

令和 5 年 9 月 25 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02018

研究課題名(和文) 祖先アミノアシルtRNA合成酵素の復元と段階的な祖先翻訳系の構築

研究課題名(英文) Resurrection of ancestral aminoacyl tRNA synthetase and stepwise construction of ancestral translation system

研究代表者

横堀 伸一 (Yokobori, Shin-ichi)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：40291702

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)：全生物の共通祖先またはそれ以前の祖先ARS(アミノアシルtRNA合成酵素)の性質に基づいて遺伝暗号表の進化を明らかにするため、IleCom(IleRSの共通祖先)、ValCom(ValRSの共通祖先)並びにIV-Anc(IleRSとValRSの共通祖先)を復元し、その機能解析を進めた。特に、LeuRS、IleRS、またはValRSを除いたEscherichia coliの再構成型無細胞タンパク質合成系に、IleCom、ValCom、またはIV-Ancを加えてタンパク質合成を行うと、IleCom、ValComおよびIV-Ancのいずれも、タンパク質合成中に機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、全生物の最後の共通祖先並びに以前のアミノアシルtRNA合成酵素の復元に成功した。これは、現生生物が共通して使用する遺伝暗号表がどのように成立したのか、その成立過程を明らかにする上で重要である。また、このような研究は生命の初期進化研究を理論だけではない実証的な研究として進めていく上でも重要である。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the evolution of the genetic code table based on the characteristics of the ancestral ARS (aminoacyl-tRNA synthetase) of universal common last common ancestor or earlier life, IleCom (common ancestor of IleRS), ValCom (common ancestor of ValRS), and IV-Anc (common ancestor of IleRS and ValRS) were resurrected and their functions were analyzed. In particular, when IleCom, ValCom, or IV-Anc was added to the reconstituted cell-free protein synthesis system of Escherichia coli without LeuRS, IleRS, or ValRS to perform protein synthesis, all of IleCom, ValCom, and IV-Anc were suggested to function during protein synthesis.

研究分野：アストロバイオロジー、進化生物学

キーワード：祖先配列復元 遺伝暗号

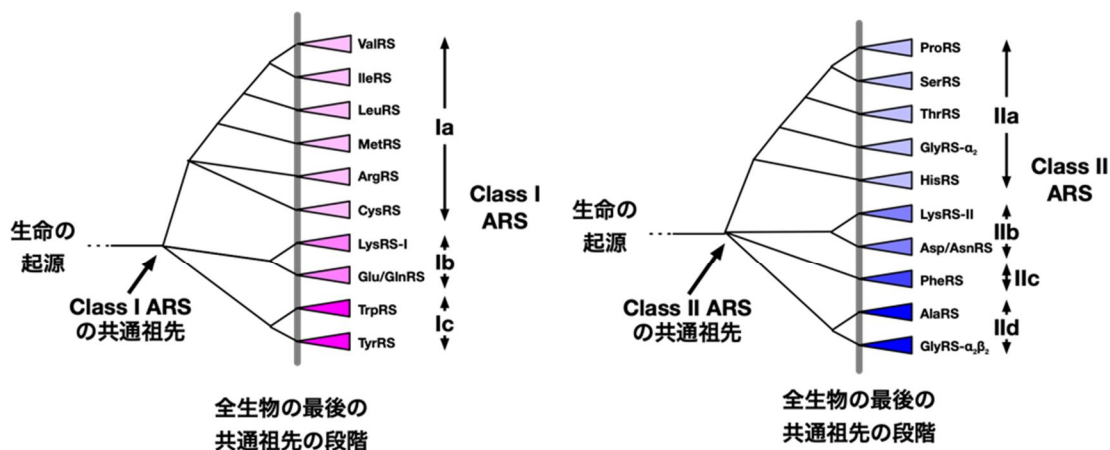
1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成(翻訳)系の成立を理解する上で、現在の 20 種類のアミノ酸レパートリーの確立と、これに密接に関連する塩基配列とアミノ酸配列を繋げる遺伝暗号の成立過程の理解は重要である。遺伝暗号の起源に関する仮説の多くは、初期翻訳系では少数のアミノ酸種が使用されたと考える。少数のアミノ酸と塩基配列との対応関係が成立した後にその対応が厳密化し、20 種類のアミノ酸が識別され翻訳に使われるようになったと考えられる。しかし、この問題に関する研究の大半は理論研究であり、実証的な研究は少ない。

