

鉄硫黄クラスターを持つ tRNA 硫黄修飾酵素の反応機構を解明

Communications Biology 3, 168 (2020). *PNAS* 114, 4954–4959 (2017).

研究背景

運搬リボ核酸 (tRNA) は遺伝暗号に応じてアミノ酸を運搬する分子で、蛋白質合成に欠かせません。生体内で合成された直後の未成熟 tRNA は、硫黄修飾のような様々な成熟化過程を経て、アミノ酸を運搬できる tRNA になります^[1]。ヒトではミトコンドリアの tRNA の硫黄修飾が欠損すると、難病のミトコンドリア病を発症します^[2]。細胞質の硫黄修飾が欠損した場合もミトコンドリアの機能が低下したり、過剰な硫黄修飾は皮膚がんや乳がんの発症を促進したりすることが知られていました^[3]。つまり、tRNA の硫黄修飾は tRNA の成熟だけではなく、様々な生命現象に関わっています。

硫黄修飾された tRNA (s^2T) が細胞質中に存在することは 1971 年に発見されましたが、 s^2T 生合成の詳細は明らかにされていませんでした^[4]。2006 年には細胞生物学実験により、2-チオウリジン合成酵素 A (TtuA) および硫黄ドナー蛋白質 (TtuB) によって s^2T が合成されることが報告されました^[5]。精製した TtuA と TtuB に細胞抽出液を加えると試験管内でも s^2T を合成できますが、細胞抽出液を加えなければ試験管内での s^2T 合成はできませんでした。このことから、TtuA が酵素として働くためには未知の因子が必要と考えられていました (図 1)。

そこで我々は TtuA の構造機能解析に取り組み、TtuA が酸素に接すると崩壊する「鉄硫黄クラスター」という不安定な因子を用いて TtuB の硫黄を tRNA に渡すことを突き止めました^[6]。さらに鉄硫黄クラスターを構成する 4 つの鉄のうち、TtuA のシステイン残基に結合していない露出した鉄(ユニーク鉄)が TtuB の硫黄を受け取ることを解明しました^[7]。

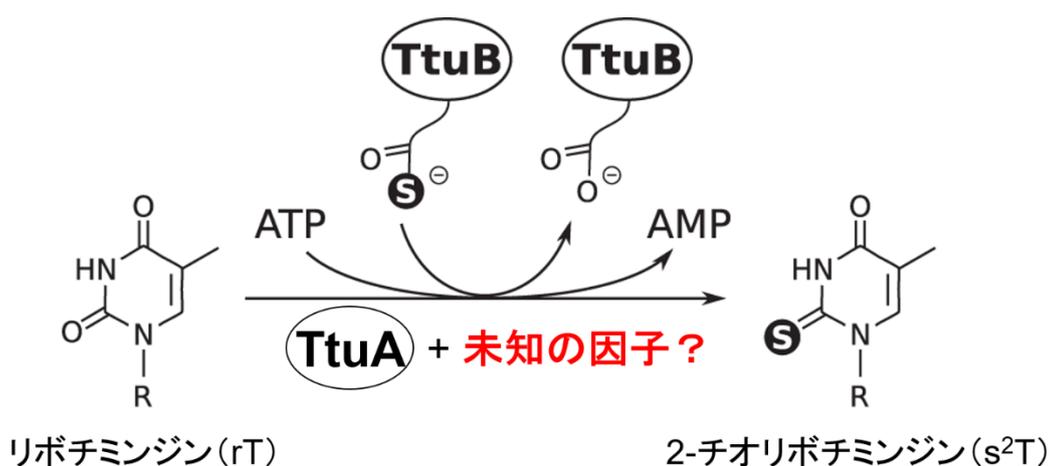


図 1. TtuA および TtuB による tRNA 硫黄修飾。TtuA は生体内のエネルギー分子 (ATP) を消費し、硫黄ドナータンパク質 TtuB から tRNA へと硫黄を渡す化学反応を促進する。TtuA が上記の化学反応を促進するためには、[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターが必要。

研究成果

我々は無酸素チャンバー内で酸化還元条件を厳密に制御したことにより、大腸菌で発現させた大量の TtuA が鉄硫黄クラスター特有の黄色を呈した状態で精製できました。さらに、X線結晶構造解析法を利用し、鉄硫黄クラスター-TtuA 複合体および、鉄硫黄クラスター-TtuA-TtuB 複合体の構造をそれぞれ分解能 2.75 Å と 2.20 Å で決定することに成功しました。得られた構造から、TtuA は4つの鉄と4つの硫黄から成る[4Fe-4S]型鉄硫黄クラスターを持つこと、TtuA のシステイン残基に結合していない露出した鉄（ユニーク鉄）があること、TtuA はユニーク鉄を介して TtuB と結合することを明らかにしました（図2）。

