4 โครงสร้างทุติยภูมิที่เป็นผลมาจากทรานสเลชั่นบริเวณ leader sequence จะเป็นตัวบอกว่า ทรานสคริปชั่นควรจะสิ้นสุดลงที่ปลาย leader sequence หรือดำเนินต่อไปจนถึงยีนโครงสร้างของโอเปอรอน โดยตัวควบคุมที่เกี่ยวข้องได้แก่ระดับภายในเซลล์ของทริปโทเฟน อันเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถี

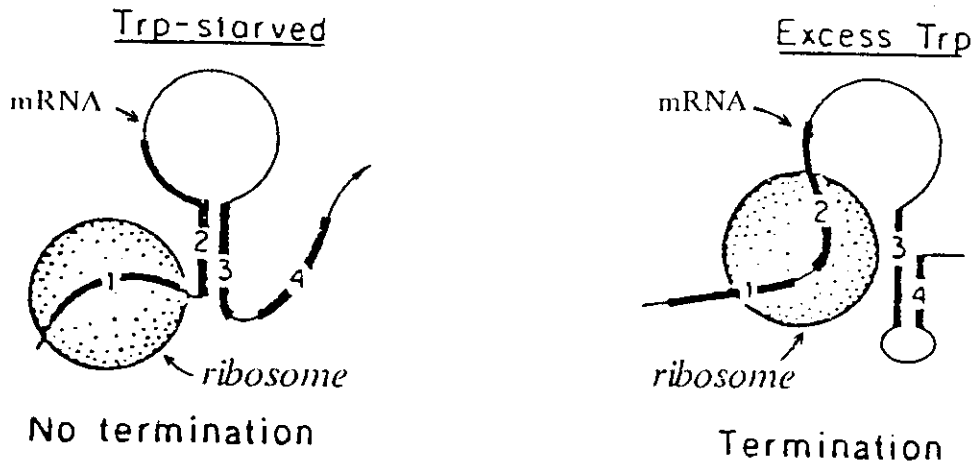
เมื่อระดับทริปโทเฟนภายในเซลล์ลดต่ำลง trp-tRNA สำหรับใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนก็จะมีจำนวนจำกัด ทำให้การแปลรหัสของ leader sequence ช้าลงเมื่อไรโบโซมมาถึงรหัสทั้งสองของทริปโทเฟน (UGG UGG) บน mRNA การหยุดชงักของไรโบโซมนี้ จะเป็นสัญญาณในการควบคุม คือทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิระหว่างบริเวณ 2 และ 3 ขึ้น เพราะเมื่อขบวนการทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นที่เกิดพร้อม ๆ กันมาถึงบริเวณนี้ ทรานสคริปชั่นจะดำเนินต่อไปได้ ในขณะที่ทรานสเลชั่นจะหยุดชงักลงชั่วขณะเนื่องจากขาด trp-tRNA ทำให้บริเวณ 1 ซึ่งอยู่ใกล้รหัส UGG ของทริปโทเฟนถูกไรโบโซมบดบังจนไม่สามารถที่จะทำพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณ 2 ที่เข้าคู่กันได้ บริเวณ 2 จึงต้องไปเข้าคู่กับบริเวณ 3 เกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิแบบ 2-3 ขึ้น ซึ่งโครงสร้างแบบนี้จะทำให้ RNA โพลีเมอเรสเกิดทรานสคริปชั่นต่อไปจนตลอดโอเปอรอน ดังนั้นจะเห็นว่า เมื่อทริปโทเฟนภายในเซลล์มีระดับต่ำจะไปช่วยกระตุ้นให้ทรานสคริปชั่นของทริปโทเฟนโอเปอรอนเกิดได้มากขึ้น ซึ่งผลสุดท้ายก็คือ จะทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์ทริปโทเฟนเพิ่มขึ้น

ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีทริปโทเฟนภายในเซลล์อย่างเพียงพอ จะไม่มีการหยุดชงักของไรโบโซมที่รหัส UGG เพราะ trp-tRNA มีจำนวนมาก ดังนั้น ขบวนการทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นก็จะเกิดไล่ ๆ กันไป ทำให้บริเวณ 1 และ 2 ไม่ว่างพอที่จะเกิดพันธะไฮโดรเจนเนื่องจากถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในขบวนการทรานสเลชั่น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อ RNA โพลีเมอเรสสร้างบริเวณที่ 3 และ 4 ขึ้นแล้ว บริเวณทั้งสองนี้จะเกิดการจับคู่กันได้ ทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบ 3-4 ซึ่งโครงสร้างแบบนี้จะเป็นสัญญาณหยุดสำหรับ RNA โพลีเมอเรส ทำให้การสังเคราะห์ mRNA สิ้นสุดลงที่ปลาย leader sequence ดังนั้น ยีนโครงสร้างทั้งหลายในทริปโทเฟนโอเปอรอนก็จะไม่ถูกถอดรหัส ในกรณีนี้จะเห็นว่า เมื่อมีทริปโทเฟนภายในเซลล์อยู่เพียงพอแล้ว ทรานสคริปชั่นของทริปโทเฟนโอเปอรอนจะลดลง

ทั้งนี้เพราะทริปโทเฟนเป็นกรดอมิโนชนิดที่พบน้อยในโปรตีนของ E.coli ทริปโทเฟนทั้ง 2 ตัวที่ถูกเติมเข้าไปในขบวนการทรานสเลชั่นนี้ จะไปมีผลทำให้ทรานสคริปชั่นของทริปโทเฟน-โอเปอรอนเกิดได้ดีขึ้นหรือลดลงตามรูปที่ 5-7

ภายในสาย mRNA ระหว่างรหัสหยุดสำหรับ leader peptide กับจุดเริ่มต้นของยีนโครงสร้างยีนแรกคือ trp E นั้น เรียกว่า attenuator บริเวณนี้สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ





รูปที่ 5-7 (บน) โครงสร้างบริเวณ 1, 2, 3, และ 4 ของ attenuator

(ล่าง) แผนผังแสดงการควบคุมแบบ attenuation ของทริปโทเฟน โอเปอรอน ของ E.coli

ให้เกิดการสร้างเอนไซม์เหนี่ยวนำที่จะใช้แหล่งพลังงานอื่น แต่ถ้าระดับกลูโคสในเซลล์ลดลง และมีแหล่งพลังงานอื่นที่เซลล์จะใช้ได้เช่นแลคโตส cAMP จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น แล้วไปรวมตัวกับ CRP ได้เป็น cAMP – CRP คอมเพล็กซ์ ซึ่งจะเข้าไปจับตัวที่บริเวณส่งเสริม แล้วช่วยให้ RNA โพลีเมอเรสหาจุดเริ่มต้นในบริเวณส่งเสริมนี้ได้ดีขึ้น ทำให้เกิดการสังเคราะห์ RNA และเอนไซม์ของยีนโครงสร้างขึ้นได้

