

新しい tRNA 修飾酵素を発見

無酸素環境下で鉄と硫黄を含む酵素に関わる反応機構を解明

岐阜大学工学部の横川隆志教授、大野敏准教授、尾木野弘実助教、及び研究室修了生・卒業生の能村友一朗博士、安田旭宏さん、日浦恵太さん、仲田沙織さん、岐阜大学工学部の安藤香織教授、岡夏央准教授、愛媛大学大学院理工学研究科の堀弘幸教授、平田章講師、および研究室修了生の河村卓哉博士で構成される研究グループは、タンパク質が作られる際に重要な働きをするトランスファーRNA (tRNA) とよばれる生体高分子に含まれるアーケオシンという化合物がどのように作られるかを、世界で初めて分子レベルで解明しました。

本研究成果は、英国の国際誌「*Nature Chemical Biology*」(電子版) 2019 年 11 月 19 日付(日本時間午前 1 時)に掲載されました。

【発表のポイント】

- ・ アーキア¹⁾由来の tRNA²⁾ 中に見出されるアーケオシン³⁾ という修飾ヌクレオシドが作られる際の反応中間体となる新奇の修飾ヌクレオシドを発見した。
- ・ 従来アーケオシンを合成すると考えられていた酵素 (ArcS) は、実は反応中間体を生成する酵素であることを明らかにした。
- ・ 反応中間体の化学構造を質量分析法⁴⁾ 等で決定した。
- ・ 複数のアーキアのゲノム情報を比較することによって、反応中間体からアーケオシンを合成する酵素の遺伝子を発見した。
- ・ 上記の遺伝子産物であるタンパク質 (RaSEA) が鉄硫黄クラスター⁵⁾ を含むことを明らかにした。
- ・ RaSEA が ArcS と複合体を形成し、無酸素環境下でのみ、アーケオシンを合成することを証明した。
- ・ 本研究は、tRNA が細胞内でどのように成熟するか、を理解することに貢献する。

【概要】

アーキアに存在する tRNA の立体構造の中心部には、アーケオシンとよばれる修飾ヌクレオシドが見つかります。アーケオシンは tRNA の立体構造を安定化すると考えられていますが、発見以来 25 年以上、その合成経路は不明なままでした。本研究では、これまでアーケオシンを合成するために必要と考えられてきた二つの tRNA 修飾酵素 (ArcTGT、ArcS) 以外に、第三の tRNA 修飾酵素 (RaSEA) が存在することを発見し、さらにアミノ酸であるリシン (Lys) とメチル基供与体としても知られる S-アデノシルメチオニン (SAM) が反応に必要なことを明らかにしました。また、RaSEA は ArcS と複合体を形成するとともに、酸素感受性であることが知られる鉄硫黄クラスターとよばれる触媒中心をもっていると推定されたことから、タンパク質複合体 (ArcS・RaSEA) の精製とアーケオシン合成反応を無酸素の環境下で行うことで、世界で初めてアーケオシンを含む tRNA を合成することに成功しました。

【研究内容】

タンパク質が作られる際、tRNA (図 1 a, b) は遺伝子とタンパク質の間を仲介する重要な物質で、生命が維持されるために、絶対に必要な生体高分子です。また、tRNA には、遺伝子 DNA から転写された後に、種々の化合物が付加されるという特徴があります。これまで、100 種類を超える、化合物が付加されたヌクレオシド、いわゆる修飾ヌクレオシドが見つっています。修飾ヌクレオシドは tRNA が働く精度を高めたり、tRNA の立体構造をより安定にしたりすると考えられています。

