

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Studies on transcriptional regulation of GTP cyclohydrolase I and catalytic mechanism of sepiapterin reductase
著者(和文)	梁宇
Author(English)	Yu Liang
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9400号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:一瀬 宏,林 宣宏,村上 聡,梶原 将,有坂 文雄,清尾 康志
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9400号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第		号	学位申請者氏名		梁 宇	
論文審査 審査員		氏 名		職 名			
	主査	一瀬 宏		教授		有坂 文雄	教授
	審査員	林 宣宏		准教授		清尾 康志	准教授
		梶原 将		教授			
		村上 聡		教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「Studies on transcriptional regulation of GTP cyclohydrolase I and catalytic mechanism of sepiapterin reductase」と題し、4章より構成され英文で書かれている。

第1章「General introduction」では、本研究の背景及び目的について述べている。

第2章「Transcriptional regulation of GCH by LPS: identification of a response element to immune stimuli in the human GTP cyclohydrolase I gene」では、リポ多糖(LPS)によるテトラヒドロbiopterin(BH4)生合成の律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH) の転写制御機構を調べている。まずヒト GCH のプロモーター領域をレポータープラスミドに導入し、マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞へトランスフェクションしたときの LPS 刺激による転写活性の変化を調べている。その結果、GCH のプロモーターのみの場合は LPS の刺激に反応しなかったが、イントロン 1 に存在する約 300 塩基対からなる領域をレポータープラスミドに加えると、転写活性が大幅に誘導されることを見出し、この領域が GCH 遺伝子の LPS 応答を示すエンハンサー領域として、GCH の転写調節にきわめて重要であることを明らかにしている。さらに、RAW264 細胞の核画分を用いたゲルシフトアッセイ実験で、このエンハンサー領域の中の転写因子結合配列を特定している。その結果、エンハンサー領域内に存在する Ets コンセンサス配列と C/EBP コンセンサス配列に特異的タンパク質が結合していることを見出している。さらに、supershift アッセイ、クロマチン免疫沈澱法、RNA interference といった実験手法を用いて、この DNA 領域と結合する転写因子を調べている。その結果、転写因子 C/EBP β がこのエンハンサー領域に結合する転写因子の一つであることを明らかにしている。以上の結果から、LPS 刺激による GCH 遺伝子の発現誘導は、イントロン 1 に存在するエンハンサー配列に C/EBP β 等の転写因子が結合することにより制御されることを結論している。

第3章「Catalytic mechanism of sepiapterin reductase」では、BH4 生合成反応の最後のステップであるセピアプテリン還元酵素(SPR)の酵素反応機構について、生化学的解析を行った結果について述べている。まず、イオン交換カラムと電気化学検出器を用いてテトラヒドロ型プテリン化合物を分離検出するシステムを確立している。次に、SPR の酵素反応機構を解析するため、酵素活性に重要な 157 番目のセリン残基と 170 番目のチロシン残基に変異を導入したヒト SPR 変異体タンパク質(hSPR-S157D と hSPR-Y170V) の発現と精製を行い、これらの変異体の酵素活性を *in vitro* で野生型ヒト SPR と比較検討している。まず、野生型 SPR は天然基質 6-pyruvoyl-tetrahydropterin のプテリン側鎖にある二つのカルボニル基を両方とも還元できるが、hSPR-Y170V は 1' 位のカルボニル基のみを還元すること、一方、hSPR-S157D は還元酵素活性を示さないことを見出している。次に、基質として 6-(1'-oxo-2'-hydroxypropyl)-tetrahydropterin を用いると、野生型 hSPR では 1' 位のカルボニル基を還元できるが、hSPR-Y170V と hSPR-S157D は還元できないことを示している。さらに、野生型 SPR はこの化合物側鎖の 1' 位のカルボニル基を 2' 位に転移させるイソメラーゼ活性を、弱アルカリ性 NADP 存在下で示すが、hSPR-Y170V と hSPR-S157D はこのイソメラーゼ活性を示さないことも見出している。最後に、これらの結果をまとめて、SPR の触媒作用における 157 番目のセリンと 170 番目のチロシンの役割と SPR 酵素反応メカニズムについて述べている。

第4章「Conclusion」では、本研究の結論と意義をまとめ、今後の展望について述べている。

以上を要するに、本論文は LPS 刺激による GCH の転写制御機構を明らかにし、さらに、SPR の酵素反応機構を分子レベルで詳細に検討している。これらの結果は、生体内における BH4 代謝の理解を一層深めるものであり、理学的貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。