

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 佑

ビフィズス菌は、ヒトの小腸下部から大腸に生息するグラム陽性の絶対嫌気性菌で、多形性を示す。また、ビフィズス菌はヘテロ乳酸菌であり、酢酸などを産生して病原菌の増殖を抑える善玉菌として知られている。宿主のヒトにおいて、食物由来の糖質の多くは小腸で吸収される。そのため、ビフィズス菌が生息する小腸下部から大腸には、難分解性オリゴ糖が多く残ると考えられる。ビフィズス菌は、植物の細胞壁やヒトの複合糖鎖などに由来する様々な難分解性オリゴ糖に作用する分解酵素を持ち、オリゴ糖を有効利用している。本論文は、ビフィズス菌由来の 2 種類の難分解性オリゴ糖分解酵素の構造と機能を解明する研究であり、2 章より構成される。

序論に続き、第 1 章では、*Bifidobacterium bifidum* JCM1254 由来のヒトミルクオリゴ糖分解酵素であるラクト-*N*-ビオシダーゼ (LNBase) の X 線結晶構造解析について述べている。ヒトミルクオリゴ糖 (HMO) は、乳児の腸内にビフィズス菌を定着させ、乳児の健康を促進するプレバイオティクス効果を持つ。HMO には多種多様なオリゴ糖が含まれている。その中でも、ラクト-*N*-ビオース I (Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc: LNB) は主要なコア構造として優位を占めている。最近、人の腸内細菌で LNB に特異的でユニークな HMO 代謝経路が同定され、LNB がビフィズス菌の重要な生育因子の 1 つであることが解明された。母乳栄養乳児の腸内細菌のうちいくつかの種は、オリゴ糖の非還元末端から LNB を遊離する LNBase を持つ。LNBase は膜結合型の菌体外酵素であり、HMO 代謝経路で重要な役割を担う。LNBase は糖質加水分解酵素ファミリー 20 (GH20) に分類されており、その反応は基質補助型機構によって進む。GH20 酵素には、 $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ ( $\beta$ -HexNAcase) と LNBase の 2 種類の酵素が分類されている。 $\beta$ -HexNAcase は基質から GlcNAc 単糖を切り離す酵素で、既に多数の結晶構造が報告されている。しかし、基質から二糖を切り離す LNBase の 3 次元構造は明らかになっていなかった。本研究では、*B. bifidum* JCM1254 由来の LNBase と LNB および LNB-チアゾリンの 2 種類の複合体構造を分解能 1.8 Å で決定した。全体構造は 3 つのドメインからなっていた。N 末端ドメインは  $\beta$ -HexNAcase によく見られる構造であり、また触媒ドメインは  $(\beta/\alpha)_8$  バレルであった。一方、C 末端ドメインは  $\beta$ -trefoil 様のユニークなフォールドをとっていた。LNBase は、 $\beta$ -HexNAcase と異なりサブサイト(-2)を持つため、より広い基質結合ポケットを持っていた。このポケットは LNB と LNB-チアゾリンがぴったりとはまる形とサイズであった。サブサイト(-2)は  $\beta$ 1,3 結合したガラクトースに特異的であり、ガラクトースを認識する残基が同定できた。結晶中に結合していた LNB 分子の水酸基は広範囲のアミノ酸と水素結合しており、LNBase が LNB に対して高い基質特異性を示すことと一致する。また、LNB の GlcNAc のピラノース環は  $4E$  に近い歪んだコンフォメーションをとっており、遷移状態の

コンフォメーションに近いと考えられた。一方、LNB-チアゾリンの場合は  ${}^4C_1$  であり、これは反応中間体のコンフォメーションに対応すると考えられた。これらの結果から、LNBase の反応過程における糖のコンフォメーション変化が明らかになった。

第2章では、*Bifidobacterium longum* JCM1217 由来植物細胞壁分解酵素である  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1) の機能・構造解析について述べている。植物は、ヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖タンパク質(hydroxyproline-rich glycoproteins: HRGP)を様々な生物学的プロセスに利用している。植物細胞壁には構造タンパク質であるエクステンシンなどの HRGP が含まれている。エクステンシンは Ser-Hyp<sub>4</sub>モチーフと呼ばれる Hyp を含む繰り返し構造を有しており、その Hyp 残基には最大4単位のアラビノフラノース (Araf) からなる  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖 (Araf $\alpha$ 1,3-Araf $\beta$ 1,2-Araf $\beta$ 1,2-Araf $\beta$ -Hyp: Ara<sub>4</sub>-Hyp) が結合している。最近、*B. longum* JCM1217 から Ara<sub>4</sub>-Hyp などを分解し取り込む経路の関連遺伝子群が発見された。さらに、ここに含まれる酵素群の中から、 $\beta$ 結合した Araf からなるオリゴ糖に対して分解活性を示す、GH127 に属する HypBA1 と GH121 に属する  $\beta$ -アラビノビオシダーゼ (HypBA2) が同定され機能解析された。Araf は植物細胞壁においてアラビナンやアラビノキシラン、アラビノガラクトサンなどの主要な多糖の構成糖であるが、その多くが  $\alpha$ 結合しており、 $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼは微生物が持つ一般的な細胞壁分解酵素としてよく知られている。しかしながら、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖に対して作用する酵素はこれまで報告がなく、HypBA1 と HypBA2 が初めての発見である。また、植物の糖タンパク質のアラビノオリゴ糖鎖を加水分解する酵素としても初めてである。当研究室では、これらの酵素のうち、HypBA1 の X線結晶構造解析が行われ、アポ状態と  $\beta$ -L-Araf 複合体の結晶構造が決定されている。複合体構造の活性中心では、1つのグルタミン酸と3つのシステイン残基が金属イオンに配位結合しており、そのうち1つのシステイン残基が触媒反応に関わるのではないかと考えられた。これを受けて本研究では、この仮説を支持するために、結晶学的な解析に加えて、活性測定や金属定量などの生化学的実験を行った。合成基質である pNP- $\beta$ -Araf を用いて活性測定を行い、変異体解析によって活性中心を構成するアミノ酸の重要性を明らかにした。また、金属原子の吸収端の異常分散測定や金属定量によって、活性中心の金属が亜鉛であることを明らかにした。HypBA1 は GH127 及び DUF1680 ファミリーに属しており、そのホモログ遺伝子は植物や真菌、細菌などに広く分布している。活性測定を構成するアミノ酸は、GH127 と DUF1680 での保存性が極めて高い。従って、HypBA1 と同様の新しい反応機構をとる酵素が植物に関係する多くの生物に利用されていることが分かった。

以上、本論文はビフィズス菌由来の糖質加水分解酵素である LNBase と HypBA1 の構造と機能を解明したものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。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。