

Wobble 塩基対のかたちと対合規則の進化

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター
高井和幸

遺伝子の塩基配列には、タンパク質のアミノ酸配列の情報が書き込まれている。タンパク質は生物の様々な機能を担う「主役」であるが、その機能は、主としてアミノ酸配列によって決まっている。だから、生命にとって、遺伝情報を正しくアミノ酸配列に変換することはもっとも重要な作業のひとつである。

遺伝子の塩基配列と、タンパク質のアミノ酸配列との対応関係は、3つの連続したヌクレオチド(コドン)とアミノ酸との対応関係に還元できる。この対応関係が、遺伝コード(genetic code)である。genetic codeのことを、「遺伝暗号」という場合が多いが、その場合、「暗号文」全体(つまり、タンパク質、あるいは、タンパク質とそれがいつどれだけ発現するか)を指すようにも解釈できるかもしれないので、ここでは、「暗号文」ではなく、「単語」のレベル(つまり、アミノ酸)の問題であることを明確にするために、「遺伝コード」と書くことにする。遺伝コードをまとめた表のことを「コドン表」ということがある。

遺伝コードの全貌が明らかになってまもない1966年、Crickはいわゆる wobble 仮説を提唱した[1]。これは、tRNA のアンチコドン第二、第三塩基と、コドン第二、第一塩基との間には Watson-Crick 型塩基対のみが許されるが、アンチコドン第一塩基とコドン第三塩基との間には「あそび(play または wobble)」があって、Watson-Crick 型塩基対以外の一部の塩基対も許される、というものであり、それによって、遺伝コードの「縮重」が説明できる、というのである。Crick は、同時に、どの塩基とどの塩基との対合が許され、どの塩基とどの塩基との対合が許されないか、生物学的な制約を考慮して考察した(表1A)。その対応関係は、後に、wobble rule と呼ばれた。

従来、wobble 仮説は「よろめき仮説」とか、「ゆらぎ仮説」といった日本語に翻訳されてきたが、ここでは、wobble 仮説と書く。また、wobble rule については適当な訳語が見つからないので、対合規則と呼ぶことにする。また、wobble 仮説と対合規則とは混同されがちである。前者は、アンチコドン第一塩基とコドン第三塩基との間に「あそび」があり、他の2つの塩基対には「あそび」がない、ということであり、後者はその「あそび」の規則である。本稿の内容は、主に、後者についてのものである。

また、「アンチコドン第一塩基」などの述語は文章を複雑にするので、アンチコドン側のヌクレオチドを、その tRNA 上のヌクレオチド番号を添えて、「U(34)」などと書くことにする。アンチコドンの一番目の位置は34位であるので、U(34)というのは、アンチコドンの一番目のウリジン、という意味である。また、コドン側のヌクレオチドについては、A(III)のように、コドンの中での位置をローマ数字で示す。さらに、ヌクレオチドを指定しないでアンチコドンの一番目のことをいうときには、N(34)と書く。

表1. 対合規則

A. 原核生物		B. 真核生物	
N(34)	N(III)	N(34)	N(III)
A	U	A	U
G	C, U	G	C, U
I	C, U, A	I	C, U
U	A, G	U	A
C	G	C	G

U(34)は転写後修飾を受けていることが多い。

Crick が考えた対合規則は、原核生物のものと同じである。

その後の研究によって, wobble 仮説そのものは基本的に正しいことがわかっている. 対合規則については, 様々な研究がなされ, いくつものバリエーションが見出された. 特に, I(34)-A(III) 対合の効率が極めて低いこと[2,3]や, U*(34)-G(III) 対 (*で修飾があるかもしれないことを示す) が真核生物ではできないこと[4]がわかった. 現在, いくつかの教科書には, 原核生物と真核生物とで対合規則が異なると書かれている(表1B).

