

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380053

研究課題名(和文) ヒトと植物の複合糖鎖を分解するビフィズス菌の新規ファミリー酵素の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of novel bifidobacterial enzymes degrading human and plant glycans

研究代表者

伏信 進矢 (Fushinobu, Shinya)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00302589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：β-L-アラビノフラノシダーゼ(HypBA1)の結晶構造をGH127として初めて決定した。HypBA1はCysを活性中心に持つ世界初の「システイングリコシダーゼ」であった。B. bifidumからは新規なグリコシダーゼを4種発見した。さらに、B. longumのβ-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写誘導機構を解明し、HypBA1ホモログの諸性質の解析を行なった。

研究成果の概要(英文)：We determined the crystal structure of GH127 beta-L-arabinofuranosidase (HypBA1). HypBA1 has a Cys residue at its active center and was the first "cysteine glycosidase". We found four new glycosidases from B. bifidum. Moreover, we revealed the transcription regulation mechanism of the beta-arabinooligosaccharide degradation system in B. longum and investigated characteristics of a HypBA1 homolog.

研究分野：農学・農芸化学

キーワード：糖質分解酵素 ビフィズス菌 血液型抗原 β-アラビノオリゴ糖 複合糖鎖

1. 研究開始当初の背景

ビフィズス菌は「善玉」乳酸菌として有名であり、ヒトの健康への寄与が科学的に解明されつつある。ビフィズス菌が棲息する小腸下部から大腸の腸管には、澱粉などの分解されやすい糖質はほとんど届かないため、難分解性糖質を利用するための、多様な糖質分解酵素を有する。一般的に、ビフィズス菌の糖質分解酵素には他の細菌にはほとんど見られないユニークな酵素が多く、立体構造の新規性も高いものが多い。我々はごく最近、ビフィズス菌から、ヒトと植物の複合糖鎖を分解する新規な糖質分解酵素(Glycoside Hydrolase, GH)を相次いで発見しつつある。

2. 研究の目的

(1) 我々がビフィズス菌から発見した新規酵素群の構造・機能解析を行いビフィズス菌が多様な糖質を分解・資化する分子機構を明らかにする。ヒト B 型抗原に特異的に作用する  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ(AgaBb)、ヒト腸管ムチンの糖鎖に作用する菌体内  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(NagBb)、植物のヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖蛋白質の  $\beta$ -アラビノフラオリゴ糖に作用する  $\beta$ -L-アラビノピオシダーゼ(HypBA2)、 $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ(HypBA1)、などである。本研究で得られた知見は、新規なプレバイオティクスの開発、乳酸菌の血液型特異性の解明、B 型抗原を除去した赤血球の開発、などに貢献できると期待される。

(2) 乳幼児腸管に高頻度に見られるビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve* のうち、*B. bifidum* はムチン培地における生育が良好で、ゲノム情報からも高いムチン資化性が示唆されている。ムチン資化能は本菌のヒト腸管への定着に関与していると考えられる。そこで、*B. bifidum* のもつムチン糖鎖分解酵素を分子レベルで明らかにすることにより、ヒトとの共生メカニズムを理解することを目的とした。これらの特異なグリコシダーゼは、今後有用オリゴ糖の調製への利用が期待される。

(3) 我々が発見した  $\beta$ -L-アラビノピオシダーゼと  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼは、その新規性が認められた結果、EC 3.2.1.187 と EC 3.2.1.185 に登録されている。*B. longum* における  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解代謝機構の解明のためには、酵素群の転写単位の解明とホモログ遺伝子の機能解析が必要である。そこで、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写誘導機構の解析と HypBA1 ホモログ (BLLJ 1826 : アミノ酸同一性 38%) の諸性質の解析を目的とした (図 1)。

