

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15734

研究課題名(和文)ホスファチジルセリン脱炭酸酵素による生体膜リン脂質生合成機構の構造生物学的解明

研究課題名(英文)Structural biology of the mechanism of biomembrane phospholipid biosynthesis by phosphatidylserine decarboxylase

研究代表者

渡邊 康紀(Watanabe, Yasunori)

山形大学・理学部・講師

研究者番号：30772636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜を構成する主要リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)の生合成に関わるホスファチジルセリン脱炭酸酵素(PSD)は酵素の発見以来50年近くその立体構造は明らかになっておらず、PE生合成の詳細なメカニズムは不明なままであった。本研究では大腸菌由来PSDの単体および基質結合型の立体構造をX線結晶構造解析法により明らかにすることに初めて成功した。決定した構造に基づいた変異解析により、基質認識に関与するアミノ酸残基の同定および膜への結合メカニズムを明らかになり、PSDによるPE生合成の構造基盤を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PEの生合成に関わるPSDは細菌からヒトに至るまで高度に保存されており、リン脂質代謝において重要な役割を果たしている。ヒト由来PSD遺伝子(PISD遺伝子)に変異が導入されることが原因で白内障や骨系統疾患が発症することが報告された。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。本研究でのPSDの構造解析研究を通して将来的にはPISD遺伝子の変異によりヒトの疾患が引き起こされる原因の解明につながるであろう。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylserine decarboxylase (PSD) is involved in the biosynthesis of phosphatidylethanolamine (PE), one of major phospholipid in biomembrane. However the detailed mechanisms of PE biosynthesis by PSD remain unclear, because the structure of PSD has not been clarified for nearly 50 years since its discovery. In this study, we succeeded for the first time in determining the structures of the apo-form and substrate-bound forms of PSD from *Escherichia coli* by X-ray crystallography. Mutational analysis based on the determined structures revealed the amino acid residues involved in substrate recognition and the mechanism of membrane binding. These results provide a structural basis for understanding the mechanism of PE biosynthesis by PSDs.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 リン脂質 PS脱炭酸酵素

1. 研究開始当初の背景

細胞やオルガネラを形作る生体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。原核細胞及び真核細胞において、ホスファチジルエタノールアミン (PE) は、最も豊富な生体膜リン脂質の一つである。例えば大腸菌の細胞膜は70%以上がPEから構成されており、哺乳類細胞では、PEは総脂質の約15~25%を構成する。PEは前駆体リン脂質であるホスファチジルセリン (PS) の頭部のカルボキシ基が脱炭酸されることによって生合成されることが知られており、ホスファチジルセリン脱炭酸酵素 (PSD) によってこの反応が触媒される。PSDは細菌からヒトに至るまで高度に保存されており、リン脂質代謝において重要な役割を果たしている。大腸菌において *psd* 遺伝子は生育に必要であることが知られている¹⁾。また、マウスの PSD をコードする *Pisd* 遺伝子を欠損するとミトコンドリアの形態変化や、酸化リン酸化の機能が損なわれ、胚性致死に至ることが知られている^{2,3)}。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⁴⁻⁶⁾。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。

PSD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高度に保存された LGST モチーフで切断され、 α 、 β の二つのポリペプチド鎖に分かれることで成熟体となる。自己プロセシング反応の過程で α 鎖の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)。ピルボイル基とPS頭部のアミノ基がシッフ塩基中間体を形成することで立つ炭酸反応が進行する。しかし、PSDはどのように脂質膜に結合し、PSを認識するのか?といったPE生合成の詳細な分子機構は明らかになっていない。

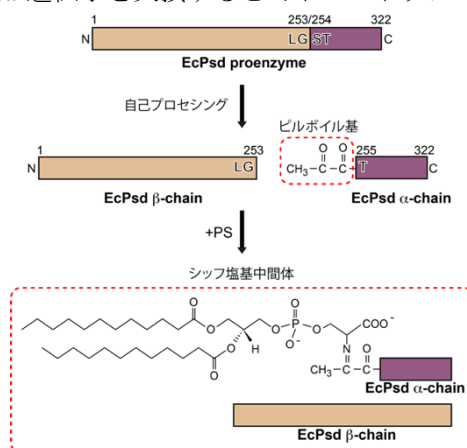


図1. EcPsdの成熟化とシッフ塩基中間体

2. 研究の目的

そこで本研究では、大腸菌由来 PSD (EcPsd) に着目し、PSDによるPE生合成の詳細な分子機構を解明することを目的として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。

3. 研究の方法

3. 1 組み換え 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 タグ融合組み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碎した。細胞破碎液の上清を 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 タグ融合組み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。

