



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Elucidation of a novel tRNA thiolation reaction mechanism involving Fe-S cluster [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	陳, 明皓
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12951号
Issue Date	2017-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68141
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Minghao_Chen_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 陳 明 皓

学 位 論 文 題 名

Elucidation of a novel tRNA thiolation reaction mechanism involving Fe-S cluster

（鉄硫黄クラスターが関与する新規 tRNA 硫黄転移機構の解明）

tRNAはDNAから転写されただけでは機能できず、様々な化学修飾を受けて初めて機能を持つようになる。現在までに100種類以上の化学修飾が報告されており、そのうち硫黄原子が付加される一群の修飾は硫黄修飾と呼ばれる。2-チオウリジン（2-thiouridine, s²U）は硫黄修飾の一種であり、ウリジンの2位の酸素原子が硫黄原子に置換されることで形成される。s²U修飾は真正細菌・古細菌・真核生物のすべての生物ドメインにて普遍的に保存されている。一部の好熱性細菌はtRNAの54位をs²U修飾することで、tRNAに熱安定性を獲得している。また真核生物では、ミトコンドリアtRNAと細胞質tRNA両方の34位（wobble位）にs²Uを有し、コドン-アンチコドンの認識制御に用いている。ミトコンドリア中のs²U修飾が欠損した場合、ミトコンドリア病が発症し、また細胞質内のs²U修飾が欠損した場合も、ミトコンドリアの活動が低下することが報告されている。しかし、s²Uが様々な重要な生体的な役割を果たしているにもかかわらず、その生合成について未知な点が多い。

好熱性真正細菌*Thermus thermophilus*におけるs²U54の合成反応は、硫黄転移酵素TtuA（Two-thiouridine synthetase A）と硫黄運搬蛋白質TtuBによって行われる。TtuAは分子量36 kDaのタンパク質で、ATP加水分解ドメイン（PP-loop domain）を持ち、ATPの加水分解反応と共役して硫黄転移反応を行うことが予想されている。一方TtuBは分子量7.3 kDaの蛋白質で、C末端をチオカルボキシル化して硫黄をTtuAに供給する。しかし先行研究では、TtuA、TtuB、ATP及び基質tRNAを*in vitro*反応系に加えても反応が進行せず、反応系に硫黄イオンと鉄イオンを加えたところ、s²Uが検出されたことから、TtuAの反応に鉄硫黄クラスターと呼ばれる補因子が必要と考えられたが、この鉄硫黄クラスターのタイプ及び機能については全く不明であった。ここで私たちは大腸菌発現系を用いて蛋白質試料を調製し、X線結晶構造解析、分光学及び生化学など複数の手法を用いて鉄硫黄クラスターが関与するTtuAのs²U生合成の反応機能について研究を進めた。

TtuAに結合している鉄硫黄クラスターは酸素感受性であることから、完全無酸素条件下での実験に取り組んだ。嫌気グローブボックス内で大腸菌を超音波破碎し、ニッケルアフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いてTtuAを精製した後、TtuA溶液中に鉄イオン及び硫黄イオンを加え、人工的にクラスターの再構築を試みた。その結果、TtuA溶液が薄い黄色から濃い茶色に変色し、鉄硫黄クラスターに特有な410 nm付近のブロードな吸収が現れた。続いて、私は結晶化、結晶観察、結晶凍結までのすべての操作を完全嫌気条件下で行うことで、分解能の2.4 Åでの結晶構造解析に成功した。得られた結晶構造では、活性部位の中心に[4Fe4S]型の鉄硫黄クラスターが存在し、保存性の高い3つのシステイン残基（Cys130, Cys133, Cys222）によって配位されている。これまで、報告されていた活性に重要であるこの3つのシステイン残基が鉄硫黄クラスターを保持する役割を担っていることを明らかにした。興味深いことに、鉄硫黄クラスターを構成する4つの鉄原子のうちの一つは（以下、ユニーク鉄と呼ぶ）、システインによって配位されておらず、活性部位にむき出しの構造をとっていた。さらに、電子スピン共鳴法（Electron Paramagnetic Resonance, EPR）でも、[4Fe4S]型の鉄硫黄クラスターの特徴的なシグナルが検出さ

