




## 学位論文審査の結果の要旨

平成 30 年 11 月 15 日

審査委員	主査	神鳥 成弘 		
	副主査	中村 隆範 		
	副主査	上田 夏生 		
願出者	専攻	社会環境病態医学	分野	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>			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 ・ <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			
<p>〔要旨〕</p> <p>本研究に関する学位論文審査委員会は平成30年11月15日に行われた。本研究は、病原性腸内細菌である <i>Bacteroides fragilis</i> 由来の糖鎖末端シアル酸を遊離させる酵素（シアリダーゼ）に関するものである。<i>Bacteroides fragilis</i> は、4つのシアリダーゼ（NanH1, NanH2, NanH3, NanH4）の遺伝子を持つと予想され、これらのうち NanH1 が天然シアリダーゼに相当すると考えられる。天然 NanH1 は翻訳語修飾を受け糖鎖が付加されており、大量に得ることは難しい。本研究では、大腸菌で大量発現させたリコンビナント NanH1（rNanH1）を精製し、その酵素特性を調べている。大腸菌での発現では、rNanH1 が封入体を形成し不溶性画分として得られたので、尿素を用いて可溶化・精製した後、アルギニン存在下で透析・リフォールディングを行い、精製酵素を得ることに成功している。精製酵素を用い、金属イオンの活性に及ぼす影響、pH と酵素活性との関係、シアル酸のグルコシド結合様式に対する基質特異性等について詳細に調べている。その結果、rNanH1 はカルシウムイオンの添加で活性が上がり鉄イオンにより活性が低下すること、rNanH1 の至適 pH は 5.0-5.5 であること、rNanH1 は <math>\alpha</math> 2-3, <math>\alpha</math> 2-4, <math>\alpha</math> 2-8 グルコシド結合のシアル酸に作用し、<math>\alpha</math> 2-8 グルコシド結合に対して一番高い親和性を示すことを明らかにした。これらは天然の NanH1 の酵素特性と類似していた。以上の結果より、他の <i>Bacteroides fragilis</i> シアリダーゼにおいても、大腸菌によるリコンビナント酵素は、酵素特性の比較解析に有用であると結論づけている。</p>				

本研究で得られた成果は、*Bacteroides fragilis* シアリダーゼNanH1の大腸菌によるリコンビナントrNanH1を得ることに成功したこと、その詳細な酵素特性を行いリコンビナント酵素による解析が有用であると示したこと、に意義があり学術的価値が高い。委員会の合議により、本論文は博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては、

1. リフォールディングが不十分なため、酵素活性が低い可能性はないのか。
2. 糖鎖修飾した酵素のリコンビナント酵素を調整することはできないのか。
3. カルシウム等を必要とする金属酵素であることを示す実験事実はあるのか。
4. 僅かに発現している可溶性の酵素を精製できないのか。
5. 腸内環境でシアリダーゼが果たしている役割は何か。
6. 活性測定において、多糖と二糖を基質としているが、これらの比較は妥当か。
7. バイオインフォマティクス的手法を用いて詳しい情報が得られるのではないか。

などについて多数の質問が行われた。申請者はいずれにも明確に応答し、博士（医学）の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

掲載誌名	Anaerobe. 第50巻, 69-75ページ.		
(公表予定) 掲載年月	2018年 4月	出版社(等)名	Elsevier

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。