3. 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。セレン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。EcPsd の PE とのシッフ塩基中間体の結晶は以下のように作製した。精製した EcPsd(1-289)を 18:1-18:1 PS と NaCNBH3 と共に 30 °C にて 30 min インキュベートした後、結晶化条件のスクリーニングを行った。Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO/OH)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 BL41XU において回折実験を行い、3.6 Å 分解能の回折データを収集した。位相はアポ型 EcPsd(1-289)の構造をモデル分子とした分子置換法により決定した。

3. 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 °C にて 30 min インキュベーター

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。

4. 研究成果

4. 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、活性に必要な 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)。EcPsd はホモダイマーを形成しており、各々のプロトマーはβサンドイッチフォールドを形成し、その上部には N 末端の 3 本のヘリックス領域 (α1-α3) が形成していた。α鎖はβサンドイッチフォールドに組み込まれており、活性中心のピルボイル基は 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。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。

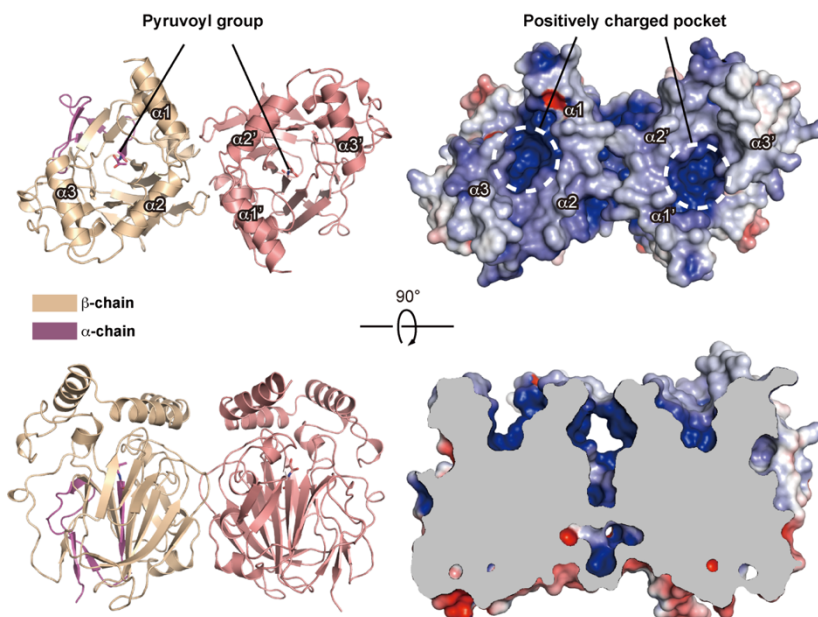


図2. 結晶構造のリボンモデル図 (左), 正電荷を青で、負電荷を赤で示した静電ポテンシャル図 (右)
Watanabe et al., *Structure* (2020)

4. 2 EcPsd のシッフ塩基中間体構造

EcPsd のより詳細な基質認識メカニズムを明らかにするために基質との複合体の結晶構造解析を試みた。EcPsd のα鎖と PS が結合することで中間体を形成するが、EcPsd と PS を混合しただけで反応が進行してしまうため PS との共結晶を得ることはできなかった。そこで、還元剤である NaCNBH₃ を PS と共に混合することで中間体形成後、EcPsd の PS との結合を還元し、反応を停止した状態の結晶化を試みた。18:1-18:1 PS と EcPsd の中間体を調製し、結晶を得ることに成功した。得られた結晶から 3.6 Å 分解能の回折データを用いて結晶構造を決定した (図 3)。EcPsd のくぼみにリン脂質の頭部が結合し、ピルボイル基とシッフ塩基中間体を形成していた。しかし、PS のカルボキシ基由来の電子密度は見えなかった。これは、NaCNBH₃ による還元反応が起こる前に脱炭酸反応が起こり PE が生成されていることが示唆される。結合した PE 付近には生物種間で保存された Tyr137 および His144 が位置しており、変異解析によりこれらのアミノ酸残基が PE 合成活性に重要であることが示された。

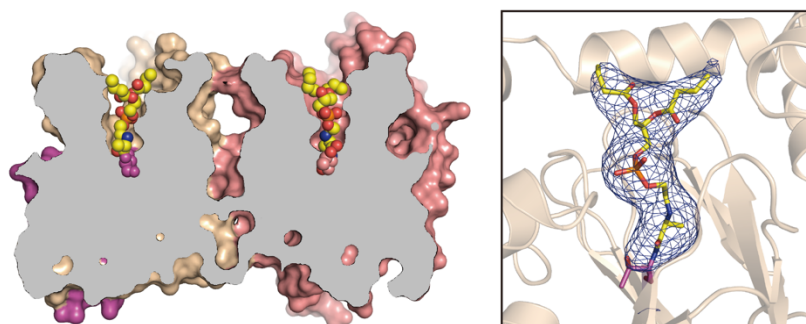


図3. EcPsd と PE のシッフ塩基中間体構造 (左) と PE 結合部位拡大図 (右)
Watanabe et al., *Structure* (2020)

