

とが明らかとなった。

5. おわりに

本研究では、サプレッサー tRNA が他の tRNA には見られないような非常に特殊な構造をとっていることを明らかにし、その特徴的な構造を PylRS が形状相補的に認識することによって直交性が維持される機構を解明することができた。近年、サプレッサー tRNA に非天然のアミノ酸を結合させる aaRS 変異体を作製し、非天然型アミノ酸をタンパク質に取り込ませるバイオテクノロジーが盛んになっている。本研究から、自然は 30 億年前からこのような遺伝暗号の読み替えを生命の中で行ってきたことが明らかとなった。この成果が、さらなる遺伝暗号の拡張と有用な機能を持ったタンパク質の合成技術の実現への手助けとなることを期待している。

- 1) Kuchino, Y. & Muramatsu, T. (1996) *Biochimie*, 78, 1007–1015.
- 2) Beier, H. & Grimm, M. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29, 4767–4782.
- 3) Xu, X., Carlson, B.A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R. S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. (2007) *Plos Biology*, 5, 96–105.
- 4) Yuan, J., Palioura, S., Salazar, J.C., Su, D., O'Donoghue, P., Hohn, M.J., Cardoso, A.M., Whitman, W.B., & Söll, D. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 18923–18927.
- 5) Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J. A., & Chan, M.K. (2002) *Science*, 296, 1462–1466.
- 6) Théobald-Dietrich, A., Frugier, M., Giegé, R., & Rudinger-Thiron, J. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32, 1091–1096.
- 7) Watanabe, Y., Kawai, G., Yokogawa, T., Hayashi, N., Kumazawa, Y., Ueda, T., Nishikawa, K., Hirao, I., Miura, K., & Watanabe, K. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 5378–5384.
- 8) Helm, M., Brulé, H., Friede, D., Giegé, R., Pütz, D., & Florentz, C. (2000) *RNA*, 6, 1356–1379.
- 9) Herring, S., Ambrogelly, A., Polycarpo, C.R., & Söll, D. (2007) *Nucleic Acids Res.*, 35, 1270–1278.
- 10) Mukai, T., Kobayashi, T., Hino, N., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371, 818–822.
- 11) Herring, S., Ambrogelly, A., Gundllapalli, S., O'Donoghue, P., Polycarpo, C.R., & Söll, D. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 3197–3203.
- 12) Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Kobayashi, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2008) *J. Mol. Biol.*, 378, 634–652.
- 13) Ambrogelly, A., Gundllapalli, S., Herring, S., Polycarpo, C., Frauer, C., & Söll, D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3141–3146.

野澤 佳世, 石谷 隆一郎, 濡木 理
(東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻)

Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNA^{Pyl} structure reveals the molecular basis of orthogonality
Kayo Nozawa, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

tRNA の硫黄修飾塩基の機能とその生合成機構

はじめに

RNA は転写後にスプライシングや化学修飾などのプロセシングを経て成熟し、その機能を発揮する。tRNA はタンパク質合成において mRNA のコドンとアミノ酸を結び付けるアダプター分子として働く。tRNA には多数の転写後修飾が存在するが、なかでも硫黄修飾はコドン認識や立体構造の安定化などの役割を担っている。そのため、RNA に硫黄を導入する機構は生命の維持にとって欠くことのできない重要な機構である。

1. 硫黄修飾塩基 2-チオウリジン (s²U) の機能

現在までに 90 種類以上の化学修飾が tRNA 分子に見られている (<http://biochem.ncsu.edu/RNAmods/>)。修飾の形態はメチル化、アセチル化、硫黄化、アミノ酸付加、糖付加など実に様々であるが、本稿ではアンチコドンと T-ループにある 2-チオウリジン (s²U) の機能と生合成について概説する。

