学位論文

tRNA 硫黄修飾酵素の機能と構造の研究

(Structural and functional studies on tRNA A thiolation enzymes)

平成 25 年 12 月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

中川 裕文

目次

Abstract

DNA 上に書かれた遺伝情報は RNA への転写, タンパク質への翻訳という過程を通して解読される. 翻訳の過程において転移 RNA（tRNA）は, 核酸である mRNA に書かれたコドン情報とタンパク質を構成するアミノ酸とをつなげるアダプター分子として働く. tRNA はゲノムから転写後, 5′や 3′の切断, イントロンの除去, CCA 末端の付加, 様々な化学修飾を経て成熟化し, 生体内で機能する. 多様な修飾の中の 1 つにウリジンおよびその誘導体の 2 位の酸素原子を硫黄原子に置換する硫黄修飾(s^2U)がある. 多くの生物では tRNA 上のアンチコドン wobble 部位である 34 位に s^2U 修飾が見つかっており, 翻訳の正確性や効率性に寄与する. *Thermus thermophilus* などの高度好熱菌においては T ループ 54 位のリボチミジン(5 メチルウリジン)にも 2 位の硫黄修飾(s^2T)が起こり, 修飾によって tRNA の熱安定性が向上し高温環境での生育に重要な役割を果たす.

アンチコドン 34 位への s^2U 修飾は真正細菌では MnmA という分子が担い, 真核生物細胞質では Ncs6•Ncs2 複合体という分子が修飾を行う. 古細菌においても Ncs6 が s^2U34 修飾を行うと予想されている. 一方で, T ループ 54 位の硫黄修飾は TtuA という分子が行う. Ncs6 と TtuA は tRNA 上の違う部位を修飾するが, 5 つの CXXC/H モチーフを持つ点や ATP ピロフォスファターゼに見られる PP モチーフを持つなど配列的に似ており, TtcA ファミリーと呼ばれるグループに含まれる. MnmA に関しては生化学的・構造生物学的知見が得られているが, TtcA ファミリーに含まれる TtuA と Ncs6 に関してはその知見が得られていない. そこで私はこれらの分子の詳細な機能を解明するために研究に取り組んだ.

超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の TtuA ホモログについて X 線結晶構造解析により分解能 2.1 Å でその構造を決定した. *P. horikoshii* TtuA は 2 量体を形成しており, 各サブユニットは N 末側の亜鉛フィンガー(Znf1), ATP ピロフォスファターゼ触媒ドメイン, C 末側の亜鉛フィンガー(Znf2)から構成されていた. 触媒ドメイン内の 2 量体化サブドメインによって 2 量体を形成していた. 2 つの亜鉛フィンガーは過去に解かれた ATP ピロフォスファターゼには見られない TtuA 特徴的なドメインであった. 5 つの保存された CXXC/H モチーフのうち 4 つが Znf1 と Znf2 の亜鉛配位に関わっていた. 触媒ドメインの構造は, 構造既知の s^2U 修飾酵素 MnmA よりも, 真正細菌で $tRNA^{Ile}{}_2$ にリシジンを修飾する TilS という別の修飾酵素とより類似しており, TtuA と TilS は共通の 2 量体化サブドメインを持っていた. TtuA の活性部位と考えられるポケットには PP モ

チーフが存在し，その周辺のアミノ酸残基は TilS と共通であった．また，活性部位の中には残りの 1 つの CXXC モチーフ上のシステイン残基を含めた合計 3 つのシステイン残基が存在した．これら 3 つのシステイン残基は TtuA が共通に持つことから，硫黄修飾反応の際に実際に重要な役割を果たす可能性が予想された. *P. horikoshii* TtuA の表面電荷を計算すると，活性ポケット,近くに存在する同じサブユニットの Znf2, 2 量体化領域，別のサブユニットの Znf1 を含めた領域が正に帯電している傾向が見られたことから，この領域に tRNA が結合する可能性が示唆された.

T. thermophilus ttuA 欠損株に対し構造情報をもとに作成した TtuA 変異体を含んだプラスミドを形質転換し，培養した菌体から tRNA を精製しその s^2T 量を HPLC を用いて解析することで，変異体の修飾への影響を調べた．活性部位に存在した 3 つのシステイン残基に相当する残基をそれぞれセリン残基に置きかえたところ，すべての変異体において tRNA 上の s^2T の存在が大きく減少したことから, 3 つのシステイン残基が協調して実際に硫黄転移の際に機能すると考えられる．また予想された ATP 結合部位についてもアラニン置換体を作成し，変異体解析を行ったところいくつかの変異体では s^2T が存在しなくなり，他の変異体においてもその量が減少したことから，実際この部位が ATP の相互作用およびアデニル化反応に関与すると推測された.

真核生物細胞質・古細菌において s^2U34 修飾を担う Ncs6•Ncs2 複合体および Ncs6 ホモログに関して組み換えタンパク質の発現，精製条件を確立した．さらに, *P. horikoshii* 由来 Ncs6 ホモログについては結晶が得られる条件を見つけ，分解能 3.79 Å の X 線回折データを収集し，分子置換法により低分解能構造を決定した．Ncs6 は TtuA と同様の構造をしており，2 量体を形成し、各サブユニットは Znf1，触媒ドメイン, Znf2 の 3 つのドメインから構成されていた．TtuA と Ncs6 を比較したところ， TilS で tRNA の認識に関与している残基が Ncs6 では保存され同じ位置に存在するのに対し，TtuA では違う残基が存在していた．これらの違いが Ncs6 と TtuA の修飾される部位の違いに影響している可能性が考えられる.

Abstract

The genetic information encoded within DNA moleules is decoded through RNA transcription and protein translation. In translation, transfer RNA (tRNA) works as adoptor molecules between codon information on mRNA, which is made up of nucleotide, and amino acids of proteins. tRNA is matured by 5´- and 3´- removal, intron removal, addition of CCA end, and various chemical modifications in living cells after transcription. One of the various modifications found in tRNA is 2-thiolation of uridine and its derivative (s^2U), which substitute position 2 of oxygen atom of uridine to sulfur atom. In many species, s^2U is found in anticodon wobble position 34 at tRNA and improves translational accuracy and efficiency. In some thermophile, including *Thermus thermophilus*, specific 2-thiolation occurs on the conserved ribothymidine at position 54 (T54) in T loop of tRNA, which stablizes tRNA tertiary structure and is important for survival of high temperature environment.

In eubacteria and eukaryote cytoplasm, s^2U34 modification is achieved by MnmA and Ncs6•Ncs2 complex, respectively. In archaea, Ncs6 is suggested to function as s^2U34 modification. In *T. thermophilus*, TtuA accomplishes T54 2-thiolation. Although Ncs6 and TtuA work at different position of tRNA, their primary sequence is similar. They have five CXXC/H motifs and PP motif, which is found in ATP pyrophosphatase, and belong to the TtcA family of tRNA 2-thiolation enzymes. While the function and struture of MnmA have been investigated well, there is no structural information about TtcA family proteins. Thus I performed X-ray crystallopraphic and functional analyses of Ncs6 and TtuA.

The crystal structure of a TtuA homologue from the hyperthermophilic archeaon *Pyrococcus horkoshii* was determined at 2.1 Å resolution. The *P. horikoshii* TtuA forms a homodimer, and each subunit contains a ATP pyrophosphatase catalytic domain and unique N- and C-terminal zinc fingers (Znf1 and Znf2). Zinc ions are coordinated by four CXXC motifs. The catalytic domain has much higher structural similarity to that of another tRNA modification enzymes, TilS ($tRNA^{Ile}{}_2$ lysidine synthetase), than MnmA, and TtuA and TilS have similar dimarization subdomain. The putative catalytic site of TtuA has PP motif, and the surrounding residues are also similar to that of TilS. Three conserved cysteine residues, including a CXXC motif, are clustered in the putative catalytic site. Since the cysteine reisidues are conserved in TtuA, they are probably important for sulfur transfer reaction. A positively-charged

surface that includes the catalytic site, dimerizationsite, two zinc fingers is likely to provide the tRNA binding site.

The TtuA mutantion plasmids were constructed based on the *P. horikoshii* TtuA structure, and were transformed into the *T. thermophilus* strain lacking the *ttuA* gene. tRNA was purified from the transformants and the s^2T amount was analysed by HPLC. Mutations of the three cysteine residues in the catalytic domain showed that all mutations greatly decreased the s^2T amount, suggesting that these cysteine residues are indeed important for sulfur transfer reaction. Besides, some mutations of the putative ATP binding site abolished the s^2T nucleoside, and other mutations are also decreased s^2T. These results may explain that the purative ATP binding site is involved in ATP binding and adenylation.

I overexpressed and purified the s^2U34 modification enzymes: the eukaryotic cytoplasm Ncs6•Ncs2 complex and archaea Ncs6 homolog. Among them, a crystal of *P. horikoshii* Ncs6 was obtained and the X-ray diffraction data was collected at 3.79 Å resolution. The low-resolution structure of Ncs6 was determined by molecular replacement. Ncs6 has structural similarlity to TtuA. Ncs6 forms a homodimer, and each subunit is composed of Znf1, the catalytic domain, and Znf2. Some tRNA recognition residues in TilS are conserved and located at similar positions in Ncs6, but not in TtuA. This difference may reflect the difference of modified base between Ncs6 and TtuA.

1. 背景

1.1 tRNA の機能と構造

DNA 上に書かれた遺伝情報は, mRNA への転写, タンパク質への翻訳という過程にへて解読される (Crick, 1958, 1970). 翻訳の段階では, リボソームにおいて核酸である mRNA 上の 3 塩基からなるコドンを 1 つのアミノ酸に対応付けてタンパク質合成を行っている. この核酸からなるコドン情報とタンパク質を合成するアミノ酸を結びつけるアダプター因子として働くのが転移 RNA (tRNA)である (Hoagland et al., 1958). tRNA は一般には 76 塩基で構成され, 2 次構造はクローバーリーフ状の構造をしており, アクセプターステム, D アーム, アンチコドンステムループ, 可変アーム, T アームと呼ばれる 5 つの領域から構成される(Holley et al., 1965). 5′側はリン酸化されており, 3′側の配列は CCA 配列で構成されている (図 1-1(a)).

tRNA の 3 次構造はその塩基配列の違いや長さに関わらず L 字型の立体構造をしている (図 1-1(b)) (Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974). L 字の片方は 2 次構造のアンチコドンステムループと D アームから構成され, 先端には mRNA 上のコドンと相互作用する, 3 塩基からなるアンチコドンが存在する. もう片方はアクセプターステムと T アームから構成され, CCA 末端に tRNA に対応した特定のアミノ酸が付加される. L 字の肩の領域で 3 次元的な相互作用ネットワークを形成し, 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の $tRNA^{Phe}$ では U8-A14-A21, A9-A23-U12, m^2G10-C25-G45, C13-G22-m^7G46, G15-C48, G18-Ψ55, G19-C56, T54-m^1A58 といった塩基対を作り L 字型の構造を安定している. アンチコドンの配列は一般に 34 位から 36 位と呼ばれ, 36 位が 1 文字目のコドン, 35 位が 2 文字目のコドン, 36 位が 3 文字目のコドンと塩基対をリボソーム上で形成する. また, 34 位は wobble 部位と呼ばれ通常のワトソンクリック塩基対(A–U, G–C)ではない塩基対を形成してリボソーム上でコドンを認識する (Crick, 1966). その結果, 一部の tRNA はいくつかの同じアミノ酸をコードしている 3 文字目が A または G のコドンを両方読むことができる. tRNA は $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Leu}$, $tRNA^{Sec}$ など一部の可変アームが長い tRNA を除きほぼ同様の立体構造をしているが, それぞれの tRNA がアイデンティティ因子と呼ばれる領域によって, tRNA にアミノ酸を付加するアミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)がある特定の tRNA のみを認識している (Giegé et al., 1998; Vasil'eva and Moor, 2007).

1.2 tRNA への修飾

tRNA はゲノムから転写後, イントロンの除去, 5′側と 3′側の余分な配列の除去や CCA 付加, 様々な転写後修飾を経て成熟化した状態で生体内では機能する. tRNA への転写後修飾は他の RNA と比べて数多くの修飾があり, 現在までに 90 以上の修飾が見つかっている(Cantara et al., 2011). tRNA への修飾はある生物種やドメインに限られたものも存在するが, 18 種類の修飾は真正細菌, 古細菌, 真核生物全てのドメインに存在する (Jackman and Alfonzo, 2013). 修飾の中にはメチル化といった他の RNA にも存在するものもあれば, tRNA においてのみ同定されている複雑な

修飾も存在する(図 1-2). tRNA への修飾は物理化学的性質を変化させ, 局所的にはヌクレオチドの構造や大きさを変化し, 通常の塩基とは違う機能をtRNAが持てるようになる. その獲得する機能を大きく分けると, (a) アンチコドンおよびその周辺部位への修飾による翻訳への影響, (b) tRNA 立体構造の安定化, の 2 つに分類される(Agris et al., 2007; Gustilo et al., 2008; Motorin and Helm, 2010).

アンチコドンおよびその周辺部位への修飾は翻訳の正確性や効率性の構造に大きく寄与する. この種類の修飾はコドン–アンチコドン対合の正確性向上, 翻訳時のフレームシフトの抑制, aaRS による正確な tRNA の認識やその活性に影響する. 例としては, 真正細菌において存在する $tRNA^{Ile}{}_2$アンチコドン C34 位へのリシジン修飾 (k^2C34)は, tRNA が成熟化する前の段階で修飾が起こることで, そのままだと aaRS が間違ってメチオニンを付加し, リボソーム上で AUG コドンを認識し間違ったメチオニンをコードしてしまうことを防いでいる (Muramatsu et al., 1988; Nakanishi et al., 2009). 古細菌においてはアグマチジン(agmC)という修飾が起こることで同様にイソロイシンとメチオニンの遺伝暗号の直交性を維持している (Ikeuchi et al., 2010; Mandal et al., 2010). また ANN コドンを認識する, アンチコドン 36 位が U の tRNA では, 隣の 37 位にはサイクリック N6-スレオニルカルバモイルアデノシン(ct^6A)といった複雑な修飾が入ることもあり, その結果最初の塩基対とスタックしてフレームシフトが起こることを妨げている (Miyauchi et al., 2013; Schweizer et al., 1969).

アンチコドンから離れた領域の, 特に L 字の肩の領域への修飾は, 多くはヌクレオチドの構造を制限し, tRNA の構造を安定化するために寄与する (Motorin and Helm, 2010). リボチミジン(5 メチルウリジン)(m^5U, T), 2′-*O*-メチルヌクレオチド(Am, Um, Cm, Gm)などはリボースのとりうる構造を C3′-*endo* 構造に固定化して, RNA が A-form をとりやすくする. とくに T の修飾は T アーム上の 54 位に保存されており, 58 位の A58(または 1 メチルアデノシン(m^1A))とフーグスティン塩基対を形成し, T ループの構造を安定化し, 融解温度を向上させる(Sengupta et al., 2000). また m^1A58 や 46 位の 7 メチルグアノシン(m^7G46), 46 位の 5 メチルシチジン(m^5C48)といった修飾が存在しない場合には tRNA は正確に機能できないとみなされ分解される(Alexandrov et al., 2006; Kadaba et al., 2004, 2006) .

tRNA への修飾は主に修飾酵素とよばれるタンパク質によって行われる. 多くの修飾は 1970 年代に同定されていたが, その実態を担う修飾酵素は 90 年以降に同定されてきた (El Yacoubi et al., 2012). 修飾酵素は例えばメチル化などは 1 つのメチル化修飾酵素によって行われるが, 複雑な修飾の一つである ct^6A は大腸菌では YrdC/Sua5, YgjD, YeaZ, YjeE, TcdA といった分子が, 古細菌では YrdC/Sua5 と KEOPS/EKC complex が修飾に関与する (Deutsch et al., 2012; Miyauchi et al., 2013; Perrochia et al., 2013).

1.3 tRNA への硫黄修飾

tRNA の修飾の中で, ほぼ全ての生物に存在する修飾の 1 つにウリジンおよびその誘導体の 2

位の酸素原子を硫黄原子に置換する硫黄修飾 2 チオウリジン(s^2U)が存在する(図 1-3) (Agris et al., 2007). 硫黄原子は酸素原子に比べて原子半径が大きいため, 硫黄に置換された結果 tRNA 上でリボースのとりうる立体配座を制限し, リボースは C2′-*endo* の構造をとりにくくなり, C3′-*endo* の構造をとりやすくなる (Yokoyama et al., 1985). 少なくとも真正細菌と真核生物において, "UUX" アンチコドン配列をもった $tRNA^{Glu}$(UUC), $tRNA^{Gln}$(UUG), $tRNA^{Lys}$(UUU)には 34 位のウリジンに s^2U 修飾が起こり, 後述するように古細菌においても存在すると考えられている (Folk and Yaniv, 1972; Oashi et al., 1970; Yoshida et al., 1970). この修飾が tRNA へのアミノアシル化において重要を果たすことが生化学・構造生物学的に明らかにされてきている (Björk, 1995; Krüger and Sørensen, 1998; Madore et al., 1999; Rodriguez-Hernandez et al., 2013). また 34 位ウリジン 2 位の硫黄修飾が起こる tRNA によって解読される Glu, Lys, Gln はコドン 3 文字目を正確に認識する必要があり, リボソーム上での XAA または XAG コドン翻訳の正確性や効率性に重要であることが報告されている (Ashraf et al., 1999; Johansson et al., 2008; Rezgui et al., 2013; Urbonavicius et al., 2001; Vendeix et al., 2012).

真正細菌においては, $tRNA^{Glu}$(UUC), $tRNA^{Gln}$(UUG), $tRNA^{Lys}$(UUU)において 34 位ウリジンは s^2U 修飾ではなく, 5 位にメチルアミノメチル修飾またはカルボキシメチルアミノメチル修飾が起こり mnm^5s^2U または $cmnm^5s^2U$ として存在する. また, 一部の生物種においては 2 位の硫黄原子がセレン原子にさらに置換した修飾や, 硫黄原子の先にさらにゲラニル基が付加した修飾の存在も報告されている(Dumelin et al., 2012; Wolfe et al., 2004). 真核生物細胞質では 5 位の部位にメチルカルボキシメチル基が修飾され mcm^5s^2U34 として機能する. 5 位に mcm 修飾が入ることで互変異性体となりリボソーム上で XXG コドンを認識するために寄与すると考えれている(Vendeix et al., 2012). 哺乳類のミトコンドリアでは s^2U の存在する塩基は 5 位にタウリノメチル修飾が起こり, τm^5s^2U として存在する (Suzuki et al., 2002). $tRNA^{Lys}$(UUU)は HIV の逆転写酵素が転写を開始する際のプライマーとして働くことが知られており, 特に硫黄修飾が重要な役割を果たすことが報告されている (Isel et al., 1996; Tisné et al., 2000). ヒトではミトコンドリア tRNA の s^2U 修飾の欠損が正常なミトコンドリアの機能に異常をきたし, ミトコンドリア病の一種である MERRF 病との関連が示唆されている(Umeda et al., 2005). 以下, s^2U 修飾と書いているものは, ウリジン 5 位の修飾の有無に関わらずウリジンおよびその誘導体に対して 2 位の酸素原子が硫黄原子に置き換わった修飾のことを基本的に指すことにして本論文では説明する.

また, 高熱環境で生育する真正細菌 *Thermus thermophilus* や *Aquifex aeolicus,* 古細菌の *Pyrococcus furiosus* においては, T ループ 54 位の T54 においても 2 位の硫黄修飾が起こり, 2 チオリボチミジン(s^2T)が生じることが知られている(図 1-3) (Awai et al., 2009; Kowalak et al., 1994; Watanabe et al., 1974). 54 位への硫黄修飾は好熱菌由来の tRNA の融解温度を上昇させ, 3 次構造の温度安定化に影響する (Horie et al., 1985; Kowalak et al., 1994; Watanabe et al., 1976). 実際, s^2T 修飾が存在しない *T. thermophilus* では高温ストレス下では生育できず, 高温環境でのタンパク質合成に寄与すると考えられる(Shigi et al., 2006a).

tRNA 上で見られるウリジン 2 位以外の硫黄修飾として，大腸菌など一部生物では D ループ 8 位のウリジン 4 位に対する硫黄修飾(s^4U)や，アンチコドンループに存在するシチジン 2 位の硫黄修飾(s^2C)などが知られている (図 1-2). これらの修飾は s^4U8 修飾については ThiI, s^2C32 修飾については TtcA という修飾酵素がそれぞれ担い，ともに ATP ピロフォスファターゼに見られる SGGxD(S/T)という配列からなる PP モチーフを持つ(Bork and Koonin, 1994; Jäger et al., 2004; Mueller et al., 1998; Palenchar et al., 2000). ThiI については立体構造が解かれており，フェレドキシン様ドメイン，THUMP ドメイン，ATP ピロフォスファターゼドメインから構成されている (Waterman et al., 2006).

1.4 好熱菌における 54 位 s^2T 修飾に関わる酵素群

54 位の s^2T 修飾については，修飾そのものは 1970 年代には発見されていたが，その修飾を担う酵素群は同定されてこなかった. 2000 年代に鴫らの報告により，硫黄修飾に関与する酵素として *T. thermophilus* においては TtuA, TtuB, TtuC, システイン脱硫酵素(IscS または SufS)といった酵素が少なくとも関与することが同定された (Shigi et al., 2006b, 2008). まず IscS または SufS によってシステインから硫黄原子を取り込み，酵素上のシステイン残基にペアスルフィド(R-SSH)を形成する. TtuB はチアミンやモリブデン合成の際の硫黄運搬に関わる ThiS, MoaD といった分子やユビキチンと似た配列からなり，C 末端に保存された GG 配列を持つ. TtuB は TtuC によって C 末のカルボキシ基がアデニル化されたのち，IscS, SufS, または他の硫黄運搬因子から硫黄原子を C 末端に受け渡されて，チオカルボキシ基(CO-SH)を形成する(図 1-4(a))(Shigi, 2010). TtuA は TtuB と複合体を形成し，tRNA および 54 位を認識し，TtuB のチオカルボキシ基上の硫黄原子を用いて ATP 依存的に修飾を行う.

TtuB は硫黄運搬分子としての機能だけでなく，ユビキチンのようにいくつかの分子と共有結合することが報告され，その共有結合する分子としては TtuA や TtuC も含まれる (Shigi, 2012). また，s^2T 修飾については現在までに *in vitro* での生化学的な再構成は行われているがそのためには *T. thermophilus* の抽出液が必要であり，何か他の因子や条件が完全な再構成のためには必要ではないかと考えられている (Shigi et al., 2006b, 2008). TtuA がどのように tRNA を認識し，修飾される 54 位を選別して修飾しているのか，TtuB からどのように TtuA が硫黄を受け取り s^2T 修飾を行うのかその具体的な反応機構や修飾に重要な部位などは不明である.

1.5 真正細菌および真核生物の s^2U34 修飾に関わる酵素群

真正細菌のうちモデル生物として用いられている大腸菌では，システイン脱硫酵素 IscS によってまずシステインから硫黄原子を取り込み，酵素自身に結合してペアスルフィドを形成する. その後 TusA, TusBCD 複合体，TusE 上のシステイン残基に活性化された硫黄原子がペアスルフィドを形成しながらリレーされていき，tRNA 修飾酵素である MnmA という分子がアンチコドン配列が UUX の tRNA を特異的に認識し，U34 のアデニル化を経て TusE から受け取った硫黄原子を用い

て修飾を行う (図 1-4(b)) (Ikeuchi et al., 2006; Kambampati and Lauhon, 2003). MnmA がどのように修飾される tRNA を特異的に認識し, U34 をアデニル化するのか, ということは過去に tRNA と MnmA 複合体の X 線結晶構造解析から明らかにされた (Numata et al., 2006). また真核生物のミトコンドリアでは MnmA のホモログである Mtu1 が tRNA を直接認識し, 修飾を担うことが知られている. 上流の活性化された硫黄原子のリレー分子はまだ同定されていないが同様の機構で修飾が行われると考えられている (Umeda et al., 2005).

一方真核生物細胞質においては, Ncs6(Ctu1), Ncs2(Ctu2), Urm1, Uba4, Tum1, Nfs1 といった因子が関与することが, *S. cerevisiae*, 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*, 線虫 *Caenorhabditis elegans*, シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*, マウスやヒトといったほぼ全てのモデル生物で報告されている (Björk et al., 2007; Dewez et al., 2008; Esberg et al., 2006; Huang et al., 2008; Leidel et al., 2009; Nakai et al., 2008; Noma et al., 2009a; Schlieker et al., 2008). システイン脱硫酵素 Nfs1 がシステイン残基から硫黄原子を引き抜きまずペアスルフィドを形成し, Tum1, Uba4 に硫黄原子がペアスルフィドを形成しながらリレーされていく. Urm1 のカルボキシ基は Uba4 によってアデニル化された後, 硫黄原子を受け取ってチオカルボキシ基を形成し硫黄輸送タンパク質として働く. その後 Ncs6·Ncs2 複合体が tRNA および U34 を認識し, ATP を用いて U34 をアデニル化したのち Urm1 のチオカルボキシ基の硫黄原子を受け取って修飾を行うと考えられている (図 1-4(c)). Ncs6•Ncs2 複合体がどのように tRNA を認識し, 34 位を認識し修飾を行うのかは不明である. *S. cerevisiae* 内在性の Ncs6•Ncs2 複合体を用いた *in vitro* での機能解析と, Ncs6 を用いていないがヒトにおいて s^2U34 修飾の *in vitro* での機能解析が報告されているが, 詳細な機能構造解析を行うためにはま組み換えタンパク質で Ncs6•Ncs2 複合体を大量に精製出来る系を確立する必要があると思われるが, 報告されていない (Chowdhury et al., 2012; Noma et al., 2009a).

Urm1 はユビキチンに似たタンパク質で, 酸化ストレスに応じてユビキチン同様共有結合することが報告されている. その生理的意義は不明であるが, 共有結合する分子の中には Ncs6, Ncs2, Uba4 など硫黄修飾に関わる分子が多く存在する (Furukawa et al., 2000; Van Der Veen et al., 2011). Ncs6, Ncs2 といった因子を欠損すると出芽酵母では硫黄源がない時に U34 への 2 位の硫黄修飾が抑えられることによって成長に重要な因子の翻訳を制御している可能性が考えられている (Laxman et al., 2013). また Ncs6 や Ncs2 を欠損するとリボソームが XAA コドン上にとどまる割合が高まるだけでなく, GCN4 によるストレス応答も活性化する (Zinshteyn and Gilbert, 2013). s^2U 修飾と, 同じ部位に起こる mcm 修飾との間には関連性が示唆されており, mcm 修飾を担う酵素群である Elongator complex を欠損すると tRNA への s^2U 修飾の導入率が低下する (Fernández-Vázquez et al., 2013; Leidel et al., 2009; Nakai et al., 2008; Noma et al., 2009a). また s^2U 修飾と mcm 修飾とに関わる遺伝子を両方欠損すると分裂酵母 *S. pombe* では生育できるが, *S. cerevisiae* や線虫 *C. elegans* では生育できなくなる (Bauer et al., 2012; Björk et al., 2007; Chen et al., 2011). さらに, Elongator complex が関与するといわれる転写の伸長やエクソサイトーシスといった現象が Ncs2 を欠損することでも見られる, といった関連性が報告されている (Esberg et al., 2006).

1.6 古細菌における tRNA ウリジン 2 位硫黄修飾に関わる知見

古細菌における tRNA 上のウリジン 2 位の硫黄修飾に関しては，上述した *P. furiosus* 以外にも，正確な修飾部位はわからないがいくつかの生物種で 2 チオウリジン，s^2T，mnm^5s^2U，および 2′-*O*-メチル 2 チオウリジン(s^2Um)の存在が報告されている (Edmonds et al., 1991; McCloskey et al., 2001). 好塩古細菌 *Haloferax volcanii* については tRNA の配列が解析され，$tRNA^{Glu}$(UUC)，$tRNA^{Gln}$(UUG)，$tRNA^{Lys}$(UUU)ではアンチコドン 34 位にウリジン誘導体の修飾が存在する (Gupta, 1984). またバイオインフォマティクス的解析から，古細菌には Ncs2 ホモログは存在しないが Ncs6 ホモログ HVO_0580 が硫黄修飾に関与すると考えられ，mcm 修飾に関わる酵素も一部存在することから，mcm^5s^2U に似た修飾が 34 位に存在するのではないか，と予想されている (Grosjean et al., 2008). 一方で，T ループ 54 位については *P. furiosus* では s^2T の存在が報告されているが，生育温度が 85 °C である *Methanocaldococcus jannaschii* では s^2T の存在は確認されておらず，微量ではあるものの 54 位には $m^1\Psi$が存在するという結果が得られている (McCloskey et al., 2001).

近年 SAMP タンパク質という真核生物のユビキチンに似たタンパク質が共有結合することが *H. volcanii* で起こることが発見された (Humbard et al., 2010). SAMP タンパク質のうち SAMP2，およびユビキチン活性化 E1 分子に似た UbaA という酵素は s^2U 修飾に関与し，*Methanosarcina acetivorans* では UbaA(ELSA)が SAMP をアデニル化することが *in vitro* で確認されている (Maupin-Furlow, 2013; Miranda et al., 2011; Ranjan et al., 2011). SAMP タンパク質が共有結合する分子には, Ncs6 ホモログや UbaA などが含まれる. Ncs6 ホモログも含めたこれらの酵素は s^2U34 修飾に関与していると考えられているが，質量分析や HPLC などで解析されていないため,どのような修飾なのか，どの部位に硫黄修飾が起こっているのか，ということは解明されていない．上流の因子については最初にシステインから硫黄原子を取り出すシステイン脱硫酵素がメタン生成古細菌を始めとするいくつかの古細菌においてはゲノム上に存在せず，実際にどのように硫黄を供給源として利用して修飾を行うことが出来るのか，という点に関しても不明な点が多い (Liu et al., 2012a).

1.7 ウリジン 2 位硫黄修飾酵素群の比較

ここまでウリジンおよびその誘導体の 2 位の硫黄修飾に関わる酵素群について述べてきたが，これらを比較すると，古細菌および真核生物細胞質の s^2U 修飾に関わると考えられる酵素と,一部の生物種に見られる s^2T 修飾に関わる酵素には多くの共通点が存在する (Noma et al., 2009b). 直接 tRNA を認識すると予想される分子に注目すると，TtuA および Ncs6 は s^2C 修飾酵素として同定された TtcA ファミリーのグループ II に属し，5 つの保存された CXXC/CXXH モチーフと，ThiI や MnmA にも見られる ATP ピロフォスファターゼ PP モチーフをもつタンパク質である (図 1-5(a)) (Jäger et al. 2004). 古細菌においては, *Pyrococcus* や *Sulfolobus*, *Thermococcus* など好熱環境で生育する生物では Ncs6 と相同性の高い分子をゲノム上で探索すると 2 つ存在する．これは TtuA と Ncs6 の 2 つの遺伝子がゲノム上に存在するためと推測される.

上流の因子に関しても，硫黄輸送タンパク質である TtuB,Urm1, SAMP2 はすべてユビキチンに似た分子であり, C 末に保存された GG 配列をもち，チオカルボキシ化されて硫黄修飾に関与する(図 1-4，図 1-5(b)(c))．さらにこれらの分子はユビキチン同様他の分子と共有結合することが報告されている. TtuB を活性化する TtuC, Urm1 を活性化する Uba4, SAMP2 を活性化する UbaA に関しても配列相同性が見られ，ともにユビキチン活性化の E1 酵素と共通の ATP 結合モチーフや Zn^{2+} 結合領域，活性部位のシステイン残基を持っている(図 1-5(d))．Uba4 は TtuC や UbaA と比べて C 末にさらにロダネーゼ様ドメインを持ち，その差が Uba4 から Urm1 が直接硫黄原子を受け取るのに対して，TtuB は TtuC ではなく IscS/SufS または Tum1 に似た分子から硫黄原子を受け取る違いとなっているのかもしれない(図 1-4，図 1-5).

一方真正細菌およびミトコンドリアで U34 に硫黄修飾を行う酵素に注目すると，MnmA および Mtu1 は TtuA および Ncs6 同様 ATP ピロフォスファターゼに見られる PP モチーフは共通して持つが，その他の CXXC モチーフなどは存在せず，別の保存された領域を持っている (Björk et al., 2007)．さらに大腸菌では全てのステップにおいてチオカルボキシ基は現れず，ペアスルフィド状態で運搬分子が硫黄を修飾酵素に受け渡されていく違いがあり，運搬分子である Tus タンパク質は TtuB/Urm1 や TtuC/Uba4 とは全く違う分子である(図 1-4，図 1-5).

1.8 本研究の概要

tRNA 硫黄修飾酵素の研究の中で, s^2T54 修飾酵素 TtuA および s^2U34 修飾酵素 Ncs6 の詳細な機能を明らかにするために，筆者は超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* TtuA ホモログについて X 線結晶構造解析に取り組み，その構造を決定した．また TtuA の構造をもとに *T. thermophilus* を用いて変異体解析に取り組み，修飾に重要な部位を同定した．真核生物 Ncs6·Ncs2 複合体および古細菌 Ncs6 ホモログについて組み換えタンパクを精製し，そのうち古細菌 *P. horikoshii* Ncs6 ホモログに関しては低分解能の構造を決定した.

2. 古細菌由来 54 位 s^2T 修飾酵素 TtuA の X 線結晶構造解析

2.1 方法

2.1.1 超好熱性古細菌 *P. horikoshii* 由来 TtuA の試料調製

P. horikoshii ゲノム上には *T. thermophilus* TtuA と配列相同性の高い遺伝子として *PH0300* と *PH1680* の 2 つが見つかり, BLAST 検索を行ったところ配列相同性はそれぞれ 43%と 34%であったことから, 2 つの遺伝子のうち *PH0300* が TtuA であると予想された. そこで以下 *PH0300* のことを *P. horikoshii* TtuA とみなして記述する.

P. horikoshii TtuA 全長をコードする遺伝子が組み込まれた pET11a (Novagen)発現ベクターを倉谷博士より頂いた. ベクターを大腸菌宿主 Rosetta(DE3) (Novagen)に形質転換し, アンピシリンを 70 μg/ml 含む LB 培地において 37 °C で培養した. OD が 0.6 になった時点で終濃度 0.3 mM になるように isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)を加え発現を誘導し, さらに 4 時間培養した後に遠心により集菌した.

得られた菌体を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM $MgCl_2$, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 1 mM phenylmethysulfonyl fluoride (PMSF)に懸濁し, 超音波により破砕した. 破砕した産物を 27,000 × *g* で 10 分間, 4 °C で遠心して夾雑物を取り除いた. その後 85 °C で 15 分熱処理し, 大腸菌由来のタンパク質を変性させた後, さらに 27,000 × *g* で 30 分間遠心した. この上清に 3.5 M 硫安溶液を終濃度 1.5 M となるように加えた. この溶液を Butyl-Toyopearl(東ソー)に吸着させ, 硫安濃度を直線勾配で 0 M まで下げることによりタンパク質を溶出した. サンプルの入った溶出画分を透析液[20 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH 6.5), 150 mM NaCl, 10 mM 2-ME]の入ったバッファーに透析した. 透析したサンプルを UnoS カラム(Biorad)に吸着させ, NaCl の濃度を 150 mM から直線勾配で 1 M まで上げることにより溶出した. サンプルの溶出画分を 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 400 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-ME で平衡化したゲルろ過カラム Hiload-16/60 Superdex 200 (GE Healthcare)に通して精製した. 以上の UnoS カラムとゲルろ過カラムは ÄKTA system (GE Healthcare)を利用した. 精製純度は SDS-PAGE で確認した(図 2-1).

2.1.2 *P. horikoshii* TtuA の結晶化

ゲルろ過カラムを通した後の *P. horikoshii* TtuA を Amicon Ultra Filter (Millipore)を用いて 10 mg/ml まで濃縮したサンプルを結晶化に利用した. 結晶化スクリーニングを 20 °C において saltRX, Natrix, Crystalscreen (Hampton), wizard I/II (Emerald Biostructures)で行った. シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて行い, 1 μm の試料を 1 μl のリザーバーと混合して行った. 得られた結晶化条件をもとに結晶化条件の最適化を検討した.

2.1.3 *P. horikoshii* TtuA の X 線回折データ測定

ネイティブ結晶は 30%DMF を抗凍結剤として利用した．X 線回折実験は放射光施設 SPring-8 ビームライン BL32XU にて行った．検出器には MR225HE を利用した．データの測定は，波長 0.97627 Å，カメラ長 250 mm，ビームサイズ 12 μm × 1 μm，露光時間 1 秒, 1 フレーム当たりの触れ角 1 °，アテニュエーター Al 900 μm で 180 枚の条件で測定した. 4 枚データを測定するごとに次の場所へと移動した．測定データは HKL2000 プログラムを用いて処理し，指数付け，回折強度計算，スケーリングを行った (Otwinowski and Minor, 1997).

位相決定の為にヨウ素をソークした．得られた結晶を凍結する前に，結晶化条件の 200 mM NaCl の代わりに 500 mM NaI を含んだ溶液に 5 分ほど浸した．その後抗凍結剤 DMSO の濃度をあげていき，最終的に 35%DMSO を含む溶液に浸した後，液体窒素で瞬間凍結させた. X 線回折実験は放射光施設 SPring-8 ビームライン BL32XU にて行った．検出器には MR225HE を利用した．データ測定は波長 1.4 Å，カメラ長は 150 mm，ビームサイズは 12 μm × 1 μm，露光時間 1 秒, 1 フレーム当たりの触れ角 1 °，アテニュエーターなし，インバースモードで 720 枚の条件で行った. 14 枚データを測定するごとに次の場所へと移動した．測定したデータは HKL2000 プログラムを用いて処理し，指数付け，回折強度計算，スケーリングを行った.

