

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580144

研究課題名(和文) ビフィズス菌のアラビノガラクトタン-プロテイン代謝機構に関わる糖質分解酵素群の解析

研究課題名(英文) Analysis of the glycosidases on the metabolism of arabinogalactan-protein in Bifidobacteria

研究代表者

藤田 清貴 (Fujita, Kiyotaka)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：20381189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アラビノガラクトタン-プロテインは、 $\alpha$ -1,3/1,6-ガラクトタン鎖がL-アラビノース等で修飾されたII型アラビノガラクトタン鎖(II型AG)を持つ植物糖タンパク質である。Bifidobacterium longum等の一部のビフィズス菌はII型AGに対する資化性を有することが報告されていたが、その分解代謝機構は未解明であった。本研究では、B. longum JCM1217株由来のエクソ- $\alpha$ -1,3-ガラクタナーゼ、 $\alpha$ -1,6-ガラクタナーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの諸性質と転写量の解析を行うことにより、B. longumにおけるII型AG分解代謝機構の全容の解明に成功した。

研究成果の概要(英文)：Type II arabinogalactan is a suitable carbohydrate source for Bifidobacterium longum, but the metabolic pathway has never been revealed. In this study, we cloned and characterized GH43 exo- $\alpha$ -1,3-galactanase (BLLJ\_1840), GH30  $\alpha$ -1,6-galactanase (BLLJ\_1841), and GH43  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (BLLJ\_1854) from B. longum JCM1217. Furthermore, we revealed a degradation pathway for type II arabinogalactan in B. longum.

研究分野：糖鎖工学、酵素工学、遺伝子工学

 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 II型  
 アラビノガラクトタン ガラクトース アラビノース

## 1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシプロリン(Hyp)が豊富な糖タンパク質(HRGP)のメンバーであるアラビノガラクトタン-プロテイン(AGP)は、 $\beta$ -1,3-ガラクトタン主鎖に $\beta$ -1,6-ガラクトタン側鎖を持つ型アラビノガラクトタン鎖(型AG)を有する植物糖タンパク質であり、その末端はL-アラビノース(L-Ara)やL-ラムノース等で修飾されている。これまでに、AGPを主成分とするアラビアガムには、ヒト腸内のビフィズス菌を増やす効果があることが確認されていた(W. Calame, *et al.*, *Br. J. Nutr.*, **100**, 1269(2008); C. Cherbut, *et al.*, *Microb. Ecol. Health Dis.*, **15**, 43(2003))。また、各種ビフィズス菌の中で *Bifidobacterium longum* と一部の *B. adolescentis* だけが型AGを利用して生育できることが報告されていた(F. Crociani, *et al.*, *Int. J. Food. Microbiol.*, **24**, 199(1994); 堀ら, 日本食品微生物学会雑誌, **24**, 163(2007))。しかし、ビフィズス菌由来の型AG分解酵素に関してはその酵素活性の報告すら無く、ビフィズス菌の型AG分解代謝機構は未解明であった。

## 2. 研究の目的

*B. longum* JCM1217株のゲノム配列情報を利用して型AG分解酵素群の探索を行った結果、型AGの分解に関与すると予想された遺伝子クラスターを見いだした(図1a)。型AG分解酵素群と予想されたBLLJ\_1840・BLLJ\_1841・BLLJ\_1854は、シグナルペプチド(SP)と膜貫通領域(TM)の予想配列を有していたことから菌体表層に局在する酵素であると予想された(図1b)。また、それらのORF中にはCAZy糖質分解酵素(GH)ファミリー43及び30に属する型AG分解酵素との相同配列が認められたため、これらの遺伝子はエキソ- $\beta$ -1,3-ガラクタナーゼ(BLLJ\_1840)、 $\beta$ -1,6-ガラクタナーゼ(BLLJ\_1841)、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ(BLLJ\_1854)をコード

すると予想された。このため、型AG分解酵素群の諸性質と転写量の解析を行うことにより、*B. longum*における型AG分解代謝機構を明らかにすることを目的とした。

