

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 6日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770140

研究課題名（和文） 転移RNAの硫黄修飾システムの解明

研究課題名（英文） Characterization of the biosynthesis system for thiouridine in tRNA

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（和文）：

好熱性真正細菌の tRNA を耐熱化する硫黄修飾塩基の生合成機構を解析した。組換えタンパク質のみを用いて試験管内での硫黄化反応の再構成に成功した。また好熱菌内で反応を解析し、硫黄化酵素 TtuA の反応機構を推定した。さらに生合成因子の一つ TtuB が翻訳後修飾因子としても働き、tRNA の硫黄化を制御していることが示唆された。これは原核生物（真正細菌）の新規なタンパク質機能制御機構であり真核生物ユビキチン系の祖先系であると考えられ興味深い。

研究成果の概要（英文）：

The biosynthesis pathway of thiouridine found in tRNA of thermophilic bacteria was analyzed. An *in vitro* reconstitution system for tRNA thiolation reaction was constructed. By using an *in vivo* system, a reaction mechanism for the thiolation enzyme TtuA was suggested. It was suggested that one of the biosynthesis protein, TtuB, also function as a protein modifier, which regulates the thiolation reaction of tRNA. This suggests an ancient origin of the eukaryotic ubiquitin system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：核酸、タンパク質、酵素、微生物

1. 研究開始当初の背景

tRNA には多数の転写後修飾塩基が存在するが、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のできない機構である。酸素原子が硫黄原子に置換されると、一見単純に見える修飾反応は、多数の因子の関与する3段階で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キャリアタンパク質間を転移され、最終的に修飾酵素に渡される（活性化硫黄リレー系）。最後に修飾酵素が tRNA に結合し、標的塩基に硫黄を導入すると推定されている。

ほぼすべての生物種で、硫黄修飾塩基はコドン認識に寄与している。コドン3文字目が

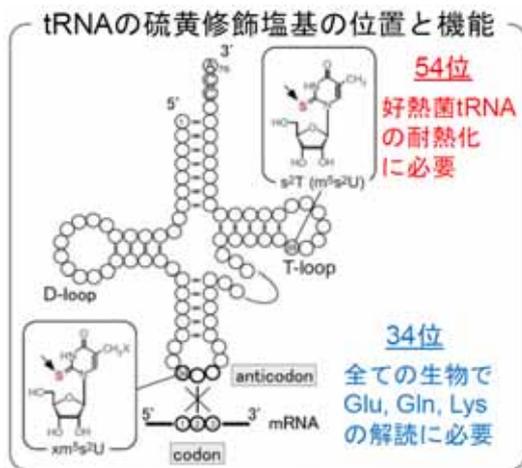


図 1

Aか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) には硫黄修飾塩基 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 2 種類に大別できる。

原核生物では、システイン脱硫酵素と修飾酵素 MnmA が関与することが知られていた。私は、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キャリアタンパク質 TusA, TusBCD 複合体, TusE の順に受け渡され、最終的に MnmA によって tRNA に導入されるという、活性化硫黄リレー系があることを明らかにした [Ikeuchi Y, Shigi N ら, Mol Cell 2006] (東大 鈴木 勉教授との共同研究)。この系に関しては立体構造解析に基づき反応機構が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を形成する (カルボキシル基の酸素が硫黄に置換された活性化硫黄種: R-CO-SH) [Leidel S ら, Nature 2009]。その後 Ncs6 が Urm1-CO-SH の硫黄を tRNA に導入すると予想されているが証明はされていない。

