

鉄硫黄クラスターが関与する tRNA チオ化修飾酵素の詳細な反応機構解明を目指した研究

石坂優人¹, 陳明皓², 奈良井峻¹, 堀谷正樹³, 田中良和^{2,4}, 姚閔^{1,2}¹北海道大学大学院 生命科学院 生命科学専攻, ²北海道大学大学院 先端生命科学研究院,³佐賀大学農学部 生命機能科学科, ⁴東北大学大学院 生命科学研究科 分子化学生物学専攻

Studies on the Detailed Reaction Mechanism of tRNA Thiolation Enzymes Involved in Iron-Sulfur Clusters

Masato ISHIZAKA¹, Minghao CHEN², Shun NARAI¹, Masaki HORITANI³, Yoshikazu TANAKA^{2,4}, and Min YAO^{1,2}¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, ²Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University,³Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University,⁴Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

Abstract

tRNA がタンパク質の生合成を担うためには、チオ化などの転写後修飾によって成熟化される必要がある。TtuA は硫黄ドナータンパク質 TtuB と共に tRNA をチオ化修飾する酵素であり、酸化に対して脆弱な「鉄硫黄クラスター」を補因子に持つ。これまで、TtuA は TtuB から硫黄原子を受け取ることは知られていたが、鉄硫黄クラスターの役割についての詳細は明らかではなかった。そこで本研究では、TtuA の酵素活性に重要な残基を解明し、TtuA の詳細な反応機構を提唱した。

1. はじめに

運搬リボ核酸 (tRNA) は遺伝暗号に従ってアミノ酸を運搬し、タンパク質の生合成に関与する重要な分子である。tRNA は伝令 RNA(mRNA) 同様に DNA から転写により合成されるが、転写直後の未成熟 tRNA は正しく機能できない。そのためスプライシング、3' 末端への CAA 付加、塩基修飾などの転写後修飾による成熟化過程を必要とする [1]。その中でも塩基修飾はメチル化、アセチル化、チオ化など 100 種類以上が知られている [2,3]。

チオ化修飾は真正細菌・古細菌・真核生物の 3 つの生物ドメイン全てでおこる普遍的な生命現象であり、tRNA の熱安定性向上 [4,5]、近紫外線感知 [6,7]、翻訳の正確性向上 [8-10] を担う。また、コドン 3 文字目を決める tRNA34 位 (Wobble 位) のチオ化修飾欠損は、筋力低下や脳卒中様の症状を伴う難病であるミトコンドリア病 (MERRF や MELAS) の発症に繋がる [11,12]。したがって、チオ化は普遍的かつ重要な修飾である。

チオ化修飾はこれまでに 16 種類発見されており、主に 2-チオウリジン、4-チオウリジン、2-チオシチジン、2-メチルチオ-N⁶-メチルアデノシンの 4 種類に分類される [13]。さらに、チオ化修飾酵素は ATP を用いるタイプと S-アデノシルメチオニン (SAM) を用いるタイプの 2 つに大別できる。前者はさらに、MnmA 型と TtuA 型に分類される [14] (Fig.1)。MnmA 型はペルスルフィド (R-SSH) と ATP を利用して tRNA に硫黄を転移する酵素であり、アデニル化 tRNA との中間体構造および活性測定による重要残基の同定から、反応機構が解明されている [15,16]。

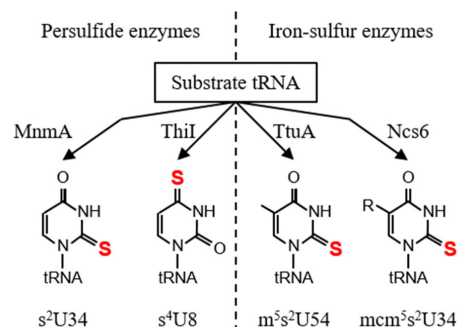


Figure 1 tRNA thiolases and those products (left: MnmA-type, right: TtuA-type). MnmA, ThiI, TtuA and Ncs6 are responsible for formation of 2-thiouridine at position 34 of tRNA (s²U34), 4-thiouridine at position 8 of tRNA (s⁴U8), 5-methyl-2-thiouridine at position 54 of tRNA (m⁵s²U54), and 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine at position 34 of tRNA (mcm⁵s²U34, -R = -CH₂COOCH₃), respectively.

