

博士論文（要約）

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

宮ノ腰 美希

目次

略語一覧	1
1. 序論	3
2. 第一章.....	7
第一章は、現在、国際誌への投稿準備中であるため、ここに掲載できない。 5年以内に出版予定である。	
3. 第二章	
3.1 要旨	8
3.2 序論	9
3.3 方法	10
3.4 結果	17
3.5 考察	35
4. 結論	40
5. 参考文献	41
謝辞.....	48

略語一覧

aaRS	アミノアシルtRNA合成酵素 (Aminoacyl-tRNA synthetase)
ADP	アデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate)
AMP	アデノシン一リン酸 (Adenosine monophosphate)
Ap ₃ A	ジアデノシン三リン酸 (Diadenosine triphosphate)
ATP	アデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate)
BCH	2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid
cDNA	相補的 DNA (Complementary DNA)
CHO細胞	チャイニーズハムスター卵巣細胞 (Chinese hamster ovary cell)
DEPC	ジエチルピロカーボネート (Diethylpyrocarbonate)
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DPO	2,5-ジフェニルオキサゾール (2,5-Diphenyloxazole)
DTT	ジチオトレイトール (Dithiothreitol)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediamine tetraacetic acid)
ES細胞	胚性幹細胞 (Embryonic stem cell)
FBS	胎児ウシ血清 (Fetal bovine serum)
Fhit	Fragile histidine traid
FITC	フルオレセイン 4-イソチオシアネート (Fluorescein-4-isothiocyanate)
FM4-64	3-トリエチルアンモニウムプロピル)-4-(6-(4-(ジエチルアミノ)フェニル)ヘキサトリエ ニル)ピリジニウム (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium)
GAG	グリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan)
GapDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

GAS IFN- γ 活性部位 (IFN- γ activation site)

HPRT ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)

IDO インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (Indoleamine 2,3-dioxygenase)

IFN- γ インターフェロン- γ (Interferon-gamma)

IPTG イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (Isopropyl- β -thiogalactopyranoside)

ISRE IFN 刺激応答因子 (IFN- stimulated response elements)

LAT 大型アミノ酸輸送体 (Large amino acid transporter)

mRNA メッセンジャーRNA (Messenger RNA)

NAD ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Nicotinamide adenine dinucleotide)

PBS リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)

PCR ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction)

PMSF フッ化フェニルメチルスルホニル (Phenylmethylsulfonyl fluoride)

POPOP 1,4-ビス(5-フェニル-2-オキサゾリル)-ベンゼン (1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzene)

PPi ピロリン酸 (Pyrophosphoric acid)

PVDF ポリフッ化ビニリデン (Polyvinylidene difluoride)

RT-PCR 逆転写PCR (Reverse transcription PCR)

S100A10 S100 calcium-binding protein A10

SDS ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate)

siRNA Small interfering RNA

TCA トリクロロ酢酸 (Trichloroacetic acid)

tRNA 運搬RNA (Transfer RNA)

Trp トリプトファン (Tryptophan)

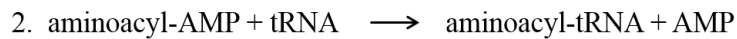
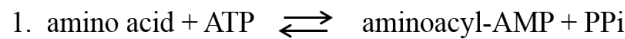
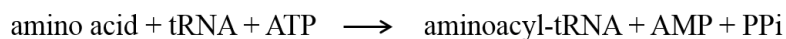
TrpRS トリプトファン tRNA 合成酵素 (Tryptophanyl-tRNA synthetase)

Trp-SA 5'-O- [N (L-tryptophanyl) sulfamoyl] adenosine

TyrRS チロシル tRNA 合成酵素 (Tyrosyl-tRNA synthetase)

1. 序論

生体内では、遺伝情報である DNA の配列を基にアミノ酸が並び、タンパク質が合成される。このタンパク質合成の場には、運搬 RNA (tRNA) と呼ばれる RNA がアミノ酸を運ぶ。tRNA に対して対応するアミノ酸を付加するアミノアシル化反応を触媒する酵素がアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) であり、20 種類のアミノ酸それぞれに対応する酵素が存在する。各 aaRS の触媒するアミノアシル化反応は、次に示す 2 段階から成り立つ。



第一段階として、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを利用してアミノ酸のカルボキシル基が AMP と結合した高エネルギー状態のアデニル化アミノ酸が合成される。この反応は可逆である。第二段階として、アデニル化アミノ酸のカルボキシル基が tRNA の 3'末端にあるヒドロキシ基に転移し、アミノ酸と tRNA がエステル結合を生じてアミノアシル tRNA となる不可逆の反応が起こる。

タンパク質の合成に必須である aaRS は、生物の生存に必須であり、原核生物から真核生物まで全ての生物において保存されており、生物進化に伴って分子進化を遂げた。高等生物の aaRS では、下等生物には見られない付加ドメインを獲得し、獲得した付加ドメインの作用により、翻訳だけに留まらない新規機能を持つことが数多く報告されている。例えば、ヒトのグルタミル-プロリル tRNA 合成酵素は、サイトカインであるインターフェロン γ (IFN- γ) に応答して GAIT (IFN- γ -activated inhibitor of translation) を形成し、IFN- γ によるタンパク質発現誘導を抑制する (1)。ヒトのセリル tRNA 合成酵素は、C 末端の脊椎動物特有なドメインに存在する核移行配列によって核に移行し、血管内皮細胞増殖因子 A の転写抑制因子として機能し、血管新生を制御する (2)。さらに、ヒトのチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) は、C 末端側に下等生物には存在しない付加ドメインを持ち、プロテアーゼによって付加ドメインが切断されると、好中球を活性化させるサイトカイン、あるいは血管新生促進因子として機能する (3)。

トリプトファン tRNA 合成酵素 (TrpRS) は、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。TrpRS はその立体構造が X 線結晶構造解析によって解析され、TyrRS のホモログであり、進化的に最も近いことが明らかになっている (図 1 A) (4, 5)。ヒトを始め、脊椎動物の TrpRS は N 末端に付加ドメインを持ち、ヒトでは、通常の TrpRS (full-length TrpRS) の他に alternative splicing によって N 末端付加ドメインの一部 (1-47 アミノ酸残基) を欠いた mini TrpRS が産生される (6-8)。この mini TrpRS はヒトでのみ報告されており、アミノアシル化活性に加えて、血管新生抑制活性を持つ (図 1 B) (9, 10)。また、ヒト full-length TrpRS はプロテアーゼによる N 末端の切断を受け、T1 TrpRS (71-471 アミノ酸残基)、T2 TrpRS (94-471 アミノ酸残基) を生じる。これら T1 TrpRS、T2 TrpRS も血管新生抑制活性を持つが、T2 TrpRS に限り、N 末端付加ドメインに加え、触媒活性ドメインの一部を欠くために、アミノアシル化活性を欠落している (図 1 B) (10)。

ヒト TrpRS は、aaRS の中で唯一、IFN- γ による発現誘導を受ける (11, 12)。また、他の aaRS と比較して組織間の発現量の差が非常に大きい (13)。しかしながら、ヒト TrpRS にこのような発現変化が起こる意義は解明されていない。そこで、私は博士課程において、発現上昇したヒト TrpRS の機能を解明することを第一章の目的とした。さらに、多機能性タンパク質であるヒト TrpRS がそれぞれの機能をどのように制御しているのかを解明することを目指した。

また、ヒト TrpRS においては alternative splicing によって N 末端を欠いた mini TrpRS が産生するが、マウスではヒトとは異なる alternative splicing variant (SV-TrpRS) が生じる (14)。この SV-TrpRS は、マウス ES 細胞において脳と比較して高く発現していることが報告されており、通常の full-length TrpRS (FL-TrpRS) の C 末端に 6 つのアミノ酸 (Cys-Phe-Cys-Phe-Asp-Thr) を付加している (図 1 C)。データベースで検索したところ、ラットでもマウス同様の SV-TrpRS が存在することがわかった。しかしながら、このげっ歯類に特異的な SV-TrpRS に関しては、SV-TrpRS の存在を報告した初めの一報以降、何も報告されておらず、SV-TrpRS の発現部位や機能については全く不明であった。そこで私は、マウスの組織における FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現部位の解析と、マウスに特異的な SV-TrpRS の機能の解明を第二章の目的とした。

私は、博士課程において上述した 2 つの目的を達成することにより、多機能性タンパク質であ

る TrpRS の機能の制御機構の解明と、その生物種特異性を明らかにすることを目指し、研究を進めた。これが明らかになれば、TrpRS 以外の aaRS に関しても、機能の制御がどのように行われるのかを解明する手掛かりになると期待できる。

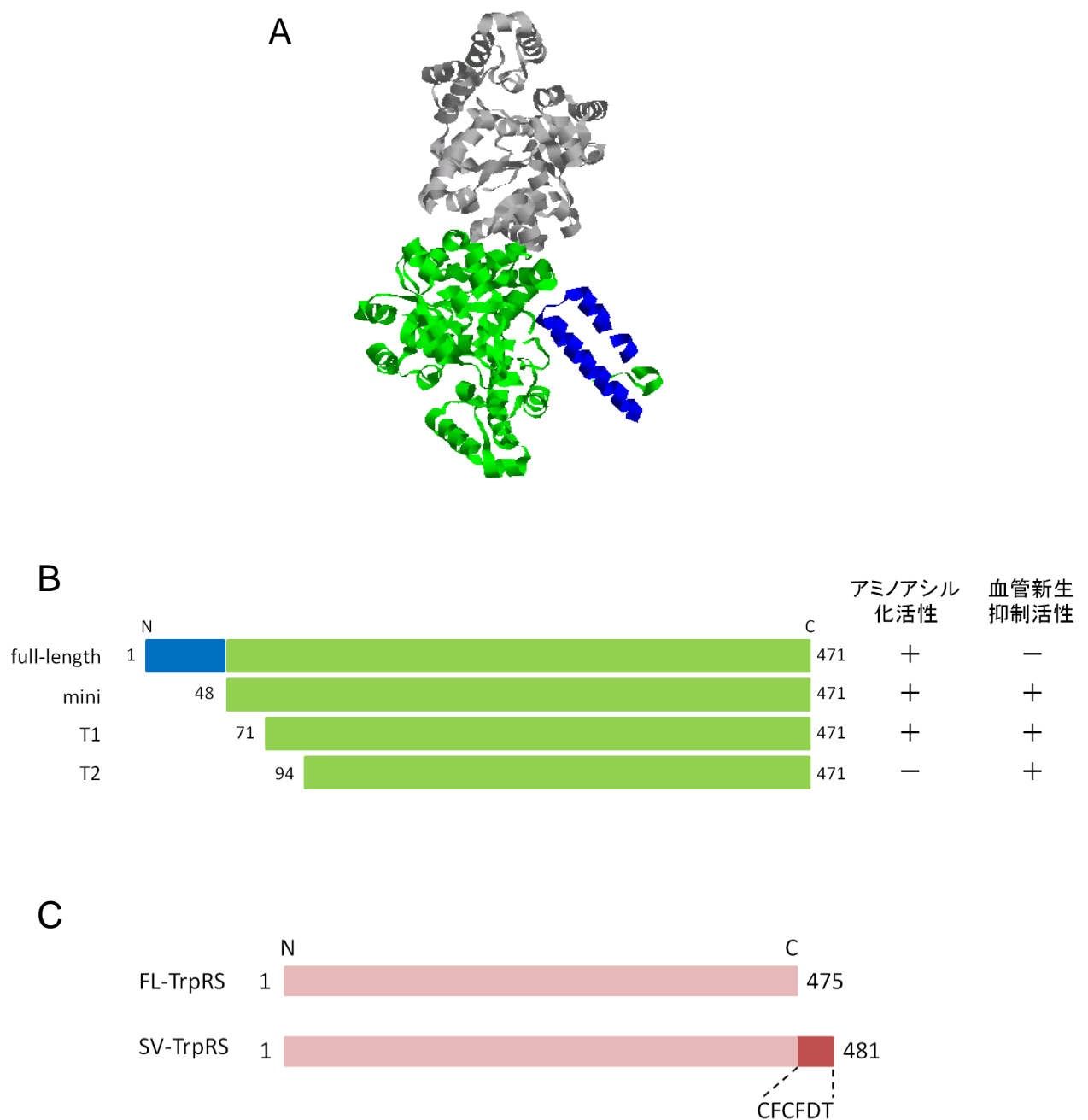


図 1 ヒト TrpRS の結晶構造及びヒト TrpRS、マウス TrpRS の一次構造

- (A) ヒト TrpRS 二量体の結晶構造。青色は N 末端付加ドメインを示す。二量体のうち一方(灰色)の N 末端付加ドメインは構造が揺らいでおり、解析されていない。(Protein Data Bank entry 1R6T)
- (B) ヒト TrpRS 多型の一次構造の模式図とそれぞれの機能。
- (C) マウス TrpRS の一次構造。マウス SV-TrpRS に特有な C 末端付加配列を赤で示した。

