

ホスファチジルセリン脱炭酸酵素 PSD の生体膜上での基質認識機構

渡邊 康紀

1. はじめに

細胞やオルガネラの多くの機能は、多くのタンパク質の機能の足場となる生体膜を構成するリン脂質の組成に大きく依存している。原核細胞および真核細胞においてホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine: PE) は、生体膜主要リン脂質の一つである。ホスファチジルセリン脱炭酸酵素 (phosphatidylserine decarboxylase: PSD) は、ホスファチジルセリン (PS) 頭部のカルボキシ基を脱離させることによって PE の生合成を担っている。PSD は細菌からヒトに至るまで保存されており、PSD の異常によりさまざまな生命機能に異常を来す。たとえばマウスの PSD をコードする *Pisd* 遺伝子を欠損すると胚性致死に至る¹⁾。また、ヒトの PSD である PISD の発現が抑制されると、腫瘍細胞の増殖が抑制されることから創薬ターゲットとしても注目されている^{2,3)}。真核生物では PSD はミトコンドリア内膜や、エンドソーム膜に局在して各オルガネラ膜上で PE の生合成を担っている。最近では、PSD は小胞体膜や脂肪滴にも局在することがわかってきた。しかし、PSD がどのように膜中の PS を認識しているのか、PSD による PE 生合成の基本的な分子メカニズムについては、未解明なままであった。本稿ではまず、PSD の自己プロセシング反応による活性化について、次に真核生物の各オルガネラに局在する PSD の機能について紹介する。最後に筆者らの研究成果である大腸菌由来 PSD の結晶構造から明らかになった生体膜上での基質認識機構を紹介する。

2. 自己プロセシング反応による PSD の活性化

PSD は自己プロセシング反応により活性化される。PSD

は前駆体として翻訳された後、高度に保存された Leu-Gly-Ser-Thr モチーフ中のセリン残基を活性中心としたセリンプロテアーゼ様自己プロセシング反応により切断され、 α 、 β の二つのポリペプチド鎖に分かれる (図 1)。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。形成したピルボイル基と 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脱炭酸反応が進行する。このように自己プロセシング反応によりピルボイル基を形成させることで活性化する脱炭酸酵素は PSD の他にも、*S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素などが知られている。一方、芳香族アミノ酸の脱炭酸酵素などは、活性中心にピルボイル基を持たず、ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素として反応を触媒する。現在知られている PSD はすべて活性中心にピルボイル基を形成するタイプの脱炭酸酵素である。

3. PSD のオルガネラ局在

PSD はそのアミノ酸配列から、ミトコンドリア内膜に

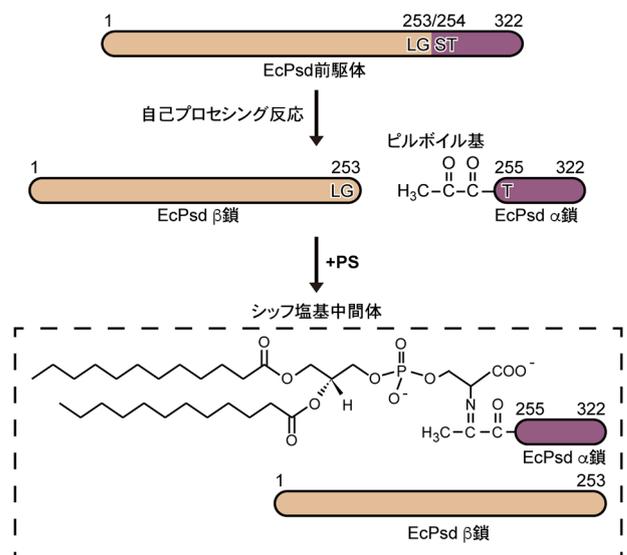


図 1 自己プロセシング反応による EcPsd の活性化
大腸菌由来 PSD (EcPsd) は LGST モチーフのセリン残基を活性中心とした自己プロセシング反応により α 鎖と β 鎖に分かれる。 α 鎖の N 末端にピルボイル基が形成され、PS 頭部のアミノ基とピルボイル基がシッフ塩基中間体を形成することで脱炭酸反応が進行する。

