

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570173

研究課題名(和文) 転移RNAの硫黄修飾塩基の生合成とその制御機構

研究課題名(英文) Characterization of biosynthesis and regulation mechanisms of sulfur-modification in tRNA

研究代表者

鳴 直樹 (Shigi, Naoki)

独立行政法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNAは転写後にスプライシングや修飾などのプロセッシングを経て成熟し機能を発揮する。本研究では立体構造の安定化やコドン認識に関わるtRNAの硫黄修飾塩基の生合成機構の解明を目的とした。本研究では好熱性細菌をモデル系として試験管内での硫黄化反応を再構成し、定量的に反応を解析した。まず硫黄化酵素TtuAには補酵素が結合し、それが酵素活性に重要であることがわかった。共同研究により補酵素の種類と状態を分光法により決定し機能を推定した。また変異TtuAタンパク質を用いて、補酵素やATPの結合と硫黄転移反応に必要な残基を特定した。以上の結果と立体構造情報から新規な反応機構を提案した。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modification of RNA is one of the important features of RNA molecules. In this study, the biosynthesis pathway of thiouridine found in tRNA of thermophilic bacteria was analyzed. An in vitro reconstitution system for tRNA thiolation reaction suitable for the quantitative analysis was constructed. By using this system and information of the three-dimensional structure of the thiolation enzyme, a novel reaction mechanism for the thiolation reaction was suggested.

研究分野：分子生物学・生化学

キーワード：核酸 タンパク質 tRNA RNA転写後修飾 酵素 硫黄転移反応 タンパク質翻訳後修飾 好熱菌

1. 研究開始当初の背景

tRNA には多数の転写後修飾が存在するが、なかでも硫黄修飾塩基は tRNA の機能に重要である。そのため RNA を硫黄化する機構は生命にとって欠くことができない。酸素原子が硫黄原子に置換されるという、一見単純に見える修飾反応は、多数の因子により達成されることが近年わかってきた。まず遊離システインの硫黄原子がシステイン脱硫酵素によりこの酵素上でペアスルフィド (R-S-SH) という活性化硫黄種となる。次いでこの活性化硫黄種が硫黄キャリアタンパク質間を転移され、修飾酵素 (tRNA 硫黄転移酵素) に渡される (活性化硫黄リレー系)。最後に修飾酵素が tRNA の標的塩基を活性化し、硫黄を導入する。

ほとんどの生物種で、硫黄修飾はコドン認識に寄与している。コドン 3 文字目が A が G である 2 コドンに対応する tRNA (Glu, Gln, Lys) 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 (2-チオ U) が存在する [図 1]。未修飾 U は、コドン 3 文字目の AGCU すべてと対合するが、硫黄修飾により A と G のみと対合するように制限され正しいコドン認識が可能になる。(なお塩基の 5 位も修飾を受け、同様の役割を果たす。) この 2-チオ U の生合成は生物種 (原核生物・真核生物) により二分される。

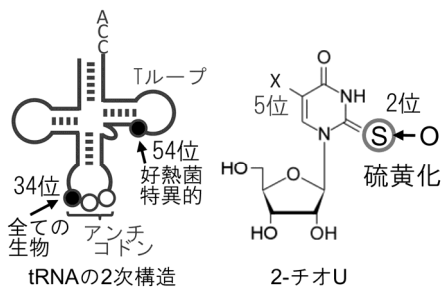


図1 本研究対象の硫黄修飾の位置と構造

原核生物では、システイン脱硫酵素により生成されたペアスルフィドが3つのキャリアタンパク質に順に受け渡され、最後に修飾酵素 MnmA によって tRNA に導入される [Ikeuchi Y, Shigi N ら, Mol Cell 2006]。立体構造解析によりその反応機構は詳細に理解されている [Numata T ら, Nature 2006]。一方、真核生物の細胞質 tRNA の場合は MnmA とは異なるファミリーの修飾酵素 Ncs6 が関与する。システイン脱硫酵素由来のペアスルフィドはキャリア 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) を形成する [Leidel S ら, Nature 2009]。その後 Ncs6 が Urm1-COSH の硫黄を tRNA に導入すると予想されている。

