

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770096

研究課題名 (和文) 高度好熱菌 tRNA を耐熱化する硫黄化修飾機構の解明

研究課題名 (英文) Characterization of the tRNA-s²T thiolation enzymes required for cell growth at extremely high temperatures

研究代表者

嶋 直樹 (SHIGI NAOKI)

独立行政法人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：20392623

研究成果の概要：

高度好熱菌 tRNA を耐熱化する働きをもつ硫黄化修飾の生合成機構の解析を行った。新規生合成因子を同定し、組換えタンパク質を用いて試験管内で反応機構を解析した。その結果この硫黄化修飾の生合成は新規中間体 (チオカルボキシレート) を経由する新しいタイプの tRNA 硫黄化反応系であることが判明した。この系はモリブデン補酵素やチアミンなどの硫黄を含む補酵素の生合成系と共通の祖先から進化したと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：核酸、tRNA、タンパク質合成系、硫黄、補酵素

1. 研究開始当初の背景

転移 RNA (tRNA) はタンパク質合成の際、mRNA のコドンとアミノ酸を対応させるアダプターとして機能している。tRNA は DNA から RNA に転写されたのち、様々な化学修飾をされ、その機能を発現する。この転写後修飾は、100 種類以上存在することが知られている。転写後修飾は、アミノアシル tRNA 合成酵素による tRNA の認識、タンパク質合成の際のコドン-アンチコドン対合の正確さの決定、3次元構造の熱安定化などタンパク質合成の各プロセスで重要な役割を担っている。ただし、その詳細な機能および生合成機構については未解明な部分が多い。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、48℃ から 85℃ という広範な温度で生育できる。そ

の温度適応性は、細胞を構成する様々な要素と共にタンパク質合成系の耐熱化に寄るところが大きい。そしてタンパク質合成系の様々な因子で唯一、培養温度により変化するのが tRNA である。*T. thermophilus* のほぼ全ての種類の tRNA は温度に応じて、54 位のリボチミジン (T) の塩基部分の 2 位の酸素原子が硫黄化され 2-チオリボチミジン (s²T) となる。この修飾により 54 位は安定なコンフォメーションをとり、tRNA 分子全体が熱安定化され、高温で効率の高いタンパク質合成が可能となる [Yokoyama S. ら, *Adv Biophys* 23, 115-47, 1987]。また、培養温度を高くするにつれ、tRNA の s²T 含量は増加すること [Watanabe K. ら, *Biochem Biophys Res Commun*, 72, 1137-44, 1976] から、高度好熱菌は周

辺温度に応じてこの硫黄化修飾の割合を変化させ、温度適応をしていると考えられる。私たちは s^2T を欠損させると、高温での生育ができなくなることを明らかにし、この修飾が熱耐性に必須である事を直接的に証明した [Shigi N. ら, *J Biol Chem*, 281, 14296-306, 2006]。さらに様々な温度で培養した菌体の細胞抽出液を使って s^2T 化活性を試験管内で検出したところ、 s^2T 化に関わる酵素の至適温度は高温域にあり、これらの酵素の発現量が培養温度依存的に増加していることが示唆された [Shigi N. ら, *J Biol Chem*, 281, 2104-13, 2006]。このように培養温度による tRNA の s^2T 含量の変化は、 s^2T の生合成に関与する酵素の比活性や発現量の変化によると推定されるが、その詳細は不明である。

硫黄化修飾の割合を温度に応じて調節する仕組みを明らかにするためには、まず s^2T 生合成機構を明らかにする必要がある。そこで、私たちは、生合成に関わる酵素の探索を行ない、現在までに s^2T の生合成に関わる遺伝子を4つ同定した (*iscS*, *sufS*, *ttuA*, および *ttuB*) [Shigi N. ら, *J Biol Chem*, 281, 14296-306, 2006]。これら4つの組換タンパク質を用いて試験管内で tRNA の硫黄化反応を再構成したところ、基質 tRNA が硫黄化される系の確立に成功している。しかしこの反応には細胞抽出液の添加が必要であり、 s^2T 合成量も低い。このことはこれまでに同定した因子のほかにも、修飾に関わる因子や補因子が存在することを示している。

