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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨
Doctoral Dissertation Evaluation Review

博士の専攻分野の名称	博士（生命科学）	氏　名	陳 明皓
Degree requested	Doctor of Life Science	Applicant name	Minghao Chen

審査担当者	主査 / Chief examiner	教　授	姚　　閔	
Examiners	副査 / Associate examiner	教　授	門出 健次	
	副査 / Associate examiner	教　授	田中 良和	（東北大学）
	副査 / Associate examiner	助　教	加藤 公児	

学 位 論 文 題 名
Title of Doctoral Dissertation

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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．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てに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，ミトコンドリア病を発症し，また細胞質内のs2U修飾が欠損した場合にも,ミトコンドリアの活動が低下することかは報告されている．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．陳明皓氏は，好熱性真正細菌*Thermus thermophilus*におけるs2Uの合成を触媒する硫黄転移酵素TtuA（Two-thiouridine synthetase A）と硫黄運搬蛋白質TtuBに着目し，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にs2U生合成の研究を進めた．

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ため，陳明皓氏は完全無酸素条件下である嫌気グローブボックス内で，(1)大腸菌を超音波破砕し，(2)ニッケルアフィニティー，ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてTtuAを精製した後に，(3)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，結晶化・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かは存在し，保存性の高い3つのCys残基（C130, C133, C222）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Cys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かは明らかにした．興味深いことに，[4Fe4S]を構成する4つの鉄原子

のうちの一つは，残基に配位されておらず（以下，ユニークな鉄と呼ぶ），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．これらの結果により，TtuAに含まれている鉄硫黄クラスターが[4Fe4S]型と同定した．

次に，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，陳明皓氏はTtuAとTtuBを共発現させ，TtuA-TtuB複合体の結晶構造解析を試みた．TtuAと同様に嫌気グローブボックス内でTtuA-TtuB複合体の調製, 結晶化を行い, 最終的に2.2 Å分解能での構造を得ることができた．[4Fe4S]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とに対して，TtuA-TtuB-[4Fe4S]複合体の結晶構造には，TtuBのC末端が，TtuAの活性部位に深く挿入し，[4Fe4S]のユニークな鉄原子と結合している．この構造は報告されていたTtuBが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ことを解釈でき，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．さらに，EPRを用いて溶液状態で，TtuA-TtuB-[4Fe4S]複合体の鉄硫黄クラスターのシグナルを観測したところ，TtuA-[4Fe4S]と比べ，TtuA-TtuB-[4Fe4S]のスペクトルの異方性に顕著な変化が見られ，溶液中でもTtuBのC末端が[4Fe4S]のユニークな鉄原子と結合配位が形成されていると結論づけた．

陳明皓氏はTtuBのC末端が鉄硫黄クラスターによる固定が，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るため，TtuA-TtuBの複合体構造がTilS-tRNA複合体（TilS：S^4U8の硫黄転移酵素）と重ね合わせることによって，TtuA-TtuB複合体がtRNAとの結合モデルを構築して見た．このモデルでは，tRNAの修飾サイトU54はTtuBのC末端の近くに配置され，硫黄原子をtRNAに直接転移する可能性が示唆された．ここで，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へ直接な硫黄転移を触媒する（直接転移）, 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（間接転移）．どちらの転移が正しいかを検証するために，硫黄原子がTtuBから離脱活性，つまり，基質tRNAの有無でのTtuBの硫黄原子の脱離を測定した．その結果， TtuBの脱硫反応はtRNAの存在に強く依存することがわかり，直接転移が証明された．

上記の結果を考え合わせ，陳明皓氏はTtuAとTtuBによるs^2Uの生合成反応機構を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な鉄を用いて固定される．なお，i)とii)に前後の順番はなく，完了した後に，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る．

以上，陳明皓氏が一連の研究によって，tRNA 硫黄転移酵素 TtuA が酵素的不安定な[4Fe4S]型の鉄硫黄クラスターを含む蛋白質であることを見出し，TtuA の反応機構を提唱した．得られた成果が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で行われた非活性状態で行った結果である可能性を示唆した．また，申請者は，本研究を通して，tRNA 硫黄転移酵素についての X 線構造生物学の研究分野において専門知識、技術ともに優れているのみならず、科学的な思考力と実証する行動力に秀でていることが見受けられた。

本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は，申請者，陳明皓氏が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。