

学位論文題名

Studies on enzymes which are present in human intestines

(ヒト腸管内に存在する酵素類に関する研究)

学位論文内容の要旨

ヒト腸管の機能は、(1) 食物成分の消化、(2) 消化された栄養成分の吸収、および水分の吸収、(3) 未消化物の体外への排泄、に大別することができる。これら腸管の働きは、肝臓や膵臓といった臓器からの分泌物や腸管上皮細胞が正しく機能することによって維持されている。

腸管内には、また、腸内細菌が生息している。その種数は約 400 といわれ、ヒト大腸の内容物 1 g あたりの細菌数は 10^{11} にのぼる。これら腸内細菌の機能には、(1) 食物成分の消化、(2) 腸管上皮細胞への栄養素の供給、(3) 宿主免疫機能の活性化、(4) 病原性細菌からの腸管の保護、等が挙げられる。他方、腸内細菌には、宿主に対して日和見感染的に病原性を発現する種が知られている。したがって、安定した腸内細菌叢の維持は腸管内環境の安定化を意味し、これが上述の腸管機能を通じてヒトの健康を保証している。

本研究ではヒト腸管内に存在する酵素類に注目し、これら酵素類が腸管を通じて宿主に与える機能を解明するための基礎となる研究、すなわち、酵素類の生化学的、および遺伝学的な研究を実施した。第 1 章、および第 2 章では、細菌の感染因子という観点から腸内細菌の sialidase に関する研究を実施した。第 3 章では、シアル酸の生理機能研究に利用されるシアル酸結合化合物の酵素合成法を開発した。第 4 章では、母乳に含まれ、乳児の腸管内脂質代謝に関与する酵素、bile salt-activated lipase との関連から、ウシ膵臓由来の類似酵素に関する研究を実施した。第 5 章、および第 6 章では、腸管内における脂質代謝の修飾という観点から、腸内細菌に由来する bile salt hydrolase に関する研究を実施した。以下に、本研究の各章で得られた結果を要約する。

第 1 章、および第 2 章 Sialidase に関する研究

日和見感染的な病原性を有するとされる腸内細菌、*Bacteroides fragilis* から sialidase を精製した。Sialidase はインフルエンザウィルス、あるいはコレラ菌等の病原体がヒトの気管や腸管に感染する際に重要な役割を担うことが知られており、したがって、当該酵素が「細菌感染」という現象に関与する可能性を念頭において、本研究を実施した。

B. fragilis SBT3182 株から、サブユニットの分子量が 55 kDa、および 50 kDa である 2 種類の酵素を精製した。分子量が 55 kDa である酵素は、生理的な条件下では 3 量体構造をとることが示唆された。基質特異性、および K_m 値に関する検討では、両酵素とも同様の性質を示した。すなわち、シアル酸の 3 種類の結合様式に対する基質特異性は、それぞれ $\alpha 2-8 > \alpha 2-3 > \alpha 2-6$ であった。また、シアル酸が $\alpha 2-8$ 結合で重合した化合物(コロミン酸)に対する K_m 値は 0.03 mM~0.04 mM、 $\alpha 2-3$ シアリルラクトースに対する K_m 値は 1.0 mM~1.2 mM、および $\alpha 2-6$ シアリルラクトースに対する K_m 値は 1.3 mM~1.5 mM であった。両酵素の N 末端アミノ酸配列は同一であり、本配列は既知の sialidase には知られていない新規な配列であった。また、両酵素は互いに異なる糖組成を有する糖タンパク質

であることが示唆され、特に分子量が 50 kDa である sialidase では、 α フコースを特異的に認識するレクチンにより酵素活性が約 20 % 阻害された。

