

タンパク質が酸素耐性を獲得するしくみの理解と 新規な抗結核菌薬の開発

所属： 産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門

助成対象者： 嶋 直樹

概要

タンパク質合成系の中心分子である、tRNAの生合成に関与するRNA硫黄化酵素(MnmA)について、生化学・分光学的に解析しその反応機構を明らかにした。祖先型と考えられる好熱性始原菌の酸素感受性の硫黄化酵素を対象とした。祖先型から進化した酸素耐性である大腸菌酵素の反応機構との比較、活性中心近傍のアミノ酸の相互置換により、酸素感受性の変換についても試みた。これらにより、タンパク質が酸素耐性を獲得するメカニズムについて考察した。多数の病原菌が酸素感受性硫黄化酵素を有しており、本研究は世界三大感染症である結核の根絶等に向け新規抗結核薬の開発の基盤とすることが期待できる。

abstract

Biochemical and spectroscopic analyses of RNA sulfurtransferases involved in the biosynthesis of tRNAs were carried out to clarify their reaction mechanisms. We focused on the analysis about an oxygen-sensitive sulfurtransferase of the thermophilic bacterium, which is considered to be the ancestral type. The reaction mechanism was compared with that of an oxygen-tolerant *E. coli* enzyme that evolved from the ancestral type, and an attempt was made to convert the oxygen sensitivity by mutual substitution of amino acids residues. The mechanism by which the protein acquires oxygen tolerance was discussed. The oxygen-sensitive sulfurtransferase is also found in many pathogenic bacteria, and this study may provide a basis for the development of new anti-tuberculosis drugs for the eradication of tuberculosis, one of the three major infectious diseases in the world.

研究内容

[背景]

タンパク質は生体を構成する主要な成分であるとともに、酵素として様々な化学反応を触媒し生命現象を支えている。遺伝情報に基づきタンパク質を作るしくみは生命の本質といえ、その異常はヒト疾病の原因となり、その阻害剤は良い抗菌薬となる。tRNAはタンパク質合成において、遺伝子のコドンをもとにタンパク質のアミノ酸に対応させる中心分子である。

tRNAには化学修飾が多数あり、特に硫黄修飾塩基は正確なコドン認識に不可欠である [Shigi N*, 2018 Front Microbiol]。

全生物で tRNA のアンチコドンにある硫黄修飾塩基 2-チオウリジン (2-チオ U34、s²U34) は正確なコドン認識のために必須である [図 1]。2-チオウリジンは前駆体 tRNA に硫黄化酵素 MnmA が導入する。本酵素は、多くの細菌で酸素耐性であり、大腸菌酵素の反応機構の詳細を既に明らかにしている [Ikeuchi, Shigi ら, 2006 Mol Cell]。一方、好熱性始原菌・光合成細菌・結核菌等の病原菌等では、アミノ酸配列の特徴と立体構造予測から、これらの祖先型の硫黄化酵素は鉄硫黄クラスターを有し、酸素感受性であると推定した。

[目的]

本研究では、酸素感受性の RNA 硫黄化酵素 (好熱菌・結核菌等) について生化学・分光学的解析により反応機構を明らかにする。さらに酸素耐性の大腸菌酵素の反応機構との比較から、鉄硫黄クラスターの結合と活性の酸素感受性の変換が可能かを試みる [図 2]。これらによりタンパク質が酸素耐性を獲得する進化の過程や、酸化環境下でも鉄硫黄クラスターを維持する理由を理解したい。

[結果]

好熱性細菌・光合成細菌・結核菌等の RNA 硫黄化酵素 MnmA は、大腸菌 MnmA とは異なりシステイン (Cys) 残基が 3 つ保存されているという特徴をもつことを見出した。ホモロジーモデリングにより立体構造モデルを構築したところ、これら 3 つの Cys 残基は酸素感受

