

実施課題名: 植物感染細菌由来リン脂質合成酵素PmtAの構造生物学的研究

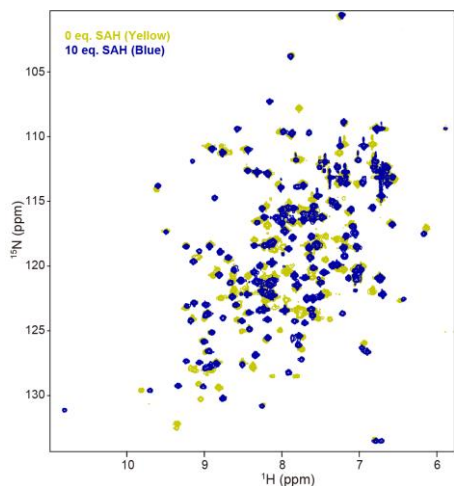
【背景】

*Agrobacterium tumefaciens*等、植物感染細菌において、生体膜中のホスファチジルコリン(PC)が植物への感染プロセスに重要な役割を担うと示唆されている。PCは前駆体リン脂質であるホスファチジリエタノールアミン(PE)からS-アデノシルメチオニン(SAM)をメチル基供与体とした三段階のメチル化反応によって生合成される。PEのメチル化反応はリン脂質メチル基転移酵素PmtAによって触媒されるが、PC生合成の詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、構造生物学的手法を用いてPmtAによるPC生合成機構の解明をめざした。本研究遂行により、植物の枯死の原因となる根頭がん腫病の新規農薬開発への貢献だけでなく、より高等な生物におけるPC生合成機構の解析を通じ、PC生合成異常により引き起こされる疾患の治療法への貢献ができると考えている。

【実施内容】

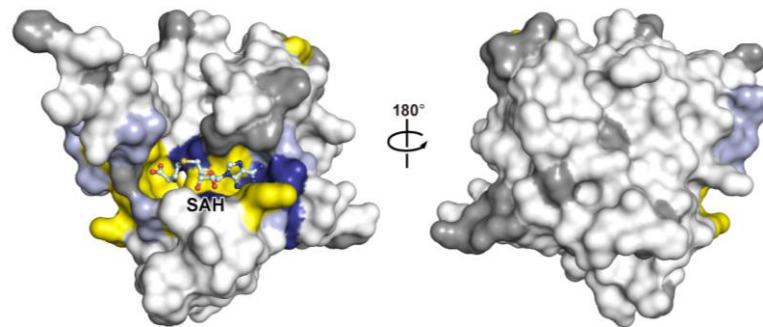
A. tumefaciens 由来PmtA (AtPmtA) の膜結合に必要なN末端25残基を欠損させたコンストラクト (AtPmtA Δ N25) を用いた。S-アデノシルメチオニン(SAM) からメチル基が解離したS-アデノシルホモシステイン(SAH) をAtPmtA Δ N25と混合することで結晶を得ることに成功した。SPRING-8のBL32XUIにて回折データを収集し、2.0 Å分解能で結晶構造を決定した。AtPmtA Δ N25はロスマンフォールドを形成しており、そのフォールド中の溝にSAHが結合していた。溶液中でのSAHの結合様式を明らかにするため、¹³C, ¹⁵Nラベル化したAtPmtA Δ N25を用いて、SAHを添加前および添加後のサンプルについて各種三次元NMR測定を行い主鎖帰属を行った。SAHの添加に伴って、いくつかのNMRシグナルについて化学シフト変化が見られ、新たに出現したNMRシグナルも観測された(Fig. 1)。化学シフト変化が見られたアミノ酸残基および新たにNMRシグナルが出現したアミノ酸残基を結晶構造上にマッピングしたところ、主にSAH分子近傍に位置しているアミノ酸残基のNMRシグナルが変化していることがわかった(Fig. 2)。溶液中においても結晶構造と同様の様式でSAHと結合することが示唆された。また、SAH添加により新たにNMRシグナルが観測されたことから、AtPmtA Δ N25はSAHの結合に伴って強固なフォールドを形成することが示唆された。

