

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14388

研究課題名（和文）腸内細菌が有する酵素特異的な専用シャペロンによるフォールディングメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the folding mechanism by LNBse-specific chaperones from Human gut bacteria

研究代表者

山田 千早 (Yamada, Chihaya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：30747944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：Bifidobacterium longum由来の母乳オリゴ糖分解酵素（LnbX）に対して特異的に作用するシャペロン（LnbY）が発見されたが、相同配列が既知のシャペロンに限らず見つからないため機能を推測することができていない。そこで本研究課題では、LnbXの下流に存在し菌体外で働くと推測される専用シャペロンLnbYによるLnbXのフォールディング作用機構を明らかにすることを目的とした。シャペロンの構造解析に関して、これまで結晶構造解析に成功していなかったLnbYのホモログであるBsaYの結晶構造を分解能2.18 Åで明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的にタンパク質の折りたたみを担う分子シャペロンと呼ばれるものは、さまざまなタンパク質に作用し折りたたむ。しかし、専用のシャペロンによるタンパク質の折りたたみがどう行われるかを明らかにするために、シャペロンの結晶構造解析に成功した。構造情報をもとに相互作用するアミノ酸残基を他の残基に変えて折りたたみしなくなるかどうか確認しているところである。タンパク質の折りたたみ機構に関する新規な機構を明らかにすることで、新たな知見を提供することができる。

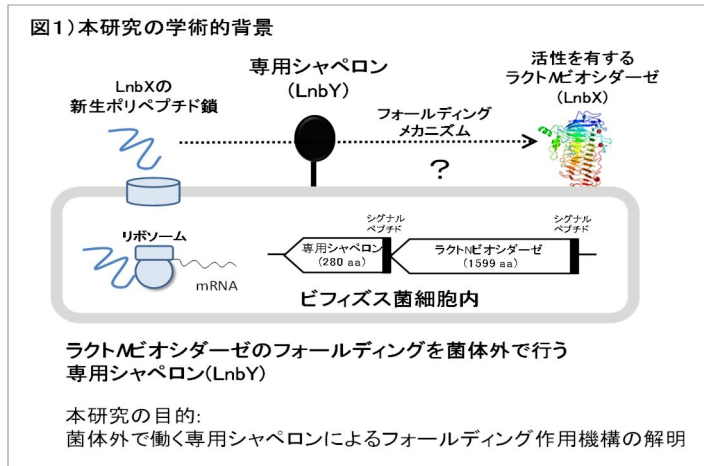
研究成果の概要（英文）：A specific chaperone (LnbY) that fold lacto-N-biosidase (LnbX) degrading human milk oligosaccharidase from Bifidobacterium longum has been discovered, but its function has not been deduced because homologous sequences are not found in all known chaperones. In this study, we aimed to elucidate the folding mechanism of LnbX by LnbY in extracellular. The crystal structure of BsaY, a homologue of LnbY, was successfully determined at a resolution of 2.18 Å.

研究分野：酵素学

キーワード：シャペロン 腸内細菌 フォールディング X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年、ビフィズス菌が有するシャペロン (LnbY) が発見された (Sakurama et al., JBC, 2013)。LnbYは興味深いことに、すぐ上流に存在する母乳オリゴ糖分解酵素 (ラクトNピオシダーゼ、LnbX) に対して特異的に作用する専用のシャペロンであると考えられている (図1)。もう一つ特徴的な点は、N末端に29残基のシグナルペプチドがあることから菌体外に局在すると予想されていることである。一般的にシャペロンのほとんどは翻訳が行われる細胞内に存在し、翻訳後の新生ポリペプチドに働くものが多いことから、LnbYはこれまでのシャペロンとは異なった特徴をしている。



