

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06537

研究課題名(和文) アミノアシルtRNA合成酵素の新規生理機能の探索とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Search for novel physiological functions of aminoacyl-tRNA synthetases and investigation of their regulatory mechanisms

研究代表者

若杉 桂輔 (Wakasugi, Keisuke)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20322167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞では、細胞外から細胞内へ、トリプトファン(Trp)に対する高い親和性と高い選択性を有する高感度な取り込みが起こり、癌周辺のTrpを枯渇させることでT細胞の活性を抑制し、免疫寛容が生じる。本プロジェクトでは、癌の免疫寛容を誘導する細胞外から細胞内への高感度Trp輸送にトリプトファンtRNA合成酵素(TrpRS)が直接関わること、また、TrpRSによるTrp-AMP合成能と細胞内のTrp飢餓状態が高感度Trp輸送に極めて重要であることを明らかにした。さらに、アミノアシルtRNA合成酵素に結合しアミノアシルtRNA合成酵素の機能を制御するポリフェノールの探索にも挑んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、癌の免疫寛容を誘導する細胞外から細胞内への高感度トリプトファン(Trp)輸送に直接関わるトリプトファンtRNA合成酵素(TrpRS)の作用機序の解明を目指し、TrpRSによるTrp-AMP合成能と細胞内のTrp飢餓状態が高感度Trp輸送に極めて重要であることを明らかにした。さらに、アミノアシルtRNA合成酵素に結合しアミノアシルtRNA合成酵素の機能を制御するポリフェノールについて解析を行った。高親和性Trp取り込みは癌が免疫機構を回避するために利用されるため、今回見出したポリフェノールはアミノアシルtRNA合成酵素をターゲットとする癌の治療薬開発のために活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The novel tryptophan (Trp) transport system, which displays high affinity and selectivity for Trp, is present in tumour cells. High-affinity Trp uptake into tumour cells results in extracellular Trp depletion and immune suppression. In this project, we showed that human tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS) has a crucial function in high-affinity Trp uptake into cells and demonstrated that Trp-AMP production by TrpRS and intracellular Trp starvation conditions are important for high-affinity Trp uptake. Moreover, we tried to search for polyphenols which bind to aminoacyl-tRNA synthetases and regulate their protein function.

研究分野：分子生命科学

キーワード：アミノアシルtRNA合成酵素 蛋白質 機能 トリプトファン 免疫寛容 制御機構 ポリフェノール 生体分子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノアシル tRNA 合成酵素は tRNA にアミノ酸を結合させるアミノアシル化反応を触媒する酵素である。我々はこれまで、アミノアシル tRNA 合成酵素の新規機能の探索を行ってきた。チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) とトリプトファン tRNA 合成酵素 (TrpRS) は、tRNA にそれぞれチロシン (Tyr) 及びトリプトファン (Trp) を結合させるアミノアシル化反応を触媒し、蛋白質の翻訳系に関わっている。我々は、ヒト TyrRS がこの触媒機能に加え、アポトーシスの初期段階で細胞から分泌され、余分な付加ドメインがプロテアーゼで切断された後、触媒活性ドメイン及び余分な付加ドメインが二種類のサイトカインとして働くことを発見した (Wakasugi and Schimmel *Science* 284, 147-151 (1999); Wakasugi and Schimmel *J. Biol. Chem.* 274, 23155-23159 (1999))。また、ヒト TyrRS の触媒活性ドメインが、血管新生促進因子として働くこと、他方、分子進化的に近縁の酵素であるヒト TrpRS も蛋白質分解酵素や alternative splicing により余分な付加ドメインが切断され、ヒト TrpRS の触媒活性ドメインは逆に血管新生抑制因子として働くことを発見した (Wakasugi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 173-177 (2002); Wakasugi et al. *J. Biol. Chem.* 277, 20124-20126 (2002))。さらに、最近、ヒト TrpRS がインターフェロン (IFN)- γ に応答して発現量が著しく増加し、細胞内から細胞外に分泌され、免疫寛容に関わる細胞外から細胞内への Trp に対する高い親和性と高い選択性を有する高感度な Trp 輸送に関わることを発見した (Miyanakoshi et al. and Wakasugi *J. Biol. Chem.* 293, 8428-8438 (2018))。

