The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

アミノアシルtRNA合成酵素の新規生理機能の探索

若杉　桂輔*・宮ノ腰美希

約38億年前に生命が誕生して以来，単細胞生物から多細胞生物の出現，脊椎動物の出現，さらに，免疫系，脳神経系の発達など，生物は進化を続けている．生命現象を実際に担っている分子にタンパク質がある．タンパク質は全部で20種類のアミノ酸がペプチド結合で連なったもので遺伝情報に基づいて合成される．一般に原始的な生物のタンパク質は単純で一つの機能だけを担っている．他方，高等な生物では，タンパク質にアミノ酸置換や付加ドメインの融合などが起こることにより，従来の原始的な生物の機能を維持しながらもまったく別の機能を併せ持ったものもあることがわかってきた．つまり，生物の進化に伴い，タンパク質の機能も進化していることが最近わかってきた．本稿では，タンパク質の合成に不可欠ですべての生物に存在するアミノアシルtRNA合成酵素を取り上げ，これまで筆者らが明らかにしてきた新たな生理機能および生物進化に伴う機能進化について概説する．

付加ドメインを有するヒトのアミノアシルtRNA合成酵素

アミノアシルtRNA合成酵素は，全身の細胞に発現しており，細胞内でATPの加水分解エネルギーを用いて転移RNA（tRNA）とアミノ酸からアミノアシルtRNAを合成する（アミノアシル化）反応を触媒するタンパク質である．20種類のアミノ酸それぞれに対して特有なアミノアシルtRNA合成酵素が存在する．

アミノ酸 + ATP + tRNA →
アミノアシルtRNA + AMP + PPi

この酵素反応は2段階からなる．まず1段階目に，ATPのエネルギーによりアミノ酸がアミノアシルAMPの状態に活性化され，2段階目に，アミノアシルAMPとtRNAが反応しアミノアシルtRNAが産生する．

1) アミノ酸 + ATP ⇄ アミノアシルAMP + PPi
2) アミノアシルAMP + tRNA →
アミノアシルtRNA + AMP

チロシルtRNA合成酵素（TyrRS）はアミノ酸の一つであるチロシンをtRNAへと結合させるアミノアシル化反応を触媒する酵素である．図1のようにヒトのTyrRSではアミノアシル化活性を持つ触媒活性ドメイン（mini TyrRS）のC末端側に下等な真核生物のTyrRSでは見られない付加ドメインを融合していること，そしてこの付加ドメインがアミノアシル化活性には影響を与えないことが明らかになった[1,2]．そこで，付加ドメインの意義を探るために，アミノ酸配列の類似性に着目した検索（ホモロジー検索）をしたところ，このC末端付加ドメインの配列が細胞間の情報伝達物質（サイトカイン）であるendothelial-monocyte-activating polypeptide II（EMAP II）と類似していることが明らかになり，サイトカインとしての活性に着目して実験したところ，C末端付加ドメインがEMAP II同様に単球と好中球の両方に対してサイトカインとして機能することを発見した（図2）[3]．TyrRSのようにアミノアシル化活性には関与しない付加ドメインを有するアミノアシルtRNA合成酵素の報告は他にもされており，ヒトのトリプトファニルtRNA合成酵素（TrpRS）では下等な真核生物のものと比べN末端側に付加ドメインが存在する（図1）．また，ヒト細胞内には，alternative splicingにより付加ドメインを欠き触媒活性ドメインのみからなるmini TrpRSが完全長TrpRSとともに存在することが明らかになっている（図1）[4,5]．

