

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月25日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570129

研究課題名（和文）チロシル及びトリプトファン tRNA 合成酵素の新規生理機能の探索

研究課題名（英文）Novel function of tyrosyl- and tryptophanyl-tRNA synthetases

研究代表者

若杉 桂輔 (Keisuke Wakasugi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：20322167

研究成果の概要（和文）：トリプトファン tRNA 合成酵素(TrpRS)は tRNA へのアミノアシル化反応を触媒する。私は以前、ヒト完全長 TrpRS から付加ドメインが切断された触媒活性ドメイン(mini TrpRS)が血管新生抑制因子として働くことを発見した。本研究では、ヒト完全長 TrpRS と mini TrpRS との構造上での違いについて解析した結果、Cys62 の周辺の環境に大きな違いがあることを明らかにした。また今回、ウシとマウス TrpRS のアミノアシル化活性はヘムあるいは亜鉛イオンの存在には依存せず常に活性が高く、ヘムや亜鉛イオンに結合し活性が上昇するヒト TrpRS の場合とは異なることを発見した。さらに、蛋白質工学を駆使し、ヒト TrpRS を常時活性型に、ウシ TrpRS をヘムあるいは亜鉛イオン依存型に相互に変換することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：Human tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS) catalyzes the aminoacylation of tRNA^{Trp}. Human TrpRS exists in two forms: a major form that is the full-length protein and a truncated form (mini TrpRS). Human mini, but not full-length, TrpRS has angiostatic activity. In the present study, I searched for conformational differences between the two proteins and showed that the molecular environment around Cys62 is significantly different between the two proteins. Previously, I demonstrated that binding of Zn²⁺ or heme to human TrpRS stimulates its aminoacylation activity. In the present study, bovine and mouse TrpRSs were found to be constitutively active regardless of the presence of Zn²⁺ or heme. Mutagenesis experiments demonstrated that the human H130R mutant is constitutively active and that the bovine R135H, E438A double mutant binds with Zn²⁺ or heme to enhance its aminoacylation activity as does human wild-type TrpRS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：蛋白質、酵素、新規機能、血管新生、制御機構

1. 研究開始当初の背景
チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) とトリプト

ファンル tRNA 合成酵素 (TrpRS) は、tRNA に
それぞれチロシン及びトリプトファンを結

合させる反応（アミノアシル化反応）を触媒する酵素であり、細胞質内で蛋白質合成において重要な役割を担っている。ヒトの TyrRS 及び TrpRS は、触媒活性には不必要な余分な付加ドメインをそれぞれ C 末端、N 末端にもっていることが報告されている。私は、ヒト TyrRS が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 (mini TyrRS) 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。また、ヒト mini TyrRS 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 もプロテアーゼにより余分な付加ドメインが切断されこの触媒活性ドメイン (mini TrpRS) は逆に血管新生抑制因子として働くことを明らかにした。さらに、ヒト TrpRS は 1 : 1 の割合で亜鉛イオンあるいはヘムを取り込み、亜鉛イオンやヘムの結合に伴ない TrpRS 活性が上昇することも明らかにした。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、血管新生抑制因子であるヒト mini TrpRS と血管新生抑制因子として働かないヒト完全長 TrpRS との構造面、機能面での違いを探索することに挑んだ。さらに、多機能性蛋白質へと進化した TrpRS の分子進化過程の解明を目指し、ヒト、ウシ、マウス、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナの TrpRS を発現・精製後、アミノアシル化活性を調べ、制御機構の生物種特異性を明らかにすることも行った。また、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 内では alternative splicing により C 末端側に 6 アミノ酸の付加配列を有する TrpRS が発現することが報告されており、この蛋白質の新規生理機能の解明にも挑んだ。

3. 研究の方法

ヒト、ウシ、マウス、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナの TrpRS cDNA を大腸菌での発現ベクターに導入した。大腸菌を用いた大量培養後、リコンビナント蛋白質を精製し、アミノアシル化活性測定を行った。また、紫外可視分光光度計、蛍光分光光度計、円偏光二色性測定装置による構造解析も行った。

