

普遍遺伝暗号表に従わない tRNA

浜島 聖文, 金井 昭夫

1. はじめに

遺伝暗号は基本的に塩基の種類とその並び方によって規定され, 3塩基ずつの組み合わせで20種類のアミノ酸を指定しタンパク質をコードする. この法則は多くの生物で共通するが, ミトコンドリアや一部の核ゲノムにおいては, 普遍暗号から逸脱した変則暗号が使用されていることが知られている (表1)¹⁾. 遺伝暗号変化の多くは, 主に使用頻度の低い終止コドンからセンスコドン (アミノ酸を指定するコドン) への変化であり, 一方, カンジダなど一部の酵母ではロイシンのCUGコドンがセリンへ変化した例もある. これらの変化の過程で鍵となる分子の一つが転移RNA (tRNA) である. 塩基の種類と並び方に由来するmRNAの情報を, 遺伝暗号に従ってアミノ酸の種類と並び方に起因するタンパク質の情報へ変換する際に, tRNAはまさに架け橋となり働く. それゆえ, このセントラルドグマの核心とも呼べる部分を担うtRNAの進化や多様性を研究することは, 遺伝暗号という生命システムの根幹をなすテーマを議論する上では欠かすことができないと考えられる. ここで, 著者らのグループはこれまでに, 通常とは異なる遺伝子構造を持った変則的なtRNAをさまざまなゲノム中に発見し, その特徴を明らかにしてきた²⁻⁵⁾. また, 近年のいくつかの研究により, 偽遺伝子化したかに見える構造の崩れたtRNAや, 単なる分解産物と思われていたtRNA由来の短いRNAが, 転写調節や翻訳の制御, RNAの生合成など, 遺伝暗号の解読だけにとどまらない多様な機構に関与することもわかってきた¹⁾. 本稿では主に, 世界初の例となる普遍暗号を変則暗号へ変換することが可能な線虫tRNAに関して, その最新情報をまとめた.

表1 これまでに報告のあった核ゲノムにおける普遍遺伝暗号表の変化

コドン	標準→変則的遺伝暗号	生物種
UGA	Stop→Trp	ファーミキューテス <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Spiroplasma citri</i> <i>Bacillus subtilis</i>
		プロテオバクテリア <i>Hodgkinia cicadicola</i> 繊毛虫 <i>Colpoda inflata</i> <i>Blepharisma americanum</i>
UGA	Stop→Cys	繊毛虫 <i>Euplotes</i> spp.
UAA	Stop→Glu	繊毛虫 <i>Vorticella microstoma</i> <i>Opisthionecta henneguyi</i> <i>Opisthionecta matiensis</i>
UAA UAG	Stop→Gln	多くの繊毛虫 ジアルジア以外の多くのディプロモナス オキシモナス <i>Streblomatrix strix</i> 緑藻 <i>Acetabularia</i> spp. <i>Batophora oerstedii</i>
UGA	Stop→Sec	多くの生物種
UGA	Stop→Sec/Cys	繊毛虫 <i>Euplotes crassus</i>
UAG	Stop→Pyl	いくつかのメタン生成古細菌/真正細菌
CUG	Leu→Ser	多くのカンジダ 多くの子囊菌

2. 線虫における新規 tRNA 分子 (nev-tRNA) の発見

一般的に, tRNAはその構造上の違いから二つのクラスに分類される. 多くのtRNAはクラスI tRNAと呼ばれ, 約70塩基からなるクローバーリーフ形の二次構造を形成する. 一方で, tRNA^{Leu}とtRNA^{Ser}のみは, バリアブルアーム (V-arm) と呼ばれる特徴的な長く伸びた構造を持ち, クラスII tRNAと呼ばれる⁶⁾. tRNAのアミノアシル化

慶應義塾大学先端生命科学研究所 (〒997-0017 山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1)

Unexpected tRNAs that do not consistently obey the universal genetic code

Kiyofumi Hamashima and Akio Kanai (Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan)