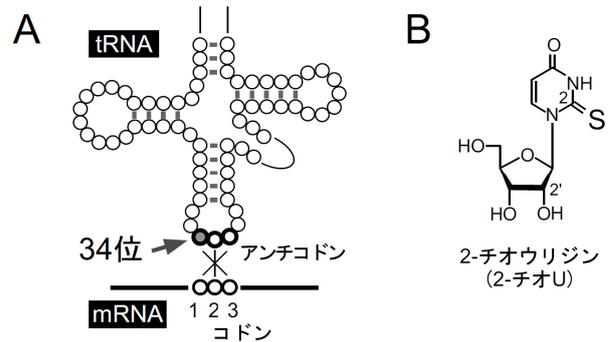
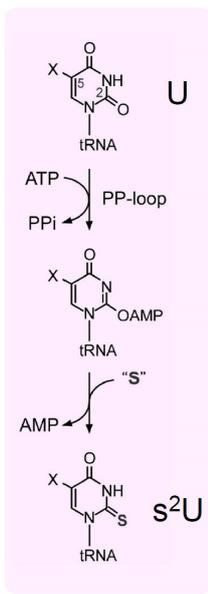


図 1 A. 硫黄修飾塩基 (34 位) は正確なコドン認識に必要 B. 硫黄修飾塩基の構造

硫黄化反応



酸素耐性の硫黄化酵素



酸素感受性の硫黄化酵素

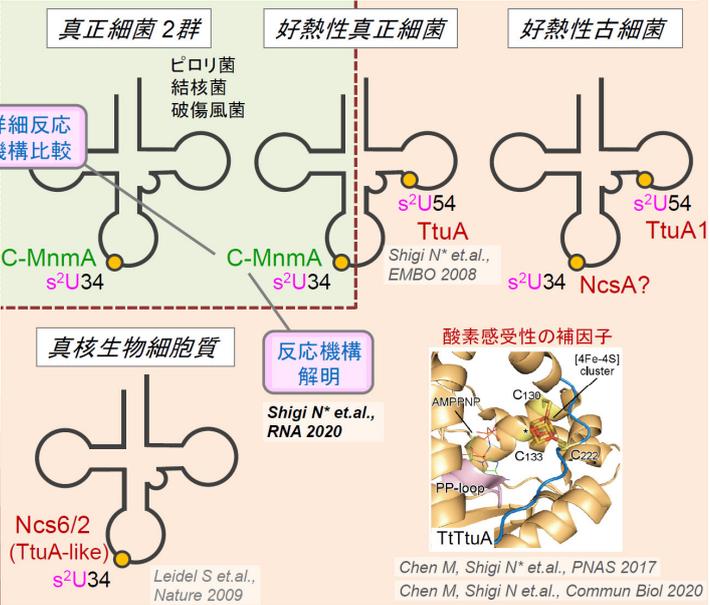


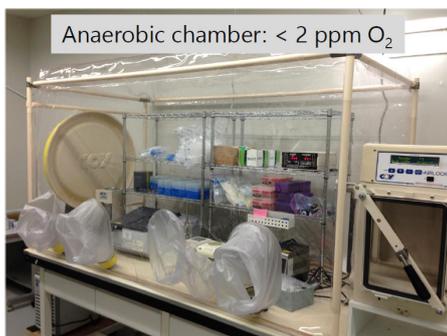
図 2. 種々の生物における硫黄修飾酵素（酸素耐性と酸素感受性の酵素がある）

性の鉄硫黄クラスターを結合するのに適した場所に位置していることが予想された。そこで好熱性始原菌 *Thermus thermophilus* 由来の MnmA（好熱菌 MnmA）を組換えタンパク質として調製し予備検討した。好気条件では鉄硫黄クラスターを結合せず活性が無かったが、嫌気条件では鉄硫黄クラスターを結合し活性を検出することができた。

