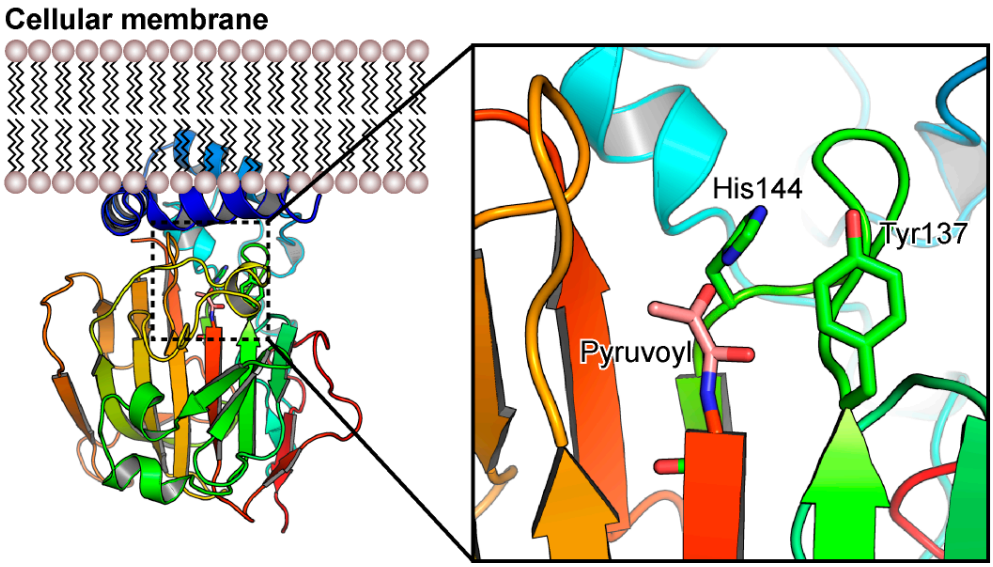
187　PS脱炭酸酵素による生体膜リン脂質の生合成機構の解明	渡邊　康紀

【目的】細胞やオルガネラが正常に機能するには生体膜を構成するリン脂質組成が正しく保たれていることが重要である。例えば大腸菌の細胞膜は約 70%がホスファチジルエタノールアミン（PE）から構成されており、ホスファチジルセリン（PS）から PE の生合成を担う PS 脱炭酸酵素をコードする *psd* 遺伝子は大腸菌の生育に必須であることが知られている。PS 脱炭酸酵素は細菌からヒトに至るまで広く保存されており、新規抗菌薬の開発やリン脂質代謝異常による疾患の治療のための標的分子として適していると考えられるが、PS 脱炭酸酵素による基質認識メカニズム等、PE 生合成の詳細な分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、大腸菌由来 PS 脱炭酸酵素（EcPsd）に着目し、EcPsd の X 線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った。

【方法および結果】EcPsd を大腸菌の系を用いて調製し、良質な結晶を得ることに成功した。SPring-8 で回折データを収集し、セレノメチオニン置換体結晶を用いた単波長異常分散法により位相決定を行い、最終的に 2.6 Å分解能で構造を決定した。EcPsd はフォールドの片側に正電荷が優勢なくぼみを形成しており、その周囲は疎水性アミノ酸残基が多く存在していた。活性中心を形成すると考えられる EcPsd のαサブユニットの N 末端に存在するピルボイル基はくぼみの底部に位置していたことから、負電荷を持つ PS 頭部はくぼみに入り反応が起こることが示唆された。構造に基づいた変異解析により、N 末端ヘリックス領域は細胞膜への結合に関与し、活性中心付近の Tyr137 および His144 は PS 脱炭酸反応の酵素活性に重要であることが示された。

