

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07311

研究課題名(和文)酸素感受性tRNA修飾酵素の反応メカニズム

研究課題名(英文) Characterization of the reaction mechanisms of oxygen-sensitive tRNA modifying enzymes

研究代表者

鳴 直樹 (Shigi, Naoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20392623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：tRNAはタンパク質合成においてコドンとアミノ酸を結び付ける要であり、転写後に化学修飾を受け機能する。tRNAの硫黄修飾塩基(2-チオウリジン)はコドン認識や構造安定化に必須である。これらの硫黄修飾塩基の生合成機構の解明を行った。好熱菌tRNAのs2T54硫黄修飾塩基の生合成に関する、新規ペアスルフィド結合タンパク質TtuDを同定し、反応性の高い硫黄原子を硫黄化酵素に確実に伝達する機構を明らかにした。またRNA硫黄化酵素TtuAや新規酵素について、無酸素下で分光学・生化学・立体構造解析等を行い(共同研究)、酸素感受性の鉄硫黄クラスターが関与するRNAの新規硫黄転移機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、複数のtRNA硫黄転移酵素において、酸素感受性補酵素が硫黄転移反応に必要なことを明らかにした。このしくみは先に明らかにした、酸素感受性補酵素を必要としない生合成系に加え、2-チオウリジン合成のもう一つのプロトタイプであることがわかった。これらの解析から硫黄化合物の生合成に共通する分子基盤を明らかにしその生物学的意義についての理解を深め、また硫黄転移酵素の進化に新知見を与えた。さらにこれらの成果は、抗菌剤や遺伝病等の治療法の開発への重要な指針を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：tRNA is extensively modified after transcription to fulfill its functions in translation. Two-thiouridines in tRNAs are essential for recognition of split-codon boxes and stabilization of the whole structure of tRNAs. We have investigated the biosynthesis mechanism of these thiouridines.

We identified ttuD as a gene for the synthesis of s2T54 in *Thermus thermophilus*. TtuD receives the persulfide generated by cysteine desulfurases and enhances the formation of thiocarboxylated TtuB, the sulfur donor for the tRNA sulfurtransferase TtuA. We also demonstrated by spectroscopic, biochemical, and crystal structure analyses that TtuA and other sulfurtransferases require oxygen-labile [4Fe-4S]-type iron-sulfur clusters for its enzymatic activity. We propose a novel molecular mechanism of sulfur transfer by these enzymes.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：tRNA 硫黄 鉄硫黄クラスター 酵素 タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硫黄は生体を構成する主要元素であり、様々な酵素反応や分子認識に関与する。全生物の tRNA には硫黄が含まれており、硫黄修飾塩基 2-チオウリジン (2-チオ U) はその機能に重要である [図 1]。全ての生物種で、アミノ酸 Glu、Gln、Lys に対応する tRNA のアンチコドン 1 文字目 (34 位) には 2-チオ U がある。2 位の酸素原子を硫黄に置換すると原子半径が大きくなり、未修飾 U をコドン認識に適した C3'-endo 型の構造に安定化する。そのため RNA 硫黄化機構は正確なタンパク質合成、ひいては生命に必須である。硫黄修飾がないとコドン認識が悪化しタンパク質合成が停滞、タンパク質の凝集を誘発する [引用文献①]。

この 2-チオ U34 の生合成は、多数の生合成因子が関与する非常に複雑な系である [図 2]。①原核生物 MnmA 型と ②真核生物 Ncs6/好熱菌 TtuA 型に大別される [発表論文②]。前者の生合成機構は解明済みであるが、後者では酸素感受性硫黄化酵素が決定的に重要であるため解析が困難であった。①原核生物の場合、システイン脱硫酵素がペアスルフィド (R-SSH) を生成し、キャリアタンパク質に順に受け渡され、硫黄化酵素 MnmA が tRNA に導入する [図 2C] [引用文献②]。構造・生化学解析により MnmA の反応機構は詳細に理解されている [引用文献③]。一方、②真核生物細胞質の場合、システイン脱硫酵素由来のペアスルフィドが硫黄キャリア Urm1 に受け渡され、チオカルボキシレート (R-COSH: カルボキシル基の酸素が硫黄に置換されたもの) を形成する [図 2 A 上段] [引用文献④]。硫黄化酵素 Ncs6 が Urm1-COSH の硫黄を tRNA に導入すると予想されている。

