

一般演題 A-13

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* 由来 1,3-1,4- α -L-フコシダーゼが有するユニークな基質特異性の構造学的基盤Structural Basis for the Unique Substrate Specificity of 1,3-1,4- α -L-fucosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

○櫻間晴子¹, 伏信進矢², 北岡本光³, 日高將文², 芦田 久⁴, 山本憲二¹, 熊谷英彦¹, 片山高嶺¹

¹石川県立大学・生物資源工学研究所, ²東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命工学専攻,

³農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所,

⁴京都大学大学院生命科学研究科・統合生命科学専攻

【目的】 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* 由来の 1,3-1,4- α -L-フコシダーゼ (*BiAfcB*) は glycoside hydrolase (GH) family 29 に属している。我々は、GH29 が分子系統樹解析によって 2 種のサブファミリー (GH29-A および GH29-B) に分類されること、またこの分類が基質特異性を良く反映していることを見出した。*BiAfcB* が属する GH29-B の酵素 (EC 3.2.1.111) は、GH29-A の酵素 (EC 3.2.1.51) と違い、 α -L-1,3/4-フコシル基を特異的に切断する厳密な基質特異性を有する。本研究では *BiAfcB* の複合体の X 線結晶構造解析を行い、その基質特異性を規定する構造基盤を解明することを目的とした。

【方法】 野生型酵素の結晶化は阻害剤であるデオキシフコノジリマイシン (DFJ) を、触媒残基 2 重変異体は基質であるラクト-N-フコペンタオース II [Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNFP II] を用いて、位相決定は ligand-free *BiAfcB* (3MO4, Midwest Center for Structural Genomics) を用いた分子置換法にて行った。

【結果と考察】 野生型酵素においては、DFJ とエチレングリコール (抗凍結剤) の電子密度が、また、変異体においては、LNFP II のうち Lewis a [Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc, Le^a] 3 糖構造の電子密度が活性中心においてそれぞれ観察された。これらの構造と ligand-free 構造を比較した結果、リガンド結合に伴い活性中心近傍のループが大きく構造変化し、触媒残基が適切な位置に配置されること (induced-fit) が明らかとなった。また、*BiAfcB* は Fuc が結合している GlcNAc 残基よりも、枝分かれした Gal 残基と強く相互作用していた。これらの構造的な特徴は、Le^{a/x} のような Gal 残基を持つ 3 糖構造によく作用し、Gal 残基を有しない 2 糖構造 (Fuc α 1-3/4GlcNAc) には作用しない結果と一致した。以上の事実から、Gal 結合部位の存在および induced-fit が *BiAfcB* の基質特異性を規定する分子機構であることが明らかになった。

一般演題 A-14**ハイドロキシプロリンに富む糖タンパク質の *Bifidobacterium longum* における分解メカニズムの解明****Analysis of Degradation Mechanism of Hydroxyproline-rich Glycoproteins on *Bifidobacterium longum***

○藤田清貴, 奥山千代美, 坂口武則, 北原兼文, 菅沼俊彦
鹿児島大学農学部

【目的】 植物に存在するアラビノガラクトタンパク質 (AGP) やエクステンシン (EXT) はハイドロキシプロリンに富む糖タンパク質 (HRGP) と呼ばれ, II型アラビノガラクトタン (AG-II) や β -アラビノオリゴ糖鎖を有している. 最近, 我々は β -アラビノオリゴ糖鎖を分解する酵素群を *Bifidobacterium longum* JCM1217株からクローニングするとともに, *B. longum*が β -アラビノオリゴ糖鎖を炭素源として生育することを報告した. 本研究では, *B. longum*が菌体表層に分泌生産する各種HRGPの分解酵素群の解析と分解代謝経路の解明を目的とした.

【方法】 大豆種皮から調製したEXT・カラマツ由来のAG-II・AGPを含むアラビアガム (GA) を2%添加したPYF培地で*B. longum* JCM1217を嫌気培養した. 比較のための炭素源としてL-アラビノース (Ara)・ガラクトース (Gal) 1%を用い, 供試菌として*B. adolescentis* JCM1275を用いて同条件で培養した. 培養菌体の酵素活性の有無は β -アラビノオリゴ糖鎖 (Ara₄-Hyp・Ara₃-Hyp) 及び β -ガラクトオリゴ糖 (β 1,3Gal₃・ β 1,6Gal₃) を用いTLC及びHPAEC-PADを用いて解析した.

