

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17820

研究課題名(和文)腸内細菌由来スルフォグリコシダーゼと硫酸化ムチンの共生における機能解明と応用研究

研究課題名(英文)Functional analysis and application studies of gut microbe-derived sulfoglycosidase and sulfated mucin in symbiosis

研究代表者

加藤 紀彦 (Kato, Toshihiko)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40724612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌*Bifidobacterium bifidum*は多くの細胞表在性糖質分解酵素を有し、腸管ムチンを分解するが、詳しいメカニズムは明らかでない。そこで本研究では、*B. bifidum*由来細胞表在性糖質分解酵素のひとつであるスルフォグリコシダーゼBbhIIの性状解析を行い、以下のことを明らかにした。1) BbhIIのムチン糖鎖遊離活性の詳細と遺伝子発現のムチン応答性。および2) BbhIIのX線構造解析。本結果は有用腸内細菌の腸管適応メカニズムの理解を深めるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、ヒト腸内細菌であるビフィズス菌に硫酸化糖鎖特異的に作用するスルフォグリコシダーゼが存在すること、および本酵素がムチン分解に関連することが明らかにされるとともに、本酵素の硫酸化糖鎖認識メカニズムが構造学的に世界で初めて明らかにされた点で学術的にも価値があると考えられる。本酵素の存在の提示によってヒト腸管から分泌されるムチン分子の腸内細菌叢の形成や定着への重要性がより一層強く示されることとなった。

研究成果の概要(英文)：*Bifidobacterium bifidum*, a beneficial gut microbe, expresses many membrane-surface glycan-degrading enzymes, although by which it degrades mucin glycoproteins secreted from intestine, the details of mucin degradation were remained unclear. Therefore, one of such membrane-surface glycan-degrading enzymes from *B. bifidum*, sulfoglycosidase BbhII, was characterized in this study. The study revealed that 1) details of BbhII mucin-degrading activity and bhhII gene response upon mucin *in vitro*, 2) x-ray crystallography of BbhII. These results help understanding about the mechanism how beneficial gut microbes adapt to intestinal habitat.