好熱性細菌には 2-チオ U が別の位置にもある。好熱菌 tRNA は 54 位が硫黄化されて耐熱化する [図 1][引用文献⑤⑥⑦]。私は好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* の生合成遺伝子群を同定し、試験管内で反応を再構成することにより、生合成の全体像をあきらかにしてきた [図 2 B 上段] [引用文献⑧]。硫黄化酵素 TtuA がチオカルボキシレート TtuB-COSH の硫黄を tRNA に導入する。真核生物 Ncs6 系と非常に良く似ていた。そこで反応機構が未解明である、Ncs6/TtuA 型硫黄化酵素のモデルとして好熱菌で解析している。TtuA タンパク質は茶色を示すが、好気下ではすぐに無色になり、活性がなくなる。そこで無酸素下での実験を行い、TtuA は酸素感受性の鉄硫黄クラスターを活性に必要とする、新規硫黄化酵素であることがわかった [嶋, 当時未発表]。真核生物 Ncs6 も鉄硫黄タンパクであると予想している。

2. 研究の目的

tRNA はタンパク質合成においてコドンとアミノ酸を結び付ける要であり、転写後に化学修飾を受け機能を発揮する。tRNA の硫黄修飾塩基はコドン認識や構造安定化などに必須である。本研究ではその生合成を担う硫黄化酵素の反応機構の解明を目的とする。独自に見出した酸素感受性という特徴をもつ新規硫黄化反応について、立体構造情報に基づいて生化学解析を行う。本研究を通して硫黄化合物の生合成に共通する分子基盤とその生物学的意義について考察・理解する。

3. 研究の方法

好熱菌 TtuA や新規 tRNA 硫黄化酵素を中心とする生合成システムをモデルに tRNA 硫黄化反応を解析した。また好熱菌の逆遺伝学手法を用いて新規生合成因子の同定、細胞での機能解析をおこなった。硫黄化酵素—硫黄ドナータンパク質複合体の立体構造に基づき、グローブボックス (酸素濃度 2ppm 以下) 内で生化学的に解析した。特に酸素感受性鉄硫黄クラスターの機能に着目し解析した。一連の解析から新規硫黄化反応のしくみをあきらかにし、既知の系 (硫黄化酵素 MnmA の関与する RNA 硫黄化修飾の系および他の硫黄化合物の生合成系) と比較した。硫黄化合物の生合成機構に共通する原理とその生物学的意義を考察した。

放射性同位元素使用施設内にも酸素濃度 100 ppm 以下を迅速に達成できる真空排気型グローブボックスをセットアップし、放射性同位元素を用いて嫌気下で再現性良く反応の追跡ができる系を構築した。

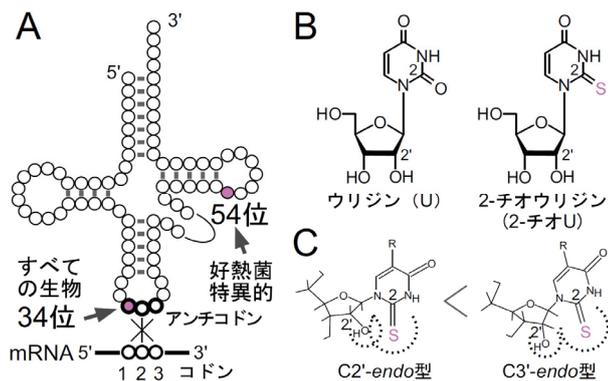


図 1 硫黄修飾塩基の位置 (A) と化学構造 (B)、立体構造 (C)