れ、結晶構造と良く一致した。これらの結果より、TtuAに結合している鉄硫黄クラスターのタイプが[4Fe4S]型と同定した。

次に私は、硫黄転移酵素TtuAと硫黄運搬蛋白質TtuBがどのように相互作用し、TtuBがどのように硫黄原子を提供するかを明らかにするために、TtuA-TtuB複合体の結晶構造解析に取り組んだ。TtuAとTtuBを共発現させたのち、TtuA単体と同様に精製、クラスター再構築及び結晶化を行った。初期スクリーニングで得られた結晶化条件を最適化することで、最終的に2.2 Å分解能の結晶構造を得ることができた。TtuA-TtuB複合体の結晶構造では、長いループを形成しているTtuBのC末端が、TtuAの活性部位に深く挿入し、鉄硫黄クラスターのユニーク鉄と結合している。この構造はC末端をチオカルボキシル化することで硫黄を運搬するTtuBの性質と良く合致し、TtuBがC末端をTtuAに挿入することで硫黄原子を供給することが明らかになった。大変興味深いことに、鉄硫黄クラスターを含まないTtuA-TtuB複合体の結晶構造では、TtuBのC末端が完全にディスオーダーしていた。ここで、私はEPRを用いて、溶液状態におけるTtuA-TtuB複合体における鉄硫黄クラスターのシグナルを観測したところ、TtuBが結合していない場合と比べて、TtuA-TtuB複合体の[4Fe4S]クラスターのスペクトルの異方性に顕著な変化が見られたことから、溶液中でもTtuBのC末端が鉄硫黄クラスターのユニーク鉄と結合配位が形成され、鉄硫黄クラスターがユニーク鉄を利用してTtuBのC末端を固定していると結論づけた。

TtuBのC末端が鉄硫黄クラスターによるTtuBの固定が、 s^2U 生合成反応にどのような意味を持つのかについて調べた。まず、得られたTtuA-TtuBの複合体構造がTilS-tRNA複合体（TilS：tRNA^{Leu}-lysine 合成酵素）と重ね合わせることで、TtuA-TtuB複合体がtRNAとの結合様式を推定した。作成したTtuA-TtuBとtRNAの結合モデルにおいて、TtuBとtRNA間には立体障害が存在しなかったことから、TtuAは、TtuB及びtRNAと同時に結合してTtuA-TtuB-tRNA三者複合体が形成されることが示唆された。興味深いことに、このモデルでは、tRNAの修飾サイトはTtuBのC末端の近くに配置され、TtuBが直接硫黄原子をtRNAに転移する可能性が示唆された。さらに、TtuAの鉄硫黄クラスターは電子伝達や硫黄貯蔵などの機能を持たないことから、考えられる反応機構は下記の二つに絞った：i) 鉄硫黄クラスターがTtuBを固定することで、TtuBのC末端からtRNAへ直接的な硫黄転移を触媒する（以下、直接転移と呼ぶ）、ii) 鉄硫黄クラスターが一旦TtuBから硫黄原子を受け取り、その後tRNAに転移する（以下、間接転移と呼ぶ）。どちらの転移が正しいかを検証するために、2種類の転移において硫黄原子がTtuBから離脱するタイミングの違いに注目した。つまり、直接転移の場合、tRNAが反応系に存在しないと硫黄原子はTtuBから離脱しないはずであり、一方、間接転移の場合ではTtuBからの硫黄の離脱はtRNAの結合とは関係ないはずである。そこで、基質tRNAの有無でTtuBの末端の硫黄原子の脱離がどのように変化するかを水銀含有ゲルを用いて観測した結果、TtuBの脱硫反応はtRNAの存在に強く依存することがわかり、直接転移が正しいことが証明された。

以上の結果を考え合わせ、TtuAとTtuBによる s^2U の生合成反応機構として下記のように提唱した：i) TtuAがtRNAと結合し、ATPを用いて基質tRNAを活性化させる。ii) TtuAがTtuBと結合し、活性部位に深く差し込まれたTtuBのC末端が、鉄硫黄クラスターのユニーク鉄に固定される。なお、i)とii)が起きる順番に関係なく、両方が完了してTtuA-TtuB-tRNA三者複合体が形成されてから、反応 iii)へと進む。iii) TtuBのC末端と基質tRNAの修飾部位がそれぞれ所定の位置に配置され、TtuBからtRNAへ硫黄が直接転移されて反応が終了する。またGeneral discussionの章では、本研究で明らかになった反応機構を、近年、他の研究チームが発表したいくつか成果と比較し、硫黄転移反応の研究に残された疑問点を整理し、今後の本分野の研究の方向性について議論した。

本研究は鉄硫黄クラスターのタイプの同定から、クラスターが関与する新規な s^2U 生合成機構の提唱まで、TtuAとTtuBが行う触媒反応を包括的に理解し、細胞内における硫黄転移反応の新たなプロトタイプを提示した。本研究は生化学・生体無機化学・核酸科学など広い範囲にわたり影響を及ぼすだけでなく、過去に報告された類縁蛋白質に関する研究が、酸素存在下という非活性条件で行われた実験に基づいた結果である可能性を示唆した学術的に意義の大きい研究成果である。