山形大学理学部理学科 (〒990-8560 山形県山形市小白川町 1-4-12)

Substrate recognition mechanism of phosphatidylserine decarboxylase (PSD) on the biological membrane

Yasunori Watanabe (Faculty of Science, Yamagata University, 1-4-12 Kojirakawa-machi, Yamagata 990-8560, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950389

© 2023 公益社団法人日本生化学会

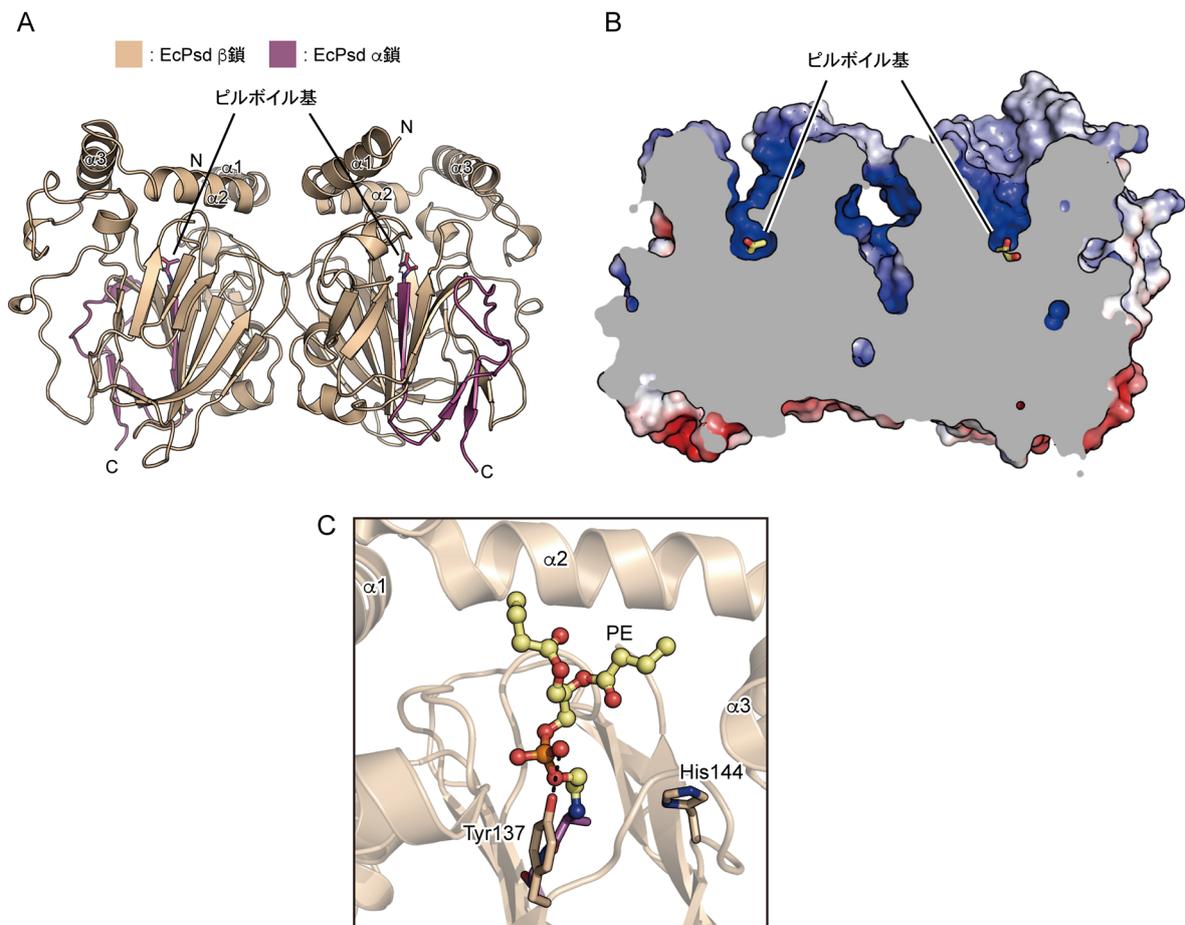


図2 EcPsdの結晶構造

(A) EcPsdのリボンモデル図。(B) EcPsdの表面電荷。正電荷を青色、負電荷を赤色で示す。ヒルポイル基をスティックモデルで示す。(C) EcPsd-PE複合体の拡大図。PE合成活性に重要な Tyr137 および His144 を示す。水素結合を破線で示す。

局在するI型PSDと、エンドソームなど細胞内膜系に局在するII型PSDに分けられる。細菌由来PSDはI型PSDに属する。出芽酵母には、ミトコンドリア内膜に局在するI型PSDであるPsd1と、エンドソーム膜に局在するII型PSDであるPsd2の2種類が存在する。シロイヌナズナには、I型PSDであるPSD1とII型PSDであるPSD2、PSD3の3種類のPSDが存在し、それぞれミトコンドリア内膜、液胞膜、小胞体膜に局在する⁴⁾。一方で、ヒトではミトコンドリア内膜に局在するI型PSDであるPISDのみ存在する。これまで、出芽酵母Psd1はミトコンドリア内膜にのみ局在すると考えられていたが、小胞体膜にも一部局在していることが明らかになった⁵⁾。小胞体膜局在Psd1の機能については現在議論が分かれている。PEの生合成が行われるケネディ経路を抑制した培養条件では、自己プロセシング反応が起こらないPsd1変異体は積極的に小胞体へ輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが示された⁶⁾。このことからPsd1は機能不全になった際に除去されるために小胞体膜に局在していることが示唆されてい

る。一方で、小胞体膜に局在するPsd1は脂肪滴の正常な形成に必要であるということや⁷⁾、ヒトPISDのスプライシングバリエントは脂肪滴に局在することが示されており⁸⁾、小胞体局在Psd1は脂肪滴の形成に関与することが示唆されている。

4. PSDによる基質認識機構

PSDは生体膜中のPSをどのように認識して脱炭酸反応を触媒するのだろうか。1974年にKennedyらのグループにより大腸菌由来PSDが単離精製されてから、45年以上もその詳細な分子メカニズムは不明であった⁹⁾。そこで筆者らは大腸菌由来PSD (EcPsd) の結晶構造解析を試みた。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、2.6Å分解能の回折データを用いて構造を決定した¹⁰⁾。EcPsdの α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体は、さらに会合してヘテロ四

量体を形成していることがわかった (図2A)。 α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体は β サンドイッチ構造を形成し、その上部にはN末端の3本のヘリックス領域 ($\alpha 1 \sim \alpha 3$) が存在していた。 α 鎖は β サンドイッチ構造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 (図2B)。ピルボイル基の周囲は正電荷を帯びており、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。

実際に正電荷のくぼみを用いてPS頭部を認識するのか明らかにするためにPSとの複合体の結晶構造解析を試みた。EcPsdのピルボイル基とPSは、結合した後にシッフ塩基中間体を形成し、脱炭酸反応が進行するのだが、この反応は両者を混合するとすぐに進行して両者の結合が解離しまうため、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とともに混合することで、シッフ塩基中間体を還元し、その後の反応が進行しない状態の結晶を得ることに成功した。得られた結晶から3.6Å分解能の回折データを用いて構造を決定したところ、予想したとおり、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。質量分析により結合したリン脂質はPEであることが明らかになった。このことから、EcPsdに結合したPSは脱炭酸反応されてPEに変換されたの

ちに、NaCNBH₃によって還元されたことが示された。PEのリン酸基とTyr137の水酸基は水素結合を形成しうる距離に位置しており、Tyr137が基質の認識に関与することが示唆された (図2C)。また、PEが結合したくぼみにはPSのカルボキシ基が入っていたと考えられる空間が存在しており、その近傍にはHis144が位置していたことから、カルボキシ基の認識にHis144が関与することが示唆された。EcPsdのY137F、H144A変異体の精製タンパク質を用いて活性を調べたところ、Y137F変異により活性が顕著に減少し、H144A変異により活性は失われていた。このことから、Tyr137およびHis144はEcPsdのPE合成活性に重要であることが明らかになった。His144は、EcPsdの自己プロセシング反応におけるセリン残基の活性化にも関与しており、実際に大腸菌細胞内ではH144A変異により自己プロセシング反応は減弱していた。しかし、H144A変異体は精製中に自己プロセシング反応が進行し α 鎖と β 鎖に分かれるため、変異解析に用いたH144A変異体は成熟後のものを用いている。Tyr137およびHis144は出芽酵母Psd1や、ヒトPISDなど真核生物由来PSDにも高度に保存されており、PSの認識メカニズムは大腸菌からヒトまで共通したメカニズムであることが示唆される。

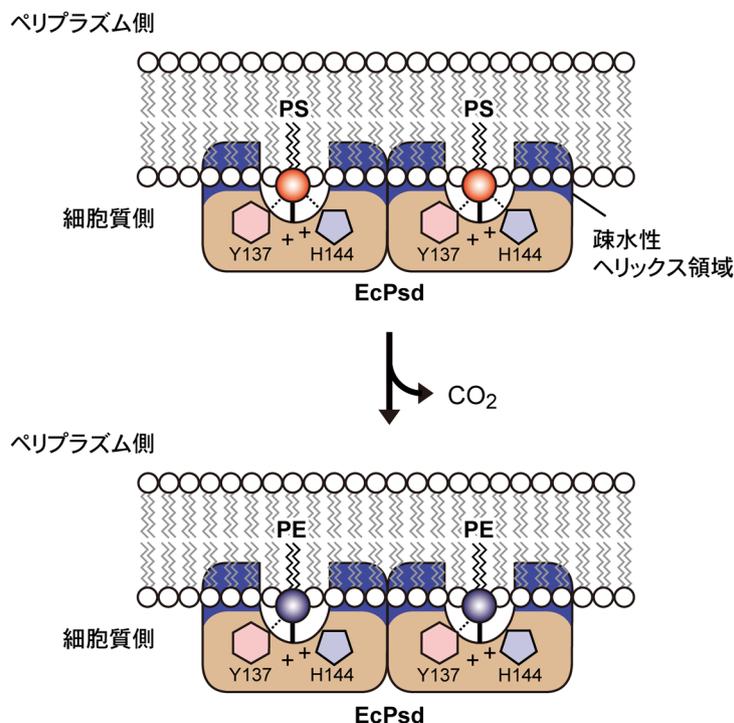


図3 EcPsdのPE生合成モデル

EcPsdの結晶構造と構造に基づいた解析から構築したPE生合成モデル。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、活性中心の位置まで埋まっている。正電荷を帯びたくぼみに位置しているTyr137、His144によってPSの頭部が認識されることで、シッフ塩基中間体を形成する。その後、脱炭酸反応が進行し、PEが合成される。

5. PSDの膜への結合様式

PSDは生体膜中のPSをどのように認識するのだろうか。次にEcPsdの生体膜への結合メカニズムの解明を目指した。EcPsdのくぼみの上部に形成されているN末端ヘリックス領域は、主に疎水性アミノ酸残基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。N末端ヘリックス領域(1~60)を欠損したEcPsd Δ N60変異体を用いたリポソーム共沈降アッセイを行ったところ、野生型EcPsdと比べてEcPsd Δ N60変異体はリポソームへの結合は弱くなっていた。このことから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。また、EcPsd Δ N60変異体のPE合成活性は失われていた。EcPsdの膜結合能はPE合成活性に必要であることが示唆される。

次にEcPsdの膜結合能とPE合成活性の関連を検証した。ヒスチジン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末端にヒスチジンタグを融合したEcPsd Δ N60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。その結果、ヒスチジンタグを介してリポソームに結合させた場合、EcPsd Δ N60変異体でも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生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。

我々がEcPsdの構造を報告してから約1年後に、KimらのグループからもEcPsdの構造が報告された¹¹⁾。筆者らは膜に結合しているEcPsdを精製する際、界面活性剤のTween-20を添加していたが、Kimらは*n*-ドデシル- β -D-マルトシド (DDM) を用いて膜から可溶化して精製したEcPsdの結晶構造を決定した。結晶構造中の疎水性N末端ヘリックス領域にはDDMの疎水性部分が結合しており、DDMの結合している位置からEcPsdは活性中心のピルボイル基が膜表面に位置する箇所まで膜に埋まっていると推定している。膜表面のPS頭部を認識するには合理的なモデルであると考えられる。以上の知見をまとめ、EcPsdのPE生合成のモデルを構築した(図3)。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、活性中心のピルボイル基の位置まで埋まっている。正電荷を帯びたくぼみに位置しているTyr137, His144によってPSの頭部が認識されることで、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。このように、筆者らとKimらのグループによりEcPsdの生体膜上でのPE生合成の構造基盤が明らかになった。

6. 今後の展望

本稿では、主に大腸菌由来PSDによるPE生合成の構造基盤について紹介した。PSの認識に関与するアミノ酸残基や、N末端ヘリックス領域は他の生物種にも保存されていることから、PSDによる生体膜上でのPE生合成メカニズムは生物種間で共通していると考えられる。しかし、真核生物ではPSは小胞体膜で合成されるためPSDの局在するミトコンドリア内膜や、エンドソーム膜など他のオルガネラ膜へPSが輸送される必要がある。出芽酵母において小胞体膜-ミトコンドリア外膜間のPS輸送はERMES (ER-mitochondria encounter structure) 複合体が担い、ミトコンドリア外膜-内膜間の輸送はUps2-Mdm35複合体が担うことが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。ヒトでは、小胞体-エンドソーム間の膜接触部位においてORP10が、エンドソームから小胞体へホスファチジルイノシトール4-リン酸を、小胞体からエンドソームへPSを交換輸送することが知られている¹⁵⁾。しかし、出芽酵母Psd2の局在するエンドソーム膜へどうやってPSを輸送しているのか明らかになっていない点が多い。また、出芽酵母Psd1はミトコンドリア内膜に局在しているにもかかわらず、外膜中のPSをPEに変換する活性を持つことが指摘されている¹⁴⁾。今後は、このようなオルガネラ膜をまたがったリン脂質の生合成はどのように行われているのかを明らかにすることが重要である。

文 献

- 1) Steenbergen, R., Nanowski, T.S., Beigneux, A., Kulinski, A., Young, S.G., & Vance, J.E. (2005) Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J. Biol. Chem.*, **280**, 40032-40040.
- 2) Keckesova, Z., Donaher, J.L., De Cock, J., Freinkman, E., Lingrell, S., Bachovchin, D.A., Bierie, B., Tischler, V., Noske, A., Okondo, M.C., et al. (2017) LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state. *Nature*, **543**, 681-686.
- 3) Seneviratne, A.K., Xu, M., Henao, J.J.A., Fajardo, V.A., Hao, Z., Voisin, V., Xu, G.W., Hurren, R., Kim, S., MacLean, N., et al. (2019) The mitochondrial transacylase, tafazzin, regulates for AML stemness by modulating intracellular levels of phospholipids. *Cell Stem Cell*, **24**, 621-636.
- 4) Nerlich, A., von Orlow, M., Rontein, D., Hanson, A.D., & Dörmann, P. (2007) Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the psd1 psd2 psd3 triple mutant of Arabidopsis affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. *Plant Physiol.*, **144**, 904-914.
- 5) Friedman, J.R., Kannan, M., Toulmay, A., Jan, C.H., Weissman, J.S., Prinz, W.A., & Nunnari, J. (2018) Lipid homeostasis is maintained by dual targeting of the mitochondrial PE biosynthesis enzyme to the ER. *Dev. Cell*, **44**, 261-270.
- 6) Sam, P.N., Calzada, E., Acoba, M.G., Zhao, T., Watanabe, Y., Nejatfard, A., Trinidad, J.C., Shutt, T.E., Neal, S.E., & Claypool, S.M. (2021) Impaired phosphatidylethanolamine metabolism activates a reversible stress response that detects and resolves

- mutant mitochondrial precursors. *iScience*, **24**, 102196.
- 7) Gok, M.O., Speer, N.O., Henne, W.M., & Friedman, J.R. (2022) ER-localized phosphatidylethanolamine synthase plays a conserved role in lipid droplet formation. *Mol. Biol. Cell*, **33**, ar11.
 - 8) Kumar, S., Chitraju, C., Farese, R.V. Jr., Walther, T.C., & Burd, C.G. (2021) Conditional targeting of phosphatidylserine decarboxylase to lipid droplets. *Biol. Open*, **10**, bio058516.
 - 9) Dowhan, W., Wickner, W.T., & Kennedy, E.P. (1974) Purification and properties of phosphatidylserine decarboxylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3079–3084.
 - 10) Watanabe, Y., Watanabe, Y., & Watanabe, S. (2020) Structural basis for phosphatidylethanolamine biosynthesis by bacterial phosphatidylserine decarboxylase. *Structure*, **28**, 799–809.
 - 11) Cho, G., Lee, E., & Kim, J. (2021) Structural insights into phosphatidylethanolamine formation in bacterial membrane biogenesis. *Sci. Rep.*, **11**, 5785.
 - 12) Kawano, S., Tamura, Y., Kojima, R., Bala, S., Asai, E., Michel, A.H., Kornmann, B., Riezman, I., Riezman, H., Sakae, Y., et al. (2018) Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES. *J. Cell Biol.*, **217**, 959–974.
 - 13) Miyata, N., Watanabe, Y., Tamura, Y., Endo, T., & Kuge, O. (2016) Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria. *J. Cell Biol.*, **214**, 77–88.
 - 14) Aaltonen, M.J., Friedman, J.R., Osman, C., Salin, B., di Rago, J.P., Nunnari, J., Langer, T., & Tatsuta, T. (2016) MICOS and phospholipid transfer by Ups2-Mdm35 organize membrane lipid synthesis in mitochondria. *J. Cell Biol.*, **213**, 525–534.
 - 15) Kawasaki, A., Sakai, A., Nakanishi, H., Hasegawa, J., Taguchi, T., Sasaki, J., Arai, H., Sasaki, T., Igarashi, M., & Nakatsu, F. (2022) PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J. Cell Biol.*, **221**, e202103141.

著者寸描

● 渡邊 康紀 (わたなべ やすのり)



山形大学理学部理学科 准教授。博士 (薬科学)。

■略歴 2008年北海道大学薬学部総合薬学科卒業。13年同大学院生命科学院生命科学専攻博士後期課程修了。14年日本学術振興会特別研究員 (PD) (京都産業大学)。17年愛媛大学大学院農学研究科助教。20年より山形大学理学部理学科講師。23年より現職。

■研究テーマと抱負 生体膜リン脂質代謝に関わるタンパク質の構造生物学。

■ウェブサイト <https://twitter.com/ywatanabelab>

■趣味 サッカー少年 (息子) の追っかけ、バレーボール。