また, U(III)と対合できるウリジン-5-オキシ酢酸 (5-carboxymethoxyuridine, cmo^5U または V) [5]をはじめとして, 様々な修飾ヌクレオチドが同定された. 多くの修飾を施すためには, それだけ多くの修飾酵素遺伝子が必要だということであり, それだけ大量のエネルギーを修飾のために使っているということである. それは, タンパク質を正確かつ効率よく合成するために必要だからである. だから, 修飾によってタンパク質合成がいかに効率よく, 正確に行われているかを調べることで, 生物が進化の過程で取った戦略の一面を理解できると考えることができる. 本稿では, 34 位のヌクレオチドの構造とコドン特異性との関係について, これまでの経緯と新しいモデルについて述べる.

1. 横山-西村仮説

標準的なコドン表には, N(III)のみが異なり, N(I), N(II)が共通の 4 つのコドンの組が, ひとつのボックスにまとめられている. これらの 4 つのコドンの組をコドンボックスとか, コドンファミリーという. コドンボックスの 4 つのコドンは, 1 種のアミノ酸を指定している場合と, 2 種以上のアミノ酸を指定している場合とがある. 前者の場合, そのコドンボックスをファミリーコドンボックスという場合があり, また, 後者の場合は, スプリットコドンボックスということがある. 分割されているコドンボックスには, 2:2 に分割されているものと, 3:1 に分割されているものとがある.

1970 年代に, 様々な修飾ウリジンが同定されたが, それらが xo^5U 型と xm^5U 型の 2 種に分類できることが明らかになった[6]. xo^5U 型は, 5-オキソウリジン誘導体であり, ファミリーボックスに対応する tRNA に存在する. 一方, xm^5U 型の修飾ウリジンは, 2:2 のスプリットボックスに対応する tRNA に見出される(図2B) [6].

横山らは, 修飾ウリジン(のヌクレオチド)のコンフォメーションを NMR で解析し, xo^5U 型の修飾は C2'-endo 形を安定化し, xm^5U 型の修飾は C3'-endo 形を安定化することを見出した

