

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02436

研究課題名（和文）tRNA硫黄修飾塩基の生合成・分解系の多様性とその分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis for biosynthetic and degradation systems for tRNA sulfur-modified bases

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・副ラボ長

研究者番号：20392623

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

研究成果の概要（和文）：生存に不可欠な生体分子の硫黄修飾、RNAの硫黄修飾塩基などについて、その代謝機構の分子基盤の解明に取り組んだ。硫黄運搬タンパク質とRNA硫黄転移酵素が適切な順序で動的に働くことで初めて実現される「硫黄転移反応」について、無酸素下実験装置を活用した反応速度解析と構造分光学解析からそのメカニズムを解析し、その反応機構を支える共通基盤原理を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硫黄RNA修飾の代謝を支える酵素反応機構の共通基盤原理と生物学的意義についての理解を深化させた。今後本成果を発展させ、生物間での差異を詳細に解明し応用展開を進める基盤を構築した。将来的には、硫黄修飾異常が関与するミトコンドリア病、糖尿病、がん等の疾病の治療法の開発や、結核菌やマラリア原虫といった病原微生物等に特異的に作用する抗生剤の創出に資することによって、喫緊の社会課題である健康長寿社会の実現を目指す。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the molecular basis of the metabolic mechanisms of sulfur modification of sulfur-modified bases of RNA, which are essential for survival. We analyzed the mechanism of the "sulfur transfer reaction" which is realized only when sulfur-transfer proteins and RNA sulfur transferases work dynamically in an appropriate sequence, by analyzing the reaction kinetics and structural spectroscopic analysis using experimental equipment under anoxia, and proposed a common fundamental principle underlying these reaction mechanism.

研究分野：生化学、酵素学、分子生物学、RNA生物学、微生物学、硫黄代謝

キーワード：tRNA 転写後修飾 修飾塩基 硫黄 活性化硫黄 無酸素実験 NMR

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硫黄原子は生体を構成する主要な元素のひとつであり、多くの同素体 (単体として 30 種類以上) として存在でき、広範な酸化数 (-2 から +6) の化合物を形成できる特異な性質を持つ。この化学的性質により、硫黄は生体内で多彩かつ動的な役割を担っている。同時に、硫黄の高い反応性は、実験的な解析を困難にしてきた。特に細胞内において、硫黄や硫黄修飾を受けた生体分子が、実際にどのような化学形態で存在しているかを知ることは容易でない。これまで代表者は、正確なタンパク質合成に必須な tRNA の硫黄修飾を題材として、生存にとって不可欠な硫黄修飾が、副次的な反応を回避しながら導入される精緻なしくみを、進化的な観点を含めあきらかにしてきた [文献]。また近年、鉄硫黄クラスターや含硫黄ビタミンの生合成でも類似のしくみがあることが報告されるようになったことから、個々の生合成系の理解とともに、硫黄を含む生体分子に共通した基盤原理の存在が明らかになってきた。

コドンとアミノ酸を結び付ける tRNA はその成熟過程で多数の転写後修飾を受ける。なかでも硫黄修飾塩基は、コドン認識の高精度化や立体構造の安定化を担っている (下図)。そのため、tRNA に硫黄を導入する機構は、生命にとって必須である。代表者は、逆遺伝学と生化学手法を駆使して、真正細菌および真核生物に保存された硫黄修飾塩基 2-thiouridine (s^2U) の生合成系を同定し、硫黄化反応を試験管内で再構成することで、約 40 年間不明であった生合成経路の全貌を明らかにした [文献 など]。その結果、硫黄化合物の生合成系が、反応性の高い活性化硫黄を、キャリアタンパク質に結合させることで RNA 硫黄転移酵素まで安全に運搬し、RNA に硫黄を転移させる共通した仕組みを見出した。これは反応性の高い硫黄の非特異的な反応を防ぎながら、目的の反応を効率的に進める巧妙な機構である。一方、この機構を支えるタンパク質の動的な作用機構の分子基盤については未だ解明が進んでいない。