การควบคุมแบบ attenuation

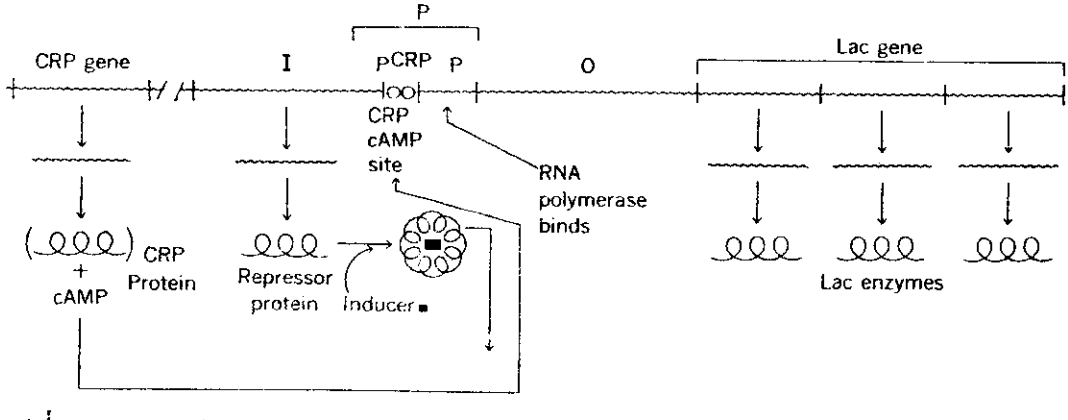
การควบคุมแบบนี้ เกิดจาก leader sequence ซึ่งคือลำดับของเบสที่เรียงกันอยู่ทางปลาย 5′ ของ mRNA ก่อนหน้าที่จะถึงเบสตัวแรกที่ถอดรหัสมาจากยีนโครงสร้าง leader sequence จะมีความยาวแตกต่างกันไปในแต่ละ mRNA เช่น ถ้าเป็น E.coli leader sequence ของ mRNA จาก gal operon จะมี 26 เบส ในขณะที่ mRNA จาก trp operon มี 140 เบส หน้าที่หนึ่งของ leader sequence ก็คือ เป็นสถานที่ให้ไรโบโซมมาจับตัว โดยบริเวณที่เกิดการจับตัวก็คือ Shine-Dalgarno sequence นอกจากนี้แล้วยังพบว่า leader sequence ส่วนมากในโปรคาริโอท จะมีส่วนช่วยควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ระดับทรานสคริปชั่นด้วย การควบคุมชนิดนี้ทำให้การเริ่มต้นทรานสคริปชั่นเกิดภายใน leader sequence แล้วหยุดลงก่อนหน้าที่จะเกิดทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างของโอเปอรอนต่อไป

การควบคุมแบบ attenuation พบในโอเปอรอนหลายชนิดของ E.coli ที่มียีนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอมิโน.เช่น ฮิสทีดีน, ลิวซีน และทริปโทเฟนโอเปอรอน Charles Yanofsky และผู้ร่วมงานได้ศึกษาการควบคุมแบบนี้ โดยใช้ trp operon ของ E.coli โอเปอรอนนี้มียีนโครงสร้าง 5 ยีนสำหรับสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการผลิตทริปโทเฟนของแบคทีเรีย เขาได้เสนอสมมติฐานขึ้นมาเพื่อใช้อธิบายรายละเอียดในระดับโมเลกุล โดยหลักใหญ่ของสมมติฐานนี้อยู่ที่ว่า ในแบคทีเรียซึ่งไม่มีนิวเคลียสนั้น ทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นจะเกิดไปพร้อม ๆ กัน กล่าวคือ ในขณะที่ RNA โพลีเมอเรสกำลังผลิต mRNA (คือเกิดทรานสคริปชั่น) อยู่นั้น ไรโบโซมก็จะเข้ามาเกาะที่ mRNA ใหม่นี้ เพื่อเกิดการสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ (คือเกิดทรานสเลชั่น) ไปด้วย ในสมมติฐาน attenuation การเริ่มต้นทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นจะอยู่ที่บริเวณ leader sequence ซึ่งมีรหัสสำหรับการสร้าง leader peptide สำหรับกรณีของทริปโทเฟนโอเปอรอน leader peptide จะมีกรดอมิโน 14 ตัว โดยที่ 2 ตัวในจำนวนนี้จะเป็นทริปโทเฟนซึ่งเรียงอยู่ติดกัน สภาพการณ์เช่นนี้นับว่าแปลกสำหรับเปปไทด์สายสั้น ๆ

ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์เหนี่ยวนำขึ้นมาเพื่อใช้น้ำตาลเหล่านั้นเป็นแหล่งพลังงานได้เลย นอกจากนี้แล้วกลูโคสยังสามารถกดดันการสร้างเอนไซม์หลายชนิดในขบวนการหายใจและขบวนการขนส่งอีเลคตรอนได้ด้วย ซึ่งแต่เดิมนั้นเข้าใจกันว่าเอนไซม์ในขบวนการเหล่านี้เป็นเอนไซม์ประจำ เมื่อเป็นเช่นนี้ก็ทำให้แบคทีเรียต้องหันกลับไปใช้วิถีที่เก่าแก่ที่สุดในการสลายสารเพื่อให้ได้พลังงาน คือวิถีกลัยโคไลซิส การที่กลูโคสหรืออนุพันธ์ที่ได้จากกลูโคสสามารถกดดันการสร้างเอนไซม์เหนี่ยวนำและเอนไซม์ประจำในขบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ได้นั้น เรียกการกดดันชนิดนี้ว่า catabolite repression

กลไกของ catabolite repression (รูปที่ 5 - 6) อธิบายได้โดยแลคโตสโอเปอรอนเช่นกัน แต่การควบคุมแบบนี้จะเกิดที่บริเวณส่งเสริม ซึ่งเป็นที่ ๆ RNA โพลีเมอเรสมาจับตัวเพื่อเริ่มต้นทรานสคริปชั่น ในบริเวณส่งเสริมนี้ยังมีสถานที่ ๆ จะทำให้คอมเพล็กซ์ตัวหนึ่งมาจับด้วย นั่นคือ cyclic AMP (cAMP) – cyclic AMP receptor protein (CRP) คอมเพล็กซ์ จากการทดลองพบว่าทั้ง cAMP และ CRP เป็นสารที่ช่วยในการเริ่มต้นสังเคราะห์ RNA โดยจะช่วยให้ RNA โพลีเมอเรสสามารถหาจุดเริ่มต้นทรานสคริปชั่นซึ่งอยู่ในบริเวณส่งเสริมได้ โดย cAMP จะต้องรวมตัวกับ CRP ให้ได้เป็นคอมเพล็กซ์เกิดขึ้นก่อน แล้วจึงจะเข้าไปจับตัวที่บริเวณส่งเสริม

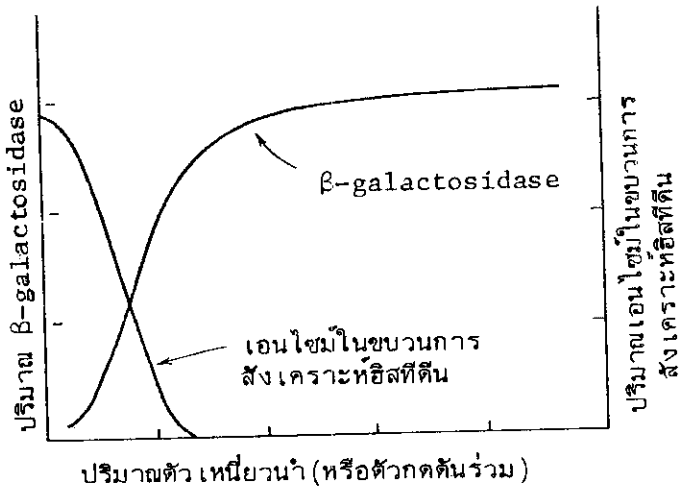
ถ้ามีกลูโคสอยู่ในเซลล์อย่างเพียงพอแล้ว cAMP จะมีปริมาณน้อย และ CRP ก็จะหมดความว่องไว ทำให้ไม่เกิดคอมเพล็กซ์ที่จะไปจับที่บริเวณส่งเสริมได้ ดังนั้นการจับตัว



รูปที่ 5 – 6 กลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ชนิด catabolite repression ในกรณีที่ปริมาณกลูโคสในเซลล์แบคทีเรียลดน้อยลง

ของ RNA โพลีเมอเรสเพื่อเริ่มทรานสคริปชั่นก็จะลดน้อยลงอย่างมาก ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่