2.1.4 回折データの処理と位相決定

HKL2000 によってスケーリングを行ったものを CCP4 program suite に含まれる scala を用いてデータ形式を mtz 形式に変換した (Evans, 2006; Winn et al., 2011). ヨウ素をソークした結晶からの回折データに対して，autoSHARP プログラムを用いてヨウ素の異常散乱を用いた単波長異常散乱法(SAD)によって位相決定を試みた (Vonrhein et al., 2007). ヨウ素原子が結晶内にどれだけ存在するかわからないため, 15 個存在すると仮定して探索した.

2.1.5 モデル構築と精密化

得られた位相情報をもとに, Phenix プログラムの autobuild プログラムによって初期モデルを作成した (Adams et al., 2010). 残りのモデル構築は *Coot* プログラムを用いて手動でモデルを作成した (Emsley et al., 2010). Test set として 5%のデータをランダムに選んだ上で, phenix.refine によってエネルギー最小化，温度因子精密化，Simulated annealing などを数回繰り返した．途中でネイティブ結晶のデータセットを用いて構造精密化を行うことに変更した．Molprobity プログラムによってラマチャンドランプロットの正確性を確認した (Chen et al., 2010). その後 phenix.refine と手動により水分子を同定した.

2.1.6 分析超遠心

分析超遠心のための *P. horikoshii* TtuA は結晶化のための試料と同様に調製した．分析超遠心は速度法と平衡法の両方で測定した．速度法においては，14 μM に調製した *P. horikoshii* TtuA を,

Optima XL-I 分析超遠心機にて An-50Ti rotor (Beckman Coulter)を用いて 40, 000 rpm で遠心し, 280 nm での吸光を 20 °C で測定した. データは 5 分ごとに測定し, 100 データセット測定した. 平衡法においては, 7 μM と 14 μM に調製した *P. horikoshii* TtuA を 20°C, An-50Ti rotor を用いて 13, 000 rpm, 15, 000 rpm, 17, 000 rpm の 3 種類の遠心速度で 16 時間遠心してデータセットを測定した. パラメータは SEDNTERP を用いて計算した. 偏比容とバッファーのρ値は 20°C でそれぞれ 0.745 と 1.02 だった. モデルのカーブは Origin ソフトウェア(MicroCal)を用いて最適化した.

2.1.7 等温滴定熱量測定

等温滴定熱量測定(ITC)用の *P. horikoshii* TtuA およびその変異体は pET28 ベクター(Novagen)に遺伝子を挿入し, C 末側に 6 ×ヒスチジンタグが付加したコンストラクトを利用した. 変異体は PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio)を用いて作成し, シーケンス反応を行い変異が導入されていることを確認した. サンプルは上記の結晶化・分析超遠心用の際と同じバッファーに懸濁し, 遠心, 熱処理した後, Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)に結合させ, 溶出バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 400 mM imidazole, 10 mM 2-ME]を用いて溶出した. 透析後は UnoS カラムを用いて精製後, 透析バッファー[20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 400 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT]に透析し, Amicon-Ultra filter を用いて濃縮した.

ITC は Microcal Auto-iTC_{200}(GE Healthcare)を用いて行った. セル側は 100 μM *P. horikoshii* TtuA およびその変異体を充填した. シリンジ側は 1 mM の ATP を透析バッファーに懸濁したサンプルを充填した. ATP を含む溶液を 150 秒ごとに 2 μL ずつ, 合計 19 回加えた. データの解析は origin ソフトウェアを用いて行った.

2.2 結果と考察

2.2.1 *P. horikoshii* TtuA の結晶化

結晶化スクリーニングを行った結果, wizard I の#29 の 10%(w/v) polyethylene glycol (PEG) 8, 000, CHES (pH 9.5), 0.2 M NaCl の条件で四角すい状の結晶が得られた (図 2-2(a)). 条件検討を行ったところ, PEG の中では PEG 3,350 が一番良い条件であることがわかった. 次に buffer を bicine buffer にすることでより大きな結晶を得ることができた. 最終的に 0.1 M Bicine –NaOH (pH 9.0), 0.2 M NaCl, 12% (w/v) PEG 3, 350 の条件で十分な大きさの結晶が得られた(図 2-2(b)). 結晶は 1 日で現れ, 数日で最大の大きさになった. 位相決定の際にはさらに 10% N, N-dimethyformadie (DMF) を加えた条件で結晶化を行い得られた結晶を X 線回折実験に利用した.

2.2.2 X 線回折実験と回折データの処理

結晶化スクリーニングから得られた結晶からは分解能 5.5 Å の反射が得られた. その後結晶化条件の最適化, 抗凍結剤の条件検討を行う中で, Dimethyl sulfoxide(DMSO)を用いた抗凍結剤から良い反射が得られることがわかり, 最大で 3.4 Å の反射を得られた. 空間群は, $P4_12_12_1$ または

$P4_32_12$ 属し，単位胞の大きさは $a = b = 68.9$ Å, $c = 138.6$ Å であった．その後さらに検討を重ねている中で，抗凍結剤に 30% DMF を用いたところ，多くの結晶では反射が流れてしまう傾向がある一方でいくつかの結晶からは 3 Å を超える反射が見られた．単位胞の長さが $a = b = 70.4$ Å, $c = 129.3$ Å と c 軸が 10 Å ほど縮んでいたことから，脱水効果などが起きてそれが結晶を壊さなかった場合にはよい反射が得られると推測された．拾う際に段階的に濃度を上げていくと結晶が割れやすい傾向があったが，結晶化条件の溶液に一度浸した後，結晶化条件に 30%DMF を含む抗凍結溶液にすぐに移し，液体窒素で瞬間凍結させた結晶からは，最終的なモデル構築に用いた分解能 2.1 Å の反射データが得られた(図 2-3)．結晶は空間群 $P4_12_12_1$ または $P4_32_12$ に属し，格子長は $a = b = 70.1$ Å, $c = 128.6$ Å であった．

位相決定の為にまずセレノメチオニン置換体の *P. horikoshii* TtuA をネイティブと同様に発現，精製，結晶化を行い，同様の条件で同じ形状の結晶が得られたが，十分な大きさには成長しなかった．X 線回折データを収集したところ，分解能が最大で 3.9 Å のデータセットを収集できたが，位相を決定することは出来なかった．位相決定のために水銀や白金など重原子のソークもいくつか試した中で，ヨウ素をソークした結晶から十分な分解能のデータセットを得ることができた．NaI をソークしたことによって結晶にヒビがはいったが，マイクロビームでヒビの入っていない部分を選ぶことでデータセットを測定することができた (図 2-4)．結晶は空間群 $P4_12_12_1$ または $P4_32_12$ に属し，格子長は $a = b = 70.3$ Å, $c = 128.0$ Å であった．

2.2.3 単波長異常散乱法による初期位相決定および分子モデルの構築と構造精密化

AutoSHARP による初期位相決定にはインプットファイルに HKL2000 で処理した sca ファイルをそのまま利用し，分解能は 2.3 Å までのデータを利用した．まず ShelxD によって 16 個のヨウ素を見つけた．その後 SHARP プログラム, SOLOMON プログラムにより位相決定および電子密度の改良を行い，初期位相を得た. Phasing power は 1.242, Figure of merit は 0.3113 であった (表 2-1)．電子密度を描くとαヘリックスと予想される電子密度が得られたため，正しい位相が得られたと解釈した(図 2-5)．この時点で空間群は $P4_32_12$ であることがわかった．

得られた位相情報をもとに Phenix プログラムの autobuild プログラム実行した結果，半分以上の分子のモデルを構築できた．残りは *Coot* プログラムを用いて手動でモデルを作成した．モデルを構築していく過程で，ヨウ素原子は結晶中では実際には 11 個結合していたと判断した (図 2-5(b))．その後ネイティブ結晶からえられた回折データを 2.1 Å まで利用して構造精密化を行い，R 因子は $R_{work} = 0.208$, $R_{free} = 0.241$ に収束した(表 2-1)．最終的に全 310 残基中, 1-222 残基, 227–262 残基, 270–309 残基についてモデルを構築することができた．残りの残基は電子密度を見ることが出来なかったため，モデルを構築しなかった．構造精密化の統計値を表 2-1 に，ラマチャンドランプロットを図 2-6 に示す．非対称単位に *P. horikoshii* TtuA は 1 分子存在したが，結晶学的対称性操作から 2 量体を形成している可能性が示唆された (図 2-7)．

2.2.4 全体構造

P. horikoshii TtuA 単量体は N 末の Zinc フィンガーZnf1(残基番号 1–26), 触媒ドメイン(残基番号 27–262), C 末の Zinc フィンガーZnf2(残基番号 270–309)から構成されていた (図 2-8, 2-9). 触媒ドメインは PP モチーフを持つ ATP ピロフォスファターゼと類似の構造をしており, 他の ATP ピロフォスファターゼと比べて 2 つの Zinc フィンガーが TtuA に特徴的な構造であった. Znf1 は触媒ドメインとつながっており, Znf2 はα10–3_{10}ヘリックスとそれに続くループ領域(残基番号 263-269, 今回の構造では電子密度は見られなかった)の先に存在していた.

P. horikoshii TtuA は結晶学的対称性操作から 2 量体であることが予測された(図 2-7). 分析超遠心実験を行ったところ, 速度法による沈降係数は 3.84, 平衡法から計算された分子量は 70.6 kDa であった (図 2-10). これは *P. horikoshii* TtuA 単量体の分子量が 35.6 kDa であることから, 溶液中でも結晶構造同様 2 量体として存在し, 生体内では 2 量体として機能すると考えられる. *P. horikoshii* TtuA2 量体の構造を図 2-11 に示す. 2 量体化は触媒ドメインの残基番号 165–173 および 227–262 の領域を介して主に疎水性相互作用を介して形成されていた. その中でも, *P. horiskoshii* TtuA の Leu165, Ile168, Leu169, Leu238, Phe249 は他の生物種由来の TtuA タンパク質においても保存されていた (図 2-9). いくつかのサブユニット間の水素結合も 2 量体化の相互作用に関与していた. 2 量体化に関わる表面積を CNS プログラムの buriedsurface を用いて計算したところ, その表面積は 1, 093 $Å^2$ であった (Brunger, 2007). それぞれのサブユニットは正に帯電した溝が存在し, 溝の周辺の領域も 2 量体化領域を含めて正に帯電していた(図 2-11(b)). この領域が tRNA に結合するのかもしれない(5.4 節参照).

2.2.5 Zinc フィンガー

TtuA は 2 つの Zinc フィンガー, Znf1 および Znf2 が他の PP モチーフを持つ ATP ピロフォスファターゼには見られない構造であった (図 2-8). Znf1 は 2 つのβストランド(β1 およびβ2)とヘリックスα1 の N 末側から構成され, 触媒ドメインのα8, α9 の近くに位置していた (図 2-8). TtuA の配列に特徴的に見られる 4 つの CXXC モチーフと 1 つの CXXH モチーフのうち, 1 番目と 2 番目の CXXC/H モチーフ上の Cys3, Cys6, Cys22 および His25 が Znf1 上で亜鉛イオンを配位していた(図 2-12(a)). Znf2 は, ループ領域とヘリックスα11 から構成され, 触媒ドメインのヘリックスα4, α5, およびβ7 とβ8 をつなぐループの近くに位置していた(図 2-8). 4番目と 5 番目の CXXC モチーフ上の Cys272, Cys275, Cys284, および Cys287 が亜鉛イオンの配位に関与していた(図 2-12(b)). Znf2 は同じサブユニットの正に帯電した溝の近くに位置し, Znf2 も正に帯電していた(図 2-11(b)). また Znf2 はヘリックスα11 上の Phe286 の側鎖が触媒ドメインのヘリックスα5 上の Tyr137 の芳香環とスタックしていた(図 2-12(b)). これらの芳香環の残基は TtuA 上で高い保存性を持っていた(図 2-9).

2.2.6 触媒ドメイン

P. horikoshii TtuA 触媒ドメインは 6 つのβストランド(β3–β8)と 10 個のαヘリックス(α1–10), お

よび1つの3_{10}ヘリックスから構成されていた(図2-8, 2-13(a)). TtuAの触媒ドメインについてDALIサーチを行い相同性のある構造を探索したところ, いくつかのPPモチーフを持つATPピロフォスファターゼと構造的に相同であった (Holm and Rosenström, 2010). その中でも, 真正細菌において$tRNA^{Ile2}$のアンチコドンC34位のシチジンをリシジンに修飾するtRNA修飾酵素TilSと最も高い相同性を持ち, *A. aeolicus* TtuAとのZ scoreは24.2であった (Kuratani et al., 2007; Nakanishi et al., 2005). *P. horikoshii* TtuAと*A. aeolicus* TilSを重ねあわせたところ, RMSDは214個のCα原子に対して2.4 Åであった. 2次構造部分の多くの領域は一致していたが, TtuAのヘリックスα4, β7とβ8の間のループ領域, およびヘリックスα7の領域は違う構造をしていた (図2-13(a), (b)). TtuAの2量体化領域はTilSのヘリックスα6, TilS-specific domainと定義された領域およびリンカーヘリックス領域と一致しており, 同様の2量体を形成していた (図2-14(a)). ただしTilSのリンカーヘリックスは*P. horikoshii* TtuAの相同するヘリックスα10と比べて5回転分長いヘリックスを形成していた.

一方, 同じウリジン2位の硫黄修飾を行う真正細菌34位の硫黄修飾酵素MnmAは単量体で機能する (Numata et al., 2006). *P. horikoshii* TtuAと*Escherichia coli*由来のMnmAの触媒ドメインを重ねあわせたところ, RMSDは148個のCα原子に対して3.0 Åであり, TilSと比べて対応するCα原子数が3分の2ほどになり, RMSDの値も大きかった (図2-13(c)). トポロジー図を比較してみると, TtuAやTilSでは触媒ドメイン内の4つめのβストランド(*P. horikoshii* TtuAではβ6)の後にくる二次構造がαヘリックスであるのに対しMnmAではβストランドとなっている(図2-13 (d)-(f)). また, TilSやTtuAで2量体化に関与する領域がMnmAには存在しなかった. このことからTtuAとMnmAは機能としては同じtRNAウリジン2位の硫黄修飾を担うが違う構造をしているといえる.

TtuAとTilSは触媒ドメインに関しては相同性が高いが, 他のドメイン構成が違っている. TtuAは2つの異なる位置にZincフィンガーをもつのに対し, TilSはC末側に全ての生物種がもつstem contact foldドメイン, 一部生物種はさらにC末にアクセプターステム結合ドメインをもっている(図2-14(b)) (Nakanishi et al., 2009). *Geobacillus kaustophilus*由来TilSの触媒ドメインと*P. horikoshii* TtuAの触媒ドメインを重ねあわせたところ, $tRNA^{Ile}{}_2$の認識に関与することが報告されている2つのC末ドメインはTtuAのZincフィンガーとは大きく異なる位置に存在していた (図2-14(c)). この原因としては, TilSのリンカーヘリックスに比べてTtuAの相当するヘリックスα10が途中で折れ曲がり3_{10}ヘリックスやりんカー領域へとつながっていることが考えられる.

2.2.7 活性部位

PPモチーフ(Ser55–Ser60)は, β3ストランドに続くループからヘリックスα2にかけての, 触媒ドメイン上の正に帯電した溝の内部に存在しており, この部位周辺にATPが結合すると推測された(図2-15(a)). *P. horikoshii* TtuAのATP結合予想部位と, 触媒ドメイン全体の構造が似ていたTilSについて, *A. aeolicus* TilS, ATP, Mg^{2+}, L-リジン複合体のATP結合領域とを比較をしてみたところ,

PP モチーフおよびβ6—α6 間は非常に似た構造をしていた(図 2-15(b)). その側鎖の位置や残基を比較したところ, TilS において ATP の認識に関わる Ser32, Arg113, His133 残基の位置に TtuA においては Ser55, Lys135, His155 が存在しており, TilS においてアデニン塩基を認識している Phe61 の主鎖と同じ位置に Ile79 の主鎖が位置していた. また TilS において Mg^{2+}イオンの認識に関わっていた Asp36 や His134, Asp137 の位置には Asp59, Asn156, Asp159 の側鎖が同様に配置していた. Asp59 に関しては側鎖が違う向きをしていたが, これは Mg^{2+}が配位していないためであると考えられる. 配列比較を行ったところ, PP モチーフだけでなく, β6—α6 間の残基も TtuA の間で保存されたいた (図 2-9).

P. horikoshii TtuA が実際に ATP を結合するのかを調べるために ITC 実験を行ったところ, TtuA は ATP と実際に 1:1 の割合で結合し, その K_d は 5.6 μM, エンタルピー変化ΔS は 6.51 cal/mol/deg であった(図 2-16(a)). また, PP モチーフ上の Asp59 を Ala に変異した TtuA について精製し ITC 実験を行ったところ, 熱量変化は見られなかったことから(図 2-16(b)), 実際に PP モチーフ上の残基が ATP の認識に関与していることが明らかになった.

PP モチーフは一般に SGGxDS 配列を持つが, TtuA の PP motif は x の領域にリジン残基が保存されている (図 1-5, 図 2-9). *P. horikoshii* TtuA では Lys58 がそのリジン残基に相当し, Lys58 は PP モチーフ内の Asp59, ヘリックスα8 上の Glu201, ヘリックスα9 上の Lys232 と水素結合ネットワークを形成していた(図 2-15(c)). これらの側鎖による水素結合ネットワークは, ヘリックスα8 とヘリックスα9 の間のループ領域とともにホールを形成していた.

P. horikoshii TtuA の構造において, Zinc フィンガー形成に関与していない 3 番目の CXXC モチーフは触媒ドメインのヘリックスα5 上に位置しており, そのうち Cys128 は, ヘリックスα8 とヘリックスα9 の間のループに存在する Cys220 とジスルフィド結合を形成していた(図 2-15(d)). これら 3 つのシステイン残基の側鎖はすべて触媒部位の方向を向いており, 硫黄修飾反応の際に重要な役割を果たすと考えられる. 配列比較を行ったところ, CXXC モチーフ上の 2 つのシステイン残基だけでなく, Cys220 も TtuA において保存されたアミノ酸残基であった(図 2-9). 一方で TilS にはこれら 3 つのシステイン残基は保存されておらず, この差が TilS は L-リジンを用いてリシジン修飾を行うのに対し, TtuA は硫黄輸送タンパク質 TtuB のチオカルボキシ基によって運ばれてきた硫黄原子を用いて硫黄修飾を行う差につながっている可能性が示唆された.

3. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を用いた TtuA 変異体による機能解析

3.1 方法

3.1.1 変異体コンストラクト作成

発現プラスミドの構築のためにブレオマイシン耐性遺伝子を発現する *E. coli-Thermus* のシャトルベクターpWUR112/77-1 を利用し，このシャトルベクターにシャイン・ダルガーノ配列と野生型 TtuA 遺伝子を挿入したプラスミドを嶋博士より頂いた (Brouns et al., 2005; Shigi, 2012). 変異体は変異導入用プライマーをそれぞれの変異箇所の為に作成し，PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio)を用いて作成した．それぞれの変異ベクターについてはシーケンス反応を行い変異が導入されていることを確認した.

3.1.2 野生型, *ttuA* 欠損株およびプラスミド形質転換体の培養

野生型及び *ttuA* 欠損株はともに rich 培地にて培養を行い，*ttuA* 欠損株はカナマイシンを 30 μg/ml 含む条件で培養を行った (Takada et al., 1993). それぞれプレートにおいてシングルコロニーを作成し，そこから 70 °C で 18 時間前培養後，植えついで 70 °C で本培養を行った．増殖が後期対数期に達したところで培養液を遠心し，集菌した．集菌した菌体は-80 °C で保管した.

作成したプラスミドを *ttuA* 欠損株にそれぞれ形質転換し，カナマイシンを 300 μg/ml，ブレオマイシンを 40 μg/ml 含むゲルライト入りプレートにて 70 °C で一晩培養した (Shigi et al., 2006b). 得られた形質転換体はカナマイシンを 30 μg/ml，ブレオマイシンを 10 μg/ml 含む rich 培地にて 70 °C で 18 時間前培養した後，植えついで 70 °C で本培養した (Takada et al., 1993). 増殖が後期対数期に達したところで培養液を遠心し，集菌した．集菌した菌体は-80 °C で保管した．各形質転換体について 3 回ずつ培養および以下の TtuA 発現, HPLC による s^2T の分析を行った.

3.1.3 TtuA 発現のウエスタンブロットによる確認

TtuA 野生型，*ttuA* 欠損株および *ttuA* 欠損株への形質転換体の培養した菌体を懸濁バッファー[50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.3 mM PMSF]に懸濁し，超音波により破砕した．破砕した産物を 15,000 rpm で 15 分遠心して夾雑物を取り除いた．上清を発現確認に利用した．タンパク質の濃度は BioRad protein assay kit(BioRad)を用いて, BSA で検量線を作成した．サンプルを SDS-PAGE(10-20% ゲル，Wako)で泳動し，iBlot(Invitrogen)を用いて polyvinyl fluoride membrane に転写した．1 次抗体は以前の報告で用いられた抗 TtuA 抗体を，2 次抗体は horseradis peroxidase が共有結合した抗ウサギ IgG 抗体(TrueBlot)を，発光のために ECL plus reagent(GE Healthcare)を用いて抗体の結合したバンドを同定した (Shigi, 2012). ポンソーS を用いて各ウェルのロード量を確認した

3.1.4 tRNA の精製

菌体をミリ Q に懸濁し, その 2 倍量の Isogen (Wako)を加えボルテックスし, 10 分間静置したのちミリ Q の 1/2 量クロロホルムを加えた. 再度ボルテックスし, 室温に静置した後 15,000 rpm で 15 分遠心した. 上清を回収後その体積と等量のイソプロパノールを加え, 室温で 10 分静置した後 15,000 rpm で 20 分遠心した後上清をすて, 沈殿を 0.3 M KOAc(pH 5.3)に懸濁した後, エタノール沈殿, 70%エタノールによるリンスを行い, 上清を取り除いたあと吸引乾燥で沈殿を乾燥させた. 乾燥させた沈殿をミリ Q に懸濁した後, 7 M 尿素を含む 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した. tRNA の分子量に相当するバンド領域を切り出し, 溶出バッファー[0.5 M 酢酸アンモニウム, 0.1 mM EDTA]を加え 37 °C で振とうして溶出した. 0.22 μm のフィルター(Millipore)を通して溶け残ったゲルを除去し, 素通りした溶液をエタノール沈殿, 70%エタノールによるリンスを行った. 上清を取り除いた後吸引乾燥で沈殿を乾燥させ, 沈殿をミリ Q に懸濁した. 7 M 尿素を含む 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製純度を確認した. 260 nm の吸光をもとに濃度を測定した.

3.1.5 HPLC による s^2T の解析

3.1.4 で精製した tRNA または全量の RNA にヌクレアーゼ P1(Yamasa), bacterial alkaline phosphatase (Takara Bio)を 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6)に加え 37 °C で一晩反応し, ヌクレオシドに分解した. 分解したヌクレオシドはフォトダイオードアレイ付きの検出器を備えた HPLC(GL-Sciences)と Inertsil ODS-3 逆相カラムを用いて分離解析した. サンプルを注入後 A buffer [5 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.3), 0.1%アセトニトリル]と B buffer[60%アセトニトリル]の直線勾配で分析した. 各ピークが何に相当するかは以前の結果を参照した (Shigi et al., 2006b). s^2T の量は UV ピークの領域から計算し, それぞれのデータはシュードウリジンのピーク量を基準にあわせた.

3.2 結果と考察

3.2.1 点変異導入部位の決定

私は 9 種類のアラニンまたはセリン置換変異体 *T. thermophilus* TtuA を作成した. アラニン変異体は第 2 章の構造および TilS, ATP, Mg^{2+}複合体との構造との比較を参考にしながら, PP モチーフ上の Asp59, PP モチーフ近くのβ6 からα6 にかけて存在する His157, Asn158, Asp161(*P. horikoshii* では Asp59, His155, Asn156, Asp161)に導入した (図 2-9, 図 2-15(a)(b)) また TtuA の PP モチーフ上に特徴的に保存されている Lys58 および その Lys58 と水素結合ネットワークを形成する Glu203(*P. horikoshii* では Glu201)についてもアラニン置換変異体を導入した. セリン置換変異体については, *P. horikoshii* TtuA において活性部位と予想される位置に存在した 3 つの保存されたシステイン残基に相当する Cys130, Cys133, Cys222(*P. horikoshii* では Cys128, Cys131, Cys220)に導入した (図 2-9, 図 2-15(d)).

3.2.2 TtuA 発現の確認

T. thermophilus TtuA 野生型, *ttuA* 欠損株, 形質転換体を 70 °C で培養した. 培養の増殖度を確認するために経時的に OD を測定したが, 増殖率が TtuA 野生型, *ttuA* 欠損株に比べて形質転換体は遅く, 後期対数期に達するまでに時間がかかった. この結果は変異体の形質転換体だけでなく野生型の形質転換体でも見られた. この原因は培養の際にブレオマイシンを加えていることが何かしら影響する可能性が考えられる.

抗 TtuA 抗体を用いたウエスタンブロットによって野生型, *ttuA* 欠損株, 形質転換体の菌体内に含まれる TtuA 量を確認した. その結果, 形質転換体では野生型, 変異体含めてどの形質転換体においても TtuA の発現量が増加していた(図 3-1). 特に, D59A および D161A 変異体においては TtuA の発現量が大きく増加しており, 他のものと比べると 10 倍ほどその発現量が多かった.

3.2.3 HPLC による s^2T の解析

tRNA 内の s^2T 量を HPLC で解析する前に, まず *T. thermphilus* から精製した全 RNA で HPLC によって野生型の TtuA 形質転換体が s^2T 修飾を回復するのか, さらに変異体によって s^2T の変化を見ることができるのかどうかを確認するために予備実験を行った. その結果, s^2T に相当するピークが形質転換体では野生型と同レベルまで回復し, いくつかの変異体では s^2T の相当するピークが減少することが確認できたため, この分析で解析できると考え tRNA まで精製し tRNA 内の修飾を確認した.

変異体解析を行う前に, 欠損株において s^2T の存在がなくなり, TtuA 野生型を含むプラスミドを形質転換することで硫黄修飾が回復するか確認した. その結果変異体では以前の報告同様 s^2T に相当するピークが完全になくなってしまったが, 野生型 TtuA 形質転換体では s^2T に相当するピークが野生株と同レベルまで回復した(図 3-2).

構造から活性部位に存在すると予想された 3 つのシステイン残基, Cys130, Cys133, Cys222 をそれぞれセリン残基に変えた変異体の s^2T の変化を最初に解析した(*P. horikoshii* では Cys128, Cys131, Cys220 に相当(図 2-9, 図 2-15)). その結果, C130S および C222S 変異体では s^2T に相当するピークが 10%以下となり, C133S ではほぼ 0 になった(図 3-3, 図 3-4). これらの結果から, 構造から予想された 3 つのシステイン残基が実際に TtuA の硫黄修飾に必要であり, TtuB のチオカルボキシ基から硫黄原子を受け取り, 硫黄修飾を行う過程に関与することが予想された.

次に PP モチーフを含めた ATP や Mg^{2+}結合に関与する領域の変異体解析を行った. 作成した変異体のうち, *T. themophilus* の Asp59 と Asp161 という 2 つの保存されたアスパラギン酸(*P. horikoshii* では Asp59 と Asp159)をアラニンに置換した 2 つの変異体では s^2T に相当するピークがともに完全になくなった(図 3-3, 図 3-4). また, *T. thermophilus* TtuA の His157 と Asn158(*P. horikoshii* では His155 と Asn156)をアラニンに置換した変異体では s^2T に相当するピークが 80%前後に減少した(図 3-3,図 3-4). これらの結果は, 以前 TilS 行われた *in vitro* での変異体解析と同様の結果となり, 機能解析からも TilS と同様の ATP 相互作用およびアデニル化反応が起こるというこ

とが示唆された(Nakanishi et al., 2005).

最後に *P. horikoshii* の構造において水素結合ネットワークを形成していた Lys58 と Glu201 に相当する *T. thermophilus* の Lys58 と Glu203 についてもアラニン変異体を作成し, 変異体解析を行った. その結果, K58A 変異体では 60%ほど, E203A 変異体では 20%ほどの s^2T に相当するピークとなった(図 3-3, 図 3-4). このことからこの活性部位周辺の水素結合ネットワークも構造維持など何かしら重要な機能を果たしていることが予想された.

4. 真核生物細胞質・古細菌における 34 位 s^2U 修飾酵素の X 線結晶構造解析に向けた取り組み

4.1 方法

4.1.1 真核生物細胞質 s^2U 修飾酵素 Ncs6•Ncs2 複合体の発現, 精製

分裂酵母 *S. pombe* 由来の Ncs6 および Ncs2 遺伝子をゲノム cDNA からサブクローニングし, pET47 ベクター(Novagen), pGEX ベクター(GE Healthcare), pCold ベクター(Takara Bio)にクローニングした. 共発現のために pET duet ベクター(Novagen)に Ncs6 と Ncs2 をクローニングしたベクターも作成した. Ncs6 単独, Ncs2 単独, および共発現は大腸菌 Rosetta(DE3)に形質転換した. 37 °C で培養した後, OD が 0.6 になったら 0.3 mM IPTC を加え, 18 °C で培養した. 20 時間後に遠心機で菌体を集菌した.

発現, 可溶化, 精製の確は, 最初に His タグを用いた精製を行う場合には Ni 懸濁バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 1mM PMSF, 20 mM イミダゾール]に懸濁して超音波破砕を行い, 遠心で夾雑物を取り除いた. 上清を Ni Sepharose 6 Fast Flow(GE Healthcare)を用いて精製し, Ni 溶出バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 400 mM イミダゾール]で溶出した. GST タグを用いた精製を行う場合はグルタチオン懸濁バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 1mM PMSF] に懸濁し, 超音波破砕, 遠心を行い Glutathone Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare)を用いて精製し, グルタチオン溶出バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 10 mM グルタチオン]で溶出した.

pET47Ncs6 と pGEXNcs2 複合体を共発現した大量精製の際には, Ni 懸濁バッファーに懸濁し超音波破砕後 27, 000 × *g* で 30 分遠心し夾雑物を取り除いた後, 上清を Ni Sepharose 6 Fast Flow を通し Ni 溶出バッファーで溶出した. Ni カラム精製後硫安沈殿のために 3.5 M 硫安を等量加えた. 30 分後遠心して沈殿を集めた後, Ni 溶出バッファーと 3.5 M 硫安を等量混ぜたバッファーに懸濁し, 再度遠心した.生じた沈殿を Ni 溶出バッファーに懸濁し, グルタチオンカラムを通しグルタチオン溶出バッファーで溶出した. サンプルの入った溶出画分を 20 mM リン酸カリウムバッファー(pH 6.5), 75 mM K_2SO_4, 10% Glycerol, 1 mM DTT を含む溶液に透析した. 透析の際には HRV3C プロテアーゼを加えて N 末のタグを切断した. 透析後 Ni カラムとグルタチオンカラムを通し切断されていないサンプルを除去し, ヘパリンカラムに結合させ, KCl の濃度を 150 mM から 750 mM まで直線勾配をかけて溶出した. 溶出したサンプルを 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 400 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex200 カラムを通して精製した. pETduet で共発現したものは, 硫安沈殿後のサンプルを懸濁後グルタチオンカラムによる精製ステップを省いてそのまま透析を行った. 最後のゲルろ過カラムは 20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 400 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT で平衡化して精製を行った.

4.1.2 tRNA の調製およびゲルシフトアッセイ

tRNA は *S. pombe* $tRNA^{Gln}$(UUG)に相当する配列を pUC18 ベクターに T7 プロモーター配列を付加した上で挿入し, PCR 法により tRNA の鋳型を増幅後, T7 RNA polymerase を用いて *in vitro* 転写した. 転写産物は resourceQ カラムを用いて精製した.

ゲルシフトアッセイの際には, tRNA は 200 μM の濃度になるように 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 400 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ に懸濁したものを利用し, *S. pombe* Ncs6•Ncs2 複合体は pETduet を用いて精製したものを 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml の濃度に濃縮したものを利用し, それぞれ 1:2 で混ぜたものを室温または 37 °C で 30 分静置した後, 7% PAGE で泳動しゲルシフトを確認した.

4.1.3 超好熱古細菌 *P. horikoshii* 由来 Ncs6 の発現, 精製

第 2 章で述べたように, *T. thermophilus* TtuA と配列相同性の高い遺伝子として *PH0300* と *PH1680* の 2 つが見つかり, *PH0300* を TtuA とみなした. *S. cerevisiae* の Ncs6 と BLAST 比較を行ったところ, 同じく *PH0300* と *PH1680* が配列相同性をもつものとして同定された. 2 つの配列相同性はそれぞれ 37%と 32%であり, *PH1680* が Ncs6 に近いと予想された. そこで以下 *PH1680* のことを *P. horikoshii* Ncs6 とみなして記述する.

P. horikoshii Ncs6 全長をゲノム上からクローニングし, pET28 ベクターにタグが付加されていない発現ベクター(pET28*Ph*Ncs6)を, pCold2 ベクター(Takara Bio)に 3C 切断部位を加えたベクターに N 末端に His タグおよび 3C 切断部位がついたベクター(pCold*Ph*Ncs6)を作成した. ベクターを大腸菌宿主 Rosetta(DE3)に形質転換し, アンピシリンを含む LB 培地において 37 °C で培養した. pET28 *Ph*Ncs6 は OD が 0.6 に達したところで終濃度 0.3 mM になるように IPTG を加え発現を誘導し, 37 °C で 4 時間または 18 °C で 20 時間培養後遠心機を用いて集菌した. pCold*Ph*Ncs6 は OD が 0.2~0.3 に達したところで IPTG を終濃度 0.3 mM となるように加え, 18 °C で 20 時間培養後遠心機を用いて集菌した.

pET28*Ph*Ncs6 は懸濁バッファー[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM $MgCl_2$, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF]に懸濁し, 超音波により破砕した. 破砕した産物を 27, 000 × *g* で 15 分間, 4 °C で遠心して夾雑物を取り除いた. その後 70 °C で 15 分熱処理し, 大腸菌由来のタンパク質を変性させた後, さらに 27, 000 × *g* で 25 分間遠心した. この上清に 3.5 M 硫安溶液を終濃度 1 M となるように加えた. この溶液を HiTrap-Butyl (GE Healthcare)に吸着させ, 硫安濃度を直線勾配で 0 M まで下げることによりタンパク質を溶出した. サンプルの入った溶出画分を透析バッファー[20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 300 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT]の入ったバッファーに透析した. 透析したサンプルを HiTrap SP カラム(GE Healthcare)に吸着させ, NaCl の 300 mM から 700 mM までの直線濃度勾配で溶出した. サンプルの溶出画分を 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 400 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT で平衡化したゲルろ過カラム Hiload-16/60 Superdex 200 (GE Healthcare)に通して精製した. 精製純度は SDS-PAGE で確認した.

pCold*Ph*Ncs6 は超音波破砕, 遠心, 熱処理, 遠心までは pET28*Ph*Ncs6 と同様に行った. 2 回目の

遠心後の上清に4 M イミダゾールを終濃度20 mMとなるように加え, Ni-A buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 20 mM イミダゾール, 1 mM DTT]で平衡化した HisTrap 5 ml (GE Healthcare)に吸着させた. 吸着させたサンプルはNi-A bufferからNi-B buffer[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 400 mM イミダゾール, 1 mM DTT]までの直線濃度勾配で溶出した. サンプルの溶出画分にHRV3Cプロテアーゼを加え, タグなしの時と同じ透析液バッファーに懸濁した. 透析サンプルを遠心後, 上清をその後の精製に用いた. その後の陽イオン交換カラム, ゲルろ過カラムでの精製は上記と同様に行った. 精製純度はSDS-PAGEで確認した.

4.1.4 *P. horikoshii* Ncs6 および *S. pombe* Ncs6•Ncs2 複合体の結晶化

ゲルろ過カラムを通した後のpET28*Ph*Ncs6および*S. pombe* Ncs6•Ncs2複合体をAmicon Ultra Filter を用いて 2.5~10 mg/ml まで濃縮したサンプルを結晶化スクリーニングに利用した. 結晶化スクリーニングはモスキートを用いて行い, 4 °C または 20 °C にて結晶化を行った (ttplabtech). スクリーニングキットはcrystal screen I/II, Index , wizard I/IIを利用した. 結晶化スクリーニングの結果得られた結晶化条件をもとにpET28*Ph*Ncs6およびpCold*Ph*Ncs6両方については結晶化条件の最適化を, シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて検討した. 最適化の際にはタンパク質濃度を5 mg/mlにて行った.

4.1.5 *P. horikoshii* Ncs6 の X 線回折データ測定

最初に得られた微結晶をIn houseのX線回折装置で当てて塩の結晶ではないか確認した. 得られた結晶に対しX線回折データはSPring-8ビームラインのBL26B2, BL32XU, BL41XUにて測定した. BL41XUにおいてデータセットを測定した際には, 抗凍結剤として30% DMSOを利用し, 波長1.0 Å, カメラ長400 mm, ビームサイズ50 μm × 50 μm, 露光時間1秒, 1フレーム当たりの触れ角0.5 °, アテニュエーター Al 900 μmで360枚の条件でデータを測定した. BL41XUでは検出器はMR225HE を利用した. BL26B2 においてデータセットを測定した歳には, 抗凍結剤として 30% DMSOを利用し, 波長1.0 Å, ビームサイズ100 μm × 100 μm, カメラ長360 mm, 1フレームあたりの露光時間15秒, 1フレーム当たりの触れ角0.6 °で300枚データを測定した.

4.1.6 回折データの処理と位相決定, 構造精密化

得られた回折データをxdsプログラムによって指数付けと積分計算を行い, aimlessを用いてスケーリングを行った (Evans and Murshudov, 2013; Kabsch, 2010). 回折データはxdsおよびaimlessにおける指標を参考に評価した. Test setとして5%のデータをランダムに選んだ.