【結果】 *B. longum*によるEXT・AG-II・GAの資化性が確認できた. Ara₄-HypとAra₃-Hypは, EXT・GA・Galで培養した菌体で分解活性が確認されたが, AG-II・Araで培養した菌体では分解活性は確認されなかった. 一方, β 1,3Gal₃と β 1,6Gal₃は全ての培養菌体により分解された. なお, *B. adolescentis*はAra・Galに対する資化性を示したが, EXT・AG-II・GAに対する資化性は示さなかった.

【考察】 EXTの分解に関わる酵素群の解析と資化性試験の結果, *B. longum*におけるEXT分解メカニズムを明らかにすることが出来た. 現在, AGPの分解に関わる遺伝子群の解析と細胞表層に局在する酵素群の詳細な解析を行っている.

一般演題 A-15

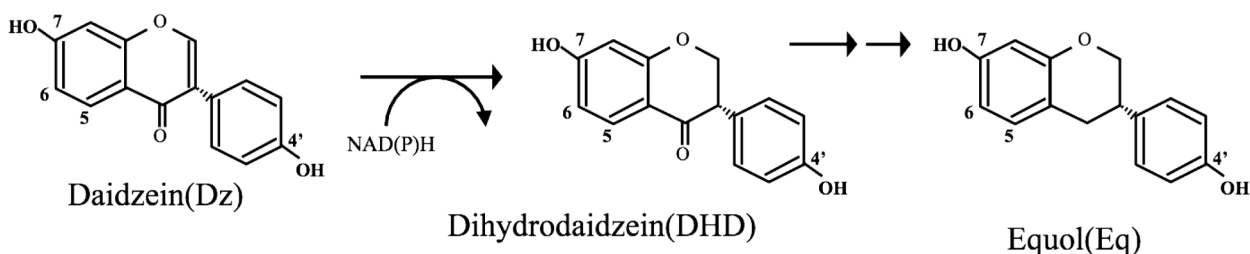
Eggerthella sp. YY7918の持つ daidzein reductaseの基質特異性の解析Substrate Specificity of Daidzein Reductase of *Eggerthella* sp. YY7918○川田結花¹, 澤村理恵², 柳瀬笑子², 大島健志朗³, 服部正平³, 横山慎一郎¹, 野村 泉⁴, 鈴木 徹⁴¹岐阜大・応用生物科学研究科, ²岐阜大・応用生物科学部,³東大・院・新領域, 岐阜県・生物学研究所, ⁴岐阜大・連合農学研究科

【目的】大豆イソフラボンには、マメ科の植物に多く含まれるイソフラボンの総称であり、その構造は女性ホルモンであるエストロゲンに類似している。近年、疫学および生物化学的な観点から、ホルモン依存である、更年期障害、骨粗鬆症などの症状に効果がある物質として注目されている。daidzein (Dz)の代謝産物の一つである EquolはDzの数百倍ものエストロゲン活性を示すことも報告されている。DzからEquolを生産することができるのは、健康な成人の20-60%のみであり、その生産性は腸内マイクロフローラに存在する細菌に依存することが示唆される。上記のような加齢とともに進行する疾病を防ぐためEquolの効率的な生産を目的とし、合成経路において関連酵素およびそのメカニズムの解明を試みている。

【実験方法】成人の糞便よりEquol生産能を持つ*Eggerthella* sp. YY7918を単離し、ショットガンシーケンスを用いて全ゲノム配列を得た。*Eggerthella* sp. YY7918は、3段階の水素添加反応によって、DzをEquolに転換する。そこでEquol生産能を持たない*Eggerthella lenta* DSM 2243とCDSを比較し、Equol生産に関わるE1, E2, E3の3つのクラスターの候補を挙げた。E1をpET11aに組み込み、*E. coli* BL21 (DE3)に導入して*E. coli* BL21 (DE3)/pET11a-E1を作成した。また、基質にDz, Genistein (Gen), Glycitein (Gly), およびそれぞれの7位配糖体であるDaidzin, Genistin, Glycitinを用いた。*in vivo*の実験系では、培養液に基質を加え、1日培養した後、培養上清を薄層クロマトグラフィーで解析した。*in vitro*の実験系では、嫌気条件下で菌体破碎した粗酵素液を、NAD(P)Hを補酵素とし反応させ、同様に解析した。