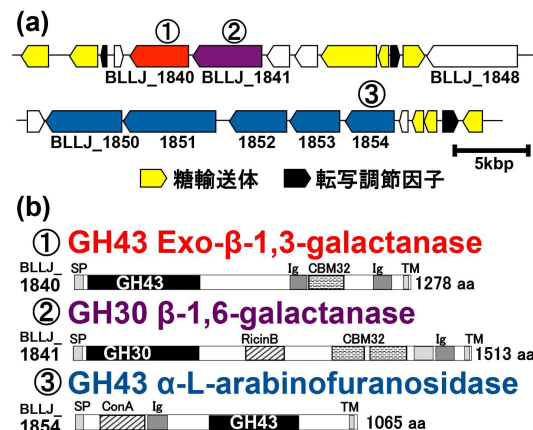


図1. *B. longum*が有する型AG分解酵素群

### (a) 型AG分解に関する遺伝子クラスター

### (b) 分解酵素群の構造モチーフ

## 3. 研究の方法

*B. longum* JCM1217株からクローニングしたBLLJ\_1840・BLLJ\_1841・BLLJ\_1854遺伝子を大腸菌で発現させ、カラマツ由来の型AG(LWAG)やアラビアガム、L-Araを除去した部分酸分解LWAGや部分酸分解アラビアガム、LWAGから調製されたオリゴ糖を利用し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、これらのオリゴ糖及び多糖を炭素源とした資化性試験と誘導生産された酵素群の転写量の解析及び酵素活性測定を行った。

## 4. 研究成果

大腸菌で発現させた各組換え酵素の基質特異性を詳細に解析し、型AGに対する本酵素群の切断様式を明らかにした(図2)。詳細は以下に示す。

組換えBLLJ\_1840タンパク質を $\beta$ -1,3-ガラクトオリゴ糖に作用させたところ、ガラクトース(Gal)の遊離が確認できた。一方、 $\beta$ -1,4と $\beta$ -1,6-ガラクトオリゴ糖には作用しなかった。本酵素の至適pHは5.5、至適温度は40であった。LWAGを基質として用いて遊離

糖の解析を行った結果、Gal、Gal- $\beta$ -1,6-Gal ( $\beta$ -1,6-Gal<sub>2</sub>)、 $\beta$ -1,6-Gal<sub>3</sub>、 $\beta$ -1,6-Gal<sub>4</sub>、L-Ara で修飾された $\beta$ -1,6-Gal<sub>3</sub> が同定された。糸状菌や放線菌で報告されているエキソ- $\beta$ -1,3-ガラクターナーゼが側鎖を除去した $\beta$ -1,3-ガラクトンに対する反応性が最も高いのに対して、本酵素は $\beta$ -1,3-ガラクトンより $\beta$ -1,6-ガラクトン側鎖を有する部分酸分解 LWAG に対して 9 倍程度高い反応性を有していた。以上の結果、BLLJ\_1840 は側鎖が付加された $\beta$ -1,3-ガラクトン主鎖を非還元末端側から切断するエキソ- $\beta$ -1,3-ガラクターナーゼであることが明らかとなった(雑誌論文 2)。

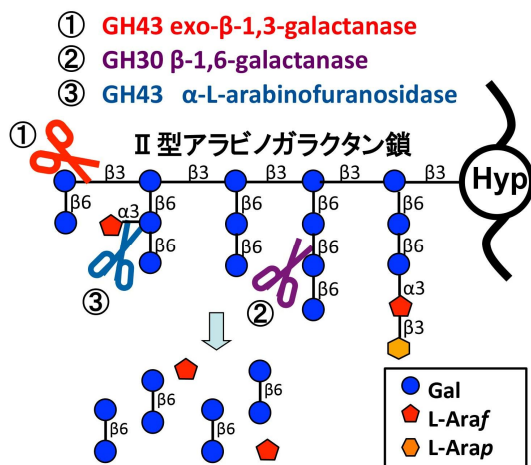


図 2. 型 AG 分解酵素群の切断様式

次に、組換え BLLJ\_1841 タンパク質を $\beta$ -1,6-ガラクトオリゴ糖 ( $\beta$ -1,6-Gal<sub>3</sub>、 $\beta$ -1,6-Gal<sub>4</sub>、 $\beta$ -1,6-Gal<sub>7</sub>、 $\beta$ -1,6-Gal<sub>8</sub>)に作用させたところ、非還元末端側からの $\beta$ -1,6-Gal<sub>2</sub>の遊離を確認した。一方、 $\beta$ -1,3と $\beta$ -1,4-ガラクトオリゴ糖には作用しなかった。本酵素の至適 pH は 4.5、至適温度は 40 であった。また、LWAG と部分酸分解 LWAG を基質として遊離糖の解析を行った結果、 $\beta$ -1,6-Gal<sub>2</sub>の遊離が確認された。このため、BLLJ\_1841 は、型 AG の $\beta$ -1,6-ガラクトン側鎖から二糖単位で $\beta$ -1,6-Gal<sub>2</sub>を遊離させる $\beta$ -1,6-ガラクターナーゼであることが明らかとなった。