アンチコドンウォブル位 (34 位) の修飾はコドンの縮重を適切に制御し、正確なタンパク質合成に必須である。グルタミン酸、グルタミン、リジンの tRNA の 34 位はほぼすべての生物において、5-メチル-2-チオウリジン誘導体 (xm⁵s²U) に修飾される¹⁾(図 1A) (5 位は生物種により異なる)。かさ高い 2-チオ基と 2'-水酸基の立体障害により C3'-endo 型が安定化される²⁾(図 1B)。これによりアンチコドンの xm⁵s²U はコドン 3 文字目の A・G との対合を強め、C・U と対合するのを防ぎ、2-コドンボックスの正確な解読が可能になる。ヒトではミトコンドリアリジン tRNA の修飾欠損によりミトコンドリア病 (MERRF) が発症する

ことからこの修飾の重要性が示唆されている³⁾。

さらに一部の好熱性細菌にはT-ループにも硫黄修飾が存在する。常温生物では、ほぼすべてのtRNA種で54位は5-メチルウリジン (m^5U , リボチミジン (rT) と呼ばれる) であるが、好熱菌 (真正細菌 *Thermus thermophilus*,

Aquifex aeolicus, 古細菌 *Pyrococcus furiosus* など) のtRNAでは一部硫黄化され、5-メチル-2-チオウリジン (m^5s^2U , または s^2T) となっている⁴⁻⁶⁾ (図1A)。アンチコドンの硫黄修飾と同じく、 m^5s^2U もC3'-endo型が安定化される (図1B)。これによりT-ループとD-ループから構成される