【結果】一段階目の反応であるE1遺伝子のDz転換反応は、*in vivo*と、*in vitro*ではNAD(P)H存在下で確認された。Dz, Gen, Glyについて反応を比較したところ、Dzのみ*Eggerthella* sp. YY7918および組換え大腸菌の培養液中で転換反応が確認された。また、全ての配糖体は、*in vivo*では転換反応がみられなかったが、*in vitro*では反応が進行した。さらに*in vivo*, *in vitro*で、7-methyl-Daidzeinおよび4'-methyl-Daidzeinのジヒドロ体へと思われる物質への転換が確認されたが、Dzに比べ反応性は低かった。

【考察】この酵素は、Dzの5位および6位を認識し細胞内で働く酵素である。腸内では、他の細菌の生産するglucosidaseが、配糖体をアグリコンに変換した後、本菌が代謝していると考えられる。更に7位と4'位のヒドロキシ基は、酵素の基質認識に部分的に関与していると考えられる。今後は、この酵素の反応性を酵素科学的に研究していくことを検討している。



一般演題 A-16

大豆イソフラボンの腸内細菌代謝産物エクオールが
骨芽細胞分化に及ぼす影響Effect of Equol, an Enterobacterial Metabolite of Soybean Isoflavones
on Osteoblast Differentiation○金 恵珍¹, 田端厚之¹, 友安俊文¹, 上野友美², 内山成人², 長宗秀明¹¹徳島大院・STS・ライフシステム, ²大塚製薬株式会社・佐賀栄養製品研

【目的】大豆イソフラボン類 (SI) は女性ホルモンのエストラジオール (E2) と類似作用を発揮し, 更年期障害や骨粗鬆症等に効果を示すことが知られている. エクオール (Eq) とは, SIのダイゼイン (Diz) が特定の代謝活性を持つ *Lactococcus garvieae* のような腸内細菌の代謝により生成される代謝産物であり, Diz等大豆中のSIよりも強いエストロゲン (Est) 様作用を持つ物質である.

ところで, 骨形成の大半を担う内軟骨性骨化では, 軟骨細胞や骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収がバランスを取って骨量を調節している. ところが加齢等でこのバランスが崩れ, 骨吸収が骨形成を上回ると, 骨密度が大きく減少する. これが骨粗鬆症である. これまで, Estは破骨細胞の寿命を調節することが知られており, Eqも同様な働きをすると考えられている. しかし骨芽細胞を中心とした骨形成過程へのEqの影響についてはまだ分子的知見が乏しい. そこで本研究では, E2やDizと比較しながら, Eqが骨芽細胞の分化にどのような効果を及ぼすのか検証を試みた.

【方法】ウシ胎児血清 (FBS) 中の内在性Estを排除するためにCharcoal/Dextranで脱ステロイド処理したFBS (CD-FBS) を作製した. 分化刺激の存在下, 骨芽細胞様株MC3T3-E1をこのCD-FBS及びFBS中で4週間培養し, その分化過程に及ぼすEq等の影響を解析した. 細胞の石灰化はAlizarin Red染色により行った. また, RT-PCR法を用いてMC3T3-E1の骨形成関連遺伝子の発現変動も検討した.

【結果・考察】顕著な石灰化が見られたFBS中と比較すると, CD-FBS中ではMC3T3-E1の石灰化能は著しく低下していた. そこにEq, Diz, E2を添加すると顕著に石灰化能が回復したが, Dizに比べEqの方が1桁程低濃度で分化促進効果が観察された. 次に同細胞の骨形成関連遺伝子の発現変動をRT-PCR法で検討した結果, SIやE2刺激でサチライシン様プロテインコンベルターゼPACE4の発現増強が観察された. PACE4は骨形成関連因子等の成熟化に関与することから, Est受容体経由の刺激がPACE4発現を調節し骨芽細胞の分化を促すことが示唆された.

以上の結果から, EqはE2と同様の機構で, Dizよりも強力に骨形成を促進することが示唆された.

一般演題 A-17

プロピオン酸菌発酵物の *Clostridium difficile* 増殖抑制効果Inhibitory Effect of *Propionibacterium freudenreichii*-Fermented Product on the Growth of *Clostridium difficile*

○利光孝之, 北 純子, 池上秀二, 内田勝幸, 伊藤裕之
株式会社明治 研究本部食機能科学研究所

【目的】プロピオン酸菌乳清発酵物は整腸作用を示すことが明らかとなっており, 感染性下痢や過敏性腸症候群を予防・改善するプレバイオティクスとしての可能性が期待される。また, *Clostridium difficile* (*C. difficile*) は抗菌薬が誘因となる下痢あるいは腸炎の主要な原因菌であり, 薬剤による治療には問題を抱えているため, 有用な食品やプロ・プレバイオティクスが強く求められている。そこで, 本研究では *C. difficile* の増殖に及ぼすプロピオン酸菌発酵物の影響について検討を行った。

