

博士論文

# ビフィズス菌の新規糖質関連酵素の 構造機能解析

平成 31 年度入学 鹿島 騰真  
指導教員 伏信 進矢



# 目次

略語表.....	1
序.....	4
0.1. はじめに.....	5
0.2. 腸内細菌とビフィズス菌.....	5
0.2.1. 宿主の成長の変化に伴う腸内細菌叢とビフィドームの変化.....	5
0.2.2. ビフィズス菌が生育に用いる炭素源の種類.....	6
0.3. 糖質関連酵素 (CAZyme) .....	6
0.3.1. 糖質加水分解酵素 (GH) .....	7
0.3.2. 糖質結合モジュール (CBM) .....	8
0.4. 本研究の目的 .....	10
第1部 乳児型ビフィズス菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM1254 株の ムチン含有 Core 2 O-glycan 代謝経路関連酵素の構造機能解析.....	11
1.0.1. はじめに .....	12
1.0.1.1. ヒト消化管由来ムチン型糖タンパク質の糖鎖 .....	12
1.0.1.2. <i>B. bifidum</i> JCM1254 株の Core 2 O-glycan 代謝経路 .....	14
第1章—B型血液型抗原に特異的な GH110 $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb の構造解析 .....	15
1.1.1. はじめに .....	15
1.1.1.1. ムチン糖鎖の血液型抗原と GH110 について.....	15
1.1.1.2. CBM51 について.....	17
1.1.1.3. AgaBb について.....	17
1.1.1.4. 本研究の目的.....	18
1.1.2. 方法 .....	19
1.1.2.1. 本研究で用いた AgaBb コンストラクト .....	19
1.1.2.2. AgaBb コンストラクトの構築 .....	19
1.1.2.3. ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) .....	21
1.1.2.4. DpnI 処理 .....	22
1.1.2.5. 形質転換 .....	22
1.1.2.6. プラスミド抽出 .....	23
1.1.2.7. 発現検討 .....	23
1.1.2.8. SDS-PAGE .....	24
1.1.2.9. 小スケールでの Ni アフィニティークロマトグラフィー(バッチ法)精製.....	24
1.1.2.10. 培養のスケールアップ .....	25
1.1.2.11. タンパク質の精製.....	25
1.1.2.12. 薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography、TLC) .....	26
1.1.2.13. 分子量測定とオリゴマー状態の検証 .....	27
1.1.2.14. 熱安定性試験 (thermal shift assay) .....	27
1.1.2.15. Pre-Crystallization Test (PCT) .....	27
1.1.2.16. 結晶化スクリーニング .....	27
1.1.2.17. 結晶化条件の最適化 .....	27
1.1.2.18. シーディング .....	28
1.1.2.19. X線回折強度データ収集.....	28

1.1.2.20. 結晶構造解析 .....	29
1.1.2.21. クライオ電子顕微鏡観察用グリッドの作製 .....	29
1.1.2.22. 粒子画像の撮影 .....	29
1.1.2.23. 粒子画像のプロセッシング .....	30
1.1.2.24. 系統樹 .....	30
<b>1.1.3. 結果 .....</b>	<b>31</b>
1.1.3.1. T7-tag_AgaBb700 コンストラクトの構造 .....	31
1.1.3.2. リガンド存在下での T7-tag_AgaBb700 コンストラクトの結晶化 .....	33
1.1.3.3. T7-tag_AgaBb673 コンストラクトの構造解析 .....	35
1.1.3.4. 良質な結晶の取得を目指したコンストラクトの再検討 .....	39
1.1.3.5. AgaBb1099 と AgaBb1180 の結晶化 .....	43
1.1.3.6. AgaBb1180 のクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析 .....	46
<b>1.1.4. 考察 .....</b>	<b>50</b>
1.1.4.1. AgaBb の結晶構造決定 .....	50
1.1.4.2. AgaBb の安定化に関わる配列の発見 .....	53
1.1.4.3. AgaBb のダイマー化とマルチプルドメイン構造の柔軟性について .....	54
1.1.4.4. 血液型変換と異種移植における GH110 の応用研究について .....	55
<b>第 2 章—ムチン糖鎖や HMO の修飾糖分解酵素 GH95 <math>\alpha</math>1,2-fucosidase AfcA に付属する新規 CBM の構造解析 .....</b>	<b>57</b>
<b>1.2.1. はじめに .....</b>	<b>57</b>
1.2.1.1. ムチン糖鎖と HMO に含まれる Fuc について .....	57
1.2.1.2. GH95 $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA について .....	58
1.2.1.3. N 領域の機能について .....	59
1.2.1.4. 本研究の目的 .....	60
<b>1.2.2. 方法 .....</b>	<b>61</b>
1.2.2.1. タンパク質の調製 .....	61
1.1.2.2. Pre-Crystallization Test .....	61
1.1.2.3. 結晶化スクリーニング .....	61
1.1.2.4. 結晶化条件の最適化 .....	61
1.1.2.5. シーディング .....	61
1.1.2.6. X 線回折強度データ収集 .....	61
1.1.2.7. 結晶構造解析 .....	61
1.1.2.8. 系統樹 .....	62
<b>1.2.3. 結果 .....</b>	<b>63</b>
1.2.3.1. AfcA NM E1142A コンストラクトの構造決定 .....	63
1.2.3.2. N1、N2 の 2'-FL との結合様式の同定 .....	65
<b>1.2.4. 考察 .....</b>	<b>68</b>
1.2.4.1. AfcA の N 領域の構造決定 .....	68
1.2.4.2. AfcA の C 領域について .....	69
1.2.4.3. 既報の Fuc を認識する CBM について .....	70
<b>第 3 章—ムチン糖鎖特有の硫酸化糖質分解酵素 GH20 <math>\beta</math>-6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII の阻害に関する 酵素学的・構造生物学的解析 .....</b>	<b>71</b>
<b>1.3.1. はじめに .....</b>	<b>71</b>
1.3.1.1. ムチン糖鎖の硫酸化と GH20 BbhII について .....	71

1.3.1.2. BbhII の結晶構造 .....	74
1.3.1.3. $\beta$ -6-SO <sub>3</sub> -N-acetylglucosaminidase の阻害剤 .....	75
1.3.1.4. 本研究の目的 .....	75
<b>1.3.2. 方法 .....</b>	<b>77</b>
1.3.2.1. 阻害剤、基質と発現プラスミド .....	77
1.3.2.2. 形質転換 .....	77
1.3.2.3. プラスミド抽出 .....	77
1.3.2.4. 発現検討 .....	77
1.3.2.5. SDS-PAGE .....	78
1.3.2.6. 培養のスケールアップ .....	78
1.3.2.7. タンパク質の精製 .....	78
1.3.2.8. BbhII の阻害活性測定 .....	78
1.3.2.9. Pre-Crystallization Test .....	78
1.3.2.10. 結晶化スクリーニング .....	78
1.3.2.11. 結晶化条件の最適化 .....	78
1.3.2.12. X線回折強度データ収集 .....	78
1.3.2.13. 結晶構造解析 .....	78
<b>1.3.3. 結果 .....</b>	<b>79</b>
1.3.3.1. PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果 .....	79
1.3.3.2. BbhII と PUGNAc-6S の複合体構造の獲得 .....	80
<b>1.3.4. 考察 .....</b>	<b>84</b>
1.3.4.1. PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果 .....	84
1.3.4.2. PUGNAc-6S と NAGT-6S による GlcNAc-6S 加水分解反応中間構造ミミクリーについて .....	85
1.3.4.3. BbhII 阻害剤の他の GH20 $\beta$ -6-SO <sub>3</sub> -N-acetylglucosaminidase 阻害の可能性について .....	85
<b>第2部 成人型ビフィズス菌 <i>Bifidobacterium dentium</i> JCM1195 株の カラメル化糖に作用する酵素群の構造機能解析 .....</b>	<b>87</b>
<b>第1章—環状フルクトース 2糖を合成する GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase <math>\alpha</math>FFase1 の構造機能解析 .....</b>	<b>88</b>
<b>2.1.1. はじめに .....</b>	<b>88</b>
2.1.1.1. $\alpha$ -D-フルクトフラノシド糖質について .....	88
2.1.1.2. $\alpha$ FFase1 について .....	88
2.1.1.3. 本研究の目的 .....	89
<b>2.1.2. 方法 .....</b>	<b>91</b>
2.1.2.1. 基質と発現用プラスミド .....	91
2.1.2.2. 形質転換 .....	91
2.1.2.3. プラスミド抽出 .....	91
2.1.2.4. 発現検討 .....	91
2.1.2.5. SDS-PAGE .....	91
2.1.2.6. 培養のスケールアップ .....	92
2.1.2.7. タンパク質の精製 .....	92
2.1.2.8. <i>p</i> NP- $\alpha$ -D-Araf を用いた活性測定 .....	92
2.1.2.9. Inulobiose と DFA I を用いた活性測定 .....	92
2.1.2.10. <sup>1</sup> H NMR によるグリコシド結合の加水分解における初期生成物の立体化学の検証 .....	93
2.1.2.11. 薄層クロマトグラフィー (TLC) .....	93
2.1.2.12. Pre-Crystallization Test .....	93

2.1.2.13. 結晶化スクリーニング .....	93
2.1.2.14. 結晶化条件の最適化 .....	93
2.1.2.15. シーディング .....	93
2.1.2.16. X線回折強度データ収集 .....	94
2.1.2.17. 結晶構造解析 .....	94
2.1.2.18. $\alpha$ FFase1 遺伝子への部位特異的変異体導入と変異体タンパク質の調製 .....	94
2.1.2.19. タンパク質の定量 .....	94
2.1.2.20. 分子動力学シミュレーション .....	94
2.1.2.21. 系統樹 .....	95
<b>2.1.3. 結果 .....</b>	<b>96</b>
2.1.3.1. $\alpha$ FFase1 酵素活性の動力的パラメーター .....	96
2.1.3.2. $\alpha$ FFase1 による反応触媒メカニズムの同定 .....	97
2.1.3.3. $\alpha$ FFase1 の結晶構造 .....	100
2.1.3.4. $\alpha$ FFase1 のリガンドとの複合体構造 .....	102
2.1.3.5. 金属キレーション剤の $\alpha$ FFase1 活性への影響 .....	104
2.1.3.6. $\alpha$ FFase1 の金属阻害 .....	104
2.1.3.7. 変異体活性測定 .....	105
2.1.3.8. 分子動力学シミュレーション .....	107
<b>2.1.4. 考察 .....</b>	<b>109</b>
2.1.4.1. $\alpha$ FFase1 の分子機能 .....	109
2.1.4.2. 新しい GH ファミリーの設立 .....	109
2.1.4.3. $\alpha$ FFase1 の代謝における役割の可能性 .....	110
2.1.4.4. 微生物における DFA の代謝経路 .....	111
2.1.4.5. 微生物ゲノムにおける $\alpha$ FFase1 ホモログの存在 .....	111
<b>第2章—カラメル化糖特有の糖質を分解する GH172 <math>\alpha</math>-D-fructofuranosidase <math>\alpha</math>FFase2 の構造解析..</b>	<b>117</b>
<b>2.2.1. はじめに .....</b>	<b>117</b>
2.2.1.1. GH172 の基質特異性について .....	117
2.2.1.2. 本研究の目的 .....	117
<b>2.2.2. 方法 .....</b>	<b>119</b>
2.2.2.1. 基質と発現用プラスミド .....	119
2.2.2.2. 形質転換 .....	119
2.2.2.3. プラスミド抽出 .....	119
2.2.2.4. 発現検討 .....	119
2.2.2.5. SDS-PAGE .....	119
2.2.2.6. 培養のスケールアップ .....	120
2.2.2.7. タンパク質の精製 .....	120
2.2.2.8. 分子量測定とオリゴマー状態の検証 .....	120
2.2.2.9. Pre-Crystallization Test .....	120
2.2.2.10. 結晶化スクリーニング .....	120
2.2.2.11. 結晶化条件の最適化 .....	120
2.2.2.12. シーディング .....	120
2.2.2.13. 結晶の染色 .....	120
2.2.2.14. X線回折強度データ収集 .....	121
2.2.2.15. 結晶構造解析 .....	121
2.2.2.16. $\alpha$ FFase 2 コンストラクトの再検討 .....	121
2.2.2.17. クライオ電子顕微鏡観察用グリッドの作製 .....	121

2.2.2.18. 粒子画像の撮影 .....	121
<b>2.2.3. 結果 .....</b>	<b>122</b>
2.2.3.1. $\alpha$ FFase2 の水溶液中でのオリゴマー状態 .....	122
2.2.3.2. $\alpha$ FFase2 の結晶化と X 線結晶構造解析 .....	123
2.2.3.3. $\alpha$ FFase2 のコンストラクト再検討と結晶化.....	126
2.2.3.4. クライオ電子顕微鏡による $\alpha$ FFase2 単粒子の撮影.....	126
<b>2.2.4. 考察 .....</b>	<b>128</b>
2.2.4.1. $\alpha$ FFase2 の構造解析に関する課題 .....	128
2.2.4.2. 予測構造から見た $\alpha$ FFase2 の基質特異性 .....	128
2.2.4.3. 構造解析における $\alpha$ FFase2 のホモログの検討 .....	128
2.2.4.4. $\alpha$ FFase2 の生理機能 .....	129
<b>第 3 部 成人型ビフィズス菌 <i>Bifidobacterium longum</i> JCM7052 株の アラビアゴム含有アラビノガラクトン 資化経路関連酵素 GH39 3-O-<math>\alpha</math>-D-galactosyl-<math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidase GAfase の構造解析 .....</b>	<b>131</b>
<b>3.1.1. はじめに .....</b>	<b>132</b>
3.1.1.1. アラビアゴム由来の AGP.....	132
3.1.1.2. <i>B. longum</i> におけるアラビアゴム AGP の代謝経路について .....	132
3.1.1.3. GH39 GAfase について .....	133
3.1.1.4. 本研究の目的.....	136
<b>3.1.2. 方法 .....</b>	<b>137</b>
3.1.2.1. 大腸菌異種発現用プラスミド .....	137
3.1.2.2. 形質転換 .....	137
3.1.2.3. プラスミド抽出 .....	137
3.1.2.4. 発現検討 .....	137
3.1.2.5. 封入体の可溶化 .....	137
3.1.2.6. SDS-PAGE .....	138
3.1.2.7. 培養のスケールアップ .....	138
3.1.2.8. タンパク質の精製 .....	138
3.1.2.9. 薄層クロマトグラフィー (TLC) .....	138
3.1.2.10. 熱安定性試験.....	138
3.1.2.11. Pre-Crystallization Test .....	138
3.1.2.12. 結晶化スクリーニング .....	138
3.1.2.13. 結晶化条件の最適化 .....	139
3.1.2.14. シーディング .....	139
3.1.2.15. X 線回折強度収集.....	139
<b>3.1.3. 結果 .....</b>	<b>140</b>
3.1.3.1. GAfase の可溶化条件の検討 .....	140
3.1.3.2. GAfase の大量調製.....	140
3.1.3.3. GAfase の結晶化 .....	141
<b>3.1.4. 考察 .....</b>	<b>145</b>
3.1.4.1. GAfase の構造予測.....	145
3.1.4.2. 今後の GAfase とリガンドの複合体構造の取得について .....	147
3.1.4.3. ビフィズス菌以外の細菌によるアラビアゴム AGP の利用について .....	148
<b>総合討論 .....</b>	<b>149</b>
ビフィズス菌の糖質代謝タンパク質と酵素の構造と進化 .....	151