<引用文献>

Shigi N, Front Microbiol 2018, 9, 2679

Ikeuchi Y, Shigi N ら, Mol Cell 2006, 21(1), 97

Chen M ら, PNAS 2017, 114(19), 4954

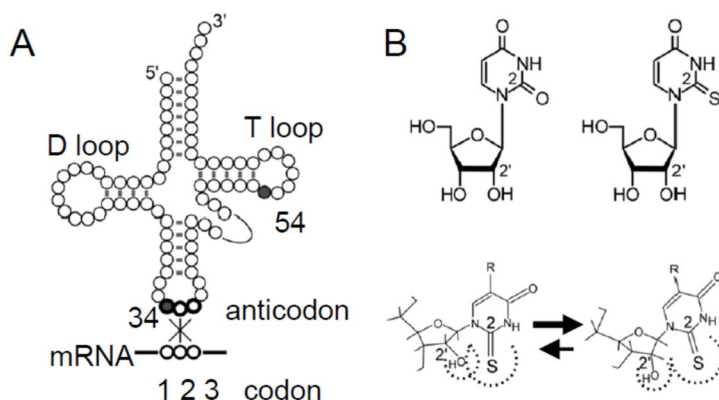


図 tRNA に存在する硫黄修飾塩基

- A. アンチコドン 34 位の硫黄修飾は正確なコドン認識に必須、54 位修飾は熱安定化に必要
B. (上) ウリジンと 2-チオウリジンの構造 (下) 硫黄化により C3'-endo 型が安定になる

2. 研究の目的

本研究は硫黄代謝に関する多様な現象 すなわち硫黄化合物の生合成・分解・恒常性維持を対象とし、硫黄の柔軟な反応性という特徴を最大限考慮し、その分子基盤を解明する。この本質的な特徴により、硫黄は生体内で多彩な形態で存在し、様々な働きを担っている。この硫黄の化学的性質に起因する生体内硫黄代謝の基盤原理の解明するため、生化学的手法と構造分光学的手法 (EPR/NMR 法など) を融合したアプローチにより解析し、硫黄化合物の生合成と分解、代謝的相互作用を統合的に理解することを目的とした。ここから硫黄修飾の代謝を支える共通基盤原理とその生物学的意義の理解を試みた。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌細胞内機能解析法

着目する RNA 硫黄修飾関連遺伝子について、native promotor とともに修飾関連遺伝子を挿入した低コピーベクターを作成し、ゲノム上の遺伝子を破壊した株を形質転換して相補系を構築した。関連遺伝子の機能解析をするため、変異導入したベクターも作成した。これらの相補株について、96 ウェルプレートを用いたハイスループット濁度経時自動計測による増殖速度の算出、LCMS による硫黄修飾塩基 s²U 含量の定量（東大工学系 鈴木研での測定）を行い、遺伝子産物の機能部位を解析した（代表者 産総研 嶋）。

(2) （無酸素下）試験管内硫黄転移反応解析法

大腸菌を宿主として、関連タンパク質因子を大量発現させ、アフィニティカラム等で精製した。基質となる tRNA については試験管内で転写合成し、ポリアクリルアミドゲルにより精製した。これらを緩衝液中で ATP や還元剤等と混合・一定時間保温することにより、硫黄転移反応を行った。酸素感受性の補因子を持つタンパク質や活性化硫黄を有する硫黄運搬タンパク質を用いるときは、酸素濃度を 2 ppm 以下に維持した嫌気実験装置内にサンプルを導入し、脱酸素したのち反応させた。反応液から RNA を回収・精製し、ヌクレオシドに分解した。ODS カラムを接続した HPLC 装置で修飾塩基を分離し、Photo Diode Array 検出器により同定・定量し、s²U の合成速度を算出した（代表者 産総研 嶋）。

(3) NMR による動的構造解析法

大腸菌を宿主として、EcMnmA の最小培地による大量発現を行った。40 KDa という分子量を考慮し、培地を重水で作成し、重水素化グルコースを添加することで、EcMnmA の完全重水素化を行った。また、NMR 観測のプロープとして Ile の 1 位に ¹H¹³C を特異的に導入した。EcMnmA は、アフィニティカラム、ゲルろ過などで精製を行った。また Ile を Val に置換したサンプルを併せて発現させ、同様に精製を行った。極低温高感度プロープを装備した 600 MHz NMR 装置を用いて、メチル基を高感度に観測するため HMQC スペクトルを測定した（分担者 東大 竹内）。

4. 研究成果

(1) 大腸菌由来硫黄タンパク質の機能解析

硫黄運搬タンパク質 EcTusE について、立体構造解析から予想される硫黄運搬タンパク質の構造上の特徴（東大薬学系 竹内研 徳永助教との共同研究により同定）が、実際に細胞内での硫黄転移過程に寄与しているかを数種類の変異体 TusE を用いて検討した。高コピーベクターを用いて相補系を構築したが、細胞内での過剰な発現や発現量のばらつきにより、この解析系の信頼性は低いと判断した。そのため、細胞内の存在量に近くなるよう、低コピーベクターと native promotor を用いた相補系を再構築した。この系で変異体発現株の性状（生育速度、硫黄修飾塩基 s²U 含量）を再現性よく定量解析することができた。この解析から、この細菌由来硫黄運搬タンパク質には、不安定な転移中間体（Cys108 上に形成される persulfide）を立体構造的に安定化することによって円滑な硫黄転移を実現する、という新奇的な仕組みが備わっていると考察した。

