

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

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	高島 惇	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	江口 正	教授	大森 建	准教授
	審査員	豊田 真司	教授		
		植草 秀裕	准教授		
工藤 史貴		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し、以下の4章から構成されている。

第1章「序論」では、本研究の背景となるコンドロイチン硫酸 (CS) に関する研究の概要を述べている。生体内において、硫酸基の数や位置によりタンパク質との相互作用が制御されていることに着目し、CSの代謝に関わる酵素の機能解明の重要性について述べている。

第2章「コンドロイチン硫酸の生合成における硫酸基転移反応を触媒する Chondroitin 4-O- sulfotransferase 1 (C4ST-1) の*in vitro*での生化学的研究」では、関節における恒常性維持を担う Chondroitin-4-O-sulfate (C4S) の生合成について概観し、その生合成の鍵酵素であるC4ST-1において重要な機能を担う糖鎖が付加されていない高活性なC4ST-1の発現法を開発し、さらにその特性を明らかにしたことについて述べている。まず、シヤペロンタンパク質である Trigger Factor (TF)と融合させたC4ST-1 (TF-C4ST-1) を大腸菌で発現させた結果、TF-C4ST-1が硫酸基転移活性を有することを明らかにしている。TF-C4ST-1の至適反応条件は、pHは真核細胞で発現させたC4ST-1とほぼ一致すること、温度は真核生物で発現させたC4ST-1よりも低いことを明らかにしている。さらに、酵素反応速度論解析の結果からTF-C4ST-1は、真核細胞で発現させたC4ST-1と遜色ない活性を有すると述べている。また、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スケールで行い、反応生成物をNMRおよびHPLCによって解析した結果から、GalNAcの4位がほぼ100%硫酸化されたC4Sが生成したことを明らかにしている。以上の結果より、TFが糖鎖の代わりにC4ST-1の活性の改善に貢献し、糖鎖修飾がなされていない高活性なC4ST-1の発現法を開発したと結論づけている。

第3章「コンドロイチン硫酸の代謝における分解反応を触媒する Chondroitin sulfate ABC endolyase (cABC-I) の*in vitro*での生化学的研究」では、*Proteus vulgaris*が生産するcABC-Iの基質認識機構を提唱したことについて述べている。まず、*P. vulgaris*から精製したcABC-Iを用いて、分子量が異なる Chondroitin 6-O-sulfate (C6S) を基質とした酵素反応を行い、C6Sの分子量の増加に伴って酵素反応速度が低下することを明らかにしている。さらに硫酸化構造が異なるCSの分子量を同等に調製し、cABC-Iと反応させることによりC4SおよびC6Sに対する反応性が高いことを明らかにしている。構造均一性が高いCS分子として、分子量が同等かつ、C4SユニットまたはC6Sユニットを約90%、非硫酸化ユニットを約10%含むCS (hC4S、hC6S) を酵素合成し、酵素反応速度論解析を行いhC4Sに対する特異性がより高いと述べている。さらに、cABC-Iと酵素反応生成物 (Δ Di-4Sまたは Δ Di-6S) との複合体の結晶構造解析およびC4S四糖またはC6S四糖とのドッキング解析を行った結果から、サブサイト+2のN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の硫酸基がアルギニン500と塩橋を形成すること、4位の硫酸基の方が6位の硫酸基よりもアルギニン500と近接していること、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アスパラギン酸490またはアスパラギン酸658と静電的反発を起こす可能性があることを述べている。以上の結果より、cABC-IはC4Sに対する特異性が最も高いと結論づけている。

第4章「総括」では、本研究で得られた知見を総括するとともに、本研究で得られた結果に基づいてCSの代謝に関わる酵素に関する研究について展望している。

以上要するに、本論文は高活性なC4ST-1の発現法の開発とcABC-Iの基質認識機構を解明するとともに、普遍的に存在するCSの代謝に関わる酵素の新たな一面を示したものである。これらの知見は生物有機化学ならびに生化学の分野において重要な知見であり、理学上の貢献は大きい。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチポジトリ (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。