癌細胞では、細胞外から細胞内へ、Trp に対する特異性及び親和性が非常に高い Trp 取り込みが起こり、癌細胞周辺の Trp を枯渇させることにより T 細胞を不活性化し、免疫系における癌の排除を回避させる免疫寛容が誘導されることが明らかになった。この高感度 Trp 取り込みは、インターフェロン (IFN)- γ に刺激された細胞や Trp の代謝酵素であるインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ 1 (IDO1) を発現する細胞が行う Trp 特異的な高親和性の取り込みである。IDO1 は癌で高発現しており、細胞周囲の Trp を枯渇させることにより、免疫系における癌の排除を回避させる。しかしながら、高感度 Trp 輸送機構の詳細は全く不明であった。ヒト TrpRS は 20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素の中で唯一 IFN- γ に応答して発現量が著しく増加する。我々の解析の結果、細胞への IFN- γ 処理により細胞内への高親和性の Trp の取り込み量が著しく増加し、高親和性 Trp の取り込み量は TrpRS の発現量に依存すること、また、細胞外へ TrpRS 蛋白質を添加すると高親和性 Trp の取り込み量が増加することが明らかになった (Miyanakoshi et al. and Wakasugi *J. Biol. Chem.* 293, 8428-8438 (2018))。

2. 研究の目的

我々は、ヒト TrpRS が IFN- γ に応答して発現量が著しく増加し、細胞内から細胞外に分泌され、免疫寛容に関わる細胞外の Trp の細胞内への輸送に関わることを発見した。癌細胞では、Trp を代謝する酵素 IDO1 が高発現しており、癌周辺の Trp を枯渇させることで T 細胞の増殖を抑え免疫寛容が生じることが明らかになっている。本プロジェクトでは、これらの新たな発見をさらに推し進め、免疫寛容を誘導する癌細胞における TrpRS を介した高感度 Trp 輸送の制御機構の全容解明を目指した。特に、Trp をキヌレニンに代謝する酵素である IDO1 に着目し、TrpRS 蛋白質を介する高感度 Trp 取り込み分子機構のさらなる解明を目指した。細胞発現用ベクターを用いてヒト TrpRS を過剰発現させると Trp 飢餓条件下の細胞内への高感度 Trp 取り込み量が増加するかどうか解析した。また、ヒト TrpRS の Trp や ATP 結合部位のアミノ酸を改変させた変異体、tRNA 結合部位を欠失させた変異体を使って Trp の取り込みを解析することにより、Trp の細胞内への取り込みに重要な TrpRS のアミノ酸残基を特定することにも挑んだ。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト子宮頸癌細胞株 (HeLa 細胞) は 4.5 g/L グルコースを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に、10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS)、2 mM グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを加えて 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。HeLa 細胞への Trp 飢餓誘導は、Trp を含まない培地で 24 時間培養することによって行った。

(2) 大腸菌でのヒト TrpRS 蛋白質および TyrRS 蛋白質の発現及び精製

ヒト TrpRS または TyrRS を発現させるための pET20b 発現ベクターを作製し、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換して大腸菌での蛋白質発現を行った。その後、pET System Manual に従い、Ni-NTA フィニティークロマトグラフィーにより蛋白質の精製を行った。

(3) 細胞へのプラスミド導入

HeLa 細胞は 60 mm dish に 1.5×10^5 cells/mL で播き、翌日、PEI MAX を用いて、TrpRS を発現するための哺乳動物発現ベクター pcDNA3.1/myc-His(-) B TrpRS vector の導入を行った。具体的には、発現ベクターと PEI MAX を混合して 20 分静置後、dish に加え、 37°C 、5% CO_2 で 24 時間培養した。

(4) 細胞外から細胞内への Trp の取り込み測定

HeLa 細胞の培地を除き、リン酸緩衝液(PBS)でよく洗浄した。細胞を回収し、 1×10^6 cells/mL となるように PBS で懸濁した。終濃度 500 nM TrpRS 蛋白質の存在下、または非存在下で、150 nM [^3H] Trp を添加し、経過時間に伴って回収した細胞を glass microfiber filters に滴下後、PBS で洗浄した。filter を乾燥後、LS 6500 Scintillation Counter を用いて測定を行った。

