

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	<p>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.</p>
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.

優秀修士論文

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 ^{Ile} 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. ノザンブ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命的となるか、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)、繊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った. 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エブルアーム (variable arm; V-arm) 上に aaRS の識別因子が存在する 경우가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とすれば、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					
		U	C	A	G		
First Base of Codon	U	Phe (UUU)	Ser (UCU)	Tyr (UAU)	Cys (UGU)	U	Third Base of Codon
		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。

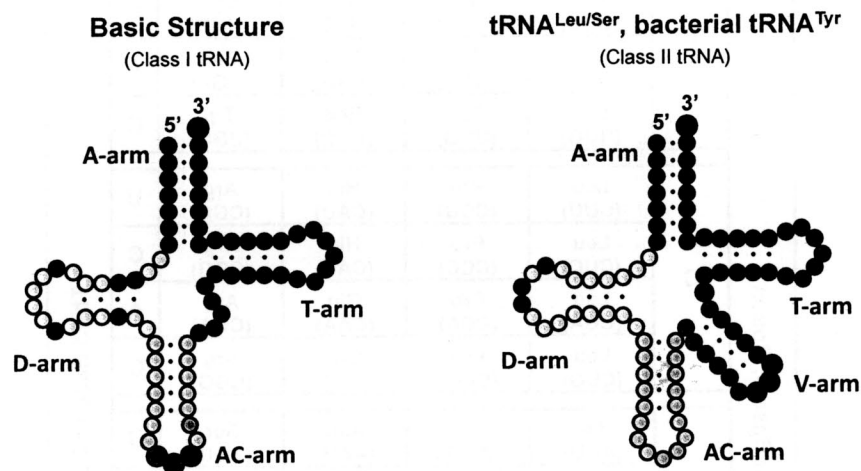


図 2. tRNA の二次構造とアイデンティティを決定するヌクレオチドの分布. tRNA はバリエーション領域の構造の違いによって2つのクラスに分類される. 多くの tRNA が属する Class I tRNA のそれは4-5 塩基程度のループであり, アイデンティティ要素はアクセプターステムやアンチコドンに多く存在する. tRNA^{Leu/Ser} (例外としてバクテリアの tRNA^{Tyr}) は Class II tRNA に属し, 15-20 塩基程度のステムループ構造 (V-arm) をもつ. aaRS による Class II tRNA の認識にはアンチコдонはさほど重要ではなく, 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きで強調している.

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

ロットティング法で Hybond-N+ membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にトランスファーした。続いて, Biotin 3'-End DNA Labeling Kit (Pierce Biothechnology, 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, エチジウムブ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) の遺伝子配列の増幅を行った. 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 50 μ g/ml アンピシリン及び 35 μ g/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 buffered 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), 3 μ g tRNA, 1 μ g aaRS (IleRS のみアミノアシル化効率が悪かったため 5 μ g 使用した) の total 25 μ l 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 (Köhler 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) を鋳型に, 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, ノザンブ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) をそれぞれ鋳型に, 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 \times 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 μ l の昆虫の翻訳系 *Spodoptera frugiperda* Sf21 cell line (Promega) を用い、4 μ g の T7 発現ベクター (PF1549 タンパク質または firefly luciferase) と 4 μ 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 μ 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 で遠心分離し壊死組織片を除去し、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 (Rappsilber 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, Tokyo, 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 μ 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 μ m O.D. \times 100 μ 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、5–10% B (5m), 10–40% B (60m), 40–100% 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 スキャンレンジは 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테인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* に共通なオーソログス遺伝子である. *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 のオーソログス遺伝子を得た. 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.

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	CCCGGGCCGCCCCGCGTGGCAGGCGAGCATTCCTACCA
	Ile(UAU)	38	TATAAGTACCACGCGCTAACCGACTGCGCCAATGGGGC
nev-tRNA	Gly(CCC)	35	CTCTGTTACCAGAATAGGATCGGGAGTCCTACGCC
	Gly(CCC)	35	TCGAACCCGCGCTCTGTTACCAGAATAGGATCGGG
	*Gly(CCC)	83	TGCGGTGGACGGGATTCGAACCCGCGCTCTGTTACCAGAATAGGATCGGGAGTC CTACGCCTTCACCGCTCGGCCACCACCGC
	Ile(UAU)	36	ACTGGTTTAACCCAATGAGATCATAAGTCTCAGGCC
	Ile(UAU)	36	TCGAACCCGCGACTGGTTTAACCCAATGAGATCATA
	Lys(CUU)	36	TCGGTTAGAACCCTTGAGATCAAGTGTCTCATGCC

* for acid-urea PAGE/northern blot analysis

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	GCATCGGTGGTTCAGTGGTAGA
	Gly(GCC)	antisense	TGCATCGACCGGAATCGAACC
	Ile(UAU)	sense	GCCCCATTGGCGCAGTCGGTTAGC
	Ile(UAU)	antisense	TGCCCCATGCCAGGCTCGAACTG
nev-tRNA	Gly(CCC)	sense	GCGGTGGTGGCCGAGCGGTC
	Gly(CCC)	antisense	TGCGGTGGACGGGATTCGAACC
	Ile(UAU)	sense	GCCCCGGTGGCCGAGCGGTCGAAG
	Ile(UAU)	antisense	TGCCCCGGGCGGGATTCTGAACCC
	Lys(CUU)	sense	GACACGGTGGCCGAGTGGTTT
	Lys(CUU)	antisense	TGACACGGGCAGGATTCGAACC

.....

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った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、その数也多コピーである。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。

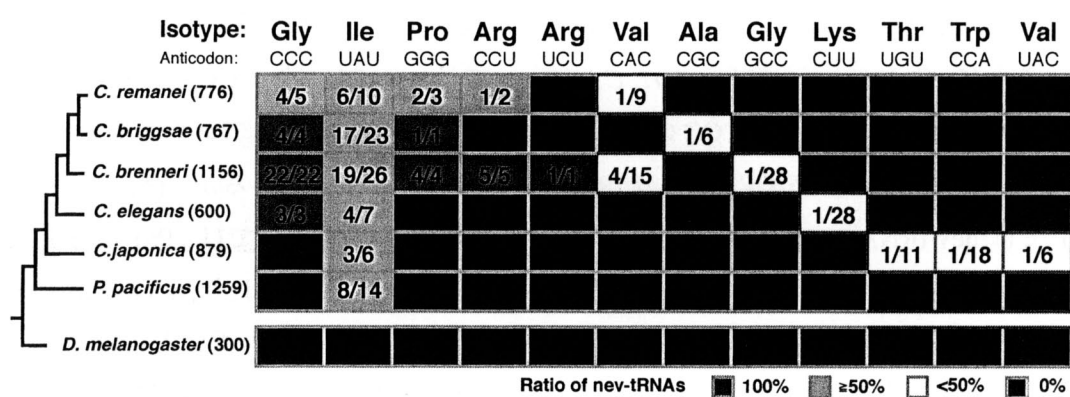


図 3. 線虫における nev-tRNA の進化的保存性. それぞれの線虫種において, 各アンチコドンに対応する tRNA の内 nev-tRNA が占める割合を色で示した. 100%が赤, 50%以上が黄, それ以下が白である. ゲノムにコードされている全 tRNA 数を生物種名の隣に示した. たとえば *C. elegans* の Ile (UAU) ではアンチコドン UAU をもつ tRNA 全 7 種のうち, 4 コピーが nev-tRNA であり, 残りの 3 コピーが標準的な Class I tRNA (ただし, この場合はイントロン介在型 tRNA) であることを意味する.