研究分野：応用微生物学

キーワード：スルフォグリコシダーゼ ビフィズス菌 糖質分解酵素 ムチン 硫酸化糖鎖

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの腸内には 100 兆にも上る数の微生物が存在し、ヒトの健康と密接に関連して免疫、栄養、疾患、精神に大きな影響を及ぼす。それら腸内細菌は、腸壁から分泌されるムチンを主成分とする粘液層に生息する。小腸から大腸へと進むに従いムチンの硫酸化・シアル酸化といった酸性残基による修飾が増加する一方で、腸内細菌の生息数も小腸下部から大腸にかけて最も多くなることから、ムチンの酸性修飾と腸内細菌の間には何らかの関連があると示唆される。さらに硫酸化糖鎖は種々の免疫細胞と相互作用してその活性を制御している可能性も示されている。すなわち、硫酸化ムチンは腸管粘膜層の保護機能を有するだけでなく、腸内細菌叢全体を制御する重要な因子であると推測される。一部の腸内細菌はムチンを分解し、ムチン由来の糖を栄養源として増殖可能である。しかしながら、腸内細菌による硫酸化ムチンの詳細な分解経路が明らかでないため、硫酸化ムチンによってどのように腸内細菌叢が制御されるのかについての検証が困難であった。ところが本研究の申請前年、代表者はヒト常在性ビフィズス菌である *Bifidobacterium bifidum* より、6 位硫酸化 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc-6S) 遊離活性 (スルフォグリコシダーゼ活性) を見出し、*bbhII* が本活性をコードすることを明らかにした。さらに、別グループによって、乳児腸管に見られる *Bifidobacterium breve* は遊離 GlcNAc-6S の代謝に関与する遺伝子クラスターを保持することが報告された (Egan *et al.*, 2016, *Appl. Environ. Microbiol.*)。同時に、*B. bifidum* が遊離したシアル酸やフコースといった単糖が他の菌種にクロスフィーディングされるという報告が出され、GlcNAc-6S もシアル酸やフコースと同様にクロスフィードされる可能性が考えられた。すなわち、これらの発見は *Bifidobacterium* 属細菌に硫酸化糖鎖を分解あるいは代謝する能力があることを示唆しており、ビフィズス菌の菌叢形成に硫酸化糖鎖に関与する可能性を示す重要な根拠であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ビフィズス菌の菌叢形成に関与すると推察されるスルフォグリコシダーゼ *BbhII* に関してすでに得られた予備的成果をもとに、本酵素の酵素学的諸性質および構造学的情報のさらなる解析を行うとともに、本活性がビフィズス菌叢形成に与える影響について明らかにすることを目的とした。あわせて、構造学的情報をもとにして本酵素を改変することでこれまで合成が困難であった硫酸化糖鎖の合成に応用することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) *BbhII* 酵素の性質決定については、大腸菌でヒスタグ融合タンパク質として作製し、ニッケルカラム精製および MonoQ 陰イオン交換カラム、ゲル濾過精製に共した単一精製組換え酵素を使用し、種々の生化学的方法を用いて行った。すなわち、酵素活性の強弱を測定する際には化学発色基質 (*p*-ニトロフェニル基を結合した糖基質) を用いて遊離した *p*-ニトロフェニルの吸光度を測定することで行った。遊離した糖の検出、定量には薄層クロマトグラフィー (TLC) による検出および蛍光標識した糖サンプルの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析による定量法を用いた。質量分析による糖鎖の検出、構造の決定法は原則的に研究代表者の以前の報告 (Kiwamoto, Katoh *et al.*, 2015, *J. Aller. Clinic. Immun.*) に従った。すなわち、ムチン分子から 脱離法によって *O*-結合型糖鎖を切り出した後に、Dowex、C18 カートリッジカラムによる糖鎖精製を行い、糖鎖の完全メチル化処理を行った。メチル化された糖鎖について、MALDI-TOF/MS によって分子量の決定し、さらに MS/MS によってフラグメントパターンを分析し、GlycoMod ツールを用いて糖鎖組成を推定した。

(2) また遺伝子発現解析にはグルコースおよびブタ胃ムチン (PGM) を炭素源として含む最小培地で培養した菌体から total RNA を抽出し、個々の遺伝子特異的なプライマーを用いた定量 PCR によって発現量を測定した。*uvrD* をレファレンス遺伝子とした。

(3) X 線構造解析では、まず酵素活性を保持する最小領域について検討した。さらにそのタンパク質断片を大量に精製し、シットティングドロップ法にて *BbhII* タンパク質の結晶化を行った。セレノメチオニン置換タンパク質は、アミノ酸制限培地にセレノメチオニンを添加して発現させることで行った。X 線結晶構造解析には東京大学伏見進矢教授・山田千早助教のご協力を得て SPring-8 にてデータ収集、リファインメントを行った。GlcNAc-6S との相互作用について重要と思われる残基については部位特異的変異を導入することでアラニン置換体を作製し、活性値や速度論的パラメーターを求めることで評価した。