次に、組換え BLLJ\_1854 タンパク質を各種 *p*-ニトロフェニル(*p*NP)基質に作用させたところ、*p*NP- $\beta$ -L-アラビノフラノシド (Araf) のみに僅かに作用したことから、 $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ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 50 であった。また、Araf 側鎖を有する $\beta$ -1,6-ガラクトオリゴ糖に作用させたところ、L-Ara の遊離が確認できた。また、LWAG 及びテンサイ由来のアラビナンからの L-Ara の遊離が確認された。これらの結果から、本酵素は植物多糖の側鎖に修飾された  $\beta$ -L-Araf を特異的に切断する  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼであると考えられる。

さらに、*B. longum* JCM1217 株を LWAG とグルコースを炭素源として培養し、Real-Time PCR を用いて各酵素遺伝子の転写量の比較を行った。その結果、LWAG を用いた際に BLLJ\_1840 は 109 倍、BLLJ\_1841 は 32 倍、BLLJ\_1854 は 34 倍の転写量の増加が確認された。また、各種炭素源を用いて培養した *B. longum* の細胞壁画分の酵素活性測定でも、LWAG を用いて培養した菌体の高い型 AG 分解活性が確認された。このため、本酵素群は型 AG 存在下で誘導生産され、型 AG を効率的に分解しているものと考えられる。

これらの研究成果を基に、*B. longum* における型 AG 糖鎖分解代謝経路を予想した(図 3 ;雑誌論文 2)。

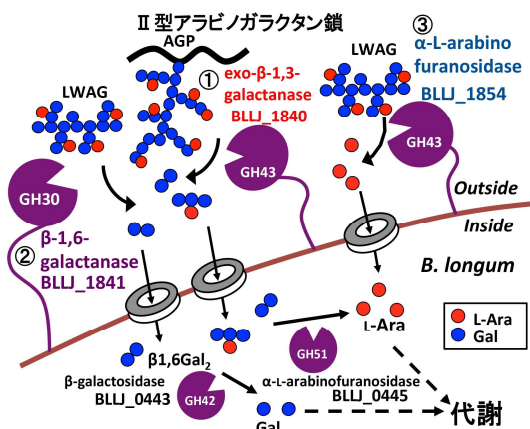


図 3. *B. longum* における型 AG 分解代謝機構

型 AG は、菌体表層に局在した 型 AG 分解酵素群により単糖から 4 糖程度の短いオリゴ糖鎖に分解された後、ABC 型糖輸送体 (BLLJ\_0446-0448) を介して菌体内に取り込まれ、菌体内酵素の GH42  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (BLLJ\_0443) 及び GH51  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ (BLLJ\_0045) の作用により単糖にまで完全に分解され代謝されるものと考えられる。

