

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07397

研究課題名(和文) 植物糖タンパク質糖鎖分解酵素群の解析から明らかにするビフィズス菌間の共生関係

研究課題名(英文) Symbiosis between bifidobacterial species by the analysis of the degradative enzymes for plant glycoprotein

研究代表者

藤田 清貴 (FUJITA, Kiyotaka)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：20381189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アラビナンやアラビノキシラン等の植物多糖及び、エクステンシンやアラビノガラクトタン・プロテイン(AGP)等の植物糖タンパク質の末端の多くはL-アラビノース(L-Ara)で修飾されている。本研究では、*B. adolescentis* JCM1275のL-アラビノース分解酵素遺伝子クラスターにコードされた -L-アラビノピラノシダーゼ、 -L-アラビノフラノシダーゼ、 -L-アラビノフラノシダーゼの諸性質の機能解析に成功した。これらの酵素は共生関係にある他のビフィズス菌によって遊離された植物多糖及び糖タンパク質由来のオリゴ糖や二糖の分解代謝を担う酵素であると予想される。

研究成果の概要(英文)：L-Arabinose is a widely occurring sugar in plant cell wall polysaccharides and proteoglycans such as arabinan, arabinoxylan, arabinogalactan protein (AGP), and extensin. *Bifidobacterium adolescentis* encodes a gene cluster for L-arabinose degradative enzymes. In this study, we cloned and characterized GH27 -L-arabinopyranosidase (BAD_1525), GH51 -L-arabinofuranosidase (BAD_1524), GH43 -L-arabinofuranosidase (BAD_1527), GH36 -L-arabinopyranosidase (BAD_1528), and GH127 -L-arabinofuranosidase (BAD_1529) from *B. adolescentis* JCM1275.

研究分野：糖質科学

キーワード：糖質分解酵素 プレバイオティクス アラビノガラクトタン-プロテイン ビフィズス菌 腸内細菌 L-アラビノシダーゼ 植物糖タンパク質 L-アラビノース

1. 研究開始当初の背景

アラビナンやアラビノキシラン等の植物多糖及び、エクステンシンやアラビノガラクトタン・プロテイン (AGP) 等の植物糖タンパク質の末端の多くは L-アラビノースで修飾されている (図 1)。さらに、その構造はピラノース (Arap) とフラノース (Araf) に分かれ、それらが β -結合と α -結合する合計 4 種類の結合様式を組み合わせることで作り上げられている。このため、腸内環境においてビフィズス菌が植物多糖や糖タンパク質を分解代謝するためには、植物多糖の主鎖や側鎖を分解する酵素に加えて、修飾糖として付加された様々な L-アラビノースに対応した分解酵素も合わせて用意する必要がある。しかしながら、植物の多様な構造を単独の菌株で分解することは難しいため、ビフィズス菌はそれぞれ得意分野の糖質分解酵素を出し合い、ビフィズス菌同士の協力関係によって効率的に分解していると考えられている。実際に、アラビノキシロオリゴ糖を用いた資化性試験では、L-アラビノースを資化できない *Bifidobacterium adolescentis* JCM1275 株とキシロースを資化できない *B. longum* JCM1217 株が互いに補完関係にあることが示されていた (H. Pastell, *et al.*, *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 8598 (2009))。

私を含む研究グループは、*B. longum* が持つ Extensin 分解酵素群 (Fujita, K., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **289**, 5240-5249 (2014)) や AGP 分解酵素群 (Fujita, K., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 4577 (2014)) を発見すると共に、AGP から遊離されるオリゴ糖 (Arap 1,3Araf 1,3Gal₃) に作用する糖質分解酵素 (GH) ファミリー 27 に属す

-L-arabinopyranosidase (BLLJ_1823) の大腸菌での発現と性質決定に成功した (M. Shimokawa, K. Fujita, *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 1 (2015))。しかし、*B. longum* の培養菌体には -L-arabinopyranosidase