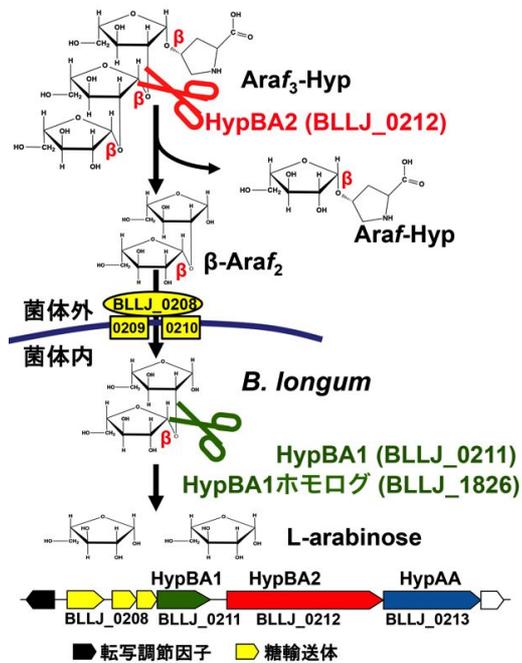


図 1 *B. longum* による  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解代謝機構

3. 研究の方法

(1) マルチドメイン酵素である AgaBb と HypBA2 に関しては、まず活性を保持する領域を絞り込んだ。続いて大腸菌でのタンパク質の大量発現と精製系を構築し、結晶化スクリーニングを行なった。結晶化に成功したサンプルに関しては主に SeMet-SAD 法などで位相決定を試みた。立体構造を決定できたサンプルに関しては、活性中心に存在する残基に部位特異的変異を導入し、変異体の活性を調べることによりその機能を調べた。HypBA1 に関しては基質が市販されていなかったため、理研の石渡明弘博士・伊藤幸成博士らにより化学合成をして頂き、その基質に対する酵素活性を調べた。また反応機構に関して米国 NREL の Gregg T. Beckham 博士らと共同研究を行い、QM/MM 法計算により酵素反応での活性化エネルギーを見積もった。

(2) *B. bifidum* JCM 1254 のゲノム中に見られるグリコシダーゼの候補遺伝子を PCR により増幅させ、pET21 ベクターを用いて大腸菌 BL21 内で高発現させた。組換え酵素の諸性質は、合成基質や天然基質に酵素を作用させ、反応液を TLC や HPLC で解析することで明らかにした。CBM の解析には等温滴定熱量計やドットプロット法を用いた。

(3)  $\beta$ -Araf<sub>2</sub>、L-Ara、グルコースを炭素源とした PYF 培地で *B. longum* JCM1217 を嫌気培養した。対数増殖後期にて集菌した菌体から mRNA を抽出後、逆転写により調製した cDNA を用いて、BLLJ\_0211 と BLLJ\_0212 に加え、 $\beta$ -Araf<sub>2</sub> の菌体内への取り込みを担う糖輸送体 BLLJ\_0208 の転写量をリアルタイム PCR により測定した。また、 $\beta$ -Araf<sub>2</sub> を炭素源

としたときのcDNAをテンプレートとして隣接する遺伝子間を増幅させることでβ-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写単位を調べた。さらに、HypBA1ホモログ(BLLJ\_1826)のクローニングを行い、大腸菌での発現解析と転写量解析、金属イオン含有量の測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1)HypBA1の合成基質 pNP-β-L-Arafを用いてHypBA1の酵素動学的パラメータを決定した(文献)。さらにHypBA1の結晶構造を、GH127ファミリーの酵素の立体構造として世界で初めて明らかにした(文献)。β-L-アラビノフラノシドに作用するグリコシダーゼの構造としても世界初となる。リガンドフリー状態とアラビノース複合体の構造をそれぞれ分解能2.2Åと2.0Åで決定した。HypBA1は触媒ドメインと2つのβ-サンドイッチドメインからなり、二量体を形成していた(図2左)。興味深いことに、活性中心にはZn<sup>2+</sup>を配位する3つのCysと1つのGluからなる新規金属結合モチーフが存在していた。E322は酸/塩基触媒残基として適当な位置に存在していた。驚くべきことに、アノマー炭素近傍で求核触媒残基として適切な位置に存在していたのは、Zn<sup>2+</sup>に配位しているC417であった。これらの残基の触媒における役割を明らかにするために変異体を作成したところ、E322およびZn<sup>2+</sup>に配位している残基では大きく活性が低下したが、特にC417の変異体では、全く活性が検出されなかった。さらに、予想される反応機構についてQM/MM計算を行なったところ、C417が求核触媒残基として働き、チオグリコシド中間体を経る二重置換機構が支持された(図2右)。以上の結果から、GH127 HypBA1は、糖質加水分解酵素としては初めてシステインが活性中心のグリコシダーゼであると提唱した。