一方で TtuA 型は「鉄硫黄クラスター」と ATP を用いて硫黄を転移する [17,18]。しかしながら、その反応機構の詳細は未だ明らかでない。

2. 2-チオウリジン合成酵素 TtuA と Ncs6 の類似性

ヒト tRNA34 位のチオ化修飾を担う Ncs6 (別名: Ctu1) は鉄硫黄クラスターが関与する TtuA 型酵素である [19,20]。Ncs6 は硫黄ドナータンパク質 Urm1 の C 末端から硫黄を受け取り、3 種類の細胞質 tRNA (tRNA^{Gln(UUG)}, tRNA^{Glu(UUC)}, tRNA^{Lys(UUU)}) へと転移する (Fig. 2 left) [21-

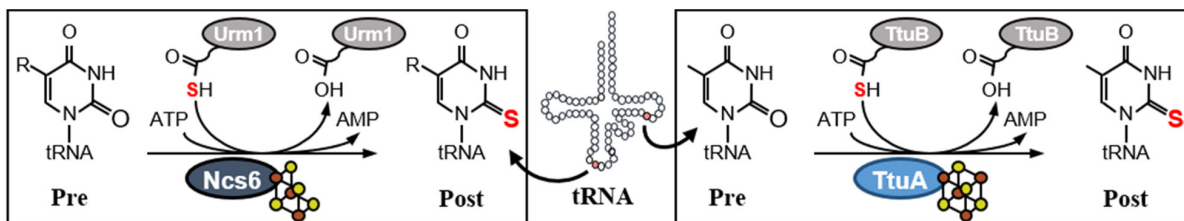


Figure 2 tRNA thiolation catalyzed by TtuA-type enzymes and sulfur donor proteins (left: Ncs6-Urm1, right: TtuA-TtuB). The objects colored in brown (iron) and yellow (sulfur) are iron-sulfur clusters ([3Fe-4S] for Ncs6 and [4Fe-4S] for TtuA). TtuB and Urm1 are thiocarboxylate sulfur donors (R-COSH) at the C-termini.

Table 1 Sequence similarity between TtuA-related proteins from *Thermus thermophilus* and Ncs6-related proteins from *Homo sapiens*.

Protein names	Similarity	Note
TtuA vs Ncs6	52%	TtuA/Ncs6 superfamily, Iron-sulfur proteins
TtuB vs Urm1	56%	Homologs of ubiquitin, Sulfur donor proteins
TtuC vs UBA4	46%	Homologs of ubiquitin activating protein (E1)

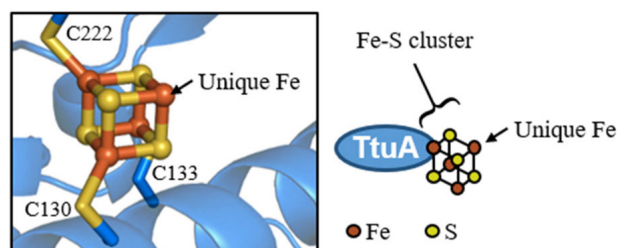


Figure 3 Structure of catalytic center of TtuA. The [4Fe-4S] cluster is shown as ball-and-stick models (PDBID: 5B4F).

23]. Ncs6 は翻訳の正確性に関わる重要な酵素だが、鉄硫黄クラスターが容易に酸化崩壊することも相まって [24], Ncs6 の構造は明らかでない。そこで我々は、鉄硫黄クラスターを用いる tRNA チオ化修飾酵素の中で、唯一 X 線構造が既知の 2-チオウリジン合成酵素 (TtuA) に焦点を当てた [14,25]。

TtuA は Ncs6 の原核生物ホモログであり、好熱菌の tRNA を硫黄修飾することで塩基の構造変化を起こす。この修飾により D ループと T ループとの相互作用が強まり (tRNA の熱安定性が高くなり)、高温環境下で生存できるようになる [25-28]。TtuA はチオカルボキシル型硫黄ドナータンパク質 TtuB (Urm1 ホモログ) と共に、基質 tRNA54 位に存在する 5-メチルウリジンの 2 位の酸素原子を硫黄原子に置換する反応を触媒する (Fig. 2 right)。また、TtuA と Ncs6、それらに硫黄を渡す TtuB と Urm1、および遊離システインから TtuB (Urm1) への硫黄運搬に関わる TtuC と UBA4 のアミノ酸の配列類似性は高い (Table1) [29,30]。したがって本研究では構造情報がある TtuA に着目し、鉄硫黄クラスターを用いる tRNA チオ化修飾の反応機構を解明することで、Ncs6 の反応機構までも議論する。