(2) 細菌由来 RNA 硫黄転移酵素の機能解析

RNA 硫黄転移酵素 MnmA（大腸菌および好熱菌由来）について、試験管内硫黄転移系を用い反応機構を解析した。系内の還元力・硫黄転移因子・鉄硫黄クラスターなどの依存性、酸素感受性の観点で、保存残基の変異体等を用いて、詳細に反応速度・反応回転などを検討した。EcMnmA は好熱菌 TtMnmA の約 1/17 という低い s²U 合成活性しか持たないことが判明した。

MnmA の酸素感受性、すなわち鉄硫黄クラスター依存性の違いをうみだす反応機構の差異について解明を試みた。好熱菌 MnmA の場合、酸素感受性の鉄硫黄クラスターが結合し、硫黄化反応に寄与する。大腸菌の場合、鉄硫黄クラスターの結合に必要な Cys 残基の 1 つが Asp になっており、鉄硫黄クラスターなしで硫黄化反応を行うとされている。しかしながら Cys と Asp の相互置換からは、酸素耐性の変換を示せなかった。さらに活性中心近傍の運動性の高い領域を置換した変異体を調製したが、顕著な活性がある変異体の取得には至っていない。

また EcMnmA の可動性が高いと予想される部位について、NMR 分光法を用いた動的な立体構造解析を行った（分担者 東大 竹内）。野生型の EcMnmA、Ile 変異体 2 種について部位特異的標識 EcMnmA を十分量調製することができた。EcMnmA は ATP 非添加条件ではすべてのシグナルが観測されなかったのに対して、2 mM ATP 添加時には期待される数（20 残基）だけのシグナルが観測された。このことは ATP 非添加で、EcMnmA がシグナルの広幅化を伴う多型を示す一方で、ATP 添加により分子全体の運動が抑制されたことを示している。また Ile 変異体を用いて、EcMnmA の特定部位の運動性とその ATP 依存性を推定した。また AlphaFold2 を用いて、硫黄転移複合体などの立体構造を予想した。

さらに大腸菌の遺伝子相補系を用いた、細胞内での機能解析系を構築し、その有用性を確認し

た(反応に必須と考えられる Cys 残基等の変異株では、MnmA 破壊株の遅い増殖速度や、s²U 修飾量の回復は見られなかった)。今後は、立体構造から予想される硫黄転移酵素の構造上の特徴が、実際に細胞内での硫黄転移過程に寄与しているか検討を進める予定である。

(3) その他の成果

硫黄修飾塩基の高感度選択的検出法の構築のため、好熱菌の硫黄修飾酵素 ThiI 遺伝子破壊株を提供し、共著論文を発表した(愛媛大との共同研究、文献)。

始原的な硫黄代謝系を保持していると考えられる超好熱性古細菌をモデルとし、その硫黄運搬タンパク質について、共同研究による機能解析を主導し論文を発表した(神戸大・東大・関西学院大との共同研究、共責任著者、文献)。外部環境の硫黄の量が多いときは、含硫黄補酵素や RNA 修飾の生合成に硫黄運搬タンパク質は不要であった。一方、外部環境に硫黄が少ないときは、硫黄運搬タンパク質が必須であった。このことから、硫黄運搬タンパク質を獲得することにより、柔軟で効率的な硫黄利用が促進され、これは始原菌が低硫黄環境に進出するために有利な形質であろうと推察した。

これまでは主に真正細菌由来の RNA 硫黄転移酵素を対象として研究を進め、大きく 2 つの酵素ファミリーに分けられることを見出している。進化的な反応機構の変遷に迫るため、より始原的な性質を保持していると考えられる、複数の古細菌の硫黄転移酵素の機能解析にも着手した。大腸菌による組換えタンパク質の調製法の確立と、試験管内硫黄転移反応検出系を確立した(東工大・東大との共同研究)。

< 引用文献 >

Sugio Y, Yamagami R, Shigi N, Hori H, RNA 2023, 29, 241

Hidese R, Ohira T, Sakakibara S, Suzuki T, Shigi N, Fujiwara S, mBio 2024, in press

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

不安定な硫黄転移中間体を硫黄運搬タンパク質 EcTusE 自身が立体構造的に安定化する機能をもっており、これにより円滑な硫黄転移を実現する、という新奇な仕組みがあるというオリジナルな結果を得た(論文執筆中)。硫黄転移を支えるひとつの重要な分子基盤を提案するものと考えている。

