

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小野 裕介

生体膜を構成する主要成分であるリン脂質は、合成、代謝における制御を受けることで、その組成が厳密に決定されていると考えられている。申請者は真核生物におけるリン脂質の合成と代謝に関与する未知の制御機構について明らかにすることを目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて研究を行った。第 1 章から 3 章までは、リン脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) を合成する Kennedy 経路の第 2 段階目に位置し、重要な役割を有するとされる CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (ECT、遺伝子 *ECT1* の産物を Ect1p と表示) の諸性質を検討し、第 4 章ではリン脂質ホスファチジルコリン (PC) の取り込みと代謝に関する遺伝学的解析を行った。

第 1 章と 2 章では、Ect1p の酵素学的性質を明らかにしている。申請者は N 末端に his-tag を付加した his-Ect1p を大腸菌で大量生産させ、精製を行った。his-Ect1p が Ect1p と同等の活性を有することを確認した上で、主として his-Ect1p についてその諸性質を検討している。基質 [^{14}C]エタノールアミンリン酸は大腸菌で生産した酵母エタノールアミンキナーゼを用いて酵素的に調製して用いている。his-Ect1p の至適 pH は 7.8、至適温度は 30 °C であり、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} といった二価の金属イオンが活性に必須であること、さらに CTP 以外に dCTP も基質として利用できることを明らかにした。his-Ect1p における K_m 、 V_{max} はラット肝細胞由来の ECT と類似している。また、酵母から調製した膜画分、とその脂質抽出物あるいは主要リン脂質 PC を用いて作製したリポソームの添加によって his-Ect1p の活性が部分的に上昇したので、膜脂質が his-Ect1p の活性に影響を与えているとしている。

第 3 章では、Ect1p の一次構造に保存されたアミノ酸配列と、共同研究者により決定された Ect1p の立体構造重要と考えられる個々のアミノ酸やドメインの役割を、変異型酵素を作製して検討している。

申請者は 1 アミノ酸を置換するように変異を導入した *ECT1* 遺伝子を Ect1p 欠損株に発現させた時の相補性、及び大腸菌を用いて精製した 1 アミノ酸置換体の活性を検討することにより、Ect1p の N 末端側半分に対応する N-ドメインに構造上予測された活性中心が存在していること、特に各種真核生物に保存された HXGH モチーフ、RTXGVSTT モチーフが活性に必須であることを示した。その他にも CTP や CDP-エタノールアミンと相互作用していることが推測された Phe16、Lys55、Tyr84、相互作用は推測されていないが種間の保存性が非常に高い Asp17 が Ect1p の活性に重要な役割を持つことを示唆した。その一方で、N-ドメインと相同性の高い C 末端側半分に対応する C-ドメインの中のアミノ酸と、Ect1p の活性との関連は見られないこと、しかし C-ドメインの存在

自体は Ect1p 活性に必要であることを示している。さらに、C 末端に形成されている α -ヘリックスの塩基性アミノ酸 Arg315 が Ect1p の反応に重要な役割を有していることを強く示唆した。

第4章では PC 合成欠損株が炭素鎖長の短いアシル鎖を有する水溶性の PC を取り込んで生育できることを利用して、この短鎖のアシル鎖を一般的な鎖長のアシル鎖に変換する機構や PC の取り込み、輸送に関与する因子の探索を行っている。

コリン要求性を示す PE のメチル化によって PC を合成するメチルトランスフェラーゼをコードする *PEM1*、*PEM2* 破壊株はコリン要求性であるが、炭素鎖長 8 のアシル基をもつ diC8PC を添加すると生育できる。主要なホスホリパーゼ B をコードする *PLB1*、*PLB2*、*PLB3* を全て破壊した 5 重破壊株が diC8PC を添加した培地で生育可能であり、diC8PC のアシル鎖の除去にはこれらの主要なホスホリパーゼは必須ではないことを示した。また、diC8PC で生育できないことを指標に $\Delta pem1 \Delta pem2$ 二重変異株から分離された変異株 A2 株は形質膜上で PE の内層への転移を行う flippase である、Dnf1p と Dnf2p のサブユニットとされる *LEM3/ROS3* に変異が生じていたこと、*LEM3/ROS3* 遺伝子を破壊した三重破壊株は diC8PC 添加培地で生育しなかったことから、短鎖のアシル基を持つ PC の取り込みに *LEM3/ROS3* が関与していることを示した。

以上、本論文は酵母 Ect1p の酵素学的諸性質を明らかにし、また、酵母における短鎖の PC の代謝機構の解明に新たな知見を加えたものであって、今後の脂質代謝の解明に向けて学術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。