4. 研究成果

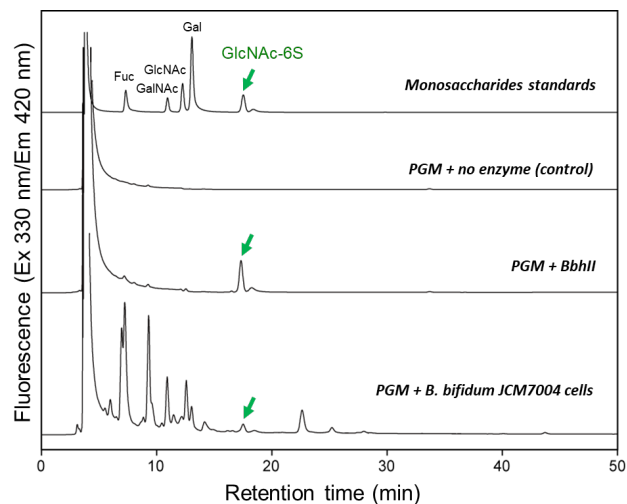


図 1、天然ムチンに対する *BbhII* の GlcNAc-6S 遊離活性を HPLC 分析によって確認した。

(1) H29 年度以前に、BbhII は化学発色基質を用いた解析から *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 遊離活性に比べてさらに強い 6-硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc-6S) 遊離活性を示すことが明らかとなっていた。そこで、引き続き天然基質に対する分解活性を検証するため、BbhII 大腸菌組換え酵素を用いて粘膜主成分であるムチンタンパク質とインキュベートし、その溶液について TLC および HPLC 分析を行った。その結果、本酵素が GlcNAc-6S を遊離することを明らかにした。さらに *B. bifidum* 菌体とムチンを混和することによっても他の糖類に混じって GlcNAc-6S の遊離が認められ、天然型 BbhII もムチンに作用可能であることが明らかにされた。本結果は BbhII が細胞表面に局在することを示唆していた。(図 1)

(2) さらに本酵素が具体的にどのような糖鎖構造に対して作用するのかについて検討するため、ブタ胃由来ムチンに BbhII 処理を行い、処理後のムチン分子上の糖鎖構造を解析した。MALDI-TOF/MS による糖鎖構造解析の結果、少なくとも 11 種の糖鎖シグナルピークについて、BbhII 処理によってシグナルが有意に減少したことを確認した(図 2A)。さらに、最も存在量の多かった *m/z* 1041 のピークについて MS/MS 分析から糖鎖構造を推定したところ、図 2C に示すようにフコシル化した Core 2 の *N*-アセチルグルコサミン残基に硫酸基が付加した構造を持つことが明らかとなった。また量的変化が検出された他の糖鎖ピークについても MS/MS 解析を行って構造を推定したところ、それらの多くは Core 2 構造の *N*-アセチルグルコサミン残基に硫酸基が結合した構造(推定構造: GlcNAc(6S) β 1-6GalNAc-Ser/Thr)を含むものであった。このことから BbhII は *N*-アセチルガラクトサミンに β 1-6 結合した GlcNAc-6S を基質として作用する可能性が示された。

(3) ムチンを炭素源とした培地で培養した菌体では、グルコース培地で培養した菌体に比べ、GlcNAc-6S 遊離活性が有意に上昇した(図 3A)。さらに定量 PCR の結果、*bbhII* 遺伝子発現量も 2 倍以上増加しており、シアリダーゼ遺伝子(*siaBb2/3*)やホスホリラーゼ遺伝子(*lnpA1/2*)など他のムチン分解系遺伝子とともにムチン存在下で発現誘導されることが明らかとなった(図 3B)。

