

| | |
|------------------|--|
| Title | 線虫において新規に獲得されたtRNA分子の進化および機能の解析 |
| Sub Title | Functional analysis of nematode-specific tRNAs and their evolutionally background |
| Author | 浜島, 聖文(Hamashima, Kiyofumi) 富田, 勝(Tomita, Masaru) |
| Publisher | 慶應義塾大学湘南藤沢学会 |
| Publication year | 2012-03 |
| Jtitle | 優秀修士論文 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | 遺伝暗号の実体は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という生命の大原則は多くの生物で共通である。転移RNA(Transfer RNA;tRNA)は遺伝暗号を解読するアダプター分子であり、20種類のアミノ酸に対応して、少なくとも20種類のtRNAとそのアミノアシル化を行う酵素が存在する。多くのtRNAは共通してクローバーリーフ型の二次構造をとるが、厳密にはそれぞれに特異的な塩基パターンやモチーフ構造が存在し、これを各酵素が認識することで正確なアミノアシル化は達成される。ゆえに、このtRNAと酵素の対応関係は、遺伝暗号に従った確実な翻訳を行う上で"普遍"でなければならない。本研究では、通常ロイシンまたはセリン用のtRNAのみに観られる可変アーム構造(variable arm;V-arm)が、線虫において他のアミノ酸用(グリシンやイソロイシン)のtRNAにも存在することに着目した。そこで、in vitroでアミノアシル化再構成実験を行ったところ、これらのtRNAは普遍暗号に対応するアミノ酸ではなく、ロイシン用の酵素により『ロイシンを変則的にチャージすることがわかった。これらのtRNAは生体内で発現しており、線虫で広く保存されていることからnematode-specific V-arm containingtRNA(nev-tRNA)と命名した。また、in vitroでnev-tRNAがタンパク質合成に使用されることも確認した。以上の結果は、線虫においてグリシンやイソロイシンからロイシンへの暗号の変換が可能であることを示唆している。高等真核生物において普遍暗号によらない翻訳を生じ得るtRNAが発見されたのは極めて異例のことである。遺伝暗号の起源や進化の更なる理解に繋がることが期待される。 |
| Notes | 先端生命科学プロジェクト 富田勝研究会2011年度 |
| Genre | Thesis or Dissertation |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0657 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應義塾大学
修士論文

線

虫において新規に獲得された
tRNA分子の進化および機能の解析

2011年度

浜島 聖文 政策・メディア研究科 修士課程

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

優秀修士論文推薦のことば

遺伝暗号はあらゆる生命現象を達成するための基本となるような根本的なルールであり、普遍的なものとして様々な生物で共通するものだと考えられてきました。しかし浜島君は線虫と呼ばれる生物において、この遺伝暗号ルールの例外が存在することを明らかにしました。その研究内容は国内外の学会発表で注目を浴び、国際学術誌 (Nucleic Acids Research) にも採択されるなど高い評価を得ました。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
富田 勝

修士論文 2011 年度 (平成 23 年度)

線虫において新規に獲得された tRNA 分子の
進化および機能の解析

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科
浜島聖文

修士論文 2011 年度 (平成 23 年度)

[題目]

線虫において新規に獲得された tRNA 分子の進化および機能の解析

[論文要旨]

遺伝暗号の実体は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という生命の大原則は多くの生物で共通である。転移 RNA (Transfer RNA; tRNA) は遺伝暗号を解読するアダプター分子であり、20 種類のアミノ酸に対応して、少なくとも 20 種類の tRNA とそのアミノアシル化を行う酵素が存在する。多くの tRNA は共通してクローバーリーフ型の二次構造をとるが、厳密にはそれぞれに特異的な塩基パターンやモチーフ構造が存在し、これを各酵素が認識することで正確なアミノアシル化は達成される。ゆえに、この tRNA と酵素の対応関係は、遺伝暗号に従った確実な翻訳を行う上で“普遍”でなければならない。

本研究では、通常ロイシンまたはセリン用の tRNA のみに観られる可変アーム構造 (variable arm; V-arm) が、線虫において他のアミノ酸用 (グリシンやイソロイシン) の tRNA にも存在することに着目した。そこで、*in vitro* でアミノアシル化再構成実験を行ったところ、これらの tRNA は普遍暗号に対応するアミノ酸ではなく、ロイシン用の酵素によりロイシンを変則的にチャージすることがわかった。これらの tRNA は生体内で発現しており、線虫で広く保存されていることから nematode-specific V-arm containing tRNA (nev-tRNA) と命名した。また、*in vitro* で nev-tRNA がタンパク質合成に使用されることも確認した。以上の結果は、線虫においてグリシンやイソロイシンからロイシンへの暗号の変換が可能であることを示唆している。高等真核生物において普遍暗号によらない翻訳を生じ得る tRNA が発見されたのは極めて異例のことで、遺伝暗号の起源や進化の更なる理解に繋がることが期待される。

[キーワード]

Transfer RNA, 遺伝暗号, 進化, アミノアシル化, variable arm, 線虫

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科
浜島聖文

Abstract of Master's Thesis Academic Year 2011

[Title]

Functional analysis of nematode-specific tRNAs and their evolutionally background

[Summary]

Class II transfer RNAs (tRNAs), including tRNA^{Leu} and tRNA^{Ser}, have an additional stem and loop structure, the long variable arm (V-arm). Here, I describe class II tRNAs with a unique anticodon corresponding to neither leucine nor serine. Because these tRNAs are specifically conserved among the nematodes, I have called them “nematode-specific V-arm-containing tRNAs” (nev-tRNAs). The expression of nev-tRNA genes in *Caenorhabditis elegans* was confirmed experimentally. A comparative sequence analysis suggested that the nev-tRNAs derived phylogenetically from tRNA^{Leu}. *In vitro* aminoacylation assays showed that nev-tRNA^{Gly} and nev-tRNA^{Ile} are only charged with leucine, which is inconsistent with their anticodons. Furthermore, the deletion and mutation of crucial determinants for leucylation in nev-tRNA led to a marked loss of activity. An *in vitro* translation analysis showed that nev-tRNA^{Gly} decodes GGG as leucine instead of the universal glycine code, indicating that nev-tRNAs can be incorporated into ribosomes and participate in protein biosynthesis. These findings provide the first example of unexpected tRNAs that do not consistently obey the general translation rules for higher eukaryotes.

[Keywords]

Transfer RNA, genetic code, evolution, aminoacylation, variable arm, nematode

Keio University Graduate School of Media and Governance
Kiyofumi Hamashima

目次

| | |
|--|----|
| 目次 | 4 |
| 図表リスト | 6 |
| | |
| 第1章 序論 | 7 |
| | |
| 第2章 対象と手法 | 12 |
| 2.1. tRNA 遺伝子の進化系統解析 | 12 |
| 2.2. Total RNA の調製 | 12 |
| 2.3. Northern blot 解析 | 12 |
| 2.4. RT-PCR 解析と塩基配列決定 | 13 |
| 2.5. 組換え体アミノアシル tRNA シンセターゼの精製 | 13 |
| 2.6. <i>In vitro</i> アミノアシル化アッセイ | 14 |
| 2.7. Acid-urea PAGE/northern blot 解析 | 15 |
| 2.8. 無細胞翻訳用の発現ベクターの作成 | 15 |
| 2.9. <i>In vitro</i> 翻訳解析 | 15 |
| 2.10. NanoLC-MS/MS 解析 | 16 |
| 2.11. Gene Ontology 解析 | 17 |

| | |
|--|----|
| 第3章 結果..... | 21 |
| 3.1. 線虫特異的な新規 Class II tRNA | 21 |
| 3.2. nev-tRNA の配列特徴とその起源 | 24 |
| 3.3. <i>C. elegans</i> において nev-tRNA は低発現している | 28 |
| 3.4. nev-tRNA ^{Gly} 及び nev-tRNA ^{Ilc} はロイシンへアミノアシル化される | 32 |
| 3.5. nev-tRNA ^{Gly} は <i>in vitro</i> でタンパク質合成に用いられる | 39 |
| 第4章 議論..... | 44 |
| 第5章 結論..... | 53 |
| 謝辞..... | 54 |
| 参考文献..... | 55 |
| 付録..... | 62 |

図表リスト

| | |
|---|----|
| 図 1. 1968 年に Crick によってまとめられた大腸菌の遺伝暗号表 | 10 |
| 図 2. tRNA の二次構造とアイデンティティを決定するヌクレオチドの分布 | 11 |
| 図 3. 線虫における nev-tRNA の進化的保存性 | 23 |
| 図 4. 線虫 tRNA の進化系統樹 | 26 |
| 図 5. nev-tRNA と関連 tRNA との塩基配列及び二次構造の比較 | 27 |
| 図 6. <i>C. elegans</i> における nev-tRNA の northern blot 解析 | 30 |
| 図 7. <i>C. elegans</i> における RT-PCR 解析による nev-tRNA の発現確認 | 31 |
| 図 8. <i>C. elegans</i> の組換え体 aaRS の SDS-PAGE | 35 |
| 図 9. nev-tRNA のアミノアシル化アッセイ | 36 |
| 図 10. ネイティブな nev-tRNA ^{Gly} (CCC) を用いた acid-urea PAGE/northern blot 解析 ... | 37 |
| 図 11. nev-tRNA ^{Gly} (CCC) 上の LeuRS の認識サイトの変異実験 | 38 |
| 図 12. <i>In vitro</i> 翻訳で合成したタンパク質の精製とその SDS-PAGE | 41 |
| 図 13. GGG コドン由来の残基を含んだペプチドの MS/MS スペクトルの比較 | 43 |
| 図 14. <i>C. japonica</i> の 3 種の nev-tRNA の配列パターンとその二次構造 | 52 |
| 表 1. ノザンプロット解析に用いたオリゴヌクレオチド | 18 |
| 表 2. RT-PCR 解析に用いたオリゴヌクレオチド | 19 |
| 表 3. 分子クローニングに用いたオリゴヌクレオチド | 20 |
| 表 4. nev-tRNA ^{Gly} を用いた <i>in vitro</i> 翻訳解析 | 42 |
| 表 5. 線虫及び近縁種におけるコドン GGG / AUA の使用頻度 | 50 |
| 表 6. 線虫特異的なコドン GGG / AUA を含む遺伝子の傾向 | 51 |

第1章 序論

生物の遺伝情報は DNA 上に刻まれており、これを元にあらゆる生命活動に必須の様々なタンパク質が合成される。DNA の構成要素であるヌクレオチドの塩基は、A, T (U), C, G, の 4 種類であり、一方でタンパク質を構成する主要なアミノ酸は 20 種類であるため、3 個ずつの塩基が 1 セットとなってアミノ酸 1 個に対応する形でタンパク質をコードしている。この対応関係は、遺伝暗号、遺伝コード (genetic code) などと呼ばれ、基本的には多くの生物で共通である。いわゆる普遍暗号は、大腸菌の系を用いて 1965 年頃に確立され、1968 年 Crick により図 1 のようにまとめられた (Crick, 1968)。この暗号ルールは、まったく異なった生物種 (酵母や脊椎動物、ウイルスなど) においても同一であったため、すべての生物で共通の普遍暗号であるとし、「現在の生物で遺伝暗号が変化すれば致死的となるか、非常に強く選択除去されるため、暗号は決して変化し得ない。全生物の共通祖先で偶然に決定し、凍結されたものであろう。」という偶然凍結説を唱えた。

ところが、1979 年になると脊椎動物のミトコンドリアでは普遍暗号とは異なり、AUA をメチオニンとして、UGA をトリプトファンとして利用していることが発見された (Barrell et al., 1979)。ミトコンドリアの暗号は普遍暗号への進化の前段階に存在した原始暗号の名残りではないか (Hasegawa and Miyata, 1980)，もしくはミトコンドリアのゲノムは核ゲノムと比べ著しく小さく、合成するタンパク質の数も数十と少ないため、遺伝暗号の変化に”例外的に”寛容だったのではないか (Jukes, 1981)，といった主張がなされたが、1985 年に核ゲノムにおいても普遍暗号から逸脱した暗号が発見された。*Mycoplasma capricolum* では UGA をトリプトファンとして (Yamao et al., 1985)，纖毛虫類のいくつかの種では UAA/UAG をグルタミンとして (Caron and Meyer, 1985; Helftenbein, 1985; Horowitz and Gorovsky, 1985; Preer et al., 1985)，酵母の *Candida cylindracea* とその近縁種では CUG をセリンとして利用しており (Kawaguchi et al., 1989; Ohama et al., 1993)，遺伝暗号は決して”普遍”ではなく、また凍結もされていないことが明らかとなった。むしろ、現存の遺伝暗号は、単一の祖先の細胞で使用されていたいわゆる普遍遺伝暗号を起源に、生物の多様化と共に変化または拡張されるものだと捉えることができる。

遺伝暗号の翻訳時のアダプター分子に対応する RNA として Transfer RNA (tRNA) が見つかったのは 1960 年代のことである (Zamecnik, 1969). 同時に, 20 個のアミノ酸に対応して少なくとも 20 種類の tRNA が存在しなければならないため, 各アミノ酸に対応してアミノアシル化を行う酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase; aaRS) の存在が示唆された. また, 単一のアミノ酸に対して一般に 1 種類以上の tRNA が存在することも明らかとなつた. tRNA は 70-85 塩基から構成される小分子で, 共通してクローバーリーフ型の二次構造をとり, L 字型の立体構造を形成する. ゆえに, 各 aaRS は非常に類似した二次構造と三次構造をもつ tRNA 群の中から, その aaRS に対応する tRNA だけを他の tRNA から区別して認識しなければならない. あるコドンの正確な翻訳はアミノアシル化 tRNA のアンチコドンによって遂行されるため, aaRS による特定 tRNA への対応するアミノ酸の正しい付加は必要不可欠の重要なプロセスとなる (Freist, 1989).

対応する aaRS によって認識される各 tRNA の特徴的な要素は tRNA アイデンティティと呼ばれ, これを決定するための実験が 1980 年代後半から現在にかけて多くの研究者によってなされてきた. 多くの tRNA のアイデンティティ要素は, 基本的にアクセプターステムとアンチコドン領域に集約される (McClain, 1993). ただし, tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser}, バクテリアの tRNA^{Tyr}のみは, これらの tRNA に特異的な構造であるバリアブルアーム (variable arm; V-arm) 上に aaRS の識別因子が存在する場合が多く (Breitschopf et al., 1995; Soma et al., 1999; Biou et al., 1994; Yaremchuk et al., 2002), アンチコドンは認識においてさほど重要でないことが知られている (Saks et al., 1994). これらの特徴により, 前者は Class I tRNA, 後者の V-arm をもつ tRNA は Class II tRNA と呼ばれる (図 2) (Sprinzl et al., 1998). tRNA^{Leu} と tRNA^{Ser} の V-arm は動物のミトコンドリアを除いたすべての生物, オルガネラで保存されているが, tRNA^{Tyr} の V-arm は 3 ドメイン分岐後にバクテリアでは残存し, 真核生物と古細菌では失われたと考えられている (Achsel and Gross, 1993).

現存の生物における tRNA の多様性を探求するために, 我々はこれまで主に古細菌や原始的な真核生物を対象にした解析を進め, 多種多様な形でゲノムにコードされている tRNA の発見に成功してきた (Sugahara et al., 2009). 主にクレンアーキオータ門に属する古細菌種からは, 1 つから最大 3 つのイントロンを介在するイントロン介在型 tRNA が多数同定された (Sugahara et al., 2006; 2007; 2008). 進化的に古細菌と近い起源を持つと考えられている真核生物の原始紅藻シゾンやその近縁種においては, 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 2 つに分断され, その順序

第1章 序論

が逆転した配列を持つ Permuted tRNA が発見された (Soma et al., 2007; Maruyama et al., 2009). 2009 年には, 3 つに分断されゲノム上の離れた位置に存在する tRNA の断片が, その組み合わせでチャージするアミノ酸を変化させるという機能をもった Tri-split tRNA がみつかった (Fujishima et al., 2009). その一方で高等真核生物では, 古くから知られるイントロンをアンチコドンの 1 塩基下流の位置 (37/38) に介在する tRNA の発見のみに留まり (Marck and Grosjean, 2002; Sugahara et al., 2009), 主に古細菌で観られるような tRNA の多様性は存在しないかに思われていた.

そこで私は, 学部時代に主に高等真核生物 tRNA を対象にした大規模なコンピュータ解析を試みた. これにより, 1) 機能しているかどうかは不明だが, 高等真核生物においても様々な位置に介在配列をもつ tRNA が存在すること, 2) レトロエレメントなどのゲノム上に複数散在する可動因子によって tRNA の断片化が引き起こされている可能性があること, 3) 線虫ではセリンやロイシン以外に対応するアンチコドンをもつ tRNA にも V-arm 構造があること, を明らかにした. なかでも 3 については, 同様のことが 2002 年に Grosjean らによって報告されており (Marck and Grosjean, 2002), 遺伝暗号と tRNA の進化を扱う上で興味深い知見である. これまで述べてきたように, V-arm 介在型の Class II tRNA のアミノアシル化にはアンチコドンはさほど影響しないために, 本来セリンやロイシン以外のアミノ酸に対応するアンチコドンを持ちながら, aaRS による V-arm 構造の認識を介してセリンもしくはロイシンがチャージされる可能性があるわけだ. さらに, この変則的にアミノ酸をチャージした tRNA がタンパク質合成に用いられるすれば, 遺伝暗号の翻訳の”例外”が生じることになる.

本論文では, この変則的な V-arm 介在型 tRNA に着目し, その進化と機能の解明に向け情報解析と実験の両アプローチから遂行した一連の研究結果を報告する. 3.1 及び 3.2 では tRNA の配列特徴やその進化的保存性について, 3.3 では *Caenorhabditis elegans* における発現について, 3.4 では tRNA の *in vitro* アミノアシル化について, 3.5 では無細胞系を用いた翻訳実験の結果について述べている. また, 第 4 章では, 普遍遺伝暗号に与える影響についても言及し, 遺伝暗号の進化を考えた上で線虫においてこの遺伝子が獲得された理由, さらにはそこから類推される生体内における役割について議論した. 本研究により, tRNA アイデンティティとそのアミノアシル化機構の更なる理解と, 遺伝暗号の起源や生命の進化を扱う分野の発展を期待する.

| | | Second Base of Codon | | | | Third Base of Codon |
|---------------------|---|----------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|
| | | U | C | A | G | |
| First Base of Codon | U | Phe (UUU) | Ser (UCU) | Tyr (UAU) | Cys (UGU) | U |
| | | Phe (UUC) | Ser (UCC) | Tyr (UAC) | Cys (UGC) | C |
| | | Leu (UUA) | Ser (UCA) | End (UAA) | End (UGA) | A |
| | | Leu (UUG) | Ser (UCG) | End (UAG) | Trp (UGG) | G |
| | C | Leu (CUU) | Pro (CCU) | His (CAU) | Arg (CGU) | U |
| | | Leu (CUC) | Pro (CCC) | His (CAC) | Arg (CGC) | C |
| | | Leu (CUA) | Pro (CCA) | Gln (CAA) | Arg (CGA) | A |
| | | Leu (CUG) | Pro (CCG) | Gln (CAG) | Arg (CGG) | G |
| | A | Ile (AUU) | Thr (ACU) | Asn (AAU) | Ser (AGU) | U |
| | | Ile (AUC) | Thr (ACC) | Asn (AAC) | Ser (AGC) | C |
| | | Ile (AUA) | Thr (ACA) | Lys (AAA) | Arg (AGA) | A |
| | | i/eMet (AUG) | Thr (ACG) | Lys (AAG) | Arg (AGG) | G |
| | G | Val (GUU) | Ala (GCU) | Asp (GAU) | Gly (GGU) | U |
| | | Val (GUC) | Ala (GCC) | Asp (GAC) | Gly (GGC) | C |
| | | Val (GUA) | Ala (GCA) | Glu (GAA) | Gly (GGA) | A |
| | | Val (GUG) | Ala (GCG) | Glu (GAG) | Gly (GGG) | G |

図 1. 1968 年に Crick によってまとめられた大腸菌の遺伝暗号表。この暗号は、酵母や脊椎動物、ウイルスにも共通だったため、“普遍”と考えられた。

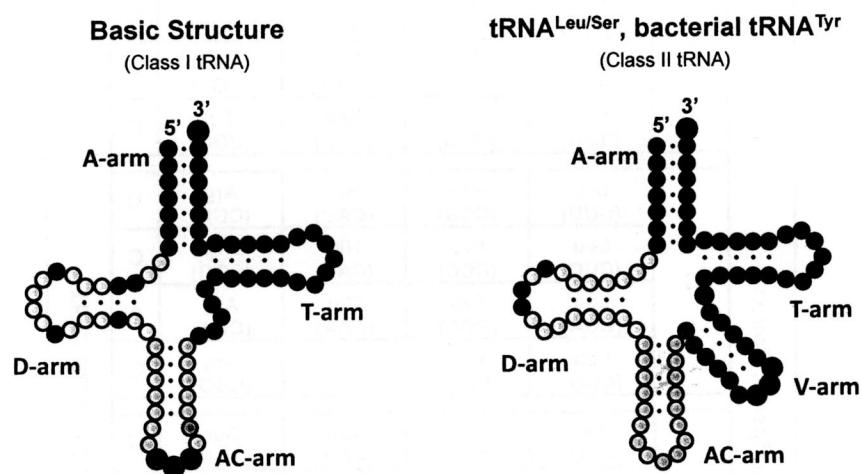


図 2. tRNA の二次構造とアイデンティティを決定するヌクレオチドの分布。tRNA はバリアブル領域の構造の違いによって 2 つのクラスに分類される。多くの tRNA が属する Class I tRNA のそれは 4-5 塩基程度のループであり、アイデンティティ要素はアクセプターステムやアンチコドンに多く存在する。tRNA^{Leu/Ser} (例外としてバクテリアの tRNA^{Tyr}) は Class II tRNA に属し、15-20 塩基程度のステムループ構造 (V-arm) をもつ。aaRS による Class II tRNA の認識にはアンチコドンはさほど重要ではなく、V-arm や 3'末端塩基が tRNA のアイデンティティ要素であることに注意。より強くアイデンティティを示すヌクレオチドを色の濃淡や円の大きさで強調している。

第2章 対象と手法

2.1. tRNA 遺伝子の進化系統解析

C. elegans, *Caenorhabditis brenneri* におけるすべての成熟 tRNA の配列を Genomic tRNA database (Chan and Lowe, 2009) より取得した. *Pristionchus pacificus* の tRNA 配列情報は, University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Bioinformatics database (Fujita et al., 2010) よりゲノム配列を取得し, デフォルトパラメーターで tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) を実行し, 予測することで取得した. 真核生物 tRNA の多くはマルチコピーであるため, 重複した場合は除去した. ClustalW (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007) を用いて non-redundant な成熟 tRNA 配列の neighbor-joining tree を作成し, iTOL (Letunic and Bork, 2007) を用いて系統樹を可視化した.