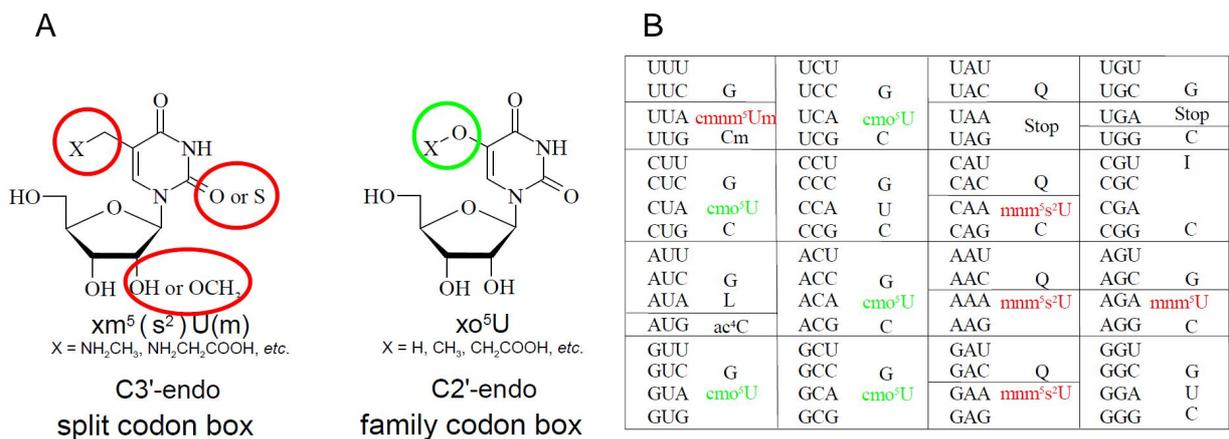


図1. 横山-西村仮説

A. 34 位に見られる修飾ウリジンの構造とコンフォメーション. ウリジンの 5 位にメチレンが直接結合する形のウリジン修飾は, C3'-endo 形の「かたい」コンフォメーションを安定化する. このような修飾ウリジンは, 同時に, 2 位のチオ化や 2' 位のメチル化を受けている場合もあるが, これらの修飾も C3'-endo 形の安定化に寄与する. 一方, 5 位に直接酸素原子が付くようなウリジン修飾は, C2'-endo 形の「やわらかい」コンフォメーションを相対的に安定化する. B. 大腸菌の N(34). 大腸菌に限らず, xm^5U 型の修飾ウリジンは, N(III)=U, C の場合と N(III)=A, G の場合とで指定するアミノ酸が異なるような場合に, N(III)=A, G のコドン認識する tRNA に見られる. また, xo^5U 型の修飾ウリジンは, N(III)=U, C でも A, G でも同じアミノ酸を指定するような場合にそれらのコドン認識する tRNA に見られる.

[7,8]. 通常の RNA 分子では, もともと C3'-endo 形が安定であるが, xo⁵U 形のヌクレオチドでは C2'-endo 形が半分程度になるほど安定であり, xm⁵U 型のヌクレオチドでは通常のヌクレオチドよりもさらに C3'-endo 形が安定だといふのである. C3'-endo 形では, P-O3'-C3'-H3'結合の二面角が G⁻にしかねないため, この形は, 「かたい」形である. 一方, C2'-endo 形では, G⁺にも G⁻にもなれるので, これは「やわらかい」形である.

彼らは, この結果を次のように解釈した. cmo⁵U(34)が U(III)と対合できるのは, この「やわらかさ」のためであり, そのために, Crick が「短い」ためにできないであろうと予測した U-U 対が可能になっている. 実際, C2'-endo 形になることさえできれば, 34 位の塩基部分はコドン側にせり出すことができるので, 短い塩基対も可能と思われる. 一方, もし, C2'-endo 形で U(III)との対合が可能になるのであれば, C2'-endo 形にならないようにすることで, 2:2 のスプリットボックスでは, U(III)との対合(もし対合すれば誤翻訳になる)を防ぐことができるはずである. 従って, 2:2 のスプリットボックスで C3'-endo 形を安定化する(すなわち C2'-endo 形を不安定化する)修飾が見出されるのは合理的である. 結局, xo⁵U への修飾は wobbling を拡張することで効率的な翻訳を可能にし, xm⁵U への修飾は wobbling を制限することで厳密な翻訳を可能にしている.

横山らのグループ(筆者も含む)では, その後, 当時不明であったアルギニン, ロイシンの tRNA の修飾ヌクレオシドの化学構造を決定することで, この仮説の増強を図った[9-11]. 一方, 無細胞タンパク質合成系を用いて, tRNA の U(34)から mo⁵U(5-methoxyuridine)への修飾が, U(III)および G(III)との対合を可能にすることを示した[12]. これらの結果は, 仮説を多少修正したものの, 根本的に矛盾するものではなかった.

2. 横山-西村仮説の問題点

ところが, 大腸菌の tRNA 修飾酵素欠損株が得られると, 横山-西村仮説の問題点が露呈し

た. 「かたい」修飾ウリジンである mnm⁵s²U(5-methylaminomethyl-2-thiouridine)を持つ tRNA^{Lys}は, Asn 飢餓状態では, Asn コドンを誤って認識することが知られていたが, 修飾欠損株ではこの誤翻訳が著しく少なくなることが判明した[13]. これは, この型のウリジン修飾が誤った翻訳を防いでいるという, 横山-西村仮説の重要な部分と矛盾する. また, 同じ修飾欠損株を用いて, GAA および GAG の Glu コドンの認識の速度が測定されたが, これらの速度に対する修飾欠損の効果は, 横山-西村仮説では全く説明できないものであった[14].

横山-西村仮説が発表されてから 10 年以上の間, 世界の研究者がもっともらしいと信じていた仮説が, なぜ, 正しくなかったのだろうか. 「やわらかい」修飾に関しては, 矛盾する実験結果は得られていない. だから, 問題は, 「かたい」修飾のほうである.