3. TtuA の構造および硫黄転移反応機構仮説

先行研究の X 線構造解析により、TtuA の活性部位には 4 つの鉄原子と 4 つの硫黄原子から成る [4Fe-4S] 型鉄硫黄クラスターが存在することが解明された [17,18]。この複合体構造では鉄硫黄クラスターを構成する 4 つの鉄原子のうち 3 つがシステインモチーフ (CXXC...C) に結合しており、残りの 1 つのむき出しの鉄 (ユニーク鉄) は TtuB と結合すると考えられた (Fig. 3)。そして、ユニーク鉄が

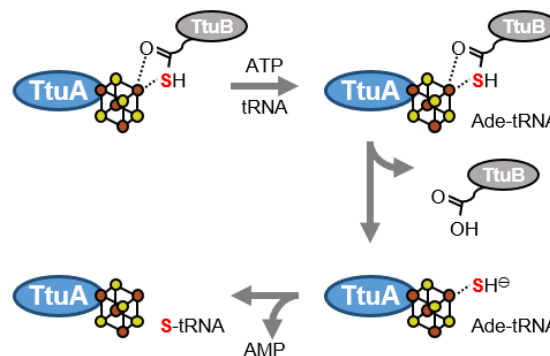


Figure 4 Proposed sulfur transfer mechanism. S-tRNA and Ade-tRNA mean m^3s^2U54 and adenylated tRNA, respectively.

TtuB から硫黄を受け取り、基質 tRNA へ硫黄を転移するという新たな tRNA チオ化修飾反応が提唱された。そこで本研究では、TtuA, TtuB による tRNA チオ化修飾機構の証明を試みた (Fig. 4)。

4. TtuB からの硫黄の受け取り

第一に、電子スピン共鳴法 (ESR) で鉄周りの構造を解析し、溶液中で鉄硫黄クラスターが TtuB の C 末端を結合するかを確認した。(i). TtuA 単独, (ii). (i) に TtuB-COOH を混ぜたもの, (iii). (i) に Na_2S を混ぜたもの, (iv). (i) に TtuB-COSH を混ぜたもののシグナルを比較すると, (iii) と (iv) の線形, g 値が一致し, (iv) の信号強度が 10 倍であった。これらは、TtuB の C 末端にある硫黄原子がユニーク鉄に効率的に結合して、鉄硫黄クラスターの構造変化を引き起こすことで、酸化還元電位が変化したことを示唆している (Table2) (投稿中)。

Table 2 Structures around the of iron-sulfur cluster of TtuA in solution.

Components	Signal	Structures
(i) [4Fe-4S]-TtuA	Type 1	
(ii) (i) + TtuB-COOH	Type 2	
(iii) (i) + Na ₂ S	Type 3	
(iv) (i) + TtuB-COSH	Type 3 Intensity: 10 times higher than (iii)	

次に、反応溶液中の硫黄を追跡できる水銀ゲル電気泳動 (APM-SDS-PAGE) を行い [31-33], 「TtuB を持つ真正細菌の TtuA」は TtuA, TtuB, tRNA, ATP がそろった時に、TtuB の硫黄をユニーク鉄が受け取ることを確認した (Fig. 4)。「TtuB の代わりに無機硫黄 S²⁻ を用いる古細菌の TtuA」でも [4Fe-4S] 型鉄硫黄クラスターのユニーク鉄が硫黄を受け取るため [18], TtuB の有無や生物ドメインに依らず、TtuA はユニーク鉄を用いて tRNA をチオ化修飾すると結論付けた (投稿中)。

5. 酵素活性に重要なアミノ酸残基とその役割の同定

次に我々は、TtuB の C 末端からユニーク鉄へと硫黄が渡される際、TtuA のどのアミノ酸残基が関わるかを解明するために、X線結晶構造に基づいて *T. thermophilus* TtuA の変異体を 10 種類作製した。さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた生化学実験により、変異体の 2-チオウリジン合成活性を評価した。その結果と構造情報を合わせ、tRNA を活性化する TtuA 残基と、TtuB からの硫黄の受け取りに関与する TtuA 残基を同定した (投稿中)。