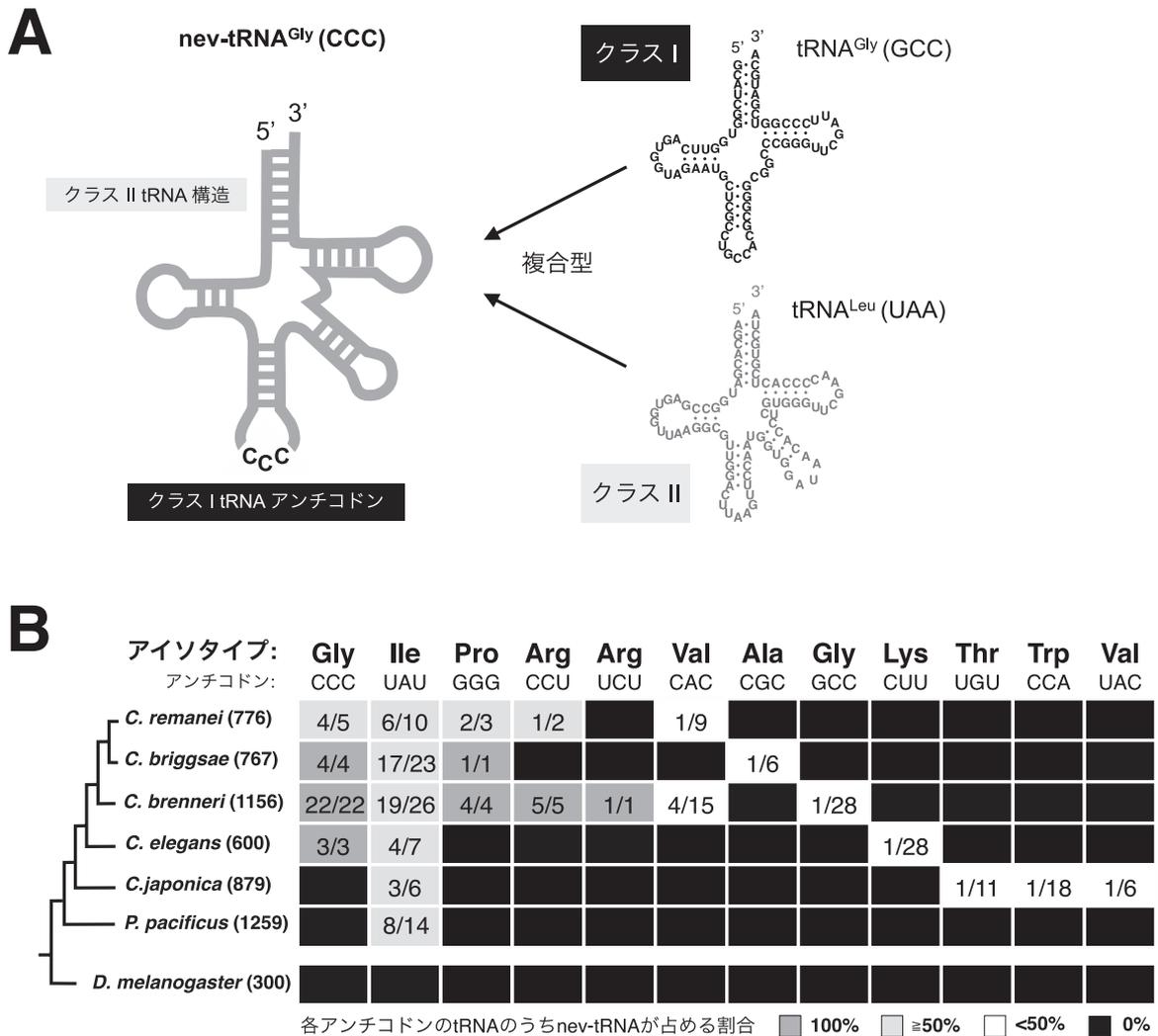


図1 線虫特異的に存在する新しいタイプの tRNA (nev-tRNA)

