

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05816

研究課題名(和文)新規アラビノビオース遊離酵素により解き明かすビフィズス菌のAGP分解メカニズム

研究課題名(英文)AGP degradative mechanism resolved by novel arabinobiose releasing enzymes

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはアラビアガムを構成するアラビノガラクトタンプロテイン(AGP)の側鎖末端に存在する二糖を遊離するビフィズス菌*Bifidobacterium longum*が持つ酵素GAfaseがアラビアガム資化性の鍵を握ることを明らかにしている。そこで、他の成人型ビフィズス菌に保存されたホモログ酵素遺伝子に着目し、その機能解析を行った。その結果、*B. pseudocatenuatum*由来の酵素がAGP全般に保存されたアラビノビオースの遊離に関わる酵素AAfaseであることを明らかにした。本研究により、多様なAGP分解酵素を持つビフィズス菌が共同でAGPを分解する仕組みの一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アラビノガラクトタンプロテイン(AGP)は全ての野菜や穀物に含まれる細胞壁構成成分の一つであり、私たちは食物繊維として日常的に摂取している。資化性試験を行うだけでビフィズス菌がプレバイオティクスとしてAGPを利用して増えることは分かるが、分解酵素を同定しなければその仕組みを理解することはできない。今回、AGPに一般的に見られる側鎖構造であるアラビノビオースを遊離する酵素を成人型ビフィズス菌*B. pseudocatenuatum*に保存されていることを明らかにできた。これは、食物繊維としてAGPを含む野菜や穀物を摂取する意義を論理的に説明することができるようになるという意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have been shown that a disaccharide at the end of the side chain of arabinogalactan protein (AGP) was released by an enzyme GAfase from *Bifidobacterium longum* and the enzyme had the key role for the gum arabic degrading ability. Therefore, we focused on the homologous enzyme gene conserved in other *Bifidobacterium* species and analyzed its function. As a result, we were able to show that the enzyme from *B. pseudocatenuatum* is an enzyme AAfase involved in arabinobiose release conserved in AGPs. We were able to clarify a part of the AGP-degradative mechanism on bifidobacteria.

研究分野：糖質科学

キーワード：アラビノガラクトタン・プロテイン ビフィズス菌 糖質分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞壁にはペクチンやヘミセルロースなどの多糖だけでなく、エクステンシンやアラビノガラクトン-プロテイン(AGP)といった β -アラビノオリゴ糖鎖や β -型アラビノガラクトン糖鎖がヒドロキシプロリンに結合した植物糖タンパク質も含まれている。ビフィズス菌は、野菜や穀物に含まれる食物繊維をエサとして利用することにより増殖し、短鎖脂肪酸を排出している。その短鎖脂肪酸はヒトのエネルギー源として利用される他、腸管中を弱酸性にすることで病原菌の増殖を抑えると共に、カルシウムなどのミネラル吸収促進作用をもたらすことが分かっている。我々は、ビフィズス菌が持つ糖質分解酵素群の解析研究により、エクステンシンや AGP の様な複雑の糖鎖構造を持つ植物糖タンパク質の分解代謝の仕組みを明らかにしてきた(K. Fujita, et. al., *Appl. Microbiol. Biotech.*, **103**, 7451 (2019))。アラビアガムは食品添加物として利用されている AGP の一つであり、他の難消化性多糖やオリゴ糖と同様にヒトの腸内でビフィズス菌を増殖させるプレバイオティクスとしての機能があることは報告されていたもののビフィズス菌の増殖機構は不明であった。我々の研究グループは、アラビアガムを構成するアラビノガラクトンプロテイン(AGP)の側鎖末端に存在する二糖を切断するビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* が持つ酵素 GAfase がアラビアガム資化性の鍵を握ることを明らかにした(Y. Sasaki, K. Fujita, et. al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **87**, e02690-20 (2021))。その相同遺伝子の検索の結果、他の成人型ビフィズス菌も AGP 分解酵素を有している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

B. longum が持つアラビアガム AGP から二糖を遊離する酵素 3-O- β -D-galactopyranosyl- β -L-arabinofuranosidase (GAfase)の相同遺伝子は、成人型ビフィズス菌としてヒトの腸内に生息する *B. pseudocatenulatum* や *B. catenulatum* などの *B. catenulatum* group に保存されていた。そこで、それらの相同遺伝子のクローニングと隣接する菌体内分解酵素の機能解析を行い、成人型ビフィズス菌における AGP 分解代謝メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

