

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	高度好塩性古細菌 <i>Haloarcula japonica</i> が生産する多分岐グルカンとその生合成に關与する GlgC ホモログの研究
Title(English)	
著者(和文)	末田 凜
Author(English)	Rin Sueda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12039号, 授与年月日:2021年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:八波 利恵,和地 正明,福居 俊昭,蒲池 利章,平沢 敬,中村 聡
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12039号, Conferred date:2021/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

【論文要約】

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* が生産する多分岐グルカンとその生合成に関与する GlgC ホモログの研究

生命理工学院 八波研究室 末田凜

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* 由来枝作り酵素 MalA は高塩濃度下で、新規多分岐グルカンを合成した。MalA は菌体内酵素であるため、*Ha. japonica* 菌体内にも同様な“多分岐グルカン”が存在すること示唆された。しかしながら、*Ha. japonica* 野生株の生産する多分岐グルカンの構造は未知である。本研究では、グルカンの抽出方法とその解析方法を確立し、多分岐グルカンの解析を行った。また、多分岐グルカンの前駆体合成を担うと推測される、*c1183* 遺伝子がコードする GlgC ホモログについて、親株における発現を行い、組換え酵素の酵素学的性質検討を行った。

Ha. japonica 野生株より多分岐グルカンを抽出し、解析したところ、多分岐グルカンは短鎖の分岐を多くもつことが示唆された。

多分岐グルカン生合成経路を明らかにするため、*Ha. japonica* 由来 GlgC ホモログの組換え酵素の性質検討を行った。*c1183* 遺伝子発現型プラスミドを導入した *Ha. japonica* 形質転換体から細胞質画分を回収し、ニッケル固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供することより、SDS-PAGE において単一タンパク質バンドを示す GlgC ホモログ (HjGlgC) の組換え酵素の精製標品を得た。組換え HjGlgC 精製標品を用い、酵素活性を評価した。すなわち、高塩濃度下でヌクレオチド三リン酸とグルコース-1-リン酸を基質としてヌクレオチド二リン酸グルコースを合成する転移反応を行い、低塩濃度下で反応副産物のピロリン酸に対して無機ピロホスファターゼ処理を行ったのち、遊離した無機リン酸を検出することで、酵素活性を見積もった。その結果、各種ヌクレオチド三リン酸のうち、GTP を基質とした際に最も高い活性を示した。これより、HjGlgC は *Ha. japonica* 菌体内において、“GDP-グルコースピロホスホリラーゼ”として働くことが考えられた。組換え HjGlgC の反応至適塩濃度は 2.60 M KCl および 3.15 M NaCl であり、比活性はそれぞれ 40.4 U/mg および 15.1 U/mg であった。また、0.2 M KCl 以上、1.0 M NaCl 以上の塩存在下において安定であった。

HjGlgC の多分岐グルカン生合成における役割を明らかにするため、HjGlgC をコードする *c1183* 遺伝子の破壊株を調製し、野生株と破壊株が生産するグルカンの解析を行った。その結果、*c1183* 遺伝子が本菌の多分岐グルカン生合成へ関与していると考えられた。