第 3 章 Sialidase によるシアル酸の転移系に関する研究

糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸の生理学的な機能性を研究するためには、各種のシアル酸含有化合物が有効な研究ツールとなる。本研究では、*B. fragilis* SBT3182 株に由来する sialidase の基質特異性とコロミン酸とを組み合わせ（第 1 章参照）、酵素の逆反応によるシアル酸転移系を開発した。シアル酸供与体としてコロミン酸、シアル酸受容体として乳糖、および部分精製酵素から反応液を調製してシアル酸転移反応を検討したところ、反応液中には 0.14 % の収率で $\alpha 2-3$ 、および $\alpha 2-6$ シアリルラクトースが、それぞれ酵素合成された。合成されたシアリルラクトースの isomer 比は $\alpha 2-6 > \alpha 2-3$ であり、これは酵素の分解活性における基質特異性を反映しなかった。また、合成されるシアリルラクトースの isomer 比は、反応時間により変化した。

第 4 章 Bile salt-activated lipase に関する研究

新生児の各種臓器は機能が未熟であり、したがって母乳には、それらの機能を補う成分が存在する。脂質代謝に関与する母乳成分は、bile salt-activated lipase (BAL) である。BAL のリパーゼ活性発現には胆汁酸が不可欠であり、母乳中で不活性の酵素は、腸管内ではじめて活性化される。ヒト膵臓には BAL が含まれるが、ウシ膵臓には BAL の存在は知られていない。そこで本研究では、母乳 BAL の代替素材を開発するという観点から、ウシ膵臓由来 BAL の単離・精製と性状把握、特に母乳 BAL との性状比較を実施した。

ウシ膵臓抽出物より分子量が 63 kDa で糖鎖を有し、リパーゼ活性、およびエステラーゼ活性を示す酵素タンパク質を精製した。本酵素のリパーゼ活性発現にはタウロコール酸が必要であったのに対し、エステラーゼ活性には不要であった。母乳酵素との性状比較により、本酵素が BAL であることが示唆された。酵素の N 末端アミノ酸配列を基に相同性検索を実施した結果、本配列はウシ膵臓に由来する既知の酵素タンパク質（コレステロールエステラーゼ活性、およびリゾホスホリパーゼ活性を有する）と同一であった。両者の分子量も一致した。以上より、ウシ膵臓由来の BAL 活性、コレステロールエステラーゼ活性、およびリゾホスホリパーゼ活性は、同一の酵素タンパク質に由来するものと結論した。

第 5 章、および第 6 章 Bile salt hydrolase に関する研究

摂取した脂質の消化・吸収のために、肝臓で合成された胆汁酸が胆のうから十二指腸内に分泌される。これらの胆汁酸のほとんどは腸管上皮細胞により再吸収され、門脈を通過して肝臓に戻される。一部の胆汁酸は再吸収を逃れて大腸内に進入し、そこで腸内細菌による代謝、すなわち脱抱合化を受ける。腸内細菌、および宿主における脱抱合作用の機能は、現在までのところ不明である。他方、脱抱合能を有する腸内乳酸菌が胆汁酸の排泄量を増加させ、これが宿主の血清コレステロール濃度を低下させる、という仮説が提出されている。

上述の仮説を系統立てた実験により検証することを目的として、本研究では、まず、抱合胆汁酸の脱抱合に関わる酵素 (bile salt hydrolase, BSH) 活性を有する乳酸菌のスクリーニングを実施した。つぎに、BSH 高生産菌、すなわち *Bifidobacterium longum* SBT2928 株から酵素を精製し、酵素の性状を詳細に検討した。また、BSH 遺伝子のクローニング、および配列分析を実施し、研究の途についたばかりである *Bifidobacterium* 属乳酸菌の遺伝子学的な研究を推進した。さらに、仮説を検証するための *in vivo* 試験に必須な BSH 活性を欠損した変異体を各種、調製した。

以上

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男
副 査 教 授 福 永 典 之
副 査 教 授 西 村 紳一郎

学 位 論 文 題 名

Studies on enzymes which are present in human intestines

(ヒト腸管内に存在する酵素類に関する研究)