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'-TGGC^NNAGTGG-3'), B-box (5'-GGTCGANNCC-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 $\text{nev-tRNA}^{\text{Ile}}$ (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、 $\text{nev-tRNA}^{\text{Ile}}$ (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。

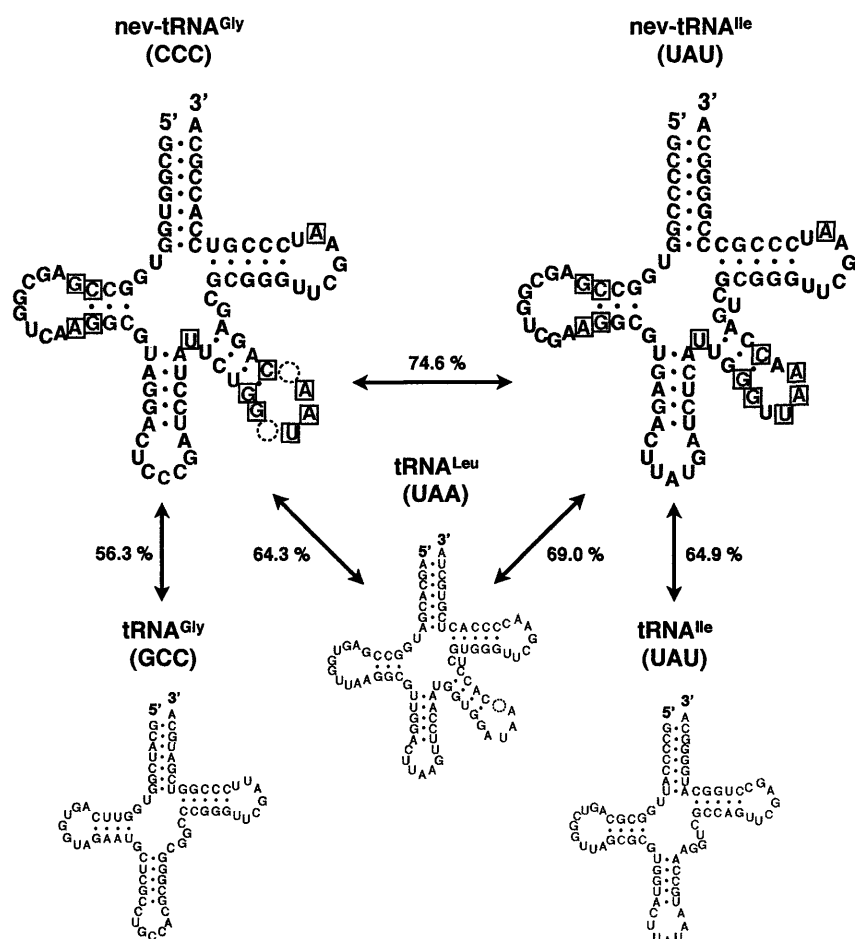


図 5. nev-tRNA と関連 tRNA との塩基配列及び二次構造の比較. nev-tRNA^{Gly} (CCC) と Class I tRNA^{Gly} (GCC) 間でのみ保存されている塩基を青で, nev-tRNA^{Ile} (UAU) と Class I tRNA^{Ile} (UAU) 間でのみ保存されている塩基を黄で, 二種の nev-tRNA と tRNA^{Leu} (UAA) 間で保存されている塩基を赤で示した. V-arm 介在型の 3 つの tRNA 間で共通する塩基は四角で囲った. それぞれの tRNA 間の配列類似度はパーセンテージで示している.

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っていない. 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った. 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 解析を行ったところ, 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 から明らかなように nev-tRNA は非常に低発現である. nev-tRNA^{Lys} に至っては northern blot 解析では検出することができず, RT-PCR 解析でやっ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 にしても成熟 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ったことにも注目したい. nev-tRNA の V-arm は本来存在すべきでない 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。

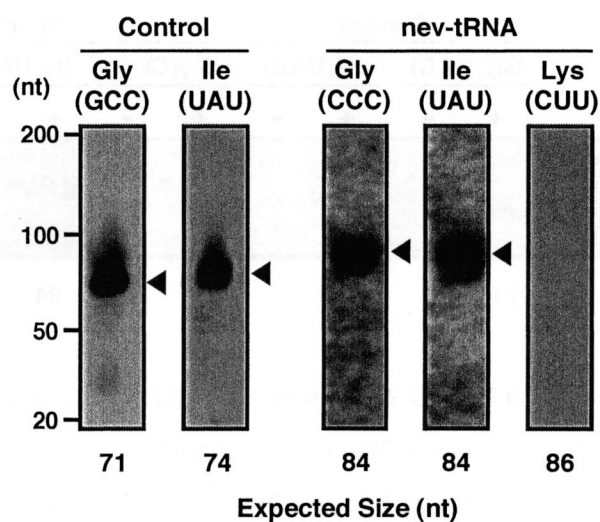


図 6. *C. elegans* における nev-tRNA の northern blot 解析. *C. elegans* より見つかった nev-tRNA^{Gly} (CCC), nev-tRNA^{Ile} (UAU), nev-tRNA^{Lys} (CUU) とコントロールにこれらの同義 tRNA にあたる tRNA^{Gly} (GCC) と tRNA^{Ile} (UAU) の northern blot 解析の結果を示した. 黒三角で情報解析によって予測された転写物のサイズの位置を示した. nev-tRNA^{Lys} は, 1 レーンあたりの total RNA の量を 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.

第3章 結果

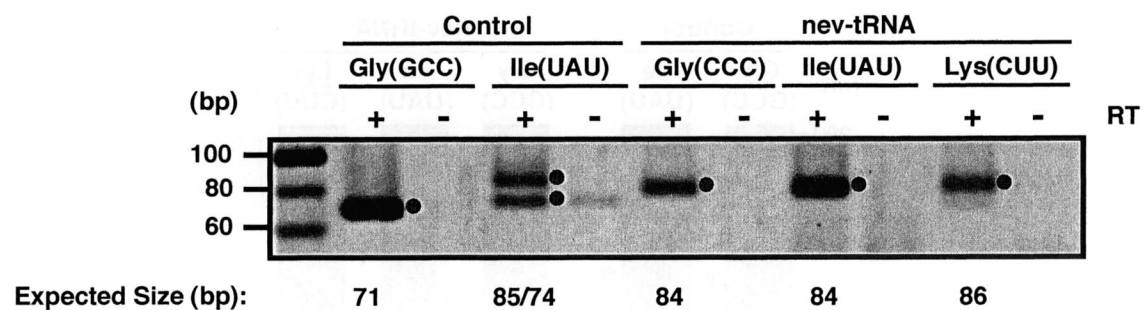


図 7. *C. elegans* における RT-PCR 解析による nev-tRNA の発現確認. *C. elegans* において予測された 3 種の nev-tRNA 及びその同義 tRNA (Control) の発現レベルを RT-PCR によって同定した. ネガティブコントロールとして用いた逆転写酵素無添加 (RT-) ではバンドは観察されず, 逆転写酵素依存にその発現が確認できる (RT+). 期待されるサイズの位置を赤いドットで示している. なお, コントロールとして用いた tRNA^{Ile} (UAU) はイントロン介在型 tRNA であるため, 前駆体/成熟 tRNA 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

第3章 結果

る結合能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) バリエーションを作成し、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* においても同様に 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ようとしたが、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)。

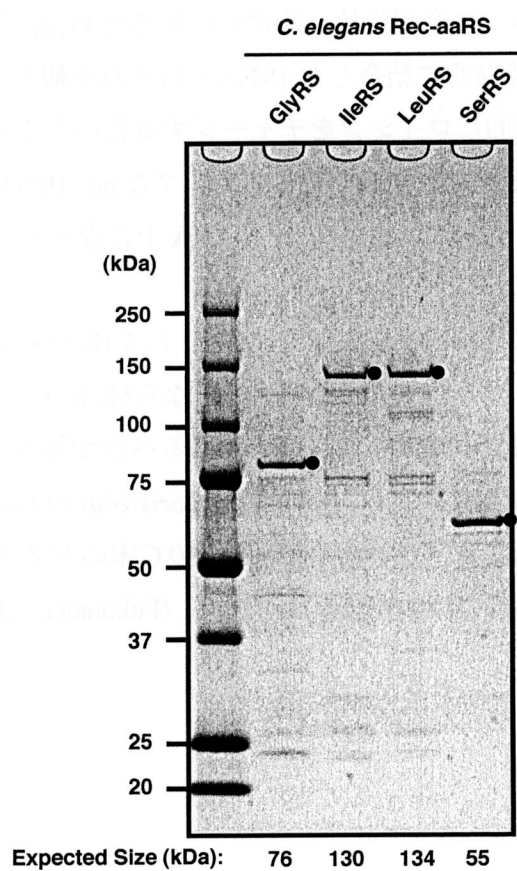


図 8. *C. elegans* の組換え体 aaRS の SDS-PAGE. Ni^{2+} のアガロース樹脂のスピンカラムを用いて His-tag の組換え体 aaRS 酵素を精製した後、ゲルろ過を行った (対象と手法参照). サンプルは 10-20% 勾配ゲルの SDS-PAGE を行い, Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色した. 精製した目的の aaRS の位置は赤で示した.

