

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06967

研究課題名(和文) リン脂質リモデリング酵素LPCAT1の構造機能解析

研究課題名(英文) Structural basis of phospholipid remodeling acyl-transferase LPCAT1

研究代表者

有吉 真理子 (ARIYOSHI, Mariko)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：80437243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質は、細胞内環境を維持する細胞膜の形成、細胞内外の物質輸送、膜タンパク質の局在・活性制御に関与し、シグナル伝達のメディエーターとしての機能も担う。脂肪酸鎖リモデリング経路は、リン脂質のホメオスタシスにおいて極めて重要な役割を果たす。本研究では、リン脂質リモデリングに関わるアシル転移酵素の一つであるリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素LPCAT1のEF-hand ドメインの立体構造を明らかにし、そのカルシウム結合能と基質認識への影響に関する新規の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids are not only the major structural components of membrane lipid bilayers, but also essential determinants of membrane biophysical properties. In addition, phospholipid mediators are involved in crucial signal transduction pathways. Phospholipid remodeling is a fundamental cellular function to generate diverse phospholipids and maintain phospholipid homeostasis. Lpcat1 is one of the acyl-transferases involved in phospholipid remodeling. LPCAT1 contains two canonical EF-hand motifs along with the catalytic domain, and has been supposed that its catalytic activity is regulated in a calcium-dependent manner. We determined the crystal structure of the EF-hand domain of LPCAT1 in apo and calcium bound forms. The crystal structure has revealed its unique domain structure comprised of four EF-hand motifs. Combined with biochemical data, the structural data gain our understanding about calcium binding mode of the EF-hand motifs and its effect on substrate binding.

研究分野：構造生物学

キーワード：リン脂質リモデリング アシル転移酵素 カルシウム結合モチーフ 結晶構造

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜の主要構成成分であるリン脂質は、グリセロールやスフィンゴシンなどを骨格として含む極性頭部と様々な脂肪酸鎖からなる疎水性領域を持つ。2本の脂肪酸鎖と極性基の組み合わせによって、生体内には、多様なリン脂質が存在する。生体膜リン脂質の脂肪酸組成の変化は、膜の流動性・透過性や膜タンパク質の局在などに影響を及ぼし、細胞の機能・形態を変質させる。さらに、炎症や免疫シグナルのメディエーターとしての役割を担うリン脂質も同定され、新たなリン脂質の生理的機能に注目が集まっていた。酸化ストレスなどで引き起こされる生体膜の変質は、細胞内外の物質輸送やシグナル伝達など様々な細胞機能の異常を引き起こすと考えられ、リン脂質の多様性に関する脂肪酸鎖リモデリング経路の重要性が認識され始めていた。

脂肪酸鎖リモデリング経路では、脱アシル化によって、脂肪酸鎖を1本失ったリゾリン脂質に再度脂肪酸鎖を結合することによって、リン脂質の再合成、脂肪酸鎖の組換えがおこる(図1)。1960年代に脂肪酸鎖リモデリング経路が提唱されて以来、再アシル化の分子機構は長い間不明であったが、再アシル化を担うリゾリン脂質アシル転移酵素が同定され、それらの機能解析が急速に進んでいる状況にあった。これらの酵素は、脂肪酸-CoA (アシル-CoA) から脂肪酸をリゾリン脂質に転移する活性を有するが、それらの基質特異性や触媒機構の詳細については不明な点が多く残されていた。このようなリン脂質の脂肪酸鎖リモデリングの分子機構の全容解明には、これら酵素の立体構造情報の蓄積が重要であると考えられた。

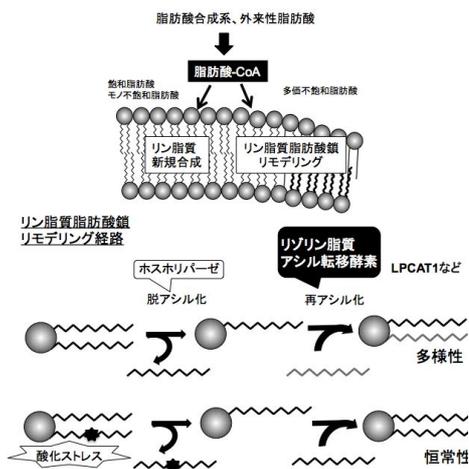


図1 リン脂質脂肪酸鎖リモデリング

### 2. 研究の目的

本研究では、リン脂質のホメオスタシス制御機構解明の糸口となる分子として、リン脂質リモデリングに関わるアシル転移酵素のひとつとして同定されたリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 LPCAT1 に着目した。