現在の翻訳系では塩基配列とアミノ酸配列の対応の正確さは、mRNA のコドンと tRNA のアンチコドンとの特異的な塩基対形成の正確性と、アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS:以下、アミノ酸 3 文字表記 + RS で各アミノ酸特異的 ARS を表記する)が触媒する tRNA のアミノアシル化の正確性に負っている。ARS は、起源の異なるアミノアシル化(触媒)ドメインを持つ、Class I と Class II という 2 グループに分類される。各々の Class はさらに 3 または 4 つの subclass に分類される。各々の Class のメンバーである ARS は、共通祖先から多様化し、個々のアミノ酸に対応するように進化してきたと考えられ(図 1)、分子系統解析等を通じてその多様化の過程が議論されてきた。ARS の多くが tRNA のアンチコドン認識部位とすることから、ARS の起源と進化の理解は、翻訳におけるアミノ酸レパートリーのみならず、コドンとアミノ酸の対応の確立を理解するために不可欠である。

近年分子系統解析手法の発展に伴い、分子系統樹に基づいて過去のタンパク質の配列を推定(祖先配列推定)し実際にそのタンパク質を再現(祖先配列復元)し、その機能や性質を解析することが行われるようになって来た。祖先タンパク質の解析研究の拡大に従って、祖先(型)ARS の解析から翻訳の進化におけるアミノ酸レパートリーの変遷を明らかとしようとする研究も始まっているが、それらの研究推定配列を統計学的に解析したのみで祖先タンパク質を直接解析したわけではない。

上記のように、遺伝暗号表の進化(翻訳系で使用するアミノ酸レパートリーの変遷)がどのように進行したのかを推定するためには、ARS の進化、多様化の歴史を遡ることは重要である。図 1 に示した系統関係を遡り、ARS のより原始的な状態を順次復元し、その基質特異性(アミノ酸、tRNA)を明らかにすることは、単純な仮説の提案ではなく、具体的に検証可能な研究に、遺伝暗号(翻訳で使用するアミノ酸レパートリー)進化研究をクラスチェンジする物である。



(Pouplana & Schimmel 2001; Valencia-Sánchez et al. 2016)と Yokobori et al. (未発表データ)に基づく

図 1. Class I ARS 並びに Class II ARS の分類と進化

2. 研究の目的

地球上の生命の初期進化において、翻訳系(タンパク質合成系)の起源と進化を理解することは重要である。中でも、現生生物の全ての翻訳系に共通するアミノ酸レパートリーと、塩基配列とアミノ酸配列を対応づける標準遺伝暗号表ががどのような過程を経て確立したのかは重要な研究課題である。アミノ酸を直接認識して tRNA に結合するアミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)の多様化と基質特異性の精密化の過程を追うことで、現在の翻訳系におけるアミノ酸レパートリーの成立過程を検討する事ができると考えられる。上記の様に ARS は起源と構造が異なる 2 つのクラスに分類され(Class I/II)、さらにそれぞれが 3 または 4 つのサブクラスに分類される(図 1)。それぞれのサブクラスの ARS について、複数の ARS 種を含む複合系統樹を作成し、アミノ酸レパートリー変化のポイントとなる時期の祖先 ARS の配列を推定する。祖先 ARS 遺伝子を作成し、さらにその産物タンパク質を発現・精製し、生化学的な解析を行い、それらのタンパク質のアミノ酸や tRNA に対する特異性を明らかにする。これとともに、現存の翻訳系で働く ARS と祖先 ARS を置き換え、「祖先化」した翻訳系を順次、歴史を遡って作製していく。その結果に基づいて、現在見られる翻訳におけるアミノ酸レパートリーの確立の過程を推定することを当