2.2. Total RNA の調製

本研究で用いた線虫 N2 株ならびに *Escherichia coli* OP50 株は *Caenorhabditis Genetics Center* (fund by NIH National Center for Research Resources) より提供して頂いた. 本研究で対象とした *C. elegans* の total RNA は, 20 °C で 4-5 日間大量培養した mixed-stage (eggs, larvae 1-4, adults) より, TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて添付の説明書の手順に従い抽出した. Acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)/northern blot 解析用の RNA サンプルは, 0.2 M Tris-HCl (pH 9.5) で 37 °C, 2 時間インキュベートし, tRNA の脱アシル化処理を行った.

2.3. Northern blot 解析

10 μ g の total RNA を 6% polyacrylamide 8M urea 変性ゲルで電気泳動し, エレクトロブ

第2章 対象と手法

ロッティング法で Hybond-N+ membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にトランസファーした。続いて、Biotin 3'-End DNA Labeling Kit (Pierce Biootechnology, Rockford, IL, USA) を用いてビオチン化したプローブ（表 1）を使用し、ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer (Ambion, Austin, TX, USA) により室温にてハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、メンブレンは 5×Wash Buffer (Ambion) を用いて室温で洗浄し、BrightStar BioDetect Kit (Ambion) と Enhanced ChemiFluorescence (ECF) substrate (GE Healthcare) により抗体反応を行った。最終的なシグナルは、Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により可視化した。

2.4. RT-PCR 解析と塩基配列決定

ReverTra Dash 及び KOD FX (Toyobo Biochemicals, Osaka, Japan) を用いて Reverse transcription (RT)-PCR 反応を行った。nev-tRNA^{Gly} (CCC) 以外の候補は、98°C (10s) – 55 °C (3s) – 74°C (6s) の 30 サイクルで増幅し、nev-tRNA^{Gly} (CCC) に関しては、98°C (10s) – 74/72/70°C (6s) を 5 サイクルずつ行ったのち、98°C (10s) – 60°C (6s) を 15 サイクル行うというステップダウン法により増幅した。PCR 産物は 3% NuSieve 3:1 agarose gel (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) で電気泳動し、エチジウムプロマイドで染色したのち、Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad Laboratories) により撮影した。また、PCR 産物は Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いてゲルから切り出し精製し、pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen) へサブクローニングした。そして、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によりインサート DNA の塩基配列を確認した。なお、この解析の PCR 反応で用いたプライマー配列の情報は表 2 にまとめた。

2.5. 組換え体アミノアシル tRNA シンセターゼの精製

C. elegans より抽出した total RNA を鋳型に、RT-PCR により 4 種のアミノアシル tRNA シンセターゼ (aminoacyl-tRNA synthetase; aaRS)：グリシル tRNA シンセターゼ (glycyl-tRNA synthetase; GlyRS, GenBank accession no. NP_871640.1), イソロイシル tRNA シンセターゼ (isoleucyl-tRNA synthetase; IleRS, GenBank accession no. NP_501914.1), ロ

第2章 対象と手法

イシル tRNA シンセターゼ (leucyl-tRNA synthetase; LeuRS, GenBank accession no. NP_497837.1), セリル tRNA シンセターゼ (seryl-tRNA synthetase; SerRS, GenBank accession no. NP_501914.1) の遺伝子配列の增幅を行った。RT-PCR は ReverTra Dash 及び KOD FX (Toyobo Biochemicals) を用いて行い、増幅産物は pET-23b expression vector (Novagen, Madison, WI, USA) へクローニングした。これにより、作成されたベクターにはそれぞれの aaRS の全長と C'末端には 6×His のタグがコードされている。インサート DNA の配列決定は ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて行い、データベースに登録されているものと同一であることを確認した。なお、ここでのクローニングに用いたプライマー配列や切断に用いた制限酵素の情報は表 3 に示した。

作成した発現ベクターは、IleRS 及び LeuRS に関しては *E. coli* の BL21(DE3)pLysS 株へ、GlyRS 及び SerRS に関しては HMS174(DE3)pLysS 株へ形質転換した。形質転換体は 50μg/ml アンピシリン及び 35μg/ml クロラムフェニコールの Luria–Bertani 培地にて 37°C で対数増殖期初期まで培養し、0.1–0.4mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside を加え 16°C でさらに一晩培養した。5000g, 5 分, 4°C で遠心分離し細胞ペレットを回収し、10mM Imidazole を含んだ 1×phosphate bufferd saline (PBS) に懸濁し 3 分間ソニケーション処理を行った。続いて 12000g, 10 分, 4°C で遠心分離し壊死組織片を除去し、Proteus IMAC Protein Purification Kit (Pro-Chem, Littleton, MA, USA) により組換え体タンパク質を部分精製した。Buffer A (50mM Tris–HCl [pH 8.0], 1mM EDTA, 0.02% Tween 20, 7mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) を用いて HiTrap column (GE Healthcare) で脱塩処理も行った。

2.6. *In vitro* アミノアシル化アッセイ

アッセイ時に鋳型となる tRNA は T7 RNA polymerase によって *in vitro* で合成し、精製した組み換え体 aaRS を用いて試験管内アミノアシル化再構成実験を行った。反応溶液は、50mM Hepes (pH 7.2), 50mM KCl, 4mM ATP, 15mM MgCl₂, 3mM dithiothreitol, 15mM アミノ酸 (グリシン, イソロイシン, ロイシン, セリン), 3μg tRNA, 1μg aaRS (IleRS のみアミノアシル化効率が悪かったため 5μg 使用した) の total 25μl の系で、室温で 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 60 分間のタイムスケールで反応を行った。等量の acid–urea stop buffer (Köhrer and Rajbhandary, 2008) を加えることで反応を停止させ、acid–urea 6.5% polyacrylamide gel によりアミノアシル化 tRNA の電気泳動分離を行った。SYBR Green II (Lonza,

第2章 対象と手法

Rockland, ME, USA) でゲル染色後, Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad Laboratories) にて撮影した.

2.7. Acid-urea PAGE/northern blot 解析

100 μ g のアルカリ処理済みの total RNA (2.2. Total RNA の調製を参照) を鋸型に, 精製した組み換え体 LeuRS または GlyRS を用いて *in vitro* アミノアシル化実験を行った. aaRS は 0.01 μ g から 1 μ g のタイトレーションをふり, 室温で 1 時間反応させた. 続いて, 反応後のサンプルを acid-urea 6.5% polyacrylamide gel で分離し, ノザンプロット解析によって特定の tRNA 分子を検出した.

2.8. 無細胞翻訳用の発現ベクターの作成

In vitro 翻訳解析用の発現ベクターとして, PF1549 タンパク質 (RNA 3'-terminal-phosphate cyclase of *Pyrococcus furiosus*, GenBank accession no. NP_579278) (Sato et al., 2011) または firefly luciferase (GenBank accession no. ACF93193.1) をクローニングした 2 種の発現ベクターを用意した. まず, *P. furiosus* のゲノム DNA 配列, luciferase ICE T7 Control DNA (Promega, Madison, WI, USA) をそれぞれ鋸型に, KOD FX (Toyobo Biochemicals) を用いて PCR 増幅を行った. 増幅産物は pF25A ICE T7 Flexi Vector (Promega) にクローニングした. これにより, 作成されたベクターには C'末端に 6×His タグが付加された PF1549 または luciferase の遺伝子がコードされ, T7 promoter により発現誘導される. インサート DNA 配列の塩基配列は ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) により決定し, いずれもデータベース上のものと同一であることを確認した. なお, これらのクローニングに用いたプライマー配列と制限酵素の情報は表 3 に示している.

2.9. *In vitro* 翻訳解析

本研究で行った無細胞系におけるタンパク質発現は, T7 promoter により誘導される

第2章 対象と手法

転写と翻訳が共役した反応である。1つの反応系あたり $40\mu\text{l}$ の昆虫の翻訳系 *Spodoptera frugiperda* Sf21 cell line (Promega) を用い、 $4\mu\text{g}$ の T7 発現ベクター (PF1549 タンパク質または firefly luciferase) と $4\mu\text{g}$ の *in vitro* 転写による合成 tRNA (Leu(AAG) または nev-Gly(CCC)) を加えた total $46\mu\text{l}$ の反応系で 29°C , 4 時間インキュベートした。反応後、Polytron sonicator (Kinematica, Bohemia, NY, USA) で 1 分間、細胞抽出液の超音波処理を行った。PF1549 の *in vitro* 翻訳を行ったサンプルに関しては、 80°C で 15 分間インキュベートすることで内在性の昆虫タンパク質を破碎した。 13000g , 10 分間, 4°C で遠心分離し壞死組織片を除去し、Talon Magnetic Beads Buffer Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) により His タグで標識された組み換え体タンパク質を精製した。

2.10. NanoLC-MS/MS 解析

精製したタンパク質は 12mM sodium deoxycholate (SDC), 12mM sodium lauroyl sarcosinate (SLS) を含んだ 100mM Tris-HCl (pH 9.0) に再懸濁し、 10mM dithiothreitol で室温, 30 分間インキュベートした後、 55mM iodoacetamide で遮光状態で室温, 30 分間アルカリ処理を行った。5 倍量の 50mM ammonium bicarbonate で希釈した後、MS-grade lysyl endoprotease で切断し、さらに一晩トリプシンによる切断処理を行った。Ethyl acetate を加え SDC 及び SLS をサンプルより除去した後 (Masuda et al., 2008; 2009), 0.5% trifluoroacetic acid を加え 1 分間振とうし酸性処理を行い、 15700g , 2 分間遠心分離を行った。そして、水層を C18 Empore Disk を用いた StageTips (Rappaport et al., 2003) で脱塩した。

Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) 計測には、 nanoLC interface (Nikkyo Technos, Tokyoo, Japan) を装備した LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) と FLM-3000 flow manager (Dionex, Germering, Germany) による Dionex Ultimate3000 pump と HTC-PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) を用いた。C18 シリカカラム ($3\mu\text{m}$; Dr Maisch, Ammerbuch, Germany) はカラムローダー (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) を用いて窒素ガスで self-pulled needle (150mm length, $375\mu\text{m}$ O.D. \times $100\mu\text{m}$ I.D.) を充填することで作成した (Ishihama et al., 2002)。流速は 500 nl/min である。移動相は、(A) 0.5% acetic acid, (B) 0.5% acetic acid / 80% acetonitrile から成り、 $5\text{--}10\%$ B (5m), $10\text{--}40\%$ B (60m), $40\text{--}100\%$ B (5m), 100% B (10m) の 3 ステップのリニアグラジエントを用いた。キャピラリーの電圧は 2400V を適用した。

第2章 対象と手法

MS スキヤンレンジは Orbitrap analyzer で 300–1500 m/z とし, MS/MS の ion trap 検出時には top 10 precursor ion 法を選択した.

生データよりピークリストを作成するために主にフラグメントイオンを Mass Navigator v1.2 (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan) を用いて解析した. ペプチドは Mascot v2.2 (Matrix, Science, London, UK) を用いて同定し, その際比較に使用したタンパク質のデータベースは PF1549, luciferase, ケラチンタンパク質及びトリプシン配列とした. プリカーサーイオンは 3ppm の質量誤差範囲内, これより得られたフラグメントイオンは 0.8Da 以内に設定し, トリプシンのミス切断は 2 箇所以内とした (Olsen et al., 2004). システイン残基のカルバミドメチル化は "fixed modification" とし, メチオニン残基の酸化は "variable modification" とした. それぞれのペプチドの identity score より mascot score の信頼性が 99% と判断されたものに関しては除外した. False-positive rate は Mascot Perl program と Matrix Science を用いて作成したランダムデータベースとの比較を行うことで算出した.

なお, 前処理以降の nanoLC-MS/MS 計測ならびにそのデータ解析については, 慶應義塾大学先端生命科学研究所増田崇氏による.

2.11. Gene Ontology 解析

解析対象とした遺伝子は *C. elegans*, *Trichinella spiralis*, *Brugia malayi*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* に共通なオーソロガス遺伝子である. *C. elegans* の全遺伝子 21,205 について KEGG Orthology (Kanehisa et al., 2004) 情報を参照することで, この 6 種に共通な 1,609 のオーソロガス遺伝子を得た. これらの遺伝子のアミノ酸配列を ClustalW (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007) を用いてアライメントすることで, 他ではロイシンに保存されているが *C. elegans* のみでグリシン GGG やイソロイシン AUA に変異している箇所ならびにその遺伝子を抽出した. なお, ClustalW はデフォルト パラメータで実行した. これらの遺伝子の Gene Ontology (GO) 解析は DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang, Sherman, and Lempicki, 2009a; 2009b) により行い, その際に使用した GO term は GO FAT で, P value < 0.01 を閾値とした.

第2章 対象と手法

表 1. ノザンプロット解析に用いたオリゴヌクレオチド。アスタリスクは主に図 10 に結果を示した acid-urea PAGE/northern blot 解析で用いたプローブである。

| Type | Anticodon | Length | Sequence - 5' to 3' |
|----------|-----------|--------|---|
| Control | Gly(GCC) | 36 | CCCGGGCCGCCCGCGTGGCAGGCAGGCATTCTACCA |
| | Ile(UAU) | 38 | TATAAGTACCACGCGCTAACCGACTGCGCCAATGGGGC |
| nev-tRNA | Gly(CCC) | 35 | CTCTGTTACCAGAAATAGGATCGGGAGTCCTACGCC |
| | Gly(CCC) | 35 | TCGAACCCGGCGCTCTGTTACCAGAAATAGGATCGGG |
| | *Gly(CCC) | 83 | TGCGGTGGACGGGATTCGAACCCGCGCTCTGTTACCAGAAATAGGATCGGGAGTC CTACGCCCTTCACCGCTCGGCCACCACCGC |
| | Ile(UAU) | 36 | ACTGGTTAACCAAATGAGATCATAAGTCTCACGCC |
| | Ile(UAU) | 36 | TCGAACCCGGCGACTGGTTAACCAAATGAGATCATA |
| | Lys(CUU) | 36 | TCGGTTAGAACCGTTGAGATCAAGTGTCTCATGCC |
| | | | * for acid-urea PAGE/northern blot analysis |

第2章 対象と手法

表 2. RT-PCR 解析に用いたオリゴヌクレオチド

| Type | Anticodon | Strand | Sequence - 5' to 3' |
|----------|-----------|-----------|--------------------------|
| Control | Gly(GCC) | sense | GCATCGGTGGTTCAAGTGGTAGA |
| | Gly(GCC) | antisense | TGCATCGACCGGAAATCGAACCC |
| | Ile(UAU) | sense | GCCCCATTGGCGCAGTCGGTTAGC |
| | Ile(UAU) | antisense | TGCCCATGCCAGGCTCGAACCTG |
| nev-tRNA | Gly(CCC) | sense | GCGGTGGTGGCCGAGCGGTC |
| | Gly(CCC) | antisense | TGCAGGTGGACGGGATTTCGAACC |
| | Ile(UAU) | sense | GCCCCGGTGGCCGAGCGGTCGAAG |
| | Ile(UAU) | antisense | TGCCCCGGCGGGATTTCGAACCC |
| | Lys(CUU) | sense | GACACGGTGGCCGAGTGGTT |
| | Lys(CUU) | antisense | TGACACGGCAGGATTTCGAACC |

第2章 対象と手法

表 3. 分子クローニングに用いたオリゴヌクレオチド

| Gene Name | Providing Restriction Enzyme | Strand | Sequence - 5' to 3' |
|------------|------------------------------|-----------|---|
| GlyRS | Nde I | sense | TAACATATGGCTACTCCGAAATTGA |
| | Not I | antisense | TAAGCGGCCGCTTCAGTTGCGCTCGCTTC |
| IleRS | Nhe I | sense | TAAGCTAGCAGCGCCTTTCGACCGT |
| | Xho I | antisense | TAACTCGAGTCGTACGAGTTGAAGAGTCT |
| LeuRS | Nde I | sense | TAACATATGTCGAAAATCAATAAGGA |
| | Not I | antisense | TAAGCGGCCGCGTTCTGGGACGTTAGC |
| SerRS | Nhe I | sense | TAAGCTAGCGTTCTCGACATTGACAT |
| | Xho I | antisense | TAACTCGAGTTCTTCCTGTCGCCCTTT |
| PF1549 | Sgf I | sense | TAAGCGATCGCCATGATAATAATAGACGGAAG |
| | Pme I | antisense | TAAGTTAACCTTAGTGTTGGTGGTGGTGCCAGGCTTCCTAACTACTC |
| luciferase | Sgf I | sense | TAAGCGATGCCATGGAAGACGCCAAAAACAT |
| | Pme I | antisense | TAAGTTAACCTTAGTGTTGGTGGTGGTGAAACCAATTGGACTTCCGC |

第3章 結果

3.1. 線虫特異的な新規 Class II tRNA

数ある tRNA のなかでも tRNA^{Ser} 及び tRNA^{Leu} (例外としてバクテリアの場合は tRNA^{Tyr}) はバリアブルアーム (variable arm; V-arm) を介在することから Class II tRNA と呼ばれ (Sprinzl et al., 1998), この構造の違いが Class II tRNA のアイデンティティに深く関与することが知られている (Breitschopf et al., 1995; Soma et al., 1999; Biou et al., 1994; Yaremchuk et al., 2002). ところが, これまでに私は, 線虫ではアンチコドン CCC や UAU といった普遍暗号に従えばグリシンやイソロイシンに対応するであろう tRNA にも V-arm 構造が存在することを明らかにした.

そこで, ここではまず, この特殊な tRNA の真核生物における一般性とその進化的保存性を明らかにするために, 44 種の真核生物における計 49,872 の tRNA 配列を Genomic tRNA Database (Chan and Lowe, 2009) より取得した. また, *Caenorhabditis japonica* 及び *P. pacificus* のゲノム配列を University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Bioinformatics database (Fujita et al., 2010) より取得し, tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) のデフォルトパラメータによって計 2,138 の tRNA を予測し取得した. これら 52,010 の tRNA の内より, 先行研究 (Sprinzl et al., 1998; Marck and Grosjean, 2002) で報告されている以下の tRNA の基本構造 (7 bp アクセプターステム, 3–4 bp D ステム, 5 bp アンチコドンステム, 5 bp T ステム, 7 nt T ループ, 7 nt アンチコドンループ) に従わない Pseudo tRNA を除去した後, Class I アンチコドンを持ちながら V-arm 構造をもつ変則的な tRNA を最終候補として取得した. その結果, *C. brenneri*, *C. briggsae*, *C. elegans*, *C. japonica*, *C. remanei*, *P. pacificus* の 6 種の線虫種より計 115 の候補の抽出に成功した (付録 1). すべての候補が線虫より見つかり他の生物種では見つからなかったため, これらの変則的な Class II tRNA を nematode-specific V-arm containing tRNA (nev-tRNA) と名付けた.

