

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15025

研究課題名（和文）ヒト腸内細菌由来の新規なルイス血液型糖鎖抗原利用因子の構造機能解析

研究課題名（英文）Structure and function analysis of a novel Lewis blood group carbohydrate antigen utilization factor from human gut bacteria.

研究代表者

山田 千早 (Yamada, Chihaya)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：30747944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌が酢酸や酪酸など短鎖脂肪酸を生成することでヒトの健康に寄与している。我々は、離乳期の子供の腸内に存在する酪酸生成Roseburia属細菌が母乳中に含まれるヒトミルクオリゴ糖からルイスa/b抗原を菌体外で切り出し取り込む新規な酵素・タンパク質を発見した。本研究では、分解酵素および取り込み結合タンパク質の立体構造を明らかにすることで離乳期における腸内細菌叢形成について分子レベルでの機能理解を深めることを目的とした。Roseburia属細菌由来の新規な糖質加水分解酵素の発現、精製、結晶化を行ったところ結晶が得られX線回折データを取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ルイスa/b抗原はヒトミルクオリゴ糖などに存在する重要な糖鎖構造である。腸内細菌由来の新規なルイスa/b抗原認識部位の特異的な配列が明らかにされることで、分子レベルでの機能理解を深めることが可能となる点で学術的意義がある。また、保存された活性残基やアミノ酸配列から他の微生物ゲノム情報に基づいて同様の活性を有しているか明らかにすることが可能になり、腸内細菌形成メカニズムの解明に寄与する知見が得られる点において社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Human gut bacteria contribute to human health by producing short-chain fatty acids such as acetate and butyrate. Novel glycoside hydrolase and binding protein were discovered from butyrate-producing Roseburia sp.. Roseburia sp. possesses the HMO utilization pathways and can utilize Lewis a/b antigen from human milk oligosaccharides in breast milk in the intestines of weaned children. In this study, we aimed to understand the function of the enzyme and the uptake-binding protein at the molecular level and to clarify the structures in the human gut microbiota formation during weaning. The novel enzyme from Roseburia sp. was expressed, purified, and crystallized, and crystals were obtained and X-ray diffraction data were obtained.

研究分野：構造解析

キーワード：ルイス抗原 腸内細菌 構造解析 糖質加水分解酵素 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には 1000 種 100 兆個もの腸内細菌が生息しており、近年、ヒトの健康や脳機能にまで影響することが明らかとなってきた (Clemente et al., Cell, 2012; Sonnenburg et al., Nature, 2016)。ヒトの胎児は無菌状態で、腸内に細菌が定着するのは産後であり、どのような細菌にさらされるかといった環境条件や食生活が大きな要因となる。乳児は母乳を飲むことで腸内にビフィズス菌が優勢となるビフィズスフローラが形成される。母乳中に含まれるヒトミルクオリゴ糖 (HMO) がビフィズス菌を特異的に増殖させることがわかってきた (Katayama, BBB, 2016)。特に産後数週間の母乳 (初乳) には HMO が 1L あたり 10-20 g 含まれ、その後の常乳中にも 10 g 程度含まれる (Urashima et al., Trend. Glycosci. Glycotecnol., 2018)。乳児期から離乳期にかけて食生活が母乳やミルクから固形食物へと劇的に変化すると腸内フローラも劇的に変化する (Odamaki et al., BMC Microbiol., 2016)。特に早期の腸内フローラは大腸がん、免疫疾患、代謝疾患の予防と関連する (Robertson et al., Trends Microbiol., 2019)。成人になると、一度定着した腸内フローラは食生活の改善だけでは変えることが困難であり、腸疾患の患者には糞便移植が治療として用いられる。また、ヒトの健康に良いということでビフィズス菌等の有名な善玉菌だけが注目される傾向があるが、Clostridiales 目細菌の存在がサルモネラ感染の抵抗性に重要であることも示されている (Kim et al., Science, 2017)。以上を踏まえ、離乳期の段階でどのような腸内フローラが形成されるかが成人になってからも重要になると考える。ルイス抗原は A 型、B 型、X 型、Y 型などがあり、血液中だけでなく HMO およびヒト腸管上皮を覆っているムチン糖タンパク質、腸管上皮細胞などに存在し、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、フコース等が結合した糖構造が特徴的である。乳児型ビフィズス菌は HMO だけでなく腸管のムチン糖タンパク質の糖鎖も特異的に分解・利用する。菌体外フコシダーゼによってフコースを遊離させてから糖鎖を利用する *Bifidobacterium bifidum* や、フコースが結合したオリゴ糖を丸ごと取り込み利用する *B. longum* subsp. *infantis* が含まれる (Sakanaka et al., Nutrients, 2020; Sela et al., PNAS, 2008)。

我々はごく最近、主要な腸内細菌の一つである酪酸生成 *Roseburia* 属細菌が離乳期に腸管に定着するために HMO やムチン糖鎖 (特にルイス抗原) を利用していることを明らかにした (Pichler & Yamada et al., Nat. Comm., 2020)。その利用方法は上述した乳児型ビフィズス菌とは異っており、新規な酵素 (RiGH136) および取り込みタンパク質 (RiSBP) が発見された。それらの新規タンパク質の分子レベルでの解析は未だ行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Roseburia* 属細菌由来の HMO およびムチン糖鎖からルイス a/b 抗原を切り出す酵素および取り込みタンパク質の立体構造を明らかにすることで離乳期における腸内細菌叢形成について分子レベルでの機能理解を深めることを目的とする。

糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase) ファミリー 136 (GH136) には、4 糖ラクト-N-テトラオースから 2 糖ラクト-N-ビオース I (LNB) を切り出す酵素ラクト-N-ビオシダーゼ (LNBase) が属する。GH136 が 2017 年に新設されたのは、2013 年に発見された乳児のビフィズス菌 *B. longum* subsp. *longum* 由来 LNBase (LnbX) の触媒ドメインの構造を我々が解明したためである (Sakurama et al., JBC, 2013; Yamada et al., CCB, 2017)。GH136 の LNBase は折りたたまれる際に専用のシャペロンを必要とする点が他の糖質加水分解酵素とは異なる。

申請者が最近立体構造を明らかにした *E. ramulus* 由来の LNBase (ErGH136) は、同一の ORF にシャペロン様ドメインが N 末側に存在し、酵素活性に必須であることが示されている。他の GH136 酵素とは全く異なる特徴をしていた (Pichler & Yamada et al., Nat. Comm., 2020)。

*R. inulinivorans* 由来の LNBase (RiGH136) のアミノ酸配列は、既知の LnbX と相同性が低く (29%)、LnbX にはないルイス a/b 抗原を切り出す新規な基質特異性を示す。特にフコース結合部位に新規性があり、立体構造解析によってフコース認識部位が明らかにすることが期待される。また同菌は菌体外で切り出したルイス a/b 抗原を取り込むための ABC トランスポーターと solute binding protein (以下 SBP) を持っている。ルイス a/b 抗原に特異的に結合するタンパク質はこれまで報告されていないことから、構造情報が明らかにされることが期待される。発見者であるデンマーク工科大学のグループと共同研究を行っており、本タンパク質の構造解析にいち早く取り組むことが可能である。また、申請者はこれまで GH136 の構造を 4 つ明らかにした経験があり、経験に基づき次の項目で述べるような工夫を行うことで本タンパク質の立体構造解析を成功させる。今後、このような新しい基質特異性を示す酵素の構造情報を基盤とし、活性残基の特定および反応メカニズムを解明することで新たな HMO 合成へと応用展開が期待される点において発展性があり創造性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) ルイス a/b 抗原を切り出す LNBase (RiGH136) の構造解析

