

平成21年 5 月 7 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007 ~ 2008
課題番号：	19570140
研究課題名(和文)	酵母における2チオ修飾 tRNA と鉄硫黄クラスターへの硫黄分配
研究課題名(英文)	Thio-modification of Yeast Cytosolic tRNA Requires a Ubiquitin-related System That Resembles Bacterial Sulfur Transfer Systems.
研究代表者	
	中井 由実 (Nakai Yumi)
	大阪医科大学・医学部・講師
	研究者番号： 80268193

研究成果の概要：

酵母サイトゾル tRNA のチオ修飾は、ミトコンドリア tRNA のチオ修飾と異なり、サイトゾルでの鉄硫黄クラスター形成タンパク質群を必要とすることをまず明らかにし、次に、それ以外に、これまで、機能不明であったユビキチン様タンパク質 Urm1 と E1 タンパク質様の Uba4 を必要とすることを、申請者は明らかにした。さらに Urm1、Uba4 を介する硫黄運搬はユビキチンのタンパク質修飾系と同じく Urm1 の末端グリシンを必要とし、Urm1 存在下で Uba4 が硫黄を付加されることを見だし、ユビキチン様修飾経路でサイトゾル tRNA へ硫黄が運搬されることを示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,900,000	570,000	2,470,000
20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学、生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：tRNA 修飾 酵母 ミトコンドリア サイトゾル 鉄硫黄クラスター
システインでスルフラゼ 硫黄 バクテリア

1. 研究開始当初の背景

tRNA の翻訳後チオ修飾にはシステインでスルフラゼが関与するが、特に真核生物ではミトコンドリアのシステインでスルフラゼ

を使ってどのようにしてサイトゾル tRNA の硫黄修飾を行うのかに関しての知見は全く得られていない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、tRNA や鉄硫黄クラスターなどの含硫分子への硫黄の運搬、分配機構の解明である。そのために、酵母 tRNA への硫黄付加と鉄硫黄クラスター形成との関連に関するこれまでの成果と知見を踏まえ、まず、特に鉄硫黄クラスター形成に関与するタンパク質を利用するサイトゾルの tRNA_{U34} の 2 チオ修飾に着目し、その各過程に関与するタンパク質を同定し、酵母（真核生物）と大腸菌（原核生物）における tRNA_{U34} の 2 チオ修飾の違いを明らかにする。さらに、tRNA・鉄硫黄クラスターのそれぞれに硫黄を付加する酵素への硫黄供給の調節を解析する手がかりを得るために、硫黄付加酵素の反応経路を明らかにする。

3. 研究の方法

酵母非必須遺伝子破壊株、あるいはタンパク質枯渇株を用いて、チオ修飾 tRNA を硫黄の修飾を受けていない tRNA と効率よく分けてノザン法で検出する方法 (APM ノザン法) で、これらの遺伝子がサイトゾル tRNA のチオ修飾に関わることを見いだした。さらに、酵母での遺伝子相補系、大腸菌でのタンパク質発現系を作り、in vivo、in vitro での tRNA チオ修飾関連のタンパク質の機能解析を行った。

4. 研究成果

まず、サイトゾルの鉄硫黄クラスター形成にも硫黄が運搬される必要があることから、これらに関わることが知られている、必須タンパク質 Cfd1, Nbp35, Cia1 が酵母 tRNA のチオ修飾にも必要かどうかを APM ノザン法で解析した。その結果、いずれも、ミトコンドリア tRNA のチオ修飾には必要ないが、サイトゾル tRNA のチオ修飾には必須であることが

明らかになった。次に、これらのうち、Cfd1、Nbp35 が核酸結合に関わる P-loopNTPase モチーフを持つことに着目し、同じく P-loopNTPase 様非必須タンパク質 Ncs2, Ncs6 も、tRNA チオ修飾に関わることを見いだした。さらに、Tuc1 (Ncs6), Tuc2 (Ncs2) の欠損株が、いずれも、特有の形態変化（偽菌糸形成）を呈する、と報告されていることに着目し、同様のフェノタイプを示す遺伝子 URM1, UBA4, EPL3 等の遺伝子欠損株の APM ノザン解析から、Tuc1, Tuc2 に加えてユビキチン様タンパク質 Urm1, E1 様タンパク質 Uba4 がサイトゾル tRNA のチオ修飾に関与することを明らかにした。（図 1）