線虫における nev-tRNA の数の分布に着目してみると, *C. remanei*, *C. briggsae*, *C.*

第3章 結果

brenneri に多く存在し、特に *C. brenneri* では 56 の nev-tRNA がゲノムにコードされていることが分かる（図 3）。*C. brenneri* は他の線虫種と比較して計 1156 コピーと tRNA が豊富にコードされている種ではあるが、それを考慮したとしても nev-tRNA^{Gly} (CCC) の 22 コピーなどこの種で爆発的に増えている nev-tRNA が観察される。一方で、*C. elegans*, *C. japonica*, *P. pacificus* といった種には 6-8 程度の nev-tRNA しか存在しない。これらの 3 種は全 6 種の中では進化的に早めに分岐した線虫種であるため、nev-tRNA の数やアンチコドンの多様性は線虫進化の過程で増大していく傾向にあると言える。

nev-tRNA は様々なアンチコドンに対応しているが、中でもアンチコドン CCC, UAU をもつ nev-tRNA は線虫において広く保存されており、その数も多コピーである。興味深いことに、*C. briggsae*, *C. brenneri*, *C. elegans* では nev-tRNA^{Gly} (CCC) がゲノム上に存在する唯一のアンチコドン CCC の tRNA となっている（図 3 赤）。アンチコドン UAU の場合は、イントロン介在型の Class I tRNA^{Ile} (UAU) も存在しているが、存在比（コピー数）では nev-tRNA^{Ile} (UAU) が勝っている（図 3 黄）。*C. brenneri* では、Pro (GGG), Arg (CCU), Arg (UCU) においても nev-tRNA がドミナントに存在しており、nev-tRNA の数や進化的保存性を考慮すれば、これらが細胞内プロセスで何らかの重要な役割を担っていることが示唆される。ここで、nev-tRNA^{Ile} (UAU) はすべての線虫種で観られる nev-tRNA であるため、線虫において進化的に初期に獲得されたものである可能性が高いことは注目だ。

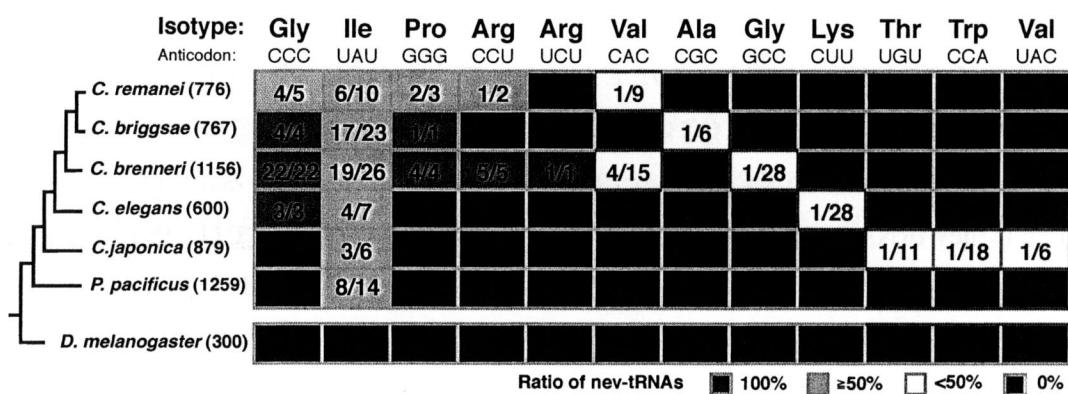


図 3. 線虫における nev-tRNA の進化的保存性。それぞれの線虫種において、各アンチコドンに対応する tRNA の内 nev-tRNA が占める割合を色で示した。100%が赤、50%以上が黄、それ以下が白である。ゲノムにコードされている全 tRNA 数を生物種名の隣に示した。たとえば *C. elegans* の Ile (UAU) ではアンチコドン UAU をもつ tRNA 全 7 種のうち、4 コピーが nev-tRNA であり、残りの 3 コピーが標準的な Class I tRNA (ただし、この場合はイントロン介在型 tRNA) であることを意味する。

3.2. nev-tRNA の配列特徴とその起源

これまで線虫における nev-tRNA の進化的保存性やその傾向を観てきたが、ここではさらに nev-tRNA の起源や進化を類推するために、線虫における代表的な tRNA 配列を用いて進化系統解析を行った。ここでは対象を絞るために、3種の線虫種, *C. brenneri* (線虫において最も多くの nev-tRNA が存在する), *C. elegans* (本研究において実験対象としている), *P. pacificus* (解析対象の計 6種のうちで、進化的に一番早く分岐している) を選択した。13種の nev-tRNA を含めた計 151 本の non-redundantな tRNA エキソン配列を用いて、Neighbor-joining 法により系統樹を作成した後 iTOL (Letunic and Bork, 2007) により描画した (図 4)。

興味深いことに、nev-tRNA のうち Ile (UAU), Gly (CCC), Arg (CCU), Lys (CUU) は Class II tRNA のクレードに属し、中でも tRNA^{Leu} (UAA) ファミリーと進化的に近いことが分かった。むしろ、これらの nev-tRNA の同義にあたる Class I tRNA^{Ile} (UAU) や tRNA^{Gly} (GCC) とは全く別にクラスター化された。nev-tRNA^{Ile} (UAU) や nev-tRNA^{Gly} (CCC) が多くの線虫種で保存されていることを考慮すれば、これらの結果は少なくとも主要な nev-tRNA に関しては、同義 tRNA の遺伝子重複によるものではなく、Class II tRNA を起源に派生してきた可能性が高いことを示唆する。しかし、別の Class I tRNA ファミリーにクラスター化された nev-tRNA (*C. brenneri* の 6種, Pro (GGG) など) も存在するため、nev-tRNA の獲得は tRNA 進化の過程で独立に二度生じた可能性がある。なお、*C. brenneri* には 2種の tRNA^{Leu} (UAA) がコードされているが、一方は nev-tRNA^{Arg} (CCU) との配列類似性が 91.6% と高いため (もう一方は 55.9%), nev-tRNA から派生したものだと考えられる (図 4 アスタリスク)。

続いて、nev-tRNA の配列と二次構造の特徴を同義 tRNA 及び tRNA^{Leu} (UAA) と比較することで分析した (図 5)。ここでは nev-tRNA^{Gly} (CCC), nev-tRNA^{Ile} (UAU), Class I tRNA^{Gly} (GCC), Class I tRNA^{Ile} (UAU), tRNA^{Leu} (UAA) を対象とした。それぞれの nev-tRNA は標準的なクローバーリーフ型の二次構造を形成し、真核生物 tRNA において広く保存されている A-box (5'-TGGCNNAGTGG-3'), B-box (5'-GGTCGANNNCC-3') と呼ばれる内在性プロモータ (Galli et al., 1981) をもち、15–16 塩基からなる V-arm を介在するという特徴がある。また、(大きくは違わないが)それぞれの同義 tRNA との配列類似性 (56.3% または 64.9%) よりも tRNA^{Leu} (UAA) との配列類似性 (64.3% または 69.0%)

第3章 結果

が高く、この結果は図4の進化系統解析の結果と関連する。中でも nev-tRNA^{Ile} (UAU) と tRNA^{Leu} (UAA) との配列類似度は約70%と高く V-arm など二次構造上も類似しており、このことは、進化保存性の解析結果（図3）と合わせ、nev-tRNA^{Ile} (UAU) が nev-tRNA の起源であり、tRNA^{Leu} (UAA) を元に派生した可能性（たとえば遺伝子重複後にアンチコドン3塩基目に変異が入るなど）を示唆する。さらに、重要なこととしては、tRNA^{Leu} (UAA) のV-arm や D-arm 上に存在する LeuRS の認識サイトとして知られる部位（Breitschopf et al., 1995; Soma et al., 1999）は、この二種の nev-tRNA 上にも存在していることが挙げられる。tRNA^{Leu} との配列及び構造の類似性から推測するに、nev-tRNA は自身のアンチコドンに対応するアミノ酸ではなく、LeuRS による認識を受け、ロイシンをチャージする可能性があるのだ。

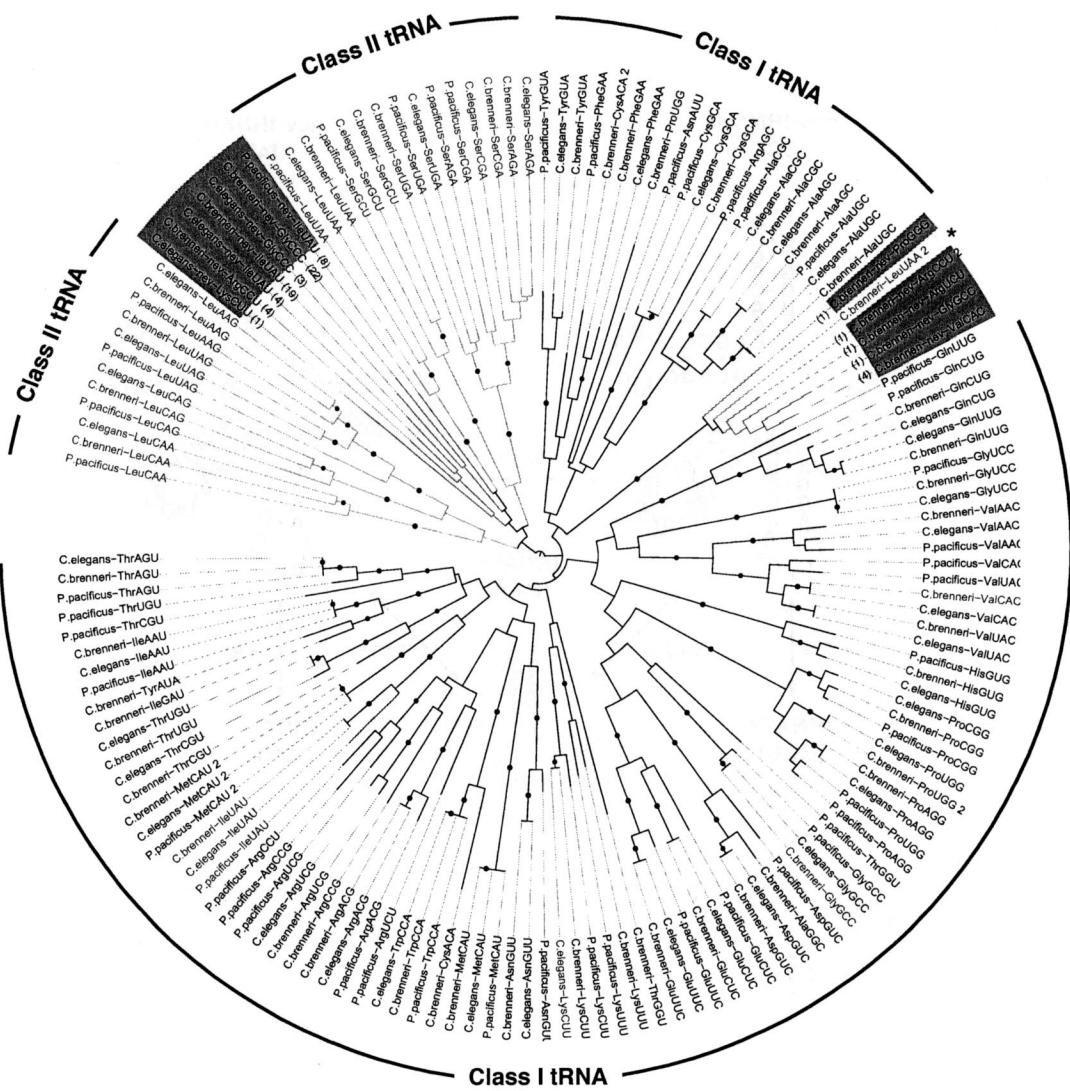


図 4. 線虫 tRNA の進化系統樹. *C. elegans*, *C. brenneri*, *P. pacificus* における全種の tRNA 配列の Neighbor-joining 法による進化系統樹を ClustalW (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007) を用いて作成し, iTOL (Letunic and Bork, 2007) によって描画した. nev-tRNA は赤, tRNA^{Leu} 及び tRNA^{Ser} は黄, nev-tRNA と同義アンチコドンをもつ tRNA は青, その他を黒で示した. nev-tRNA に関してはコピー数を表示した. 黒い点はブートストラップ値が 80 以上のものである. *C. brenneri* は 2 種の tRNA^{Leu} (UAA) をもつが, 一方は nev-tRNA^{Arg} (CCU) の配列に酷似しているため nev-tRNA としてカテゴリライズされている (アスタリスク).

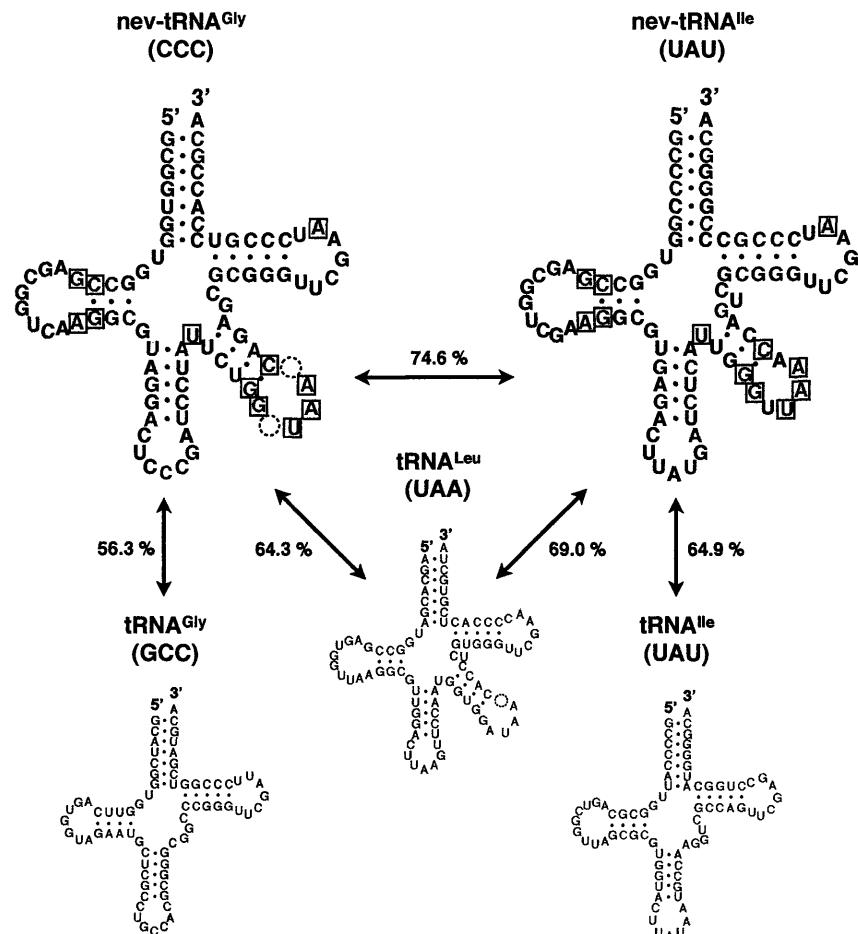


図 5. nev-tRNA と関連 tRNA との塩基配列及び二次構造の比較. nev-tRNA^{Gly} (CCC) と Class I tRNA^{Gly} (GCC) 間でのみ保存されている塩基を青で, nev-tRNA^{Ile} (UAU) と Class I tRNA^{Ile} (UAU) 間でのみ保存されている塩基を黄で, 二種の nev-tRNA と tRNA^{Leu} (UAA) 間で保存されている塩基を赤で示した. V-arm 介在型の 3 つの tRNA 間で共通する塩基は四角で囲った. それぞれの tRNA 間の配列類似度はパーセンテージで示している.

3.3. *C. elegans*において nev-tRNA は低発現している

これまでの一連のバイオインフォマティクス解析により, nev-tRNA は tRNA^{Leu} を起源に派生した可能性が高く, 線虫において広く保存されていることが示唆された。しかし, nev-tRNA が実際に生体内において発現し, 機能しているかどうかは未だ明らかになつていない。そこで, *C. elegans* を対象に northern blot 解析を行うことでその発現レベルを検証した。用いた RNA サンプルは mixed-stage (egg, larvae 1-4, adults) より調製した total RNA で, ハイブリダイゼーションに用いたプローブは表 1 に示した。その結果, 低発現ながら nev-tRNA^{Gly} (CCC) 及び nev-tRNA^{Ile} (UAU) の発現を確認することができた(図 6)。しかし, nev-tRNA^{Lys} (CUU) の発現は確認できなかつた。そこで, northern blot 解析と比べ高感度にトランスクリプトを同定することが可能な RT-PCR 解析を行つたところ, nev-tRNA^{Lys} も含めた全種の nev-tRNA の発現ならびにその配列を確認することができた(図 7)。

図 6 からも明らかなように nev-tRNA は非常に低発現である。nev-tRNA^{Lys} に至つては northern blot 解析では検出することができず, RT-PCR 解析でやつとという発現レベルである。そもそも tRNA の発現解析は, northern blot にしても RT-PCR にても成熟 tRNA 上に数多く存在する修飾塩基が, ハイブリダイゼーションやアニーリング反応効率を低下させるため一般的に難しいとされている。このことを考慮したとしても, 概算で少なくとも 10 倍以上は通常の tRNA と比べその発現は低い。前節で述べたように内在性のプロモータの存在は確認しているが, 今後, 遺伝子の上流に存在するであろうプロモータ配列の解析も行うことで, この低発現の理由の一端を考察する必要がある。例えば, ヒートショックや外的ストレス誘導型のシグナル配列が存在する可能性なども考えられる。

図 7において, nev-tRNA のレーンで 70 塩基程度のバンドが観察されなかつたことにも注目したい。nev-tRNA の V-arm は本来存在するべきでない tRNA^{Gly} や tRNA^{Ile} に介在するものであるために, 転写後にスプライシングアウトされるイントロン配列なのではないかと考えることもできる。尤も, 真核生物ではアンチコドンのすぐ下流の位置(37/38) 以外にイントロンを介在する tRNA の報告例はないが, 古細菌では 45/46 の位置などにイントロンが介在している例などがある(Marck and Grosjean, 2002; Sugahara et al., 2009)。nev-tRNA に介在する V-arm をイントロンとした場合, RT-PCR を行うとイント

第3章 結果

ロン介在時の前駆体 tRNA (85 塩基程度) と切り出された後の成熟 tRNA (70 塩基程度) の 2 種のバンドが観察されるはずである。ところが、図 7 が示すところそれが観察されないということは、V-arm がイントロンであるという仮説は完全に棄却され、tRNA の一部として機能する構造であることが強く示唆される。

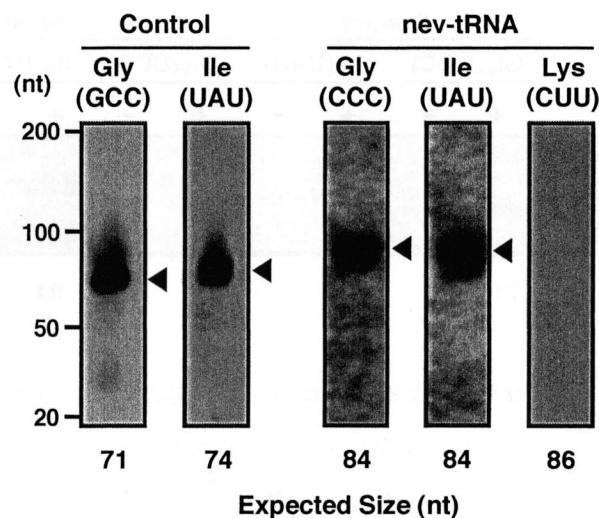


図 6. *C. elegans* における nev-tRNA の northern blot 解析. *C. elegans* より見つかった nev-tRNA^{Gly} (CCC), nev-tRNA^{Ile} (UAU), nev-tRNA^{Lys} (CUU) とコントロールにこれらの同義 tRNA にあたる tRNA^{Gly} (GCC) と tRNA^{Ile} (UAU) の northern blot 解析の結果を示した. 黒三角で情報解析によって予測された転写物のサイズの位置を示した. nev-tRNA^{Lys} は, 1 レーンあたりの total RNA の量を 30 μ g まで上げても検出できなかった. なお, nev-tRNA のシグナルは濃く焼いている.

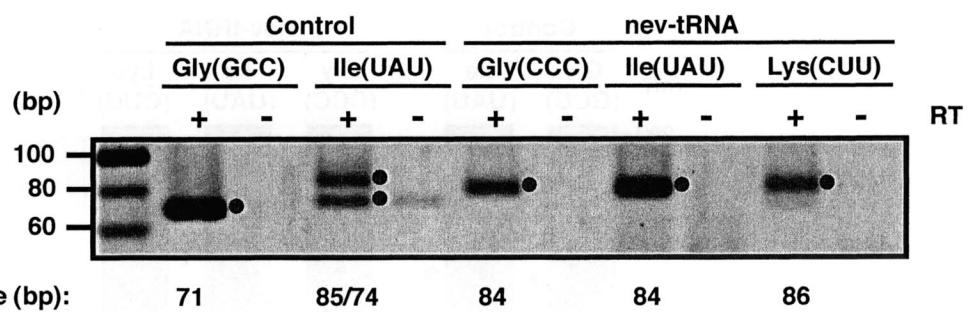


図 7. *C. elegans* における RT-PCR 解析による nev-tRNA の発現確認. *C. elegans* において予測された 3 種の nev-tRNA 及びその同義 tRNA (Control) の発現レベルを RT-PCR によって同定した. ネガティブコントロールとして用いた逆転写酵素無添加 (RT-) ではバンドは観察されず, 逆転写酵素依存にその発現が確認できる (RT+). 期待されるサイズの位置を赤いドットで示している. なお, コントロールとして用いた tRNA^{Ile} (UAU) はインtron介在型 tRNA であるため, 前駆体／成熟 tRNA の 2 種のバンドが観察された.