さらに好熱性細菌には tRNA の別の位置にも tRNA の熱安定化に寄与する硫黄修飾塩基が存在する。常温生物では、54 位は 5-メチルウリジン (5-メチル U) であるが、好熱菌の tRNA では一部硫黄化され、5-メチル 2-チオU となっている (図 1)。高温環境では硫黄化 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]。Thermus thermophilus でこの硫黄修飾を欠損させると高温で生育できない [Shigi N ら, J Biol Chem 2006a]。私は 2-チオU 生合成遺伝子を 5 つ (システイン脱硫酵素 (IscS と SufS)、TtuA, TtuB, TtuC) 同定し、硫黄化反応を試験管内で再構成することにより新規活性化硫黄リレー系を解析した。キャリア TtuB は活性化酵素 TtuC により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。そして低い効率ではあるが TtuB-CO-SH の硫黄が修飾酵素 TtuA により tRNA に導入されることを示した [Shigi N ら, J Biol Chem 2006a, b, EMBO J 2008]。

ユビキチンは真核生物にのみ普遍的に存在する翻訳後修飾タンパク質であり、標的タンパク質に結合してその機能を調節し、細胞周期やシグナル伝達などの多彩な生命機能に關与する。しかし私は原核生物にも同様のタンパク質修飾がある可能性に気付いた。上記の好熱菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成には TtuB と TtuC

という真核生物ユビキチンとその活性化酵素に類似したタンパク質が関与しており [Shigi N ら, EMBO J 2008]、TtuB がタンパク質翻訳後修飾因子として働いている可能性がある (図 2,3)。

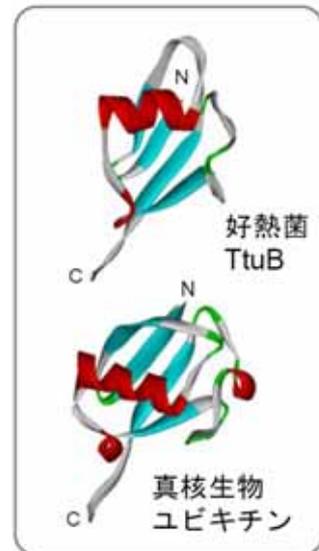


図 2

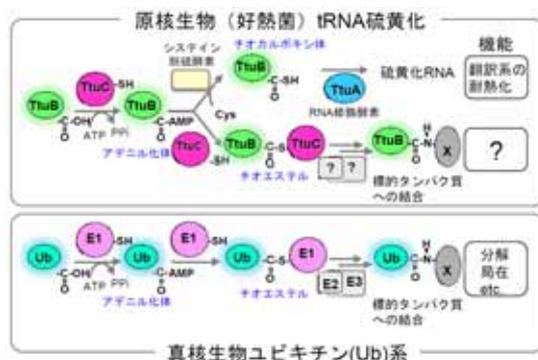


図 3

2. 研究の目的

本研究では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、両者の硫黄修飾系は共通の起源と反応機構をもつ系であると考えられる。そこで本研究では好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* の系をモデルとして用いて、tRNA への硫黄導入機構を解析する。さらに原核生物におけるユビキチンに類似したタンパク質翻訳後修飾現象の存在の確認とその機能解析をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 試験管内 tRNA 硫黄化反応の再構成

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不活性化してしまうことが判明したので、精製後に再活性化させる手法を確立した。反応条件 (反応溶液の組成、温度など) を検討することにより、高効率な tRNA 硫黄化反応の再構成系を構築した。反応後 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、逆送 HPLC により硫黄修飾塩基の量を定量した。

(2) 好熱菌内 tRNA 硫黄化の解析系の構築

好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* の tRNA 硫黄化修飾塩基の生合成は多数のタンパク質が関与する複雑な系である。それらのタンパク質の機能に重要なアミノ酸残基を簡便に同定するために、生合成タンパク質の変異体を好熱菌内で発現させ、その株の tRNA の硫黄修飾塩基の量を定量する系を構築した。

強力なプロモーターを含む薬剤耐性遺伝子の下流にリボソーム結合サイト (SD 配列) を含む目的遺伝子を配置した好熱菌内で複製可能なプラスミドベクターを作成した。必要に応じて生合成タンパク質に変異を導入した。生合成遺伝子破壊株を上記発現プラスミドで形質転換し、変異体発現株を作成した。これらの株から tRNA を抽出し (1) と同様の方法で tRNA 中の硫黄修飾塩基の量を定量した。

