

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21570242

研究課題名（和文）動物の進化におけるミトコンドリアの遺伝暗号と tRNA の共進化の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of co-evolution of mitochondrial genetic codes and tRNA in the evolution of animals

研究代表者

渡辺公綱（WATANABE KIMITSUNA）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：00134502

研究成果の概要（和文）：動物ミトコンドリアではすべての動物門で非普遍暗号の分布状況（コドンとアミノ酸の対応関係）が解明されている。しかしコドンとアンチコドンの対応関係は脊椎動物と線形動物しか明らかにされていない。本研究では遺伝暗号の解読機構の全体像を解明するため、尾索動物（ホヤ）と軟体動物（イカ）について該当する tRNA を単離し、LC/MS で分析することによりこの対応関係を明らかにした。ホヤの tRNA^{Trp}、tRNA^{Met}、tRNA^{Gly} 並びにイカの tRNA^{Trp} のアンチコドン 1 字目に 5-タウリノメチルウリジン（ $\tau\text{m}^5\text{U}$ ）を発見し、これを含むアンチコドンが A と G で終わるコドンを解読することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In animal mitochondria, distribution of the non-universal codons (relationship between codon and amino acid) has been clarified in all animal phyla. However, relationship between codon and anticodon has not clarified except for Vertebrata and Nematoda. In order to elucidate a whole image for the decoding mechanism of genetic code, we isolated the relevant tRNAs from a tunicate (ascidian) and a mollusc (squid) and analysed them by using LC/MS. By doing so, we clarified the relationship. We found 5-aurinomethyluridine ($\tau\text{m}^5\text{U}$) in the first position of ascidian tRNA^{Trp}, tRNA^{Met} and tRNA^{Gly}, and squid tRNA^{Trp} and concluded that $\tau\text{m}^5\text{U}$ -bearing anticodons decode A- and G-ending codons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、進化生物学

キーワード：遺伝暗号、ミトコンドリア、tRNA、修飾塩基、分子進化

1. 研究開始当初の背景

遺伝暗号は地球上の全生物で共通、普遍であるとされていたが、1979年ヒトとウシ・ミトコンドリアで非普遍暗号が発見されたことを契機として動物ミトコンドリアや種々の生物(核遺伝子)で、普遍暗号に従わない例が少なからず発見されたため、普遍遺伝暗号説は否定され、現在では生物の進化に伴って遺伝暗号は変化し得るものであるという概念が定着した。

動物ミトコンドリアではすべての動物門において代表的な動物種のミトコンドリアのゲノム解析が行われており、非普遍暗号の分布状況が明らかになっている。しかし暗号変化のメカニズムや必然性についてはまだ十分理解されていない。

2. 研究の目的

そこで各種動物ミトコンドリアにおける暗号変化の分子機構を探るために、個々の動物種のミトコンドリアについて、各非普遍暗号に対応するtRNAのアンチコドン解析し、コドン-アンチコドン対応関係を詳細に解明することにより、コドンとtRNAの共進化の分子機構を突き止めることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究対象としては無脊椎動物と脊椎動物の中間に位置する尾索動物ホヤ(マボヤ: *Halocynthia roretzi*)と無脊椎動物の代表として軟体動物イカ(ヤリイカ: *Loligo bleekeri*)を取り上げ、それらの暗号変化(ホヤ: UGA, 終止コドン→Trp; AUA, Ile→Met; AGA/G, Arg→Gly, イカ: UGA, 終止コドン→Trp; AUA, Ile→Met; AGA/G, Arg→Ser)に対応するtRNAを単離精製した。まずホヤとイカの筋肉より、フェノールクロロフォルムを用いる定法に従って核酸を単離し、DEAE-セルロースによってRNA分画を精製した。これを東大・鈴木研究室が独自に開発した往復循環クロマトグラフィー(RCC: 目的とするtRNAの特定の領域に相補的なDNAプローブを合成し、それをチップに固定化する。8個のチップを並列に並べtRNA溶液に浸し、溶液を吸い上げて、DNAプローブに相補的なtRNAだけをハイブリダイゼーションで結合させる。tRNA溶液を攪拌しながら溶液の吸入と吐出を繰り返すことにより、tRNA原液中の特定のtRNAを完全に吸着し終わった後、各チップを洗浄、高塩溶液で吸着したtRNAを溶出させる)にかけ、非普遍暗号に対応するミトコンドリアの単一tRNAを分取し、RNaseT1で分解し各断片を高精度質量分析装置(LC/MS)を用