5 位にメチレンを介した修飾がある場合は, 2-チオ化や 2'-O-メチル化も同時に受けている場合が多い. 物理化学的測定によって, 5 位の修飾の「かたく」する効果は大きくないことがわかった[15]. また, tRNA^{Lys}の場合は特殊で, 2-チオ化などの修飾がないと, アンチコドン全体がコドンを認識できる立体構造をとらないことがわかっていて[15]. だから, Asn コドンの誤翻訳が, 修飾がアンチコドン全体に及ぼす効果に依存しており, U(34)のみへの効果だけでは解釈できないことも確かである. しかし, そうだとしても, Glu コドンの結果は説明できない.

3. 新しいモデル

少なくとも, 修飾がコンフォメーションに影響を与えることは間違いなさそうである. Glu コドンの認識の速度への修飾の効果が説明できないのは, 何か, 今まで考慮されていないことを見逃しているからである可能性が高い. 原核生物と真核生物との間での対合規則の違い(表1B)も, 古いモデルでは考慮されていない. 著者は, 次の点を仮定することで, 物理化学的測定の結果と矛盾せずに, Glu コドンの結果が説明できることを見出した(図2)[16,17].

仮説1: N(34)の塩基がワトソン-クリック型の位置からマイナーグループ側に移動した位置(図2AのPy3およびPu6)は, C3'-endo形をとる場合は, ワトソン-クリック型の位置(Py2およびPu5)とほぼ等価である. また, C2'-endo形を取ることのできる修飾ウリジンでは, メジャーグループ側に移動した位置(Py1)とそこからさらにコドン側に移動した位置(Py4)で N(III)と対合することが可能である.

仮説2: 5-アミノメチルウリジン誘導体(xnm⁵U*)のH3プロトンは生理条件で一部解離しており, イオン化した分子種が G(III)と対合できる.

仮説1は, 言い換えると, そのようにするメカニズムが存在している, ということである. そうであれば, C3'-endo形を安定化する修飾によって, ワトソン-クリック型の位置およびそこからマイナーグループ側に移動した位置での塩基対合が促進されるはずである. 多くの tRNA^{Phe} は Gm(34)修飾を受けている[18]が, この修飾により C3'-endo形が安定化されるはずであるので, もし仮説1が正しいならば, この修飾が C(III)との対合ばかりでなく U(III)との対合をも促進することが期待され, 合理的である. また, 未修飾 tRNA を用いた実験では, G(34)-U(III)を伴うコドン認識は A(34)-U(III)を伴うコドン認識と比較して同効率かむしろ高効率である[19]. この結果は, 仮説1と合致している.

仮説2は, 仮説1と併せて, 上記の Glu コドンの結果を説明する[16,17]. mnm⁵s²U(34)からの mnm⁵修飾の欠損は, イオン化を抑えるので, G(III)との対合を抑制し, A(III)との対合を促進する. s²修飾の欠損の場合は, C3'-endo形の不安定化を招くので A(III)との対合も G(III)との対合も抑制しそうであるが, G(III)との対合については, Py3に加えて Py2での対合も可能になるので抑制と促進が拮抗する. 実験結果では A(III)との対合が抑制され G(III)との対合にはあまり効果がないので, 予測と矛盾しない.

xnm⁵U*(34)は, 原核生物および真核生物オルガネラ由来の tRNA にしか存在しない[18]ので, 真核生物では xm⁵U(34)-G(III)対はできないと考えられる. これは, 実験事実と一致している. xo⁵U(34)も真核生物由来 tRNA には無い[18]ので, 結果として, 真核生物では U*(34)-G(III)対はできない. 従って, この仮説で, 真核生物と原核生物とで対合規則が異なる点の一つを修飾の違いに帰することができる[16].

4. 実験事実との整合性

上記の仮説が一般側であるためには, Glu コドンの結果だけでなく, 他の過去の実験結果についても説明できる必要がある.

