

宇宙地球フロンティア実地研修 報告書

Report for Onsite Training in Earth-Space Frontier Science

氏名/Name	村山華子 / Hanako Murayama		
所属部局/ Affiliation	理学系 研究科 生物科学 専攻 Department of Biological Sciences , Graduate School of Science		
研究機関・企業名 /Hosting Institution	スクリプス研究所 / Scripps Research Institute		
期間/Period	2025 年 1 月 28 日 1/28/2025	～ 2025 年 5 月 1 日 5/1/2025	* 西暦で記入 mm/dd/yyyy

【研究内容】 本研究では、GlyRS (glycyl-tRNA synthetase) と Nrp1 (neuropilin-1) との相互作用に焦点を当てた解析を行った。近年、GlyRS が翻訳以外の機能を持つことが複数報告されており、その一つとして神経細胞における GlyRS と Nrp1 の結合が注目されている。本研究では、先行研究により示唆されたこの相互作用の分子基盤を明らかにすることを目的とし、特に GlyRS のどのドメインが Nrp1 との結合に関与しているか、また tRNA がこの結合にどのように関わっているかについて検討した。具体的には、GlyRS のドメイン欠損体を作製し、免疫沈降およびウェスタンブロットを用いた結合解析を実施した。また、質量光度測定 (mass photometry) を用いて GlyRS と Nrp1 の複合体形成の状態を可視化するとともに、tRNA の存在・非存在下での複合体形成の変化を評価した。さらに、ノーザンブロットを用いて tRNA の修飾状態と GlyRS-Nrp1 結合の関連性についても解析を行った。これらのアプローチにより、GlyRS の翻訳外機能を支える新たな分子メカニズムの解明を試みた。

【研究状況】 本研究ではまず、GlyRS の既知の構造情報に基づいて、Nrp1 との相互作用に関与すると予想されるドメイン (WHEP ドメインおよび Ins3 ドメイン) を欠損させた変異体を作製した。これらの変異体および野生型 GlyRS を用いて免疫沈降・ウェスタンブロットを行った結果、WHEP および Ins3 ドメインを欠損させた GlyRS は、野生型よりも Nrp1 との結合が強くなることが明らかになった。このことは、これらのドメインが結合を抑制的に制御している可能性を示唆するものである。さらに、質量光度測定により、GlyRS と Nrp1 が一定のモル比で安定した複合体を形成することが確認された。この複合体形成には tRNA が重要な役割を果たしている可能性が示された。

[Research Content] In this study, we focused on the interaction between glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) and neuropilin-1 (Nrp1).

Recent studies have reported several non-canonical functions of GlyRS beyond translation, among which its interaction with Nrp1 in neuronal cells has attracted particular attention.

The aim of this work was to clarify the molecular basis of this interaction—specifically, to identify which domains of GlyRS are involved in Nrp1 binding and how tRNA contributes to this interaction.

To this end, we generated domain-deletion mutants of GlyRS and performed binding analyses using immunoprecipitation and western blotting.

We also used mass photometry to visualize the state of GlyRS–Nrp1 complex formation and evaluated how tRNA presence or absence affects complex assembly.

Furthermore, we examined the relationship between the tRNA modification state and GlyRS–Nrp1 binding by northern blotting.

Through these approaches, we sought to uncover a novel molecular mechanism underlying the non-translational functions of GlyRS.

[Research Progress] Based on the available structural information on GlyRS, we first generated mutants lacking the WHEP and Ins3 domains, both predicted to participate in Nrp1 interaction.

Immunoprecipitation and western blot analyses using these mutants and the wild-type enzyme revealed that GlyRS lacking either the WHEP or Ins3 domain bound Nrp1 more strongly than the wild type.

This finding suggests that these domains may negatively regulate Nrp1 binding.

Mass photometry further confirmed that GlyRS and Nrp1 form a stable complex at a defined stoichiometric ratio, and that tRNA likely plays a crucial role in stabilizing this complex formation.