2 第一章

第一章では、細胞内で発現量が増加したヒト TrpRS の機能を解明することを目的に研究を進めた。

現在、国際誌への投稿準備中であるため、ここに掲載できないが、5 年以内には出版予定である。

3 第二章

3.1 要旨

マウスに特有な alternative splicing によって産生する SV-TrpRS は、ヒト full-length TrpRS に相当する FL-TrpRS の C 末端に 6 つのアミノ酸 (Cys-Phe-Cys-Phe-Asp-Thr) が付加している。SV-TrpRS の mRNA の発現は、脳と比較して、ES 細胞において発現が高いことが報告されている。本研究の第二章では、SV-TrpRS の mRNA を特異的に検出することのできるプライマーを設計し、Real-time RT-PCR により、マウスに特有な SV-TrpRS の ES 細胞、各組織、胚における発現を mRNA レベルで解析した。その結果、マウス SV-TrpRS は ES 細胞に限らず、さまざまな組織において発現しており、特に肺や肝臓、脾臓、子宮、胚で高い発現を示した。一方、脳における発現量は、FL-TrpRS と比較して非常に低いことを発見した。さらに、マウス培養細胞の Real-time RT-PCR による mRNA 発現解析から、マウス FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現量が、ヒト TrpRS と同様に IFN- γ によって上昇することを初めて明らかにした。また、大腸菌を用いて発現、精製したマウス FL-TrpRS、SV-TrpRS のアミノアシル化活性を解析したところ、SV-TrpRS のアミノアシル化活性が FL-TrpRS と比較して 50%程度であった。アミノ酸置換変異体解析の結果、SV-TrpRS の C 末端付加配列に存在する Cys 残基によって、アミノアシル化活性が低く制御されていることが明らかになり、ヒト TrpRS と同様に金属による制御が行われている可能性が示唆された。

3.1 序論

ヒト TrpRS に関しては、アミノアシル化活性、血管新生抑制活性の研究を中心に、これまでも多くの研究がなされてきた。ヒト以外の生物種の TrpRS に関しては、例えば、ウシにおいて、アミノ酸残基が一カ所だけ置換した 2 種類の TrpRS が存在することや、膵臓から TrpRS が多く分泌されることが報告されている (47)。また、ヒト TrpRS においては alternative splicing によって N 末端を欠いた mini TrpRS が産生するが、マウスではヒトとは異なる alternative splicing variant TrpRS (SV-TrpRS) が生じることが報告されている (14)。しかしながら、これらの報告に続報はなく、ヒト以外の生物種の TrpRS に関する研究は非常に少ない。そこで、本研究では、マウス特有なスプライス変異体である SV-TrpRS に着目し、その発現と機能を解析することを第二章の目的とした。

マウスに特有な SV-TrpRS は、マウス ES 細胞において脳と比較して高く発現していることが報告されており、ヒト full-length TrpRS に相当するマウス FL-TrpRS の C 末端に 6 つのアミノ酸 (Cys-Phe-Cys-Phe-Asp-Thr) が付加している。データベースで検索したところ、ラットでもマウス同様の SV-TrpRS が存在することが分かり、げっ歯類に特有なスプライシングが起きていることが示唆された。しかしながら、このげっ歯類に特異的な SV-TrpRS に関しては、SV-TrpRS の存在と、その配列上の特徴を報告した初めの一報以降、何も報告されておらず、SV-TrpRS の発現部位や機能については全く不明であった。そこで本研究の第二章では、マウスの各組織や胚、細胞における FL-TrpRS、SV-TrpRS の mRNA レベル、タンパク質レベルでの発現を解析することを第一の目的とした。さらに、大腸菌を用いて作製したマウス FL-TrpRS、SV-TrpRS のアミノアシル化活性の解析により、機能面での SV-TrpRS の特徴を調べることを第二の目的とした。

3.3. 材料・方法

3.3.1 発現ベクターの準備

マウス FL-TrpRS、SV-TrpRS の細胞発現用ベクター (pcDNA3.1 myc-His (-) B)、大腸菌発現用ベクター (pET151D) については、すでに研究室で作製済みのものを使用した。

3.3.2 発現ベクターの調製

大腸菌からのタンパク質精製に用いたベクターは、*Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α に形質転換し、QIAprep SPIN Miniprep kit (QIAGEN) を用い、そのプロトコルに従って精製した。

3.3.3 変異体の作製

ベクターへの部位特異的変異の導入は、Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) のプロトコルに従い行った。具体的には、変異を含むプライマー (表 3-1) を用意し、野生型 TrpRS が挿入されたプラスミドを鋳型とし、その全長を PCR 反応により増幅した。この PCR 産物に *Dpn* I を加え、37 °C で 1 時間インキュベートすることで、アデニンがメチル化されている鋳型プラスミドを選択的に分解した。これを井上・野島法によって *E.coli* DH5 α 株に形質転換し、TYE 寒天培地にまき、37 °C で一晚培養後、形質転換体を含むコロニーを得た。変異が導入されたことは、DNA シーケンスの解析により確認した。

表 3-1 : 変異体作製に用いたプライマー

変異	配列	
C476S	Fw	5'-CCTTCCACTTCCAGTCCTTCTGCTTTGACAC-3'
	Rv	5'-GTGTCAAAGCAGAAGGACTGGAAGTGAAGC-3'
C478S	Fw	5'-CCACTTCCAGTGCTTCTCCTTTGACACTTG-3'
	Rv	5'-CAAGTGTCAAAGGAGAAGCACTGGAAGTGG-3'
E155Q	Fw	5'-GAATCAAATTCTGGATGCCTATCAAAATAAGAAGCCATTCTACC-3'
	Rv	5'-GGTAGAATGGCTTCTTATTTTGATAGGCATCCAGAATTTGATTG-3'
D189N	Fw	5'-CACAAAGTGGCTACAGAATGTGTTCAATGTGCCTTTGG-3'
	Rv	5'-CCAAAGGCACATTGAACACATTCTGTAGCCACTTTGTG-3'
C229S	Fw	5'-GCAAAGGACATCATTGCCTCTGGCTTCGACATCAACAAAAC-3'
	Rv	5'-GTTTTGTTGATGTGCGAAGCCAGAGGCAATGATGTCCTTTGC-3'
D232N	Fw	5'-GGACATCATTGCCTGTGGCTTCAACATCAACAAAACCTTCATCTTC-3'
	Rv	5'-GAAGATGAAAGTTTTGTTGATGTTGAAGCCACAGGCAATGATGTCC-3'
D306N	Fw	5'-GATCTTCCGAGACAGGACAAAATATCCAGTGCCACATCCCGTGTG-3'
	Rv	5'-CACACGGGATGTGGCACTGGATATTTGTCCTGTCTCGGAAGATC-3'
H473A	Fw	5'-CCAGGCAGCTGTCCTTCGCCTTCCAGTGCTTCTGCTTTGACAC-3'
	Rv	5'-GTGTCAAAGCAGAAGCACTGGAAGGCGAAGGACAGCTGCCTGG-3'
D480N	Fw	5'-CCACTTCCAGTGCTTCTGCTTTAACAATTGAAAGGGCGAGCTCAG-3'
	Rv	5'-CTGAGCTCGCCCTTTCAAGTGTTAAAGCAGAAGCACTGGAAGTGG-3'

3.3.4 細胞培養

マウス肝癌細胞株 (Hepa1-6 細胞)、マウス白血球由来癌細胞株 (RAW264 細胞)、マウス神経芽細胞腫 (Neuro-2a 細胞) は 4.5 g/L グルコースを含む DMEM に、10% (v/v) FBS、2 mM グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを加えて 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。3 または 4 日置きに培地交換を行い、90% コンフルエントに達し次第継代した。

3.3.5 細胞への IFN- γ 処理

Hepa1-6 細胞、RAW264 細胞、Neuro-2a 細胞は 35 mm dish に 4×10⁵ cells/mL で播き、翌日マウス IFN- γ を終濃度 100 U/mL となるように添加し、37 °C、5% CO₂ で 24 時間培養した。

3.3.6 Neuro-2a 細胞の分化処理

Neuro-2a 細胞は、poly-D-Lysin dish に 3×10^4 cells/mL で播き、 37°C 、5% CO_2 のインキュベーター内で一晩培養した後、培地を 2% (v/v) FBS, 2 mM グルタミン、20 μM のレチノイン酸を含む DMEM 培地に交換することで分化を促進した。IFN- γ 処理を行う場合には、分化処理 5 日後に 100 U/mL マウス IFN- γ を添加し、さらに一晩培養した。

3.3.7 細胞内 mRNA の回収

Total RNA Mini Kit (BIO-RAD) を用い、そのプロトコルに従って精製した。具体的には、培養細胞の培地を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、回収した。500 G、10 分遠心して PBS を除き、風乾後に Lysis Solution、70% エタノールを加えて懸濁し、遠心してカラムに通した。続いて Low-stringency wash solution をカラムに通し、*DNase* I をカラムに加えて 15 分処理した。再び遠心した後、High stringency wash solution、Low stringency wash solution を順次カラムに通し、Elution solution で溶出した。溶出した mRNA は -20°C で保存した。

3.3.8 Real-time RT-PCR

培養細胞から回収した mRNA、Mouse Total RNA Master Panel (Clontech) の mRNA をもとに逆転写反応を行い、cDNA を作成した。具体的には、RNA 5 μL を DEPC 処理水で 11 μL に調製し、1 μL Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (invitrogen) を加えた。そして 65°C 、5 分反応後、氷上に移し 10 mM dNTP (invitrogen) 1 μL 、PCR Grade Buffer (invitrogen) 4 μL 、0.1 M DTT (invitrogen) 2 μL 加えた。この調製液を 3.3°C 、2 分静置後、SuperScript II Reverse Transcriptase (invitrogen) 1 μL を加え、 3.3°C 、50 分で逆転写を行った。その後、 70°C 、15 分で酵素を失活させ、Ribonuclease H (invitrogen) 1 μL 加えて 37°C 、20 分静置した。 100°C 、5 分で酵素を失活させた後、 -20°C で保存した。

逆転写反応によって作成したマウス培養細胞 cDNA、組織 cDNA、そしてマウス ES 細胞 (ST1、E14.1) cDNA は C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD) を用いて定量を行った。マウス ES 細胞 cDNA は東京工業大学 田川陽一准教授から譲渡されたものを用いた。これらの cDNA とプライ

マー、iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) を混合し、Real-time PCR 反応解析を行った。結果は全て、ハウスキーピング遺伝子である HPRT (ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) を用いて標準化し、脳組織における HPRT に対する TrpRS の発現量を 1 とした、相対値で示した。使用したプライマーは、HPRT には HPRT primer set (HPRT forward primer、HPRT reverse primer)、FL-TrpRS と SV-TrpRS の両者を測定するものには Total primer set (Total forward primer、Total reverse primer)、SV-TrpRS を特異的に認識するものには SV1 primer set (SV1 forward primer、SV1 reverse primer) 及び、SV2 primer set (SV2 forward primer、SV2 reverse primer) を用いた (配列は表 3-2 に記載)。反応サイクルは以下の 2 通りである。まず HPRT primer set と Total primer set は 95 °C、30 秒を経た後、95 °C で 5 秒処理した後、55 °C で 20 秒処理するという反応サイクルを 40 回繰り返した。また SV1 primer set と SV2 primer set は 95 °C、30 秒を経た後、95 °C、5 秒処理した後、55.7 °C で 20 秒処理するという反応サイクルを 40 回繰り返した。