3.4. nev-tRNA^{Gly} 及び nev-tRNA^{Ile} はロイシンへアミノアシル化される

nev-tRNA のアンチコドンは普遍遺伝暗号表においてはグリシンやイソロイシンに対応するにも関わらず、これらの tRNA 上には V-arm や 3'末端の A 塩基といった LeuRS の認識部位が広く保存されて存在している。そこで、細胞内における nev-tRNA の機能についてさらに言及するために、続いて nev-tRNA がチャージするアミノ酸の種類を決定した。そのために、*C. elegans* の aaRS4 種類、GlyRS, IleRS, SerRS, LeuRS の遺伝子をクローニングし、大腸菌にて過剰発現し、HisTag のピークとして精製した（図 8）。これらの組換え体 aaRS と *in vitro* で転写し合成した tRNA を用いてアミノアシル化試験管内再構成実験を行った。まずコントロールとして用いた tRNA は、アンチコドンに対応するアミノ酸が、対になる aaRS によってチャージされた（図 9A 左）。同一条件で、nev-tRNA^{Gly} (CCC) や nev-tRNA^{Ile} (UAU) についてもアッセイしたところ、いずれの場合も対応するアミノ酸（それぞれグリシン、イソロイシン）やセリンは付加されなかつた。ところが、予想した通り LeuRS 存在下にロイシンのチャージが観察された（図 9A 右）。アミノアシル化効率やその特異性をタイムスケールで観察したところ、nev-tRNA のロイシル化は tRNA^{Leu} (AAG) のそれの効率には劣るもの、GlyRS や IleRS によるアミノアシル化はほぼ受けないことが示唆された（図 9B）。

前述の通り tRNA 上には多くの転写後修飾が存在し、これら修飾塩基の存在が aaRS による tRNA 認識に影響を与えることが知られている（Stern and Schulman, 1978; Szweykowska-Kulinska et al., 1994）。*in vivo* で修飾を受けた nev-tRNA も同様にロイシンをチャージするのか？このことを検証するために、total RNA を鑄型にアミノアシル化アッセイを行った後に、northern blot 解析を行い目的のネイティブな nev-tRNA のアミノアシル化の検出を試みた。ところが、nev-tRNA の発現レベルが非常に低いためか、これまで用いていたプローブでの検出は困難であった。そこで、nev-tRNA^{Gly} の完全長に相補的な比較的長鎖のオリゴヌクレオチドプローブ（表 1 アスタリスク）を設計することで、その検出感度の向上を試みた。ただし、プローブ配列は長くすることで感度を上げることができる反面、非特異的な転写物にもハイブリダイゼーションしやすくなる場合がある。そこで、当プローブを用いて *in vitro* で合成した nev-tRNA^{Gly}, tRNA^{Gly} (GCC), tRNA^{Leu} (AAG) に対して 50, 55, 60, 65 °C の 4 条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、50 °C では tRNA^{Leu} (AAG) に対する非特異的結合が観られるが、55 °C 以上ではそれはほとんど観られなかった（図 10A）。65 °C 以上になると nev-tRNA^{Gly} (CCC) に対する

第3章 結果

る結合力も落ちてしまうため、ここでは 60 °C で実際の反応を行うこととした。その結果が図 10B である。Total RNA に対して LeuRS を加えて反応させたサンプルからはアミノアシル化 nev-tRNA^{Gly} が検出されたが、GlyRS を加えて反応させたサンプルからは検出されなかった。このことは、*in vivo* で修飾を受けた nev-tRNA^{Gly} も同様に LeuRS によりロイシンをチャージし、GlyRS によるグリシンのチャージは受けないことを示唆している。ゆえに、nev-tRNA は *in vivo* においても *in vitro* においても特異的にロイシンをチャージすることが明らかになった。

LeuRS による認識を受ける nev-tRNA 上のポジション (= nev-tRNA のアイデンティティ要素) を決定するために、いくつかの認識サイトに変異を入れた nev-tRNA^{Gly} (CCC) バリアントを作成し、更なるアミノアシル化アッセイを行った。繰り返しになるが V-arm 領域は Class II tRNA 認識の主要な決定因子であり (Breitschopf et al., 1995; Soma et al., 1999; Biou et al., 1994; Yaremchuk et al., 2002), *Pyrococcus horikoshii* の LeuRS-tRNA^{Leu} 複合体の X 線構造解析によると LeuRS と突出した C 末ドメインが V-arm の先端の数塩基を認識することが知られている (Fukunaga and Yokoyama, 2005). *C. elegans* は tRNA^{Leu} のアイソアクセプターを 5 種もつが、nev-tRNA の V-arm と一番類似した配列をもつのが tRNA^{Leu} (UAA) であり、V-arm の先端の 2 塩基 (U47b, A47c) は tRNA^{Leu} (CAA) でも共通である (図 11A)。変異体を用いたアミノアシル化実験によると、nev-tRNA^{Gly} の V-arm は完全に欠如するとロイシル化効率は著しく低下し (図 11B, M1)，先端の 2 塩基を GG に置換すると 2 倍弱効率が低下することがわかった (図 11B, M2)。これらの結果は tRNA^{Leu} の認識とほぼ同様に、nev-tRNA のロイシル化の決定を担っている部位が先端 2 塩基を中心とした V-arm であることを示唆している。

tRNA^{Leu} の認識において V-arm と並んで決定的な要素であるポジション 73 の A の塩基 (A73) は、*E. coli* (Asahara et al., 1993) から yeast (Soma et al., 1996), human (Breitschopf et al., 1995) にかけて広く保存されている。*C. elegans* においても同様で 5 種の tRNA^{Leu} はすべて A73 をもち、反対に tRNA^{Ser} は G73 をもつ (図 11A)。ここで、線虫における nev-tRNA 115 種のすべてが A73 であるという点は注目に値し、実際に nev-tRNA を G73 に置換するとロイシル化はほぼ起こらない (図 11B, M3)。これら nev-tRNA 上に強く保存されている A73 と V-arm 構造の存在は、nev-tRNA が LeuRS に認識されるように進化圧を受けている可能性を示唆している。

Total RNA を鋳型にアミノアシル化アッセイを行うことで、*in vivo* で修飾を受けた

第3章 結果

tRNA のアミノアシル化を観察することは可能である。ただし、total RNA 中には様々な tRNA が混在するために、特定のアミノアシル化 tRNA のみを検出したい場合は northern blot 解析を間に挟む必要があり、実際に図 10においてもこのコンビネーションにより ネイティブな nev-tRNA^{Gly} のアミノアシル化を観察した。Northern blot 解析を行うためやはり目的の tRNA 以外のものも混在してしまい、今回はハイブリダイゼーションと洗浄の温度を 60 °C まで上げることでその可能性を極力下げるよう努めたが、わずかに tRNA^{Leu} との結合も存在しているというのが厳密な解釈である（図 10A）。特に、nev-tRNA の発現は tRNA^{Leu} の発現に比べ圧倒的に劣るため、nev-tRNA のアミノアシル化を観ているつもりで非特異的に結合した tRNA^{Leu} のそれを観ている可能性もある。より明確に nev-tRNA が特異的にロイシンをチャージするということを示すには、1) ストレプトアビジンカラムなどを介して目的のネイティブな nev-tRNA を単離した後にアミノアシル化アッセイを行い、2) LC-MS によって tRNA 上に存在する修飾をすべて同定する、などの工夫が必要である。

アミノアシル化実験で用いた aaRS はすべて C 末に HisTag を付加し精製した組み換え体タンパク質である。ここも厳密性を要求するならば、N 末に HisTag を付加したもの、もしくは HisTag を精製後に除去したものを用いるべきである。古細菌と高等真核生物ではその様式が異なることもあるが、*Pyrococcus horikoshii* の LeuRS-tRNA^{Leu} の複合体の X 線構造解析で明らかにされているように、aaRS の C 末のドメインがそのアミノアシル化効率に深く寄与している場合があるからである（Fukunaga and Yokoyama, 2005）。

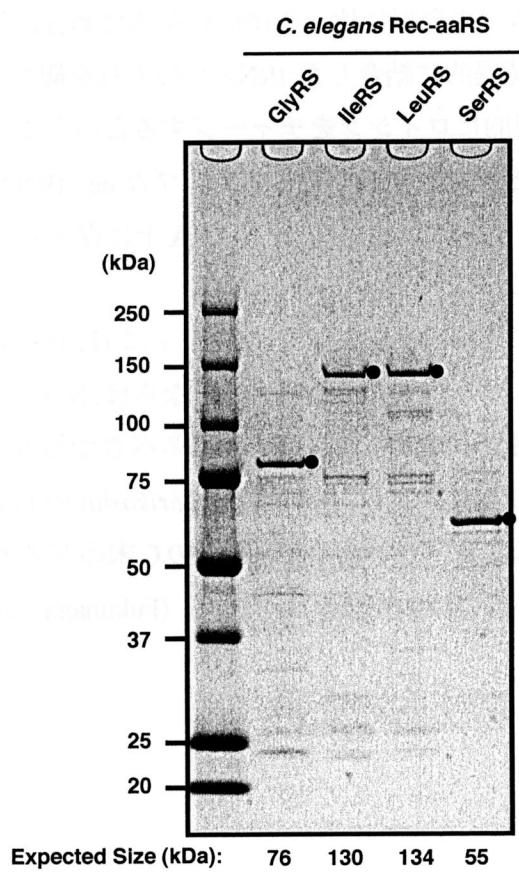


図 8. *C. elegans* の組換え体 aaRS の SDS-PAGE. Ni^{2+} のアガロース樹脂のスピンカラムを用いて His-tag の組換え体 aaRS 酵素を精製した後、ゲルろ過を行った (対象と手法参照)。サンプルは 10-20% 勾配ゲルの SDS-PAGE を行い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した。精製した目的の aaRS の位置は赤で示した。

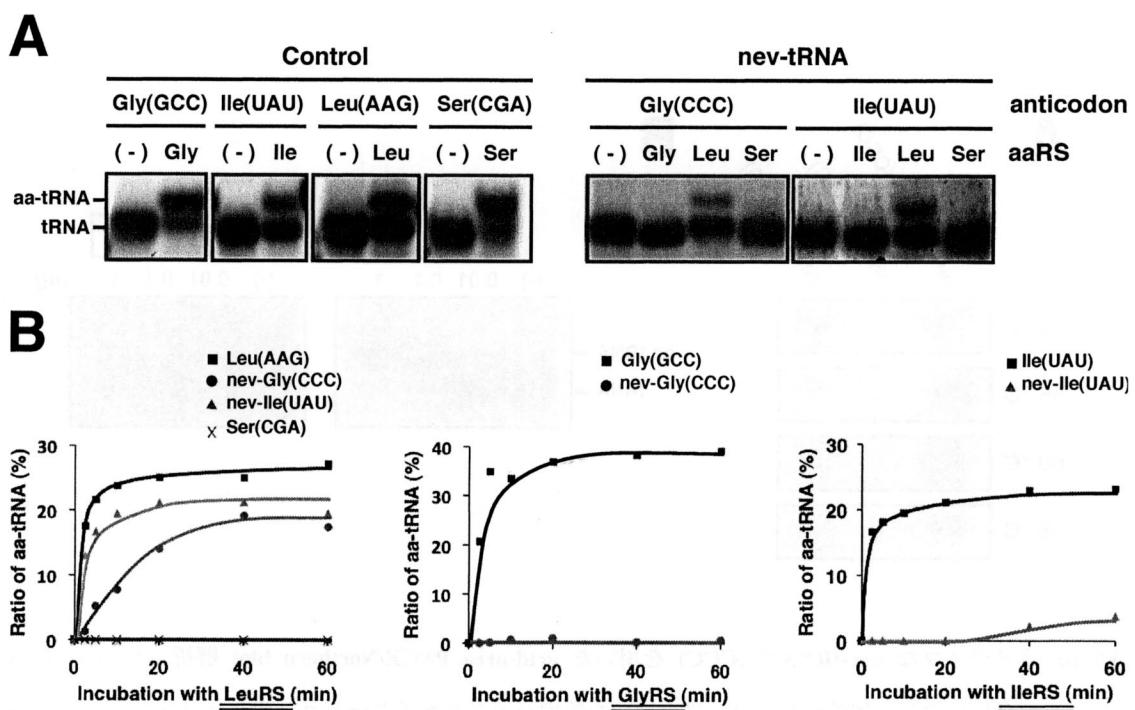


図 9. nev-tRNA のアミノアシル化アッセイ。(A) *In vitro* 転写により合成した4種のcontrol tRNA, nev-tRNA^{Gly} (CCC) 及び nev-tRNA^{Ile} (UAU) のアミノアシル化を4種の組み換え体 aaRS (GlyRS, IleRS, SerRS, LeuRS) を用いて行った。アミノアシル化 tRNA (aminoacylated tRNA; aa-tRNA) は acid-urea PAGE で電気泳動分離し, SYBR Green II で染色した。(B) nev-tRNA のアミノアシル化効率を 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 分のタイムスケールで測定した。LeuRS による tRNA^{Leu} (AAG), tRNA^{Ser} (CGA), 2種の nev-tRNA のロイシル化 (左), GlyRS による tRNA^{Gly} (GCC) と nev-tRNA^{Gly} (CCC) のグリシル化 (中央), IleRS による tRNA^{Ile} (UAU), nev-tRNA^{Ile} (UAU) のイソロイシル化 (右) をそれぞれ示している。

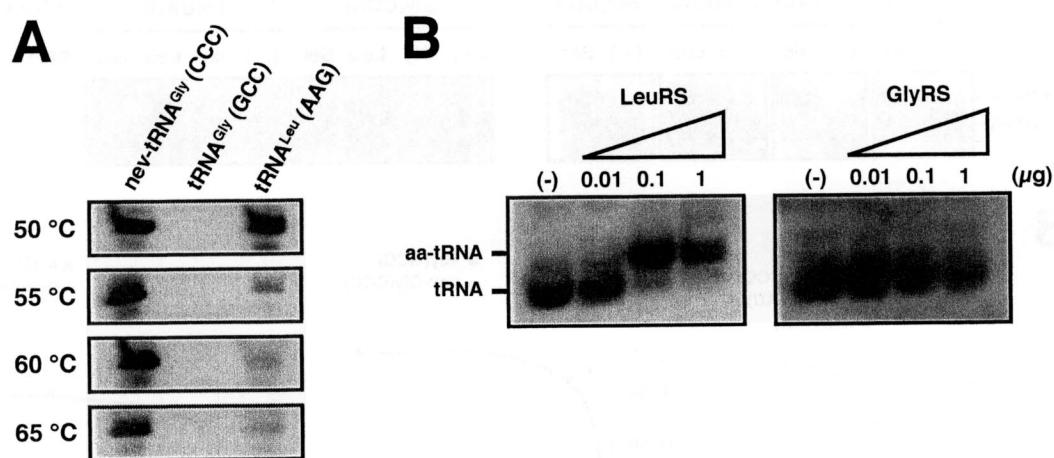


図 10. ネイティブな nev-tRNA^{Gly} (CCC) を用いた acid-urea PAGE/Northern blot 解析. (A) nev-tRNA^{Gly} (CCC) の全長に対して相補的なプローブを用いた際のハイブリダイゼーションのストリングエンサーの検討. ハイブリダイゼーションと洗浄を 50, 55, 60, 65 °C の 4 条件で行い, それぞれの条件における *In vitro* 転写により合成した nev-tRNA^{Gly} (CCC), tRNA^{Gly} (GCC), tRNA^{Leu} (AAG) の検出を試みた. (B) acid-urea PAGE/Northern blot 解析によるネイティブ nev-tRNA^{Gly} のアミノアシル化の検出. アミノアシル化アッセイは, 0.01 から 1 μg のタイトレーションつけた LeuRS もしくは GlyRS を用いて室温で 60 分行った.

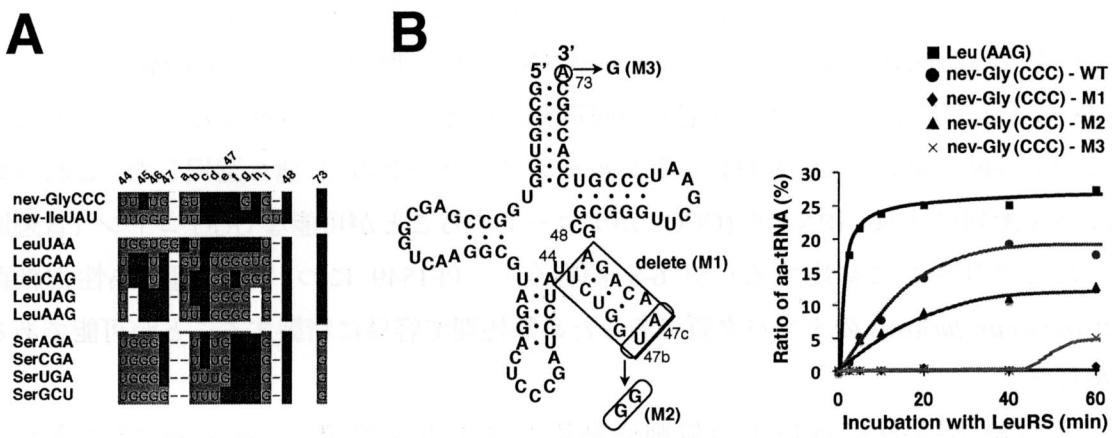


図 11. nev-tRNA^{Gly} (CCC) 上の LeuRS の認識サイトの変異実験。(A) *C. elegans* における nev-tRNA も含めた Class II tRNA の V-arm 配列と 3'末端塩基 (ポジション 73) をアライメントしたもの。アライメント上部にはヌクレオチドポジションを示しており、これは先行研究で定められたものによる (Sprinzl et al., 1998)。(B) 本研究で使用した nev-tRNA^{Gly} (CCC) のバリエントの概略図 (左)。コントロールとして tRNA^{Leu} (AAG), ワイルドタイプの nev-tRNA^{Gly} (WT), 3 種の nev-tRNA^{Gly} バリエント (M1-3) のロイシル化効率 (右)。なお、それぞれのアッセイは 2 回以上ずつを行い再現性を確認している。

3.5. nev-tRNA^{Gly} は *in vitro* でタンパク質合成に用いられる

これまでの一連の解析により, nev-tRNA は自身のアンチコドンには対応しないアミノ酸(ロイシン)をチャージする特性があることは分かったが, 実際にこの tRNA はタンパク質合成に用いられるのだろうか? 仮にタンパク質合成に用いられるとするならば, それは線虫で普遍遺伝暗号に従わない翻訳が生じていることになる。ただ, nev-tRNA の発現は通常の tRNA と比べ非常に低いため, プロテオームを単に分析したとしても nev-tRNA を介したロイシンの取り込みを高感度で検出することは難しいと想定される。そこで, nev-tRNA が少なくともリボソームに取り込まれ, 翻訳に用いられ得るのかどうか検証するために, これら nev-tRNA と無細胞系を用いて *in vitro* 翻訳を行い, MS による合成されたペプチド配列の同定を試みた。ここでは合成するタンパク質として, PF1549 (Sato et al., 2011) とホタルルシフェラーゼの 2 種を選択した。これらの mRNA 配列には nev-tRNA^{Gly} (CCC) がデコードすることが可能な GGG コドン(普遍暗号だとグリシンに対応する)が 6-8 個存在し, PF1549 については超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* のタンパク質であるため熱処理で容易に精製することが可能であるからだ。

In vitro 翻訳反応は昆虫の無細胞翻訳システムを利用し, *in vitro* で合成した nev-tRNA^{Gly} もしくはコントロールとして tRNA^{Leu} (AAG) を加えた。マグネットビーズによる部分精製後, SDS/PAGE によりそれぞれのタンパク質が目的のサイズで合成されていることを確認した(図 12)。続いて, nev-tRNA^{Gly} を加えた無細胞系で, GGG コドンがロイシンに翻訳されたペプチドが合成されているかどうか nanoLC-MS/MS により分析した(同定された全ペプチド情報は付録 2 を参照)。その結果, PF1549 の場合もルシフェラーゼの場合も nev-tRNA^{Gly} を加えた時にのみ, GGG コドンがロイシンに翻訳されたペプチドが検出された(表 4, 図 13)。MS ではロイシンとイソロイシンを区別することはできないが, *in vitro* アミノアシル化の結果より nev-tRNA^{Gly} はイソロイシンをチャージしないことが示唆されているため, これらの残基はロイシンである可能性が高い。また, GGG コドンがグリシンへ翻訳されたペプチドも検出されているが, これは無細胞系由来の昆虫の tRNA^{Gly} (UCC) の G-U ゆらぎ塩基対(Varani and McClain, 2000)による認識によるものだと考えられる。以上の結果は, 少なくとも *in vitro* レベルでは nev-tRNA^{Gly} は真核生物のリボソームに翻訳時に取り込まれ, mRNA 上の GGG コドンを認識しロイシンへ翻訳できることを強く示唆している。