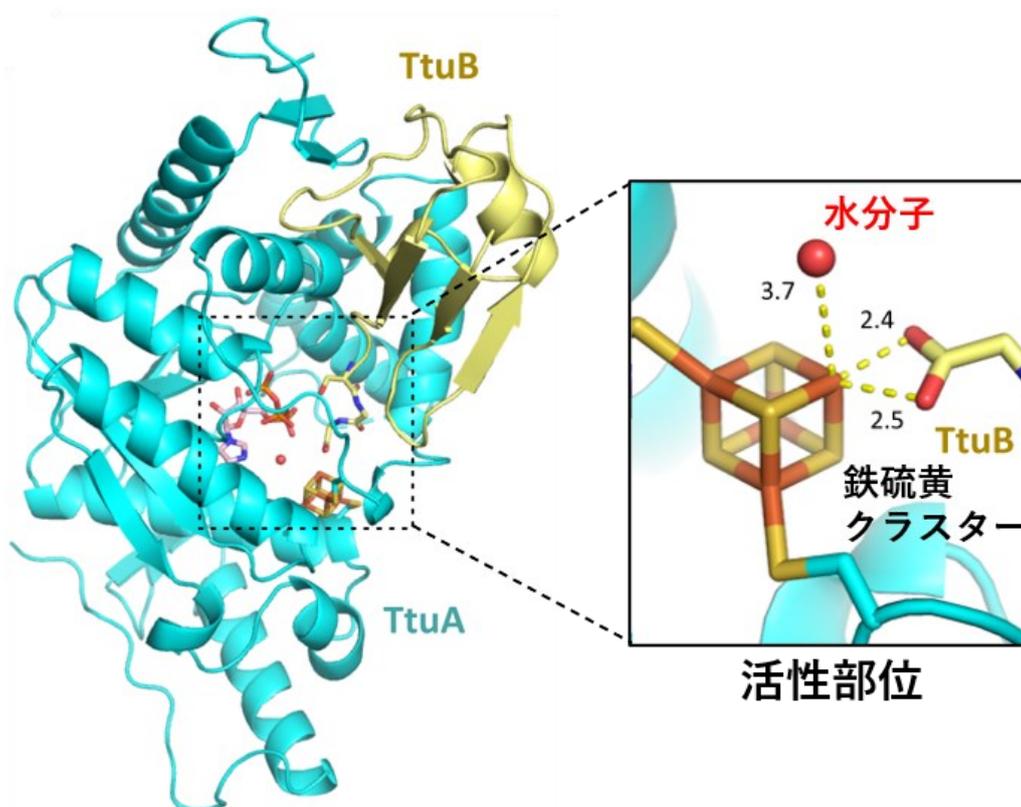


図2. 鉄硫黄クラスター-TtuA-TtuB の全体（左）および活性部位の構造（右）。ユニーク鉄は TtuB や水分子と直接結合している。結合距離はÅ ($=10^{-10}$ m)。

また、分光学・生化学的解析も組み合わせることで、TtuA は鉄硫黄クラスターが存在する場合のみ s²T 合成を触媒できること、ユニーク鉄と TtuB が結合してもすぐには硫黄が放出されず、基質 tRNA の活性化（アデニル化）が必要なことも明らかにしました。得られた構造に基づいて変異解析を行った結果、TtuB からユニーク鉄へ硫黄を渡すために重要な TtuA のアミノ酸残基の同定にも成功しました。これらの結果を基に、TtuA と TtuB が担う tRNA 硫黄修飾反応の包括的な分子機構を提案しました（図3）。