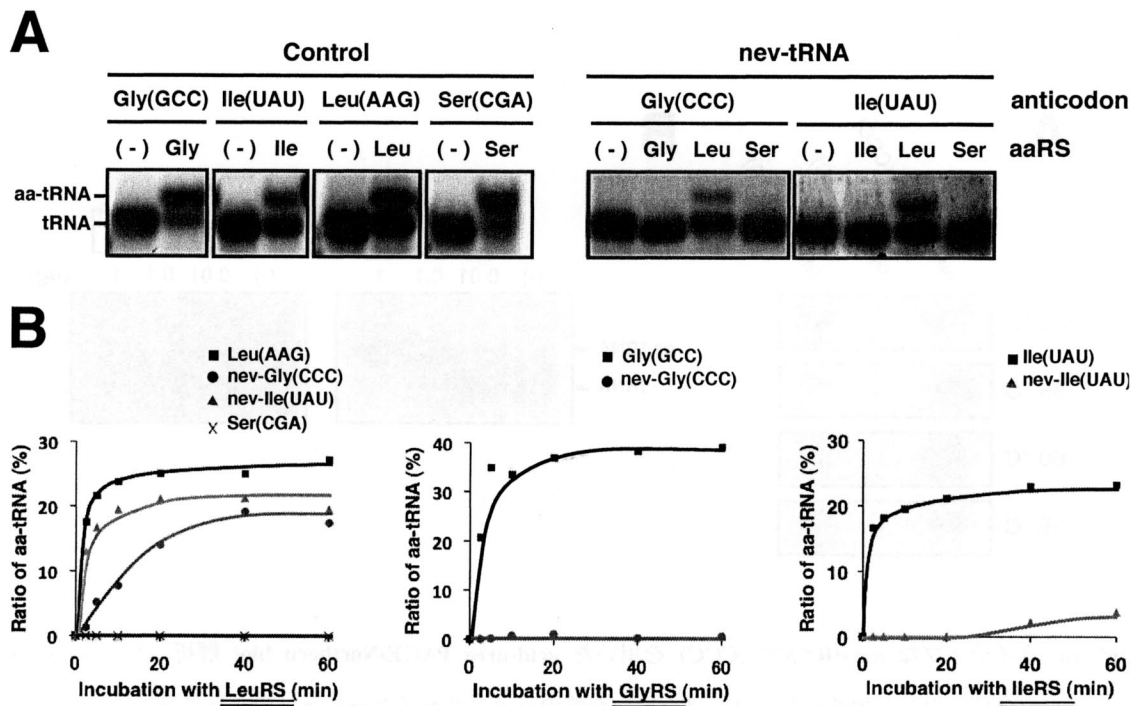


図 9. nev-tRNA のアミノアシル化アッセイ。(A) *In vitro* 転写により合成した4種の control tRNA, nev-tRNA^{Gly} (CCC) 及び nev-tRNA^{Ile} (UAU) のアミノアシル化を4種の組み換え体 aaRS (GlyRS, IleRS, SerRS, LeuRS) を用いて行った。アミノアシル化 tRNA (aminoacylated tRNA; aa-tRNA) は acid-urea PAGE で電気泳動分離し、SYBR Green II で染色した。(B) nev-tRNA のアミノアシル化効率を0, 2.5, 5, 10, 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。

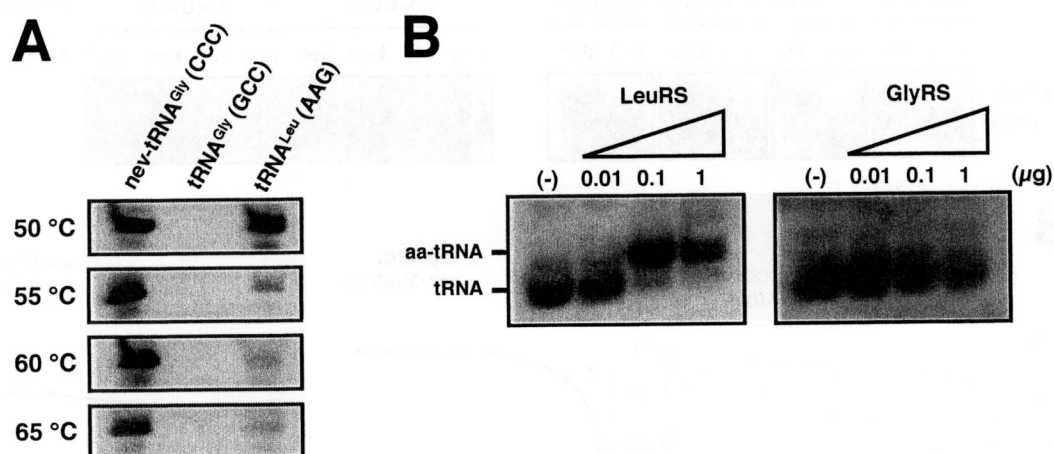


図 10. ネイティブな nev-tRNA^{Gly} (CCC) を用いた acid-urea PAGE/Northern blot 解析. (A) nev-tRNA^{Gly} (CCC) の全長に対して相補的なプローブを用いた際のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの検討. ハイブリダイゼーションと洗浄を 50, 55, 60, 65 °C の 4 条件で行い, それぞれの条件における *In vitro* 転写により合成した nev-tRNA^{Gly} (CCC), tRNA^{Gly} (GCC), tRNA^{Leu} (AAG) の検出を試みた. (B) acid-urea 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 分を行った.

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.

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).

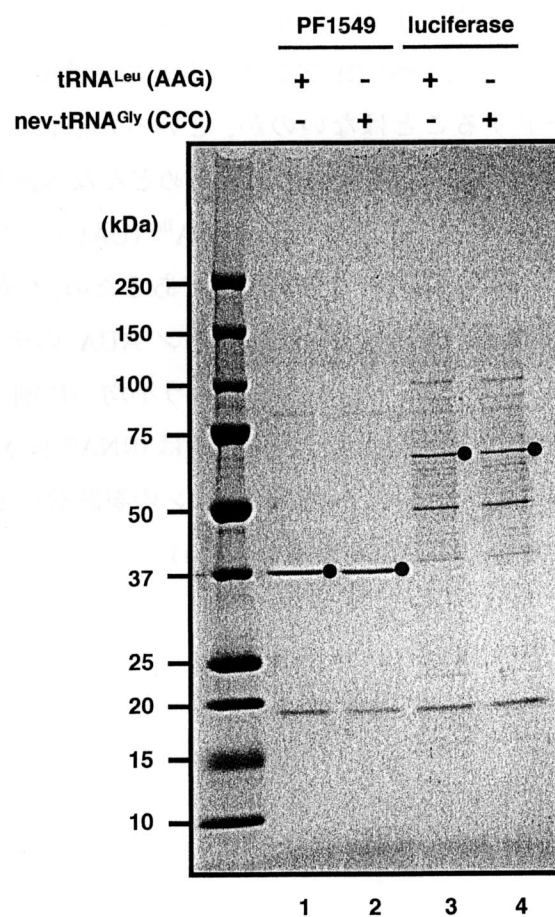


図 12. *In vitro* 翻訳で合成したタンパク質の精製とその SDS-PAGE. His-tag を付加した組み換え体タンパク質を、無細胞翻訳系で合成した後にマグネットビーズで精製した (対象と手法参照). サンプルは 10-20% の勾配ゲルで SDS-PAGE を行い, CBB で染色した. レーン 1-2 が *in vitro* で翻訳した PF1549 (37kDa) で, レーン 3-4 がルシフェラーゼ (61kDa) である. 翻訳反応で外部から加えた tRNA は, レーン 1, 3 が tRNA^{Leu} (AAG), レーン 2, 4 が nev-tRNA^{Gly} (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	GGGIVAGYVKPIER		45.0	37.4
PF1549	GGGIVAGYVKPIERK		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	GGLIVAGYVKPIER		-	46.1
PF1549	GGLIVAGYVKPIERK		-	20.1
PF1549	KLKPAEEVGR		-	42.8
PF1549	KLKPAEEVGREAAQELLSQVK		-	20.3
PF1549	LKPAEEVGR		-	30.5
PF1549	LKPAEEVGREAAQELLSQVK		-	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	TIALIMNSSGSGTGLPK	Oxidation@M:6	122.0	121.6
Luciferase	VVDLDTGK		40.6	37.0
Luciferase	EVLEAVAK		-	25.9
Luciferase	RFHLPILIR		-	25.4
Luciferase	STLIDKYDLSNLHETASIGAPLSK		-	71.6
Luciferase	TIALIMNSSGSGTLLPK		-	91.6
Luciferase	VVDLDTLK		-	47.3

