

Title	Analysis of recombinant human Saposin A expressed by <i>Pichia pastoris</i>
Author(s)	山田, 穰
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46174
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	山田 穂
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19710 号
学位授与年月日	平成 17 年 4 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Analysis of recombinant human Saposin A expressed by <i>Pichia pastoris</i> (酵母 <i>Pichia pastoris</i> を用いて発現させた組換えヒトサポシン A の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 大菌 恵一 (副査) 教授 内山 安男 教授 佐古田三郎

論文内容の要旨

[目的]

生体内におけるスフィンゴ脂質は、リソソームに存在する一連の加水分解酵素の作用によって分解される。これらの酵素のいくつかには、耐熱性蛋白質であるスフィンゴ脂質活性化蛋白質 (SAP) と呼ばれる活性化因子が存在する。ヒトには 4 種類の相同性の高い蛋白質 SAP-A、B、C、D が存年する。

SAP-A は SAP-C と同様ガラクトセブロンダーゼおよびグルコセブロンダーゼの活性を促進することが知られている。SAP-A ノックアウトマウスではヒトのガラクトセブロンダーゼ欠損と同様な病態が認められる。このことは SAP-A がガラクトセブロンダーゼの活性化に重要な役割を果たしていることを示している。

今回我々は生化学的研究の目的にて、*Pichia pastoris* によるヒト SAP-A の発現系を構築した。SAP-A は分子量約 16 kDa の糖蛋白質で、分子内に 3 組のジスルフィド結合を持つ。本酵母を利用することで、ジスルフィド結合の形成などの翻訳後修飾が期待される。

[方法ならびに成績]

SAP-A の cDNA はヒト小腸 cDNA ライブラリーより PCR 法によりクローニングした。SAP-A の N 末端に α 分泌因子、C 末端にヒスチジンタグを付加するように設計されたベクター pPIC9K-SAPA を構築した。このベクターを制限酵素で直鎖状に切断した後、電気穿孔法にて *Pichia pastoris* GS115 株へ導入した。ヒスチジン要求性の喪失及び G418 に対する耐性獲得により酵母染色体上に SAP-A 遺伝子が挿入された組換え体を選択した。

この組換え体を 1% のメタノールを含む BMMY 培地で 6 日間培養し、発現誘導を行った。培養上清を Tricine SDS-PAGE で確認したところ 18 kDa と 10 kDa の 2 種類の蛋白が分泌されていた。発現蛋白質の確認のために、さらにアミノ酸シーケンズ、glycopeptidase F による糖鎖の切断、Mass spectrometry を行った。その結果、発現蛋白質の分子量の違いは糖鎖付加の有無によることがわかった。

SAP-A の精製は、Ni-NTA カラム、Con-A カラム、逆相クロマトグラフィーを用いて行った。最終的に 500 ml の培養上清から糖鎖の付加しない SAP-A が約 60 mg 得られた。

精製した SAP-A は、フォスファチジルセリン存在下でガラクトセレブロシダーゼの活性を上昇させたが、糖鎖の付加した SAP-A の方が活性上昇効果は高かった。また、グルコセレブロシダーゼに対する活性上昇効果についても確認できたが糖鎖の有無による差は認められなかった。

[総括]

我々が用いた酵母による発現系は、活性を持った SAP-A 蛋白質を培養上清中に大量に分泌させることができ、非常に有用な方法であった。

今回得られた SAP-A 蛋白質はガラクトセレブロシダーゼとグルコセレブロシダーゼの活性を上昇させたことから正しい折りたたみ構造を取っていると考えられる。生体内では SAP-A は、プロサポシンの分解によって生成されるが、我々の発現系では SAP-A の配列のみで正しく折りたたみ構造を取った蛋白が得られた。SAP-A 蛋白質の正しいフォールディングのためにはプロサポシンという前駆体を経る必要はないと考えられた。

論文審査の結果の要旨

神経変性疾患のクラッペ病はリソソーム酵素であるガラクトセレブロシダーゼの欠損症である。この酵素は、髄鞘の主要糖脂質であるガラクトセレブロシドを加水分解するが、この時に SAP-A と呼ばれる非酵素性の活性化蛋白質を必要とする。酵母 *Pichia pastoris* によるヒト SAP-A の発現系を構築し、500 ml の培養上清から約 60 mg の SAP-A を得ることができ、非常に効率的であった。この SAP-A は標的リソソーム酵素であるガラクトセレブロシダーゼおよびグルコセレブロシダーゼの活性を上昇させた。また、SAP-A はグルコセレブロシダーゼの熱変性を抑制することを示した。このリコンビナント SAP-A によってクラッペ病患者のガラクトセレブロシダーゼの残存活性を上昇させることができれば治療へつながる可能性がある。以上よりこの研究は学位の授与に値すると考えられる。