(A) nev-tRNA の特徴的な二次構造。線虫には、クラス I tRNA とクラス II tRNA の両者の特徴を持ち合わせる変則的な tRNA (nev-tRNA) が存在する。(B) 線虫における nev-tRNA の進化的保存性。各線虫について、それぞれのアンチコドンに対応する tRNA のうち、nev-tRNA が占める割合を示した。たとえば、*C. remanei* のアンチコドン CCC を持つ tRNA は計 5 遺伝子ゲノム上にコードされており、そのうち 4 種が nev-tRNA であり、別の 1 種は通常のクラス I tRNA^{Gly} であることを示す。また、ゲノム上に存在する tRNA 遺伝子総数は種名の横に示した。

(tRNA ごとにその 3' 末端に特定のアミノ酸が結合する反応のことでアミノアシル tRNA 合成酵素によって触媒される)の際に、対応するアミノアシル tRNA 合成酵素に認識される各 tRNA の特徴的な要素を tRNA アイデンティティと呼ぶが、クラス II tRNA の場合はそれが V-arm 領域に集約される場合が多いため、V-arm は正確かつ確実な翻訳を達成するために重要な構造となる^{7,8)}。ここで、著者らはロイシンやセリン以外のコドンを読むアンチコドン (クラス I アンチコドン) を持ちながら、V-arm 構造をとともに有する変則的な tRNA 遺伝子が、線虫ゲノムには存在することに着目した。このような tRNA が *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) のゲノム上に存在することは 2002 年にドイツの研究グループにより一部報告があったが⁹⁾、その進化

的保存性や機能などについて詳細は明らかになっていなかった。本来 tRNA^{Gly} はクラス I tRNA に属するため V-arm 構造を介在しないはずであるにも関わらず、*C. elegans* にはアンチコドン CCC を持つ V-arm 介在型の tRNA^{Gly} がコードされている (図 1A)。そこでまず、このような tRNA がどれくらい広範な生物に存在するものであるか検討した。

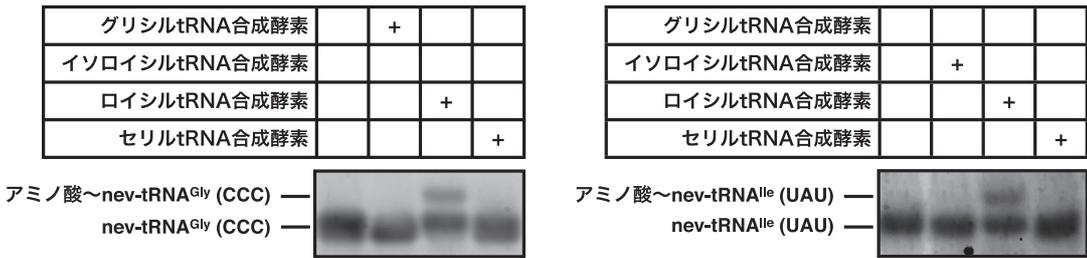
ヒトから植物、昆虫、真菌など多岐にわたる計 44 種の真核生物のゲノム配列を取得し、クラス I アンチコドンを持つ V-arm 介在型の tRNA 遺伝子がコードされているか否か、大規模に解析した。その結果、同様の特徴を持つ tRNA を計 115 見つけ出すことに成功した。興味深いことにそのすべては *C. elegans* のような自由生活性の線虫 (寄

生性ではなく、土壌や水中で独立して生息する線虫) より見いだされた (図 1B)。したがって我々は、クラス I アンチコドンを持ちながら V-arm を介在する線虫特異的な tRNA のことを、nematode-specific V-arm containing tRNA (nev-tRNA) と命名した⁵⁾。nev-tRNA の遺伝子数やそのアンチコドンのバリエーションは線虫の進化の過程で増大する傾向にあり、特に、*C. elegans* より進化的に後から分岐したとされる *C. brenneri* や *C. briggsae* では実に多様なアンチコドンの nev-tRNA がゲノム上に多数存在することがわかった (図 1B)。なかでも、アンチコドン CCC (グリシンに対応) や UAU (イソロイシンに対応) の nev-tRNA は最大で 20 超の遺伝子数を誇り、多くの線虫種で保存されていることから、生体内で何らかの役割を果たしている可能性がある。