参考文献.....	153
補足—AlphaFold2 に関する見解 .....	165
発表論文.....	166
学会発表.....	166
謝辞 .....	167

## 略語表

- AA : Auxiliary activity、補助活性
- ABC transporter : ATP-binding cassette transporter、ATP 結合カセット輸送体
- AgaBb :  $\alpha$ 1,3-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* JCM1254、  
*Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来  $\alpha$ 1,3-ガラクトシダーゼ
- AfcA :  $\alpha$ 1,2-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum* JCM1254、  
*Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来  $\alpha$ 1,2-フコシダーゼ
- $\alpha$ FFase1 : Difructose dianhydride synthase/hydrolase from *Bifidobacterium dentium* JCM1195、  
*Bifidobacterium dentium* JCM1195 株由来ジフルクトースジアンヒドリドシンターゼ・  
ヒドロラーゼ
- $\alpha$ FFase2 :  $\alpha$ -D-fructofuranosidase from *Bifidobacterium dentium* JCM1195、  
*Bifidobacterium dentium* JCM1195 株由来  $\alpha$ -D-フルクトフラノシダーゼ
- AGP : Arabinogalactan protein、アラビノガラクトタンタンパク質
- APS : Ammonium Persulfate、過硫酸アンモニウム
- Araf : Arabinofuranose、アラビノフラノース
- ATP : Adenosine triphosphate、アデノシン 3-リン酸
- BbhII :  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* JCM1254、  
*Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来  $\beta$ -6-硫酸-N-アセチルグルコサミニダーゼ
- BCA : Bicinchoninic acid、ビシンコン酸
- BL : Beam line、ビームライン
- BSA : Bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン
- CAZyme : Carbohydrate active enzyme、糖質関連酵素
- CBB : Coomassie brilliant blue、クマシーブリリアントブルー
- CBM : Carbohydrate binding module、糖質結合モジュール
- CE : Carbohydrate esterase、糖質エステラーゼ
- CTF : Contrast transfer function、コントラスト伝達関数
- CV : Column volume、カラムボリューム
- DFA : Difructose dianhydride、ジフルクトースジアンヒドリド
- DUF : Domain of unknown function、機能未知ドメイン
- EC : Enzyme commission numbers、酵素番号
- FOM : Figure of merit、性能指数
- Fru<sub>f</sub> : Fructofuranoside、フルクトフラノシド
- FSC : Fourier shell correlation、フーリエシェルコリレーション
- Fuc : Fucose、フコース
- GAase : 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*  
JCM7052、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM7052 株由来 3-O- $\alpha$ -D-ガラクトシル- $\alpha$ -L-  
アラビノフラノシダーゼ
- Gal : Galactose、ガラクトース
- GalNAc : N-acetylgalactosamine、N-アセチルガラクトサミン
- GH : Glycoside hydrolase、糖質加水分解酵素
- Glc : Glucose、グルコース
- GlcA : Glucuronic acid、グルクロン酸
- GlcNAc : N-acetylglucosamine、N-アセチルグルコサミン
- GT : Glycosyltransferase、糖転移酵素
- GNB : Galacto-N-biose、ガラクト-N-ビオース
- HEPES : 4-(2-Hydroxy ethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid、

#### 4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジンエタンスルホン酸

HMO : Human milk oligosaccharide、ヒトミルクオリゴ糖  
IMAC : Immobilized metal affinity chromatography、  
固定化金属アフィニティークロマトグラフィー  
IPTG : Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド  
ITC : Isothermal calorimetry、等温滴定カロリメトリー  
IUBMB : International union of biochemistry and molecular biology  
KEK : 高エネルギー加速器研究機構  
Lac : Lactose、ラクトース  
LacNAc : *N*-acetylglucosamine、*N*-アセチルラクトサミン  
LB : Luria-Bertani (培地の種類)  
LGB : Lower Gel Buffer (SDS-PAGE の分離ゲルのバッファー)  
LNB : Lacto-*N*-biose I、ラクト-*N*-ビオース I  
LNT : Lacto-*N*-triose II、ラクト-*N*-トリオース II  
IDDT : Local-difference distance test (AlphaFold2 の予測モデルを評価するための指標)  
MD : Molecular dynamics、分子動力学  
MMS : Microseed matrix screening (シーディングを用いた結晶化スクリーニングの手法)  
MPD : 2-methyl-2,4-pentanediol、2-メチル-2,4-ペンタンジオール  
MSA : Multiple sequence alignment、多重整列  
NAGT-6S : *N*-acetylglucosamine thiazoline-6 sulfate、*N*-アセチルグルコサミンチアゾリン-6-硫酸  
Neu5Ac : Neuraminic acid、ノイラミン酸  
NMR : Nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴  
OD : Optical density、光学密度  
PAE : Predicted aligned error (AlphaFold2 の予測モデルを評価するための指標)  
PBS : Phosphate Buffered Saline、リン酸緩衝生理食塩水  
PCT : Pre-crystallization test (結晶化スクリーニングの濃度を決定するためのキット)  
PDB : Protein data bank、タンパク質構造データバンク  
PEG : Polyethylene glycol、ポリエチレングリコール  
PF : Photon factory、放射光実験施設フォトンファクトリー  
PGM : Porcine gastric mucin、ブタ胃ムチン  
PL : Polysaccharide lyase、多糖リアーゼ  
*p*NP : *para*-nitrophenol、パラニトロフェノール  
QM/MM : Quantum mechanics/molecular mechanics、量子力学/分子力学  
Rha : Rhamnose、ラムノース  
RMSD : Root-mean-square deviation、平均二乗偏差値  
SAD : Single-wavelength anomalous dispersion、単波長異常分散  
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis、  
ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
Se-Met : Selenomethione、セレノメチオニン  
SHT : SKIK-His<sub>10</sub> tag-TEV sequence、SKIK-His<sub>10</sub> tag-TEV プロテアーゼ認識サイト  
Sia : Sialic Acid、シアル酸  
SKIK : Serine-lysine-isoleucine-lysine、セリン-リジン-イソロイシン-リジン  
SLS : Swiss light source (スイスにある放射光施設の名称)  
SNFG : Symbol nomenclature for glycans (糖質の模式図と略称の標準規格)  
TEMED : Tetramethylethylenediamine、テトラメチルエチレンジアミン  
TEV : Tobacco Etch virus、タバコエッチウイルス  
TLC : Thin layer chromatography、薄層クロマトグラフィー  
Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン

UGB : Upper Gel Buffer (SDS-PAGE の濃縮ゲルのバッファー)

UV : Ultra violet、紫外線

2'-FL : 2'-Fucosyllactose、2'-フコシルラクトース

序

## 0.1. はじめに

本研究では、ヒトから単離されたビフィズス菌の増殖に寄与する6種類の糖質関連酵素の分子機能に着目し、構造生物学的な解析を行った。第1部では乳児型ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* 由来の腸管粘膜ムチン糖鎖代謝に関わる3つの酵素の構造解析および酵素学的・生化学的実験を行った。第2部では成人型ビフィズス菌 *B. dentium* 由来のカラメル化糖に作用する酵素群の酵素学的・生化学的解析および構造解析を行った。第3部では *B. longum* subsp. *longum* (*B. longum*) 由来のアラビアゴム含有特殊アラビノガラクトサン資化経路関連酵素の構造解析を行った。

序論では本研究で扱うサンプルに共通する「ビフィズス菌」と「糖質関連酵素」について概説し、最後に本論文の研究目的を述べる。

## 0.2. 腸内細菌とビフィズス菌

腸内細菌は、ヒトの腸管内に1000種類以上、乾燥糞便1gあたり約1兆個と非常に多く生息している。近年の研究によって、腸内細菌が宿主の健康に及ぼす影響は多岐に渡ることが次々と明らかにされてきた。

中でも「善玉菌」は宿主の健康増進をもたらす微生物である。健康科学の分野では兼ねてより、①摂取することで腸内フローラの改善や回復などの健康効果を持つ生きた微生物をプロバイオティクス、②摂取することで善玉菌の増殖や活性化を促す物質をプレバイオティクス、③プロバイオティクスとプレバイオティクスの混合物をシンバイオティクス、と呼んでいる(1)。近年ではさらに健康増進効果のあるプロバイオティクスの代謝物(ポストバイオティクス)や加熱殺菌された微生物(パラプロバイオティクス)など、新たな概念が唱えられている(2)。これらは下痢(3)、アレルギー(4)、アトピー性皮膚炎(5)の予防・改善効果、抗腫瘍免疫の増強(6)、血清コレステロール値の低減(7)、腸管内のビタミン、葉酸利用の制御(8)など、様々な作用が報告されている。特に乳酸菌(*Lactobacillus* 属)、ビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)、そして納豆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*)が善玉菌の代表例として扱われている。以降では主にビフィズス菌について述べる。

### 0.2.1. 宿主の成長の変化に伴う腸内細菌叢とビフィドームの変化

胎児は体内で完全な無菌状態で生活し、生後、急速に細菌叢が形成される。生後1日目には、ほとんど全ての新生児の便から大腸菌、腸球菌、乳酸菌、クロストリジウム、ブドウ球菌が検出される。母乳で育った乳児では生後3日目あたりからビフィズス菌が出現し始め、それまで出現していた菌群が減少していく。生後4~7日目にはビフィズス菌が優勢となり、他属の菌数はビフィズス菌の約1%にまで減少し「ビフィドーム」と呼ばれるビフィズス菌が全体の微生物群の100%近くを占めるような状態になる。離乳期に入ると、腸内細菌叢は成人に近いグラム陰性菌叢が優勢な状態になり、ビフィズス菌はフローラ全体の約10%にまで減少する(9、図0-1.)。

年齢層によって優勢なビフィズス菌種やバイオタイプに違いが見られる。乳児から単離されたビフィズス菌は、*B. bifidum*、*B. longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*)、*B. breve* subsp. *breve* (*B. breve*)、*B. breve* subsp. *parvulorum* (*B. parvulorum*)、*B. longum* である。これらの種は、*B. longum* を除いてほとんど乳児にしか存在しない。一方、*B. adolescentis* と *B. longum* は、小児、成人、老年男性の腸内で多く見られ、老年男性では *B. adolescentis* の出現率が他の年齢層に比べて有意に多い。これらの種は、乳幼児からはごく稀にしか検出されない。近年では更に *B. catenulatum*、*B. angulatum*、そして口腔内細菌のイメージが強い *B. dentium* など新たな種が成人の便から単離されている(10)。

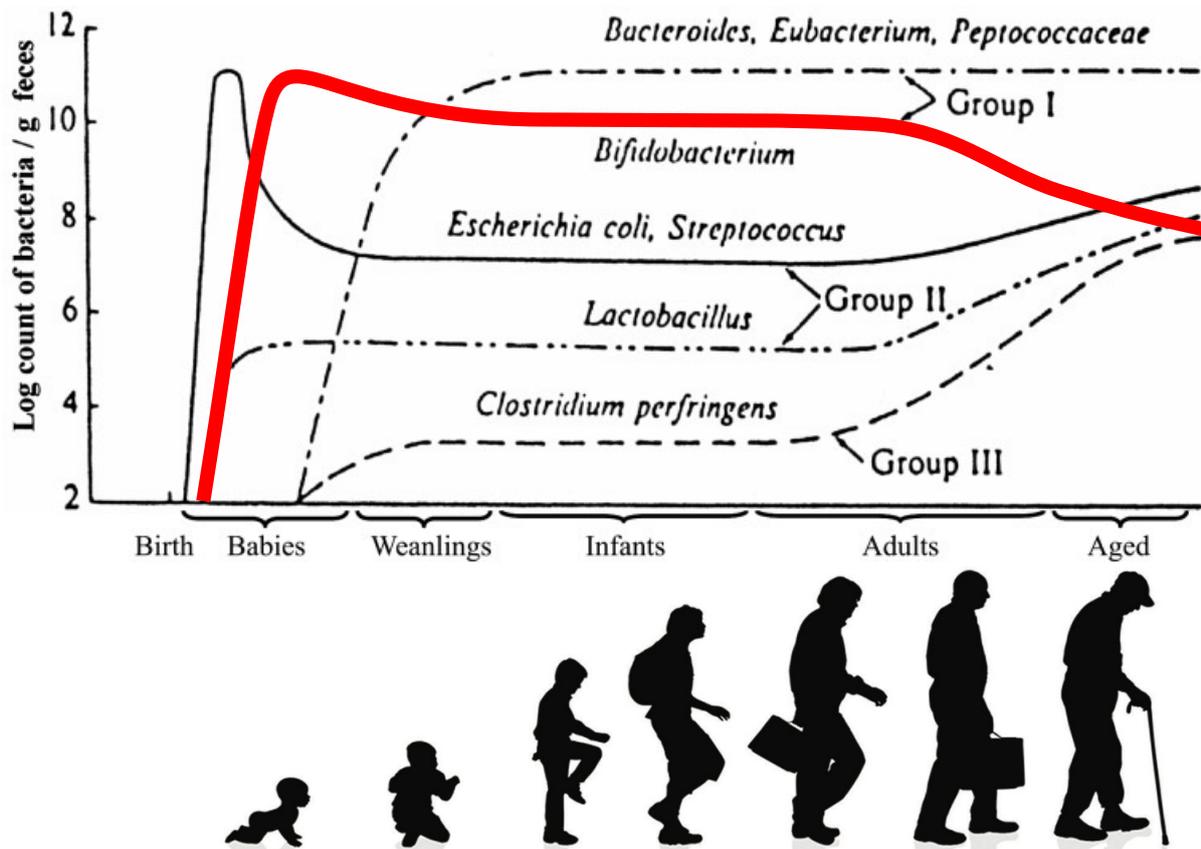


図 0-1. 年齢に伴う糞便中の微生物叢の変化。赤い曲線がビフィズス菌の菌数に該当する。Mitsuoka, *Biosci Microbiota Food Health*, 2014(9)より一部改変。