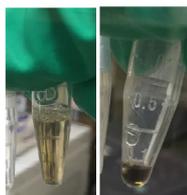
本研究では、好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* 由来の MnmA (TtMnmA) を発現・精製し、生化学および分光学的に詳細に解析した [図 3]。嫌気条件下で TtMnmA を鉄および硫化物イオンと保温後、電子常磁性共鳴 (EPR) 分光解析をおこない [4Fe-4S] タイプの鉄硫黄クラスターが結合することを明らかにした。この鉄硫黄クラスター結合型 TtMnmA と硫黄ドナーをもちいて tRNA₃₄ 位の硫黄化反応の試験管内再構成に成功し、定量的に硫黄化反応を解析した。また、変異体解析から鉄硫黄クラスターは活性中心にある 3つの Cys 残基 (Cys105, 108, 200) に結合することを明らかにし、硫黄化反応機構を推定した。類縁の鉄硫黄クラスターを有する硫黄化酵素 TtuA の反応機構 [Chen, Shigi*ら, 2017 Proc Natl Acad Sci USA]と同様に、鉄硫黄クラスターに活性化硫黄原子が結合し、この硫黄が tRNA に導入されると推定した。鉄硫黄クラスターを必要としない酸素耐性の大腸菌 MnmA では、活性中心にある Cys 残基に直接活性化硫黄が結合すると考えられており [Numata ら, 2006 Nature]、好熱菌の MnmA は大腸菌 MnmA とは異なる反応機構を有することが判明した。

TtMnmAは酸素感受性のFe-Sクラスターを活性に必要とする

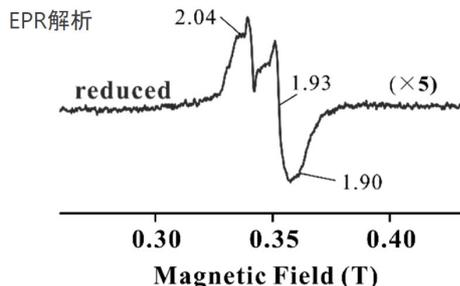
嫌気条件下でFe-Sクラスターを結合する



TtMnmAに
FeCl₃とNa₂Sと混ぜて
Fe-Sクラスターを再構成



[4Fe-4S]クラスターが結合する



鉄硫黄クラスターが硫黄転移反応に必要

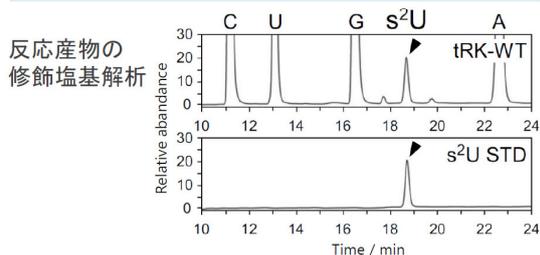


図3 . 好熱菌 MnmA の解析結果

好熱菌と大腸菌の MnmA のアミノ酸配列の保存性は全長にわたり高い (40%が同一であった)。非常に興味深いことに大腸菌の場合、鉄硫黄クラスターの結合に必要なアミノ酸残基である Cys の 1 つがアスパラギン酸 (Asp) になっている。好熱菌 MnmA のこの Cys を大腸菌型である Asp に置換したが、酸素耐性にはならなかった。そこで活性中心近傍に変異を導入し活性がある変異体の取得を検討している。逆に酸素耐性の大腸菌 MnmA についても Asp の代わりに Cys を導入することにより、酸素感受性の活性をもつかを検討したが微弱な活性しか検出できていない。今後も以上の双方向のアプローチにより酸素耐性を獲得するしくみを考察する。

さらに、結核菌 MnmA 等を標的とする抗菌薬の開発のためには、阻害剤スクリーニング系の構築基盤として、ハイスループット活性評価系を構築する必要がある。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた方法について、溶出条件を検討し 2 割解析時間を短縮した。しかし HPLC を用いた方法では 1 サンプルずつしか解析できないので処理能力が低い。そこで、並行して多サンプルの解析を可能にするゲル電気泳動法の改善も行った。

[今後]

硫黄化酵素 MnmA の欠損は細胞増殖を顕著に阻害する。よって硫黄修飾機構は抗菌薬開発の良い標的である。結核は世界三大感染症のひとつであり、年間 150 万人が死亡している。