(1) ミトコンドリア tRNA^{Leu} の修飾欠損の効果

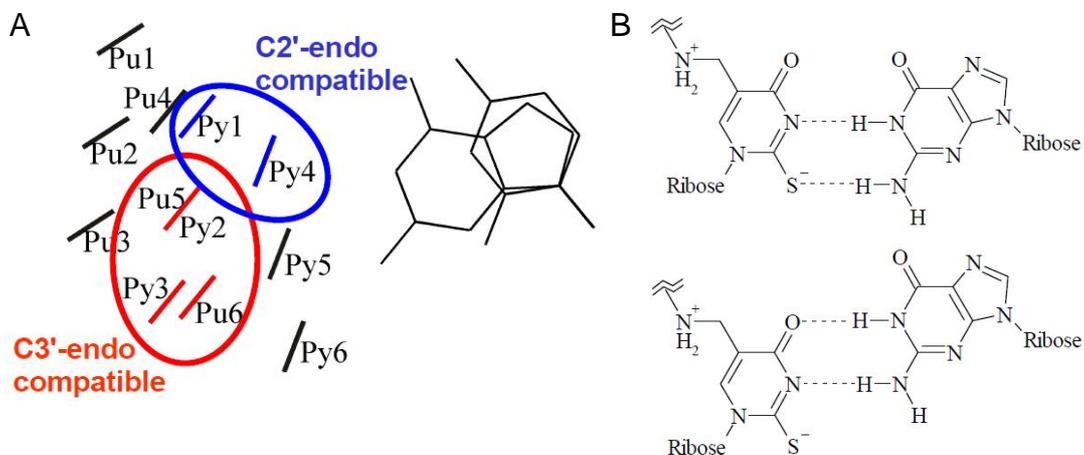


図2. 仮説.

A. 仮説1と塩基の位置の記号. 塩基の位置を, N-グリコシル結合の位置で示す. Py2とPu5は Watson-Crick 型塩基対の場合の位置であり, 同一の位置である. B. 仮説2に述べられている可能な xnm⁵U*-(34)-G(III)塩基対.

哺乳動物ミトコンドリアの $tRNA^{Leu}_{UUR}$ は、34 位に 5-taurinomethyluridine (τm^5U) (図3) を持っている。MELAS という病気を引き起こすこの $tRNA$ の変異では、このヌクレオシド修飾が欠損するが、この修飾欠損 $tRNA$ は UUG コドンを認識できない[20]。このヌクレオシドは、 xnm^5U 型である(タウリンのアミノ基の窒素が 5 位のメチレン炭素に直接結合している)ので、仮説 2 が正しければ、生理条件である程度イオン化すると考えられる。従って、野生型 $tRNA$ で G(III)と対合でき、欠損 $tRNA$ で G(III)と対合できないのは合理的である。ミトコンドリアでは、生理条件での pH が細胞質よりも高いので、大腸菌などの場合よりも元々イオン化の割合が高く、欠損の影響も大きいかもしれない。

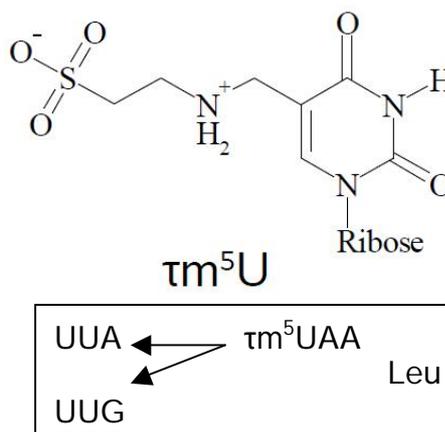


図3. 動物ミトコンドリアの τm^5U

ならない。しかし、誤翻訳は一般に効率が低いので、そのメカニズムを直接決定するのはほとんど不可能である。

C(34)-A(III)塩基対としては、A のプロトン化による Py1 の対が考えられるが、これは、仮説 1 を考慮すると、あまりありそうもない。もうひとつ、可能性があるとすれば、水素結合がひとつだけで、Py3 の対である。実は、筆者は、水素結合がひとつ足りないだけというのが、もっとも可能性が高いと考えている。というのは、水素結合がひとつ足りないだけならば、 $tRNA$ とコドンとの間の複合体のかたちは、水素結合がある場合と同じである。だから、そのような対は、エネルギー的には水素結合のエネルギー分だけしか劣っていない。逆に言うと、場所が仮説1で許されていない場所で 2 つの水素結合が仮にできたとしても、塩基間水素結合以外の相互作用がうまくいかないの、その対が許されないようになっている、と考えている。