3. nev-tRNA の変則的な特性

ここで問題となるのは、両クラスの tRNA のアイデンティティ要素を持ち合わせる nev-tRNA には、一体どのアミノ酸が付加されるのかである。たとえば nev-tRNA^{Gly} (CCC) について考えたとき、アンチコドンからすればグリシンが付加されると推定されるが、構造上の特徴からすればロイシンやセリンが付加されると考えられる。そこで、*C. elegans* が持つグリシル、イソロイシル、ロイシル、セリル tRNA 合成酵素の組換え体タンパク質を部分精製し、試験管内で nev-tRNA のアミノアシル化再構成実験を行った。その結果、nev-tRNA^{Gly} にはアンチコドンに対応するグリシンではなく、ロイシンが特異的に付加されることがわかった (図 2A)。nev-tRNA^{Ile} (UAU) も同様で、アンチコドンに対応するイソロイシンではなく、ロイシン

A



B

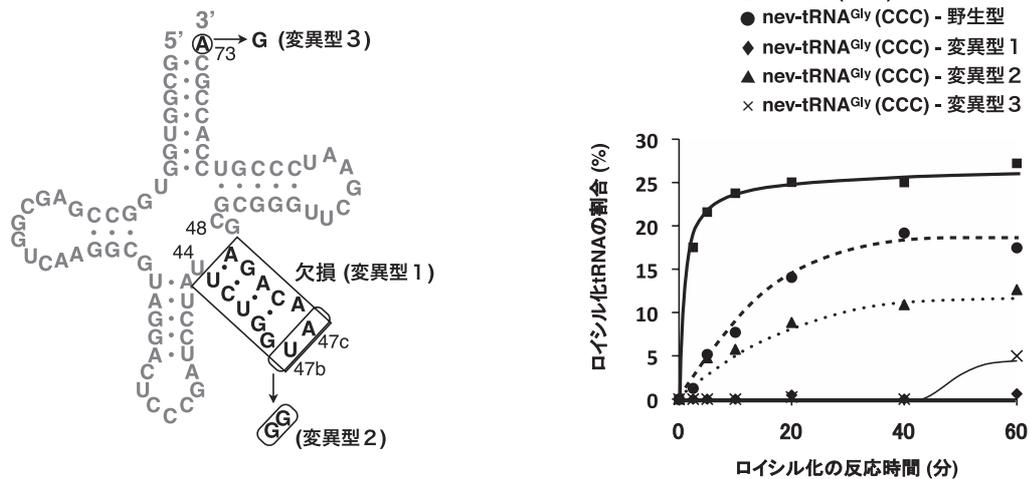
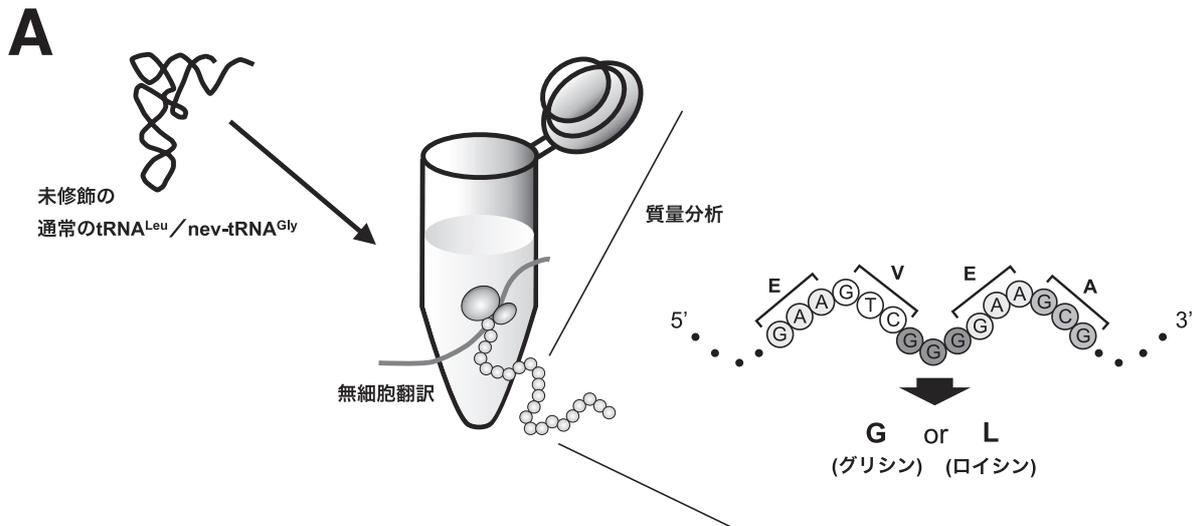