好熱性細菌にはアンチコドン以外にも tRNA の熱安定化に寄与する硫黄修飾がある。好熱菌の tRNA の 54 位は一部が硫黄化され 5-メチル 2-チオ U となっている [図 1]。高温環境で硫黄化 tRNA の割合が増え、硫黄化に

より tRNA の構造が安定化される [Yokoyama S ら, Adv Biophys 1987]。実際好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* で硫黄修飾を欠損させると高温で生育できなくなる [Shigi N ら, J Biol Chem 2006]。私は生合成遺伝子 (システイン脱硫酵素、TtuA, TtuB, TtuC) を同定し、試験管内で新規硫黄化反応系を解析した [図 2A 上段]。キャリア TtuB は TtuC によりそのカルボキシ末端がアデニル化された後、システイン脱硫酵素のペアスルフィド硫黄を受け取りチオカルボキシレートになる。そして TtuB-COSH の硫黄が硫黄化酵素 TtuA により tRNA に導入される [Shigi N ら, J Biol Chem 2006 (2 報), EMBO J 2008]。また TtuA には酸素感受性の補酵素が結合し、酵素活性に必要であることが示唆されている。

硫黄キャリア TtuB はユビキチン類似構造をもつ [図 2B,D]。ユビキチンは真核生物に普遍的に存在する翻訳後修飾タンパク質で、標的タンパク質の機能を調節し、細胞周期やシグナル伝達などの多彩な生命機能に関与する。ユビキチンは E1 酵素によりその C 末端がアデニル化され、ついで E1 酵素のシステイン残基とチオエステル結合する。最終的にユビキチンは E2 と E3 酵素を介して標的タンパク質に共有結合する [図 2C]。最初のアデニル化反応はユビキチンと TtuB で共通しており、E1 酵素と TtuC も相同性がある。そこで TtuB が翻訳後修飾因子としても働くのかを検討したところ、好熱菌内で TtuB が多数の標的タンパク質に共有結合していることが判明し [図 2A 下段]、TtuC と修飾酵素 TtuA が TtuB 化されていることがわかった [Shigi N, J Biol Chem 2012]。さらに TtuA の活性中心近傍の 3 か所の Lys 残基が TtuB 化されることを明らかにした。これは真正細菌でもユビキチン類似分子による翻訳後修飾がおこるという初めての発見である。TtuB 化はおそらく分解のシグナルではなく、脱ユビキチン化酵素ホモログの変異株では、TtuA と TtuC の TtuB 化状態が変化し、2-チオ U が半減することが判明した [Shigi N, J Biol Chem 2012]。つまり 2-チオ U 合成系が生合成因子の TtuB 化修飾により制御されている可能性を示唆している。

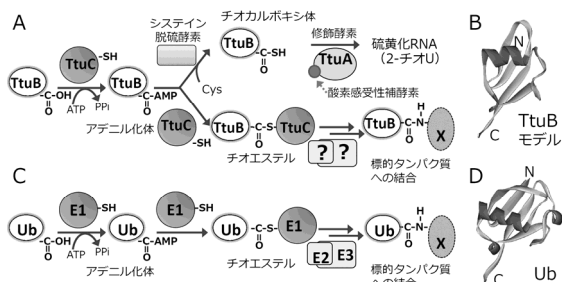


図2 A. 原核生物 (好熱菌) tRNA 硫黄化系 B. 好熱菌 TtuB の立体構造 C. 真核生物ユビキチン系 D. 真核生物ユビキチン(Ub)の立体構造

2. 研究の目的

比較的解析が進んでいないRNA 硫黄化反応の1つの代表的な系 チオカルボキシレートと修飾酵素 Ncs6/TtuA ファミリーが関与する系の分子基盤の解明をめざす。真核生物 Ncs6/Urm1 と好熱菌 TtuA/TtuB はそれぞれ相同タンパク質であり、真核生物でも Urm1 による生合成因子の翻訳後修飾が報告されている [Van deer Veen AG ら, PNAS 2011]。

そこで本研究では好熱菌 *T. thermophilus* をモデルに、生合成因子間の硫黄転移と修飾酵素 TtuA による tRNA への硫黄導入を解析し、反応の制御の可能性について検証する。具体的には、複数の生合成因子の硫黄の授受への関与を解析する。また修飾酵素 TtuA による tRNA の活性化、硫黄導入機構について、酸素感受性補酵素の働きに着目し明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試験管内での硫黄化反応解析法