表 3-2 : Real-time RT-PCR に用いたプライマー

名前	標的	配列	
HPRT	HPRT	Fw	5'-ATACAGGCCAGACTTTGTTGG-3'
		Rv	5'-CAACTTGCGCTCATCTTAGG-3'
Total	FL-TrpRS, SV-TrpRS	Fw	5'-GAAAGGCATTTTCGGCTTTACG-3'
		Rv	5'-GATGAGGCACTGGATATCTG-3'
SV1	SV-TrpRS	Fw	5'-CTGTCCTTCCACTTCCAG-3'
		Rv	5'-CTGCTGTTCTTTTCTGTCTAG-3'
SV2	SV-TrpRS	Fw	5'-GGAGCAGATCAGAAAGGATTAC-3'
		Rv	5'-TCAAAGCAGAAGCACTGGAAG-3'

3.3.9 細胞へのプラスミド導入

Hepa1-6 細胞は 35 mm dish に 4×10^5 cells/mL で播き、翌日、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) のプロトコルに従って哺乳動物発現ベクターである pcDNA4 His Max に挿入したマウス TrpRS の導入を行い、37 °C、5% CO₂ で 24 時間培養した。

3.3.10 細胞の回収

dish から培地を除き、PBS で洗浄した。Lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% NP-40, 0.4% (v/v) PMSF, プロテアーゼインヒビターカクテル) を加え、セルスクレーパーで細胞を剥がした。超音波破碎の後、15,000 rpm、4 °C、10 分遠心し、可溶性画分に等量の 2×SDS loading buffer を加えた。

3.3.11 Western blot 解析

15% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いて試料を分離し、Trans-Blot® SD Cell (BIO-RAD) を用いて 100 mA、1 時間で Poly Vinylene DiFluoride (PVDF) 膜にタンパク質を転写した。その後、PVDF 膜をブロッキング溶液 (5% スkimミルク、1% Tween、10 mM Tris-HCl (pH8.0)) でブロッキングし、洗浄バッファー (1% Tween、10 mM Tris-HCl (pH8.0)) で洗浄後、500 倍希釈した一次抗体 (表 3-3) で室温、1 時間振とうした。一次抗体反応後、洗浄バッファーで洗浄し、5000 倍希釈した ECL Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase Linked Whole Antibody (from sheep) あるいは ECL Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase Linked F (ab')₂ fragment (from donkey) (どちらも GE Healthcare) で室温、1 時間振とうした。二時抗体を洗浄バッファーで洗浄後、LAS 4000 mini (GE health care) により発光を検出した。

表 3-3 : 一次抗体

標的タンパク質	抗体名	二次抗体	会社名
マウス TrpRS	polyclonal WRS antibody	rabbit	invitrogen
6×His tag	anti-His C-term	mouse	invitrogen
マウス Actin	monoclonal anti-β actin antibody	mouse	SIGMA-ALDRICH

3.3.12 タンパク質の発現・精製

マウス TrpRS の発現および精製は、次のように行った。pET151D に挿入されたマウス TrpRS のプラスミドを用い、塩化カルシウム法によって *E.coli* BL21 (DE3) に形質転換し

て TYE 寒天培地上で一晩培養した。得られた菌体を 100 μ g/ml アンピシリンを添加した 2×TY 培地で 37 °C、5 時間培養した後、0.4 mM イソプロピル- β -D-ガラクトピラノシド (IPTG) を添加して、TrpRS または IDO1 の発現を 37 °C 下で 4 時間誘導した。菌体は 4,500 rpm、室温で 7 分間遠心して回収し、-20 °C 下で保存した。

タンパク質精製は pET System Manual (Novagen) に従い、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより行った。回収した菌体を Binding buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、500 mM NaCl、5 mM イミダゾール)、0.4% (v/v) PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテルに懸濁し、氷上で超音波破碎後、4 °C、10,000 rpm、30 分遠心し上清を回収した。Charge buffer (50 mM NiSO₄) を用いて Ni を補填し、Binding buffer で平衡化した Ni-NTA His Bind Resin (Novagen) に遠心上清を添加した。カラムを Binding buffer で洗浄後、さらに Wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、500 mM NaCl、60 mM イミダゾール) で洗浄し、Elute buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、500 mM NaCl、1 M イミダゾール) により 6×His タグ付きの目的タンパク質を回収した。得られたタンパク質は Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) を用いて Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) にバッファ一置換し、-80°C 下に保存した。

3.3.13 アミノアシル化活性の測定

前処理として 3 MM paper filter (Whatman) に 5% トリクロロ酢酸 (TCA) を滴下し、1 時間乾燥させた。反応液は 150 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM KCl、10 mM MgCl₂、4 mM ATP、19 μ M Trp、1 μ M [³H]Trp (PerkinElmer) に、72 °C、2 分インキュベートした Yeast-tRNA (Roche) を終濃度 500 μ M となるように加え、室温で 30 分静置することで tRNA のリフォールディングを促した。反応液に終濃度 100 nM になるよう TrpRS を加えて反応を開始し、経時変化に伴って反応液を filter に滴下し、反応を停止させ、2 mM Trp を含む 5% TCA で洗浄後、99.5% エタノールですすいだ。filter は室温、1 時間乾燥させた後、0.5 mM 2,5-ジフェニル・オキサゾール (DPO)、16.5 mM 1,4-ビス-,2-(5-フェニルオキサゾイル)-ベンゼン (POPOP) を含

むトルエン 2 mL を入れたバイアルに入れ、LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (BECKMAN) を用いて測定を行った。

3.3.14 統計処理

アミノアシル化活性の測定結果については、one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests にかけた。

3.4 結果

3.4.1 マウス組織、胚、細胞における TrpRS の発現解析

3.4.1.1 設計したプライマーはマウス SV-TrpRS を特異的に検出する

本研究では、マウス FL-TrpRS 及び SV-TrpRS の mRNA の発現を Real-time RT-PCR (Reverse transcription PCR) によって定量するため、それぞれの TrpRS を特異的に検出することのできる 3 種類のプライマーを設計した (図 3-1 A)。1 つ目は、FL-TrpRS と SV-TrpRS の共通した領域に結合し、どちらの TrpRS も検出する、即ち TrpRS の全体量を検出することのできる Total プライマーである。次に SV-TrpRS のみを検出することのできる 2 つの異なるプライマーを設計した。第一に、リバーズ (Rv) プライマーの 21 塩基のうち、7 塩基が FL-TrpRS と SV-TrpRS との C 末端共通部分に、残りの 14 塩基が SV-TrpRS の C 末端付加配列に結合する SV1 プライマーである。このプライマーは SV-TrpRS にのみ結合し、FL-TrpRS には結合しない。第二に、Rv プライマーが 3' 非翻訳領域に結合する SV2 プライマーである。このプライマーは、FL-TrpRS の 3' 非翻訳領域にも結合することのできるものの、伸長時間が足りず (1054 b) 増幅しない。一方、SV-TrpRS に結合すると正しく伸長し、119 b の PCR 産物が生じる。

設計したプライマーの特異性を確認するため、FL-TrpRS あるいは SV-TrpRS の cDNA を組み込んだ 2 つのプラスミドベクターを鋳型として Real-time PCR を行った (図 3-1 B)。Total プライマーを用いた場合には、どちらのベクターでも同じように PCR 産物が増幅し、同程度の C_t 値を示した。一方、SV1 プライマー、SV2 プライマーを用いた場合には、SV-TrpRS の cDNA を組み込んだベクターで優先的な増幅が見られた。さらに SV1 プライマー、SV2 プライマーで得られた SV-TrpRS ベクターにおける C_t 値は、Total プライマーでの C_t 値とほぼ一致した。PCR 産物を 2 %アガロースゲルを用いて電気泳動したところ、Total プライマーで増幅した場合には、FL-TrpRS、SV-TrpRS のどちらのベクターを鋳型とした場合にも期待されるバンドが見られたが、SV1 プライマー、SV2

プライマーの場合は SV-TrpRS ベクターでのみ、バンドが見られた (図 3-1 C)。これらの結果から、設計した Total プライマーは FL-TrpRS と SV-TrpRS の両方を、SV1 プライマー、SV2 プライマーは SV-TrpRS のみを特異的に検出することが確認された。

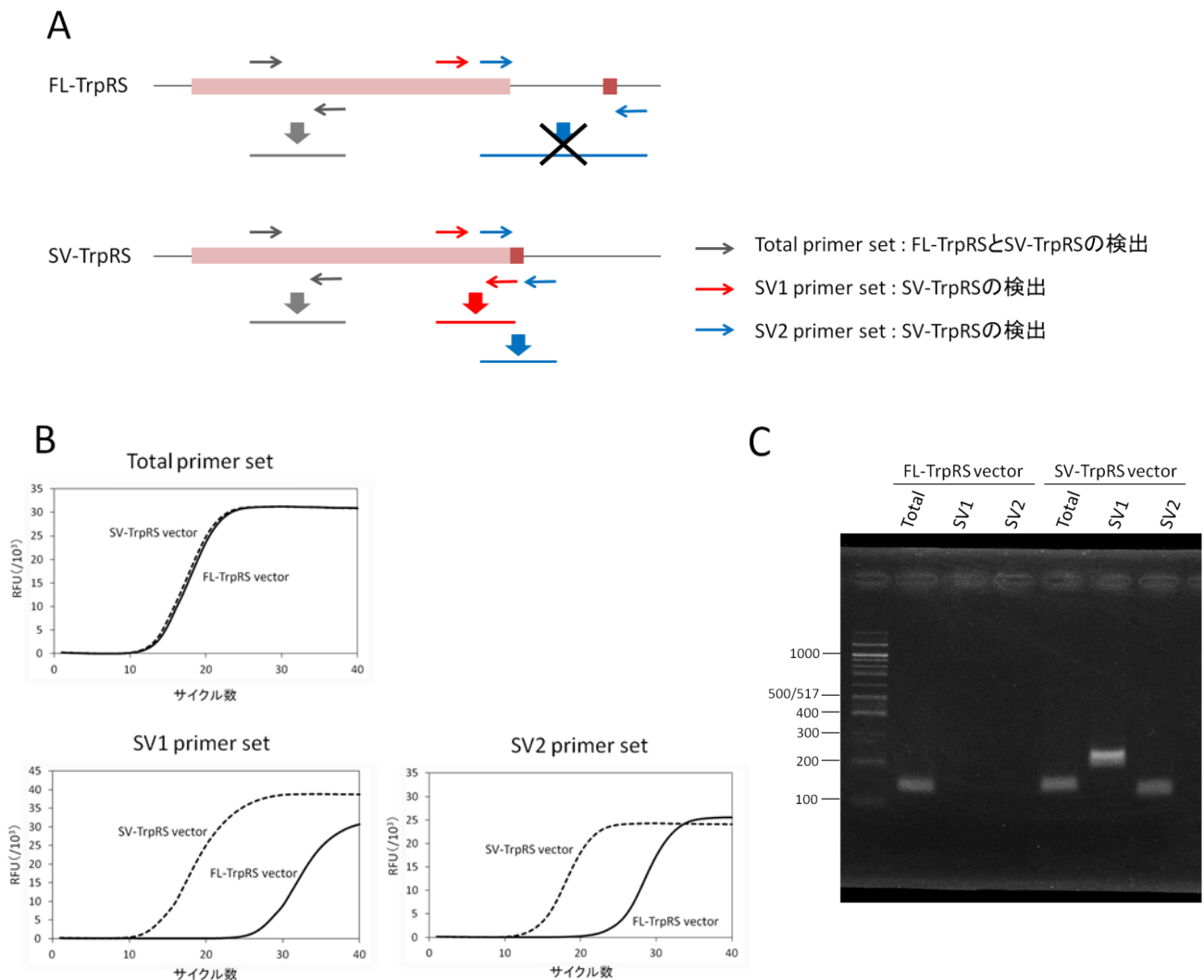


図 3-1 RT-PCR を用いたマウス FL-TrpRS、SV-TrpRS の mRNA の検出

(A) マウス TrpRS mRNA と設計したプライマーの模式図。桃色の四角形はマウス FL-TrpRS をコードしたオープンリーディングフレームのうち、FL-TrpRS、SV-TrpRS に共通の部分、濃い赤色は alternative splicing を受けて翻訳される配列を示している。灰色は FL-TrpRS と SV-TrpRS の両方を検出する Total primer set を、赤色と青色は SV-TrpRS のみを検出する SV primer set を示している。