位相決定のために, Phenixプログラムに含まれるMRage, CCP4iプログラムに含まれるmolrep, phaser, mr.bumpを利用して位相決定を試みた (Adams et al., 2010; Keegan and Winn, 2007; McCoy et al., 2007; Vagin and Teplyakov, 1997). サーチモデルとして私が決定した *P. horikoshii* TtuA をswiss-modelサーバーによって配列を*P. horikoshii* Ncs6に変更したモデルを作成し, そのモデルを

Phaser と molrep では利用した(Kiefer et al., 2009). 正しい解が得られたと判断した後は, phenix.refine と Refmac5 を用いて構造の精密化を行い, Coot を用いて手動で電子密度の見えない領域の除去などを行った (Adams et al., 2010; Emsley et al., 2010; Murshudov et al., 2011). Molprobity を用いてラマチャンドランプロットの正確性を確認した (Chen et al., 2010).

4.1.7 分析超遠心

分析超遠心のための *P. horikoshii* Ncs6 はタグ無しの *P. horikoshii* と同様に調製した. 分析超遠心は速度法で測定した. 速度法においては, 14 μM に調製した *P. horikoshii* Ncs6 を, Optima XL-I 分析超遠心機にて An-50Ti rotor (Beckman Coulter)を用いて 40, 000 rpm で遠心し, 280 nm での吸光を 20 °C で測定した. データは 5 分ごとに測定し, 100 データセット測定した.パラメータは SEDNTERP を用いて計算し, 偏比容とバッファーのρ値は 20°C でそれぞれ 0.73 と 1.016 だった.

4.2 結果と考察

4.2.1 真核生物型 Ncs6•Ncs2 複合体の精製

まず *S. pombe* Ncs6, Ncs2 をそれぞれ単独で発現したところ, Ncs6 に関しては pCold ベクターや pET ベクターといった N 末に His タグが付加したタンパク質で可溶性が確認できたが, Ncs2 は可溶化しなかった. Ncs2 は N 末にグルタチオン融合タグを加えたところ可溶化が見られたが, タグを切断すると沈殿が生じた. それぞれ単独でのさらなる精製を試みたが, 非常に不安定でその後の精製を行うことが出来なかった. また別々に発現させたものを混ぜて, 複合体として精製できるかを Ncs6 側に His タグ, Ncs2 側に GST タグをつけ検討したが, 複合体として精製することが出来なかった. このことから, 別々に発現した場合には Ncs6 と Ncs2 は機能できる状態として大腸菌内で発現できていないと推測された.

次に pET47 Ncs6 と pGEX Ncs2 をともに形質転換し共発現したものを Ni カラムまたはグルタチオンカラムで精製したところ, 複合体として精製することが出来た. タグを切断した後も Ncs2 は沈殿しなかった. DnaK とみられるタンパク質が結合していたためその後の精製を試みたが, 核酸が強く結合しておりイオン交換カラムに結合せず, 疎水性カラムでの精製のため硫安を加えると沈殿が生じてしまった. そこで硫安沈殿によって核酸を除去し, その後の精製を試みたところ, ヘパリンカラムに結合し DnaK を分離できる条件を見つけた. 最終的にゲルろ過カラムにかけてみたところ, ピークが右側に肩があり, 収量が少ないと 2 つの山になってしまうが void 領域ではない領域に溶出され, 安定な複合体を調製することが出来たと考えた. SDS-PAGE およびゲルろ過カラムの結果を図 4-1 に示す. また pET duet ベクターを用いて共発現した場合には Ncs2 に GST タグを付加しなくても複合体が精製できることがわかった. ゲルろ過カラムの結果も同様であるため, この条件でも安定な複合体が調製できたと考えた.

実際にこの Ncs6•Ncs2 複合体が tRNA と複合体を形成するか確認するため, *S. pombe* $tRNA^{Gln}$(UUG)のゲルシフト実験を行ったところ, 室温および 37 °C いずれの条件で反応させた時

でも tRNA のバンドのシフトが観察されたことから, tRNA を認識して結合できる複合体の調製方法を確立したと考えられる(図 4-2).

4.2.2 古細菌型 *P. horikoshii* Ncs6 の精製

精製の過程で, 陽イオン交換カラムを通す前透析の過程で塩濃度を下げる際に, 最初は塩濃度 150 mM で行うと沈殿が生じてしまったが, 塩濃度を上げグリセロールを加えることで沈殿の割合が減少した. pET28*Ph*Ncs6 は精製の純度を SDS-PAGE で確認したところ, 目的産物付近にいくつかのバンドが見られた(図 4-3(a)). これはジスルフィド結合した産物だけでなく分解産物などではないかと考え, 精製条件, 培養条件をいくつか試したが, 大きな改善は見られなかった. そこで別の発現コンストラクトとして N 末端側に His タグが付加した pCold ベクターを用いた. pCold ベクターは Ni カラムで精製後 HRV 3C カラムを用いてタグを切断し, 陽イオン交換カラムを通すために透析を行った際に pET28*Ph*Ncs6 より多くの沈殿が見られた. SDS-PAGE で確認したところ沈殿産物の多くは N 末側の His タグが切断できていないものであった. ゲルろ過後の pCold*Ph*Ncs6 の純度を確認したところ, His タグが切断されていないものも含まれるためいくつかのバンドが pET28*Ph*Ncs6 同様見られ, SDS-PAGE 上では大きな差は見られなかった (図 4-3(b)).

4.2.3 *P. horikoshii* Ncs6 の結晶化

S. pombe Ncs6•Ncs2 複合体および pET28*Ph*Ncs6 の結晶化スクリーニングを行った結果, *P. horikoshii* Ncs6 については沈殿剤が PEG3,350 のいくつかの条件でポリクリ状の茶色い微結晶を沈殿の中から得られた (図 4-4(a)). pH, 塩濃度, 沈殿剤の濃度などを変更しても大きな改善は見られなかった. PEG3,350 を含むリザーバーと結晶化スクリーニングキットを 4:1 で混ぜたブレンドスクリーニングを行ったところ様々の条件でポリクリ状の結晶に加えて単一の結晶を得ることができた (図4-4(b)). 一部の結晶は50 μm の大きさの結晶まで成長した. 単結晶はブレンドスクリーニングの様々な条件で得られたため, この結果はブレンドスクリーニングによるリザーバーの変化ではなく, 元のリザーバーの混ぜる量が 8 割に減ったためではないかと考え, 15% PEG3, 350 を含む条件でリザーバーとタンパク質試料を 0.8:1 で混ぜたところ, 再現よく単結晶が得られた. 結晶化ドロップの作成方法を変更した上で結晶化条件の最適化を行ったところ, 100 mM HEPES-NaOH (pH 6.8), 200 mM sodium thiocyanate, 16% PEG 3,350 の条件で 100 μm の大きさの結晶を得ることが出来た (図 4-4(c)).

pCold*Ph*Ncs6 についても沈殿剤が PEG3,350 の条件で結晶が得られないか確認したところ, いくつかの条件で pET28*Ph*Ncs6 と比べて角のある六角柱状の結晶が得られた (図 4-5(a)). その後 buffer 条件や塩の条件を検討したところ, Tris バッファーと sodium fluoride (NaF)を用いた条件において, 出来る結晶の数が少なく大きくなりやすい結晶を得ることが出来た. さらにリザーバーに DTT を加えると結晶が 1 週間ほど成長し続け, 一部の結晶は一辺が 200 μm ほどまで成長した. 0.1 M Tris-HCl(pH6.6), 0.2 M NaF, 14% PEG 3,350, 1 mM DTT の条件において得られた結晶写真を図

4-5(b)に示す.

4.2.4 *P. horikoshii* Ncs6 の X 線回折実験と回折データの処理

最初に pET28*Ph*Ncs6 から得られた微結晶を In house の回折装置で当てて塩の結晶ではないか確認したところ何も回折像が得られなかったため, 塩の結晶ではないと予想された. BL32XU にてその微結晶に X 線を照射した測定したところ, 非常に低分解能ながら回折像が得られた. その後 pET28*Ph*Ncs6 から得られた単結晶について SPring-8 BL41XU にて回折像を収集したところ, 最大で 6 Å の反射を得ることが出来た.

次に pCold*Ph*Ncs6 から得られた結晶から SPring-8 BL41XU にて回折像を測定したところ, pET28*Ph*Ncs6 よりも高分解能の回折像を得ることが出来た. その中でも抗凍結剤として 30% DMSO を加えた条件で測定した際には 4 Å を超える反射を確認することが出来た. データセットを測定し xds で処理した結果, 空間群 $P3_121$ または $P3_221$ に属し, 格子長は $a = b = 87.4$ Å, $c = 179.1$ Å, $\alpha = \beta = 90°$, $\gamma = 120°$であり, 全体の I/σが 2 以上を基準にすると分解能は 3.95 Å であった. ただし異方性があり, aimless の結果を参照すると, I/σが 2 以上を基準として, *a* 軸と *b* 軸は分解能 3.8 Å *c* 軸は 6.33 Å となった. BL26B2 でより大きな結晶でデータセットを測定した際には霜が付着してしまいアイスリングが含まれていたため, 得られたデータを xds で処理する際にはアイスリングの領域を除去した上で行った(図 4-6). 処理した結果, 結晶は空間群 $P3_121$ または $P3_221$ に属し, 格子長は $a = b = 86.7$ Å, $c = 175.1$ Å, $\alpha = \beta = 90°$, $\gamma = 120°$であり, 全体の I/σが 2 以上を基準にすると分解能は 3.79 Å であった. アイスリングの領域を除去したため, 高分解能の shell の completeness は 66%にとどまった. Aimless の結果を参照すると, I/σが 2 以上を基準として, *a* 軸と *b* 軸は分解能 3.38 Å , *c* 軸は 6.37 Å となった.

4.2.5 分子置換法を用いた位相決定および構造の精密化

BL41XU で測定したデータについて, 分子置換法を用いて最初に自分で用意したモデルを利用しプログラム Phaser や molrep を用いて位相決定を試みたが, 正しい位相と思われる解を得ることができなかった. Phenix プログラムに含まれる MRage を用いて分子置換を行った結果, Z スコアが 8.45 の解と予想される結果が得られた. 電子密度とモデルを確認したところ, 1 分子について解が見つかりヘリックスとシートがはっきりと確認できたため, 正しい位相が得られたと思われた. しかしアミノ酸配列と単位胞から予想された Mattews 係数によると非対称単位に 2 分子存在すると予想された. そのため MRage を用いて得られたモデルをサーチモデルとして, Phaser プログラムや molrep プログラムを実行したが, 2 分子目を見つけられなかった. CCP4i プログラムの Mr.Bump を用いて, MRage で得られた解をもとにいくつかのモデルを作成させ, 分子置換を行ったところ, Z スコアが 8.86 の結果が得ることが出来た. 電子密度を確認したところ, この解の結果は 2 分子に対してどちらもヘリックスと予想される電子密度が確認できたため, 2 分子目の解が得られたと判断した(図 4-7). 得られた 2 分子は, *P. horikoshii* TtuA と違う配置をしていたが, 結晶学

的対称操作を行ったところ, TtuA と同様の 2 量体も形成しており(図 4-8), PISA を用いて 4 次構造を確認した結果においても同様の 2 量体を形成していると予想されたため, 構造的に正しく機能すると予想される 2 量体中の 2 分子を用いて構造の精密化を行った (Krissinel and Henrick, 2007). 途中でより高分解能側の反射の I/σが強い BL26B2 のデータセットに対して, 分子置換の得られたモデルで分子置換を行い, その後の構造の精密化を行った.

Phenix プログラムの phenix.refine にて rigid body refinement, TLS refinement, CCP4i プログラムの Refmac5 を用いて restrain refinement を行い構造の精密化を行った. 多くの部位は側鎖がみえないため, モデルは電子密度から側鎖の存在が予想された部位や TtuA の構造から位置が予想された PP モチーフや保存されたシステイン残基など一部についてのみ配置し, 残りはアラニン残基をおいた. グリシン残基やプロリン残基の部位はアラニン残基の代わりにそれらの残基をおいた. 最終的に R_{work} と R_{free} はそれぞれ 0.303 と 0.344 となった(表 4-1). 最終的なモデル構築は, 分子 A は残基番号 3-71, 77-125, 137-188, 201-232, 239 -270, 283-308 について, 分子 B は残基番号 1-71, 77-125, 136-192, 204-229, 239-274, 284-303 まで作成した. ラマチャンドランプロットを図 4-9 に示す. DALI lite を用いて構造を比較したところ, 2 つのサブユニット間の RMSD は 248 残基に対して 1.1 Å であった.

4.2.6 *P. horikoshii* Ncs6 の全体構造

ゲルろ過カラム Hiload16/60 superdex200 での精製結果を比較すると, 溶出位置が TtuA と Ncs6 とでほぼ同じ位置であった (図 2-1(b), 図 4-10(a)). 分析超遠心実験を行ったところ, 速度法による沈降係数は 4.078 であった(図 4-10(b)). この値をもとに分子量を計算すると, 58.6 kDa となり, 単量体か 2 量体化のいずれかで溶液中では存在すると予想されるが, 以上の結果を総合的に判断すると 2 量体として *P. horikoshii* Ncs6 は機能すると考えられる.

P. horikoshii Ncs6 のサブユニットは *P. horikoshii* TtuA と同様に Znf1, 触媒ドメイン, Znf2 の 3 つのドメインから構成されていた (図 4-11). データセットを基に亜鉛イオンの異常散乱マップ描いたところ確認することはできなかったが, xafs の測定結果から亜鉛のシグナルが検出された(図 4-12). *P. horikoshii* Ncs6 精製過程の溶液や結晶化溶液に亜鉛イオンが含まれていないため, この結果は Ncs6 は TtuA 同様に Znf1, Znf2 内で亜鉛イオンを配位していると考えられる. サブユニット内の各ドメインや 2 次構造の配置は TtuA のサブユニットとほぼ同じであり, 2 量体化領域もヘリックスα9 とα10 を中心とした領域で構成されていた (図 4-11). 得られた X 線回折像は低分解能であり, TtuA の 2 次構造のラベルと同様に記載すると, ヘリックスα2 とβ4 ストランドのループ領域, ヘリックスα4 とヘリックスα5 の間のループ領域, ヘリックスα7 とβ8 ストランドの間のβ7 ストランドを含めた領域, ヘリックスα8 とα9 の間のループ領域の一部, 3_{10} ヘリックスから Znf2 へとつながる領域は電子密度を確認することができなかった. TtuA との細かな違いを確認することは出来なかったが, 2 次構造で見られる大きな違いとしては, *P. horikoshii* Ncs6 では 2 分子中 1 分子に関して Znf2 がβストランドを2つ持ち, ヘリックスα11 が TtuA に比べて長くなっていた. DALI lite を

用いて *P. horikoshii* TtuA と Ncs6 のサブユニット構造を比較したところ, RMSD は 269 原子または 275 原子にたいして 1.4 Å であった. 2 量体化領域のヘリックスα9 について, TtuA, Ncs6 のサブユニット A, サブユニット B でそれぞれ角度の変化が見られた (図 4-13(a)).

低分解能のためほとんどのアミノ酸残基の側鎖がはっきりとしないが, *P. horiikoshii* TtuA の立体構造とほぼ同じであることから, 配列比較をもとに多くの残基の位置は推測できると考えられる. 古細菌の Ncs6 と真核生物の Ncs6 についての配列比較を TtuA の配列とともに行った結果を図 4-14 に示す. *P. horiikoshii* Ncs6 においても 1 つめと 2 つめの CXXC/H モチーフ(Cys3, Cys6, Cys22, His25), 4 つめと 5 つめの CXXC モチーフ(Cys285, Cys288, Cys297, Cys300)がそれぞれ Znf1 と Znf2 上において亜鉛イオンを配位していると予想された. *M. jannaschii* や *C. elegans* など一部の生物種では N 末側の CXXC モチーフのシステイン間の残基数や位置に違いが見られるが, 周辺にシステイン残基があることからこれらの生物種でも Zinc フィンガーが存在すると予想される.また 3 つめの CXXC モチーフの Cys139, Cys142 はヘリックスα5 上に位置している. CXXC モチーフとは別にもう 1 つ保存されたシステイン残基が Ncs6 にも存在し, TtuA 同様ヘリックスα8 とα9 の間のループ領域に存在すると考えられるため, 硫黄転移反応の際に活性部位上の 3 つのシステイン残基が重要な役割を果たすと考えられる. Cα原子の位置で比較すると, CXXC モチーフ上の 2 つのシステイン残基とループ上のシステイン残基の距離が TtuA ではそれぞれ 6.1 Å と 7.9 Å, Ncs6 ではそれぞれ 10.4 Å と 12.6 Å であり, Ncs6 ではジスルフィド結合を直接結合できる位置には存在しないと思われるため, TtuA で見られたジスルフィド結合は可逆的なものである可能性が考えられる(図 2-15(d), 図 4-15). ATP 結合モチーフの PP モチーフも TtuA 同様に活性ポケットの内部に位置し, TtuA において活性に重要な役割を果たすアスパラギン残基の Asp159 の位置には Ncs6 では Asp170 が位置しており, 同様にアデニル化の際に重要な役割を果たすと考えられる. β6 ストランドからヘリックスα6 における領域も, Asp170 含めて Ncs6 においても TtuA と同様の配列が保存されているため, アデニル化反応の過程も Ncs6 と TtuA で同様であることが示唆される. Ncs6 はまた, β4 ストランドからヘリックスα3 の間のループ領域, ヘリックスα6 とα7 の間のループ領域にも保存性の高い残基が多く存在していた.

Ncs6 と TtuA2 量体のうち片方のサブユニットについて重ねあわせたところ, 重ねあわせていない側のサブユニットが TtuA と Ncs6 の間でずれていた(図 4-13(b)(c)). 分子 B をもとに重ねあわせたところ, Znf1 の中の亜鉛イオンの位置が 14 Å, Znf2 の亜鉛イオンの位置が 12 Å ずつ移動していた(図 4-13(b)). Zinc フィンガーだけでなく, 触媒ドメインにおいてもヘリックスやシートの位置が TtuA と Ncs6 の間で移動しており, ヘリックスの片方の先端の位置は場所によっては 10 Å 以上移動していた(図 4-13(c)). この結果は結晶化のパッキングの影響と, 実際の生体内での TtuA と Ncs6 での構造の差を反映しているという 2 通りの可能性が考えられる.

5. 総合討論

5.1 構造をもとにした TtcA ファミリーの特徴

今回の研究で *P. horikoshii* TtuA の分解能 2.1 Å での構造および *P. horikoshii* Ncs6 の 3.79 Å での低分解能構造を明らかにした．これらはtRNA上のピリミジン2位の酸素原子を硫黄原子に置き換える修飾を担う TtcA ファミリーの構造としては初めての報告である. TtcA ファミリーの配列特徴としては，保存された CXXC/H モチーフ，ならびに ATP ピロフォスファターゼに見られる PP モチーフが存在する. TtuA や Ncs6 は CXXC/H モチーフを 5 つもち，グループ II に分類されている．一方 TtcA は CXXC モチーフを 2 つもち，グループ I に分類されている (Jäger et al. 2004).

P. horikoshii TtuA は 2 量体を形成し，各サブユニットは PP モチーフを含む触媒ドメインと，Znf1 と Znf2 の 2 つの zinc finger から構成されていた(図 2-8, 2-11). 5 つの保存された CXXC/H モチーフのうち, 1 つめと 2 つめの CXXC モチーフが Znf1 の, 4 つめと 5 つめの CXXC モチーフが Znf2 の亜鉛の配位に関わっていた．また 3 つめの CXXC モチーフは触媒ドメイン上に存在しており，変異体解析から 3 つめの CXXC モチーフ上のシステイン残基が硫黄修飾に重要な役割を果たすことが明らかになった. *P. horikoshii* TtuA は触媒ドメイン上にもう一つ保存されたシステイン残基をもっており, 3 つめの CXXC モチーフの片方のシステイン残基とジスルフィド結合を形成していた．このシステイン残基も第 3 章の変異体解析から硫黄修飾に重要であることが明らかになった.

P. horikoshii Ncs6 は低分解能のためほとんどの側鎖のモデルを構築できなかったが, 2 量体を形成し，各サブユニットは触媒ドメインと Znf1, Znf2 の 3 つのドメインから構成されており，全体構造は TtuA と似た構造であった(図 4-11). アミノ酸配列の順序に従うと TtuA 同様に 5 つの保存された CXXC/H モチーフのうち 4 箇所が Znf1, Znf2 上でそれぞれ亜鉛を配位するために利用されていると考えられる．また 3 つめの CXXC モチーフおよび Cys232 が触媒部位に集まり, TtuA 同様硫黄転移反応の際に重要な役割を果たす可能性が示唆された (図 4-14, 4-15). ATP 結合部位の PP モチーフも TtuA と同じ部位に存在することから，修飾の過程で起こるアデニル化反応，硫黄転移反応は TtuA と同様の反応で起こると推測される (図 4-14). 実際，真核生物 *S. cerevisiae* Ncs6 の *in vivo* での変異体解析では， 3 つめの CXXC モチーフの二重変異では硫黄修飾がなくなること，PP モチーフの変異体においても s^2U 修飾が起こらなくなることが報告されている (Dewez et al., 2008).

グループ I に含まれる TtcA とグループ II に含まれる Ncs6 と TtuA を PP モチーフなどの位置と構造をもとに改めて配列比較を行ったところ, TtcA は Zinc フィンガーを構成する N 末側と C 末側の CXXC モチーフのペアが存在しないことから, TtcA には Zinc フィンガーが存在しないと考えられる(図 1-5(a)). TtcA に 2 つ存在する CXXC モチーフのうち，1 つめの CXXC モチーフは TtuA/Ncs6 の 3 つめの CXXC モチーフの近い位置に存在した．過去の TtcA の変異体解析では, 1 つめの CXXC モチーフに関してはそのシステイン残基の変異体では s^2C 修飾がなくなることが報告されている (Jäger et al. 2004). また, TtcA の 2 つめの CXXC モチーフは, TtuA や Ncs6 で触媒部位

に存在するもう 1 つの保存されたシステイン残基と似たような位置に存在した．以上のことから，TtcA は TtuA や Ncs6 と違い 4 つのシステイン残基を用いて反応を行っているのではないか，と推測される．また古細菌の TtuA や Ncs6，真正細菌の似た触媒ドメインの構成をしているリシジン修飾酵素 TilS で見られた 2 量体化サブドメインと予想される領域も存在するため，同様の 2 量体構造をしているかもしれない．

以上をまとめると，TtcA ファミリーは活性部位に 3 から 4 つのシステイン残基を持ち，また最初に TilS に特徴的な領域とされた部分を含めた 2 量体化領域をもったファミリーであると考えられる．グループ II に含まれる Ncs6 や TtuA はさらに N 末側と C 末側に 2 つの Zinc フィンガーをもっている，といった特徴がある．

5.2 硫黄転移反応メカニズム

硫黄修飾は，TtuA や Ncs6 では修飾される塩基の ATP を用いたアデニル化，硫黄原子による求核攻撃という 2 段階の反応をへて行われると考えられる (Nakai et al., 2008; Shigi et al., 2006b)．今回の構造から，TtuA や Ncs6 はリシジン修飾酵素 TilS と構造的な相同性が見られた (図 2-13,図 2-14)．TilS は修飾される塩基を最初に ATP を用いてアデニル化し，その後リジン残基によってアデニル化された中間体が求核攻撃されリシジン修飾が行われる (Ikeuchi et al., 2005)．TilS は TtuA や Ncs6 と違う修飾を行うが，2 つの反応のうち最初のアデニル化の反応過程は共通しており，構造から TtuA と TilS の ATP 結合部位周辺は同じ残基が存在していたことから，最初の反応は同様のメカニズムで行われると考えられる (図 2-15(a)(b))．その後の硫黄修飾とリシジン修飾の違いは，TtuA や Ncs6 で存在するシステイン残基が TilS には存在しない点が影響しているのかもしれない．

P. horikoshii TtuA の構造上では，反応部位に位置する Cys128 と Cys220 がジスルフィド結合を形成していた(図 2-15(d))．真正細菌の 34 位硫黄修飾酵素 MnmA と tRNA 複合体の反応前状態の構造では，MnmA は触媒部位にシステイン残基を 2 つしかもたないが今回の TtuA の構造同様ジスルフィド結合を形成していた (Numata et al., 2006) (図 5-1(a))．MnmA•tRNA 複合体のアデニル化した状態の構造では，ジスルフィド結合が還元され 2 つのシステイン残基のうちの片方が修飾される U34 に近づいていた．生化学的解析から，MnmA は反応サイクルにおいてペアスルフィド状態をとっていると示唆された．構造比較を行うと，*P. horikoshii* TtuA の Cys128 および Cys131 が存在する αヘリックスと同じヘリックス上に *E. coli* MnmA の Cys102 が存在し，Cys220 に相当する位置に *E. coli* MnmA の Cys199 が存在していた．

また，メタン生成古細菌 *Methanococcus maripaludis* での s^4U 修飾酵素 ThiI は 3 つのシステイン残基 Cys265, Cys268, Cys348 が修飾に重要な役割を果たし，これら 3 つのシステイン残基がすべてペアスルフィド状態の中間体を形成するために必要である，ということが近年報告された(Liu et al., 2012b)．この報告で議論されていたように，以前解かれた *Bacillus anthracis* ThiI の構造をもとにしたモデル構造を TtuA と比較すると (Waterman et al., 2006)，CXXC モチーフ上の Cys265 と Cys268 は *P. horikoshii* TtuA の触媒ドメイン上の CXXC モチーフ Cys128, Cys131 と同様の位置に

存在し, Cys348 は *B. anthracis* ThiI 上でディスオーダーした領域に存在するが, *P. horikoshi* TtuA の Cys220 に近い位置に存在すると推測された (図 2-15(d), 図 5-1(b)). *M. maripaludis* ThiI の CXXC モチーフの *in vivo* での変異体解析では, Cys265 の変異体は s^4U 修飾が 10%程度, Cys268 では完全になくなり, この変異の割合は *T. thermophilus* TtuA の結果とほぼ一致している(図 3-3, 図 3-4). 一方もう一つの Cys348 の変異体では s^4U が 60%ほど野生型と比べて存在し, *T. thermophilus* TtuA との結果とは違った結果となっている. また *in vitro* での解析により *M. maripaludis* ThiI は反応前に CXXC モチーフの Cys265 と Cys268 がジスルフィド結合を形成し, 今回の *P. horikoshii* TtuA の構造上でジスルフィド結合を形成していた Cys128 と Cys220 とは違ったシステインどうしとなっていた. いくつかの違いはあるものの, *M. maripaludis* ThiI の反応に重要な 3 つのシステイン残基は TtuA の 3 つのシステイン残基とそれぞれ対応し, 似たような反応機構を持っている可能性が考えられる. 実際, 本論文作成中に *M. taripaludis* 中に存在する Ncs6 ホモログを組み換えタンパク質で作成したものを解析するとがペアスルフィド形成するという結果が報告されている (Liu et al., 2014).

一方, 真核生物では鉄硫黄クラスターの合成に関与する因子が s^2U 修飾に影響する (Nakai et al., 2007). Ncs6 や TtuA は活性部位に 3 つシステイン残基をもっており, 例えば radical SAM 酵素はシステイン残基を 3 つ利用して鉄硫黄クラスターを形成することから, TtuA や Ncs6 も活性部位上にクラスターを形成しており, 活性状態では上記で議論したペアスルフィドをとらないかもしれない (Shisler and Broderick, 2012). また, 硫黄運搬因子である Urm1(真核生物細胞質 s^2U34), SAMP2(古細菌 s^2U34), TtuB(好熱菌 s^2T54)はペアスルフィドの形ではなくチオカルボキシ基の形で硫黄を運ぶ. チオカルボキシ基の形で硫黄を運ぶ因子は, 硫黄を受け渡す際にシステイン残基などに受け渡した上で求核攻撃されるのではなく, 直接求核攻撃をされるのではないか, といったモデルを提唱している報告も存在することから, Ncs6 や TtuA はペアスルフィドを介さずに Urm1 や TtuB が活性部位においてチオカルボキシ化された C 末端が硫黄を受渡しやすいような構造をとっているのかもしれない (Jurgenson et al., 2008). TtuA や Ncs6 は, 今回の構造では一部ディスオーダーしていたが, 溝の入り口とは別に, 活性部位に外からアクセスできるホールが存在していた(図 2-15(c)). TilS でも同様のホールが存在し, その部位に求核攻撃するリジンが結合することから, 同じようにホールから C 末が入り込み活性部位まで硫黄原子を届けるのかもしれない (Kuratani et al., 2007).

活性部位においてペアスルフィドを形成するのか, それとも鉄硫黄クラスターを形成するのかを明らかにするためには, TtuB や Urm1, SAMP2 との複合体構造や詳細な生化学的解析を今後は進めていくことが必要になると考えられる. また鉄硫黄クラスターを形成するかどうかは, TtuA は好気性条件では無色であり鉄硫黄クラスターを結合していないと考えられ、一般的に鉄硫黄クラスターを含むタンパク質は酸素に敏感で嫌気性条件下で再構成できるという報告が多く存在するため, 同様に嫌気性条件下で解析することが必要になると思わえる.

5.3真核生物細胞質 Ncs6•Ncs2 複合体と古細菌 Ncs6 との比較

真核生物細胞質において s^2U34 修飾は Ncs6•Ncs2 複合体というヘテロ複合体が担う(図 1-4(c)). 古細菌のゲノム上では Ncs6 のホモログは存在する一方で, Ncs2 に相当する分子は見つけられなかった. 真核生物の Ncs2 の配列比較を行うと, N 末側に 2 つの CXXC モチーフ, C 末側に 2 つの CXXC モチーフが保存され, PP モチーフに似た配列を持っているが, 活性部位で Ncs6 や TtuA で保存されている 3 つのシステイン残基や PP モチーフ以外の ATP 結合部位周辺のアミノ酸配列は保存されていなかった(図 5-2). Ncs2 は conserved domain database によると N 末端側の ATP ピロフォスファターゼドメインと, C 末端側の機能未知の G(R/K)G 配列を持っている DUF2392 ドメインをもつものとして定義されている(Marchler-Bauer et al., 2013). また *S. pombe* の Ncs6 と Ncs2 を比較すると, 残基数はそれぞれ 335 残基と 366 残基で大きな違いは存在せず, 配列相同性が 23%存在する. 以上のことを考えると, Ncs2 は Ncs6 に近い構造をしており, N 末と C 末に Zinc フィンガーをもっている可能性が考えられる. 活性部位に重要なシステイン残基は見られないものの, ヒトでは Ncs6 が存在せず Ncs2 のみを用いて *in vitro* で s^2U 修飾が確認できた報告があり, 機能構造的に Ncs6 に近いことを示唆する (Chowdhury et al., 2012).

S. pombe Ncs6•Ncs2 複合体の精製途中でゲルろ過カラム Hiload 16/60 Superdex200 を通すと, 大きなピークは *P. horikoshii* Ncs6 や TtuA で見られたピークよりも早く溶出された (図 2-1, 図 4-1, 図 4-10). そのため, 真核生物 Ncs6•Ncs2 複合体は古細菌 Ncs6 や TtuA で見られた 2 量体よりも大きな複合体を形成していると考えられる. Ncs2 が Ncs6 に近い構造をしているという上記の議論に基づくと, Ncs6•Ncs2 複合体は Ncs6 同士が *P. horikoshii* Ncs6 と同じような相互作用でホモ 2 量体を形成し, その外側に Ncs2 が結合した複合体を形成する, もしくは Ncs6 と Ncs2 が 1 分子ずつあわさって今回の *P. horikoshii* Ncs6 でみられたような 2 量体をヘテロ複合体として形成し, その 2 量体が合わさってより大きな複合体を形成する, といった 2 つの可能性が少なくともあると思われる.

5.4 構造をもとにした TtuA および Ncs6 による tRNA の認識機構

TtuA および Ncs6 は 2 量体構造をしており, 合計 4 つの zinc フィンガーを持っていた. Zinc フィンガーは DNA だけでなく RNA を認識することが報告されている(Brown, 2005)(Hall, 2005). *P. horikoshii* TtuA の表面電荷を描くと, 触媒ポケットおよびその周辺が正に帯電していた(図 2-11). 片方のサブユニットに注目すると, その領域には近くに位置する同じサブユニット由来の Znf2, 二量体化サブドメインなどが含まれている. また, tRNA を表面電荷に基いて 54 位が活性部位周辺に来るように配置すると, もう片方のサブユニット由来の Znf1 も tRNA との相互作用可能な位置に存在していた(図 5-3(a)(b)). 以上のことから, 2 量体化領域および TtuA に特徴的に存在する Zinc フィンガーが tRNA との相互作用において重要な役割を果たすと推測される.

TtuA および Ncs6 の触媒ドメインの構造は硫黄修飾と違うリシジン修飾を行う TilS の触媒ド

メインの構造と相同性が高い (図2-13, 図2-14, 図4-10). *P. horikoshii* Ncs6をtRNAに結合したTilSと重ねあわせると, フリップアウトした34位のCが活性ポケットに大きな衝突なく入り込むことができた (Nakanishi et al., 2009)(図 5-3(c)). *P. horikoshii* TtuA の構造をもとに考えると, C34 の 2 位の酸素原子の位置はATPによるアデニル化や3つのシステイン残基による硫黄転移反応を行える位置の近くに存在することから, tRNA のアンチコドン周辺はTilSとの結合様式と似ている可能性が考えられる. また, アンチコドンループが結合しているサブユニットとは別のサブユニット側の Znf1 が tRNA の D アーム近くに存在し, この領域が tRNA との結合に関与していることが示唆された. 一方 Znf2 は tRNA とはそのままでは結合できない領域にある. Znf2 は触媒ドメインとディスオーダーしたループでつながっており, tRNA が結合した際にはドメインが移動し tRNA の認識できる位置に移動しているかもしれない. TilS•tRNA 複合体と比較すると,アンチコドンステムループの領域は同じように結合できるが, TilS では tRNA のアクセプターステムやフリップアウトした 38 位の塩基を TilS 特有の C 末のドメインが認識している, といった違いが見られる(図 5-3(d)).

またアミノ酸配列で Ncs6 と TilS を比較すると TilS•tRNA 複合体上で tRNA の認識に関与している TilS のいくつかの残基は *P. horikoshii* Ncs6 でも保存されていた. 具体的には, *Geobacillus kaustophilus* TilS のヘリックスα5 上の Arg142, ヘリックスα8 上の Arg199 がそれぞれ *P. horikoshii* Ncs6 のヘリックスα6 とα7 の間の Arg181, ヘリックスα9 の N 末側の Arg240 に相当していた (表 5-1). これらの残基はNcs6間では一部の古細菌ではArg181に相当する残基がグルタミン酸になっているが, アルギニン残基が高く保存されていた(図 4-14). また *G. kaustophilus* TilS の Arg142, *P. horikoshii* Ncs6 の Arg181 の次の残基はともにグリシンであり, これらは TilS と Ncs6 で保存されていた.さらに *G. kaustophilus* TilS で Arg199 と塩橋を形成している Glu134 に相当する残基が古細菌 Ncs6 ではグルタミン, 真核生物 Ncs6 ではグルタミン酸が保存されていた. 一方, これらの残基は TtuA では保存されていなかったことから, 活性部位周辺の細かな残基の違いが Ncs6 と TtuA による 34 位と 54 位の修飾部位の差と関連する可能性も考えられる (表 5-1).

真核生物細胞質では, Ncs6 は Ncs2 と複合体を形成し機能する. 5.3 節で議論したように, Ncs2 は Zinc フィンガーを持ち中央のドメインも Ncs6 と同様の構造をしており, 古細菌の Ncs6 の構造をもとにすると少なくとも 2 通りの複合体のパターンが予想される. Ncs6 と Ncs2 がヘテロ 2 量体を形成する場合には, Ncs2 上の Znf1 が認識に関与する可能性が考えられる. Ncs6 が古細菌同様ホモ 2 量体を形成する場合には, その外側に Ncs2 が存在し,アンチコドンや D アーム以外の tRNA の認識に関与することに寄与しているのかもしれない.

5.5 *P. horikoshii* TtuA と Ncs6 の違い

今回の研究では, 構造解析には古細菌の *P. horikoshii* を用いた. *P. horikoshii* のゲノム上には TtcA ファミリーに属するものが *PH0300*, *PH1680* の 2 つ存在し, 今回の論文では第 2 章, 第 4 章の冒頭に書いたように前者が TtuA に相当するもの, 後者が Ncs6 に相当するものとみなして研究を

行った．これらが本当にそれぞれ T ループ 54 位とアンチコドン 34 位と修飾部位が違うのか，といったことはわからないため，これら 2 つの分子は同じ機能をもった分子が 2 つゲノム上に存在するだけなのかもしれない．5.4 節において記述したように，構造をもとにした配列比較において，TilS において tRNA の認識に関与していた残基に注目すると，*P. horikoshii* Ncs6 とした *PH1680* では TilS と同じような残基が存在し，真核生物 Ncs6 も含めて保存されていた一方，TtuA とした *PH0300* では違うアミノ酸が位置していた．また，TilS に結合した tRNA とのドッキングモデルでは，Ncs6 では上述したように Znf1 が D アームの近くに存在したが，TtuA では結合するためには少し離れた位置に存在していた(図 5-3(c)(e))．第 4 章で述べたように，2 量体構造の Ncs6 と TtuA の片方のサブユニットに対するもう片方のサブユニットの位置の違いが生体内での構造の違いを実際に反映しているのか単なる結晶化のパッキングなのかどちらであるのかはわからないが，前者である場合にはこの違いが Ncs6 と TtuA の認識の違いを反映している可能性も考えられ，2 つの分子の機能の違いを説明できると考えられる．

5.6 TtuB による共有結合部位メカニズム

第 1 章で述べたように，*T. thermophilus* の TtuB,真核生物の Urm1，古細菌の SAMP2 は Ncs6 や TtuA といった tRNA 修飾酵素と C 末が Lys 残基と共有結合することが報告されている (Shigi, 2012). *T. thermophilus* TtuA は Lys137, Lys226, Lys229 が共有結合される．このうち Lys226, Lys229 は *P. horikoshii* TtuA には保存されておらず，今回の構造では電子密度がみられずモデルをおいてないヘリックスα8 とヘリックスα9 の間のループ領域に位置するすると考えられる．Lys137 は *P. horikoshii* では Lys135 に相当し，これは活性部位に位置していた(図 2-15(a)). *P. horikoshii* TtuA の構造をもとにした *T. thermophilus* TtuA の構造モデルでは，Lys226 と Lys229 は外側の表面近くにあるのに対し Lys137 は内側に存在する(図 5-4)．共有結合した TtuA-TtuB の電気泳動によるバンドの位置がずれているという結果について構造モデルをもとにすると，Lys226 と Lys229 に結合したものと，内側の Lys137 に結合したものとの違いを反映している可能性が高いと思われる．TtuB が共有結合する生理的な機能はわからないが，TtuA の Lys137 に結合すると活性部位が埋まってしまい，tRNA が相互作用できなくなる，または修飾反応が進められなくなると考えられるため，何かしらのストレスなどに応じて硫黄修飾酵素の活性を制御している可能性が考えられる．今後のさらなる機能解析によって，TtuB の共有結合の生理的な機能が明らかになることが期待される．古細菌や真核生物細胞質においては具体的な共有結合部位は同定されていないが，これらも同様に活性ポケット周辺に存在するリジン残基と共有結合し，硫黄修飾など何かしらの生理的機能を制御しているのかもしれない.(Humbard et al., 2010; Van Der Veen et al., 2011).

