

# 論文内容要旨（和文）

令和元年度入学 大学院博士後期課程

地球共生圏科学専攻 生物学分野

氏名 木村 啓介



論文題目 Structural and functional analysis of a CDP-diacylglycerol synthase Tam41  
(CDP-ジアシルグリセロール合成酵素Tam41の構造機能解析)

真核生物にはオルガネラと呼ばれる膜構造が発達しており、それぞれが特徴的な機能を有している。オルガネラの正常な機能発現には、オルガネラ膜の主成分であるリン脂質が適切な組成で維持される必要があるため、リン脂質の合成や細胞内輸送は生命活動にとって重要である。多くのリン脂質は、高エネルギー中間体リン脂質、CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) を介して合成される。CDP-DAG を合成する酵素は、真核生物において 2 種類存在することが知られている。1 つは原核生物から真核細胞まで広く保存されている複数回膜貫通タンパク質 Cds1 で、真核生物では小胞体膜で機能する。もう一方は、Cds1 とは異なり明確な膜貫通領域を持たない膜表在性タンパク質 Tam41 である。Tam41 は、真核生物のミトコンドリア内膜のマトリックス側表面で機能する。本研究では、このように構造が全く異なるタンパク質が、同じ酵素活性を発揮する分子メカニズムを解明することを目的に、Tam41 の結晶化及び X 線構造解析を行った。

様々な真核生物由来の Tam41 をクローニングし、大腸菌内での発現を試みたが、そのほとんどが発現しないか、不溶性タンパク質として発現した。一方、例外的に Tam41 ホモログを有する原核生物 *Firmicutes bacterium* CAG:884 の Tam41 (FbTam41) を大腸菌内で発現したところ、可溶性タンパク質として大量精製可能であることがわかった。そこで FbTam41 が実際に CDP-DAG 合成酵素として機能するかを確認するために、Tam41 を欠失した出芽酵母細胞のミトコンドリアマトリクスに FbTam41 を発現させたところ、Tam41 の欠損により引き起こされる増殖阻害が回復した。また精製 FbTam41 をニトロベンゾオキサジアゾール(NBD)で蛍光標識したホスファチジン酸 (NBD-PA) に加えたところ、NBD-CDP-DAG が合成されることを確認した。これらの結果から、FbTam41 が CDP-DAG 合成酵素であることを明らかにした。

次に FbTam41 の立体構造を明らかにするために、FbTam41 の結晶化を目指した。様々な条件検討の結果、膜結合に重要な疎水的な領域である C 末端領域を欠失させた変異体 (FbTam41ΔC) が、再現性良く結晶化することがわかった。この FbTam41ΔC の結晶を Spring-8 に送り、得られた X 線回析データを解析したところ、 $2.6\text{\AA}$  の分解能で FbTam41, CTP,  $\text{Mg}^{2+}$  の共結晶の構造を決定することに成功した。FbTam41 は NTase フォールドドメインと Winged ヘリックスドメインを持ち、これらのドメインの中間に CTP- $\text{Mg}^{2+}$  を特異的に認識する正電荷に富んだポケットを有していた。この構造データを、タンパク質-リガンド間相互作用の概略を二次元で表示するプログラム Ligplot+ で解析し、CTP- $\text{Mg}^{2+}$  の認識に重要なアミノ酸残基候補を同定した。これらのアミノ酸残基にアラニン変異を導入した FbTam41 変異体を多数作成し、その CDP-DAG 合成酵素活性を測定することで、CTP および  $\text{Mg}^{2+}$  の認識に重要なアミノ酸を探査した。その結果、 $\text{Mg}^{2+}$  と配位結合を形成する 40 番目のアスパラギン酸、CTP と水素結合を形成する 126 番目のリシン、176 番目のアスパラギン酸、187 番目のリシン、CTP と疎水相互作用や分子間力等が作用している 22 番目のグリシン、123 番目のアルギニン、