(B) RT-PCR によってマウス FL-TrpRS(実線)あるいは SV-TrpRS(点線)の cDNA を組み込んだプラスミドベクターを検出したときの増殖曲線。(RFU: relative fluorescence units)

(C) PCR 産物の泳動像。cDNA を組み込んだプラスミドベクターを RT-PCR によって増幅し、14 サイクル終了後の PCR 産物を 2 %アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。DNA の分子量マーカー(100、200、300、400、500、517、600、700、800、900、1000、1200、1517 bp)のうち一部を左に示した。

3.4.1.2 マウス ES 細胞の分化前後で SV-TrpRS の発現量に変化はない

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を Northern blot 解析によって明らかにした (14)。それを受けて本研究では 2 種類のマウス ES 細胞 (ST1、E14.1) から回収した mRNA を基に、RT-PCR によって cDNA を作製した。さらに、ES 細胞を肝組織へと分化誘導させた場合の cDNA も同様に作製し、分化前後における FL-TrpRS 及び SV-TrpRS の mRNA の発現量を Real-time PCR によって解析した。これら ES 細胞の cDNA は東京工業大学の田川陽一准教授、玉井美保先生により調製していただいた。Real-time PCR の結果、分化の前後において FL-TrpRS、SV-TrpRS のどちらの発現量も大きな変化がないことが明らかとなった (図 3-2 A-C)。

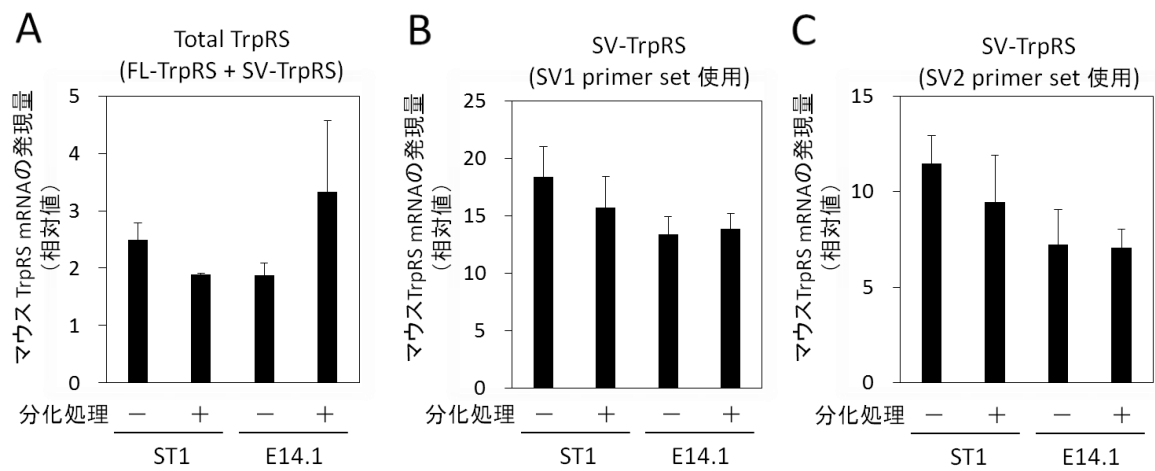


図 3-2 マウス ES 細胞 ST1、E14.1 とそれらを分化させた細胞における FL-、SV-TrpRS の発現

(A) Total primer set を用いて検出した Total TrpRS (FL-TrpRS と SV-TrpRS) の発現量

(B) SV1 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(C) SV2 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(A)～(C)すべてのデータは HPRT の発現量で補正し、脳組織における TrpRS の発現を 1 とした相対値で示した。(n ≥ 3)

3.4.1.3 一部の組織、胚において SV-TrpRS の発現量が高い

3.4.1.2 より、マウス ES 細胞においては分化の前後で FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現量に変化はなかった。そこで、マウスの各組織や胚の mRNA を購入し、RT-PCR によって cDNA を作製した後、TrpRS の発現量を解析した。その結果、組織における TrpRS の全体量 (FL-TrpRS+SV-TrpRS) は、組織によってばらつきがあり、特に脾臓や肺、肝臓、子宮、そして胚において高い発現を示すことが明らかとなった (図 3-3 A)。組織におけるこの発現パターンは、ヒト TrpRS のそれと類似していたが、各組織間の発現量の差はヒト TrpRS よりも小さかった (13)。また、SV-TrpRS の発現については、ES 細胞に限らず、いくつかの組織において高い発現を示し、一方で脳では発現が低いことが明らかとなった (図 3-3 B, C)。SV-TrpRS の組織間の発現パターンは、マウス TrpRS 全体のパターンと類似していたが、SV-TrpRS の組織間の発現量の差は、全体の差よりも非常に大きかった。

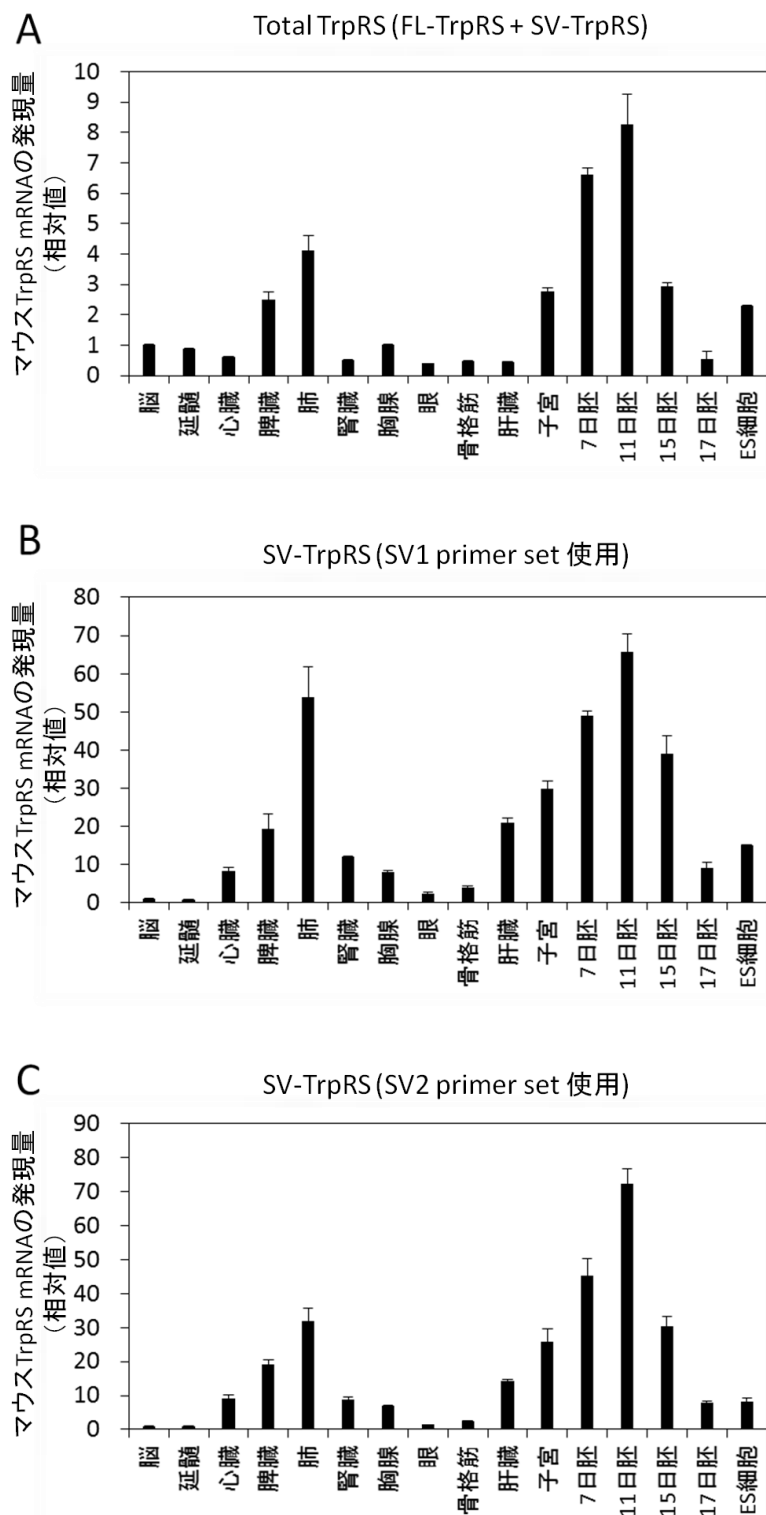


図 3-3 マウス組織における FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現

(A) Total primer set を用いて検出した Total TrpRS (FL-TrpRS + SV-TrpRS) の発現量

(B) SV1 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(C) SV2 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(A)~(C) すべてのデータは HPRT の発現量で補正し、脳組織における TrpRS の発現を 1 とした相対値で示した。(n ≥ 3)

3.4.1.4 マウス TrpRS mRNA の発現は IFN- γ の影響を受ける

ヒトでは、いくつかの培養細胞において IFN- γ を処理したときに TrpRS の発現が大きく増加することが報告されている (11, 12, 15)。そこで今回、マウスのマクロファージ様細胞株 (RAW264 細胞)、肝癌細胞株 (Hepa1-6 細胞)、そして神経芽細胞株 (Neuro-2a 細胞) に対してマウス IFN- γ を処理し、24 時間後に mRNA を回収し、マウス TrpRS の発現を Real-time RT-PCR によって解析した。その結果、RAW264 細胞、Neuro-2a 細胞では IFN- γ 処理の有無によって TrpRS の全体量、SV-TrpRS の発現量ともに変化はなかった (図 3-4 A, B, C)。一方、Hepa1-6 細胞では IFN- γ 処理によって TrpRS の全体量、SV-TrpRS の発現量ともに 5 倍程度の増加が見られた (図 3-4 A, B, C)。

組織のマウス TrpRS の発現解析では、脳における SV-TrpRS の発現が非常に低かったが、神経細胞である Neuro-2a 細胞では他の 2 つの細胞と比較しても SV-TrpRS の発現は高かった。この要因が、未分化の Neuro-2a 細胞を使用していることにありと見え、Neuro-2a 細胞をレチノイン酸によって分化させた後、Real-time RT-PCR を行った。その結果、マウス TrpRS 全体量は、分化処理の有無で大きな差がなかったが、分化後の方が IFN- γ 処理による発現上昇が起こる傾向が見られた (図 3-5 A)。一方、マウス SV-TrpRS に関しては、分化処理の有無でほとんど変化がなかった (図 3-5 B)。