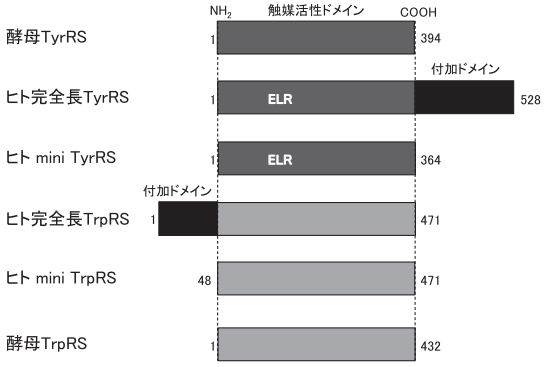

図1．酵母とヒトのTyrRSとTrpRS間での一次構造比較．Clustal Wによりアミノ酸配列のアライメントを行った結果を示す．N末端，C末端の番号は各末端のアミノ酸残基番号を示す．

ヒトmini TyrRSは細胞外でサイトカインとして機能する

TyrRSに対するサイトカイン活性に着目した実験の結果，驚いたことに，C末端付加ドメインを欠くmini TyrRSもまた，好中球に特異的なサイトカイン活性を持つことを発見した（図2）[3]．さらに，ヒトの完全長

*著者紹介　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（准教授）　E-mail: wakasugi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

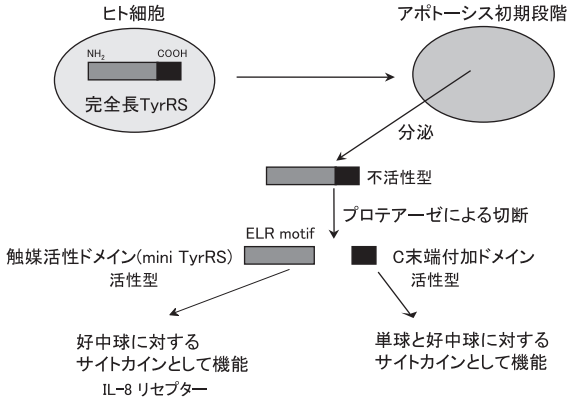

図2. サイトカインとして機能するヒトTyrRS

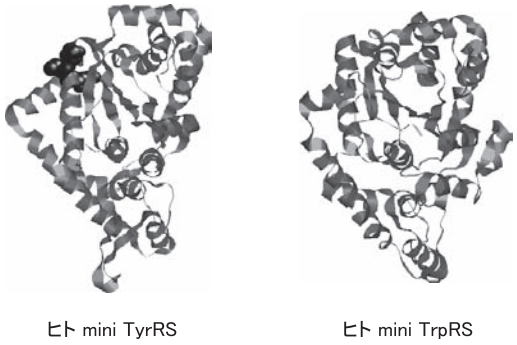

図3. ヒトmini TyrRSとヒトmini TrpRS間の立体構造比較. タンパク質をリボンモデルで表した. また，ヒトmini TyrRS内のELRモチーフのアミノ酸残基を空間充填モデルで示した.

TyrRSがアポトーシスの初期段階で細胞外に分泌され，タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）によりmini TyrRSとC末端付加ドメインとに切断されること，また切断前の完全長TyrRSはサイトカインとしての活性はないことも明らかになった(図2)[3]. これらに加えて，mini TyrRSは細胞表面にあるインターロイキン-8(IL-8)リセプターに結合することが明らかになり，IL-8の場合と同様にGlu-Leu-Arg（ELR）という3つのアミノ酸からなるモチーフ配列がサイトカイン活性に重要であることが判明した[3]. さらに，ヒトmini TyrRSのX線結晶構造解析により，ELRモチーフがタンパク質表面に露出していることも明らかになった(図3).

酵母菌TyrRSでは，ELRに相当する配列がNYRとなっており，サイトカイン活性がないことも判明した[6]. また，付加ドメイン内のサイトカイン活性に重要な領域の配列も生物種ごと大きく異なっており，より下等な生物の類似した配列ではサイトカインとしての活性がないことも明らかになった[6]. 以上の結果から，TyrRSが生物の進化に伴い突然変異を繰り返し，サイトカイン活性を獲得してきたと考えられる.