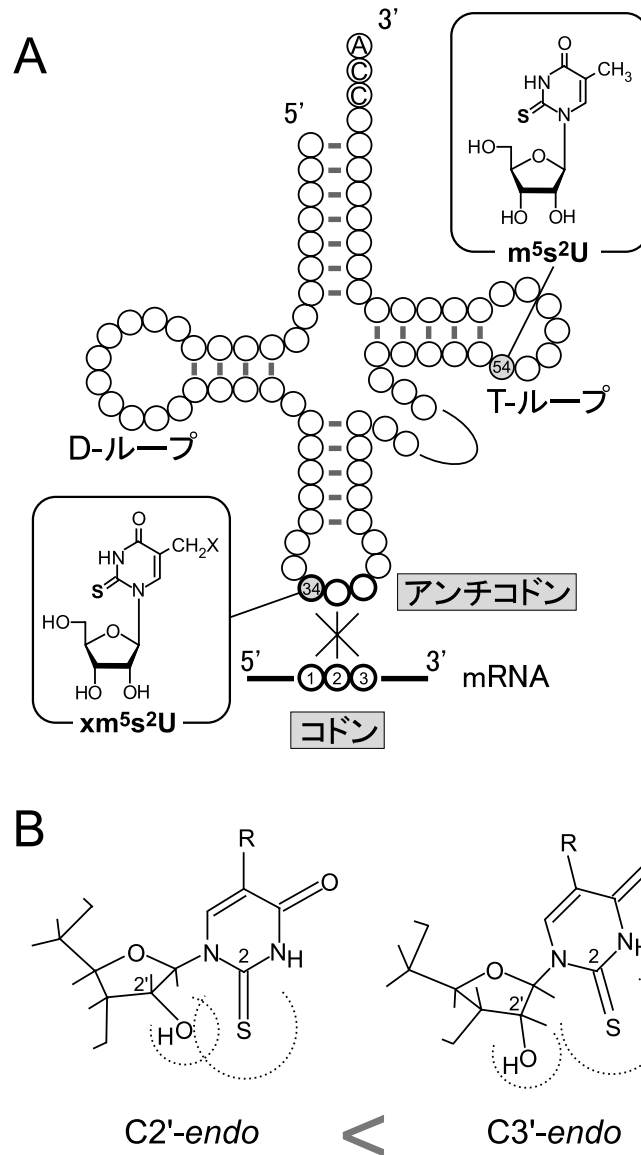


図1 tRNAの硫黄修飾

A. 硫黄修飾塩基の化学構造とtRNA上の位置。

34位 (アンチコドンウォブル位) はコドンの3文字目と対合する。xm⁵s²U: 5-メチル2-チオウリジン誘導体, m⁵s²U: 5-メチル2-チオウリジン。

B. xm⁵s²Uの分子内相互作用による構造安定化。

かさ高い2-チオカルボニル基と2'-水酸基の立体障害によりC3'-endo型が安定化される。

表1 2-チオウリジン (s^2U) の生合成系の比較

生物種	修飾塩基	tRNA 上の位置	機能	修飾酵素	活性化硫黄種
大腸菌	mnm^5s^2U	34 位	コドン解読	MnmA 型	ペアスルフィド
出芽酵母 (ミトコンドリア)	$cmnm^5s^2U$	34 位	コドン解読	MnmA 型	ペアスルフィド
出芽酵母 (細胞質)	mcm^5s^2U	34 位	コドン解読	Ncs6/TtuA 型	ペアスルフィド チオカルボキシレート
好熱菌 (<i>T. thermophilus</i>)	m^5s^2U (s^2T)	54 位	立体構造の熱安定化	Ncs6/TtuA 型	ペアスルフィド チオカルボキシレート

mnm^5s^2U : 5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン

$cmnm^5s^2U$: 5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン

mcm^5s^2U : 5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン

m^5s^2U : 5-メチル-2-チオウリジン

tRNA の肩領域の構造が安定化され、tRNA 全体の熱安定性が向上する。高温環境では硫黄化 tRNA の割合が増え、高温適応していると考えられている⁷⁾。実際 *T. thermophilus* でこの硫黄修飾を欠損させると高温で生育できない⁸⁾。

長年これらの s^2U がどのように生合成されるかは謎であったが、最近の研究から大腸菌・酵母・好熱菌の s^2U の生合成系は2種類に大別できることが明らかになってきた(表1)。なお5位の修飾には別の酵素群が関与する。

2. アンチコドンの硫黄修飾塩基 s^2U の生合成 (大腸菌)

大腸菌では、 s^2U34 の生合成にシステイン脱硫酵素 IscS と、tRNA に結合し硫黄を導入する修飾酵素 MnmA が関与することが知られていた⁹⁾。システイン脱硫酵素はピリドキサルリン酸依存的にシステインを分解し、酵素自身に結合したペアスルフィド (R-S-SH) を形成する。この硫黄原子は鉄硫黄クラスターなどの生合成にも使われる。しかし、IscS と MnmA のみでは tRNA の硫黄化効率は低く、他の因子の関与が予想されていた。そこで筆者を含む鈴木勉らのグループでは大腸菌の遺伝子破壊株コレクションの tRNA 修飾を質量分析により網羅的に解析し、五つの生合成遺伝子を同定した。さらに試験管内の硫黄転移反応の再構成実験から、システイン脱硫酵素 IscS により生成されたペアスルフィドが TusA, TusBCD 複合体, TusE の保存システイン残基に順に受け渡された後修飾酵素 MnmA に渡されるという、活性化硫黄リレー系があることを明らかにした¹⁰⁾(図2A)。MnmA は ATP を用いウリジンの2位の酸素原子をアデニレートとして活性化し、最終的に硫黄を tRNA に導入する¹¹⁾。

3. アンチコドンの硫黄修飾塩基 s^2U の生合成 (真核生物)

真核生物ミトコンドリア tRNA の s^2U34 生合成にはシステイン脱硫酵素 Nfs1 と、Mtu1 という大腸菌 MnmA のホモログが関与している^{12,13)}。活性化硫黄リレー系は現在のところ未同定である。