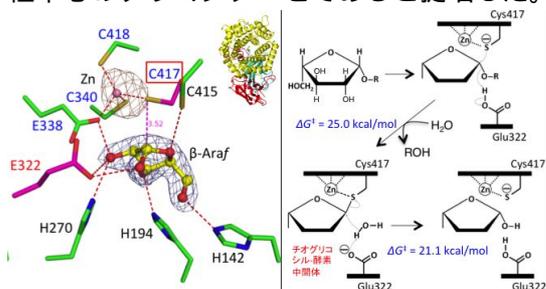


図2 HypBA1の立体構造(左)と反応機構(右)

AgaBbでは、全長1289aaのうち触媒ドメインを含み活性を保持する部分を特定することに成功した。このコンストラクトを用いてnative結晶を得て、分解能2.0Åの解説データを得ることに成功した。また、NagBbにおいても結晶化に成功し、native結晶を用いて分解能2.8Åのデータを得ている。しかし、これらのサンプルにおいては、SeMet置換体はnative結晶と同じ条件で結晶が得られない

ため、重原子同形置換法やS-SAD法により位相決定を行なっている。HypBA2では、反応産物との共結晶により結晶化に成功し、分解能2.8Åのnative結晶データを得ており、SeMet結晶の作成を行なっている。

#### (2) ムチン型糖鎖のコア1型糖鎖

(Galβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr)に特異的に作用するエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ(EngBF)にわずかな類似性を示す遺伝子nagbbを見出した(文献)。NagBbはGalNAcα1-Ser/Thrによく作用するという既知の酵素とは異なる基質特異性を示し、新規GH129ファミリーが創成された。本酵素は糖転移活性を有し、pNP-α-GalNAcを供与体、セリンを受容体とする反応において、GalNAcα1-Serを生成した。

ABO式血液型物質は分泌型のヒトのムチン上にも発現している。B型血液型物質に作用することが予想されるGH110α-ガラクトシダーゼ(AgaBb)をクローニングしたところ、B型物質によく作用したが、フコース残基(文献)を欠くりニアな構造には作用しなかった。またB型赤血球をO型に変換することができた。AgaBbにはCBM51ドメインが存在しており、このドメインがB型物質に特異的に結合して高分子多価の基質への親和性を高める作用があることを、等温滴定量計により明らかにした。

胃と十二指腸のムチンに特異的に見られるα-N-アセチルグルコサミンキャップ構造はピロリ菌の感染を阻害する生体防御因子であり、難分解性の構造である。この糖鎖に作用するGH89α-N-アセチルグルコサミニダーゼAgnBのクローニングに成功した(文献)。また、C末端にタンデムに並んだ3つのCBM32ドメインがムチン糖鎖への結合性を示し、多価基質への親和性を高めることを示した。

Sd<sup>a</sup>抗原[GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAc-R]は血液型抗原として発見されたが、消化管ムチンにも存在している。GH33α-シアリダーゼドメインとGH123β-N-アセチルガラクトサミニダーゼドメインの両方をもつユニークな酵素SiaBb3をクローニングしてSd<sup>a</sup>抗原への作用を調べたところ、ひとつの酵素でSd<sup>a</sup>抗原の末端分岐構造を分解できることが明らかになった。同様の末端構造をもつGM2に作用させたところ、ラクトシルセラミドにまで分解された。各ドメインの点変異体酵素を用いて作用機序を調べたところ、まずシアル酸が切断され、次にN-アセチルガラクトサミンが遊離することが明らかになった。

(3)β-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写量の比較を行った結果、β-Araf<sub>2</sub>を用いた際にBLLJ\_0208はグルコースの29.5倍、BLLJ\_0211は17.0倍、BLLJ\_0212は51.6倍の転写量の増加が確認された。一方、L-Ara

においては転写量の増加は確認されなかった。このため、本酵素群は $\beta$ -Ara<sub>2</sub>存在下で転写誘導されると考えられる。また、転写単位の調査を行った結果、BLLJ\_0208からBLLJ\_0213が一本のmRNAとして転写されていることを確認した。これらの結果より、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群は $\beta$ -Ara<sub>2</sub>により転写制御されるオペロンであると考えられる。