第3章 結果

今回、無細胞系に外部から加えた nev-tRNA^{Gly} は *in vitro* 転写により合成したものである。当然 3'末端にアミノ酸は付加されていないため、ここでの結果は nev-tRNA が昆虫の翻訳系で実際にロイシンにアミノアシル化されたことを示している。ただし、*C. elegans* の生体内で修飾を受けた tRNA を用いているわけではないため、1) そのような場合もロイシンをチャージするのか、2) アンチコドンに修飾や RNA editing などが起きて別のコドンをデコードすることはないのか、といった点については未解決である。nev-tRNA^{Gly} の場合はアンチコドンが CCC であるためどんな修飾が入ったとしてもロイシンコドンを読むことは不可能であるが、nev-tRNA^{Ile} (UAU) の場合はアンチコドン未修飾であると開始コドン AUG も読むことが可能であるため、修飾の有無によってデコードするコドンの種類が変わってくるからだ。コドン AUA のデコードは、イソロイシン 3 (AUU, AUC, AUA)：メチオニン 1 (AUG) という不均一に割り当てられたコドンボックスであることも理由して複雑であり、古細菌では tRNA^{Ile} (CAU) の 1 塩基目がアグマチジン (agm²C) に修飾されることで AUG コドンの誤読を回避していることなどが知られている (Terasaka et al., 2011; Osawa et al., 2011)。

第3章 結果

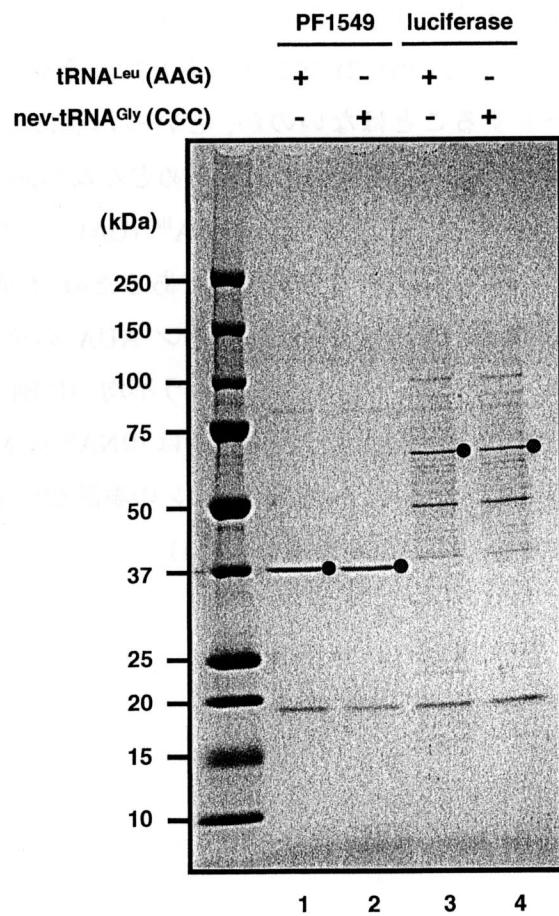


図 12. *In vitro* 翻訳で合成したタンパク質の精製とその SDS-PAGE. His-tag を付加した組み換え体タンパク質を、無細胞翻訳系で合成した後にマグネットビーズで精製した（対象と手法参照）。サンプルは 10-20% の勾配ゲルで SDS-PAGE を行い、CBB で染色した。レーン 1-2 が *in vitro* で翻訳した PF1549 (37kDa) で、レーン 3-4 がルシフェラーゼ (61kDa) である。翻訳反応で外部から加えた tRNA は、レーン 1, 3 が tRNA^{Leu} (AAG), レーン 2, 4 が nev-tRNA^{Gly} (CCC) である。赤い点で精製した組み換え体タンパク質の位置を示している。

第3章 結果

表 4. nev-tRNA^{Gly} を用いた *in vitro* 翻訳解析. PF1549 もしくは Luciferase を tRNA^{Leu} (AAG) / nev-tRNA^{Gly} (CCC) 存在下で *in vitro* 翻訳により合成した. GGG コドン由来の残基 (赤) が含まれたペプチドのみを示している. nev-tRNA を加えた時にのみ検出されたペプチド配列とその Mascot Score を灰色のバックグラウンドで示した. なお Mascot Score は 4 回の計測のうち一番高かったものを採用した.

| Protein Name | Sequence | Modification | Mascot Score (n = 4) | |
|--------------|--------------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------|
| | | | tRNA ^{Leu} (Control) | nev-tRNA ^{Gly} |
| PF1549 | GGGIVAGYVVPWIER | | 45.0 | 37.4 |
| PF1549 | GGGIVAGYVVPWIERK | | 57.6 | 44.5 |
| PF1549 | GKPAEEVGREAAQELLSQVK | | 69.1 | 63.3 |
| PF1549 | KGKPAEEVGREAAQELLSQVK | | 74.9 | 73.6 |
| PF1549 | KLANAKVEGAEVGSR | | 75.1 | 83.4 |
| PF1549 | LANAKVEGAEVGSR | | 49.2 | 61.8 |
| PF1549 | GGLIVAGYVVPWIER | | - | 46.1 |
| PF1549 | GGLIVAGYVVPWIERK | | - | 20.1 |
| PF1549 | KLKPAEEVGR | | - | 42.8 |
| PF1549 | KLKPAEEVGREAAQELLSQVK | | - | 20.3 |
| PF1549 | LKPAEEVGR | | - | 30.5 |
| PF1549 | LKEPAEEVGREAAQELLSQVK | | - | 42.1 |
| PF1549 | VEGAEVLSR | | - | 63.0 |
| Luciferase | EVGEAVAK | | 25.7 | 29.1 |
| Luciferase | RFHLPGIR | | 39.3 | 43.5 |
| Luciferase | STLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSK | | 110.2 | 113.4 |
| Luciferase | TIALIMNSSGSTGLPK | Oxidation@M:6 | 122.0 | 121.6 |
| Luciferase | VVDLDTGK | | 40.6 | 37.0 |
| Luciferase | EVLEAVAK | | - | 25.9 |
| Luciferase | RFHLPLIR | | - | 25.4 |
| Luciferase | STLIDKYDLSNLHEIASLGAPLSK | | - | 71.6 |
| Luciferase | TIALIMNSSGSTLLPK | | - | 91.6 |
| Luciferase | VVDLDTLK | | - | 47.3 |

第3章 結果

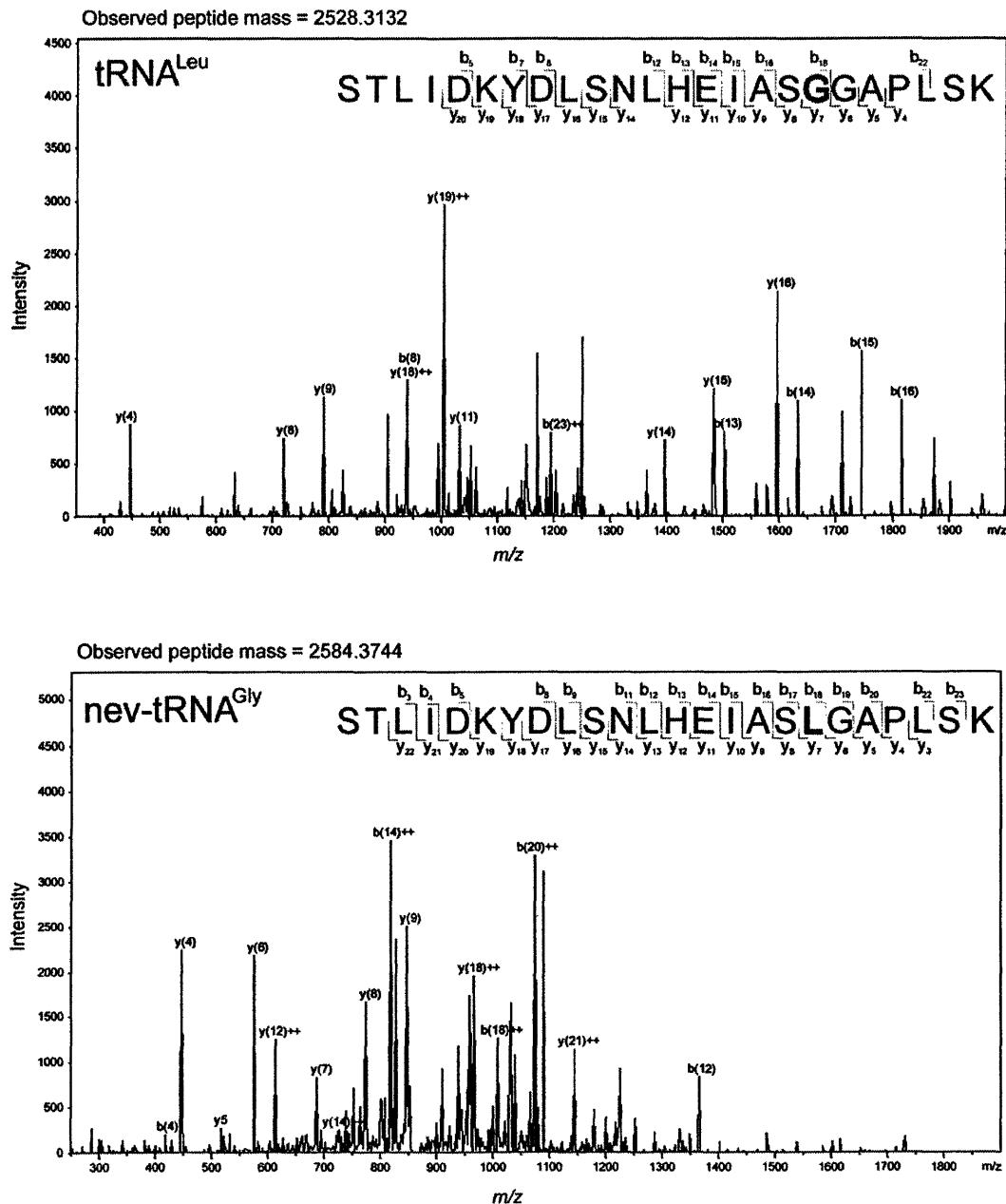


図 13. GGG コドン由来の残基を含んだペプチドの MS/MS スペクトルの比較。tRNA^{Leu} (AAG) もしくは nev-tRNA^{Gly} (CCC) を含んだ無細胞系において合成したルシフェラーゼ由来のペプチド STLIDKYDLSNLH EIAS(G/L)GAPLSK を比較した。この解析において検出されたフラグメントイオンを示しており、GGG コドン由来の残基の位置は赤で表示した。

第4章 議論

現在、遺伝暗号の変化の機構として有力な説とされるのがコドン捕獲説である (Osawa and Jukes, 1989). 暗号変化が中間状態を経ずに直接的に起きれば、塩基配列は変化しないがタンパク質上のあるアミノ酸が一斉に変化してしまうため、Crick が偶然凍結説で主張したように細胞にとって有害であり、こうした置換は致死的だと考えられる。そこでコドン捕獲説ではまず、AT 圧や GC 圧など方向性のある変異圧などにより、あるコドンは適当な同義コドンに置き換えられ非指定コドンとなり (Kano et al., 1991), 消失したコドンに対応する tRNA は不要となり変異が蓄積し Pseudo tRNA となる。続いて、先ほどとは逆方向の変異圧により再び非指定コドンがゲノム上に現れた時、同時にそのコドンを翻訳可能な tRNA が遺伝子重複などで出現すれば、消失前とは別の意味がそのコドンに与えられることになる。例えば、その新しく出現した tRNA がロイシン用であったらそのコドンはロイシンに”捕獲”されるわけだ。その結果、塩基配列は変化するが、タンパク質のアミノ酸配列は変化しない。コドン捕獲説でのポイントは一連の無害な中立的な変化を伴うということで、1) アミノ酸コドンの同義コドンへの変換による一時的なゲノム上からの消失と、2) そのコドンを翻訳する tRNA の消失が必要とされる。

これらのこと考慮した上で本研究のケースを振り返ると、二点の大きな疑問点が挙げられる。1つ目は、同一コドンをそれぞれ異なるアミノ酸へ翻訳可能な 2 種以上の tRNA が存在していることである。nev-tRNA^{Gly} (CCC) の場合は GGG コドン翻訳用であるが、Class I tRNA^{Gly} (UCC) も G-U ゆらぎ塩基対によってデコード可能である。nev-tRNA^{Ile} (UAU) の場合は AUA コドン翻訳用であるが、こちらはさらに話が単純で同一アンチコドンをもつ Class I tRNA^{Ile} (UAU) が存在しているのだ。前述した通り、暗号変化の際には変更前のアミノ酸へ翻訳する tRNA は消失していなければ成り立たず、同一コドンを翻訳可能な tRNA が競合することはあり得ない。仮に GGG や AUA コドンが非指定コドンであれば、暗号変化の中間状態である可能性がないわけではない。しかし実際は、比較的マイナーコドンである傾向は示すものの非常に稀というほどではなく(表 5), *C. elegans* では全 23,801 の CDS 中 GGG は 16,704 の、AUA は 18,849 の CDS 上に存在する。

2つ目は、ロイシンコドンからそれぞれのコドンへの再割り当てを起こすのが相当に難しいことである。コドン捕獲説で主張されているように、非普遍暗号を含むと考えられる遺伝子のアミノ酸配列は、自身の重複遺伝子もしくは普遍暗号を使用する生物種の同じ遺伝子のアミノ酸配列と等しい。ゆえに、このケースで GGG コドンや AUA コドンがロイシンをコードするようにコドンの再割り当てを起こすためには、遺伝子上のロイシンコドンの位置が GGG や AUA コドンに変化しなければならない。ロイシンコドンから GGG コドンへの変化では、どのようなステップを経たとしてもいくつかコドンを中継していかなければならない。このような変異は常に負の選択圧に曝されるため、複数の変異ステップを経なければならぬロイシンコドンから GGG コドンへの再指定は考えにくい。一方で、ロイシンコドンから AUA コドンへの変化は比較的容易に思える。たとえば、UUA コドンの一塩基目が A に変化すれば良いのだが、このような方向性のある変異は存在するだろうか？

ゆえに、線虫における nev-tRNA の存在は普遍遺伝暗号の変化もしくはその中間状態を捉えたものでもないと考える。では一体 nev-tRNA はどのように獲得され、何のために存在するのだろうか？そもそも nev-tRNA^{Gly} (CCC) はタンパク質配列中のグリシンを無差別にロイシンに変異させるため、生物にとって有害であり強い負の選択圧に曝されてきたと考えるのが自然である。それが逆に、線虫進化の過程で遺伝子数が増大するようなことがあるのだから（図 3），そこには何らかの意味のある機能があるに違いない。

nev-tRNA は様々なコドンに対応し得る多様なアンチコドンをもつが、その中でも nev-tRNA^{Ile} (UAU) がその起源である可能性がある。nev-tRNA^{Ile} (UAU) は対象にした線虫種 6 種すべてに存在し、その数は 3 から最大 19 コピーである（図 3）。tRNA^{Leu} との配列類似度も高く（図 5），たとえばアンチコドン UAA の tRNA^{Leu} からはアンチコドンの三塩基目に変異が入ることでアンチコドン UAU となることは可能である。通常、変異が入ることで Pseudo tRNA となることもあるが、この場合は淘汰されるどころか増えているのだからそこに何らかの意味をもった可能性があると考える方が自然である。偶然にも、イソロイシンからロイシンの変化はプロテオームにそれほど影響を与えないことから、細胞の生存に影響しないとされに寛容に受け入れられたのかもしれない。nev-tRNA が非常に低発現（図 6）というのも関係しているかもしれない。nev-tRNA の発現が競合する tRNA のそれと比べ格段に弱いために、まれに nev-tRNA によってロイシンが取り込まれたとしても、それはタンパク質合成時のエラー率と同等もしくはそれ以下の無

第4章 議論

視できる程度のものである可能性があるからだ。

いずれの場合も nev-tRNA^{Ile} (UAU) のアンチコドン上の修飾の有無は重要となる。3.5でも論じたように、アンチコドン UAU の一塩基目はリシンなどに修飾されなくてはならず、未修飾のままではコドン AUG もデコード可能である。AUG コドン翻訳用の tRNA は initiator tRNA^{Met} (tRNA^{iMet}) と elongator tRNA^{Met} (tRNA^{eMet}) の 2 種存在し、翻訳開始に使われる tRNA^{iMet} はその構造の違いによりリボソームの小サブユニットと結合し、翻訳開始部位に運ばれることができる (Basavappa and Sigler, 1991; Drabkin et al., 1998)。nev-tRNA^{Ile} (UAU) のアンチコドンが未修飾であり、小サブユニットへの結合性を持ち合わせるのであれば、翻訳開始を妨げるという役割があるのかもしれない。しかし、nev-tRNA のアンチコドンが CCC や GGG へ多様化していった理由は不明であり、この立場をとった場合に説明できない矛盾点は多い。

すべての遺伝子上の GGG ないし AUA コドンがロイシンへ翻訳されるのではなく、ある特殊なコンテクストにあるコドンのみがロイシンへ”捕獲”されている可能性はある。21 番目のアミノ酸として知られるセレノシステインは、1986 年に大腸菌のギ酸脱水素酵素とげっ歯類のグルタチオンペルオキシターゼで見つかり (Zinoni et al., 1986; Chambers et al., 1986)，細胞内で微量に存在するアンチコドン UCA をもつ特殊な tRNA^{Sec} によってコドン UGA へ挿入される (Leinfelder et al., 1988)。真核生物の場合、本来終止コドンである UGA にセレノシステインを挿入するためには 3' UTR に特異的なヌクレオチド鎖延長因子と複合体を形成した tRNA^{Sec} がこれを認識することで、mRNA 上のどの部位にある UGA とも対応することが可能となる (Berry et al., 1993)。このことを本研究のケースに当てはめると、ほとんどの遺伝子上のコドン GGG, AUA は普遍暗号に従い通常通り翻訳されるが、3' UTR に特殊な二次構造などをもつ mRNA 上のコドンは例外的にロイシンへ翻訳される、と考えることができる。

近縁種ではロイシンに保存されているが線虫ではその位置が変異しているような遺伝子の傾向を分析することで、nev-tRNA が作用する条件やそのような遺伝子の周辺のコンテクストが観えてくる可能性はある。そこで、近縁種とオーソロガス遺伝子のアミノ酸配列を比較し、近縁種ではロイシンに保存されているが *C. elegans* で GGG (グリシン) や AUA (イソロイシン) に変異しているような箇所の特定を試みた。まず、KEGG Orthology (Kanehisa et al., 2004) 情報を参照して *C. elegans*, *T. spiralis*, *B. malayi*, *D. melanogaster*, *H. sapiens* で共通のオーソロガス遺伝子 1,609 を取得した。続いて、

第4章 議論

ClustalW (Thompson et al., 1994; Larkin et al., 2007) をデフォルトパラメータで実行しアライメントを行い変異箇所を抽出した。その結果、ロイシンから GGG へ変異した箇所は 2 箇所、AUA へ変異した箇所は 98 箇所同定することができ、重複を除いた計 93 の遺伝子の Gene Ontology (GO) 解析を行った（表 6）。傾向としては「reproductive developmental process」や「embryonic development / morphogenesis」などの生殖系列の遺伝子が多く、このことは *C. elegans* で nev-tRNA^{Gly} (CCC) の発現が成長につれて増大することと関連があるかもしれない (data not shown)。また、GGG や AUA 由来のロイシンが特徴あるヌクレオチドとして、輸送シグナルなどとして機能している可能性も考えられるので、mRNA 上のこれらのコドンの位置に着目した解析などが今後期待される。ただし、nev-tRNA は構造的に EF-Tu による認識を受ける可能性が高いので、セレノシステインのようなシステムをそのまま適用できるかどうかは疑問である。

nev-tRNA のアンチコドンは特別な意味をもたない可能性がある。言い換えれば、nev-tRNA はロイシンへ翻訳する tRNA であるということが重要であって、ある特定のコドンをデコードしなければならないという制約はないのではないか？ このことを示唆する傾向としては、nev-tRNA のアンチコドンの可変性が挙げられる。nev-tRNA の主要なアンチコドンは CCC や UAU であるが、他にも GGG や CCU などが存在し、*C. brenneri* に至っては最大の 8 種存在する（図 3）。本来 tRNA のアンチコドンの変異は、翻訳の正確性の確保という点から非常に強い選択圧で排除されるはずなのだ。しかしこれは表裏一体で、逆に必要のない tRNA だからアンチコドンに変異が入っても排除されず残っているという可能性もある。ただ、アンチコドンには変異が入る一方で、他の構造（例えばアクセプターステムやアンチコドンシステムなど）を崩すような変異はほとんど観察されないという傾向が存在する。図 14 にこの傾向が明瞭に現れている *C. japonica* の例を紹介する。3 種の異なるアンチコドン Trp (CCA), Val (TAC), Thr (TGT) をもちながら、互いに配列類似度は 90% 以上と非常に高いことから、進化的に比較的最近に遺伝子重複したものだと考えられる。変異はすべてアンチコドンアームに集中しているが（このことは逆転写により遺伝子重複が発生した可能性を示唆するが詳細は後述）、注目したいのはアンチコドンの変動が大きいこととシステム構造を崩すような変異はないことがある。前者はそれが選択的に起きたかどうかは不明だが、後者は逆に二次構造を崩すような変異は Pseudo 化を引き起こすということで、安定した構造が nev-tRNA の機能性に重要である可能性を示唆している。