### 0.2.2. ビフィズス菌が生育に用いる炭素源の種類

ヒトのゲノムには、糖質の消化に直接関係する遺伝子が 8 つしか存在しない(11)。これらの遺伝子は食物に含まれる複雑な糖鎖を全て分解するには不十分であり、腸内細菌は宿主が資化できない糖鎖を炭素源・エネルギー源としている。しかし澱粉などの易消化糖質は、消化管上部に生息する腸内細菌によって消化・吸収されるため、ビフィズス菌の生息する消化管下部には容易に分解し吸収し得る糖質はほとんど届かない。これに対して、ビフィズス菌は独自の糖代謝経路を複数有することにより、貧栄養環境中でも難消化性の糖を分解し利用して生育することを可能にしている。

乳児と成人の食習慣の違いは明確である。乳児の腸内に存在するビフィズス菌（乳児型ビフィズス菌）は腸管粘膜のムチン糖鎖やヒトミルクオリゴ糖（human milk oligosaccharide、HMO）を代謝する。*B. bifidum* と *B. infantis* のゲノム上にはムチン糖鎖と HMO の代謝に対応した遺伝子が多数存在する(12)。*B. breve* や *B. longum* などの他のビフィズス菌種は、*B. bifidum* や *B. infantis* に見られるような HMO 異化に関わる遺伝子群を保有していない。しかし、特定の HMO を分解することができ、また、他のビフィズス菌が分解する糖質を獲得することで共生関係を確立している(13)。離乳後、ビフィズス菌は植物由来の糖質の代謝に適応できる種（成人型ビフィズス菌）へと変化する。これについては、成人の食習慣が乳児と比較して多様かつ複雑であるため、代謝経路についてまだ不明な点が多々存在する。

ムチン糖鎖、HMO、植物由来の糖質の糖構造は大きく異なる。ビフィズス菌のゲノムに含まれる遺伝子の 12% 以上は糖質代謝に関わる酵素（糖質関連酵素）をコードしていると予測されている。これによって多彩な構造を持つ糖質を分解しエネルギー源としていると考えられている。

### 0.3. 糖質関連酵素（CAZyme）

ビフィズス菌が資化する糖質は、複数の単糖のグリコシド結合によって形成される糖質のことを指す。グリコシド結合は、ある糖のアノマー炭素と別の糖のヒドロキシ基の間に生じる(14)。一つの糖にはヒドロキシ基が複数あり、また 2 つのアノマー型が存在する。更にはフラノースやピラノースな

どの環状構造の違いや硫酸基などの修飾が存在する。これらの組み合わせで成り立っている糖質の構造の可能性は無限に近い(15)。このような構造の多様性を反映して、糖質の生合成、修飾、結合、異化に関する酵素の種類も非常に多様である。

糖質関連酵素 (carbohydrate active enzyme, CAZyme) は糖質を合成・分解する酵素の総称である。CAZyme は、国際生化学・分子生物学連合 (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) による酵素命名法に従っている (例:  $\alpha$ -amylase、 $\beta$ -galactosidase など)。しかし、この命名法は基質特異性に基づいたものであり、酵素の反応機構や配列、構造類似性などの特徴を反映していない。そのため、Bernard Henrissat らは CAZyme をアミノ酸配列の相同性に基づいて「ファミリー」に分類し、CAZy database (<http://www.cazy.org>) に纏めている。CAZy では、CAZyme を糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase, GH, EC 3.2.1-)、糖転移酵素 (glycosyltransferase, GT, EC 2.-)、多糖リアーゼ (polysaccharide lyase, PL, EC 4.2.2.-)、糖質エステラーゼ (carbohydrate esterase, CE, EC 3.1.1.-)、補助活性 (auxiliary activity, AA, EC 1.-)、糖質結合モジュール (carbohydrate binding module, CBM) の 6 つのクラスに大別され、クラス毎に細かいファミリーに分類している(16)。この分類法により同一ファミリーに分類される酵素には以下の特徴がある。

- 同様の構造を持つ。
- 進化的に関連がある。
- 同様の反応機構を持つ。

ただし、酵素の基質特異性を反映していないため、同じファミリー内に様々な基質特異性を持つ酵素が含まれている。なお、CBM は酵素活性を有していないが、他のクラスの触媒に関連していることが多い。

ビフィズス菌は CAZyme の中でも GH を特に多く保有しており、ビフィズス菌のゲノムが初めて発表されて以来、これらの GH に関する知見が多く得られている(17)。本研究でもビフィズス菌由来の GH、そしてその活性に間接的に関わる CBM について論ずる。

### 0.3.1. 糖質加水分解酵素 (GH)

GH は、糖質の *O*-、*N*-、*S*-型グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素で、糖のヘミアセタールまたはヘミケタールと、アグリコンを遊離させる (図 0-2. A)。CAZy では 2021 年 12 月現在、欠番となっている 8 つのファミリーを含む 172 のファミリー (GH1~GH172) が設立されている。また、ファミリー縦断的にフォールドに基づいた 18 のクラン分類 (GH-A~GH-R) がなされている(18)。1 つのファミリーの酵素群は配列・フォールドが類似しているため同じクランに属し、1 つのクランには複数のファミリーが含まれている。また、どのクランにも該当しないファミリーも存在する。他にも、糖質の非還元末端 (稀に還元末端) に作用し単糖を遊離する *exo* 型と、鎖の中間を切断する *endo* 型で区別することもできる (図 0-2. B)。

#### 糖質加水分解酵素の反応機構

GH では、1953 年に Koshland が定義したアノマー保持型とアノマー反転型の反応機構が頻繁に見られている(19)。しかし、これらのメカニズムの興味深いバリエーションがいくつか発見されており、近年では、NADH を補酵素とし反応を触媒する、従来のものとは根本的に異なるメカニズムも発見されている。また、1 つのファミリーにつき反応機構は 1 種類だけとは限らない(20)。

- アノマー反転型反応機構

アノマー反転型反応機構は図 0-2. C のように、オキソカルベニウムイオンのような遷移状態を伴う 1 段階の単一置換機構によって達成される。この反応は、通常 6-11 Å 離れた位置にある 2 つのアミノ酸側鎖 (通常は Glu または Asp) がそれぞれ一般酸触媒残基、一般塩基触媒残基として働くことによって成り立つ。このメカニズムの特性として、基質と生成物でアノマー形が異なる点が挙げられる。

例外として、mannose-1-phosphate を基質とする一部の GH62 mannosidase は一般酸触媒残基を持っていなくても反応を触媒する。

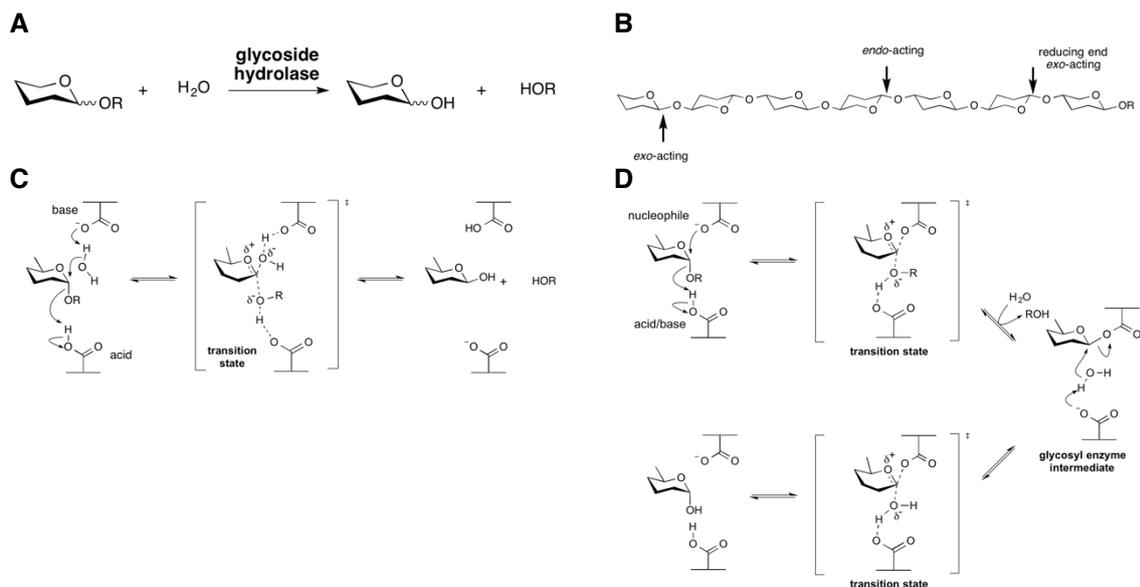


図 0-2. 糖質加水分解酵素 (GH) の分子機構。A. GH が触媒する反応の模式図。B. 糖鎖上で exo 型、endo 型の酵素が作用する部位。C. アノマー反転型 GH の反応機構。D. アノマー保持型 GH の反応機構。CAZypedia ([https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_hydrolases](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases)) より。

- アノマー保持型反応機構

アノマー保持型反応機構は図 0-2. D のように、共有結合したグリコシル酵素中間体を含む 2 段階の 2 重置換機構によって行われるのが一般的である。各段階でオキソカルベニウムイオンのような遷移状態を通過する。反応は、5.5 Å 間隔で配置された 2 つのアミノ酸側鎖 (Glu または Asp) がそれぞれ酸塩基性触媒残基および求核性触媒残基として働くことによって成り立つ。グリコシル化とも呼ばれる第一段階では、一方の残基がアノマー炭素を求核攻撃してアグリコンを置換し、グリコシル酵素の中間体を形成する。同時に、もう一方の残基が酸性触媒残基として機能し、結合が切断される際にグリコシル結合の酸素をプロトン化する。第 2 段階 (脱グリコシル化) では、グリコシル酵素が水分子によって加水分解され、もう一方の残基が塩基性触媒残基として機能し、水分子が攻撃する際にプロトンを獲得する。このメカニズムの特性として、基質と生成物でアノマー形が同じである点が挙げられる。酸塩基性触媒残基の pKa 値は、触媒作用中に高値と低値の間を循環し、触媒作用の各ステップでの役割に応じて最適化される(21)。

### 0.3.2. 糖質結合モジュール (CBM)

CBM は、複数のドメインを有する CAZyme の一部を形成し、構造的に独立したモジュールに折りたたまれたドメインである(22)。CBM の一般的な役割は、糖鎖リガンドに結合し、触媒ドメインに導くことで、CAZyme の触媒効率を高めることである。CBM 自体は触媒活性を持たず、一般的には GH と関連しているが、PL、GT、polysaccharide oxidase、植物細胞壁に結合するエキспанシンやいくつかのレクチンでも確認されている。

CBM はリガンドと結合しても、それ自体には構造変化を起こさない。むしろ糖鎖結合部位の形状は、結合部位のアミノ酸側鎖が標的リガンドの形状と相補的になるように形成されている。CBM を含むマルチドメイン酵素は、全体的に非常に柔軟で、基質を結合する際に大きなコンフォメーション変化を起こすことがある。CBM と活性部位の間では、Ser-Thr-Pro からなる柔軟な配列が頻繁に見られ、これが CBM に対する触媒モジュールの向きや方向の変化を可能にする。例外的に 5 helical bundle linker モジュールのような硬い連結領域を持つ酵素も存在する(23)。

2021 年 12 月現在、CBM は GH と同様にアミノ酸配列の類似性に基づいて CAZy database にて 88 のファミリーに分類されている。これらのファミリーは、構造的に類似したフォールドや糖鎖結合機能を持つモジュールを集めていることが多い。しかし、ターゲットとする糖鎖リガンドに多様性を示すファミリーもいくつかある。

CBM には、大きく 7 種類のフォールドが存在する(24)。CBM の最も一般的なフォールドは、3~6本の逆並行  $\beta$ -strand からなる 2 枚の  $\beta$ -sheet が重なり合った  $\beta$ -sandwich fold である。リガンド結合部位は、 $\beta$ -sheet の一方の面に位置する場合と、 $\beta$ -sheet の可変ループ領域内に位置する場合がある。2 つのリガンド結合部位を有する CBM も存在する(25)。その他のフォールドファミリーには、 $\beta$ -trefoil fold、cystine knot、OB fold、hevein、hevein-like、unique fold、などがある。 $\beta$ -trefoil fold の CBM は、多糖への結合を示し、キシランやアラビノキシランとの相互作用が報告されている(26)。

CBM は標的となるリガンドの形状と重合度によって 3 つのタイプに分類される (図 0-3)。結合部位の構造は、酵素が糖鎖のどの領域を標的とするかと深く関係している。

