

氏 名	ぬの 布	うら 浦	なお 直	き 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)			
学 位 記 番 号	農 博 第 917 号			
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当			
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻			
学位論文題目	Studies on <i>Bifidobacterium breve</i> β -Glucosidase (<i>Bifidobacterium breve</i> の β -グルコシダーゼに関する研究)			
論文調査委員	(主 査) 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 木 村 光 教 授 清 水 昌			

論 文 内 容 の 要 旨

腸内嫌気性細菌であるビフィズス菌は、宿主であるヒトに種々の好影響を与えることが明らかにされており、医療や健康維持のために積極的に利用されている。著者は、ビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* の糖質代謝酵素のひとつである β -グルコシダーゼ及びその遺伝子について基礎及び応用研究を行い、本論文にまとめた。その内容は以下のようである。

1. ビフィズス菌の β -グルコシダーゼの精製と性質

ビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* 203 をセロビオース含有培地で馴養（5 日毎に20回継代培養）し、 β -グルコシダーゼ及び β -フコシダーゼの両活性が著しく上昇したセロビオース馴養株 (*B. breve* clb) を得た。そして、その無細胞抽出液から β -グルコシダーゼを精製し、電気泳動的に単一な標品を得た。精製 β -グルコシダーゼは β -グルコシド水解活性の他に β -D-フコシド水解活性を合わせ持つ、分子量約 50,000 のモノマー酵素であった。本酵素の糖転移触媒能を利用して新規なビフィズス因子、D-フコシルグルコース及び D-フコシルキシロースを合成した。

2. β -グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現

大腸菌を用いて *B. breve* clb のゲノムライブラリーを、また本酵素 N-末端アミノ酸配列 30 残基をもとにヌクレオチドプローブを作成した。コロニーハイブリダイゼーションにより本酵素遺伝子を有するクローンを得て、本酵素遺伝子が 1,380bp のオープンリーディングフレーム (ORF) にコードされていることを明らかにした。本酵素は 460 アミノ酸残基から成り、推定分子量は 51,513 であった。アミノ酸配列を比較し、本酵素はセルラーゼファミリーの BGA サブファミリーに属することを認めた。

また、組換え大腸菌株 OKle が本酵素を大量に発現していることを認め、本菌体より本酵素を精製し、結晶化した。

3. フコシルグルコースの酵素合成とビフィズス菌による資化

担体にホルミルセルロファインを用い、これに本酵素を共有結合させた。固定化による本酵素活性の低

下は殆ど認められず、安定性が増加した。この固定化酵素カラムに、活性炭カラムを直列に連結したタンデムカラムを作製した。グルコース 1M 及びフコース 1M から成る反応液を循環させ、オリゴ糖を連続的に合成したところ、活性炭カラムに 2 種類のオリゴ糖が吸着された。それぞれのオリゴ糖を単離して構造解析を行い、D-フコシル ($\beta 1 \rightarrow 6$) グルコースとゲンチオビオースであることを明らかにした。

酵素合成した D-フコシルグルコース 1% を炭素源として、各種の腸内細菌を培養した結果、多くのビフィズス菌 (9 菌株中 8 菌株) がこれを資化したのに対し、乳酸桿菌の大部分、*Bacteroides*, *Clostridium*, 大腸菌, 腸球菌, 乳酸球菌, 黄色ブドウ球菌などは資化しなかった。

4. ビフィズス菌での β -グルコシダーゼ遺伝子の発現調節

セロビオースによる馴養によって、 β -グルコシダーゼ活性が著しく上昇するメカニズムについて検討した。ウエスタンブロットの結果、*B. breve* **clb** では β -グルコシダーゼタンパク質が大量に発現していることを明らかにした。ノーザンブロットにより、馴養株 *B. breve* **clb** では本酵素の mRNA が親株に比べ大量に転写されていることを明らかにした。また、染色体 DNA を調製し、本酵素 ORF に特異的なプローブを用いてサザンブロットを行い、両株の遺伝子の制限酵素による切断パターンに差異がないことを明らかにした。本酵素構造遺伝子の 5' 上流域を検討した結果、親株と馴養株両株とも翻訳開始点より 100~130bp 上流側にプロモーター配列を認めた。両株の上流域約 600bp までの塩基配列に差異を認めなかった。また、本酵素 mRNA の転写開始点は、両株とも翻訳開始点より 94bp 上流側のアデニン残基であることを明らかにした。転写開始点より約 30bp 下流側には大腸菌の *lac* リプレッサーが結合する配列に相同性の高い配列を認めた。これらの結果より、セロビオースの馴養による本酵素活性の上昇は遺伝子の調節領域の変異によるものではないことを明らかにした。本酵素の発現調節には何らかの DNA 結合タンパク質が関与していると推測し、馴養の現象もその調節タンパク質における何らかの変化によるものと考察した。

論文審査の結果の要旨

ビフィズス菌はグラム陽性の偏性嫌気性桿菌であり、ヒトや家畜の腸管内などに棲息する。特に母乳栄養児では腸管下部における最優先菌として存在することが知られている。本菌は宿主に対して腸管の感染防禦、腸内腐敗の抑制、免疫機能の増強、栄養改善あるいは整腸などの様々な有益な作用を持つことが指摘されており、本菌を添加した発酵食品や生菌製剤などがいくつか実用化され利用されている。本菌の腸管内での増殖、定着に関しては、オリゴ糖であるビフィズス因子に関する研究が古くから行われており、この因子を用いて本菌の選択的増殖をはかろうとする試みが数多くなされている。しかしながら本菌の糖質代謝に関与する酵素あるいは遺伝子に関する知見は未だ不十分である。

そこで著者は、ビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* の糖質代謝酵素のひとつ β -グルコシダーゼ及びその遺伝子に関する生化学的、分子生物学的研究を行った。

評価すべき主な点は以下の通りである。

1. ヒト由来のビフィズス菌のセロビオース馴養株 *B. breve* **clb** よりビフィズス菌に特徴的な β -グルコシダーゼを精製単離し、その諸性質を明らかにした。そして本酵素が β -フコシダーゼ活性を合わせ持つ

ことを解明した。

2. *B. breve* clb の β -グルコシダーゼ遺伝子をクローニングしてその塩基配列ならびに本酵素のアミノ酸配列を決定した。

3. ビフィズス菌由来の β -グルコシダーゼを大腸菌内で発現させて、その組換え酵素を精製単離し、その諸性質を明らかにした。この酵素標品を用いて固定化酵素カラムを作製し、ビフィズス菌によって優先的に資化される有用なオリゴ糖 D-フコシルグルコースを連続的に合成することに成功した。

4. ビフィズス菌のセロビオース馴養による β -グルコシダーゼ活性の上昇が転写レベルで起きることを明らかにした。また遺伝子の転写開始点を明らかにした。

以上のように、本論文はビフィズス菌の特徴的な β -グルコシダーゼとその遺伝子の諸性質の解明を行うとともに、それらのバイオテクノロジー分野での応用を実際に示したものであり、微生物生理学及び応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成9年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。