4. 研究成果

(1) s²T54 に関する新規生成因子 TtuD の同定と機能解析

これまでに、細胞内の硫黄化合物の生合成には、さまざまな活性化硫黄運搬タンパク質が関与し、反応性の高い硫黄原子を安全かつ確実に硫黄化酵素に伝達していくという概念を提唱している。今回新たに、好熱菌 tRNA の硫黄修飾塩基 (s²T54, 別名 5-methyl-s²U54) の生合成に関与する新規タンパク質 TtuD を好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* を用い逆遺伝学手法により同定した。試験管内で組換えタンパク質を用いて硫黄転移機構を生化学的に解析し、ペアスルフィド結合タンパク質 TtuD の硫黄修飾塩基の生合成における以下の役割をあきらかにした [図 2B 上段]。

まず生合成の最初の段階ではシステイン脱硫酵素がペアスルフィドを生成する。TtuD はシステイン脱硫酵素の反応を促進する。次にこの硫黄原子を受け取り、効率的に TtuB に伝達する。最終的に TtuB に結合した硫黄原子が硫黄化酵素 TtuA により RNA に導入される (FEBS Letters, 2016 に発表; 発表論文⑤)。

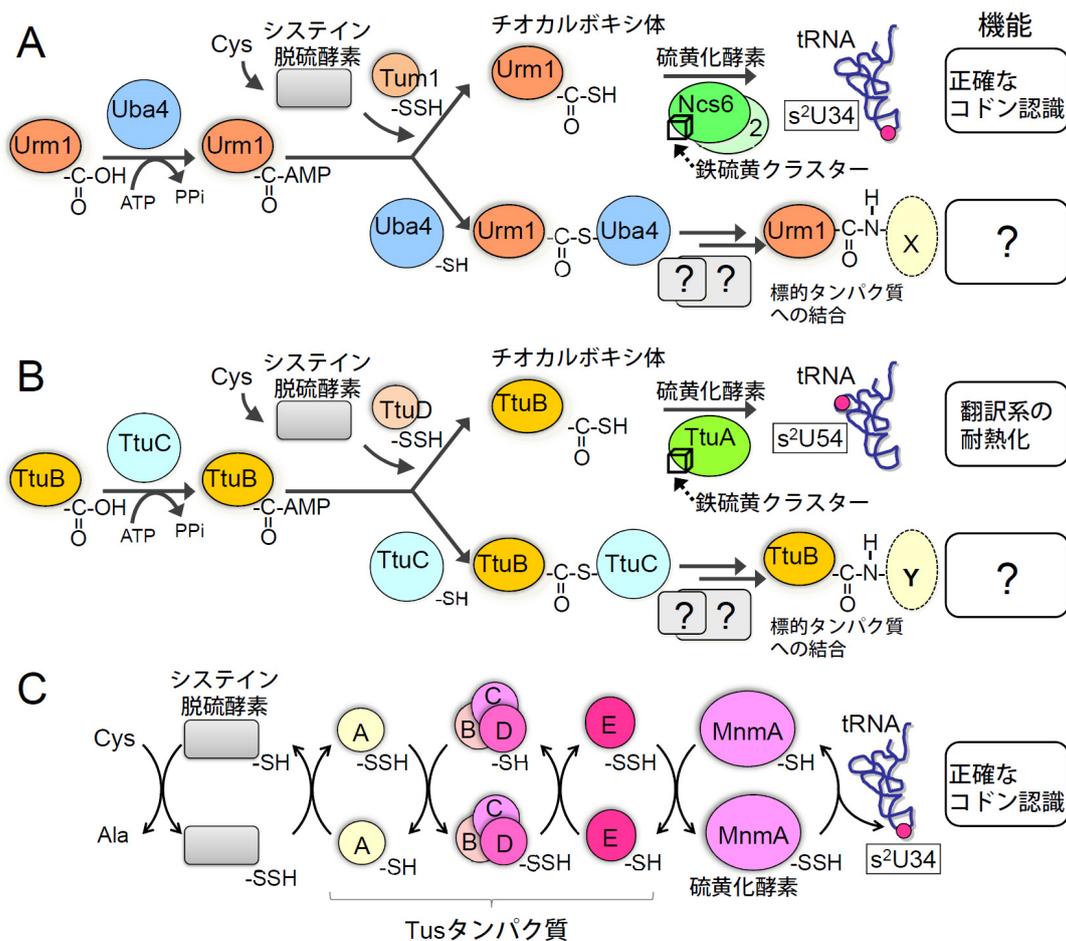


図 2 硫黄修飾塩基の生合成機構と翻訳後修飾

A. 真核生物 2-チオ U34 生合成系 (Ncs6 系) **B.** 好熱菌 2-チオ U54 生合成系. TtuD は本研究で同定 **C.** 原核生物 2-チオ U34 生合成系 (MnmA 系)

(2) s²T54 硫黄化酵素複合体 TtuA-TtuB の機能解析

tRNA-s²T54 硫黄修飾塩基の生合成に関与する RNA 硫黄化酵素複合体 TtuA-TtuB の構造解析に成功した (Acta Crystallographica Section F, 2016; 発表論文⑥ 北海道大学 田中良和准教授らとの共同研究)。TtuA-TtuB の立体構造情報に基づいて、酸素感受性という特徴をもつ新規硫黄化反応について解析を行った。無酸素下で生化学的に解析し、酸素感受性の鉄硫黄クラスターが硫黄化反応に必須であることをあきらかにした。