活性が確認できず、ビフィズス菌の中で *B. adolescentis* のみが酵素活性を有していた。

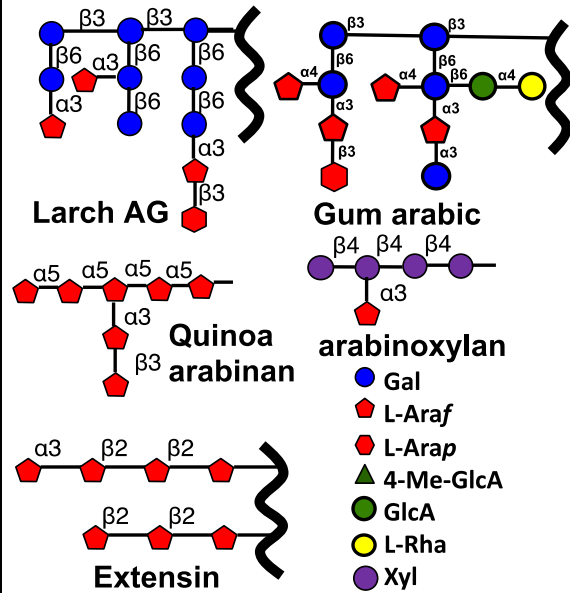


図 1. 植物多糖や植物糖タンパク質の糖鎖構造

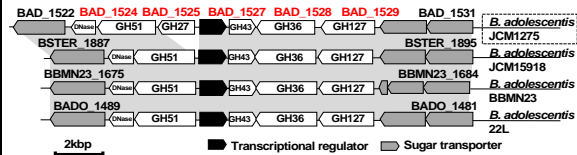


図 2. *B. adolescentis* がコードする L-アラビノース分解酵素遺伝子クラスター

2. 研究の目的

B. adolescentis JCM1275 には、BLLJ_1823 のホモログ遺伝子である GH27

-L-arabinopyranosidase 候補遺伝子 BAD_1525 と共に、BAD_1525 に隣接した GH51 -L-arabinofuranosidase (BAD_1524)、GH43 -L-arabinofuranosidase (BAD_1527)、GH36 -L-arabinopyranosidase (BAD_1528)、GH127 -L-arabinofuranosidase (BAD_1529) といった様々な L-アラビノース分解酵素の候補遺伝子が保存されていた (図 2)。また、BAD_1525 を除いて、その遺伝子群の多くはデータベース上に登録されている他の *B. adolescentis* 株にも保存されていた。これらの L-アラビノース分解酵素の全てがシグナ

ルペプチドを持たない菌体内酵素であった。このため、共生関係にあることが予想された *B. longum* 等のビフィズス菌によって部分分解されたオリゴ糖や二糖の分解代謝を担う酵素であることが予想された。そこで、この L-アラビノース分解酵素群の機能解析を行い、ビフィズス菌間の共生関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

B. adolescentis JCM1275 株からクローニングした BAD_1524・BAD_1525・BAD_1527・BAD_1528・BAD_1529 遺伝子を大腸菌で発現させ、Larch 由来のアラビノガラクトン (AG)、アラビアガム、アラビナン、アラビノキシラン及び、これらの多糖や植物糖タンパク質から調製されたオリゴ糖や pNP 基質を用いて、基質特異性及び酵素化学的諸性質の解析を行った。また、AGP から遊離された二糖である Arap 1,3Ara を炭素源とした資化性試験を行った。

4. 研究成果

大腸菌で発現させた組換え BAD_1524 タンパク質は pNP- -L-Araf のみに作用したことから、-L-arabinofuranosidase であることが確認できた。本酵素の至適 pH は 5.5、至適温度は 40 であった。また、1,3-Araf 側鎖を有するガラクトオリゴ糖鎖に作用させたところ、L-アラビノースの遊離が確認できた。

組換え BAD_1525 タンパク質は、pNP- -L-Arap と pNP- -D-galactopyranoside (Galp) に作用した。また、Larch AG からは L-アラビノースが遊離し、アラビアガムからは L-アラビノースと D-ガラクトースが遊離した。更に、1,3-Arap 側鎖を有するガラクトオリゴ糖鎖に作用させたところ、L-アラビノースの遊離が確認できた。本酵素の至適温度は 45、至適 pH は 5.0 であった。また、