Fig. 1



AtPmtA Δ N25の[¹H-¹⁵N]HSQCスペクトル。SAHを添加していないスペクトルを黄色で、10等量SAHを添加したスペクトルを青色で示す。

Fig. 2



NMRシグナル変化が見られたアミノ酸残基をAtPmtA Δ N25-SAH複合体構造にマッピングした。新たにシグナルが観測された残基を黄色で、0.2 ppm以上および0.4 ppm以上化学シフト変化が見られた残基をそれぞれ水色、青色で示す。未帰属の残基を灰色で示す。

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF21-01-042		
利用課題名	植物感染細菌由来リン脂質合成酵素 PmtA の構造生物学的研究		
所属機関	山形大学		
所属部署	理学部		
役職・氏名	役職	准教授	氏名 渡邊康紀
利用実施時期、及び期間	2022年 2月 1日～2024年 2月 29日 総利用日数: 761 h <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		

1. 本課題の概要・目的

ホスファチジルコリン(PC)は真核生物に特異的なリン脂質であるが、*Agrobacterium tumefaciens* 等、植物へ感染し、根頭がん腫病など宿主の腫瘍形成を導く一部の細菌は生体膜中に PC を含んでおり、真核生物のリン脂質組成と似ている。PC を生合成できない *A. tumefaciens* は、植物への感染能を失うことが報告されており、PC が植物への感染プロセスに重要な役割を担うことを示唆している。PC はホスファチジリエタノールアミン (PE) から S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体とした三段階のメチル化反応によって生合成される。リン脂質 N-メチル基転移酵素 PmtA が PE のメチル化反応を触媒するが、PmtA による基質認識機構など詳細な PC 生合成機構は明らかになっていない。そこで本研究では、NMR 法を用いた構造機能解析により PmtA による PC 生合成機構の解明をめざす。¹³C, ¹⁵N ラベルした PmtA を調製し、各種三次元 NMR 測定した後、構造決定を行う。並行して X 線結晶構造解析法による構造決定も試みる。構造決定後、基質である PE や SAM の滴定実験により基質の認識に重要な領域を明らかにする。本研究遂行により、植物の枯死の原因となる根頭がん腫病の新規農薬開発への貢献だけでなく、より高等な生物における PC 生合成機構の解析を通し、PC 生合成異常により引き起こされる疾患の治療法への貢献ができると考えている。

2. 成果の概要

実施内容

A. tumefaciens 由来 PmtA (AtPmtA) は大腸菌の系を用いて調製した。AtPmtA 全長では NMR 測定に必要な量を調製することはできなかったが、AtPmtA の膜結合に必要な領域である N 末端 25 残基を欠損させることで (AtPmtA Δ N25)、NMR 測定に十分な量を調製できた。しかし、室温では時間と共にタンパク質溶液が白濁していくため AtPmtA Δ N25 は不安定であることが示唆された。温度条件を検討したところ、10°C の条件では 1 週間程度は NMR 測定に影響のない状態で保たれていることがわかった。そこで、¹³C, ¹⁵N ラベルした AtPmtA Δ N25 を調製して、10°C の条件で各種三次元 NMR 測定を行った。得たスペクトルに基づいて主鎖帰属を行った。また、SAM

からメチル基が脱離した S-アデノシルホモシステイン (SAH) 存在下では 25°C でも 1 週間以上沈殿が生じることなく NMR 測定を行えることから SAH の結合に伴って AtPmtA Δ N25 の安定性が向上したことが示唆された。そこで AtPmtA Δ N25 について SAH 存在下で各種三次元 NMR 測定を行い、得たスペクトルに基づいて SAH 結合状態の主鎖帰属を行った。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

AtPmtA の NMR 法を用いた機能解析と並行して X 線結晶構造解析を試みた。SAH を AtPmtA Δ N25 と混合することで結晶を得ることに成功した。SPring-8 の BL32XU にて回折データを収集し、2.0 Å 分解能で結晶構造を決定した。AtPmtA はロスマンフォールドを形成しており、そのフォールド中の溝に SAH が結合していた。溶液中での SAH の結合様式を明らかにするため、¹³C, ¹⁵N ラベル化した AtPmtA Δ N25 を用いて、SAH を添加前および添加後のサンプルについて各種三次元 NMR を測定し、主鎖帰属を行った。SAH の添加に伴って、いくつかの NMR シグナルについて化学シフト変化が見られ、新たに出現した NMR シグナルも観測された。化学シフト変化が見られたアミノ酸残基および新たに NMR シグナルが観測されたアミノ酸残基を結晶構造上にマッピングしたところ、主に SAH 分子近傍に位置しているアミノ酸残基の NMR シグナルが変化していることがわかった。SAH 添加に伴って新たに SAH 結合に関与するアミノ酸残基由来の NMR シグナルが観測されたことから、AtPmtA Δ N25 は SAH 結合に伴って強固なフォールドを形成することが示唆された。

AtPmtA はホスファチジルエタノールアミンの三段階のメチル化反応全て触媒することで PC の生合成を担うが、大豆根粒菌である *Bradyrhizobium japonicum* 由来 PmtA (BjPmtA) は PE の最初の二段階のメチル化反応しか触媒しない。AtPmtA の SAH 結合部位から示唆された PE の認識ポケットを構成するアミノ酸のうち、Ile159 が BjPmtA では Phe161 になっていた。AtPmtA の I159F 変異体は PE の三段階目のメチル化反応を触媒しなくなり、BjPmtA の F161I 変異体は PE の三段階のメチル化反応全て触媒した。以上のことから AtPmtA の Ile159 (BjPmtA の Phe161) が基質特異性の決定に関与していることが示唆された。

成果発表

口頭発表

日本生化学会東北支部 第 88 回例会・シンポジウム, 2022 年 5 月

植物病原細菌由来リン脂質メチル基転移酵素 PmtA による基質認識機構の構造基盤
渡邊康紀、久米田博之

ポスター発表

第 23 回日本蛋白質科学会年会 2023 年 7 月

Structural basis for phosphatidylcholine biosynthesis by bacterial phospholipid N-methyltransferase PmtA
渡邊康紀、久米田博之

今後の展開

AtPmtA Δ N25 は SAM および SAH の結合能は保持しているが、膜結合能および PC 合成活性を失っているため、AtPmtA による詳細な PC 合成メカニズムは明らかになっていない。PC 合成活性を持つ AtPmtA について膜結合メカニズムおよび基質である PE 認識メカニズムを明らかにするため、NMR 法を用いた AtPmtA のリポソームおよび基質との相互作用解析を行う。まずは NMR 測定に耐えうる PC 合成活性を持つ AtPmtA の調製系を構築する。これまでに N 末端 10 残基を欠損させることで PC 合成活性は保持しつつ、全長よりも安定なサンプルを調製できることがわかった。そこで、¹⁵N ラベル化した AtPmtA に対して、リポソームおよび基質の PE の滴定実験を行い、膜結合および基質認識に重要なアミノ酸残基を同定する。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究で PmtA による PC 生合成メカニズムの構造基盤が明らかになることで、立体構造に基づいた in silico スクリーニングにより植物病原細菌に特異的に作用する PC 生合成阻害剤の合理的デザインが可能となり、新規抗菌薬の開発への貢献が期待される。また、ヒトにおける PE N-メチル基転移酵素である PEMT の異常により非アルコール性脂肪性肝疾患などの肝臓病を引き起こすことが知られている。将来的には、これまでの PmtA による PC 生合成機構の解析と、より高等な生物における PC 生合成機構の解析を通し、PC 生合成異常により引き起こされる疾患の治療法への貢献ができると考えている。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

北海道大学の久米田博之博士に NMR 測定および主鎖帰属を行っていただきました。また、サンプル調製について非常に有益な助言もいただきました。測定や帰属に関して、迅速かつ丁寧に対応していただきましてありがとうございました。

5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

久米田博士のような NMR 装置の管理や、測定および帰属に関して経験豊富な研究者に支援していただいたおかげで本研究課題が予想よりも大きく進展することができました。今後もこのような支援体制で利用させていただけますと大変心強い限りです。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

北海道大学

溶液 800MHz

2021 年度分

利用期間 1: 2022 年 2 月 1 日～2022 年 2 月 28 日 migi 288 h

利用期間 2: 2022 年 2 月 1 日～2022 年 2 月 28 日 hidari 288 h

利用期間 3: 2022 年 4 月 1 日～2023 年 1 月 31 日 migi 5 h

利用期間 4: 2023 年 4 月 1 日～2024 年 2 月 20 日 hidari 180 h

9. その他の利用施設