次に、HypBA1ホモログであるBLLJ\_1826の諸性質の解析を行った。BLLJ\_1826は30の培養条件で可溶化が確認され、His-tagを利用して単一精製できた。本酵素の至適温度は35から40であり、至適pHは5.0であった。本酵素はホモ二量体を形成しており、本酵素一分子中に亜鉛イオンを一分子含んでいた。また、HypBA1と同様に $\beta$ -Ara<sub>2</sub>に対して高い反応性を示した。これらの結果より、BLLJ\_1826はHypBA1と類似した機能と構造を有していると考えられる。また、BLLJ\_1826はBLLJ\_0211と同様に $\beta$ -Ara<sub>2</sub>の存在下で17.5倍の転写量の増加が確認された。このため、*B. longum*は類似した機能性を有する2つの $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼの働きにより $\beta$ -Ara<sub>2</sub>をL-Araに分解することで、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の効率的な分解代謝を行っていると考えられる。

#### 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11件)

M. Kiyohara, T. Nakatomi, S. Kurihara, S. Fushinobu, H. Suzuki, T. Tanaka, S.-I. Shoda, M. Kitaoka, T. Katayama, K. Yamamoto, and H. Ashida. An  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to a novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in an alternative mucin degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **287**, 693-700 (2012) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.277384

H. Sakurama, S. Fushinobu, M. Hidaka, E. Yoshida, Y. Honda, H. Ashida, M. Kitaoka, H. Kumagai, K. Yamamoto, and T. Katayama. 1,3-1,4- $\alpha$ -L-Fucosyltransferase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *J. Biol. Chem.* **287**, 16709-16719 (2012) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.333781

Fujita K., Kitahara K., and Sukanuma T. Functional analysis of degradative enzymes for hydroxyproline-linked  $\beta$ -L-arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **24**, 215-224 (2012). 査読有 doi: 10.4052/tigg.24.215

S. Kaeothip, A. Ishiwata, T. Ito, S. Fushinobu, K. Fujita K., and Y. Ito. Preparation of p-nitrophenyl  $\beta$ -L-arabinofuranoside as a substrate of  $\beta$ -L-arabinofuranosidase. *Carbohydr. Res.* **382**, 95-100 (2013) 査読有 doi:

10.1016/j.carres.2013.10.005

T. Ito, T. Katayama, M. Hattie, H. Sakurama, J. Wada, R. Suzuki, H. Ashida, T. Wakagi, K. Yamamoto, K. A. Stubbs, and S. Fushinobu. Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-N-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J. Biol. Chem.* **288**, 11795-11806 (2013) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M112.420109

Wakinaka T, Kiyohara M, Kurihara S, Hirata A, Chaiwangsi T, Ohnuma T, Fukamizo T, Katayama T, Ashida H, Yamamoto K. Bifidobacterial  $\alpha$ -galactosidase with unique carbohydrate-binding module specifically acts on blood group B antigen. *Glycobiology* **23** 232-240 (2013) 査読有 doi: 10.1093/glycob/cws142

Sakurama H, Kiyohara M, Wada J, Honda Y, Yamaguchi M, Fukiya S, Yokota A, Ashida H, Kumagai H, Kitaoka M, Yamamoto K, Katayama T. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. *J. Biol. Chem.* **288** 25194-25206 (2013) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.484733

T. Ito, K. Saikawa, S. Kim, K. Fujita, A. Ishiwata, S. Kaeothip, T. Arakawa, T. Wakagi, G. T. Beckham, Y. Ito, and S. Fushinobu. Crystal structure of glycoside hydrolase family 127  $\beta$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **447**, 32-37 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.096

Fujita K., Sakaguchi, T., Sakamoto, A., Shimokawa, M., and Kitahara, K. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* exo- $\beta$ -1,3-galactanase, an enzyme for the degradation of type II arabinogalactan. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4577-4584 (2014) 査読有 doi: 10.1128/AEM.00802-14

Shimada Y, Watanabe Y, Wakinaka T, Funeno Y, Kubota M, Chaiwangsi T, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T, Ashida H.  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes  $\alpha$ -linked N-acetylglucosamine at nonreducing terminus of O-glycan on gastric mucin. *Appl. Microbiol. Biotech.* **99** 3941-3948 (2015) 査読有 doi: 10.1007/s00253-014-6201-x