謝辞

指導教員の深田先生には本研究のために研究環境を整えていただきました．理化学研究所横山構造生物学研究室の横山茂之上席研究員にはこの研究のために研究環境を整えて下さり，研究を進めていく過程で様々なアドバイスを頂きました．また横山構造生物学研究室の倉谷光央博士には tRNA 硫黄修飾酵素について何もわからないところから実験手法，解析手法を忙しい中指導していただきました．また論文投稿時にも多くの助言をいただきました．理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの関根俊一チームリーダー，伊藤拓宏ユニットリーダーには特に X 線回折データの測定や構造解析の際に手伝って頂き，多くの指導や助言をしていただきました．現在分子生物学研究所に在籍しております伊藤(後藤)桜子博士には tRNA 修飾酵素について実験手法や過去の知見について多くのことを教えていただきました．産業技術総合研究所の嶋直樹博士には，TtuA に関する知見，*T. thermophilus* を用いた tRNA の修飾の解析手法，投稿論文執筆の際に多くの指導を頂きました．分析超遠心での解析の際には理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの桂一茂博士，白水美香子博士，横山構造生物学研究室の寺田貴帆博士にお世話になりました．SPring-8 での X 線回折データの測定にはビームラインスタッフの方々のサポートがなければ構造決定することができませんでした．深田研究室の山木海絵子様，現在東京大学大学院化学系研究科菅研究室に在籍しております武藤(篠崎)貴理子様，理化学研究所秘書の中山朋子様，山中香様，東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻事務の皆様には事務面で様々な便宜を図って戴きました．その他横山構造生物学研究室の方々，理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センターの皆様，かつて私が在籍した東京大学横山研究室の先輩，同期，後輩の方々には研究生活の多くの面で支えていただきました．以上の方々に心から感謝いたします．

博士課程在学時は，理化学研究所の大学院生リサーチ・アソシエイト，日本学術研究会の特別研究員制度により経済面で支えていただき研究に励むことができました．最後に，生活面，精神面で支えてくださった両親，家族に心から感謝いたします．

略語表及び参考文献

略語表

アミノ酸

1 文字表記	3 文字表記	英語表記	日本語表記
A	Ala	Alanine	アラニン
C	Cys	Cysteine	システイン
D	Asp	Aspartic acid	アスパラギン酸
E	Glu	Glutamic acid	グルタミン酸
F	Phe	Phenylalanine	フェニルアラニン
G	Gly	Glycine	グリシン
H	His	Histidine	ヒスチジン
I	Ile	Isoleucine	イソロイシン
K	Lys	Lysine	リジン
L	Leu	Leucine	ロイシン
M	Met	Methionine	メチオニン
N	Asn	Asparagine	アスパラギン
P	Pro	Proline	プロリン
Q	Gln	Glutamine	グルタミン
R	Arg	Arginine	アルギニン
S	Ser	Serine	セリン
T	Thr	Threonine	スレオニン
V	Val	Valine	バリン
W	Trp	Tryptophan	トリプトファン
Y	Tyr	Tyrosine	チロシン
U	Sec	Selenocysteine	セレノシステイン

ヌクレオシドおよび修飾塩基

略号	英語表記	日本語表記
A	Adenosine	アデノシン
C	Cytidine	シチジン
G	Guanosine	グアノシン
U	Uridine	ウリジン
T	Thymidine/5-metyluridine	チミジン / リボチミジン（5 メチルウリジン）
s^2U	2-thiouridine	2 チオウリジン
s^4U	4-thiouridine	4 チオウリジン
s^2C	2-thiocytidine	2 チオシチジン
mnm^5U	5-methylaminomethyluridine	5 メチルアミノメチルウリジン
$cmnm^5U$	5-carboxymethylaminomethyluridine	5 カルボキシメチルアミノメチルウリジン
mnm^5s^2U	5-methylaminomethyl-2thiouridine	5 メチルアミノメチル 2 チオウリジン
$cmnm^5s^2U$	5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine	5 カルボキシメチルアミノメチル 2 チオウリジン
τm^5U	5-taurinomethyluridine	5 タウリノメチルウリジン
τm^5s^2U	5-taurinomethyl-2thiouridine	5 タウリノメチル 2 チオウリジン
mcm^5U	5-methoxycarbonylmethyluridine	5 メトキシカルボキシメチルウリジン
ncm^5U	5-carbamoylmethyluridine	5 カルバモイルメチルウリジン
mcm^5s^2U	5-methoxycarbonylmethyluridine	5 メトキシカルボキシメチル 2 チオウリジン
s^2T	5-methyl-2thiouridine	2 チオリボチミジン
se^2U	2-selenouridine	2 セレノウリジン
ges^2U	2-geranylthiouridine	2 ゲラニルチオウリジン
s^2Um	2-thio-2′-*O*-metyluridine	2 チオ 2′-*O*- メチルウリジン

ヌクレオシドおよび修飾塩基 (続)

略号	英語表記	日本語表記
k^2C	lysidine	リシジン
agm^2C	agmatidine	アグマチジン
ct^6A	cyclic N6-threonylcarbamoyladenosine	サイクリック N6- スレオニル カルバモイルアデノシン
m^1A	1-methyl-adenosine	1 メチルアデノシン
Am	2´-*O*-methyladenosine	2´-*O*- メチルアデノシン
Cm	2´-*O*-methylcytidine	2´-*O*- メチルシチジン
Gm	2´-*O*-methylguanosine	2´-*O*- メチルグアノシン
Um	2´-*O*-methyluridine	2´-*O*- メチルウリジン
m^2G	2-methylguanosine	2 メチルグアノシン
m^7G	7-methylguanosine	7 メチルグアノシン
m^5C	5-methylcytidine	5 メチルシチジン
Ψ	pseudouridine	シュードウリジン

略号	英語表記	日本語表記
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
mRNA	messenger RNA	伝達 RNA
tRNA	transfer RNA	転移 RNA
aaRS	Aminoacyl-tRNA synthetase	アミノアシル tRNA 合成酵素
ATP	Adenosine 5´-triphosphate	アデノシン 5´- 三リン酸
CTP	Cytidine 5´-triphosphate	シチジン 5´- 三リン酸
GTP	Guanosine 5´-triphosphate	グアノシン 5´- 三リン酸
UTP	Uridine 5´-triphosphate	ウリジン 5´- 三リン酸
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethane	トリス [ヒドロキシメチル] アミノメタン
HEPES	N-[2-hydroxyethy]piperasine-N´-[2-ethanesulfonic acid]	
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogaractopyranoside	
2-ME	2-merchaptoethanol	2- メルカプトエタノール
DTT	Dithiothreitol	ジチオスレイトール
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
SAD	single-wavelength anomalous dispersion	単波長異常分散法
R.m.s.d.	Root-mean square deviation	二重平均平方根偏差
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	

参考文献

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *66*, 213–221.

Agris, P.F., Vendeix, F.A., and Graham, W.D. (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. J. Mol. Biol. *366*, 1–13.

Alexandrov, A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S.L., Hughes, T.R., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (2006). Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. Mol. Cell *21*, 87–96.

Ashraf, S.S., Sochacka, E., Cain, R., Guenther, R., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (1999). Single atom modification (O-->S) of tRNA confers ribosome binding. RNA *5*, 188–194.

Awai, T., Kimura, S., Tomikawa, C., Ochi, A., Ihsawatina, Bessho, Y., Yokoyama, S., Ohno, S., Nishikawa, K., Yokogawa, T., Suzuki, T., Hori, H. (2009). *Aquifex aeolicus* tRNA (N2,N2-guanine)-dimethyltransferase (Trm1) catalyzes transfer of methyl groups not only to guanine 26 but also to guanine 27 in tRNA. J. Biol. Chem. *284*, 20467–20478.

Bauer, F., Matsuyama, A., Candiracci, J., Dieu, M., Scheliga, J., Wolf, D.A., Yoshida, M., and Hermand, D. (2012). Translational control of cell division by Elongator. Cell Rep. *1*, 424–433.

Björk, G.R. (1995). Biosynthesis and function of modified nucleosides. In tRNA:Structure, Biosynthesis, and Function, D. Söll, and U.L. RajiBhandary, ed. (Washington DC: American Society for Microbiology), pp. 165–205.

Björk, G.R., Huang, B., Persson, O.P., and Byström, A.S. (2007). A conserved modified wobble nucleoside (mcm^5s^2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. RNA *13*, 1245–1255.

Bork, P., and Koonin, E.V. (1994). A P-loop-like motif in a widespread ATP pyrophosphatase domain: implications for the evolution of sequence motifs and enzyme activity. Proteins *20*, 347–355.

Brouns, S.J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A.P., de Vos, W.M., and van der Oost, J. (2005). Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. J. Biol. Chem. *280*, 11422–11431.

Brown, R.S. (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. Curr. Opin. Struct. Biol. *15*, 94–98.

Brunger, A.T. (2007). Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. Nat. Protoc. *2*, 2728–2733.

Cantara, W.A., Crain, P.F., Rozenski, J., McCloskey, J.A., Harris, K.A., Zhang, X., Vendeix, F.A., Fabris, D., and Agris, P.F. (2011). The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. Nucleic Acids Res. *39*, D195–201.

Chen, C., Huang, B., Anderson, J.T., and Byström, A.S. (2011). Unexpected accumulation of ncm^5U and ncm^5s^2U in a trm9 mutant suggests an additional step in the synthesis of mcm^5U and mcm^5s^2U. PLoS One *6*, e20783.

Chen, V.B., Arendall, W.B. 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *66*, 12–21.

Chowdhury, M.M., Dosche, C., Löhmannsröben, H.G., and Leimkühler, S. (2012). Dual role of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MOCS3 in tRNA thiolation and molybdenum cofactor biosynthesis in humans. J. Biol. Chem. *287*, 17297–17307.

Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol. *12*, 138–163.

Crick, F.H. (1966). Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. J. Mol. Biol. *19*, 548–555.

Crick, F.H. (1970). Central dogma of molecular biology. Nature *227*, 561–563.

Deutsch, C., El Yacoubi, B., de Crécy-Lagard, V., and Iwata-Reuyl, D. (2012). Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t^6A), a universal tRNA nucleoside. J. Biol. Chem. *287*, 13666–13673.

Dewez, M., Bauer, F., Dieu, M., Raes, M., Vandenhaute, J., and Hermand, D. (2008). The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 5459–5464.

Dumelin, C.E., Chen, Y., Leconte, A.M., Chen, Y.G., and Liu, D.R. (2012). Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria. Nat. Chem. Biol. *8*, 913–919.

Edmonds, C.G., Crain, P.F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C.H., Kowalak, J.A., Pomerantz, S.C., Stetter, K.O., and McCloskey, J.A. (1991). Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaebacteria). J. Bacteriol. *173*, 3138–3148.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *66*, 486–501.

Esberg, A., Huang, B., Johansson, M.J., and Byström, A.S. (2006). Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for elongator complex in transcription and exocytosis. Mol. Cell *24*, 139–148.

Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *62*, 72–82.

Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *69*, 1204–1214.

Fernández-Vázquez, J., Vargas-Pérez, I., Sansó, M., Buhne, K., Carmona, M., Paulo, E., Hermand, D., Rodríguez-Gabriel, M., Ayté, J., Leidel, S., and Hidalgo, E. (2013). Modification of $tRNA^{Lys}_{UUU}$ by elongator is essential for efficient translation of stress mRNAs. PLoS Genet. *9*, e1003647.

Folk, W.R., and Yaniv, M. (1972). Coding properties and nucleotide sequences of *E. coli* glutamine tRNAs. Nat. New Biol. *237*, 165–166.

Furukawa, K., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). A protein conjugation system in yeast with homology to biosynthetic enzyme reaction of prokaryotes. J. Biol. Chem. *275*, 7462–7465.

Giegé, R., Sissler, M., and Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. Nucleic Acids Res. *26*, 5017–5035.

Grosjean, H., Gaspin, C., Marck, C., Decatur, W.A., and de Crécy-Lagard, V. (2008). RNomics and Modomics in the halophilic archaea *Haloferax volcanii*: identification of RNA modification genes. BMC Genomics *9*, 470.

Gupta, R. (1984). *Halobacterium volcanii* tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs. J. Biol. Chem. *259*, 9461–9471.

Gustilo, E.M., Vendeix, F.A., and Agris, P.F. (2008). tRNA's modifications bring order to gene expression. Curr. Opin. Microbiol. *11*, 134–140.

Hall, T.M. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. Curr. Opin. Struct. Biol. *15*, 367–373.

Hoagland, M.B., Stephenxon, M.L., Scott, J.F., Hecht, L.I., and Zamecnik, P.C. (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. J. Biol. Chem. *231*, 241–257.

Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., and Zamir, A. (1965). Structure of a Ribonucleic acid. Science *147*, 1462–1465.

Holm, L., and Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. Nucleic Acids Res. *38*, W545–W549.

Horie, N., Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S., Watanabe, K., Kuchino, Y., Nishimura, S., and Miyazawa, T. (1985). Two $tRNA^{Ile}_{1}$ species from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8: effect of 2-thiolation of ribothymidine on the thermostability of tRNA. Biochemistry *24*, 5711–5715.

Huang, B., Lu, J., and Byström, A.S. (2008). A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA *14*, 2183–2194.

Humbard, M.A., Miranda, H.V., Lim, J.M., Krause, D.J., Pritz, J.R., Zhou, G., Chen, S., Wells, L., and Maupin-Furlow, J.A. (2010). Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) in *Haloferax volcanii*. Nature *463*, 54–60.

Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y., and Suzuki, T. (2005). Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition. Mol. Cell *19*, 235–246.

Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. (2006). Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. Mol. Cell *21*, 97–108.

Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T., and Suzuki, T. (2010). Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. Nat. Chem. Biol. *6*, 277–282.

Isel, C., Lanchy, J.M., Le Grice, S.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Marquet, R. (1996). Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer $tRNA_3^{Lys}$. EMBO J. *15*, 917–924.

Jackman, J.E., and Alfonzo, J.D. (2013). Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. Wiley Interdiscip. Rev. RNA *4*, 35–48.

Jäger, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q., and Björk, G.R. (2004). The conserved Cys-X1-X2-Cys motif present in the TtcA protein is required for the thiolation of cytidine in position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. *186*, 750–757.

Johansson, M.J.O., Esberg, A., Huang, B., Björk, G.R., and Byström, A.S. (2008). Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. Mol. Cell. Biol. *28*, 3301–3312.

Jurgenson, C.T., Burns, K.E., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2008). Crystal structure of a sulfur carrier protein complex found in the cysteine biosynthetic pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry *47*, 10354–10364.

Kabsch, W. (2010). XDS. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *66*, 125–132.

Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator $tRNA^{Met}$ in *S. cerevisiae*. Genes Dev. *18*, 1227–1240.

Kadaba, S., Wang, X., and Anderson, J.T. (2006). Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. RNA *12*, 508–521.

Kambampati, R., and Lauhon, C.T. (2003). MnmA and IscS are required for *in vitro* 2-thiouridine biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochemistry *42*, 1109–1117.

Keegan, R.M., and Winn, M.D. (2007). Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *63*, 447–457.

Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nucleic Acids Res. *37*, D387–D392.

Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H., Seeman, N.C., and Rich, A. (1974). Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. Science *185*, 435–440.

Kowalak, J.A., Dalluge, J.J., McCloskey, J.A., and Stetter, K.O. (1994). The Role of Posttranscriptional Modification in Stabilization of Transfer RNA from Hyperthermophiles. Biochemistry *33*, 7869–7876.

Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. *372*, 774–797.

Krüger, M.K., and Sørensen, M.A. (1998). Aminoacylation of hypomodified $tRNA^{Glu}$ *in vivo*. J. Mol. Biol. *284*, 609–620.

Kuratani, M., Yoshikawa, Y., Bessho, Y., Higashijima, K., Ishii, T., Shibata, R., Takahashi, S., Yutani, K., and Yokoyama, S. (2007). Structural basis of the initial binding of $tRNA^{Ile}$ lysidine synthetase TilS with ATP and L-lysine. Structure *15*, 1642–1653.

Laxman, S., Sutter, B.M., Wu, X., Kumar, S., Guo, X., Trudgian, D.C., Mirzaei, H., and Tu, B.P. (2013). Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. Cell *154*, 416–429.

Leidel, S., Pedrioli, P.G. a, Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K., and Peter, M. (2009). Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. Nature *458*, 228–232.

Liu, Y., Beer, L.L., and Whitman, W.B. (2012a). Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. Environ. Microbiol. *14*, 2632–2644.

Liu, Y., Zhu, X., Nakamura, A., Orlando, R., Söll, D., and Whitman, W.B. (2012b). Biosynthesis of 4-Thiouridine in tRNA in the Methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*. J. Biol. Chem. *287*, 36683–36692.

Liu, Y., Long, F., Wang, L., Söll, D., and Whitman, W.B. (2014). The putative tRNA 2-thiouridine synthetase Ncs6 is an essential sulfur carrier in *Methanococcus maripaludis*. FEBS Lett. Published online February 13, 2014 http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.065

Madore, E., Florentz, C., Giegé, R., Sekine, S., Yokoyama, S., and Lapointe, J. (1999). Effect of modified nucleotides on *Escherichia coli* $tRNA^{Glu}$ structure and on its aminoacylation by glutamyl-tRNA synthetase. Predominant and distinct roles of the mnm^5 and s^2 modifications of U34. Eur. J. Biochem. *266*, 1128–1135.

Mandal, D., Köhrer, C., Su, D., Russell, S.P., Krivos, K., Castleberry, C.M., Blum, P., Limbach, P.A., Söll, D., and RajBhandary, U.L. (2010). Agmatidine, a modified cytidine in the anticodon of archaeal $tRNA^{Ile}$, base pairs with adenosine but not with guanosine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 2872–2877.

Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Bryant, S.H. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. Nucleic Acids Res. *41*, D348–D352.

Maupin-Furlow, J.A. (2013). Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. Trends Microbiol. *21*, 31–38.

McCloskey, J.A., Graham, D.E., Zhou, S., Crain, P.F., Ibba, M., Konisky, J., Söll, D., and Olsen, G.J. (2001). Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic *Methanococcales*. Nucleic Acids Res. *29*, 4699–4706.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. *40*, 658–674.

Miranda, H.V., Nembhard, N., Su, D., Hepowit, N., Krause, D.J., Pritz, J.R., Phillips, C., Söll, D., and Maupin-Furlow, J.A. (2011). E1- and ubiquitin-like proteins provide a direct link between protein conjugation and sulfur transfer in archaea. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

Miyauchi, K., Kimura, S., and Suzuki, T. (2013). A cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenosine as a widely distributed tRNA hypermodification. Nat. Chem. Biol. *9*, 105–111.

Motorin, Y., and Helm, M. (2010). tRNA stabilization by modified nucleotides. Biochemistry *49*, 4934–4944.

Mueller, E.G., Buck, C.J., Palenchar, P.M., Barnhart, L.E., and Paulson, J.L. (1998). Identification of a gene involved in the generation of 4-thiouridine in tRNA. Nucleic Acids Res. *26*, 2606–2610.

Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T., and Yokoyama, S. (1988). Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. Nature *336*, 179–181.

Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., and Vagin, A.A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *67*, 355–367.

Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T., and Hayashi, H. (2007). Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway. Mol. Cell. Biol. *27*, 2841–2847.

Nakai, Y., Nakai, M., and Hayashi, H. (2008). Thio-modification of yeast cytosolic tRNA requires a ubiquitin-related system that resembles bacterial sulfur transfer systems. J. Biol. Chem. *283*, 27469–27476.

Nakanishi, K., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Soma, A., Sekine, Y., Suzuki, T., and Nureki, O. (2005). Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied by a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 7487–7492.

Nakanishi, K., Bonnefond, L., Kimura, S., Suzuki, T., Ishitani, R., and Nureki, O. (2009). Structural basis for translational fidelity ensured by transfer RNA lysidine synthetase. Nature *461*, 1144–1148.

Noma, A., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T. (2009a). Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. Nucleic Acids Res. *37*, 1335–1352.

Noma, A., Shigi, N., and Suzuki, T. (2009b). Biogenesis and functions of thio- compounds in tRNA: comparison of bacterial and eukaryotic thiolation machineries. In DNA and RNA Modification Enzymes:

Structure, Mechanism, Function and Evolution. H. Grosjean, ed. (Washington, DC: ASM Press) pp392–405.

Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T., and Nureki, O. (2006). Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate. Nature *442*, 419–424.

Oashi, Z., Saneyoshi, M., Harada, F., Hara, H., and Nishimura, S. (1970). Presumed anticodon structure of glutamic acid tRNA from *E. coli*: a possible location of a 2-thiouridine derivative in the first position of the anticodon. Biochem. Biophys. Res. Commun. *40*, 866–872.

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods Enzymol. *276*, 307–326.

Palenchar, P.M., Buck, C.J., Cheng, H., Larson, T.J., and Mueller, E.G. (2000). Evidence That ThiI , an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. J. Biol. Chem. *275*, 8283–8286.

Perrochia, L., Crozat, E., Hecker, A., Zhang, W., Bareille, J., Collinet, B., van Tilbeurgh, H., Forterre, P., and Basta, T. (2013). *In vitro* biosynthesis of a universal t^6A tRNA modification in Archaea and Eukarya. Nucleic Acids Res. *41*, 1953–1964.

Ranjan, N., Damberger, F.F., Sutter, M., Allain, F.H.T., and Weber-Ban, E. (2011). Solution structure and activation mechanism of ubiquitin-like small archaeal modifier proteins. J. Mol. Biol. *405*, 1040–1055.

Rezgui, V.A., Tyagi, K., Ranjan, N., Konevega, A.L., Mittelstaet, J., Rodnina, M.V., Peter, M., and Pedrioli, P.G. (2013). tRNA tK^{UUU}, tQ^{UUG}, and tE^{UUC} wobble position modifications fine-tune protein translation by promoting ribosome A-site binding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 12289–12294.

Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F., and Klug, A. (1974). Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 A resolution. Nature *250*, 546–551.

Rodriguez-Hernandez, A., Spears, J.L., Gaston, K.W., Limbach, P.A., Gamper, H., Hou, Y.M., Kaiser, R., Agris, P.F., and Perona, J.J. (2013). Structural and mechanistic basis for enhanced translational efficiency by 2-thiouridine at the tRNA anticodon wobble position. J. Mol. Biol. *425*, 3888–3906.

Schlieker, C., Van der Veen, A.G., Damon, J.R., Spooner, E., and Ploegh, H.L. (2008). A functional proteomics approach links the ubiquitin-related modifier Urm1 to a tRNA modification pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 18255–18260.

Schweizer, M.P., Chheda, G.B., Baczynskyj, L., and Hall, R.H. (1969). Aminoacyl nucleosides. VII. N-(Purin-6-ylcarbamoyl)threonine. A new component of transfer ribonucleic acid. Biochemistry *8*, 3283–3289.

Sengupta, R., Vainauskas, S., Yarian, C., Sochacka, E., Malkiewicz, A., Guenther, R.H., Koshlap, K.M., and Agris, P.F. (2000). Modified constructs of the tRNA TΨC domain to probe substrate conformational requirements of m^1A_{58} and m^5U_{54} tRNA methyltransferases. Nucleic Acids Res. *28*, 1374–1380.

Shigi, N. (2010). Functions and biosynthesis pathway of sulfur-modifications in tRNA. Seikagaku. *82*, 623–628.

Shigi, N. (2012). Posttranslational modification of cellular proteins by a ubiquitin-like protein in bacteria. J. Biol. Chem. *287*, 17568–17577.

Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Watanabe, K. (2006a). Temperature-dependent biosynthesis of 2-thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA. J. Biol. Chem. *281*, 2104–2113.

Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2006b). Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. J. Biol. Chem. *281*, 14296–14306.

Shigi, N., Sakaguchi, Y., Asai, S.I., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2008). Common thiolation mechanism in the biosynthesis of tRNA thiouridine and sulphur-containing cofactors. EMBO J. *27*, 3267–3278.

Shisler, K.A., and Broderick, J.B. (2012). Emerging themes in radical SAM chemistry. Curr. Opin. Struct. Biol. *22*, 701–710.

Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K., and Watanabe, K. (2002). Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. EMBO J. *21*, 6581–6589.

Takada, T., Akanuma, S., Kotsuka, T., Tamakoshi, M., Yamagishi, A., and Oshima, T. (1993). Recombination-Deficient Mutants of an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. *59*, 2737–2739.

Tisné, C., Rigourd, M., and Marquet, R. (2000). NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA (Lys)3 expressed in *Escherichia coli*: identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription. RNA *6*, 1403–1412.

Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., and Suzuki, T. (2005). Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. J. Biol. Chem. *280*, 1613–1624.

Urbonavicius, J., Qian, Q., Durand, J.M., Hagervall, T.G., and Björk, G.R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. EMBO J. *20*, 4863–4873.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997). MOLREP : an Automated Program for Molecular Replacement. J. Appl. Crystallogr. *30*, 1022–1025.

Vasil'eva, I.A., and Moor, N.A. (2007). Interaction of aminoacyl-tRNA synthetases with tRNA: general principles and distinguishing characteristics of the high-molecular-weight substrate recognition. Biochemistry(Mosc). *72*, 247–263.

Van der Veen, A.G., Schorpp, K., Schlieker, C., Buti, L., Damon, J.R., Spooner, E., Ploegh, H.L., and Jentsch, S. (2011). Role of the ubiquitin-like protein Urm1 as a noncanonical lysine-directed protein modifier. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 1763-1770.

Vendeix, F.A., Murphy, F.V. 4th., Cantara, W.A., Leszczyńska, G., Gustilo, E.M., Sproat, B., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (2012). Human $tRNA^{Lys3}{}_{UUU}$ is pre-structured by natural modifications for cognate and wobble codon binding through keto-enol tautomerism. J. Mol. Biol. *416*, 467–485.

Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2007). Automated structure solution with autoSHARP. Methods Mol. Biol. *364*, 215–230.

Watanabe, K., Oshima, T., Saneyoshi, M., and Nishimura, S. (1974). Replacement of ribothymidine by 5-methyl-2-thiouridine in sequence GT psi C in tRNA of an extreme thermophile. FEBS Lett. *43*, 59–63.

Watanabe, K., Shinma, M., Oshima, T., and Nishimura, S. (1976). Heat-induced stability of tRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. *72*, 1137–1144.

Waterman, D.G., Ortiz-Lombardía, M., Fogg, M.J., Koonin, E.V., and Antson, A.A. (2006). Crystal structure of *Bacillus anthracis* ThiI, a tRNA-modifying enzyme containing the predicted RNA-binding THUMP domain. J. Mol. Biol. *356*, 97–110.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. *67*, 235–242.

Wolfe, M.D., Ahmed, F., Lacourciere, G.M., Lauhon, C.T., Stadtman, T.C., and Larson, T.J. (2004). Functional diversity of the rhodanese homology domain: the *Escherichia coli* ybbB gene encodes a selenophosphate-dependent tRNA 2-selenouridine synthase. J. Biol. Chem. *279*, 1801–1809.

El Yacoubi, B., Bailly, M., and de Crécy-Lagard, V. (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. Annu. Rev. Genet. *46*, 69–95.

Yokoyama, S., Watanabe, T., Murao, K., Ishikura, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Miyazawa, T. (1985). Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *82*, 4905–4909.

Yoshida, M., Takeishi, K., and Ukita, T. (1970). Anticodon structure of GAA-specific glutamic acid tRNA from yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. *39*, 852–857.

Zinshteyn, B., and Gilbert, W.V. (2013). Loss of a conserved tRNA anticodon modification perturbs cellular signaling. PLoS Genet. *9*, e1003675.

(表 2-1) *P. horikoshii* TtuA の X 線回折データ測定と構造精密化の統計値

Diffraction data	Native	NaI-soak
Data collection		
Beamline	SPring-8 BL32XU	SPring-8 BL32XU
Space group	$P4_32_12$	$P4_32_12$
Unit cell (Å)	$a = b = 70.1$, $c = 128.6$	$a = b = 70.3$, $c = 128.0$
Wavelength (Å)	0.97627	1.4000
Resolution (Å)	50-2.1 (2.18-2.10)*	50-2.3 (2.34-2.30)
Completeness (%)	100.0 (99.9)	100.0 (100.0)
Redundancy	12.5 (5.8)	27.9 (27.3)
$I/\sigma(I)$	25.1 (2.0)	29.2 (4.7)
R_{sym}†	0.105 (0.512)	0.122 (0.542)
Phasing		
I sites identified		16
Phasing power		1.242
FOM‡		0.31130
Refinement		
Resolution (Å)	50-2.1	
Number of reflections	35632	
R_{work} / R_{free}§	0.208/0.244	
No. atoms		
Protein	2411	
Ligand/ion	11/2	
water	80	
B-factor		
Protein	35.5	
Ligand/ion	34.0/37.0	
water	32.7	
R.m.s. deviation		
Bond lengths (Å)	0.008	
Bond angles (°)	1.038	
Ramachandran plot		
Favored (%)	99.0	
Allowed (%)	1.0	
Disallowed (%)	0.0	

*The statistics in the highest-resolution shell are given in parentheses.

†$R_{sym} = \Sigma|I - \langle I \rangle|/\Sigma I$, where I is the observed intensity of reflections.

‡FOM, figure of merit.

§$R_{work,\ free} = \Sigma|F_{obs} - F_{calc}|/\Sigma F_{obs}$. Free reflections consist of 5% of the total number of reflections.

(表 4-1) *P. horikoshii* Ncs6 の X 線回折データ測定と構造精密化の統計値

Diffraction data	Native
Data collection	
Beamline	SPring-8 BL26B2
Space group	$P3_121$
Unit cell (Å)	$a = b = 86.7$, $c = 175.15$
Wavelength (Å)	1.0000
Resolution (Å)	50-3.79 (4.02-3.79)*
Completeness (%)	94.8 (68.1)
Redundancy	5.8(5.4)
$I/\sigma(I)$	12.5 (2.2)
R_{sym}†	0.060 (0.923)
$CC_{1/2}$	1.000(0.871)
Refinement	
Resolution (Å)	50-3.79
Number of reflections	13896
R_{work} / R_{free}§	0.303/0.344
No. atoms	
Protein	2784
ion	4
B-factor	
Protein	303.4
ion	370.8
R.m.s. deviation	
Bond lengths (Å)	0.013
Bond angles (°)	1.69
Ramachandran plot	
Favored (%)	93.0
Allowed (%)	6.8
Disallowed (%)	0.2

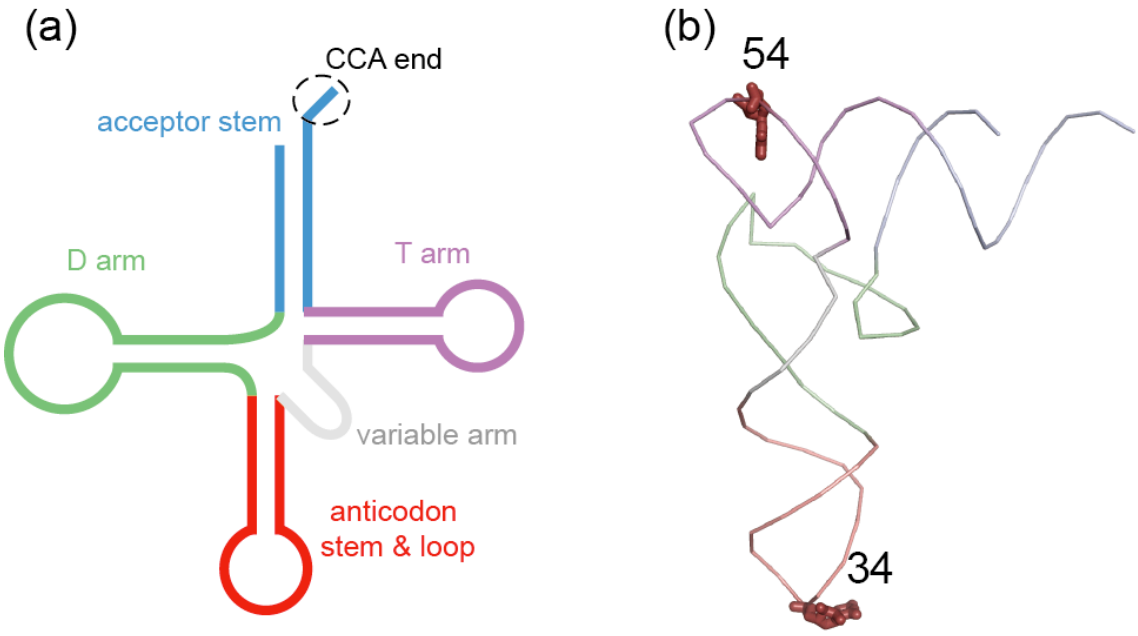
*The statistics in the highest-resolution shell are given in parentheses.

†$R_{sym} = \Sigma|I - \langle I \rangle|/\Sigma I$, where I is the observed intensity of reflections.

§$R_{work,\ free} = \Sigma|F_{obs} - F_{calc}|/\Sigma F_{obs}$. Free reflections consist of 5% of the total number of reflections.

