



同义密码子通过精微翻译选择机制实现对基因的表达调控

冯茜莉^{1,2}, 王慧慧^{1,2}, 汪梦竹^{1,2}, 赵泽阳^{1,2}, 周建华^{1,3*}

1 西北民族大学, 生物医学研究中心, 甘肃 兰州 730030

2 西北民族大学, 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730010

3 中国农业科学院, 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046

冯茜莉, 王慧慧, 汪梦竹, 赵泽阳, 周建华. 同义密码子通过精微翻译选择机制实现对基因的表达调控. 微生物学报, 2022, 62(10): 3681–3695.

Feng Xili, Wang Huihui, Wang Mengzhu, Zhao Zeyang, Zhou Jianhua. Regulation of fine-tuning translation selection mediated by synonymous codon usage for gene expression. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3681–3695.

摘要: 自然界中, 同义密码子的存在使得众多氨基酸能够同时被多种密码子编码合成。随着研究的深入, 同义密码子使用偏嗜性发挥出的生物学功能已经渗透到了基因复制、转录、翻译以及化学修饰等生命活动过程中。基于同义密码子使用偏嗜性的生物学特性, 陆续发现密码子对(codon pair)和密码子共现(codon co-occurrence)同样在使用模式上存在明显的偏嗜性。在基因表达的过程中, 针对编码序列的密码子优化能够显著提升基因的表达水平, 这在生物工程领域对于蛋白表达有着重要的生物学意义。此外, 同义密码子使用模式在调控基因转录、化学修饰以及翻译过程中间接控制着细胞内生命活动的有序性。而这些与同义密码子使用模式有着千丝万缕联系的生命过程主要是受精微翻译选择压力来调控运行的。本文中, 我们结合当前同义密码子使用模式介导的精微翻译选择压力, 简述密码子使用模式如何从转录、化学修饰以及翻译等方面来影响基因表达及蛋白产物生物学功能。这将为今后生物工程学领域如何优化蛋白高效表达以及深入研究重要生物学活动中基因表达调控提供可参考的思路与理念。

关键词: 同义密码子; 精微翻译选择压力; 调控; 基因表达; 生物工程

基金项目: 西北民族大学引进人才科研项目(xbmuyjrc202225); 国家自然科学基金(31302100)

Supported by the Introduction of Talent Research Fund of Northwest Minzu University (xbmuyjrc202225) and by the National Natural Science Foundation of China (31302100)

*Corresponding author. E-mail: zhoujianhua@xbmu.edu.cn

Received: 12 February 2022; Revised: 17 April 2022; Published online: 6 June 2022

Regulation of fine-tuning translation selection mediated by synonymous codon usage for gene expression

FENG Xili^{1,2}, WANG Huihui^{1,2}, WANG Mengzhu^{1,2}, ZHAO Zeyang^{1,2}, ZHOU Jianhua^{1,3*}

1 Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 Life Science and Engineering College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730010, Gansu, China

3 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: In nature, most amino acids are encoded by more than one codon which is termed as synonymous codon. Along with the deep investigations, synonymous codon usage bias is considered as one important factor in gene replication, transcription, translation and modification. According to the biological functions of synonymous codon usage bias, the biased usage patterns have been verified in codon pair and codon co-occurrence as well. In gene expression, codon optimization can assist the gene of interest in enhancing its translational efficiency, which benefits the field of biological engineering in terms of protein expression. Moreover, synonymous codon usage pattern indirectly mediates biological processes related to transcription, chemical modification and translation in cells. The performances involved in the important life cycles mentioned above can be carried out by fine-tuning translation selection derived from synonymous codon usage bias. In this review, we tried to clarify how fine-tuning translation selection participated in gene expression and protein function via transcription, chemical modification and translation, and provide some new insights into optimal gene expression and the mechanism underlying the regulation of gene expression.

Keywords: synonymous codon; fine-tuning translation selection; mediation; gene expression; biological engineering

在自然界中,中心法则(DNA 转录成 mRNA, mRNA 翻译成蛋白质)在生物体中的稳定运转是维持生命活动的众多基石之一。基因从转录水平转变为翻译水平的过程中,核糖体复合物与 tRNA 分子群在其中扮演着穿针引线的角色。tRNA 携带正确的氨基酸连接到新生肽链的过程中,核苷酸三联体组成的密码子与 tRNA 结构中反密码子精准识别并特异性结合发挥着关键作用^[1]。核糖体复合物为 tRNA 和 mRNA 序列中密码子上演的“精彩剧目”提供了一个大舞台。而遗传密码子的“简并性”(同义密码子)为生物体从众多 mRNA 序列中准确翻译合成目标蛋白提供了广阔的发挥空间。这是因为同义突

变不影响被编码氨基酸的同一性,所以起初认为同义突变对蛋白质的功能和生物体的适应性是没有影响的。然而,对比序列分析显示,在不同生物的基因中,同义密码子在基因序列中的使用并非随机和均一,而是具有很强的遗传偏嗜性。每一种生命体(尤其是繁殖速率极快的微生物)似乎更喜欢将基因中同义密码子使用的偏嗜性作为其长期遗传演化过程中的“成绩单”^[2-7]。

随着对同义密码子使用偏嗜性产生的精微调控翻译选择压力(fine-tuning translation selection)的生物学效应的深入研究,发现这种精微调控翻译选择压力通过在基因编码序列的翻译起

始区限制核糖体移动速率来确保基因的顺利表达^[8]。笔者在分析病毒基因高效翻译表达中,发现翻译起始区的密码子使用模式也是倾向于选择非优势密码子(甚至是稀有密码子)来确保病毒基因的高效表达^[9-10]。此外,精微调控翻译选择压力还体现在基因依赖同义密码子使用模式与特定氨基酸对应 tRNA 的丰度差异来精准调节核糖体的移动速率,从而实现了对基因整体上表达的把控,学者称之为密码子共现(codon co-occurrence,意指特定同义密码子在特定基因区域内高频出现)现象^[11]。除了上述密码子与核糖体以及 tRNA 互作、识别和结合方面的研究成果外,精微调控翻译选择压力的身影也存在于同义密码子使用模式衍生出来的密码子对(codon pair,意指存在于基因中特定密码子二联体)、密码子比邻核苷酸使用模式(即特定密码子与其第一位核苷酸的上游紧邻核苷酸联合体)对 mRNA 二级结构和序列中化学修饰位点活性的影响等方面^[12-14]。本文中,我们将围绕同义密码子使用模式所形成的精微调控翻译选择压力的生物学和遗传学效应,阐述同义密码子使用偏嗜性在基因复制、转录、翻译以及化学修饰等方面的机理,为今后生物工程领域外源基因表达、细胞生物学领域中基因调控以及遗传学领域中基因遗传进化多样性提供可参考的信息。

1 密码子使用偏嗜性是生物遗传进化的结果

随着基因组测序技术的突飞猛进,生物学遗传进化分类已经从生物表型的分类进入到了分子遗传学分类的新领域^[15]。由于核苷酸分布的多样性导致基因在复制、转录、转录后修饰以及翻译等关键生命活动中存在差异,最终