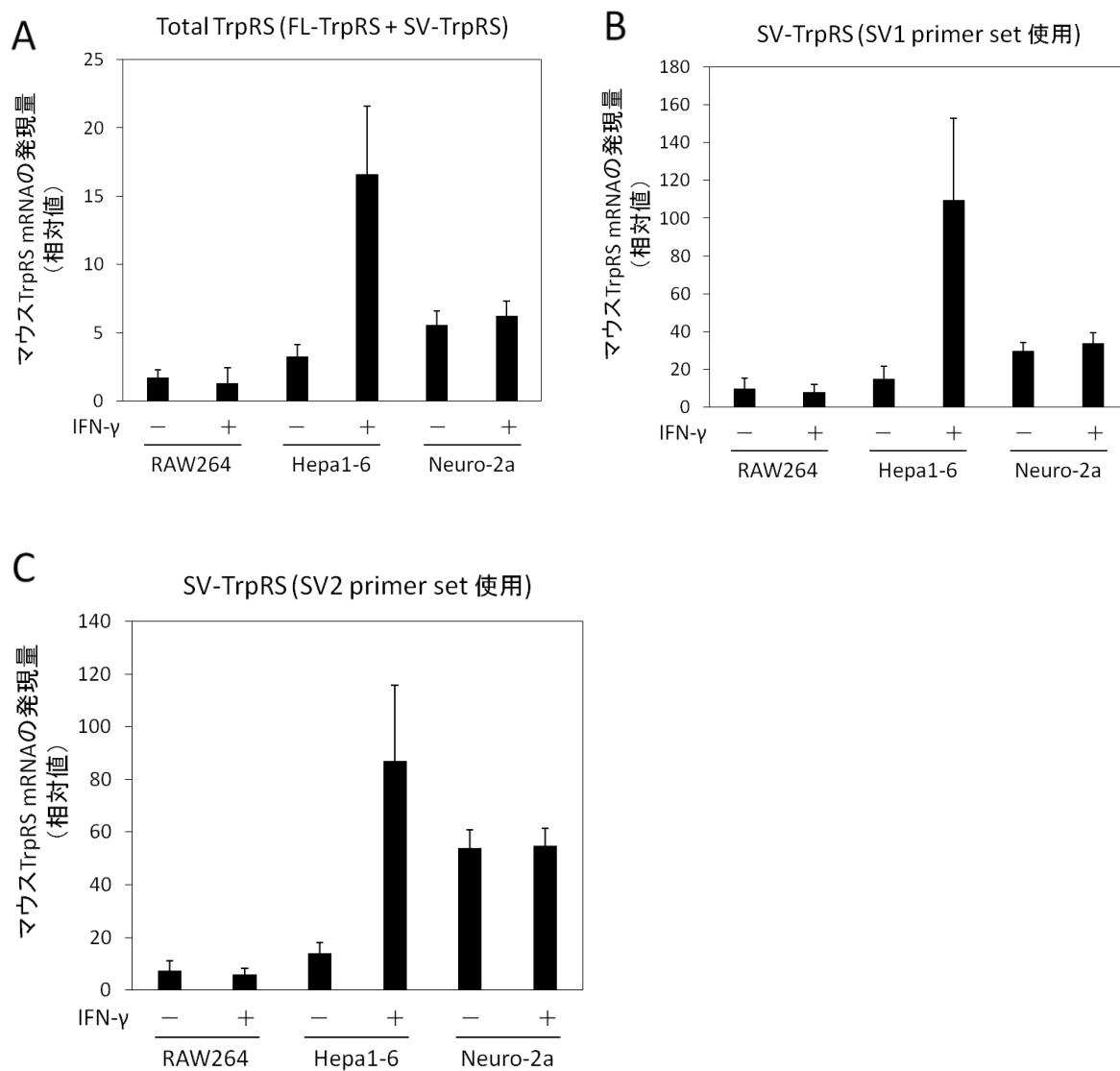


図 3-4 マウス培養細胞における FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現

(A) Total primer set を用いて検出した Total TrpRS (FL-TrpRS と SV-TrpRS) の発現量

(B) SV1 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(C) SV2 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(A)~(C) すべてのデータは HPRT の発現量で補正し、脳組織における TrpRS の発現を 1 とした相対値で示した。(n ≥ 3)

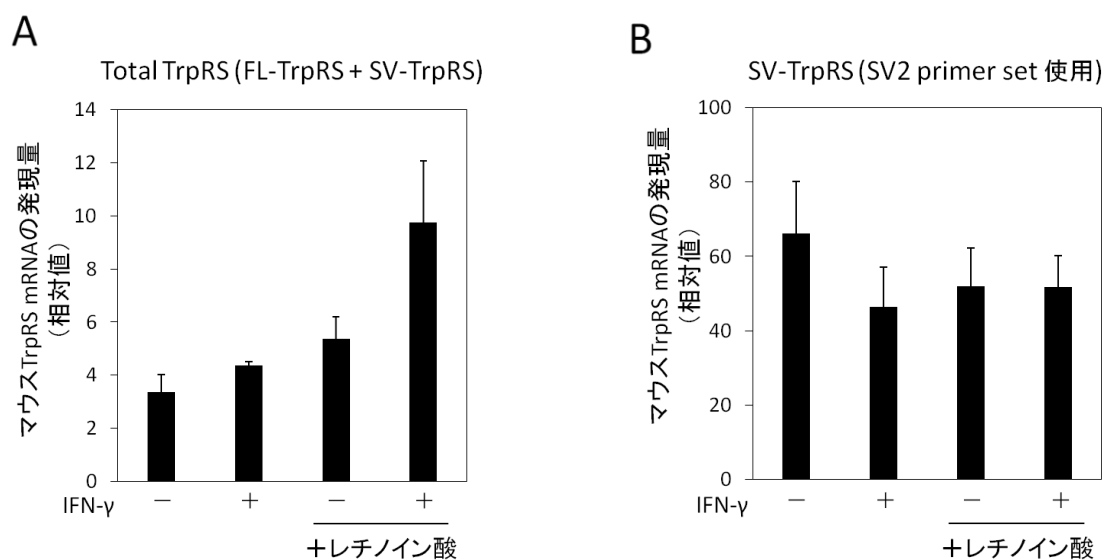


図 3-5 マウス神経細胞における FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現

(A) Total primer set を用いて検出した Total TrpRS (FL-TrpRS と SV-TrpRS) の発現量

(B) SV2 primer set を用いて検出した SV-TrpRS の発現量

(A)、(B) すべてのデータは HPRT の発現量で補正し、脳組織における TrpRS の発現を 1 とした相対値で示した。(n \geq 3)

3.4.1.5 マウス TrpRS タンパク質の発現は IFN- γ の影響を受ける

mRNA 発現解析を行った細胞に対し、タンパク質レベルでも TrpRS の発現を確認するため、Western blot 解析を行った。まず、ヒト TrpRS を認識する抗体がマウス TrpRS も特異的に認識することを確認するため、細胞発現用ベクターを用いて Hepa1-6 細胞に His タグ付きのマウス FL-TrpRS あるいは SV-TrpRS を過剰発現させた。細胞破碎液を Western blot 解析を行った結果、抗 His 抗体と抗ヒト TrpRS 抗体では同じ位置に特異的なバンドが検出され、抗ヒト TrpRS 抗体がマウス TrpRS を特異的に認識することを確認した (図 3-6 A)。そこで IFN- γ 処理した RAW246 細胞、Hepa1-6 細胞、Neuro-2a 細胞に対して Western blot 解析を行うと、RAW246 細胞と Neuro-2a 細胞では IFN- γ 処理の有無によるタンパク質発現の変化は見られなかった (図 3-6 B)。一方、Hepa1-6 細胞では IFN- γ 処理時に TrpRS の発現上昇が見られた (図 3-6 B)。これらは mRNA の発現解析の結果と一致しており、タンパク質レベルでもマウス TrpRS の発現が IFN- γ による制御を受けていることが明らかとなった。

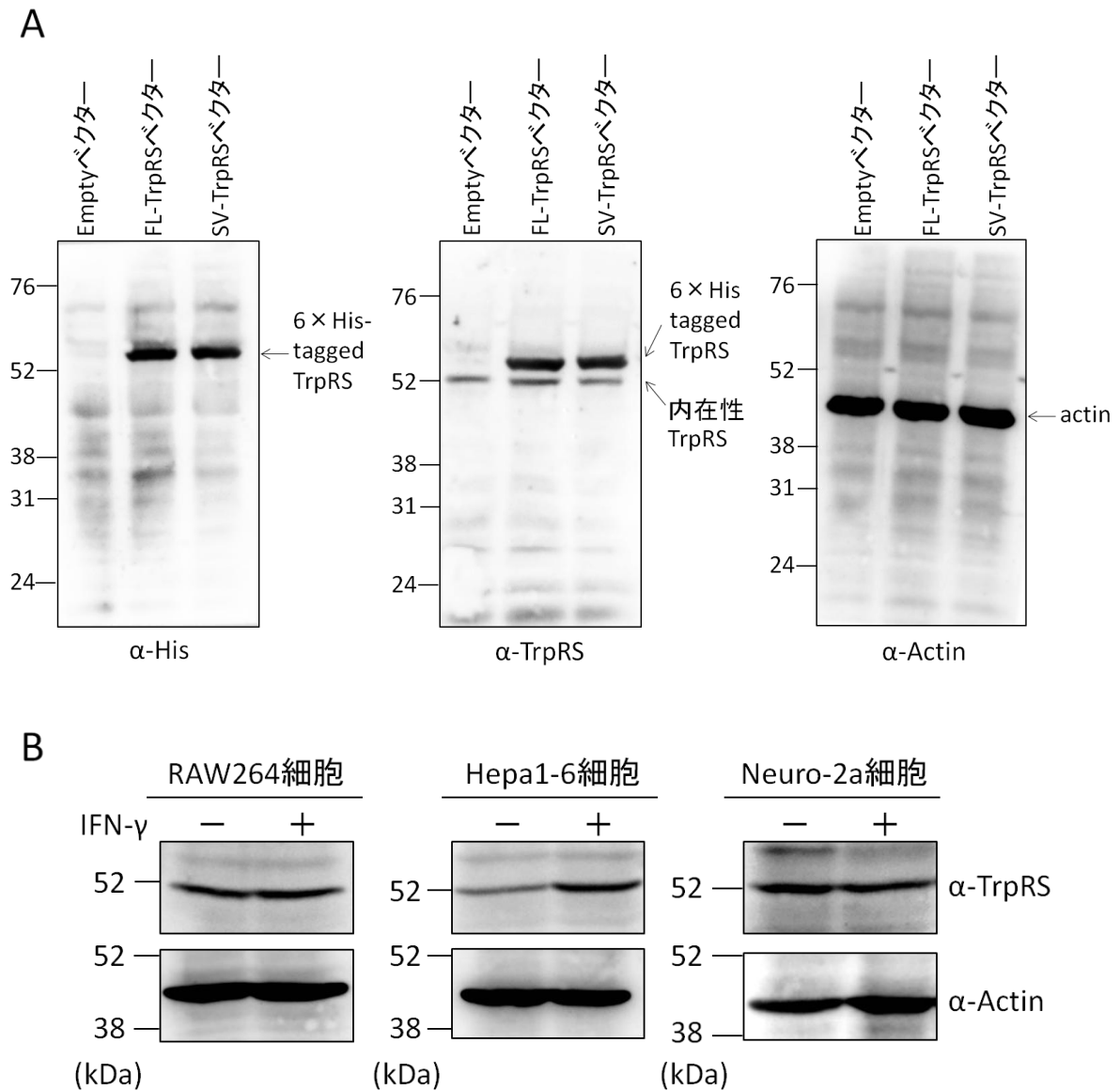


図 3-6 マウス培養細胞における TrpRS の発現

- (A) Empty vector、FL-TrpRS vector、SV-TrpRS vector を導入した Hepa1-6 細胞における 6 × His-tagged TrpRS、内在性 TrpRS、アクチンを Western blot 解析により検出した。
- (B) RAW264 細胞、Hepa1-6 細胞、Neuro-2a 細胞を IFN- γ で処理し、Western blot 解析によりマウス TrpRS 及び、actin を検出した。

3.4.2 マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性の解析

3.4.2.1 マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性は低い

Real-time RT-PCR を用いた発現解析により、マウス SV-TrpRS の発現が、組織特異的であり、脳において低いことを明らかにした。そこで、SV-TrpRS の機能を解析するため、大腸菌を用いてマウス FL-TrpRS 及び SV-TrpRS を発現させ、Ni-NTA 精製を行った。精製した TrpRS のアミノアシル化活性を測定した結果、SV-TrpRS のアミノアシル化活性は FL-TrpRS と比較して 50%程度であることが明らかになった（図 3-7）。