(表 5-1) TilS において tRNA 認識に関与していた残基の Ncs6, TtuA との比較

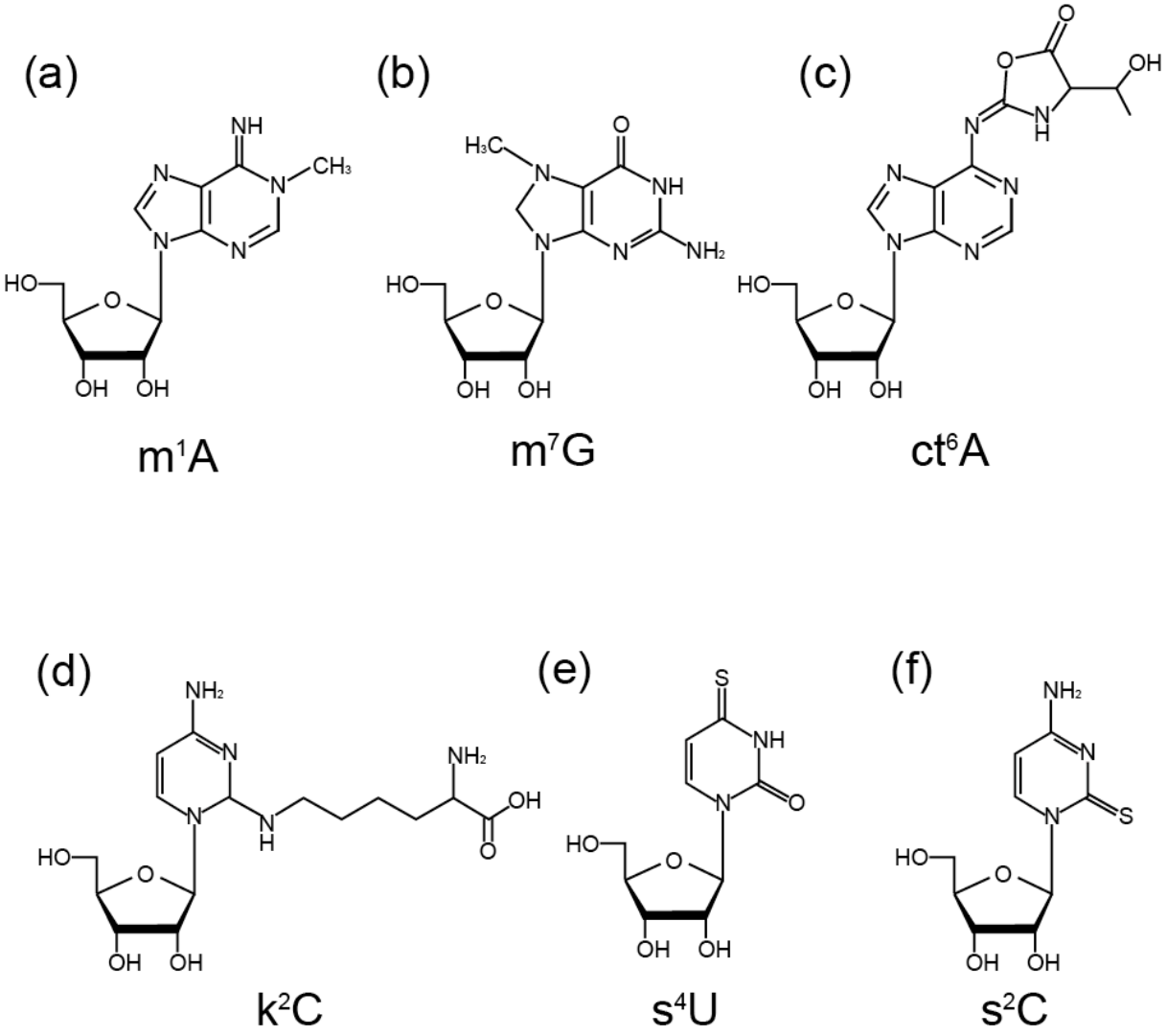
G. kaustophilus TilS	*P. horikoshii* Ncs6	*S.pombe* Ncs6	*P. horikoshii* TtuA
Arg142	Arg181	Arg184	His170
Arg199	Arg240	Arg243	Thr228
Glu134	Gln173	Glu176	Ser161



(図 1-1)　tRNA の構造

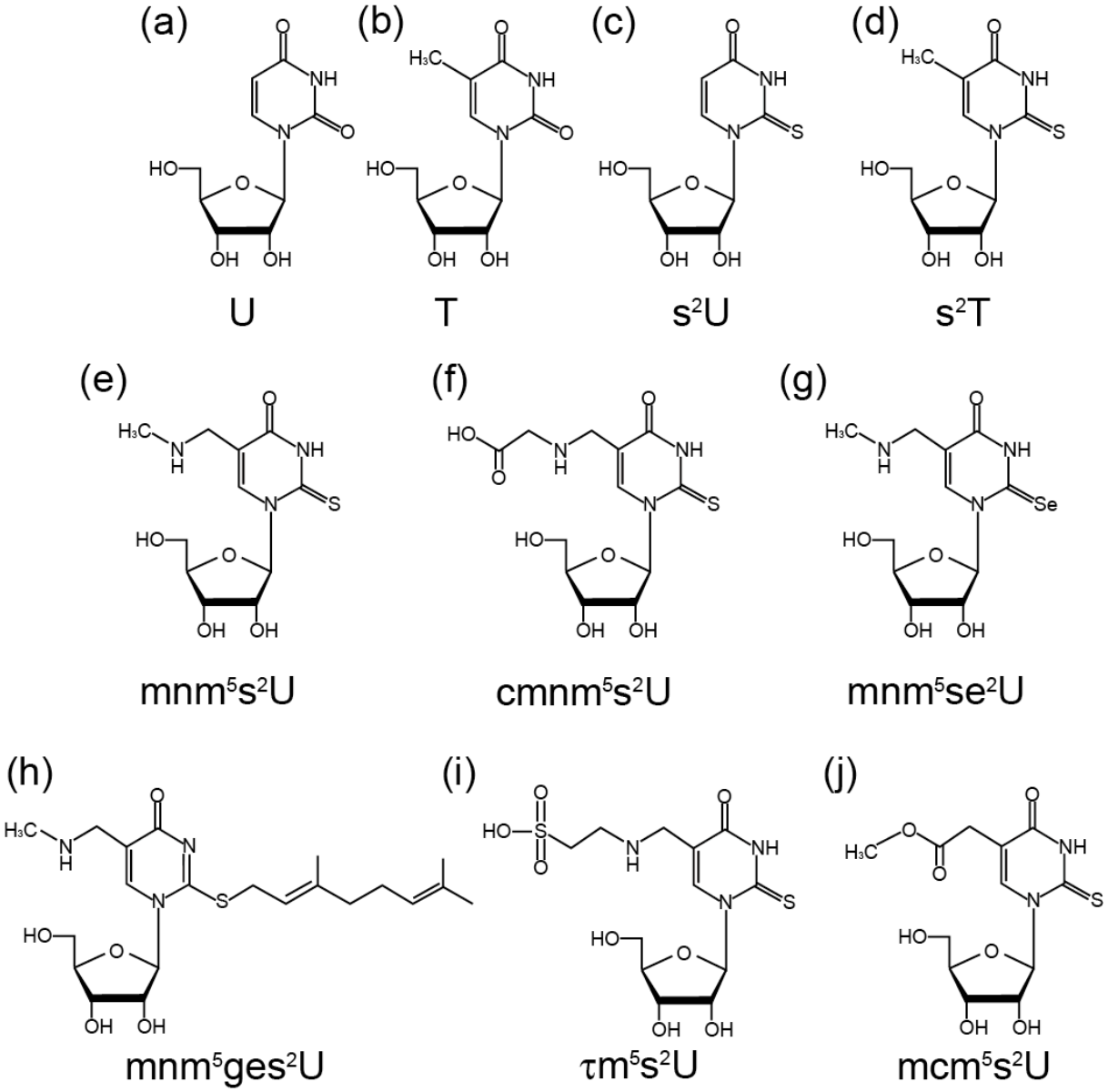
(a) tRNA の 2 次構造(クローバーリーフモデル). アクセプターステムを青, D アームを緑, アンチコドンステムループを赤, 可変アームを灰色, T アームを紫で示した.

(b) tRNA の 3 次構造(L 字型構造). 全体をリボンモデルで, 34 位および 54 位硫黄修飾の位置をスティックモデルで表示した. 色分けは(a)と同様に作成した.



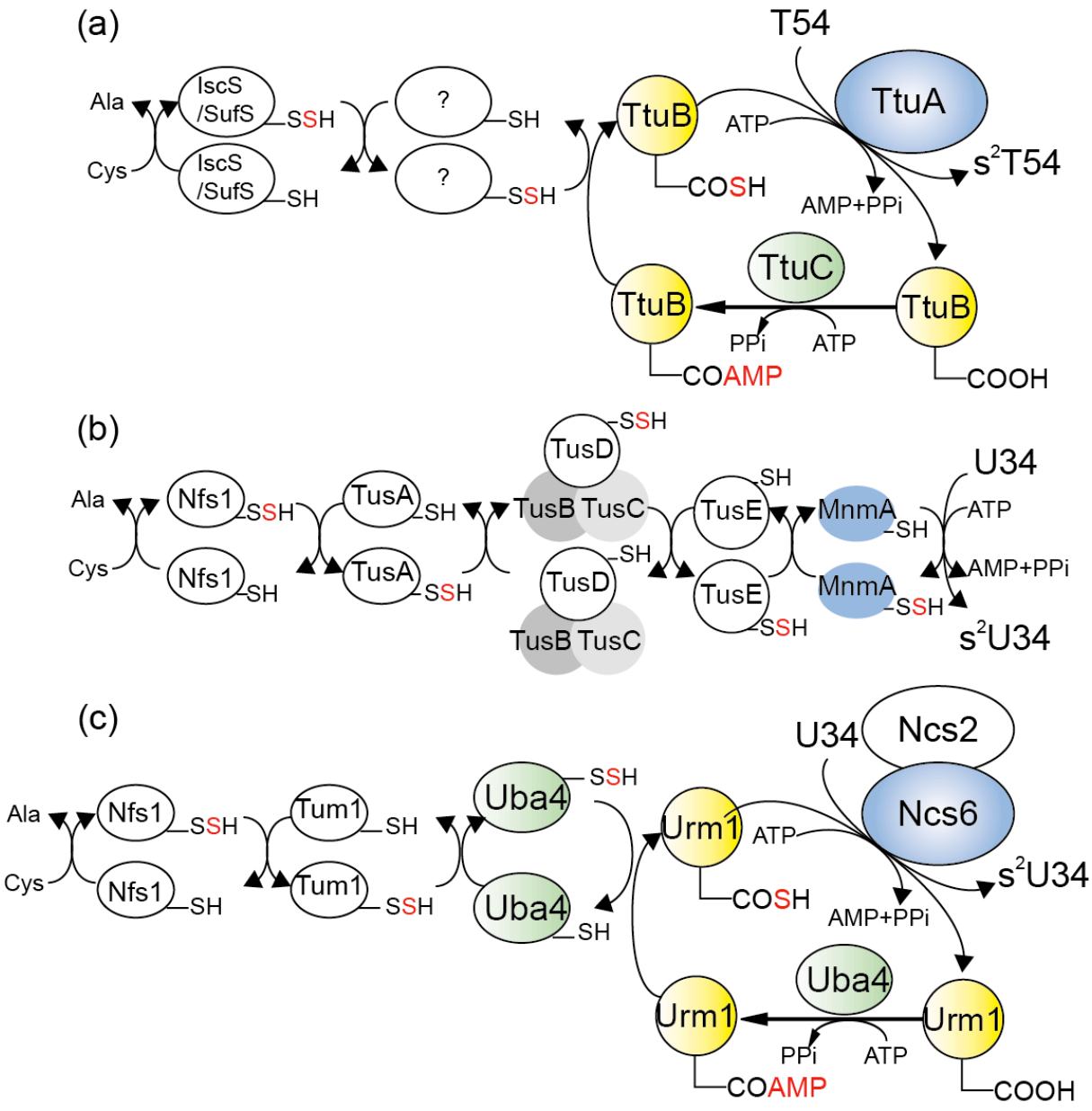
(図 1-2)　tRNA 上に見られる化学修飾の例

(a) 1 メチルアデノシン (b) 7 メチルグアノシン (c) サイクリック N6-スレオニルカルバモイルアデノシン (d) リシジン (e) 4 チオウリジン (f) 2 チオシチジン の化学構造



(図 1-3)　ウリジンとウリジン誘導体 2 位の硫黄修飾塩基の化学構造

(a) ウリジン (b) リボチミジン(5 メチルウリジン) (c) 2 チオウリジン (d) 2 チオリボチミジン (e) 5 メチルアミノメチル 2 チオウリジン (f) 5 カルボキシメチルアミノメチル 2 チオウリジン (g) 5 メチルアミノメチル 2 セレノウリジン(h) 5 メチルアミノメチル 2 ゲラニルチオウリジン(i) 5 タウリルメチル 2 チオウリジン(j) 5 メチルカルボキシメチル 2 チオウリジンの化学構造

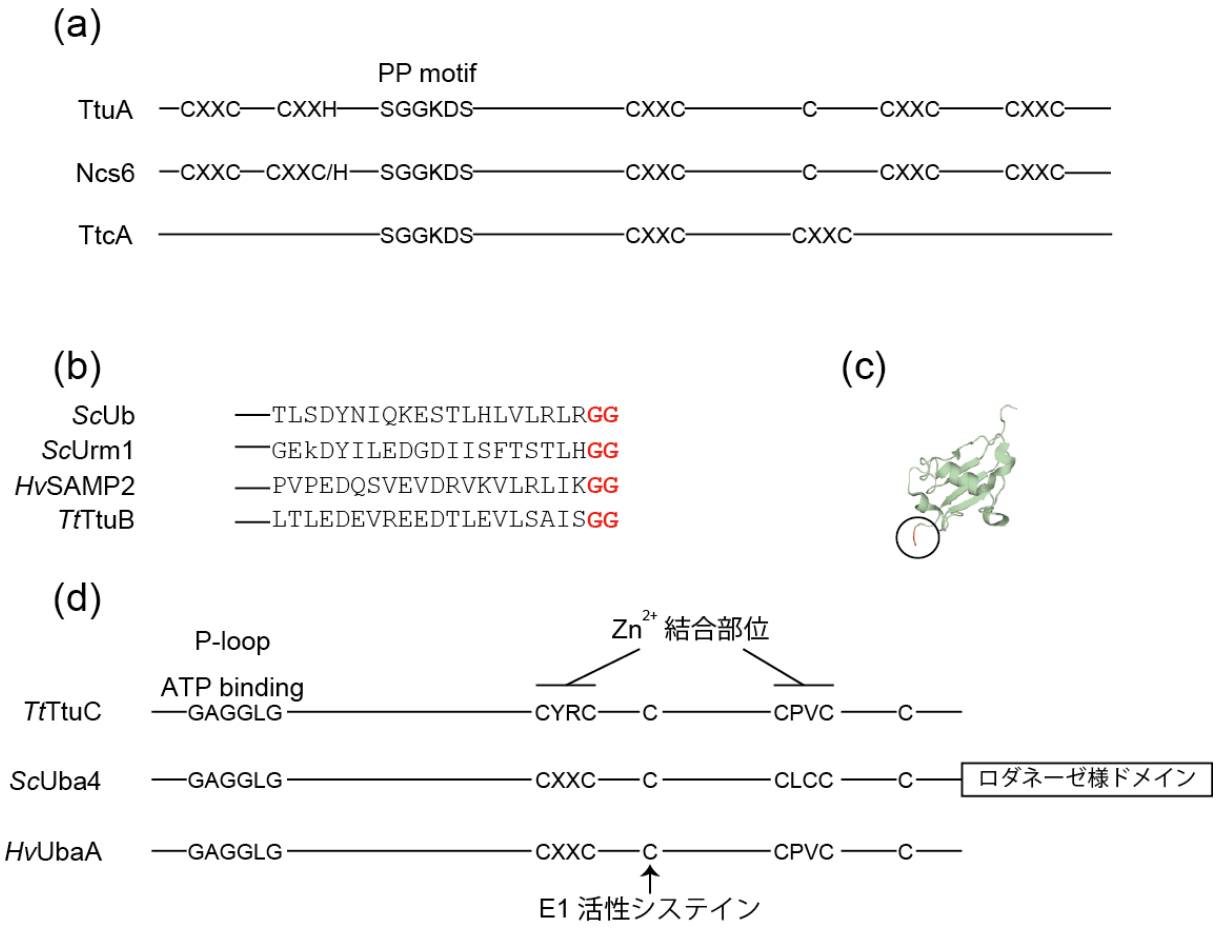


(図 1-4)　tRNA ウリジン 2 位硫黄修飾系

(a) *Thermus thermophilus* で見られる s^2T54 修飾に関わる酵素.

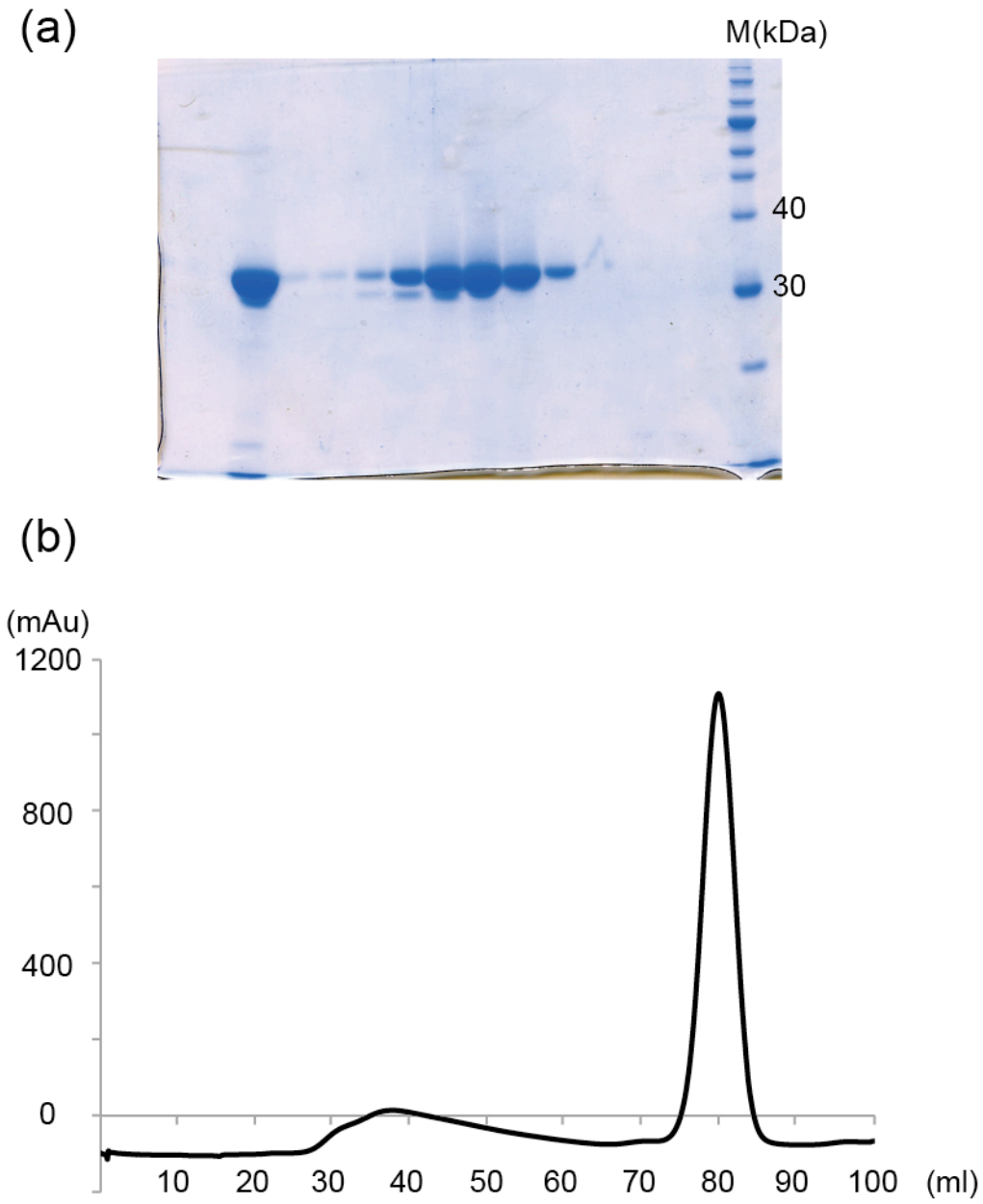
(b) 真正細菌大腸菌における s^2U34 修飾に関わる酵素

(c) 真核生物細胞質における s^2U34 修飾に関わる酵素



(図 1-5)　tRNA 硫黄修飾に関わる酵素群の比較

(a) tRNA 修飾酵素 TtuA, Ncs6, TtcA の配列比較, (b) ユビキチン Ub, 硫黄運搬因子 Urm1(真核生物), SAMP2(古細菌), TtuB(好熱菌 54 位)の C 末配列比較. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae, Hv*: *Halofelax volcanii*, *Tt*: *Thermus thermophilus*. (c) *S. cerevisiae* Urm1 の構造(PDB ID: 2AX5) (d) 硫黄運搬因子活性化酵素 TtuC, Uba4, UbaA の比較.

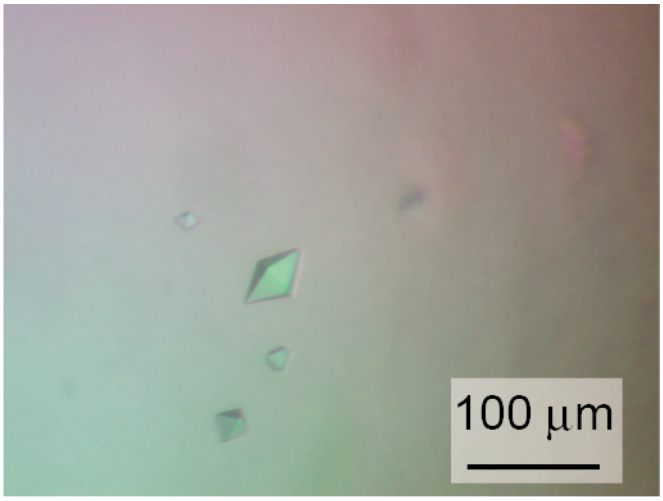


(図 2-1)　*Pyrococcus horikoshii* TtuA の精製

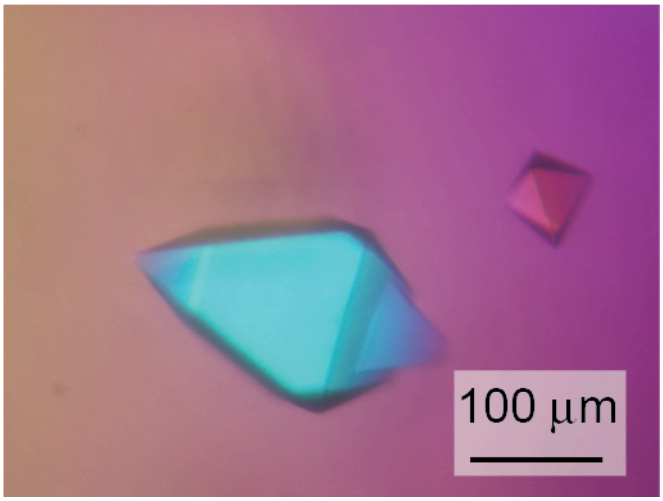
(a) ゲルろ過後の 12% SDS-PAGE の結果を表す．染色は simply blue(Invitrogen)を用いて行った. M はマーカーを表す.

(b) ゲルろ過カラム Hiload 16/60 superdex 200 の結果. 280 nm での吸光の結果を示す.

(a)

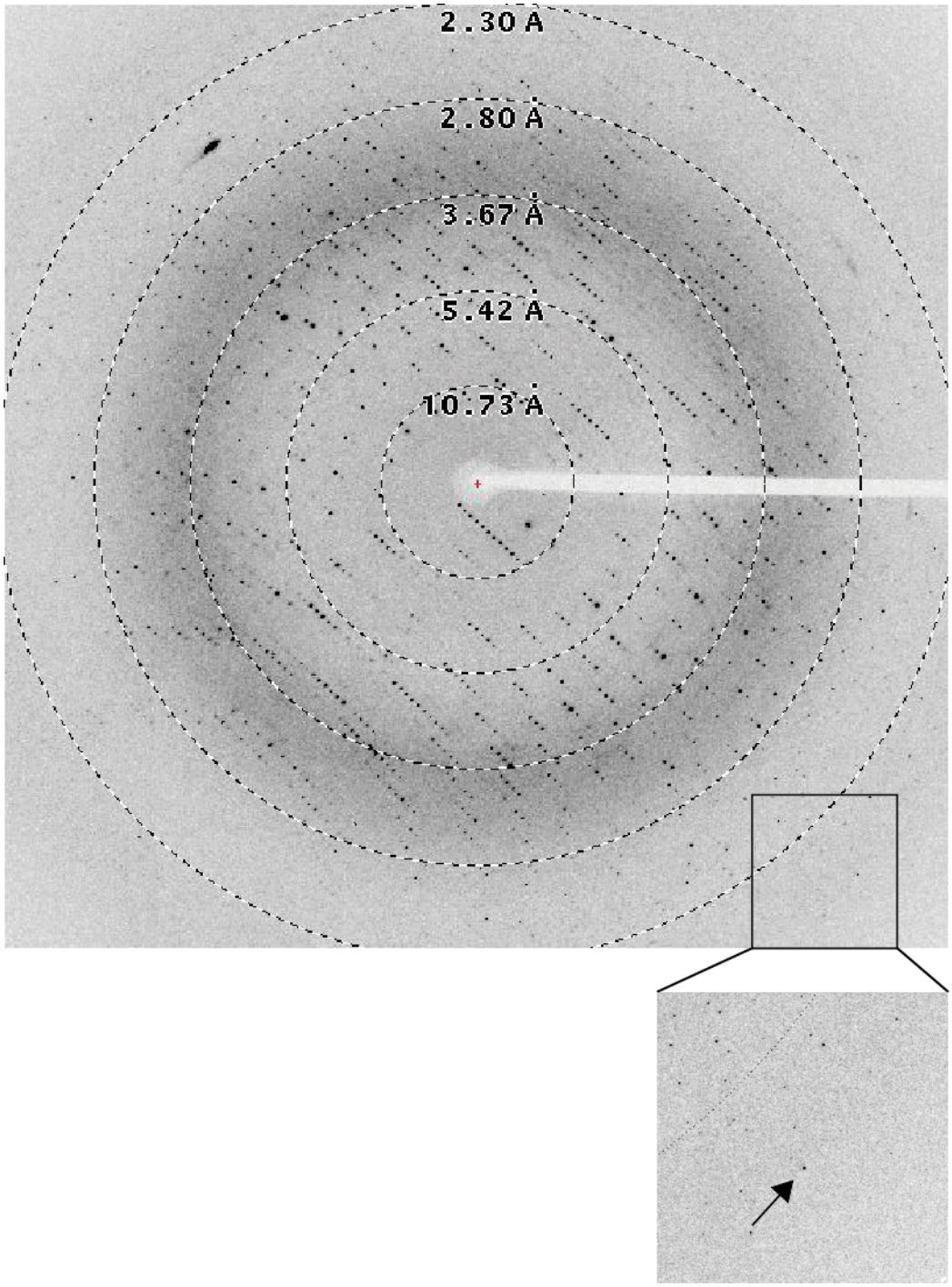


(b)



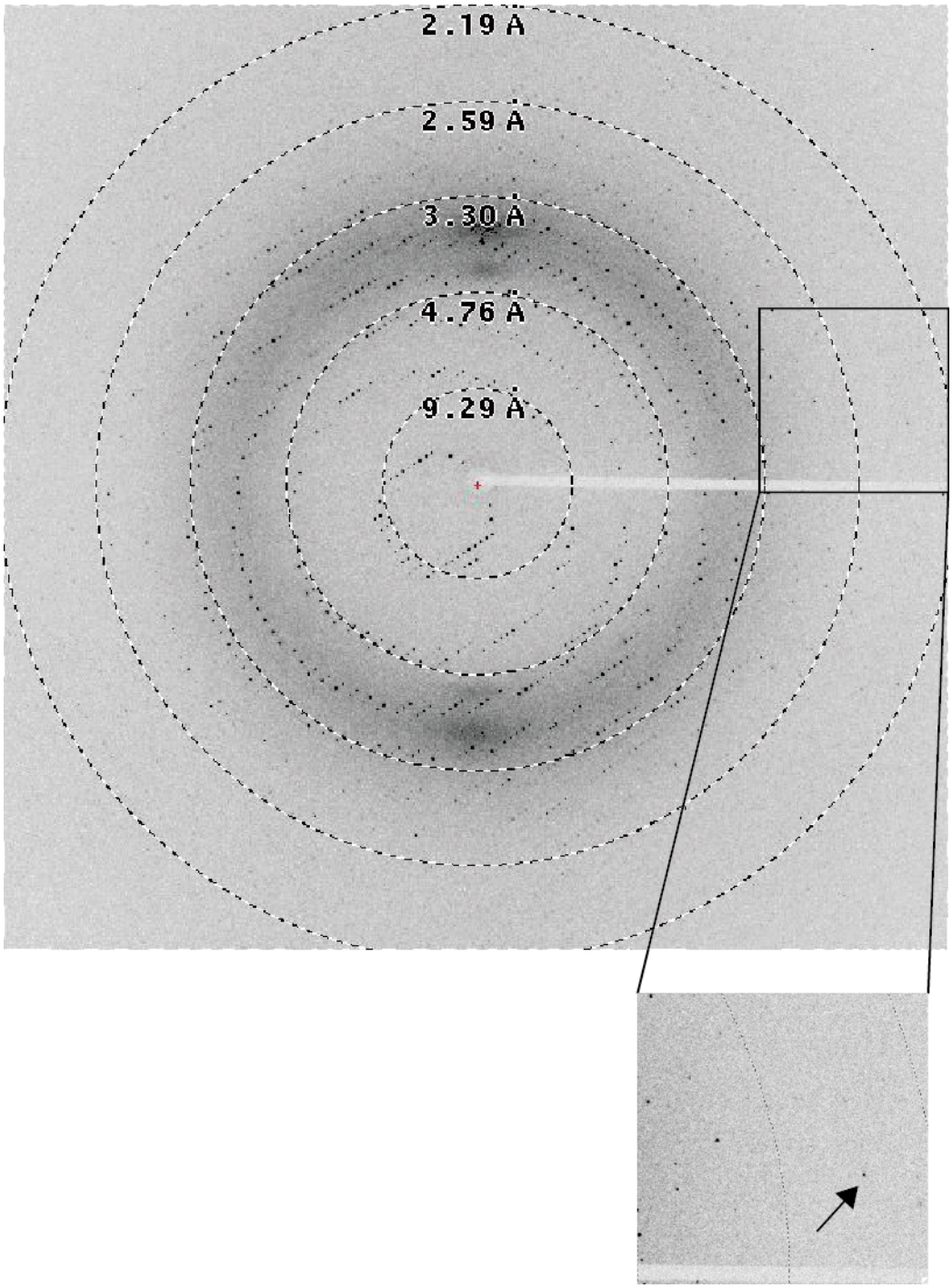
(図 2-2)　*P. horikoshii* TtuA の結晶写真

(a) 結晶化スクリーニングによって得られた結晶 (b)最終的に得られた結晶



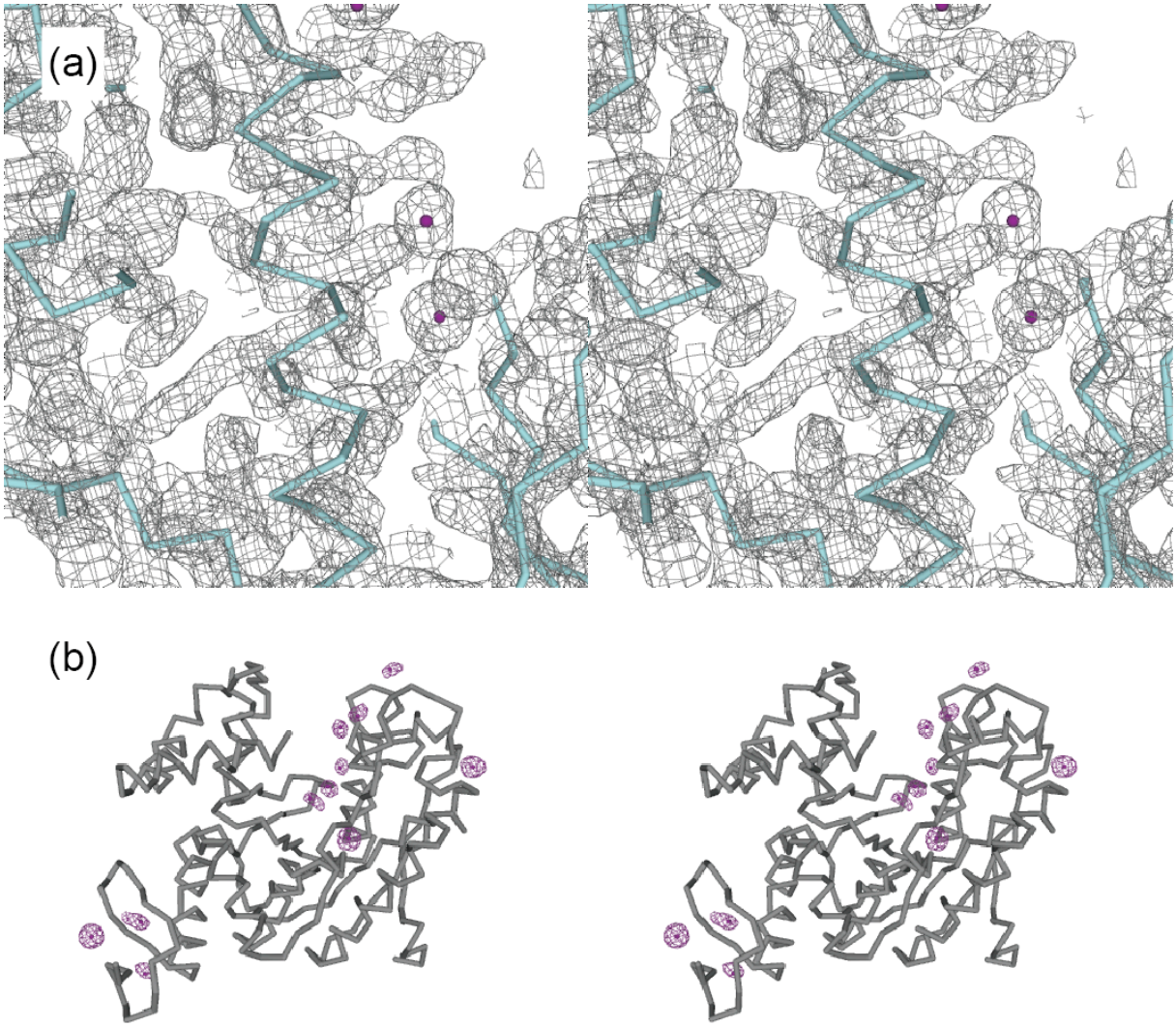
(図 2-3)　*P. horikoshii* TtuA の X 線回折像

SPring-8 BL32XU で測定した. 検出器は MR225HE を利用した.



(図 2-4)　*P. horikoshii* TtuA ヨウ素ソーク結晶の X 線回折像

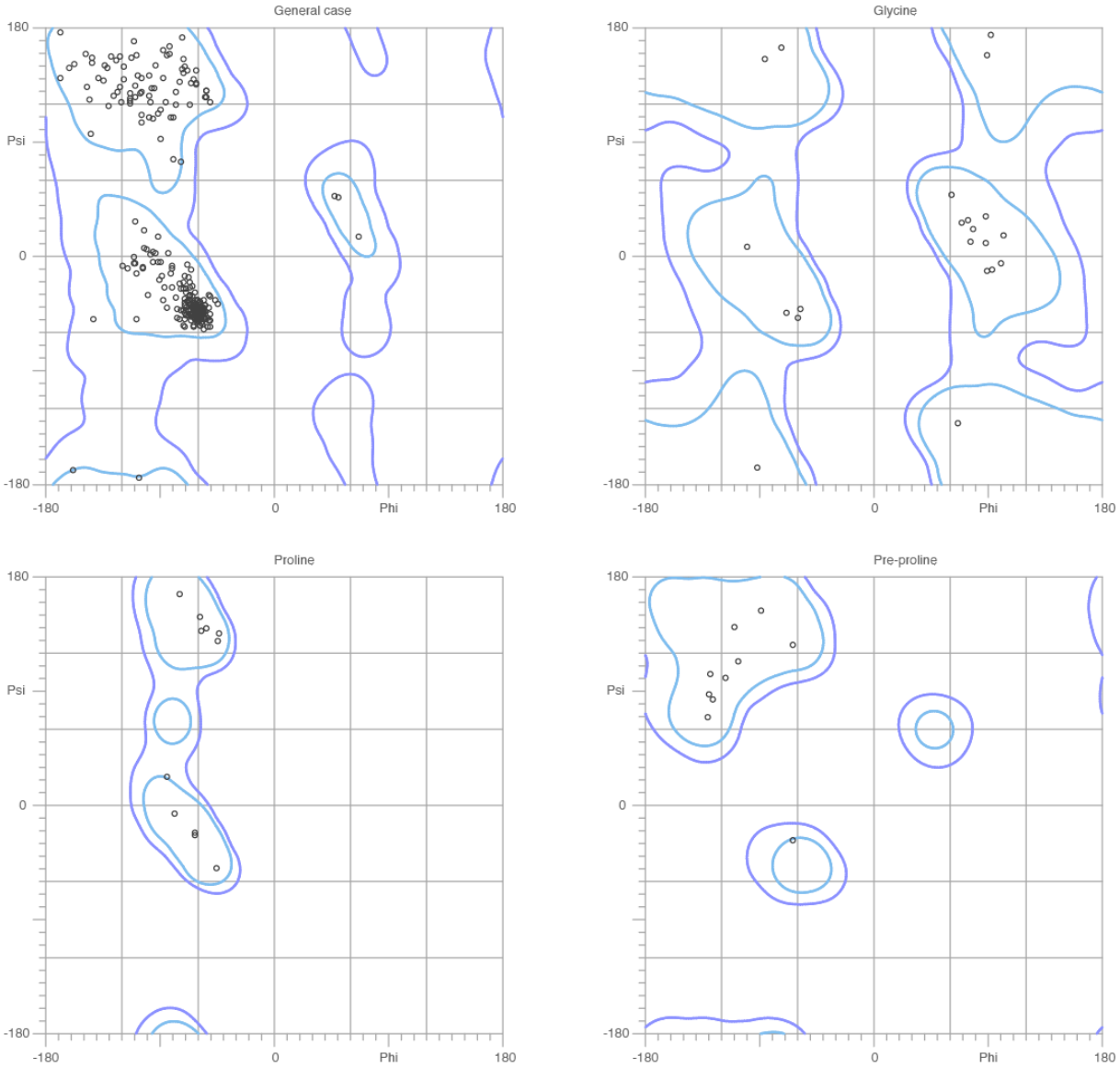
SPring-8 BL32XU で測定した. 検出器は MR225HE を利用した.



(図 2-5)　TtuA の初期位相に基づく電子密度と異常散乱電子密度(立体視)

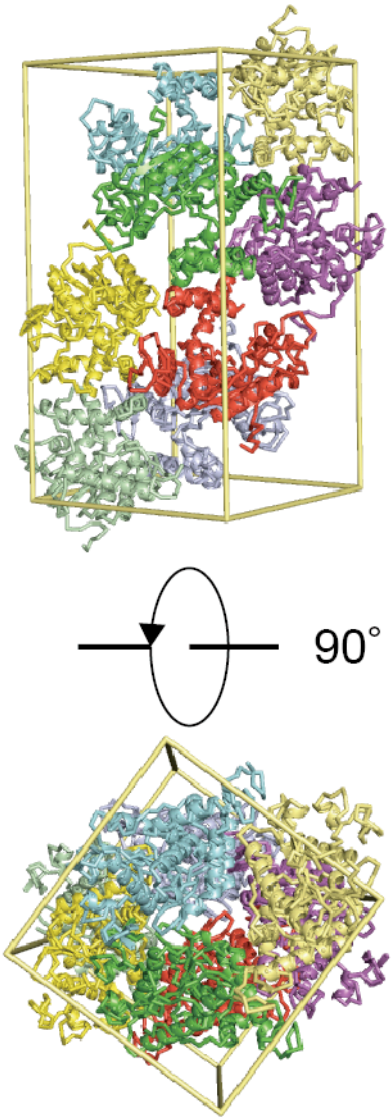
(a) SAD 法により計算し，密度修正を行った後の電子密度図(カットオフ 1.1 σ). タンパク部分をリボンモデルで，ヨウ素イオンは紫の球状モデルで表示した.

(b) 精密化を進めた後のヨウ素の異常散乱電子密度(3.0 σ). 電子密度を紫で表示した.



