

審査の結果の要旨

氏名 鹿島 騰真

腸内細菌は宿主が摂取する食物の消化を助け、ヒトの健康に貢献している。中でもビフィズス菌は出生後から腸内に留まり、免疫力向上や病原菌の定着、感染の予防等に寄与する善玉菌の代表格である。ビフィズス菌が生息している小腸下部と大腸には、澱粉などの易消化性糖質はほとんど届かない。ビフィズス菌は宿主や他の細菌が利用しにくいヒトミルクオリゴ糖 (human milk oligosaccharide、HMO)、腸管粘膜のムチン糖鎖や食物繊維などの難消化性糖質から炭素源・エネルギー源を獲得している。一方、乳児と成人では摂取する難消化性糖質の種類が異なり、それに対応するようにビフィズス菌は自らが持つ糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase、GH) を独自に進化させてきた。

本論文ではビフィズス菌より発見された、増殖に関わるとされている6つの GH の構造からその分子機能を解明することを目的とし、3部、全6章から構成される。

第1部では乳児型ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株のムチン含有 Core 2 O-glycan 代謝経路関連酵素の構造機能解析について述べている。

第1部第1章では B 型血液型抗原に特異的な GH110 α 1,3-galactosidase (AgaBb) の構造解析について述べている。AgaBb の全体構造は β -helix を主体とし、側面に小さな β -barrel domain を2つ有していた。配列同一性 27%の *Pseudoalteromonas distincta* U2A 株由来 PdGH110B との構造比較により基質の一部であるガラクトース二糖 (Gal- α 1,3-Gal) が入る-1、+1 サブサイトを形成する候補残基を確定した。また、B 型抗原三糖の中のフコース (Fuc) が E380 と R270 と相互作用した形が最もあり得るコンフォメーションであると考えられた。

第1部第2章ではムチン糖鎖と HMO の修飾糖分解酵素 GH95 α 1,2-fucosidase (AfcA) に付属する新規な糖質結合モジュール (CBM) の構造解析について述べている。AfcA の N 末端領域はタンデムに連なった2つの CBM のドメインとリンカードメインで構成されていた。2つの CBM は配列同一性 48%のホモログ同士であった。その構造は3枚の逆平行 β -sheet、4つの短い α -helix、そして1つのナトリウムイオンからなる、ユニークな形に折り畳まれていた。リガンドである 2'-フコシルラクトース (2'-FL) の Fuc 部分は CBM のループ部分にある3つまたは4つのアミノ酸と水素結合しており、ガラクトース (Gal) 部分は4つまたは5つの残基と水素結合を形成し、さらにトリプトファン残基のスタッキング相互作用によって認識されていることが解ったと述べている。

第1部第3章ではムチン糖鎖特有の硫酸化糖質分解酵素 GH20 β -6-SO₃-N-acetylglucosaminidase (BbhII) の阻害に関する酵素学的、構造生物学的解析について述べて

いる。BbhII の阻害剤候補物質である PUGNAc-6S と NAGT-6S は BbhII の加水分解反応に対してそれぞれ極めて強い競合阻害効果を示した。更に X 線結晶構造解析により決定した BbhII と PUGNAc-6S の複合体構造から、PUGNAc-6S が活性中心内で $B_{3,0}$ のボート型のコンフォメーションを取っていることが確認され、N 末端の CBM32 ドメインでは 4C_1 のイス型のコンフォメーションを取っていたと述べている。

第 2 部では成人型ビフィズス菌 *Bifidobacterium dentium* JCM1195 株のカラメル化糖に作用する酵素群の構造機能解析について述べている。

第 2 部第 1 章では環状フルクトース二糖を合成する GH172 difructose dianhydride synthase (α FFase1) の構造機能解析について述べている。 ${}^1\text{H}$ NMR 解析により、 α FFase1 がアノマー保持型機構を有する GH であることが解った。さらに天然基質では反応中間体構造中で非還元末端側にあるフルクトフラノース (Fru_f) の 1 位のヒドロキシ基が求核攻撃することで脱水縮合反応の触媒が成り立っていた。X 線結晶構造解析によって解かれた α FFase1 と β -D-Araf および β -D-Fru_f の複合体構造から DFA I の認識様式が推測された。 α FFase1 は D3 二面对称構造を持った 6 量体構造であり、各プロトマーは 2 つの β -jelly roll と 1 つの α -helix で構成されていた。基質はオリゴマー構造内に入り、2 つのプロトマーが協調的にその認識に関わることで活性が成り立っていた。更に分子動力学シミュレーションで 6 量体構造内部にある活性部位からの糖の脱離経路を推定した。 α FFase1 は独自の配列、構造、反応機構を有することから、本酵素の研究により糖質関連酵素データベース CAZy では新しく GH172 ファミリーが設立されたと述べている。

第 2 部第 2 章ではカラメル化糖特有の糖質を分解する GH172 α -D-fructofuranosidase (α FFase2) の構造解析について述べている。析出しやすい K/Na tartrate を沈殿剤とし、Additive Screen によって同定された chromium (III) chloride および TCEP hydrochloride を組み合わせた複雑な結晶化の系を確立した。これを最適化することにより最大分解能 1.96 Å の X 線回折データセットを獲得したと述べている。

第 3 部では成人型ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JCM7052 株のアラビアガム含有アラビノガラクトサン資化経路関連酵素 GH39 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase (GAfase) の構造解析について述べている。緻密な発現検討により酵素の可溶化に最適な異種発現条件を特定し、それを基に精製 GAfase を大量調製した。これを基に得られた結晶から分解能 2.7 Å の X 線回折像を獲得したと述べている。

以上、本論文により明らかにされた、ビフィズス菌由来の新規性の高い糖質関連酵素の構造と機能についての知見は、学術・応用の双方に寄与することが期待される。よって、本論文は博士（農学）の学位請求論文として合格と認められる。