初の目的とした。

### 3. 研究の方法

我々は、Class Ia ARS の中でも近縁であることが示唆されてきたイソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) とバリン tRNA 合成酵素 (ValRS) に注目した。ロイシル tRNA 合成酵素 (LeuRS) をアウトグループとして、3 種の ARS の複合系統樹を作製した。この系統樹を元に、全生物の最後の共通祖先 (Commonote) 段階の IleRS (IleCom), Commonote 段階の ValRS (ValCom), IleRS と ValRS の共通祖先 (IV-Anc) の配列を推定し、大腸菌細胞内での遺伝子発現用プラスミドを構築し、発現、精製を行った。また、IV-Anc の段階では、イソロイシン (Ile) とバリン (Val) を区別していなかった可能性を考慮し、IV-Anc 遺伝子中の Ile 残基を全て Val に置換した IV-Anc-V と IV-Anc 遺伝子中の Val 残基を全て Ile に置換した IV-Anc-I の遺伝子発現用プラスミドもそれぞれ構築し、発現、精製を行った。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の全 tRNA を基質の 1 つとし、アミノアシル化反応の過程で生成するピロリン酸をピロフォスファターゼでリン酸に分解し、その生成リン酸量を定量することで、各祖先 ARS のアミノ酸特異性を推定した。また、アミノアシル化反応の特異性の検討に加え、再構築型 *Escherichia coli* 無細胞タンパク質合成系を用いて、祖先 ARS が *E. coli* ARS を相補するか、タンパク質合成を行うことで検証した。

Class II ARS については 2 つのサブクラス IIa と IIb の複合系統樹を作製した。AsnRS は AspRS の群内群と考えられるため、IIa に属する HisRS, GlyRS (2 タイプ), ThrRS, ProRS, SerRS と IIb に属する Class II LysRS (LysRS-II) と AspRS の 7 種類の ARS を系統解析に含めた。これらの ARS のそれぞれの Commonote 段階の祖先 ARS と、複数種の ARS の各段階の祖先 ARS (図 1 を参照) の配列を推定し、祖先配列に基づく Class IIa ならびに IIb 祖先 ARS のアミノ酸特異性を推定した。

上記の結果を総合し、復元した各祖先 ARS の基質 (アミノ酸と tRNA) 特異性に基づき、どのような過程で現在のアミノ酸レパートリーが成立したのか、現在のアミノ酸と遺伝暗号の対応関係が成立したのか、を考察した。

### 4. 研究成果

我々は、解析対象とする ARS として Class Ia ARS と Class IIa ARS に注目した。Class Ia と Class IIa ARS は各クラス内でそれぞれ最大のサブクラス (それぞれ 6 種と 5 種の ARS をメンバー) として含み、サブクラス内の構造 (ドメイン構造、四次構造等) の保存性も比較的高い。この点において、祖先配列復元において重要なアライメントが比較的容易になることが期待された。

#### ① Class Ia アミノアシル tRNA 合成酵素の進化

IleCom, ValCom, IV-Anc, IV-Anc-I, IV-Anc-V のいずれもが、大腸菌内で可溶性タンパク質として発現し、それぞれ精製された。

アミノ酸特異性: その結果、IleCom と ValCom は、現生生物の IleRS と ValRS と同様に、それぞれ Ile と Val に高い基質特異性を示した。また、IV-Anc と IV-Anc-I は、IleCom や ValCom に比較し、アミノ酸特異性が低く、IV-Anc は複数のアミノ酸を区別せずに tRNA への結合を触媒することが示唆された。IV-Anc-V も低いながらもアミノアシル化触媒活性があることが示唆された。IV-Anc-I と IV-Anc-V の両方が IV-Anc に加えて活性を持つことは、これらの祖先 ARS が存在した時代のタンパク質の合成では、厳密な Ile と Val の識別されていなかったことを示唆し、Ile と Val については少なくとも様々な比率でランダムにタンパク質合成にしようされたとしても、その様なタンパク質の混合物であっても、当時の生物の生存には十分な活性であった可能性を示唆する。これらの結果は、Commonote より前の祖先生物では翻訳系において、現在よりもアミノ酸の識別が曖昧であったという可能性を強く支持する。