จากตัวอย่างทั้งสองของการควบคุมแบบเนกาทีฟที่กล่าวมานี้ จะเห็นว่ามีความแตกต่างกันอยู่ในเรื่องของจำนวนเอนไซม์ในเซลล์ เมื่อดูเปรียบเทียบกับจำนวนตัวเหนี่ยวนำ (หรือตัวร่วมกดดัน) ที่ให้ลงไปในน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย (รูปที่ 5 - 5) กล่าวคือ ในกรณีของเอนไซม์เบต้ากา



รูปที่ 5 – 5 ความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของตัวเหนี่ยวนำ (หรือตัวร่วมกดดัน) ที่ให้กับแบคทีเรีย

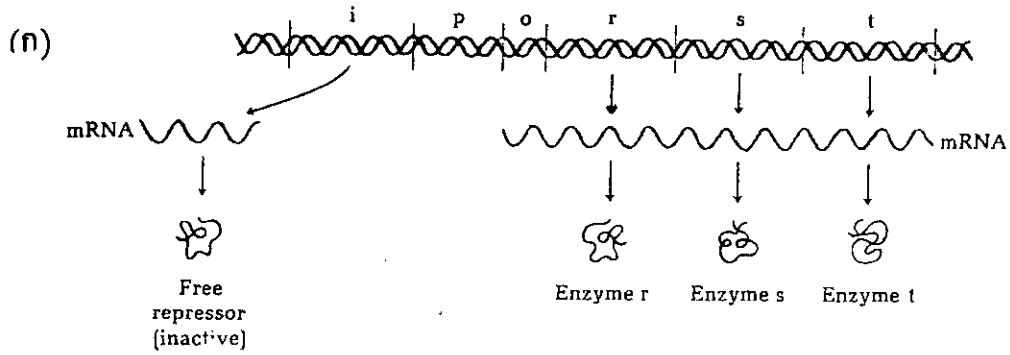
แลคโตซิเดสนั้น ถ้ายิ่งมีตัวเหนี่ยวนำคือแลคโตสอยู่มาก ปริมาณของเอนไซม์ก็จะยิ่งมีมากขึ้นตามไปด้วย แต่ถ้าเป็นในกรณีของฮิสทีดีน ถ้ามีฮิสทีดีนอยู่มาก ปริมาณของเอนไซม์ในขบวนการสังเคราะห์ฮิสทีดีนจะถูกกดดันให้มีการสร้างน้อยลง

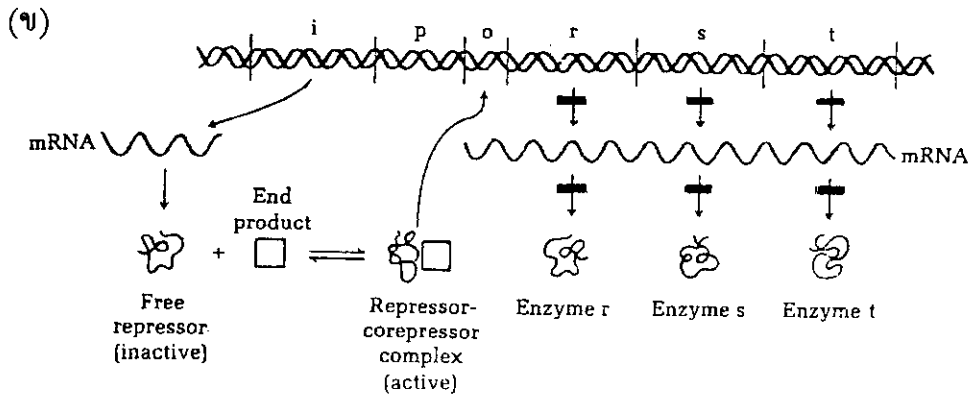
การควบคุมแบบโพซิทีฟ

การควบคุมแบบนี้คือ ถ้ามีตัวควบคุมไปจับที่บริเวณส่งเสริม (มิใช่ที่บริเวณดำเนินการเหมือนในกรณีการควบคุมแบบเนกาทีฟ) จะทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้างเกิดได้มากขึ้น ตัวอย่างของการควบคุมแบบโพซิทีฟนี้ พบในการกดดันการสร้างเอนไซม์อีกแบบหนึ่งของแบคทีเรียคือ catabolite repression