一方、真核生物細胞質の s^2U34 生合成については、まずシステイン脱硫酵素 Nfs1 と鉄硫黄クラスターの生合成系が関与することが報告された¹³⁾。さらに最近複数のグループにより相次いで五つの生合成遺伝子が同定された(出芽酵母では *TUM1*, *URM1*, *UBA4*, *NCS6*, *NCS2*¹⁴⁻¹⁶⁾)。分裂酵母、線虫、ヒト培養細胞でも解析され、真核生物に保存された系であることが明らかになったが、出芽酵母の系を例に解説する(図2B)。システイン脱硫酵素 Nfs1 に生成されたペアスルフィドは Tum1, Uba4 のロダネーゼ様ドメイン (RLD) に順に渡される。Urm1 (ubiquitin related modifier 1) はユビキチンに類似したタンパク質翻訳後修飾因子であり、Uba4 は Urm1 の活性化酵素 (E1 酵素) として標的タンパク質のウルミル化に関与することが報告されている¹⁷⁾(図2B下側)。Urm1 のカルボキシ末端は Uba4 によりアデニル化された後、硫黄原子を受け取りチオカルボキシレート (R-COSH: カルボキシル基の酸素が硫黄に置換された活性化硫黄種) を形成する。その後 tRNA に結合する修飾酵素複合体 Ncs6/Ncs2 が Urm1-COSH から tRNA に硫黄を導入すると考えられている。