図 2 nev-tRNA にはアンチコドンと無関係にロイシンが付加される (A) nev-tRNA のアミノアシル化再構成実験。試験管内転写により合成した tRNA のアミノアシル化を、4 種の組換え体アミノアシル tRNA 合成酵素を用いて行った。アミノアシル化 tRNA は Acid-Urea PAGE で電気泳動分離し、SYBR Green II で染色した。(B) nev-tRNA^{Gly} (CCC) 上のロイシル tRNA 合成酵素の認識部位の変異実験。本実験で使用された nev-tRNA^{Gly} の変異型の概略図 (左) とそのロイシル化効率 (右) を示した。



B

ペプチド配列 (ルシフェラーゼ)	修飾	Mascot Score (n = 4)	
		tRNA ^{Leu} (コントロール)	nev-tRNA ^{Gly}
EVGEAVAK		25.7	29.1
RFHLPGIR		39.3	43.5
STLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSK		110.2	113.4
TIALIMNSSGSGTGLPK	Oxidation@M:6	122.0	121.6
VVDLDTGK		40.6	37.0
EVLEAVAK		-	25.9
RFHLP ^L IR		-	25.4
STLIDKYDLSNLHEIASL ^G GAPLSK		-	71.6
TIALIMNSSGSGTLLPK		-	91.6
VVDLDTLK		-	47.3

図3 nev-tRNAは試験管内で普遍暗号を変則暗号へ変換可能である

(A) nev-tRNAの試験管内翻訳実験の概要。(B) nano-LC/MSにより同定されたGGGコドン由来の残基(太字)が含まれたウミホタルルシフェラーゼのペプチド一覧。無細胞翻訳系にnev-tRNAを加えたときのみ検出されたペプチドについて灰色の背景で示している。

が特異的に付加された。続いて、ロイシル tRNA 合成酵素の認識部位^{7,8)}に対応する領域を、nev-tRNA 上から欠損または変異させた際のロイシル化の効率について解析したところ、いずれの変異型においてもその効率が低下した(図2B)。以上の結果は、アンチコドンと独立にnev-tRNAが特異的にロイシンを付加するように進化圧を受け、保存されてきた可能性を示唆している。

さて、これまでの結果はあくまでnev-tRNAのアミノアシル化を再現したまでにすぎない。次に明らかにしなければならないことは、例外的にロイシンが付加されたnev-tRNAがはたして翻訳に使用されるかということである。そこでこの問題に答えるため、試験管内の翻訳系において、nev-tRNAを導入した際に合成されるタンパク質のアミノ酸配列を、質量分析計を用いて決定した。ここではモデル系に、昆虫の無細胞翻訳系とウミホタルルシフェラー

ゼを用いた。また、nev-tRNA^{Gly}のアンチコドンはCCCなので、対応するGGGコドンが使用されている箇所について着目した(図3A)。まず、コントロールとして線虫の通常のtRNA^{Leu}(ロイシンを運搬するがそのアンチコドンがAAGなので、GGGコドンを読むことはない)を加えた際には、GGGコドンが普遍暗号に従いグリシンに翻訳されたペプチドが検出されることを確認した。次に、この系にnev-tRNA^{Gly}を加えた際には、同様のペプチドが検出された一方で、GGGコドンが変則的にロイシンに翻訳されたペプチドも検出されることが明らかになった(図3B)。このことは、昆虫由来の翻訳系においてnev-tRNA^{Gly}にロイシンが付加され、リボソームに取り込まれタンパク質合成へ使用されたことにほかならない。したがってnev-tRNAは、少なくとも試験管内において、普遍暗号を変則暗号へ変換することが可能なこれまで前例のないtRNA分子であ