近年、基礎生物学分野でもヒトを対象とした研究が多くなってきている。ヒトはその腸管内に多数の細菌を保持し、それらの細菌と協働して健康な生活を維持していると言える。ヒト腸管内に生息している細菌の種数は約400と言われ、その数は大腸の内容物1gあたり 10^{11} にのぼる。これらの腸内細菌の存在はヒトにとって：(1)食物成分の消化、(2)腸間上皮細胞への栄養素の供給、(3)宿主免疫機能の活性化、(4)病原性細菌からの腸管の保護、などの利点がある。他方、腸内細菌の中には、宿主であるヒトに対して日和見感染的に病原性を発現する種が知られている。従って、安定した腸内細菌叢の維持は腸管内環境の安定化を意味し、これが上述の腸管機能を通じてヒトの健康を保証している。

本研究は現代的な手法を用いた研究が遅れているヒトの腸内細菌が宿主であるヒトに対する働き of 仕組みを理解するために、これらの細菌が持っている酵素3種類について生化学的及び遺伝学的な検討を行ったものである。第一は、腸内細菌に由来する抱合胆汁酸の脱抱合に関わる酵素 bile salt hydrolase に関するもの、第二は、母乳に含まれ、乳児の腸管内脂質代謝に関与する酵素である胆汁酸依存性リパーゼの活性化に関する研究で、第三に、腸内細菌の sialidase に関する研究である。

肝臓で合成され、胆のうから十二指腸内に分泌され、摂取した脂質の消化・吸収を助ける働きをする胆汁酸のほとんどは腸管上皮細胞により再吸収され、門脈を通過して肝臓に戻される。しかし、一部の胆汁酸は再吸収されずに大腸内に進入し、そこで腸内細菌によって脱抱合化を受ける。腸内細菌及び宿主であるヒト腸管内における脱抱合作用の機構及び意義については、脱抱合能を有する腸内乳酸菌が胆汁酸の排泄量を増加させ、これが宿主であるヒトの血清コレステロール濃度を低下させるという仮説が提出されてはいるものの、統一され

た理解は皆無である。これは偏に、腸内細菌の持つ抱合胆汁酸の脱抱合に関わる酵素についての基礎的研究が行われていないことに原因がある。本研究の特筆すべき成果の一つは、世界で初めて脱抱合に関わる酵素遺伝子を持つ腸内細菌を特定し、この酵素遺伝子の構造を明らかにしたことである。さらに本研究は、脱抱合に関わる酵素活性を持つ菌 *Bifidobacterium longum* SBT2928 株から酵素蛋白質を精製し、酵素が同一のサブユニット4つからなる分子量13万の蛋白質であることを明らかにし、基質特異性などの酵素学的性質を明らかにした。加えて、この酵素蛋白質を発現しない自然突然変異菌1種類を見出し、2種類の人工突然変異菌を作成した。さらに、これらの突然変異体はすべて“点突然変異”であることも明らかにした。

一方、日和見感染的な病原性を有する腸内細菌 *Bacteroides fragilis* から、同一の基質特異性、Km値及びN末端アミノ酸配列を持つサブユニットの分子量が55kDa及び50kDaの2種類の新規シアリダーゼを精製し、これらの酵素の逆反応を利用して、シアル酸供与体としてコロミン酸、シアル酸受容体として乳糖を用い、0.14%の収率で $\alpha 2-3$ 及び $\alpha 2-6$ シアリルラクトースが合成される効率的なシアル酸転移系を開発した。

さらに、胆汁酸によって活性化されるリパーゼを精製し、この酵素が持つ2種の活性のうち、エステラーゼ活性発現には胆汁酸成分中のタウロコール酸は必要ではないが、リパーゼ活性発現には必要であることを明らかにした。

以上、腸内細菌の持つ酵素類のうちヒトの腸管内における物質代謝に関与している3種類の酵素について明らかにされた生化学的及び分子生物学的研究成果は腸内細菌の役割の解明に大きな貢献をするものと考えられる。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める