

審査の結果の要旨

氏名 王世鵬

本論文では、ヒト癌細胞の生存に重要なホスホエタノールアミンシチジル基転移酵素(hECT)を標的とした抗癌剤設計の構造基盤を解明することを目的とし、X線結晶構造解析、構造比較、変異体酵素を用いた活性の評価を行い、hECTの基質認識機構と基質特異性の構造基盤について述べている。本論文は全五章からなる。

第一章序論では、ホスファチジルエタノールアミン(PE)の生合成に重要である鍵酵素ホスホエタノールアミンシチジル基転移酵素(ECT)に関する先行研究についてまとめている。哺乳類の心臓、肝臓におけるPEの主要な生合成経路はCDP-Ethanolamine (CDP-Etn)経路である。ECTはCDP-Etn経路を制御する鍵酵素として知られており、CTPとホスホエタノールアミンから、シチジル基の転移反応によってCDP-Etnとピロリン酸を生成する。癌細胞がECTの活性を増強すること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るなど、hECTは近年注目されており、2008年にhECTのapo状態の結晶構造がPDBに登録されたが、この結晶構造は活性に不可欠なC末端領域を欠いた構造であるため、基質認識機構および基質特異性を実現するメカニズムは不明である。これらの不明の点は全長hECTおよびECT/基質複合体の結晶構造解析によって明らかにされると期待される。

第二章では、全長hECTの結晶構造の決定および立体構造に見られた特徴を述べている。申請者は大腸菌発現系を用いた全長hECTの発現・精製系を構築し、hECTの結晶を取得した。X線回折データを収集し、全長hECTのapo状態の結晶構造を最高分解能2.5 Åで決定した。C末端352-356残基と364-370残基の構造を世界で初めて決定した。構造情報に基づいて、様々な長さでC末端を削った変異体を作り、活性測定を行った結果、C末端領域の中で358-363残基が非常に活性に重要であることが示唆された。また、hECT/基質複合体の結晶構造の取得を目指したが、apo状態の結晶しか得られなかった。

第三章では研究対象を酵母*Saccharomyces cerevisiae*由来ECT(yECT)に切り替え、基質複合体の構造決定に成功したこと、およびyECTの基質認識機構に

ついて述べている。申請者は大腸菌を宿主とする全長yECTの発現・精製系を利用し、基質P-Etnのアナログである 2-aminoethyl hydrogensulfate (S-Etn)と CTPとMg²⁺を含む溶液条件でyECTの結晶を得た。X線回折データを収集し、ECT/CTP/S-Etn/Mg²⁺複合体の結晶構造を最高分解能 1.8 Åで決定した。構造情報に基づき、yECTにおける基質CTP、P-Etn、Mg²⁺の認識機構を明らかにした。

第四章では、hECT の基質認識機構と基質特異性を決定する構造基盤の解明について論じている。hECT の Gln41 が基質 CTP の結合に対して立体障害を起こすことが、hECT/基質複合体結晶が得られにくい原因だと考えられた。更に、S-Etn と CTP の α リン酸基の認識に関わる yECT のアミノ酸残基が進化的によく保存され、hECT においてもこれらのアミノ酸残基が基質を認識すると推定された。変異体解析を行った結果、Gln41 が hECT の活性を阻害することと、Lys66、Asp115、His112、Arg140 が活性に重要であることが確かめられた。ECT とホスホコリンシチジル基転移酵素(CCT)との構造比較により、His57 が基質特異性を決定しているとの仮説を立て、hECT の変異体解析を行った。その結果、野生型 hECT が基質として利用できない P-Cho に対し、His57 の変異体が活性を示すことが示された。このことから、His57 が基質特異性に大きく寄与することが示唆された。

第五章総合討論では、CTP:X cytidyltransferase family において各酵素の比較および ECT の進化的な考察を行っている。CTP:X cytidyltransferase family において同じような CTP Binding Pocket を有する膜貫通酵素 CTP:phosphatidic acid cytidyltransferase との比較も行った。また、高等真核生物の ECT は触媒能を低下させる方向で進化したと論じている。

以上、本研究は、hECT の基質認識機構、基質特異性の構造基盤を解明し、hECT を標的とした抗癌剤の設計に資する構造基盤を提供したもので、本研究の成果は学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。