

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 26 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21570150
研究課題名（和文）	ミトコンドリアから運搬されサイトゾル含硫小分子に使われる硫黄の運搬経路の解明
研究課題名（英文）	Investigation of a cytosolic sulfur transfer pathway for tRNA thio-modification and biosynthesis of sulfur-containing molecules.
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（和文）：申請者は、本研究において、サイトゾルでの硫黄運搬の中心となるタンパク質 Uba4 のロダネース部位が硫黄の授受に重要な役割を果たすこと、この部位が真核生物における硫黄運搬に特有であることを明らかにした。また、Uba4 が硫黄を受け渡す Urm1 はユビキチン様タンパク質(Ub1)であるがこれは、共通の β grasped structure と、C 末端にグリシン残基を有することが特徴である。申請者は、サイトゾルでの硫黄運搬に関わる酵母 Uba4 と Urm1 においても、この Ub1 特有のカルボキシル末端のグリシンへのチオカルボキシル基形成が、その後ターゲットとなる分子に硫黄を付加するのに必須であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）： We found that ubiquitin-like protein Urm1 and ubiquitin-activating enzyme-like protein Uba4 were strictly required for the s2 modification. The carboxyl-terminal glycine residue of Urm1 was critical for the s2 modification, indicating direct involvement of the unique ubiquitin-related system in this process. We also demonstrated that the s2 and mcm5 modifications in cytosolic tRNAs influence each other's efficiency. Taken together, our data indicate that the s2 modification of cytosolic tRNAs is a more complex process that requires additional unidentified components.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：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 硫黄修飾 酵母 ミトコンドリア サイトゾル 鉄硫黄クラスター システインデスルフララーゼ

1. 研究開始当初の背景

酸素と同族の第三周期の元素である

「硫黄」は、生体に不可欠な微量元素の一つで、タンパク質構造の保持や酸化還元反応に利用される以外に、チアミン・ビオチン・モリブデンコファクターなどの『含硫コファクター』や、鉄と結合した『鉄硫黄クラスター』の構成成分として存在し、また『硫黄修飾 tRNA』としても存在する。特に tRNA^{UUU}(Lys)や tRNA^{AUC}(Glu)のアンチコドン一番目(wobble 位)のウリジンの硫黄修飾は、翻訳効率の維持に寄与する。

サイトゾルの鉄硫黄タンパク質形成にはミトコンドリアの硫黄供給酵素 Nfs1 とサイトゾルの CIA タンパク質群が必要である。一方、サイトゾルの硫黄修飾 tRNA (cy-tRNA) の生成にも、ミトコンドリアの Nfs1 とサイトゾルの CIA タンパク質群がいくつかのタンパク質が必要である事が知られている。一方、しかしながら、ミトコンドリアからの硫黄の運搬経路やサイトゾル内での cy-tRNA への硫黄運搬・付加の全容は明らかではない。特にミトコンドリア Nfs1 は、基質システインから硫黄原子を切り出して相手方の分子に受け渡す機能を持ち、その分配先の小分子によって受け渡し先の経路が異なるが、酵母ではミトコンドリア tRNA の硫黄修飾やミトコンドリア内の鉄硫黄クラスターへのみならず、サイトゾルの鉄硫黄クラスターや修飾される cy-tRNA へもの供給される。しかしながら Nfs1 が供給する硫黄が、これらのサイトゾルの含硫小分子の生合成過程でどのよ

うに運搬されるか、また、どのように分配されるかについて

その機構は不明である。これらの知見をふまえ、硫黄の細胞内分配、運搬が、細胞内オルガネラー細胞質間でどのように行われているかを明らかにするためには、まず、細胞内のそれぞれの硫黄運搬タンパク質の構造と硫黄運搬という機能の相関関係を明らかにする事が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、「真核生物における、生体内含硫小分子への硫黄運搬・分配機構の解明」という全体構想の一環として行われるものである。ミトコンドリアに存在する硫黄供給酵素 Nfs1 から硫黄原子の供給を受けるサイトゾルの様々な含硫小分子の中でも、特にリジンまたはグルタミン酸をコードするサイトゾル tRNA (cy-tRNA) に硫黄を運搬する機構の解明、また、同じく Nfs1 に由来する硫黄を構成成分として保持する、サイトゾルの鉄硫黄クラスターへの硫黄運搬経路との関連の解明を目的とするものである。

3. 研究の方法

申請者はパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、ミトコンドリア、サイトゾル双方における、鉄硫黄クラスターと硫黄修飾 tRNA の形成に関わる遺伝子の変異株を多数作製した。これらの遺伝子変異株にたいして、様々な変異を導入した遺伝子の機能相補実験を行い、硫黄運搬能力やタンパク質の性質をかいせきすることによって、目的とするタンパク質の機能