使得生物体有其特定的生物表型。其中,同义密码子使用偏嗜性是导致基因在复制、转录、转录后修饰和翻译发生改变的重要因素之一^[16-17]。笔者在研究不同病毒及细菌遗传进化中发现,同义密码子使用模式所展示出来特定对象的遗传进化特征呈现出种属特异性,并且同义密码子使用模式的可塑性主要受到来自基因组自身核苷酸成分限制性突变压力(nucleotide composition constraint)和自然选择压力(natural selection)的影响^[18-25]。近期,研究人员在对比抗辐射细菌与对辐射敏感细菌的同义密码子使用模式过程中发现,抗辐射细菌基因组在核苷酸成分选择上更倾向于利用鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)作为构架其基因组的基石,并且与翻译压力(隶属于自然选择压力家族成员)紧密相关的 tRNA 丰度和密码子使用模式呈现共进化(co-evolution)的现象^[2]。这一发现对于上述 2 种压力推动微生物在同义密码子使用模式不断进化增添了更为有力的证据。放眼整个生物界,同义密码子使用偏嗜性始终贯穿物种遗传进化的过程,并且其使用偏嗜性在很大程度上体现了细胞内 tRNA 的丰度以及基因组核苷酸类型使用频率的遗传学特征^[26-27]。既然基因组核苷酸序列的自发突变与自然选择压力“携手”构筑了具有物种特异性同义密码子使用模式,那么作为遗传进化的原动力的双方是如何做到这一切的呢?笔者认为基因组核苷酸成分限制压力在生物体基因组复制过程中不断施加突变压力,这一定程度上推动基因组中不同基因的同义密码子使用模式持续形成新的遗传模式。并且这些同义密码子使用模式的“新变体”可以在转录、转录后修饰以及翻译水平上产生“变体”。这些“变体”的生物学效应涵盖了生物学表型、蛋白表达水平、蛋白产物的生物活性(升高、降低或失活)等方面,令宿主生物(尤其是繁殖速率

极快的微生物)面对自然选择压力的遴选。在经历“物竞天择”的自然法则后，最终被淘汰或者遗传保留。在人类基因组的转录与翻译过程中，密码子使用模式与基因中外显子剪切是密切相关的，这直接关系到 mRNA 在细胞内的转录水平；与 GC 含量高的密码子使用模式相比，RNA 剪切更能够促进 AT 含量高的密码子使用模式基因在 mRNA 产量、蛋白质稳定性以及 mRNA 在细胞内定位的活性^[28]。这一研究结果反映出，人类基因组遗传压力已经“渗透”到了基因密码子使用模式参与基因功能活动的“各个角落”。那么同义密码子使用模式的改变是如何对生物

体进化施加特定的生物遗传学效应呢？笔者认为同义密码子使用模式所产生的生物遗传学效应可概括为精微翻译调控选择压力。简单地说就是：生物体为了在其自身进化过程中降低能量以及营养物质代谢的成本，会最大程度上优化不同功能基因在转录和翻译中的高效运行；而基因复制过程中关键区域同义密码子使用模式的改变会影响转录以及翻译过程中的各个环节，最后产生的蛋白产物在自然选择压力的筛选中依据适应性强弱而遗传保留或者淘汰(图 1)。Mordstein 等分析了 1 520 种对脊椎动物具有侵袭性的病毒基因组中的密码子使用模式后指

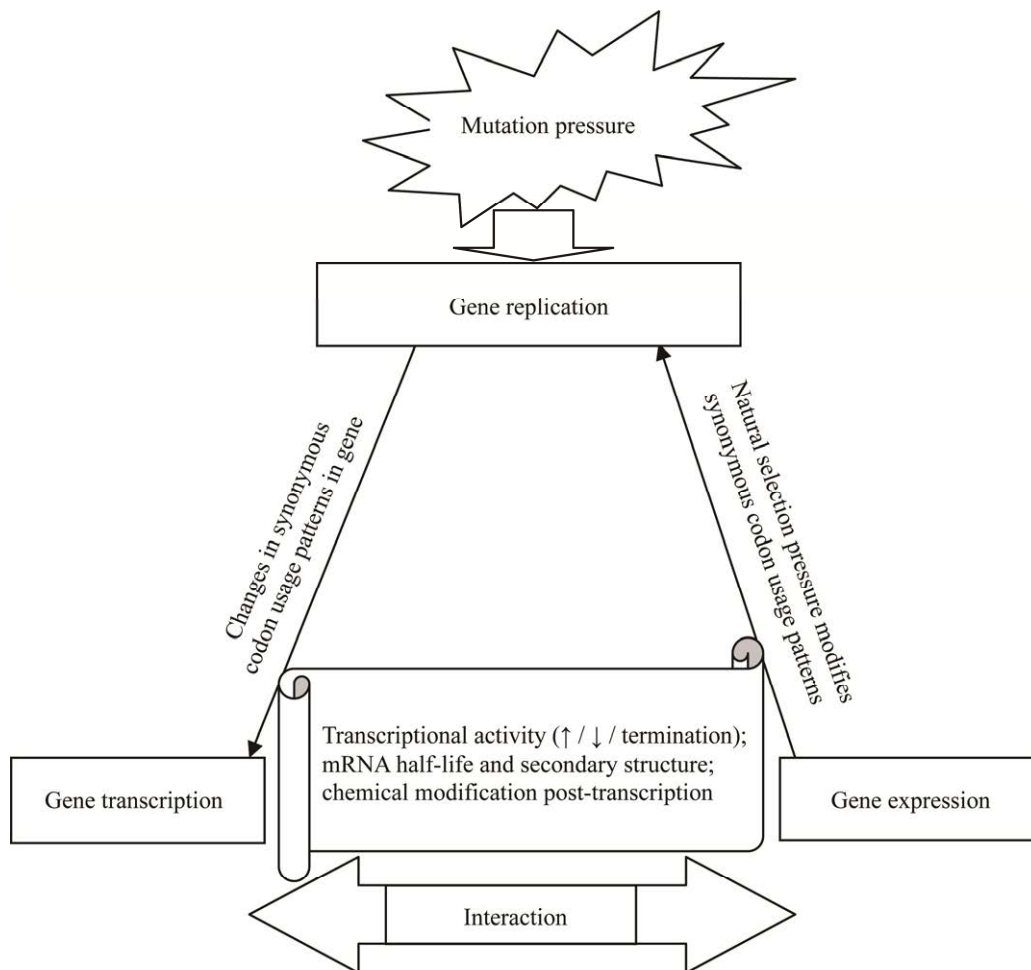


图 1 同义密码子使用模式在中心法则中的作用

Figure 1 The role of synonymous codon usage pattern of gene in the central dogma.