ほ乳類細胞では、酸化ストレス応答としてメチオニン用ではない tRNA もメチオニン

第4章 議論

をミスチャージし、メチオニンを多く含んだタンパク質が合成されることが知られている (Netzer et al., 2009; Jones et al., 2011). その機能についてはまだ詳細に明らかになってはいないが、翻訳の正確度を下げることでストレス時のタンパク質合成を負に制御しているのではないかとされている。nev-tRNA の場合では、アミノ酸の種類はメチオニンではなくロイシンと異なるが、様々なコドンの誤読を引き起こしタンパク質凝集やアポトーシスなどのストレス応答を誘発する役割を担っているのかもしれない。このほかにも、ストレス時に tRNA が様々な機能を担うということは近年報告されており (Thompson and Parker, 2009), 植物ではアンチコドンにニックの入った tRNA が、ほ乳類細胞ではアンチコドンで切断を受けた tRNA 断片が翻訳を（後者は翻訳開始を）阻害する例などもある (Zhang et al., 2009; Yamasaki et al., 2009; Ivanov et al., 2011). 現段階では nev-tRNA の発現の生理条件は不明だが、今後、様々なストレスや発生段階、組織別に発現を俯瞰することで、nev-tRNA に秘められた新しい機能が観えてくる可能性がある。nev-tRNA が核や細胞質で働くとは限らず、ミトコンドリアへの移行などが観察されればそれも面白い。

tRNA があたかも siRNA や miRNA のような small RNA (sRNA) として遺伝子発現制御に関わっている例も報告されている (Thompson and Parker, 2009). *H. sapiens* ではプロセシングを受けた tRNA 由来の sRNA が標的遺伝子の発現を減少させることが知られており (Haussecker et al., 2010), *D. melanogaster* やラットでは Argonote や Piwi と複合体を形成し標的 mRNA を切断することが報告されている (Kawamura et al., 2008; Lau et al., 2006). aaRS をコードする mRNA の 3' UTR に結合し、その発現を制御するという特殊な tRNA も存在し (Rudinger-Thirion et al., 2011), 翻訳時のアダプターとしてではない tRNA の役割というのが近年一つ注目されている。nev-tRNA にもこのような sRNA としての機能があるのかもしれない期待が集まるところであるが、*C. brenneri* の nev-tRNA^{Gly} (CCC) で 22 コピー (図 3) といった多コピーである必然性は考えづらく、その点の論理性に欠ける。

このように考えていると、どのような機構でここまで nev-tRNA は数を増やしたのか、という点は興味深い論点である。一般的に tRNA の遺伝子重複は逆転写によるものか、組換えイベント、もしくはレトロトранスポゾンの転移によるものだと考えられているが、nev-tRNA はゲノム上に広く散在する傾向にあるため、組換えよりも逆転写によって増幅していった可能性が高い。アンチコドンは構造上突出しており一番外部からアクセスしやすい部位であるため、細胞内で機能している間に変異が入ったものが逆転写により重複し多様性を獲得した可能性があり、このことは前述の nev-tRNA のアンチ

第4章 議論

コドンの可変性(図14)と関連してくるのかもしれない。一方で、レトロトランスポゾンの転移によるものもある可能性もある。短鎖散在配列(SINE)の5'末端には度々tRNA様構造が存在することが知られているが(Ohshima et al., 1993),このイベントと無関係かどうかはnev-tRNAの上流または下流領域の比較解析を行えばおそらく容易に分かることである。いずれにしても,nev-tRNAの数やバリエーションが爆発的に増えた*C. brenneri*がすべての鍵を握っているように思え,今後この生物を対象にした実験を行うことが期待される。

表 5. 線虫及び近縁種におけるコドン GGG / AUA の使用頻度. 100 コドンあたりにそれぞれのコドンが出現する頻度 (%) と各アミノ酸ごとでそれぞれのコドンが占める割合 (Ratio) を示した. (*A. thaliana*: *Arabidopsis thaliana*)

| | GGG Codon Usage | | AUA Codon Usage (%) | |
|------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-------|
| | % ¹ | Ratio ² | % | Ratio |
| <i>C. elegans</i> | 0.45 | 0.08 | 1.00 | 0.16 |
| <i>C. briggsae</i> | 0.45 | 0.08 | 0.79 | 0.13 |
| <i>B. malayi</i> | 0.40 | 0.07 | 1.85 | 0.29 |
| <i>T. spiralis</i> | 0.46 | 0.09 | 1.36 | 0.24 |
| <i>D. melanogaster</i> | 0.47 | 0.07 | 1.00 | 0.20 |
| <i>H. sapiens</i> | 1.63 | 0.24 | 0.76 | 0.17 |
| <i>A. thaliana</i> | 1.01 | 0.15 | 1.33 | 0.24 |

¹ % represents the average frequency this codon is used per 100 codons.

² Ratio represents the abundance of that codon relative to all of the codons for that particular amino acid.

表 6. 線虫特異的なコドン GGG / AUA を含む遺伝子の傾向。近縁種ではロイシンに保存されているが、線虫では GGG / AUA に変異したような箇所をもつ遺伝子の Gene Ontology (GO) 解析の結果を示した。なお、P Value < 0.01 のものを表示している。

| Category | | GO Term | PValue | Fold Enrichment | Count |
|--------------------|------------|---|----------|-----------------|-------|
| Biological process | GO:0003006 | reproductive developmental process | 3.29E-06 | 2.87 | 24 |
| | GO:0009792 | embryonic development ending in birth or egg hatching | 9.50E-06 | 1.74 | 46 |
| | GO:0007548 | sex differentiation | 1.29E-05 | 2.83 | 22 |
| | GO:0048806 | genitalia development | 3.62E-05 | 2.85 | 20 |
| | GO:0048598 | embryonic morphogenesis | 6.59E-05 | 6.42 | 9 |
| | GO:0040035 | hermaphrodite genitalia development | 1.10E-04 | 2.73 | 19 |
| | GO:0006259 | DNA metabolic process | 1.29E-04 | 5.84 | 9 |
| | GO:0045927 | positive regulation of growth | 1.34E-04 | 1.82 | 35 |
| | GO:0040008 | regulation of growth | 2.63E-04 | 1.77 | 35 |
| | GO:0002009 | morphogenesis of an epithelium | 3.97E-04 | 3.60 | 12 |
| | GO:0060429 | epithelium development | 4.51E-04 | 3.54 | 12 |
| | GO:0048729 | tissue morphogenesis | 5.63E-04 | 3.45 | 12 |
| | GO:0040010 | positive regulation of growth rate | 6.84E-04 | 1.79 | 31 |
| | GO:0040009 | regulation of growth rate | 6.91E-04 | 1.78 | 31 |
| | GO:0040024 | dauer larval development | 1.15E-03 | 7.44 | 6 |
| | GO:0009057 | macromolecule catabolic process | 1.19E-03 | 4.19 | 9 |
| | GO:0044265 | cellular macromolecule catabolic process | 1.94E-03 | 4.43 | 8 |
| | GO:0007369 | gastrulation | 1.95E-03 | 6.61 | 6 |
| | GO:0006396 | RNA processing | 6.02E-03 | 4.18 | 7 |
| | GO:0030163 | protein catabolic process | 6.94E-03 | 4.06 | 7 |
| | GO:0016568 | chromatin modification | 8.24E-03 | 9.45 | 4 |
| | GO:0006357 | regulation of transcription from RNA polymerase II promoter | 1.00E-02 | 5.84 | 5 |
| Molecular function | GO:0003887 | reproductive developmental process | 2.45E-04 | 30.95 | 4 |
| | GO:0003677 | DNA binding | 3.50E-04 | 2.49 | 18 |
| | GO:0034061 | DNA polymerase activity | 3.53E-04 | 27.51 | 4 |
| | GO:0016779 | nucleotidyltransferase activity | 2.96E-03 | 8.15 | 5 |
| | GO:0000166 | nucleotide binding | 6.72E-03 | 1.81 | 20 |
| Cellular component | GO:0044451 | reproductive developmental process | 5.39E-05 | 22.74 | 5 |
| | GO:0005654 | nucleoplasm | 7.95E-05 | 20.60 | 5 |
| | GO:0031981 | nuclear lumen | 3.26E-04 | 14.33 | 5 |
| | GO:0000151 | ubiquitin ligase complex | 1.51E-03 | 49.45 | 3 |
| | GO:0043233 | organelle lumen | 1.67E-03 | 9.29 | 5 |
| | GO:0070013 | intracellular organelle lumen | 1.67E-03 | 9.29 | 5 |
| | GO:0031974 | membrane-enclosed lumen | 1.94E-03 | 8.91 | 5 |
| | GO:0005829 | cytosol | 9.74E-03 | 19.30 | 3 |

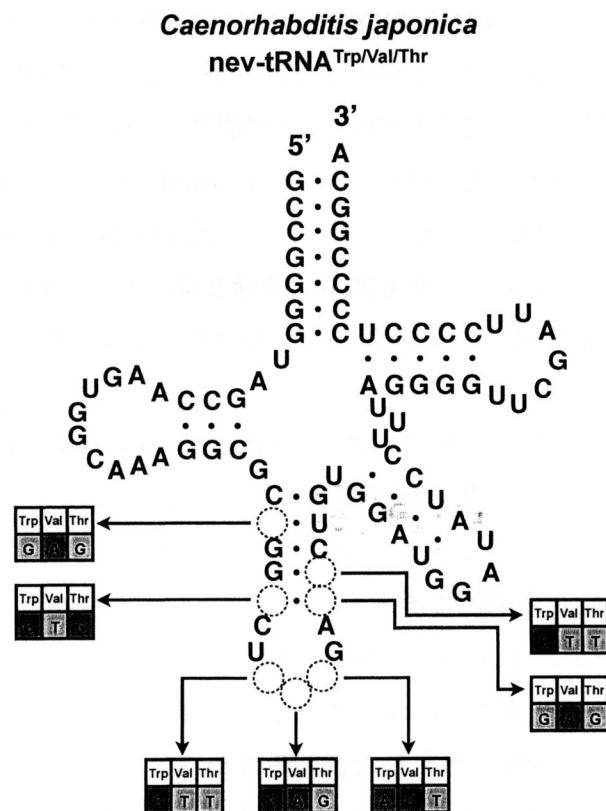


図 14. *C. japonica* の 3 種の nev-tRNA の配列パターンとその二次構造。*C. japonica* における互いに高い配列類似度をもつ 3 種の nev-tRNA^{Trp} (CCA), nev-tRNA^{Val} (UAC), nev-tRNA^{Thr} (UGU) の配列を比較したもの。ハイライトした箇所が互いに異なるヌクレオチドをもつ位置で、他の位置はすべて同一ヌクレオチドをもつ。

第5章 結論

本研究では、本来 Class II tRNA ($tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Leu}$, 例外としてバクテリアの $tRNA^{Tyr}$) のみがもつとされる V-arm 構造が、線虫では他の異なるアミノ酸に対応する tRNA 上に存在することに注目し、その進化的な背景と機能性について情報学と実験学の両方面から解析した。線虫特異的に見つかったため nematode-specific V-arm containing tRNA (nev-tRNA) と名付けられたこの遺伝子は、線虫進化の過程でその数を増大していった傾向にあり、アンチコドンのタイプも非常に多種多様である。線虫 tRNA の進化系統解析により $tRNA^{Leu}$ を起源に派生した可能性が示唆され、発現解析実験によって *C. elegans* における発現が確認された。

線虫において特に広く保存されている nev-tRNA^{Gly} (CCC) 及び nev-tRNA^{Ile} (UAU) を用いた *in vitro* のアミノアシル化再構成実験により、興味深いことにこれらの tRNA はアンチコドンに対応するグリシンやイソロイシンではなく、ロイシン用のアミノアシル化酵素によりロイシンを変則的にチャージすることが示唆された。また、無細胞系を用いた *in vitro* の翻訳解析により、nev-tRNA^{Gly} (CCC) のリボソームへの取り込みが確認され、普遍暗号のグリシンコドン GGG をロイシンへ解読することが確認された。これらの結果は、線虫では nev-tRNA を介した普遍暗号からロイシンへの暗号の変換が可能であることを示している。生体内で nev-tRNA が果たす生物学的役割は現段階では明らかとなっていないが、変則的な翻訳を生じ得る tRNA がこうして線虫進化の過程で淘汰されず保存されていることからも、何らかの重要な機能を有していることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたって、慶應義塾大学環境情報学部金井昭夫教授、改め金井さんは研究指導から論文執筆、私生活など多方面に渡ってお世話になりました。学生に対する献身的なサポートとその研究姿勢は、私の目指すの理想の教育者かつ研究者像であり尊敬してやみません。同大学藤島皓介博士、改めふじしさんは本研究を論文レベルへブラッシュアップするのに一番貢献して頂いた方であり、この多大のサポート無しにはここまで成果は成し得なかつたに違いありません。囲碁や競馬など次々に新しい趣味を私から吸収していくフットワークの軽さには感服致すところであり、私もでかい夢をもって世界へ挑戦する研究者になりたいと思う所存であります。同大学菅原潤一博士、改め菅原さんには3期目から7期目まで長きにわたりアドバイザーを引き受けた頂き、現在のテーマである「tRNA」の魅力を私に初めて教えて下さった方でもあり、研究者としての私の命の恩人であります。同大学先端生命科学研究所増田崇氏、改め増田さんには、本研究において最重要パートであるMS解析を担当して頂き、学生の研究の手伝いを快く引き受けて頂いたことに感謝してやみません。同大学大学院政策・メディア研究科高根香織氏、改めかくにたん、同大学医学部渡邊由香氏、改め渡邊先輩には、ストレスの溜まる鶴岡生活の捌け口となって頂きました。昨年度まで同じRNAグループで汗を流した森田啓介氏、改めもりちゃん、千綿洋平氏、改めちわとは同年代ということで意気投合できる富田研内の数少ない友達の1人であり、互いに別々の人生を歩むことになりましたが数年後に会った時に自慢話に花を咲かせるよう切磋琢磨していきたいですね。同大学環境情報学部広瀬友香氏、改めゆかちゃんには友達の少ない私にいつも構って頂き、鶴岡生活を実りあるものにして頂きました。同大学河野暢明氏、改めのぶさん、池上慶太氏、改めたっぴー、野崎慎氏、改めざきの、小川真菜氏、改め中川さんらSFC側の同志には、関東に戻った際にはいつも温かく向かい入れて頂き感謝致しております。その他にも、ファカルティの皆さん、RNAグループのメンバ、事務の方々、掃除のおばさん、鶴岡市の皆さん、そして両親にも多大な感謝な気持ちで一杯です。最後になりましたが、このような素晴らしい環境と仲間を提供して下さっている同大学環境情報学部富田勝教授に心より感謝致します。

参考文献

- Achsel T, Gross HJ (1993) Identity determinants of human tRNASer : sequence elements necessary for serylization and maturation of tRNA with a long extra arm. *EMBO J*, **12**, 3333-3338.
- Asahara H, Himeno H, Tamura K, Hasegawa T, Watanabe K, Shimizu M (1993) Recognition nucleotides of Escherichia coli tRNA(Leu) and its elements facilitating discrimination from tRNASer and tRNA(Tyr). *J Mol Biol*, **231**, 219-229.
- Barrell BG, Bankier AT, Drouin J (1979) A different genetic code in human mitochondria. *Nature*, **282**, 189-194.
- Basavappa R, Sigler PB (1991) The 3 A crystal structure of yeast initiator tRNA: functional implications in initiator/elongator discrimination. *EMBO J*, **10**, 3105-1111.
- Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*, **353**, 273-276.
- Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR (1993) Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J*, **12**, 3315-3322.
- Biou V, Yaremchuk A, Tukalo M, Cusack S (1994) The 2.9 A crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Ser). *Science*, **263**, 1404-1410.
- Breitschopf K, Achsel T, Busch K, Gross HJ (1995) Identity elements of human tRNA(Leu): structural requirements for converting human tRNA(Ser) into a leucine acceptor in vitro. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3633-3637.
- Caron F, Meyer E (1985) Does Paramecium primaurelia use a different genetic code in its macronucleus? *Nature*, **314**, 185-188.

参考文献

- Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the “termination” codon, TGA. *EMBO J*, **5**, 1221-1227.
- Chan PP, Lowe TM (2009) GtRNAdb: a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, **37**, D93-D97.
- Crick FH (1968) The origin of the genetic code. *J Mol Biol*, **38**, 367-379.
- Drabkin HJ, Estrella M, Rajbhandary UL (1998) Initiator-elongator discrimination in vertebrate tRNAs for protein synthesis. *Mol Cell Biol*, **18**, 1459-1466.
- Farabaugh PJ (1993) Alternative readings of the genetic code. *Cell*, **74**, 591-596.
- Freist W (1989) Mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases: a critical consideration of recent results. *Biochemistry*, **28**, 6787-6795.
- Fujishima K, Sugahara J, Kikuta K, Hirano R, Sato A, Tomita M, Kanai A (2009) Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 2683-2687.
- Fujita PA et al. (2010) The UCSC Genome Browser database: update 2011. *Nucleic Acids Res*, **39**, D876-D882.
- Fukunaga R, Yokoyama S (2005) Aminoacylation complex structures of leucyl-tRNA synthetase and tRNALeu reveal two modes of discriminator-base recognition. *Nature Struct Mol Biol*, **12**, 915-922.
- Galli G, Hofstetter H, Birnstiel M (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature*, **294**, 626-631.
- Hasegawa M, Miyata T (1980) On the antisymmetry of the amino acid code table. *Orig Life*, **10**, 265-270.
- Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA (2010) Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*, **16**, 673-95.
- Helftenbein E (1985) Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for alpha-tubulin from the ciliate *Styloynchia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. *Nucleic Acids Res*, **13**, 415-433.
- Horowitz S, Gorovsky MA (1985) An unusual genetic code in nuclear genes of Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 2452-2455.
- Ishihama Y, Rappaport J, Andersen JS, Mann M (2002) Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J Chromatogr A*, **979**, 233-239.

参考文献

- Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P (2011) Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol Cell*, **43**, 613-623.
- Jones TE, Alexander RW, Pan T (2011) Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 6933-6938.
- Jukes TH (1981) Amino acid codes in mitochondria as possible clues to primitive codes. *J Mol Evol*, **18**, 15-17.
- Kano A, Andachi Y, Ohama T, Osawa S (1991) Novel anticodon composition of transfer RNAs in *Micrococcus luteus*, a bacterium with a high genomic G + C content: correlation with codon usage. *J Mol Biol*, **221**, 387-401.
- Kawaguchi Y, Honda H, Taniguchi-Morimura J, Iwasaki S (1989) The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature*, **341**, 164-166.
- Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC, Siomi H (2008) Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature*, **453**, 793-797.
- Köhler C, Rajbhandary UL (2008) The many applications of acid urea polyacrylamide gel electrophoresis to studies of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods*, **44**, 129-138.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, **313**, 363-367.
- Leinfelder W, Zehlein E, Mandrand-Berthelot MA, Böck A (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, **331**, 723-725.
- Letunic I, Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, **23**, 127-128.
- Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, **25**, 955-964.
- Marck C, Grosjean H (2002) tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA*, **8**, 1189-1232.
- Maruyama S, Sugahara J, Kanai A, Nozaki H (2009) Permuted tRNA genes in the nuclear and nucleomorph genomes of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol*, **27**, 1070-1076.
- Masuda T, Saito N, Tomita M, Ishihama Y (2009) Unbiased quantitation of Escherichia coli membrane proteome using phase transfer surfactants. *Mol Cell Proteomics*, **8**, 2770-2777.