ることが明らかになった。

4. 遺伝暗号と tRNA の多様化

それでは線虫では nev-tRNA を介した翻訳により、変則的な遺伝暗号表が使用されているのだろうか？ nev-tRNA^{Gly} や nev-tRNA^{Leu} が読むコドンは GGG や UAU であり、当然のことながら、線虫ゲノムにはこれらのコドンに対応する通常の tRNA^{Gly} や tRNA^{Leu} も存在する。そこで、仮に nev-tRNA が生体内で翻訳に使用されているとすれば、これらの tRNA と競合しているということになり、GGG コドンの位置にはグリシンまたはロイシン、UAU コドンの位置にはイソロイシンまたはロイシンが取り込まれると推定される。ゆえに、これは遺伝暗号の二重指定状態になる。

遺伝暗号の二重指定状態は、カンジダや織毛虫の一部の生物種で数例報告があり^{10,11)}、遺伝暗号変化の中間状態を捉えたものではないかという見解で注目を集めている¹²⁾。特定のコドンが多義性を獲得することによる進化的な利点は現段階では明らかになっていないが、出芽酵母では人工的に CUG コドンに多義性を持たせたところ、表現型の多様化や環境適応能力の向上などがみられた^{13,14)}。しかしながら、遺伝暗号の二重指定状態は、誤翻訳によってプロテオームへ与える影響も大きいので、多義語コドンは使用頻度を低く抑えられるような進化圧を受けているはずである¹⁵⁾。ここで、興味深いことに、nev-tRNA^{Gly} など主要な nev-tRNA はいずれも線虫においては使用頻度の低いレアコドンに対応し、その生体内における発現量も低い傾向にある⁵⁾。一方で、ロイシンはイソロイシンの構造異性体であるので、nev-tRNA^{Leu} によるイソロイシンからロイシンへの置換の影響も比較的強く抑えられている可能性がある。したがって、線虫ゲノムにおける nev-tRNA の存在も、遺伝暗号変化の過程の中間状態を捉えたものであると想像することもできる。また、出芽酵母のコドン多義性の例を勘案すれば、線虫進化の過程において nev-tRNA の獲得が、表現型の多様化や環境適応能力の向上など生存戦略においてプラスに貢献していることも考えられる。実際にこのような表現型の変化が細胞内で起きているのかなど、線虫における nev-tRNA の生物学的意義を詳細に明らかにすることは今後の課題である。

5. おわりに

本稿では新しく見いだした nev-tRNA を中心に、遺伝暗号と tRNA の多様化について紹介した。tRNA は最も初期に発見された古典的な non-coding RNA の一種でありながら、いまだにその進化や機能については全貌が明らかに

なっているとはいえないだろう。実際、近年、三つに分断されゲノム上の離れた位置に存在する tRNA 断片が、その組み合わせでアンチコドンが変化する tri-split tRNA³⁾ や、本来転写されるべき順列とは逆順列で、遺伝子領域の前半と後半が二つに分断された配列を持つ permuted tRNA²⁾ など、ユニークな様式でゲノムにコードされている tRNA が一部のアーキア（古細菌）や原始藻類には存在することが見いだされ、tRNA の持つ多様性が明らかになりつつある。また、これまではジャンクなものとして捉えられていた偽遺伝子化した tRNA や tRNA 由来の断片も機能的であることも徐々にわかってきている¹⁾。これらの事実は、tRNA の多様化が線虫だけでなくとどまらず、生物の多様化とともに複数の独立した種で起こっていることを示唆している。また、それは同時に、本来の tRNA の役割に付加価値を生み出し、翻訳だけでないさまざまな機構における tRNA の重要性を強く示唆するものである。したがって、tRNA 分子の進化や機能を探求していくことは、必ずや生命の起原や遺伝暗号の成り立ち、その進化の解明につながるものと考えられる。