出, 自然选择与突变压力在推动病毒进化的过程中是以病毒基因转录、转录物输出以及逃逸宿主免疫的效率为中心^[29]。由此可见, 如何产生更能适应自然选择压力“拷问”的蛋白产物是同义密码子使用模式介导生物体(尤其是微生物)适应宿主和周围环境的终极目标。众所周知, 翻译环节中核糖体对 mRNA 的高效识别以及多肽链合成的准确性是天然蛋白产生的关键因素^[30]。笔者在分析口蹄疫病毒蛋白翻译效率的过程中发现, 关键基因区同义密码子使用偏嗜性与宿主 tRNA 丰度有着较强的相关性^[10]。随着研究范围的扩展, 研究人员在很多生物体中均发现了同义密码子使用偏嗜性与 tRNA 丰度之间关系的蛛丝马迹^[31-33]。笔者将在后续章节中具体阐述同义密码子使用偏嗜性产生精微调控翻译选择压力在影响优质蛋白产生过程中所扮演的角色。

2 同义密码子使用偏嗜性与基因表达相关性强

无论功能性编码基因通过核苷酸序列突变获得怎样的遗传信息, 基因表达产生具有正确生物功能的蛋白质均需经受自然选择的洗礼。同义密码子使用模式发生改变导致基因表达效率的改变是最直接的证据。其中涉及到核糖体识别目标 mRNA, 并且对序列进行扫描而引导氨酰 tRNA (aminoacyl-tRNA) 进入核糖体 A 位点, 以此实现新生多肽链在 E 位点的延伸。对于基因表达翻译效率的高低, 笔者认为核糖体扫描 mRNA 过程中 A 位点暴露出来的核苷酸三联体(同义密码子)能否在胞质中甄选出相对应的氨酰 tRNA 发挥重要作用。这样就出现了一个生物工程领域关心的问题, 即外源基因具有自身属性的同义密码子使用模式能否适应工程菌/细胞具

有的 tRNA 丰度, 从而实现外源基因的高效表达。

研究人员在利用工程菌或者细胞系对病毒基因实现高效表达的主要策略之一就是优化病毒基因的同义密码子使用模式, 目的是令外源基因在宿主体内能够适应 tRNA 的丰度以及模拟宿主细胞同义密码子的使用特征^[34-36]。虽然在生物工程以及基因工程领域追求外源基因的高效表达是研究人员的目的之一, 但是一些病毒(例如甲型肝炎病毒)同义密码子使用模式会尽量避开宿主的密码子使用模式^[37-39]。当 Sabin 2 型脊髓灰质炎病毒衣壳蛋白的非优势密码子被替换成为优势密码子后, 与野生型病毒相比较, 改造后的病毒形成噬斑的能力下降了 10 倍, 并且病毒滴度降低了 65 倍^[40]。这种避免与宿主细胞争抢资源的遗传策略同样给相关领域研究人员一些新启发, 即对于宿主细胞同义密码子使用模式, 病毒基因选取使用频率偏低的同义密码子有利于病毒蛋白在缓慢翻译速率下合成出具有正常功能活性的病毒蛋白。SARS-CoV-2 纤突蛋白编码基因中存在稀有密码子 CGG, 当 CGG 被同义密码子 CCU 替换后, 虽然纤突蛋白产量显著提升, 但所产生的病毒颗粒的量以及感染力方面都明显降低^[41]。笔者在分析几种病毒基因组翻译起始区或者基因内部关键区域的同义密码子使用偏嗜性后发现, 稀有密码子倾向于出现在翻译起始区以及一些关键编码序列中^[23,42-43]。不仅病毒基因中的非优势密码子在病毒产物合成过程中发挥重要的调控作用, 细菌基因组中非优势密码子也有类似的调控作用。在大肠杆菌 K-12 菌株的限制-修饰系统(restriction-modification, R-M)中, 将限制性核酸内切酶和 DNA 甲基转移酶基因中精氨酸对应的 AGA 和 AGG (在 K-12 菌株中为稀有密码子)进行同义密码子优化, 结果导致 R-M 系统介导的 K-12 菌株宿主适应性明显下降^[44]。不仅

如此, 占人类基因组 8% 份额的内源性逆转录病毒基因序列已经成为人类基因组中重要的遗传组分, 并且与人类炎症和肿瘤的发生发展息息相关。研究人员将人内源性逆转录病毒基因组中的 *HSPA5* 和 *sXBPI* 基因进行密码子优化, 发现所表达的糖基化蛋白产物的生物学功能明显下降^[45]。这些结果也在一定程度上说明基因翻译的准确性和高效性共同决定基因同义密码子使用模式的特征(尤其是稀有密码子的使用偏嗜性)。随着蛋白质组学(proteomics)及核糖体密度图谱(ribosome occupancy profiling)技术的应用, 曾经被人们“嫌弃”的稀有密码子已经被证实在调控基因翻译效率以及新生多肽合成准确性方面发挥着“中流砥柱”的作用^[46-48]。根据同义密码子使用模式变化不引发氨基酸组分改变但可以调控基因表达水平的特点, 笔者将同义密码子使用模式在基因翻译表达过程中所发挥的生物学遗传效应统称为精微调控翻译选择压力。在下面的章节中, 笔者将围绕同义密码子使用模式与 tRNA 之间的共进化(co-evolution)来阐述同义密码子(尤其是稀有密码子)与 tRNA 之间的互作是如何对基因表达和蛋白质生物学功能产生影响的。

3 同义密码子使用偏嗜性与胞内 tRNA 丰度相关

基于同义密码子使用偏嗜性普遍存在于生物体的特性, 它如何在基因表达中发挥精微调控选择压力来影响蛋白质翻译就成了研究焦点。在分析了不同生物体(尤其是单细胞模式生物)后, 研究人员发现同义密码子使用偏嗜性与生物体细胞中 tRNA 丰度相关^[49-51]。在研究同义密码子使用模式的改变对宿主细胞以及病毒复制的影响过程中, 大肠杆菌 Syn61 菌株在敲除 TCA 或 TCG 同义密码子特异结合的 tRNA^{Ser}_{CGA}

和 tRNA^{Ser}_{UGA} 后, lambda、Plvir、T4、T6 和 T7 噬菌体均无法正常产生子代病毒粒子^[52]。读码框移码的发生频率直接关系着 HIV 病毒粒子的结构以及侵染性, 而 tRNA 又与读码框移码事件有着千丝万缕的联系。近期一项关于 HIV-1 Gag/Gag-Pol 编码框移码的研究成果表明, 虽然 tRNA^{UUA}_{Leu} 在人源 T 淋巴细胞(HIV-1 的靶细胞)中的丰度极低, 但是这种 tRNA 在识别 HIV 基因中 Gag/Gag-Pol 读码框发生移码事件的过程中通过控制核糖体移动停滞的程度来发挥重要的精微调控作用^[53]。这里需要注意的是, 在高等生物中, 同义密码子使用模式与 tRNA 丰度的相关性不如单细胞生物体的强。这可能与多细胞生物在细胞分化、转录调控以及翻译调控的复杂性有很大关系。对于具有庞大基因组的生物来说, tRNA 基因的冗长性、密码子与 tRNA 中反密码子结合的摆动性以及酰胺-tRNA 含量随细胞生命周期的变化而改变三者之间有很大的关系。另外, 细菌在氨基酸匮乏的培养环境中, 特异性识别同义密码子的 tRNA 的极性(由电荷引起的极化现象)会减弱, 从而影响 tRNA 与同义密码子的识别互作^[54]。

事实上, 在对比细胞内现有 tRNA 表达种类与同义密码子对应关系的过程中, 发现生物体并没有与同义密码子完整配套的 tRNA 谱, 例如在大肠杆菌中存在 39 种具有不同反密码子的 tRNA, 古菌硫磺矿硫化叶菌(*archaeon Sulfolobus solfataricus*)中有 35 个, 而人类只有 45 个^[55]。这说明单个 tRNA 要依赖其“摆动性”来肩负识别结合多个同义密码子的任务, 即反密码子环第一、二位碱基按照 Watson-Crick 碱基配对原则(A-U 以及 C-G), 而第三位碱基(对应于反密码子的 5'位, 即 tRNA 的 34 位)允许通过摆动效应实现如 G-U 配对的事件发生。由于同义密码