2. 研究の目的

研究では、ビフィズス菌の菌体外で働く専用シャペロンによるフォールディング作用機構を明らかにすることを目的とする。






3. 研究の方法

a) シャペロンとクライアントタンパク質とのヘテロ2量体の構造解析

シャペロン LnbY とクライアントタンパク質 LnbX をコードする遺伝子を挿入したそれぞれの発現プラスミドで形質転換した大腸菌株を用いてそれぞれ発現・精製した後に結晶化スクリーニングをおこなった。その結果、20%(v/v) PEG3350、0.2 M 酢酸マグネシウムで結晶が得られ、さらに条件の精密化を行った。得られたタンパク質の結晶は、高エネルギー加速器研究機構のビームラインにて X 線回折像を得た。また、SEC-SAXS によって unfolded-LnbX と LnbY を混合して folding 過程を観察することを目的として SEC-SAXS 解析を行った。

b) 類似シャペロンの探索および基質特異性の解析

LnbY 以外に、基質タンパク質のホモログに対して働くシャペロンを合計で5つ見出し、それらのシャペロンについても LnbY と同様に機能解析を進めた (図2)。それぞれ X-Y の発現プラスミドを大腸菌にて異種発現し、Xの方が正しく折りたたまれると、フォールディングされ酵素活性が検出されることから、大腸菌の破碎液を用いて簡易的にフォールディングしたかどうかを判断した。

由来の腸内細菌の分類	由来の腸内細菌	GH136 LNBBase	立体構造と PDB ID	専用シャペロン	立体構造と PDB ID
Actinobacteria 門 Actinobacteria 綱	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 1217	LnbX	 5GQC 5GQF 5GQG	LnbY	-
	<i>Bifidobacterium saguini</i> DSM 23967	BsaX	 7V6I	BsaY	-
Firmicutes 門 Clostridia 綱	<i>Tyzzarella nexilis</i> (<i>Clostridium nexile</i>) DSM 1787	TnX	 7V6M	TnY	-
	<i>Ruminococcus lactaris</i> ATCC29176	RIX	-	RIY	-
	<i>Eubacterium ramulus</i> DSM 15684	<u>ErLnb136_{II}</u>	 6KQT 6KQS	<u>ErLnb136_I</u>	 6KQT 6KQS

ErLnb136

図2. 本研究で用いたクライアントタンパク質 LnbX ホモログ (GH136 LNBBase) とその専用シャペロン LnbY ホモログの一欄

c) *in vitro* におけるフォールディング過程の観察

unfolded-X と専用シャペロン Y をそれぞれ発現精製した後に、試験管内で混合し、Folding するかどうかを活性の有無にて判断した。250 nM unfolded-LnbX, 0 or 5 or 25 μ M LnbY (His タグ除去), 0.1 mM $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$ と 50 mM HEPES -NaOH (pH 7) を使用し 200 μ L までメスアップした反応液を 30 °C で 2 時間反応させて、酵素活性を測定した。

4. 研究成果

a-1. シャペロン LnbY と BsaY の結晶構造解析

LnbY の結晶構造解析を目的として、His タグを除去したり、これまでさまざまな結晶化条件を検討してきたが、結晶化に成功していなかった。そこで、LnbY ホモログである BsaY の発現・精製したタンパク質を用いて結晶化を行ったところ結晶化に成功し、分解能 2.18 Å で構造決定に成功した (図3)。位相の決定は、Se-SAD 法で行った。ヘリックス 8 本からなる構造をしていることがわかり、どの既知のシャペロンとも似ていなかったこと、PPIase と比較した結果、活性中心の残基も保存されていなかったことから全く異なっていることがわかった。ヘテロ二量体の構造解析を行うことを目的として LnbY と LnbX とを混合して結晶化を行ったが結晶を得ることはできなかった。