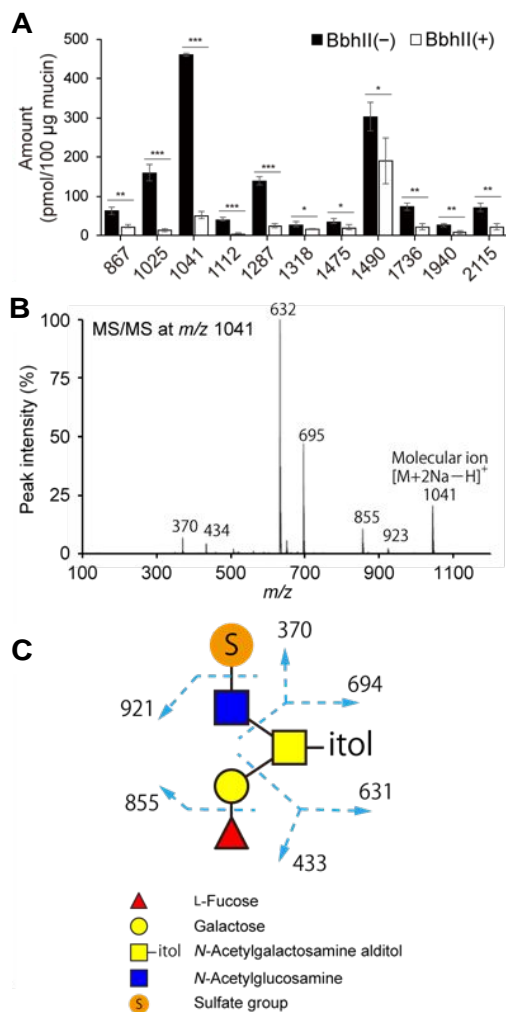


図 2、(A) BbhII 処理によって分解されたブタ結腸ムチン糖鎖の質量分析による半定量値。各バー下の数値はメチル化・糖鎖の *m/z* 値。(B) *m/z* 1041 の MS/MS フラグメントパターン。(C) B のフラグメントパターンから推定される *O*-結合型糖鎖の構造。

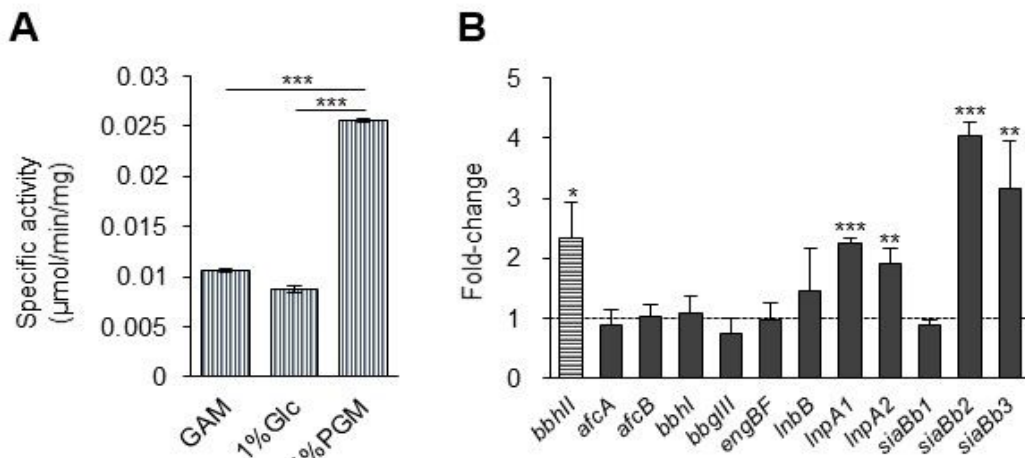


図 3、ムチン存在下における BbhII の発現上昇。(A) BbhII 活性の上昇。(B) *bbhII* および他 *B. bifidum* 糖質分解酵素遺伝子のムチン存在下での発現変化。

(4) BbhII によって遊離した GlcNAc-6S は、*B. bifidum* 自身ではなく同じビフィズスフローラに構成員である *B. breve* によって取り込まれ、代謝される可能性が指摘されていた。そのクロスフィーディングの可能性を検証するため、菌特異的プライマーを用いた PCR によって各菌種の増殖（ゲノムコピー数）について定量した。その結果、予備的ではあるものの、ムチンを含む培地において *B. breve* は単培養時と比べ、*B. bifidum* との共培養時に、有意に高い増殖能を示すという結果を得た。この結果から *B. bifidum* の分解した糖鎖が他菌種の増殖に影響を与えている可能性が示唆された。