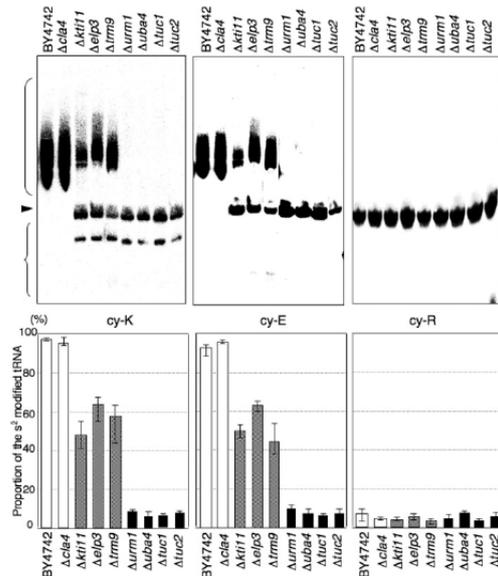
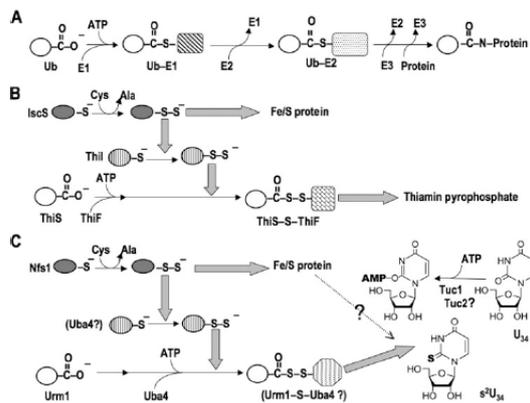


FIGURE 1. Gel retardation analysis coupled with Northern hybridization. The 5' modification of total tRNAs was examined by APM-Northern analysis with specific DNA probes against cy-tRNA^{Phe} (cy-K), cy-tRNA^{His} (cy-E), and cy-tRNA^{Arg} (cy-R) (upper panels). Parenthesis and arrowhead indicate corresponding tRNAs with and without the 5' modification. The brace indicates smaller degradation products of the unmodified form. Proportions of the 5'-modified tRNAs were plotted (lower panels) as a bar graph representing the average values obtained from three independent experiments. Error bars represent the ranges of values of the three independent experiments.

図 1 Urm1, Uba4, Tuc1, Tuc2 は酵母サイトゾル tRNA のチオ修飾に必要である。

また、申請者は、in vivo での遺伝子相補の解析から、Urm1 末端のグリシン残基が必要であること、in vitro の解析から、Uba4・Urm1 の両方があって初めて Uba4 が硫黄修飾されることを示した。また、U34 の 5 位のメチル修飾に関わる遺伝子 Trm9, Kti11 の遺伝子破壊

壊株を用いた APM ノザン解析から、5 位と 2 位の修飾はお互いに関連していると考えられる結果を得た。そして、Urm1 と Uba4 の作用機序が、バクテリアにみられる含硫コファクター(チアミンやモリブデンコファクターなど)の生合成経路と、真核生物のもつユビキチン様タンパク質修飾経路の双方に類似点をもつことを明らかにした。(図 2)



(図 2) 酵母サイトゾルの tRNA チオ修飾はバクテリアの硫黄付加反応に似た、ユビキチン様硫黄運搬システムによって行なわれる、A 真核生物のユビキチンシステム B 原核生物のチアミン生合成経路における硫黄運搬システム C 酵母サイトゾル tRNA のチオ修飾経路

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 2 件)

(1)

Nakai, Y., et. al.

Thio-modification of Yeast Cytosolic tRNA Requires a Ubiquitin-related System That Resembles Bacterial Sulfur Transfer Systems.

Journal of Biological Chemistry(査読有)

283(41) 27469-27476 (2008)

(2)

Nakai, Y., et. al.

Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway.

Molecular and Cellular Biology (査読有)
27(8) 2841-2847 (2007)

[学会発表] (計 4 件)

(1)

中井由実 他

酵母における 2 チオ修飾 tRNA と鉄硫黄クラスターへの硫黄分配

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008)

2008 年 12 月 9 日～12 日

神戸ポートアイランド (日本)

(2)

中井由実 他

酵母 tRNA の 2 チオ修飾と鉄硫黄クラスター形成経路の関係

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)

2007 年 12 月 11 日～15 日

パシフィコ横浜 (日本)

(3)

Nakai, Y., et. al.

The 2-thio modification of cytosolic tRNA is Fe/S protein-dependent and required both CIA and ISC Machineries in Yeast.

13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry

July 15th-20th 2007

University of Vienna (Austria)

(4)

Nakai, Y., et. al.

The 2-thio modification of cytosolic tRNA

is Fe/S protein-dependent and required both CIA and ISC Machineries in Yeast.

4th International meeting on “Biogenesis of Iron-Sulfur Proteins: Cluster Assembly and Regulation”

July 9th-12th 2007

Villard de Lans (France)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 由実 (Nakai Yumi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 80268193