(2) 酵母 $tRNA^{Ile}$

酵母の AUA コドンに対応するイソロイシン $tRNA$ の 34 位はシュードウリジン (ψ) である[21]。Crick の考え方では、 $\psi(34)$ は G(III)と対合できると考えられるが、もし対合できるのであれば、メチオニンのコドンを誤認識してしまう。塩基部分が 180 度回転して *syn* 形のコンフォメーションになれば、A(III)と対合でき、しかも、G(III)と対合できなくなるので、当初はそのように考えられた[21]。

$\psi(34)$ が G(III)と対合するためには、Py1 の位置に移動することが必要である。従って、仮説1が正しければ、*syn* 形のコンフォメーションを仮定しなくても、G(III)と対合しないことが理解できる。

(3) 大腸菌 $tRNA^{Met}$

大腸菌 $tRNA^{Met}$ の 34 位は 4-N-acetylcytidine (ac^4C) である。このアセチル化修飾により、イソロイシンの AUA コドンの誤認識を防ぐ効果があることが知られている[22]。この修飾は、C3'-endo 形を安定化するので、横山-西村仮説に従って、そのことが、誤翻訳を抑制していると解釈された[23]が、横山-西村仮説のほう誤翻訳の制限についてどこまで正しいのかよくわからなくなってしまったので、それが正しいのかどうか、わからなくなってしまった。

そもそも、誤翻訳を防ぐメカニズムを理解するためには、誤翻訳の原因を突き止めなければ

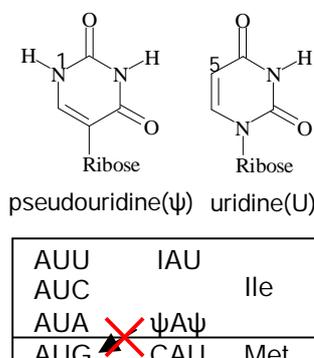


図4. 酵母イソロイシン $tRNA$ に見られる $\psi(34)$

もし、水素結合 1 本だけの, Py3 の C(34)-A(III)が、一番問題になるミスペアであるとする、それを防ぐ効果がアセチル化修飾にあればよい、ということになる。ところが、Py3 の ac⁴C(34)-A(III)対では、水素結合が 2 本描けるのである！(図5) これでは、誤翻訳を防ぐどころか促進してしまう。しかも、C3'-endo 安定化効果もあるのである。

これについては、今のところ、次のように解釈している。ac⁴C のアセチル基のカルボニル酸素は、少なくとも結晶中では 5 位のほうを向いている[24](図5)。このコンフォメーションならば、メチル基の立体障害のために、水素結合はひとつも作れない。溶液中でのカルボニル酸素の向きについては、核酸関連化学の研究を行っている多くの研究室に NMR データが眠っているはずであるが、細かいデータは文献には出てこないで、どれだけの割合が 5 位のほうを向いているのかはわからない。

(4) リシジンと A(III)との対合

コドン AUA に対応する大腸菌 tRNA_{2^{Ile}} の 34 位はリシジン(L)と呼ばれるヌクレオシドである[25]。これと A(III)との対の形としては、Py1 の位置のものと Py2 の位置のものとが考えられていた。仮説1を考慮すれば、Py2 のものと考えべきであろう(図6)。