(5) BbhII は GlcNAc-6S を遊離するという希有な基質特異性を有するため、その基質認識に興味を持たれた。そこで、BbhII の X 線結晶構造解析を行った。まず、十分なスルフォグリコシダーゼ活性を保持する最小のドメインを決定するため、N 末端および C 末端からトリミングを行い、その活性を評価した。その結果、アミノ酸 39-861aa の配列を有するタンパク質断片が 4 割程度の活性を保持し、大腸菌における組換えタンパク質の発現量も十分であることが確認された。このタンパク質について SDS-PAGE で単一タンパク質となるまで精製を行い、結晶化を試みた。その結果、いくつかの条件で平板状の結晶を得ることに成功した。本結晶について SPring8 にて X 線結晶構造データ収集しリファインメントを行ったところ、分解能 1.7Å (Native タンパク質) 1.9Å (Se-Met 置換タンパク質) でそれぞれ GlcNAc-6S との共結晶構造を得た (図 4A)。BbhII 全体構造は図 4 に示すように N 末端側の Carbohydrate binding module 32 (CBM32) ドメイン、GH20 触媒ドメイン、C 末端ドメインがリンカーを介して存在する様子が明らかとなった。Dali サーバーによる構造類似性検索の結果、GH20 触媒ドメインは *Streptomyces plicatus* 由来 β -N-hexosaminidase (SpHex) と最も類似性が高く、また CBM32 ドメインは DD2 キトサナーゼ/グルカナーゼの CBM32 ドメインと最も類似していた。C 末端ドメインと顕著な類似性が見られるものはなかった。これは結晶に用いた BbhII が完全長ではないため C 末端ドメインが不完全なフォールドをしているためと考えられた。GlcNAc-6S は BbhII の CBM32 ドメインおよび GH20 触媒ドメイン (-1) サブサイトへの結合が見られた。触媒ドメインサブサイトにおける結合にはスルホン酸との水素結合では Gln640、Trp651 が、また疎水の残基の Pro639、Val649 が周囲に存在していた (図 4B)。さらに GlcNAc の N-アセチル基の認識に関与する aromatic cage と呼ばれる残基 (Trp588、Trp607、Trp685) も保存されていた。予想と異なり、スルホン酸は正電荷を持つ残基 (Arg や Lys) との相互作用は見られなかった。また Asp552、Glu553 が触媒残基と推定された。触媒ドメインサブサイトの各アミノ酸のアラニン置換体では特に Gln640 変異体および Gln640/Trp651 二重変異体で基質親和性の低下が認められた。CBM32 ドメインと GlcNAc-6S の結合には Trp183 が疎水性平面結合をしており、Glu62、Arg95、Asn89、Ser97、Asn126 が直接の相互作用をしていた (図 4C)。こちらスルホン酸と Arg や Lys との結合は見られなかった。CBM32 ドメインが GlcNAc-6S と相互作用するという知見、およびスルフォグリコシダーゼ GH20 ドメインサブサイトの硫酸化糖認識アミノ酸残基の特定についてはこれまでに報告されておらず、本酵素の CBM32 ドメインが初めての報告となる。

