tRNA 硫黄修飾酵素の解析およびその応用

■ はじめに

好熱菌は 85℃という高温において生育可能な微生物である。それは高温下でも生体が機能を保つことが出来る様々な仕組みがあるためであり、中でも我々は tRNA の硫黄化に注目している。tRNA は遺伝情報である DNA から生体を構成するタンパク質をつくる際に、タンパク質の一次構造であるアミノ酸を指定する分子である。tRNA の硫黄化は、熱耐性に関与する部位と正確なアミノ酸を指定するために必要な部位におこる。アミノ酸を指定する部位の硫黄化はすべての生物で共通しており、ヒトにおいては硫黄化の異常が様々な疾病に関与することが分かっている。本研究では tRNA の硫黄修飾関連タンパク質について解析し、その応用を目指す。

■ 研究内容

- 先行研究：常温菌では tRNA の 54 位は 5-メチルウリジン(m^5U)であるが、好熱菌では m^5U の 2 位が硫黄化された 5-メチル 2-チオウリジン(m^5s^2U)が m^5U と共存しており、耐熱化に寄与している(図1)。

  すべての生物のグルタミン酸、グルタミン、リジンの tRNA では、遺伝暗号のコドンを読み取る tRNA のアンチコドン 34 位が 5-メチルチオウリジン誘導体(xm^5s^2U)に修飾されている。これは正確にアミノ酸を指定するために必要不可欠なシステムである(図1)。
- 目的：tRNAの硫黄化酵素を同定し、機能解析することで、硫黄化の耐熱性への寄与や正確なアミノ酸指定における役割を明らかにする。
- 方法：高度好熱真正細菌である *Thermus thermophilus*を用い、硫黄化にかかわる遺伝子候補を探索し、欠損変異株を解析する。
- 結果：tRNA硫黄化酵素TtuA (tRNA-two-thiouridine A) と硫黄運搬タンパク質TtuB、TtuB活性化酵素TtuCを同定した。これらの欠損株は高温下で生育不可能となった。またこれらの組換えタンパク質を用いて試験管内でtRNA硫黄化反応を解析した。

■産業への応用

- 硫黄化 tRNA は熱に安定であるために高温下でタンパク質を合成することが可能である。好熱菌由来の無細胞タンパク質生合成システムに、今回同定した硫黄化酵素で耐熱化したtRNAを加えることで、新規高温下高効率生体外タンパク質合成系の創出を試みる(図2)。
- 真核生物のtRNA34位の硫黄化修飾酵素と今回同定した好熱菌のtRNA54位硫黄化酵素には相同性がある(図2)。ヒトにおいてはtRNA34位の硫黄化酵素発現異常や硫黄修飾塩基の欠損が乳がんや前立腺がん、ミトコンドリア脳筋症の原因となることが明らかにされている。今回同定した硫黄修飾タンパク質をモデルに、様々な疾病の原因解明や治療が期待出来る(図3)。

図1 硫黄修飾塩基の位置と機能

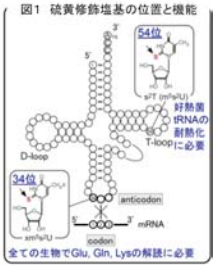

図2 tRNA硫黄化酵素解析の応用

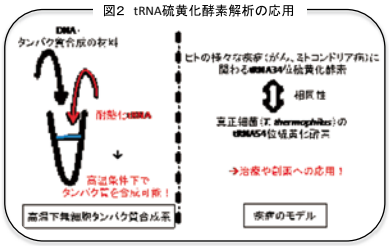

図3 硫黄化の生合成機構

生物種	修飾塩基	位置	機能	修飾酵素	活性中心
真正細菌	xm^5s^2U	34	コドン解読	MnmA type	R-SSH
真核生物（ミトコンドリア）	xm^5s^2U	34	コドン解読	MnmA type	R-SSH
真核生物（細胞質）	xm^5s^2U	34	コドン解読	TtuA/Ncs6 type	R-SSH R-COSH
好熱性真正細菌	m^5s^2U (s^2T)	54	立体構造の熱安定化	TtuA/Ncs6 type	R-SSH R-COSH

R-SSH:ペアスルフィド / R-COSH: チオカルボキシレート

■ 関連文献

1) Shigi N *et al.*, **EMBO J.**, 17;27(24):3267-78, 2008.
2) Shigi N., **J Biol Chem.**, 18;287(21):17568-77., 2012.
3) Nakagawa H. *et al.*, **Proteins.**, 81(7):1232-44., 2013.
4) Shigi N., **Front Genet.**, 2;5:67., 2014

代表発表者　**姫野　美沙緒（ひめの　みさお）[1)]**
　　鳴　直樹（しぎ　なおき）[2)]
所　　属　**1)産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門・イノベーションスクール 10 期 PD 生**
　　2)産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 最先端バイオ技術探求グループ・主任研究員
問合せ先　**〒135-0064 東京都江東区青海 2-4-7**
　　TEL：03-3599-8927, FAX:03-3599-8494
　　E-mail: himeno-kuroki-misao@aist.go.jp、naoki-shigi@aist.go.jp

■キーワード： (1) tRNA
(2) 好熱菌
(3) 硫黄化修飾

■共同研究者：鈴木　勉
（東京大学大学院工学系研究科・化学生命工学専攻）