様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　５ 月 １８ 日現在

機関番号：３２６８９
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｈ０３７１６

研究課題名（和文）初期翻訳系で使われたアミノ酸種類の時系列変化に関する研究

研究課題名（英文）Study on the evolution of amino acid usage in early translation system

研究代表者
赤沼　哲史（Akanuma, Satoshi）

早稲田大学・人間科学学術院・准教授

研究者番号：１０３２１７２０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,900,000円

研究成果の概要（和文）：祖先復元型ヌクレオシドニリン酸キナーゼのアミノ酸組成を網羅的に単純化することによって、13アミノ酸種あれば触媒活性を持ったタンパク質を再構成できることを明らかにした。さらに、10アミノ酸種あれば安定な立体構造を形成するアミノ酸配列を作れること、その10アミノ酸種の多くは、原始地球にも比較的豊富に存在した可能性が指摘されていることも明らかにした。
クラスIaに属するアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）の系統解析と祖先型復元解析からは、IleRS共通祖先、ValRS共通祖先、IleRSとValRS両者の共通祖先ともアミノ酸特異的に反応を触媒することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究から、生命誕生初期の原始タンパク質のアミノ酸組成に関する重要な知見が得られた。特に、初期地球環境で容易に合成されるアミノ酸、隕石中から見つかっているアミノ酸など、初期地球上に比較的多く存在したと推測されるアミノ酸種が、タンパク質の安定な立体構造形成に重要であることを明らかにした。加えて、本研究成果から、宇宙における生命起源の場として、タンパク質、あるいは、タンパク質に代わる生命機能を司る生体高分子の安定な立体構造形成に必須な10種類程度のアミノ酸、あるいは、アミノ酸に代わるビルディングブロックが利用可能な地域・天体が有力であると予想できる。

研究成果の概要（英文）：By comprehensively simplifying the amino acid composition of a reconstructed ancestral nucleoside diphosphate kinase, we found that 13 amino acid types are enough to reconstitute a catalytically active protein. In addition, we showed that 10 amino acid types can produce a sequence that folds into a stable tertiary structure. Moreover, not all but many of the 10 amino acid types required for the formation of the stable structure are consistent with the prebiotic amino acids that may have been relatively abundant in primitive Earth.
Phylogenetic analyses and ancestral reconstruction of aminoacyl-tRNA synthetases (ARSs) belonging to class Ia showed that the ancestral form of IleRS, that of ValRS, and the common ancestor of IleRS and ValRS catalyzed respective amino acid-dependent reactions. We also analyzed the evolution of class IIa ARSs.

研究分野：進化生物学

キーワード：生命の起源　アミノ酸組成　初期進化　原始タンパク質　翻訳系　祖先復元型タンパク質　祖先型再構成　進化系統解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｆ－１９－２

１．研究開始当初の背景

地球上の生物では、核酸が遺伝情報を持ち、多くの場合タンパク質が機能分子として働く。核酸はタンパク質の情報を持ち、タンパク質は核酸の複製に関わる。したがって、「卵と鶏」の関係にある「核酸が先か、それともタンパク質が先か？」というパラドックスの解決が生命の起源に関する長年の課題であった。しかし、非生物的なリボヌクレオチド合成と重合、RNA 触媒である様々なリボザイムに関する報告から、タンパク質に先んじて RNA ワールドの存在が支持を広げている。RNA ワールドを過程した場合、次の問題が RNA ワールドから RNA-タンパク質ワールドへの移行である。RNA-タンパク質ワールドの成立には、遺伝情報を持つ RNA からタンパク質への情報発現の過程である翻訳系の成立が不可欠である。したがって、生命の材料となる有機分子を合成した化学進化、RNA ワールドと並び、現在の生物に共通する 20 種類のアミノ酸を用いた翻訳系の成立過程の理解が、地球上における生命の誕生プロセスを明らかにするための鍵となる

初期翻訳系におけるアミノ酸種の変遷と密接に関わる遺伝暗号の起源と進化に関して、半世紀以上前から「偶然凍結説」や「共進化説」、「立体化学説」、「C4N 仮説」等の多くの仮説が提唱されてきた。これらの仮説は共通して、初期遺伝暗号表は現在よりも少ないアミノ酸種を指定したと主張している。さらに、初期翻訳系に用いられたアミノ酸種の理論的研究も多く報告されているが、結論は必ずしも一致せず、実証の困難さから実験による検証はおこなわれていなかった。したがって、研究開始時点では初期生命がタンパク質合成に用いたアミノ酸種類の時系列変化は明確ではなかった。