EcPsd の細胞膜結合モデルと活性部位の拡大図



187. PS 脱炭酸酵素による生体膜リン脂質の生合成機構の解明

渡邊　康紀

愛媛大学 大学院農学研究科 生命機能学専攻 応用生命化学コース 生化学教育分野

Key words：リン脂質，PS 脱炭酸酵素，X 線結晶構造解析

緒　言

細胞膜やオルガネラ膜の主な構成成分であるリン脂質は、頭部の形状や極性の違いによる膜の形態変化、膜タンパク質の活性や安定性への関与、種々シグナル伝達の関与など様々な役割を担っている。また、生体膜はそれぞれ固有のリン脂質組成を有しており、細胞やオルガネラが正常に機能するには多くのタンパク質の機能の場となる生体膜を構成するリン脂質の組成が正しく保たれていることが重要である。例えば大腸菌の細胞膜は約 70%がホスファチジルエタノールアミン（PE）から構成されており、ホスファチジルセリン（PS）から PE の生合成を担う PS 脱炭酸酵素をコードする *psd* 遺伝子は大腸菌の生育に必須であることが知られている［1］。また、マウスの PS 脱炭酸酵素をコードする *Pisd* 遺伝子を欠損すると胚性致死に至ることが知られている［2］。さらに最近、白内障や骨系統疾患に関連するヒト *PISD* 遺伝子の変異が報告された［3，4］。これらは生体膜を構成するリン脂質の代謝の恒常性維持が生命活動に密接に関連していることを示唆している。細菌からヒトに至るまで広く保存された PS 脱炭酸酵素は、生命活動に重要なリン脂質代謝の恒常性維持に関与していることから、新規抗菌薬の開発やリン脂質代謝異常による疾患の治療のための標的分子として適していると考えられる。PS 脱炭酸酵素は前駆体として翻訳された後、セリンプロテアーゼ様自己プロセシング反応によりα、βの二つのサブユニットに分かれ成熟体となり、自己プロセシング反応の過程でαサブユニットの N 末端に PS の脱炭酸反応の活性中心となるピルボイル基が形成される（図 1）。しかし、PS 脱炭酸酵素による基質認識メカニズム等、PE 生合成の詳細な分子機構は明らかになっていない。

そこで本研究では、大腸菌由来 PS 脱炭酸酵素（EcPsd）に着目し、EcPsd の X 線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った。EcPsd の活性部位付近は正電荷が優勢な窪みを形成しており、その周囲は多くの疎水性アミノ酸残基で形成されたヘリックス構造により囲まれていた。このことから EcPsd の疎水性領域を介して膜と結合し、頭部に負電荷を持つ PS は正電荷を帯びた窪みに入り脱炭酸反応が起こることが示唆された。

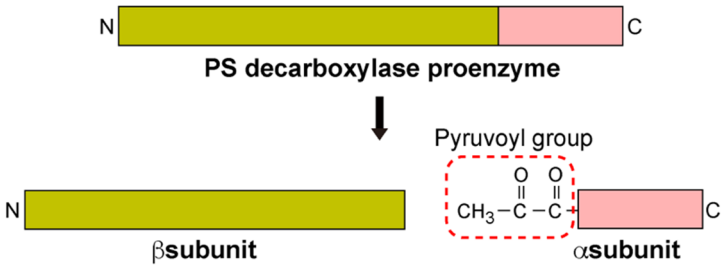


図 1. PS 脱炭酸酵素の自己プロセシング反応

PS 脱炭酸酵素は前駆体として翻訳された後、セリンプロテアーゼ様自己プロセシング反応によりα、βの二つのサブユニットに分かれ成熟体となり、自己プロセシング反応の過程でαサブユニットの N 末端に PS の脱炭酸反応の活性中心となるピルボイル基が形成される。

方　法

1.　組換え EcPsd の調製

活性測定に用いた EcPsd（322 アミノ酸残基）および各種変異体について、大腸菌を用いて C 末端 His タグ融合組換えタンパク質として発現させ、1% Tween-20 を含む緩衝溶液中で細胞を超音波で破砕した。細胞破砕液の上清を Ni アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。結晶化には EcPsd の 1～289 アミノ酸残基の領域を用い、大腸菌の系により N 末端 His タグ融合組換えタンパク質として発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

2.　結晶化および X 線結晶構造解析

精製した EcPsd（1～289）を結晶化サンプルとし、各種スクリーニングキットを利用して蒸気拡散法により結晶化条件のスクリーニングを行った。Tacsimate を主な沈殿剤に用いた条件で結晶が得られた。得られた結晶を用いて SPring-8 の BL26B1 および BL41XU において回折実験を行い、2.6 Å分解能の回折データを収集した。セレノメチオニン標識した EcPsd 結晶を調製し、セレンを利用した単波長異常分散法により位相を決定した。

3.　EcPsd の活性測定

250 nM 精製 EcPsd と 10 μM の蛍光標識された PS（NBD-PS）を 30℃にて 30 min インキュベート後、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより抽出した脂質を分離した。