と構造相関を解析した。

4. 研究成果

申請者は、硫黄供給酵素 Nfs1 から硫黄原子の供給を受けるサイトゾルの tRNA と鉄硫黄クラスターへの硫黄運搬経路の解明をめざし、硫黄運搬タンパク質 Uba4 の生理機能解明を通して、サイトゾル内での硫黄運搬経路、ならびにミトコンドリアからサイトゾルへの硫黄運搬経路を明らかにすることを本研究課題に掲げている。その解析の中心となるタンパク質 Uba4 は、MoeB ドメインと呼ばれる ATP アデニル化活性部位と硫黄付加に関わるロダネース部位を持ち、双方が硫黄の受取、硫黄付加タンパク Urm1 への受け渡しに必要であると考えられる。そこで、まず、酵母のサイトゾル tRNA への硫黄付加の初期段階に関わると考えられる、非致死遺伝子 UBA4 の欠損株に、部位特異的変異を導入した Uba4 タンパク質を発現させた株を複数種類作成し、それぞれの変異 Uba4 の tRNA チオ修飾能力の回復の程度を解析した。この結果、Uba4 の二つのドメイン構造がともに tRNA チオ修飾には必要であることが明らかとなった。これにより Uba4 の硫黄付加に関わるロダネース部位が硫黄の受取、硫黄付加タンパク Urm1 への受け渡しに必要であることを明らかにした。次に、Uba4 が硫黄を受け渡す先となっている Urm1 などのタンパク質についての解析に着手した。Urm1 はユビキチン様タンパク質(Ub1)で、Ub1 特有のカルボキシル末端のグリシンへのチオカルボキシル基形成が、その後、ターゲットとなる分子に硫黄を付加するのに必須であることから、他の Ub1 タンパク質に比べて Urm1 に特徴的な部位を予測し Uba4 に対するアフィニティ

を解析した。真核生物にはユビキチン以外にも多種類の Ub1 タンパク質が存在し、いずれも、 β grasped structure と、C 末端にグリシン残基を有することが特徴である。この C 末端グリシン残基は、例えばユビキチンの場合は相手方タンパク質システイン残基の硫黄原子との間にチオカルボキシル結合を作ることによって両者が反応するために、重要である。申請者らは、サイトゾルでの硫黄運搬に関わる酵母 Uba4 と Urm1 においても、この Ub1 特有のカルボキシル末端のグリシンへのチオカルボキシル基形成が、その後ターゲットとなる分子に硫黄を付加するのに必須であることを見いだした。他の Ub1 タンパク質との比較も踏まえ、Urm1-Uba4 間の機能-構造相関関係についても新たな知見を得ている。

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. Kohbushi H, Nakai Y, Kikuchi S, Yabe T, Hori H, Nakai M. Arabidopsis cytosolic Nbp35 homodimer can assemble both [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in two distinct domains. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jan 23;378(4):810-5. PubMed PMID: 19084504.

[学会発表] (計 5 件)

1. 中井由実・原田明子・橋口康之・中井正人・林秀行 (口頭発表・ポスター)
tRNA 修飾に関与するユビキチン様 (UBL) タンパク質・ユビキチン活性化タンパク質

様 (UBA) タンパク質の機能相関と、その酵母オルソログとの関係の解析.

第 84 回日本生化学会大会 (2011) 京都国際会館 (日本) (H23. 9. 20)

2. Yumi Nakai · Akiko Harada · Yasuyuki Hashiguchi · Takeshi Murakawa · Masato Nakai · Hideyuki Hayashi (oral presentation)

Proteins required for thio-modification of tRNAs participate in the biosyntheses of sulfur-containing cofactors.

The Third International Conference on Cofactors 03 (ICC-03) (2011) Univ. of Turku (Finland) (H23 7.12)

3. Yumi Nakai · Masato Nakai · Hideyuki Hayashi (poster)

Cytosolic thio-modification of the wobble uridine in cytosolic tRNAs requires a ubiquitin-like protein Urm1 and an E1-like protein Uba4.

The 16th Annual Meeting of the RNA & Society and The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting 2011. (2011) International Conference Center of Kyoto (Japan) (H23. 6. 16)

4. 中井由実 · 中井正人 · 林秀行 (口頭発表 · ポスター)

酵母 Urm1-Uba4 は酵母サイトゾル tRNA の硫黄修飾に必要なタンパク質修飾系 (UBL-UBA) である。

- BMB2010 (第 32 回日本分子生物学会年会 · 第 83 回 日本生化学会大会合同) (2009) 神戸ポートアイランド (H22. 12. 10)

5. 中井由実 · 中井正人 · 林秀行 (ポスター)

酵母の鉄硫黄クラスター生合成と tRNA 硫黄修飾の関連について

- 第 82 回 日本生化学会大会 (2009) 神戸ポートアイランド (日本) (H21. 10. 23)

[図書] (計 1 件)

1. 中井正人、中井由実
無敵のバイオテクニカルシリーズ 改訂第 4 版タンパク質実験ノート (上) タンパク質をとり出そう (抽出・精製・発現編), タンパク質の抽出法 1-3 酵母
pp. 53-58. 羊土社 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件) [その他]

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/med/index.htm>

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