4. 研究成果

(1) ID01 過剰発現細胞への TrpRS 蛋白質の添加は高感度 Trp 取り込みにさらなる相乗効果をもたらす

Trp 高感度取り込みにおいて Trp 代謝酵素と TrpRS がどのように関わり合っているのか明らかにすることを目指した。まず、細胞に野生型(WT) ID01 発現ベクターを導入し ID01 を過剰発現させると、Trp 高感度取り込みが起こることが明らかになった(図 1)。次に、ID01 を過剰発現させた細胞に TrpRS 蛋白質を外部添加して Trp 取り込みを測定したところ、TrpRS 添加のみや ID01 過剰発現のみの細胞と比較して、Trp 高感度取り込み量が著しく上昇することを発見した(図 1)。一方で、ID01 のヘム結合に重要な 346 番目のヒスチジン残基をアラニンに置換し、Trp 代謝活性を失った H346A ID01 変異体の過剰発現ではこのよ

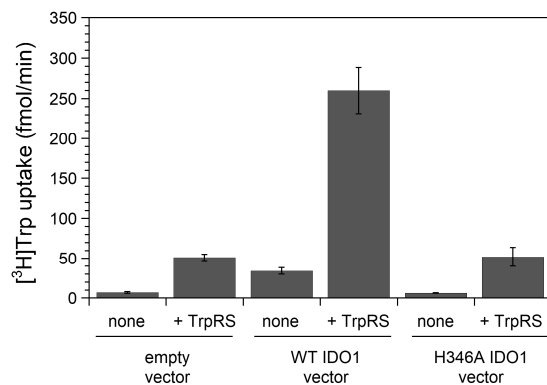


図 1. TrpRS 蛋白質を添加した際の ID01 過剰発現細胞

ような相乗効果は確認されなかった(図 1)。以上のことから、ID01 過剰発現細胞では細胞外 TrpRS 蛋白質による Trp 高感度取り込みが促進されており、ID01 過剰発現による Trp 代謝に伴う Trp の欠乏が、細胞膜上で TrpRS と相互作用する蛋白質の発現量を増加させている可能性が考えられる。この内容は、*Genes (Basel)*誌上で投稿論文 (Yokosawa, T., Sato, A., and Wakasugi, K. Tryptophan depletion modulates tryptophanyl-tRNA synthetase-mediated high-affinity tryptophan uptake into human cells. *Genes (Basel)* (査読有) 11, 1423 (2020)) として発表された。

(2) 細胞の Trp 欠乏状態が TrpRS を介する Trp 高感度取り込みに重要となる

ID01 の過剰発現により TrpRS 蛋白質の添加に伴う Trp 高感度取り込みが著しく増加することが確認されたことから、ID01 により生じた Trp 代謝物が Trp 高感度取り込みを引き起こす、もしくは Trp 代謝による細胞の Trp 欠乏状態が Trp 高感度取り込みを誘導するという 2 つの可能性が考えられる。過去の研究において ID01 の Trp 代謝で生じるキヌレニンが芳香族炭化水素受容体を活性化させ、細胞の Trp 取り込みを上昇させることが報告されている。そこで、キヌレニン存在下

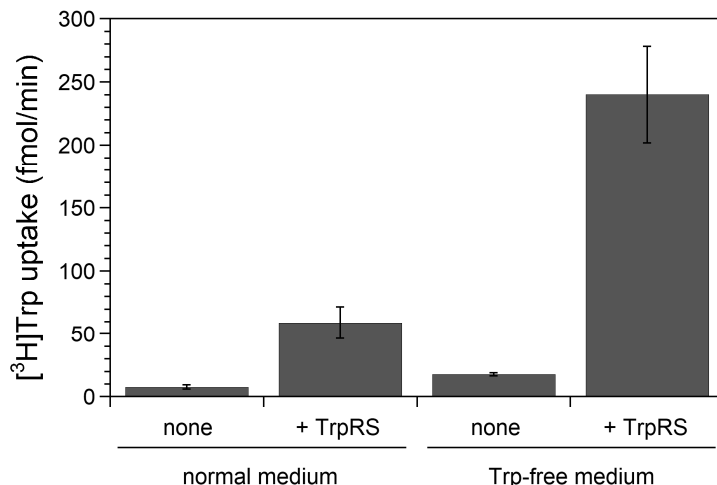


図 2. TrpRS 蛋白質を添加した際の Trp 飢餓細胞の高親和性 Trp 取り込み

や低濃度 Trp 培地で培養した HeLa 細胞を用いて、TrpRS を介する Trp 取り込みを測定し、Trp 代謝物と Trp 欠乏状態のどちらが Trp 高感度取り込みの誘導に重要であるかについて検証を行った。キヌレニンで処理した HeLa 細胞では、TrpRS 添加に伴う Trp 高感度取り込みの上昇は確認されなかった一方、Trp を欠く培地で培養した細胞に対し精製 TrpRS 蛋白質を外部添加すると Trp 高感度取り込みがさらに著しく増加することが明らかになった (図 2)。これらの結果から、細胞の Trp 欠乏状態が TrpRS による Trp 高感度取り込みに重要であること、また、細胞外 TrpRS が Trp 飢餓細胞の Trp 高感度取り込みに関わることを明らかになった。この内容は、*Genes (Base1)*誌上で投稿論文 (Yokosawa, T., Sato, A., and Wakasugi, K. Tryptophan depletion modulates tryptophanyl-tRNA synthetase-mediated high-affinity tryptophan uptake into human cells. *Genes (Base1)* (査読有) 11, 1423 (2020)) として発表した。

(3) IDO1 過剰発現細胞では確かに Trp が枯渇している

転写因子 ATF4 の細胞内発現量は、過去の報告同様、Trp 飢餓に反応して増加することが明らかになった (図 3A)。そこで、ATF4 の発現量変化を指標に、Trp 代謝酵素の過剰発現に伴い Trp が枯渇しているかどうか検証する実験を次に行った。WT IDO1 を過剰発現させると ATF4 の発現量が増加し、Trp 代謝活性のない H346A IDO1 の過剰発現では ATF4 発現量は変化しなかった (図 3B)。また、Trp を 400 μ M 過剰に含む培地で WT IDO1 過剰発現細胞を培養すると、通常培地での培養と比べ、ATF4 発現量が著しく低下した (図 3C)。以上の実験結果より、Trp 欠乏を ATF4 発現量でモニターできること、また、IDO1 過剰発現細胞では確かに Trp が枯渇していることが明らかになった。この内容は、*Genes (Base1)*誌上で投稿論文

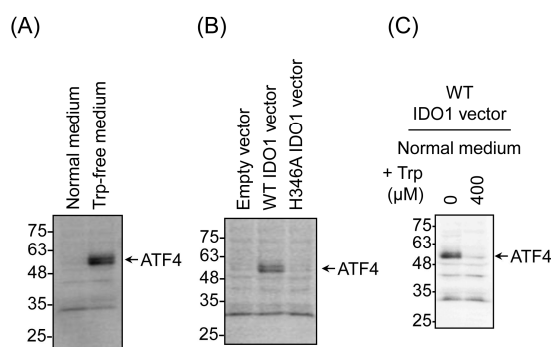


図 3. 転写因子 ATF4 の細胞内発現量の比較

ATF4 抗体を用いて Western blot 解析を行った。なお、右側の矢印は、ATF4 の予測されたバンド位置を示す。(A) Trp を欠く培地で培養した細胞との比較、(B) IDO1 過剰発現細胞との比較、(C) Trp を多く含む培地で培養した IDO1 過剰発現細胞との比較

(Yokosawa, T., Sato, A., and Wakasugi, K. Tryptophan depletion modulates tryptophanyl-tRNA synthetase-mediated high-affinity tryptophan uptake into human cells. *Genes (Base1)* (査読有) 11, 1423 (2020)) として発表した。