EPR 分光法・補酵素を含む構造解析を行い、TtuA による新規の硫黄転移機構を提唱した (北海道大学 田中良和准教授、東北大学 齋藤正男教授、東京大学 鈴木勉教授らとの共同研究) [図 3]。[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターは TtuA の活性中心にある 3 つの保存されたシステイン残基により TtuA に保持されており、さらにリガンドを結合できる手の空いた Fe 原子を 1 つ有する。この Fe 原子が、(1) 硫黄キャリア TtuB を活性中心に保持する、または TtuB から遊離した硫化物イオン (S²⁻) を活性中心に配置し硫黄化反応を進行させると推論した。

この内容の一部は先行研究により実施していた。本研究期間には論文執筆と投稿・追加実験を行い、共責任著者としてPNAS誌に発表した[発表論文④]。他の研究者により、ヒトNcs6も同様の補酵素を結合し、類似の反応機構を担っていることが提案されている[引用文献⑨]。この硫黄転移機構はヒトでは間接的にミトコンドリアの活性を支えている[引用文献⑩]。進化的に重要な硫黄化反応をあきらかにし、ヒト細胞のエネルギー生産機構を解明する手懸かりと与えるというプレスリリースをおこなった。

(3) 新規 tRNA 硫黄化酵素の同定と機能解析

ゲノム配列データベースから種々の tRNA 硫黄化酵素候補のアミノ酸配列を取得し、詳細に配列解析をおこない、保存残基等の特徴を整理した。そして一部の生物種では、TtuA/Ncs6とは別種の硫黄修飾塩基の生合成酵素も、酸素感受性補酵素を活性に必要とすることが推測された。予想通り、硫黄化酵素は酸素感受性の補酵素を結合することを示した。EPR分光法により、補酵素の電子構造を同定した(佐賀大学 堀谷正樹助教との共同研究)。さらにこの硫黄修飾塩基のHPLCによる迅速定量法を確立し、無酸素条件下で生化学的に硫黄化反応を再構成し、定量的に解析することに成功した。これらにより、TtuA/Ncs6とは別種の硫黄転移酵素においても、酸素感受性補酵素が tRNA への硫黄転移反応に必要なことをあきらかにした。硫黄転移酵素の反応機構に関して新たな知見を与える結果である[鳴、堀谷ら、投稿中]。