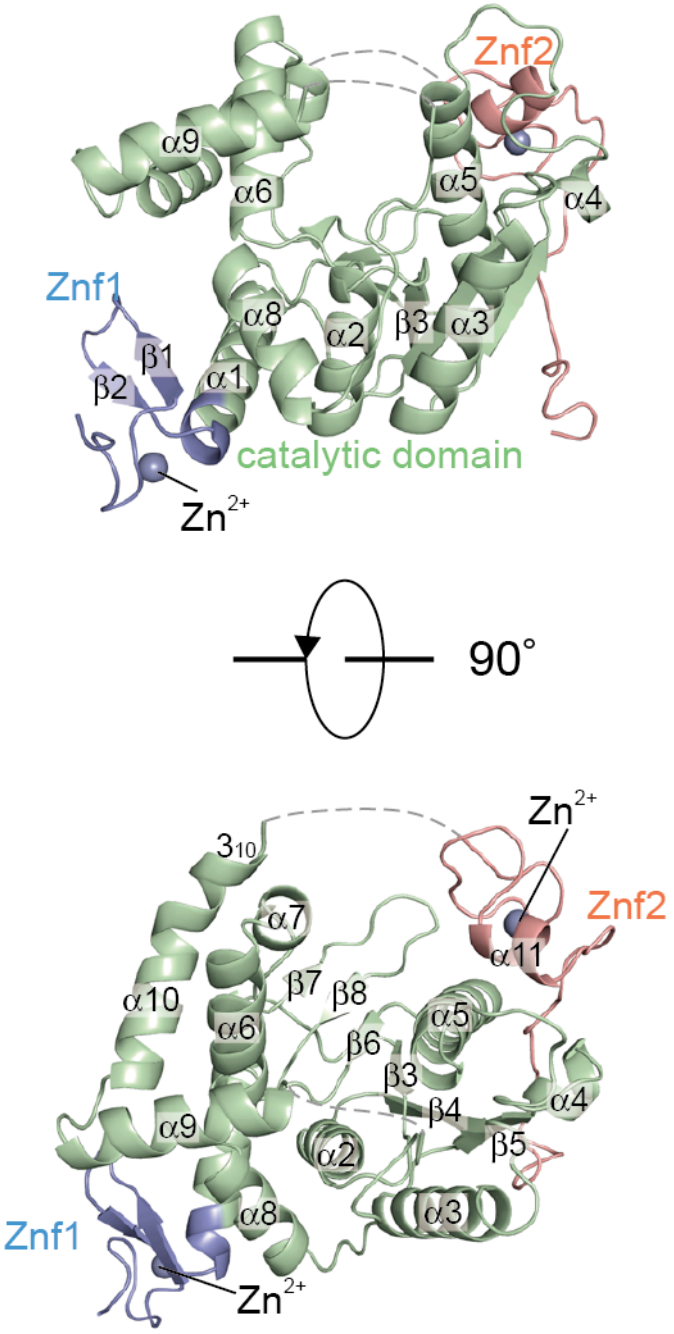
(図 2-6) *P. horikoshii* TtuA の Ramachandran プロット

Molprobity を用いて作成した.



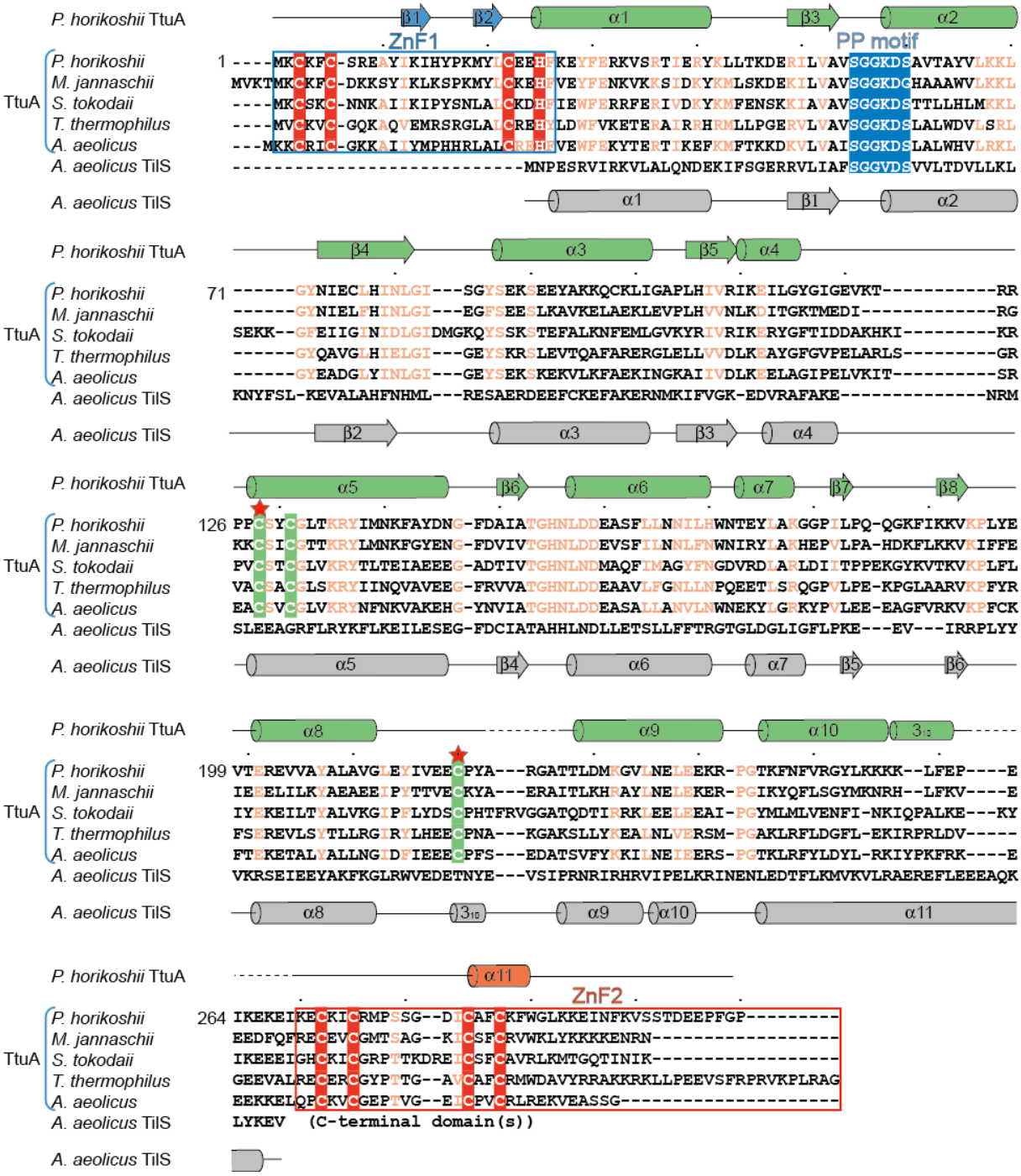
(図 2-7) 単位格子中のパッキングの様子

Z 軸に垂直な方向と，水平な方向から見た図を示した．結晶学的対称操作により示した，赤色と緑色の分子が生物学的な二量体を形成している．



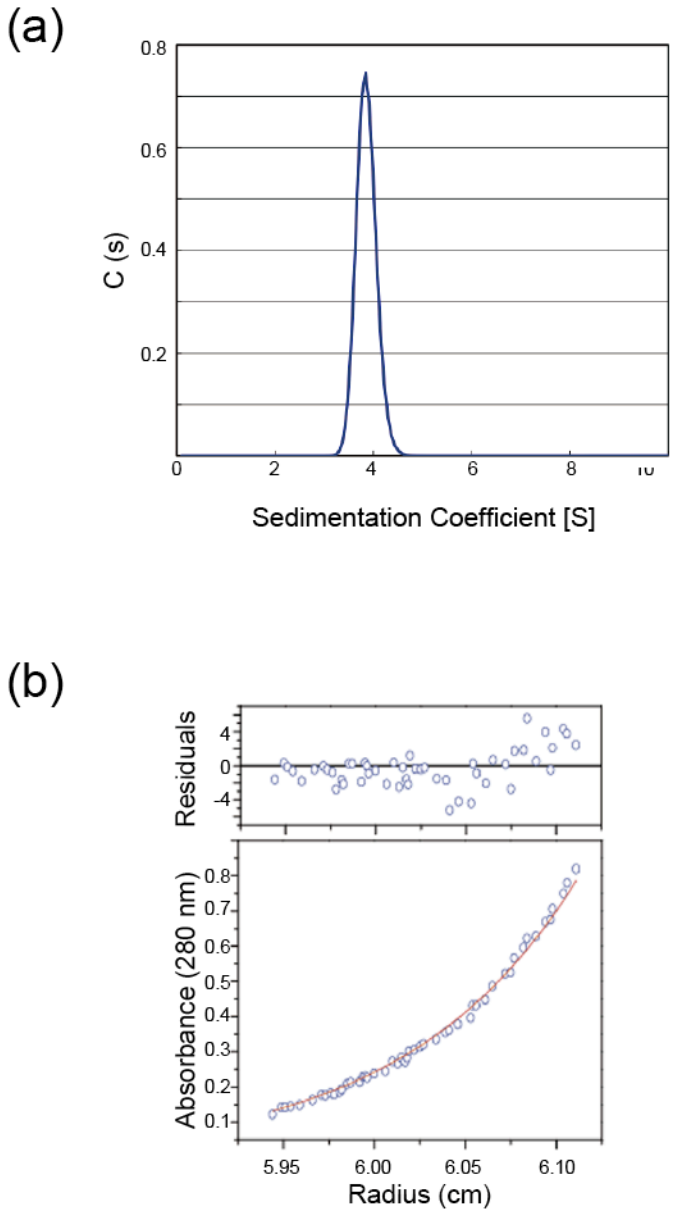
(図 2-8) *P. horikoshii* TtuA サブユニット構造

P. horikoshii TtuA のリボンモデル. Znf1 を青, 触媒ドメインを薄い緑, Znf2 をうすい赤で表示した. 原子モデルをおいていない領域は点線で表示した.



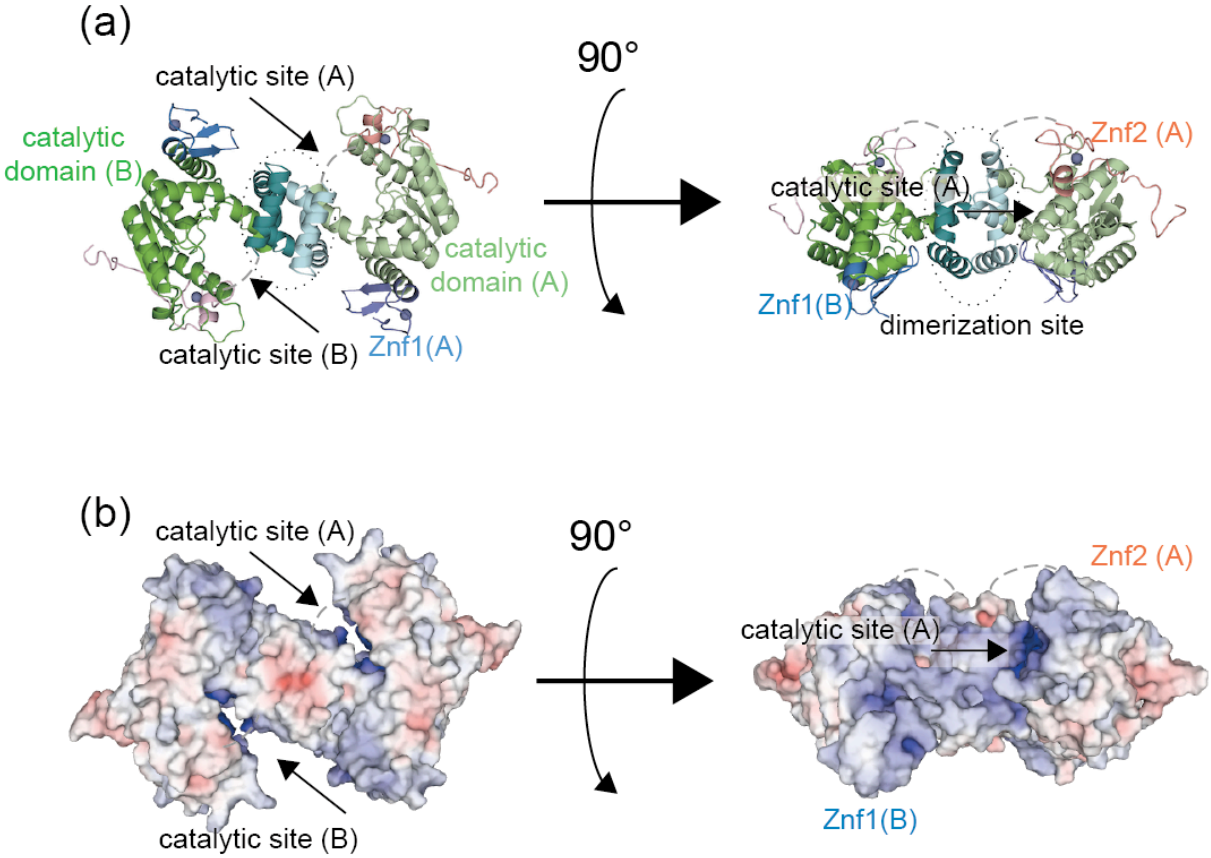
(図 2-9) *P. horikoshii* TtuA 構造に基づく配列アラインメント

P. horikoshii TtuA のアミノ酸配列を *Methanocaldococcus jannnaschii*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermus thermophilus*, *Aquifex aeolicus* の TtuA, *A. aeolicus* TilS 配列と比較した. *P. horikoshii* TtuA と *A. aeolicus* TilS の 2 次構造をアラインメントの上下にそれぞれ示した. TtuA の Znf1, 触媒ドメイン, Znf2 をそれぞれ青, 緑, 赤で, TilS の 2 次構造を灰色でそれぞれ表示した. 赤枠:亜鉛配位に関与するCXXC/H モチーフ, 緑枠:TtuA の触媒ドメインに存在するシステイン残基, 青枠:PP モチーフを示す. ジスルフィド結合を形成している残基を星で表示した. 強く保存された領域をオレンジ色で表示した



(図 2-10) *P. horikoshii* TtuA の分析超遠心

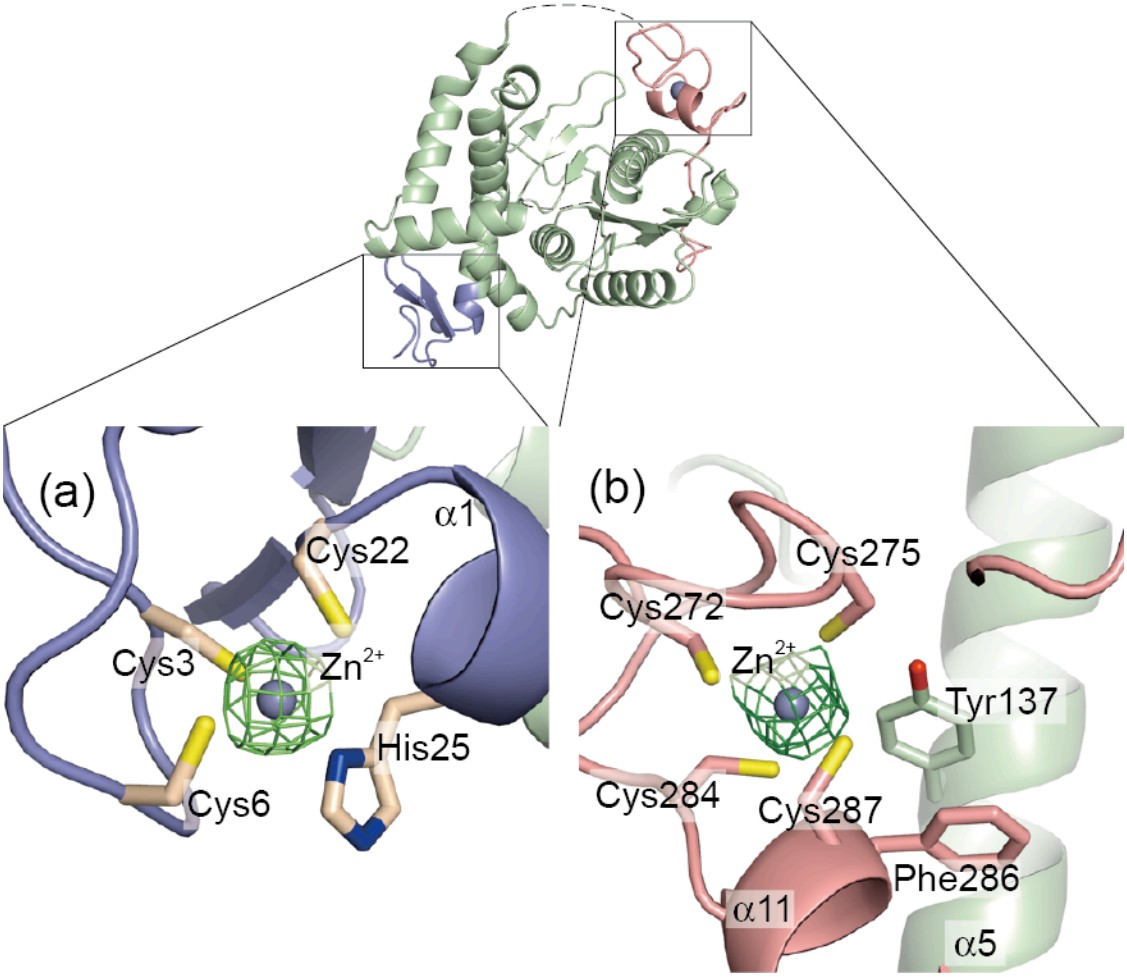
(a) 速度法による測定. (b) 平衡法による測定. 20 °C, 15,000 rpm での結果を表示した.



(図 2-11) *P. horikoshii* TtuA 2 量体構造

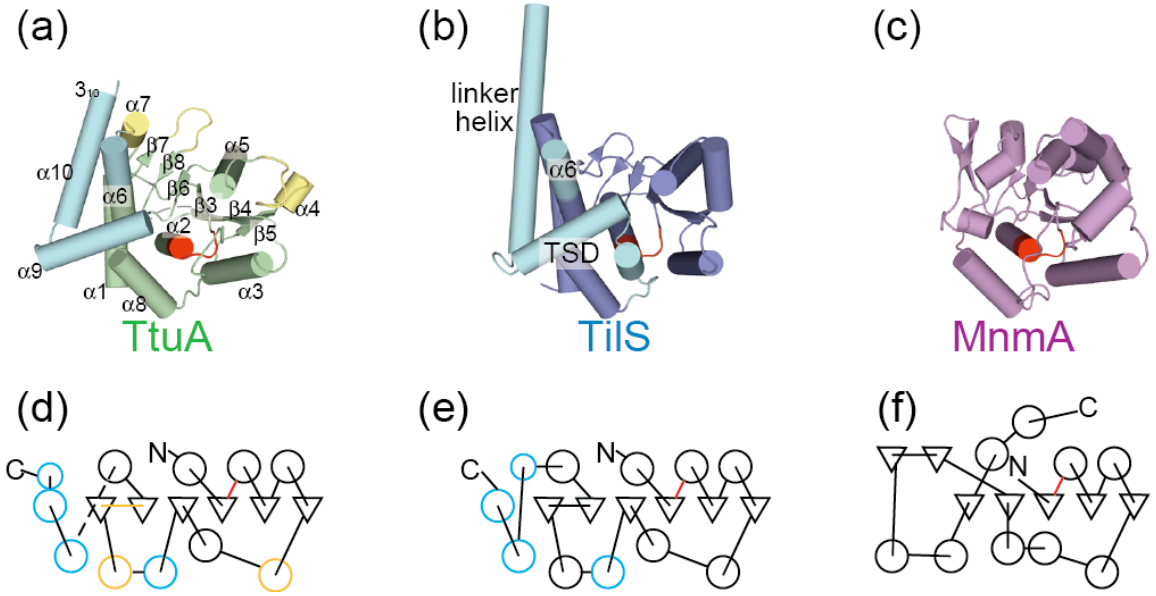
(a) リボンモデルで 2 量体を表示した．サブユニットのうちの一つは(図 2-8)と同様に表示した．もう 1 つのサブユニットの Znf1，触媒ドメイン, Znf2 はそれぞれ濃い青，緑，ピンクで表示した. 2 量体化に関わるサブドメインをそれぞれシアンと濃いシアンで表示した．活性部位は矢印で示した.

(b) 表面電荷モデル. APBS を用いて計算した．赤が-10 kT/e，青が+10 kT/e となるような色で表示した.



(図 2-12) TtuA 上の Zinc フィンガー

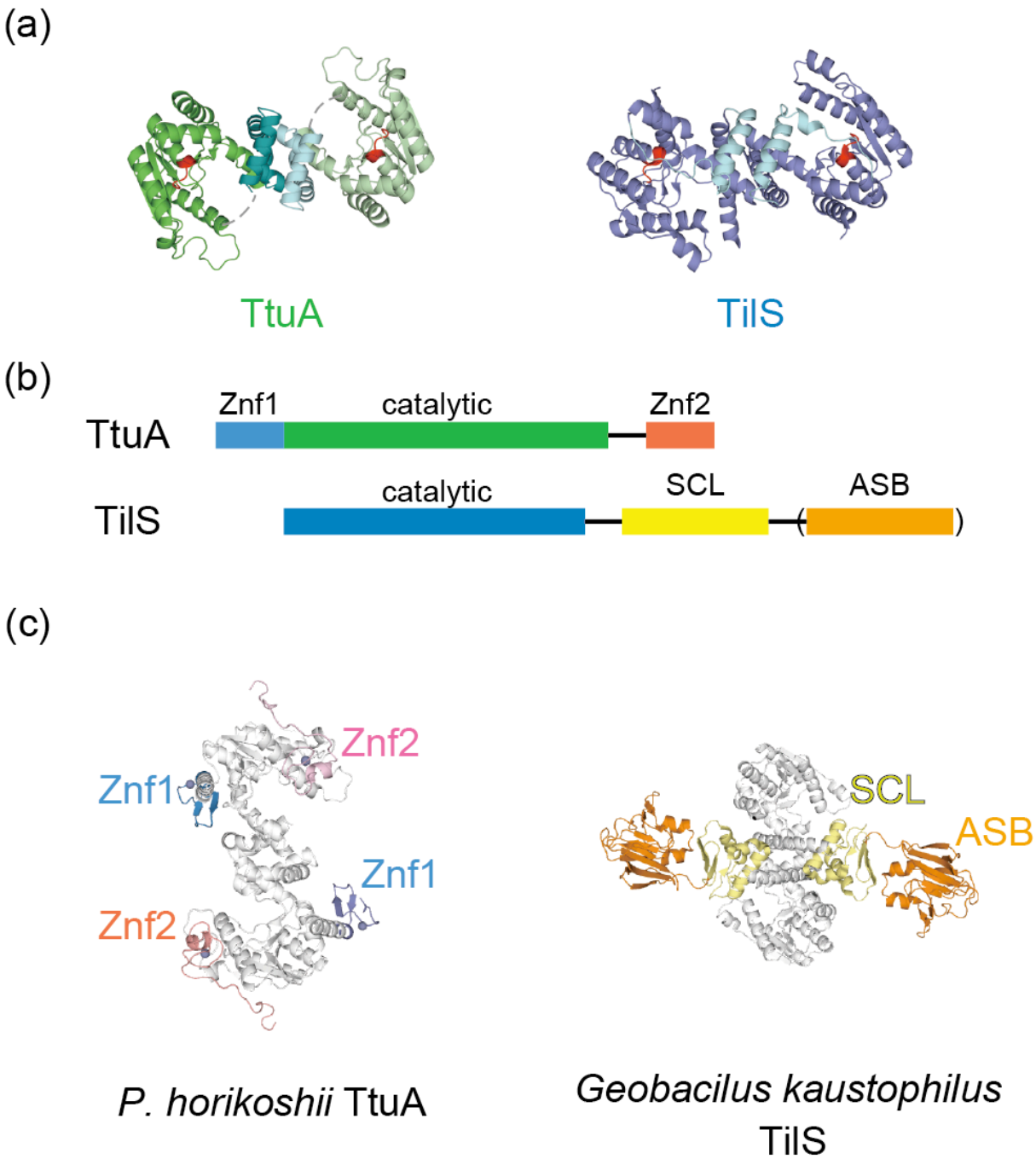
(a) Znf1, (b) Znf2 の拡大図．亜鉛イオンは銀色で示した．亜鉛を配位しているシステインおよびヒスチジン残基，および触媒ドメインと Znf2 の間でスタックしている芳香環の残基をスティックモデルで示した．異常散乱の電子密度を計算し, 5 σで示した.



(図 2-13) *P. horikoshii* TtuA 触媒ドメインの構造比較

(a)*P. horikoshii* TtuA, (b) *A. aeolicus* TilS (PDB ID:2E89), (c) *E. coli* MnmA (PDB ID: 2DET)の触媒ドメインの比較. TtuA, TilS, MnmA は *Coot* プログラムの SSM アルゴリズムを用いて重ねあわせた. *P. horikoshii* TtuA の触媒ドメインは薄い緑で表し, TilS の構造と違う領域は黄色で示した. *A. aeolicus* TilS と *E. coli* MnmA の触媒ドメインはそれぞれ青とマゼンタで表示した. TtuA の 2 量体化サブドメインと TilS の 2 量体化に関与する領域はシアンで示した. PP motif は赤で示した.

(d) TtuA, (e) TilS, (f) MnmA 触媒ドメインのトポロジー図. シアン, 黄色, 赤で示したところは(a-c)の領域と一致する. 三角形で表したものはβ-ストランド, 大きな丸で示したものはα-ヘリックス, 小さな丸で示したものは 3_{10} ヘリックスにそれぞれ対応する.

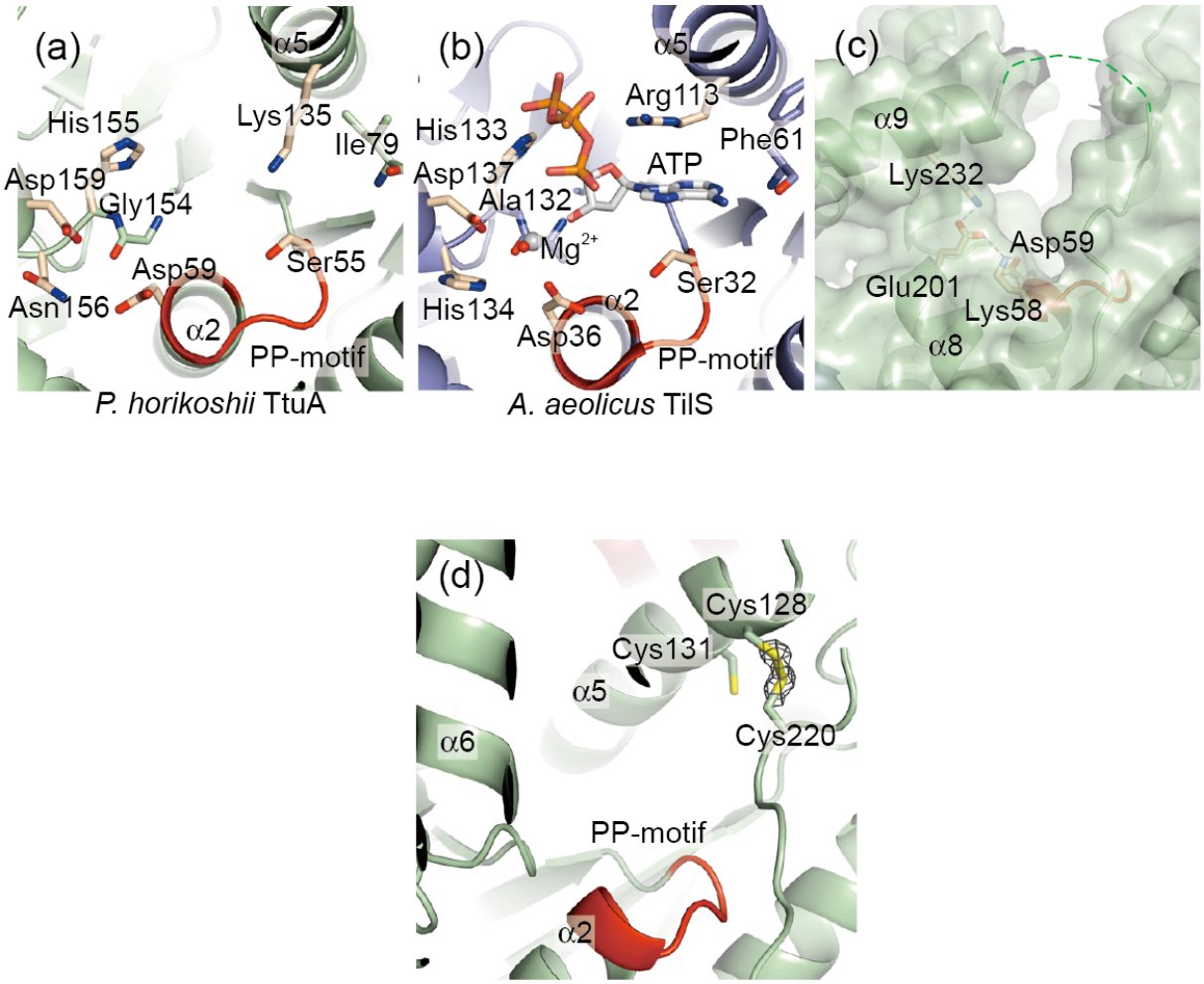


(図 2-14) TtuA と TilS 全体構造の比較

(a) *P. horikoshii* TtuA 触媒ドメインと *A. aeolicus* TilS 触媒ドメインの 2 量体構造の比較

(b) TtuA と TilS のドメイン比較

(c) *P. horikoshii* TtuA と *Geobacilus kaustophilus* TilS (PDB ID: 3A2K)の全体構造の比較. *P. horikoshii* TtuA の Zinc フィンガーは(図 2-11)と同じ色で, TilS の SCL と ASB はそれぞれ黄色とオレンジで示した.



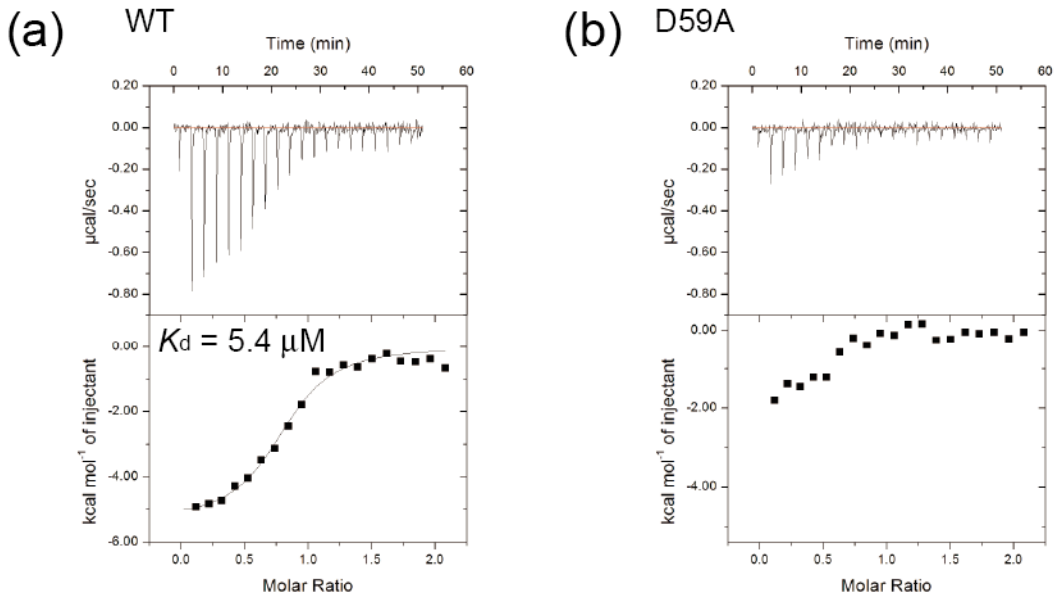
(図 2-15) TtuA 活性部位

(a) *P. horikoshii* TtuA PP モチーフ 周辺部位. ATP の結合, Mg^{2+}の配位に関与すると予想される残基をスティックモデルで示した.

(b) *A. aeolicus* TilS PP モチーフ周辺部位 (PDB ID: 2E89). ATP の認識や Mg^{2+}の配位に関与する残基をスティックモデルで示した.

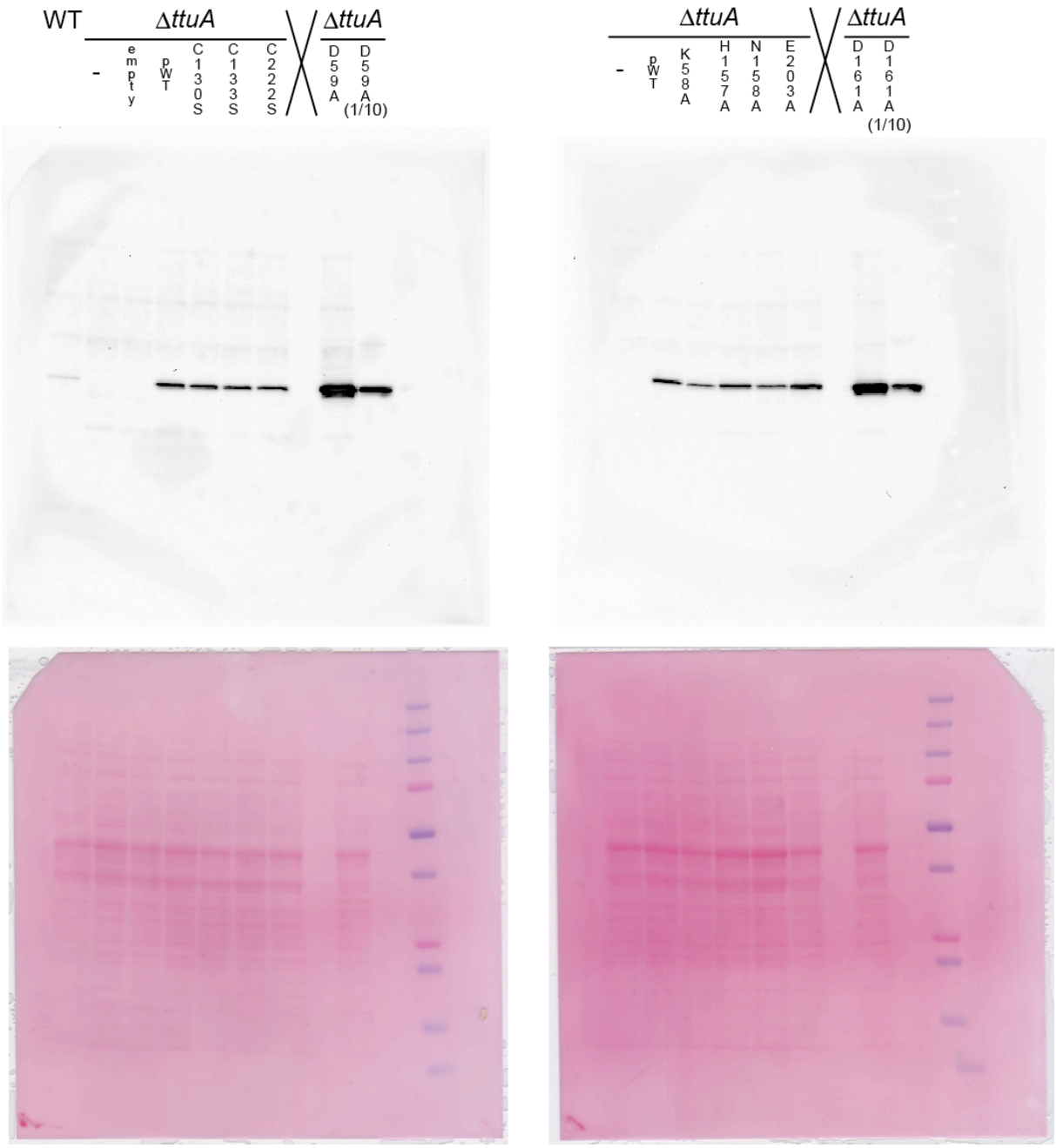
(c) Lys58 周辺の水素結合ネットワーク. 水素結合を形成している残基をスティックモデルで示した.

(d) TtuA 活性部位. 保存されたシステイン残基をスティックモデルで示した. ジスルフィド結合の 2*Fo*-*Fc* マップを 2.5 σで計算し, 灰色で示した.



(図 2-16) iTC 実験

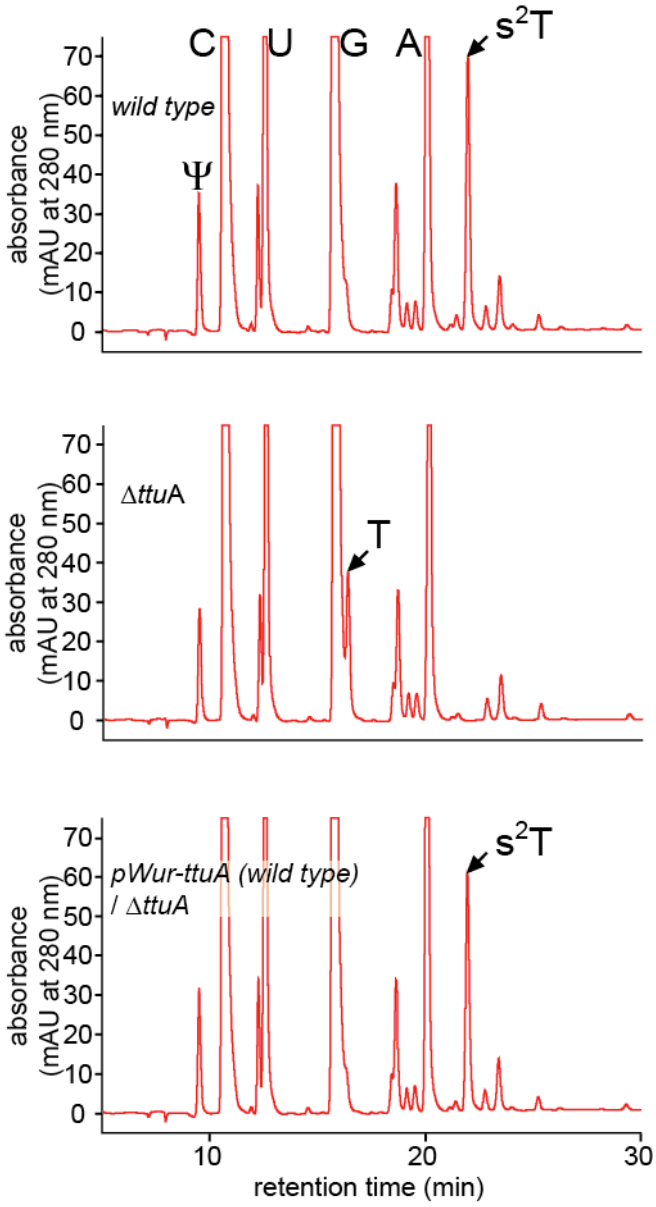
P. horikoshii TtuA と ATP との滴定実験. (a) 野生型の *P. horikoshii* TtuA との結果, (b) D59A との相互作用の結果を示す. 上のパネルには生データを, 下のパネルには解析データを示す.