A75I と G76D の変異導入を行った結果、-D-galactopyranosidase 活性が消失し、-L-arabinopyranosidase 活性のみを示した。これより BAD_1525 は、-L-arabinopyranosidase 活性と -D-galactopyranosidase 活性を合わせ持つ酵素であることが確認された。

組換え BAD_1527 タンパク質は、pNP- -L-Araf に作用したことから、-L-arabinofuranosidase であることが確認できた。また、アラビナンやアラビノキシラン、Larch AG などの 1,3-Araf 側鎖を有する多糖に作用させたところ、L-アラビノースの遊離が確認できた。

組換え BAD_1528 タンパク質は、pNP- -L-Arap に作用し、pNP- -D-Galp にもわずかに作用した。その活性を kcat/Km 値を用いて比較すると、-L-arabinopyranosidase 活性が -D-galactopyranosidase 活性の 135 倍であった。このため、BAD_1528 は GH36 で初めての -L-arabinopyranosidase であることが明らかとなった(雑誌論文 3)。また、BAD_1528 は糖転移活性を示すアノマー保持型の糖質分解酵素であり、至適温度は 40、至適 pH は 5.0 であった。

組換え BAD_1529 タンパク質は、pNP- -L-Araf に作用したことから、-L-arabinofuranosidase であることが確認できた。また、1,2-, 1,3-, 1,5-Araf 構造を持つオリゴ糖から L-アラビノースの遊離が確認できた。このため、広い基質特異性を持つ酵素であることが明らかになった。

これらの各酵素の機能解析の結果、植物多糖や糖タンパク質から遊離されたオリゴ糖は、*B. adolescentis* に取り込まれた後、BAD_1524-1529 にコードされた L-アラビノースの分解を担う菌体内酵素群の作用によって分解・代謝されると予想された(図 3)。

B. adolescentis と *B. longum* の共生関係を明らかにするため、*B. longum* によって AGP

から遊離された二糖である Arap 1,3Ara を用いた *B. adolescentis* JCM1275, JCM7046, JCM15918 の資化性試験を行った。その結果、今回用いた *B. adolescentis* 株では Arap 1,3Ara の資化性を確認することができなかつたため、*B. adolescentis* が AGP 由来のオリゴ糖を利用する明確な証拠を得ることはできなかつた。しかし、*B. adolescentis* が様々な L-アラビノース分解酵素を持っていることから、菌体内に取り込まれたオリゴ糖に修飾された L-アラビノースを除去するアクセサリ酵素として機能している可能性も高いと考えられる。様々なビフィズス菌とオリゴ糖との組み合わせた資化性試験を行うことで、ビフィズス菌間の共生関係を明らかにする必要がある。

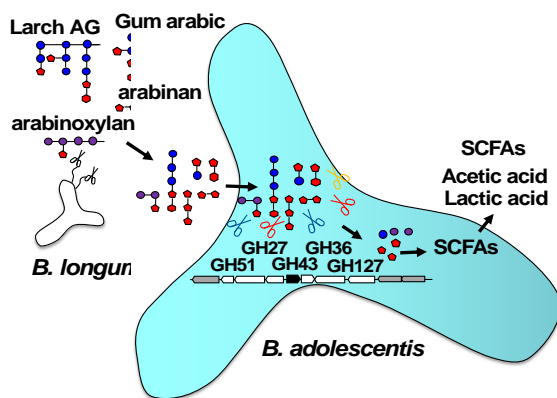


図 3. 腸内環境における *B. adolescentis* のアラビノオリゴ糖代謝システム

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Sasaki, Y., Togo, N., Kitahara, K., and Fujita, K.: Characterization of a GH36 -L-arabinopyranosidase in *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Appl. Glycosci.*, **65**, 23-30 (2018). (査読有)