子通过摆动碱基配对与 tRNA 识别的亲合力相对经典碱基配对的亲合力较弱, 诸如 G-U 碱基配对的摆动事件在很大程度上受到 Watson-Crick 碱基配对法则的限制。这给深入分析同义密码子与 tRNA 特异性识别导致核糖体对 mRNA 序列解码并扫描的效率研究带来了不小的阻碍。从另一个角度说明, 基因中同义密码子使用模式的形成受到了 tRNA 摆动性的影响。研究人员在研究酵母体内 70 多种 tRNA 修饰酶对 tRNA 在蛋白合成的作用中发现, tRNA 修饰酶 Elp1、Elp3、Sml3 以及 Trm9 对于 tRNA 反密码子中的 34 位尿嘧啶(U34)的修饰活性非常重要, 而 U34 的修饰能够影响 tRNA 介导蛋白合成并形成正确的空间构象^[56]。不仅仅是酵母菌, 若秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)一些 tRNA 反密码子 U34 修饰活性引发的核糖体扫描停滞几率明显升高, 则内源蛋白会无序堆积, 最终导致 *C. elegans* 体内发生蛋白质毒性压力的产生^[57]。进一步把对 tRNA 反密码子 U34 修饰的蛋白酶敲除后发现, 基因中的密码子使用模式对于蛋白质合成是需要 tRNA 反密码子 U34 通过修饰产生的 tRNA 摆动性共同作用来实现的^[58]。在这里需要补充一种普遍存在于真核生物及部分原核生物中十分重要的 tRNA 化学修饰现象, 即在 tRNA 反密码子摇摆位(I34)上, 腺嘌呤核苷能够在腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADAT)的化学修饰下转变为次黄嘌呤, 而次黄嘌呤通过非 Watson-Crick 碱基配对法则能够与腺嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶互补配对。那么, I34 位点的化学修饰在引发 tRNA 丰度变化的同时如何影响同义密码子使用模式所介导的基因表达呢? 研究人员通过沉默 *adat2* 基因在粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中表达 ADAT 后发现, 与依赖 ADAT 化学修饰相关的 tRNA 丰度发生了明显改变, 进而减弱了核糖体在与 ADAT 相关

密码子(ADAT-related codon)位点的翻译延伸速率^[30]。这也进一步说明, ADAT 在同义密码子使用偏嗜性介导的基因表达中扮演着重要角色。考虑到 tRNA 在表达量、电荷水平以及识别同义密码子的“摆动性”会根据细胞生理状态而产生较大波动^[59-60], 这些生物学现象进一步为同义密码子使用偏嗜性所产生的精微调控翻译选择压力在发挥其调控基因表达方面提供了更广阔的天地(图 2)。

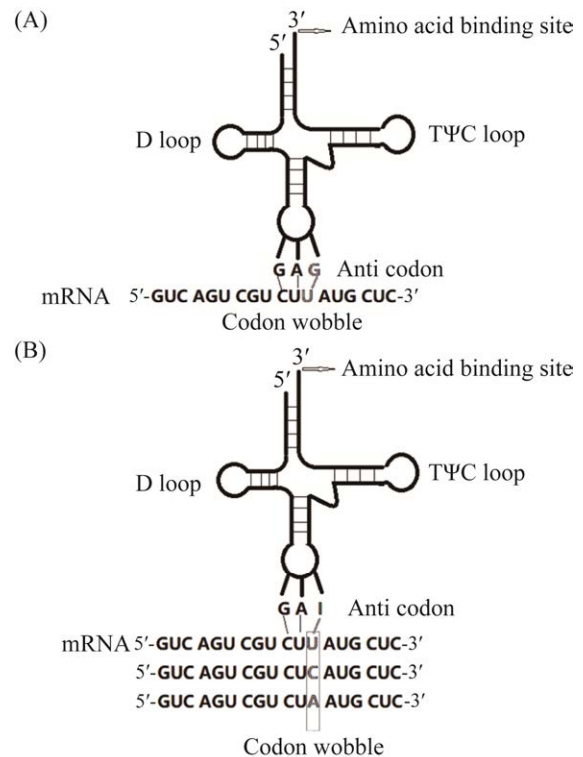


图 2 tRNA 通过摆动性与同义密码子结合来合成特定的氨基酸

Figure 2 tRNA with a wobbling codon-anticodon base pair recognizes synonymous codon for the specific amino acid. A: the G-U pairing is performed by tRNA in which the third base site recognizes the specific base via non-standard Watson-Crick base-pairing rule; B: due to modification of adenosine to inosine at the tRNA anticodon wobble position (I34), the specific tRNA expands the binding spectrum of different codons.

4 同义密码子使用模式衍生出密码子共现和密码子对偏嗜性

当核糖体对 mRNA 扫描并解码其密码子链所携带的遗传信息时，核糖体周围会大量聚集 tRNA。俗话说“近水楼台先得月”，那么核糖体周围较高浓度的特定类型 tRNA 会不会很快就又投入到核糖体对下游密码子链的解码工作中呢？显然，核糖体利用刚从其 E 位点解离出来的 tRNA 再次酰胺化，而后通过与其对应的同义密码子配对进入 A 位点，再次参与到新生肽链的合成。这样的运行模式符合生物体节约物质代谢和能量代谢的自然法则。令人欣慰的是，同义密码子使用模式似乎与 tRNA 在核糖体周围浓度高这一现象“心心相印”，密码子共现偏嗜 (codon co-occurrence bias) 与密码子对偏嗜 (codon pair bias) 就是同义密码子使用模式对 tRNA 聚集于扫描解码状态下的核糖体周围的有力回应 (图 3)。从图 3 中不难看出，在提高基因表达效率以及降低细胞基因表达过程中，密码子共现和密码子对偏嗜性在能量及物质代谢方面所表现出来的优势。

随着基因组测序技术的不断升级，被深度测序的生物体基因组越来越多。一张张基因组精细图谱展现在研究人员面前。这使得我们可以从宏观角度来探究同义密码子使用模式为基因组中的基因群落带来的遗传学效应。基于同义密码子在基因组层面上的总体偏嗜性，进一步发现它们在基因上的排列次序在某种程度上具有偏嗜性。例如，酿酒酵母基因组中同义密码子使用偏嗜性不仅体现在单个同义密码子水平，而且同义密码子使用偏嗜性具有成簇的特征，这就是最早密码子共现的线索。密码子共现最大的优点就是能够迅速调集刚从核糖体 E 位点脱离的 tRNA 进行酰胺化，继续进入 A 位点参与多肽链的合成^[11]。线粒体在细胞中所展现的生物学及遗传学特征均是独特的，而密码子共现所主导的同义密码子突变是不同人种进化的一种体现^[61]。这也说明密码子共现偏嗜性是受到自然选择压力而形成的。在研究玉米基因组同义密码子使用偏嗜性对基因组结构的影响中发现，自然选择压力迫使玉米基因组在自然突变过程中维持密码子共现偏嗜性^[62]。需要注意一点，密码子共现这一特殊遗传学现象