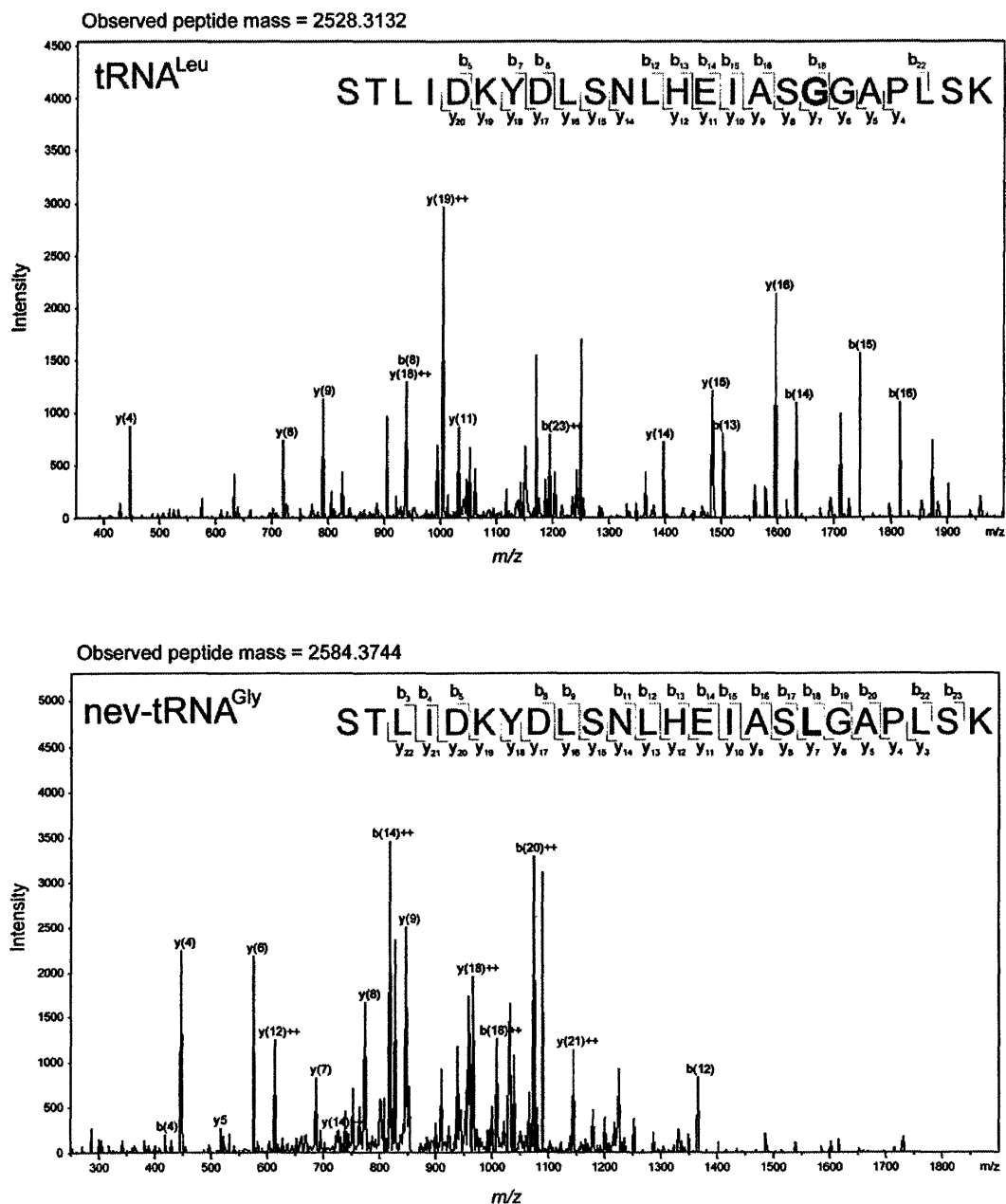


図 13. GGG コドン由来の残基を含んだペプチドの MS/MS スペクトルの比較. tRNA^{Leu} (AAG) もしくは nev-tRNA^{Gly} (CCC) を含んだ無細胞系において合成したルシフェラーゼ由来のペプチド STLIDKYDLSNLH EIAS(G/L)GAPLSK を比較した. この解析において検出されたフラグメントイオンを示しており, GGG コドン由来の残基の位置は赤で表示した.

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、こうした置換は致命的だと考えられる。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。

これらのことを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。

第4章 議論

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経なければならぬ。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ない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する。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の方が自然である。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 の一塩基目はリシジ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、ある特殊なコンテキ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 に特異的なステムループ構造が必要で (Berry et al., 1991; 1993; Farabaugh, 1993)、EF-Tu に代わる特殊なペプ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 とも対合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キストが観えてくる可能性はある。そこで、近縁種とオーソログ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を特定を試みた。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* で共通のオーソログス遺伝子 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のか？ 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ステム構造を崩すような変異はないことである。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と期待が集まる場所であるが、*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、もしくはレトロトラン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である可能性もある. 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.

第4章 議論

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

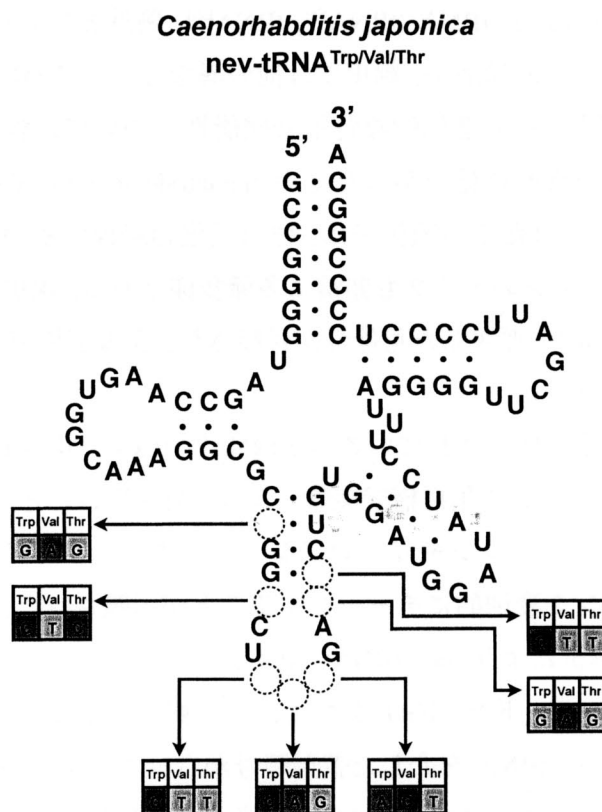


図 14. *C. japonica* の 3 種の nev-tRNA の配列パターンとその二次構造. *C. japonica* における互いに高い配列類似度をもつ 3 種の nev-tRNA^{Trp} (CCA), nev-tRNA^{Val} (UAC), nev-tRNA^{Thr} (UGU) の配列を比較したもの. ハイライトした箇所が互いに異なるヌクレオチドをもつ位置で, 他の位置はすべて同一ヌクレオチドをもつ.