LPCAT1 は、1-アシルグリセロール-3-リン酸-0-アシル転移酵素 (AGPAT) ファミリーに属する小胞体膜上に局在するアシル転移酵素であり、リゾホスファチジルコリンと脂肪酸-CoA から生体膜の主要成分であるホスファチジルコリンを再構成する( )。LPCAT1 は、酸化された生体膜中のホスファチジルコリンの修復や正常な肺の機能を維持するための肺上皮細胞における生体内界面活性剤(肺サーフェクタントリン脂質)の合成に関与する( )。さらに、免疫アレルギーメディエーターとして機能するリン脂質である血小板活性化因子の合成制御にも関わることも示されている( )。本研究では、LPCAT1 のアシル基転移反応の構造基盤情報を得るため、ヒト由来 LPCAT1 の立体構造解析を行った。

### 3. 研究の方法

LPCAT1 は、アミノ末端領域にある膜貫通領域、AGPAT ファミリーに保存された触媒ドメインを有する。まず、アミノ酸配列解析、2次構造予測、立体構造予測の解析結果から、構造機能解析に適した領域の検討を行った。その結果、LPCAT1 の N 末領域におよそ 25 アミノ酸残基からなる膜貫通ヘリックス(TM 領域)が存在することが予測された。また、C 末領域には、2つのカルシウム結合モチーフ、EF-hand が存在する(図2)。この情報に基づき、それぞれの機能ドメインの大腸菌大量発現系を構築し、構造解析及び生化学的な解析に適した均一な試料調製法を確立した。

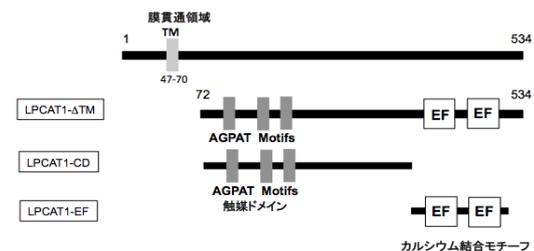


図2 LPCAT1 の機能ドメイン

#### (1) LPCAT1 EF-hand 領域の結晶構造解析

カルシウム結合モチーフである2つのEF-handを含む領域(LPCAT1-EF; アミノ酸325-495)の結晶化を行い、X線回折実験に適した単結晶を得た。結晶化は、10 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下、もしくは10 mM 金属キレート剤であるEGTA存在下の両方で行った。どちらの場合もマロン酸を沈殿剤とする類似の結晶化条件から単結晶を得た。セレノメチオニンを導入したタンパク質試料を調製、結晶化し、セレンの異常分散効果を用いて初期位相を得た。最終的に LPCAT1 EF-hand ドメインの結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定した。X線回折データ収集は、高エネルギー加速器研究

機構・放射光実験施設のビームライン (PF BL1A, BL17) を用いた。

## (2) LPCAT1 触媒ドメインの精製・結晶化

第一に、触媒ドメイン (LPCAT1-CD; アミノ酸 75-295) の発現・精製を行ったが、大部分が不溶性タンパク質として発現され、構造機能解析に十分な量のタンパク質試料を得ることができなかった。そこで、EF-hand モチーフを含む領域 (LPCAT1- $\Delta$ TM: アミノ酸 75-495) の発現・精製を行い、機能解析に十分な量のタンパク質試料を得ることに成功した。得られたタンパク質を用いて、結晶化及び基質との結合実験を行った。

## (3) LPCAT1- $\Delta$ TM の基質結合

LPCAT 1 は脂肪酸 Co-A の一つであるパルミトイル Co-A の脂肪酸をリゾリン脂質に付加する脂肪酸転移反応を触媒する。そこで、基質となるパルミトイル Co-A との結合に対するカルシウム依存性を調べた。パルミトイル Co-A アガロースカラムを用いて、LPCAT1- $\Delta$ TM および LPCAT1-EF のパルミトイル Co-A との結合を検証した。また、高濃度の  $\text{CaCl}_2$  もしくは EGTA 存在下で結合実験を行い、そのカルシウム依存性を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) LPCAT1 EF-hand 領域の結晶構造解析

LPCAT1-EF 2 の結晶構造を図 3 に示す。LPCAT1-EF2 は結晶化中で 2 量体を形成していた。一方、分析ゲルろ過カラムクロマトグラフィーでは、このドメイン単独では溶液中で単量体として存在することが示された。2 量体形成面には結晶化の際に沈殿剤として用いたマロン酸分子が結合し、構造を安定化していた。したがって、結晶中で観察された二量体形成は結晶化の際の人為的な影響によるものであると考えた。