結果および考察

1.　EcPsd の結晶構造

EcPsd は全長（1～322）では結晶を得ることはできなかったが、活性に必要のない C 末端の領域を削ったコンストラクト（1～289）の結晶を得ることに成功し、2.6 Å分解能の回折データを用いて結晶構造を決定した（図 2）。結晶構造では、α サブユニットのピルボイル基は N 末端ヘリックス領域が形成するくぼみの中心に位置していた。活性中心と予想されるピルボイル基の周囲の表面電荷は正電荷が優勢であり、負電荷を持つ PS 頭部を認識するには適した構造であると考えられる。

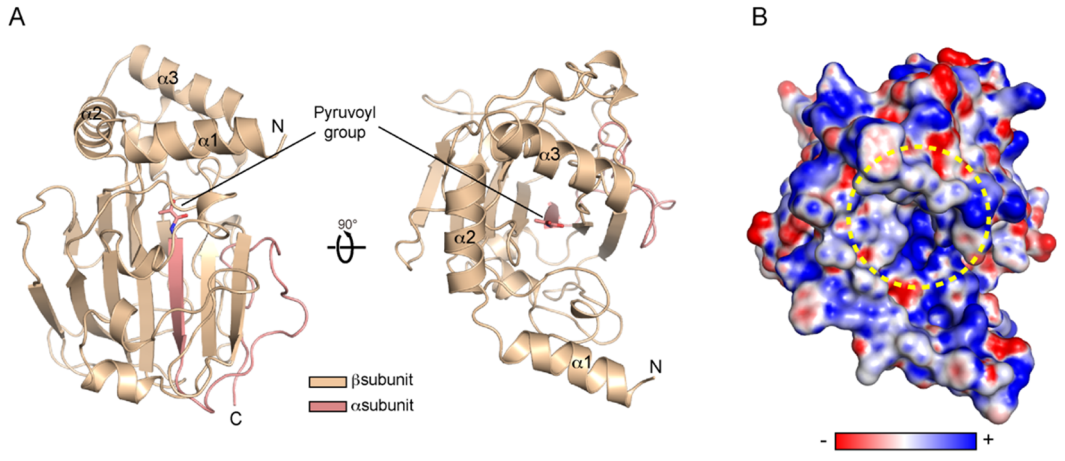


図 2.　EcPsd の結晶構造

A）　EcPsd の結晶構造のリボンモデル図。α サブユニットをピンク色で、β サブユニットを薄茶色で示す。

B）　EcPsd の表面電荷。負電荷を赤色で、正電荷を青色で示す。活性中心のくぼみを黄色の破線で示す。

2. His144 は自己プロセシング反応に関与する

生物種間で保存されており、ピルボイル基の付近に位置しているアミノ酸残基に変異を導入し、各変異体を精製し、自己プロセシング反応への影響を調べた（図 3）。自己プロセシング反応後、ピルボイル基に変換される Ser254 を Ala に変異すると、自己プロセシング反応は全く起こらなかった。H144A 変異により、自己プロセシング反応の効率は低下していた。この結果から His144 は自己プロセシング反応に関与することが示唆された。

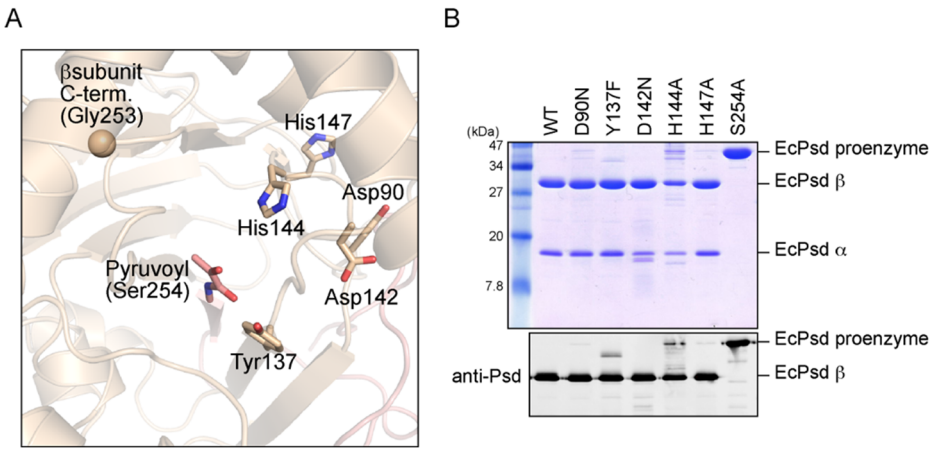


図 3. 自己プロセシング反応に関与するアミノ酸残基

A） EcPsd の活性中心部の構造。

B） 精製した各種変異体。上段：CBB 染色、下段：抗 EcPsd 抗体を用いたウエスタンブロット。

3. Tyr137 および His144 は PS の脱炭酸反応に関与する

調製した各変異体を用いて PS 脱炭酸反応の酵素活性を調べた（図 5）。活性中心のピルボイル基が形成されない S254A 変異により PS 脱炭酸反応の酵素活性は無くなった。Y137F および H144A 変異体は自己プロセシング反応が起こっているにも関わらず、PS 脱炭酸反応の効率は低下していた。以上の結果から、Tyr137 および His144 は PS の脱炭酸反応に関与することが示唆された。

