

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K14598

研究課題名(和文)全生物共通祖先以前のアミノアシルtRNA合成酵素のアミノ酸特異性の解析

研究課題名(英文) Analysis of amino acid specificity of aminoacyl-tRNA synthetase before last universal common ancestor

研究代表者

古川 龍太郎 (Furukawa, Ryutaro)

早稲田大学・人間科学学術院・助教

研究者番号：30845053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生命誕生初期のアミノアシルtRNA合成酵素(ARS)がどのようなアミノ酸を認識し、tRNAに結合していたのか。この謎を明らかにすることで、生命誕生初期に用いられていた少数のアミノ酸種から成るタンパク質合成系がどのような段階を経て現在のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸に増加したかを理解することができると考えた。本研究では、複数のARSの複合系統樹から、ARSの進化過程を推定、複数の分岐点における祖先ARSのアミノ酸配列を推定した。現存の生物が持つARSのアミノ酸結合部位のアミノ酸を、祖先ARSのアミノ酸に置き換えてタンパク質発現を試みたが、解析可能な可溶性タンパク質は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全生物共通祖先以前の初期生命の段階では、少数のアミノ酸から徐々に20種類のアミノ酸を使うようになったと考えられてきたが、それに伴って各々のアミノ酸を認識するアミノアシルtRNA合成酵素(ARS)が進化し、tRNAと共に20セットへ増加してきた。本研究結果によって、部分的にはあるが、ARSの進化とアミノ酸の増加の順番を直接結びつけて推定することができた。生化学的な検証がさらに必要である。

研究成果の概要(英文)：How aminoacyl-tRNA synthetase (ARS) recognize and bind amino acids to tRNA in the early stages of life? clarifying the question provide our understanding how the early protein synthesis system increased to the 20 amino acids. In this study, the evolutionary process of ARS was estimated from the composite phylogenetic tree of multiple ARSs. The amino acid sequences of the ancestral ARS were estimated. Expression of the mutant ARSs by replacing to the ancestral amino acid at the amino acid binding site were tried. However, no soluble protein was obtained.

研究分野：生物進化

キーワード：アミノアシルtRNA合成酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全ての生物は、20種類のアミノ酸を使ったタンパク質合成系を当然のように用いている。少なくとも、40~35億年前に存在したとされる全生物共通祖先は20種類のアミノ酸を使っていたと推定されている。それ以前の初期生命の段階では、少数のアミノ酸から徐々に20種類のアミノ酸を使うようになったと考えられてきたが、それに伴って各々のアミノ酸を認識するアミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)が進化し、tRNA と共に20セット揃うことが不可欠であった。ARS の進化について、分子系統解析、立体構造解析、現存生物のARS のアミノ酸特異性解析を用いて推定が行われてきたが、未だアミノ酸の増加の順番とARS の進化を直接結びつけて理解できていない。20種のARS は各々にとって特異的なアミノ酸を認識し、特定のtRNA に結合させる役割を持つことから、タンパク質の合成の正確さの大半を司っていると言える。つまり、ARS のアミノ酸認識部位の進化に伴って、タンパク質合成に用いられるアミノ酸の種類が拡大もしくは縮小したと考えることができる。実際には、アミノ酸認識部位の進化の他に、間違っただアミノ酸を認識した場合に働く校正機構が進化の過程で備わっているが、それらは全生物共通祖先以後に獲得された可能性が高い。ARS は、構造と配列相同性により2つのクラス(Class I、Class II)に分類されており、それぞれ別々に祖先ARS があると考えられている。つまり、2つの祖先ARS から複数回の遺伝子重複を経て20種類以上のARS に分岐進化したと推定されている。この2つの祖先ARS は、いったいどのようなアミノ酸特異性を持っていたのだろうか。さらに、遺伝子重複後の各分岐点の祖先ARS はいったいどのようなアミノ酸特異性を持っていたのだろうか。この問いを明らかにすることでタンパク質合成の進化過程におけるアミノ酸種の変遷を明らかにすることを試みた。

### 2. 研究の目的

Class II ARS の複合系統樹からARS の分岐順と祖先ARS のアミノ酸配列を推定する。現存生物のARS のアミノ酸認識部位のアミノ酸配列を、各分岐点における祖先ARS のアミノ酸配列に置き換え、アミノ酸特異性を解析することで、祖先ARS のアミノ酸特異性を明らかにする。この結果を時系列順に並べることで、アミノ酸種がタンパク質合成に用いられるようになった順序を推定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