図の遺伝子クラスターで示した森永乳業保存菌株である *B. pseudocatenulatum* MCC10289 株からクローニングした MCC10289_0425 遺伝子と隣接する MCC10289_0426 遺伝子及び、基準株である *B. catenulatum* JCM1194 株からクローニングした BBCT_0495 遺伝子と隣接する BBCT_0496 遺伝子が大腸菌 BL21(DE3)株で発現させた。次に、カラマツ由来の AGP、アラビアガム AGP(セネガル種)、イネ AGP、小麦 AGP 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である methyl- β -L-arabinopyranosyl-1,3-L-arabinofuranose (AA- β -OMe)及び methyl- β -D-galactopyranosyl-1,3-L-arabinofuranose (GA- β -OMe)に作用させ、基質特異性及び酵素化学的諸性質の解析を行った。

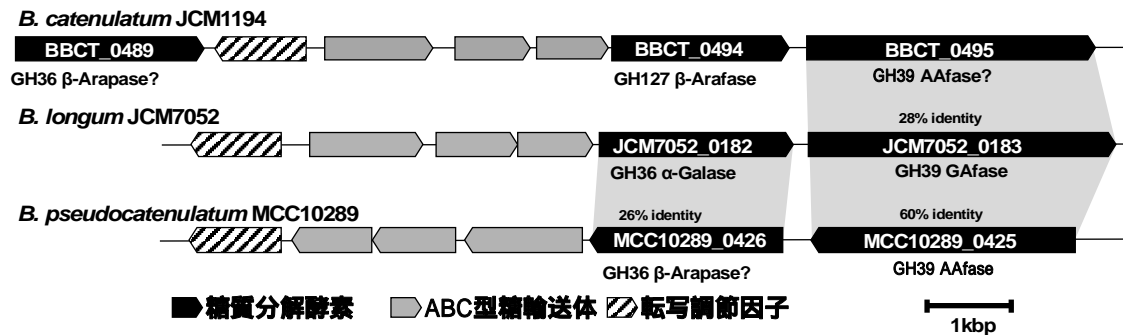


図. AGP分解酵素群をコードするビフィズス菌遺伝子クラスター

4. 研究成果

大腸菌で発現させた組換え MCC10289_0425 タンパク質は、カラマツ由来の AGP の側鎖末端に存在する L-arabinopyranosyl- 1,3-L-arabinofuranose (AA) の遊離を触媒する 3-O- -L-arabinopyranosyl- -L-arabinofuranosidase (Aafase)であることが確認できた。本酵素の至適 pH は 6.5、至適温度は 35~45 であった。カラマツ由来の AGP に対する活性を 100%として各基質に対する反応性を検討した結果、アラビアガム、アラビナンに対してはそれぞれ 43.92%、8.75%の活性を示した。また、AA- -OMe に対する活性に比較して GA- -OMe に対する活性は非常に低いことから、Aafase は Gafase とは対照的に GA よりも AA の方を優先的に遊離することが明らかになった。そこで、Gafase と Aafase の基質認識を特徴付けるアミノ酸の同定を試みた。Gafase と Aafase が認識する GA と AA の違いは、非還元末端に位置する D-galactopyranose (Galp)と L-arabinopyranose (L-Arap)のみであり、これらの糖質の構造上の違いは 5 位の CH₂OH の有無だけである。既に、ルーメン嫌気性真菌から、Galp- 1,2-Araf- 1-または Araf- 1,2-Araf- 1-を認識し、非還元末端二糖をアラビナンやアラビノキシランから切断する CAZy 糖質加水分解酵素ファミリーGH39 に属す酵素が発見されており、構造解析も行われていた(D.-R. Jones *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 12606(2017))。Gafase における Galp/L-Arap の認識に関わるサブサイト-2 に位置するアミノ酸である Asn119 は、Aafase では Tyr であった。そこで、Gafase に N119Y の変異導入を行ったところ GA- -OMe に対する活性よりも AA- -OMe に対する活性が高くなった。このため、サブサイト-2 に位置するアミノ酸が基質認識において重要な役割を担うことが明らかとなった。遺伝子クラスターで Gafase に隣接する遺伝子 JCM7052_0182 は GH36 に属す -ガラクトシダーゼをコードすることが明らかとなっている(Y. Sasaki, K. Fujita, *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, **68**, 47(2021))。これは、Gafase が遊離した GA 二糖の切断に最適化するための酵素を効率的に転写制御するビフィズス菌の糖質分解代謝システムの存在を意味していた。一方、Aafase に隣接する MCC10289_0426 は発現時に不溶化し酵素活性を測定することができなかったものの、系統解析から GH36 に属す -L-アラビノピラノシダーゼと予想された。このため、Aafase に隣接する菌体内酵素も -Arap の切断に最適化されたものと考えられる。