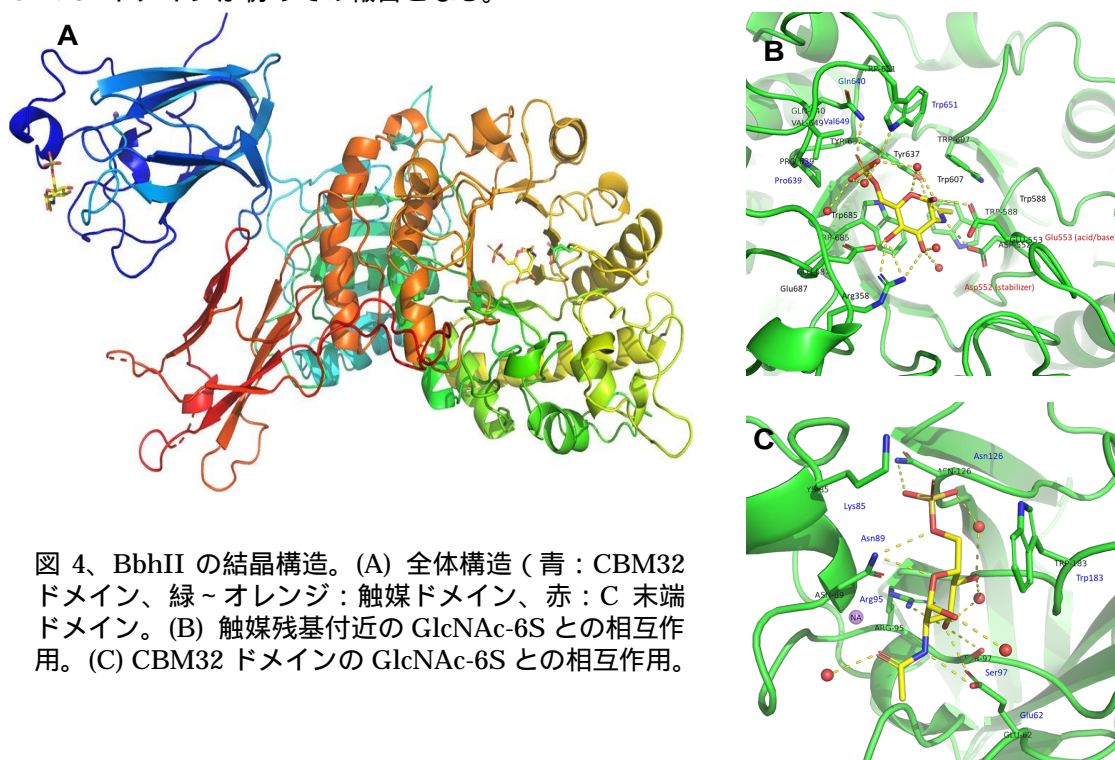


図 4、BbhII の結晶構造。(A) 全体構造 (青：CBM32 ドメイン、緑～オレンジ：触媒ドメイン、赤：C 末端ドメイン)。(B) 触媒残基付近の GlcNAc-6S との相互作用。(C) CBM32 ドメインの GlcNAc-6S との相互作用。

(6) BbhII 酵素のシンターゼ化に関して、結晶構造情報をもとに触媒残基周辺に位置するいくつかの特定のアミノ酸変異体を作製し、シンターゼ活性の有無について検討を行った。これまでのところシンターゼ活性を確認出来ていないが、引き続き検討を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Toshihiko Katoh, Takako Maeshibu, Kei-ichi Kikkawa, Aina Gotoh, Yusuke Tomabechi, Motoharu Nakamura, Wei-Hsiang Liao, Masanori Yamaguchi, Hisashi Ashida, Kenji Yamamoto & Takane Katayama. Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り、2017 Vol. 81, No. 10, 2018–2027. DOI: 10.1080/09168451.2017.1361810

[学会発表](計4件)

加藤紀彦、山田千早、前洪貴子、芦田 久、伏信進矢、片山高嶺、*Bifidobacterium bifidum* 由来スルフォグリコシダーゼ BbhII の X 線結晶構造解析、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019 年 3 月 24 日

前洪貴子、加藤紀彦、後藤愛那、山口真範、芦田久、山本憲二、片山高嶺、ムチン資化性菌 *Bifidobacterium bifidum* が産生するスルフォグリコシダーゼの機能解析、2018 応用糖質科学会第 44 回近畿支部会、2018 年 11 月 7 日

加藤紀彦、前洪貴子、吉川慶一、後藤愛那、苔米地祐輔、芦田久、山本憲二、片山高嶺、ムチン分解に関与するピフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼ A mucin-degrading sulfoglycosidase from bifidobacteria、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会、2017 年 9 月 22 日。

加藤紀彦、前洪貴子、吉川慶一、後藤愛那、山口真範、芦田久、山本憲二、片山高嶺、ムチンの硫酸化糖鎖に作用するピフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼ、第 18 回 関西グライコサイエンスフォーラム、2017 年 5 月 13 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp/katayama/Home.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：前洪貴子

ローマ字氏名：Takako Maeshibu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。