ตัวกดดันในกรณีนี้คือกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งพลังงานโดยตรงของเซลล์ เมื่อมีกลูโคสอยู่ในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียแล้ว ไม่ว่าจะมีแลคโตสหรือน้ำตาลตัวอื่น ๆ อยู่ด้วยก็ตาม กลูโคสจะไปกดดัน

164





รูปที่ 5 – 4 กลไกการทำงานของฮิสทีดีนโอเปอรอนเมื่อไม่มีตัวร่วมกดดัน (ก) และเมื่อมีตัวร่วมกดดัน (ข)

เมื่อไม่มีแลคโตส ยีนควบคุมจะสร้างโปรตีนกดดันซึ่งมีความว่องไว สามารถไปจับที่บริเวณดำเนินการได้ ทำให้ทรานสคริปชั่นของยีนโครงสร้าง z, y, a เกิดไม่ได้ ก็จะไม่มีการสร้างเอนไซม์เกิดขึ้น แต่ถ้ามีตัวเหนี่ยวนำคือแลคโตส แลคโตสจะจับตัวกับโปรตีนกดดัน ได้คอมเพล็กซ์ซึ่งหมดความว่องไว จึงไปจับตัวที่บริเวณดำเนินการไม่ได้ ดังนั้นทรานสคริปชั่นจะเกิดขึ้นได้ และทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ทั้งสามชนิดนั้นขึ้นด้วย

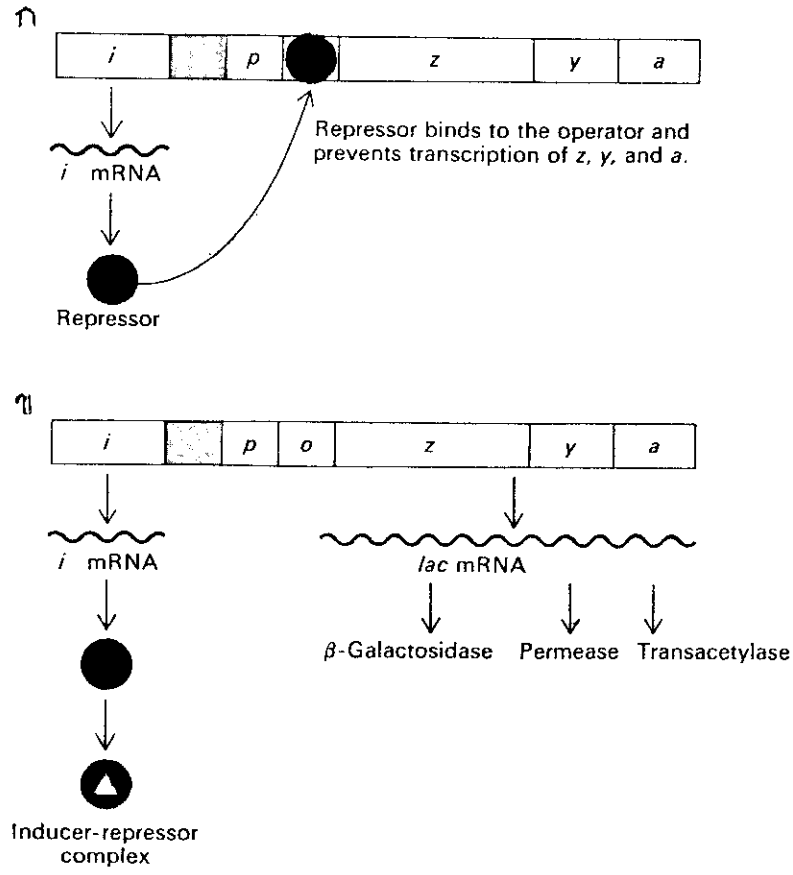
การจับตัวกันระหว่างโปรตีนกดดันและตัวเหนี่ยวนำนั้น เป็นชนิดที่สามารถผันกลับได้ คือ เมื่อเอนไซม์ได้ย่อยแลคโตสจนหมดลงแล้ว จำนวนของเอนไซม์เหล่านั้นก็จะลดลงทันที