173番目のチロシンが、酵素活性に重要なアミノ酸残基として同定された。実際にこれらのアミノ酸残基の変異体は、Tam41の欠損による増殖阻害を相補できなかった。

結晶構造解析に成功した FbTam41ΔC は、両親媒性ヘリックスを形成すると予想される C 末端の膜結合ドメインを欠失していた。そこで、脂質膜上で行われる CDP-DAG の生合成機構を明らかにするため、この C 末端領域を補完した全長 FbTam41 構造の解明を試みた。具体的には、C 末端両親媒性ヘリックスの位置を、FbTam41ΔC の表面電荷から予測したマニュアルモデルと、タンパク質構造予測プログラム AlphaFold2 を用いて予測したモデルを作成した。これらのモデル構造のどちらが確からしいかを検証するために、様々な生化学的検証を行い、AlphaFold2 を用いて予測した全長 FbTam41 の構造が、確からしいことがわかった。興味深いことにこの予測構造では、CTP-Mg<sup>2+</sup>を認識するポケットの近傍に疎水性アミノ酸残基 (F65, I66, V181, I262, I267, L271, L275, F282) が同じ面に集まつた疎水性クラスターを形成していた。FbTam41 はこの疎水性領域を脂質膜の疎水性領域に陷入させることで、脂質膜中に存在する PA と CTP を近接させ、CDP-DAG の生合成を促進することが示唆される。

# 論文内容要旨（英文）

令和元年度入学 大学院博士後期課程

地球共生圈科学専攻 生物学分野

氏名 木村 啓介



論文題目 Structural and functional analysis of a CDP-diacylglycerol synthase Tam41

Eukaryotic cells have highly developed membrane structures called organelle. In order for organelles to function properly, phospholipids, major components of the organelle membrane, must be maintained at an appropriate composition. Most phospholipids are synthesized from a high-energy intermediate phospholipid CDP-diacylglycerol (CDP-DAG). Two types of CDP-DAG synthetic enzymes are present in eukaryotic cells. Cds1, which is widely conserved from bacteria to human, is a multi-spanning membrane protein. Another enzyme is Tam41, which is almost exclusively present in eukaryotic cells, lacks transmembrane domains.

In order to clarify the mechanism by which these two proteins with different structures exert the same enzymatic activity, I decided to determine Tam41 structure. To this end, I first searched for Tam41 protein that can be purified as a soluble protein. Among various proteins tested, I found that *Firmicutes bacterium* Tam41 (FbTam41) was a protein that met this criterion. I confirmed that FbTam41 directly catalyzed the CDP-DAG synthesis *in vitro* and functionally substituted yeast Tam41 *in vivo*. These results demonstrate that FbTam41 is a novel CDP-DAG synthase in prokaryotic cells. I succeeded in determining the crystal structure of FbTam41 lacking the C-terminal 18 residues in the cytidine triphosphate (CTP)-Mg<sup>2+</sup> bound form at a resolution of 2.6 Å. FbTam41 consists of the NTase and WH domains, and possesses a positively charged pocket. Biochemical analyses provided insights into the positions of the substrate, CTP-Mg<sup>2+</sup>. In particular, Arg123 and Tyr173 sandwiched the cytosine base of CTP by π-π interactions in a planar conformation, and Asp40 was proximally located to Mg<sup>2+</sup>. These amino acid residues were indeed critical for the CDP-DAG activity.

Moreover, I predicted and evaluated the structure of full-length FbTam41 containing the C-terminal amphipathic α-helix, which was missing in the crystal structure. Based on the modeled full-length structure, I propose potential mechanistic insights into the CDP-DAG synthesis by FbTam41.

