

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870855

研究課題名(和文)植物におけるセリン生合成制御の分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular basis regulation mechanism for serine biosynthesis in plant

研究代表者

岡村 英治 (OKAMURA, EIJI)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：90604398

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)：3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素(PGDH)はセリン生合成を担うリン酸化経路において、代謝調節の鍵酵素である。これまで植物に由来するPGDHは活性制御機構が未解明であった。本研究ではシロイヌナズナ、イネ及びヒメツリガネゴケ由来PGDHの酵素活性がセリンによる活性阻害のみならず、ホモシステインやメチオニン、アラニン、バリン、ホモセリンによって活性促進を受けることをはじめて明らかにした。また、PGDHの各アミノ酸に対する用量反応解析から、ホモシステインが最も低濃度で作用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：3-Phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH) is the first committed enzyme of the phosphorylated pathway of serine biosynthesis, and is regulated by negative feedback from serine in bacteria and plants.

In the present study, some PGDH isoforms from *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Physcomitrella patens* were inhibited by serine but were activated by homocysteine, methionine, alanine, valine and homoserine in vitro. Activation and inhibition by these amino acids was cooperative, suggesting an allosteric mechanism. Moreover, homocysteine was 2 orders of magnitude lower than that of the other effector amino acids, suggesting greater regulatory potency. These are the first data to show that PGDH from plants are activated by various biomolecules and indicate that serine biosynthesis in plant is regulated by multiple pathways.

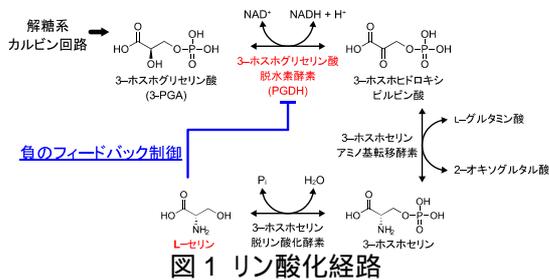
研究分野：生化学

キーワード：Plant Arabidopsis Serine Allosteric Oryza Physcomitrella Homocysteine

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸の一種であるセリンは、タンパク質の構成成分としてのみならず、リン脂質や核酸、さらにはトリプトファンや含硫アミノ酸であるシステイン及びメチオニンの生合成に関与する。従って、セリンの代謝制御を理解することは、セリンに関わるさまざまな細胞プロセスを理解する上で重要である。

リン酸化経路はセリン生合成を担う主要な代謝経路のひとつであり、解糖系やカルビン回路の中間体である 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) を出発物質として 3 段階の反応によってセリンを合成する。また、リン酸化経路は初発反応を触媒する酵素である 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (PGDH) がその代謝調節における律速酵素であると考えられている。大腸菌などのバクテリアでは、PGDH がセリンによるアロステリックな活性調節を受ける結果、リン酸化経路が負のフィードバック制御を受けると考えられている (図 1)。



また、大腸菌などのバクテリアでは PGDH のアロステリック調節に関する分子機構が明らかにされており、PGDH の C 末端に存在する ACT (Aspartate kinase-Chorismate mutase-TyrA) ドメインと呼ばれる領域に L-セリンが結合することが重要であることが明らかにされている。

研究開始当初、シロイヌナズナでは、3 つの PGDH 遺伝子 (*AtPGDH1*、*AtPGDH2* 及び *AtPGDH3*) が見出されていたが、それらの酵素活性調節機構や各アイソザイムの生理学的機能さらにはリン酸化経路の生理学的意義については未解明であった。このような背景において、本研究ではシロイヌナズナの各 PGDH アイソザイムの大腸菌組換え酵素の活性を調べた結果、2 つの PGDH 組換え酵素の活性が、L-セリンによる阻害のみならず含硫アミノ酸である L-メチオニンによって促進されることを見出した。このことから、植物の PGDH はバクテリアとは異なる酵素活性制御を有していると推察された。