(3) 好熱菌内 TtuB 翻訳後修飾の解析

好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* のタンパク質の翻訳後修飾因子 TtuB や TtuA、TtuC に対する特異抗体をもちいて、好熱菌内において TtuB によるタンパク質翻訳後修飾現象について検討した。多種の好熱菌変異株

を作成して、ウエスタンブロット、免疫沈降、質量分析装置を使用して、翻訳後修飾の化学形態、修飾のおこるしくみについて解析した。また、脱翻訳後修飾タンパク質を同定することにより、この翻訳後修飾の機能についても解析を行った。

4. 研究成果

(1) 高効率試験管内 tRNA 硫黄化反応の再構成

これまでの構築してきた試験管内 tRNA 硫黄化反応系 [Shigi *N*ら, EMBO J 2008] では、組換えタンパク質以外に好熱菌の細胞抽出液の添加が必要であった。また基質 tRNA の 1% 以下しか硫黄化がおこらず、放射性同位元素をもちいたトレーサ実験が必要であった。そこで種々の改良試みた結果、組換えタンパク質のみをもちいて、基質 tRNA の 90% 以上が硫黄化される系の構築に成功した。今後はこの系をもちいてより詳細に硫黄化反応について生化学的解析をおこなう予定である。

(2) tRNA 硫黄修飾酵素 TtuA の反応機構の推定

TtuA はほぼ全ての生物種に保存されているタンパク質である。多種の生物種の TtuA についてアミノ酸配列を比較することにより保存されたアミノ酸残基を同定した。さらに既知の tRNA 修飾酵素の活性中心の保存残基との比較により、tRNA 硫黄化反応に必要なと考えられる、ATP 結合に必要なアミノ酸残基と、硫黄の受け渡しに必要な Cys 残基を推定した。

そこでこれらの tRNA の硫黄化反応に必要なと考えられるアミノ酸残基に変異を導入した TtuA を好熱菌内で発現させる系を構築し、それらの株から tRNA を抽出、その硫黄化修飾塩基の量を定量した。その結果 ATP 結合に必要な PP-loop 上の保存残基と Cys 残基の変異体では顕著な硫黄化効率の減少が観測された。これにより、TtuA は ATP をもちいて基質 tRNA の 54 位のウリジンをアデニル化して活性化したのち、硫黄運搬タンパク質 TtuB の供給する活性化硫黄種 (チオカルボキシレート) をもちいて tRNA に硫黄を転移させることが推測された。この内容については理化学研究所 横山茂之研究室との共同研究で行った。

(3) 真正細菌におけるユビキチン類似タンパク質翻訳後修飾現象の発見とその機能解析

好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* のタンパク質の tRNA の硫黄修飾塩基の生合成系において活性化硫黄種を供給するタンパク質 TtuB は真核生物ユビキチンに類似した構造をとることが予想され、タンパク質の翻

訳後修飾因子としても機能している可能性がある(図2,3)。そこでまず TtuB のタンパク質翻訳後修飾因子としての性質について解析した。TtuB 特異的抗体をもちいて好熱菌総タンパク質に対すしてウエスタンブロット解析を行い、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た。

さらに遺伝子欠損株や変異体発現株をもちいた解析をおこない、TtuC が TtuB 化の活性化酵素として働くこと、TtuB のカルボキシ末端の Gly 残基が標的タンパク質との共有結合に重要であることがわかった。また、特異的抗体をもちいた免疫沈降とウエスタンブロット実験により、TtuB 化の標的タンパク質として TtuC と TtuA を同定した。さらに TtuA については、TtuA-TtuB 共有結合体を好熱菌内で大量発現後、免疫沈降することにより大量精製し、共有結合の様式を質量分析装置により解析した(質量分析装置による解析は東京大学大学院工学系 鈴木勉教授、坂口裕理子氏により行われた)。この解析により3か所の Lys 残基が TtuB 化されることが明らかになった。さらにそれらの Lys 残基に変異を導入した TtuA では TtuB 結合体ができないことが確認できた。これらの Lys 残基は1次構造上、tRNA の硫黄化反応に重要と予想される Cys 残基の近傍に位置しており、TtuB による翻訳後修飾が tRNA の硫黄化反応に影響を与えていることが推測された。以上の解析によりこの好熱菌で見出した TtuB による翻訳後修飾は、真核生物ユビキチン系に非常に類似した機構でおこることが判明した。

次いで TtuB 化の機能について検討した。TtuB 破壊株において TtuB 化の標的タンパク質の一つである TtuC の定常状態量は野生株と変わらなかったことから、TtuB 化は少なくとも TtuC タンパク質の安定性や分解には寄与していないことが推測された。また真核生物では標的からユビキチンを取り外す脱ユビキチン酵素も、標的のユビキチン化状態を制御するうえで重要である。好熱菌において脱 TtuB 化酵素を同定し、その遺伝子破壊株では TtuC と TtuA の TtuB 化状態が変化し、tRNA の硫黄修飾塩基の量も変動した。つまり生合成酵素の TtuB 化修飾が生合成反応を制御していることが示唆された [Shigi N ら, J Biol Chem 2012 に論文発表]。

本研究結果は原核生物における新規なタンパク質機能制御機構であるとともに真核生物ユビキチン系の祖先系であると考えられ興味深い。本発見は、別系統の原核生物(古細菌)で最近発見されたユビキチン類似翻訳後修飾現象 [Humbard MA ら, Nature 2010] につぎ、真正細菌では初めての発見である。真正細菌と古細菌の共通祖先に既にユビキチン類似翻訳後修飾現象が存在していたこと

を示唆している。さらにその機能の一つとして、TtuB 化修飾により TtuA と TtuC の酵素活性が制御されていることが本研究により示唆されたので、今後はその制御機構の詳細、すなわち TtuB 化修飾による酵素活性を変化させる分子メカニズムについて明らかにしていきたい。またあわせて、多数存在する TtuA や TtuC 以外の標的タンパク質を同定することにより、tRNA 硫黄修飾塩基の生合成の制御以外の機能についても検討していきたいと考えている。

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2件)

嶋直樹、Posttranslational modification of cellular proteins by a ubiquitin-like modifier in Bacteria、Journal of Biological Chemistry、査読有、Vol. 287、No. 21、2012、pp.17568-17577、DOI: 10.1074/jbc.M112.359844

嶋直樹、tRNA の硫黄修飾塩基の機能とその生合成機構、生化学、査読有、Vol. 82、No. 7、2010、pp.623-628、<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/82-07-07.pdf>

[学会発表](計4件)

嶋直樹、Post-translational modification of cellular proteins by a ubiquitin-like modifier in eubacteria、EMBO Conference Series / Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers、2011/09/23、Cavtat (Croatia)

嶋直樹、坂口裕理子、朝井真一、鈴木勉、渡辺公綱、Biosynthesis of tRNA thiouridine in *Thermus thermophilus* and its evolutionary relationship with eukaryotic ubiquitin system、第16回 RNA 学会年会、2011/06/17、京都

嶋直樹、坂口裕理子、朝井真一、鈴木勉、渡辺公綱、tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構の解析から明らかになったユビキチン修飾系との進化的関連、BMB2010、2010/12/09、神戸

嶋直樹、坂口裕理子、朝井真一、鈴木勉、渡辺公綱、高度好熱菌 tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構の解析から明らかになった真核生物ユビキチン修飾系との進化的関連、高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第9回連携研究会、2010/08/22、兵庫県 SPring8

〔その他〕
ホームページ等
<http://unit.aist.go.jp/birc2/RNA/index.html>

6. 研究組織
(1) 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・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