

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	ペトロス キングストーン チグエチヨカ
題 目	ティラピアシアリダーゼの生化学的解析とエドワードジェラタルダ感染におけるその意義 (Biochemical Characterization of Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Sialidases and their Significance in <i>Edwardsiella tarda</i> Infection)

シアリダーゼは糖タンパクや糖脂質の非還元末端よりシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素である。最近、哺乳類シアリダーゼが種々の疾病や発生に深く関与していることが明らかとなってきたが、その一方で魚類におけるシアリダーゼの機能についてはよくわかっていない。本研究では、世界中で広く養殖されているティラピアを材料とし、魚類シアリダーゼの性状解析とその意義を明らかにすることを目的とした。ティラピアゲノムの解析により、シアリダーゼのホモログとして2つの *neu1* (*neu1a* および *neu1b*)、5つの *neu3* (*neu3a*, *neu3b*, *neu3c*, *neu3d* および *neu3e*) および1つの *neu4* の計8遺伝子が同定された。実際にティラピア脳で発現が確認されたのはこのうち6遺伝子であり、残りの2つ (*neu3b* および *neu3c*) は偽遺伝子だと推察された。この6種類のシアリダーゼについて遺伝子クローニング、およびそのリコンビナントタンパクの性状解析を行った。その結果、それぞれに Asp-Box や RIP モチーフなどが保存されている一方で、その酵素学的性状は大きく異なっていることが明らかとなった。*Neu1a* はリソソームに局在し MU-NANA、3-シアロオリゴ糖およびコロミン酸を良い基質とするのに対し、*Neu1b* は MU-NANA のみを基質としていた。一方、*Neu3a* が形質膜に局在するガングリオシドシアリダーゼであったのに対し、*Neu3d* および *Neu3e* では優位な酵素活性は認められなかった。*Neu4* は3-および6-シアロオリゴ糖を良く切断するが、核にその局在が認められるなど哺乳類やメダカとは異なる特性を示した。

次にこれらシアリダーゼの魚類細胞における意義を明らかにするため、種々の解析を行ったところ、これらが魚病バクテリア *Edwardsiella tarda* 感染に関与していることを見出した。魚類 GAKS 細胞に対する *E. tarda* の感染実験を行ったところ、*Neu1a* および *Neu4* 過剰発現 GAKS 細胞において *E. tarda* の感染が上昇した。一方、*Neu3a* 過剰に細胞においてはその感染が逆に抑制されていた。その感染制御には宿主細胞のシアル酸脱離が関与していることが示唆されたため、シアリダーゼ阻害剤 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid (DANA) で *E. tarda* を前処理して感染実験を行ったところ、その感染が有意に抑制され、*E. tarda* の持つ脱シアリル化酵素 *NanA* が感染に重要であることが明らかとなった。そこで *NanA* のクローニングおよびリコンビナントタンパクの性状解析を行ったところ、*NanA* は3-シアロオリゴ糖や糖タンパクを良く切断していた。この組換え *NanA* を GAKS 細胞に曝露すると *E. tarda* の感染が促進し、さらに GAKS 細胞表面の糖タンパクの Sia2-3 結合が良く切断されていた。*Neu1* および *Neu4* の過剰発現細胞においても同様の傾向が認められたことから、これら魚類シアリダーゼによる *E. tarda* 感染の助長機構はシアロ糖タンパクの脱シアリル化によるものだと考えられた。本研究ではティラピアにおける脱シアリル化機構、および脱シアリル化酵素の魚類における意義として *E. tarda* 感染制御について明らかにした。糖鎖は生理状態により構造が変化することが知られていることから、本研究の成果は魚類における生理状態の新規指標開発に繋がると期待される。