2. 研究の目的

本研究は好熱菌の硫黄を含む修飾塩基 s^2T の生合成系の解明と、この修飾塩基の含量変化による周辺温度への適応機構の解明を目的とする。

これまでに同定した4つの遺伝子産物による反応の機構は、保存されたアミノ酸配列をもつドメインの機能や他の硫黄化合物(モリブデン補酵素・チアミン)の生合成機構との比較から以下のように推定される。システインデスルフラゼファミリーの酵素である *IscS* と *SufS* は、システインから硫黄をペアスルフィド (R-SSH) として引き抜き、*TtuB* に活性化された硫黄原子を渡すと考えられる。*TtuA* は tRNA に結合し、ATP を用いて54位のウリジンをアデニル化して活性化するとともに、硫黄化された *TtuB* と結合し、tRNA に硫黄を転移すると考えられる。本研究ではこれらの因子に加えて s^2T 生合成に関わるすべての因子を同定し、細胞抽出液の添加を必要としない組換タンパク質のみによる試験管内での s^2T 化反応の完全再構成を目指し、上記の予想反応機構について実験的証明を試みる。

また s^2T 生合成系と類似していると予想される、他の硫黄化合物(モリブデン補酵素・チアミン)の生合成系との関連について実験的に明らかにし、 s^2T 生合成の起源について考察する。

3. 研究の方法

(1) 新規生合成因子の同定

既に同定している s^2T の生合成因子と硫黄を含む補酵素(モリブデン補酵素・チアミン)の生合成因子の比較、および研究期間中に他のグループにより報告された真核生物の硫黄化修飾の生合成因子との比較から新規候補因子を好熱菌 *Thermus thermophilus* のゲノム配列データベースから同定した。新規候補因子遺伝子の破壊株を作成し、その株由来の tRNA の硫黄修飾の有無を質量分析装置で解析し、候補遺伝子が s^2T の生合成に関与しているかを明らかにし、新規 s^2T 生合成因子を同定した (*TtuC*, *TtuD*)。

(2) 試験管内 tRNA 硫黄化反応の解析

生合成因子の組換タンパク質を調製し、試験管内で tRNA の硫黄化反応を放射性同位体標識および質量分析法により解析した。さらに生合成因子の機能に重要と予想されるアミノ酸残基に変異を導入した組換タンパク質を調製し反応をおこない、反応機構について詳細に解析した。

(3) 他の硫黄化合物の生合成系との関連

新規因子 *TtuC* は硫黄を含む補酵素であるモリブデン補酵素とチアミンの生合成に関与している可能性があるため、*TtuC* 遺伝子破壊株でこれらの生合成を解析した。モリブデン補酵素の生合成に関しては、活性中心にこの補酵素をもつ硝酸還元酵素の活性を測定することにより解析した。チアミンに関しては最少培地を用いて栄養要求性で調べた。

次いでこれらの硫黄化合物の生成にはそれぞれ *TtuB* とは別の硫黄キャリアタンパク質がもちいられる。そこでこれらの組換タンパク質を調製し *TtuC* がこれらのタンパク質の硫黄付加にも関与しているかを調べた。さらに、それぞれの立体構造モデルの構築により *TtuC* がこれら複数の硫黄キャリアタンパク質を認識する仕組みを考察した。

(4) 真核生物ユビキチン系との関連

TtuB と新規因子 *TtuC* はそれぞれユビキチンと E1 酵素(ユビキチン活性化酵素)に配列が類似している。ユビキチン化において、ユビキチンと E1 酵素のチオエステル結合体は最初の重要な中間体である。組換体 *TtuB* と *TtuC* によるチオエステル結合体の生成をゲル電気泳動法(SDS-PAGE)および質量分析装置により解析した。

(5) TtuA と TtuB の転写の様式

培養温度による tRNA の s²T 含量の変化は、s²T の生合成に関与する生合成因子の比活性や発現量の変化によると推定されるが、その詳細は不明である。このうち発現量の変化は転写量や翻訳量の変化によると予想される。生合成因子の転写についての基礎的な知見を得るため、まず細胞内での TtuA と TtuB の転写の様式をゲノム配列の解析と RT-PCR 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 新規生合成因子の同定