(図 3-1) 形質転換体の TtuA 発現の確認

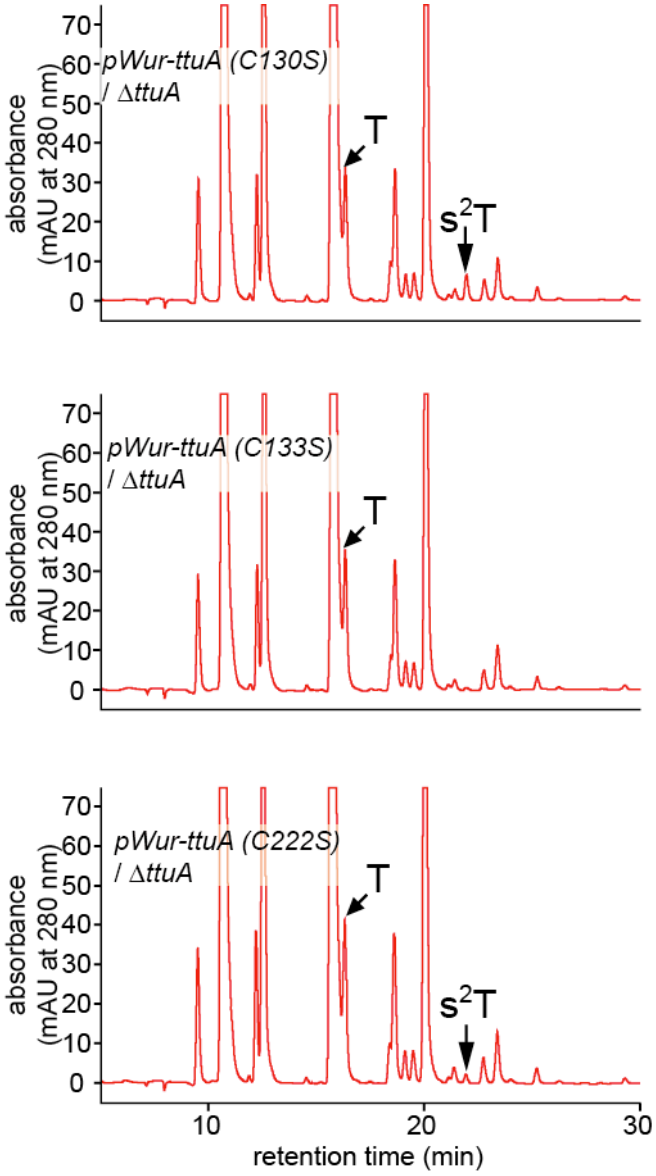
(上) 抗 TtuA 抗体を 1 次抗体を用いたウエスタンブロット

(下) ポンソーS によるタンパク質全体のロード量の確認



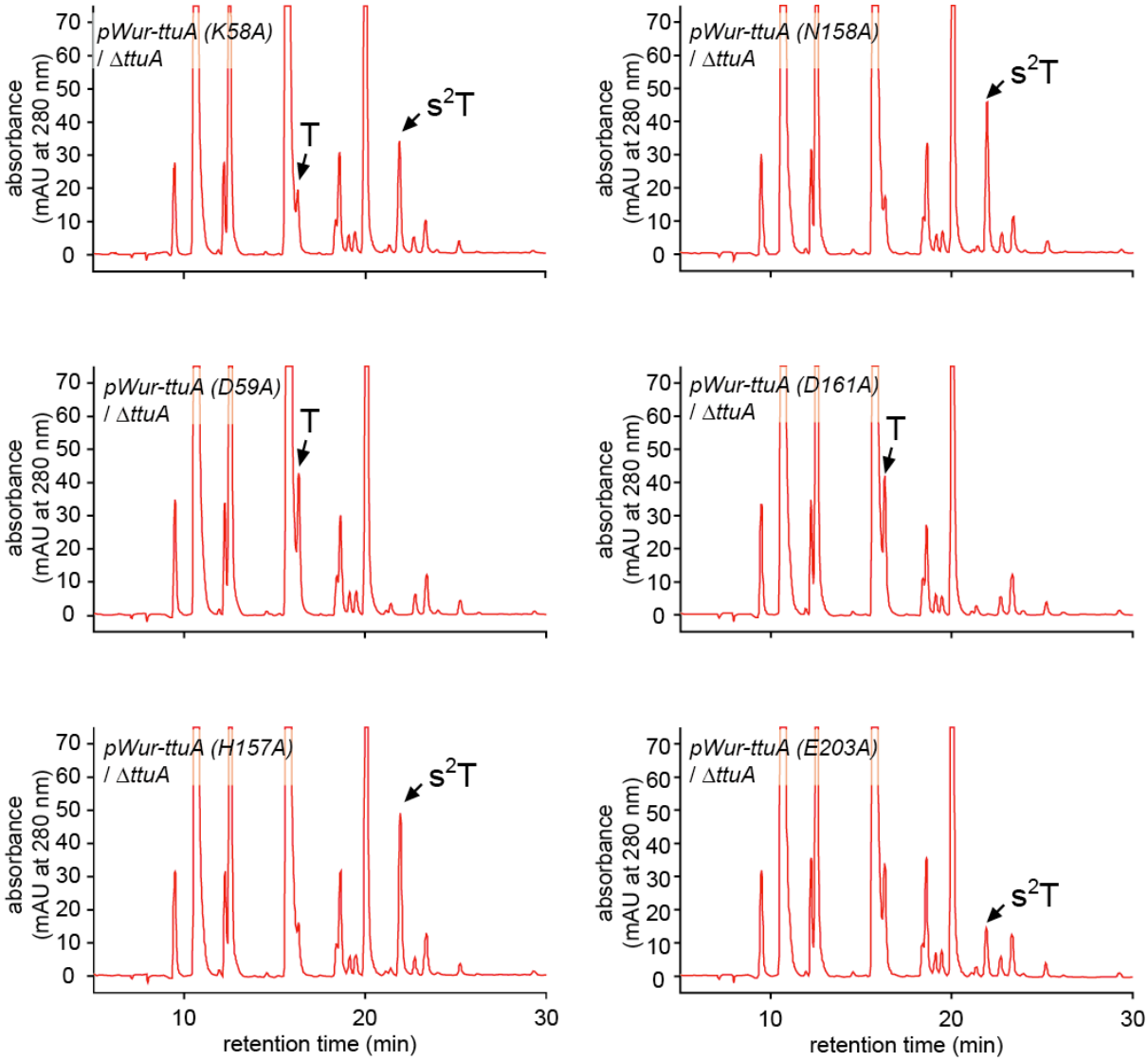
(図 3-2) HPLC による s^2T の形質転換体 TtuA 野生型の解析

(上) WT の HPLC 結果. (中) *ttuA* 欠損株の結果 (下) *ttuA* 欠損株に TtuA 野生型を形質転換した結果



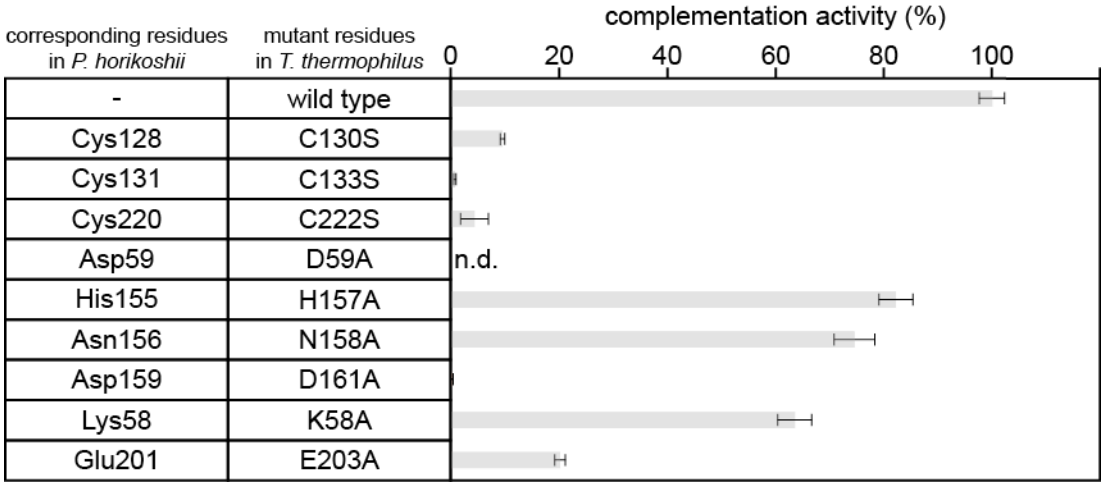
(図 3-3) HPLC による s^2T の形質転換体 TtuA 変異体の解析

C130S, C133S, C222S の結果を示した.



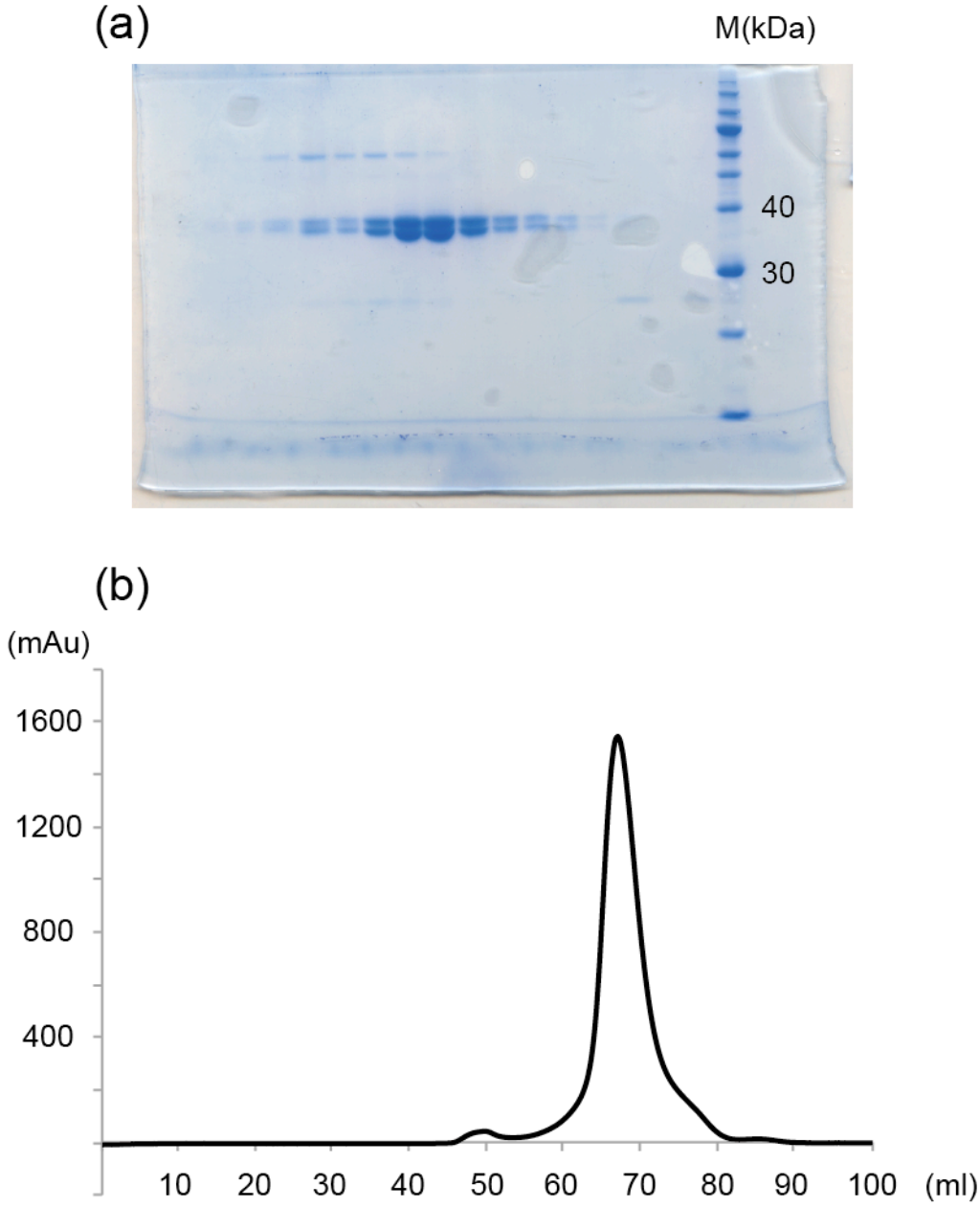
(図 3-3) HPLC による s^2T の形質転換体 TtuA 変異体の解析(続き)

このページでは K58A, D59A, H157A, N158A, D161A, E203A の HPLC の結果を示した.



(図 3-4)TtuA 変異体による s^2T 量変化のまとめ

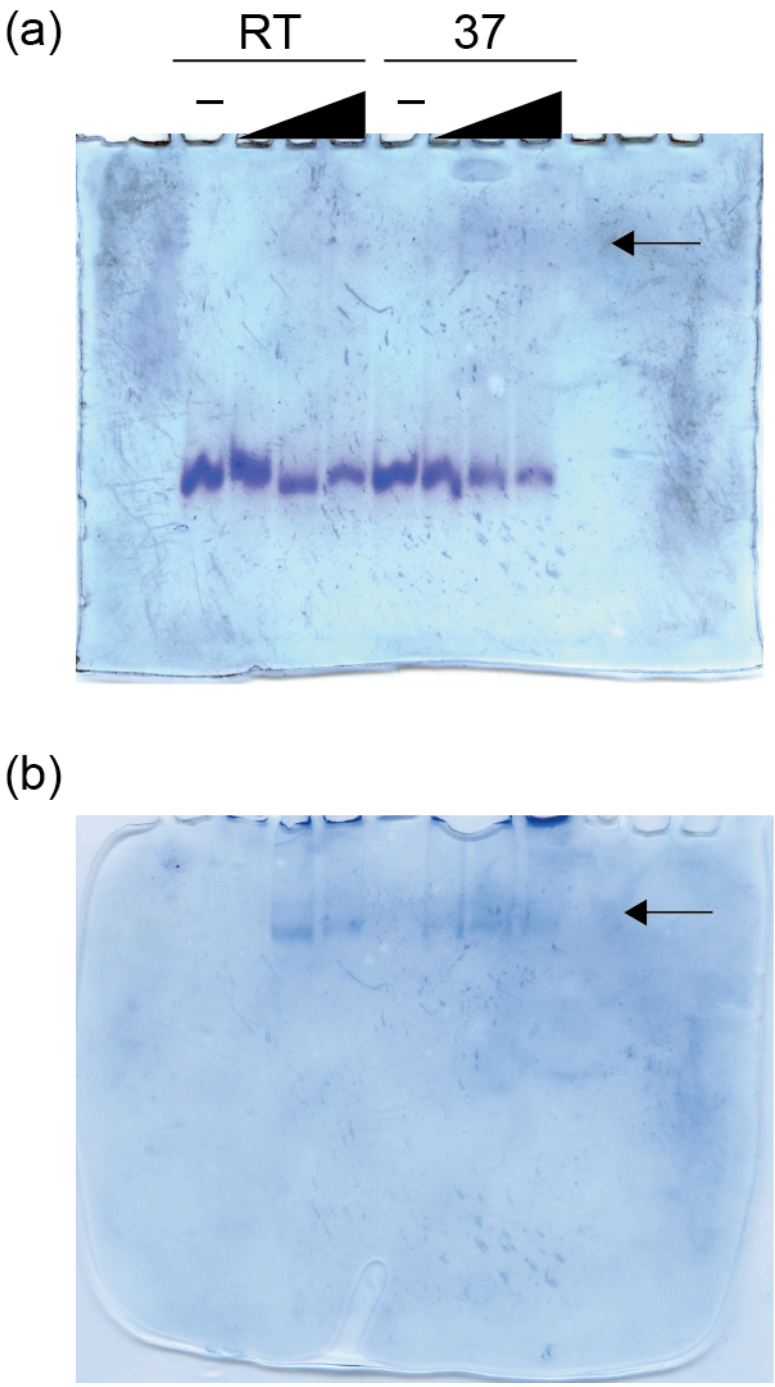
3 回測定した平均値を棒グラフでそれぞれ表す．エラーバーは標準偏差を表す．N.d.: not detected



(図 4-1) *S. pombe* Ncs6•Ncs2 複合体の精製

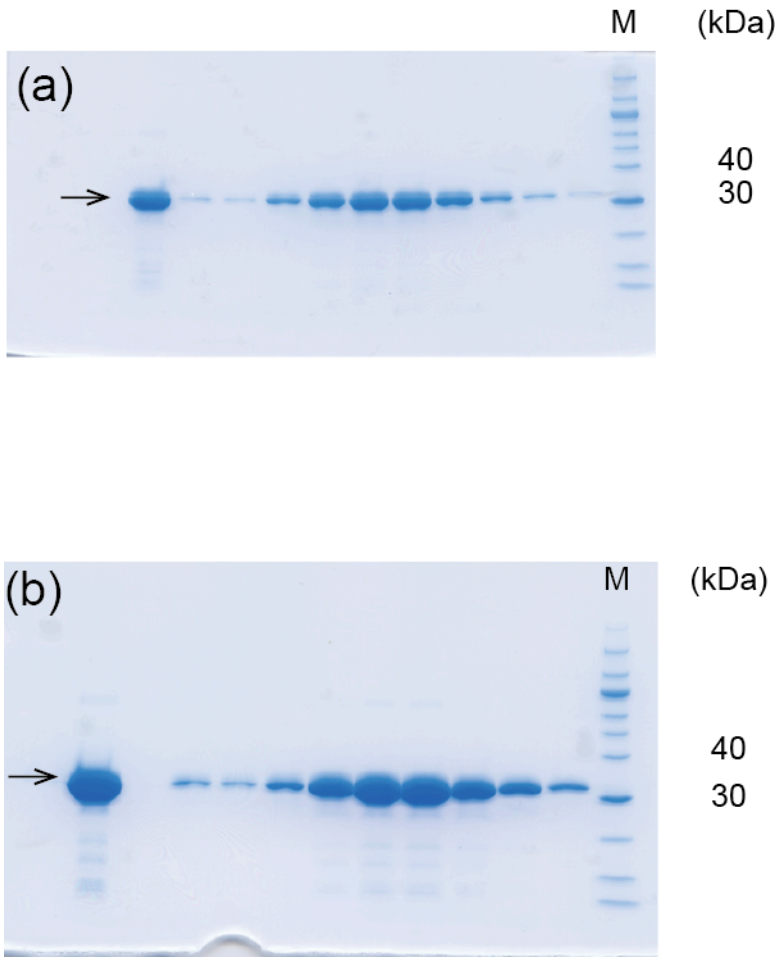
(a) ゲルろ過後の SDS-PAGE の結果を表す. 染色は simpleblue を用いて行った.

(b) ゲルろ過カラム superdex 200 16/60 の結果. 280 nm での吸光を示す.



(図 4-2) *S. pombe* Ncs6•Ncs2 と tRNA とのゲルシフト

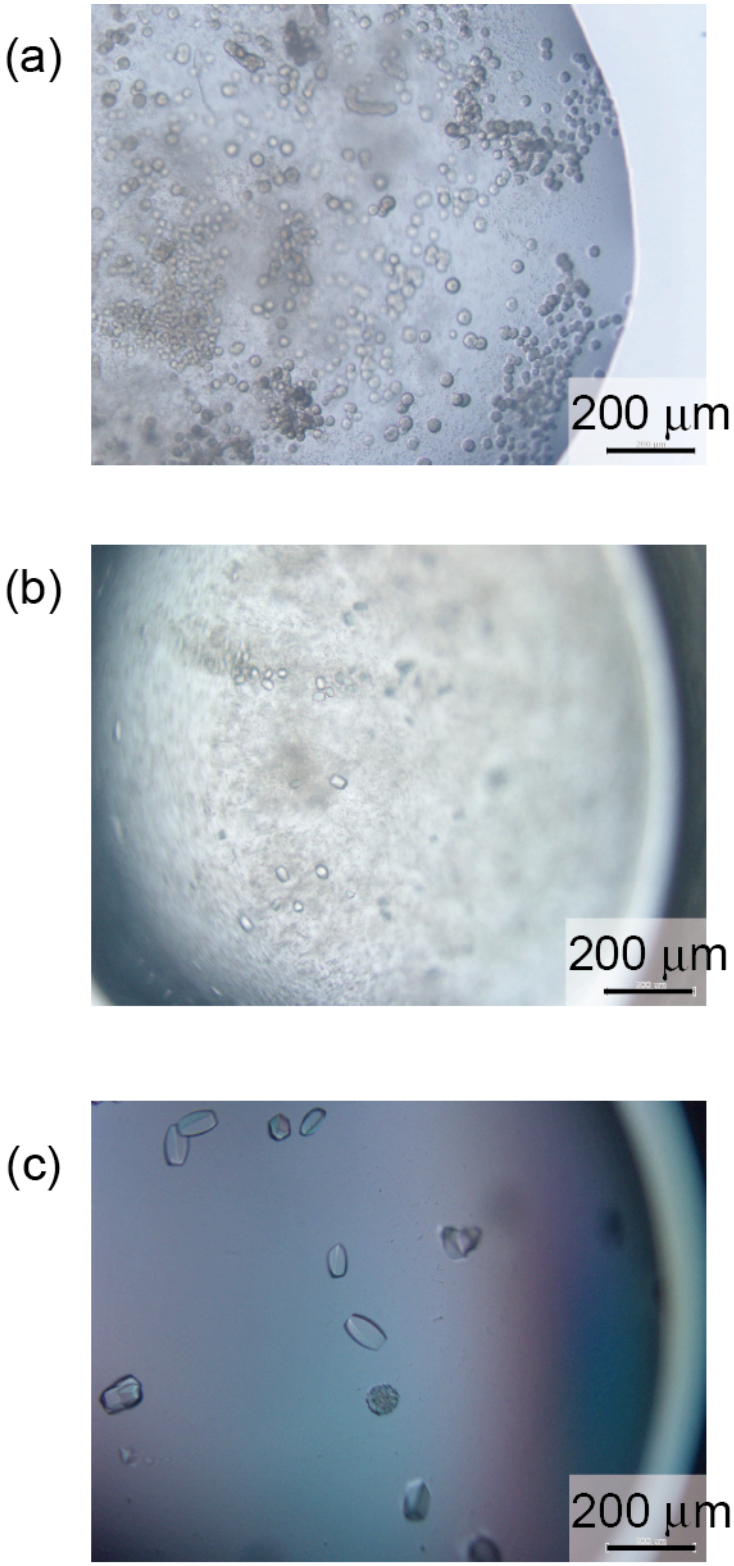
Native-PAGE での結果を示す. (a) トルイジンブルーでの染色, (b) simply blue での染色結果をそれぞれ示す. シフトした結果現れたバンドを矢印で示す.



(図 4-3) *P. horikoshii* Ncs6 の精製

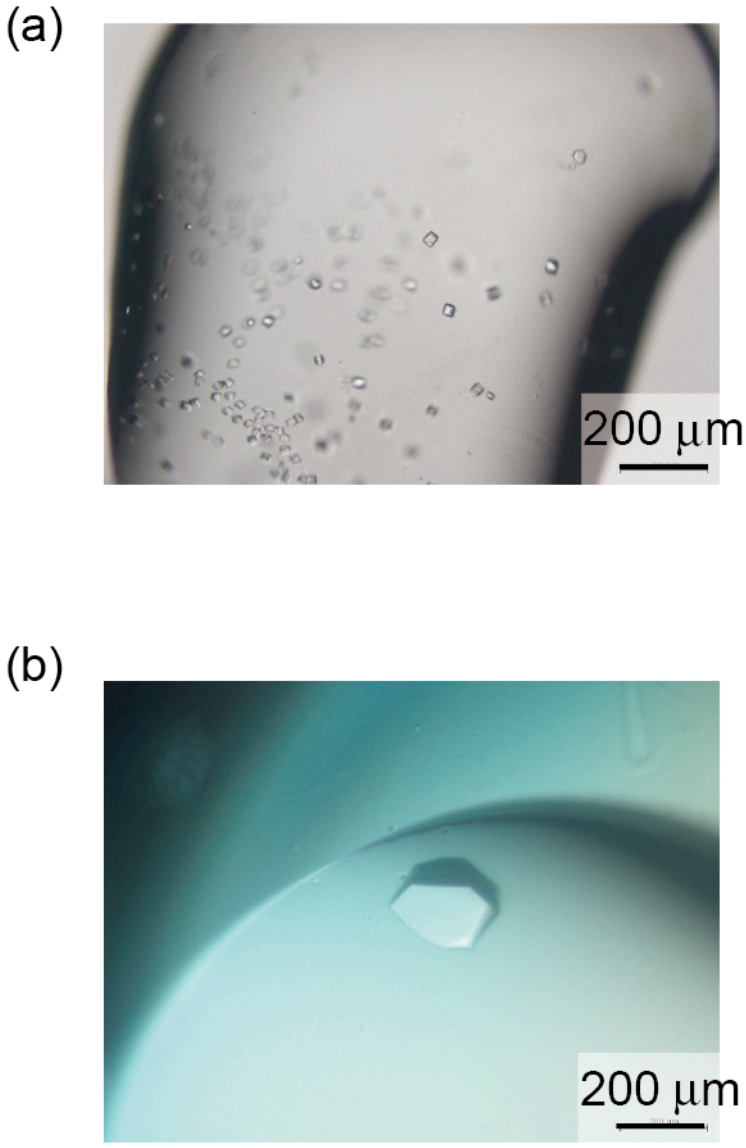
ゲルろ過後の SDS-PAGE の結果．染色は simply blue(Invitrogen)を用いて行った．

(a) pET28*Ph*Ncs6, (b) pCold*Ph*Ncs6 の図をそれぞれ表示した．



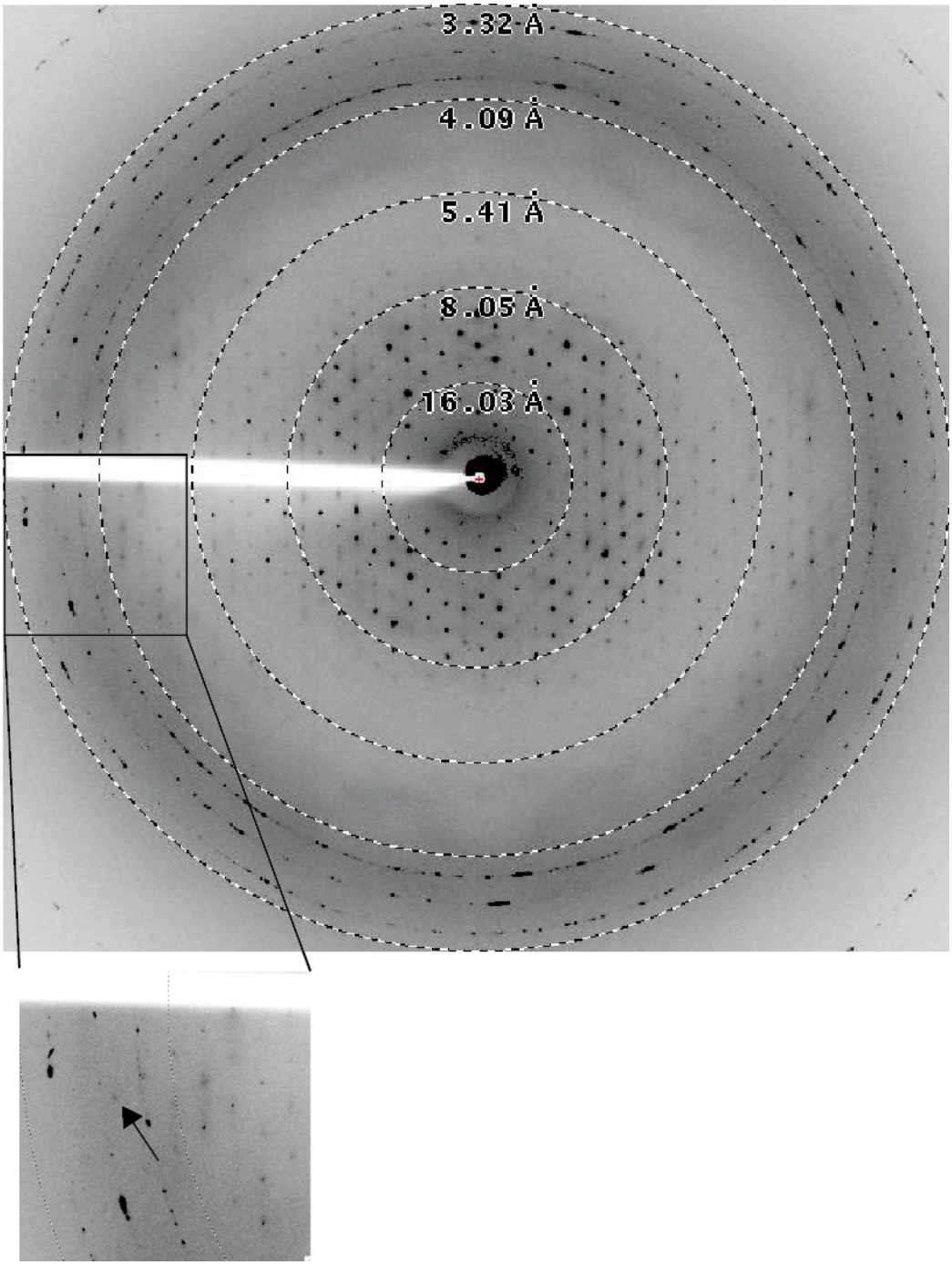
(図 4-4) pET28*Ph*Ncs6 の結晶

(a)結晶化スクリーニングによって得られた結晶 (b)ブレンドスクリーニングの結果得られた結晶 (c)最終的に得られた結晶



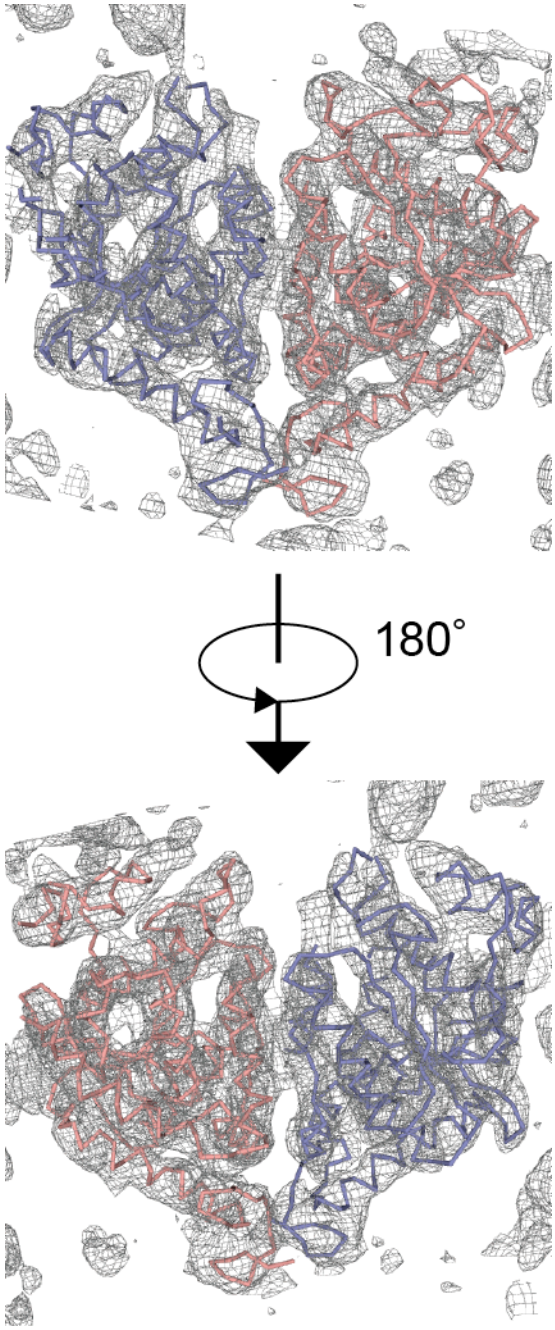
(図 4-5) pCold*Ph*Ncs6 の結晶

(a) PEG3,350 を含むリザーバーでのスクリーニングで得られた条件 (b) 図 4-6 のデータ測定の際に用いた結晶



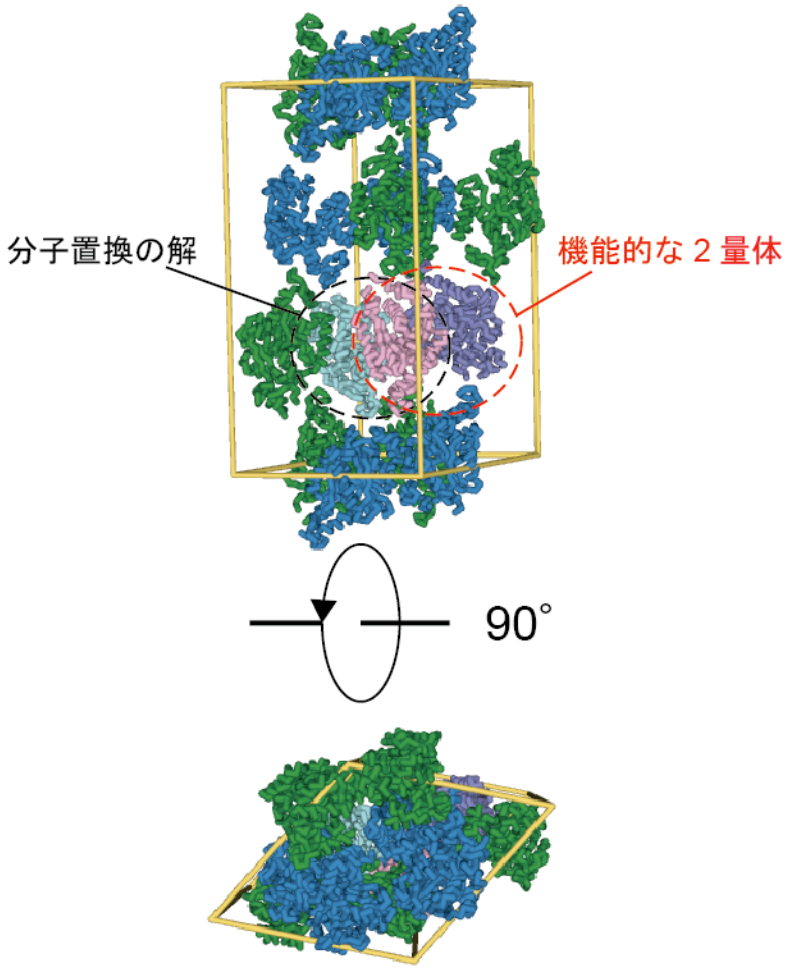
(図 4-6) pCold*Ph*Ncs6 の結晶から得られた回折像

SPring-8 BL26B2 で測定した．検出器は MR225 を利用した



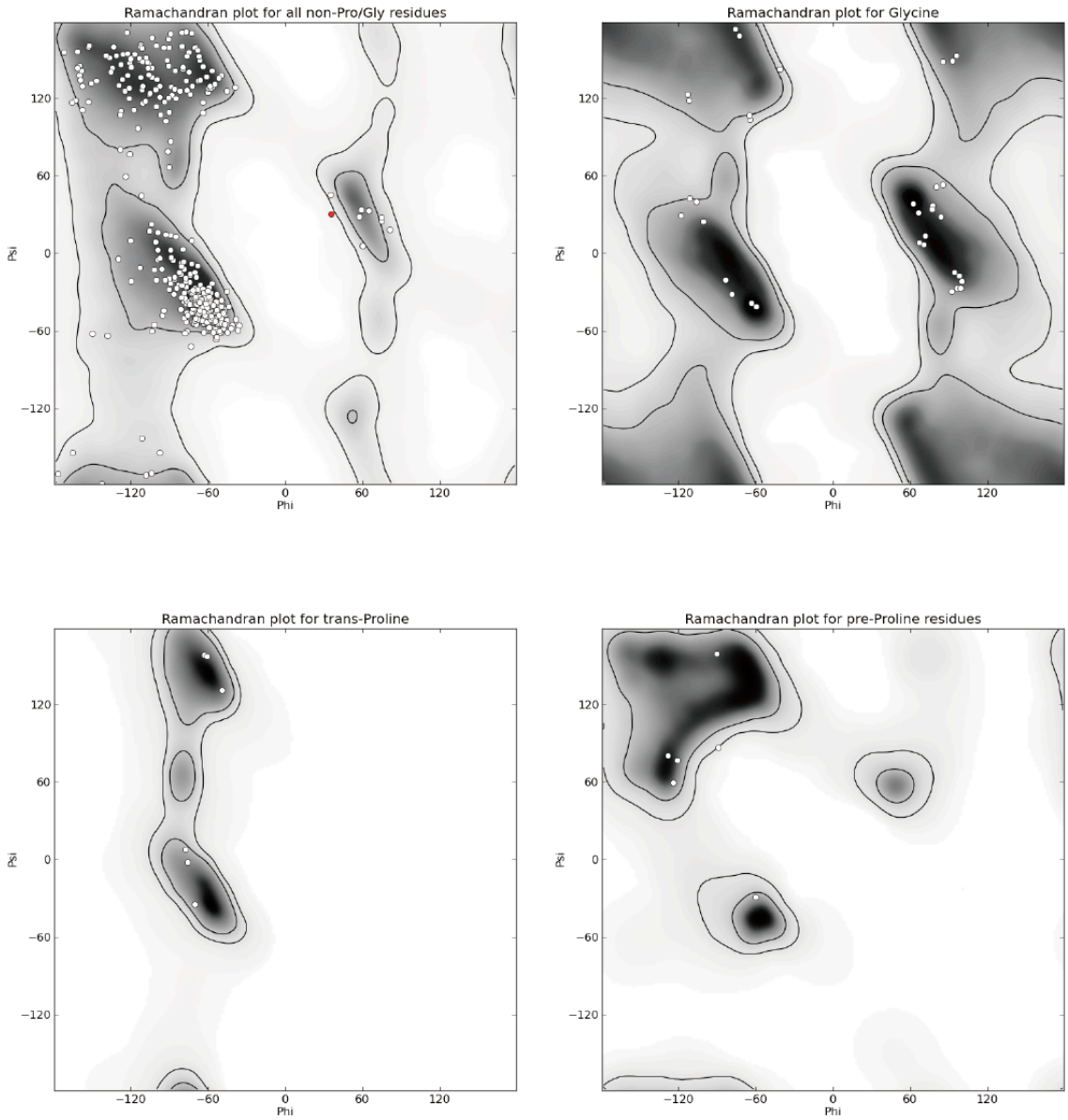
(図 4-7) 分子置換法の結果得られた位相

Mr.Bump の結果得られた解の分子と，電子密度 FWT-PHIWT を示す(1.1 σ)