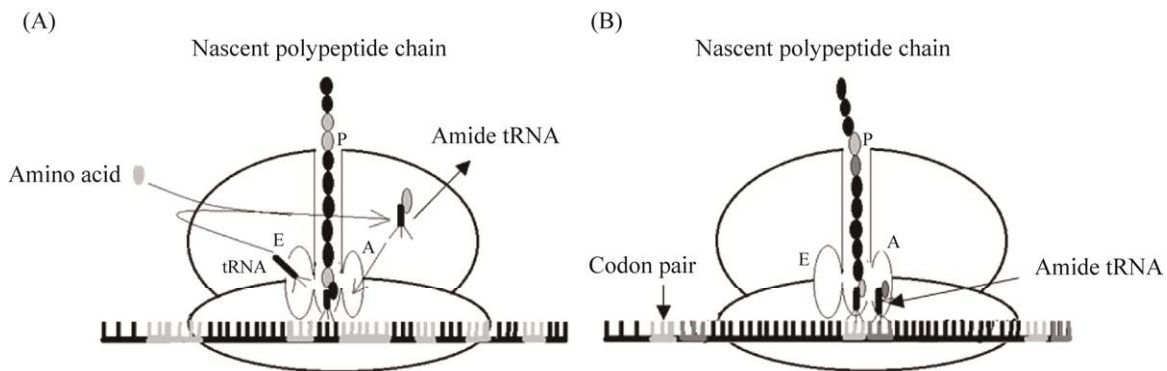


图 3 由密码子共现及密码子对偏嗜性介导的基因翻译模型

Figure 3 The translational model driven by codon co-occurrence bias and codon pair bias. A: codon co-occurrence bias increases gene expression, presumably due to tRNA recharging in the vicinity of the scanning ribosome; B: codon pair bias is probably selected because of more optimal interactions of tRNAs in the A site and the P site.

并不是优势同义密码子的专属物,稀有密码子导致的密码子共现在参与细胞应激或信号调控功能的高表达基因中也是常见的。这一现象可能与结构相似度高、亲和力强的 tRNA 共同识别具有密码子共现特征的序列相关,从而有效利用解码过程中游离在核糖体周围的酰胺 tRNA 参与基因翻译,最终实现降低基因表达所需要的代谢能量以及提高翻译效率。除了密码子共现对基因表达影响显著,同义密码子在排序上的非随机性也导致密码子对的偏嗜性。人们很自然地会认为,处于使用优势地位的同义密码子一定会以较高几率形成其“领衔”的密码子对,然而事实并非如此。以人体同义密码子使用为例,虽然 GC 核苷酸含量占主导地位,但是在 GCC 使用偏嗜性强的背景下,GCC-GAA 密码子对实际使用频率仍旧远远低于理论预测水平^[63]。然而密码子对并不是高等动物的“独享进化硕果”,不同细菌、古菌以及真核生物体基因组在密码子对的选择上也表现出种种偏嗜性,并且可以以一定的使用模式存在于生物体基因组中(表 1)^[64]。

在研究酿酒酵母基因组中密码子对使用偏嗜性与编码基因表达效率的过程中,发现菌体在数百万年前已经开始利用 tRNA 识别的摆动性原则(I-A 或者 U-A)并借助调控密码子对使用偏嗜性来对多肽链合成速率进行调控^[65]。这些密码子对使用模式的核苷酸组合特征可能是生物体转录和翻译机制对于同义密码子使用相关的精微调控翻译选择压力的一种遗传学反馈,

目的是实现蛋白质合成过程的高效性和精准性。可能的原因之一是由于密码子对在核糖体中同时占据着 E、P、A 3 个位点中的 2 个位点,这将大大增强酰胺 tRNA 在与编码序列互作过程中的调节力,以此实现对蛋白质合成过程的调控。利用密码子对调节基因表达效率和精确度这一遗传学特性,针对病毒基因组中优势密码子对进行基因改造后,病毒由于基因组中密码子对使用偏嗜性的降低而使其毒力减弱^[14]。Jordan-Paiz 等对 HIV-1 的 *env* 基因密码子对进行优化或者去优化时发现,*env* 基因密码子对去优化并未对病毒造成明显的弱化,而密码子对优化后可显著降低病毒在 MT-4 细胞中的复制活力^[66]。呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)在按照人体密码子对使用情况进行优化后,其在啮齿类动物体内的复制能力减弱,并且这种改造病毒在仓鼠体内诱导中和抗体的水平很低^[67]。当针对寨卡病毒的 E 基因和 NS1 基因的密码子对去优化后,该病毒对于哺乳动物细胞系(例如 Vero 细胞系)的适应性明显弱于对昆虫细胞系的适应性,并且密码子对去优化的寨卡病毒对小鼠的致病性明显降低^[68]。针对马立克氏病病毒的 UL54/ICP27 和 UL49/VP22 蛋白编码序列进行密码子对的去优化,能够导致改造病毒在淋巴细胞中产生子代病毒的能力显著降低^[69]。此外,在利用密码子对去优化研制基因工程弱毒苗方面,针对 HA 和 NA 基因密码子对去优化的改造毒株在 MDBK 细胞中表达 HA 和 NA 蛋白的量降低了,但是其具有的

表 1 不同生物基因组中使用的低频和高频密码子对

Table 1 Low frequency and high frequency codon pair used in genomes of different species

Codon pair usage in low frequencies	Codon pair usage in high frequencies
nnGGnn, nnGnnC, nnCGCn, GUCCnn, CUCCnn, nnCnnA, UUCGnn	nnGCnn, nnCAnn, nnUnCn

N: any nucleotide; A, C, U, G: stand for adenine, cytosine, uracil and guanine, respectively.

TCID₅₀ 的数值与常规弱毒苗十分相似, 此外, 这种改造病毒能够在不引起雪貂出现临床症状的前提下在上下呼吸道进行有效增殖^[70]。这说明无论外源基因还是内源基因, 密码子对使用偏嗜性产生的精微调控选择压力在调控蛋白翻译的过程中没有种属特异性的限制, 而是具有普遍性且能够在较大范围的研究领域内推广使用。

5 基因内部的密码子使用偏嗜簇调节翻译延伸速率

除了上述基因层面的密码子偏嗜性影响基因表达, 同义密码子使用偏嗜性在基因局部形成簇状聚集也能产生精微调控翻译选择压力。当核糖体在 mRNA 翻译扫描过程中出现扫描停滞时, 解码核糖体就会终止翻译并解离为大小亚基。在链孢霉(*Neurospora*)和果蝇细胞中, 翻译终止因子 eRF1 可以特异性识别由于稀有密码子导致扫描停滞的核糖体, 从而终止蛋白翻译的进程^[47]。因此, 需要防止核糖体在解码过程中由于核糖体在 mRNA 上过于“拥堵”而引发扫描骤停。这就需要 mRNA 在其内部或者某个特定区域设置“减速带”使解码核糖体在 mRNA 上有序排列, 避免拥堵现象出现。而这种“簇状”密码子使用偏嗜性常见于稀有密码子在特定基因区域高频使用, 由此减缓解码核糖体扫描 mRNA 的即时速率, 调节核糖体“串”在 mRNA 上的分布密度^[48,71]。常见的稀有密码子簇存在于基因翻译起始区, 从源头就防止解码核糖体在 mRNA 上的拥堵。除此之外, 基因还会在其内部设立“减速带”, 以确保精准的蛋白空间构象。例如, 跨膜蛋白与分泌蛋白的基因中存在明显的稀有密码子簇。酵母菌基因组中, 信号识别粒子(binding site for the signal recognition