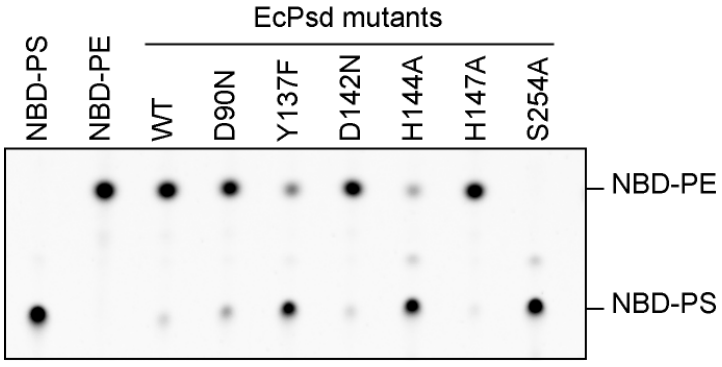


図 4. PS 脱炭酸反応の酵素活性

NBD-PS を用いた薄層クロマトグラフィーによる PS 脱炭酸反応の酵素活性測定。

4. N 末端ヘリックス領域は膜への結合および PS の脱炭酸反応に関与する

EcPsd の N 末端ヘリックス領域は多くの疎水性アミノ酸残基から形成されていた（図 5A）。このことから EcPsd は N 末端ヘリックス領域を介して膜と結合する可能性が示唆された。この仮説を検証するために、N 末端ヘリックス領域の 1～60 アミノ酸残基を欠損したコンストラクト（EcPsd ΔN60）を作製した。野生型 EcPsd は大腸菌から調製する際、緩衝溶液中に界面活性剤である Tween-20 を加えないと効率良く可溶性画分に得られない。しかし、EcPsd ΔN60 は Tween-20 非依存的に可溶性画分に得られた（図 5B）。また、EcPsd ΔN60 の PS 脱炭酸反応の酵素活性を調べたところ、活性は無くなっていた（図 5C）。以上のことから N 末端ヘリックス領域は細胞膜への結合および PS の脱炭酸反応に重要であることが示された。