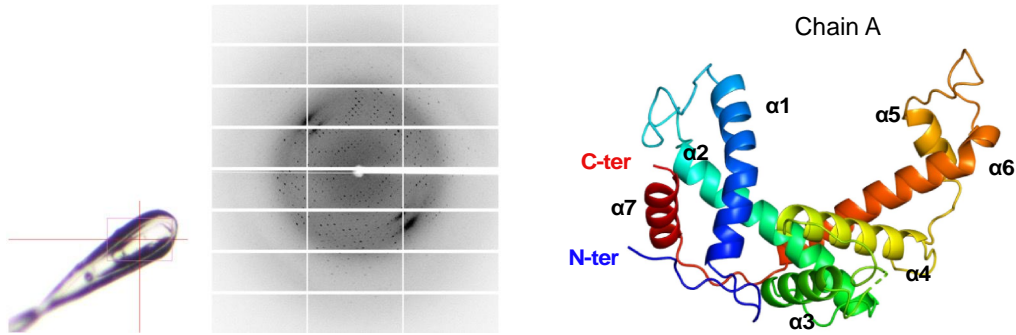


図3 BsaYの結晶とX線回折像、X線結晶構造解析

a-2. X線小角散乱法 SAXS によるシャペロン LnbY とクライアントタンパク質 LnbX とのヘテロ二量体解析

a-2-1. SEC-MALS

Unfolded-LnbXc、folded-LnbXc、LnbY、unfolded-LnbXc + LnbYに関してSEC-MALSを行った。スペクトルの位置より、unfolded-LnbXc は8636 kDa、folded-LnbXc は63.2 kDa、LnbY は28.6kDa であるという結果となったことから、溶液中でfolded-LnbXcとLnbYはそれぞれモノマー状態で存在していることがわかった。また、LnbYと混合した条件でのunfolded LnbXcは3975 kDaであるという結果となり、unfolded-LnbXcおよびunfolded-LnbXc + LnbYはSEC-SAXSの測定範囲外であることがわかった。

a-2-2. SEC-SAXS

Unfolded-LnbXcの測定はSEC-MALS解析の結果から大き過ぎてvoidの状態であり、測定できないことがわかったため、folded-LnbXcのSEC-SAXS解析を行った。ギニエ解析の結果から、 R_g は25.3 となり、 $P(r)$ 関数から、 D_{max} は77 、 R_g は25.2 となった。また、SAXS から求めたダミアトムモデルと結晶構造 (PDB ID: 5GQF) の重ね合わせはおおよそ一致した (図4) 。LnbYのSEC-SAXS解析は、ギニエ解析の結果から、 R_g は26.3 となり、 $P(r)$ 関数から、 D_{max} は100 、 R_g は27.0 となった。また、SAXS から求めたダミアトムモデルは、テールが長い結果となった。LnbY のホモログであるBsaY の結晶構造と重ね合わせを行ったところ、図4のようになったが、分子の向きがあっているかどうかは不明である。