ถ้ายีนควบคุมเกิดผิดปกติ ไม่สามารถสร้างโปรตีนกดดันได้ ก็จะไม่มีตัวขัดขวางบริเวณดำเนินการ ทำให้ RNA โพลีเมอเรสสร้าง mRNA ได้ตลอดเวลาไม่ว่าจะมีตัวเหนี่ยวนำอยู่หรือไม่ ดังนั้น เอนไซม์เหนี่ยวนำก็จะกลับมีอยู่ตลอดเวลาภายในเซลล์ด้วยปริมาณที่คงที่ ทำให้กลายเป็นเอนไซม์ประจำ (constitutive enzyme) ไป

2. การกดดันการสร้างเอนไซม์ (enzyme repression) กรณีนี้พบในฮิสทีดีนโอเปอรอน ซึ่งเป็นส่วนของยีนที่มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการสังเคราะห์ฮิสทีดีน ถ้าให้ฮีสทีดีนลงในน้ำเลี้ยง E. coli แล้ว E. coli จะเอาฮิสทีดีนนี้ไปใช้โดยตรงเลย จึงไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์ทั้งหมดในขบวนการสังเคราะห์ฮิสทีดีนขึ้น การกดดันการสร้างเอนไซม์ประเภทนี้เรียกว่าการกดดันร่วม (coordinate repression)

กลไกการทำงานของฮิสทีดีนโอเปอรอน (รูปที่ 5 - 4) คือ เมื่อไม่มีฮิสทีดีน ยีนควบคุมจะสร้างโปรตีนกดดันซึ่งไม่ว่องไว ดังนั้นจึงไปจับตัวที่บริเวณดำเนินการไม่ได้ ทำให้ทรานสคริปชั่นเกิดขึ้นได้ และเอนไซม์ก็จะถูกสังเคราะห์ขึ้น แต่ถ้ามีฮิสทีดีนหรือเรียกว่าตัวร่วมกดดัน (corepressor) อยู่ด้วยแล้ว ฮิสทีดีนจะไปจับตัวกับโปรตีนกดดัน ได้คอมเพล็กซ์ที่มีความว่องไวเกิดขึ้น สามารถไปจับที่บริเวณดำเนินการได้ ทำให้ทรานสคริปชั่นหยุดลง และไม่เกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้น

แบคทีเรียนี้เสียใหม่ ให้มีแต่แลคโตสเท่านั้นที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในภาวะเช่นนี้จะเกิดการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ทั้งสามชนิดนั้นขึ้นมา เพื่อใช้ย่อยแลคโตสเป็นกาแลคโตสและกลูโคส แล้วแบคทีเรียจะได้นำกลูโคสไปใช้เป็นพลังงานได้ต่อไป ปรากฏการณ์ที่ตัวเหนี่ยวนำเพียงตัวเดียวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าหนึ่งชนิดนี้ เรียกว่าการเหนี่ยวนำร่วม (coordinate induction) กลไกการทำงานของแลคโตสโอเปอรอน (รูปที่ 5 - 3) อธิบายได้ดังนี้คือ



รูปที่ 5 – 3 รูปแสดงส่วนประกอบของแลคโตสโอเปอรอน และแสดงการทำงานของโอเปอรอนเมื่อไม่มีตัวเหนี่ยวนำ (ก) กับเมื่อมีตัวเหนี่ยวนำ (ข)