## 学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

令和 4 年 3 月 2 日

理 工 学 研 究 科 長 殿

## 課程博士論文審査委員会

主査	田村 康	印
副査	宮沢 豊	印
副査	奥野 貴士	印
副査		印
副査		印

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

## 記

論文申請者	専攻・分野名 地球共生圈科学専攻・生物分野			氏名 木村 啓介
論文題目	Structural and functional analysis of a CDP-diacylglycerol synthase Tam41 (CDP-ジアシルグリセロール合成酵素 Tam41 の構造機能解析)			
学位論文審査結果	合格		論文審査年月日	令和 4 年 1 月 20 日～ 令和 4 年 2 月 2 日
論文公聴会	令和 4 年 2 月 2 日		場所	理学部 A405 教室
最終試験結果	合格		最終試験年月日	令和 4 年 2 月 2 日

## 学位論文の審査結果の要旨 (1,000 字程度)

リン脂質の多くは、高エネルギー中間体リン脂質、CDP-ジアシルグリセロール (DAG) を介して合成される。CDP-DAG 合成酵素には、原核生物からヒトまで広く保存されている Cds1 型と、真核生物のみに存在する Tam41 型の 2 種類の酵素が存在することがわかつっていた。Cds1 は複数回膜貫通タンパク質である一方、Tam41 には明確な膜貫通領域を持たない膜表在性タンパク質である。本学位論文では、このように構造が全く異なる 2 つの酵素が、全く同じ酵素活性を発揮する分子機構の解明を目的に、Tam41 の結晶構造解明を行った。

具体的には、これまで真核生物のみに存在すると考えられてきた Tam41 のホモログタンパク質が、一部の原核生物 (Firmicutes bacterium) に存在することを見出し (FbTam41 と命名)、その構造機能解析に取り組んだ。まず、C 末端 18 アミノ酸残基を欠損させることで FbTam41 を大腸菌から大量に発現精製可能であることを見出した。この精製 FbTam41 を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った結果、FbTam41 と CTP-Mg<sup>2+</sup>との共結晶化に成功し、最終的に 2.6 Å の分解能でその X 線結晶構造を決定した。得られた結晶構造から、Tam41 の CTP-Mg<sup>2+</sup>の認識に重要と考えられるアミノ酸残基を予測し、その部位にアラニン変異を導入した変異体を多数作製した。これらの FbTam41 変異体を用いた解析を通じ、CTP-Mg<sup>2+</sup>の認識に重要と考えられるアミノ酸残基の決定に成功した。また、結晶化の際に欠失させた C 末端 18 アミノ酸残基が、両親媒性ヘリックスを形成すると予測され、脂質二重膜への結合に重要であること示した。さらにこの C 末端領域を含む Tam41 全長の予測構造モデルを構築し、生化学実験によりその妥当性を解析した。興味深いことに予測した Tam41 の全長モデル構造では、①C 末端両親媒性ヘリックスの疎水面が、Tam41 が持つ疎水面と同じ方向に位置することで、大きな疎水性領域を形成し、脂質膜表面への結合に重要な役割を果たすこと、②C 末端両親媒性ヘリックスにおける正電荷表面が、Tam41 の活性中心近傍の多数の正電荷アミノ酸とクラスターを形成することで、酵素活性に重要な役割を果たすことが示唆された。これらの発見は、これまで謎であった Tam41 が CTP-Mg<sup>2+</sup>を認識する分子機構や、Tam41 の脂質二重膜表面への結合様式の解明につながるものであり、Tam41 による CDP-DAG 合成機構の解明に大きく貢献する研究成果である。本学位論文では上記の研究成果が、適切にまとめられており、博士学位論文として十分な新規性と独自性を持つ研究内容であることが確認できたため、博士学位論文審査を合格と判定した。

また本論文は、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ありません。

## 最終試験の結果の要旨

最終試験では、学位論文の研究内容に関する約 45 分の口頭発表を行い、その後約 30 分の口頭試問を行った。口頭発表では研究背景、研究結果、考察が明確に発表され、本研究によって博士の学位取得に値する新規性と独自性を持った研究成果が遂行されたことを確認した。また口頭試問においても、適切な質疑応答ができており、博士の学位取得に十分な高い専門知識、研究遂行能力を身に着けていることが確認できたため、合格と判定した。