

受賞者

若杉 桂輔

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

研究テーマ

細胞分化に関わるアミノアシルtRNA合成酵素の制御機構の解明

1. 序論

アミノアシルtRNA合成酵素は、tRNAにアミノ酸を結合させる反応（アミノアシル化反応）を触媒する蛋白質であり、蛋白質の翻訳系で重要な働きを担っている。私は、チロシンをtRNAに結合させるチロシルtRNA合成酵素(TyrRS)が、プロテアーゼによる切断の後、サイトカインとして機能することを発見した（文献1）。また、このTyrRSが血管新生促進因子として機能すること、さらに、分子進化的に近縁のトリプトファンをtRNAに結合させるトリプトファンil-tRNA合成酵素(TrpRS)が逆に血管新生抑制因子として働くことを発見した（文献2,3）。さらに、酸化ストレス時、TrpRSがグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（GapDH）と結合することにより、酸化ストレス下でTrpRS活性を制御していることも明らかにした（文献4）。

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への、また、単球から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、IFN- γ 添加時の高発現したTrpRSのアミノアシル化活性の制御機構の解明を行った。さらに、他の真核生物や他の哺乳類由来のTrpRSの大腸菌による発現系、精製方法を確立し、それらの活性測定を行うことにより、TrpRSのアミノアシル活性の制御機構の生物種間での違い、さらに、活性制御機構の分子進化過程の解明にも挑んだ。

2. 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。

3. 結果、研究成果

3-1. ヘム（プロトポルフィリン鉄錯体）によるヒトTrpRSのアミノアシル化活性制御の発見

ヒトTrpRSはヘム結合蛋白質であり、ヘムによりTrpRSの酵素活性が制御されていることを発見した（文献5,6）。ヒトのTrpRSはIFN- γ により細胞内の発現量が著しく増加する。この際、ヘムの合成阻害剤succinylacetoneを加えると、TrpRSの発現量には影響を与えずにTrpRSの活性が大きく減少すること、また、この系にヘムを外から補うとTrpRS活性が増加することを見出した（文献5,6）。ヒトTrpRSを大腸菌で発現させ精製後、紫外可視分光光度計などを用いたリコンビナント蛋白質の生化学的解析から、ヒトのTrpRSは1:1の割合でヘムと結合し、ヘムの結合に伴ないTrpRS活性が上昇することを明らかにした（文献5,6）。さらに、部位特異的なアミノ酸置換により、ヘムと結合しないTrpRS

変異体 (H130R TrpRS) の創製に成功した (文献5, 6)。現在、ヒトTrpRSにヘムが結合する生理学的意義のさらなる解明を目指している。

3-2. 様々な生物由来のTrpRSの比較解析によるTrpRS活性制御機構の分子進化の解明

下等真核生物や他の哺乳類由来などのアミノアシルtRNA合成酵素の大腸菌による発現系、精製方法を確立し、それらの活性測定を行い、アミノアシルtRNA合成酵素の分子進化過程の解明に挑んだ (文献6)。具体的には、ヒトの他に、ウシ、マウス、ゼブラフィッシュ、シロイヌナズナのTrpRSの大腸菌での発現ベクターを構築し、大腸菌を用いた大量培養後、蛋白質の精製を行った。各種生物由来のTrpRSのアミノアシル化活性の違い、特に、ヘム結合、亜鉛イオン結合により活性が制御されるかどうか解析を行った。さらに、それらの活性制御の比較に基づいて、活性調節の制御機構の分子進化について考察検討した (文献6)。この際、ヒトの蛋白質とのキメラ蛋白質や部位特異的アミノ酸置換体を作製し、構造及び機能解析を行った。現在、経時変化を追跡可能なタイムラプス機能を有する蛍光顕微鏡により、TrpRSの細胞内局在、細胞外への分泌などがあるかどうかなどについても解析している。

3-3. TrpRSによるAp3Aの産生機構の解明

TrpRSは、ジアデノシン3リン酸 (Ap3A) の合成及び消費を行うことができるが、他の多くのアミノアシルtRNA合成酵素はジアデノシン4リン酸 (Ap4A) の合成を触媒することが報告されている。このAp3AとAp4Aの相対的濃度比に依存し細胞は分化したり細胞死をおこしたりする。現在、TrpRSのAp3Aの産生メカニズム及び産生制御メカニズムの解明、及び、細胞分化との関連の解明に挑んでいる。

4. まとめ

本プロジェクトでは、ヒトを含め様々な生物種由来のTrpRSを発現、精製し、ヘムまたは亜鉛イオンによる活性制御機構を解析することにより、生物進化に伴うTrpRSの活性調節機構の進化を解明することに成功した。今後、TrpRSが多機能性蛋白質になった分子進化的な必然性の解明に向けて、TrpRSのさらなる機能探索を行って行く予定である。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Wakasugi, K., and Schimmel, P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**, 147-151 (1999).
- 2) Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Ewalt, K. L., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* (Accelerated Publication) **277**, 20124-20126 (2002).
- 3) Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K. L., Friedlander, M., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 173-177 (2002).
- 4) Wakasugi, K., Nakano, T., and Morishima, I. Oxidative stress-responsive intracellular regulation specific for the angiostatic form of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **44**, 225-232 (2005).

- 5) Wakasugi, K. Human tryptophanyl-tRNA synthetase binds with heme to enhance its aminoacylation activity. *Biochemistry* **46**, 11291-11298 (2007).
- 6) Wakasugi, K. Species-specific regulation of the aminoacylation activity of tryptophanyl-tRNA synthetase. Submitted for publication.