4. T ループの硫黄修飾塩基 s^2U の生合成 (好熱菌)

好熱菌 *T. thermophilus* はゲノムが解読されており、遺伝子破壊が比較的簡単に行え、またその組換えタンパク質は

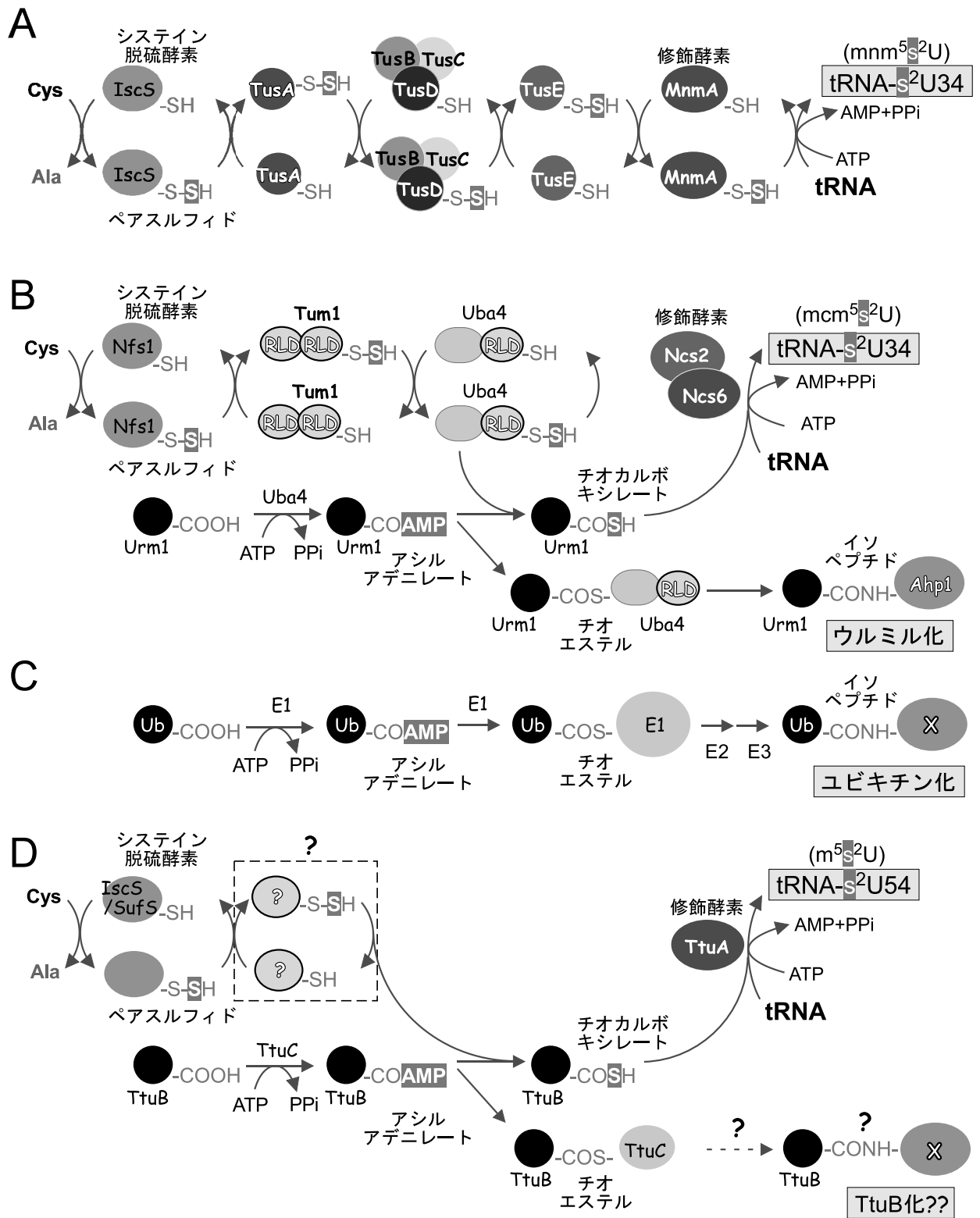


図 2

非常に安定で生化学的解析が容易である。私たちはこれらの利点に質量分析による高感度な修飾塩基の解析法を組み合わせて、 s^2U54 生合成遺伝子を五つ（システイン脱硫酵素 (IscS と SufS), TtuA, TtuB, TtuC) 同定し、硫黄化反応を試験管内で再構成し解析した^{8,18,19)} (図 2D)。TtuB のカルボキシ末端は活性化酵素 TtuC によりアデニル化された後、システイン脱硫酵素のペアスルフィド硫黄を受け取り、チオカルボキシレートになることが明らかになった。そして低い効率ではあるが TtuB-COSH の硫黄が修飾酵素 TtuA により ATP 依存的に tRNA に導入されることを示した。この系は真核生物細胞質の s^2U34 の生合成機構と非常に類似していることが明らかになった。TtuA は Ncs6 に、TtuB は Urm1 に、TtuC は Uba4 にそれぞれ配列が類似している。そして遺伝子破壊株の解析から、Tum1 の好熱菌ホモログも s^2U54 の生合成に関与していることを明らかにしている (鳴直樹ら、投稿準備中)。

5. 他の硫黄代謝系との関連

システイン脱硫酵素は鉄硫黄クラスターなど様々な硫黄化合物の生合成系にペアスルフィドを供給するが、TusA と Tum1 はシステイン脱硫酵素の活性を促進し、tRNA 硫黄修飾系に硫黄を振り分ける役割がある。Tus タンパク質のホモログは光合成細菌では硫黄酸化に関与することが報告されている²⁰⁾。Tum1 と Uba4 にあるロダネーゼ様ドメイン (RLD) は種々の硫黄代謝に関与するタンパク質に幅広くみられる。

酵母細胞質・好熱菌の s^2U の生合成系ではチオカルボキシレートが中間体として形成される。硫黄を含む補酵素で

図 2 tRNA の 2-チオウリジン生合成系とユビキチン化系の比較

A. 大腸菌における s^2U34 の生合成系。

システイン脱硫酵素 IscS により生成されたペアスルフィドが TusA, TusBCD 複合体, TusE, 修飾酵素 MnmA に順に渡される。最終的に MnmA が硫黄を ATP 依存的に tRNA に導入する。