既に同定している生合成因子 (IscS、SufS、TtuA、TtuB) と硫黄を含む補酵素 (モリブデン補酵素・チアミン) の生合成因子との比較から新規候補因子 TtuC を好熱菌 *Thermus thermophilus* のゲノムデータベースから同定した。TtuC の遺伝子破壊株を作成し、tRNA を解析したところ、硫黄修飾が欠損しており、TtuC が新規生合成因子であることがわかった。

また真核生物の硫黄修飾の生合成系との比較を行うことにより、好熱菌 *T. thermophilus* のゲノムデータベースから別の新規候補因子 TtuD を同定した。TtuD の遺伝子破壊株を作成し、その tRNA を解析したところ s²T 量が野生株の約 6 割に低下していることが判明した。よって TtuD は硫黄化修飾反応には必須ではないが生合成に関与していることがわかった。TtuD がどのような働きをしているかに関しては今後さらなる検討が必要である。

(2) 試験管内 tRNA 硫黄化反応の解析

生合成因子の組換えタンパク質をもちいて、試験管内での tRNA の硫黄化反応を解析した。その結果、まず TtuB はそのカルボキシ末端 (65 位) のグリシン残基が活性化酵素 TtuC によりアデニル化された後、システインデスルフラゼ IscS/SufS により遊離 L-システインから活性化された硫黄原子を受け取りチオカルボキシレート中間体を形成する (TtuB-COSH)。チオカルボキシレート (R-COSH) はカルボキシル基 (R-COOH) の 1 つの酸素原子が硫黄原子に置換された活性化硫黄種 (反応性の高い硫黄原子) である。その後修飾酵素 TtuA により、TtuB-COSH から tRNA に硫黄原子が転移されることを明らかにした [図]。s²T 生合成系において TtuB は硫黄キャリアタンパク質としてふるまうことがこの系の特徴である。これまでの硫黄修飾の研究ではペアスルフィド (R-SSH) 中間体が硫黄修飾の生合成に関与する系が原核生物で既に知られていた [Ikeuchi Y. ら, *Mol Cell*, 21, 97-108, 2006] が、本研究は硫黄修飾の生合成にチオカルボキシレート

という新規の中間体が重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて明らかにした。

さらに TtuB-COSH の硫黄原子は修飾酵素 TtuA により tRNA に導入されるが、これまでは試験管内での反応には細胞抽出液の添加が必要であった。反応に必要な因子を探索した結果、補因子結合型の TtuA を用いた予備的な実験では、細胞抽出液を添加しない条件で高効率で s²T の合成が観測された。TtuA による tRNA の活性化、硫黄転移の詳細に関しては今後の検討課題である。

