

## (論文内容の要旨)

母乳栄養児の腸管では人工乳栄養児と比べて生後速やかにビフィズス菌の優勢なフローラが形成される。この現象には母乳に含まれるオリゴ糖(ヒトミルクオリゴ糖)が関与するとされているが、その詳細なメカニズムは不明である。ヒトミルクオリゴ糖はラクトースを還元末端側に持ち、*N*-アセチルグルコサミンやガラクトースなどが付加した複雑な構造を持つ。その中で、ラクト-*N*-テトラオース(Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc)をはじめとする 1 型糖鎖構造(Gal $\beta$ 1,3GlcNAc; ラクト-*N*-ビオース)を有するオリゴ糖の含有量が高いことが知られている。

そこで、ビフィズス菌を含む種々の腸内細菌の培養液を、ヒトミルクオリゴ糖の主要成分であるラクト-*N*-テトラオースに作用させたところ、乳幼児の腸管に生息することが知られている *Bifidobacterium longum* や *B. bifidum* がラクト-*N*-ビオースを遊離する活性(ラクト-*N*-ビオシダーゼ活性)を有することが示された。一方、他の腸内細菌はラクト-*N*-テトラオースを全く分解できなかった。そこで、強いラクト-*N*-ビオシダーゼ活性を示した *B. bifidum* JCM1254 株より本酵素遺伝子をクローニングして塩基配列を決定した。本酵素は 1112 アミノ酸残基からなり、*N* 末端と *C* 末端にそれぞれシグナルペプチドとアンカードメインを有する菌体外酵素であった。大腸菌で発現させた組換え酵素について諸性質を調べたところ、 $\beta$ -結合したラクト-*N*-ビオースを非還元末端に持つオリゴ糖に特異的に作用することが明らかとなった。また、本酵素の糖転移活性及び縮合活性を用いてラクト-*N*-テトラオースを酵素合成することに成功した。

一方、最近、ラクト-*N*-ビオースを加リン酸分解する酵素(ガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ)の遺伝子がビフィズス菌よりクローニングされたが、ガラクト-*N*-ビオースは、ムチン型糖鎖のコア 1 構造の二糖であり、多くのビフィズス菌はエンド- $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼを分泌発現して、ムチン糖タンパク質よりこの二糖を遊離する。すなわち、ビフィズス菌は、分泌酵素であるラクト-*N*-ビオシダーゼおよびエンド- $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼを利用して、ミルクオリゴ糖からはラクト-*N*-ビオースを、ムチン糖タンパク質からはガラクト-*N*-ビオースを切り出し、その後、菌体内ホスホリラーゼによって資化することが考えられる。

本経路から推察すると、ビフィズス菌は、これら遊離した二糖を細胞内へ取り込むシステムを有するはずである。ゲノム上の上記ホスホリラーゼ遺伝子の上流に ABC トランスポーターをコードすると推定される領域が存在していたので、本遺伝子群を *B. longum* JCM1217 株よりクローニングした後、プラスミドを利用して *B. longum* 105A 株に多コピー導入し、 $[^{14}\text{C}]$ ラベルした合成ラクト-*N*-ビオースを基質としてトランスポートアッセイを行った。その結果、本遺伝子群を導入した株において顕著な取り込み能の増加が観察され、本トランスポーターがラクト-*N*-ビオースの取り込みに関わることが強く示唆された。本遺伝子のホモログはビフィズス菌にのみ見られ、他の腸内細菌には全く見られなかった。そこで、トランスポーターの基質認識に最も重要な役割をはたす基質結合タンパク質(ガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオース結合タンパク質; GL-BP と命名)を大腸菌にて大量発現し、等温滴定量熱計を用いて熱力学的解析を行った結果、ガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースを極めて特異的に認識して結合し、他の単糖や二糖に対しては全く結合を示さないことがわかった。これら二糖に対する結合の構造学的基盤を明らかにする目的で X 線結晶構造解析を行い、約 2 Å の分解能でガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースとの複合体構造を決定した。その結果、ガラクト-*N*-ビオースに対する結合はラクト-*N*-ビオースより水素結合が一本多いことが明らかとなった。ガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースに対する  $K_a$  値の差は、この水素結合によるものと考えられた。