(4) ヒト TrpRS の過剰発現細胞を用いた Trp 飢餓条件下での高感度 Trp 取り込みの解析

ヒト WT TrpRS 過剰発現細胞を Trp を含まない培地で培養すると、通常の培地で培養した TrpRS 過剰発現細胞や、Trp を含まない培地で培養した空のベクターを導入した細胞と比較して、Trp 取り込みの顕著な増加が観察された。これらの結果から、細胞の Trp 飢餓状態が TrpRS による Trp 高感度取り込みに重要であることが明らかになった。次に、Trp を欠く培地で細胞発現用ベクターを用いてヒト TrpRS 変異体を HeLa 細胞で過剰発現させ、 $[^3\text{H}]$ Trp の取り込みを測定したところ、Trp が結合できない変異体 Y159A/Q194A TrpRS 変異体、ATP が結合するアデノシンポケットを塞いだ A310W TrpRS 変異体を過剰発現させた場合には、WT TrpRS を過剰発現させた場合にみられた Trp 飢餓条件下での高感度 Trp 取り込みは誘導されなかった。他方、tRNA 結合部位の 382 から 389 番目のアミノ酸残基を欠失させた 382-389 変異体の過剰発現により、WT TrpRS 過剰発現細胞と同様のレベルまで Trp 飢餓細胞への Trp 取り込み量が増加した。以上のことから、TrpRS による高感度 Trp 輸送に、TrpRS のトリプトファン AMP 形成能 (Trp 結合能と ATP 結合能) は重要であるが、TrpRS の tRNA 結合能は必須ではないことが明らかになった。また、ヒトの tRNA をアミノアシル化できない枯草菌 TrpRS を過剰発現させた HeLa 細胞を Trp 飢餓条件下で培養した場合でも Trp の活発な取り込みが見られたことから、TrpRS への tRNA 結合は TrpRS による Trp の取り込みに不必要であることが再確認された。また、精製した枯草菌 TrpRS 蛋白質を取り込みアッセイバッファーに添加した場合にも、Trp 飢餓細胞への高親和性 Trp 取り込みを促進した。これら実験結果からも、TrpRS への tRNA 結合能は TrpRS による高感度 Trp 輸送には不必要であると考えられる。現在、これら実験結果を投稿論文として執筆中である。

(5) IFN- γ による高感度 Trp 輸送の誘導におけるヘムの影響の解析

HeLa 細胞の培地に IFN- γ を添加すると高感度 Trp 輸送が増加するが、今回、IFN- γ 添加とともにスクシニルアセトン添加しヘム合成を阻害すると高感度 Trp 輸送が著しく減少し、この細胞にヘムを補充すると高感度 Trp 輸送が大きく増加することも明らかになった。この実験

結果は、Trp 代謝酵素がヘム蛋白質であり、ヘムの結合が Trp 代謝活性に必須であるためと解釈される。

(6) アミノアシル tRNA 合成酵素の機能を制御するポリフェノールの探索

レスベラトロールは、ポリフェノールの一種であり、酸化ストレスからの細胞保護効果がある。最近、レスベラトロールが、ヒトの TyrRS の Tyr 結合ポケット内に Tyr 同様に結合した後、ヒト TyrRS がアセチル化修飾を受け、アセチル化修飾した TyrRS は核に移行し、転写因子 E2F1 や poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1)を活性化し、DNA 損傷修復遺伝子の発現を増加させることにより、酸化ストレスから細胞を保護する働きがあることが明らかになった。レスベラトロールは TyrRS に結合し TyrRS のアミノアシル化活性を阻害することから、アミノアシル化活性の阻害を指標に、TyrRS または TrpRS と結合するポリフェノールを探索した。その結果、いくつかのポリフェノールがヒト TyrRS のアミノアシル化活性を阻害し、しかも、過酸化水素による細胞死から細胞を保護することに関与することが明らかになった。また、ヒト TrpRS に結合するポリフェノールも見つかると、ポリフェノールの TrpRS への結合に伴い TrpRS の蛋白質 - 蛋白質間相互作用が変化することも明らかになった。アミノアシル tRNA 合成酵素に結合しアミノアシル tRNA 合成酵素の機能を制御するポリフェノールについて解析を行った。今回見出したポリフェノールは、アミノアシル tRNA 合成酵素をターゲットとする癌の治療薬開発のために活用できると考えている。

