

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 28 年度 博士課程 進学
氏名 佐藤 真与
指導教員名 伏信 進矢

論文題目

乳児型ビフィズス菌の腸管内増殖に関わる菌体内糖代謝酵素の構造生物学的解析

近年、人の健康と腸内細菌との関係は高い社会的関心を集め、とりわけビフィズス菌は最も主要な善玉菌・プロバイオティクスとして広く親しまれている。実際にビフィズス菌は、短鎖脂肪酸の生成による免疫力向上効果や、病原菌の感染予防効果、発ガン抑制、抗炎症作用など、種々の健康促進効果を有することが科学的に明らかにされてきた。ビフィズス菌のヒト腸管内での定着や増殖を目指して、その代謝機構や増殖因子の研究は世界中で熱心に進められている。ビフィズス菌は、主に小腸下部から大腸にかけて棲息しており、この領域は澱粉などの易消化性糖質はほとんど届かない貧栄養環境である。これに対応して、ビフィズス菌は、宿主や他の細菌が利用しにくい難消化性の糖質である、食物繊維や、ヒトの消化管粘膜のムチン糖タンパク質の糖鎖なども利用していることが明らかになってきた。また、ビフィズス菌は、母乳に含まれる乳糖以外の希少オリゴ糖に特化した資化経路を有することにより、母乳栄養児ではビフィズス菌が腸内フローラの 95%以上を占める優占種となる。

本研究では、乳児で見られるビフィズス菌種より単離された、ヒト腸管内での増殖に利用すると考えられている 2 種の酵素、 α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (NagBb) と、UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (GalT_{BI}) に関して、構造と機能の解明を試みた。

第 1 章 *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来

α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (NagBb) に関する構造生物学的・生化学的解析

NagBb は、ビフィズス菌特有の糖ペプチド代謝経路で働く加水分解酵素として同定された酵素であり、消化管粘膜のムチン糖タンパク質から切り出されてビフィズス菌体内に取り込まれた Tn 抗原 (GalNAc α 1-Ser/Thr) の *O*-結合を切断する。NagBb は既存の糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase ; GH) のどのファミリーの酵素とも有意なアミノ酸配

列相同性を示さなかったため、新規ファミリーとして GH129 に分類された。

X線結晶構造解析により、NagBb のリガンド未結合および GalNAc 複合体状態の立体構造を決定し、変異体解析を通じて触媒残基を決定した。さらに、基質 GalNAc を認識する新たな金属サイト (M1) が見出された。M1 サイトでは GalNAc の *N*-アセチル基の酸素が 2 つの水に結合する形で認識され、GH ファミリーにおいては活性部位におけるこのような様式は初めての知見であった。M1 サイトの中心金属イオンについて、配位状況から Ca^{2+} であると推測されたが、以下の種々の分析を行い、金属種の同定を試みた。

まず、EDTA 処理にて金属を取り除いた NagBb 酵素に対して、様々な金属イオン添加条件で活性測定を行った。しかし、今回の実験を行った範囲内では完全に活性が回復するものは見られなかった。NagBb には M1 サイトとは別に、もう一つ金属サイト (M2) が存在し (こちらは異常分散データの取得により、 Zn^{2+} と同定された)、金属サイトが複数あることにより、金属を 1 種類ずつ添加する実験では判断が難しいと考えられた。また、ICP-MS 装置を用いて金属定量を行った。M2 サイトの Zn^{2+} は常にタンパク分子 1 mol に対して約 1 : 1 のモル比で定量されたのに対し、 Ca^{2+} および Mg^{2+} は外部混入を防ぎ測定精度を保つことが困難であった。