- タイプ A はセルロースやキチンのような多糖の結晶表面に結合する。その結合部位は平面的で、芳香族アミノ酸が豊富に含まれており、平面的な多糖類の表面に結合するための平らなプラットフォームを形成している。
- タイプ B は糖鎖の中間部分と結合する endo 型結合様式を有する。タイプ B は、現在までに報告されている CBM の中で最も多い形態である。その結合部位は、4 糖以上の長い糖鎖に対応するため、いくつもの結合サブサイトを持ち、拡張された溝やクレフトのように見える。
- タイプ C は糖鎖の還元末端、または非還元末端に結合する exo 型結合様式を有する。タイプ C の結合部位は、単糖から 3 糖の短い糖鎖リガンドを認識するための小さなポケットである。このタイプは「レクチン様」とされ、レクチンや触媒モジュールが付加されていないタンパク質がメンバーとして含まれることがある。

### CBM の役割

CBM は主に 4 つの機能的な役割を担っている。

- CBM の結合部位の構造に応じて、酵素の基質糖質を認識する。
- 酵素を基質となる糖類に接近させ、局所的に酵素濃度を高める。これにより、迅速かつ効率的に基質を分解することができる。
- 一部の CBM では、例えばセルロース繊維や澱粉顆粒のような強固に充填された多糖類の表面と相互作用して構造を攪乱し、触媒モジュールの基質へのアクセスを助ける効果が確認されている。これによって効率的な分解が行われていることも示されている。
- 一部の CBM は、細菌の細胞壁の表面に酵素を付着させ、外部の隣接する基質に対して触媒反応を促す。

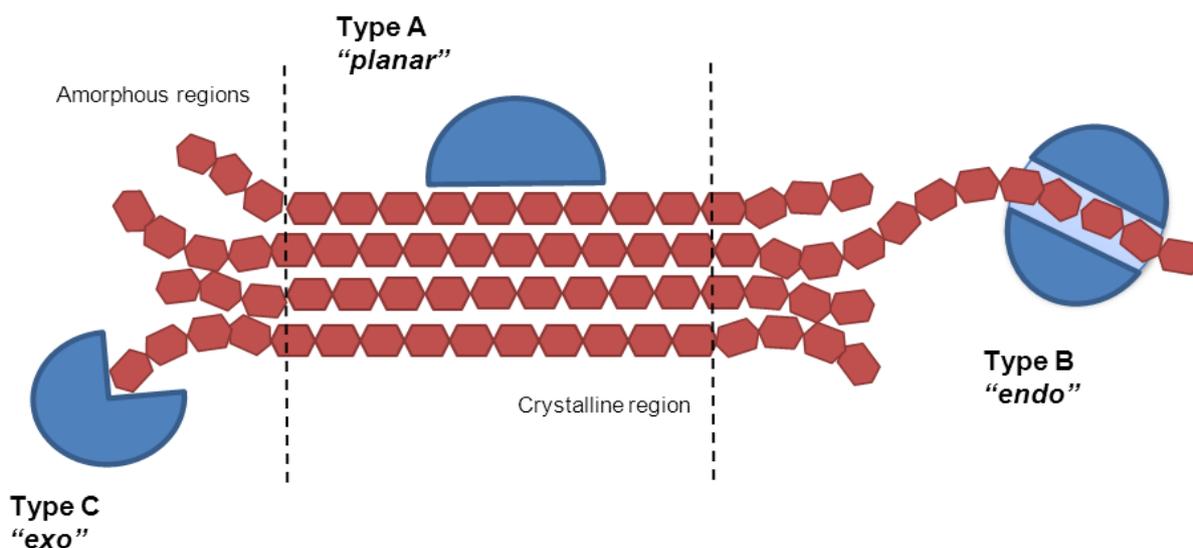


図 0-3. 多糖基質に対する各 CBM タイプの結合様式。CAZyedia ([https://www.cazyedia.org/index.php/Carbohydrate-binding\\_modules](https://www.cazyedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules)) より

#### 0.4. 本研究の目的

先述の通り、ビフィズス菌は独自に進化させた様々な CAZyme を利用することにより貧栄養環境下にある難消化性糖質を分解し、炭素源・エネルギー源を獲得して大腸内に定着・増殖する。これまで世界中で成された研究により、ビフィズス菌由来の CAZyme の生化学的な機能が明らかにされて来た。しかし分子レベルでの機構の解明に至っては、知見が不十分なタンパク質がまだまだ多く存在する。

そこで本研究では、X 線結晶構造解析を主体に新規性の高い GH や CBM の高分解能構造の決定をまず目標とした。これにより、CAZyme のどのアミノ酸残基がどのように糖質と相互作用し、その結果、どのような現象が起こり得るのか推測を立て、更なる機能解析へと繋げた。

酵素の分子機能を解明することで、ビフィズス菌がヒトとの共生関係の中でどのようにして独自の進化を遂げて「善玉菌の代表格」となるに至ったのか、その理解の一端に触れることが出来る。また、分子機能の解明は、「ビフィズス菌がどの糖質を効率的に分解できるのか」の理解に繋がり、新たなビフィズス菌の増殖因子の構築のヒントを得られる可能性がある。さらに、タンパク質の構造と分子機能が解れば、変異による機能改変が容易なものとなる。実際、GH の機能改変によって作製されたグライコシターゼ、糖転移酵素、糖質ホスホリラーゼは産業的な実用化が期待されている。このように本研究は基礎研究と応用研究の両方で大きな意義を持っている。

より網羅的な知見を得るため、本研究ではビフィズス菌種、基質となる糖質を問わず、6種類の CAZymes を対象に実験を行った。本論文は3部に分けてこれらの CAZymes を紹介する。

- 第1部では、乳児型ビフィズス菌 *B. bifidum* JCM1254 株のムチン含有 Core 2 O-glycan 代謝関連酵素群として、膜結合型 CAZyme である GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb、GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA 及びその N 末端に付属する新規 CBM、そして GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII について取り挙げる。
- 第2部では、成人型ビフィズス菌 *B. dentium* JCM1195 株のイヌリン代謝経路及びカラメル化糖分解酵素群として、菌体内 GH である GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase  $\alpha$ FFase1、GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase  $\alpha$ FFase2 について取り挙げる。
- 第3部では、成人型ビフィズス菌 *B. longum* JCM7052 株のアラビアゴム含有アラビノガラクトン糖鎖資化関連酵素として GH39 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GAfase について取り挙げる。

## 第 1 部

乳児型ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株の  
ムチン含有 Core 2 O-glycan 代謝経路関連酵素の構造機能解析

## 1.0.1. はじめに

ここでは乳児型ビフィズス菌 *B. bifidum* JCM1254 株のムチン含有 Core 2 O-glycan 代謝関連酵素群の研究を扱う。それに先立ち、序論としてヒト消化管由来ムチン型糖タンパク質と *B. bifidum* の膜表面結合型酵素群によって形成される Core 2 O-glycan 代謝経路の全容について概説する。

### 1.0.1.1. ヒト消化管由来ムチン型糖タンパク質の糖鎖

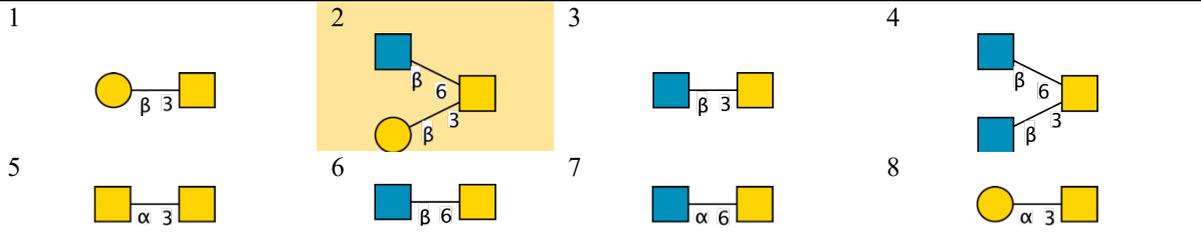
ヒトの呼吸器、胃腸などの消化管、生殖腺などの上皮は、ムチンを主成分とした粘液に覆われている。ムチンは、糖を多量に含む糖タンパク質であり、2層構造を取っている。外層のゲル層は共生細菌の定着の場として、上皮細胞に接する粘液層である内層は細菌の上皮細胞への侵入を防ぐバリアとしての役割を果たしている(27)。ビフィズス菌にとって、ムチンは最も主要な受容体、すなわち生息の場であると考えられており、同時に最も身近な糖質源となる。

ムチン糖鎖は、ほとんどが糖鎖の *N*-アセチルガラクトサミン (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) とコアタンパク質の Ser または Thr 残基のヒドロキシ基とで  $\alpha$ -*O*-グリコシド結合により連結している。糖鎖の種類と結合の仕方によりコア構造が定められており、Core 1 から Core 8 まで知られている。これらの組み合わせで母核構造を作る。基幹領域はガラクトース (galactose, Gal) と *N*-アセチルグルコサミン (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) で構成される二糖: Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc (type I)、Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc (type II) からなる。さらに GalNAc の結合により分岐化され、 $\alpha$  結合した Gal、GalNAc、フコース (fucose, Fuc)、あるいはシアル酸 (sialic acid, Sia、またはノイラミン酸、neuraminic acid、Neu5Ac) で終結する (図 1-0-1、(28))。

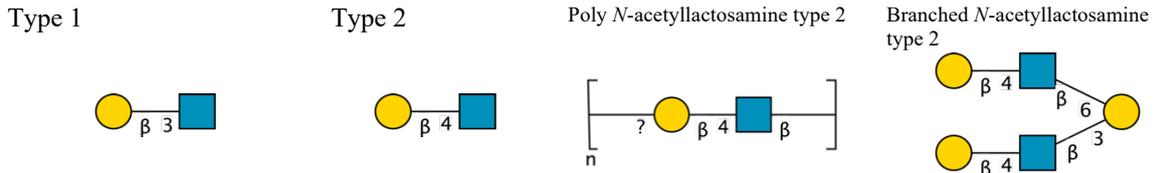
さらに、ヒト由来のムチン糖鎖に含まれる GlcNAc の 6 位や Gal の 3 位は硫酸化修飾されることがある。硫酸化によるムチン糖鎖の誘導構造は 40 以上報告されている(29)。この修飾は腸管粘膜におけるムチンの炎症刺激に対する粘膜バリアとしての機能や大腸炎抑制の働きに重要であることが、マウスの GlcNAc-6-*O*-硫酸基転移酵素遺伝子欠損株を用いて証明された(30)。

私の知る限り、乳児と成人での違いを評価した文献は存在しないが、ムチン糖鎖のコア構造は消化管の部位により異なっている。消化管上部 (胃・十二指腸) では Core 1 ガラクト-*N*-ビオース (galacto-*N*-biose, GNB) 構造が主である。一方、消化管下部 (小腸) では sialyl/galactosyl-Core 3 がムチン糖鎖の主構造である(29)。Core 2 は小腸と大腸を含む様々な組織に分布している(31)。ビフィズス菌はこれらの糖鎖を加水分解する酵素群を有することが知られており、種によって代謝経路に違いがある(32)。本研究では、現時点で最も詳細に研究されている *B. bifidum* JCM1254 株由来の Core 2 構造、6 位硫酸化 GlcNAc、B 型血液型エピトープを組み合わせた糖鎖の代謝経路に焦点を当てる。以降、この組み合わせの糖構造を、Katoh et al., *Microorganisms*, 2020 における糖鎖の名称に合わせて Core 2 O-glycan と呼ぶ。

ムチン糖鎖のコア構造



ムチン糖鎖骨格の繰り返し構造



ムチン糖鎖の主要なエピトープ構造

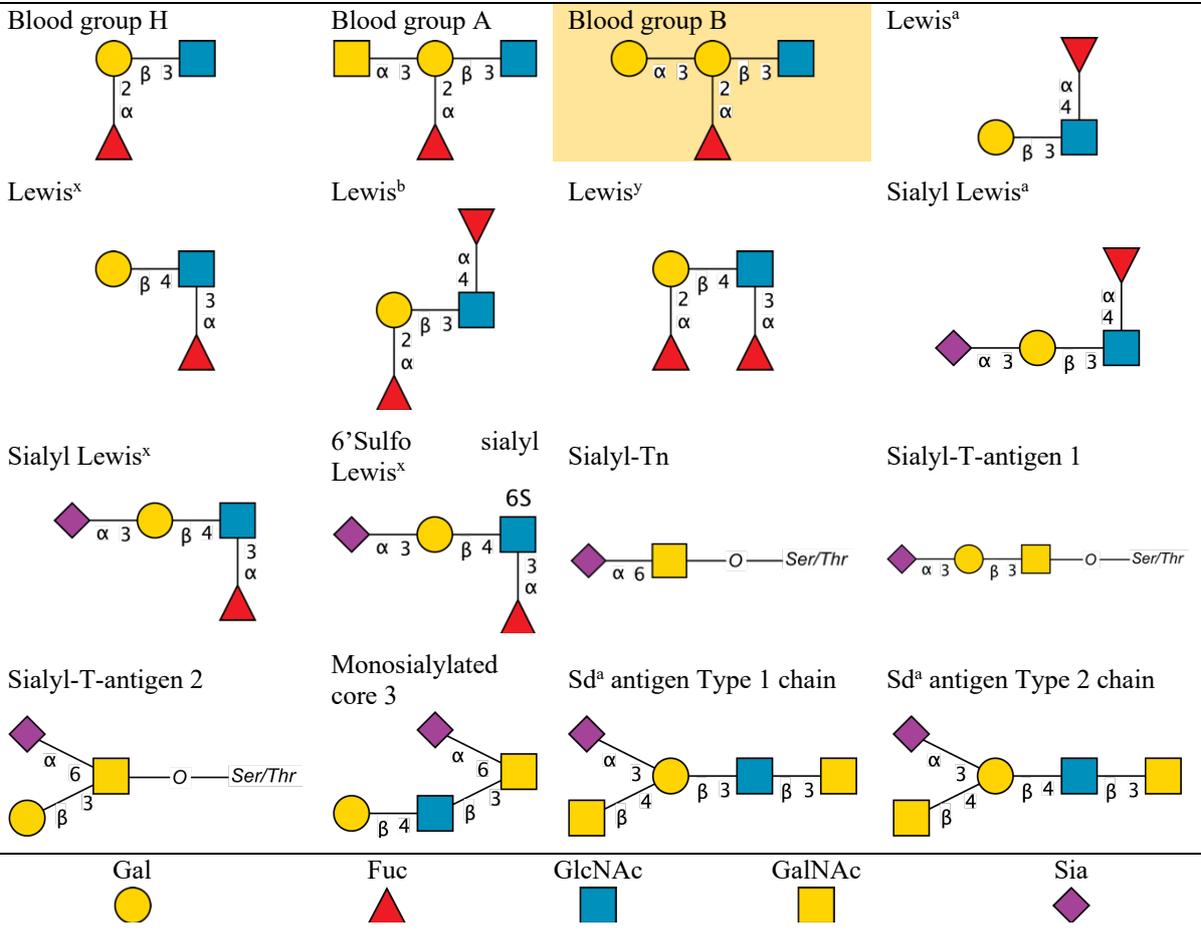


図 1-0-1. ムチン糖鎖の様々な糖構造。本研究で主に取り上げる Core 2 および B 型血液型エピトープ (blood Group B) を黄色で示す。糖の表記は Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) に基づく。Corfield, *Biochim Biophys Acta*, 2015(33)より改変。

### 1.0.1.2. *B. bifidum* JCM1254 株の Core 2 O-glycan 代謝経路

*B. bifidum* JCM1254 株は硫酸化および B 型血液型エпитープ（図 1-0-1 の blood Group B）を付加された Core 2 糖構造から 4 つの膜表面結合型 GH、GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb(34)、GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA(35)、GH2  $\beta$ 1,4-galactosidase BbgIII(36)、GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII(37) を用いて単糖を一つずつ遊離させる。その後、GH101 endo- $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase EngBF の作用により GNB とムチンタンパク質の Ser/Thr 側鎖間の  $\alpha$ -O-グリコシド結合が切られ(38)、ABC transporter を経由して GNB が菌体内に取り込まれる。菌体内の GNB は GH112  $\beta$ 1,3-galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase GLNBP によって Gal-1 リン酸 (Gal1P) と GalNAc に分けられ(39)、それぞれの糖は GNB/LNB 経路というビフィズス菌特有の代謝経路に取り込まれる（図 1-0-2、(31)）。

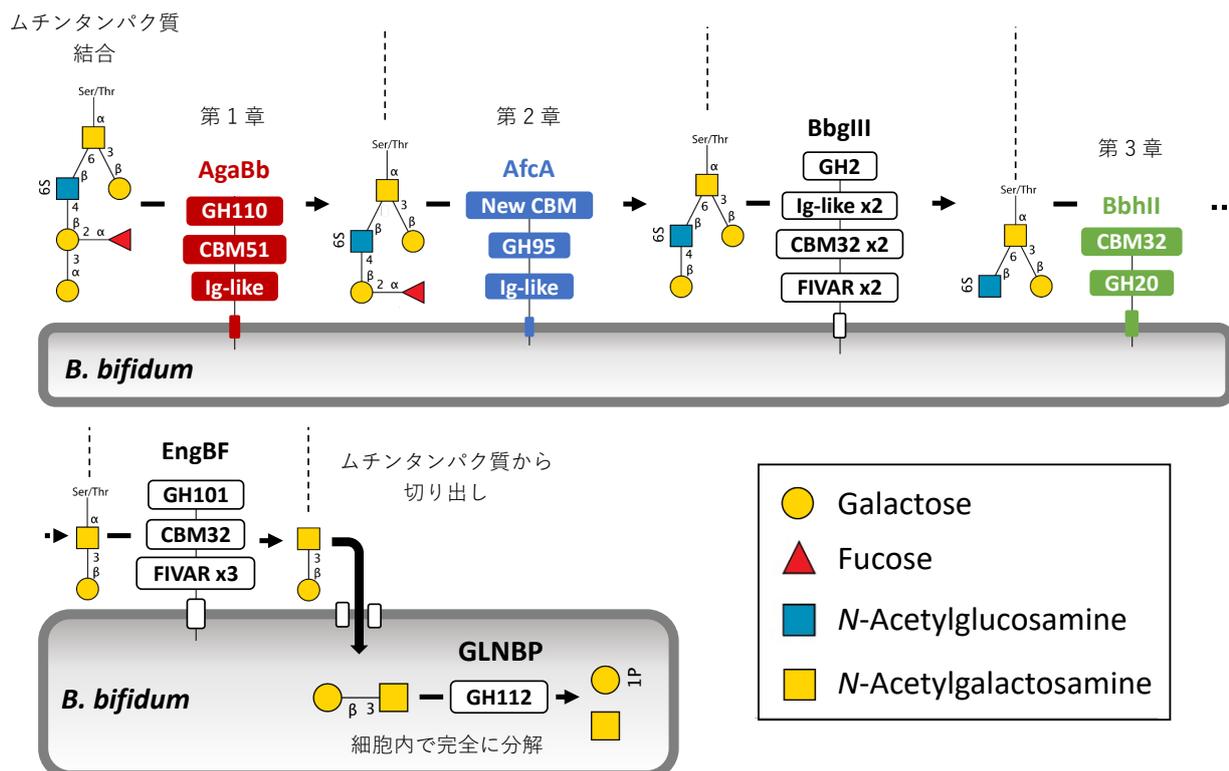


図 1-0-2. *B. bifidum* JCM1254 株の Core 2 O-glycan 糖代謝経路。各酵素の基質、生成物、そしてドメイン構成（N 末端から C 末端の順）を示す。本論文で研究対象としている酵素（AgaBb、AfcA、BbhII）は色付きで示す。糖の表記は SNFG に基づく。Kato et al., *Microorganisms*, 2020(31)より改変。

この代謝経路に関わる酵素群はいずれも生化学的に、また酵素学的に詳細に研究され著名な国際誌にて発表されている。更に、AfcA の活性ドメイン(40)、BbgIII(41)、EngBF(42)、GLNBP(43)については構造解析が行われ、発表当時はその新規性が注目を集めた。これらの知見を基に特に AfcA と GLNBP に至っては HMO の合成を目的としたグライコシンターゼ化や反応効率向上などの反応改変への挑戦が繰り返されている（(44)、福田勇介 2020 年度修士論文より）。

一方、AgaBb、BbhII、AfcA の N 末端部分は既知の構造との配列同一性が 30%以下と低く、AlphaFold2 などで作製した構造予測モデル(45)を用いた構造比較などから分子機能を解明するのは極めて困難である。これらの酵素の分子機能を解明すれば GLNBP などと同様に糖質合成などの応用研究に展開できるかもしれない。よって本研究ではこの 3 つの酵素の構造解析をまず行い、そこから触媒活性の分子メカニズムの予想を立て、実験的に証明することを目指した。

# 第 1 章—B 型血液型抗原に特異的な GH110 $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb の構造解析

## 1.1.1. はじめに

本章では B 型血液型抗原に特異的な GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb の構造解析について述べる。序論としてムチン糖鎖の血液型抗原と GH110、CBM51、AgaBb について概説した上で、本研究の目的、方法、結果、考察について詳細に論ずる。

### 1.1.1.1. ムチン糖鎖の血液型抗原と GH110 について

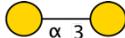
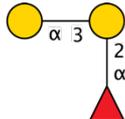
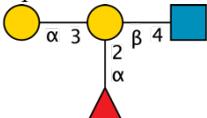
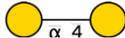
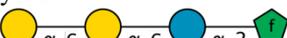
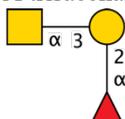
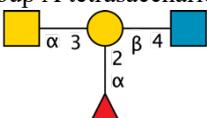
消化管ムチンの O-結合型糖鎖の非還元末端は、通常、様々な血液型抗原で覆われており、一般の常在菌の消化酵素に対する抵抗性を付与している。ABH 血液型抗原は、赤血球やその他の体細胞の細胞表面抗原としてよく知られている。また、ABH 抗原は、ヒトでは消化管ムチンなどの分泌型糖タンパク質でも発現している。H 抗原 (O 型血液型抗原) は単純な 2 糖構造 (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal) からなる。GalNAc または Gal が H 抗原の Gal 残基に  $\alpha$ 1,3 結合し、分岐型の A 型 [GalNAc- $\alpha$ 1,3-(Fuc- $\alpha$ 1,2)-Gal] または B 型 [Gal- $\alpha$ 1,3-(Fuc- $\alpha$ 1,2)-Gal] 血液型抗原を形成する (46)。

GH110 は、B 型血液型抗原の末端  $\alpha$ Gal を選択的かつ効率的に除去し、H 抗原に変換する酵素の探索の一環で、2007 年に Liu らによって発見された (47)。通常、多くの GH がオリゴ糖よりも *para*-nitrophenol (*p*NP) 基質に高い見かけの活性を示すのとは対照的に、当時解析された *Bacteroides fragilis* NTCT9343 株由来の酵素 (*BfGal110A*) は分岐型の B 型血液型抗原に対して 6.6 U/mg、*p*NP- $\alpha$ -Gal に対して 0.3 U/mg と、従来とは逆の特性を示した。*BfGal110A* は分岐型の B 型血液型抗原に含まれる  $\alpha$ 1,3 結合の Gal に対してのみ強い活性を示し、P1 および Pk 血液型抗原に見られる  $\alpha$ 1,4Gal 結合、Fuc を含まない直鎖型の B 型血液型抗原 (Galili 抗原) の  $\alpha$ 1,3-Gal を加水分解しない (表 1-1-1)。この特性から、*BfGal110A* は Fuc を認識しないと galactosidase 活性を示さない可能性が示唆された。

その後、2008 年に Liu らの続報により 2 つの異なる subfamily の存在が明らかになった (48)。subfamily A は分岐型の B 型血液型抗原にのみ作用するが、subfamily B には分岐型、直鎖型の両方に作用する結合特異的な  $\alpha$ 1,3-galactosidase が含まれている。

一方、近年まで GH110 の研究では腸内細菌由来のものしか解析されていなかった。B 型血液型抗原は霊長類、魚類、両生類、その他の動物、一部の植物が有しているとされているため、その他の生態系で GH110 が発見されることは想定されていなかった。しかし 2020 年に McGuire らによって海洋細菌 *Pseudoalteromonas distincta* U2A 株から新規な特異性を持つ GH110 (*PdGH110B*) が発見された。*PdGH110B* は  $\lambda$  carrageenan のような硫酸化ガラクトタンに作用する (49)。この酵素は Liu らが報告したサブファミリーのどちらにも属さない。また、ガラクトビオース (galactobiose、Gal- $\alpha$ 1,3-Gal) に含まれるグリコシド結合を加水分解するが、B 型血液型抗原には作用しない (表 1-1-1)。さらに *PdGH110B* は GH110 で唯一、結晶構造が解かれている酵素として CAZy に登録されている (図 1-1-1)。McGuire らが発表した結晶構造から GH110 は GH-N ( $\beta$ -helix) クランに属することが解った。しかし、その基質特異性の違いにより、*PdGH110B* の結晶構造を基に他の subfamily による Fuc の認識様式は特定できない。

表 1-1-1. GH110 の各 subfamily の基質特異性。本研究で扱う AgaBb が属する subfamily A の基質特異性を黄色で示す。糖の表記は SNFG に基づく。

Substrate	Subfamily A	Subfamily B	<i>PdGH110B</i>					
<b>Gal-<math>\alpha</math>1,3-Gal structures</b>								
Galactobiose 	-	+	+					
Galili antigen 	-	+	not reported					
Blood group B trisaccharide 	+	+	-					
Blood group B tetrasaccharide 	+	+	not reported					
<b>Gal-<math>\alpha</math>1,4-Gal structures</b>								
P1 antigen 	-	-	not reported					
pk antigen 	-	-	not reported					
<b>Gal-<math>\alpha</math>1,6-Gal structures</b>								
Raffinose 	-	-	not reported					
Stachyose 	-	-	not reported					
<b>GalNAc-<math>\alpha</math>1,3-Gal structures</b>								
Blood group A trisaccharide 	-	-	not reported					
Blood group A tetrasaccharide 	-	-	not reported					
Reference	Liu et al., JBC, 2008	Liu et al., JBC, 2008	McGuire et al., JBC, 2020					
<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>Gal </td> <td>GlcNAc </td> <td>Fuc </td> <td>Fru </td> <td>GalNAc </td> </tr> </table>				Gal 	GlcNAc 	Fuc 	Fru 	GalNAc 
Gal 	GlcNAc 	Fuc 	Fru 	GalNAc 				

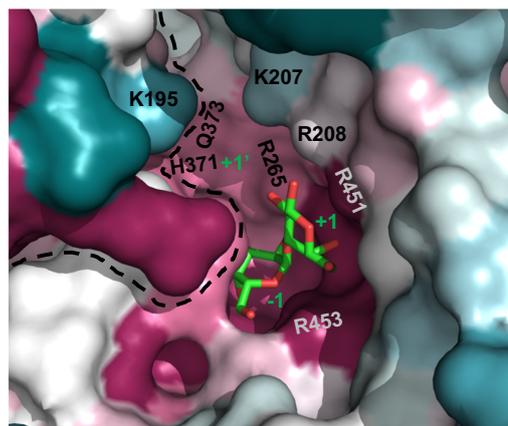
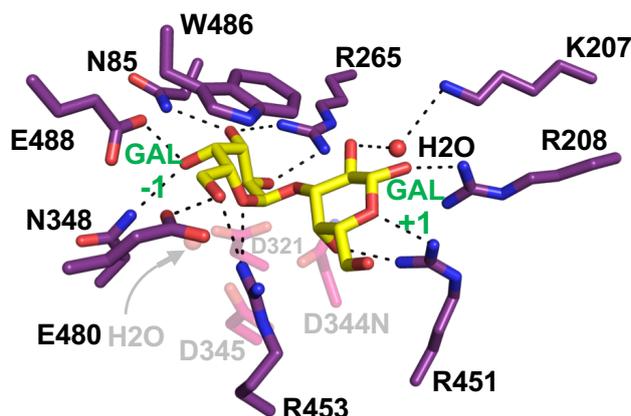


図 1-1-1. *Pseudoalteromonas distincta* U2A 株由来 PdGH110B D344N 変異体と galactobiose の複合体構造。左で-1 subsite と +1 subsite、右で硫酸基が入るであろう推定+1' subsite を示す。McGuire et al., *J Biol Chem*, 2020 (48)より。

### GH110 の反応触媒メカニズム

既報の  $\alpha$ -galactosidase (GH4、GH27、GH36、GH57) が全てアノマー保持型なのに対し、GH110 はアノマー反転型の酵素である。pNP- $\alpha$ -Gal を基質とし、*B. fragilis* 由来の BfGal110B を酵素として用いて、加水分解の立体化学的变化を  $^1\text{H NMR}$  でモニタリングした結果、最初に  $\beta$ -Gal が生成され、アノマーの配置が反転することが明らかになった(48)。また PdGH110B の結晶構造と同一クランの酵素との比較により、酸性触媒残基は D344 であり、塩基性触媒残基として 2 つの距離的に非常に近い D321 と D345 が候補に挙げられている。

#### 1.1.1.2. CBM51 について

CBM51 は GH2、GH27、GH31、GH95、GH98、GH101 に付加されていることで知られている  $\beta$ -sandwich 型の CBM である(50)。先行研究で行われた糖鎖マイクロアレイスクリーニング、等温滴定熱量測定 (isothermal calorimetry、ITC)、X線結晶構造解析により、CBM51 は非保存的な相互作用により A/B 型血液型抗原に特異的な CBM51a と、Gal と結合する CBM51b の 2 種類に分けられている。真核生物の細胞膜表層部分の糖鎖に特異性を持つ CBM として様々な環境細菌で保存されている。

#### 1.1.1.3. AgaBb について

*B. bifidum* JCM1254 株由来の GH110 AgaBb は、B 型血液型を分解して、消化管内のムチンオリゴ糖から栄養分を獲得するのに重要な役割を果たす酵素として、2012 年に脇中らによって機能解析が行われた(34)。AgaBb は N 末端からシグナルペプチド、GH110 ドメイン、200 残基余りからなる未解析領域、CBM51、ペプチドグリカンとの相互作用によってタンパク質を安定化すると予想されている免疫グロブリン様 Big2 ドメイン、そして膜結合ドメインからなる菌体外膜結合型 GH である (図 1-1-2)。

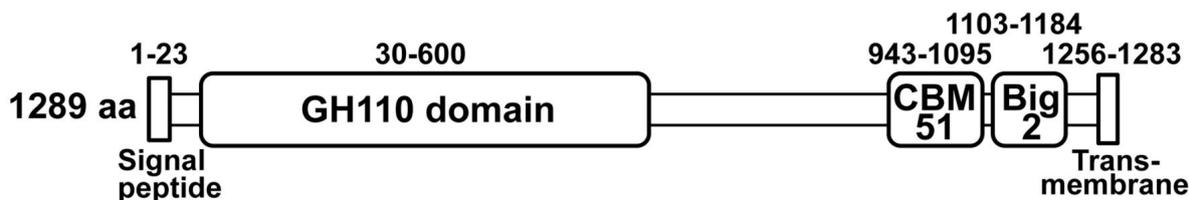


図 1-1-2. GH110 AgaBb のドメイン構造。Wakinaka et al., *Glycobiology*, 2012(34)より。

AgaBb の GH110 ドメインは既報の GH110 Subfamily A の中でも *Streptomyces avermitilis* ATCC3162 株由来の SaGal110A と高い配列同一性 (46.11%) を示す。そこから予想される通り、AgaBb は分岐型

の B 型血液型抗原にのみ作用する特異性の高い酵素である。唯一、結晶構造が明らかとなっている GH110、PdGH110B とは配列同一性が 27.09%と低い（表 1-1-2）。

表 1-1-2. AgaBb と既報の GH110 の BLASTp 配列アラインメントの結果。アミノ酸配列は CAZy を介して UniProt および protein data bank (PDB) より入手した。

Subfamily	Protein name	Organism	Uniprot ID	E value	Percentage Identity	Source
A	SaGal110A	<i>Streptomyces avermitilis</i> ATCC31267	Q826C5	$7 \times 10^{-163}$	46.11%	(48)
A	BtGal110A	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i> ATCC29148	Q8A2Z5	$5 \times 10^{-107}$	37.52%	(48)
A	BfGal110A	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	Q5L7M8	$3 \times 10^{-98}$	32.11%	(48)
B	BtGal110B	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i> ATCC29148	Q89ZX0	$5 \times 10^{-80}$	30.22%	(48)
B	BfGal110B	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	Q5LGZ8	$2 \times 10^{-73}$	30.72%	(48)
-	PdGH110B	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> U2A	(PDB ID: 7JW4, 7JWF)	$4 \times 10^{-50}$	27.09%	(49)

CBM51 ドメインについては既報のホモログでは *Clostridium perfringens* ATCC13124 株由来の GH95CBM51 と最も高い配列同一性 (38.74%) を示している (表 1-1-3)。AgaBb の CBM51 は血液型抗原の中でも B 型血液型抗原を特異的に認識することが解っている。これは機能解析がされている他の CBM51 と異なる。

表 1-1-3. AgaBb と既報の CBM51 の blastp 配列アラインメントの結果。アミノ酸配列は CAZy を介して UniProt より入手した。

Subfamily	Protein name	Organism	Uniprot ID	E value	Percentage identity	Source
b	GH95CBM51 (CPF-2129)	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124	A0A0H2YQB3	$2 \times 10^{-24}$	38.74%	(50)
a	GH98CBM51 (CPE0329)	<i>Clostridium perfringens</i> strain 13	Q8XNK4	$2 \times 10^{-23}$	36.74%	(50)

#### 1.1.1.4. 本研究の目的

AgaBb と PdGH110B は遠縁のホモログであるものの、基質の特異性が異なるため、PdGH110B の結晶構造から AgaBb の B 型血液型抗原に対する強い特異性を具体的に説明するのは困難である。そこで本研究では AgaBb の結晶構造解析およびリガンドとの複合体構造の決定を主目的とした。

本研究は 2012 年まで私の研究室に在籍していた修士課程の赤間恵氏の研究から派生したものである。赤間氏は AgaBb の GH110 ドメインの結晶化に成功したものの、位相決定、構造決定には至らなかった。本研究では当時取得された X 線回折像を利用しているため、後述で赤間氏の研究データに触れる。

それとは別に、CBM はリガンドを認識することで GH ドメインの基質へのアクセスを促している特性から、フレキシブルに動くドメインであると考えられている。結晶構造ではパッキングによりタンパク質のコンホメーションが制限され、必ずしも水溶液中の状態を反映していない。そこで本研究では、クライオ電子顕微鏡による AgaBb の構造解析から、活性ドメインと CBM の兼ね合いの検証も試みた。

## 1.1.2. 方法

本研究における試薬は特記のない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を用いた。また、液体試薬は予め滅菌したもの、あるいは滅菌された状態で入手したものを利用している。遠心にはMX-307（トミー）を用いた。

また特記のない限り、濃度は全て終濃度である。

### 1.1.2.1. 本研究で用いた AgaBb コンストラクト

図 1-1-3 に本研究で用いた AgaBb のコンストラクトを纏める。

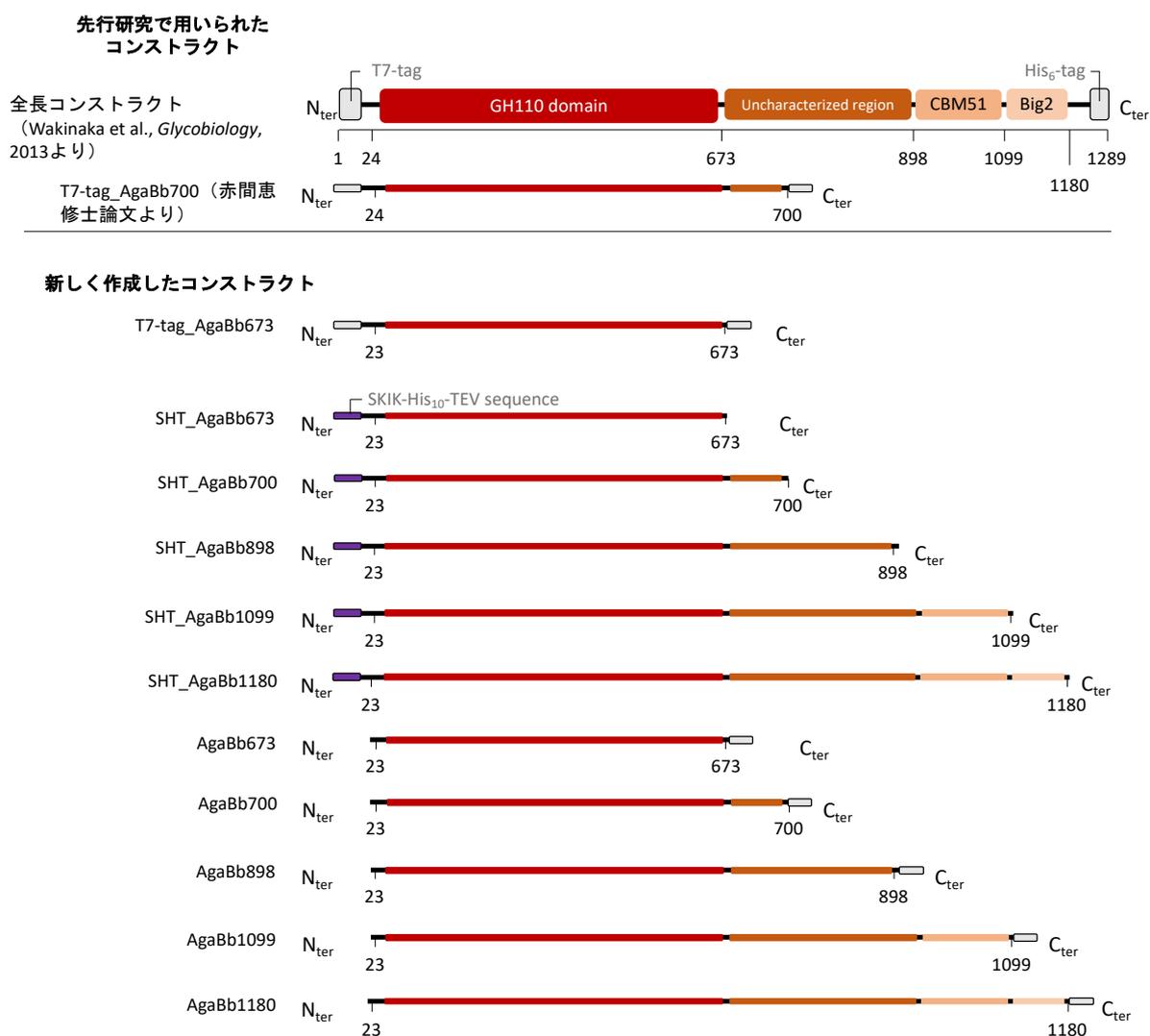


図 1-1-3. 本研究で用いた AgaBb のコンストラクト。SHT : SKIK-His10-TEV sequence。

### 1.1.2.2. AgaBb コンストラクトの構築

本研究では、先行研究で用いられた大腸菌異種発現用プラスミド pET23b T7-tag\_AgaBb700 (2012年度卒業、赤間恵修士論文より、図 1-1-4. 左)、および近畿大学の芦田久教授から供与された AgaBb 全長配列を含んだ大腸菌異種発現用プラスミド pET23b T7-tag\_AgaBb\_Full (Wakinaka et al., *Glycobiology*, 2013 で用いられたもの、図 1-1-4 右) を基に発現タンパク質コンストラクトの再構築を行なった。いずれのコンストラクトも Ni-IMAC 精製用の His<sub>6</sub>-tag が付加されている。

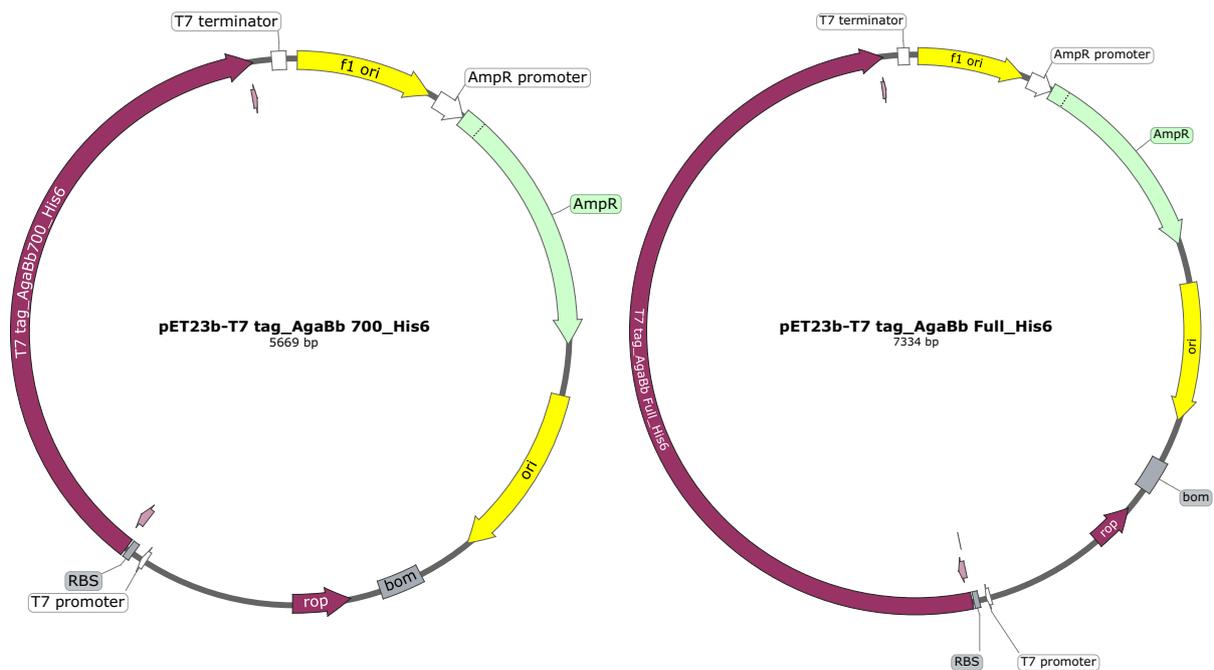


図 1-1-4. コンストラクト再構築のスタート地点に用いたプラスミドのマップ

再構築の初期段階として、まず組換えタンパク質のN末端にある T7-tag を、結晶化には不要な揺らぎの大きい領域として除去した。それと並行して、発現量を増やすための SKIK 配列(51)、Ni-IMAC 精製に用いる His<sub>10</sub>-tag、精製後にタグを除去するための TEV プロテアーゼ認識サイト（以降、SKIK-His<sub>10</sub> tag-TEV sequence、SHT 配列）を付加したコンストラクトも作製した。なお SHT 配列全長の付加は1回の DNA ワークで行うには長すぎたため、先に SKIK 配列と TEV プロテアーゼ認識サイト、次に His<sub>10</sub>-tag を加える形で、プライマーを2対デザインした。

続いて、C 末端の配列を除去した。切断部分は前任者が用いていたコンストラクト（AgaBb700）、初期的に決定した結晶構造の結果（AgaBb673、後述、1.1.3.3 節を参照）、そして PSIPRED や Disopred による 2 次構造予測およびディスオーダー領域の予測（AgaBb800、AgaBb1099、AgaBb1180、後述、図 1-1-14 参照）から決定した。PSIPRED ではディスオーダー領域前半部分、2 次構造を崩さないと思われる位置を見極めて切断部分を判断した。

配列の挿入と欠失は Hasson et al., *Anal Biochem*, 2008(52)の方法を改変し、PCR、DpnI 処理、形質転換、プラスミド抽出の順で行なった（図 1-1-5）。

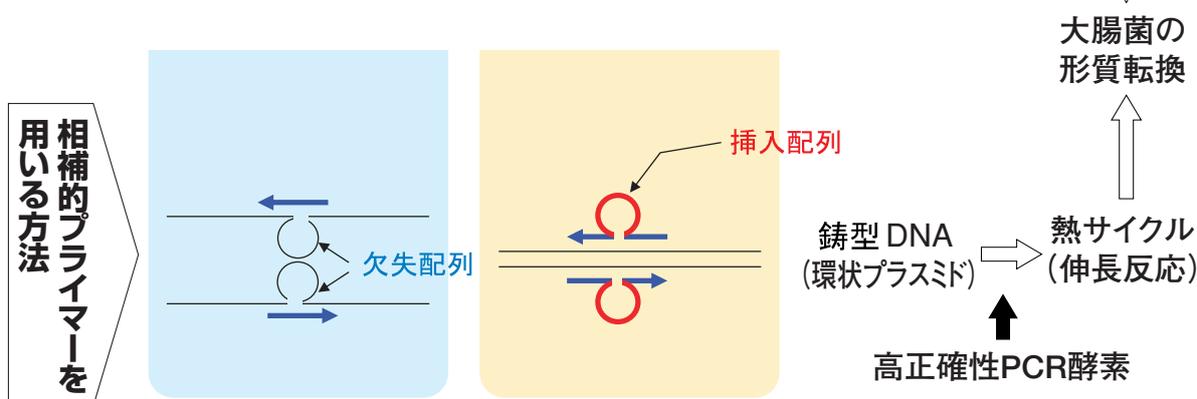


図 1-1-5. 相補的プライマーを用いたプラスミド配列の欠失・挿入の原理。東洋紡株式会社 (<https://lifescience.toyobo.co.jp/jikken/per93se01.pdf>) より改変。

### 1.1.2.3. ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR は KOD One PCR Master Mix 取扱説明書 (東洋紡、[https://lifescience.toyobo.co.jp/user\\_data/pdf/products/manual/KMM-101\\_201.pdf](https://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/pdf/products/manual/KMM-101_201.pdf)) の手順を一部改変し、表 1-1-4 の通りに試薬を混合し、TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ) で 1 分間、98°C で加熱した。その後、表 1-1-5 に沿って PCR サイクルを行った。用いたプライマー対は表 1-1-6 に纏めた。本の方法から改変した点は以下の通りである。

- PCR 産物を多量に作る必要がなかった為、全量を 50  $\mu\text{L}$  から 10  $\mu\text{L}$  に下げた。
- アニーリング温度はプライマーの融解温度から 5°C 差し引いた温度とされていたが、設定の手間を省く為、温度を 50°C に固定し、プライマーの  $T_m$  値が 55°C 以上になるように設計した。なお、プライマーの  $T_m$  値は SnapGene Viewer (SnapGene) が算出したものを採用した。
- 伸長時間は 1 kb あたり 1 から 10 秒とされていたが、確実に伸長されるために 30 秒/kb に伸ばした。本章については、いずれのコンストラクトやプラスミドについても伸長時間を 210 秒に固定した。
- サイクル数は 25 から 45 サイクルとされていたが、PCR 産物の量を最大にするため 45 サイクルに固定した。

表 1-1-4. PCR 反応液の組成

試薬	終濃度・液量
KOD One® PCR Master Mix	1x (5 $\mu\text{L}$ )
プライマー	それぞれ 0.3 $\mu\text{M}$
テンプレートプラスミド	約 1 ng/ $\mu\text{L}$
滅菌水	Up to 10 $\mu\text{L}$

表 1-1-5. PCR 反応条件

	温度 (°C)	時間 (秒)	} 45 サイクル
変性	98	10	
アニーリング	50	5	
伸長	68	30 /kb	

表 1-1-6. AgaBb コンストラクト再構築に用いたプライマー対。C 末端の切断部位はアミノ酸残基番号で表している。

用途	プライマー
T7-tag 除去	5'-AAGAAGGAGATATACATATGGCCGGAGGAGACGTCG-3' 3'-TCCTCTATATGTATACCGGCTCCTCTGCAGCAGAG-5'
SKIK_His10-tag_TEV sequence 挿入 (第1段階)	5'-TCATAAAATAAAAGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGACGTCGTCTCGGTCG-3' 3'-TCCTCTATATGTATACAGATTTTATTTTCTTTTGGACATAAAAAGTCCCG-5'
SKIK_His10-tag_TEV sequence 挿入 (第2段階)	5'-TCTAAAATAAAACATCATCACCATCACCACCATCATCACCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGACGTCGTCTCGGTCG-3' 3'-TCCTCTATATGTATACAGATTTTATTTTGTAGTAGTGGTAGTGGTGGTAGTAGTGGTACTTTTGGACATAAAAAGTCCCG-5'
C 末端を 673 まで 切除 + His <sub>6</sub> 切除	5'-GGACGGTCTCGTCCCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAG-3' 3'-CGCGCCTGCCAGAGCAGGGGACTCTAGGCCGACGAT-5'
C 末端を 700 まで 切除 + His <sub>6</sub> 切除	5'-GATCACCGCGGTCCGGCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGC-3' 3'-CGTGCTAGTGGCGCCAGCCGACTCTAGGCCGACGAT-5'
C 末端を 898 まで 切除 + His <sub>6</sub> 切除	5'-TAGCAGCCGGATCTCAGCCGTTCCACCCGATCAGCT-3' 3'-GAGTCAAGAAAGCCGAAACAATCGTCGGCTAGAGTCGGCAAGTGGCGTAG-5'
C 末端を 1099 まで 切除 + His <sub>6</sub> 切除	5'-CGGCGTTGAGATGCCGTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGC-3' 3'-AGCAGCCGCAACTCTACGGCACTCTAGGCCGACGAT-5'
C 末端を 1180 まで 切除 + His <sub>6</sub> 切除	5'-CGGCGTCCGTCGGTGTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGT-3' 3'-AGCGTAGGCAGCCACGGCAGCCACTCTAGGCCGACGAT-5'
C 末端を 673 まで 切除	5'-GGACGGTCTCGTCCCCTCGAGCACCACCACCACCA-3' 3'-CGCGCCTGCCAGAGCAGGGGAGCTCGTGGTGGTGG-5'
C 末端を 700 まで 切除	5'-GATCACCGCGGTCCGGCTCGAGCACCACCACCACCACTGAGATCCGGC-3' 3'-CGTGCTAGTGGCGCCAGCCGAGCTCGTGGTGGTGGTGGT-5'
C 末端を 898 まで 切除	5'-GATGCGGGTGAACGGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGC-3' 3'-CGGTGTAACGTGACTACGCCACTTGCCTGGAGCTCGTGGTGGTGGTGGT-5'
C 末端を 1099 まで 切除 + His <sub>6</sub> 切除	5'-CGGCGTTGAGATGCCGTGAGATCCGGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCC-3' 3'-GCCAAGCAGCCGCAACTCTACGGCGAGCTCGTGGTGGTGG-5'
C 末端を 1180 まで 切除	5'-CGGCGTCCGTCGGTGTGAGATCCGGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGC-3' 3'-GCAGCGCCACGGCAGCCACGAGCTCGTGGTGGTGG-5'

#### 1.1.2.4. DpnI 処理

DpnI 制限酵素を用いたテンプレートプラスミドの分解はタカラバイオの取扱説明書 ([https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/1235A\\_DS\\_j.pdf](https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/1235A_DS_j.pdf)) を基にプロトコルを構築した。表 1-1-7 の組成で PCR 産物に試薬を添加、混合して 1 時間、37°C で反応させた。

表 1-1-7. DpnI 処理反応液の組成

試薬	終濃度・液量
PCR 反応液	10 μL
10x T Buffer	1x
DpnI	0.5 U/μL
滅菌水	メスアップ 20 μL

#### 1.1.2.5. 形質転換

プラスミドまたは反応液 2 μL を氷上で解凍した *E. coli* コンピテントセル 100 μL と混合し、30 分間氷上で静置した。その後、混合物を 70 秒間、42°C で熱処理し、2 分間氷上で静置、SOC 培地 150 μL と混合して 1 時間、37°C で回復培養を行なった。回復培養後、用いている大腸菌株とプラスミドベクターに応じた抗生物質を加えた SOC 個体培地に培養液全量を塗抹し一晩、37°C で培養した。得られたコロニーを、抗生物質を加えた 5 mL LB 培地に植菌し一晩、37°C で振盪培養した。培養液の濁りを

確認したのち、滅菌した PBS 2X、50% Glycerol と培養液を 1:1 の比率 (500  $\mu$ L:500  $\mu$ L) で混合し、これをグリセロールストックとして-80°Cで凍結保存した。

大腸菌株について、コンストラクト再構築およびプラスミド増幅には *E. coli* JM109 株 (Agilent) と DH5 $\alpha$  株 (Agilent) を用いていた。抗生物質は 100  $\mu$ g/mL ampicillin を用いた。

異種発現 (後述、1.1.2.7 節を参照) には BL21 CodonPlus(DE3) RIL (Agilent)、Rosetta2 (DE3) (Merck)、BL21 Star (DE3) (ThermoFischer Scientific) を用いた。BL21 Star (DE3)に至っては形質転換時にレアコドンを補充するための pRARE2 プラスミドを目的プラスミドと共に添加した。抗生物質は 100  $\mu$ g/mL ampicillin、17  $\mu$ g/mL chloramphenicol を用いた。

### 1.1.2.6. プラスミド抽出

1.1.2.5. で余った培養液 4.5 mL 分を用いてプラスミド抽出を行なった。抽出には日本ジェネティクスの FastGene™ プラスミドミニキットを用いて、メーカー推奨の手順の通りに行なった。作業手順の概要を図 1-1-6 に纏める。抽出したプラスミドの濃度を Nanodrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific) と付属のソフトウェアで測定した 260 nm の吸光度から求めた。ブランクには滅菌水を用いた。抽出したプラスミドの配列は、Fasmac Premix 解析のガイドラインに沿って、プラスミドを 300~600 ng、プライマーを 6.4 pmol、滅菌水をメス・アップ 14  $\mu$ L で混合し、シークエンス解析 (Fasmac シークエンス解析外注サービス) を行なった。解析結果は SnapGene Viewer で確認した。

### 1.1.2.7. 発現検討

異種発現用プラスミドを発現用大腸菌株に、1.1.2.5. の手順に沿って組み込んだ。凍結状態のグリセロールストックを用いて抗生物質を加えた 3 mL の LB 培地を植菌し一晩、37°C で振盪培養した。これを前培養とした。前培養 50  $\mu$ L を用いて抗生物質を加えた 5 mL の LB 培地を植菌し 37°C で培養液の 600nm の光学密度 (OD<sub>600</sub>) が 0.4~0.6 に達するまで振盪培養した。OD<sub>600</sub> は Mini photo 518R (TAITEC) で、植菌されていない LB 培地をブランクに用いて測定した。OD<sub>600</sub> が目的の吸光度に達したところで、IPTG (Protein Ark) を添加し、培養を再開した。培養条件は以下のように条件を振って行なった。

- ① IPTG 濃度を 0.1 mM、培養時間を 20 時間に固定し、発現株を数種類、IPTG 誘導後の温度を 37、30、25、18°C に振った。なお、18°C が発現に最も適したサンプルについては誘導前の温度検討として、37°C と 25°C を試した。
- ② ① で最も発現量の多かった条件で培養時間を 3、6、20、44 時間に振った。
- ③ ② で最も発現量の多かった条件で IPTG 濃度を 1、0.5、0.1、0 mM に振った。

なお、SHT\_AgaBb673、SHT\_AgaBb700、SHT\_AgaBb898、SHT\_AgaBb1099、SHT\_AgaBb1180、AgaBb673、AgaBb700、AgaBb898、AgaBb1099、AgaBb1180 の際はコンストラクトの数が多かったため、①しか実行していない。