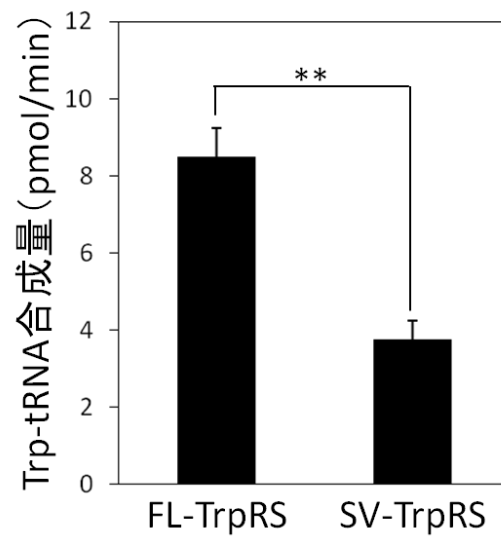


図 3-7 マウス TrpRS のアミノアシル化活性

マウス FL-TrpRS、SV-TrpRS のアミノアシル化活性 (Trp-tRNA 合成量)。(n=18, **, $p < 0.01$)

3.4.2.2 マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性は Cys 残基が制御する

ヒト TrpRS のアミノアシル化活性は、金属の結合によって制御されている (48)。一方で、マウス FL-TrpRS やウシ TrpRS では、金属による活性制御はなく、常に高い活性状態であることが報告されている (49)。そこで、マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性が金属によって低く制御されているのか検証した。マウス SV-TrpRS の C 末端付加配列には、システイン (Cys) 残基が 2 つ含まれていることから、これらの残基をセリンに置換した変異体 (C476S, C478S, C476S/C478S) を作製し、アミノアシル化活性を測定した。その結果、C476S は WT SV-TrpRS と同様に低いアミノアシル化活性を示したが、C478S と C476S/C478S では、FL-TrpRS と同様に高いアミノアシル化活性を示した (図 3-8)。このことから、マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性制御には、C 末端付加配列に含まれる 478 番目の Cys 残基が関与していることが明らかになった。

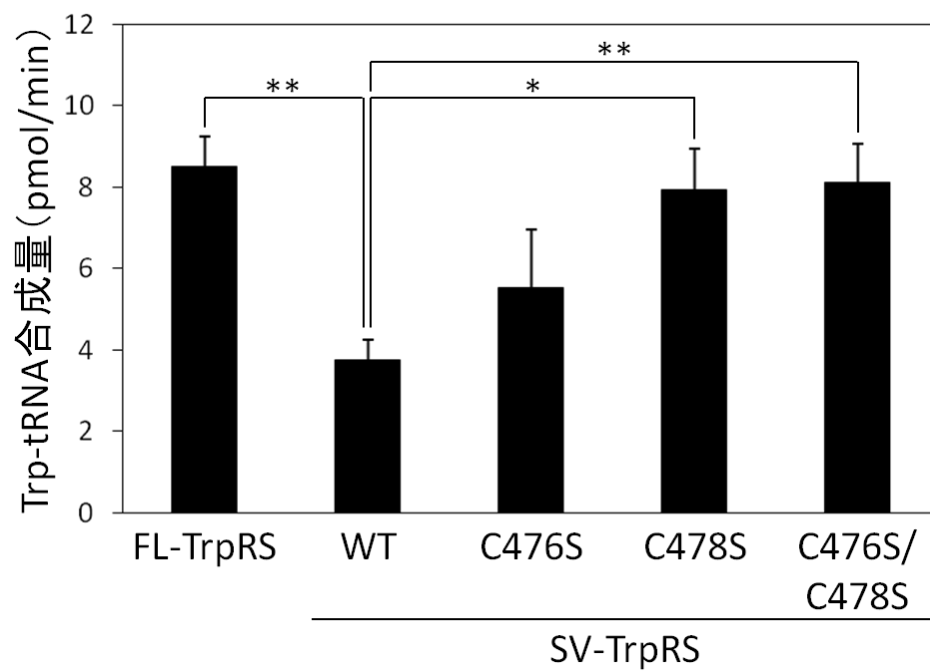


図 3-8 マウス SV-TrpRS 変異体のアミノアシル化活性

マウス FL-TrpRS と SV-TrpRS WT, 変異体のアミノアシル化活性 (Trp-tRNA 合成量)

($n \geq 3$, *, $p < 0.05$ **; $p < 0.01$)

3.4.2.3 金属が SV-TrpRS のアミノアシル化活性を制御するかもしれない

Cys 残基が活性制御に関与することから、マウス SV-TrpRS には金属が結合しており、アミノアシル化活性を低く制御している可能性がある。そこで Cys478 とともに金属結合に関与するアミノ酸残基の特定を目指した。マウス TrpRS は結晶構造がとられていないため、ヒト TrpRS の結晶構造を基に、タンパク質表面に局在し、C 末端部分と距離の近いアスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、システイン残基を候補とし、7 つのアミノ酸置換変異体を作製した (D155N、D189N、C229S、D232N、D306N、H473A、D480N) (図 3-9 A)。これらのうち、C229S、D232N は大腸菌において不溶性画分に発現し、精製することができなかった。Cys229 と Asp232 は構造の安定化に重要な残基だと考えられる。E155Q、D189N、D306N、H473A、D480N に関しては、大腸菌において可溶性画分に発現したため、Ni-NTA により精製した。変異体のアミノアシル化活性を測定した結果、E155Q、D306N、H473A、D480N では、SV-TrpRS 野生型と同程度の活性を示した (図 3-9 B)。一方、D189N は、アミノアシル化活性がほとんど見られず、Asp189 がアミノアシル化活性に必須であることが明らかになった (図 3-9 B)。候補残基に変異を入れた 7 つの変異体では、C478S や C476S/C478S のようにアミノアシル化活性の復活が見られるものはなかったが、アミノアシル化活性や構造の安定に重要な Asp189、Cys229、Asp232 が Cys478 とともに金属結合に関与している可能性が高い。

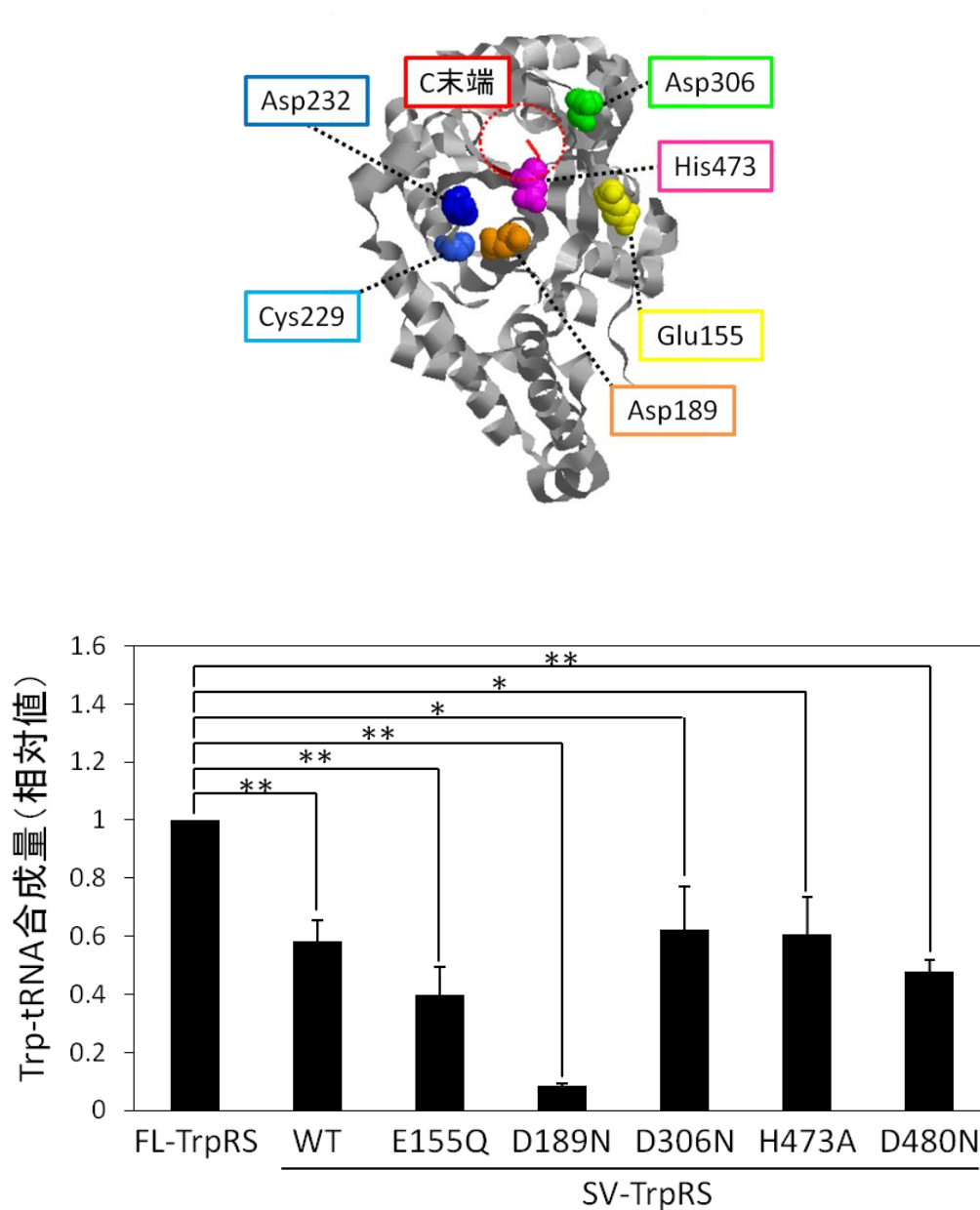


図 3-9 マウス SV-TrpRS 変異体のアミノアシル化活性

(A) マウス SV-TrpRS に変異を入れたアミノ酸残基の位置。マウス TrpRS は結晶が取れていないため、ヒト mini TrpRS の結晶構造を用いた。(PDB:105T)

(B) マウス FL-TrpRS と SV-TrpRS WT, 変異体のアミノアシル化活性 (Trp-tRNA 合成量)。FL-TrpRS のアミノアシル化活性を 1 とした相対値で示した。(n ≥ 3, *; p < 0.05 **; p < 0.01)

3.5 考察

3.5.1 マウス TrpRS の発現解析

今回の研究では、FL-TrpRS と SV-TrpRS の mRNA がマウス ES 細胞や、脾臓、肺、肝臓、子宮のようないくつかの組織において高く発現していること、一方で脳組織では FL-TrpRS の発現量に対する SV-TrpRS の発現量が非常に少ないことを発見した。SV-TrpRS の cDNA を組み込んだベクターについて、SV1 プライマー、SV2 プライマーは Total プライマーと同様の増幅効率を示したことから、 C_t 値を基に TrpRS 全体量 (FL-TrpRS + SV TrpRS) に対する SV-TrpRS の割合を見積もったところ、マウス脳組織では 0.7 %未満、一方で ES 細胞ではおよそ 6 %となった。この結果は、先行文献の Northern blot 解析による分析とほぼ一致している (14)。また、今回の研究では、脳組織において SV-TrpRS の発現が非常に低い一方で、神経芽細胞 Neuro-2a では SV-TrpRS の高い発現が見られ、組織とは異なる結果を得た。この要因が分化処理をしていないことにあると考えたが、レチノイン酸による分化処理でも、SV-TrpRS の発現量が高いままであった。これについては、2つの原因が考えられる。1つは、脳組織は神経細胞だけでなく、グリア細胞などの雑多な細胞の集合であるのに対し、Neuro-2a 細胞は神経細胞だけを見ている。SV-TrpRS の発現が低いのは神経細胞ではなく、脳組織のその他の構成要素である可能性がある。2つ目として、細胞の置かれた環境の違いが挙げられる。脳組織は他の組織と比較しても酸素の消費が激しく、活性酸素などによるストレスも大きい。このような細胞の外部環境が SV-TrpRS の発現に関与する可能性もあるため、今後検討する必要がある。

今回の研究で FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現が高かった臓器は、発現量の差はマウスの方が小さいものの、ヒトにおいて TrpRS の発現が高い臓器とほぼ一致している (13)。さらに、Hepa1-6 細胞を IFN- γ で処理すると FL-TrpRS、SV-TrpRS の発現が 5 倍程度まで増加することが明らかになったが、この結果もヒト TrpRS の発現が IFN- γ に応答する