いて分析した。修飾塩基を含む各断片の塩基配列を決定後、各断片はミトコンドリアゲノム配列に従って、位置が特定できるので、tRNA全体の塩基配列を再構成することができる。このようにして、特に多くの場合アンチコドン1字目に存在する修飾塩基と、コドンとの対応関係を明らかにする。

4. 研究成果

非普遍暗号に対応する、ホヤの3種類のtRNA(Trp, Met, Gly)とイカtRNA^{Trp}のアンチコドン1字目に5-タウリノメチルウリジン($\tau\text{m}^5\text{U}$)を発見した。これがコドン3字目のAとGを認識することにより、上記の暗号変化(ホヤの場合: UGA, 終止コドン→Trp; AUA, Ile→Met; AGA/G, Arg→Gly, イカの場合: UGA, 終止コドン→Trp)を引き起こすことが結論された。またホヤでは例外的にMet用のtRNAが2種類(アンチコドンに $\tau\text{m}^5\text{UAU}$ をもつものとCAUを持つもの)存在するが、アンチコドンにCAUを持つ方は開始tRNAであることが推定された。ホヤの結果については *J. Biol. Chem.* に発表した。イカの非普遍暗号に対応する、他の2種類のtRNA(Met, Ser)のアンチコドンはそれぞれ未修飾のCと m^7G (ファミリーボックスの4つのコドンすべてに対応することが我々のグループによりすでに解明されている)であった。これまでの暗号変化はすべて修飾塩基が関与して実現されるものであったが、イカtRNA^{Met}での未修飾Cの発見は、Cは本来GとAを認識できるポテンシャルを有するものであり、これまでに明らかになった未修飾のU, A, Gの塩基対形成能とを総合して考察すると、初期遺伝暗号はすべて未修飾のアンチコドン、ひいては未修飾RNAで実現されることを強力に示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- (1) Watanabe, K. and Yokobori, S. (2011) tRNA modification and genetic code variations in animal mitochondria. *J. Nucleic Acids* (Online J.) 査読有、doi: 10.4061/2001/623095
- (2) Watanabe, K. and Yokobori, S. (2011) Genetic code introduction. *Encyclopedia of Life Sciences* (Online J.) 査読有、doi: 10.1002/9780470015902
- (3) Suzuki, T., Miyauchi, K., Suzuki, T.,