一方で、急速に増えている生物のゲノムデータを比較することで，過去のタンパク質配列を予測し、復元することが可能となった。研究代表者らは、祖先生物のヌクレオシド二リン酸キナーゼ（NDK）配列を過去の研究で推定・復元した。祖先 NDK は高い耐熱性を持ち、全生物共通祖先が超好熱菌であったことを示す最初の実験による証拠となった。これは復元に成功した世界最古（約 38 億年前）のタンパク質である。本研究では、復元した約 38 億年前のタンパク質を、さらに過去に遡った翻訳系の成立過程を探るために利用できると考えた。

２．研究の目的

生命の遺伝情報と機能をリンクさせる翻訳系の起源と進化は、核酸の起源、タンパク質の起源と並ぶ、生命の起源を理解するうえでの最重要課題の一つである。現在の翻訳系がいかなる進化の過程も経ずに成立したとは考えづらく、初期の生命は 20 種類未満のアミノ酸種だけからタンパク質を合成していた可能性がある。初期のタンパク質が少数アミノ酸種から構成されていたとしても、ある程度の活性と安定性を持っていたはずである。研究代表者は、本研究開始以前に、復元した約 38 億年前の NDK の一つから、１アミノ酸種を他のアミノ酸に置換することによって完全に欠損させた改変体を作製し、その安定性と触媒活性を解析した。その結果から、12 アミノ酸種は容易に欠損可能なアミノ酸であったが、残りの８アミノ酸種は欠損が困難な、活性を持つタンパク質に必須なアミノ酸であると判定した。そこで、本研究期間内に、以前の研究で復元した祖先型 NDK を材料に、活性を持った安定なタンパク質を合成するために必要な少数アミノ酸種と、活性を失ったとしても安定な立体構造を形成するために必要な少数アミノ酸種を明らかにすることを目的とした。

一方、タンパク質のビルディングユニットであるアミノ酸を区別して認識し、アミノ酸と核酸とを結びつける酵素がアミノアシル tRNA 合成酵素（ARS）である。すなわち、20 種類のアミノ酸を利用したタンパク質合成系の成立過程を理解するためには、どのような経緯で現在の 20 種類のアミノ酸に対応する ARS が誕生したのかを明らかにすることが鍵となる。20 種のアミノ酸に対応する ARS は二つの祖先 ARS から分岐してきたと考えられている。本研究では、クラス Ia に属する ARS のうち、Leu、Ile、Val、Met に対応する ARS の共通祖先酵素を実験により復元し、そのアミノ酸特異性を明らかにすることと、クラス Ia 以外の ARS についてもサブクラスごとの ARS の複合系統樹を作製し、ARS の進化を明らかにすることを目的とした。

以上の研究・解析を通じて、翻訳系成立途上におけるタンパク質合成に使われたアミノ酸種類の時系列変化を探ることを当初の目的とした。

３．研究の方法

過去の研究で復元した祖先型 NDK である Arc1 から、どれか１種類のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することによって欠損させた。得られた改変体の耐熱性と触媒活性を調べることによって、欠損が容易なアミノ酸と欠損できないアミノ酸を判定した。次いで、系統的に欠損させるアミノ酸を１種ずつ増やしていくことによって、触媒活性を保持した NDK の再構成に必要な最少アミノ酸セット、安定な立体構造形成に必要な最少アミノ酸セットを明らかにした。

クラス Ia に分類される ARS のうち、Val，Ile，Leu，Met に対応する ARS の複合系統樹を作成した。４つの ARS が揃うよりも以前に存在した祖先 ARS のアミノ酸配列を推定し、その祖先アミノ酸配列を実験により復元した。祖先型 ARS の活性測定をおこない、アミノ酸特異性を明らかにした。クラス Ia 以外の ARS についても、サブクラスごとの ARS の複合系統樹の構築と祖先配列推定をおこなった。