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、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、改め金井さんに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の成果は成し得なかっ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て頂き、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、改めぎきの、小川真菜氏、改め小川さんら 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い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 tRNA^{Ser} : sequence elements necessary for serylation 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 tRNA^{Ser} 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 Å 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 Å 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 tRNA^{Leu} 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 *Stylonychia 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, Rappsilber 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, McGettigan 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.
- Rappsilber 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.
- Sprinzi 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-azmatinylcytidine 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, Kriklivyi 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

						Nearest Gene ^b	
ID	Chromosome	Strand	Start Position	End Position	Isotype	COVE ^a	Localization
CBEUV01	chrUn	-	49595801	49595718	Arg (CCU)	75.7	intergenic
CBEUV02	chrUn	+	90481247	90481331	Arg (CCU)	51.8	intergenic
CBEUV03	chrUn	+	135420606	135420689	Arg (CCU)	78.2	intergenic
CBEUV04	chrUn	+	139901106	139901189	Arg (CCU)	68.5	intergenic
CBEUV05	chrUn	-	173476590	173476497	Arg (CCU)	75.7	intergenic
CBEUV06	chrUn	+	98280538	98280621	Arg (UCU)	56.5	intergenic
CBEUV07	chrUn	-	157628871	157628786	Gly (GCC)	46.7	intron
CBEUV08	chrUn	-	44895006	44898923	Gly (CCC)	66.0	intergenic
CBEUV09	chrUn	-	44956004	44955921	Gly (CCC)	63.5	intron
CBEUV10	chrUn	+	52302398	52302481	Gly (CCC)	72.0	intergenic
CBEUV11	chrUn	+	65756121	65756204	Gly (CCC)	69.6	intergenic
CBEUV12	chrUn	+	65779668	65779751	Gly (CCC)	73.5	intergenic
CBEUV13	chrUn	-	65784772	65784689	Gly (CCC)	69.6	intergenic
CBEUV14	chrUn	-	77278666	77278583	Gly (CCC)	63.5	intron-as
CBEUV15	chrUn	-	77347572	77347489	Gly (CCC)	72.0	intron
CBEUV16	chrUn	-	96214039	96213956	Gly (CCC)	72.0	intron
CBEUV17	chrUn	-	96217761	96217678	Gly (CCC)	65.7	intron
CBEUV18	chrUn	-	96223989	96223906	Gly (CCC)	70.5	intron
CBEUV19	chrUn	+	96229404	96229487	Gly (CCC)	72.0	intron-as
CBEUV20	chrUn	-	108459014	108458931	Gly (CCC)	72.0	intron-as
CBEUV21	chrUn	+	108464259	108464342	Gly (CCC)	72.0	intron-as
CBEUV22	chrUn	-	108466679	108466596	Gly (CCC)	72.0	intron-as
CBEUV23	chrUn	+	108469757	108469640	Gly (CCC)	72.0	intron
CBEUV24	chrUn	+	108472283	108472366	Gly (CCC)	70.0	intron
CBEUV25	chrUn	+	123534372	123534455	Gly (CCC)	63.5	intergenic
CBEUV26	chrUn	-	128630580	128630497	Gly (CCC)	59.0	intron-as
CBEUV27	chrUn	+	151162459	151162542	Gly (CCC)	67.7	intergenic
CBEUV28	chrUn	+	174812053	174812136	Gly (CCC)	62.7	intergenic
CBEUV29	chrUn	-	204709220	204709137	Gly (CCC)	63.5	intergenic
CBEUV30	chrUn	+	81985208	81985292	Ile (UAU)	70.7	intron-as
CBEUV31	chrUn	+	81988507	81988591	Ile (UAU)	72.5	intron-as
CBEUV32	chrUn	+	82018557	82018641	Ile (UAU)	72.3	intergenic
CBEUV33	chrUn	+	82019139	82019223	Ile (UAU)	71.2	intergenic
CBEUV34	chrUn	+	82092949	82093033	Ile (UAU)	73.6	intergenic
CBEUV35	chrUn	-	82093543	82093627	Ile (UAU)	66.1	intergenic
CBEUV36	chrUn	-	113365509	113365425	Ile (UAU)	71.2	intergenic
CBEUV37	chrUn	-	113367599	113367599	Ile (UAU)	71.2	intergenic
CBEUV38	chrUn	-	113368278	113368194	Ile (UAU)	73.6	intergenic
CBEUV39	chrUn	+	117389737	117389821	Ile (UAU)	73.6	intergenic
CBEUV40	chrUn	+	117390341	117390425	Ile (UAU)	71.3	intergenic
CBEUV41	chrUn	+	117392494	117392578	Ile (UAU)	71.2	intergenic
CBEUV42	chrUn	+	128873151	128873235	Ile (UAU)	74.6	intergenic
						Name	
						sra-11	Serpentine Receptor, class A (alpha) family member
						ZK418.11	hypothetical protein
						pqr-71	Prion-like (QJN-rich)-domain-bearing protein family member
						W0288.1	hypothetical protein
						sra-11	Serpentine Receptor, class A (alpha) family member
						K08H10.3	hypothetical protein
						K08H10.3	hypothetical protein
						clec-234	C-type LECTin family member
						Y69H2.14	hypothetical protein
						F58E2.2	hypothetical protein
						C31C9.7	hypothetical protein
						Y48E1A.1	hypothetical protein
						kqt-3	potassium channel, KvQLT family member
						pgh-1	Pharynx-associated GAS (growth arrest protein) related family member
						cdc-25.4	Cell Division Cycle related family member
						F54B3.1	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						CS0F4.10	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						F54B3.1	hypothetical protein
						clec-125	C-type LECTin family member
						pgh-1	Pharynx-associated GAS (growth arrest protein) related family member
						srd-2	Serpentine Receptor, class D (delta) family member
						C31C9.7	hypothetical protein
						fipr-13	FIP (Fungus-Induced Protein) Related family member
						ugt-27	UDP-GlucuronosylTransferase family member
						ugt-28	UDP-GlucuronosylTransferase family member
						W09C3.7	hypothetical protein
						ugt-32	UDP-GlucuronosylTransferase family member
						Y23H5B.4	hypothetical protein
						Y23H5B.4	hypothetical protein
						noah-1	NOMpA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member
						pqp-2	P-GlycoProtein related family member
						pqp-2	P-GlycoProtein related family member
						noah-1	NOMpA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member
						noah-1	NOMpA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member
						noah-1	NOMpA Homolog (Drosophila nompA; no mechanoreceptor potential A) family member
						anx-5	ARp23 complex component family member