真正細菌57種類、古細菌23種類を持つ7種類のARSのアミノ酸配列からClass IIa ARSとClass IIb ARSの複合系統樹を推定した。Class IIb ARSを外群とした時に、Class IIa ARSは、GlyRSとHisRSのグループおよびThrRS、ProRS、SerRSのグループに分かれることがわかった。系統樹の分岐点において祖先配列を推定した。5つのARSの共通祖先をAncHGSPT、GlyRSとHisRSの共通祖先をAncHG、ThrRS、ProRS、SerRSの共通祖先をAncSPT、ProRSとSerRSの共通祖先をAncSPと名付けた。同様にして、全生物共通祖先が持っていたと推定される5つのARSをComH、ComG、ComT、ComP、ComSと名付けた。これら9つの祖先ARSを持つアミノ酸特異性の推定をアミノ酸認識部位の保存性から行なった。この推定結果を実験的に検証するために、本計画では*T. Thermophilus*のClass IIa ARSのアミノ酸認識部位に当たる15残基を祖先ARSのアミノ酸に置き換えた変異体を作成し、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸に対するアミノアシル化活性を計測する予定であった。まず、*T. Thermophilus* HisRS(TTH)のアミノ酸認識部位にあたる15アミノ酸をAncHG、ComHのアミノ酸に置き換えた変異体TTHancHG、TTHcomH、同様にして設計されたTTGancHG、TTGcomGの遺伝子を合成した。野生型であるTTHとTTGを含めた6遺伝子をそれぞれ大腸菌内で発現、精製し、変異体の可溶性タンパク質を得ることを試みた。獲得した4つのARS変異体と2つの野生型ARSのアミノアシル化活性を、アミノアシル化反応で出るリン酸の量を基に測定する予定であった。また、ComH、ComGの全長のアミノ酸配列を基に遺伝子を合成し、ComH、ComGの発現も試みた。

### 4. 研究成果

ヒスチジル tRNA 合成酵素(HisRS)とグリシル tRNA 合成酵素(GlyRS)の共通祖先に当たる祖先ARS (AncHG)のアミノ酸配列から基質アミノ酸との結合に重要な部位を選出し、その部位に当たるアミノ酸を現存する好熱菌である *Thermus thermophilus* が持つ HisRS および GlyRS に導入し、様々なアミノ酸に対するアミノアシル化活性を測定することで、祖先ARS(AncHG)のアミノ酸特異性を調べることにした。まず、*Thermus thermophilus* が持つ HisRS および GlyRS(以下 TTHis、TTGly と略す)を大腸菌内で発現させた。次に、全生物共通祖先が持っていた HisRS、GlyRS の基質アミノ酸との結合に重要な部位を選出し、その部位に当たるアミノ酸を TTHis、TTGly に導入した ComH、ComG を設計し、大腸菌内で発現させた。TTHis、TTGly、TTHcomH、TTGcomG は可溶性のタンパク質として得られ、70°Cの熱処理にも耐える安定性を有していた。続いて、AncHG の基質アミノ酸との結合に重要な部位を選出し、TTHis、TTGly に導入した TTHancHG、TTGancHG を設計し、大腸菌内で発現を行った。TTHancHG、TTGancHG は発現していたが、不

溶性であった。祖先配列推定に問題があるかどうかを確かめるために、全生物共通祖先が持っていたと推定される HisRS、GlyRS の遺伝子(ComH、ComG)を合成し、発現を行った。全生物共通祖先 HisRS と全生物共通祖先 GlyRS は発現し、可溶性であったが、熱安定性が失われていた。これまでに復元されている全生物共通祖先が持つと考えられるタンパク質は、高い耐熱性を有していたことから、今回推定された ComH、ComG の祖先配列が正確ではないと考えられると同時に、AncHG の祖先配列も正確ではないと考えられる。分子系統解析から、HisRS と GlyRS が近縁であるということがわかったが、HisRS と GlyRS がはっきりと共通祖先を持つかどうかは疑わしく、今回使用した 80 種類の生物の配列セットから構成された配列アラインメントから、さらに生物種を増やした配列セットの使用、構造情報やアラインメントプログラム、系統解析や祖先配列推定のプログラムや方法を見直し、さらに正確な ARS の系統関係や祖先配列を推定する方策が必要である。また、推定した配列から、いかに安定な可溶性タンパク質を得るかの方策も練り直す必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------