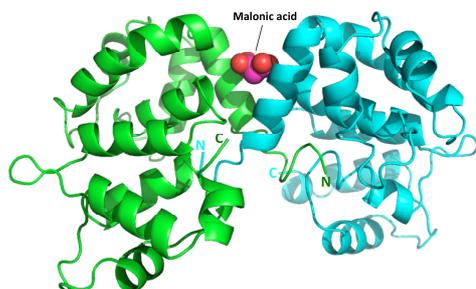


図 3 LPCAT1-EF2 の結晶構造 (2 量体)

### (2) LPCAT1 の EF-hand モチーフ構造

EF-hand はタンパク質の構造モチーフの一つであり、12 アミノ酸残基程度の短いリンカーループで連結され、ほぼ互いに垂直に配置された 2 本の  $\alpha$  ヘリックスからなる。多くの EF-hand はカルシウム結合モチーフとして機能することが知られているが、カルシウム結

合能を示さない例も報告されている。アミノ酸配列から、LPCAT1-EF ドメインには 2 つの典型的な EF ハンドモチーフが存在すると予測され (図 2)、カルシウムがその酵素活性制御に関与する可能性が示唆されていた。LPCAT1 の脂肪酸転移アシル化活性に関しては、カルシウム非依存的な脂肪酸転移活性とカルシウムによる阻害効果の両方が報告されており、その因果関係は明確になっていない。本酵素の活性発現におけるカルシウムの意義を明確にするためには、EF-hand モチーフの構造知見は重要でだと考えられた。

今回得られた結晶構造から、LPCAT1 が 2 つの典型的 (canonical) な EF-hand モチーフ (cEF-hand) を持つことが実証された。さらに興味深いことに、実際に LPCAT1-EF ドメインの立体構造を決定すると、予測された cEF-hand モチーフに加えて、配列から予測できなかった 2 つの 'hidden' EF-hand (hEF-hand) モチーフを有することがわかった (図 4)。2 対の cEF-hand/hEF-hand モチーフが、それぞれ、サブドメインを形成していた。これら 2 つのサブドメインは、分子内で擬似的な 2 回対称軸を持つように配置されている。N 末端側と C 末端側のそれぞれのサブドメインに典型的な cEF-hand が存在する (N 末側の cEF1 と C 末側の cEF2)。hEF-hand は典型的なカルシウム結合ループ領域を持たず、cEF1 のヘリックス配置やループ構造を安定化する役割を果たしている。このような特徴的なドメイン構造は、ミトコンドリアのカルシウム結合 GTPase である Miro タンパク質のカルシウム結合ドメインにもみられる ( )。

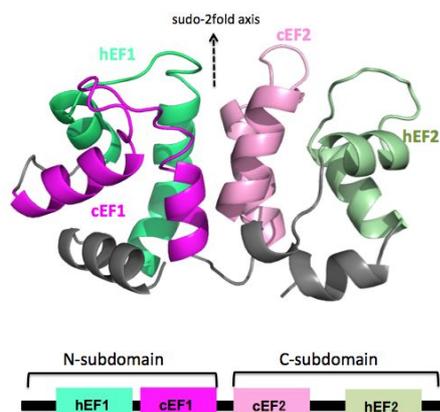


図 4 LPCAT1 の E-hand モチーフ

4 つの EF-hand モチーフを結晶構造上に色付けして示している。cEF1 と cEF2 が配列解析より予測された EF-hand モチーフ。hEF1 と hEF2 が結晶構造より新たに同定された EF-hand モチーフ。

### (3) LPCAT1-EF2 のカルシウム結合に関する新規構造知見

LPCAT1 の cEF-hand モチーフのカルシウム結合やそれによって引き起こされる構造変化の有無を調べるために、10 mM EGTA 存在下

(Form1)および 10 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下(Form2)で結晶化を行った。その結果、金属イオンフリーの apo 型、Mg イオン結合型および Ca イオン結合型の結晶構造を決定した。カルシウム非存在下において、cEF1 モチーフのループ領域には、マグネシウムイオンが結合している構造が観測されたが、同じ結晶中で cEF2 モチーフのループ領域にはそのような金属イオンの結合はみられなかった (図 5)。カルシウム存在下で得られた結晶中では、cEF1 モチーフのループに結合するカルシウムイオンが同定された。しかし、その占有率は低く、少なくとも結晶化条件下ではカルシウムに対して高い親和性を示さないことが示唆された。カルシウムイオンを比較的に高濃度を含む条件下においても、cEF2 モチーフのループ領域のカルシウム結合はみられなかった。