次に、*Bifidobacterium catenulatum* 由来の 28%の同一性を持つ Gafase ホモログ遺伝子 BBCT_0495 のクローニングとその組換え酵素の諸性質の解析を試みた。当初は、隣接遺伝子 BBCT_0494 が GH127 に属す -L-アラビノフラノシダーゼホモログをコードしていたことから AGP の側鎖末端に存在する L-arabinofuranosyl- 1,3-L-arabinofuranose (AfA) の遊離を触媒する 3-O- -L-arabinofuranosyl- -L-arabinofuranosidase (AfAafase)と予想して解析を進めたが、その組換え酵素は、AfA の構造を有するイネの AGP には作用せず、*B. pseudocatenulatum* 由来の酵素と同様にカラマツ由来の AGP の側鎖末端に存在するアラビノピオースの遊離を触媒した。ただし、その遊離活性は非常に低かった。基質探索のため、小麦 AGP やセネガル種のアラビアガムやテンサイ由来のアラビナンなどに作用させたものの、どれも低い遊離活性しか確認できなかった。次に、隣接する BBCT_0494 遺伝子の

クローニングと機能解析を行ったところ、予想通りの α -L-アラビノフラノシダーゼ活性が確認された。AGP は全ての植物に保存されている糖タンパク質であり、今回解析対象とした基質の中には真のターゲット基質が存在しなかったと予想される。

成人の大腸内では *B. longum* や *B. catenulatum* group や *B. adolescentis* 等の成人型ビフィズス菌が定着していることが知られている。我々は、*B. longum* において AGP 分解代謝システムの全容の解明に成功している。成人型ビフィズス菌が複雑な糖鎖構造を有する AGP に対応するため菌種毎に異なる分解戦略を持つことにより競合すること無く効率的に分解している姿が見えてきた。今後も地道な酵素機能解析を進めることで成人型ビフィズス菌全体の AGP 分解代謝システムの全容解明を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujita Kiyotaka, Sasaki Yuki, Kitahara Kanefumi	4. 巻 103
2. 論文標題 Degradation of plant arabinogalactan proteins by intestinal bacteria: characteristics and functions of the enzymes involved	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 7451 ~ 7457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10049-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Yuki, Horigome Ayako, Odamaki Toshitaka, Xiao Jin-Zhong, Ishiwata Akihiro, Ito Yukishige, Kitahara Kanefumi, Fujita Kiyotaka	4. 巻 87
2. 論文標題 Characterization of a novel 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase for the assimilation of gum arabic AGP in <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02690-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02690-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Yuki, Uchimura Yumi, Kitahara Kanefumi, Fujita Kiyotaka	4. 巻 68
2. 論文標題 Characterization of a GH36 α -D-galactosidase associated with assimilation of gum arabic in <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM7052	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 47 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2021_0004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Yuki, Komeno Masahiro, Ishiwata Akihiro, Horigome Ayako, Odamaki Toshitaka, Xiao Jin-Zhong, Tanaka Katsunori, Ito Yukishige, Kitahara Kanefumi, Ashida Hisashi, Fujita Kiyotaka	4. 巻 88
2. 論文標題 Mechanism of Cooperative Degradation of Gum Arabic Arabinogalactan Protein by <i>Bifidobacterium longum</i> Surface Enzymes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02187-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.02187-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sasaki, Y., Horigome, A., Odamaki, T., Jin-Zhong Xiao, Kitahara, K., Fujita, K..
2. 発表標題 Discovery and characterization of a key enzyme for the assimilation of gum arabic AGP in <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM7052.
3. 学会等名 13th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health (IPC2019). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 優紀、内村 祐美、堀米 綾子、小田巻 俊孝、清水（肖） 金忠、北原 兼文、藤田清貴
2. 発表標題 アラビアガム資化性を持つビフィズス菌由来のGH36 β -D-galactosidaseの機能解析.
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 優紀、柳田真言、吉田圭祐、小田巻 俊孝、清水（肖） 金忠、北原 兼文、藤田清貴
2. 発表標題 アラビノガラクトタンパク質に対する成人型ビフィズス菌の二糖遊離酵素の機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 優紀、堀米 綾子、小田巻 俊孝、清水（肖） 金忠、石渡明弘、伊藤幸成、北原 兼文、藤田清貴
2. 発表標題 ビフィズス菌のアラビアガム資化性の鍵を握る3-O- β -D-galactopyranosyl- β -L-arabinofuranosidaseの機能解析.
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会 応用糖質科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田清貴
2. 発表標題 成人型ビフィズス菌が持つ植物糖タンパク質糖鎖を資化するための分解酵素群.
3. 学会等名 ビフィズス菌研究会第1回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田清貴
2. 発表標題 未知の糖質分解酵素探索とビフィズス菌の生存戦略の解明.
3. 学会等名 酵素が拓くSDGs への道. JBA “未来へのバイオ技術” 勉強会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糖質分解酵素、食品添加用細菌のスクリーニング方法、プレバイオティクスの評価方法及びプライマー対	発明者 藤田清貴、石渡明弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-055336	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

藤田清貴のHP https://hypba2.jimdo.com
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------