参考文献

- Masuda T, Tomita M, Ishihama Y (2008) Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res*, **7**, 731-740.
- McClain WH (1993) Rules that govern tRNA identity in protein synthesis. *J Mol Biol*, **234**, 257-280.
- Netzer N, Goodenbour JM, David A, Dittmar K a, Jones RB, Schneider JR, Boone D, Eves EM, Rosner MR, Gibbs JS, Embry A, Dolan B, Das S, Hickman HD, Berglund P, Bennink JR, Yewdell JW, Pan T (2009) Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature*, **462**, 522-526.
- Ohama T, Suzuki T, Mori M, Osawa S, Ueda T, Watanabe K, Nakase T (1993) Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several Candida species. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4039-4045.
- Ohshima K, Koishi R, Matsuo M, Okada N (1993) Several short interspersed repetitive elements (SINEs) in distant species may have originated from a common ancestral retrovirus: characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retroposons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 6260-6264.
- Olsen JV, Ong S-E, Mann M (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics*, **3**, 608-614.
- Osawa S, Jukes TH (1989) Codon reassignment (codon capture) in evolution. *J Mol Evol*, **28**, 271-278.
- Osawa T, Kimura S, Terasaka N, Inanaga H, Suzuki T, Numata T (2011) Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 1275-1280.
- Preer JR, Preer LB, Rudman BM, Barnett AJ (1985) Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in Paramecium. *Nature*, **314**, 188-190.
- Rappaport J, Ishihama Y, Mann M (2003) Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*, **75**, 663-670.
- Rudinger-Thirion J, Lescure A, Paulus C, Frugier M (2011) Misfolded human tRNA isodecoder binds and neutralizes a 3' UTR-embedded Alu element. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, E794-802.
- Saks ME, Sampson JR, Abelson JN (1994) The transfer RNA identity problem: a search for rules. *Science*, **263**, 191-197.
- Sato A, Soga T, Igarashi K, Takesue K, Tomita M, Kanai A (2011) GTP-dependent RNA 3'-terminal phosphate cyclase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus. *Genes cells*, **16**, 1190-1199.
- Soma A, Kumagai R, Nishikawa K, Himeno H (1996) The anticodon loop is a major identity determinant of Saccharomyces cerevisiae tRNA(Leu). *J Mol Biol*, **263**, 707-714.

参考文献

- Soma A, Onodera A, Sugahara J, Kanai A, Yachie N, Tomita M, Kawamura F, Sekine Y (2007) Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science*, **318**, 450-453.
- Soma A, Uchiyama K, Sakamoto T, Maeda M, Himeno H (1999) Unique recognition style of tRNA(Leu) by *Haloferax volcanii* leucyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol*, **293**, 1029-1038.
- Sprinzel M, Horn C, Brown M, Ioudovitch A, Steinberg S (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 148-153.
- Stern L, Schulman LH (1978) The role of the minor base N4-acetylcytidine in the function of the *Escherichia coli* noninitiator methionine transfer RNA. *J Biol Chem*, **253**, 6132-6139.
- Sugahara J, Fujishima K, Morita K, Tomita M, Kanai A (2009) Disrupted tRNA gene diversity and possible evolutionary scenarios. *J Mol Evol*, **69**, 497-504.
- Sugahara J, Kikuta K, Fujishima K, Yachie N, Tomita M, Kanai A (2008) Comprehensive analysis of archaeal tRNA genes reveals rapid increase of tRNA introns in the order thermoproteales. *Mol Biol Evol*, **25**, 2709-2716.
- Sugahara J, Yachie N, Arakawa K, Tomita M (2007) In silico screening of archaeal tRNA-encoding genes having multiple introns with bulge-helix-bulge splicing motifs. *RNA*, **13**, 671-681.
- Sugahara J, Yachie N, Sekine Y, Soma A, Matsui M, Tomita M, Kanai A (2006) SPLITS: a new program for predicting split and intron-containing tRNA genes at the genome level. *In Silico Biol*, **6**, 411-418.
- Szweykowska-Kulinska Z, Senger B, Keith G, Fasiolo F, Grosjean H (1994) Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA(Ile). *EMBO J*, **13**, 4636-4644.
- Terasaka N, Kimura S, Osawa T, Numata T, Suzuki T (2011) Biogenesis of 2-agmatinylcytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 1268-1274.
- Thompson DM, Parker R (2009) Stressing out over tRNA cleavage. *Cell*, **138**, 215-219.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Varani G, McClain WH (2000) The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep*, **1**, 18-23.
- Yamao F, Muto A, Kawauchi Y, Iwami M, Iwagami S, Azumi Y, Osawa S (1985) UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 2306-2309.

参考文献

- Yamasaki S, Ivanov P, Hu G-F, Anderson P (2009) Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol*, **185**, 35-42.
- Yaremchuk A, Krikliyi I, Tukalo M, Cusack S (2002) Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition. *EMBO J*, **21**, 3829-3840.
- Zamecnik PC (1969) An historical account of protein synthesis, with current overtones--a personalized view. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **34**, 1-16.
- Zhang S, Sun L, Kragler F (2009) The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol*, **150**, 378-387.
- Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 4650-4654.
- 大澤省三, 渡辺公綱, 上田卓也, 大濱武 (1997) 遺伝暗号の起源と進化. 共立出版株式会社.

付録

付録1. Nematodaで予測された全nev-tRNA一覧

| ID | Chromosome | Strand | Start Position | End Position | Isotype | COVE* | Localization | Name | Annotation | Nearest Gene* |
|---------|------------|--------|----------------|--------------|-----------|-------|--------------|--|--|---------------|
| CBEUV01 | chrUn | - | 49595901 | 49595718 | Arg (CCU) | 75.7 | intergenic | sra-11 | Serpentine Receptor, class A (alpha) family member | ZK418.11 |
| CBEUV02 | chrUn | + | 90481247 | 90481331 | Arg (CCU) | 51.8 | intergenic | hypothetical protein | | |
| CBEUV03 | chrUn | + | 135420606 | 135420689 | Arg (CCU) | 78.2 | intergenic | Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member | prn-71 | |
| CBEUV04 | chrUn | + | 139901106 | 139901189 | Arg (CCU) | 68.5 | intergenic | hypothetical protein | W02BB.1 | |
| CBEUV05 | chrUn | - | 173476580 | 173476497 | Arg (CCU) | 75.7 | intergenic | Serpentine Receptor, class A (alpha) family member | sra-11 | |
| CBEUV06 | chrUn | + | 98280538 | 98280521 | Arg (UCU) | 56.5 | intergenic | hypothetical protein | K03H10.3 | |
| CBEUV07 | chrUn | - | 157628871 | 157628788 | Gly (GCC) | 46.7 | intron | hypothetical protein | K03H10.3 | |
| CBEUV08 | chrUn | - | 44899006 | 44898923 | Gly (CCC) | 66.0 | intergenic | C-type LECtin family member | clec-234 | |
| CBEUV09 | chrUn | - | 44956004 | 44955921 | Gly (CCC) | 63.5 | intron | hypothetical protein | Y69H12.14 | |
| CBEUV10 | chrUn | + | 52302398 | 52302481 | Gly (CCC) | 72.0 | intergenic | hypothetical protein | F58E2.2 | |
| CBEUV11 | chrUn | + | 65756121 | 65756204 | Gly (CCC) | 69.6 | intergenic | hypothetical protein | C31C9.7 | |
| CBEUV12 | chrUn | + | 65779668 | 65779751 | Gly (CCC) | 73.5 | intergenic | hypothetical protein | Y48E1A.1 | |
| CBEUV13 | chrUn | - | 65784772 | 65784689 | Gly (CCC) | 69.6 | intergenic | potassium channel, KvQLT family member | kqt-3 | |
| CBEUV14 | chrUn | - | 77278566 | 77278583 | Gly (CCC) | 63.5 | introns-as | Pharynx-associated GAS (growth arrest protein) related family member | phg-1 | |
| CBEUV15 | chrUn | - | 77347572 | 77347489 | Gly (CCC) | 72.0 | intron | Cell Division Cycle related family member | cdc-25.4 | |
| CBEUV16 | chrUn | - | 96214039 | 96213956 | Gly (CCC) | 72.0 | intron | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV17 | chrUn | - | 96217761 | 96217678 | Gly (CCC) | 65.7 | intron | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV18 | chrUn | - | 96223989 | 96223906 | Gly (CCC) | 70.5 | intron | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV19 | chrUn | + | 96229404 | 96229487 | Gly (CCC) | 72.0 | introns-as | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV20 | chrUn | - | 108459014 | 108458931 | Gly (CCC) | 72.0 | introns-as | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV21 | chrUn | + | 108464259 | 108464342 | Gly (CCC) | 72.0 | introns-as | hypothetical protein | C5F4.1 | |
| CBEUV22 | chrUn | + | 108466679 | 108466596 | Gly (CCC) | 72.0 | introns-as | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV23 | chrUn | + | 108469757 | 108469840 | Gly (CCC) | 72.0 | introns-as | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV24 | chrUn | + | 108472283 | 108472366 | Gly (CCC) | 70.0 | introns-as | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV25 | chrUn | + | 123534372 | 123534455 | Gly (CCC) | 63.5 | intergenic | C-type LECtin family member | clc-125 | |
| CBEUV26 | chrUn | - | 128630580 | 128630497 | Gly (CCC) | 59.0 | introns-as | hypothetical protein | F54B3.1 | |
| CBEUV27 | chrUn | + | 151162459 | 151162542 | Gly (CCC) | 67.7 | intergenic | Serpin Receptor, class D (delta) family member | serd-2 | |
| CBEUV28 | chrUn | + | 174812053 | 174812136 | Gly (CCC) | 62.7 | intergenic | hypothetical protein | C31C9.7 | |
| CBEUV29 | chrUn | - | 204709220 | 204709137 | Gly (CCC) | 63.5 | intergenic | FIP (Fungus-induced Protein) Related family member | fipr-13 | |
| CBEUV30 | chrUn | + | 81985208 | 81985292 | Ile (UAU) | 70.7 | introns-as | UDP-GlucuronosylTransferase family member | ugt-27 | |
| CBEUV31 | chrUn | + | 81988507 | 81988591 | Ile (UAU) | 72.5 | introns-as | hypothetical protein | W09C3.7 | |
| CBEUV32 | chrUn | + | 82018557 | 82018641 | Ile (UAU) | 72.3 | introns-as | hypothetical protein | ugt-32 | |
| CBEUV33 | chrUn | + | 82019139 | 82019223 | Ile (UAU) | 71.2 | introns-as | UDP-GlucuronosylTransferase family member | Y23H5B.4 | |
| CBEUV34 | chrUn | + | 82092949 | 82093033 | Ile (UAU) | 73.6 | introns-as | hypothetical protein | Y23H5B.4 | |
| CBEUV35 | chrUn | + | 82093543 | 82093627 | Ile (UAU) | 66.1 | introns-as | hypothetical protein | noah-1 | |
| CBEUV36 | chrUn | - | 113365509 | 113365425 | Ile (UAU) | 71.2 | intergenic | NompA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member | Pcp-1 | |
| CBEUV37 | chrUn | - | 113367683 | 113367599 | Ile (UAU) | 71.2 | intergenic | P-GlycoProtein related family member | Pcp-2 | |
| CBEUV38 | chrUn | - | 113368278 | 113368194 | Ile (UAU) | 73.6 | intergenic | P-Glyco-Protein related family member | Pcp-2 | |
| CBEUV39 | chrUn | + | 117389737 | 117389821 | Ile (UAU) | 73.6 | intergenic | NompA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member | noah-1 | |
| CBEUV40 | chrUn | + | 117390341 | 117390425 | Ile (UAU) | 71.3 | intergenic | NompA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member | noah-1 | |
| CBEUV41 | chrUn | + | 117392484 | 117392578 | Ile (UAU) | 71.2 | intergenic | NompA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member | ark-5 | |
| CBEUV42 | chrUn | + | 128873151 | 128873235 | Ile (UAU) | 74.6 | intergenic | Arp2/3 complex component family member | | |

| | | | | | | | | | | |
|---------|-------------|---|-----------|-----------|-----|-------|------|------------|--|--|
| CBEUV43 | chrJn | + | 139484203 | 139484287 | Ile | (UAU) | 72.2 | intron | gmr-1 | |
| CBEUV44 | chrJn | - | 162257307 | 162257223 | Ile | (UAU) | 73.0 | intron-as | ugt-29 | |
| CBEUV45 | chrJn | - | 162260979 | 162260895 | Ile | (UAU) | 71.2 | intronic | ugt-28 | |
| CBEUV46 | chrJn | + | 179278696 | 179278780 | Ile | (UAU) | 73.6 | intergenic | Y23h5B.4 | |
| CBEUV47 | chrJn | + | 179278681 | 179278665 | Ile | (UAU) | 71.3 | intergenic | hypothetical protein | |
| CBEUV48 | chrJn | + | 191197626 | 191197710 | Ile | (UAU) | 71.2 | intergenic | Equilibrative Nucleoside Transporter family member | |
| CBEUV49 | chrJn | - | 115464800 | 115464715 | Pro | (GGG) | 37.1 | intergenic | ent-3 | |
| CBEUV50 | chrJn | + | 130684124 | 130684209 | Pro | (GGG) | 40.6 | intergenic | E01G4.6 | |
| CBEUV51 | chrJn | + | 163234209 | 163234292 | Pro | (GGG) | 49.0 | intergenic | F02E9.5 | |
| CBEUV52 | chrJn | + | 182030967 | 182031080 | Pro | (GGG) | 49.0 | intergenic | T10B11.2 | |
| CBEUV53 | chrJn | + | 129301206 | 129301290 | Val | (CAC) | 52.5 | intergenic | fbp-1 | |
| CBEUV54 | chrJn | - | 129309145 | 129309061 | Val | (CAC) | 45.5 | intergenic | fbp-1 | |
| CBEUV55 | chrJn | + | 148827660 | 148827764 | Val | (CAC) | 50.4 | intergenic | C03G6.6 | |
| CBEUV56 | chrJn | - | 148834876 | 148834792 | Val | (CAC) | 52.5 | intergenic | F44D12.8 | |
| CBIUV01 | chrI | + | 6307513 | 6307595 | Ala | (CGC) | 57.5 | intergenic | F44D12.8 | |
| CBIUV02 | chrI | + | 3962928 | 3963011 | Gly | (CCC) | 67.3 | intron | ZK418.11 | |
| CBIUV03 | chrI | + | 3971981 | 3971898 | Gly | (CCC) | 73.2 | intron | bcs-1 | |
| CBIUV04 | chrI | + | 3972134 | 3972217 | Gly | (CCC) | 67.7 | intron | BCS1 (mitochondrial chaperone) homolog family member | |
| CBIUV05 | chrI_random | - | 3975781 | 3975698 | Gly | (CCC) | 79.2 | intronic | F54C9.9 | |
| CBIUV06 | chrI_random | - | 3498371 | 3498288 | Ile | (UAU) | 80.6 | intron | hypothetical protein | |
| CBIUV07 | chrI | - | 3498899 | 3498816 | Ile | (UAU) | 76.1 | intronic | ar-1 | |
| CBIUV08 | chrI | + | 6501949 | 6501866 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | H37N21.1 | |
| CBIUV09 | chrI | + | 6502462 | 6502545 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | F54C9.9 | |
| CBIUV10 | chrI | + | 6506662 | 6506745 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | hypothetical protein | |
| CBIUV11 | chrI | + | 6509561 | 6509644 | Ile | (UAU) | 68.0 | intergenic | H37N21.1 | |
| CBIUV12 | chrI | - | 6510161 | 6510078 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | C56F7.2 | |
| CBIUV13 | chrI | + | 6511932 | 6512015 | Ile | (UAU) | 51.2 | intergenic | hypothetical protein | |
| CBIUV14 | chrI | - | 6520859 | 6520776 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | T22C1.9 | |
| CBIUV15 | chrI | - | 6642252 | 6642169 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | hypothetical protein | |
| CBIUV16 | chrI | + | 6642801 | 6642884 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | T22C1.9 | |
| CBIUV17 | chrI | + | 6643457 | 6643540 | Ile | (UAU) | 69.8 | intergenic | hypothetical protein | |
| CBIUV18 | chrI | - | 6665886 | 6665803 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | T22C1.9 | |
| CBIUV19 | chrI | + | 6744901 | 6744984 | Ile | (UAU) | 74.9 | intergenic | hypothetical protein | |
| CBIUV20 | chrI | + | 6746285 | 6746368 | Ile | (UAU) | 73.9 | intergenic | C54G4.4 | |
| CBIUV21 | chrI | + | 6748639 | 6748722 | Ile | (UAU) | 57.9 | intergenic | C54G4.4 | |
| CBIUV22 | chrI | + | 6785191 | 6785278 | Ile | (UAU) | 66.7 | intergenic | F58D5.7 | |
| CBIUV23 | chrI | - | 4211509 | 4211426 | Pro | (GGG) | 32.8 | intergenic | hypothetical protein | |
| CELUV01 | chrI | - | 10601202 | 10601120 | Gly | (CCC) | 72.0 | intron | F55D12.2 | |
| CELUV02 | chrI | + | 10601838 | 10601920 | Gly | (CCC) | 72.0 | intron | C54G4.4 | |
| CELUV03 | chrI | - | 10604203 | 10604121 | Gly | (CCC) | 72.0 | intron | F55D12.2 | |
| CELUV04 | chrI | + | 7960830 | 7960914 | Ile | (UAU) | 79.7 | intronic | hypothetical protein | |
| CELUV05 | chrI | + | 9562343 | 9562427 | Ile | (UAU) | 79.7 | intergenic | T22C1.12 | |
| CELUV06 | chrI | - | 9563917 | 9563833 | Ile | (UAU) | 79.7 | intergenic | rig-5 | |
| CELUV07 | chrX | - | 9828683 | 9828599 | Ile | (CUU) | 71.0 | intron | rro-1 | |
| CELUV08 | chrI | - | 6724158 | 6724073 | Lys | (CUU) | 75.7 | intergenic | F37A4.1 | |
| CJAUV01 | chrJn | - | 117342044 | 117341960 | Ile | (UAU) | 75.7 | intergenic | RSK-pNinety (RSK-p90 kinase) homolog family member | |
| CJAUV02 | chrJn | + | 138538062 | 138538146 | Ile | (UAU) | 75.7 | intergenic | K04G2.9 | |

| | | | | | | | | | |
|---------|-------|---|-----------|-----------|-----|-------|-------|------------|----------|
| CJAUV03 | chrUn | - | 138543058 | 138542974 | Ile | (UAU) | 75.7 | intergenic | KoG32.9 |
| CJAUV04 | chrUn | - | 42974041 | 42973958 | Thr | (UGU) | 51.3 | intron | ugf-9 |
| CJAUV05 | chrUn | + | 87595760 | 87595843 | Trp | (CCA) | 55.8 | intergenic | g1-26 |
| CJAUV06 | chrUn | + | 126225166 | 126225249 | Val | (UAC) | 53.1 | intron-as | cjk-1 |
| CREUV01 | chrUn | - | 23853810 | 23853727 | Arg | (CCU) | 47.8 | intergenic | grl-29 |
| CREUV02 | chrUn | - | 19286759 | 19286678 | Gly | (CCC) | 75.2 | intron-as | C46H11.6 |
| CREUV03 | chrUn | - | 19323134 | 19323052 | Gly | (CCC) | 74.1 | intron | C05D11.8 |
| CREUV04 | chrUn | - | 19325044 | 19324962 | Gly | (CCC) | 74.1 | intron | C05D11.8 |
| CREUV05 | chrUn | - | 19671121 | 19671039 | Gly | (CCC) | 74.1 | intron-as | polq-1 |
| CREUV06 | chrUn | + | 21965339 | 21965423 | Ile | (UAU) | 75.1 | intron | smg-1 |
| CREUV07 | chrUn | - | 25627015 | 25626931 | Ile | (UAU) | 73.2 | intergenic | msh-5 |
| CREUV08 | chrUn | - | 25631915 | 25631831 | Ile | (UAU) | 73.2 | intron | msh-5 |
| CREUV09 | chrUn | - | 25636216 | 25636132 | Ile | (UAU) | 73.2 | intergenic | msh-5 |
| CREUV10 | chrUn | - | 25642385 | 25642301 | Ile | (UAU) | 73.2 | intergenic | C56C3.3 |
| CREUV11 | chrUn | - | 25694155 | 25694071 | Ile | (UAU) | 73.2 | introns-as | y48G1C.4 |
| CREUV12 | chrUn | + | 109191950 | 109192033 | Pro | (GGG) | 49.5 | intergenic | K06B9.3 |
| CREUV13 | chrUn | - | 111749904 | 111749821 | Pro | (GGG) | 49.5 | intergenic | C36A4.4 |
| CREUV14 | chrUn | - | 21921327 | 21921327 | Val | (CAC) | 48.8 | intergenic | F02E9.5 |
| PPAUV1 | chrUn | - | 10269759 | 10269677 | Ile | (UAU) | 72.51 | intron | PxI-1 |
| PPAUV2 | chrUn | - | 97319877 | 97319795 | Ile | (UAU) | 74.48 | introns-as | F25D7.2 |
| PPAUV3 | chrUn | - | 133533498 | 133533416 | Ile | (UAU) | 74.48 | introns-as | nt-6 |
| PPAUV4 | chrUn | + | 160878869 | 160878748 | Ile | (UAU) | 58.38 | intron | F35H1.2a |
| PPAUV5 | chrUn | + | 160889950 | 160889032 | Ile | (UAU) | 71.75 | introns-as | cdc-42 |
| PPAUV6 | chrUn | + | 160892350 | 160892422 | Ile | (UAU) | 66.04 | introns-as | cdc-42 |
| PPAUV7 | chrUn | - | 160902611 | 160902693 | Ile | (UAU) | 74.01 | introns-as | unc-33 |
| PPAUV8 | chrUn | - | 171980594 | 171980512 | Ile | (UAU) | 70.73 | introns-as | C32D5.3 |

* Covariance model (COVE) scores were calculated by tRNAscan-SE (Eddy and Durbin 1994; Lowe and Eddy, 1997).