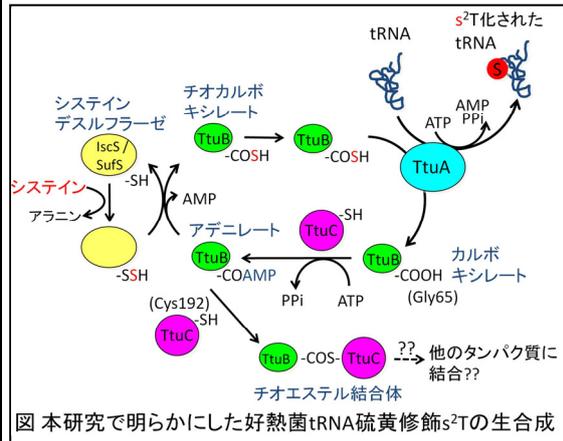


図 本研究で明らかにした好熱菌 tRNA 硫黄修飾 s²T の生合成

この好熱菌の硫黄修飾の生合成系は、すべての生物種でコドン認識に関わる硫黄修飾の生合成系のプロトタイプの一つであることが判明した。グルタミン酸、グルタミン、リジンの tRNA のアンチコドン 1 文字目 (34 位) には硫黄修飾 (2-チオウリジン, s²U) が存在する。この硫黄修飾は、コドンの 3 文字目の A と G のみと対合できるように制限して、正しいコドン認識を可能にする。(なお塩基の 5 位も修飾を受け、同様の役割を果たしている。) この s²U の生合成は 2 種類に大別できることが本研究と同時期に明らかにされた。真核生物の細胞質 tRNA のアンチコドンの硫黄化には修飾酵素 TtuA のホモログが関与しており、活性化硫黄種も好熱菌系と同様でチオカルボキシレートである [Dewez M. ら, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 5459-64, 2008] [Leidel S. ら, *Nature*, 458, 228-32, 2009]。一方、原核生物では、アンチコドンの硫黄化には TtuA とは異なるファミリーの修飾酵素 MnmA が関与する。大腸菌では硫黄原子はペアスルフィドの形で TusA、TusBCD 複合体、TusE という複数の硫黄キャリアタンパク質に順次受け渡され、最終的に修飾酵素 MnmA によって tRNA に導入される。[Ikeuchi Y. ら, *Mol Cell*, 21, 97-108, 2006]。本研究から好熱菌の硫黄化修飾と真核生物の硫黄化修飾の生合成系は修飾酵素と活性化硫黄種の種類という点において非常に類似しているという意外なことが判明した。現在のところその

理由は不明であるが、共通の起源から進化したものと考えている。

これらの系で見られる、反応性が高い活性化硫黄種をキャリアタンパク質で安定化するという仕組みは、鉄硫黄クラスターや含硫黄補酵素などの硫黄化合物の生合成においても見られる共通の仕組みであると考えられる。本研究により好熱菌の tRNA 硫黄修飾に関わる因子の同定、解析を中心に進めることにより、硫黄化合物の生合成に共通する分子基盤を明らかにすることができた。

(3) 他の硫黄化合物の生合成系との関連

好熱菌 *T. thermophilus* の TtuC の遺伝子破壊株を解析し、硫黄を含む補酵素であるモリブデン補酵素とチアミンの生合成ができないことがわかった。これにより好熱菌では TtuC は tRNA 硫黄修飾、モリブデン補酵素、およびチアミンの生合成系で共通に機能していることが示唆された。次いでこれらの硫黄化合物の生成に用いられる TtuB とは別の 3 つの硫黄キャリアタンパク質の組換えタンパク質をもちいた実験により TtuC はこれら 3 つのタンパク質の硫黄付加にも関与していることを明らかにした。さらに、それぞれの立体構造モデルの構築により TtuC はこれら複数の硫黄キャリアタンパク質の共通性の高い分子表面を認識して結合すると推定された。この結果は tRNA の硫黄修飾と含硫黄補酵素の生合成系は同様の仕組みで働いており、おそらく進化的に起源が同一であることを強く示唆する。生体内の硫黄化合物の生合成系の進化を考える上で非常に興味深い知見をあきらかにすることができた。

また、TtuC の保存されたシステイン残基 (192 位) は、チアミンの生合成では必須とされているが、意外なことに tRNA の硫黄化には必須ではなく反応機構に微妙な差異もあると考えられる。

(4) 真核生物ユビキチン系との関連

試験管内でチオカルボキシ中間体の生成反応を解析していたところ、TtuB-TtuC 共有結合体が微量に生成されることが SDS-PAGE をもちいた解析からわかった。そこで反応条件を検討し、この結合体が大量にできる (約 50% が共有結合体を形成する) 条件を見出した。この結合体を質量分析装置で解析したところ TtuB と TtuC はチオエステル結合を介して結合していることが判明した。この結合体は還元剤ジチオスレイトールにより分解されることから上記の結論は支持される。変異体をもちいた解析から、TtuB のカルボキシ末端のグリシン残基 (65 位) と TtuC の保存されたシステイン残基 (192 位) を介して結合していることを明らかにした [図 下側]。

