

## 学位論文審査結果の要旨

|  |  |           |       |
|--|--|-----------|-------|
| 学位申請者<br>氏名  | Petros Kingstone Chigwechokha<br>連研第849号   |           |       |
| 審査委員   | 主査   | 鹿児島大学 教授  | 板倉 隆夫 |
|  | 副査   | 鹿児島大学 准教授 | 塩崎 一弘 |
|  | 副査   | 琉球大学 教授   | 屋 宏典  |
|  | 副査   | 鹿児島大学 准教授 | 小松 正治 |
|  | 副査   | 鹿児島大学 教授  | 安部 淳一 |
| 審査協力者  | 印  |           |       |
| 題目   | ティラピアシアリダーゼの生化学的解析と<br>エドワードジェラタルダ感染におけるその意義<br>(Biochemical characterization of tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )<br>sialidases and their significance in <i>Edwardsiella tarda</i> infection) |           |       |
| <p>本研究はティラピアの糖鎖分解酵素の一つであるシアリダーゼについて、その酵素学的特性と魚病バクテリア <i>Edwardsiella tarda</i> 感染に対する糖鎖制御機構について明らかにしたものである。シアル酸は複合糖質の非還元末端に位置する酸性糖であり、哺乳類ではシアル酸を含む糖鎖の量的・質的変動が様々な生理現象に関与する事が報告されている。特に細胞表面の糖鎖は、多くのバクテリアやウイルスの認識分子であることから、宿主の糖鎖構造の制御因子解析は感染予防の点からも重要であると考えられる。しかし魚類においては、微生物感染時における宿主細胞の糖鎖の意義、およびその制御因子に関する知見は少ない。</p> <p>そこでまず本研究では、シアル酸を糖鎖より切り離す酵素であるシアリダーゼに着目し、ティラピアにおける脱シアリル化機構を明らかにすることを試みた。ゲノム解析を行ったところ、2つの <i>neul</i> (<i>neula</i>, <i>neulb</i>)、5つの <i>neu3</i> (<i>neu3a</i>, <i>neu3b</i>, <i>neu3c</i>, <i>neu3d</i>, <i>neu3e</i>, <i>neu3e</i>)、1つの <i>neu4</i> の計8つのシアリダーゼ遺伝子の存在が明らかとなった。そこでティラピア組織由来RNAを用い、これら遺伝子のクローニングを行ったところ、偽遺伝子である <i>neu3b</i> と <i>neu3c</i> を除く6つの遺伝子の発現が認められ、それらの遺伝子および演繹アミノ酸配列を決定した。</p> |  |           |       |

Real-time PCRにより各組織における発現量を解析したところ、これらシアリダーゼのmRNA組織発現パターンはそれぞれ異なっているが、肝臓では共通して高い発現が認められた。

次にこれらシアリダーゼの生理的役割を明らかにするため、培養細胞を用いて組換えタンパクの調製を行い、それらの性状について解析を行った。その結果、Neu1aはpH4.5を至適pHとし、グリオシドやオリゴ糖、人工基質であるMU-NANAを良い基質とするが、Neu1bはMU-NANAのみに特異性を示した。Neu3のアイソフォームはNeu3aにのみ有意な酵素活性が認められ、その活性はグリオシドに特異的であった。またNeu4シアリダーゼの至適pHは4.0~7.0とかなり広く、オリゴ糖を良い基質としている事が明らかとなった。また免疫染色の結果から、Neu1aはリソソーム、Neu3aは形質膜、Neu4は核とリソソームにその局在が認められた。以上の結果から、ティラピアにおける脱シアリル化の機構が明らかとなり、Neu4に関しては魚類間での性状があまり保存されていない事が分かった。

次にこれらシアリダーゼの*E.tarda*感染への影響について検討した。ティラピアシアリダーゼを遺伝子導入したGAKS細胞に*E.tarda*を曝露したところ、コントロール細胞に比べ、Neu1およびNeu4導入細胞で*E.tarda*の感染が増加し、一方でNeu3導入細胞ではその感染が低下していた。ところで*E.tarda*には脱シアリル化酵素NanAが存在することが知られているが、感染におけるその意義については不明であった。そこでティラピアシアリダーゼが*E.tarda*感染に作用する理由を明らかにするため、*E.tarda*の糖鎖を介した感染機構の解明を試みた。*E.tarda*に非特異的シアリダーゼ阻害剤DANAを曝露するとGAKS細胞への感染が低下することから、NanAシアリダーゼが感染に重要であることが見いだされた。次に*nanA*遺伝子をクローニングし、さらに組換えタンパクを調製して解析したところ、試験管内においてNanAシアリダーゼは $\alpha$ 2-3結合のシアル酸を良く切断することが明らかとなった。そこでGAKS細胞にNanAを曝露し、細胞表面の糖鎖構造の変化について解析したところ、 $\alpha$ 2-3結合のシアル酸を持つ糖タンパクが減少していることが見いだされた。脱シアリル化が*E.tarda*感染に重要な理由として、シアル酸のマイナスの電荷がバクテリアの細胞接着を阻害しているからであり、感染のためには脱シアリル化が必要であると示唆された。また*E.tarda*は脱シアリル化された糖鎖のマンノースとN-アセチルグルコサミンに結合することが明らかとなった。そこで、ティラピアシアリダーゼNeu1aおよびNeu3を導入した細胞における糖鎖構造を解析したところ、 $\alpha$ 2-3結合のシアロ糖タンパクが減少していた。以上の結果から、これら遺伝子導入細胞において*E.tarda*の感染が促進するのは、 $\alpha$ 2-3シアロ糖タンパクをNanAとティラピアシアリダーゼが競合することによるからであることが明らかとなった。

以上のように、本研究は、ティラピアにおける脱シアリル化の機構を明らかにし、その糖鎖構造の制御が*E.tarda*感染に与える影響について示した価値あるものであると評価された。