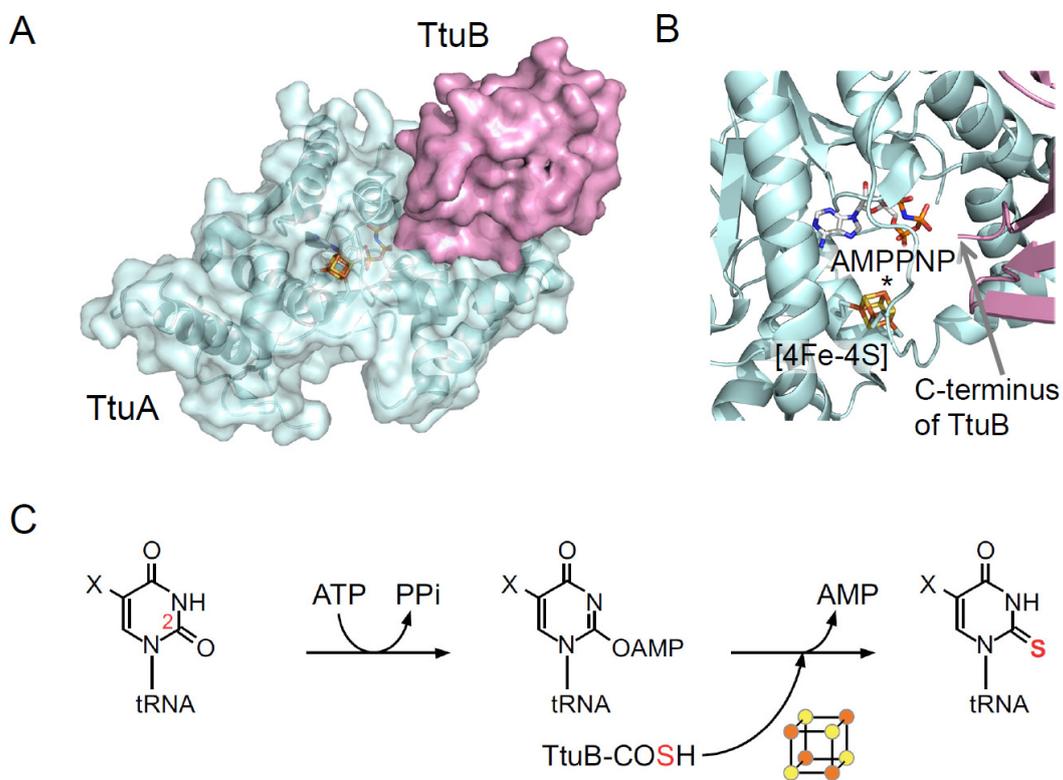


図3 酸素感受性鉄硫黄クラスターを有する硫黄化酵素 TtuA

A. 硫黄化酵素 TtuA と硫黄キャリアタンパク質 TtuB の複合体構造 **B.** TtuA の活性中心の構造. 硫黄を運んでくる TtuB の C 末端, ATP アナログ, [4Fe-4S] クラスターが近接している. リガンド結合のできる Fe を*で示す. **C.** TtuA の推定反応機構

(4) まとめと今後の展開

本研究では、複数の tRNA 硫黄転移酵素において、酸素感受性鉄硫黄クラスターが硫黄転移反応に必要なことをあきらかにした。このしくみは先にあきらかにした、酸素感受性補酵素を必要としない生合成系 (MnmA 系) に加え、2-チオウリジン合成のもう一つのプロトタイプであることがわかった。これらの解析からは硫黄転移酵素の進化に関する新知見も得られた。これらの成果は、抗菌剤や遺伝病等の治療法の開発への重要な指針を提供するものである。今後は酸化ストレス等による修飾塩基の生合成機構の制御や、脱修飾反応機構の探索などにより、生体内での硫黄修飾塩基によるタンパク質合成制御機構の全容解明を行いたい。