世界的には 4 グループ程度が、MnmA の反応機構の解明に取り組んでいる。現在 2 つの反応機構が予想されているが、グループ間の実験条件の違いなどもあり、整理されていない状況である。我々は動的な構造解析にもとづく生化学解析からリーズナブルな反応機構の提案を行いたい。

始原菌をモデルとし、硫黄運搬タンパク質の低硫黄環境における必要性を明らかにした。古代の硫黄リッチな環境に生息する生物は主に最終段階の(RNA)硫黄転移酵素のみをもつ未成熟な硫黄代謝系をもっていたが、硫黄運搬タンパク質を獲得することによって、低い濃度の硫黄を活用できるようになり、生存範囲の拡大につながった可能性を提案した。これは硫黄代謝系に関する全くオリジナルな進化的考察である。

さらに、硫黄塩基の簡便な検出定量法を開発し、研究コミュニティに有用なツールを提供した。

(なお、本課題開始時に予定していた、硫黄修飾塩基の分解系の解析については、海外のグループが先行している(分解酵素の同定及び構造解析を含めた反応機構の推定)、このため現状我々はあまり注力をしていない。)

(5) 今後の展望

今後は EcTusE 以外の多様な硫黄運搬タンパク質群の解析を進め、これらの仕組みが生体内での硫黄転移において共通的に重要な仕組みであるかどうか検証する。また RNA 硫黄転移酵素への硫黄の受け渡し、酵素内部での硫黄の移動経路についても解析を進める。

RNA 硫黄化酵素 MnmA は、マラリア原虫の生育に必須なアピコプラスト(基幹代謝系に關与する細胞内小器官)の維持や、マクロファージ内での結核菌の増殖に重要であることが報告されている。今後これらを含めた重篤な感染症等に対する抗生剤の開発など応用面での研究がさらに盛んになると思われる。またヒトにおいて硫黄修飾異常は、ミトコンドリア病、糖尿病、がん等の疾病発症の原因となることが相次いで報告されている。我々はその治療法の開発に資する基盤的情報を提供していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ryota Hidese, Takayuki Ohira, Satsuki Sakakibara, Tsutomu Suzuki, Naoki Shigi, Shinsuke Fujiwara	4. 巻 in press
2. 論文標題 Functional redundancy of ubiquitin-like sulfur-carrier proteins facilitates flexible, efficient sulfur utilization in the primordial archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugio Yuzuru, Yamagami Ryota, Shigi Naoki, Hori Hiroyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 A selective and sensitive detection system for 4-thiouridine modification in RNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 241 ~ 251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.079445.122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigi Naoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Biosynthesis and Degradation of Sulfur Modifications in tRNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11937 ~ 11937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋 直樹
2. 発表標題 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構に見出した酸素感受性の反応機構とその環境適応進化
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 嶋 直樹
2. 発表標題 tRNA 硫黄化酵素の酸素感受性の反応機構とその環境適応進化
3. 学会等名 遺伝研研究会「エピトランスクリプトーム制御の分子機構と生理機能」(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shigi Naoki
2. 発表標題 Discovery and characterization of oxygen-sensitive RNA-sulfurtransferases in <i>Thermus thermophilus</i> and its implication for the evolution of RNA modification enzymes
3. 学会等名 International Workshop on "Neotechnologies for ThermusQ initiative"
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徳永 裕二、嶋 直樹、竹内 恒
2. 発表標題 大腸菌由来tRNA硫黄修飾関連タンパク質TusEによる硫黄運搬の構造機構の溶液NMR解析
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 徳永 裕二、嶋 直樹、嶋田 一夫、竹内 恒
2. 発表標題 大腸菌由来tRNA硫黄修飾関連タンパク質TusEによる硫黄運搬の構造機構の溶液NMR解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigi Naoki
2. 発表標題 Biosynthesis and Functions of Sulfur Modifications of Transfer RNA
3. 学会等名 30th Tokyo RNA Club (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋 直樹、堀谷正樹、宮内 健常、鈴木 勉、姫野 美沙緒
2. 発表標題 酸素感受性の [4Fe-4S] クラスターを有するtRNA硫黄化酵素の機能解析とその環境適応進化機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 嶋 直樹	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 8
3. 書名 極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線 (第3編第3章第4節)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	堀谷 正樹 (Horitani Masaki) (80532134)	佐賀大学・農学部・准教授 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹内 恒 (Takeuchi Koh) (20581284)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関