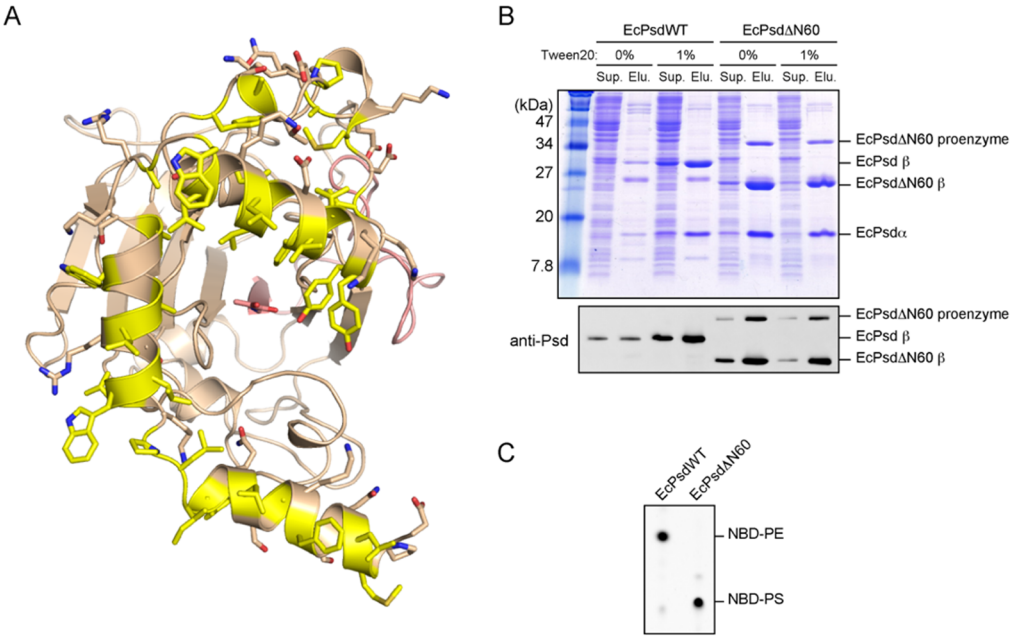


図 5. EcPsd の N 末端ヘリックス領域

A） EcPsd の結晶構造のリボンモデル図。N 末端ヘリックス領域の疎水性アミノ酸残基を黄色で示す。

B） 野生型 EcPsd および EcPsd ΔN60 を大腸菌の系で発現させ、1% Tween-20 存在下もしくは非存在下で細胞を破砕し、Ni アフィニティークロマトグラフィーを行い、各画分を SDS-PAGE に供した。Sup.：大腸菌破砕後の上清、Elu.：Ni アフィニティークロマトグラフィー溶出画分。

C） 野生型 EcPsd と EcPsd ΔN60 における PS 脱炭酸反応の酵素活性。

本研究において、EcPsd の結晶構造を 2.6 Å分解能で決定し、自己プロセシング反応および PS 脱炭酸反応に重要なアミノ酸残基を同定した。さらに、EcPsd は疎水性の N 末端ヘリックス領域を介して細胞膜と結合し、活性中心のピルボイル基が位置する正電荷を帯びたくぼみに基質である PS が入ることで脱炭酸反応が進行することが示唆された（図 6）。現在、PS がどのように認識されるのか明らかにするために EcPsd と PS の複合体の結晶構造解析に取り組んでいる。

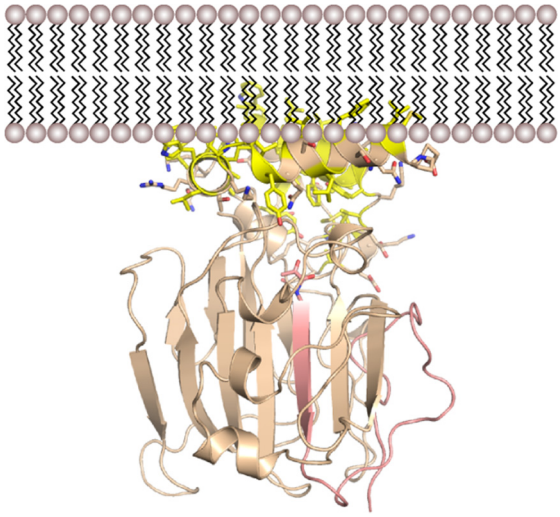


図 6. EcPsd の細胞膜への結合モデル
EcPsd は疎水性の N 末端ヘリックス領域を介して細胞膜と結合する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、愛媛大学大学院農学研究科生命機能学専攻応用生命化学コース生化学教育分野の渡辺誠也である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Hawrot M, Kennedy EP. Conditional lethal phosphatidylserine decarboxylase mutants of Escherichia coli. Mapping of the structural gene for phosphatidylserine decarboxylase. Mol Gen Genet. 1976 Nov 17;148(3):271-9. PMID: 796663

2) Steenbergen R, Nanowski TS, Beigneux A, Kulinski A, Young SG, Vance JE. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. J Biol Chem. 2005 Dec 2;280(48):40032-40. Epub 2005 Sep 28. PMID: 16192276 DOI: 10.1074/jbc.M506510200

3) Girisha KM, von Elsner L, Neethukrishna K, Muranjan M, Shukla A, Bhavani GS, Nishimura G, Kutsche K, Mortier G. The homozygous variant c.797G>A/p.(Cys266Tyr) in PISD is associated with a Spondyloepimetaphyseal dysplasia with large epiphyses and disturbed mitochondrial function. Hum Mutat. 2019 Mar;40(3):299-309. doi: 10.1002/humu.23693. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30488656 DOI: 10.1002/humu.23693

4) Zhao T, Goedhart CM, Sam PN, Sabouny R, Lingrell S, Cornish AJ, Lamont RE, Bernier FP, Sinasac D, Parboosingh JS; Care4Rare Canada Consortium, Vance JE, Claypool SM, Innes AM, Shutt TE. *PISD* is a mitochondrial disease gene causing skeletal dysplasia, cataracts, and white matter changes. Life Sci Alliance. 2019 Mar 11;2(2). pii: e201900353. doi: 10.26508/lsa.201900353. Print 2019 Apr. PMID: 30858161 DOI: 10.26508/lsa.201900353