本研究では、ビフィズス菌による 1 型ミルクオリゴ糖の資化に重要な役割を果たすと考えられるラクト-*N*-ビオシダーゼおよびガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオーストランスポーターの遺伝子クローニングおよび構造解析を行った。また、他の腸内細菌におけるこれら酵素活性の分布やゲノム情報の比較を行うことで、ビフィズス菌が母乳乳幼児の腸管内でどのようにして優位に生息しているかについて考察した。

## (論文審査の結果の要旨)

本論文の著者は、腸内における善玉菌の代表として知られるビフィズス菌が人工乳栄養児の腸管内に比べて母乳栄養児の腸管内で優勢的に棲息する現象について、母乳中に含まれるオリゴ糖の関与が示唆されることに着目し、ビフィズス菌の腸管における菌叢形成のメカニズムを明らかにする目的でビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖代謝機構に関する研究を行った。

ヒトミルクオリゴ糖はラクト-*N*-ビオース構造を有するタイプ I 型のオリゴ糖を多く含むことを特徴としているが、本論文の著者は種々の腸内細菌についてスクリーニングした結果、母乳栄養児の腸管内に生息する数種のビフィズス菌が I 型ヒトミルクオリゴ糖の主要成分であるラクト-*N*-テトラオースからラクト-*N*-ビオースを遊離するラクト-*N*-ビオンダーゼ (LnbB) 活性を有することを見出した。そこで、*B. bifidum* JCM1254 株から本酵素の遺伝子をクローニングし、諸性質を調べた結果、本酵素はさまざまなヒトミルクオリゴ糖の非還元末端に結合するラクト-*N*-ビオースに特異的に作用することを明らかにした。ビフィズス菌によるオリゴ糖の分解に関する報告は多数存在するが、これまでにラクト-*N*-ビオースという二糖に注目した報告は全くない。本研究においてヒトミルクオリゴ糖をビフィズス菌がラクト-*N*-ビオースと言う二糖構造で遊離することを発見した事実は非常に重要な知見である。また、LnbB の糖転移活性と縮合活性を用いることにより、ラクト-*N*-テトラオースの酵素合成に成功したことは将来、多量に酵素合成でき得る途を開いたものであり、ビフィズス菌の増殖因子として人工ミルクなどに添加し得る可能性が示された。

本論文の著者はビフィズス菌の菌体外分泌酵素によって、ムチン糖タンパク質およびヒトミルクオリゴ糖から遊離されたガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースを菌体内に特異的に輸送するトランスポーターの候補遺伝子群を *B. longum* JCM1217 株から見出し、単離した。さらに、ビフィズス菌の本遺伝子群多コピー導入株を用いたトランスポートアッセイによってラクト-*N*-ビオースを輸送することを明らかにした。また、トランスポーターを構成する基質結合タンパク質 (GL-BP) についてはガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースと特異的に結合することを明らかにした。これらの結果はビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖代謝経路を明らかにしたものであり、また、ビフィズス菌の ABC トランスポーターに関する詳細な研究としては初めての成果である。

以上のように、本論文の著者は一連の研究から、ビフィズス菌が自ら分泌する酵素によって糖鎖やオリゴ糖からガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースを遊離し、それらを菌体内に取り込んで加リン酸分解酵素などによって代謝するという経路を提唱している。ビフィズス菌の母乳栄養児腸管内における速やかな定着は長年にわたって未解明なままであった。しかし、本研究において、母乳中のヒトミルクオリゴ糖の構成成分が特異的にビフィズス菌によって代謝される経路を解明したことは大変に重要な成果であり、ガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースがビフィズス因子であることを示唆する仮説は極めて興味深い。今後、ガラクト-*N*-ビオースおよびラクト-*N*-ビオースを人工乳に添加して母乳に近づけることにより乳幼児の健康増進に貢献できるものと思われる。

以上、本論文の研究は乳酸菌研究における基礎的分野、応用的分野の両方において重要な貢献をするものである。

よって本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成20年11月12日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。