無細胞タンパク質合成: 大腸菌の再構築型無細胞タンパク質合成システムから、大腸菌の LeuRS, IleRS, ValRS の何れか、またはこれらを様々に組み合わせさせて除き、ComI, ComV, IV-Anc の何れかを加えてタンパク質合成を行った。その結果、例えば、ComI は大腸菌 IleRS と置き換えてもタンパク質合成が進行した。ComV, IV-Anc も大腸菌 ARS と置き換えてもタンパク質合成が進行するケースが有り、今後その再現性を確認中で有り、今後、これらの祖先 ARS のアミノ酸 (と tRNA) に対する対応をさらに検討する予定である。この検討の中には以下のことが含まれる。第 1 に、祖先 ARS の存在下で生成したタンパク質の質量分析等によるアミノ酸配列の決定による、本来 Ile や Val である座位のアミノ酸のランダム度の検討が含まれる。また、Leu, Ile, Val の側鎖の異性体などの非タンパク質アミノ酸のタンパク質合成への取り込みの可否の検討が挙げられる。これらを通じて、祖先 ARS が現在の ARS よりも幅広い基質特異性を持っていたのか、またその様な ARS の存在下で機能タンパク質の合成は進行可能であったのか、を検討する。

#### ② Class IIa/b アミノアシル tRNA 合成酵素の進化

アライメントに基づき、GlyRS, ThrRS, ProRS に共通な C 末端側のアンチコドン結合ドメインが、SerRS では N 末に移動して tRNA 結合ドメインとなったと推定した。また、SerRS の姉妹群は ProRS であった。また、この解析では、LysRS-II は AspRS の群内群となった。

この系統樹に基づき複数の手法で祖先配列を復元し、各祖先 ARS のアミノ酸結合部位周辺の配列の保存性を現生生物の ARS と比較した。Class IIa と Class IIb とを結ぶ枝上にこの系統樹の

根が位置すると仮定すると、Class IIa ARS の最古の結点である AncHGSPT では HisRS ( や GlyRS ) に類似する。これは単純に ARS の祖先について時間を遡ってたどっていても、必ずしもアミノ酸に対する基質特異性は無制限に広くはならないことを示唆している。しかし、これは配列の比較による推定であり、本研究の Class Ia ARS における IV-Anc のように祖先タンパク質をタンパク質として解析したものではない。そこで、我々は図 2 に示した祖先 ARS ( ComK, ComG, ComH, ComT, ComP, ComS, AncSP, AncSPT, AncHSPT, AncHGSPT, AncDK(=ComD) ) の配列を推定した。その中でも ComP, ComS, AncSP, ComK, AncDK(=ComD) に注目し、その大腸菌内での発現と、それに続く精製、機能解析を進行中である。

