



# HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第15305号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89645">https://hdl.handle.net/2115/89645</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Masato_Ishizaka_review.pdf, 審査の要旨



# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏名 石坂 優人

審査担当者	主査	教授 尾瀬 農之
	副査	教授 相沢 智康
	副査	教授 比能 洋

## 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)

### 博士學位論文審査等の結果について (報告)

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。

石坂優人氏は、高熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* における tRNA<sub>54</sub> 位の硫黄修飾 (5-メチル-2-チオウリジン, m<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U54) に着目し、m<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U54 合成を触媒する 2-チオウリジン合成酵素 TtuA の反応機構の解明を試みた。先行研究では、TtuA は容易に酸化崩壊する[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターと結合し、システインに結合していないむき出しの鉄 (ユニーク鉄) が、硫黄ドナー蛋白質 TtuB の C 末端と結合している結晶構造が報告されていた。この結晶構造から、TtuA のユニーク鉄が TtuB から硫黄を受け取り、m<sup>s</sup>s<sup>2</sup>U54 合成を触媒するという反応機構が示唆されていた。一方、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、硫黄ドナー蛋白質 Urm1 と共に tRNA<sub>34</sub> 位の硫黄修飾を触媒する。しかし Ncs6 には、[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターの報告だけでなく、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もあった。すなわち、活性型の tRNA 硫黄修飾酵素が[4Fe-4S]と[3Fe-4S]の両方を利用するか、[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターのみ利用するか明らかでなかった。さらに先行研究では、過剰な鉄と硫黄を加えて[4Fe-4S]-TtuA を再構成していたため、[3Fe-4S]-TtuA の可能性は検討されていなかった。

そこで石坂優人氏は、無酸素環境下で[4Fe-4S]-TtuA と[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。まず、組換え大腸菌で TtuA を過剰発現し、嫌気チャンバー内で精製した後、過剰な鉄や硫黄を加えて[4Fe-4S]-TtuA を再構成した。次に、[4Fe-4S]-TtuA に酸化剤を加え、脱塩カラムで酸化剤と遊離鉄を除き、[3Fe-4S]-TtuA を調製した。そして、[3Fe-4S]-TtuA の調製から 5, 10, 20, 30 分, 1, 2, 12, 24 時間後の TtuA に結合している鉄硫黄クラスターの構造を電子スピン共鳴法 (EPR) で解析した。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 が増加した。新鮮な[4Fe-4S]-TtuA 溶液と比べると、[3Fe-4S]-TtuA の調製から数十分間後の溶液には約 20%、24 時間後の溶液には約 75%の

[4Fe-4S]-TtuA が含まれていた。故に、不安定な[3Fe-4S]-TtuA が鉄を放出し、別の[3Fe-4S]-TtuA 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、新鮮な[4Fe-4S]-TtuA および、[3Fe-4S]-TtuA の調製から 5 分, 1, 2, 24 時間後の TtuA を用いて、嫌気チャンバー内で tRNA 硫黄修飾を行った。その後、反応溶液から抽出した tRNA を消化酵素で処理し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で  $m^5s^2U54$  合成量を測定した。その結果、[4Fe-4S]-TtuA に比べて、[3Fe-4S]-TtuA 調製から 5 分後の TtuA では約 20%、24 時間後の TtuA では約 75%の酵素活性が見られた。EPR と HPLC の結果を合わせると、[3Fe-4S]-TtuA から[4Fe-4S]-TtuA への変化に伴って TtuA の酵素活性が回復し、最終的には「apo-TtuA : [4Fe-4S]-TtuA = 25: 75」の混合溶液になったと考察した。

さらに、[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 の硫黄と結合したが、[3Fe-4S]-TtuA は TtuB の硫黄と結合しなかった。したがって、ユニーク鉄を失った[3Fe-4S]-TtuA は TtuB から硫黄を受け取ることができないため不活性型であること、溶液中の活性型[4Fe-4S]-TtuA はユニーク鉄を介して TtuB の C 末端にある硫黄と結合できることを見出した。

また、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) で TtuB の C 末端の硫黄を追跡した。その結果、[4Fe-4S]-TtuA-TtuB 複合体を形成しただけでは TtuB は硫黄を放出せず、ATP と tRNA も揃うと、TtuB は硫黄を放出することを発見した。すなわち、アデニル化 tRNA (活性化 tRNA) が合成された後に、硫黄転移反応が起こることを明らかにした。さらに、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 で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、無機硫黄  $Na_2S$  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 の近傍に位置するため、ATP 結合や tRNA 活性化を担うと考えた。また、K137 は水を介して TtuA のユニーク鉄と結合するため、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いた。また、その他の tRNA 硫黄修飾酵素 (MnmA, ThiI) では硫黄ドナー蛋白質の代わりに無機硫黄を用いて tRNA 硫黄修飾を触媒すること、一部の MnmA ではアスパラギン酸が鉄硫黄クラスターに結合することを考慮すると、tRNA 硫黄修飾酵素の重要残基は類似していた。また、AlphaFold2 で TtcA と ThiI の三次元構造を予測した結果、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 複合体モデルの構造から、ユニーク鉄や D161 は基質 tRNA と相互作用する可能性を示唆した。

これらの結果から石坂優人氏は、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 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、[4Fe-4S]-TtuA-TtuB 複合体の形成後、S55, D59 を用いて ATP と結合し、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、ATP および D161 を用いて tRNA が活性化され、K137 が TtuB からユニーク鉄への硫黄転移を触媒し、[4Fe-5S]-TtuA-活性化 tRNA 中間体を形成する。最後に、[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。

以上、石坂優人氏は tRNA 硫黄修飾酵素 TtuA の分光・生化学実験により、[3Fe-4S]-TtuA は不活性型であること、[4Fe-4S]-TtuA のみ活性型であることを明らかにした。さらに、TtuA の重要残基を加味した tRNA 硫黄修飾の反応機構を提唱した。また、バイオインフォマティクス解析により、tRNA 硫黄修飾酵素の類似性を見出し、tRNA 硫黄修飾酵素は一般的に[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターを用いる可能性を示唆した。本研究を通して石坂優人氏は、tRNA 硫黄修飾酵素に関する構造生物化学の研究において専門知識や技術を有し、科学的な思考に基づいて仮説を立て、実証する行動力に秀でていることが見受けられた。

本成果は、tRNA 硫黄修飾の反応機構について新たな知見を得たものであり、ヒトの疾患にも関わる tRNA 硫黄修飾酵素も含め、現象理解や産業応用に展開できる可能性がある。故に審査員一同は、石坂優人氏に北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があると認めた。