4. 3 N 末端ヘリックス領域は膜への結合に重要である

人工脂質膜小胞 (リポソーム) を用いた共沈降アッセイにより EcPsd の膜への結合能を検証した。EcPsd のくぼみの上部に形成している N 末端ヘリックス領域は、多くの疎水性アミノ酸によって構成されていることから、この領域を介して膜と結合することが示唆される。そこで、N 末端ヘリックス領域の 1-60 アミノ酸残基を欠損した変異体 (EcPsdΔN60) を作製し、リポソーム共沈降アッセイを行った。EcPsdΔN60 はリポソームへの結合が弱くなっており、EcPsd の N 末端の疎水性ヘリックス領域は膜への結合に重要であることが明らかになった。

次に EcPsd の膜結合能と PE 生合成活性の関連を検証した。His タグ融合タンパク質と結合する Ni²⁺イオンを配位した脂質である DGS-NTA を含んだリポソームを調製し、N 末端に His タグを融合した EcPsdΔN60 変異体を用いてリポソームに強制的に結合させた際の PE 合成活性を

調べた (図4)。DGS-NTA を含んだリポソームを用いた場合のみ、微弱ではあるが PE が合成されていることがわかった。以上のことから EcPsd の膜結合能は PE 合成に必要であることが明らかになり、N 末端ヘリックス領域を介した膜の結合により効率的に PS を認識していることが示唆された。

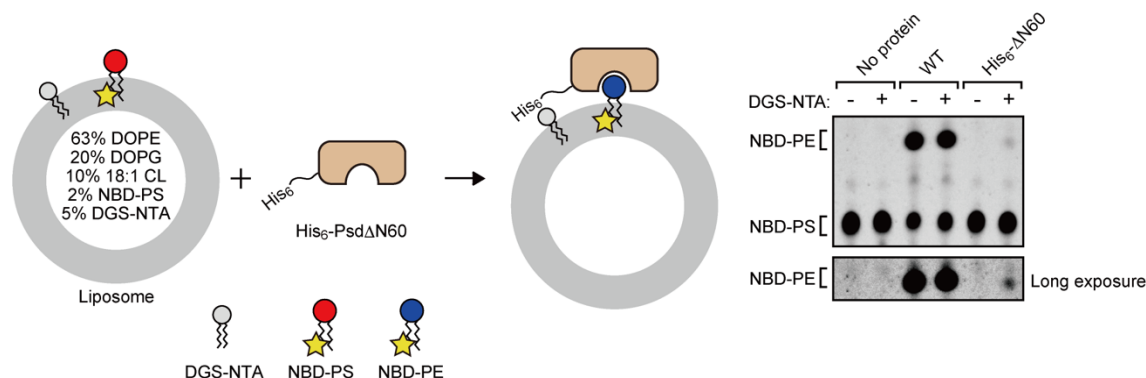


図4. EcPsd の膜結合能は PE 合成に必要である
Watanabe et al., *Structure* (2020)

4. 4 まとめ

本研究のまとめとして EcPsd の PE 合成のモデルを構築した (図5)。EcPsd は N 末端の疎水性ヘリックス領域を介して膜に結合し、正電荷を帯びたくぼみに PS の頭部が Tyr137, His144 に認識されシッフ塩基中間体を形成する。脱炭酸反応により PE に変換され、その後、加水分解によりシッフ塩基中間体は解離する。NaCNBH₃ を用いた反応停止の実験により、脱炭酸反応ではなく、PE 生成後の加水分解が PE 合成反応の律速段階であることが示唆された。このように本研究により EcPsd による PE 合成の構造基盤を解明することができた。今後は、白内障や骨系統疾患に関連するヒト由来 PISD の構造解析を通して、PISD 変異がヒトの疾患を引き起こす原因の解明をめざす。