硫黄化合物はビタミンなど重要な生体分子を構成しているが、これらの化合物の生合成系でも活性化硫黄種を結合し、安定に最終硫黄化酵素に受け渡す系が存在する。本研究においても TtuD や TtuB のような活性化硫黄キャリアタンパク質が存在し、類似の系を構成していることがあきらかになった。これは硫黄化合物の生合成全体に共通する基盤原理であろう。さらに全生物は鉄硫黄タンパク質を多数持つが(たとえば大腸菌では120個以上)、その多くは酸素

感受性のため解析が難しく未解析である。本研究で確立した実験手法は、鉄硫黄タンパク質の新たな機能をあきらかにするための解析法としても適用可能である。

ヒト硫黄化酵素 Ncs6 は癌での発現変動が報告されている [引用文献⑩]。ミトコンドリア tRNA の 2-チオ U34 欠損でも重篤なミトコンドリア病になる [引用文献⑪]。多くの病態において細胞の酸化ストレスの増加が指摘されており、それにより酸素感受性タンパク質の活性が低下して発症することが考えられる。そのため本研究を進展させ、ヒト疾病の原因解明と治療法を開発することも考えている。

本研究成果は原著論文 (3 報)、総説・解説 (4 報)、プレス発表 (1 件) 等で研究者および社会に発表し、1 件の受賞 (極限生物環境学会) を受けた。

<引用文献>

- ① Nedialkova DD et al, Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity, **Cell**, 161(7),1606-18, 2015
- ② Ikeuchi Y, Shigi N et al, Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions, **Mol Cell**, 21(1), 97-108, 2006
- ③ Numata T et al, Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate, *Nature*, 442(7101), 419-24, 2006
- ④ Leidel S et al, Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA, **Nature**, 458(7235),228-32, 2009
- ⑤ Watanabe K et al, Heat-induced stability of tRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, **BBRC**, 72(3), 1137-44, 1976
- ⑥ Shigi N et al, Temperature-dependent biosynthesis of 2-thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA, **JBC**, 281(4), 2104-13, 2006a
- ⑦ Shigi N et al, Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures, **JBC**, 281(20), 14296-306, 2006b
- ⑧ Shigi N et al, Common thiolation mechanism in the biosynthesis of tRNA thiouridine and sulphur-containing cofactors, **EMBO J**, 27(24), 3267-78, 2008
- ⑨ Liu Y et al, A [3Fe-4S] cluster is required for tRNA thiolation in archaea and eukaryotes, **PNAS**, 113(45), 12703-8, 2016
- ⑩ Tigano M et al, Elongator-dependent modification of cytoplasmic tRNA^{Lys}UUU is required for mitochondrial function under stress conditions, **NAR**, 43(17), 8368-80, 2015
- ⑪ Yousef GM et al, Molecular cloning of a new gene which is differentially expressed in breast and prostate cancers, **Tumor Biology**, 25(3), 122-33, 2004
- ⑫ Yasukawa T et al, Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease, **EMBO J**, 20(17), 4794-802, 2001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① 高度好熱菌を耐熱化する tRNA 硫黄修飾塩基の生合成と機能の解明, 嶋直樹, **極限環境生物学会誌**, 17, pp.5-11, 2019, 査読無
- ② Recent Advances in our Understanding of the Biosynthesis of Sulfur Modifications in tRNAs, 嶋直樹, **Frontiers in Microbiology**, 9-2679, pp.1-9, 2018, 査読有, DOI 10.3389/fmicb.2018.02679
- ③ RNA チオ化, 嶋直樹, *生体の科学*, 69-5, pp.396-397, 2018, 査読無
- ④ Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA, 陳明皓、朝井真一、奈良井峻、南部周介、大村直毅、坂口裕理子、鈴木勉、池田齋藤正男、渡辺公綱、姚閔、嶋直樹、田中良和, **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 114-19, pp.4954-4959, 2017, 査読有, DOI 10.1073/pnas.1615585114
- ⑤ Identification of a rhodanese-like protein involved in thiouridine biosynthesis in *Thermus thermophilus* tRNA, 嶋直樹、朝井真一、渡辺公綱, **Febs Letters**, 590-24, pp.4628-4637, 2016, 査読有, DOI 10.1002/1873-3468.12499
- ⑥ Crystallographic study of the 2-thioribothymidine-synthetic complex TtuA-TtuB from *Thermus thermophilus*, 陳明皓、奈良井峻、大村直毅、嶋直樹、チムナロン サリン、田中良和、姚閔, **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications**, F72, pp.777-781, 2016, 査読有, DOI 10.1107/S2053230X16014242