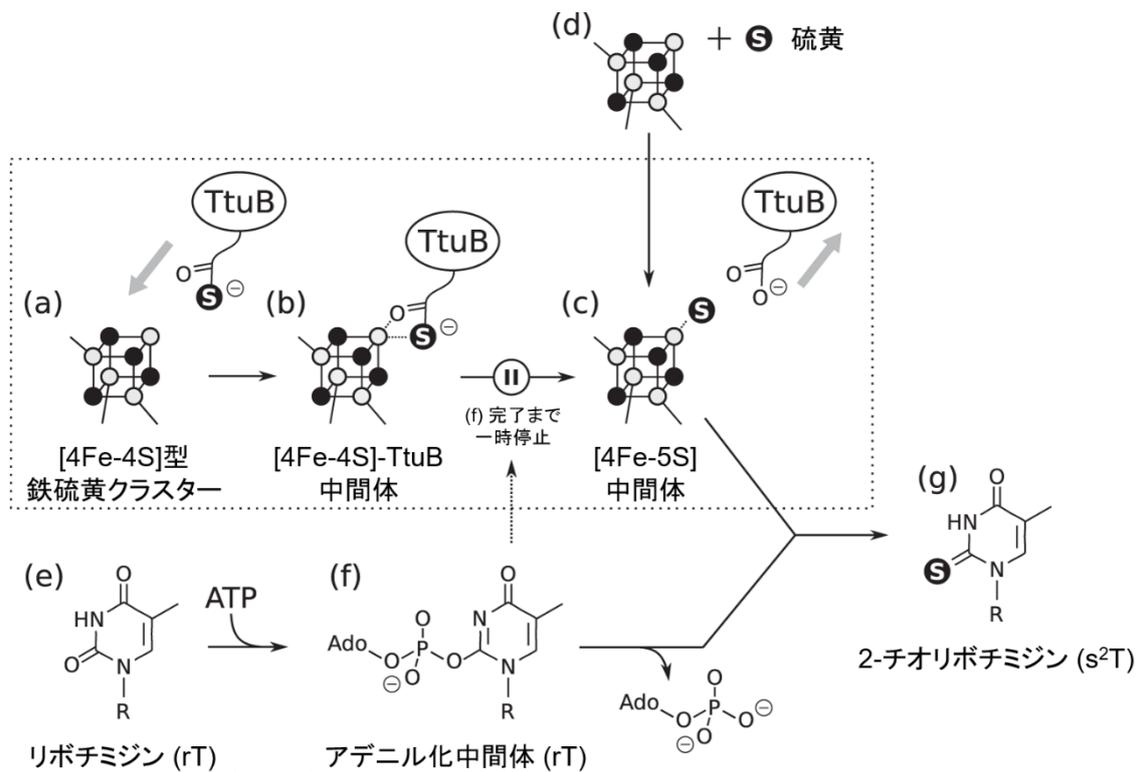


図 3. 本研究によって提唱された tRNA 硫黄修飾機構。(a) TtuB が TtuA の活性部位に近づく。(b) TtuB が鉄硫黄クラスターに結合して[4Fe-4S]-TtuB 中間体を形成する。(c) 点線矢印のように tRNA の活性化 (アデニル化) が完了すると、TtuB は TtuA のユニーク鉄に硫黄を渡し、[4Fe-5S]中間体を形成する。(d) 高熱菌ピュロコックス・ホリコシのように TtuB を持たない生物の場合、細胞内の遊離硫黄を利用して[4Fe-5S]中間体を形成する。(e) 基質 tRNA 塩基は ATP によって活性化される。(f) アデニル化中間体を形成する。(g) 最終的には、鉄硫黄クラスターに結合した硫黄が rT のアデニル基と反応し、s²T が合成される。点線の枠は、今回の研究で示された反応を示している。

今後への期待

TtuA と tRNA の結合様式および tRNA 活性化機構 (図 3e, f) の詳細は未だ不明です。そのため、鉄硫黄クラスター・TtuA・TtuB・tRNA 複合体の構造機能解析によってそれらを明らかにし、鉄硫黄クラスターを持つ tRNA 硫黄修飾酵素の詳細な反応機構が解明されることが期待されています。この細胞質における s²T 生合成機構の解明は、ミトコンドリアの機能における tRNA の硫黄修飾の影響についての理解を深めると考えられます。

参考文献

1. N. Shigi, *Front. Microbiol.* **9**, 2679 (2018).
2. T. Yasukawa et al., *EMBO J.* **20**, 4794–4802 (2001).
3. I. Barbieri, et al., *Nat. Rev. Cancer* **20**, 303–322 (2020).
4. F. Kimura-Harada, et al., *FEBS Lett.* **13**, 335–338 (1971).
5. N. Shigi, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 14296–14306 (2006).
6. M. Chen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 4954–4959 (2017).
7. M. Chen, et al., *Commun. Biol.* **3**, 168 (2020).