

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651219

研究課題名(和文) グルタミン合成酵素の新奇基質認識機構の解明による除草剤耐性植物の創出

研究課題名(英文) Analysis of a new substrate recognition mechanism of glutamine synthetase and its application for modulation of herbicide sensitivity

研究代表者

長谷 俊治 (Hase, Toshiharu)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：00127276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン合成酵素(GS)はGluとアンモニアからGlnの合成反応を触媒し、ATPによるGlu側鎖のカルボキシル基のリン酸化が反応の駆動力となる。Gluの類縁体であるフォスフィノスリシンやメチオニンスルフォキシドは、このリン酸化中間体の生成段階で反応を阻害する。本研究は、結晶構造が明らかなトウモロコシ由来のGS1aを材料として、活性中心およびその遠位領域に部位特異的のアミノ酸置換を導入した酵素を作製し、変異酵素の基質認識と阻害剤に対する感受性を調べた上で、大きく変化した変異体の結晶構造を決定した。これらの結果から、基質と阻害剤に対する親和性を区別して変化させる分子改変の可能性を提出した。

研究成果の概要(英文)：Plant glutamine synthetase (GS) has an oligomeric structure with 10 identical subunits to form two pentamer rings. We made several amino acid substitutions at the inter-ring contact site of maize cytosolic GS (GS1a). Three such mutants, P146G, F150G and F150 showed a low activity and their K_m value for glutamate became higher by ca 50 fold than that of WT enzyme. An active site mutant, H249Q was also made, whose affinity for glutamate was remarkably decreased. Inhibitory effect of phosphinothricin (PPT) on the enzyme activity was more remarkable in H249Q than in WT. Such strong inhibition by PPT was not observed in P146G, F150G or delta F150, suggesting that their low affinity for glutamate was not due to its weak binding to the active site. Double mutation at the active site and at the inter-ring contact site resulted in a synergistic drop in the activity. The structural basis for our findings is proposed based on crystal structures of these mutants.

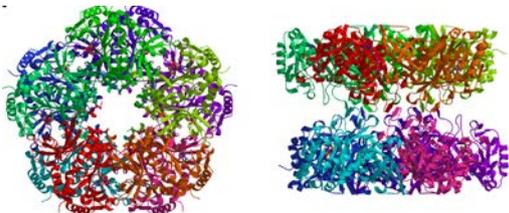
研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：グルタミン合成酵素 窒素同化 蛋白質工学 活性中心

1. 研究開始当初の背景

トウモロコシ由来の細胞質型の GS の X 線結晶構造を公表した (Unno et al. J. Biol. Chem. 281, 29278-29296, 2006)。この構造は、動物 GS も含めて真核生物由来の GS では初めてであり、多くの新しい知見を得た。その一つは、真核生物の GS は 8 量体であると長年信じられていたが、この常識を覆すものであった。同一サブユニット 5 個からなるリングが向かい合う形で 2 つ積み重なった 10 量体



構造である。グルタミン酸の類縁体である PTT やメチオニンスルフォキミド (MetSox) と ATP 存在下で結晶を調製し、活性中心に阻害剤が結合した状態の構造も得た。活性中心は隣り合うサブユニット間に位置し、合計 10 ヶ所存在した。この立体構造情報を活用した構造機能相関の研究をスタートさせており、活性中心の変異のみならず、従来全く考えが及ばなかった 2 つのリング間の接触部位の変異でも基質や阻害剤に対する親和性が大きく変化することを見出している。この新しい基質認識機構を明らかにすれば GS の機能改変の自由度が広がり、応用的研究へと発展させられるとの着想に至った。

2. 研究の目的

植物の独立栄養機能の代謝過程の根幹に位置する GS を対象として、窒素同化経路の阻害剤感受性を改変した酵素分子を創出し、植物に除草剤耐性機能を付与する機能開発を目指す。GS はアンモニアを ATP 依存的にグルタミン酸に付加してグルタミンに変換する。この反応は植物の生育に必須であり、この経路が絶たれると植物は枯死する。例えば、本酵素の阻害剤であるフォスフィノスリン (PTT) 等は除草剤として広く使用されている。この薬剤を分解する微生物由来の *bar* 遺伝子を導入した組換え植物は除草剤耐性能を獲得するので、組換え作物として農業に利用されているが、微生物由来の酵素を持つ組換え体は消費者にとっては歓迎され難い。我々は初めて植物の GS の X 線結晶構造を解明し、立体構造情報をもとに基質特異性や 4 次構造を変化させた改変体の研究を進め阻害剤に対する感受性が変化した分子種の創出が可能であることを見出している。この知見をもとに、PTT 等の阻害剤耐性の優れた GS を新たに創出し、*bar* 遺伝子導入の従来法とは全く異なる原理で除草剤耐性能を獲得させることを目標に置いた。