ここで真正細菌および古細菌 (それぞれ TtuB を持つものと持たないもの) の TtuA, ヒトおよび出芽酵母の Ncs6

の合計 6 種類についてアミノ酸残基の配列比較を行った (Fig. 5)。その結果、前述の重要残基がいずれも保存されていたことから、Ncs6 も同じ残基を用いて tRNA の活性化や硫黄運搬を行うと推定された。

6. 鉄硫黄クラスターの電荷変化に伴う TtuA の構造変化

鉄硫黄クラスターを持つタンパク質では、クラスターの電荷によって構造が変化することがある。たとえば NADH などの電子ドナーが関与するヒドロゲナーゼ、ニトロゲナーゼ、キノンオキシドレダクターゼが挙げられる [34-36]。一方で、電子ドナーを必要としないアコニターゼのように、ユニーク鉄が酸化還元反応を触媒せずに基質を配位する鉄硫黄クラスタータンパク質も存在する [37]。TtuA の鉄硫黄クラスターはアコニターゼと同様の機構で基質を配位していると考えられているが [18], さらに理解を深めるために還元型 TtuA の結晶構造解析を行った。

得られた分解能 3.3 Å の非還元型 (+2 価, $S = 0$ のため ESR で検出できない) と分解能 3.5 Å の還元型 (+1 価, $S = 1/2$ のため ESR で検出可能) の構造を重ねて比較した結果、構造変化は観察されなかった (全体構造 (C α): RMSD = 0.160 Å, 活性部位の重要残基 7 つ (C α): RMSD = 0.119 Å)。したがって、ESR 測定に必要なジチオナイト還元処理は TtuA の鉄硫黄クラスターの性質や構造を変化させないと結論付けた (Fig. 6)。

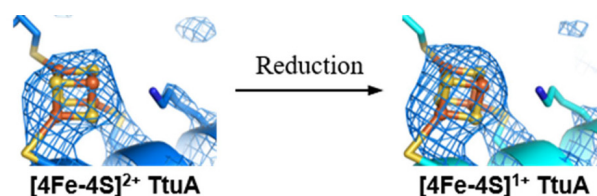


Figure 6 Structural comparison of TtuAs in the two redox conditions. [4Fe-4S]²⁺ TtuA (left) are reduced to [4Fe-4S]¹⁺ TtuA (right) by dithionite in the anaerobic chamber. 2Fo-Fc map contoured at 2.0 σ (blue).

Organism		A part of amino acid sequences							
Thermophilic bacterium (<i>T. thermophilus</i>)	TtuA, TtuB	<u>S55</u> ... <u>D59</u> ... <u>C130</u> ... <u>C133</u> ... <u>K137</u> ... <u>D161</u> ... <u>C222</u>							
Thermophilic archaeon (<i>A. aeolicus</i>)	TtuA, inorganic S ²⁻	<u>S</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u> ... <u>C</u> ... <u>K</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u>							
Thermophilic bacterium (<i>T. maritima</i>)	TtuA, TtuB	<u>S</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u> ... <u>C</u> ... <u>R</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u>							
Thermophilic archaeon (<i>P. horikoshii</i>)	TtuA, inorganic S ²⁻	<u>S</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u> ... <u>C</u> ... <u>K</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u>							
Human (<i>H. sapiens</i>)	Ncs6, Urm1	<u>S</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u> ... <u>C</u> ... <u>R</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u>							
Budding yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	Ncs6, Urm1	<u>S</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u> ... <u>C</u> ... <u>R</u> ... <u>D</u> ... <u>C</u>							

Figure 5 Sequence alignment of TtuAs and Ncs6s. The completely conserved residues and highly conserved residues are highlighted in red and yellow, respectively. The residue numbers are indicated in our target protein, TtuA from *T. thermophilus*. The anchor residues of the iron-sulfur cluster are underlined.