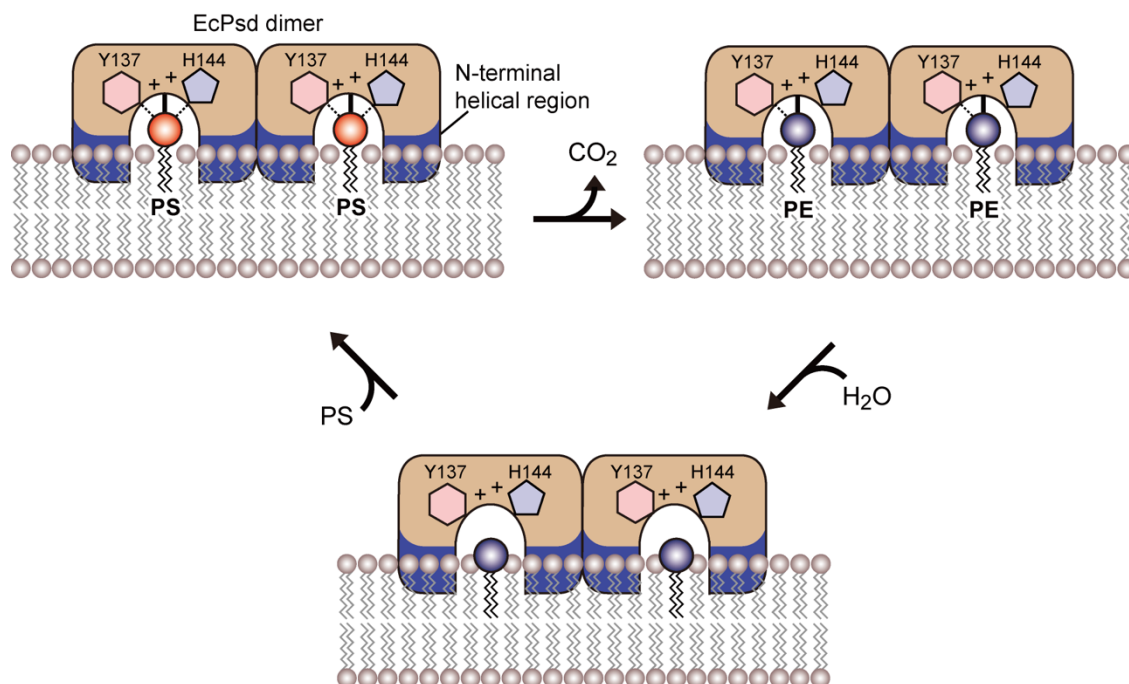


図5. EcPsd の PE 合成モデル
Watanabe et al., *Structure* (2020)

参考文献

- 1). E. Hawrot, E.P. Kennedy, Biogenesis of membrane lipids: mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive phosphatidylserine decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **72**, 1112-1116 (1975).
- 2). R. Steenbergen, et al., Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J. Biol. Chem.* **280**, 40032-40040 (2005).
- 3). G. Tasseva, et al., Phosphatidylethanolamine deficiency in mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* **288**, 4158-4173

- (2013).
- 4). K.M. Girisha, *et al.*, 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.* **40**, 299-309 (2019).
 - 5). V.G. Peter, *et al.*, The Liverfarb syndrome, a multisystem disorder affecting eye, ear, bone, and brain development, is caused by a founder pathogenic variant in the PISD gene. *Genet. Med.* **21**, 2734-2743 (2019).
 - 6). T. Zhao, *et al.*, PISD is a mitochondrial disease gene causing skeletal dysplasia, cataracts, and white matter changes. *Life Sci. Alliance* **2**, <https://doi.org/10.26508/lssa.201900353>. (2019)
 - 7). Y. Watanabe, Y. Watanabe, S. Watanabe, Structural basis for phosphatidylethanolamine biosynthesis by bacterial phosphatidylserine decarboxylase. *Structure* **28**, 799-809 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sam Pingdewinde N., Calzada Elizabeth, Acoba Michelle Grace, Zhao Tian, Watanabe Yasunori, Nejatfard Anahita, Trinidad Jonathan C., Shutt Timothy E., Neal Sonya E., Claypool Steven M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Impaired phosphatidylethanolamine metabolism activates a reversible stress response that detects and resolves mutant mitochondrial precursors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102196 ~ 102196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Yasunori, Watanabe Yasuo, Watanabe Seiya	4. 巻 28
2. 論文標題 Structural Basis for Phosphatidylethanolamine Biosynthesis by Bacterial Phosphatidylserine Decarboxylase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 799 ~ 809.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2020.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊康紀
2. 発表標題 ミトコンドリアにおけるホスファチジルエタノールアミン生合成機構の構造基盤
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊康紀
2. 発表標題 PE生合成を担うPS脱炭酸酵素の構造機能解析
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊康紀
2. 発表標題 ホスファチジルセリン脱炭酸酵素の結晶構造が解き明かす生体膜リン脂質生成機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊康紀
2. 発表標題 Crystal Structures of Phosphatidylserine Decarboxylase Reveal the Basis of Phosphatidylethanolamine Biosynthesis
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Johns Hopkins University		