particle, SRP)结合位点下游 35–40 个密码子的位置高频出现稀有密码子簇, 而 35–40 个密码子的长度大约等于核糖体 P 位点输出新生多肽孔道的长度, 这一特征有利于 SRP 针对分泌信号序列或者跨膜蛋白结构域的识别^[72]。SRP 与新生多肽链结合的过程有一定的时间差, 而稀有密码子簇通过精微调控翻译选择压力降低核糖体扫描翻译的速率, 这有助于 SRP 对新生多肽中目标靶位的识别和结合。Chen 等利用高通量 mRNA 定量等技术对酵母菌同义密码子突变与内/外源基因转录水平之间的内在联系进行了详细的描述^[73]。此项研究涉及到 3 556 种同义密码子突变的绿色荧光报告基因(green fluorescent protein, GFP) (外源基因)和 523 种同义密码子突变的 TDH3 基因(内源基因), 除了明确内/外源基因特定区段同义密码子使用模式的改变能够影响目标基因转录水平的变化, 还发现 GFP 不同区段[第 41–52 位密码子(蛋白 N 端)和第 156–167 位密码子(蛋白 C 端)]的同义密码子发生同义替换均会影响 GFP 基因的 mRNA 水平; 利用同义密码子 TTA 和 TTG (编码亮氨酸)在 GFP 特定位点的单独同义突变后分析发现, 只有影响 mRNA 二级结构的特定位点发生同义突变会显著影响 mRNA 的二级结构, 而那些在 mRNA 局部二级结构中不产生作用的同义密码子位点对同义突变具有“忍耐力”。值得注意的是, 这些在 GFP 基因的研究结果与内源基因 TDH3 的研究结果具有很高的相似度。另一项研究密码子使用模式通过影响 mRNA 二级结构来调控基因表达的研究报告指出, 编码基因的密码子使用模式能够通过促使 mRNA 形成特定二级结构来改变 mRNA 的半衰期, 以达到细胞对蛋白翻译水平的调控^[74]。这些实验证据最直接地反映出, 同义密码子使用模式对 mRNA 半

衰期的影响主要体现在 mRNA 二级结构的关键区域。

除了真核生物外, 原核生物的核糖体在扫描翻译跨膜蛋白编码基因的过程中也会出现类似特征的稀有密码子簇来调控跨膜蛋白的正确合成。这进一步说明, 同义密码子使用模式所发挥的精微调控翻译选择压力是在核糖体及酰胺 tRNA 共同作用下实现的。酰胺 tRNA 在识别特定同义密码子的过程中, tRNA 修饰酶 Elp1、Elp3、Sml3 和 Trm9 共同影响反密码子 U34 位点的鸟嘌呤的活性, 进而实现 tRNA 介导目的蛋白合成过程中的正确折叠^[56]。稀有密码子所发挥的精微调控翻译选择压力不仅仅在蛋白结合活性区发挥作用, 而且还能精准到蛋白质二级结构的形成过程中。笔者在分析一些病毒蛋白不同二级结构与同义密码子使用之间的潜在关系时发现, 一些稀有密码子倾向于出现在诸如 α -螺旋或者 β -折叠对应的编码序列中, 而无规卷曲的形成与前两者对应的同义密码子使用模式有明显的差异^[75-76]。相对于优势密码子簇在形成 β -折叠的过程中所占的主导地位, 同义密码子使用模式在形成 α -螺旋的过程较复杂, 即 α -螺旋两端倾向于选用稀有密码子, 而中部是优势密码子聚集的区域^[72]。这进一步表明, 一味追求基因密码子优化会很大程度降低蛋白结构形成上的精确性, 稀有密码子与优势密码子的“配合”排布更能尽显精微调控翻译选择压力在蛋白翻译中的效率和精确性。

6 展望

同义密码子使用模式在生命过程中的复杂性主要体现在不同同义密码子在使用频率上构成了一个类似“神经网络”的系统, 所发挥出来的精微调控翻译选择压力构成了这个网络的“主干经络”。在不同生物体中, 同义密码子使

用模式介导的精微调控翻译选择压力已经渗透到了基因复制、转录、翻译及化学修饰等方面。除了人们熟知的稀有密码子所发挥的调控作用以外, 密码子对和密码子共现等密码子联用效应亦能参与到 RNA 剪切、mRNA 半衰期、mRNA 二级结构形成、tRNA 摆动以及蛋白质翻译和翻译后修饰等生命过程中。在生物工程领域, 人们已经不再单纯通过密码子优化来提升目标蛋白的产量了, 而是越来越关注所表达的蛋白产物的天然活性与表达量之间的平衡。笔者建议今后在利用诸如一些工程菌/细胞株(例如大肠杆菌、酵母菌以及各种真核细胞系)来表达目的基因的过程中, 应该切实结合宿主菌/细胞 tRNA 谱以及靶基因形成 mRNA 的半衰期以及二级结构等生物学特征, 为有效获得目的蛋白产物提供良好的“环境”。此外, 为了进一步将密码子使用模式的精微调控翻译选择压力运用到生物工程的表达领域中, 研究人员还应该深入探寻 tRNA 在不同修饰酶的化学修饰后对特定密码子使用模式的生物学效应, 并且深入了解由密码子使用模式介导 mRNA 二级结构形成对蛋白质翻译后修饰等生物学效应。

参考文献

- [1] 金志忠. 密码子与反密码子的本质与拓展. 生物学通报, 2020, 55(11): 13-16.
Jin ZZ. The essence and extension of codon and anticodon. *Bulletin of Biology*, 2020, 55(11): 13-16. (in Chinese)
- [2] Dilucca M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, Giansanti A. Codon usage bias in radioresistant bacteria. *Gene*, 2020, 742: 144554.
- [3] Liu Y. A code within the genetic code: codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 2020, 18(1): 145.
- [4] Liu HB, Lu YZ, Lan BL, Xu JC. Codon usage by chloroplast gene is bias in *Hemiptelea davidii*. *Journal of Genetics*, 2020, 99: 8.
- [5] Wang X, Xu WH, Fan KW, Chiu HC, Huang CQ.