〔学会発表〕 (計 15 件)

- ① 嶋直樹, 新規な酸素感受性 tRNA 硫黄化酵素の機能解析, 第 19 回 極限環境生物学会 年会, 2018
- ② 嶋直樹, Biosynthesis of Sulfur-modifications of tRNA in *Thermus thermophilus*, International workshop on 50th anniversary of *Thermus thermophilus* discovery, 2018

- ③ 陳 明皓, ユビキチン様タンパク質を用いて tRNA に硫黄を転移する酵素 TtuA の硫黄転移機構, 日本生物物理学会 東北支部会, 2017
- ④ 田中 良和, Investigating a novel tRNA thiolational modification mechanism involving an [4Fe-4S] cluster, 2nd joint International Symposium of NSRRC and IPR, 2017
- ⑤ 嶋 直樹, 高度好熱菌を耐熱化する tRNA 硫黄修飾塩基の生合成と機能の解明, 極限環境生物学会 年会, 2017
- ⑥ 嶋 直樹, 好熱菌に耐熱性を付与する tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構, 環境微生物系学会 合同大会, 2017
- ⑦ 嶋 直樹, Characterization of the biosynthesis of 2-thiouridine in transfer RNA catalyzed by an iron-sulfur protein, International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2017
- ⑧ 嶋 直樹, tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構, 第 19 回 日本 RNA 学会年会, 2017
- ⑨ 陳 明皓, 鉄硫黄クラスターが関与する新規硫黄転移機構の解明, 第 17 回 日本蛋白質科学会 年会, 2017
- ⑩ 陳 明皓, 硫黄転移反応における鉄硫黄クラスターの役割の解明, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会, 2017
- ⑪ 姫野 美沙緒, tRNA 硫黄修飾酵素の解析およびその応用, SAT テクノロジー・ショーケース, 2017
- ⑫ 嶋 直樹, 生命の中樞をささえる RNA 硫黄化のしくみ, 第 7 回 連合農学研究科セミナー, 2016
- ⑬ 嶋 直樹, 好熱菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構, 第 89 回 日本生化学会大会, 2016
- ⑭ 嶋 直樹, Biosynthesis of Sulfur-modification of tRNA in a Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophilus*, 11th International Congress on Extremophiles, 2016
- ⑮ 陳 明皓, バクテリアにおける二機能性ユビキチン様タンパク質の機能調節の構造基盤, 第 16 回 日本蛋白質科学会 年会, 2016

〔図書〕(計 1 件)

- ① Sulfur-modifications in tRNA: function and implications for human disease, 嶋 直樹, RNA Technologies: Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine, **Springer**, pp.55-71 (全 453 頁)、2016, 査読有

〔その他〕

- ① プレスリリース (発表・掲載日: 2017/04/25)
細胞内における硫黄修飾の新たな反応機構を解明
https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2017/pr20170425/pr20170425.html
- ② 受賞 (2017 年度極限環境生物学会 研究奨励賞)
高度好熱菌を耐熱化する tRNA 硫黄修飾塩基, 嶋 直樹
- ③ ホームページ (産業技術総合研究所創薬基盤研究部門最先端バイオ技術探究グループ)
<https://unit.aist.go.jp/brd/jp/groups/lbrg/lbrg.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし