



Title	Mechanistic insights into tRNA thiolation catalyzed by iron-sulfur enzymes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	石坂, 優人
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第15305号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89645
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Masato_Ishizaka_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学)

氏名 石坂 優人

学位論文題名

Mechanistic insights into tRNA thiolation catalyzed by iron-sulfur enzymes
(鉄硫黄クラスター含有酵素が触媒する tRNA 硫黄修飾の反応機構解析)

運搬リボ核酸 (tRNA) はリボソームへとアミノ酸を運ぶアダプター分子であり、DNA の遺伝情報を蛋白質に翻訳する。しかし、DNA から転写された直後の未成熟 tRNA は機能しない。そこで、tRNA は塩基/リボース修飾などの転写後修飾を経て成熟し、生体内で機能する。現在までに tRNA の修飾は 110 種類以上も発見されており、その中でも tRNA に硫黄を導入する硫黄修飾は、tRNA の熱安定性や翻訳の正確性を向上させる普遍的かつ重要な酵素反応である。tRNA 硫黄修飾酵素は既に複数同定されているが、これらの反応機構は完全には明らかでない。興味深いことに、過剰な tRNA 硫黄修飾は、乳がんの浸潤転移を促進する。一方で、tRNA 硫黄修飾の欠損は、難病のミトコンドリア病 (MERRF) の発症に関連すると報告されている。

我々が着目している tRNA⁵⁴ 位の硫黄修飾 (5-メチル-2-チオウリジン修飾, m⁵s²U⁵⁴) は、好熱菌が高温環境で生存するために必須である。高熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* では、m⁵s²U⁵⁴ 修飾は 2-チオウリジン合成酵素 TtuA と、C 末端がチオカルボキシル化 (R-COSH) された硫黄ドナー蛋白質 TtuB により触媒される。当研究室は近年、TtuA-TtuB 複合体の構造機能解析から、TtuA の酵素活性には極めて酸化に脆弱な [4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターが必要であることを明らかにした。一般的な [4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターは、4 つの鉄が全てアミノ酸残基と結合している。一方で、TtuA の [4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターは 3 つのシステイン残基と結合しており、残り 1 つのむき出しの鉄 (ユニーク鉄) は、TtuB の C 末端に結合していた。この結晶構造は、TtuA のユニーク鉄が TtuB から硫黄を受け取る可能性を示唆し、[4Fe-4S]-TtuA のユニーク鉄が蛋白質-蛋白質相互作用の足場として機能し、m⁵s²U⁵⁴ 合成を触媒するという完全新規な反応機構が示唆された。

一方で、古細菌や真核生物では、TtuA と同一の酵素ファミリーに属する tRNA 硫黄修飾酵素 Ncs6 が、ユビキチン様硫黄ドナー蛋白質 Urm1 とともに細胞質 tRNA³⁴ 位の tRNA 硫黄修飾 (5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン, mcm⁵s²U³⁴) を触媒する。しかしながら、Ncs6 には、ユニーク鉄を失った [3Fe-4S] 鉄硫黄クラスターを持つという報告と、ユニーク鉄を持つという報告がある。すなわち、活性型の tRNA 硫黄修飾酵素が [4Fe-4S] と [3Fe-4S] のどちらも利用するのか、[4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターのみを用いるかは明らかでなかった。特に TtuA では、過剰な鉄と硫黄を加えて [4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターを再構成していたため、[3Fe-4S]-TtuA の可能性は全く検討されていなかった。そこで我々は、酸素濃度 1 ppm 未満の厳密な無酸素環境で [4Fe-4S]-TtuA および [3Fe-4S]-TtuA を調製し、それらの鉄硫黄クラスターの構造と酵素活性を経時的に解析することで、正確な鉄硫黄クラスターの構造に基づいた tRNA 硫黄修飾酵素の反応機構の解明を目指した。

この問題を解決するために私は、まず組換え大腸菌で TtuA と TtuB を過剰発現し、嫌気チャンパー内で[4Fe-4S]-TtuA を再構成した。その後、過剰の酸化剤 $K_3[Fe(CN)_6]$ を加えて、酸化剤と遊離鉄を除いて、[3Fe-4S]-TtuA を調製した。そして、酸化から 5, 10, 20, 30 分, 1, 2, 12, 24 時間後の TtuA を調製し、電子スピン共鳴法 (EPR) を用いて、TtuA に結合している鉄硫黄クラスターの構造を解析した。その結果、新たに鉄を加えなくても、経時的な[3Fe-4S]-TtuA の減少に伴って[4Fe-4S]-TtuA が増加し、酸化から数十分間後の溶液には酸化前に比べて約 20%、24 時間後の溶液には約 75%の[4Fe-4S]-TtuA が存在していた。故に、不安定な[3Fe-4S]-TtuA が鉄を放出し、別の[3Fe-4S]-TtuA 分子がその鉄を受け取ることで、自発的に[4Fe-4S]-TtuA が再構成されたと結論付けた。

次に、[3Fe-4S]-TtuA の酵素活性を明らかにするために、酸化前、酸化から 5 分, 1, 2, 24 時間後の TtuA を用いて、tRNA 硫黄修飾反応を行った。その後、反応溶液から tRNA を抽出して消化酵素で処理し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で m^5s^2U 合成活性を測定した。その結果、経時的に TtuA の酵素活性が回復し、酸化から数十分間後は酸化前に比べて約 30%、酸化から 24 時間後は約 75%の酵素活性が見られた。また、[3Fe-4S]-TtuA が酵素活性を持たない原因を追究するために、EPR 法を用いて TtuA と TtuB の結合を評価した。その結果、[4Fe-4S]-TtuA は TtuB の硫黄と相互作用したが、[3Fe-4S]-TtuA は TtuB の硫黄と相互作用しなかった。したがって、活性型 TtuA はユニーク鉄を持つ[4Fe-4S]型のみであり、溶液中でも[4Fe-4S]-TtuA のユニーク鉄は TtuB の C 末端の硫黄と直接結合することを見出した。

さらに、tRNA 硫黄修飾が起こる条件を明らかにするために、水銀ゲル電気泳動 (APM-PAGE) を用いて、TtuB の C 末端の硫黄を追跡した。その結果、[4Fe-4S]-TtuA と TtuB を混ぜただけでは TtuB は硫黄を放出せず、ATP と tRNA を加えた 4 者が揃わなければ、TtuB は硫黄を放出しないことを発見した。また、tRNA 硫黄修飾における TtuA の重要残基を同定するために、[4Fe-4S]-TtuA-TtuB-ATP 複合体の構造に基づいて 10 種類の変異体 TtuA を調製し、HPLC を用いて酵素活性を測定した。その結果、S55A, D59A, K137A, D161A 変異体では、 m^5s^2U54 合成活性が消失した。一方で、無機硫黄を用いると K137A 変異体のみ m^5s^2U54 合成活性が回復した。S55, D59, D161 は ATP の周辺に位置するため、tRNA 活性化を担うと考えられる。K137 は水を介してユニーク鉄と相互作用するため、TtuB からユニーク鉄への硫黄転移を担う触媒残基であると結論付けた。

これら 4 つの残基は、TtuA/Ncs6 ファミリー酵素 (TtuA, Ncs6, TtcA) で完全に保存されており、その他の tRNA 硫黄修飾酵素 (MnmA, ThiI) でも類似していた。また、AlphaFold2 を用いた TtcA と ThiI の三次元構造予測の結果、上記 4 つの残基は tRNA 硫黄修飾酵素の同様の位置に存在していた。さらに、[4Fe-4S]-TtuA-TtuB-tRNA 複合体モデルおよび[4Fe-4S]-Ncs6-Urm1-tRNA 複合体の立体構造モデルから、ユニーク鉄や D161 は基質 tRNA と相互作用する可能性が示唆された。

以上の結果をまとめると、TtuA のみならず、活性型の tRNA 硫黄修飾酵素は一般的に、[4Fe-4S] 鉄硫黄クラスターを持つことを提案した。さらに、重要残基を加味した *Tth*TtuA の m^5s^2U54 合成、特に TtuB から tRNA への硫黄転移の詳細な分子機構を解明した。具体的には、(1) [4Fe-4S]-TtuA-TtuB 複合体の形成後、PP ループの S55, D59 を用いて ATP と結合し、(2) ユニーク鉄を介して[4Fe-4S]-TtuA-TtuB-ATP-tRNA 複合体を形成する。その後、(3) ATP および D161 を用いて tRNA のアデニル化が触媒され、(4) TtuB の C 末端から TtuA のユニーク鉄への硫黄転移を K137 が触媒し、[4Fe-5S]-TtuA-活性化 tRNA 中間体を形成する。最後に、(5) [4Fe-5S]-TtuA から活性化 tRNA への硫黄転移が触媒され、 m^5s^2U54 合成が完了する。