ことと一致する。過去の報告では、IFN- γ に曝したヒト培養細胞では、TrpRS の mRNA が通常時の 50 倍程度まで増加することから、マウス TrpRS の発現誘導はヒト TrpRS よりも弱い (12)。しかしながら、マウスにおいてもヒトと同様に IFN- γ によって TrpRS の発現が誘導されることは、マウスとヒトの臓器で TrpRS の発現が同様のパターンを示したことと関係していると考えられる。TrpRS の他に IFN- γ によって発現が誘導されるタンパク質として IDO1 が挙げられる (23, 50)。IDO1 は Trp を代謝するキヌレニン経路の初期反応を触媒し、この経路の律速酵素となっている (24)。マウスの脾臓や子宮において IDO1 が高く発現することが検出されている (51)。IDO1 を発現している細胞は、Trp の代謝が活発になり、Trp が欠乏することによる細胞死から自身を守るために TrpRS を発現していると言われている (52)。TrpRS が過剰に発現した細胞では、Trp を Trp-AMP という形で貯蓄し、IDO1 による Trp の代謝からタンパク質合成に必要な Trp を確保しているのだろう。IFN- γ は免疫応答の調節を中心的に担っている (53, 54)。IFN- γ 誘導性遺伝子には Gamma Activation Sequence (GAS) あるいは Interferon-stimulated Response Element (ISRE) 配列が重要である。マウス TrpRS の遺伝子配列と alternative splicing の模式図を図 3-10 に示した。NCBI と Ensembl のデータベースを基に 2 つの転写開始点 P1 と P2 を見い出し、これらの配列付近で GAS と ISRE に相当する配列を探したところ、P1 と P2 の間に存在した。GAS のコンセンサス配列を TTC/ANNNG/TAA、ISRE のコンセンサス配列を NGAAANNGAAAG/CN としている。IFN- γ 誘導性の TrpRS 発現調節に関しては今後さらなる解析が必要である。

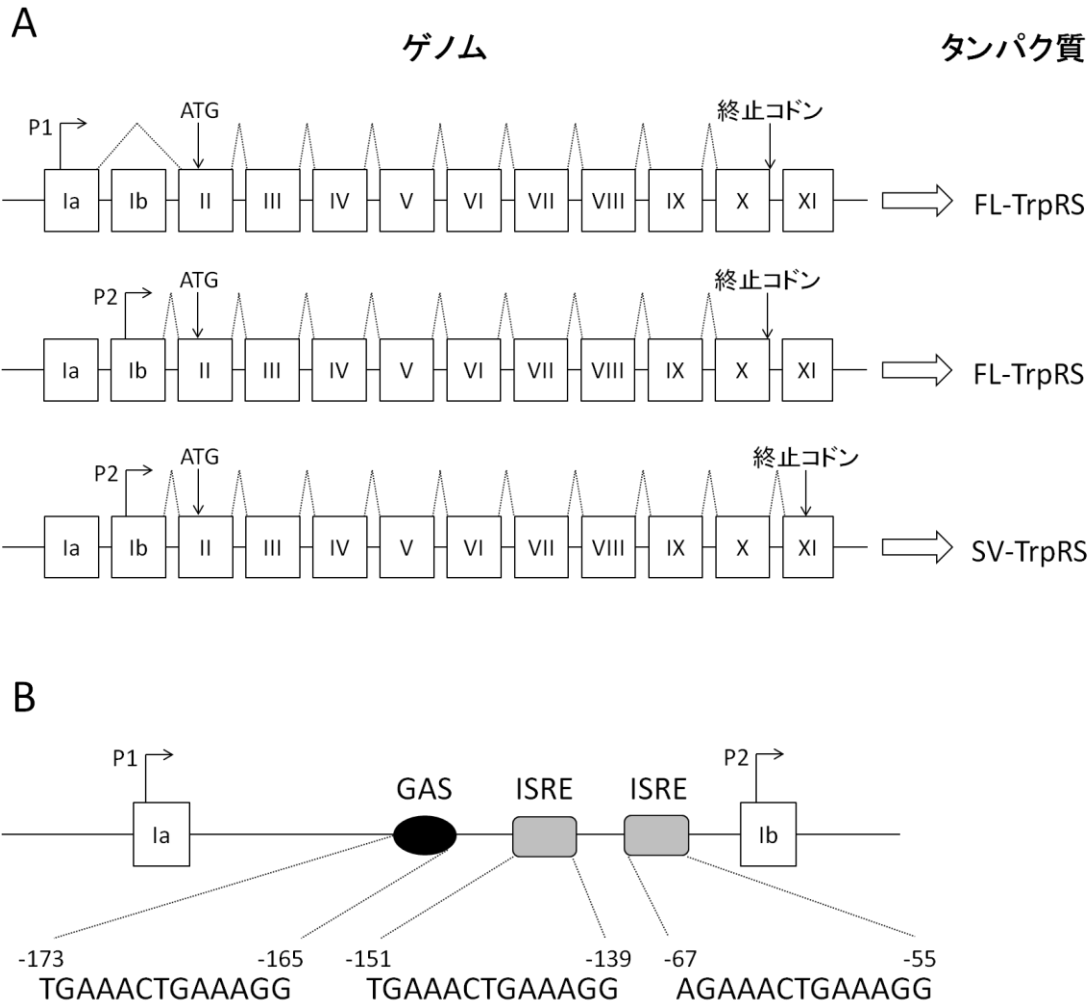


図 3-10 マウス TrpRS 遺伝子の概略図

(A) マウス TrpRS のゲノム構造と alternative splicing の概略図。図は NCBI と Ensembl のデータベースを基にして描いた。白抜き四角形はエクソン、線はイントロン、点線は TrpRS の mRNA のスプライス型、開始コドン(ATG)と終止コドンは矢印で示している。推定される転写開始位置を P1、P2 とした。

(B) マウス TrpRS の 5' 転写調節領域の概略図。エクソン Ib 内の推定転写開始部位を +1 とした。推定される IFN- γ 調節因子 GAS、ISRE とその位置、塩基配列を示している。

3.5.2 マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性とその制御機構

本研究では、マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性が FL-TrpRS の 50%程度であることが明らかになった。アミノアシル化活性の低い要因として、SV-TrpRS の C 末端付加配列 (CFCFDT) に含まれる 2 つの Cys 残基に着目し、変異体を用いた解析をした結果、特に 2 つ目の Cys 残基 (Cys478) によってアミノアシル化活性が低く制御されていることを発見した。哺乳類 TrpRS のアミノアシル化活性の制御は生物種ごとに異なる (49)。ヒト TrpRS は亜鉛イオンやヘムとの結合によってアミノアシル化活性が制御されている。亜鉛イオンを欠乏させたヒト TrpRS ではアミノアシル化活性が低い、そこに亜鉛イオンあるいはヘムを結合させると、アミノアシル化活性が大きく上昇する (48)。さらに、IFN- γ に曝された細胞ではヒト TrpRS の発現が大きく増加するが、新しく合成されたヒト TrpRS は亜鉛イオン非結合型が存在するため、これらのヒト TrpRS のアミノアシル化活性はヘムや亜鉛イオンの濃度に依存する。一方で、マウス FL-TrpRS やウシ TrpRS は亜鉛イオンやヘムの結合の有無に関わらず、常時活性型である (49)。本研究により、マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性が C 末端付加配列の Cys 残基によって低く制御されることが明らかになったことから、マウス SV-TrpRS のアミノアシル化活性がヒト TrpRS と同様に金属によって制御される可能性が示唆された。C 末端付加配列とともに金属の結合部位となるアミノ酸残基の候補として、マウス TrpRS と相同性の高いヒト TrpRS の結晶構造を参考にして、タンパク質表面の Asp、Glu、His、Cys 残基に着目した。アミノ酸置換変異体のアミノアシル化活性の解析結果から、E155Q、D306N、H473A、D480N は野生型 SV-TrpRS と同程度のアミノアシル化活性を示したため、Glu155、Asp306、His473、Asp480 が金属結合部位でないことが明らかになった。一方で、D189N ではアミノアシル化活性が失われており、また、C229S、D232N は不溶性画分に発現したため、タンパク質の精製ができなかった。このことから、Asp189、Cys229、Asp232 は構造維持に重要な残基であり、SV-TrpRS のアミノアシル化活性を低く制御するための金属結合部位である可能性が示唆された。

本研究では、マウス SV-TrpRS の mRNA がマウス ES 細胞に加え、胚やさまざまな組

織において発現していること、Hepa1-6 細胞では IFN- γ によって発現が増加することを明らかにした。これまでに、他の下等あるいは高等な脊椎動物において、マウス TrpRS のような alternative splicing を受ける TrpRS の報告はされていない。マウス SV-TrpRS の組織特異的な発現パターンや、IFN- γ による発現の増加、マウス SV-TrpRS の低いアミノアシル化活性からも、SV-TrpRS がアミノアシル化活性とは別に、何らかの重要な機能を持つことを示唆している。ヒト TrpRS は細胞外に分泌されて血管新生を抑制したり、核に移行して p53 を活性化したりすることが報告されている (20)。本研究から、Trp のトランスポーターとして機能することも明らかになった。今後は、マウス FL-TrpRS と SV-TrpRS がこれらの機能を持つのか検証する必要がある。さらに、細胞内局在やストレス応答、相互作用分子などについての比較を通して SV-TrpRS の機能を解明することが課題である。

4. 結論

本研究の第二章では、マウスに特有な SV-TrpRS の発現及びアミノアシル化活性を解析し、SV-TrpRS は脳における発現量が非常に低いこと、アミノアシル化活性が低いことを明らかにした。特に、アミノアシル化活性は、C 末端付加配列の Cys 残基に金属が結合することによる制御である可能性が示唆された。ヒト TrpRS は、金属の結合によってアミノアシル化反応の活性型と不活性型が存在し、上述したように、それによって他の機能が制御されている可能性がある。一方、ヒト full-length TrpRS にあたるマウス FL-TrpRS は、金属の結合の有無に関わらず、常に高いアミノアシル化活性を持つ。マウスでは、アミノアシル化活性の低い SV-TrpRS が alternative splicing によって產生されることで、アミノアシル化反応以外の機能を SV-TrpRS が担当しているのかもしれない（図 4）。また、マウス以外の生物でも、アミノアシル化不活性型の TrpRS が存在し、多機能を制御している可能性がある。

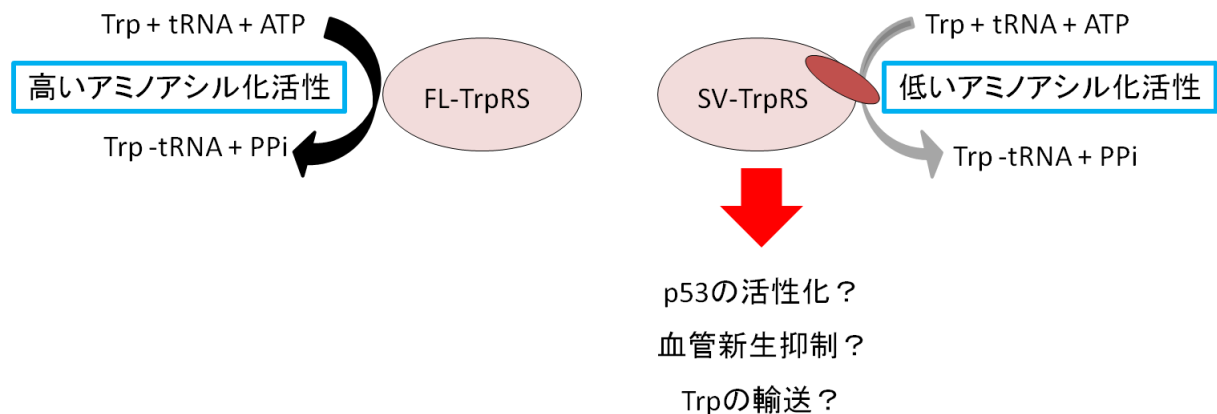


図 4 マウス TrpRS の機能制御の模式図(仮説)

5. 参考文献

1. Mukhopadhyay, R., Jia, J., Arif, A., Ray, P. S. and Fox, P. L. (2009) The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 324-331.
2. Shi, Y., Xu, X., Zhang, Q., Fu, G., Mo, Z., Wang, G. S., Kishi, S. and Yang, X. L. (2014) tRNA synthetase counteracts c-Myc to develop functional vasculature. *Elife*. **3**, e02349.
3. Wakasugi, K., and Schimmel, P. (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**, 147-151.
4. Doublié, S., Bricogne, G., Gilmore, C., and Carter, C. W. Jr. (1995) Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase. *Structure* **3**, 17-31.
5. Yang, X. L., Otero, F. J., Skene, R. J., McRee, D. E., Schimmel, P., and Ribas de Pouplana, L. (2003) Crystal structures that suggest late development of genetic code components for differentiating aromatic side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 15376-15380.
6. Frolova, L. Y., Grigorieva, A. Y., Sudomoina, M. A., and Kisselev, L. L. (1993) The human gene encoding tryptophanyl-tRNA synthetase: Interferon-response elements and exon-intron organization. *Gene* **128**, 237-245.
7. Tolstrup, A. B., Bejder, A., Fleckner, J., and Justesen, J. (1995) Transcriptional regulation of the interferon- γ -inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **270**, 397-403.
8. Turpaev, K. T., Zakhariev, V. M., Sokolova, I. V., Narovlyansky, A. N., Amchenkova, A. M., Justesen, J., and Frolova, L. Y. (1996) Alternative processing of the tryptophanyl-tRNA synthetase mRNA from interferon-treated human cells. *Eur. J. Biochem.* **240**, 732-737.

9. Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K. L., Friedlander, M., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. (2002) A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 173-177.
10. Otani, A., Slike, B. M., Dorrell, M. I., Hood, J., Kinder, K., Ewalt, K. L., Cheresch, D., Schimmel, P., and Friedlander, M. (2002) A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 178-183.
11. Shaw, A. C., Larsen, M. R., Roepstorff, P., Justesen, J., Christiansen, G. and Birkelund, S. (1999) Mapping and identification of interferon γ -regulated HeLa cell proteins separated by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 984-993.
12. Fleckner, J., Martensen, P. M., Tolstrup, A. B., Kjeldgaard, N. O. and Justesen, J. (1995) Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine* **7**, 70-77.
13. Ewalt, K. L. and Schimmel, P. (2002) Activation of angiogenic signaling pathways by two human tRNA synthetases. *Biochemistry* **41**, 13344-13349.
14. Pajot, B., Sarger, C., Bonnet, J. and Garret, M. (1994) An alternative splicing modifies the C-terminal end of tryptophanyl-tRNA synthetase in murine embryonic stem cells. *J. Mol. Biol.* **242**, 599-603.
15. Krause, S. W., Rehli, M., Kreutz, M., Schwarzfischer, L., Paulauskis, J. D. and Andreessen, R. (1996) Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 540-545.
16. Seymour, R. L., Ganapathy, V., Mellor, A. L. and Munn, D. H. (2006) A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1320-1327.

17. Silk, J. D., Lakhal, S., Laynes, R., Vallius, L., Karydis, I., Marcea, C., Boyd, C. A. and Cerundolo, V. (2012) IDO induces expression of a novel tryptophan transporter in mouse and human tumor cells. *J. Immunol.* **187**, 1617-1625.
18. Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. and Kanai, Y. (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* **274**, 19745-19751.
19. Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S. H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J. Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. and Endou, H. (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.* **1514**, 291-302.
20. Sajish, M., Zhou, Q., Kishi, S., Valdez, D. M. Jr., Kapoor, M., Guo, M., Lee, S., Kim, S., Yang, X. L. and Schimmel, P. (2012) Trp-tRNA synthetase bridges DNA -PKcs to PARP-1 to link IFN- γ and p53 signaling. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 547-554.
21. Paley, E. L., Perry, G. and Sokolova, O. (2013) Tryptamine induces axonopathy and mitochondriopathy mimicking neurodegenerative diseases via tryptophanyl-tRNA deficiency. *Curr. Alzheimer Res.* **9**, 987-1004.
22. Kapoor, M., Zhou, Q., Otero, F., Myers, C. A., Bates, A., Belani, R., Liu, J., Luo, J. K., Tzima, E., Zhang, D. E., Yang, X. L. and Schimmel, P. (2007) Evidence for annexin II-S100A10 complex and plasmin in mobilization of cytokine activity of human TrpRS. *J. Biol. Chem.* **283**, 2070-2077.
23. Yasui, H., Takai, K., Yoshida, R. and Hayashi, O. (1986) Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: Its possible occurrence in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 6622-6626.
24. Taylor, M. W. and Feng, G. (1991) Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB. J.* **5**, 2516-2522.

25. Littlejohn, T. K., Takikawa, O., Truscott, R. J. and Walker, M. J. (2003) Asp274 and his346 are essential for heme binding and catalytic function of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **278**, 29525-29531.
26. Wakasugi, K., Nakano, T., and Morishima, I. (2005) Oxidative stress-responsive intracellular regulation specific for the angiostatic form of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **44**, 225-232.
27. Heard, K. S., Diguette, M., Heard, A. C. and Carruthers, A. (1998) Membrane-bound glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and multiphasic erythrocyte sugar transport. *Exp. Physiol.* **83**, 195-202.
28. Kumar, S., Sheokand, N., Mhadeshwar, M. A., Raje, C. I. and Raje, M. (2012) Characterization of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase as a novel transferrin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44** 189-199.
29. Kise, Y., Lee, S. W., Park, S. G., Fukai, S., Sengoku, T., Ishii, R., Yokoyama, S., Kim, S. and Nureki, O. (2004) A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 149-156.
30. Tzima, E., Reader, J. S., Irani-Tehrani, M., Ewalt, K. L., Schwartz, M. A. and Schimmel, P. (2005) VE-cadherin links tRNA synthetase cytokine to anti-angiogenic function. *J. Biol. Chem.* **280**, 2405-2408.
31. Futaki, S., Suzuki, T., Ohasi, W., Yakami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836-5840.
32. Futaki, S. (2005) Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv. Drug. Rev.* **57**, 547-558.
33. Watanabe, S. and Wakasugi, K. (2011) Module M1 of zebrafish neuroglobin acts as a structural and functional protein building block for a cell-membrane-penetrating activity. *PLoS One.* **6**, e16808.

34. Frolova, L. Yu., Sudomoina, M. A., Grigorieva, A. Yu., Zinovieva, O. L. and Kisselev, L. L. (1991) Cloning and nucleotide sequence of the structural gene encoding for human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Gene* **109**, 291-296.
35. Blechynden, L. M., Lawson, C. M. and Garlepp, M. J. (1996) Sequence and polymorphism analysis of the murine gene encoding histidyl-tRNA synthetase. *Gene* **178**, 151-156.
36. Basilion, J. P., Schievella, A. R., Burns, E., Rioux, P., Olson, J. C., Monia, B. P., Lemonidis, K. M., Stanton, V. P. Jr. and Housman, D. E. (1999) Selective killing of cancer cells based on loss of heterozygosity and normal variation in the human genome: a new paradigm for anticancer drug therapy. *Mol. Pharmacol.* **56**, 359-369.
37. Ewalt, K. L., Yang, X. L., Otero, F. J., Liu, J., Slike, B. and Schimmel, P. (2005) Variant of human enzyme sequesters reactive intermediate. *Biochemistry* **44**, 4216-4221.
38. Yang, X. L., Guo, M., Kapoor, M., Ewalt, K. L., Otero, F. J., Skene, R. J., McRee, D. E. and Schimmel, P. (2007) Functional and crystal structure analysis of active site adaptations of a potent anti-angiogenic human tRNA synthetase. *Structure* **15**, 793-805.
39. Zhou, Q., Kapoor, M., Guo, M., Belani, R., Xu, X., Kiosses, W. B., Hanan, M., Park, C., Armour, E., Do, M. H., Nangle, L. A., Schimmel, P. and Yang, X. L. (2010) Orthogonal use of a human tRNA synthetase active site to achieve multifunctionality. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 57-61.
40. Kovaleva, G. K., Merkulova, T. I. and Kiselev, L. L. (1988) Tryptophanyl-tRNA-synthetase catalyzes synthesis of Ap₃A but not Ap₄A. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **301**, 1501-1504.
41. Vartanian, A., Narovlyansky, A., Amchenkova, A., Turpaev, K. and Kisselev, L. (1996) Interferons induce accumulation of diadenosine triphosphate (Ap₃A) in human cultured cells. *FEBS Lett.* **381**, 32-34.

42. Barnes, L. D., Garrison, P. N., Siprashvili, Z., Guranowski, A., Robinson, A. K., Ingram, S. W., Croce, C. M., Ohta, M. and Huebner, K. (1996) Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* **35**, 11529-11535.
43. Xu, F., Chen, X., Xin, L., Chen, L., Jin, Y. and Wang, D. (2001) Species-specific differences in the operational RNA code for aminoacylation of tRNA^{Trp}. *Nucleic. Acids. Res.* **29**, 4125-4133.
44. Nakamoto, T., Miyanokoshi, M., Tanaka, T. and Wakasugi, K. (2016) Identification of a residue crucial for the angiostatic activity of human mini tryptophanyl-tRNA synthetase by focusing on its molecular evolution. *Sci. Rep.* **6**, 24750.
45. Ahn, Y. H., Park, S., Choi, J. J., Park, B. K., Rhee, K. H., Kang, E., Ahn, S., Lee, C. H., Lee, J. S., Inn, K. S., Cho, M. L., Park, S. H., Park, K., Park, H. J., Lee, J. H., Park, J. W., Kwon, N. H., Shim, H., Han, B. W., Kim, P., Lee, J. Y., Jeon, Y., Huh, J. W., Jin, M. and Kim, S. (2016) Secreted tryptophanyl-tRNA synthetase as a primary defence system against infection. *Nat. Microbiol.* **2**, 16191.
46. Vartanian, A., Prudovsky, I., Suzuki, H., Dal, Pra, I. and Kisselev, L. (1997) Opposite effects of cell differentiation and apoptosis on Ap3A/Ap4A ratio in human cell cultures. *FEBS. Lett.* **415**, 160-162.
47. Favorova, O. O., Zargarova, T. A., Rukosuyev, V. S., Beresten, S. F. and Kisselev, L. L. (1989) Molecular and cellular studies of tryptophanyl-tRNA synthetases using monoclonal antibodies. Remarkable variations in the content of tryptophanyl-tRNA synthetase in the pancreas of different mammals. *Eur. J. Biochem.* **184**, 583-588.
48. Wakasugi, K. (2007) Human tryptophanyl-tRNA synthetase binds with heme to enhance its aminoacylation activity. *Biochemistry* **46**, 11291-11298.

49. Wakasugi, K. (2010) Species-specific differences in the regulation of the aminoacylation activity of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **584**, 229-232.
50. Yoshida, R., Imanishi, J., Oku, T., Kishida, T. and Hayashi, O. (1981) Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 129-132.
51. Dai, X. and Zhu, B. T. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J. Histochem. Cytochem.* **58**, 17-28.
52. Boasso, A., Herbeuval, J. P., Hardy, A. W., Winkler, C. and Shearer, G. M. (2005) Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells. *Blood* **105**, 1574-1581.
53. Platanias, L. C. (2005) Mechanism of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375-386.
54. Saha, B., Prasanna, S. J., Chandrasekar, B. and Nandi, D. (2010) Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon γ . *Cytokine* **50**, 1-14.

謝辞

本研究で用いたマウス ES 細胞の cDNA は、東京工業大学の田川陽一准教授、玉井美保先生に提供していただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、指導教官の若杉桂輔准教授には、研究の機会・環境を与えていただくとともに、多くのご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

研究全般において、若杉研究室の高橋望先生、同期、後輩、そして卒業した先輩方には貴重な助言をいただきました。皆様とのディスカッションは、本研究を進めるにあたり大きな力となりました。また、生命環境科学系の諸先生方、同期の皆様にも研究面や精神面で支えていただきました。楽しい学生生活を送ることができたのも皆様のおかげだと心から感謝しています。

最後に、私のことを理解し、学業に専念できるよう精神面、経済面で支えてくださった家族に深く感謝いたします。