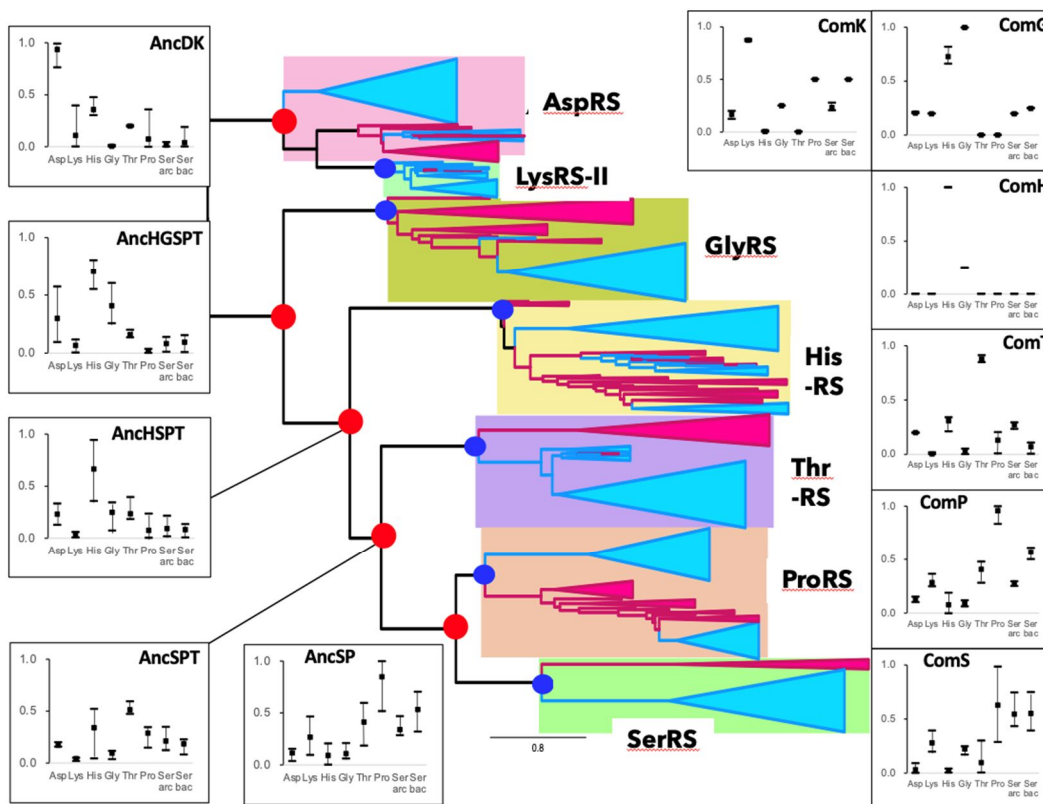


図 2. Class IIa/b ARS の分子系統解析 (最尤法による) と祖先配列のアミノ酸認識部位の配列保存性の、現生生物 ARS との比較。Furukawa et al. (2022) の Figure 8 を一部改変。

#### 考察と今後の展望

IleRS と ValRS の共通祖先である IV-Anc の解析から、Commonote 以前の ARS が現在よりも未分化であった時代には、ARS の基質特異性、特にアミノ酸特異性、は現在の ARS よりも広がったことが示唆された。一方、Class IIa/b ARS における配列比較からは、祖先 ARS のアミノ酸特異性の幅には限界があることが示唆され、Commonote 以前の ARS 群が現在の 20 種類のアミノ酸の全てをカバーしてはなかった可能性がある。今後、さらに各進化段階の Commonote 以前の祖先 ARS を復元し、その基質特異性を明らかにすることで、どのように翻訳における遺伝暗号表とアミノ酸レパートリーが確立したのか、その経路を推定することが出来ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furukawa Ryutarō, Yokobori Shin-ichi, Sato Riku, Kumagawa Taimu, Nakagawa Mizuho, Katoh Kazutaka, Yamagishi Akihiko	4. 巻 90
2. 論文標題 Amino Acid Specificity of Ancestral Aminoacyl-tRNA Synthetase Prior to the Last Universal Common Ancestor Commonote commonote	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Evolution	6. 最初と最後の頁 73~94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00239-021-10043-z	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横堀伸一、見渡空汰、守屋日向
2. 発表標題 全生物共通祖先tRNAの復元
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川龍太郎、横堀伸一、佐藤陸、熊川大夢、中川穂、加藤和貴、山岸明彦
2. 発表標題 最後の共通祖先コモノート以前の祖先型アミノアシル tRNA 合成酵素のアミノ酸特異性
3. 学会等名 第46回生命の起原および進化学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横堀伸一、馬場 紘、橋本ちひろ、古川龍太郎、松田直樹、遠藤有紀、佐藤陸、笹本峻弘、横川隆志、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
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横堀伸一
2. 発表標題 祖先アミノアシルtRNA合成酵素の復元から考える翻訳系の進化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横堀伸一
2. 発表標題 生命の歴史をさかのぼる
3. 学会等名 Keio Astrobiology Camp 2020 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横堀伸一、馬場紘、橋本ちひろ、松田直樹、遠藤有紀、佐藤陸、笹本峻弘、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
3. 学会等名 日本進化学会年大会第24回沼津大会
4. 発表年 2022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	時下 進一  (Tokishita Shin-ichi)  (60266898)	東京薬科大学・生命科学部・准教授   (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------