(5) I(34)-A(III)と C(34)-A(III)との競合

大腸菌などの多くの細菌の CGN コドンは、I(34)を持つ tRNA と C(34)を持つ tRNA とで認識されている[18]。I(34)-A(III)対は Pu2 の位置であり、これは、安定でないことは、十分知られている[2,3,26]。一方、上記の通り、水素結合が 1 本の Py3 の位置の C(34)-A(III)対は、ある程度の安定性を持っている可能性がある。in vivo で CGA コドンがどちらの対によって認識されているのか(あるいは両方なのか、生物種に依存するのか、etc.)は、はっきりしない。

以上、今回の仮説と既存の実験結果との関係を述べてきたが、ここでは十分に延べつことができない。今回の仮説と矛盾しないがそれだけでは説明できない実験結果もいくつかある。また、特に、対合規則が規則であるためには、N(34)-N(III)対に、(すべての組み合わせが許されるという規則でない限り)コドンの認

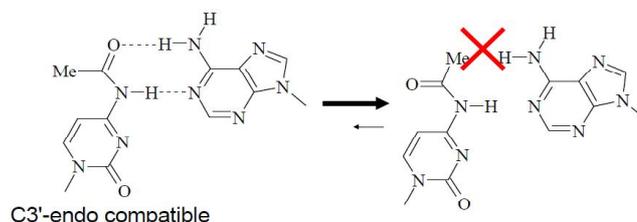


図5. 大腸菌 tRNA^{Met} の ac⁴C(34)修飾による A(III)との対合の制限の可能なメカニズム。

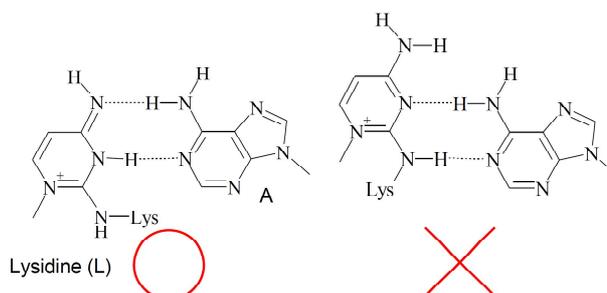


図6. 考えられる L(34)-A(III)対。

識が依存していなければならないし、N(34)/N(III)以外の部分への依存性が十分無視できる必要がある[17]。詳しいことは、最近発表した論文を読んでいただきたい[17]。しかし、いずれにしても、今回の仮説と既存の実験結果が矛盾するわけではないと、筆者は信じている。現在、いくつかの実験を考えて進めているが、今のところ、明らかに仮説と矛盾するデータは出ていない。

文献

- [1] Crick, F. H. C., 1966. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **19**, 548-555.
- [2] Munz, P., Leupold, U., Agris, P., and Kohli, J., 1981. In vivo decoding rules in *Schizosaccharomyces pombe* are at variance with in vitro data. *Nature* **294**, 187-188.
- [3] Curran, J. F., 1995. Decoding with the A:I wobble pair is inefficient. *Nucleic Acids Res.* **23**, 683-688.
- [4] Percudani, R., 2001. Restricted wobble rules for eukaryotic genomes. *Trends. Genet.* **17**, 133-135.
- [5] Murao, K., Saneyoshi, M., Harada, F., and Nishimura, S., 1970. Uridin-5-oxy acetic acid: a new minor constituent from *E. coli* valine transfer RNA I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 657-662.
- [6] Mizuno, H. and Sundaralingam, M., 1978. Stacking of Crick wobble pair and Watson-Crick pair: stability rules of G-U pairs at ends of helical stems in tRNAs and the relation to codon-anticodon wobble interaction. *Nucleic Acids Res.* **5**, 4451-4461.

- [7] Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Miyazawa, T., 1985. Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4905-4909.
- [8] Yokoyama, S. and Nishimura, S., 1995. Modified nucleosides and codon recognition. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, Ed. by Söll, D. and RajBhandary, U., ASM Press, Washington, D. C., USA, pp. 207-223.
- [9] Sakamoto, K., Kawai, G., Niimi, T., Satoh, T., Sekine, M., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Miyazawa, T., and Yokoyama, S., 1993. A modified uridine in the first position of the anticodon of a minor species of arginine tRNA, the *argU* gene product, from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **216**, 369-375.
- [10] Sakamoto, K., Kawai, G., Watanabe, S., Niimi, T., Hayashi, N., Muto, Y., Watanabe, K., Satoh, T., Sekine, M., and Yokoyama, S., 1996. NMR studies of the effects of the 5'-phosphate group on conformational properties of 5-methylaminomethyluridine found in the first position of the anticodon of *Escherichia coli* tRNA₄^{Arg}. *Biochemistry* **35**, 6533-6538.
- [11] Horie, N., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Takai, K., Goldman, E., Miyazawa, T., Nishimura, S., and Yokoyama, S., 1999. Modified nucleoside in the first positions of the anticodons of tRNA₄^{Leu} and tRNA₅^{Leu} from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 207-217.
- [12] Takai, K., Okumura, S., Hosono, K., Yokoyama, S., and Takaku, H., 1999. A single uridine modification at the wobble position of an artificial tRNA enhances wobbling in an *Escherichia coli* cell-free translation system. *FEBS Lett.* **447**, 1-4.
- [13] Hagervall, T. G., Pomerantz, S. C., and McCloskey, J. A., 1998. Reduced misreading of asparagines codons by *Escherichia coli* tRNA^{Lys} with hypermodified derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the wobble position. *J. Mol. Biol.* **284**, 33-42.
- [14] Krüger, M. K., Pedersen, S., Hagervall, T. G., and Sørensen, M. A., 1998. The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **284**, 621-631.
- [15] Sundaram, M., Durant, P. C., and Davis, D. R. (2000) Hypermodified nucleosides in the anticodon of tRNA^{Lys} stabilize a canonical U-turn structure. *Biochemistry* **39**, 12575-12584.
- [16] Takai, K. and Yokoyama, S., 2003. Roles of 5-substituents of tRNA wobble uridines in the recognition of purine-ending codons. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6383-6391.
- [17] Takai, K., 2006. Classification of the possible pairs between the first anticodon and the third codon positions based on a simple model assuming two geometries with which the pairing effectively potentiates the decoding complex. *J. Theor. Biol.*, in press.
- [18] Rozenski, J., Crain, P. F., and McCloskey, J.A., 1999. The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res.* **27**, 196-197.
- [19] Takai, K., Takaku, H., and Yokoyama, S., 1999. *In vitro* codon-reading specificities of unmodified tRNA molecules with different anticodons on the sequence background of *Escherichia coli* tRNA₁^{Ser}. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 662-667.
- [20] Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S., and Watanabe, K., 2001. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.* **20**, 4791-4802.
- [21] Szweykowska-Kulinska, Z., Senger, B., Keith, G., Fasiolo, F., and Grosjean, H., 1994. Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA^{lle}. *EMBO J.* **13**, 4636-4644.
- [22] Stern, L. and Schulman, L. H., 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.
- [23] Kawai, G., Hashizume, T., Yasuda, M., Miyazawa, T., McCloskey, J., and Yokoyama, S., 1992. Conformational rigidity of N⁴-acetyl-2'-O-methylcytidine found in tRNA of extremely thermophilic archaeobacteria (Archaea). *Nucleosides Nuclotides* **11**, 759-771.
- [24] Parthasarathy, R., Ginell, S. L., De, N. C., Chheda, G. B., 1978. Conformation of N⁴-acetylcytidine, a modified nucleoside of tRNA, and stereochemistry of codon-anticodon interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 657-663.
- [25] Muramatsu, T., Yokoyama, S., Horie, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S., and Miyazawa, T., 1988a. A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 9261-9267.
- [26] Murphy IV, F. V., Ramakrishnan, V., Malkiewicz, A., and Agris, P., 2004. Structure of purine-purine wobble base pair in the decoding center of the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1251-1253.