- codon usage bias in the H gene of canine distemper virus. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104511.
- [6] Luo W, Tian L, Gan YD, Chen EL, Shen XJ, Pan JB, Irwin DM, Chen RA, Shen YY. The fit of codon usage of human-isolated avian influenza A viruses to human. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 81: 104181.
- [7] LaBella AL, Opulente DA, Steenwyk JL, Hittinger CT, Rokas A. Variation and selection on codon usage bias across an entire subphylum. *PLoS Genetics*, 2019, 15(7): e1008304.
- [8] 任桂萍, 董璿莹, 党云琨. 密码子中的密码: 密码子偏好性与基因表达的精细调控. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(7): 839–847.
Ren GP, Dong YY, Dang YK. Codon codes: codon usage bias influences many levels of gene expression. *Scientia Sinica: Vitae*, 2019, 49(7): 839–847. (in Chinese)
- [9] Zhou JH, Zhang J, Ding YZ, Chen HT, Ma LN, Liu YS. Characteristics of codon usage bias in two regions downstream of the initiation codons of foot-and-mouth disease virus. *Biosystems*, 2010, 101(1): 20–28.
- [10] Zhou JH, Zhang J, Sun DJ, Ma Q, Ma B, Pejsak Z, Chen HT, Ma LN, Ding YZ, Liu YS. Potential roles of synonymous codon usage and tRNA concentration in hosts on the two initiation regions of foot-and-mouth disease virus RNA. *Virus Research*, 2013, 176(1/2): 298–302.
- [11] Cannarozzi G, Schraudolph NN, Faty M, Von Rohr P, Friberg MT, Roth AC, Gonnet P, Gonnet G, Barral Y. A role for codon order in translation dynamics. *Cell*, 2010, 141(2): 355–367.
- [12] Wu YQ, Jin L, Li YC, Zhang DR, Zhao YQ, Chu YF, Ma ZR, Ma XX, Shang YJ. The nucleotide usages significantly impact synonymous codon usage in *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(2): 133–146.
- [13] Alexaki A, Kames J, Holcomb DD, Athey J, Santana-Quintero LV, Lam PVN, Hamasaki-Katagiri N, Osipova E, Simonyan V, Bar H, Komar AA, Kimchi-Sarfaty C. Codon and codon-pair usage tables (CoCoPUTs): facilitating genetic variation analyses and recombinant gene design. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(13): 2434–2441.
- [14] Groenke N, Trimpert J, Merz S, Conradie AM, Wyler E, Zhang HW, Hazapis OG, Rausch S, Landthaler M, Osterrieder N, Kunec D. Mechanism of virus attenuation by codon pair deoptimization. *Cell Reports*, 2020, 31(4): 107586.
- [15] 李国治, 邓卫东. 基因组测序技术及其应用研究进展. *安徽农业科学*, 2018, 46(22): 20–22, 25.
Li GZ, Deng WD. Research progress and application of genome sequencing technology. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(22): 20–22, 25. (in Chinese)
- [16] Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(1): 20–30.
- [17] Komar AA. The Yin and Yang of codon usage. *Human Molecular Genetics*, 2016, 25(R2): R77–R85.
- [18] Wang YN, Ji WH, Li XR, Liu YS, Zhou JH. Unique features of nucleotide and codon usage patterns in mycoplasmas revealed by information entropy. *Biosystems*, 2018, 165: 1–7.
- [19] Ge ZY, Li XR, Cao XA, Wang R, Hu W, Gen L, Han SY, Shang YJ, Liu YS, Zhou JH. Viral adaptation of staphylococcal phage: a genome-based analysis of the selective preference based on codon usage Bias. *Genomics*, 2020, 112(6): 4657–4665.
- [20] Zhou JH, Li XR, Lan X, Han SY, Wang YN, Hu YH, Pan QW. The genetic divergences of codon usage shed new lights on transmission of hepatitis E virus from swine to human. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 68: 23–29.
- [21] Cao XA, Hu W, Shang YJ, Liu YS, Han SY, Wang YN, Zhao L, Li XR, Zhou JH. Analyses of nucleotide, synonymous codon and amino acid usages at gene levels of *Brucella melitensis* strain QY1. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 65: 257–264.
- [22] Zhou JH, Gao ZL, Zhang J, Ding YZ, Stipkovits L, Szathmary S, Pejsak Z, Liu YS. The analysis of codon bias of foot-and-mouth disease virus and the adaptation of this virus to the hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, 14: 105–110.
- [23] Zhou JH, Gao ZL, Sun DJ, Ding YZ, Zhang J, Stipkovits L, Szathmary S, Pejsak Z, Liu YS. A comparative analysis on the synonymous codon usage pattern in viral functional genes and their translational initiation region of ASFV. *Virus Genes*, 2013, 46(2): 271–279.
- [24] Zhou JH, Ding YZ, He Y, Chu YF, Zhao P, Ma LY, Wang XJ, Li XR, Liu YS. The effect of multiple evolutionary selections on synonymous codon usage of genes in the *Mycoplasma bovis* genome. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108949.
- [25] Tian HF, Hu QM, Xiao HB, Zeng LB, Meng Y, Li Z. Genetic and codon usage bias analyses of major capsid

- protein gene in *Ranavirus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 84: 104379.
- [26] Deng Y, De Lima Hedayioglu F, Kalfon J, Chu D, Von Der Haar T. Hidden patterns of codon usage bias across kingdoms. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2020, 17(163): 20190819.
- [27] Krasovec M, Filatov DA. Evolution of codon usage bias in diatoms. *Genes*, 2019, 10(11): 894.
- [28] Mordstein C, Savisaar R, Young RS, Bazile J, Talmane L, Luft J, Liss M, Taylor MS, Hurst LD, Kudla G. Codon usage and splicing jointly influence mRNA localization. *Cell Systems*, 2020, 10(4): 351–362.e8.
- [29] Mordstein C, Cano L, Morales AC, Young B, Ho AT, Rice AM, Liss M, Hurst LD, Kudla G. Transcription, mRNA export, and immune evasion shape the codon usage of viruses. *Genome Biology and Evolution*, 2021, 13(9): evab106.
- [30] Nürenberg-Goloub E, Tampé R. Ribosome recycling in mRNA translation, quality control, and homeostasis. *Biological Chemistry*, 2019, 401(1): 47–61.
- [31] Lyu XL, Yang Q, Li L, Dang YK, Zhou ZP, Chen S, Liu Y. Adaptation of codon usage to tRNA I34 modification controls translation kinetics and proteome landscape. *PLoS Genetics*, 2020, 16(6): e1008836.
- [32] Wei YL, Silke JR, Xia XH. An improved estimation of tRNA expression to better elucidate the coevolution between tRNA abundance and codon usage in bacteria. *Scientific Reports*, 2019, 9: 3184.
- [33] López JL, Lozano MJ, Fabre ML, Lagares A. Codon usage optimization in the prokaryotic tree of life: how synonymous codons are differentially selected in sequence domains with different expression levels and degrees of conservation. *mBio*, 2020, 11(4): e00766-20.
- [34] Jack BR, Boutz DR, Paff ML, Smith BL, Wilke CO. Transcript degradation and codon usage regulate gene expression in a lytic phage. *Virus Evolution*, 2019, 5(2): vez055.
- [35] Chen F, Wu P, Deng SY, Zhang H, Hou YT, Hu Z, Zhang JZ, Chen XS, Yang JR. Dissimilation of synonymous codon usage bias in virus-host coevolution due to translational selection. *Nature Ecology & Evolution*, 2020, 4(4): 589–600.
- [36] Shin YC, Bischof GF, Lauer WA, Desrosiers RC. Importance of codon usage for the temporal regulation of viral gene expression. *PNAS*, 2015, 112(45): 14030–14035.
- [37] Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, D'Andrea L, De Castellarnau M, Guix S, Bosch A. Hepatitis A virus codon usage: implications for translation kinetics and capsid folding. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2018, 8(10): a031781.
- [38] Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D'Andrea L, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A virus adaptation to cellular shutoff is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids. *Journal of Virology*, 2014, 88(9): 5029–5041.
- [39] Pintó RM, Bosch A. The codon usage code for cotranslational folding of viral capsids. *Genome Biology and Evolution*, 2021, 13(9): evab089.
- [40] Burns CC, Shaw J, Campagnoli R, Jorba J, Vincent A, Quay J, Kew O. Modulation of poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3259–3272.
- [41] Postnikova OA, Uppal S, Huang WL, Kane MA, Villasmil R, Rogozin IB, Poliakov E, Redmond TM. The functional consequences of the novel ribosomal pausing site in SARS-CoV-2 spike glycoprotein RNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6490.
- [42] Zhou JH, Su JH, Chen HT, Zhang J, Ma LN, Ding YZ, Stipkovits L, Szathmary S, Pejsak Z, Liu YS. Clustering of low usage codons in the translation initiation region of hepatitis C virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, 18: 8–12.
- [43] Zhou JH, Zhang J, Chen HT, Ma LN, Ding YZ, Pejsak Z, Liu YS. The codon usage model of the context flanking each cleavage site in the polyprotein of foot-and-mouth disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11(7): 1815–1819.
- [44] Mruk I, Kaczorowski T, Witczak A. Natural tuning of restriction endonuclease synthesis by cluster of rare arginine codons. *Scientific Reports*, 2019, 9: 5808.
- [45] Gröger V, Wieland L, Naumann M, Meinecke AC, Meinhardt B, Rossner S, Ihling C, Emmer A, Staeger MS, Cynis H. Formation of HERV-K and HERV-Fc1 envelope family members is suppressed on transcriptional and translational level. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7855.
- [46] Guimaraes JC, Mittal N, Gnann A, Jedlinski D, Riba A, Buczak K, Schmidt A, Zavolan M. A rare codon-based translational program of cell proliferation. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 44.
- [47] Yang Q, Yu CH, Zhao FZ, Dang YK, Wu C, Xie PC,