ヒトmini TyrRSおよびmini TrpRSは血管新生の制御因子として働く

IL-8はαケモカインの一つであり，ELRモチーフを持つαケモカインは血管新生を促進する因子として働き，ELR以外の配列を持つαケモカインは逆に血管新生を抑制する因子として機能することが報告されていた[7]. そこで，20種類のアミノアシルtRNA合成酵素の中でTyrRSと最も分子進化的に近縁の酵素であるトリプトファニルtRNA合成酵素（TrpRS）に着目した. 図3のようにTrpRSの触媒活性ドメインはTyrRSの触媒活性ドメインと非常に構造が類似している. ヒトTyrRSのELRモチーフに相当する配列がヒトTrpRSではELRとは異なっていることから，ELRモチーフを持つmini TyrRSが血管新生促進因子として，ELRモチーフを持たないmini TrpRSが血管新生抑制因子として働くという仮説をたて検証を行った.

まずELRモチーフを持つヒトmini TyrRSの血管新生の活性について解析した結果，mini TyrRSがIL-8と同様，血管内皮細胞のケモタキシスを誘導し，血管新生促進因子として働くことを発見した(図4)[9]. さらに，IL-8の活性にはELRの3アミノ酸の配列が重要であるが，mini TyrRSにおいてもELR配列がきわめて重要であることが部位特異的アミノ酸置換体を用いた解析により明らかになった[9]. また，mini TyrRSの血管新生促進能は，IP-10などの血管新生抑制因子により抑制されることも明らかになった[9]. 完全長TyrRSには，mini TyrRSが持つ血管新生促進因子としての活性がまったくないことも判明した[9].

さらに，ELRモチーフを持たないヒトmini TrpRSは逆に血管新生抑制因子として働くことを発見した(図4)[8]. また，ヒト完全長TrpRSのN末端付加ドメインはプロテアーゼによって切断され，mini TrpRSとほぼ同じ大きさのT1 TrpRS（a.a.71-471），T2 TrpRS（a.a.94-471）が産生し，これらもまた血管新生抑制因子として働くことが明らかとなった[8]. 特にT2 TrpRSは血管内皮細胞の

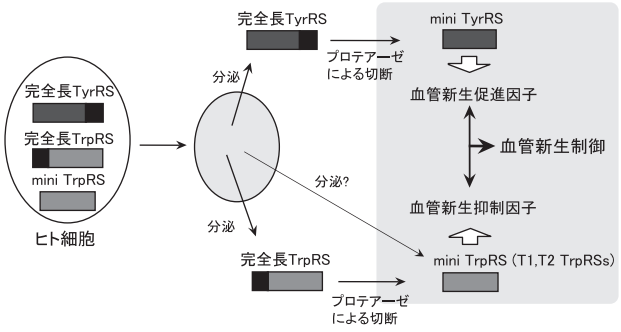

図4. 血管新生の制御因子として働くヒトmini TyrRSとヒトmini TrpRS

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

表面に存在するVE-カドヘリンに結合することで血管新生を抑えることが明らかにされた[10]．ヒトmini，T1，T2 TrpRSは，血管新生促進因子として機能するmini TyrRSの働きも抑制することから，TrpRSとTyrRSはファミリーを形成し，血管新生の制御をしていると考えられる（図4）．ヒトTrpRSの触媒活性ドメインは，その後，糖尿病性網膜症，加齢（老人性）黄斑変性症の治療薬として臨床試験が行われており，市販の薬より優れた治療効果を持ち，しかも，副作用がきわめて低いという結果が得られている．

生物種特異的なTrpRSのアミノアシル化活性制御機構

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分化の際にも高発現することが報告されている[11,12]．そこで，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目指した．ヒト培養細胞に，プロトポルフィリン鉄錯体であるヘムの合成阻害剤succinylacetoneを加えるとTrpRSの発現量には影響を与えずにTrpRSのアミノアシル化活性が大きく減少すること，また，この系に外からヘムを補うとTrpRS活性が増加することを見いだした[13]．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，ヘムの結合に伴ってTrpRS活性が上昇することを明らかにした[13]．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）の創製にも成功した[13]．