日本では発症者の7割が60歳以上であり、また多剤耐性菌の出現が社会問題となっている。この深刻な病原菌である結核菌を標的とする抗菌薬の開発は急務である。そこで今後は、結核菌 MnmA について、阻害剤をスクリーニングする系の構築を試みる。ヒトでは酸素耐性の MnmA と、MnmA と異なるタイプの硫黄化酵素 (Ncs6) が生合成を担うので、結核菌 MnmA に対する阻害剤はヒト硫黄化酵素に対しては作用しないと考えられ、副作用を回避できる [図 2]。

原始地球は酸素がない還元的環境であったが、現在は酸化環境である。一部の硫黄化酵素が酸素存在下で不安定な鉄硫黄クラスターを必要としなくなったのは、生命維持のための重要な進化といえる (大腸菌等の多くの真正細菌)。一方、生命は一見生存に不利な酸素感受性の鉄硫黄クラスターを放棄しない選択も行っており (好熱性始原菌、光合成細菌、結核菌等)、この場合壊れた鉄硫黄クラスターを積極的に修復していると考えている。鉄硫黄クラスターをもたない酸素耐性の硫黄化酵素は、好熱性始原菌の酸素感受性の酵素から進化してできたと考えている。今後は MnmA をモデルとして、酸素感受性および酸素耐性酵素の反応機構を理解し、酸素感受性から耐性への変化のしくみをより詳細に推定することができれば、酸素の出現という環境変化に伴い爆発的進化を遂げた地球上の生命についてより深い理解が可能となる。鉄硫黄クラスターの修復機構との共進化も想起させる。生物の多様な進化について硫黄修飾機構を通じて明らかにするとともに、創薬への応用および解析が遅れている多数の酸素感受性酵素の理解にも貢献していきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、住友電工グループ社会貢献基金からの助成を頂きました。本助成により、無酸素生化学実験を進めるための試薬およびディスプレイ器具などを調達し、本研究を進める上で大変お世話になりました。ここに感謝を申し上げます。

引用文献

- Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. Ikeuchi Y, Shigi N, Kato J, Nishimura A, Suzuki T*. **Mol Cell**. 2006; 21(1):97-108.
- Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate. Numata T, Ikeuchi Y, Fukai S, Suzuki T, Nureki O*. **Nature**. 2006; 442(7101):419-24.
- Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA. Chen M, Asai SI, Narai S, Nambu S, Omura N, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ikeda-Saito M, Watanabe K, Yao M, Shigi N*, Tanaka Y*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2017; 114(19):4954-4959.
- Recent Advances in Our Understanding of the Biosynthesis of Sulfur Modifications in tRNAs. Shigi N*. **Front Microbiol**. 2018; 9:2679.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

- An ancient type of MnmA protein is an iron-sulfur cluster-dependent sulfurtransferase for tRNA anticodons, 嶋 直樹*, 堀谷 正樹 (佐賀大農学部)、宮内 健常 (東大工学部)、鈴木 勉 (東大工学部)、姫野 美沙緒 (産総研), **RNA**, 26-3, pp.240-250, 2020

[口頭発表]

- 酸素感受性 [4Fe-4S] クラスターを有する tRNA 硫黄化酵素 MnmA の機能解析, 嶋 直樹、堀谷 正樹 (佐賀大農学部)、宮内 健常 (東大工学部)、鈴木 勉 (東大工学部)、姫野 美沙緒 (産総研),

第 93 回日本生化学会大会, オンライン、2020/09/14

[ポスター発表]

- 新規な酸素感受性 tRNA 硫黄化酵素の機能解析, 嶋 直樹、堀谷 正樹 (佐賀大農学部)、宮内 健常 (東大工学部)、鈴木 勉 (東大工学部)、姫野 美沙緒 (産総研),

極限環境生物学会 第 20 回年会, 京都府・京都市、2019/11/17