

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	コンドロイチン硫酸の代謝に関わる酵素のin vitroでの生化学的研究
Title(English)	
著者(和文)	高島惇
Author(English)	Makoto Takashima
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11685号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,豊田 真司,植草 秀裕,工藤 史貴,大森 建
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11685号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	物質科学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 理学 ）
学生氏名： Student's Name	高島 惇		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	江口 正	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

コンドロイチン硫酸 (CS) は、D-グルクロン酸(GlcA)と N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が繰り返し結合した硫酸化多糖である。CS は、硫酸基の位置や数の違いによって異なる生物学的機能を有する。本研究では CS の代謝に関わる酵素の *in vitro* で生化学的研究を行った。

まず、CS の生成において、コンドロイチンの GalNAc の 4 位への硫酸基転移反応を触媒する酵素である Chondroitin 4-O- sulfotransferase 1 (C4ST-1)の *in vitro* における生化学的な研究に取り組んだ。真核生物の多くの硫酸基転移酵素と同様に、C4ST-1 は N 型糖鎖を有する。その糖鎖が C4ST-1 の活性と安定性に重要な役割を果たす。大腸菌発現 C4ST-1 は糖鎖未修飾体であるために活性が弱く、C4ST-1 の発現は糖鎖修飾可能な発現系（哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母 等）が用いられてきた。本研究では、高活性な糖鎖未修飾 C4ST-1 の取得を目指し、大腸菌発現系での C4ST-1 発現検討とその特性解析に取り組んだ。初めに、C4ST-1 の大腸菌発現を低温培養条件下で検討したが、活性を有する C4ST-1 を取得することはできなかった。そこで、タンパク質のフォールディング形成を担うシャペロンタンパク質である trigger factor と融合させた C4ST-1 (TF-C4ST-1) の発現を行った。その結果、TF-C4ST-1 が活性を有することが分かった。次に、TF-C4ST-1 の至適反応条件を検討し、TF-C4ST-1 の至適 pH が糖鎖修飾体の C4ST-1 とほぼ一致すること、至適温度は 25°C~30°C であり糖鎖修飾体の C4ST-1 よりも低いことを明らかにした。酵素反応速度論的解析の結果、TF-C4ST-1 の k_{cat}/K_m は、糖鎖修飾体の C4ST-1 のその約 60%であった。TF-C4ST-1 を用いて、コンドロイチンを基質とした酵素反応を 10 mg スケールにて行った結果、GalNAc の 4 位がほぼ 100%硫酸化された Chondroitin 4-O-sulfate (C4S)が生成した。これらの結果から、TF は糖鎖の代わりに C4ST-1 の活性と安定性に寄与していること、TF-C4ST-1 が C4S の製造に足る十分な活性を有することを明らかにした。

次に、CS の代謝において分解反応を触媒する Chondroitin sulfate ABC endolyase (cABC-I)の基質特異性の解明に取り組んだ。cABC-I は、*Proteus vulgaris* が生産する酵素であり、CS が有するグリコシド結合を β -脱離反応によって切断する。本研究では、cABC-I の基質特異性を明らかにするために構造均一性が高い基質を用いた反応解析および cABC-I と反応生成物の複合体の結晶構造解析に取り組んだ。*P. vulgaris* から精製した cABC-I を用いて、分子量が 8~64 kDa の Chondroitin 6-O-sulfate (C6S) を基質とした酵素反応を行った結果、C6S の分子量の増加に伴って酵素反応速度が低下した。そこで、分子量を同等に調整した硫酸化構造が異なる CS を用いて cABC-I の反応性を比較した。その結果、反応性は C4S > C6S > Chondroitin 4,6-O-sulfate \approx Chondroitin 2,6-O-sulfate であることが明らかとなった。また、各 CS の反応生成物の解析を行った結果、C4S または C6S の分解物である Δ Di-4S および Δ Di-6S が主要生成物であることが分かった。さらに、構造均一性が高い CS 分子として C4S ユニットまたは C6S ユニットの約 90%、非硫酸化ユニットを約 10%含む CS (hC4S、hC6S) を酵素合成し、酵素反応速度論的解析を行った。その結果、hC4S と hC6S の k_{cat}/K_m は、それぞれ 964 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ と 599 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ であった。次に、cABC-I と酵素反応生成物 (Δ Di-4S、 Δ Di-6S、 Δ Di-OS) との複合体の結晶構造解析を行った。その結果、Arg500 が Δ Di-4S または Δ Di-6S の硫酸基と塩橋を形成すること、 Δ Di-4S の硫酸基の方が Δ Di-6S の硫酸基よりも Arg500 と近接していること、が明らかとなった。さらに、ドッキング解析を行ったところ、サブサイト-1 の GalNAc の 4 位硫酸基は His561 によって、GalNAc の 6 位硫酸基は Arg560 と His561 によって認識されること、サブサイト-1 またはサブサイト+2 の GalNAc の 6 位硫酸基が酸性のアミノ酸残基である Asp490 または Asp658 と静電的反発を起こすこと、が示唆された。以上の実験結果から、cABC-I は C4S に対する特異性が最も高いと考えられる。

