

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	佐々木 優紀 <span style="float: right;">1010</span>
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 藤田 清貴
	副査 鹿児島大学 教授 北原 兼文
	副査 琉球大学 教授 金子 哲
	副査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 鹿児島大学 准教授 塩崎 一弘
審査協力者	印
実施年月日	令和 4年 1月 18日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;"><input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答</span>	
<p>主査及び副査は、令和4年1月18日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者  
氏名

佐々木 優紀

1010

[質問1] AGPは糖タンパク質としてコアプロテインも含まれていると思うが、ビフィズス菌の資化性と関係は無いか？

[回答1] アラビアガムAGPは90%近くが糖で構成されています。このため、タンパク質はビフィズス菌資化性とは無関係だと考えます。

[質問2] AGP分解経路を酵素の機能性から証明しているが、関連遺伝子の転写量は見ているか？

[回答2] 今回、遺伝子の転写量は見ておりません。ただ、培養試験や培養菌体を用いた分解性試験などを通じて関連遺伝子が実際の生菌で機能していることは確認しております。

[質問3] 酵素の至適pHは低めで至適温度は高めであるが実際の腸内環境を反映しているか？

[回答3] 今回解析した加水分解酵素の多くはpH5付近、温度は37℃よりやや高い程度でした。腸内でのビフィズス菌の存在環境は自身が排出する短鎖脂肪酸により弱酸性環境と考えられます。このため、実際の腸内環境を反映した至適条件であると考えます。

[質問4] GAfaseの結晶構造解析は実施しなかったのか？

[回答4] 試みましたがうまく結晶化できませんでした。GH39に分類されるため ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> バレル構造に近いと推定しております。

[質問5] GAfaseの-1サブサイトがL-アラビノースで-2サブサイトがガラクトースとのことだが、基質特異性から判断すると-2サブサイトが基質認識に重要ということか？

[回答5] GAfaseホモログでは-2サブサイトがL-アラビノピラノースを認識する酵素も存在し、その認識に重要な-2に位置するチロシン残基に変異を入れることで基質特異性を変えることも可能です。このため、-2サブサイトが基質認識には重要であると考えます。

[質問6] では、GAfaseの+1サブサイトの重要性はどのように考えるか？

[回答6] +1サブサイトは糖である必要性が無く、糖転移物であるGA-Meのメタノールが+1に位置していても切断することができます。このため、あまり

重要では無いと考えております。

〔質問6〕 Ig-likeドメインが菌体表層局在型酵素の多くに見受けられるがどのような働きがあるのか？

〔回答6〕 Ig-likeドメインの機能性は不明です。

〔質問7〕 ビフィズス菌の一部だけがアラビアガムAGPを分解するとのことだが、国籍など摂取する民族とAGP分解性との相関性はあるか？

〔回答7〕 今回用いたビフィズス菌は日本人由来であるため、国籍との関係性は言えません。また、NCBIデータベースを見ても国籍と資化性との関係は、はっきり分かりません。ただ、サルの一ツのコモンマーモセットのビフィズス菌では樹液の摂取との関係性がありそうですので、ヒトでも食餌との関係性を追跡すれば新たな知見が得られる可能性があります。

〔質問8〕 アラビアガムAGPはどの程度ビフィズス菌で分解されるのか？

〔回答8〕 10%程度含まれるGal  $\alpha$  1, 3Ara二糖は完全に分解されます。側鎖だと半分ぐらいが分解されていると思われます。

〔質問9〕 主鎖を切る $\beta$  1, 3galactanase単独では遊離糖が出ていないようであるが何故か？

〔回答9〕 GAfaseが存在しない環境ではブロックされており主鎖を切ることができませんが、 $\beta$  1, 3galactanaseを同時に加えることでS4という主鎖が分解されて遊離するオリゴ糖が生じます。GAfaseの作用により主鎖に作用できるようになると考えております。

〔質問10〕 GAfaseは単量体か？

〔回答10〕 解析はできていないので不明です。ゲル濾過やnative-PAGEなどで解析する必要があると思われます。

〔質問11〕 活性中心の変異実験でグルタミン酸をグルタミンに置換するケースとアラニンに置換するケースがあるがどうしてか？

〔回答11〕 論文などを参考にして変異残基を決めました。結果的にどちらでも触媒活性の消失は確認できております。

〔質問12〕 ABC輸送体の糖の取り込みはどのような仕組みか？

〔回答12〕 基質結合ドメインが目的の糖を認識し、ATPの加水分解エネルギーの駆動力を用いて、効率的に取り込むと考えられます。