Shimokawa M, Kitahara K, and Fujita K. Characterization of a  $\beta$ -L-arabinopyranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *J. Appl. Glycosci.* **62**, 1-6 (2015). 査読有 doi: 10.5458/jag.jag.JAG-2014\_006

[学会発表](計13件)

S. Fushinobu, T. Ito, K. Saikawa, K. Fujita, S. Kaeothip, A. Ishiwata, and Y. Ito. The crystal structure of GH127  $\beta$ -L-arabinofuranosidase. 10th Carbohydrate Engineering Meeting, 2013年4月21-24日、プラハ(チェコ)

T. Ito, T. Katayama, M. Hattie, J. Wada, R. Suzuki, H. Ashida, T. Wakagi, K. Yamamoto, K. A. Stubbs, and S. Fushinobu. Crystal structure of lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. 10th Carbohydrate Engineering Meeting, 2013 年 4 月 21-24 日、プラハ (チェコ)

伊藤佑、齋川匡、Seonah Kim、藤田清貴、石渡 明弘、Sophon Kaeothip、荒川孝俊、若木高善、Gregg T. Beckham、伊藤幸成、伏信進矢「ピフィズス菌由来 GH127 -L-アラビノフラノシダーゼの新規な活性中心」日本農芸化学会大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学 (神奈川県川崎市)

藤田清貴、吉嶺良平、下川倫子、北原兼文「*Bifidobacterium longum*におけるβ-アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の転写解析」日本農芸化学会大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学 (神奈川県川崎市)

伏信進矢「ピフィズス菌由来 GH127 -L-アラビノフラノシダーゼの新規な活性中心」セルラーゼ研究会、2014 年 7 月 11-12 日、幕張セミナーハウス (千葉県幕張市)

伏信進矢「チオグリコシド中間体を經由する GH127 -L-アラビノフラノシダーゼの触媒メカニズム」糖質学会大会、2014 年 8 月 11 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)

櫻間晴子、清原正志、芦田 久、北岡本光、高橋里美、山本憲二、片山高嶺「ピフィズス菌由来の新規ラクト-*N*-ピオシダーゼの同定と機能解析」第 15 回 関西グライコサイエンスフォーラム(一般講演)、2014 年 5 月 24 日、大阪市立大学 (大阪府大阪市)

H. Ashida, Y. Shimada, Y. Funeno, M. Kubota, T. Chaiwangsri, T. Katoh, T. Koyanagi, H. Tamaki, K. Yamamoto and T. Katayama. Screening and analysis of useful glycosidases for production of bifidogenic factors. The 1st Joint Seminar. New Core to Core Program. A. Advanced Research Networks on "Establishment of an International Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas", 2014 年 8 月 10-11 日、バンコク (タイ)

芦田 久「ムチンの糖鎖に作用するピフィズス菌の新規グリコシダーゼ」食品酵素化学研究会第 14 回学術講演会、2014 年 8 月 30 日、大阪府立大学 (大阪府大阪市)

芦田 久「ムチン型糖鎖に作用するグリコシダーゼ ~ 土壤微生物から腸内細菌へ ~」日本応用糖質科学会第 39 回近畿支部会・講演会 (招待講演) 2014 年 11 月 15 日、近畿大学会館 (大阪府大阪市)

藤田清貴、川原由義、下川倫子、伏信進矢、石渡明弘、Sophon Kaeothip、伊藤幸成、北原兼文「*Bifidobacterium longum*にコードされたβ-L-アラビノフラノシダーゼホモログの機能解析」日本応用糖質科学会大会、2014 年 9 月 24-26 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

芦田 久、鈴木里奈「Sda 抗原を分解するピフィズス菌由来のバイファンクショナル酵

素」日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 29 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

藤田清貴、坂本彩美、下川倫子、金子哲、北原兼文「HRGP の分解に關与する *Bifidobacterium longum* 由来 -L-アラビノフラノシダーゼの機能解析」日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 29 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伏信 進矢 (FUSHINOBU, Shinya)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 00302589

### (2) 研究分担者

芦田 久 (ASHIDA, Hisashi)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号: 40370987

藤田 清貴 (FUJITA, Kiyotaka)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号: 20381189