

平成22年4月26日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780056
 研究課題名（和文） 新規な酵素機能から解明するビフィズス菌とヒトとの共生関係およびその応用への展開
 研究課題名（英文） Symbiotic relationship between human and bifidobacteria: Understanding and exploiting the functions of bifidobacterial glycosidases.

研究代表者

片山 高嶺 (KATAYAMA TAKANE)
 石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
 研究者番号：70346104

研究成果の概要（和文）：母乳栄養乳児にはビフィズス菌が優先的に生息する。従来より、母乳に含まれているオリゴ糖（ヒトミルクオリゴ糖）成分が、ビフィズス菌の選択的増殖に関わるとされていたが、長い間そのメカニズムは明らかでなかった。研究代表者は、本研究において、ある種のビフィズス菌がヒトミルクオリゴ糖を特異的に分解する経路を有することを見出し、その経路上にある酵素の構造や機能を明らかにした。また、単離した酵素を改変することで、ミルクオリゴ糖の合成に成功した。

研究成果の概要（英文）：Breast-fed infants normally have intestinal microbiota dominated by bifidobacteria, in contrast to formula-fed infants. This selective growth has been attributed to oligosaccharides contained in human milk (HMOs). We found that several bifidobacterial strains have a unique metabolic pathway for degrading HMOs. We isolated the specific enzymes involved in this pathway, determined their properties and x-ray structures, and revealed their structure-function relationship. Also, we succeeded in synthesizing 2'-fucosyllactose, a major component of HMOs, by exploiting 1,2- α -L-fucosidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌・ヒトミルクオリゴ糖・ムチン型糖鎖・グリコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

ビフィズス菌は健康なヒトの腸管に生息し、整腸作用や抗感染症作用など宿主に良い影響を及ぼすプロバイオティクスとして知られている。また最近では、抗アレルギー作用や抗腫瘍作用なども報告されており、宿主腸管内での免疫調節機能の点からも注目されている。ビフィズス菌は宿主の小腸下部から大腸に生息しているが、宿主が摂取した糖成分は宿主自身による消化吸収および消化管上部に生息する腸内細菌によって消費されてしまうため、本菌の生息する消化管下部には容易に分解し得る糖成分はほとんど届かない。そのため、ビフィズス菌は多種多様な糖質分解酵素を分泌生産して、食餌性由来の難分解性とされる糖成分から栄養を獲得していると考えられてきた。

2. 研究の目的

研究代表者は、ある種のビフィズス菌が、ヒト自身の糖質（腸管内に分泌されるムチン糖タンパク質などの糖鎖）に作用する特異的な酵素を有していることを見出した。このことは、ビフィズス菌とヒトとの「共生」を考える上で大きなパラダイムとなった。そこで本研究においては、ビフィズス菌の有する「ヒトの糖質」に作用する酵素をターゲットとして、その構造機能解析を行い、共生のメカニズムを解明する上での分子レベルでの基盤作りを目指した。特に、母乳中に含まれるオリゴ糖（ヒトミルクオリゴ糖）に作用する酵素を主要なターゲットとした。

また、得られた酵素を改変利用した精密オリゴ糖合成にも取り組み、新規なビフィズス因子の創製を目指した。

3. 研究の方法

①遺伝子解析

1, 2- α -L-フコシダーゼ、1, 3-1, 4- α -L-フコシダーゼ、ラクト-N-ビオシダーゼ、エンド

- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、ガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオーストランスポーターの遺伝子を単離し、解析を行った。単離は発現クローニングや縮重プライマーなどにより行った。

②タンパク質発現

大腸菌 T7 システムを用いて上記タンパク質を発現させて、機能解析に用いた。

③機能解析

グリコシダーゼについては、基質特異性の決定や速度論的解析を行うとともに、変異体を作製して、触媒残基の同定などを行った。また、トランスポーターについては等温滴定熱量計を使用して機能解析を行った。

④X線結晶構造解析

ラクト-N-ビオシダーゼ、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、ガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオーストランスポーターについてX線結晶構造解析を行った。

⑤オリゴ糖合成

1, 2- α -L-フコシダーゼの触媒残基を改変し、ミルクオリゴ糖の主成分である 2-フコシルラクトースの酵素合成を行った。

4. 研究成果

①ビフィズス菌に特異的に存在する酵素群について

単離した遺伝子から予測されたアミノ酸配列を相同性検索した結果、ラクト-N-ビオシダーゼおよびガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオーストランスポーターは、ビフィズス菌に極めて特異的に存在していることが分かった。これらの酵素は、ヒトミルクオリゴ糖に特異的に作用する酵素であり、腸内細菌においてビフィズス菌においてのみ存在するという結果は、「母乳で育てた乳幼児には、なぜ、ビフィズス菌が多いのか」という長年の間を解明する端緒となった。

②基質特異性について

組み換え酵素を解析したところ、これらの

酵素群は、ヒトの糖質（ヒトミルクオリゴ糖およびムチン型糖鎖）に極めて高い特異性を示すことが分かった。

③X線結晶構造解析について

ラクト-*N*-ビオシダーゼについては、ラクト-*N*-ビオースとの複合体構造を約 2.5 Å の分解能で決定した。複合体との構造を解析することで、基質認識機構を詳細に解明することが可能となった。

エンド- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼは、約 2000 アミノ酸残基という巨大なタンパク質であったため、deletion 解析を行い、活性発現に重要な領域（約 1200 アミノ酸）を単離して構造解析に用いた。約 2.0 Å の分解能で構造を決定し、基質認識に関わると推測されたアミノ酸残基に変異を導入するなどして、本酵素の機能相関を明らかとした。

ガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオーストランスポーターについては、ラクト-*N*-ビオースおよびガラクト-*N*-ビオースとの複合体構造を約 2.5 Å の分解能で決定した。等温滴定量熱計の解析において、本タンパク質がラクト-*N*-ビオースに比べて、ガラクト-*N*-ビオースにより強く結合することが明らかとなっていたが、構造解析の結果、ガラクト-*N*-ビオース複合体では水素結合が一本多く形成されていることが明らかとなり、親和性の差を良く反映するものであった。

④オリゴ糖合成

1,2- α -L-フコシダーゼは、通常のグリコシダーゼとは異なる反応メカニズムで加水分解を行う。すなわち、D766 で活性化された N423 が塩基触媒として機能する。D766 をすべてのアミノ酸に置換した変異体を作製し、フッ化フコースをドナー、ラクトースをアクセプターとしてグリコシダーゼ反応を試みたところ、D766G においてのみ 2-フコシルラクトースの合成が観察された。反応産物を単離精製し、NMR および MS によって確認し、本変異型酵素の位置特異性および立体特異性を実証した。

本研究により、ビフィズス菌が有する特異

な糖代謝経路上の酵素のほぼ全容を明らかにすることが出来た。ビフィズス菌は、ヒト自身が分泌発現する糖鎖構造（ヒトミルクオリゴ糖やムチン型糖鎖）に作用し、これらを栄養源として腸管内で生息していることが強く示唆された。また、単離した酵素を改変することで、ミルクオリゴ糖の合成に成功した。2-フコシルラクトースは、ビフィズス菌を選択的に増殖するビフィズス因子としての機能だけでなく、乳幼児に深刻な下痢を引き起こすカンピロバクター・ジェジュニなどの病原微生物の感染を阻害する機能を有しており、大量生産が可能となれば粉ミルクへの添加が期待できる。

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 9 件）

- ① Yamamoto, K., Katayama, T., Kitaoka, M., and Fushinobu, S. Analyses of bifidobacterial glycosidases involved in the metabolism of oligosaccharides. (2010). *Bioscience and Microflora*. 29(1):23-30. 査読有
- ② Suzuki, R., Katayama, T., Fushinobu, S., Kitaoka, M., Kumagai, H., Wakagi, T., Shoun, H., Ashida, H., Yamamoto, K. Crystal structure of GH101 endo- α -*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. (2009). *J. Appl. Glycosci.* 56:105-110. 査読有
- ③ Kitaoka, M., Honda, Y., Fushinobu, S., Hidaka, M., Katayama, T., Yamamoto, K. (2009). Conversion of inverting glycoside hydrolases into catalysts for synthesizing glycosides employing a glycosynthase technology. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 21(117):23-39. 査読有
- ④ Katayama, T., Wada, J., Fujita, K., Kiyohara, M., Ashida, H., and

- Yamamoto, K. (2008). Functions of novel glycosidases isolated from bifidobacteria. *J. Appl. Glycosci.* 55:101-109.
- ⑤ Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T., and Yamamoto, K. (2009). Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology.* 19(9):1010-1017.
- ⑥ Suzuki, R., Katayama, T., Kitaoka, M., Kumagai, H., Wakagi, T., Shoun, H., Ashida, H., Yamamoto, K., and Fushinobu, S. (2009). Crystallographic and mutational analyses of substrate recognition of endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biochem.* 146(3):389-398.
- ⑦ Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., and Yamamoto, K. (2008). 1,2- α -L-Fucosynthase: A glycosynthase derived from an inverting α -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS Lett.* 582:3739-3743.
- ⑧ Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T., and Yamamoto, K. (2008). *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type-1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(13):3996-4004.
- ⑨ Suzuki, R., Wada, J., Katayama, T., Fushinobu, S., Wakagi, T., Shoun, H., Sugimoto, H., Tanaka, A., Kumagai, H., Ashida, H., Kitaoka, M., and

Yamamoto, K. (2008). Structural and thermodynamic analyses of solute-binding protein from *Bifidobacterium longum* specific for core 1 disaccharide and lacto-N-biose I. *J. Biol. Chem.* 283(19):13165-13173.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 片山高嶺、和田潤、本多裕司、長江雅倫、加藤龍一、若槻壮市、谷口肇、熊谷英彦、北本光、山本 憲二・ビフィズス菌由来 1,2- α -L-フコシダーゼを用いたヒトミルクオリゴ糖 2'-フコシルラクトースの合成. 2009 年度乳酸菌・腸内細菌工学研究部会講演会・加賀観光ホテル・2009 年 5 月 15 日
- ② 三宅章子、清原正志、和田潤、片山高嶺、芦田久、山本憲二・*Bifidobacterium bifidum* が分泌する特異的な α -1,3/4-L-fucosidase の解析・2009 年度日本農芸化学会大会・マリンメッセ福岡・2009 年 3 月 28 日
- ③ 和田潤、清原正志、片山高嶺、芦田久、鈴木龍一郎、伏信進矢、熊谷英彦、北岡本光、山本憲二・ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖資化経路・2008 年日本糖質学会年会・つくば国際会議場 2008 年 8 月 19 日
- ④ 片山高嶺、和田潤、山本憲二、芦田久、清原正志・ヒトミルクオリゴ糖に作用するビフィズス菌のグリコシダーゼ・2008 年度日本乳酸菌学会・京都大学百周年時計台記念館・2008 年 7 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 高嶺 (KATAYAMA TAKANE)
石川県立大学・生物資源環境学部
・准教授
研究者番号：70346104