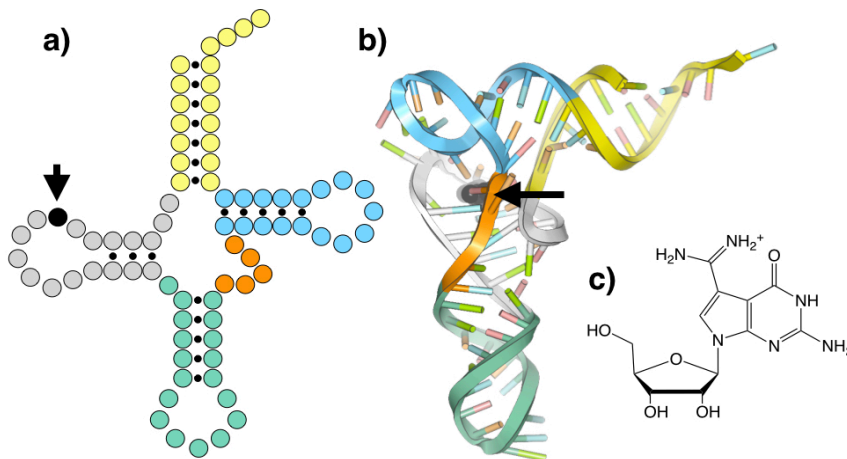


図 1 tRNA とアーケオシン

a) tRNA の二次構造

b) tRNA の立体構造

c) アーケオシンの化学構造

矢印はアーケオシンが見出される部位を示す

アーキア tRNA の場合、多くの tRNA の立体構造の中心部には、アーケオシンという修飾ヌクレオシドが見つかります (図 1 c) 。アーケオシンは 1981 年にその存在が見出され、1993 年にその化学構造が決定されました。その複雑な構造から複数の酵素が関わって合成されると推定され、1997 年、その第一の酵素 ArcTGT が見つかりました。ArcTGT は tRNA の 15 番目のグアニン塩基を preQ₀ とよばれる 7-シアノ-7-デアザグアニンに交換します (図 2 a) 。しばらく時を置いて、2010 年には preQ₀ を含む tRNA からアーケオシンを含む tRNA を合成するという第二の酵素 ArcS が報告されました (図 2 b) 。

本研究グループでは ArcS を用いてアーケオシンを合成しようと何度も試みましたが、どうしても試験管内で反応を再現することができませんでした。そこで ArcS の働きを再調査することにしました。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の ArcS 遺伝子をなくすると確かにアーケオシンは見られなくなりましたが、そこに別種のアーキア *Thermoplasma acidophilum* の ArcS 遺伝子を組み込んでもアーケオシンの生成は回復せず、代わりに、これまで知られていないヌクレオシドが現れることに気づきました。この新奇ヌクレオシドの質量分析を行うことによって、このヌクレオシドは preQ₀ に Lys が付加された塩基をもっていることを突き止めました (図 2 c) 。さらに従来、アーケオシンを合成すると報告されていた ArcS は preQ₀ に Lys を付加するまでの反応しか行わないことを発見しました。この結果から、アーケオシン合成には第三の酵素が存在すること、第二の酵素 ArcS と第三の酵素の間には相性があり、異なる生物の酵素の組み合わせでは、アーケオシンを生成できないことがわかりました。

第三の酵素を探すために、好塩性アーキア *Haloquadratum walsbyi* に着目しました。ArcTGT 遺伝子はほぼすべてのアーキアに存在しますが、例外的に *H. walsbyi* には存在しません。さらに *H. walsbyi* には ArcS 遺伝子もありませんでした。そこで第三の酵素遺伝子も存在しないと考えて複数のアーキアのゲノム情報を比較することで第三の酵素遺伝子である RaSEA 遺伝子を発見することができました。

RaSEA は ArcS と複合体を形成すること、またそのアミノ酸配列から SAM を反応に利用すること、酸素感受性の鉄硫黄クラスターをもつこと、が推測されました。そこで、無酸素条件を作り出せる装置内で ArcS と RaSEA の複合体 (ArcS•RaSEA) を精製し、preQ₀ を含む tRNA に Lys と SAM を加えて反応することで、アーケオシンを含む tRNA が合成されることを質量分析で確かめました (図 2 d) 。

