

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 真与

ビフィズス菌のヒト腸管内での定着や増殖を目指して、その代謝機構や増殖因子の研究は世界中で進められている。ビフィズス菌は、母乳に含まれる乳糖以外の希少オリゴ糖に特化した資化経路や、ヒト消化管粘膜のムチン糖タンパク質の糖鎖に対する資化経路を有することが明らかになっている。それらを構成するタンパク質や酵素はヒトとの共進化の過程でビフィズス菌が独自に獲得してきた特有なものが多いが、個々の解析が十分になされていないものもある。本論文は乳児型ビフィズス菌に由来するヒト糖鎖代謝に関わる 2 つの菌体内酵素の構造・機能研究であり、2 章から構成される。

第 1 章では *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 由来の α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (NagBb) の構造機能解析について述べている。X 線結晶構造解析により NagBb のリガンドフリー状態の構造、反応生成物である GalNAc との複合体構造、阻害剤である Gal-NHAc-DNJ との複合体構造、金属に配位される 4 残基の四重変異体の構造を決定することに成功した。NagBb の全体構造は、中心部は GH13 α -アミラーゼファミリーに代表される (α/β)₈-barrel 様構造、N 末側と C 末側はそれぞれ β サンドイッチ構造を取っていた。NagBb は糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase ; GH) ファミリー 129 に属する酵素として、初めて立体構造が明らかになった。反応生成物 GalNAc との複合体構造からは、求核触媒残基 Asp435 と酸/塩基触媒残基 Glu478 が同定された。また、基質認識に関わる残基の変異体の活性測定も行い、スタッキング相互作用により基質認識に関わる Trp398 の重要性も明らかになった。また、GalNAc の *N*-アセチル基の認識を 2 つの水を介して行う金属イオンを擁する金属サイト M1 の存在が見出された。M1 サイトは 3 つの His 残基と 1 つの Asp 残基より構成されており、中心に金属が存在していた。これらの 4 残基を Ala に変異させた四重変異体は活性が著しく低下した。またこの結晶構造は、GalNAc の存在下で結晶化を行ったが、金属とともに GalNAc の電子密度は観察されず、基質認識における金属の重要性が明らかになった。金属種の同定のため、金属イオン添加による活性測定、ICP-MS による金属定量を行い、X 線による金属の異常分散データを測定することにより M1 サイトの金属種がカルシウムイオンであることを同定した。また、NagBb は分子表面に位置し構造安定性に関与すると考えられる金属サイト M2 も有するが、M2 サイトの金属種は ICP-MS による金属定量と X 線による金属の異常分散データにより亜鉛イオンであること

が同定された。以上の結果から、ビフィズス菌由来の GH129 酵素に特有の、金属の関わる反応機構の詳細が明らかになった。

第 2 章では *Bifidobacterium longum* JCM1217 で発見された UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (GalT_{BI}) の構造と機能について述べている。X 線結晶構造解析により GalT_{BI} のリガンドフリー状態の構造、基質の 1 つである UDP-ガラクトースとの複合体構造を決定することに成功した。GalT_{BI} の全体構造は、N 末端に 5 つの α ヘリックスから成る付加ドメイン (Auxiliary 1)、中心部に 2 つの histidine triad 様フォールドドメイン (HIT1、HIT2)、そして周辺部の基質の壁を構成する補助ドメイン (Auxiliary 2) から構成される。UDP-ガラクトースとの複合体構造においては、基質の電子密度は不明瞭であったが、酵素の糖認識に関する示唆が得られた。この周囲の残基の Ala 変異体について活性測定を行い、これらの残基が触媒反応に関わっている可能性が極めて高いことが示された。本構造は *Firmicutes* 門と *Actinobacteria* 門の限られた生物にしか存在しない GalT Class II に属する酵素として初めて得られたものであり、モノマーで機能する GalT における糖認識に関する示唆が初めて得られたことになる。野生型 GalT_{BI} について、酵素学的パラメータを算出し、Gal1P と GalNAc1P に対する K_m をそれぞれ測定した。その結果、GalNAc1P に対する K_m は Gal1P に対する K_m の約 1/50 であり、GalNAc1P に対して高い親和性を示すことが明らかになった。これより GalT_{BI} が GalNAc1P を基質とするように適応していることが示唆され、*N*-アセチル基およびその認識が GalT_{BI} を保有するビフィズス菌の資化において非常に重要であることが示唆された。

以上、本論文は 2 つの乳児型ビフィズス菌由来のヒト糖鎖代謝に関わる酵素の詳細な機能と構造を解明することに成功したものであり、これらの研究成果は学術上・応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。