

## 学位論文の内容の要旨

専攻	社会環境病態医学	部門	中毒・薬物代謝学
学籍番号	13D761	氏名	山本高成
論文題目	Characterization of a recombinant <i>Bacteroides fragilis</i> sialidase expressed in <i>Escherichia coli</i>		
(論文要旨)			
<p>【目的】 <i>Bacteroides fragilis</i> (BF) は腸管に常在する偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、<i>Bacteroides</i> 属の中で最も病原性が強い。また、多数の糖加水分解酵素遺伝子を有しており、宿主腸粘膜に存在する多糖を分解利用している。シアル酸 (N-アセチルノイラミン酸) は3種の結合様式 (<math>\alpha</math>2,3、<math>\alpha</math>2,6、<math>\alpha</math>2,8) で糖鎖の非還元末端に結合する酸性糖である。宿主由来の糖鎖を効率良く利用するためには、シアリダーゼによるシアル酸の遊離が必要となるため、本酵素はBFの病原因子の1つと考えられている。BF SBT3182株の天然シアリダーゼは翻訳後糖修飾を受けており <math>\alpha</math>2,8 結合型シアル酸に親和性が高いと報告されているが、大腸菌で発現させたリコンビナント BF シアリダーゼの特性は検証されていない。本研究では敗血症患者から分離された BF YCH46 株の 60 kDa シアリダーゼ (NanH1) を大腸菌で大量発現させ、リコンビナント NanH1 (rNanH1) を精製し、その酵素特性を調べた。</p> <p>【方法・結果】 BF YCH46 株のゲノムには4個の <i>nanH</i> 遺伝子パラログが同定されている (<i>nanH1-nanH4</i>)。NanH1 とのアミノ酸の相同性は NanH2 で 78.4%、NanH3 で 23.5%、NanH4 で 40.4%であった。<i>nanH1</i> は <i>sgu</i> (sialoglycoconjugate utilization) locus に位置し、標準培養条件で発現しているが、<i>nanH2-nanH4</i> の mRNA レベルは <i>nanH1</i> に比べて非常に低い。N 末端アミノ酸配列の比較から、NanH1 が BF SBT3182 株の天然シアリダーゼに相当すると考えられた。<i>nanH1</i> 遺伝子の PCR 増幅を行い、6個の histidine 残基 (6 x His-Tag) が C 末端に付加された rNanH1 が産生されるように overexpression vector pET-28b (+) の NdeI-XhoI 部位に増幅産物を挿入し、プラスミド pFR466 を作製した。pFR466 で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) の培養液に 1 mM IPTG を加え、3時間培養した。菌体を超音波破碎した後、遠心分離して可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれの画分のシアリダーゼ活性を調べたところ、可溶性画分では 1.50、不溶性画分では 2.13 <math>\mu</math>mol/min/mg であった。SDS-PAGE を行ったところ rNanH1 の大部分が不溶性画分で封入体を形成していた。rNanH1 の活性に影響を及ぼす金属イオンを検索したところ、<math>Ca^{2+}</math>、<math>Mn^{2+}</math>、<math>Mg^{2+}</math> の添加により活性が上昇した。不溶性画分を 10 mM Tris-HCl (pH7.0)、100 mM NaCl、8 M urea (変性剤) を用いて可溶化し、Ni-NTA column を用いて変性シアリダーゼを精製した。SDS-PAGE で 60 kDa 付近の単一バンドを確認したが、変性条件下で精製したシアリダーゼは活性を示さなかった。そこで、10 mM Tris-HCl (pH7.0)、100 mM NaCl、100 mM <math>CaCl_2</math>、1 mM dithiothreitol、50 mM L-arginine で透析を行うことにより urea および imidazole を除去し、変性シアリダーゼの refolding を試みた。4-MU-NANA を基質とし、refolding 後のシアリダーゼの比活性を調べたところ、6.16 <math>\mu</math>mol/min/mg の活性が認められた。この精製酵素を用い、rNanH1 の酵素特性を調べた結果、至適 pH は 5.0-5.5、<math>K_m</math> 値は 0.055 M、<math>V_{max}</math> 値は 1.05 nmol/min であった。シアリダーゼ阻害剤の Neu5Ac2en を用いた場合の <math>K_i</math> 値は 0.032 mM であった。rNanH1 は、<math>\alpha</math>2,3 および <math>\alpha</math>2,6 結合したシアル酸よりも <math>\alpha</math>2,8 結合したシアル酸に高い親和性を示した。生体分子に対する基質特異性は mucin &gt; fetuin=transferrin &gt; <math>\alpha</math>1-acid glycoprotein の順に高く、BF SBT3182 株の天然シアリダーゼと類似した特性を示した。これらの結果から、BF シアリダーゼの翻訳後糖修飾は基質特異性には影響しないと考えられた。</p> <p>【結論】 本研究で示した方法及び結果は、他の BF シアリダーゼアイソエンザイムのリコンビナントタンパク質の精製や酵素特性の比較解析に有用である。</p>			

掲 載 誌 名	Anaerobe		第 50 卷
掲 載 年 月	2018年 2月	出版社(等)名	Elsevier
Peer Review	Ⓞ		無

(備考) 論文要旨は、日本語で1,500字以内にまとめてください。