４．研究成果

(1) 研究開始時以前に、13 アミノ酸種だけから構成された２つのアミノ酸組成単純化型 NDK である Arc1-13FI（C，F，I，M，Q，T，W を持たなない）と Arc1-13KS（C，K，M，Q，S，T，W を持たない）が安定な立体構造を形成し、検出可能な触媒活性を持つことを明らかにしていた。研究期間内には、Arc1-13FI の 91 番目のアミノ酸残基を元の T に、131 番目のアミノ酸を元の F に戻した Arc1-13FI+TF と、Arc1-13KS の 9 番目のアミノ酸を元の K に、91 番目のアミノ酸を元の T に、117 番目のアミノ酸を元の S に戻した Arc1-13KS＋KST を作製した。熱変性解析とリン酸基転移活性の測定をおこなったところ、Arc1-13FI+TF は Arc1-13FI と比べて変性温度が７℃回復し、Arc1-13FI+TF の比活性も Arc1-13 の 13 倍以上に向上することを見出した。また、Arc1-13KS＋KST は Arc1-13KS と比べて変性温度が５℃回復し、Arc1-13KS＋KST の比活性も Arc1-13KS の 17 倍以上に向上することも見出した。この結果は、アミノ酸種類の拡大によって原始タンパク質の安定性や機能が向上し、その結果、宿主生物のフィットネスを向上させることで生物の初期進化の駆動力になった可能性を示唆するものである。

(2) Arc1-13KS から His，Asn，Tyr をさらに欠損させて再構成した Arc1-10KS が、80°C以上の高い熱変性温度を示すが、触媒活性を失うことを明らかにした。

(3) Arc1-10KS から Ala、Phe、Ile のうちのいずれか２つのアミノ酸種を欠損させた Arc1-8KSAF、Arc1-8KSAI、Arc1-8KSFI を合成した。これらの改変体は高い溶解度を示したが、天然様の立体構造を形成していないことが示唆された。すなわち、少なくとも現時点では、８アミノ酸種類だけから溶解度の高いポリペプチド鎖は合成できるか、安定な立体構造を構築できなかった。

(4) Arc1-10KS に加えて、Arc1-10RS（C，H，M，N，Q，R，S，T，W，Y を持たない）と Arc1-10FI（C，F，H，I，M，N，Q，T，W，Y を持たなない）を作製した。Arc1-10RS は Arc1-10KS と同様に検出可能なリン酸基転移活性を示さなかったが、80°C以上まで安定な立体構造を保つことが分かった。この結果から、10 アミノ酸種類あれば、安定なタンパク質構造の形成に必要な情報を内包したアミノ酸配列がつくれることが示された。アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、セリン、トレオニン、バリンの 10 アミノ酸種はしばしばプレバイオティックアミノ酸として参照され、原始地球にも比較的豊富に存在した可能性が指摘されているが、Arc1-10KS と Arc1-10RS では、どちらもプレバイオティックアミノ酸が 81.2%を占めた。すなわち、原始地球にも比較的豊富に存在したと推定されるアミノ酸を主要構成成分として安定な立体構造を形成するタンパク質が合成できることを示した。

一方、Arc1-10FI は大腸菌で十分に発現できなかった。

(5) Arc1-10KS と Arc1-10FI の触媒活性に重要と思われる部位を元のアミノ酸に戻した Arc1-10KS+HKNY と Arc1-10FI+HNY を作製したところ、検出可能なリン酸基転移活性を回復した(図１)。Arc1-10KS+HKNY と Arc1-10FI+HNY では、上述のプレバイオティックアミノ酸がそれぞれ 78.2%と 81.9%を占めた。Arc1-10RS の触媒活性に重要と思われるアミノ酸を戻した Arc1-10RS+HN2RY は検出可能な活性を示さなかった（図１）。