つぎに，TrpRSの機能の分子進化の解明を目指し，ヒト以外に，ウシ，マウス由来の完全長TrpRSを用いて生物種間での機能の比較を行った．これらTrpRSはいずれもヒトTrpRS同様N末端付加ドメインを有している．機能解析の結果，ヒトの完全長TrpRS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を持つ一方，ヒト以外のウシ，マウスの完全長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を初めて明らかにした[14]．さらに，タンパク質工学を駆使し，ヒト完全長TrpRSを常時活性型に，ウシ完全長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[14]．現在，ヒトTrpRSにのみ存在するアミノアシル活性の不活性型（ヘム，亜鉛イオン非結合時）の生理学的意義の解明を目指している．特に，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り，このヒト特有のIFN-γによる発現量の増加とヒトTrpRS特有な活性制御機構とが関連しているどうか，以前筆者らが発見した酸化ストレスによるヒトTrpRSの活性制御機構の解析結果[15,16]もふまえながら，研究を推し進めている．

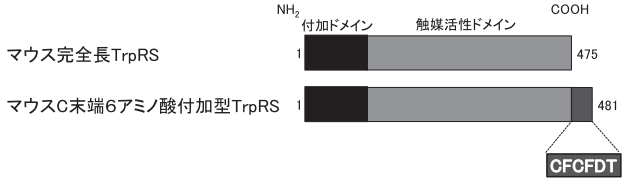

図5．マウスES細胞でalternative splicingにより産生されるC末端に6アミノ酸を付加されたTrpRS

マウス胚性幹細胞（ES細胞）内で産生される特異なTrpRS

1994年にマウスES細胞内でTrpRSに関してヒトの場合とは異なるalternative splicingが起こっていることが明らかになった[17]．マウスのES細胞と脳細胞においてalternative splicingにより産生されるTrpRSのmRNA量を比較解析した結果，alternative splicingがES細胞において特異的に起こっていることが明らかになった[17]．このalternative splicingにより通常型と比較してC末端に6アミノ酸（Cys-Phe-Cys-Phe-Asp-Thr-COOH）が余分に付加されたTrpRSが産生される（図5）[17]．この付加配列はRasタンパク質や三量体Gタンパク質γサブユニット内の配列と類似しており，これらタンパク質で見られるようにCys残基へのプレニル基の付加などの翻訳後脂質修飾が起こるかもしれない．このマウスC末端6アミノ酸付加型TrpRSの解析はこの報告以来現在に至るまでまったく行われておらず，現在，筆者らの研究室で構造及び機能解析を進めているところである．このタンパク質がマウスES細胞においてどんな生理機能を担っているのか大変興味深い．

文　献

1) Wakasugi, K. *et al.*: *EMBO J.*, **17**, 297 (1998).
2) Kleeman, T. A. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **272**, 14420 (1997).
3) Wakasugi, K. and Schimmel, P.: *Science*, **284**, 147 (1999).
4) Tolstrup, A. B. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **270**, 397 (1995).
5) Turpaev, K. T. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **240**, 732 (1996).
6) Wakasugi, K. and Schimmel, P.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 23155 (1999).
7) Strieter, R. M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **270**, 27348 (1995).
8) Wakasugi, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 173 (2002).
9) Wakasugi, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **277**, 20124 (2002).
10) Tzima, E. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **280**, 2405 (2005).
11) Fleckner, J. *et al.*: *Cytokine*, **7**, 70 (1995).
12) Shaw, A. C. *et al.*: *Electrophoresis*, **20**, 984 (1999).
13) Wakasugi, K.: *Biochemistry*, **46**, 11291 (2007).
14) Wakasugi, K.: *FEBS Lett.*, **584**, 229 (2010).
15) Wakasugi, K. *et al.*: *Biochemistry*, **44**, 225 (2005).
16) Wakasugi, K.: *Biochemistry*, **49**, 3156 (2010).
17) Pajot, B. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **242**, 599 (1994).

NII-Electronic Library Service