CBEUV43	chrUn	+	139484203	139484287	Ile	(UUA)	72.2	intron	gnr-1	human GnRH Receptor (GnRH-R) related family member
CBEUV44	chrUn	-	162257307	162257223	Ile	(UUA)	73.0	intron-as	ugt-29	UDP-Glucuronosyltransferase family member
CBEUV45	chrUn	-	162260979	162260895	Ile	(UUA)	71.2	intron-as	ugt-28	UDP-Glucuronosyltransferase family member
CBEUV46	chrUn	+	179276696	179276780	Ile	(UUA)	73.6	intergenic	Y23H5B.4	hypothetical protein
CBEUV47	chrUn	+	179279581	179279665	Ile	(UUA)	71.3	intergenic	ent-3	Equilibrative Nucleoside Transporter family member
CBEUV48	chrUn	+	191197626	191197710	Ile	(UUA)	71.2	intergenic	E01G4.6	hypothetical protein
CBEUV49	chrUn	-	115464800	115464715	Pro	(GGG)	37.1	intergenic	F02E9.5	hypothetical protein
CBEUV50	chrUn	+	130684124	130684209	Pro	(GGG)	40.6	intergenic	T10B11.2	hypothetical protein
CBEUV51	chrUn	+	163234209	163234292	Pro	(GGG)	49.0	intergenic	fbp-1	Fructose-1,6-BiPhosphatase family member
CBEUV52	chrUn	+	182030997	182031080	Pro	(GGG)	49.0	intergenic	fbp-1	Fructose-1,6-BiPhosphatase family member
CBEUV53	chrUn	+	129301206	129301290	Val	(CAC)	52.5	intergenic	C03G6.6	hypothetical protein
CBEUV54	chrUn	-	129309145	129309061	Val	(CAC)	45.5	intergenic	F44D12.8	hypothetical protein
CBEUV55	chrUn	+	148827680	148827764	Val	(CAC)	50.4	intergenic	F44D12.8	hypothetical protein
CBEUV56	chrUn	+	148834876	148834792	Val	(CAC)	52.5	intergenic	C03G6.6	hypothetical protein
CBIUV01	chrIII	+	6307513	6307596	Ala	(GCG)	57.5	intergenic	ZK418.11	hypothetical protein
CBIUV02	chrI	+	3962928	3963011	Gly	(CCC)	67.3	intron	bcs-1	BCS1 (mitochondrial chaperone) homolog family member
CBIUV03	chrI	-	3971981	3971988	Gly	(CCC)	73.2	intron-as	F54C9.9	hypothetical protein
CBIUV04	chrI	+	3972134	3972217	Gly	(CCC)	67.7	intron	F54C9.9	hypothetical protein
CBIUV05	chrI	-	3975781	3975698	Gly	(CCC)	79.2	intron-as	art-1	ARF-Like family member
CBIUV06	chrI_random	-	3498371	3498288	Ile	(UUA)	80.6	intron-as	H37N21.1	hypothetical protein
CBIUV07	chrI_random	-	3498899	3498816	Ile	(UUA)	76.1	intron-as	H37N21.1	hypothetical protein
CBIUV08	chrI	-	6501949	6501866	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	C36F7.2	hypothetical protein
CBIUV09	chrI	+	6502462	6502545	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	C36F7.2	hypothetical protein
CBIUV10	chrI	+	6506662	6506745	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	T22C1.9	hypothetical protein
CBIUV11	chrI	+	6509561	6509644	Ile	(UUA)	68.0	intergenic	T22C1.9	hypothetical protein
CBIUV12	chrI	-	6510161	6510078	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	T22C1.9	hypothetical protein
CBIUV13	chrI	+	6511932	6512015	Ile	(UUA)	51.2	intergenic	T22C1.9	hypothetical protein
CBIUV14	chrI	-	6520859	6520776	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	C28A5.2	hypothetical protein
CBIUV15	chrI	-	6642252	6642169	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	C54G4.4	hypothetical protein
CBIUV16	chrI	+	6642801	6642884	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	C54G4.4	hypothetical protein
CBIUV17	chrI	+	6643457	6643540	Ile	(UUA)	69.8	intergenic	C54G4.4	hypothetical protein
CBIUV18	chrI	+	6665886	6665803	Ile	(UUA)	73.9	intergenic	F58D5.7	hypothetical protein
CBIUV19	chrI	+	6744901	6744984	Ile	(UUA)	74.9	intron-as	F55D12.2	hypothetical protein
CBIUV20	chrI	+	6746285	6746368	Ile	(UUA)	73.9	intron-as	F55D12.2	hypothetical protein
CBIUV21	chrI	+	6748639	6748722	Ile	(UUA)	57.9	intron-as	F55D12.2	hypothetical protein
CBIUV22	chrI	+	6785191	6785278	Ile	(UUA)	66.7	intergenic	dfr-3	Dicer Related Helicase family member
CBIUV23	chrIII	-	4211509	4211426	Pro	(GGG)	32.8	intergenic	C54C8.6	hypothetical protein
CEUV01	chrI	-	10601202	10601120	Gly	(CCC)	72.0	intron-as	pash-1	Partner of DroSHA (DRSH-3 interactor) family member
CEUV02	chrI	+	10601838	10601820	Gly	(CCC)	72.0	intron	pash-1	Partner of DroSHA (DRSH-1 interactor) family member
CEUV03	chrI	-	10604203	10604121	Gly	(CCC)	72.0	intron-as	pash-1	Partner of DroSHA (DRSH-2 interactor) family member
CEUV04	chrI	+	7960830	7960914	Ile	(UUA)	79.7	intron-as	T22C1.12	hypothetical protein
CEUV05	chrI	+	9562343	9562427	Ile	(UUA)	79.7	intergenic	fig-5	neuRonal IGCAM family member
CEUV06	chrI	-	9563917	9563833	Ile	(UUA)	79.7	intergenic	fig-5	neuRonal IGCAM family member
CEUV07	chrX	-	9829683	9829599	Ile	(UUA)	79.7	intron	roc-1	RhoGAP for Rac-1 and Cdc-42 family member
CEUV08	chrIII	-	6724158	6724073	Lys	(CUU)	71.0	intron-as	F37A4.1	hypothetical protein
CJAU01	chrUn	-	117342044	117341960	Ile	(UUA)	75.7	intergenic	rskn-2	RSK-pNinety (RSK-p90 kinase) homolog family member
CJAU02	chrUn	+	138538062	138538146	Ile	(UUA)	75.7	intergenic	K04G2.9	hypothetical protein

CJAU03	chrUn	-	138543058	138542974	Ile	(UUA)	75.7	intergenic	K04G32.9	hypothetical protein
CJAU04	chrUn	-	42974041	42973958	Thr	(UGU)	51.3	intron	ugt-9	UDP-Glucuronosyltransferase family member
CJAU05	chrUn	+	87595760	87595843	Trp	(CCA)	55.8	intergenic	gri-26	Ground-Like (gri related) family member
CJAU06	chrUn	+	126225166	126225249	Val	(UAC)	53.1	intergenic	cyk-1	Cytokinesis defect family member
CREUV01	chrUn	-	23853810	23853727	Arg	(CGU)	47.8	intron-as	gri-29	Ground-Like (gri related) family member
CREUV02	chrUn	-	19286759	19286678	Gly	(CCC)	75.2	intron-as	C48H11.6	hypothetical protein
CREUV03	chrUn	-	19323134	19323052	Gly	(CCC)	74.1	intron	C05D11.8	hypothetical protein
CREUV04	chrUn	-	19325044	19324962	Gly	(CCC)	74.1	intron	C05D11.8	hypothetical protein
CREUV05	chrUn	-	19671121	19671039	Gly	(CCC)	74.1	intron-as	polq-1	POLQ (DNA polymerase theta) homolog family member
CREUV06	chrUn	+	21965339	21965423	Ile	(UAU)	75.1	intron	sng-1	Suppressor with Morphological effect on Genitalia family member
CREUV07	chrUn	-	25627015	25626931	Ile	(UAU)	73.2	intergenic	msh-5	MSH (MutS Homolog) family member
CREUV08	chrUn	-	25631915	25631831	Ile	(UAU)	73.2	intron	msh-5	MSH (MutS Homolog) family member
CREUV09	chrUn	-	25636216	25636132	Ile	(UAU)	73.2	intergenic	msh-5	MSH (MutS Homolog) family member
CREUV10	chrUn	-	25642385	25642301	Ile	(UAU)	73.2	intergenic	C55C3.3	hypothetical protein
CREUV11	chrUn	-	25694155	25694071	Ile	(UAU)	73.2	intron-as	Y48G1C.4	hypothetical protein
CREUV12	chrUn	+	109191950	109192033	Pro	(GGG)	49.5	intergenic	K08B9.3	hypothetical protein
CREUV13	chrUn	-	111749904	111749821	Pro	(GGG)	49.5	intergenic	C36A4.4	hypothetical protein
CREUV14	chrUn	-	21921410	21921327	Val	(CAC)	48.8	intergenic	F02E9.5	hypothetical protein
PPAU01	chrUn	-	10268759	10268677	Ile	(UAU)	72.51	intron	pxf-1	PDZ exchange factor
PPAU02	chrUn	-	97319877	97319795	Ile	(UAU)	74.48	intron-as	F25D7.2	hypothetical protein
PPAU03	chrUn	-	133533498	133533416	Ile	(UAU)	74.48	intron-as	noi-6	a nucleolar RNA-associated protein (NRAP)
PPAU04	chrUn	+	160878689	160878748	Ile	(UAU)	58.33	intron	F36H1.2a	hypothetical protein
PPAU05	chrUn	+	160889950	160890032	Ile	(UAU)	71.75	intron-as	cdc-42	Cell Division Cycle related protein
PPAU06	chrUn	+	160892350	160892432	Ile	(UAU)	66.04	intron-as	cdc-42	Cell Division Cycle related protein
PPAU07	chrUn	-	160902693	160902611	Ile	(UAU)	74.01	intron-as	unc-33	Collapsin response mediator protein-2
PPAU08	chrUn	-	171980594	171980512	Ile	(UAU)	70.73	intron-as	C32D5.3	hypothetical protein