† The information of nearest genes from the candidates was searched using UCSC genome browser (Kent et al. 2002).

Reference

Eddy SR, Durbin R (1994) RNA sequence analysis using covariance models. *Nucleic Acids Res* 22:2079-2088.

Kent WJ et al. (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:986-1006.

Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 25:955-964.

付録2. *In vitro*翻訳で合成されたPF1549及びLuciferaseのペプチド同定結果 (FDR: 0.38%)

| Protein* | Sequence | Modification | ObslMass | ObslMz | CalchMass | CalchMz | DeltaMass | Charge | PeptScore | Data |
|---------------|------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-----------|---------------------------|
| PF1549 (Ctrl) | AAMEELK | Oxidation@M:3 | 806.3846 | 404.1986 | 806.3844 | 404.1985 | -0.0002 | 2 | 49.2 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ACVDFLGDQIIPPLA-SGGK | Carbamidomethylation@C:2 | 2248.1929 | 750.4049 | 2248.1926 | 750.4048 | -0.0003 | 3 | 40.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ANRPNGPRPQHMAILALK | | 2192.2621 | 731.7613 | 2192.2654 | 731.7624 | -0.0034 | 3 | 42.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ANRPNGPRPQHMAILALK | | 2320.3605 | 581.0974 | 2320.3603 | 581.0974 | -0.0002 | 4 | 42.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EAQELLSQVK | | 1214.6500 | 608.3323 | 1214.6506 | 608.3326 | -0.0006 | 2 | 75.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EAQELLSQVK | | 1444.7933 | 482.2717 | 1443.7933 | 482.2717 | -0.0002 | 3 | 25.3 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ELIAEEFENIYK | | 1496.7386 | 749.3766 | 1496.7398 | 749.3772 | -0.0011 | 2 | 97.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EVSHSLGPGSIVVWAETCLR | Carbamidomethylation@C:20 | 2382.1582 | 1192.0864 | 2382.1638 | 1192.0892 | -0.0055 | 2 | 133.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EVTFIPGELK | | 1131.6166 | 586.8156 | 1131.6176 | 586.8161 | -0.0009 | 2 | 57.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EVTFIPGELKGEIR | | 1643.8882 | 548.9700 | 1643.8883 | 548.9700 | -0.0003 | 3 | 38.1 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | FLGDQIIPPLA-SGGK | | 1674.9344 | 838.4745 | 1674.9345 | 838.4745 | -0.0000 | 2 | 86.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | GGITAGTVKIEWIR | | 1600.8702 | 801.4424 | 1600.8726 | 801.4436 | -0.0023 | 2 | 45.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | GGGITAGTVKIEWIR | | 1728.9686 | 865.4916 | 1728.9675 | 865.4910 | 0.0012 | 2 | 57.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | GRPAEVEGRQAELLSQVK | | 2138.1340 | 713.7186 | 2138.1331 | 713.7183 | 0.0008 | 3 | 69.1 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | IGIEEBIK | | 857.4866 | 429.7506 | 857.4858 | 429.7502 | 0.0009 | 2 | 26.7 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | IKVAITK | | 900.5653 | 301.1957 | 900.5644 | 301.1954 | 0.0010 | 3 | 27.8 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KELIEEFENIYK | | 1624.8322 | 813.4234 | 1624.8348 | 813.4247 | -0.0026 | 2 | 80.8 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KEVHSISLGPSGIVVWAETCLR | Carbamidomethylation@C:21 | 2510.2593 | 628.5721 | 2510.2588 | 628.5720 | 0.0004 | 4 | 51.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KCKPKAEVGRQAELLSQVK | | 2266.2244 | 756.4154 | 2266.2281 | 756.4166 | -0.0038 | 3 | 74.9 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KIGIGEIK | | 985.5800 | 493.7973 | 985.5808 | 493.7977 | -0.0008 | 2 | 53.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KUANAKVGAEVGSR | | 1527.8362 | 510.2860 | 1527.8369 | 510.2862 | -0.0008 | 3 | 75.1 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | LANKAVEGAEVGSR | | 1389.7419 | 467.5879 | 1389.7419 | 467.5879 | 0.0000 | 3 | 49.2 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | IQQDALRK | | 729.4028 | 365.7087 | 729.4021 | 365.7083 | 0.0008 | 2 | 48.1 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | IQQDALRK | | 857.4968 | 429.7557 | 857.4971 | 429.7558 | -0.0002 | 2 | 56.5 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | MIIIDGSTEGEGQQLIR | | 1793.8996 | 887.9571 | 1793.8982 | 887.9564 | 0.0015 | 2 | 120.2 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | TSIALSATTGEPVK | | 1385.7760 | 693.8853 | 1385.7766 | 693.8856 | -0.0006 | 2 | 101.1 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | TSIALSATTGEPVKINIR | | 1995.1726 | 666.0648 | 1995.1728 | 666.0649 | -0.0003 | 3 | 85.3 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | VLGVIIEIK | | 966.6112 | 484.3129 | 966.6114 | 484.3130 | -0.0002 | 2 | 69.9 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | VLGVTEIK | | 1094.7058 | 548.3602 | 1094.7053 | 548.3604 | -0.0004 | 2 | 52.9 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | VSGISHATNLPAHYAER | | 1757.9182 | 879.9664 | 1757.9173 | 879.9659 | 0.0010 | 2 | 96.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | AAMEELK | | 806.3844 | 404.1985 | 806.3844 | 404.1985 | 0.0001 | 2 | 48.8 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ACVDFLGDQIIPPLA-SGGK | | 2248.1905 | 750.4044 | 2248.1926 | 750.4048 | -0.0022 | 3 | 46.8 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ANRPNGPRPQHMAILALK | | 2192.2624 | 731.7624 | 2192.2654 | 731.7624 | -0.0001 | 3 | 43.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ANRPNGPRPQHMAILALK | | 2320.3593 | 581.0971 | 2320.3603 | 581.0974 | -0.0010 | 4 | 34.9 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EAQELLSQVK | | 2817.6573 | 705.4216 | 2817.6565 | 705.4214 | 0.0008 | 4 | 22.8 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EAQELLSQVK | | 1214.6504 | 608.3325 | 1214.6506 | 608.3326 | -0.0002 | 2 | 72.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | ELIAEEFENIYK | | 1443.7933 | 482.2717 | 1443.7933 | 482.2717 | -0.0001 | 3 | 41.8 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EVSHSLGPGSIVVWAETCLR | Carbamidomethylation@C:20 | 1496.7394 | 749.3770 | 1496.7398 | 749.3772 | -0.0003 | 2 | 84.9 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EVTFIPGELK | | 1131.6172 | 566.8159 | 1131.6176 | 566.8161 | -0.0010 | 2 | 136.3 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | EVTFIPGELKGEIR | | 1643.8888 | 548.9702 | 1643.8883 | 548.9700 | 0.0004 | 2 | 55.2 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | FLGDQIIPPLA-SGGK | | 1674.9336 | 838.4741 | 1674.9345 | 838.4745 | -0.0008 | 3 | 37.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | GGITAGTVKIEWIR | | 1600.8724 | 534.6314 | 1600.8726 | 534.6315 | -0.0001 | 3 | 37.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | GGGITAGTVKIEWIR | | 1728.9670 | 865.4908 | 1728.9675 | 865.4910 | -0.0004 | 2 | 44.5 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | GRPAEVEGRQAELLSQVK | | 2138.1290 | 1070.0718 | 2138.1331 | 1070.0738 | -0.0041 | 2 | 63.3 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KSGKPAEYVGREAQELLSQVK | | 2266.2292 | 756.4170 | 2266.2281 | 756.4166 | 0.0010 | 3 | 73.6 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | KLANAKVGAEVGSR | | 1527.8353 | 510.2857 | 1527.8359 | 510.2862 | -0.0018 | 3 | 83.4 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | IGIEEBIK | | 857.4868 | 429.7507 | 857.4858 | 429.7502 | 0.0011 | 2 | 42.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |
| PF1549 (Ctrl) | IIIDGSYCGGGQTLIR | | 1646.8604 | 824.4375 | 1646.8628 | 824.4387 | -0.0023 | 2 | 107.0 | PF1549-rRNA ^{ay} |

| | | | | | | | |
|----------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---|
| IKVAEITK | F-1549 (Ctn) | 900.5656 | 301.1958 | 900.5644 | 301.1954 | 0.0013 | 3 |
| KELIASEFFENLYK | | 1624.8372 | 813.4259 | 1624.8348 | 813.4247 | 0.0024 | 2 |
| KEYSHBLGGSGLUVVWAAFTICLIR | | 2510.2568 | 628.5720 | 2510.2558 | 628.5720 | 0.0002 | 4 |
| LANKATEVGAEVSR | | 1398.7413 | 467.5877 | 1398.7419 | 467.5879 | -0.0006 | 3 |
| KICIEBRIK | | 985.5802 | 493.7974 | 985.5808 | 493.7977 | -0.0006 | 2 |
| GGLIVAGYTKPWEIR | | 1656.9370 | 553.3196 | 1656.9352 | 553.3190 | 0.0017 | 3 |
| GGLIVAGYTKPWEIR | (G-L) | 1785.0309 | 447.2850 | 1785.0301 | 447.2848 | 0.0009 | 4 |
| KLKPAEVEGR | | 1125.6508 | 376.2242 | 1125.6506 | 376.2241 | 0.0002 | 3 |
| KLKPAEVEGRQEAQELLSVOK | | 2322.2917 | 581.5802 | 2322.2906 | 581.5799 | 0.0013 | 4 |
| LGSDALGK | | 729.4024 | 365.7085 | 729.4021 | 365.7088 | 0.0003 | 2 |
| LGSDALGK | | 857.4970 | 429.7558 | 857.4971 | 429.7558 | -0.0001 | 2 |
| LPKAEEVGR | | 987.5565 | 333.5261 | 987.5556 | 333.5258 | 0.0010 | 3 |
| LPKAEEVGRQAQELLSVOK | | 2194.1917 | 732.4045 | 2194.1957 | 732.4058 | -0.0041 | 3 |
| MILIDSYKEGGQQILR | | 1793.8988 | 897.9967 | 1793.8982 | 897.9564 | 0.0006 | 2 |
| TSIALSAITCEPVKINR | | 1385.7766 | 693.8856 | 1385.7766 | 693.8856 | 0.0001 | 2 |
| F-1549 (Ctn) | | 1995.1726 | 666.0848 | 1995.1728 | 666.0849 | -0.0002 | 2 |
| VEGAEVLSR | | 958.5078 | 480.2612 | 958.5083 | 480.2614 | -0.0004 | 2 |
| VIGVPTEIK | | 986.6110 | 484.3128 | 986.6114 | 484.3130 | -0.0004 | 2 |
| VIGVPTEIKK | | 1094.7050 | 548.3603 | 1094.7063 | 548.3604 | -0.0002 | 2 |
| VSGLSRATHMLDPAHVAER | | 1757.9160 | 879.9853 | 1757.9173 | 879.9859 | -0.0012 | 2 |
| EIVDYYASQVTTAK | | 1522.7854 | 762.4000 | 1522.7879 | 762.4012 | -0.0024 | 2 |
| EIVDYYASQVTTAK | | 1650.8824 | 626.4485 | 1650.8828 | 626.4487 | -0.0004 | 2 |
| ELLNSNNISI8QPTVVFYSK | | 2021.0450 | 1011.5303 | 2021.0503 | 1011.5324 | -0.0043 | 2 |
| ELLNSNNISI8QPTVVFYSK | | 2133.1492 | 1087.5819 | 2133.1504 | 1067.5825 | -0.0012 | 2 |
| EVGEAYTAK | | 801.4234 | 401.7190 | 801.4232 | 401.7189 | 0.0002 | 2 |
| FEPELTIR | | 1081.5442 | 541.7794 | 1081.5444 | 541.7795 | -0.0001 | 2 |
| FHLPGTR | | 838.4814 | 420.2480 | 838.4814 | 420.2480 | 0.0001 | 2 |
| GGVTVFDEVPK | | 1144.6130 | 573.3138 | 1144.6129 | 573.3137 | 0.0001 | 2 |
| GLTGKLDAR | | 929.5292 | 465.7719 | 929.5294 | 465.7720 | -0.0001 | 2 |
| GLTGKLDAR | | 1057.6252 | 353.5490 | 1057.6244 | 353.5487 | 0.0009 | 3 |
| GPAPFLPLDGTAEGOLHK | | 2023.9736 | 1013.9841 | 2023.9796 | 1013.9871 | -0.0059 | 2 |
| GPMIMSCYNNPEATNALIDK | | 2234.0692 | 1118.0419 | 2234.0711 | 1118.0428 | -0.0019 | 2 |
| GVALPHR | | 748.4342 | 375.2244 | 748.4344 | 375.2245 | -0.0001 | 2 |
| IIIMDSK | | 818.4566 | 410.2356 | 818.4572 | 410.2305 | -0.0005 | 2 |
| IQSALLYVPLTFSPFPK | | 1781.0104 | 891.5125 | 1781.0127 | 891.5136 | -0.0022 | 2 |
| IREFLIK | | 883.5858 | 442.8002 | 883.5854 | 442.8000 | 0.0005 | 2 |
| KGPAPFLPLDGTAEGOLHK | | 2154.0752 | 1078.0449 | 2154.0746 | 1078.0446 | 0.0006 | 2 |
| KIREILIK | | 1011.6794 | 506.8470 | 1011.6804 | 506.8475 | -0.0001 | 2 |
| KLPFIOK | | 838.5640 | 420.2893 | 838.5640 | 420.2893 | 0.0001 | 2 |
| KLRGGVYFDEVPK | | 1541.8918 | 771.9532 | 1541.8930 | 771.9538 | -0.0012 | 2 |
| LAAEAKR | | 817.4484 | 409.7315 | 817.4480 | 409.7313 | 0.0005 | 2 |
| LRSQVYFDEVPK | | 1413.6000 | 707.9073 | 1413.7490 | 707.9063 | 0.0010 | 2 |
| QGTQLTETTSATLITPEGDDKEGAVK | | 2717.3680 | 906.7866 | 2717.3760 | 906.7893 | -0.0080 | 3 |
| REFLPGTR | | 994.5826 | 332.5848 | 994.5825 | 332.5848 | 0.0001 | 3 |
| RYGLNTMHR | | 1129.5736 | 565.7941 | 1129.5741 | 565.7943 | -0.0004 | 2 |
| SLODKYQSLALLYPTLFSPFPK | | 2515.3735 | 839.4651 | 2515.3726 | 839.4648 | 0.0009 | 3 |
| STLIDKTDNLHEIASGAPLSK | | 2528.3132 | 1265.1639 | 2528.3122 | 1265.1634 | 0.0010 | 2 |
| TIALTANSSGSTCLPK | | 1588.8486 | 795.4316 | 1588.8484 | 795.4320 | -0.0007 | 2 |
| TLYGNQR | | 786.4350 | 384.2248 | 786.4348 | 384.2247 | 0.0003 | 2 |
| WVDLICK | | 845.4496 | 423.7921 | 845.4495 | 423.7920 | 0.0001 | 2 |
| WPPEFEAK | | 935.5118 | 468.7632 | 935.5117 | 468.7631 | 0.0001 | 2 |
| YDLSNLHEIASGAPLSK | | 1870.9392 | 936.4769 | 1870.9425 | 936.4785 | -0.0033 | 2 |

| | | | |
|------------------|-------------------------------|-----------|------------------------------------|
| YGLN1NTER | | 68.6 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | EIVDYYASQVTTAK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | EIVDYYASQVTTAKK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | ELINSHANISOPTVVFVSK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | ELINSHANISOPTVVFVSKK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | EVGEVAK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | EVGEVAKR | -0.0002 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (G-L) | EVELEAVK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | FEEFLFIR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | FHLPGIR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | GGVVFDEVPK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | GIGSKDAR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | GLNGKDARK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | GPAPPFLDEDTGATEQHK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | GPMIMSYVNNEPATNALIDK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | GVALPHR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | IIMDSK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | IQSALLVPTLFSPEAK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | IRELLIK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | KGPAPPVPLDEDGTAGEQHK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | KIRELLIK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | KLP1IQR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | KLRGVVYFDEVPK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | LAREMKR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | LRGVVYFDEVPK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | QGYCLTPTTSAILITPPEGDDKEPGAVSK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | RFLHPGR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (G-L) | RFHFLPLIR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | RYGLN1NTER | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | SLODKTQSLALVPTLFSPPFAK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | STLIDKTDLSNLHEIASGAPLSK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | STLIDKTDLSNLHEIASGAPLSK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | TIAIIMSSSSTLKP | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | TIAIIMSSSSTLKP | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (G-L) | TIGYNNQR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | TIGYNNQRGELCVR | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | VVDLDTRK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (G-L) | VVDLDTRK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | VVPPEFAK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | YDLNSNLHEIASGAPLSK | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| Luciferase (Crt) | YGLN1NTER | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| | | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |
| 973.4728 | 487.7437 | 973.4730 | 487.7436 |
| 1522.7882 | 762.4014 | 1522.7879 | 762.4012 |
| 1650.8814 | 826.4480 | 1650.8828 | 826.4487 |
| 2005.0522 | 1003.5334 | 2005.0554 | 1003.5350 |
| 2138.1482 | 1067.5814 | 2133.1504 | 1067.5825 |
| 801.4236 | 401.7191 | 801.4232 | 401.7189 |
| 957.5242 | 479.7894 | 957.5243 | 479.7894 |
| 857.4864 | 429.7505 | 857.4858 | 429.7502 |
| 1081.5448 | 541.7797 | 1081.5444 | 541.7795 |
| 838.4824 | 420.2485 | 838.4814 | 420.2480 |
| 1144.6124 | 573.3135 | 1144.6129 | 573.3137 |
| 929.5300 | 465.7723 | 929.5284 | 465.7720 |
| 1057.6258 | 353.5492 | 1057.6244 | 353.5487 |
| 2028.9738 | 1013.9867 | 2025.9738 | 1013.9871 |
| 2234.0638 | 1118.0417 | 2234.0711 | 1118.0428 |
| 748.4344 | 375.2245 | 748.4344 | 375.2245 |
| 818.4572 | 410.2359 | 818.4572 | 410.2359 |
| 1781.0118 | 891.5132 | 1781.0127 | 891.5136 |
| 883.5854 | 442.8000 | 883.5854 | 442.8000 |
| 2154.0778 | 1078.0462 | 2154.0746 | 1078.0446 |
| 1011.6804 | 506.8475 | 1011.6804 | 506.8475 |
| 838.5638 | 420.2892 | 838.5640 | 420.2893 |
| 1541.8924 | 771.9535 | 1541.8930 | 771.9538 |
| 817.4478 | 409.7312 | 817.4480 | 409.7313 |
| 1413.7978 | 707.9062 | 1413.7980 | 707.9063 |
| 2717.3716 | 906.7978 | 2717.3760 | 906.7983 |
| 994.5820 | 498.2983 | 994.5825 | 498.2985 |
| 1050.8466 | 351.2223 | 1050.8451 | 351.2223 |
| 1128.5742 | 377.5320 | 1129.5741 | 377.5320 |
| 2515.5732 | 839.4650 | 2515.5726 | 839.4648 |
| 2528.3102 | 1285.1624 | 2528.3122 | 1265.1634 |
| 2584.3744 | 862.4654 | 2584.3748 | 862.4655 |
| 1604.8444 | 803.4295 | 1604.8443 | 803.4294 |
| 1644.9114 | 823.4630 | 1644.9120 | 823.4633 |
| 786.4348 | 394.2247 | 786.4348 | 394.2247 |
| 1500.7825 | 501.2681 | 1500.7821 | 501.2683 |
| 845.4495 | 423.7319 | 845.4495 | 423.7320 |
| 901.5122 | 451.7634 | 901.5121 | 451.7633 |
| 935.5116 | 468.7631 | 935.5117 | 468.7631 |
| 1870.9398 | 936.4772 | 1870.9425 | 936.4785 |
| 973.4726 | 487.7436 | 973.4730 | 487.7438 |
| | | 2 | Luciferase-nev-tRNA ^{Leu} |

* Specific peptides with leucine translated from GCG codon are indicated as "G-".

線虫において新規に獲得された
tRNA分子の進化および機能の解析

2012年3月30日 初版発行

著者 浜島聖文

監修 先端生命科学研究所会(金井・富田・曾我・板谷・内藤・佐野)

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会

〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322

TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

ISBN 978-4-87762-253-4
SFC-MT 2011-003