【方法】*C. difficile* の培養時に各種プロピオン酸菌の培養上清を添加し, 生菌数及びOD値を測定することによって *C. difficile* の増殖に及ぼす影響を調べた。また, *Propionibacterium freudenreichii* ET-3株の乳清発酵物, プロピオン酸菌が産生する主な代謝物である1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (DHNA) 及びプロピオン酸の作用についても併せて検討した。さらに, DHNAについては各種ビフィズス菌や乳酸菌, その他のクロストリジウム属菌の増殖に及ぼす影響についても評価した。

【結果】プロピオン酸菌の中でも *Propionibacterium freudenreichii* ET-3株の培養上清は有意に *C. difficile* の増殖を抑制した。また, DHNA及びプロピオン酸にも有意な *C. difficile* 増殖抑制効果が見られたことから, これらに関与成分であると考えられた。DHNAは *C. difficile* に対して特に強い抑制効果を示し, *Clostridium perfringens* などのクロストリジウム属菌の増殖にも弱いながら抑制効果を示した。その一方, 各種ビフィズス菌の増殖は有意に促進し, 乳酸菌などの有益菌の増殖には影響を及ぼさなかった。

【考察】プロピオン酸菌乳清発酵物の整腸作用には, 腸内菌叢の改善が関与すると考えられる。また, プロピオン酸菌が産生するDHNAは *C. difficile* の増殖を抑制することから, *C. difficile* による下痢症状にも有効な作用を示すことが示唆された。

一般演題 A-18

タンナーゼ産生乳酸菌およびカテキン摂取における抗肥満効果の検証

Study on Anti-obesity Effect of Tannase-producing Lactic Acid Bacteria and Tea Catechins

○林多恵子², 上田宗平¹, 桑原浩誠², 大澤 朗¹¹国立大学法人神大・院・農, ²丸善製薬株式会社・研究開発本部

【目的】緑茶に含まれるカテキン類は、多くの疾病予防効果を有しており機能性食品素材として認知されている。しかし、その大半を占める没食子酸エステル型カテキン (EGCg, GCg) は、腸内で食品成分と複合体を形成して殆ど腸管から吸収されないことが指摘されている。これまでの研究により、漬け物から分離されたタンナーゼ産生乳酸菌が没食子酸エステル型カテキンを易吸収型の非エステル型カテキン (EGC, GC) に変換することを確認した。そこで緑茶の機能性として近年特に注目されている抗肥満効果について、カテキンとタンナーゼ産生乳酸菌を同時に摂取することにより吸収が高まり、さらなる効果を発揮するのではないかと考えマウスを用いた抗肥満試験を行った。

【方法】C57BL/6J (♂) マウスを高脂肪食摂取により肥満化させ、没食子酸エステル型カテキンである EGCg およびタンナーゼ産生乳酸菌の中でも最も活性の高かった *Lactobacillus plantarum* 22A-3 株 (LP22A-3) を摂取させて体重の変化・血中パラメーター・内臓脂肪の重量を測定した。比較対象に EGCg 投与群・LP 投与群・タンナーゼを産生しない *Lactobacillus brevis* 投与群を設置した。

【結果】被験飼料投与中の糞を回収して、生菌数およびカテキン含量を確認したところ、LP22A-3 株を投与している各群からは 10^9 CFU/g 以上の生菌が確認された。また、EGCg 投与群の糞中からは高濃度の EGCg が検出されたが、EGCg と LP22A-3 株を投与した群では EGCg 量が著しく減少していた。

試験終了時の剖検ではすべての群間で体重の変化・血中パラメーターには有意な差は見られなかった。一方で内臓脂肪重量に関しては、EGCg と LP22A-3 株を投与した群において、他の群に比べ有意に減少していた。

【考察】EGCg と LP22A-3 株を同時に摂取すると、糞中の EGCg が著しく減少していたことから、摂取した EGCg は LP22A-3 株によってマウス腸内で EGC に変換される。さらに、吸収性の高い EGC は腸管から吸収されたのちに脂肪燃焼効果を発揮して、内臓脂肪を減少させたと考えられる。これらの結果から、漬物由来のタンナーゼ産生乳酸菌は安全性も高く、植物ポリフェノールの機能性を向上させる新規プロバイオティクスとして利用可能であることが示唆された。