4. 研究成果

(1) ヒト完全長 TrpRS と mini TrpRS との構造上での違いの探索

ヒト細胞内には 2 種類の TrpRS が存在する。一つは完全長 TrpRS であり、もう一つは alternative splicing により産生する mini TrpRS である。完全長 TrpRS, mini TrpRS は、ともにアミノアシル化活性を持っている。私は、以前、mini TrpRS が細胞外で血管新生抑

制因子として働き、他方、完全長 TrpRS は血管新生の制御因子として活性はないことを見出した。今回、完全長 TrpRS と mini TrpRS の細胞内での働きの違いについて検討した。その結果、酸化ストレス下 mini TrpRS は完全長 TrpRS と比べ Cys62 を介するジスルフィド結合により会合しやすいことが明らかになった。つまり、mini TrpRS 内の Cys62 の反応性が完全長 TrpRS 内の場合より、著しく増加していることを発見した。

これらの内容は、*Biochemistry* に投稿論文 (Wakasugi, K. An exposed cysteine residue of human angiostatic mini tryptophanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* (査読有) **49**, 3156-3160 (2010).) として発表した。

(2) 生物種特異的なアミノアシル化活性制御機構の発見

以前私は、ヒト TrpRS が亜鉛イオン及びヘムにより活性の制御を受けることが明らかにした。具体的には、ヒト TrpRS が 1 : 1 の割合でヘムと結合するヘム結合蛋白質であり、ヘムあるいは亜鉛イオンとの結合に伴ない TrpRS の酵素活性が著しく上昇することを初めて明らかにした。

今回、多機能性蛋白質である TrpRS の機能の分子進化の解明を目指す研究を行った。具体的には、ヒト以外に、ウシ、マウス由来の TrpRS をクローニングし、大腸菌での発現ベクターを作製し、蛋白質の精製方法を確立した。そして、亜鉛イオン、ヘム結合により、活性が制御されるかどうか解析した。その結果、亜鉛イオン、ヘムによる制御は、TrpRS の機能進化と密接に関連していることが明らかになった。ヒト以外のウシ、マウスの TrpRS のアミノアシル化活性は、ヘムあるいは亜鉛イオンの存在には依存せず、常に活性が高いことが明らかになった。この結果は、ヘムあるいは亜鉛イオンと結合した時のみアミノアシル化活性があらわれるヒト TrpRS との違いを明らかにした。さらに、蛋白質工学を駆使し、ヒト TrpRS を常時活性型に、ウシ TrpRS をヘムあるいは亜鉛イオン依存型に相互に変換することにも成功した。

これらの内容は、*FEBS Lett.* に投稿論文 (Wakasugi, K. Species-specific differences in the regulation of the aminoacylation activity of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* (査読有) **584**, 229-232 (2010).) として発表した。

(3) 種々の生物種由来のTrpRSの血管新生抑制能の解明

ヒト、ウシ、マウス、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナ由来のTrpRSを大腸菌で発現させた後、蛋白質精製を行った。今回、まず、ヒトTrpRS同様にN末端側に付加ドメインが存在するウシTrpRSにおいても、プロテアーゼにより付加ドメインが切断され、触媒活性ドメイン mini TrpRS が産生されることを明らかにした。さらに、様々な生物種由来TrpRSの血管新生抑制活性の測定を行い、相互に比較解析することにより、血管新生抑制能を獲得した TrpRS の分子進化について検討した。その結果、血管新生抑制能のある TrpRS と血管新生抑制能を持たない TrpRS とが存在することが明らかになった。現在、アミノ酸配列情報を基に、血管新生抑制能に重要なアミノ酸残基の特定を目指す研究に挑んでいる。

(4) マウスにおいて alternative splicing により生じる TrpRS 変異体の機能解析

以前、マウス胚性幹細胞(ES細胞)内で、alternative splicingによりC末端側に6アミノ酸が付加されることが報告された。本プロジェクトではRT-PCR解析によってalternative splicingによりC末端側に6アミノ酸を付加されたマウスTrpRS(6アミノ酸付加型)がES細胞で高発現していることを実証することに成功した。