## 2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナをはじめとした植物由来 PGDH の酵素活性調節機構の解明、及びシロイヌナズナにおける PGDH アイソザイムの生理学的役割さらにはリン酸化経路の生理学的意義の解明を目的として以下項目の実験に取り組んだ。

(1) シロイヌナズナやイネ、ヒメツリガネゴケ、由来 PGDH のアミノ酸に対する用量反応解析、及

びアミノ酸の結合部位の解明。

(2) シロイヌナズナにおける逆遺伝学的手法による各 PGDH 遺伝子変異体の機能解析及び PGDH アイソザイムのアミノ酸による活性制御の生理学的役割の解明。

## 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナやイネ、ヒメツリガネゴケ由来 PGDH の大腸菌組換えタンパク質を大量発現させ、アフィニティ精製によってそれぞれの組換え酵素を取得した。これら組換え酵素の活性は、基質である 3-PGA の酸化反応に伴って生成する NADH の吸収極大 (340 nm) の変化を分光光度計で計測し、比活性 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) をもとに評価した。

アミノ酸の添加による PGDH 組換え酵素の応答は、アミノ酸を添加しない場合の比活性を基準として、添加したアミノ酸の各濃度における比活性を百分率で示した相対活性の算出により評価した。

大腸菌由来 PGDH のアロステリック制御では、その活性変化が L-セリンの濃度に対して協同的 (cooperative) であることが知られている。そこで作成した PGDH 組換え酵素とアミノ酸の用量応答を調べるため、各アミノ酸、及び各濃度における相対活性を以下 Sigmoidal  $E_{\text{max}}$  model with baseline response (Goutelle, S. *et al.* *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22, 633-648 [2008]) の式にあてはめて協同性の指標であるヒル係数 (nH) や 50% 効果濃度 ( $EC_{50}$ ) を算出した。

$$E = E_0 + E_{\text{max}} \frac{C^{\text{nH}}}{(EC_{50}^{\text{nH}} + C^{\text{nH}})}$$

E; 各アミノ酸濃度における相対活性

$E_0$ ; アミノ酸非添加時の相対活性 (基準値)

$E_{\text{max}}$ ; アミノ酸最大濃度における相対活性

C; 各アミノ酸濃度

(2) *AtPGDH1*、*AtPGDH2* 及び *AtPGDH3* 遺伝子の T-DNA 挿入によるホモノックアウト株を作成して、その形質を観察した。

## 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ由来 *AtPGDH1*、*AtPGDH2* 及び *AtPGDH3* 遺伝子の組換え酵素の比活性を、L 体及び D 体の 43 種類のアミノ酸を 10 mM の濃度で添加して調べた結果、*AtPGDH1* と *AtPGDH3* の比活性は L-セリンによる阻害に加え、L-メチオニンや L-アラニン、L-バリン、L-ホモセリンや L-ホモシステニンによって促進されることを見出した。一方、*AtPGDH2* の比活性はいずれのアミノ酸を添加した場合でも有意な変化は観察できなかった (次ページ、図 2)。

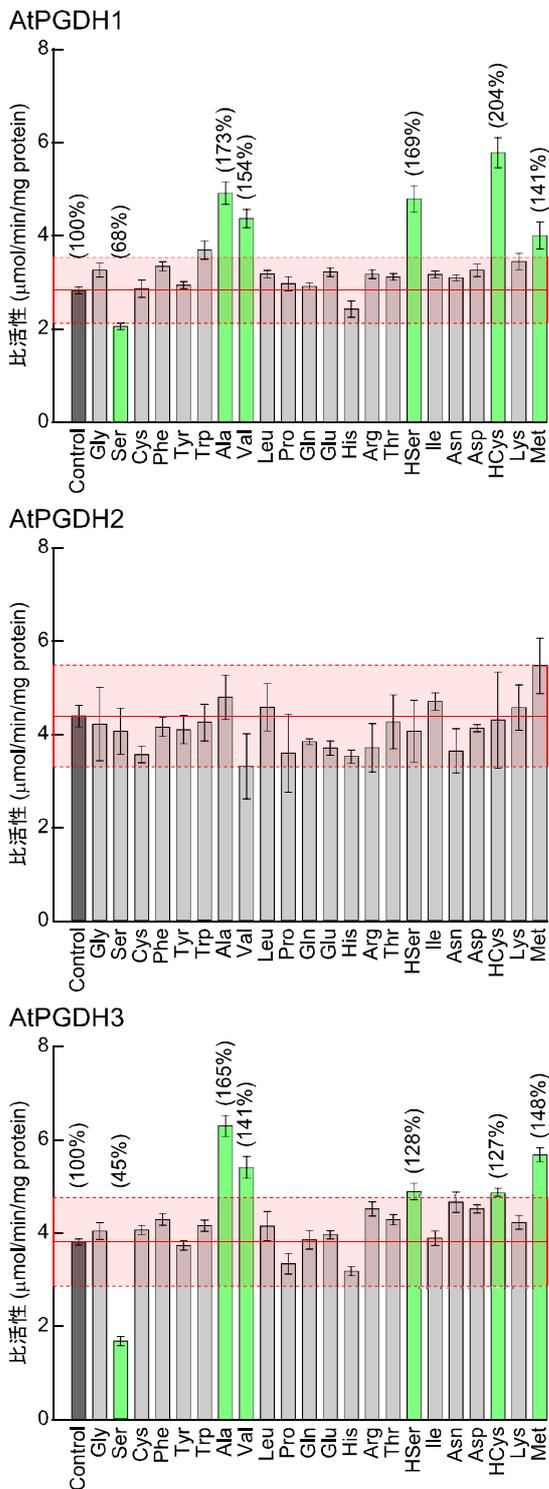


図2 シロイヌナズナ由来 PGDH アイソザイムの比活性におけるアミノ酸の影響 [E. Okamura et al. (2017) *Sci. Rep.* Fig. 5 を改変]

アミノ酸は3文字表記により示した。また HSer は L-ホモセリン、HCys は L-ホモシステインを示す。各アミノ酸を添加した場合の比活性が、Control (アミノ酸非添加) と比較して 25%以上 ( $p < 0.001$ ) 変化したものを阻害もしくは促進効果があると判断した。図中において赤枠は Control を基準とした 25%の比活性変化の領域を、緑色の棒グラフは有意差があることを示す。また有意差があったアミノ酸に関しては、棒グラフ上部に Control を 100%とした相対活性を示した。エラーバーは標準誤差を示す。

た。エラーバーは標準誤差を示す。

次に、AtPGDH1 と AtPGDH3 の上記 6 つのアミノ酸に対する用量応答を調べた結果、すべてのアミノ酸において特徴的なシグモイド状の応答を示した。また、ヒル係数は 2 以上であったことから、セリンによる活性阻害、及びメチオニンやアラニン、バリン、ホモセリン、ホモシステインによる活性促進は協同的であることを明らかにした (図 3)。また、各アミノ酸の 50% 効果濃度 ( $EC_{50}$ ) の算出から、ホモシステインが最も低濃度で活性促進をもたらすことを明らかにした (図 3)。

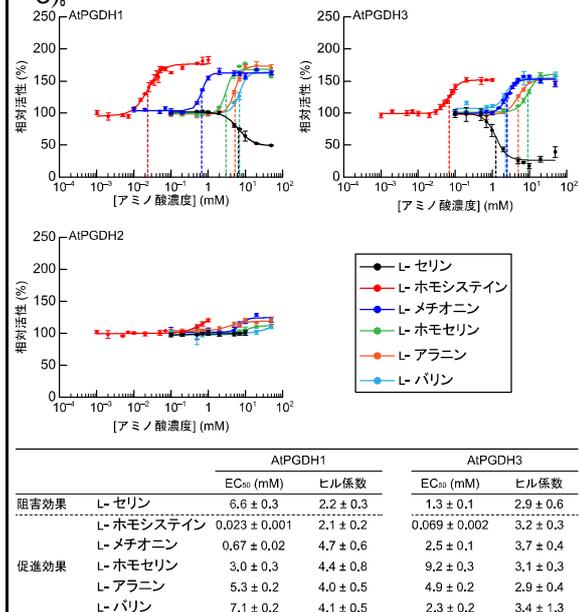


図3 シロイヌナズナ由来 PGDH アイソザイムの用量反応曲線とヒル係数及び  $EC_{50}$  値の算出 [E. Okamura et al. (2017) *Sci. Rep.* Fig. 6 を改変]

図中の用量反応曲線において、各色の点線は  $EC_{50}$  値を示す。またエラーバーは標準誤差を示す。

細胞内においては、これらアミノ酸は単独で存在しているのではなく、混合した状態で存在していると考えられることから、活性阻害と活性促進が互いにどのように影響するかを調べた。その結果、L-ホモシステインなどの活性促進アミノ酸による酵素活性の上昇は、L-セリンの濃度上昇によって消失することを明らかにした (図 4)。

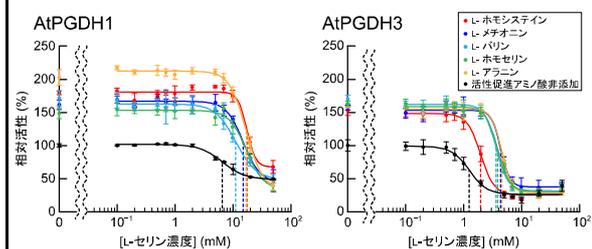


図4 AtPGDH1 及び AtPGDH3 の活性促進アミノ酸存在下における L-セリンに対する用量反応曲線 [E. Okamura et al. (2017) *Sci. Rep.* Fig.9a を改変]

図中の用量反応曲線において、各色の点線

は EC<sub>50</sub> 値を示す。またエラーバーは標準誤差を示す。

また、L-セリンによる酵素活性阻害は、L-ホモシステインをはじめとした活性促進アミノ酸の濃度上昇によって消失することを明らかにした (図 5)。

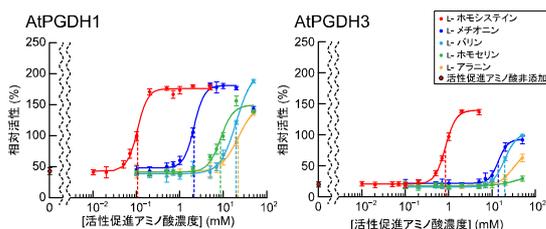


図 5 AtPGDH1 及び AtPGDH3 の L-セリン(20 mM)存在下における活性促進アミノ酸に対する用量反応曲線[E. Okamura et al. (2017) *Sci. Rep.* Fig.9b を改変]

図中の用量反応曲線において、各色の点線は EC<sub>50</sub> 値を示す。またエラーバーは標準誤差を示す。

AtPGDH1 や AtPGDH3 の酵素活性制御に関する発見から、L-セリンや L-ホモシステインが他の植物由来 PGDH においても同様の作用を有すると推測して、イネに見出される 3 つの PGDH アイソザイム、及びヒメツリガネゴケに見出される 4 つの PGDH アイソザイムについてこれらのアミノ酸に対する用量反応を調べた。その結果、イネでは 2 つ、ヒメツリガネゴケでは 1 つの PGDH アイソザイムが L-セリンによる活性阻害、及び L-ホモシステインによる活性促進を受けることを見出した。また、いずれの PGDH アイソザイムにおいても、AtPGDH1 や AtPGDH3 と同様 L-ホモシステインは最も低濃度で作用することを明らかにしており、これらの成果は第 58 回日本植物生理学会年会で発表した。

エフェクターとなるアミノ酸の結合部位に関しては、AtPGDH アイソザイムの変異酵素を解析することで明らかにした。まず、AtPGDH2 がいずれのアミノ酸によっても活性制御を受けないことから、AtPGDH1 と AtPGDH2 の N 末端と C 末端のアミノ酸配列をもつキメラ酵素を作出して、L-セリンや L-ホモシステインをはじめとしたエフェクターアミノ酸に対する用量反応を調べた。その結果、これらのアミノ酸は AtPGDH1 の ACT ドメインと相同な領域に結合することが示唆された (E. Okamura et al. [2017] *Sci. Rep.*)。また、大腸菌や結核菌などのバクテリア由来 PGDH では、ACT ドメインにおける L-セリンの結合に関する分子機構が解明されている。そこで、AtPGDH1 とこれらバクテリア由来 PGDH のアラインメントによって、L-セリンの結合に重要な 3 つのアミノ酸残基を推定し、それらアミノ酸残基をアラニンに置換した部位特異的変異酵素を作成した。

これら部位特異的変異酵素のエフェクターアミノ酸に対する用量反応を調べた結果、3 つのアミノ酸残基のうち 2 つが、エフェクターアミノ酸の結

合に重要であることを明らかにした。本成果は、今後 AtPGDH アイソザイムの結晶構造を明らかにした際に合わせて発表する予定である。

(2) これまでに、シロイヌナズナの AtPGDH2 遺伝子及び AtPGDH3 遺伝子のホモノックアウト株を確立した。また AtPGDH2 遺伝子と AtPGDH3 遺伝子のダブルノックアウト株を確立した。一方、AtPGDH1 遺伝子のホモノックアウト株に関しては、胚性致死となることが知られており、本研究では、L-セリンによる栄養相補によってホモノックアウト株の確立を目指した。しかしながら、再三の試みにも関わらず L-セリンの栄養相補によってはホモノックアウト株を確立することはできなかった。また、研究期間中に複数のグループからシロイヌナズナの AtPGDH 遺伝子に関する研究成果が発表された。これらの報告においては、AtPGDH1 遺伝子がトリプトファン生合成に関わっていることが明らかにされたが、他の AtPGDH2 遺伝子や AtPGDH3 遺伝子に関しては未だ生理学的役割が明らかにされていない。本研究では今後、AtPGDH2 遺伝子及び AtPGDH3 遺伝子について、特にスフィンゴ脂質との関連性に注目して AtPGDH2 遺伝子や AtPGDH3 遺伝子の生理学的機能解明を目指す。

#### 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 1 件)

Eiji Okamura and Masami Yokota Hirai Novel regulatory mechanism of serine biosynthesis associated with 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* [in press] (2017) 査読有

(学会発表) (計 8 件)

岡村英治、平井優美 植物のセリン生合成を担う 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼの新規活性制御機構 第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年 3 月 17 日) 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)

Eiji Okamura and Masami Yokota Hirai A novel regulatory mechanism of the phosphorylated pathway of serine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. 5th SULPHYTON WORKSHOP “Sulfur Nutrition and Metabolism in Plants” (2016/9/15) University of Taipei (Taipei, Taiwan)

岡村英治、平井優美 植物におけるセリン生合成を担うリン酸化経路の新規制御機構 第 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会 (2016 年 9 月 1 日) 信州大学 (長野県・上田市)

岡村英治、平井優美 シロイヌナズナ由来 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼの基質特異性に関する研究 第 57 回日本植物生理学会年会 (2016 年 3 月 18 日) 岩手大学上田キャンパス (岩手県・盛岡市)

Eiji Okamura and Masami Yokota Hirai An

unprecedented regulatory mechanism of the phosphorylated pathway of serine biosynthesis in plant. 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (2015/8/4) Juridicum hall, University of Vienna (Vienna, Austria)

岡村英治、平井優美 シロイヌナズナ由来 PGDH の活性制御ドメインにおける含硫アミノ酸結合機構の生化学的解析 日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 27 日) 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

Eiji Okamura, Masami Yokota Hirai Biochemical elucidation of binding mechanisms of sulfur containing amino acids to regulatory domain on PGDH from Arabidopsis. 第 56 回日本植物生理学会年会(2015 年 3 月 17 日) 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)

Eiji Okamura, Masami Yokota Hirai Elucidation of L-methionine and L-serine binding mechanisms in ACT domain of PGDH from Arabidopsis thaliana. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 27 日) 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡村 英治 (OKAMURA EIJI)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号: 90604398