N 末端のシグナル配列を除去した全長のコンストラクト、C 末端を削除したコンストラクトをそれぞれ作製し、大腸菌を用いて異種発現した。その後、Ni アフィニティーカラム精製、サイズ排除クロマトグラフィーに供してタンパク質を精製し、結晶化スクリーニングキットを用いて条件検討を行なった。蒸気拡散法にて 20°C で結晶化を行った。位相決定には、Alpha Fold 3 で予測した構造を基に分子置換法で行なった。さらなる分解能向上に向けて、条件の精密化を行なった。また、基質特異性に関与するアミノ酸残基の特定を目指すためにリガンドとなる糖化合物 (フコースやルイス a/b 抗原) が結合した複合体構造の取得による活性残基およびフコース認識部位を推定することを目指した。

#### (2) ルイス a/b 抗原結合タンパク質 (RiSBP) の構造解析

菌体外で切り出したルイス a/b 抗原を RiSBP は LNB よりもフコース残基を持つルイス a/b 抗原に強く結合することがわかっている。ルイス a/b 抗原が結合した結晶構造を目指して、発現系の構築を行なった。PCR の後にシームレスクローニングによりコンストラクトを作製した。現在、発現させているところである。

### 4. 研究成果

#### (1) ルイス a/b 抗原を切り出す LNBase (RiGH136) の構造解析

C 末端を削除したコンストラクトを異種発現して、3 種類のカラムに供して精製した後に結晶化試薬を用いて結晶化した (図 1)。その結果、1 週間後に結晶が得られた (図 2)。高エネルギー加速器研究機構のビームラインにて X 線回折実験を行なったところ、3 Å 程度のデータが得られた。空間群は P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> であった。分解能向上に向けて、シーディング法を用いて条件の精密化を行っているところである。また、タンパク質の発現・収率が低く、何度も発現精製を繰り返さなければならないため、発現条件の向上および破碎方法や精製方法など様々な条件検討を行っている。

#### (2) ルイス a/b 抗原結合タンパク質 (RiSBP) の構造解析

PCR の後にシームレスクローニングによりコンストラクトを作製し現在、様々な大腸菌の発現株を用いて発現検討している段階である。

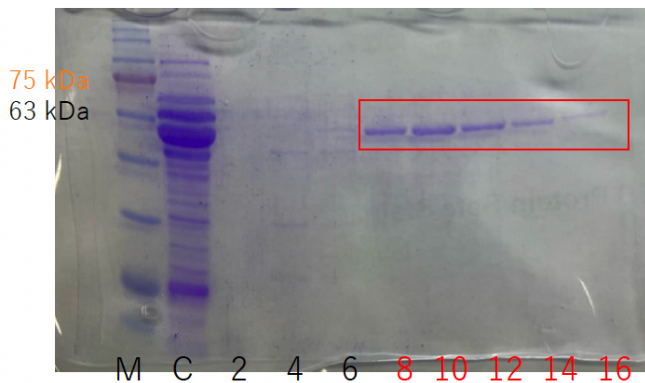


図 1 RiGH136C 末端削除タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー後の SDS-PAGE

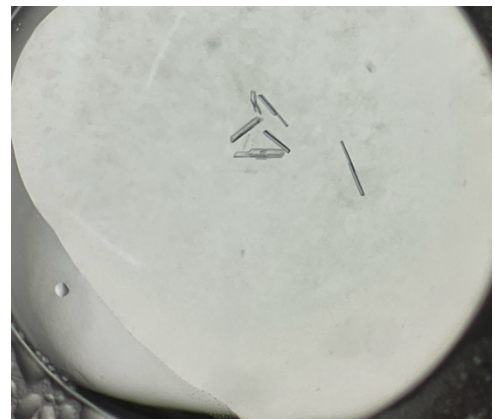


図 2 RiGH136 C 末端削除タンパク質の結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------