- Yokobori, S., Shigi, N., Kondow, A., Takeuchi, N., Yamagishi, A. and Watanabe, K.** (2011) Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 286, 35494-35498. 査読有.
- (4) **Higashiura, Y., Yamaguchi, M., Ishihara, M., Ono, N., Tsukagoshi, H., Yokobori, S., Tokishita, S., Yamagata, H. and Fukatsu, T.** (2011) Male death resulting from hybridization between subspecies of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Heredity*, 106, 603-613. 査読有.
- (5) **Yokobori, S., Ueda, T. and Watanabe, K.** (2010) Evolution of genetic code. In: *Encyclopedia of Life Science 2010*. John Wiley & Sons, Ltd.(Online J.) 査読有. Doi. 10.1002/9780470015902.a0000548.pub 2.
- (6) **Okada, K., Yamazaki, Y., Yokobori, S., and Wada, H.** (2010) Repetitive sequences in the lamprey mitochondrial DNA control region and speciation of Lethenteron. *Gene*, 465, 45-52. 査読有
- (7) **Ito, A., Aoki, M., Yokobori, S. and Wada, A.** (2010) The complete mitochondrial genome of *Caprella scaura* (Caprellidea) with a note on a unique gene order pattern and duplicated ncontrol region. *Mitochondrial DNA*, 21, 183-190. 査読有.
- (8) **Watanabe, K.** (2010) Unique features of animal mitochondrial translation systems – The non-universal genetic code, unusual features of the translational apparatus and their relevance to human mitochondrial diseases –. *Proc. Jpn. Acad. Ser.B* 86, 11-39. 査読有、doi:10.2183/pjab.86.11
- [学会発表] (計 15 件)
- (1) **Watanabe, K., Yokobori, S. and Suzuki, T.** (2011/12/17) An approach to an early genetic code table inferred from decoding system of non-universal genetic codes in animal mitochondria. Symposium on behalf of Tom RajBhandary (招待講演) Bangalore, India.
- (2) **Suzuki, T., Miyauchi, K., Suzuki, T., Yokobori, S., Shigi, N., Kondow, A., Takeuchi, N., Yamagishi, A. and Watanabe, K.** (2011/6/17) Unique characteristics of ascidian mitochondrial tRNAs involved in deciphering the non-universal genetic codes and an initiator tRNA corresponding to AUG codon. RNA2011, 京都.
- (3) **横堀伸一、山岸明彦、渡辺公綱** (2011/7/31) 尾索動物ミトコンドリア遺伝暗号の進化、日本進化学会第 13 回年会、京都.
- (4) **末松卓真、渡邊修、横堀伸一、北潔、渡邊洋一** (2011/9/24) ミトコンドリア翻訳伸長因子 EF-G の多様性：リボソームサブユニット解離活性を「再構築」した植物ミトコンドリア EF-G? 第 84 回日本生化学会年会、京都
- (5) **大曾根祐、廣瀬裕一、和田洋、西川淳、倉橋敦、山岸明彦、横堀伸一** (2011/9/21) ミトコンドリアゲノムに基づく尾索動物の分子系統解析、動物学会、旭川、北海道
- (6) **横堀伸一** (2011/11/27) tRNA から見た遺伝暗号の進化、第 4 回アストロバイオロジーネットワークワークショップ、神戸
- (7) **Yokobori, S., Watanabe, K. and Yamagishi, A.** (2011/12/14) molecular phylogeny of urochordates and evolution of mitochondrial genetic code in urochordate mitochondria. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜
- (8) **小澤元希、島村繁、高木善弘、横堀伸一、丸山正、吉田尊雄** (2011/12/14) 深海性二枚貝シロウリガイ類のミトコンドリアゲノム解析、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜
- (9) **小澤元希、島村繁、高木善弘、横堀伸一、前田太郎、丸山正、吉田尊雄** (2011/2/22)

シロウリガイ類のミトコンドリアゲノム
解析、ブルーアース 2012, 東京

- (10) 横堀伸一、山岸明彦、渡辺公綱
(2011/3/8) ミトコンドリア tRNA の解析
から見た遺伝暗号の進化、第 37 回生命の
起源と進化学会学術講演会、高槻
- (11) 横堀伸一(201010/31) 遺伝暗号の進化：
ミトコンドリア遺伝情報系をモデルとし
て。第 3 回アストロバイオロジーネット
ワーク・ワークショップ、多摩
- (12) 大曾根祐、倉持祐吾、和田洋、倉橋敦、
廣瀬裕一、西川淳、山岸明彦、横堀伸一
(2010/9/24) 尾索動物ミトコンドリア構
造多様性の進化、第 81 回動物学会年会、
駒場
- (13) Yokobori, S., Kurabayashi, A.,
Nishikawa, J., Ohson, Y., Yamagishi, A.
and Hirose, E. (2009/6/21) Molecular
phylogeny of Urochordata (Tunicata)
based on complete mitochondrial
genome sequences and 18S rRNA gene
sequences., The 5th International
Tunicate Meeting, Okinawa
- (14) Ohson, Y., Wada, H., Nishikawa, J.,
Kurabayashi, A., Hirose, E., Yamagishi,
A. and Yokobori, S. (2009/6/22)
Complete nucleotide sequences of
mitochondrial genomes of two salps
Ritteriella amboinensis and *R. picteri*.
The 5th International Tunicate Meeting,
Okinawa
- (15) 横堀伸一、大曾根祐、倉橋敦、西川淳、
廣瀬裕一、山岸明彦 (2009/9/19) ミトコ
ンドリアゲノムに基づく尾索動物の分子
系統解析、第 80 回日本動物学会年会、静
岡

[図書] (計 1 件)

渡辺公綱・姫野俵太著 丸善出版、生命化
学 II 遺伝子の働きとその応用 第 2 版、
2011 年、269 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 公綱 (Watanabe Kimitsuna)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・
名誉教授

研究者番号：00134502

(2) 研究分担者

横堀 伸一 (Yokobori Shin-ichi)

東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：40291702

嶋 直樹 (Shigi Naoki)

(独) 産業技術総合研究所・バイオメディ
シナル情報研究センター・研究員

研究者番号：20391623