タンパク質の翻訳後修飾の 1 つであるユビキチン化は、細胞周期の進行やシグナル伝達など生体にとって重要な現象と密接に関連している。このような修飾システムは真核生物においては普遍的に存在するが、原核生物ではこれまで発見されていない。真核生物において、ユビキチンは E1 酵素とチオエステル結合体を形成し、最終的に標的タンパク質に転移され、標的タンパク質の機能を制御する。好熱菌 s^2T 生合成系の硫黄キャリアタンパク質 TtuB とその活性化酵素 TtuC はそれぞれユビキチンと E1 酵素 (ユビキチン活性化酵素) に配列が類似している。それに加えてこれらはチオエステル結合体を形成することが観測された。原核生物でユビキチンのようなチオエステル結合体の生成が観測されたのは本研究が初めてである。この結果は原核生物でも真核生物と同様のタンパク質の翻訳後修飾システムが存在している可能性を示唆するものである。もし原核生物にこういったシステムが存在しているとすると、これは全く新しいタンパク質の機能調整機構と考えられ非常に興味深い。

(5) TtuA と TtuB の転写の様式

ゲノム配列上で TtuA と TtuB は隣り合っており、単一の mRNA として転写されている可能性があることが推測された。そこで、mRNA を RT-PCR 法で解析したところ、両者は単一の mRNA として転写されていることを確認できた。おそらく両者の発現量が同等のレベルになるように制御されていると推測でき興味深い。今後周辺温度により、これらの転写産物の量の変化を検討する。さらにタンパク質の量、酵素活性の変化を調べ、周辺温度による tRNA の s^2T 含量変化機構を明らかにしていきたい。

(6) まとめ

新規 s^2T 生合成因子を同定し、細胞抽出液を加えないで s^2T の生成を試験管内で再構成するという当初の目的を達成した。さらにこの系を用いて反応を詳細に解析した結果、 s^2T 生合成はチオカルボキシレート中間体を經由する tRNA 硫黄化反応のひとつの代表的な系であることが判明した。またこの系はモリブデン補酵素やチアミンなどの含硫黄補酵素の生合成系と機能的および進化的に強く関連していることがわかった。さらに原核生物にユビキチンに類似したシステムが存在している可能性を示唆する予備的な結果を得ることができた。以上の成果を次項雑誌論文①に発表した。また真核生物をふくめた tRNA の硫黄化修飾の生合成機構について次項図書①に総説としてまとめた。

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 1 件)

① 嶋直樹、坂口裕理子、朝井真一、鈴木勉、渡辺公綱、Common thiolation mechanism in the biosynthesis of tRNA thiouridine and sulphur-containing cofactors、The EMBO Journal、27 巻、pp3267-3278、2008、査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① 嶋直樹ら、Common thiolation mechanism in the biosynthesis of transfer RNA thiouridine and sulphur-containing cofactors、EMBO-FEMS workshop on: Microbial sulfur metabolism、平成 21 年 3 月 16 日、トマール (ポルトガル)
- ② 嶋直樹ら、Characterization of the tRNA-s²T thiolation enzymes required for cell growth at extremely high temperatures、RNA2008、平成 20 年 8 月 1 日、ベルリン (ドイツ)
- ③ 嶋直樹ら、高度好熱菌タンパク質合成系を耐熱化する tRNA の硫黄修飾の生合成機構、BMB2007 日本分子生物学会・日本生化学会年会、平成 19 年 12 月 13 日、横浜
- ④ 嶋直樹ら、Characterization of the tRNA-s²T thiolation enzymes required for cell growth at extremely high temperatures、22nd tRNA workshop、平成 19 年 11 月 4 日、ウプサラ (スウェーデン)
- ⑤ 堀 弘幸ら、Transfer RNA methylation in *Thermus thermophilus*、22nd tRNA workshop、平成 19 年 11 月 4 日、ウプサラ (スウェーデン)
- ⑥ 嶋直樹ら、高度好熱菌 tRNA に耐熱性を付与する修飾塩基 s²T の生合成機構、第 9 回 日本 RNA 学会年会、平成 19 年 7 月 30 日、名古屋

[図書] (計 1 件)

① 野間章子、嶋直樹、鈴木 勉、Biogenesis and functions of thio-compounds in transfer RNA: comparison of bacterial and eukaryotic thiolation machineries (Book Title: DNA and RNA modification enzymes) Landes Bioscience、印刷中、査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋直樹

独立行政法人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：20392623

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし