

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 24 年度博士課程 進学
氏 名 王 世鵬
指導教員名 田之倉 優

論文題目

Structural insight into human CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase
(ヒト由来ホスホエタノールアミンシチジル基転移酵素 ECT の X 線結晶構造解析)

序論

ホスファチジルエタノールアミン (PE)はグリセロリン脂質の一種であり、真核生物のリン脂質含量の 20%を占め、生体膜の重要な構成成分として知られている。PE は生物の膜融合、細胞周期、オートファジー、アポトーシスなどの細胞プロセスに重要な役割を果たしている。真核生物において PE は生合成によって必要な量が維持されている。真核生物における PE の生合成経路として、ホスファチジルセリン(PS)が脱炭酸化により PE に変換される経路とエタノールアミンから三段階の酵素反応で PE が合成される CDP-Ethanolamine (CDP-Etn)経路の二つの主要な経路が存在する。前者は真核生物と原核生物に共通の生合成経路であり、後者は真核生物に特有の経路である。哺乳類の心臓、肝臓においては、PE の生合成は後者の CDP-Etn 経路を主要経路として行われている。

酵素CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (ECT)は、この経路を制御する鍵酵素として知られており、CDP-Etn経路の二段階目の反応を担う。この反応はCTPとO-phosphoethanolamine (P-Etn)を基質とし、シチジル基の転移反応によってCDP-Etnとピロリン酸 (PPi)を生成する。この反応において、基質の結合はCTPが先にP-Etnが後、また反応産物の解離はPPiが先にCDP-Etnが後のordered bi bi機構で進行することが示されている。ECTの活性化にはMg²⁺などの2価金属イオンが必須である。

本研究の対象はヒト由来のCTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (hECTまたはPcvt2)である。哺乳類細胞を用いた生化学解析の結果、癌細胞はhECT活性の上方制御によって飢餓状態に適応し、生存率を向上させることが示された。癌細胞の生存メカニズムに関わるhECTは最近注目度が非常に高く、機能解析および活性制御について研究が進んでいる。2008年にhECTのapo状態の結晶構造がPDBに登録されたが、この構造は活性に不可欠なC末端が除かれたコンストラクトを用いて行われた研究成果であり、基質や反応産物とのドッキングシミュレーションのモデルとしても不十分である。また、この構造には基質が結合していないため、基質認識機構および基質特異性を実現するメカニズムも不明であった。その後hECTの構造解析は進んでおらず、このapo構造に基づいた議論もほとんどなされなかった。

以上のような背景から、本研究ではhECTを対象として、X線結晶構造解析およびドッキングシミュレーションを中心とした手法により、hECTの基質認識機構および基質特異性を決定する構造基盤について解析した。

hECTの結晶構造解析

大腸菌発現系を用いて、N末端にヒスチジンタグを付加した*Homo sapiens*由来の全長hECTを大量発現させた。Ni-アフィニティー精製、thrombinによるヒスチジンタグの切断、陽イオン交換クロマトグラフィーを経て、hECTを精製した。結晶化条件の探索の結果、タンパク質の結晶を得た。X線回折データを収集し、分子置換法によって位相と初期構造を決定した。その後、モデル構築、精密化を進め、hECTのapo状態の結晶構造を分解能2.5 Åで決定した。

得られた構造は、空間群P2₁で、非対称単位に四分子が存在していた。既存のapo構造において構造決定できていなかったC末端領域が、活性部位近傍に存在することが分かった。hECTはN末端とC末端に二つのシチジル基転移(CT)ドメインを持っているが、シチジル基転移反応に関わらないと考えられているC末端側のCTドメインのポケットにCMPが結合していた。結晶化および精製過程において、CTPやCMPを添加していな

いため、このCMPは発現宿主である大腸菌由来のものである。さらにhECTのCTPase活性を調べた結果、hECTのCTPase活性は検出できなかったため、CTPを添加してもCMPを生成することができない。

基質認識機構を解明するために、 Mg^{2+} の存在下で、基質CTP単独およびCTPとP-Etnを含む溶液条件で共結晶化を行ったところ、hECTの結晶が得られた。構造解析を行った結果、基質の電子密度が確認できず、複合体の結晶構造が得られなかった。基質のソーキングをしても、基質結合状態の結晶は得られなかった。

hECTと基質のドッキングシミュレーション

本研究で決定した hECT apo 構造を用いて、ソフトウェア AutoDock Vina を使って基質である CTP と P-Etn のドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションの結果、CTP と P-Etn はポケットによくフィットした。基質と結合するアミノ酸残基についての変異体解析により、活性に重要なアミノ酸を推定した。

yECT基質複合体の結晶構造解析

酵素 ECT は、哺乳類において保存性がかなり高いため、他の哺乳類由来の ECT を用いて基質複合体の結晶構造を決定するのは困難と考えた。そこで、同じ真核生物に属する酵母由来の ECT を用いて基質複合体の構造決定に挑戦した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (yECT)は hECT と 36%のアミノ酸配列相同性を持ち、活性に重要な二つのモチーフ HXGH と RTXGVSTT がよく保存され、hECT と同じ基質結合様式を取ると考えられた。

大腸菌発現系を用いて、N末端にヒスチジンタグを付加したyECTを大量発現させた。Ni-アフィニティー精製、thrombinによるヒスチジンタグの切断、ゲルろ過クロマトグラフィーを経て、yECTを精製した。結晶化条件の探索の結果、基質P-Etnのアナログである 2-aminoethyl hydrogensulfate (S-Etn)とCTPと Mg^{2+} を含む溶液条件でタンパク質の結晶を得た。X線回折データを収集し、分子置換法によって位相と初期構造を決定した。その後、モデル構築、精密化を進め、ECT・CTP・S-Etn・Mg複合体の結晶構造を分解能 1.8 Åで決定した。

CTPはN末端側のCTドメインに存在する正電荷を帯びたポケット内に結合していた。CTPの認識機構について、二つのモチーフ“HXGH”モチーフおよび“RTXGVSTT”

モチーフに含まれるアミノ酸残基の他にも、Cys15、Phe16、Lys55、Gly102、Asp104、Arg315、Lys319 が CTP との結合に関わっていた。

アミノ酸残基 Cys15、His46、Lys55、His101、Tyr115 が S-Etn との結合に関わっていた。S-Etn のアミノ基が Tyr115 の O_{η} 原子および His46 の N_{ϵ} 原子との水素結合を形成しており、エタノールアミン部分のメチレン基が、Tyr84 の芳香環と疎水的な相互作用をしていた。

ECT・CTP・S-Etn・Mg複合体のMg²⁺の電子密度は活性部位に観察された。Mg²⁺とECTのアミノ酸残基との間には相互作用が存在せず、Mg²⁺はCTPの α 、 β 、 γ リン酸基、そして3つの水分子との間に配位結合を形成していた。ここで見られた配位様式は、配位子を正8面体の頂点に配置した6配位構造であり、Mg²⁺の配位様式として典型的である。

yECT と hECT の構造解析の結果、酵素 ECT の基質認識機構および基質特異性を決定する構造基盤を解明した。hECT の Loop114-126 は基質の結合によって開閉構造を取り、閉構造の場合には His57、Tyr95、Tyr126 によって空間を制限することにより基質 P-Etn のアミノ基の結合部位が形成されていた。また、CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase が触媒する反応のメカニズムを提唱した。

総括

本研究は hECT-apo および hECT の酵母ホモログ yECT の基質結合状態の X 線結晶構造を決定した。また、各種変異体の機能解析を行ったことにより、基質認識機構および基質特異性を実現するメカニズムを明らかにした。これらの成果は、hECT に対する阻害剤の設計によって抗癌薬の開発に役立つことが期待される。