

## 論文の内容の要旨

論文題目 多機能性タンパク質であるトリプトファン tRNA 合成酵素  
の機能制御機構の解明

氏 名 宮ノ腰 美希

### 【背景と目的】

トリプトファン tRNA 合成酵素 (TrpRS) はアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) の一つであり、tRNA にトリプトファン (Trp) を付加するアミノアシル化反応を触媒する。タンパク質合成に必須である TrpRS はすべての生物が持つが、脊椎動物への進化に伴って N 末端に付加ドメインを獲得した。ヒトにおいては、通常の TrpRS (full-length TrpRS) の他に、alternative splicing により N 末端付加ドメインを欠いた mini TrpRS と、full-length TrpRS がプロテアーゼに切断されることで N 末端付加ドメインを欠いた T1 及び T2 TrpRS が存在し、血管新生の抑制に働くことが報告されている。

ヒトの単球では、サイトカインの一種であるインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) によって、マクロファージへと分化する際に Trp の取り込みが著しく増加することが報告されている。この取り込みは Trp に対する特異性、親和性が非常に高く、既知のトランスポーターとは異なる、新たな Trp トランスポーターが発現することが示唆された。また、IFN- $\gamma$  で刺激を受けた細胞では、ヒト TrpRS の発現量が大きく増加することが報告されている。分化に伴う Trp の取り込み量の増加、

即ち、新規 Trp トランスポーターの発現と、TrpRS の発現上昇が同時に起こることから、私は TrpRS が Trp の輸送に関与しているのではないかと推測し、これを検証することを本研究の第一の目的とした。さらに、ヒト TrpRS は、Trp の輸送に加え、アミノアシル化活性、血管新生抑制活性などの複数の機能を持つが、それらの機能がどのように制御されているのかは解明されていない。そこで、本研究では、ヒト TrpRS による Trp の輸送の制御機構の解明を進めることで、ヒト TrpRS の多機能制御機構の解明につなげる第一歩となることを目指した。

また、マウスにおいてはヒト full-length TrpRS に対応する TrpRS (FL-TrpRS) の他に、ヒトとは異なる alternative splicing が起こり、C 末端に 6 つのアミノ酸 (CFCFDT) が付加した TrpRS (SV-TrpRS) が産生されると報告された。SV-TrpRS は脳組織と比較して ES 細胞においてその発現が高いとされている。しかしながら SV-TrpRS については最初の一報以降、何も報告がされておらず、その発現制御や機能については不明である。そこで本研究では、マウス SV-TrpRS の発現、及びアミノアシル化活性を解析することを第二の目的とした。

## 【結果と考察】

### 1. ヒト TrpRS の新規機能の発見と制御機構の解明

#### (1) ヒト TrpRS が Trp を細胞内に輸送する

まず先行文献に倣い、ヒト培養細胞に IFN- $\gamma$  を処理したところ、無処理の細胞と比較して Trp の取り込みが著しく増加した (図 1 A)。このとき同時にヒト TrpRS の発現量は大きく上昇した (図 1 B)。IFN- $\gamma$  処理細胞に siRNA を用いてヒト TrpRS を抑制すると Trp の取り込み量は減少し (図 1 A, B)、一方で細胞発現用ベクターを用いてヒト TrpRS を過剰発現させた細胞では Trp の取り込み量が上昇したことから、ヒト TrpRS の発現量と Trp の取り込み量が相関することを発見した。さらに、大腸菌で発現させ、精製したヒト TrpRS を Trp と同時に細胞外に添加した場合にも、細胞内への Trp の取り込みが見られたことから、ヒト TrpRS が Trp を輸送することが明らかになった。また、蛍光標識したヒト TrpRS の細胞内移行も観察された。すでにヒト TrpRS の分泌は報告されていることから、分泌されたヒト TrpRS が Trp を結合して細胞膜透過することが示唆された (図 1 C)。

#### (2) Trp の輸送には ATP 結合部位が重要である

ヒト TrpRS が Trp をどのように輸送するのかを調べるため、アミノアシル化活性の基質である Trp、ATP、tRNA の結合部位にそれぞれ変異を入れたヒト TrpRS 変異体を培養細胞に過剰発現

させた。その結果、Trp と ATP の結合部位の変異体では Trp の取り込みが見れらず、tRNA の結合部位の変異体では Trp の取り込みが見られた。このことから、ヒト TrpRS の ATP 結合部位が Trp の輸送に重要なことが明らかになり、Trp-AMP として Trp を輸送する可能性が示唆された。

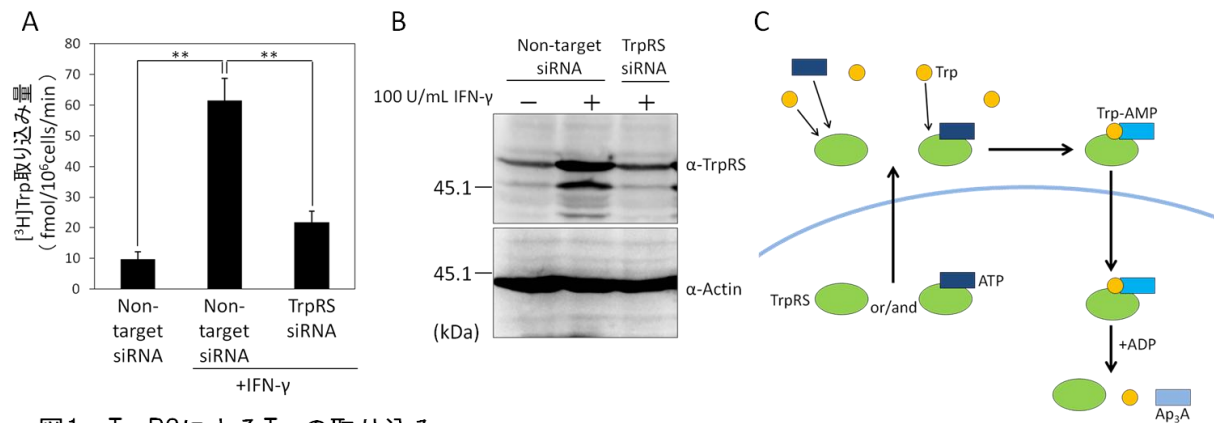


図1 TrpRSによるTrpの取り込み

(A) IFN- $\gamma$ 、siRNA処理した細胞におけるTrpの取り込み量 (\*\*;  $p < 0.01$ )