7. まとめと今後の展望

本研究は分光学・生化学・構造生物学の手法を組み合わせることで、TtuBの硫黄がTtuAの鉄硫黄クラスターへと運搬されることを証明した。また、TtuB由来の硫黄が鉄硫黄クラスターに転移するためには、ATPと基質tRNAも必要であること、そしてその際に関与するTtuAの残基を明らかにした。さらに、これらの結果を統合することにより、tRNAが活性化した後にTtuBの硫黄原子がユニーク鉄に転移する詳細な反応機構を提唱した。Ncs6はユニーク鉄を持たない[3Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを持つというESR報告がある[19]。一方で本研究では、TtuAとNcs6の共通性から両者がユニーク鉄を持つ[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを用いた、共通の反応機構でtRNAチオ化修飾を行う可能性を見出した。

今後は[4Fe-4S]-TtuA-TtuB-tRNA-ATP5者複合体のX線結晶構造解析に挑戦し、[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターが担うtRNAチオ化修飾の反応機構を完全に解明したい。さらに、厳密に酸化還元状態を制御した上で人工的に[3Fe-4S]型酵素を作製し、tRNAチオ化修飾酵素の酵素活性と鉄硫黄クラスター構造の関係性解明を目指したい。

8. 謝辞

実験系立ち上げにご協力下さった、産業技術総合研究所の嶋直樹博士に御礼申し上げます。本研究では、Photon FactoryのBL-1A, BL-5A, AR-NW12A(課題番号: 2016G141)およびSPring-8のBL41XUを用いてX線回折実験を行いました。お力添え下さったビームラインスタッフの皆様は心より感謝申し上げます。また、研究費をご提供して下さいました北海道大学大学院特別教育プログラム「新渡戸スクール」にもこの場をお借りして御礼申し上げます(Project No.: PKF8618101)。

引用文献

- [1] E.M. Phizicky and A.K. Hopper, *Genes Dev.*, **24**, 1832 (2010).
- [2] W.A. Cantara, P.F. Crain, J. Rozenski, J.A. McCloskey, K.A. Harris, X. Zhang, F.A. Vendeix, D. Fabris, and P.F. Agris, *Nucleic Acids Res.*, **39**, D195 (2011).
- [3] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T.K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P.A. Limbach, A. Kotter, M. Helm, and J.M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D303 (2017).
- [4] K. Watanabe, M. Shinma, T. Oshima, and S. Nishimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1137 (1976).
- [5] N. Shigi, T. Suzuki, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and K. Watanabe, *J. Biol. Chem.*, **281**, 2104 (2006).
- [6] A. Calderia de Araujo, and A. Favre, *Eur. J. Biochem.*, **146**, 605 (1985).
- [7] E.G. Mueller, C.J. Buck, P.M. Palenchar, L.E. Barnhart, and J.L. Paulson, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2606 (1998).
- [8] Y. Ikeuchi, A. Soma, T. Ote, J. Kato, Y. Sekine, and T. Suzuki, *Mol. Cell*, **19**, 235 (2005).
- [9] M.K. Krüger, S. Pedersen, T.G. Hagervall, and M.A. Sørensen, *J. Mol. Biol.*, **284**, 621 (1998).
- [10] C. Yarian, H. Townsend, W. Czestkowski, E. Sochacka, A.J. Malkiewicz, R. Guenther, A. Miskiewicz, and P.F. Agris, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16391 (2002).
- [11] T. Yasukawa, T. Suzuki, N. Ishii, S. Ohta, and K. Watanabe, *EMBO J.*, **20**, 4794 (2001).
- [12] Y. Kirino, and T. Suzuki, *RNA Biol.*, **2**, 41 (2005).
- [13] S. Boschi-Muller, and Y. Motorin, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1392 (2013).
- [14] N. Shigi, *Front. Microbiol.*, **9**, 2679 (2018).
- [15] E.G. Mueller, P.M. Palenchar, and C.J. Buck, *J. Biol. Chem.*, **276**, 33588 (2001).
- [16] T. Numata, Y. Ikeuchi, S. Fukai, T. Suzuki, and O. Nureki, *Nature*, **442**, 419 (2006).
- [17] M. Chen, S. Asai, S. Narai, S. Nambu, N. Omura, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, M. Ikeda-Sato, K. Watanabe, M. Yao, N. Shigi, and Y. Tanaka, *PNAS*, **114**, 4954 (2017).
- [18] S. Arragain, O. Bimai, P. Legrand, S. Caillat, J. Ravanat, N. Touati, L. Binet, M. Atta, M. Fontecave, and B. Golinelli-Pimpaneau, *PNAS*, **114**, 7355 (2017).
- [19] Y. Liu, D.J. Vinyard, M.E. Reesbeck, T. Suzuki, K. Manakongtreecheep, P.L. Holland, G.W. Brudvig, and D. Söll, *PNAS*, **113**, 12703 (2016).
- [20] Y. Nakai, M. Nakai, R. Lill, T. Suzuki, and H. Hayashi, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 2841 (2007).
- [21] G.R. Björk, B. Huang, O.P. Persson and A.S. Byström, *RNA*, **13**, 1245 (2007).
- [22] C.D. Schlieker, A.G. Van der Veen, J.R. Damon, E. Spooner, and H.L. Ploegh, *PNAS*, **105**, 18255 (2008).
- [23] S. Leidel, P.G.A. Pedrioli, T. Bucher, R. Brost, M. Costanzo, A. Schmidt, R. Aebersold, C. Boone, K. Hofmann, and M. Peter, *Nature*, **458**, 228 (2009).
- [24] Y. Nicolet, R. Rohac, L. Martin, and J.C. Fontecilla-Camps, *PNAS*, **110**, 7188 (2013).
- [25] N. Shigi, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, and K. Watanabe, *J. Biol. Chem.*, **281**, 14296 (2006).
- [26] S. Yokoyama, K. Watanabe, and T. Miyazawa, *Adv. Biophys.*, **23**, 115 (1987).
- [27] K. Watanabe, S. Yokoyama, F. Hansske, H. Kasai, and T. Miyazawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 671 (1979).
- [28] J.A. Kowalak, J.J. Dalluge, J.A. McCloskey, and K. Stetter, *Biochemistry*, **33**, 7869 (1994).
- [29] N. Shigi, Y. Sakaguchi, S. Asai, T. Suzuki, and K. Watanabe, *EMBO J.*, **27**, 3267 (2008).
- [30] A. Noma, Y. Sakaguchi, and T. Suzuki, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1335 (2009).
- [31] G.L. Igloi, *Biochemistry*, **27**, 3842 (1988).