(7) 細胞外から細胞内への高感度 Trp 取り込み機構の仮説

本プロジェクトで得られた実験結果をもとに、Trp 高感度取り込み機構を図 4 にまとめた。まず、細胞を IFN- γ で刺激すると、IDO1 と TrpRS の発現量が著しく増加する。IDO1 の発現量の増加は、Trp の代謝を促進し、Trp の欠乏状態に導く。細胞内の Trp の欠乏状態は、TrpRS と相互作用する蛋白質分子の発現量を増加させ、また、TrpRS の細胞外への分泌を誘導する可能性がある。その後、細胞外に分泌された TrpRS は細胞外の Trp と結合し、発現量が増加した TrpRS 相互作用蛋白質を介して、Trp を細胞内へ選択的に輸送する Trp 高感度取り込みが誘導されると考えられる。Trp 欠乏状態の細胞では、Trp と結合していない TrpRS が増加し、小胞体ストレスや GCN2-ATF4 経路が促進されると推測される。これらによって細胞膜上で TrpRS と相互作用する分子の増加と、TrpRS の細胞外への分泌や細胞膜への移行が起こり、細胞の Trp 高感度取り込みが誘導される可能性がある。

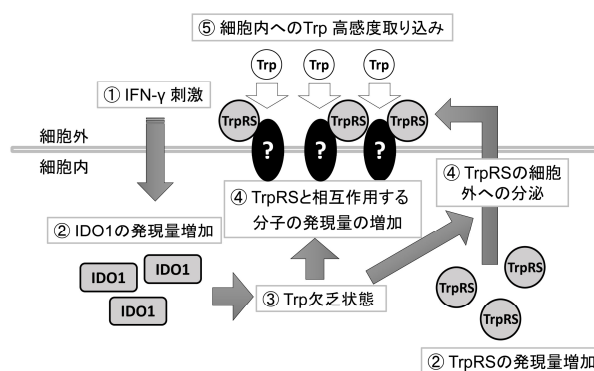


図 4. Trp 高感度取り込み機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokosawa Takumi, Sato Aomi, Wakasugi Keisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Tryptophan Depletion Modulates Tryptophanyl-tRNA Synthetase-Mediated High-Affinity Tryptophan Uptake into Human Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1423 ~ 1423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11121423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wakasugi Keisuke, Yokosawa Takumi	4. 巻 48
2. 論文標題 Non-canonical functions of human cytoplasmic tyrosyl-, tryptophanyl- and other aminoacyl-tRNA synthetases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Enzymes (Elsevier)	6. 最初と最後の頁 207 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.enz.2020.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 横沢 匠、若杉 柱輔
2. 発表標題 免疫寛容の誘導に関わる新規トリプトファン高感度取り込み機構の解明
3. 学会等名 第20回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横沢 匠、若杉 柱輔
2. 発表標題 トリプトファンの欠乏状態がTrpRSを介した高親和性Trp輸送に關与する
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wakasugi, K., and Yokosawa, T.
2. 発表標題 Tryptophanyl-tRNA synthetase mediates high-affinity tryptophan uptake into human cells
3. 学会等名 The 12th International NO Conference & The 22nd NOSJ, Sendai (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横沢 匠、若杉 桂輔
2. 発表標題 トリプトファン代謝酵素はトリプトファンtRNA合成酵素を介する細胞の高親和性トリプトファン取り込みを促進する
3. 学会等名 第22回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 希生、高塚 絢、横沢 匠、高橋 望、若杉 桂輔
2. 発表標題 ニューログロビンのヘム配位状態に依存的なヘテロ三量体Gタンパク質 サブユニットとの相互作用の解析
3. 学会等名 第22回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yokosawa, T., and Wakasugi, K.
2. 発表標題 Tryptophan depletion induces high-affinity tryptophan uptake mediated by tryptophanyl-tRNA synthetase into human cells
3. 学会等名 13th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases (AARS2023), Ontario, Canada (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 若杉桂輔	4. 発行年 2022年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 8
3. 書名 「ニューログロビン」、ヘムタンパク質の科学：生理機能の理解とその展開に向けて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------