10.5458/jag.jag.JAG-2018_001

2. 藤田清貴: ビフィズス菌が持つ糖タンパク質糖鎖の分解代謝システム: ビフィズス菌を増やすプレバイオティック糖タンパク質, *化学と生物*, **55**, 242-248 (2017). (査読有) 10.1271/kagakutoseibutsu.55.242
3. 藤田清貴: 糖タンパク質糖鎖の加水分解酵素に関する研究, *応用糖質科学*, **6**, 30-36 (2016). (査読有) <https://ci.nii.ac.jp/naid/110010048532>

[学会発表](計 14 件)

1. 藤田清貴、嵩下 愛果、東郷 奈未、福元 諒、角町 華子、佐々木 優紀、北原 兼文: *Bifidobacterium adolescentis* のアラビノガラクトタンパク質分解酵素群をコードする遺伝子クラスターの解析. 日本農芸化学会 2018 年度大会、(2018)
2. 佐々木 優紀、堀米 綾子、小田巻 俊孝、清水(肖) 金忠、北原 兼文、藤田清貴: ビフィズス菌のアラビアガム資化性の鍵を握る酵素 endo-1,3- -L-arabinofuranosidase の機能解析. 日本農芸化学会 2018 年度大会、(2018)
3. 藤田清貴、坂本 彩美、嵩下 愛果、東郷 奈未、北原兼文: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の II 型アラビノガラクトタンパク質分解酵素群の解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会、(2017)
4. 藤田清貴、石渡明弘、伊藤幸成、北原兼文: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来の -L-アラビノフラノシダーゼの機能解析. 第 36 回日本糖質学会年会、(2017)
5. 藤田清貴: ビフィズス菌が持つ植物

- 糖タンパク質糖鎖分解酵素の役割.
第 31 回キチンキトサン学会大会、
(2017)
6. 佐々木優紀, 東郷奈未, 北原兼文,
藤田清貴 : *Bifidobacterium*
adolescentis 由来の新規 -L-アラ
ビノピラノシダーゼの機能解析. 日
本応用糖質科学会平成 29 年度大会、
(2017)
7. 藤田清貴 : *Bifidobacterium longum*
subsp. *longum* が持つ植物 HRGP 分解
酵素群の役割. 第 8 回グライコバイ
オロジクス研究会、(2017)
8. Fujita, K., Tsunomachi, H., and
Kitahara, K.: The mechanism by
which the plant HRGPs have
prebiotic effect on
Bifidobacterium longum. Food for
Health International Conference
(FOHIC2016), (2016)
9. Fujita, K., Tsunomachi, H.,
Ishiwata, A., Ito, I., and Kitahara,
K.: Characterization of novel
-L-arabinofuranosidases acting
on HRGPs. 10th Georgia
Glycoscience Symposium / Plant
Polysaccharide Workshop 2016,
(2016)
10. Fujita, K.: Characterization of a
-1,3 specific
-L-arabinofuranosidases from
subsp. *Bifidobacterium longum*
subsp. *longum*. International
Carbohydrate Symposium 2016,
(2016)
11. 藤田清貴, 福元諒, 北原兼文 :
Bifidobacterium adolescentis 由来
の GH27 -L-アラビノピラノシダー
ゼ / -D-ガラクトピラノシダーゼ
の機能解析. 日本農芸化学会 2016
年度大会、(2016)
12. 藤田清貴, 角町華子, 石渡明弘, 伊
藤幸成, 北原兼文 : -1,3-結合に作
用する -L-アラビノフラノシダ
ゼの機能解析. 日本応用糖質科学会
平成 28 年度大会、(2016)
13. 藤田清貴, 亀山恭平, 下川倫子, 伏
信進矢, 石渡明弘, Sophon Kaeothip,
伊藤幸成, 北原兼文 : -アラビノオ
リゴ糖鎖に作用する -L-アラビノ
フラノシダーゼの機能解析. 第 34 回
日本糖質学会年会、(2015)
14. 藤田清貴 : 糖タンパク質糖鎖の加水
分解酵素に関する研究. 日本応用糖
質科学会平成 27 年度大会、(2015)

〔その他〕

ホームページ等

<https://hypba2.jimdo.com>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 清貴(FUJITA, Kiyotaka)

鹿児島大学・農水獣医学域農学系・准教授

研究者番号:20381189