(B) IFN- $\gamma$ 、siRNA処理した細胞破碎液のWestern blot解析

(C) TrpRSによるTrpの取り込みの仮説

## 2. マウス SV-TrpRS の発現及び機能解析

### (1) マウス SV-TrpRS の発現は組織特異的である

マウス SV-TrpRS の存在を報告した最初の論文では、マウスの脳組織と比較して ES 細胞において SV-TrpRS が高く発現していることが報告された。それを受けて今回、マウスの ES 細胞、各組織、培養細胞における FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現を Real-time RT-PCR により解析した。その結果、SV-TrpRS はマウスのさまざまな組織で発現しており、特に胚や子宮、肺、肝臓、脾臓においてその発現が高いこと、その一方で脳組織では SV-TrpRS の発現が非常に低いことを明らかにした (図 2 A)。また、従来 IFN- $\gamma$  による TrpRS の発現誘導はヒトの場合のみ起こると考えられていたが、今回初めて、マウス肝癌細胞 Hepa1-6 に IFN- $\gamma$  を処理した場合には、ヒトと同様に TrpRS の発現が上昇することを見出した。

### (2) マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性は低く制御されている

マウス FL-TrpRS 及び SV-TrpRS の大腸菌での発現・精製系を確立した。精製した FL-TrpRS、SV-TrpRS のアミノアシル化活性を測定したところ、SV-TrpRS は FL-TrpRS の 50% 程度の活性を示した (図 2 B)。そこで、SV-TrpRS の C 末端付加配列に含まれる 2 つの Cys 残基を Ser に

置換した変異体（C476S/C478S）を作製したところ、C476S/C478S では FL-TrpRS と同様に高い活性を示した。このことから、SV-TrpRS のアミノアシル化活性が金属によって制御されている可能性が示唆された。

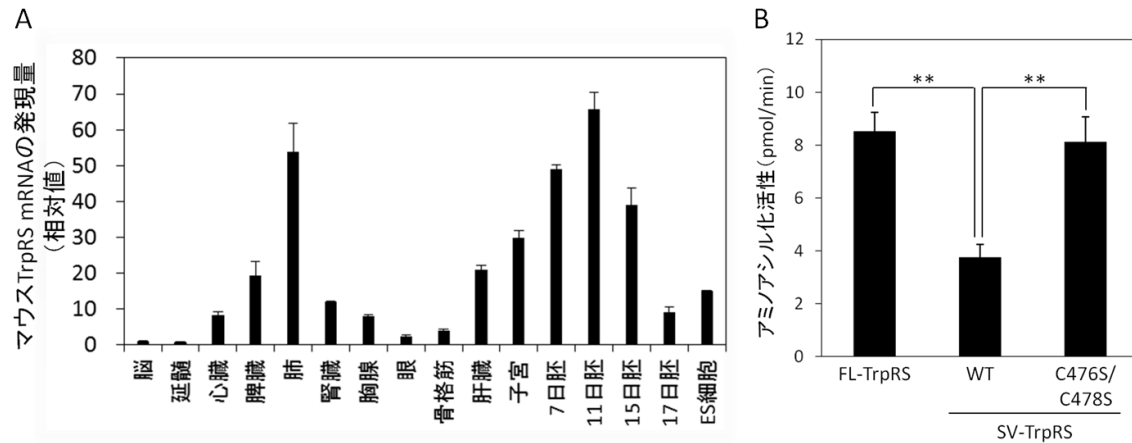


図2 マウスSV-TrpRSの発現及びアミノアシル化活性

(A) マウスSV-TrpRSの各組織、胚における発現量（脳における発現量を1とした相対値）

(B) マウスFL-TrpRS、SV-TrpRSのアミノアシル化活性 (\*\*;  $p < 0.01$ )

## 【まとめ】

ヒト TrpRS の研究では、ヒト TrpRS が Trp の輸送を行うことを初めて明らかにした。細胞内で発現が上昇したヒト TrpRS の一部が細胞外へと分泌され、Trp-AMP の形で Trp を結合し、細胞膜を透過して細胞内へと Trp を輸送すると考えられる。

マウス TrpRS の研究では、マウスに特有な SV-TrpRS の発現量が組織によって大きく異なることを発見した。また、ヒト TrpRS と同様にマウス FL-TrpRS、SV-TrpRS も IFN- $\gamma$  によって発現誘導を受けることを明らかにした。マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性は、C 末端付加配列の Cys 残基によって FL-TrpRS の 50%程度と低く制御されていた。

## 【発表論文】

本研究のマウス SV-TrpRS に関する成果は以下の論文において発表した。

Miyanokoshi, M., Tanaka, T., Tamai, M., Tagawa, Y. and Wakasugi, K. (2013) Expression of the rodent-specific alternative splice variant of tryptophanyl-tRNA synthetase in murine tissues and cells. *Sci. Rep.* **3**, 3477.