先行研究により試験管内反応の再構成系を構築しているが、定量性と再現性に問題がある。好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* の tRNA 硫黄化修飾に関与するタンパク質 4 種 (SufS, TtuA, TtuB, TtuC) を大腸菌で大量発現、精製した。TtuA については精製の過程で大部分が酸素により不活性化してしまうので、好気下での精製後に無酸素チャンパー内で再活性化させる。無酸素チャンパーを新規に導入し、安定に運用する手法を検討した。この装置内で反応条件を検討することにより、再現性の高い tRNA 硫黄化反応の再構成系を構築した。

反応後にフェノール抽出とエタノール沈殿により tRNA を回収し、ヌクレアーゼ P1/アルカリフォスファターゼ処理によりヌクレオシドに分解した。このサンプルを逆相 HPLC により分離し、硫黄修飾塩基の量を定量した。

(2) 放射性同位元素を用いた反応解析法

上記で構築した無酸素チャンパーは通常の実験室に設置しているため、放射性同位元素を用いた実験を行うことができない。そのため、放射性同位元素使用施設内にも簡易的な無酸素チャンパーを設置しセットアップした。

4. 研究成果

(1) tRNA 硫黄化酵素 TtuA の反応機構の推定 (菌体内硫黄化活性評価系による)

横山茂之 上席研究員のグループ (理化学研究所) が決定した好熱菌 tRNA 硫黄修飾酵素 TtuA の構造をもとに、活性部位の 3 つの保存されたシステイン残基や ATP 結合部位と

推定される部位について、菌体内での TtuA 変異体解析を共同研究により行った。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 菌体内の相補系を構築して解析し、ATP 結合部位や 3 つのシステイン残基などがいずれも硫黄修飾反応に重要であることが明らかになった (上記内容の主要な実験に関しては、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・改定を行い、共責任著者として *Proteins* 誌に発表した)。

(2) 迅速試験管内反応解析法の構築

迅速かつ再現性の高い試験管内反応解析法を確立した。まず無酸素チャンパーを新規に立ち上げ、安定して無酸素状態 (酸素濃度 50 ppm 以下) で実験できる環境をセットアップした。水素ガスとパラジウム触媒により、残存する酸素を水にして除去するしくみである。水素濃度、触媒交換の頻度、湿度管理、使用する試薬とマイクロチューブの脱酸素の方法などについて検討した。(千田俊哉 高エネルギー加速器研究機構 教授らの助言を頂いた。)

放射性同位元素使用施設内にも簡易的な装置を設置した。上記のようにパラジウム触媒は使用せず、単純にアルゴンガスで装置内を置換するしくみである。残存する酸素は 500 ppm 程度であり上記の装置に比べると嫌気度は低いが、数時間の実験には十分な低酸素状態を保つことができる。

また硫黄修飾塩基の HPLC による定量法については、既存の HPLC システムにオートサンブラとカラムオープンを導入し、さらに送液グラジエントプログラムの最適化により、短時間かつ再現性の高い定量法を確立した。また数日間自動で測定が可能になった。

(3) 硫黄化反応の基礎的解析

上記で確立した手法を用いて硫黄修飾反応の基礎的な性質について定量的に解析した。まず修飾酵素 TtuA には補酵素が結合し、それが酵素活性に重要であることがわかった。また ATP 要求性も確認した。さらに 35S 標識システインを基質に用いた反応では tRNA に 35S が取り込まれることが確認された。

また TtuB-COSH を基質として用いて、量論的に硫黄修飾塩基が生合成されることがわかった。(TtuB-COSH はインティン発現系を用いて発現系を設計し、田中良和 北海道大学准教授にサンプル提供して頂いた。)

さらに硫黄原子の転移に関与する一群の生合成因子の硫黄化反応に与える影響を定量的に解析した。全ての因子が揃った条件下、硫黄化反応が効率的におこることが明らかになった。

(4) 分光法による補酵素のスペクトル測定

無酸素下で再活性化した TtuA サンプルを用いて、無酸素チャンパー内に設置した紫外-可視分光装置でスペクトルを測定した。ま

た東北大学 齋藤教授との共同研究により電子常磁性共鳴分光法により測定し、TtuA に結合している補酵素のスペクトルを得ることができた。

(5) TtuA の機能解析

変異 TtuA タンパク質を用いて、補酵素や ATP の結合と硫黄転移反応に必要な残基を特定した。(変異体 TtuA の一部については田中良和 北海道大学 准教授に提供して頂いた。) 補酵素の結合に必要な残基の変異体では、補酵素の結合が低下し、硫黄化活性も著しく低下した。ATP 結合モチーフの変異体もやはり顕著な活性の低下がみられた。