B. 酵母細胞質における s^2U34 の生合成系。

システイン脱硫酵素 Nfs1 に生成されたペアスルフィドは Tum1, Uba4 のロダネーゼ様ドメイン (RLD) に順に渡される。Urm1 のカルボキシ末端は Uba4 によりアデニル化された後、硫黄原子を受け取りチオカルボキシレート (R-COSH) を形成する (中央)。その後 tRNA に結合する修飾酵素複合体 Ncs6/Ncs2 が Urm1-COSH から ATP 依存的に tRNA に硫黄を導入すると考えられる。Urm1 はユビキチンに類似したタンパク質翻訳後修飾因子であり、Uba4 は Urm1 の活性化酵素 (E1 酵素) として標的タンパク質 Ahp1 のウルミル化にも関与する (下段)。

C. 真核生物ユビキチン化系。

ユビキチン (Ub) は E1 酵素とチオエステル結合体を形成し、E2 および E3 酵素により標的タンパク質に転移され、その機能を制御する。

D. 好熱菌における s^2U54 の生合成系。

TtuB のカルボキシ末端は活性化酵素 TtuC によりアデニル化された後、システイン脱硫酵素 (IscS または SufS) のペアスルフィド硫黄を受け取り、チオカルボキシレートになる (中央)。そして TtuB-COSH の硫黄が修飾酵素 TtuA により ATP 依存的に tRNA に導入される。酵母細胞質の系 (B) との比較から Tum1 の好熱菌ホモログも硫黄転移に関与していると思われる。また、試験管内では TtuB-TtuC チオエステル結合体が形成されることから好熱菌にもユビキチン化に類似したタンパク質の翻訳後修飾系があることが示唆される (下段)。

あるモリブデン補酵素とチアミンの生合成にもそれぞれ TtuB/Urm1 と TtuC/Uba4 のホモログが関与しチオカルボキシレートが硫黄の供与体となる²¹⁾。 *T. thermophilus* のゲノムには TtuC 様の ORF は一つしかなく、*ttuC* の遺伝子破壊株の解析から、好熱菌では TtuC は tRNA 硫黄修飾、モリブデン補酵素、チアミンの生合成すべてに機能していることが判明した¹⁹⁾。この結果から tRNA の硫黄修飾と含硫黄補酵素の生合成系は非常に近縁であり、これらの起源は同一であることが示唆される。

酵母において、鉄硫黄クラスターの生合成因子の機能破壊株では細胞質の s^2U の生合成がおこらない¹³⁾ ことから、細胞質の s^2U の生合成系のどこかに鉄硫黄クラスターをもつタンパク質があることが推定されるが現在のところ未同定である。修飾酵素 Ncs6 は Cys-Xaa-Xaa-Cys からなるモチーフを複数もつのでその候補と考えられる。

6. 真核生物ユビキチン系との関連

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるユビキチン化は、細胞周期の進行やシグナル伝達など生体にとって重要な現象と関連している。このシステムは真核生物においては普遍的に存在するが、原核生物ではこれまで確認されていない。ユビキチンは E1 酵素とチオエステル結合体を形成し、最終的に標的タンパク質に転移され、その機能を制御する (図 2C)。好熱菌 s^2U54 の生合成系の硫黄キャリア TtuB とその活性化酵素 TtuC はそれぞれユビキチンと E1 酵素に配列が類似している。試験管内では還元剤に感受性の TtuB-TtuC 共有結合体が微量に生成され、チオエステルの介して結合していることが質量分析により判明した¹⁹⁾。

原核生物でこのようなチオエステル体が観測されたのは本研究が初めてである。この結果から好熱菌にもユビキチン化に類似したタンパク質の翻訳後修飾系があることが示唆される(図2D下側)。これは原核生物では全く新しいタンパク質の機能制御機構と考えられるので、現在好熱菌内でTtuB化されているタンパク質があるのか解析中である。また前述のように真核生物ではUrm1がタンパク質翻訳後修飾因子として機能するとともに、 s^2U の生合成因子としても機能する。それゆえ真核生物のユビキチンによるタンパク質翻訳後修飾システムは、原核生物にもみられるチオカルボキシレートが関与する硫黄化合物の生合成系から進化してきたと考えられる。

