

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大塚 淳

本論文は真核生物のホスファチジルエタノールアミン生合成系『CDP-Etn 経路』の制御に重要とされている酵素 CTP : phosphoethanolamine cytidyltransferase (以下、ECT) が持つ 2 つのドメインの役割および反応機構の詳細を立体構造解析の立場から示したもので、ECT に見られたダイナミックな構造変化に関する考察を展開した。本論文の構成は第 1 章の『序論』、第 2 章の『ECT・CTP 複合体構造』、第 3 章の『ECT・CDP-Etn 複合体構造』、第 4 章の『ECT・CDP-Etn・PPi 複合体構造』、第 5 章の『総合討論』の 5 章からなる。

第 2 章では、ECT と基質 CTP の複合体の結晶構造を決定している。大腸菌で組換え体 ECT を発現させる段階から精製、結晶化、構造決定の流れと、決定した結晶構造から基質 CTP の認識機構の詳細を解説している。精製において ECT が不安定であったという問題、および構造決定における空間群の誤解釈の問題を見事に解決し、ECT の結晶構造を決定したことは評価に値する。アミノ酸配列から予想されていたように、ECT が 2 つの構造が似たドメインから構成されることを立体構造から明らかにした。2 つのドメインの構造を比較することにより、N 末端側ドメインだけに活性部位が存在するというを示した。本論文以前には、ECT が 2 つのドメインに活性を持つという説が唱えられていたが、本研究の結晶構造から活性部位の所在が初めて明らかにされたと言える。

第 3 章では ECT と反応産物 CDP-Etn の複合体の結晶構造を決定している。CTP との複合体構造との比較をおこない、活性部位が開構造と閉構造を取ることを示した。そしてこの構造変化が、活性部位に結合しているリガンドの種類によって決定されているというメカニズムを提唱している。

第 4 章では ECT と 2 つの反応産物 CDP-Etn およびピロリン酸 (以下、PPi) との複合体の結晶構造を決定している。この複合体中において、ECT の反応に必須とされるマグネシウムイオンの結合様式も決定している。この ECT・CDP-Etn・PPi 複合体構造は ECT の反応中間体として非常に価値の高い結晶構造である。この複合体構造から、ECT の C 末端に存在する  $\alpha$ ヘリックスが大きな構造変化を起こすことを示し、この  $\alpha$ ヘリックスが反応産物 PPi の認識に関わることを示した。第 2 章で活性部位が N 末端側ドメインに存在することを示したが、N 末端側ドメインには含まれていない C 末端の  $\alpha$ ヘリックスが ECT の活性に関わるという結果は、ECT の酵素反応において非常に興味深い結果である。また、シチジル基の転移反応におけるマグネシウムイオンの役割は、基質や反応産物の間に起こる静電的な反発を干渉することにあると本研究以前から予想されていたが、本論文で見

られたマグネシウムイオンの結合は、このようなマグネシウムイオンの役割を直接的に示す初めての成果である。

第5章の総合討論では、得られた複数の結晶構造を用いて、ECTの反応機構である ordered bi bi を可視化した。構造生物学の使命の一つとして生命現象を原子レベルで視覚的に明らかにすることが挙げられるが、本論文では ordered bi bi 反応の様子を見事に可視化している。そして、第3章と第4章で明らかにした2つの構造変化が ordered bi bi 反応の中でどのような役割を担っているかを明らかにしたことは、ECTの反応機構に関する研究という以上に、構造生物学に携わる人間に夢を与えるユニークな成果である。

本論文は1つの酵素に対して徹底的な結晶構造解析を行ったことにより、複数の反応ステップに対応する結晶構造を決定した。したがって本論文で述べられた結果は酵素の構造解析という分野において質・量ともに高い評価を受けるに値する。また、本論文に述べられた実験方法、構造情報の解釈、そしてECTに関する既知の知見を踏まえた考察は論理性に富み、かつ魅力的である。以上のことから、本論文は学術的に価値が高いと判断できる。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。