さらに 32P 標識 ATP 等を用いた実験から tRNA が活性化中間体を経て硫黄化されることが推定された。以上の結果と立体構造情報から新規な反応機構を提案した。反応に重要な残基は生物間で保存されており、生物間で共通のメカニズムであると考えられる。

(6) まとめと今後

RNA 硫黄修飾の一つの代表的な系の詳細を明らかにした。他の硫黄化系との比較から、生体内の硫黄化合物の生合成機構に共通する原理を考察し、国際誌総説と日本語解説 2 報を発表した。今後は、今回明らかにした生合成機構をもとにして、その制御機構の分子基盤を明らかにしたい。

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4件)

嶋 直樹、コピキチン修飾系の起源は RNA の硫黄修飾系?、生物工学会誌、査読無、Vol. 92、p.364、2014、

http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9207/9207_biomed_4.pdf

嶋 直樹、Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA、Frontiers in Genetics、査読有、Vol.5 (67)、pp.1-11、2014、DOI: 10.3389/fgene.2014.00067

嶋 直樹、好熱性真正細菌における tRNA 硫黄修飾塩基とコピキチン類似翻訳後修飾、バイオサイエンスとインダストリー、査読無、Vol.71、pp.146-149、2013、http://www.jba.or.jp/pc/archive/2013/vol171_no2.html

中川 裕文、倉谷 光央、伊藤(後藤) 桜子、伊藤 拓宏、桂 一茂、寺田 貴帆、白水 美香子、関根 俊一、嶋 直樹、横山 茂之、Crystallographic and mutational studies on the tRNA thiouridine synthetase TtuA、Proteins、査読有、Vol.81 (7)、pp.1232-1244、2013、DOI: 10.1002/prot.24273

[学会発表](計13件)

陳 明皓、奈良井 峻、大村 直毅、田中 良和、嶋 直樹、田中 勲、姚 閔、Elucidating of the novel tRNA posttranscriptional modification mechanism、2nd International Life-Science Symposium、2014/10/23、北海道大学(北海道・札幌市)

中川 裕文、倉谷 光央、伊藤(後藤) 桜子、伊藤 拓宏、桂 一茂、寺田 貴帆、白水 美香子、関根 俊一、嶋 直樹、横山 茂之、好熱菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構、第 87 回日本生化学会大会、2014/10/18、京都国際会議場(京都府・京都市)

嶋 直樹、原核生物のコピキチン類似翻訳後修飾現象の機能解析、LS-BT 合同研究発表会、2014/2/18、産業技術総合研究所(茨城県・つくば市)

中川 裕文、倉谷 光央、伊藤(後藤) 桜子、伊藤 拓宏、桂 一茂、寺田 貴帆、白水 美香子、関根 俊一、嶋 直樹、横山 茂之、好熱菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構、第 14 回極限環境生物学会年会、2013/10/26、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

嶋 直樹、tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構とコピキチン類似翻訳後修飾、第 86 回日本生化学会大会、2013/9/12、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

嶋 直樹、真正細菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成における コピキチン類似翻訳後修飾の発見、LS-BT 合同研究発表会、2013/2/5、産業技術総合研究所(茨城県・つくば市)

嶋 直樹、Post-translational modification of cellular proteins by a ubiquitin-like protein in tRNA thiouridine synthesis in Bacteria、XXIV tRNA conference、2012/12/4、Olume (Chile)

嶋 直樹、真正細菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成における コピキチン類似翻訳後修飾の発見とその機能、第 13 回 極限環境生物学会年会、2012/12/1、日本大学文理学部(東京都・世田谷区)

嶋 直樹、真正細菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成におけるコピキチン類似翻訳後修飾の発見とその機能、第 14 回 日本 RNA 学会年、2012/7/19、東北大学(宮城県・仙台市)

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/brd/jp/groups/groups.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

嶋 直樹 (Naoki SHIGI)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号: 20392623