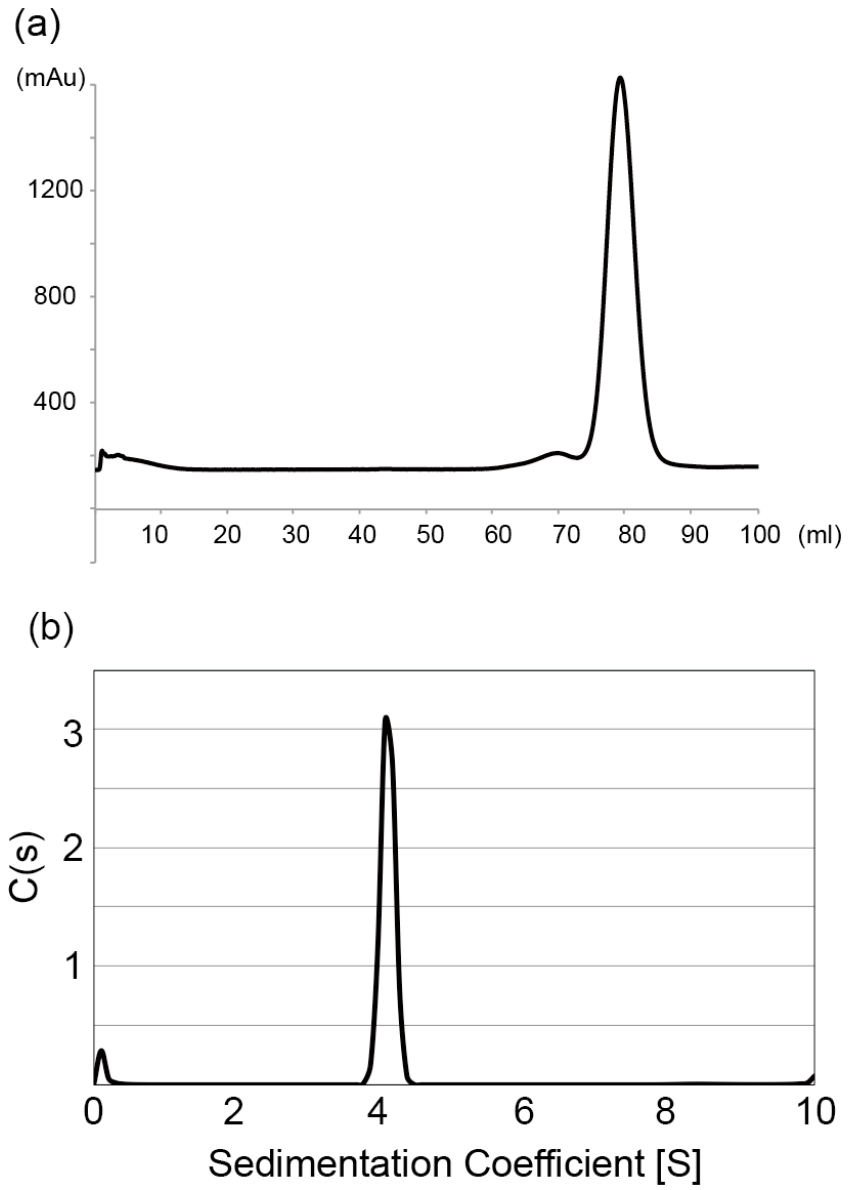
(図 4-8) 結晶中のパッキングの様子

Z 軸に垂直な方向と，水平な方向から見た図を示した．分子置換によって得られた解の 2 分子がシアンとピンクに，機能的な 2 量体と予想される 2 分子がピンクと紫色の分子にそれぞれ対応する．



(図 4-9) *P. horikoshii* Ncs6 のラマチャンドランプロット

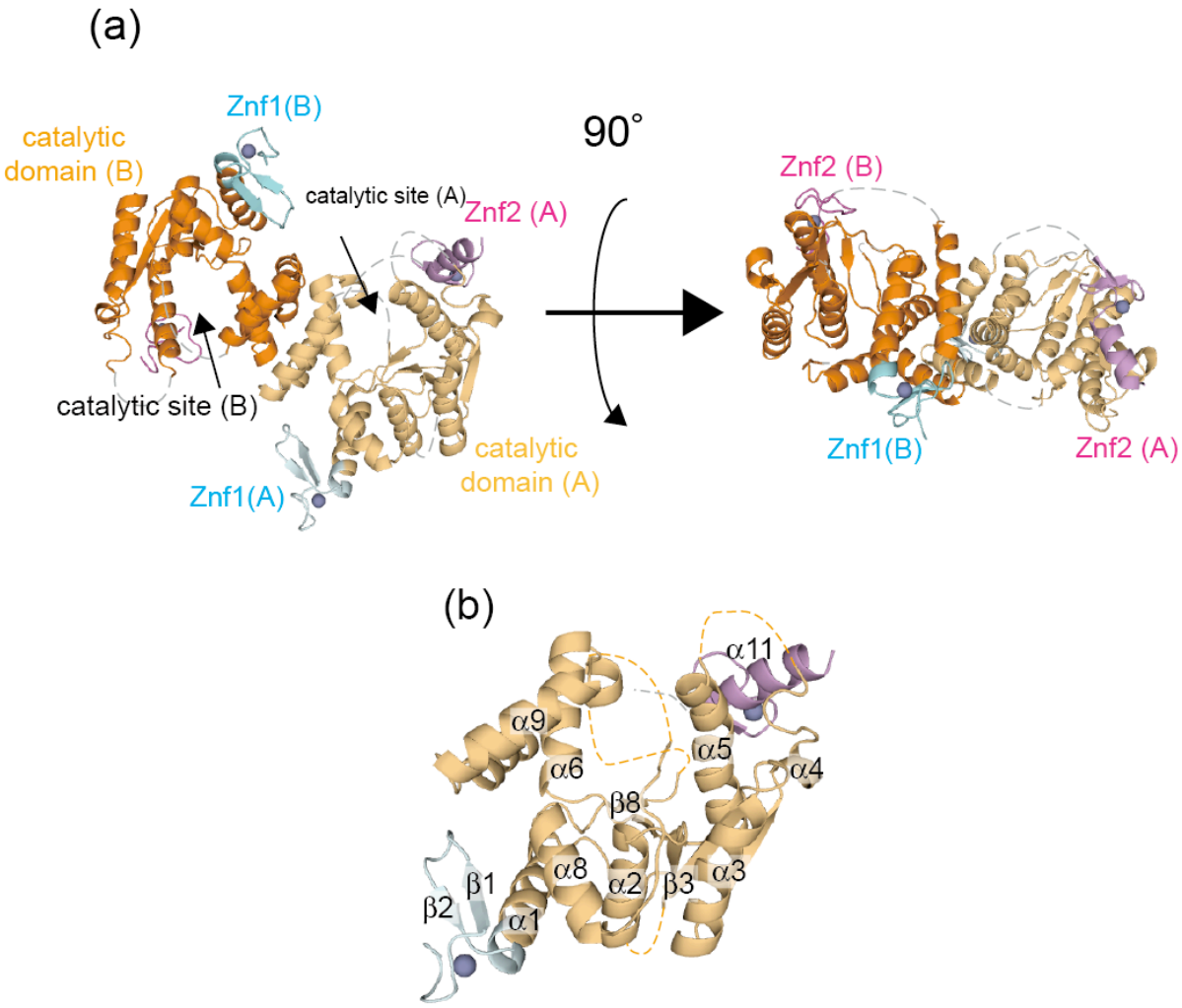
Molprobity を用いて作成した.



(図 4-10) *P. horikoshii* Ncs6 のゲルろ過カラムによる分離および分析超遠心

(a) ゲルろ過カラム Hiload 16/60 superdex200 で精製した際の 280 nm の吸光度を示す.

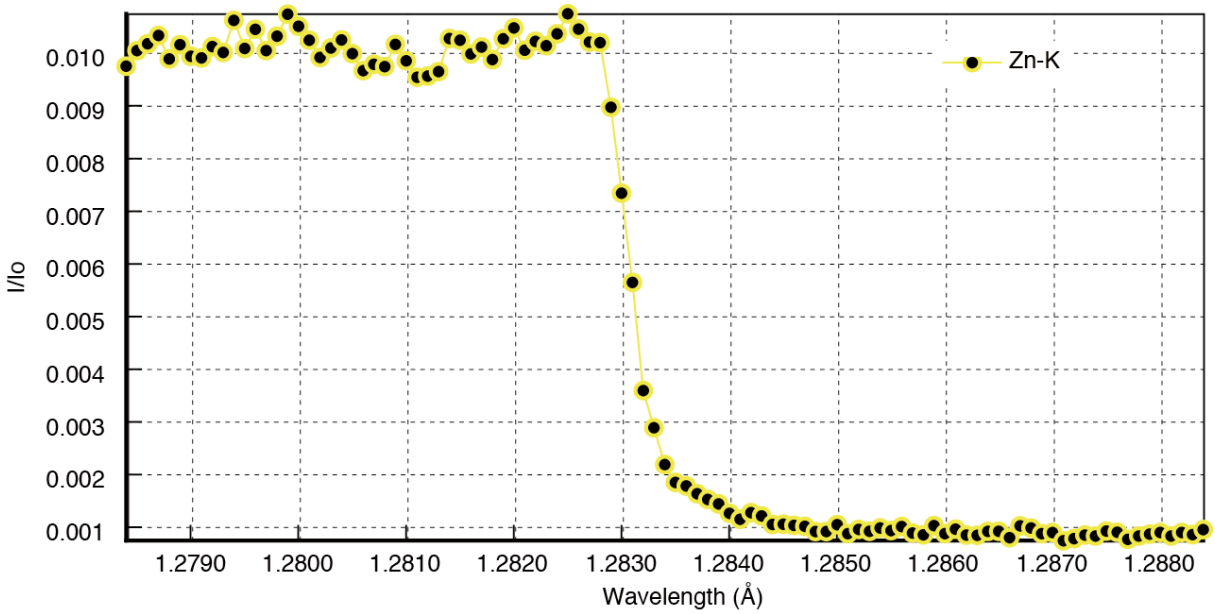
(b) 分析超遠心. 速度法による測定結果を示す.



(図 4-11) *P. horikoshii* Ncs6 の全体構造

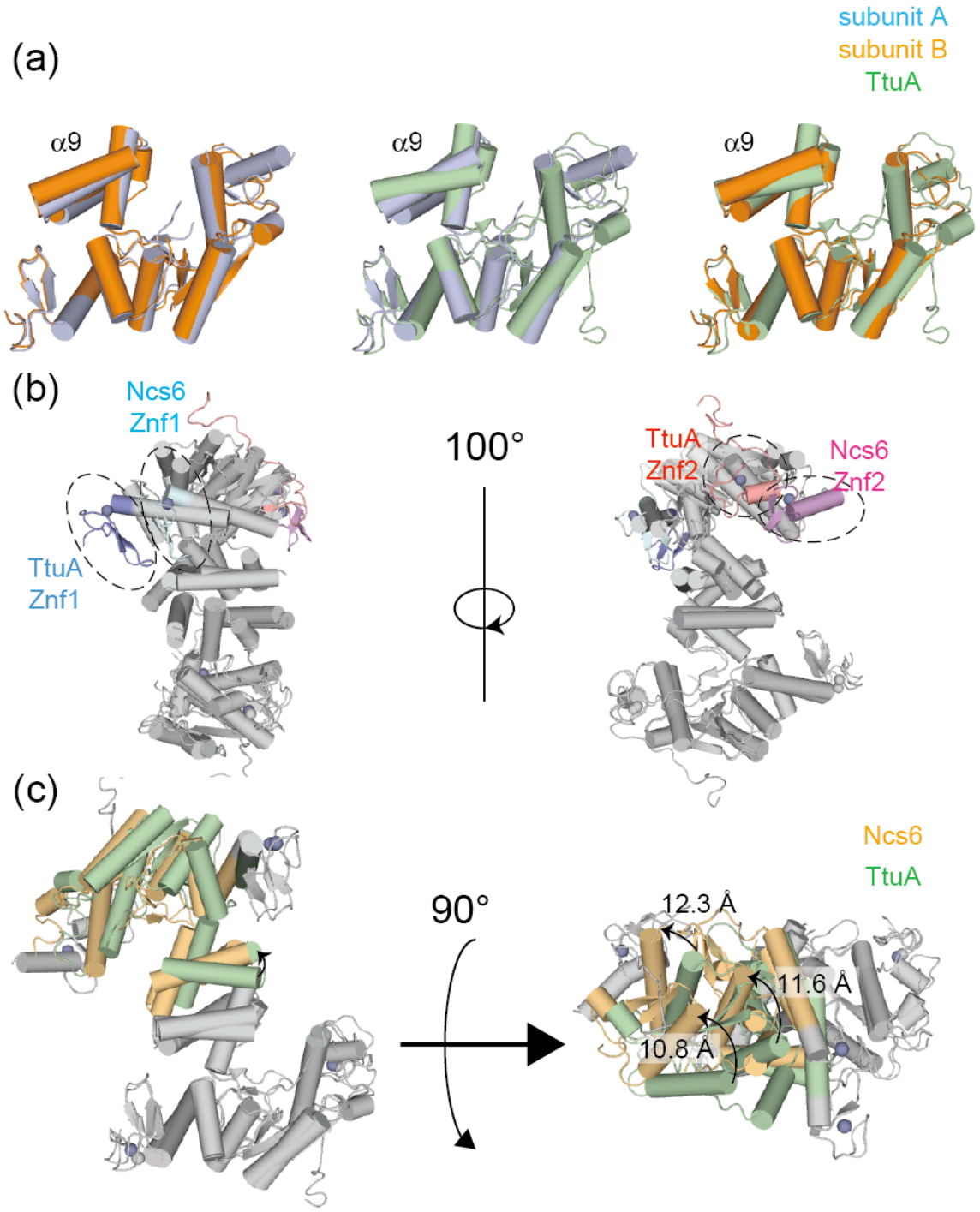
(a) 全体構造．リボンモデルで表示した．Znf1 をシアン，触媒ドメインをオレンジ，Znf2 をマゼンタでそれぞれ表示した．

(b) *P. horikoshii* Ncs6 のサブユニット構造



(図 4-12) *P. horikoshii* Ncs6 結晶から得られた xafs

xafs スペクトル. 1.2785 Å から 1.2885 Å の間で測定した結果を表示する.

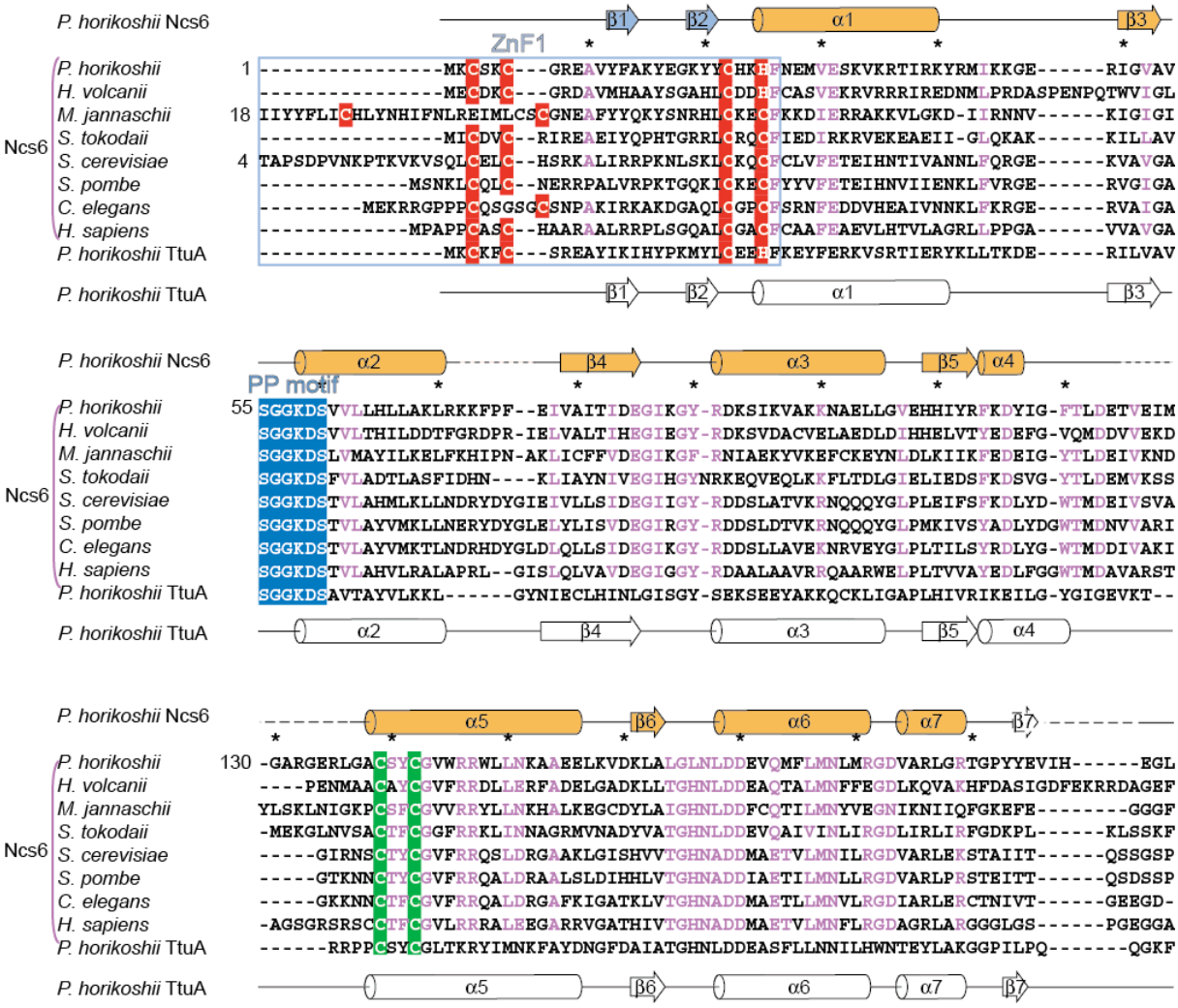


(図 4-13) *P. horikoshii* Ncs6 と *P. horikoshii* TtuA の構造比較

(a) 各サブユニット間の比較

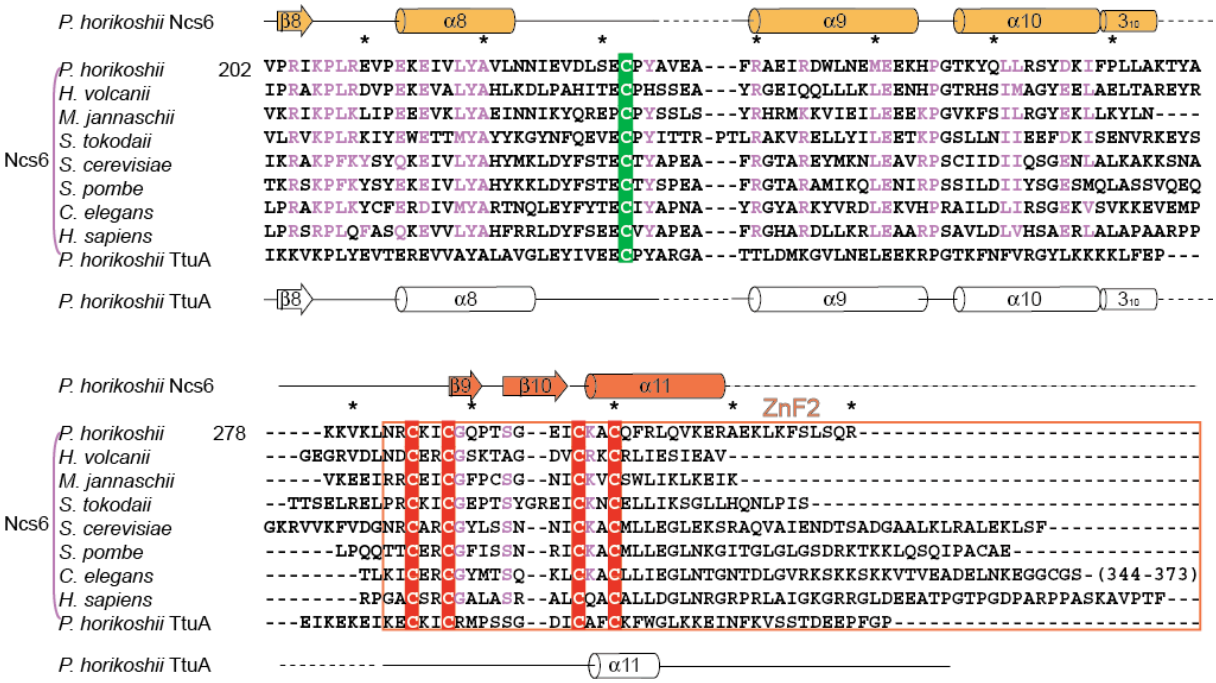
(b) 2 量体間での Zinc フィンガーの比較. Ncs6 は(図 4-10)に, TtuA は(図 2-11)と同じ色で示した. 2 量体化サブドメインも同じサブユニットの触媒ドメインと同じ色で表示した.

(c) 2 量体間での触媒ドメインの比較. 触媒ドメインの色は(b)同様にしめした.



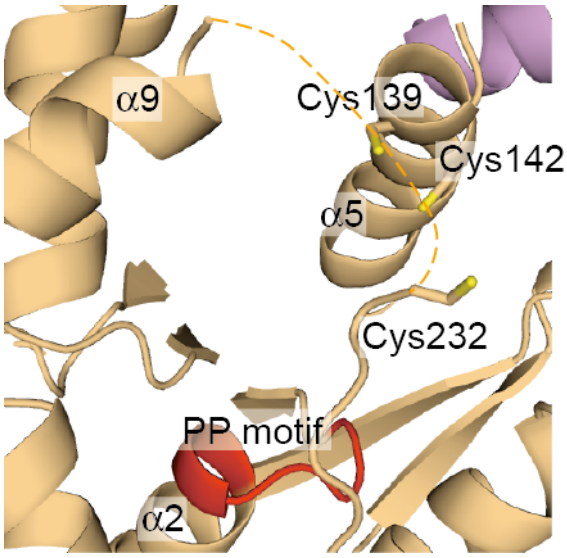
(図 4-14) Ncs6 の配列比較

P. horikoshii Ncs6 のアミノ酸配列を古細菌 *Haloferax volcanii*, *M. jannnaschii*, *S. tokodaii*, 真核生物 *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens* の Ncs6, *P. horikoshii* TtuA と比較した. *P. horikoshii* Ncs6 と TtuA の 2 次構造をアラインメントの上下にそれぞれ示した.



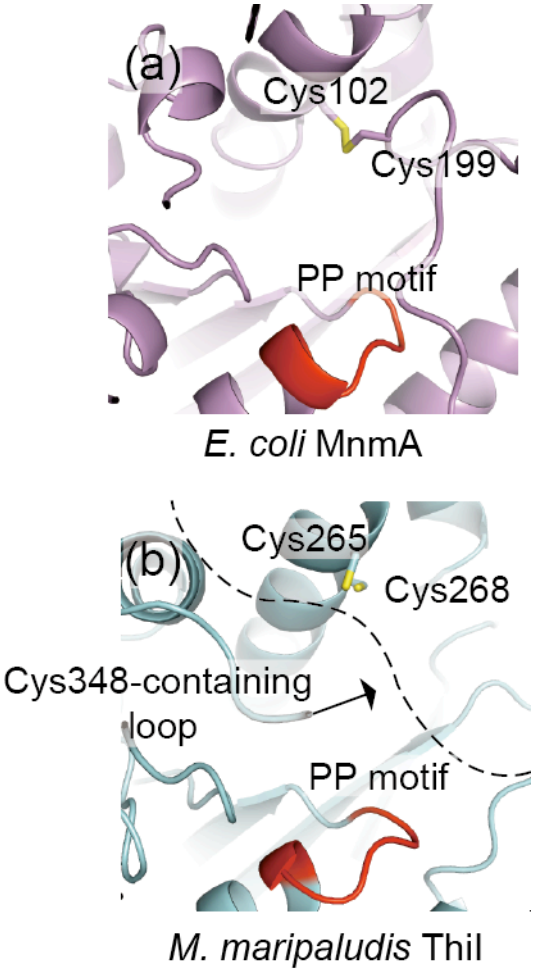
(図 4-14) Ncs6 の配列比較(続き)

Ncs6 の Znf1, 触媒ドメイン, Znf2 をそれぞれシアン, オレンジ, 赤で,TtuA の 2 次構造を白でそれぞれ表示した. 赤枠:亜鉛配位に関与する CXXC/H モチーフ, 緑枠:TtuA の触媒ドメインに存在するシステイン残基, 青枠:PP モチーフを示した. 保存されている領域を紫色で表示した.



(図 4-15) *P. horikoshii* Ncs6 の活性ポケット周辺の拡大図

PP モチーフを赤色で, 3 つのシステイン残基をスティックモデルで示した. 構造精密化の際には Cys232 はアラニンとして行い, 232 番目の残基をシステインに変えた図を示した.



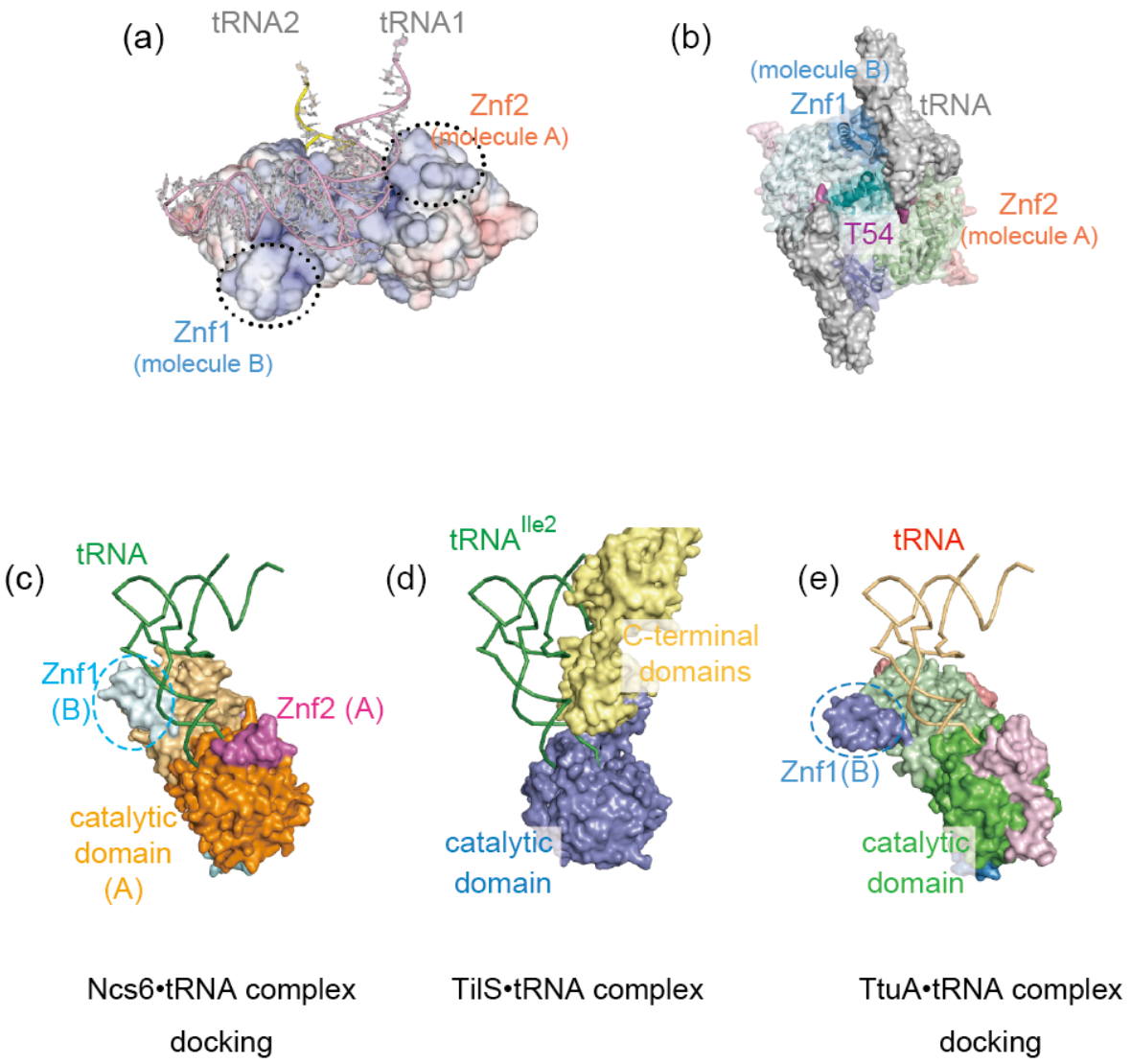
(図 5-1) MnmA の活性部位および *M. maripaludis* ThiI モデル活性部位の比較

(a) *E. coli* MnmA (PDB ID: 2DER)の活性部位. PP モチーフを赤で，修飾に関わるシステイン残基をスティックモデルで表した. (b) *M. maripaludis* ThiI モデル構造の活性部位. PP モチーフ，システイン残基は(a)と同様に表示した．Cys348 が存在すると予想されるループ領域は点線で示した.

```
                                                CXXC                CXXC
S. cerevisiae   -------------------------MECQRCPASARNPATVESRKEKFCDECFIKFVSTKQRKQMMKDEYFRNLF
S. pombe        --------------MQNTALDNSADSKCSKCDNKAT----VLTKSDAVCDSCFVRRIENKIRRQFELVR------
C. elegans      -------------MELGNFVTDLNGKKCVKCDKDAK-FTGVDPKKAWYCQECFVQMVRNKFRSSLSKKKIY----
H. sapiens      MCQVGEDYGEPAPEEPPPAPRPSREQKCVKC-KEAQ-PVVVIRAGDAFCRDCFKAFYVHKFRAMLGKNRLIFP--

S. cerevisiae   KVIYPFEKEGSVSKILLPISLSDSGSLVMLDIVHDLLLEQTKQHNNRTGFTVDVLTVFT---EENVSVIKERMES
S. pombe        ----PNLQGRKSKRAMLAISGGISSMAMLETANY---LSKYRDDNYRPMFDELLAVHFQ---WGTDSAVAKTIEE
C. elegans      -------KDADARDTLIVRDGTLSGTFLLHQIND----ALKQITYKRLMVKPTVLVLVSLTEDTEIQMVIKRIQE
H. sapiens      -----------GEKVLLAWSGGPSSSSMVWQVLE----GLSQDSAKRLRFVAGVIFVDEGAACGQ---SLEERSK

S. cerevisiae   LINEKMSQLNKISNIFNVHFIDVNEFFNNASEV-------------------STFIIDNE---------------
S. pombe        SISKNYPK-------CPFKVIGEAELL-------------------------NRTIATD---------------
C. elegans      IKKSVLE------------------------NVRWVVAHLACSMYDE-----DFKLKENECNGV-----------
H. sapiens      TLAEVKPILQATG--FPWHVVALEEVFSLPPSVLWCSAQELVGSEGAYKAAVDSFLQQQHVLGAGGGPGPTQGEE

                                                                                        ←
S. cerevisiae   ---NFEIFSKSKSVDDS-NILTLKEILGKYCLNNSSRSDLISIIKTQLIKHFAYENGYNAIMWGHSMTKLSEVII
S. pombe        SRGNIEINADNEKFNP------------EVISSLASRQDLLYRIRDKLLVSYARKANCDTIVFGDSGTTIAARVL
C. elegans      ------------------EKISDYNQLIASCSVPTYRKELERVLKEKCLQKIACSMGILKCMVPDHADDLGRLAI
H. sapiens      QPPQPPLDPQNLARPPAPAQTEALSQLFCSVRTLTAKEELLQTLRTHLILHMARAHGYSKVMTGDSCTRLAIKLM

                                                DUF2392
S. cerevisiae   SLVVKGKGSQIATFLDSESFDTLNNKP--CKYKNLYPMKDLLSVEIESFLQIRNLAQF-LINVEETNVKPNCLIA
S. pombe        ELVAEGRGFAIPWYT------SVCSKLPNCDTFLLRPLREVLSSDLKSYMNIKGL----AFCDSLIEARPN----
C. elegans      DQLCLGRGGSISTLV------TVTDKR--PDFMLIRPLCDISKKELAVYNYLCDIDKH-CIHIAQQNNQQK----
H. sapiens      TNLALGRGAFLAWDT------GFSDER-HGDVVVVRPMRDHTLKEVAFYNRLFSVPSVFTPAVDTKAPEKA----

                                                                                CXXC
S. cerevisiae   RKSLPSLGQQKLVKNMTINEITNKYFQDIQND-YSNIISTVLRTADKLTQ-----PKSSMAKPSQCQICQSKIYT
S. pombe        ----------------TIHGVTESYFSSLNDT-FPSLVSTVVKMSSKLHV-----PS----TEAICTICNLPMQE
C. elegans      ----------------SVQTLTDAFICTLENEKFYSTINTVLSTAAKIHN-----TSIGK-DDSKCSFCNVEVAD
H. sapiens      ----------------SIHRLMEAFILRLQTQ-FPSTVSTVYRTSEKLVKGPRDGPAAGD-SGPRCLLCMCALDV

                                                                                CXXC
S. cerevisiae   NPSNWLNRITVTSPYPVETTEEKYLFKQWQDSKLGQSHTHYVELLNEIKQGASNSLDVEDGDVKLCYGCLILLNT
S. pombe        DAETWLQKTTVEHPDSVEGIKNQ-------------------------------------NVCYGCSVSLKS
C. elegans      SVCSTCSAI-------------------------------------------------------VCSTCSAIREC
H. sapiens      DAADSATAFGAQTSSRLSQMQSPIPLTETRTPPGPCCSPGVGWAQRCGQGACRREDPQACIEEQLCYSCRVNMKD

S. cerevisiae   SIKDKNLVWPKVDTMDITANA---TNNNKELSQILDQFEINSD---GEE
S. pombe        LKSLKGTLHIPDIEKEGI----------------------------------
C. elegans      TGDLLTLLF-----------------------------------
H. sapiens      LPSLDPLPP-----YILAEAQLRTQRAWGLQEIRDCLIEDSDDEAGQS
```

(図 5-2) 真核生物 Ncs2 の配列比較

MAFFT プログラムを用いて行った. CXXC モチーフ, PP モチーフ, G(R/K)G モチーフは水色で, その他の保存された残基は赤色で示した. *S. pombe* で DUF2392 ファミリーと予想された領域を緑の矢印で示す.



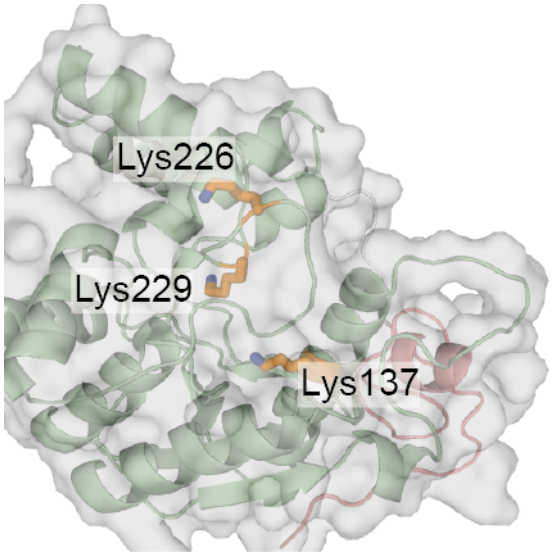
(図 5-3) tRNA とのドッキングモデル

(a)(b) TtuA と tRNA とのドッキングモデル. (a)表面電荷モデル, (b) 表面モデルで TtuA を, (a)リボンモデルと(b)表面モデルで tRNA を表した

(c) Ncs6 と TilS に結合した tRNA のドッキングモデル.

(d) TilS·tRNA 複合体構造(PDB ID: 3A2K)

(e) TtuA と TilS に結合した tRNA とのドッキングモデル



(図 5-4) *T. thermophilus* TtuA モデルと共有結合するリジン残基

P. horikoshii TtuA の構造をもとに, swiss model を用いて作成した. サブユニット単体のみ示す. 共有結合するリジン残基はスティックモデルで表示した.