3. 研究の方法

組換え酵素の調製は大腸菌の培養から精

製酵素までの一連の方法は確立している。発現量 (数 mg/L) が多いので、精製ステップは省力化でき、多数の試料を平行して取り扱うことができる。改変体の分子設計にあたっては 2 つの方法を用いた。

(1) 分子デザイン 1 では、すでに得ている His249 改変体をベースに、活性中心の近傍の His249 を除いた他の 6 箇所について、優先順位を考慮しながら改変を加えた。また、2 リングのインターフェースに存在する F150 の変異とその近傍領域にまたがる新規の変異の導入、およびそれに活性中心の変異を加えた 2 カ所部位の同時変異体の作製も行った。

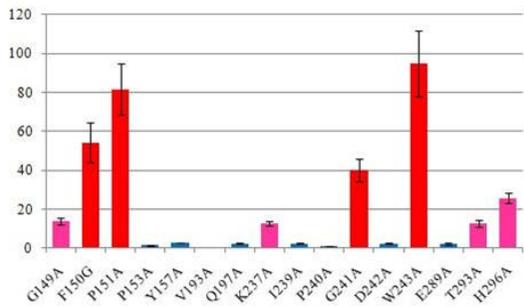
(2) 分子デザイン 2 では、活性中心の近傍の 7 箇所の残基ごとに他の 19 種類のアミノ酸に変換するプライマーを一括して合成し、混合プライマーとして網羅的な部位特異的変異の導入操作を行う。大腸菌は PTT 等の阻害剤存在下では自身の GS 活性の消失により成育不能となるが、外来性の阻害剤体制の植物 GS で形質転換された場合には有意な生育能を獲得することになる。

(3) 酵素活性の評価は、トランスフェラーゼ活性 (グルタミンのアミド基とヒドロキシルアミンの交換反応、非生理的反応であるが、高い活性を示す) とシンセターゼ活性 (グルタミン酸の側鎖カルボキシル基を ATP でリン酸化し、このリン酸化中間体に対するヒドロキシルアミンの付加反応であり、生理的反応に近い) で行う。マイクロタイタープレートとプレートリーダーを用いたハイスループットのアッセイシステムを確立した。

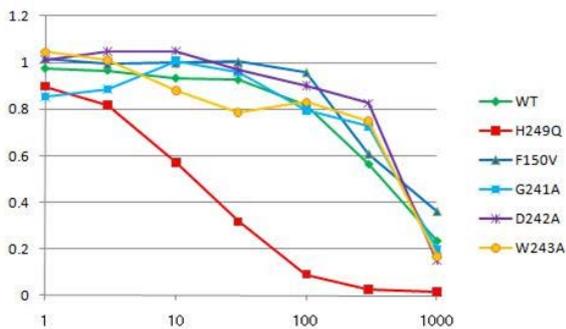
(4) 作製された改変体群は、プラスミドが混合状態のまま大腸菌に導入し、出来るだけ高濃度存在下でも生育してくる大腸菌を選ぶ。0.1-0.5 mg/ml の PTT 存在下の MS 培地では通常の大腸菌は増殖しない。このような操作を 7 箇所の残基について行い、耐性をしめす大腸菌群を混合物のまま集菌し、プラスミド DNA を調製する。より高濃度の PTT 存在下でも増殖する大腸菌群が出現することが期待される。この一連の操作により野生型 GS より PTT 耐性能を獲得した改変体 GS が多数得られることが期待できる。大きく耐性が増強した改変体を得られれば構造解析も行う。

4. 研究成果

(1) 活性中心部位の改変酵素 H249Q と 2 リング接触部位の改変酵素 F150V, G241A, W243A の 3 種類では共にグルタミン酸に対する親和性が低下するが、阻害剤の感受性には明瞭な差があり、前者のみが野生型より阻害効果が著しいことが判明した。また、H249A は野生型より強い阻害剤耐性を示した。1 残基あるいは少数の残基の改変で、阻害剤感受性が明瞭に変化させられることが判明した。

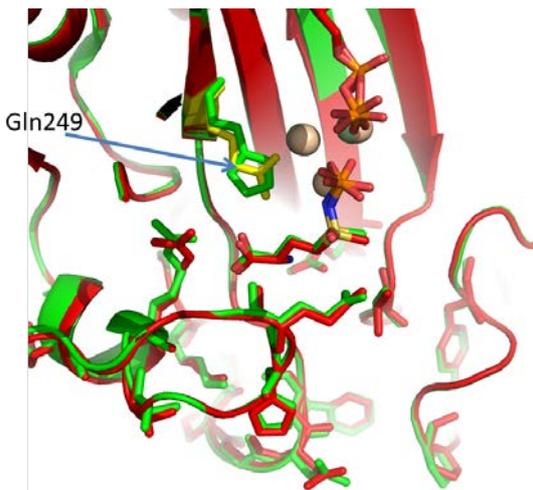


改変体のグルタミン酸に対する Km 値 (mM)

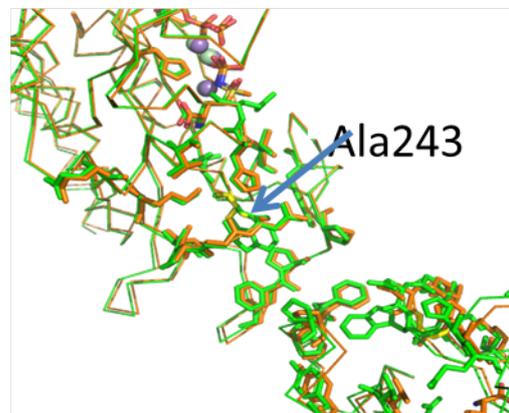
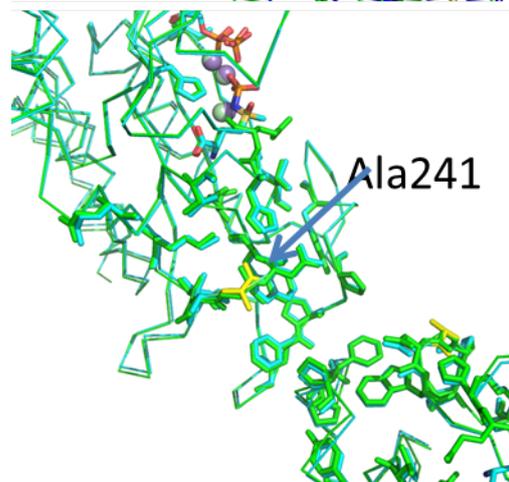
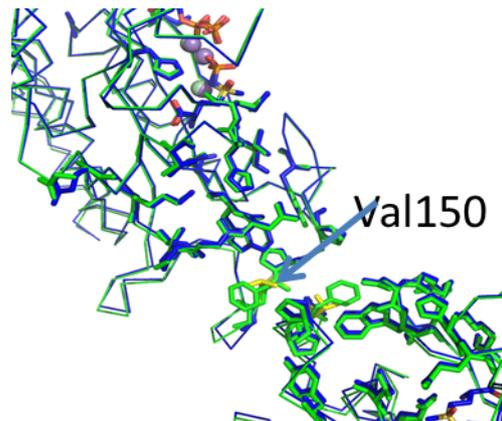


改変体の PTT の阻害効果、縦軸は阻害度、横軸は PTT の濃度 (μM)

(2) 変異体の結晶構造を明らかにしたところ、改変導入部位以外には有意な構造変化が無かった。H249Q は活性中心の構造変化により基質親和性が低下し、F150V, G241A, W243A の 3 種類の変異体の基質親和性の低下は活性中心以外の構造変化によると結論される。



H249Q の活性中心近傍の構造。野生型酵素 (緑色) に重ね書きしている。Gln249 の位置を矢印で示している



F150V, G241A, W243A の 2 リング接触部位近傍の構造。野生型酵素 (緑色) に重ね書きして比較している。Val150, Ala241, Ala243 の位置を矢印で示している

(3) これらを総合するとグルタミン酸の親和性に関与する領域は活性中心に加え、活性中心から離れた場所にも存在すると予想される。その場所はリング結合領域からグルタミン酸の活性中心への入り口に跨ってマップされていた。これは GS の基質認識や阻害剤の感受性についての新しい知見であり、本研究の重要な成果である。GS の反応機構やその応用面での発展が期待される。

(4) 野生型や改変体 GS プラスミドを発現させた大腸菌を PTT 存在下で継続培養して、PTT 耐性株の取得を試みた。多くの耐性株を得たが、それらは GS 遺伝子に変異が生じたものではなく、大腸菌自身が PTT を細胞内に取り込まない、あるいは積極的に排出すると思われる形質を示した。これは予想外の観察であり、菌体細胞レベルでの GS 阻害剤体制株の取得は現時点では出来ていない。今後に取り越された課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① IUCr2011, Palacio Municipal de Madrid / Municipal Conference Centre, 22-23 August 2011

Study of substrate recognition mechanism of plant glutamine synthetase: Identification of the region distant from the active site involved in high affinity of glutamate

T. Ozaki, A. Nakagawa, T. Hase, M. Kusunoki

②平成 23 年度日本結晶学会年会、北海道大学、学術交流会館、平成 23 年 11 月 23 日-25 日

トウモロコシ由来グルタミン合成酵素 GS1a と GS1d 活性の変化の構造学的研究

尾崎健、中川敦史、長谷俊治、小林大千、楠木正巳

③第 86 回日本生化学会、パシフィコ横浜、2013 年 9 月 11 日-13 日

Site-directed mutation of plant glutamine synthetase resulting in differential effect on the recognition of glutamate and inhibition by substrate analogues

T. Ozaki, M. Kusunoki, A. Nakagawa, T. Hase

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 俊治 (HASE, Toshiharu)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号 : 001272767

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :