

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15259

研究課題名(和文) 酵素学的研究によるホスファチジン酸のde novo合成を担う分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis for de novo phosphatidic acid synthesis through enzymological studies

研究代表者

小川 拓哉 (OGAWA, Takuya)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：40756318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜リン脂質の合成に関わるアシルグリセロールリン酸アシル基転移酵素(AGPAT)について機能同定や反応機構解析に取り組んだ。AGPATは細胞膜の形成に必須な一次代謝酵素であるが、膜タンパク質であるために活性を保ったまま精製することが難しく解析が困難であったため、これまで酵素学的な知見が限られていた。本研究の結果、AGPATの構造解析に向けた阻害剤を開発し、また基質選択性の異なるさまざまなAGPATの同定および反応特性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

細胞膜の脂肪酸組成は各細胞が正常に働くために、また細胞外の環境変化に順応するために適切に調節されている。AGPATは細胞膜の脂肪酸組成を規定する要因の1つであるが、これまで個々のAGPATの反応特性や作用機序に関する知見は乏しかった。本研究における発見は、AGPATの酵素機能とその多様性について新しい知見を与えると同時に、細胞膜脂質の多様性創出とその生理的意義の理解に向けて基盤となる成果だと考えられる。

研究成果の概要(英文)： I here attempted to analyze the function and reaction mechanism of acylglycerophosphate acyltransferase (AGPAT), which is involved in the membrane phospholipid synthesis. Although it is the primary enzyme required for the formation of cellular membrane, the knowledge of its enzymological properties has been limited so far because it is a membrane protein that often lose its activity during purification and thus is difficult to assay. In this study, I developed an AGPAT inhibitor that may be suitable for structural analysis and identified and functionally analyzed several AGPATs that have different substrate selectivity.

研究分野：農芸化学

キーワード：アシルグリセロールリン酸アシル基転移酵素 グリセロリン脂質 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の主成分であるグリセロリン脂質 (GPL) は、*sn*-グリセロール 3 リン酸を基本骨格として親水性の頭部基 1 つと脂肪酸アシル基 2 つが結合した構造をとる (図 1A)。これらの頭部基とアシル基の組み合わせによって極めて多様な分子構造が可能であるが、実際に、細胞膜はさまざまな構造の GPL 分子で構成されており、このような GPL の構造多様性が生命現象を支えていることが知られている。例えば、典型的な GPL は *sn*-1 位に飽和脂肪酸、*sn*-2 位に一価の不飽和脂肪酸を結合しているが、脳や網膜の細胞は *sn*-2 位にドコサヘキサエン酸 (多価不飽和脂肪酸の 1 種) を結合した GPL を豊富に含んでいたり、肺胞の細胞に含まれる GPL のアシル鎖は 2 つの飽和脂肪酸で構成されており、このようなユニークな構造をもった GPL が各組織の正常な働きに不可欠である。また、細菌のような原核生物においても同様のことが言える。細菌は周囲の環境の変化に応答して GPL の脂肪酸を入れ替えることで細胞膜の不飽和度等を調節し、これによって環境変化の前後で細胞膜の流動性、厚み、物質の透過性といった物理化学的な性質を保ち、生命活動を維持する仕組みを有している。

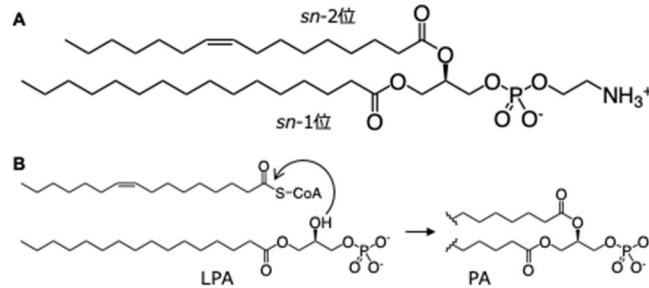


図 1 . GPL の構造 (A) と PA 合成反応 (B)

GPL に結合する 2 つの脂肪酸アシル基のうち、*sn*-2 位のアシル基は 1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (AGPAT) の働きで導入される。AGPAT は 1-アシル-*sn*-グリセロール 3 リン酸 [リゾホスファチジン酸 (LPA)] を基質とし、脂肪酸アシル基を *sn*-2 位に導入することでホスファチジン酸 (PA) を合成する (図 1B)。細胞膜を構成する種々の GPL は PA を共通の中間体として *de novo* 合成されるため、AGPAT は細胞膜の形成、ひいては生命活動に必須の一次代謝酵素である。また、ヒトにおいては複数の AGPAT が存在し、細胞膜中の既存の GPL のアシル基を交換する、いわゆるリモデリング反応において新規アシル基の導入を担う。過去の研究から、これらの AGPAT はそれぞれ導入する脂肪酸が異なる (すなわち、異なる基質選択性を持つ) ことが示唆されており、このことが GPL に構造多様性をもたらす要因の 1 つであると考えられている。同様に、細菌も基質選択性の異なる AGPAT ホモログ (PlsC) を複数持っており、それらの複合的な働きによって細胞膜の脂肪酸組成を調整することで様々な生育環境に順応していると考えられる。

GPL の代謝に関する研究の歴史は長く、GPL の *de novo* 合成やアシル基のリモデリング反応といった代謝経路と、これらを担う多くの酵素が同定されてきた。しかし、これらの酵素の多くは膜タンパク質であり、活性を保ったまま細胞膜から可溶化・精製することが難しいことから、精製酵素を用いた酵素学的な研究は進んでこなかった。同様に AGPAT/PlsC も膜タンパク質であり、活性型酵素の精製例は近年になるまで皆無であった。このため、前述したような基礎生物学的に極めて重要な酵素であるにもかかわらず、AGPAT/PlsC の特性や基質選択性、さらには触媒作用や基質認識の分子メカニズムに関する知見は限定的だった。

2. 研究の目的

本研究代表者は以前に、南極海水由来の低温性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 が有する 5 つの AGPAT ホモログ (PlsC1-PlsC5) のうち、PlsC1 を対象として酵素学的な研究を行った。*S. livingstonensis* Ac10 は *sn*-2 位にエイコサペンタエン酸 (EPA) を結合した GPL を生産するが、*in vivo* の実験結果から、GPL への EPA の導入には PlsC1 が必要であることがわかってきた (Trace Nutr. Res., 2012, 29:92-99)。そこで、本研究代表者は PlsC1 の精製方法を検討し、その結果、酵素活性を保ったまま PlsC1 を精製する方法を見出した。さらに、精製した PlsC1 の反応性を分析することで、PlsC1 が *in vitro* においても EPA 等の多価不飽和脂肪酸に対して選択的に反応性を示すことを発見した (J. Biochem., 2018, 164:33-39)。AGPAT/PlsC の精製とそれに続く *in vitro* の特性評価を行った研究としては初の報告であり、さらに 2017 年に好熱性細菌由来の PlsC の結晶構造が報告されたことで、AGPAT/PlsC の酵素学的な研究への道が開かれたと言える。

本科研費研究では、これまで未解明であった AGPAT/PlsC の反応特性、触媒機構の理解を目指し、基質認識メカニズムを調べることを目的として (1) *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 の変異解析、および (2) 阻害剤の開発を行った。また、同酵素に限らず AGPAT/PlsC に関する知見を広く収集するため (3) 他生物種の AGPAT/PlsC の精製と特性評価や、(4) 細菌が持つ複数の PlsC ホモログの機能同定にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 の基質認識メカニズムの解析

PlsC1 は、飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸と比べて、EPA をはじめとする多価不飽和脂肪酸に対して高い反応性を示す (J. Biochem., 2018, 164:33-39)。この特性に着目し、AGPAT/PlsC の基質選択性の分子メカニズムを調べるため、PlsC1 をモデル酵素として変異解析を行った。2017

年に報告された好熱性細菌の PlsC の結晶構造を基に PlsC1 の構造モデルを計算して基質のアシル基の結合部位を推定し、これを構成するアミノ酸残基に置換変異を導入した変異型 PlsC1 をデザインした。これを大腸菌 *Escherichia coli* において発現させ、GPL を抽出して質量分析に供して、脂肪酸組成の変化を調べた。また、変異型 PlsC1 の基質選択性を評価するため、*E. coli* 中で組換え発現させ、精製を試みた。

(2) *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 の阻害剤の開発

PlsC1 の基質選択性の分子メカニズムをより直接的に調べるには結晶構造解析が適している。低温菌である *S. livingstonensis* Ac10 由来の PlsC1 は安定性が低くそのままでは同解析には不向きであり、このような場合、基質や阻害剤を結合させた状態で解析に供するのが一般的であるが、AGPAT/PlsC に対する阻害剤は報告がなかった。そこで、PlsC1 に対する阻害剤の新規開発に取り組んだ。精製した PlsC1 を用い、化合物ライブラリーの約 600 種の化合物の存在下で PA 合成反応を行い、各化合物の阻害作用を検討した。さらに、より高い阻害作用を持った化合物の開発を目指し、絞り込んだ阻害剤候補化合物を基に構造的に一部改変を加えた一連の化合物を新たに有機合成し、PlsC1 の PA 合成活性に対する阻害作用を検討した。

(3) 他生物種の AGPAT/PlsC の精製と特性評価

本研究代表者は以前に、*S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 について、活性を保った状態で精製する方法を確立した (J. Biochem., 2018, 164:33-39)。この精製方法がほかの生物種の AGPAT/PlsC にも適用可能であれば AGPAT/PlsC の研究の発展につながると期待され、この点を明らかにすることは有意義である。そこで、ヒト AGPAT1 と *E. coli* の PlsC を対象として活性型酵素の精製を試みた。*E. coli* や酵母を宿主として同酵素の組換え発現系を作製し、培養温度や誘導剤濃度等の培養条件を調整して組換え発現を検討した。発現が良好であった *E. coli* PlsC について、*S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 と同様の方法で細胞膜からの可溶化、およびアフィニティ精製を行い、精製酵素の活性測定を行った。また、当時すでに進めていた好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 の PlsC の解析について、精製酵素を用いて酵素学的な諸性質 (至適反応温度・pH や基質選択性等) の分析を進めた。

(4) 細菌が持つ複数の PlsC ホモログの機能同定

細菌は基質選択性の異なる PlsC ホモログを複数持ち、これによって多様な GPL を生産することが示唆されている。*S. livingstonensis* Ac10 は 5 つの AGPAT ホモログ (PlsC1-PlsC5) を持ち、これらの酵素の複合的な働きによって細胞膜の脂肪酸組成を調整し、南極海水のような低温環境に順応していると考えられるが、これまで PlsC1 以外のホモログ酵素について十分な解析がなされていなかった。そこで、PlsC4 と PlsC5 について変異解析を行い、これらの酵素の機能同定を試みた。触媒残基をアラニンに置換した PlsC4 および PlsC5 不活性化変異株をそれぞれ作製し、GPL を抽出し質量分析に供して脂肪酸組成の変化を分析した。また、PlsC4/5 の生理機能を調べるため、不活性化株の低温条件下における生育や運動性等を評価した。

また、*E. coli* が持つ機能未知タンパク質 YihG は *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC4/5 のオーソログであり、その酵素機能や生理機能、および γ -プロテオバクテリア綱の細菌に広く分布する生物学的な意義に興味を持たれた。そこで、*E. coli* YihG の機能を調べるため、*E. coli* において YihG を遺伝子欠損、および過剰発現させた変異株を作製し、GPL の脂肪酸組成の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 の基質認識メカニズムの解析

変異型 PlsC1 を発現させた *E. coli* から GPL を抽出して分析した結果、GPL の脂肪酸組成の変化が認められ、野生型 PlsC1 の発現株と比べてパルミトレイン酸 (C16:1, $\Delta 9$) の割合が減少し、パルミチン酸 (16:0) やバクセン酸 (18:1, $\Delta 11$) が増加していた。このことから、変異導入によって PlsC1 の基質選択性が変化したことが示唆された。つぎに、これらの変異型 PlsC1 の精製を試みたが、精製酵素は活性を著しく損なっていたため *in vitro* で基質選択性を分析することができず、基質認識メカニズムの解明には至らなかった。

(2) *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 の阻害剤の開発

スクリーニングの結果、化合物ライブラリーの約 600 種の化合物のうち 6 種が高い阻害作用を示し、PlsC1 の PA 合成活性を 0-40% にまで低減させた。このうち 5 つの化合物は共通してベンゼンジオール構造を有しており、この部分構造が阻害活性に重要であることが考えられた。また、構造を改変した化合物にも高い阻害活性が認められ、半数阻害濃度は 5-25 μM であった。この数値であれば結晶構造解析に利用可能だと期待される。

(3) 他生物種の AGPAT/PlsC の精製と特性評価

さまざまな培養条件でヒト AGPAT1 の組換え発現を試みたが、精製や活性測定に十分な発現レベルが得られず特性評価には至らなかった。一方で、*E. coli* PlsC の発現レベルは良好であり、可溶化・精製を試みた結果、これらの操作後も酵素活性を維持していることがわかった。現在も解析を進めているが、これまでに精製酵素の酵素学的な性質を一部明らかにしており、一価の不飽和脂肪酸に選択性が高いことがわかった。また、*T. thermophilus* HB8 の PlsC についても酵素学的な諸性質を明らかにし、本研究成果を論文にまとめた (Biosci. Biotech. Biochem., 2020, in press)。特筆すべき点として、本酵素は飽和、不飽和、分枝鎖脂肪酸のいずれにも反応性を示

し(図2) *S. livingstonensis* Ac10 の PlsC1 や *E. coli* PlsC と異なり、基質選択性が緩いことがわかった。

(4) 細菌が持つ複数の PlsC ホモログの機能同定

PlsC4 不活性化株の GPL を分析した結果、*iso*-トリデカン酸 (*iso*-C13:0) 等の分枝鎖脂肪酸を結合した GPL の割合が著しく低下していた。

一方で、PlsC5 の不活性化株の GPL においては *sn*-1 位に *iso*-ペンタデカン酸 (*iso*-C15:0) *sn*-2 位にパルミトレイン酸 (C16:1, Δ9) が結合した GPL が大きく減少していた。このことから、PlsC4 と PlsC5 はともに PlsC1 とは異なる基質特異性を有しており、*S. livingstonensis* Ac10 において GPL の構造多様性形成に寄与していることが明らかになった。表現型解析の結果、これらの不活性化株は野生株と比べて生育速度や細胞形態、細胞の運動性に違いが見られず、これらとは別の生理機能を担っていることが考えられた。

E. coli YihG については、解析の結果、GPL の脂肪酸組成に変化が認められ、親株と比べて遺伝子欠損株および過剰発現株ではミスチン酸 (14:0) やバクセン酸 (18:1, Δ11) の割合が変動していた。これまで *E. coli* は AGPAT ホモログを1つしか持たないと考えられてきたが、本研究によって *E. coli* もまた基質選択性の異なる2つの AGPAT ホモログ (PlsC と YihG) を持つことが初めて明らかになった。別の解析の結果、YihG に *E. coli* 細胞のべん毛運動との関連が示唆されており、以上の研究成果を論文にまとめた (Biomolecules, 2020, 10:E745)。

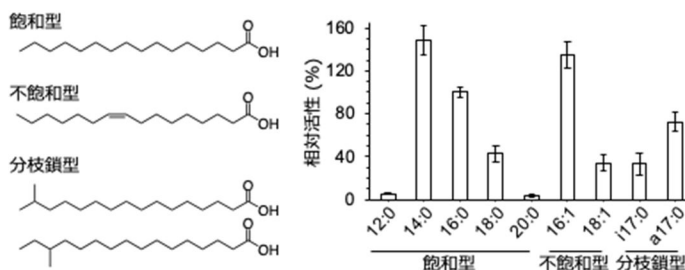


図2 . *T. thermophilus* HB8 の基質選択性

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yosuke Toyotake, Masayoshi Nishiyama, Fumiaki Yokoyama, Takuya Ogawa, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara	4. 巻 10
2. 論文標題 A Novel Lysophosphatidic Acid Acyltransferase of Escherichia coli Produces Membrane Phospholipids With a cis-vaccenoyl Group and Is Related to Flagellar Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 E745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10050745	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 -

1. 著者名 Takuya Ogawa, Nittikarn Suwanawat, Yosuke Toyotake, Bunta Watanabe, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara	4. 巻
2. 論文標題 Lysophosphatidic Acid Acyltransferase From the Thermophilic Bacterium Thermus thermophilus HB8 Displays Substrate Promiscuity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1771169	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 豊竹洋佑、川本 純、西山雅祥、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 A novel 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase homolog from a marine bacterium is related to cell flocculation and swimming motility
3. 学会等名 Extremophiles 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊竹洋佑、川本 純、西山雅祥、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 新規リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素YihGのEscherichia coli膜リン脂質生合成への寄与とその生理機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊竹洋佑、川本 純、西山雅祥、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 Escherichia coli 由来新規リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 YihG の基質特異性と生理機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保嶋美咲、小川拓哉、川本 純、栗原達夫
2. 発表標題 低温菌Shewanella livingstonensis Ac10における リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素PlsC5の機能解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2019年度（第20回）年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保嶋美咲、SUWANAWAT Nittikarn、川本 純、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの比較解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
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