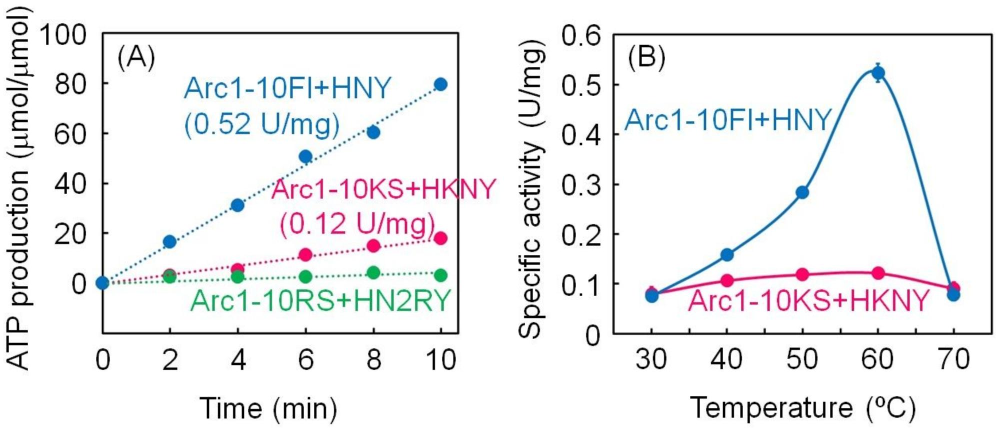

図１．(A) 60℃での活性測定。生成したATP量を定量した。(B) 触媒活性の温度依存性。

(6) アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)ついては、IleRS、ValRS各々の共通祖先、IleRSとValRSの共通祖先のアミノ酸配列を推定した。さらに、IleRS共通祖先、ValRS共通祖先、IleRS/ValRS共通祖先のアミノアシル化触媒活性を、アミノアシル化反応で生成するピロリン酸をリン酸に分解して定量した。その結果、いずれの祖先型ARSもアミノ酸特異的にリン酸の生成が生じることを確認した。

(7) クラスIIaに属するProRS共通祖先、SerRS共通祖先、ProRS/SerRS共通祖先について、分子系統解析に基づく配列推定と祖先型復元をおこなった。

以上の研究成果から、生命誕生初期の原始タンパク質のアミノ酸組成に関する重要な知見が得られた。特に、初期地球環境で容易に合成されるアミノ酸、隕石中から見つかっているアミノ酸など、初期地球上に比較的多く存在したと推測されるアミノ酸種が、タンパク質の安定な立体構造形成に重要であることを明らかにした。加えて、本研究成果から、宇宙における生命起源の場として、タンパク質、あるいは、タンパク質に代わる生命機能を司る生体高分子の安定な立体構造形成に必須な10種類程度のアミノ酸、あるいは、アミノ酸に代わるビルディングブロックが利用可能な地域・天体が有力であると予想でき、生命探査の地域・天体選択に重要な知見となるだろう。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計8件（うち査読付論文　7件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Harada M, Nagano A, Yagi S, Furukawa R, Yokobori S, Yamagishi A.	４．巻 522
２．論文標題 Planktonic adaptive evolution to the sea surface temperature in the Neoproterozoic inferred from ancestral NDK of marine cyanobacteria	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Earth and Planetary Science Letters	６．最初と最後の頁 98-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.epsl.2019.06.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Kimura M, Akanuma S.	４．巻 -
２．論文標題 Reconstruction and characterization of thermally stable and catalytically active proteins comprising an alphabet of ~13 amino acids	５．発行年 2020年
３．雑誌名 J. Mol. Evol.	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00239-020-09938-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Shibue Rei, Akanuma Satoshi	４．巻 46
２．論文標題 Reduced amino acid set proteins suggest a role of prebiotic amino acids in primitive protein synthesis	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Viva Origino	６．最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 AKANUMA Satoshi	４．巻 59
２．論文標題 Exploring the Amino Acid Composition in Primitive Proteins Using a Reconstructed Ancestral Protein	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Seibutsu Butsuri	６．最初と最後の頁 023～025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.59.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Akanuma Satoshi	4．巻 -
2．論文標題 The Common Ancestor of All Modern Life	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Astrobiology：From the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence (eds. Yamagishi A, Kakegawa T, Usui T) Springer	6．最初と最後の頁 91～103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-13-3639-3_7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1．著者名 赤沼哲史、渋江怜	4．巻 31
2．論文標題 人類への進化のはじまり：生命の起源と全生物の最後の共通祖先	5．発行年 2018年
3．雑誌名 人間科学研究	6．最初と最後の頁 139～145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1．著者名 Akanuma Satoshi	4．巻 7
2．論文標題 Characterization of Reconstructed Ancestral Proteins Suggests a Change in Temperature of the Ancient Biosphere	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Life	6．最初と最後の頁 33～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life7030033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1．著者名 Shibue Rei、Sasamoto Takahiro、Shimada Masami、Zhang Bowen、Yamagishi Akihiko、Akanuma Satoshi	4．巻 8
2．論文標題 Comprehensive reduction of amino acid set in a protein suggests the importance of prebiotic amino acids for stable proteins	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 1227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19561-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕　計20件（うち招待講演　4件／うち国際学会　4件）

1．発表者名 横堀伸一，馬場柾，笹本峻弘，松田直樹，橋本ちひろ，村松あやか，佐藤陸，　遠藤有紀，宮下奈津実，丸山真歩，横川隆志，古川龍太郎，山岸明彦
2．発表標題 祖先アミノアシル tRNA 合成酵素の復元に基づく遺伝暗号の進化の解析
3．学会等名 第21回日本進化学会年会
4．発表年 2019年