既に、我々は HRGP のメンバーであるエクステンシンの糖タンパク質糖鎖である  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の *B. longum* における分解代謝機構を明らかにしている (雑誌論文 4)。今回、新たに 型 AG 分解代謝機構を明らかにしたことにより、*B. longum* が主要な HRGP 糖鎖である 型 AG と  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の両方を効率的に分解代謝していることを明らかにした。HRGP は、ヒトの消化酵素によって分解できない食物繊維として大腸に届き、*B. longum* を選択的に増殖させることができる「プレバイオティック糖タンパク質」である。このため、HRGP を含有する野菜や穀物の細胞壁画分の摂取によりビフィズス菌が増えることにより、腸内環境を健全に保つことができると考えられる。また、増粘多糖類として認可されているアラビアガムや LWAG をサプリメントとして摂取することでも同様の効果が期待できる。今後は、*B. longum* が持つ HRGP 分解酵素群の詳細な解析を進めると共に、ヒト腸内環境で共存する他のビフィズス菌との共生関係を明らかにすることにより、プレバイオティック糖タンパク質としての HRGP の機能解明を進めていきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. 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) 10.5458/jag.jag.JAG-2014\_006
2. 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) 10.1128/AEM.00802-14
3. Ito, T., Saikawa, K., Kim, S., Fujita, K., Ishiwata, A., Kaeothip, S., Arakawa, T., Wakagi, T., Beckham G. T., Ito, Y., and Fushinobu, S.: Crystal structure of glycoside hydrolase family 127  $\beta$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **447**, 32-37 (2014). (査読有) 10.1016/j.bbrc.2014.03.096
4. Fujita, K., Takashi, Y., Obuchi, E., Kitahara, K., and Sukanuma, T.: Characterization of a novel  $\beta$ -L-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: Functional elucidation of a DUF1680 protein family member. *J. Biol. Chem.*, **289**, 5240-5249 (2014). (査読有) 10.1074/jbc.M113.528711
5. Kaeothip, S., Ishiwata, A., Ito, T., Fushinobu, S., Fujita, K., and Ito, Y.: Preparation of *p*-nitrophenyl  $\beta$ -L-arabinofuranoside as a substrate of  $\beta$ -L-arabinofuranosidase. *Carbohydr. Res.*, **382**, 95-100 (2013). (査読有) 10.1016/j.carres.2013.10.005
6. 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) 10.4052/tigg.24.215

#### 〔学会発表〕(計 14 件)

1. 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  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼの機能解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.28、岡山大学 (岡山県・岡山市)
2. 藤田清貴：ビフィズス菌における L-アラビノースの輸送体と代謝酵素の同定. 加藤記念財団 第 5 回研究助成 報告交流会、

- 2014.11.14、協和発酵キリン 東京リサーチパーク(東京都・町田市)
3. 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平成 26 年度大会、2014.9.24、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)
  4. 坂本彩美、下川倫子、小竹敬久、円谷陽一、北原兼文、藤田清貴：*Bifidobacterium longum* 由来のβ-1,6-ガラクトサン側鎖分解酵素群の機能解析。日本応用糖質科学会平成 26 年度大会、2014.9.24、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)
  5. 藤田清貴、坂本彩美、下川倫子、北原兼文：*Bifidobacterium longum* の型アラビノガラクトサン分解代謝経路の解析。第 33 回日本糖質学会年会、2014.8.10、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
  6. 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 2014 年度大会、2014.3.29、明治大学(神奈川県・川崎市)
  7. 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：ビフィズス菌由来 GH127 β-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 2014 年度大会、2014.3.29、明治大学(神奈川県・川崎市)
  8. 下川倫子、藤田清貴、北原兼文、菅沼俊彦：*Bifidobacterium longum* 由来のβ-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 25 年度大会、2013.9.25、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)
  9. 坂本彩美、坂口武則、下川倫子、藤田清貴、北原兼文、菅沼俊彦：*Bifidobacterium longum* 由来のエンド-β-1,6-ガラクトサナーゼの機能解析。日本応用糖質科学会平成 25 年度大会、2013.9.25、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)
  10. 藤田清貴、坂本彩美、坂口武則、下川倫子、北原兼文：ビフィズス菌由来の型アラビノガラクトサン分解酵素群の機能解析。第 32 回日本糖質学会年会、大阪国際交流センター、2013.8.7(大阪府・大阪市)
  11. 藤田清貴、坂口武則、北原兼文、菅沼俊彦：*Bifidobacterium longum* 由来のエキソ-β-1,3-ガラクタナーゼの機能解析。日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.26、東北大学(宮城県・仙台市)
  12. 藤田清貴：ビフィズス菌が生産する植物糖タンパク質糖鎖分解酵素群の解析。第 2 回新潟大学国際糖質科学シンポジウム、2012.11.13、新潟大学(新潟県・新潟市)
  13. 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。第 36 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2012.9.7、サンホテルフェニックス(宮崎県・宮崎市)
  14. 藤田清貴、奥山千代美、坂口武則、北原兼文、菅沼俊彦：*Bifidobacterium longum* のハイドロキシプロリンに富む糖タンパク質の分解メカニズムの解明。第 16 回腸内細菌学会、2012.6.14、神戸市産業振興センター(兵庫県・神戸市)
- ホームページ等  
<http://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・農学部・准教授  
 研究者番号:20381189
- (2)研究分担者  
 無し。
- (3)連携研究者  
 無し。
- (4)研究協力者

下川 倫子(SHIMOKAWA, Michiko)