謝辞

本研究は慶應義塾大学先端生命科学研究所の RNA 研究グループをはじめとして、数多くの共同研究者の協力の下になしえたものです。ここにお礼申し上げます。

- 1) Hamashima, K. & Kanai, A. (2013) *Biomol. Concepts*, 4, 309–318.
- 2) Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F., & Sekine, Y. (2007) *Science*, 318, 450–453.
- 3) Fujishima, K., Sugahara, J., Kikuta, K., Hirano, R., Sato, A., Tomita, M., & Kanai, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 2683–2687.
- 4) Sugahara, J., Fujishima, K., Morita, K., Tomita, M., & Kanai, A. (2009) *J. Mol. Evol.*, 69, 497–504.
- 5) Hamashima, K., Fujishima, K., Masuda, T., Sugahara, J., Tomita, M., & Kanai, A. (2012) *Nuc. Acids Res.*, 40, 3653–3662.
- 6) Sprinzl, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A., & Steinberg, S. (1998) *Nuc. Acids Res.*, 26, 148–153.
- 7) Breitschopf, K., Achsel, T., Busch, K., & Gross, H.J. (1995) *Nuc. Acids Res.*, 23, 3633–3637.
- 8) Soma, A., Uchiyama, K., Sakamoto, T., Maeda, M., & Himeno, H. (1999) *J. Mol. Biol.*, 293, 1029–1038.
- 9) Iben, J.R. & Maraia, R.J. (2012) *RNA*, 18, 1358–1372.
- 10) Moura, G.R., Paredes, J.A., & Santos, M.A.S. (2010) *FEBS Lett.*, 584, 334–341.
- 11) Turanov, A.A., Lobanov, A.V., Fomenko, D.E., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Klobutcher, L.A., Hatfield, D.L., & Gladyshev, V.N. (2009) *Science*, 323, 259–261.
- 12) Schultz, D.W. & Yarus, M. (1996) *J. Mol. Evol.*, 42, 597–601.
- 13) Gomes, A.C., Miranda, I., Silva, R.M., Moura, G.R., Thomas, B., Akoulitchev, A., & Santos, M.A.S. (2007) *Genome Biol.*,

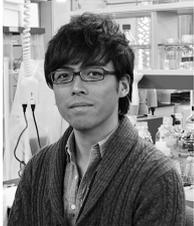
8, R206.

14) Miranda, I., Rocha, R., Santos, M.C., Mateus, D.D., Moura, G. R., Carreto, L., & Santos, M.A.S. (2007) *PLoS One*, 2, e996.

15) Schultz, D.W. & Yarus, M. (1994) *J. Mol. Biol.*, 235, 1377-1380.

著者寸描

●浜島 聖文 (はましま きよふみ)



慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科博士課程3年。

■略歴 2010年慶應義塾大学環境情報学部卒業。12年同大学大学院政策・メディア研究科修士課程修了。同年同博士課程に入学し、現在に至る。12年より日本学術振興会特別研究員(DC1)。

■研究テーマと抱負 分子生物学と情報生物学による機能性RNAと遺伝暗号の研究。人にやさしく自分に厳しく、さらなる上を目指して行きたい。

■趣味 サーフィン、スノーボード、野球観戦。

●金井 昭夫 (かない あきお)



慶應義塾大学先端生命科学研究so教授(同環境情報学部教授)。薬学博士。

■略歴 1985年早稲田大学教育学部理学科生物学専修卒業。87年同大学大学院理工学研究科修士課程物理学及び応用物理学専攻修了。90年東京大学大学院薬学系研究科博士課程生命薬学専攻修了。90年米

国国立衛生研究所(米国NIH)博士訪問研究員、92年東京都臨床医学総合研究所研究員、96年科学技術振興事業団ERATOプロジェクトグループリーダー、技術参事を経て、2001年より慶應義塾大学先端生命科学研究so助教授。06年より現職。

■研究テーマと抱負 RNAの分子生物学。日本から新しい生命科学のコンセプトを世界に売り出したい。

■ウェブサイト <http://www.iab.keio.ac.jp/en/content/view/45/63/>

■趣味 腕時計、音楽、美術関係全般。