次に、NagBb 結晶に対して X 線蛍光測定による波長スキャン解析を行い、重金属の特性 X 線を調査した結果、M2 サイトに含まれる Zn^{2+} 以外には、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} などの 2 価重金属イオンは検出されないことを確認した。さらに、 Ca^{2+} の吸収端波長 (3.07 Å) をまたぐ 2 つの波長における X 線結晶回折データを取得した。短波長側 (high energy 波長 2.70 Å) では金属の異常分散差フーリエピークが見られたが、長波長側 (low energy 波長 3.15 Å) で取得したデータでは、M1 サイトに重なる位置に明瞭なピークは観察されなかった。これにより、M1 サイトの金属イオンが Ca^{2+} であることを示す結果が得られた。また、金属配位子である His271、His320、Asp322、His366 の Ala への四重変異体立体構造も決定したところ、M1 サイトの金属異常分散ピークは消失し、基質と共結晶化したにも関わらず基質の電子密度も見られなかった。このことから、M1 サイトの中心金属が、*N*-アセチル糖認識に重大な貢献をすると判断された。

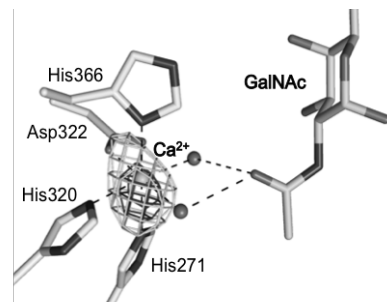


図1. 2.7 Å における M1 サイト中心金属付近の異常分散差フーリエ電子密度マップ (3.5 σ)

以上の知見に、阻害剤を用いた結晶学および酵素学的解析を加え、NagBb の触媒機構を推定した。GH129 ファミリーに属する別の菌種由来の酵素との立体構造の比較を行うことにより、M1 サイトがビフィズス菌由来の GH129 酵素に特有の構造であることと、ビフィズス菌の GalNAc 含有オリゴ糖代謝系を構築する酵素における *N*-アセチル糖認識

の重要性がより明確になった。

第2章 *Bifidobacterium longum* JCM1217 株由来

UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (GalT_{BI}) に関する 構造生物学的・生化学的解析

ビフィズス菌は、母乳オリゴ糖を構成するラクト-*N*-ビオース (Gal- β 1,3-GlcNAc ; LNB) とムチン型糖鎖を構成するガラクト-*N*-ビオース (Gal- β 1,3-GalNAc ; GNB) と呼ばれる二糖に関する特異的な糖代謝経路である GNB/LNB 経路を有する。GalT_{BI} はこの経路中で働く菌体内酵素で、経路の上流で生成してきた GalNAc1P と UDP-GlcNAc の間における UMP 基の交換反応を行い、UDP-GalNAc と GlcNAc1P を生成する反応を触媒する。GalT 活性を持つ酵素は Class I と Class II に分類されており、Class I の GalT は真核生物から原核細菌まで多種多様な生物が有するガラクトース代謝を担う Leloir 経路中で働く酵素である。一方、Class II の GalT は *Firmicutes* 門と *Actinobacteria* 門の限られた生物にしか存在しない。*B. longum* JCM1217 株はゲノム中に GalT 遺伝子を 2 つ持ち、それぞれ GalT1、GalT2 と呼ばれる。GalT1 と GalT2 はそれぞれ Class I と Class II に属し、本研究で GalT_{BI} として取り扱っている酵素は GalT2 である。GalT1 と GalT2 を同時に有する種は、*B. longum* subsp. *longum*、*B. longum* subsp. *infantis*、*B. bifidum*、*B. breve* という、乳児で特に多く見られる乳児型ビフィズス菌の 4 種のみであることが明らかになっている。GalT1 と GalT2 の配列相同性は約 12% とかなり低い。この新規性と独自性が非常に高い GalT_{BI} に関して、Class II GalT として初めて立体構造を明らかにすることを目的として、研究を行った。

様々な結晶化条件を模索した結果 GalT_{BI} の結晶化に成功し、X 線回折測定と Se-SAD 法による位相決定を経て立体構造を決定した。GalT_{BI} の全体構造は、N 末端に 5 つの α ヘリックスから成る付加ドメイン (Auxiliary 1)、中心部に 2 つの histidine triad 様フォールドドメイン (HIT1、HIT2)、そして周辺部の基質の壁を構成する補助ドメイン (Auxiliary 2) から成っていた。

基質の 1 つである UDP-ガラクトースの複合体構造により、酵素の糖認識に関する示唆が得られた。この周囲の残基の Ala 変異体について活性測定を行い、これらの残基が触媒反応に関わっている可能性が極めて高いことが示された。本研究により、GalT 酵素の糖認識における示唆が新たに得られた。すなわち、Class I の GalT は、糖基質側の認識は、ホモ二量体を形成するもう一方のプロトマーの残基によりなされるが、単量体で機能する GalT_{BI} は Auxiliary 2 ドメイン中の残基により糖が認識されることが明らかになった。

野生型 GalT_{BI} について、酵素学的パラメータを算出した結果、Gal1P に対する K_m が 2.56 mM であるのに対し、GalNAc1P に対する K_m が 0.0492 mM と、約 50 倍高い親和性を示すことが分かった。一方 GalT1 は Gal1P を基質とするものの、GalNAc1P は基質にできないことが分かっている。この結果は、GalT_{BI} が GalNAc1P を基質とするように適応していることを示しており、*N*-アセチル基およびその認識が GalT2 を保有するビフィズス菌の資化において非常に重要なであることを示している。

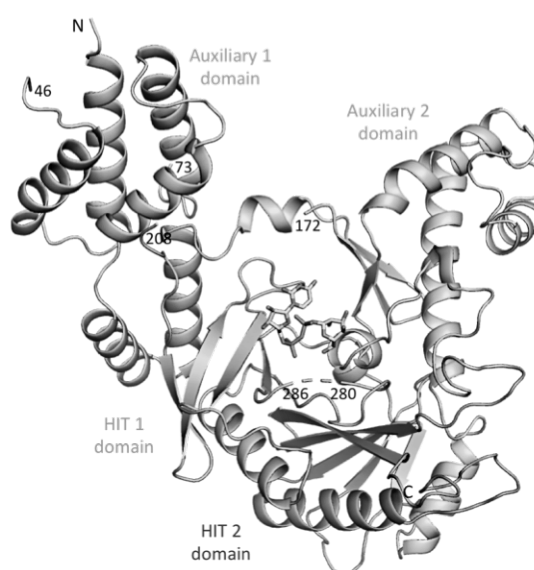


図2. GalT_{BI}の全体構造

総括

本研究により、これら2つの酵素はビフィズス菌に特有であり、ヒト腸内での増殖のために、ビフィズス菌がこれらの酵素機能を独自に獲得してきた証拠が示された。NagBb や GalT_{BI} からは、特に、GalNAc 基質の *N*-アセチル基の認識を独自に進化させてきたと思われる痕跡が見出された。本研究により、ビフィズス菌の増殖因子に関する新たな知見が得られ、今後のヒト腸管内におけるビフィズス菌の定着に役立つことが期待される。

発表論文

- (1) Sato, M., Arakawa, T., Nam, Y. W., Nishimoto, M., N., Kitaoka, M., Fushinobu, S. (2015) "Open-close structural change upon ligand binding and two magnesium ions required for the catalysis of *N*-acetylhexosamine 1-kinase" *BBA - Proteins & Proteomics*, **1854**, 333-340
- (2) Sato, M., Liebschner, D., Yamada, Y., Matsugaki, N., Arakawa, T., Wills, S. S., Hattie, M., Stubbs, K. A., Ito, T., Senda, T., Ashida, H., Fushinobu, S. (2017) "The first crystal structure of a family 129 glycoside hydrolase from a probiotic bacterium reveals critical residues and metal cofactors" *J. Biol. Chem.*, **292**, 12126-12138