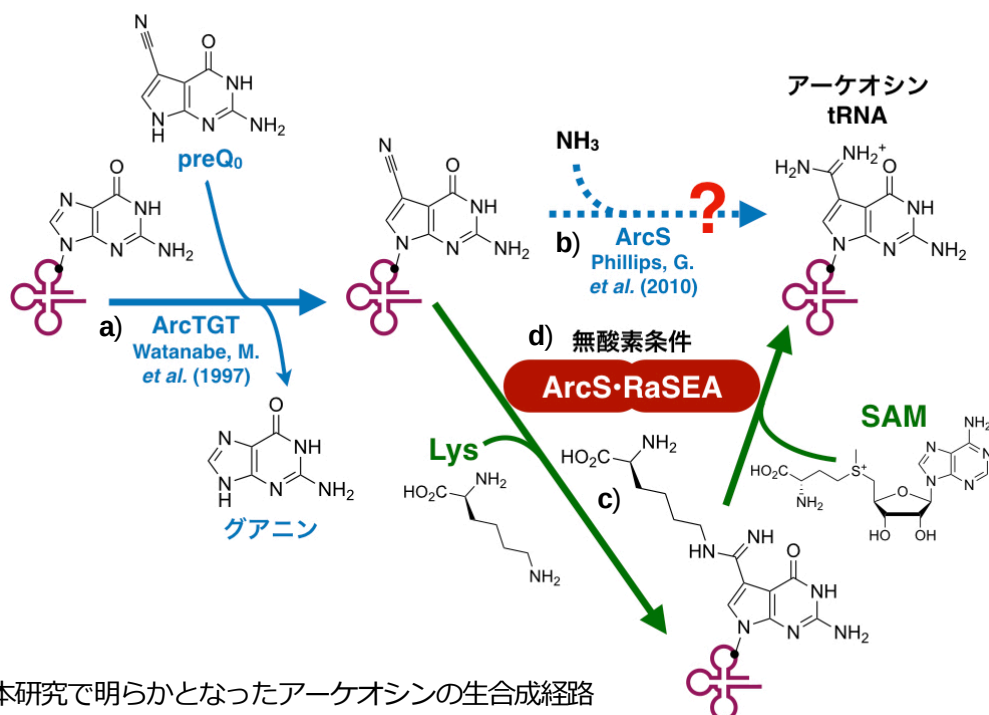


図2 本研究で明らかとなったアーケオシンの生合成経路

本研究では、生物が tRNA の働きを最適化するために、複雑な過程で tRNA を成熟する、その一端を明らかにすることができました。どの生物においても tRNA の成熟は生命を維持するための重要なステップになっているので、今後、高次生命現象と tRNA の転写後修飾との関連性が明らかになっていくことを期待しています。

なお、本研究は、科学研究費補助金、越山科学技術振興財団の支援を受けています。

【今後の展開】

本研究の成果により、tRNA に ArcTGT と ArcS•RaSEA を作用させれば、アーケオシンを合成することができるとわかりました。実際にアーケオシンが存在する tRNA を作製して、アーケオシンがどの程度 tRNA の安定化に貢献するのかを調べます。また、ArcTGT や ArcS•RaSEA を上手に活用すれば、tRNA の種類を問わず tRNA を蛍光標識することができます。蛍光標識された tRNA を利用して一分子イメージングを行うことで、タンパク質が合成される様子を可視化できると期待しています。

【論文情報】

雑誌名：Nature Chemical Biology

タイトル：Identification of a radical SAM enzyme involved in the synthesis of archaeosine

著者：Takashi Yokogawa, Yuichiro Nomura, Akihiro Yasuda, Hiromi Ogino, Keita Hiura, Saori

Nakada, Natsuhisa Oka, Kaori Ando, Takuya Kawamura, Akira Hirata, Hiroyuki Hori & Satoshi Ohno

DOI 番号：10.1038/s41589-019-0390-7

論文公開URL：https://www.nature.com/articles/s41589-019-0390-7

【用語解説】

- 1) **アーキア**：古細菌や始原菌とよばれることもある。地球上に生息する生物は、バクテリア（細菌）、アーキア、真核生物の3つのドメインに分類することができる。アーキアは形態こそバクテリアに似ているが、生命を維持するために必須な複製、転写、翻訳などの装置は真核生物に似ているため、近年、真核生物の起源はアーキアであると考えられるようになってきている。また、アーキアは炭素や窒素の地球規模の循環に関わっていると考えられることから、地球の環境研究面からも興味深い研究対象である。ただし、純粋培養が困難な種が多いため、生命現象を司る RNA やタンパク質の研究はバクテリアや真核生物に比べて大きく遅れている。

- 2) **tRNA** : トランスファー-RNA。分子量 約 25,000 と比較的低分子量の RNA で、タンパク質が作られる際、重要な働きをする。tRNA の末端にはアミノ酸が結合し、アミノ酸を活性化した状態でリボソームへと運搬する。リボソーム内で tRNA は、遺伝子 DNA のコピーであるメッセンジャー-RNA と結合することで遺伝子の塩基配列をタンパク質のアミノ酸配列へと変換するアダプター分子として働く。
- 3) **アーケオシン** : アーキアに存在する tRNA に特異的に見られる修飾ヌクレオシド。塩基部に正電荷をもつデアザグアニン誘導体を持ち、tRNA の立体構造の中心部に位置することから、tRNA の立体構造の安定化に重要な役割を担うと考えられている。
- 4) **質量分析法** : 分子をイオン化し、質量電荷比によって分離することで、その分子の質量を正確に測定することができる分析法。分子の質量変化を調べることで反応を追跡したり、分析中に分子がどのように壊れるか調べることで、分子の構造を推定したりすることができる。
- 5) **鉄硫黄クラスター** : 複数の鉄原子と硫黄原子が結合した構造で、一般的には、タンパク質中のシステイン残基と結合している。本研究で発見された酵素 RaSEA では、四つの鉄原子と四つの硫黄原子が三つのシステイン残基に結合した構造を持ち、反応に直接関わると推定される。

【本件に関する問い合わせ先】

＜研究に関すること＞

岐阜大学工学部教授 横川 隆志

電話 : 058-293-2644

E-mail : don@gifu-u.ac.jp

愛媛大学大学院大学院理工学研究科教授 堀 弘幸

電話 : 089-927-8548

E-mail : hori.hiroyuki.my@ehime-u.ac.jp

＜報道担当＞

岐阜大学総合企画部総務課広報係

電話 : 058-293-3377

E-mail : kohositu@gifu-u.ac.jp

愛媛大学総務部広報課

電話 : 089-927-9022

E-mail : koho@stu.ehime-u.ac.jp