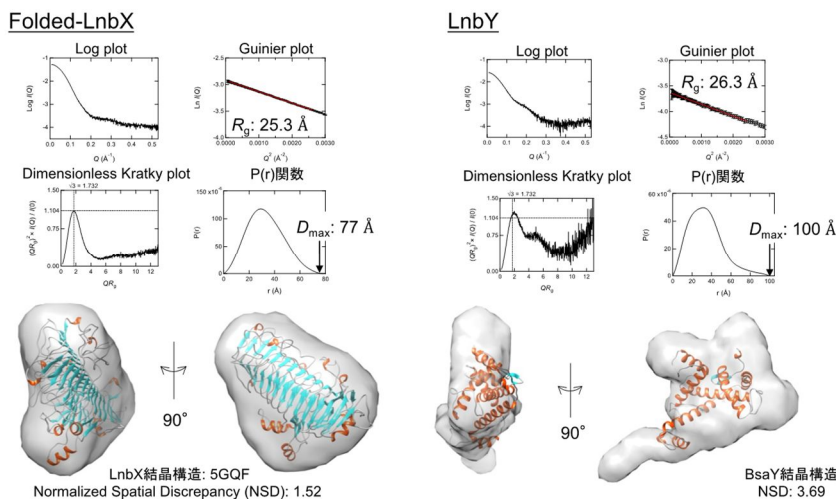


図4 SEC-SAXS 解析の結果

b. GH136LNBase とシャペロンを共発現させた大腸菌破碎液中の活性確認による特異性の解析

クライアントタンパク質GH136LNBaseとシャペロンLnbYのホモログ、それぞれを25種類の組み合わせでフォールディング活性の特異性を調べた(表1)。その結果、同じ腸内細菌由来のGH136 LNBase と専用シャペロンの組み合わせに加えて、*B. longum* subsp. *longum* 由来、*B. saguini* 由来のタンパク質の組み合わせ(LnbXcとBsaY)、*T. nexilis*由来、*R. lactaris* 由来のタンパク質の組み合わせ(TnXcとRIY、RIXcとTnY)において同じ腸内細菌由来の組み合わせと同等のLNBase 活性が確認され、BsaY はLnbXcを、RIY はTnXc を、TnY はRIXc をそれぞれフォールディングすることが示された。LnbXcとBsaXc、LnbYとBsaY、TnXcとRIXc、TnYとRIYは配列同一性が高いため、この結果は、配列同一性の高い組み合わせ同士でLNBase 活性が確認されたと考えられ、LnbY とBsaY、TnY とRIY のフォールディングメカニズムがそれぞれ類似している可能性が示唆された。これは、菌体外で働くと考えられるLnbY とBsaY、菌体内で働くと考えられるTnY とRIY でフォールディングメカニズムが異なっている可能性が考えられる。

表 1 大腸菌でクライアントタンパク質 GH136LNBase と専用シャペロン Y とを共発現させた菌体破碎液上清の活性測定の結果

		専用シャペロン					
		なし	LnbY (30-280)	BsaY (36-268)	TnY (1-247)	RIY (1-248)	<i>ErLnb136_I</i> (1-240)
GH136 LNBase	LnbXc (31-625)	n.d.	+++	+++	n.d.	n.d.	+
	BsaXc (34-640)	n.d.	+	+++	n.d.	n.d.	+
	TnXc (31-605)	n.d.	n.d.	n.d.	+++	+++	/
	RIXc (27-607)	n.d.	n.d.	n.d.	+++	+++	/
	<i>ErLnb136_{II}</i> (241-663)	n.d.	/	+	/	/	++

比活性 x (U/mg) のとき、not detected (n.d.) は $x < 0.002$ 、+ は $0.002 < x < 0.2$ 、++ は $0.2 < x < 2.0$ 、+++ は $x > 2.0$ として、4 段階で表した。

c) *in vitro* におけるフォールディング過程の観察

Unfolded-LnbX と LnbY を試験管内で混合し、Unfolded-LnbX が折りたたまれて Folded-LnbX になるかどうか酵素活性を検出することで確認した。Unfolded-LnbX や LnbY の濃度を上げて、変性剤グアニジン塩酸塩でほぐしながら Folding しても活性は見られなかったことから Folding しなかったと判断した。今後は、添加剤を加えること、また他の組み合わせでもやるなどの *in vitro* におけるフォールディング条件の再検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Michael Jakob Pichler, Chihaya Yamada, Bashar Shuoker, Maria Camila Alvarez-Silva, Aina Gotoh, Maria Louise Leth, Erwin Schoof, Toshihiko Kato, Mikiyasu Sakanaka, Takane Katayama, Chunsheng Jin, Niclas G. Karlsson, Manimozhiyan Arumugam, Shinya Fushinobu, Maher Abou Hachem	4. 巻 11
2. 論文標題 Butyrate producing Clostridiales utilize distinct human milk oligosaccharides correlating to early colonization and prevalence in the human gut	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 3285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17075-x	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 該当する

1. 著者名 Chihaya Yamada, Takane Katayama, Shinya Fushinobu	4. 巻 86
2. 論文標題 Crystal structures of glycoside hydrolase family 136 lacto-N-biosidases from monkey gut- and human adult gut bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 464-475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac015	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田千早、片山高嶺、伏信進矢
2. 発表標題 GH136に属するラクト-N-ピオシダーゼホモログの結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野菜摘、山田千早、清水伸隆、荒川孝俊、片山高嶺、伏信進矢
2. 発表標題 霊長類腸内細菌由来母乳オリゴ糖分解酵素と専用シャペロンのX線結晶構造解析とBioSAXS
3. 学会等名 量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------