これらの構造知見を検証するため、等温滴定カロリメトリー法を用いた結合実験を行った。その結果、LPCAT1-EF ドメインの領域のカルシウムに対する解離定数は 2.8 μM であった。典型的な EF-hand については、カルシウムイオンに対する解離定数は 10<sup>-7</sup> - 10<sup>-5</sup> M の範囲にあることが知られている。また、NMR 滴定実験からも cEF1 モチーフのループ領域に数 μM 程度の親和性でカルシウムイオンが結合することが示された。cEF2 への結合は観測されなかった。これらの結果から、LPCAT1-EF2 ドメインは cEF1 モチーフを介して、比較的弱い親和性でカルシウムイオンに結合すると考えられる。一方、cEF2 モチーフは典型的なカルシウム結合モチーフとしての機能はないことがわかった。

今回得られた apo 型、Mg 結合型および Ca 結合型では、ループ構造も含めて大きな構造の違いは見られなかった (図 5)

。EF-hand ドメインのみでは、カルシウム結合による大きな構造変化はないと考えられる。しかしながら、全長 LPCAT 1 において、近接する触媒ドメインの存在や基質結合が、EF-hand ドメインへのカルシウム結合状態を変化させる可能性を検証する必要がある。

#### (4) LPCAT1-ΔTM の基質結合

LPCAT1-ΔTM および LPCAT1-EF のパルミトイル Co-A への結合を検証した結果、予想通り、LPCAT1-EF ドメインのみではパルミトイル Co-A への結合を示さなかった。一方、LPCAT1-ΔTM はパルミトイル Co-A に結合するが、その結合はカルシウムイオンや EGTA による影響を受けなかった。このことから、少なくともあシル Co-A への結合に対するカルシウム依存性や EF ドメインの寄与はないと考えられる。

また、精製の際の LPCAT1-ΔTM のゲルろ過カラムの溶出位置から、4 量体以上の高次の会合状態にあることが示唆された。そこで、パルミトイル Co-A やリゾリン脂質の存在下で会合状態が変化するかどうか調べた。その結果、リゾリン脂質共存下で会合状態が 2 量

体もしくは単量体へと部分的に移行することが示された。この会合状態の変化においてもカルシウムイオンの影響は見られなかった。このことから、基質の結合においては、顕著なカルシウムイオン依存性はないと示唆される。今後、触媒反応への影響を検証する必要がある。

#### (5) LPCAT1-ΔTM の結晶化

最初の結晶化スクリーニング実験では、結晶を得ることはできなかった。基質となるリゾリン脂質やパルミトイル Co-A 存在下での結晶化を試みたところ、パルミトイル Co-A 存在下で微結晶が得られた。現在、X 線回折実験に適した単結晶を得るには至らず、さらなる条件検討が必要である。今後、LPCAT1-ΔTM の結晶構造が明らかになれば、触媒ドメインと EF-hand ドメインの機能相関など本酵素の触媒機構を詳細に理解できると考える。

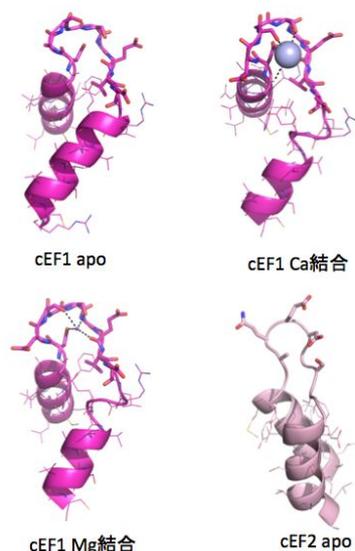


図 5 cEF-hand モチーフのループ構造

#### < 引用論文 >

- Harayama et al. (2009) J. Lipid Research 50: 1824-1831  
 Soupene et al. (2008) PNAS 105:99-93  
 Nakanishi. et al. (2006) J. Biol. Chem. 281, 20140-20147  
 Harayama et al. (2008) J. Biol. Chem. 283, 11097-11106  
 Klosowiak et al. (2013) EMBO report 14, 968-974

#### 5. 主な発表論文等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

有吉眞理子 (ARIYOSHI, Mariko)  
 大阪大学・生命機能研究科・特任助教  
 研究者番号: 80437243