- Sachs MS, Liu Y. eRF1 mediates codon usage effects on mRNA translation efficiency through premature termination at rare codons. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(17): 9243–9258.
- [48] Huo YX, Zheng B, Wang N, Yang Y, Liang X, Ma X. Identifying amino acid overproducers using rare-codon-rich markers. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2019(148): e59331.
- [49] Plotkin JB, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(1): 32–42.
- [50] Zhou ZP, Dang YK, Zhou M, Li L, Yu CH, Fu JJ, Chen S, Liu Y. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *PNAS*, 2016, 113(41): E6117–E6125.
- [51] Fu JJ, Dang YK, Counter C, Liu Y. Codon usage regulates human KRAS expression at both transcriptional and translational levels. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(46): 17929–17940.
- [52] Robertson WE, Funke LFH, De La Torre D, Fredens J, Elliott TS, Spinck M, Christova Y, Cervettini D, Böge FL, Liu KC, Buse S, Maslen S, Salmond GPC, Chin JW. Sense codon reassignment enables viral resistance and encoded polymer synthesis. *Science*, 2021, 372(6546): 1057–1062.
- [53] Korniy N, Goyal A, Hoffmann M, Samatova E, Peske F, Pöhlmann S, Rodnina MV. Modulation of HIV-1 gag/gag-pol frameshifting by tRNA abundance. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(10): 5210–5222.
- [54] Dittmar KA, Sørensen MA, Elf J, Ehrenberg M, Pan T. Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Reports*, 2005, 6(2): 151–157.
- [55] Quax TEF, Claassens NJ, Söll D, Van Der Oost J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Molecular Cell*, 2015, 59(2): 149–161.
- [56] Tavares JF, Davis NK, Poim A, Reis A, Kellner S, Sousa I, Soares AR, Moura GMR, Dedon PC, Santos M. tRNA-modifying enzyme mutations induce codon-specific mistranslation and protein aggregation in yeast. *RNA Biology*, 2021, 18(4): 563–575.
- [57] Nedialkova DD, Leidel SA. Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity. *Cell*, 2015, 161(7): 1606–1618.
- [58] Rapino F, Zhou ZL, Roncero Sanchez AM, Joiret M, Seca C, El Hachem N, Valenti G, Latini S, Shostak K, Geris L, Li P, Huang G, Mazzucchelli G, Baiwir D, Desmet CJ, Chariot A, Georges M, Close P. Wobble tRNA modification and hydrophilic amino acid patterns dictate protein fate. *Nature Communications*, 2021, 12: 2170.
- [59] Sørensen MA, Elf J, Bouakaz E, Tenson T, Sanyal S, Björk GR, Ehrenberg M. Over expression of a tRNA^{Leu} isoacceptor changes charging pattern of leucine tRNAs and reveals new codon reading. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 354(1): 16–24.
- [60] Elf J, Nilsson D, Tenson T, Ehrenberg M. Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science*, 2003, 300(5626): 1718–1722.
- [61] Shinde P, Sarkar C, Jalan S. Codon based co-occurrence network motifs in human mitochondria. *Scientific Reports*, 2018, 8: 3060.
- [62] Chu D, Wei L. Parsing the synonymous mutations in the maize genome: isoaccepting mutations are more advantageous in regions with codon co-occurrence bias. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 422.
- [63] Coleman JR, Papamichail D, Skiena S, Futcher B, Wimmer E, Mueller S. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science*, 2008, 320(5884): 1784–1787.
- [64] Tats A, Tenson T, Remm M. Preferred and avoided codon pairs in three domains of life. *BMC Genomics*, 2008, 9: 463.
- [65] Ghoneim DH, Zhang XJ, Brule CE, Mathews DH, Grayhack EJ. Conservation of location of several specific inhibitory codon pairs in the *Saccharomyces sensu stricto* yeasts reveals translational selection. *Nucleic Acids Research*, 2018, 47(3): 1164–1177.
- [66] Jordan-Paiz A, Franco S, Martinez MA. Synonymous codon pair recoding of the HIV-1 *env* gene affects virus replication capacity. *Cells*, 2021, 10(7): 1636.
- [67] Le Nouën C, Luongo CL, Yang LJ, Mueller S, Wimmer E, DiNapoli JM, Collins PL, Buchholz UJ. Optimization of the codon pair usage of human respiratory syncytial virus paradoxically resulted in reduced viral replication *in vivo* and reduced immunogenicity. *Journal of Virology*, 2020, 94(2): e01296-19.
- [68] Li PH, Ke XL, Wang T, Tan ZY, Luo D, Miao YJ, Sun JH, Zhang Y, Liu Y, Hu QX, Xu FQ, Wang HZ, Zheng ZH. Zika virus attenuation by codon pair deoptimization induces sterilizing immunity in mouse models. *Journal of Virology*, 2018, 92(17): e00701–e00718.
- [69] Conrad SJ, Silva RF, Hearn CJ, Climans M, Dunn JR. Attenuation of Marek's disease virus by codon pair deoptimization of a core gene. *Virology*, 2018, 516: 219–226.

- [70] Broadbent AJ, Santos CP, Anafu A, Wimmer E, Mueller S, Subbarao K. Evaluation of the attenuation, immunogenicity, and efficacy of a live virus vaccine generated by codon-pair bias de-optimization of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus, in ferrets. *Vaccine*, 2016, 34(4): 563–570.
- [71] Wada M, Ito K. Misdecoding of rare CGA codon by translation termination factors, eRF1/eRF3, suggests novel class of ribosome rescue pathway in *S. cerevisiae*. *The FEBS Journal*, 2019, 286(4): 788–802.
- [72] Pechmann S, Frydman J. Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(2): 237–243.
- [73] Chen SY, Li K, Cao WQ, Wang J, Zhao T, Huan Q, Yang YF, Wu SH, Qian WF. Codon-resolution analysis reveals a direct and context-dependent impact of individual synonymous mutations on mRNA level. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(11): 2944–2958.
- [74] Mauger DM, Cabral BJ, Presnyak V, Su SV, Reid DW, Goodman B, Link K, Khatwani N, Reynders J, Moore MJ, McFadyen IJ. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *PNAS*, 2019, 116(48): 24075–24083.
- [75] Zhou JH, You YN, Chen HT, Zhang J, Ma LN, Ding YZ, Pejsak Z, Liu YS. The effects of the synonymous codon usage and tRNA abundance on protein folding of the 3C protease of foot-and-mouth disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, 16: 270–274.
- [76] Ma XX, Wang YN, Cao XA, Li XR, Liu YS, Zhou JH, Cai XP. The effects of codon usage on the formation of secondary structures of nucleocapsid protein of peste des petits ruminants virus. *Genes & Genomics*, 2018, 40(9): 905–912.