さらに、マウス通常型TrpRS及び6アミノ酸付加型TrpRSとを大腸菌で大量発現させ精製後、アミノアシル化活性を比較検討した。その結果、マウス6アミノ酸付加型TrpRSは通常型TrpRSとは異なるアミノアシル化活性の制御機構を持っていることを発見した。現在、これら実験結果を投稿論文として執筆中である。

(5) ヒトTrpRSの翻訳後修飾の発見

ヒトのTrpRSは、20種類のアミノアシルtRNA合成酵素の中で唯一、インターフェロン γ (IFN- γ)を添加した細胞内で発現量が増加する酵素であり、単球からマクロファージや樹状細胞への細胞分化の際にも高発現することが報告されている。

本プロジェクトでは、ウエスタン・ブロット解析により、培養細胞の培地中へのIFN- γ の添加によりヒトTrpRSの発現量が著しく増加することが明らかになった。また、IFN- γ によりヒトmini TrpRSが翻訳後修飾を受けることを初めて明らかにした。今後、IFN- γ 処理

や細胞分化に伴うTrpRSの翻訳後修飾の部位の特定、翻訳後修飾の種類特定、さらに、翻訳後修飾によりTrpRSの生理活性がどのように変化するか解析する。

また、各種生物の中でヒトの場合のみIFN- γ によりTrpRSの発現量が著しく増加することが明らかになっており、ヒトTrpRSのIFN- γ による発現量の増加とヒトTrpRS特有の亜鉛イオンあるいはヘムによる活性制御機構とに関連があるかどうか現在解析中である。

(6) ヒトmini TyrRSとmini TrpRSの分子進化過程の解明に向けて

TyrRSとTrpRSとは触媒活性ドメインの構造が類似しているにも関わらず、血管新生能に関し全く正反対な働きをする。ヒトmini TyrRSとmini TrpRSの構造・機能解析を行い、類似点及び相違点を解明することに挑んだ。その結果、精製したヒトmini TyrRS、ヒトmini TrpRSに変性剤である尿素を加え変性させた後、蛋白質のリフォールディングを行ったところ、ヒトmini TrpRSは活性型にリフォールディングできる一方、mini TyrRSは不活性型になることが明らかになった。現在、活性型のmini TyrRSにリフォールディングできる実験条件を探索している。さらに、TyrRS、TrpRS間でドメインを相互に置換したキメラ蛋白質を作製し、それら蛋白質の構造・機能解析も現在行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. 若杉桂輔「新規機能性蛋白質の探索と創製」、日本化学会 生体機能関連化学部会 NEWS LETTER (査読有) **26**, 3-6 (2011).
2. 若杉桂輔「TOPICS: 化学的アプローチからの生命の神秘の探究」、東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻年報 Frontière 2010 (査読有)、双文社印刷、6-7 (2011).
3. Wakasugi, K. An exposed cysteine residue of human angiostatic mini

tryptophanyl-tRNA synthetase.
Biochemistry (査読有) **49**, 3156-3160
(2010).

4. Wakasugi, K. Species-specific differences in the regulation of the aminoacylation activity of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* (査読有) **584**, 229-232 (2010).
5. Wakasugi, K. Regulation of human tryptophanyl-tRNA synthetase activity by heme. *J. Biol. Inorg. Chem.* (査読有) **14**, S196 (2009).

[学会発表] (計 2 件)

1. 勝又理恵、若杉桂輔 「培養細胞におけるヒトのトリプトファン tRNA 合成酵素の発現解析」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学大会合同大会)、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸ポートアイランド
2. Wakasugi, K. “Regulation of human tryptophanyl-tRNA synthetase activity by heme”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 25-30, 2009, Nagoya.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
若杉 桂輔 (Keisuke Wakasugi)
東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：20322167

(2) 研究分担者 ()

無し
研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

無し
研究者番号：