おわりに

一見単純そうに思える硫黄修飾塩基の生合成は多数の因子が関与する複雑な仕組みによって達成されることが明らかになってきた。時として生体にとって毒性を示す活性化硫黄種を安定化させる硫黄キャリアタンパク質の関与がこの生合成系の特徴である。これにより反応性の高い活性化硫黄種を安全に目的の基質とのみ反応させることができる。これは硫黄化合物生合成の共通原理であると考えられる。今後は各経路による活性化硫黄種(ペアスルフィド・チオカルボキシレート)の使い分け・その反応性の違い、キャリアタンパク質間の硫黄転移の分子メカニズムを明らかにしていきたい。

謝辞

これまでご指導頂いた東京大学渡辺公綱名誉教授(現東京薬科大学)・東京大学鈴木勉教授、両研究室のメンバー、共同研究者に感謝致します。また文部科学省科研費補助金・内藤記念科学振興財団のサポートにも感謝致します。

- 1) Björk, G.R. (1995) in *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (Söll, D. & RajBhandary, U. eds.), pp. 165–205, ASM press, Washington DC.
- 2) Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura, H., Yamazumi, Z., Nishimura, S., & Miyazawa, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **82**, 4905–4909.
- 3) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S., & Watanabe, K. (2001) *EMBO J.*, **20**, 4794–4802.
- 4) Watanabe, K., Oshima, T., Saneyoshi, M., & Nishimura, S. (1974) *FEBS Lett.*, **43**, 59–63.
- 5) Kowalak, J.A., Dalluge, J.J., McCloskey, J.A., & Stetter, K.O. (1994) *Biochemistry*, **33**, 7869–7876.
- 6) Awai, T., Kimura, S., Tomikawa, C., Ochi, A., Ihsanawati, Bessho, Y., Yokoyama, S., Ohno, S., Nishikawa, K., Yoko-

- gawa, T., Suzuki, T., & Hori, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20467–20478.
- 7) Yokoyama, S., Watanabe, K., & Miyazawa, T. (1987) *Adv. Biophys.*, **23**, 115–147.
- 8) Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Watanabe, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14296–14306.
- 9) Kambampati, R. & Lauhon, C.T. (2003) *Biochemistry*, **42**, 1109–1117.
- 10) Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., & Suzuki, T. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 97–108.
- 11) Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T., & Nureki, O. (2006) *Nature*, **442**, 419–424.
- 12) Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., & Watanabe, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1613–1624.
- 13) Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T., & Hayashi, H. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 2841–2847.
- 14) Nakai, Y., Nakai, M., & Hayashi, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 27469–27476.
- 15) Leidel, S., Pedrioli, P.G., Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K., & Peter, M. (2009) *Nature*, **458**, 228–232.
- 16) Noma, A., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1335–1352.
- 17) Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 7462–7465.
- 18) Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., & Watanabe, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 2104–2113.
- 19) Shigi, N., Sakaguchi, Y., Asai, S., Suzuki, T., & Watanabe, K. (2008) *EMBO J.*, **27**, 3267–3278.
- 20) Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A.S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., Deuster, O., & Brune, D.C. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 1392–1404.
- 21) Pitterle, D.M. & Rajagopalan, K.V. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13499–13505.

鳴 直樹

(独立行政法人 産業技術総合研究所
バイオメディシナル情報研究センター)

Functions and biosynthesis pathway of sulfur-modifications in tRNA

Naoki Shigi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-4-7 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan)

筋萎縮性側索硬化症におけるD-セリン

はじめに

生体はL体のアミノ酸で統一されていると考えられてき