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

^b 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* 12:996-1006.
 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	ObsMass	ObsMz	CalcMass	CalcMz	DeltaMass	Charge	PeptScore	Data
PF1549 (Ch)	AMEELK	Oxidation@M:3	806.3846	404.1996	806.3844	404.1995	0.0002	2	49.2	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	ACVDKELGDIIPFLAISGGK	Carbamidomethylation@C:2	2248.1929	750.4049	2248.1926	750.4048	0.0003	3	40.6	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	ANRPNGRLRPOHNAIILALK		2192.2621	731.7613	2192.2654	731.7624	-0.0034	4	42.6	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	ANRPNGRLRPOHNAIILALK		2320.3603	581.0974	2320.3603	581.0974	0.0002	4	42.0	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	EAQQLLSQVK		1214.6500	608.3323	1214.6506	608.3326	-0.0006	2	75.4	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	EAQQLLSQVKTK		1443.7933	482.2717	1443.7933	482.2717	-0.0002	3	25.3	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	ELIAEFENIYK		1496.7386	749.3786	1496.7398	749.3772	-0.0011	2	97.0	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	EYSHSLGPGSGIVVWAETCLR	Carbamidomethylation@C:20	2382.1582	1192.0864	2382.1638	1192.0892	-0.0055	2	133.6	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	EYTFIPGELK		1131.6166	566.8156	1131.6176	566.8161	-0.0009	2	57.4	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	EVTFIPGELKGGEIR		1643.8882	548.9700	1643.8883	548.9700	-0.0003	3	38.1	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	FLGDDIIPFLAISGGK		1674.9344	838.4745	1674.9345	838.4745	0.0000	2	86.6	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	GGIVAGYVVPWIER		1600.8702	801.4424	1600.8726	801.4436	-0.0023	2	45.0	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	GGIVAGYVVPWIERK		1728.9686	865.4916	1728.9675	865.4910	0.0012	2	57.6	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	GRPAEEVGREAQQLLSQVK		2138.1340	713.7186	2138.1331	713.7183	0.0008	3	69.1	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	IGIEGEIK		857.4866	429.7506	857.4858	429.7502	0.0009	2	26.7	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	IKVAETIK		900.5653	301.1957	900.5644	301.1954	0.0010	3	27.8	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	KELIAEFENIYK		1624.8322	813.4234	1624.8348	813.4247	-0.0026	2	80.8	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	KEVSHSLGPGSGIVVWAETCLR	Carbamidomethylation@C:21	2510.2588	628.5721	2510.2588	628.5720	0.0004	4	51.4	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	KGPAAEEVGREAQQLLSQVK		2266.2244	756.4154	2266.2281	756.4166	-0.0038	3	74.9	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	KIGIEGEIK		985.5800	493.7973	985.5808	493.7977	-0.0008	2	53.4	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	KLANAKVEGAEEVGSR		1527.8362	512.8369	1527.8369	512.8362	-0.0008	3	75.1	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	LAKAKVEGANVGSR		1399.7419	467.5879	1399.7419	467.5879	0.0000	3	49.2	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	LGDDALGK		729.4028	365.7087	729.4021	365.7083	0.0008	2	48.1	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	LGDDALGKK		857.4968	429.7557	857.4971	429.7558	-0.0002	2	56.5	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	MIIDSGYGGGQILR	Oxidation@M:1	1793.8986	897.9571	1793.8982	897.9564	0.0015	2	120.2	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	TSIALSAITCEPVK		1385.7760	693.8953	1385.7766	693.8956	-0.0006	2	101.1	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	TSIALSAITCEPVKIINR		1995.1728	666.0648	1995.1728	666.0649	-0.0003	3	85.3	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	VLGVPIEIK		966.6112	484.3129	966.6114	484.3130	-0.0002	2	69.5	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	VLGVPIEIKK		1094.7058	548.3602	1094.7063	548.3604	-0.0004	2	52.9	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	VSGISHATNLPARVAER		1757.9182	879.9664	1757.9173	879.9659	0.0010	2	96.0	PF1549-RNA _{Leu}
PF1549 (Ch)	AMEELK	Oxidation@M:3	806.3844	404.1995	806.3844	404.1995	0.0001	2	48.8	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	ACVDKFLGDDIIPFLAISGGK	Carbamidomethylation@C:2	2248.1905	750.4041	2248.1926	750.4048	-0.0022	3	46.8	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	ANRPNGRLRPOHNAIILALK		2192.2654	731.7624	2192.2654	731.7624	-0.0001	3	43.0	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	ANRPNGRLRPOHNAIILALK		2320.3593	581.0971	2320.3603	581.0974	-0.0010	4	34.9	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	EAQQLLSQVK		2817.6573	705.4216	2817.6565	705.4214	0.0008	4	22.8	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	ELIAEFENIYK		1443.7933	482.2717	1443.7933	482.2717	-0.0001	3	72.6	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	EYSHSLGPGSGIVVWAETCLR	Carbamidomethylation@C:20	2382.1568	1192.0857	2382.1638	1192.0892	-0.0003	2	41.8	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	EYTFIPGELK		1131.6172	566.8159	1131.6176	566.8161	-0.0004	2	84.9	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	EVTFIPGELKGGEIR		1643.8888	548.9702	1643.8883	548.9700	-0.0005	2	136.3	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	FLGDDIIPFLAISGGK		1674.9336	838.4741	1674.9345	838.4745	-0.0008	2	55.2	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	GGIVAGYVVPWIER		1600.8724	801.4424	1600.8726	801.4424	-0.0002	2	37.4	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	GGIVAGYVVPWIERK		1728.9670	865.4908	1728.9675	865.4910	-0.0004	2	93.3	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	GRPAEEVGREAQQLLSQVK		2138.1290	713.7186	2138.1331	713.7186	-0.0041	3	37.4	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	KGPAAEEVGREAQQLLSQVK		2266.2292	756.4170	2266.2281	756.4166	0.0010	2	63.3	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	KLANAKVEGAEEVGSR		1527.8353	512.8357	1527.8369	512.8362	-0.0018	3	73.6	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	IGIEGEIK		857.4868	429.7507	857.4858	429.7502	0.0011	2	83.4	PF1549-nev-tRNA _{Asp}
PF1549 (Ch)	IIIDSGYGGGQILR		1646.8604	824.4375	1646.8628	824.4387	-0.0023	2	107.0	PF1549-nev-tRNA _{Asp}