- [32] Y. Liu, X. Zhu, A. Nakamura, R. Orlando, D. Söll, and W.B. Whitman, *J. Biol. Chem.*, **287**, 36683 (2012).
- [33] H.V. Miranda, N. Nembhard, D. Su, N. Hepowit, D.J. Krause, J.R. Pritz, C. Phillips, D. Söll, and J.A. Maupin-Furlow, *PNAS*, **108**, 4417 (2011).
- [34] Y. Shomura, K. Yoon, H. Nishihara, and Y. Higuchi, *Nature*, **479**, 253 (2011).
- [35] J.W. Peters, M.H.B. Stowell, S.M. Soltis, M.G. Finnegan, M.K. Johnson, and D.C. Rees, *Biochemistry*, **36**, 1181 (1997).
- [36] J.M. Berrisford, and L.A. Sazanow, *J. Biol. Chem.*, **284**, 29773 (2009).
- [37] S.J. Lloyd, H. Lauble, G.S. Prasad, and C.D. Stout, *Protein Sci.*, **8**, 2655 (1999).

(原稿受付日：2019年9月21日)

著者紹介

石坂優人 Masato ISHIZAKA



北海道大学大学院 生命科学院
博士前期課程 2年
〒060-0810 札幌市北区北10-西8
TEL: 011-706-4479, FAX: 011-706-4481
e-mail: ishizaka@castor.sci.hokudai.ac.jp
略歴：2018年 北海道大学大学院入学

最近の研究：反応経路自動探索プログラム GRRM による量子化学計算を取り入れた量子構造生物学への展開。

趣味：ランニング, ボードゲーム, アニメ観賞

田中良和 Yoshikazu TANAKA



東北大学大学院 生命科学研究科 教授
〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1
TEL: 022-217-6205, FAX: 022-217-6205
e-mail: yoshikazu.tanaka.e8@tohoku.ac.jp

略歴：2017年 東北大学教授。博士(工学)。
最近の研究：巨大タンパク質の内部空間

を利用した構造解析手法の開発。

趣味：ゴルフ

姚閔 Min YAO



北海道大学大学院 先端生命科学研究院
教授

〒060-0810 札幌市北区北10-西8
TEL: 011-706-4479, FAX: 011-706-4481

e-mail: yao@castor.sci.hokudai.ac.jp

略歴：2012年 北海道大学教授。博士(理

学)。

最近の研究：熱応答ゲル化ポリマーを利用した、中性子線構造解析のための大型結晶作成法の開発。

趣味：旅行