以上、本研究では C4ST-1 の *in vitro* で生化学的研究を通して、シャペロンを活用した高活性な糖鎖未修飾 C4ST-1 の調製法を開発し、その特性を明らかにした。また、cABC-I の *in vitro* で生化学的研究によって古くから未解明であった cABC-I の基質認識機構を明らかにした。本研究によって得られた成果は、CS の生体内における機能を理解する上で重要な知見となる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	物質科学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	高島 惇		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	江口 正	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Chondroitin sulfate (CS) is a sulfated polysaccharide composed of D-glucuronic acid (GlcA) and *N*-acetyl galactosamine (GalNAc). CS has various biological functions depending on the position and number of sulfate groups. In this thesis, I focused on the enzyme involved in the metabolism of CS and conducted the biochemical studies *in vitro*.

First, the *in vitro* biochemical study of chondroitin 4-*O*-sulfotransferase 1 (C4ST-1), which is an enzyme that transfers sulfate to the position 4 of GalNAc in the biosynthesis of Chondroitin 4-*O*-sulfate (C4S), are described. Since *N*-glycans of C4ST-1 are essential for enzyme activity and stability, recombinant C4ST-1 has been prepared in eukaryotic expression systems. To express C4ST-1 in *E. coli*, trigger factor (TF), a chaperone protein that is induced at a low temperature, was fused with C4ST-1. As a result, TF fused C4ST-1 (TF-C4ST-1) possessed sulfotransferase activity. The optimal pH of TF-C4ST-1 was the almost the same as that of *N*-glycosylated C4ST-1, and the optimal temperature of TF-C4ST-1 was lower than that of *N*-glycosylated C4ST-1. Michaelis-Menten kinetic analysis was subsequently performed, and the k_{cat}/K_m of TF-C4ST-1 was approximately 60% of that of rhC4ST-1 expressed in eukaryotic expression system. These results suggested that TF contributes to the enzyme stability and activity by promoting proper folding instead of *N*-glycans.

Second, the substrate specificity analysis of Chondroitin sulfate ABC endolyase (cABC-I) was investigated. cABC-I cleaves the glycosidic linkage of CS by β -elimination. The enzyme reaction of cABC-I purified from *Proteus vulgaris* was conducted with CS. As a result, cABC-I showed the high reactivity to Chondroitin 4-*O*-sulfate (C4S) and Chondroitin 6-*O*-sulfate (C6S) rather than other CS, and the k_{cat}/K_m value of cABC-I for C4S was higher than that for C6S. Next, the crystal structures of cABC-I in complex with CS disaccharides were determined, and the crystallographic data in combination with molecular docking data were analyzed. Arg500 interacts with 4-*O*-sulfated and 6-*O*-sulfated GalNAc residues. The distance between Arg500 and the 4-*O*-sulfate group was shorter than that between Arg500 and the 6-*O*-sulfated group. Moreover, it is likely that the 6-*O*-sulfated group causes electrostatic repulsion with the nearby Asp490 and Asp658. From these results, cABC-I has the highest affinity for the C4S-rich molecule among all CS structures.

This study solved long-standing problems of CS metabolizing enzymes: the development of a highly active C4ST-1 without *N*-glycans preparation method and the clarification of substrate specificity of cABC-I.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).