1．発表者名 横堀伸一
2．発表標題 遺伝暗号は進化する
3．学会等名 2019年度生命の起原・アストロバイオロジー夏の学校
4．発表年 2019年

1．発表者名 赤沼哲史
2．発表標題 ほぼ10アミノ酸種で再構成した酵素の解析
3．学会等名 2019年度アストロバイオロジーワークショップ
4．発表年 2019年

1．発表者名 横堀伸一、古川龍太郎、松田直樹、笹本峻弘、横川隆志、山岸明彦
2．発表標題 祖先配列復元とその解析に基づくClass IaアミノアシルtRNA合成酵素の進化
3．学会等名 2019年度アストロバイオロジーワークショップ
4．発表年 2019年

１．発表者名 赤沼哲史、古川龍太郎
２．発表標題 祖先配列の再構成とタンパク質単純化による原始アミノ酸組成の探索
３．学会等名 第42回日本分子生物学会年会
４．発表年 2019年

１．発表者名 古川龍太郎、馬場柾、松田直樹、笹本峻弘、横川隆志、横堀伸一、山岸明彦
２．発表標題 祖先Class Iaアミノアシル tRNA合成酵素の基質特異性に基づく初期翻訳系の進化
３．学会等名 第42回日本分子生物学会年会
４．発表年 2019年

１．発表者名 Yamagishi, A., Yokobori S., Akanuma S.
２．発表標題 Evolution of life revealed from genetic information
３．学会等名 Puzzles and Solutions in Astrobiology（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 Yokobori S
２．発表標題 Quest for ancestors of eukaryotic cell; Implications from evolution of aminoacyl tRNA synthethases
３．学会等名 Puzzles and Solutions in Astrobiology（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名
赤沼哲史

２．発表標題
生命の初期進化を探る蛋白質工学研究

３．学会等名
第18回日本蛋白質科学会年会

４．発表年
2018年

１．発表者名
渋江 怜、笹本 峻弘、山岸 明彦、赤沼 哲史

２．発表標題
少数種アミノ酸で再構成されたタンパク質が示唆する前生物的アミノ酸の役割

３．学会等名
第18回日本蛋白質科学会年会

４．発表年
2018年

１．発表者名
赤沼哲史

２．発表標題
原始地球上に比較的多く存在したと推定されるアミノ酸種のタンパク質合成における役割

３．学会等名
日本進化学会第20回大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
Akanuma S

２．発表標題
Protein engineering studies to explore primordial proteins ’ characteristics

３．学会等名
Extremophiles 2018（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Shibue R., Akanuma S.

２．発表標題
Contribution of a hydrophobic amino acid letter(s) to the stability and activity of a reconstructed ancestral nucleoside diphosphate kinase

３．学会等名
Extremophiles 2018（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
横堀伸一

２．発表標題
アミノアシルtRNA合成酵素の分子系統解析と祖先酵素復元に基づく翻訳系の進化の解析

３．学会等名
第41回日本分子生物学会年会

４．発表年
2018年

１．発表者名
赤沼哲史

２．発表標題
11アミノ酸種だけを用いた活性を持つ酵素の再構成

３．学会等名
第44回生命の起原および進化学会学術講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦

２．発表標題
Class IIaアミノアシルtRNA合成酵素の分子系統解析に基づく初期翻訳系の進化

３．学会等名
第44回生命の起原および進化学会学術講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Akanuma S

２．発表標題
Protein engineering experiments to explore the evolution of early life

３．学会等名
New Frontier in Protein Design & Engineering（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
赤沼哲史

２．発表標題
20種未満のアミノ酸によるタンパク質の再構成

３．学会等名
2017年度日本アストロバイオロジーネットワークワークショップ

４．発表年
2017年

１．発表者名
赤沼哲史

２．発表標題
共通祖先

３．学会等名
アストロバイオロジーセンター（ABC）シンポジウム2018（招待講演）

４．発表年
2018年

１．発表者名
渋江怜、赤沼哲史

２．発表標題
網羅的アミノ酸欠損実験によって示唆された前生物的アミノ酸のタンパク質安定性への寄与

３．学会等名
生命の起原および進化学会第43回学術講演会

４．発表年
2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	横堀　伸一 (Yokobori Shin-ichi) (40291702)	東京薬科大学・生命科学部・講師 (32659)	