PF1549 (Chr)	IKVAETTK	900.5656	301.1958	900.5644	301.1854	0.0013	3	41.4	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	KELIAEFENLYK	1624.8372	813.4259	1624.8348	813.4247	0.0024	2	79.7	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	KEVSHLPGSGGIVVWAEQLR	2510.2589	628.5720	2510.2588	628.5720	0.0002	4	42.4	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	LANAKVEGAEVGSR	1399.7413	467.5877	1399.7419	467.5879	-0.0006	3	61.8	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	KIGIEGEIK	985.5802	493.7974	985.5808	493.7977	-0.0006	2	50.3	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	GGLIVAGYVKEWIER	1656.9370	553.3196	1656.9352	553.3190	0.0017	3	46.1	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	GGLIVAGYVKEWIERK	1785.0309	447.2650	1785.0301	447.2648	0.0009	4	20.1	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	KLKPAEEVGR	1123.6508	376.2242	1125.6506	376.2241	0.0002	3	42.8	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	KLKPAEEVGRRAAQLLSQVK	2322.2917	581.5802	2322.2906	581.5799	0.0013	4	20.3	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	LGSDALGK	729.4024	365.7085	729.4021	365.7083	0.0003	2	43.4	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	LGSDALGK	857.4970	429.7558	857.4971	429.7558	-0.0001	2	49.7	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	IKPAEEVGR	997.5565	333.5261	997.5558	333.5258	0.0010	3	30.5	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	LKPAEEVGRRAAQLLSQVK	2194.1917	732.4045	2194.1957	732.4058	-0.0041	3	42.1	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	MIIDSYGEGGQILR	1793.8988	897.9567	1793.8982	897.9564	0.0006	2	134.8	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	TSIALSAITGEPVK	1385.7766	693.8956	1385.7766	693.8956	0.0001	2	97.0	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	TSIALSAITGEPVKIINIR	1995.1726	666.0648	1995.1728	666.0649	-0.0002	3	75.9	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (G-L)	VEGEVLSR	958.5078	480.2612	958.5083	480.2614	-0.0004	2	63.0	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	VLGVPIEIK	966.6110	484.3128	966.6114	484.3130	-0.0004	2	61.2	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	VLGVPIEIK	1094.7060	548.3603	1094.7063	548.3604	-0.0002	2	47.5	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
PF1549 (Chr)	VSGLSHATNPAHVAER	1757.9180	879.9653	1757.9173	879.9659	-0.0012	2	88.4	PF1549-nev-rRNA ^{ay}
Luciferase (Chr)	EIVDYVASQVTTAK	1522.7854	762.4000	1522.7879	762.4012	-0.0024	2	120.5	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	EIVDYVASQVTTAK	1650.8824	826.4485	1650.8828	826.4487	-0.0004	2	89.4	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	ELLSMNISQPTTVFVSK	2021.0460	1011.5303	2021.0503	1011.5324	-0.0043	2	76.3	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	ELLSMNISQPTTVFVSK	2133.1492	1067.5819	2133.1492	1067.5825	-0.0012	2	86.6	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	EVGEAVAK	801.4234	401.7190	801.4232	401.7189	0.0002	2	25.7	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	FEELFLIR	1081.5442	541.7794	1081.5444	541.7795	-0.0001	2	46.9	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	FHLPGIR	838.4814	420.2480	838.4814	420.2480	0.0001	2	31.4	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	GGVVFVDEVPK	1144.6130	573.3138	1144.6129	573.3137	0.0001	2	85.6	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	GLTGKLDAR	929.5292	465.7719	929.5294	465.7720	-0.0001	2	46.4	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	GLTGKLDAR	1057.6252	353.5490	1057.6244	353.5487	0.0009	3	20.6	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	GPAPFPYLEDGTAGEQLHK	2025.9736	1013.9941	2025.9796	1013.9971	-0.0059	2	90.2	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	GPAPFPYLEDGTAGEQLHK	2234.0692	1118.0419	2234.0711	1118.0428	-0.0019	2	130.0	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	GVALPHR	748.4342	375.2244	748.4344	375.2245	-0.0001	2	28.2	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	LIINDSK	818.4566	410.2356	818.4572	410.2359	-0.0005	2	45.8	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	IQSALLVPTLFSFFAK	1781.0104	891.5125	1781.0127	891.5136	-0.0022	2	91.8	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	IREILIK	883.5853	442.8002	883.5854	442.8000	0.0005	2	28.4	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	KIRIELIK	2154.0752	1078.0449	2154.0746	1078.0446	0.0006	2	99.8	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	KLPFIQK	1011.6794	506.8470	1011.6804	506.8475	-0.0009	2	36.6	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	KRGGVFVDEVPK	838.5640	420.2893	838.5640	420.2893	0.0001	2	47.3	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	LAEMKR	1541.8918	771.9532	1541.8930	771.9538	-0.0012	2	56.8	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	LRGVVFVDEVPK	817.4484	409.7315	817.4480	409.7313	0.0005	2	48.1	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	LRGVVFVDEVPK	1413.8000	707.9073	1413.7980	707.9063	0.0020	2	50.4	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	QGYGLFTWTSALLITPEGDDKPGAVK	2717.3680	906.7966	2717.3760	906.7993	-0.0080	3	132.1	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	RFLPGLR	994.5826	332.5348	994.5825	332.5348	0.0001	3	39.3	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	RYGLTNHR	1129.5736	565.7941	1129.5741	565.7943	-0.0004	2	44.6	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	SLQDYKIQSALLVPTLFSFFAK	2515.3735	839.4651	2515.3726	839.4646	0.0009	3	34.1	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	STLIDKYDLSNHLIASGAPLSK	2528.3132	1265.1639	2528.3122	1265.1634	0.0010	2	110.2	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	TIALINNSGSGTGLPK	1588.8486	795.4316	1588.8494	795.4320	-0.0007	2	122.0	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	TLGNQR	786.4350	394.2248	786.4348	394.2247	0.0003	2	54.4	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	VVDLDTGK	845.4496	423.7321	845.4495	423.7320	0.0001	2	40.6	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	VVPFEAK	935.5118	468.7632	935.5117	468.7631	0.0001	2	28.3	Luciferase-tRNA ^{au}
Luciferase (Chr)	YDLSNLHETASGAPLSK	1870.9392	936.4789	1870.9425	936.4785	-0.0033	2	101.3	Luciferase-tRNA ^{au}

Carbamidomethylation@C:21

Oxidation@M:1

Oxidation@M:6

Luciferase (Ctrl)	YGLTNHR	973.4728	487.7437	973.4730	487.7438	-0.0002	2	68.6	Luciferase-tRNA ^{Met}
Luciferase (Ctrl)	EIVDIYASQVTTAK	1522.7882	782.4014	1522.7879	782.4012	0.0003	2	103.7	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	EIVDIYASQVTTAKK	1520.8814	826.4480	1650.8828	826.4487	-0.0014	2	98.9	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	ELLSNNISQPTVVFSK	2005.0522	1003.5334	2005.0554	1003.5350	-0.0032	2	71.6	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	ELLSNNISQPTVVFSKK	2133.1482	1087.5814	2133.1504	1087.5825	-0.0022	2	87.5	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	FVGEAVAK	957.4236	401.7191	801.4232	401.7189	0.0005	2	29.1	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	FVGEAVAKR	957.5242	479.7694	957.5243	479.7694	-0.0001	2	33.2	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (G-L)	FVLEAVAK	857.4864	429.7505	857.4858	429.7502	0.0006	2	25.9	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	FEELFLIR	1081.5448	541.7797	1081.5444	541.7795	0.0005	2	46.9	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	PHLPGIR	838.4824	420.2485	838.4814	420.2480	0.0010	2	25.9	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	GVVFFVDEVPK	1144.6124	573.3135	1144.6129	573.3137	-0.0005	2	100.6	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	GLTGKLDAR	929.5300	465.7723	929.5294	465.7720	0.0007	2	41.4	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	GLTGKLDARK	1057.6258	353.5492	1057.6244	353.5487	0.0012	3	22.3	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	GPAPFFLEDGTAGEQLHK	2025.9788	1013.9967	2025.9796	1013.9971	-0.0007	2	79.9	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	GFIMSGYVNPATNALIDK	2234.0688	1118.0417	2234.0711	1118.0428	-0.0023	2	137.3	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	GVALPFR	748.4344	375.2245	748.4344	375.2245	0.0000	2	33.1	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	IIVINDSK	1781.0118	891.5132	1781.0127	891.5136	-0.0008	2	45.8	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	IQSALLVPTLSPFAK	883.5854	442.8000	883.5854	442.8000	0.0001	2	66.8	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	IREILIK	2154.0778	1078.0462	2154.0746	1078.0446	0.0033	2	33.5	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	KGPAPFFLEDGTAGEQLHK	1011.6804	506.8475	1011.6804	506.8475	0.0001	2	83.5	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	KIRELIK	838.5638	420.2892	838.5640	420.2893	-0.0001	2	29.7	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	KLPIIQK	1541.8924	771.9535	1541.8930	771.9538	-0.0005	2	43.7	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	KLRGVVFDVPEPK	817.4478	408.7312	817.4480	408.7313	-0.0001	2	49.9	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	LAEMKR	1413.7978	707.9062	1413.7980	707.9063	-0.0001	2	57.0	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	LRGGVVFVDEVPK	2717.3716	906.7978	2717.3760	906.7993	-0.0043	3	141.1	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	OGYGLTETTSAILITPEGDXPQAVGK	994.5820	498.2983	994.5825	498.2985	-0.0004	2	43.5	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	RPHLPGR	1050.6466	351.2228	1050.6451	351.2223	0.0015	3	25.4	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (G-L)	RYGLTNHR	1129.5742	377.5320	1129.5741	377.5320	0.0000	3	32.6	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	SLQDYKQSALLVPTLSPFAK	2515.3732	839.4850	2515.3726	839.4848	0.0007	3	45.1	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	STLIDKYDLSNLHEIASGAPLSK	2528.3102	1285.1624	2528.3122	1285.1634	-0.0019	2	113.4	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (G-L)	STLIDKYDLSNLHEIASLGLPSK	2584.3744	862.4654	2584.3748	862.4655	-0.0005	3	71.6	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	TIALINSSGSTGLPK	1604.8444	803.4295	1604.8443	803.4294	0.0001	2	121.6	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (G-L)	TIALINSSGSTLLPK	1644.9114	823.4630	1644.9120	823.4633	-0.0005	2	91.6	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	TLGVNQR	786.4348	394.2247	786.4348	394.2247	0.0001	2	54.1	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	TLGVNQRGELCVR	1500.7825	501.2881	1500.7831	501.2883	-0.0006	3	28.1	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	VVDLDYTK	845.4492	423.7319	845.4495	423.7320	-0.0003	2	37.0	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (G-L)	VVDLDYTK	901.5122	451.7634	901.5121	451.7633	0.0001	2	47.3	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	VVPFFFAK	935.5116	468.7631	935.5117	468.7631	0.0000	2	29.2	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	YDLSNLHEIASGAPLSK	1870.9398	936.4772	1870.9425	936.4785	-0.0027	2	115.3	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}
Luciferase (Ctrl)	YGLTNHR	973.4726	487.7436	973.4730	487.7438	-0.0003	2	65.7	Luciferase-nev-tRNA ^{Arg}

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

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 ワキブリントピア

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

■ 本論文は修士論文において優秀と認められ、出版されたものです。