培養後、菌体を 10 分間 13000 rpm で遠心し、上清を除去し、800  $\mu$ L 破碎バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.0、200 mM NaCl) に懸濁した。懸濁物を、微量超音波ホモジェナイザー Q125 (Qsonica) を

集菌	 培養液 1 ~ 5ml >10,000rpm 2min  上清を除去
溶菌	 200 $\mu$ l mP1 <sup>※1</sup> ボルテックス 200 $\mu$ l mP2 転倒混合 室温 2min 300 $\mu$ l mP3 転倒混合
ライセート 清澄化	 13,000rpm 2min 
カラム結合	 上清を分注 13,000rpm 30sec 
メンブレン 洗浄	 (400 $\mu$ l mP4) (13,000rpm) (30sec) <sup>※2</sup>  600 $\mu$ l mP5 <sup>※1</sup> 13,000rpm 30sec
メンブレン 乾燥	 13,000rpm 2min 
溶出	 50 $\mu$ l mP6 室温 2min 13,000rpm 2min 

図 1-1-6. シリカメンブレン法を用いたプラスミド抽出。日本ジェネティクス株式会社 ([https://www.n-genetics.com/products/search/detail.html?product\\_id=4480](https://www.n-genetics.com/products/search/detail.html?product_id=4480)) より 1 部改変。

pulse 1 秒、amplitude 39%に設定し、1 分間、氷上で破碎した。破碎物を 45 分間 13000 rpm で遠心し、上清（粗酵素液）と沈殿物（不溶画分）をわけ、沈殿物を破碎バッファーで懸濁した。粗酵素液と不溶画分溶液を SDS-PAGE の試料として用いた。

#### 1.1.2.8. SDS-PAGE

SDS-PAGE は MBL のウェブサイト「ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）の原理と方法」（<https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/sds-page.html>）に沿って行った。ただし、以下の点についてメソッドを改変した。

- 分離ゲル（アクリルアミド濃度 7.5%）は 6 mL 鋳型に注入した。組成は表 1-1-8 に示す。
- 濃縮ゲルは 2.7 mL 鋳型に注入した。組成は表 1-1-9 に示す。
- 試料をそれぞれ SDS-PAGE 用サンプルバッファーと 1.5:3.5 の比率で混合し、95°C で 5 分間加熱した。これを SDS-PAGE サンプルとした。サンプルバッファーの組成は表 1-1-10 に示す。

SDS-PAGE サンプルは 15  $\mu$ L、分子量マーカー（Protein Ladder-Broad、ビオテックラボ）は 5  $\mu$ L ずつレーンに注入した。

電気泳動の電流・電圧は myPowerII300 AE-8135（ATTA）で設定した。初期設定 200 V、35 mA に設定し、泳動中に定電流から定電圧に自動的に切り替わるようにした。泳動時間は約 60 分であった。

ゲルをガラス板から剥がし、タッパに移した後、タンパク質の固定化を行った。RO 水に浸してサララップで蓋をし、1 分間電子レンジ（500 W）で加熱、5 分間振盪して、RO 水を捨てた。これを計 3 回繰り返した。

その後、RO 水を除去し、CBB 染色液を加え、10 から 15 秒間電子レンジ（500 W）で加熱、30 分間振盪し、CBB 染色液を回収し、SDS-PAGE のゲルを観察した。CBB 染色液は CBB G-250 を終濃度 0.08 g/L で滅菌水に溶かし、一晚攪拌した後、塩酸を終濃度 0.2 M になるように加えて作製した。なお、CBB 染色液は滅菌していない。

表 1-1-8. 分離ゲルの組成

試薬	液量
40% Acrylamide	1.5 mL
滅菌水	4.5 mL
Lower gel fuffer (LGB)*	2.0 mL
25% Ammonium persulfate (APS)	50 $\mu$ L
TEMED**	7.5 $\mu$ L

\*1.5 M Tris pH 8.8、0.4% SDS

\*\*Tetramethylethylenediamine

表 1-1-9. 濃縮ゲルの組成

試薬	液量
40% acrylamide	0.48 mL
滅菌水	2.52 mL
Upper gel buffer (UGB)*	1.0 mL
25% APS	25 $\mu$ L
TEMED	4.0 $\mu$ L

\*0.5 M Tris pH 6.8、0.5% SDS

表 1-1-10. SDS-PAGE 用サンプルバッファーの組成

試薬	液量
10% SDS	10 mL
UGB	25 mL
80% Glycerol	6.25 mL
$\beta$ -mercaptoethanol	2.5 mL
Bromophenol blue	2.5 mL
滅菌水	3.75 mL

#### 1.1.2.9. 小スケールでの Ni アフィニティークロマトグラフィー(バッチ法)精製

SHT を付加したコンストラクトについてはバッチ法による簡易的な精製を行い、His<sub>10</sub>-tag が N 末端に付加されているか確認した。発現検討で得た粗酵素液を予め 1.5 mL チューブ内で 1.1.2.7. の破碎バッファーを用いて洗浄した cOmplete His-tag resin (Roche) 133.33  $\mu$ L に加え、1 時間、4°C で転倒混合した。その後、5 分間、500 xg で遠心し、上清（素通り画分）を SDS-PAGE 用に回収した。次に破碎

バッファー500  $\mu$ L でレジンを懸濁し、5 分間、500 xg で遠心し、上清を除去するというサイクルを 3 回繰り返した。200  $\mu$ L 破碎バッファー+500 mM Imidazole でレジンを懸濁し、5 分間、4°C で転倒混合した。最後に 5 分間、4°C で遠心し、上清を SDS-PAGE 用に回収した。

#### 1.1.2.10. 培養のスケールアップ

発現検討で決定した異種発現に最適な培養条件を基に、状況に応じて 150 mL、または 1.5 L スケール（発現検討の 30、または 300 倍）での培養を行なった。前培養と本培養、抗生物質、IPTG の液量を培養スケールに合わせて調製した。培養後、集菌した菌体を使用時まで -80°C に凍結保存した。

#### 1.1.2.11. タンパク質の精製

本章では特記のない限りタンパク質の精製を Ni-固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (Ni-IMAC)、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で行なった。なお、N 末端に SHT が付加されているコンストラクトについては Ni-IMAC の後に TEV プロテアーゼを用いてタグを切り出している。

##### Ni-固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (Ni-IMAC)

回収した菌体を約 0.1 g/mL となるよう 50 mM Tris-HCl pH 7, 200 mM NaCl (破碎バッファー) に懸濁し、氷冷しながら超音波破碎を行った。超音波破碎器は Sonifier 250D (BRANSON) を用い、出力レベル 6、Duty 50%、Pulse 1 秒で約 0.25 min/mL 行った。高速 (13,000 rpm 以上) で、45 分間の遠心した後、上清のみを採取した。その後、親水性の 0.45  $\mu$ m 孔径フィルターを用いて微粒子を除去し、粗酵素液を得た。

Ni-IMAC は以下の装置を連結して行なった。

- ペリスタルチックポンプ Econo Gradient Pump (ペリスタポンプ、Bio-rad)、流速は 4 mL/min に設定した。
- cOmplete His-Tag resin を 5 mL 充填した C-16/20 カラム (Pharmacia Biotech) (以降 Ni カラム)。
- UV 検出器 Bio-MiniUV Monitor AC-5100L(ATTO)、検出の出力として Electronic Polyrecorder (TOA) を接続した。

予め Ni カラムを 1.1.2.7. の破碎バッファー 5 column volume (CV) で平衡化した後、粗酵素液全量を Ni カラムに通し、目的タンパク質を吸着させた。検出機のシグナルがベースラインに戻るまで破碎バッファーを流し、破碎バッファー+5 mM imidazole (Ni 精製洗浄バッファー) を 15 mL 流してレジンに吸着した夾雑物を除去した。破碎バッファー+500 mM imidazole (Ni 精製溶出バッファー) を 45 mL (検出量が多い時は 90 mL) 流し、目的タンパク質を溶出させた。粗酵素液、Ni カラム素通り画分、洗浄液、溶出液をそれぞれ用いて SDS-PAGE を行い、精製純度を確認した。Amicon Ultra centrifugal filter device MWCO 10,000(Merck)を用いて、分離した酵素液を 2 mL 以下まで濃縮し、バッファーを 25 mM Tris-HCl pH 7.0 (陰イオン交換バッファー) に置換、そして 0.45  $\mu$ m 孔径の親水性 Ultrafree スピンフィルター (Merck) で微粒子や沈殿物を除去した。TEV protease で処理が必要なコンストラクトについては破碎バッファーで置換した。

##### TEV protease によるタグの除去

コンストラクトに TEV protease の認識配列が含まれているコンストラクトについては濃縮・バッファー置換した Ni-IMAC 溶出液のタンパク質濃度を Nanodrop 2000c で測定した 280 nm の吸光度から算出した。そこに研究室内で自家生成した TEV protease を、濃度が目的タンパク質の 1/100 程度になるように加え、4°C に一晩インキュベートした。インキュベートした溶液で再度 Ni-IMAC を行った。目的タンパク質は His-tag が付加されていないので素通り画分に含まれている。回収したタンパク質を Amicon ultra centrifugal filter device MWCO 10,000(Merck)を用いて、分離した酵素液を 2 mL 以下まで濃縮した。

### 陰イオン交換クロマトグラフィー

精製装置には AKTA Purifier (Amersham Biosciences)、制御ソフトには UNICORN ver.5.31、カラムには Mono Q 10/100 GL (Pharmacia Biotech) を用いた。流速は 2 mL/min、自動分取は 50 mAU 以上の UV シグナルが検出された時に 2 mL ずつ分取されるように設定した。

予め MonoQ カラムを陰イオン交換バッファー 10 CV で平衡化した後、Ni-IMAC で獲得したタンパク質溶液を流路に注入し、陰イオン交換バッファー+500 mM NaCl へ塩濃度の 20 CV のリニアグラジエントを掛け、サンプルに含まれているタンパク質を電荷に応じて分離・分取した。分取されたフラクションをそれぞれ用いて SDS-PAGE を行い、精製純度を確認した。目的タンパク質を見かけ 90% 以上の純度で含んだフラクションを、Amicon ultra centrifugal filter device MWCO 10,000 を用いて 2 mL 以下まで濃縮、そして 0.45  $\mu\text{m}$  孔径の親水性 Ultrafree スピニングフィルター (Merck) で微粒子や沈殿物を除去した。

### ゲルろ過クロマトグラフィー

精製装置には AKTA FPLC、制御ソフトには UNICORN ver.5.31、カラムには Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Lifesciences) を用いた。流速は 1 mL/min、自動分取は 20 mAU 以上の UV シグナルが検出された時に 2 mL ずつ分取されるように設定した。

予め Superdex カラムを 25 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM NaCl (ゲルろ過バッファー) 2 CV で平衡化した後、陰イオン交換クロマトグラフィーで獲得したタンパク質溶液を流路に注入し、ゲルろ過バッファー 1 CV を流すことで、サンプルに含まれているタンパク質を分子量に応じて分離・分取した。分取されたフラクションをそれぞれ用いて SDS-PAGE を行い、精製の精度を確認した。目的タンパク質を見かけ 95% 以上の純度で含んだフラクションを、Amicon ultra centrifugal filter device MWCO 10,000 を用いてタンパク質濃度が 20 mg/mL 以上になるように濃縮し、バッファーを 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM NaCl に置換 (1.1.2.14 の熱安定性試験においてのみ、温度変動による pH の変化を避けるべく 10 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 200 mM NaCl に置換した)、そして 0.22  $\mu\text{m}$  孔径の親水性 Ultrafree スピニングフィルター (Merck) で微粒子や沈殿物を除去した。タンパク濃度は Nanodrop 2000c Spectrophotometer と付属のソフトウェアで測定した 280 nm の吸光度と ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) が算出したタンパク質吸光係数の理論値から求めた。

ここで獲得したタンパク質を以降の実験に用いた。タンパク溶液は全て使用時まで 4°C で保管し、1 ヶ月以内に使い切るようにした。673 コンストラクトのみ、コロナウィルス感染拡大に伴う研究室閉鎖に応じて、10  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、-20°C で凍結保存した。使用時は氷上で 15 分以上かけて溶解した。

### 1.1.2.12. 薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography、TLC)

定性的な活性測定を行うため、精製酵素と基質を表 1-1-11 の条件で混合し、一晚反応させた。

表 1-1-11. TLC 用の酵素反応液の組成表

試薬	終濃度・液量
酵素	1 $\mu\text{g/mL}$
基質	10 mM
バッファー	100 mM
滅菌水	Up to 4 $\mu\text{L}$

本章では基質に B 型血液型抗原 3 糖 Gal- $\alpha$ 1,3-(Fuc- $\alpha$ 1,2-)-Gal、Dextra)、バッファーに sodium acetate pH 6.0 を用いた。

図 1-1-7 のように HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) に HB 鉛筆で印を付け反応液 1  $\mu\text{L}$  を原点の位置にスポットングした。担体を 5 分間乾燥させた後、展開溶媒を充填させた槽に原点が溶媒に浸からないように立て、2 時間ほど静

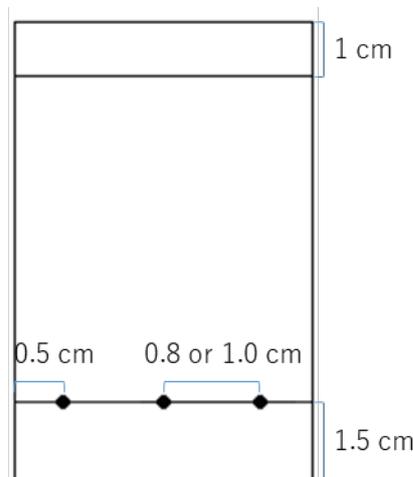


図 1-1-7. TLC 単体の模式図

置する事でサンプルを固定層上で展開させた。展開フロントが担体上部に到達したところで担体を槽から取り出し 15 分乾燥させた。担体全体に呈色液を吹き掛け、15 分間乾燥させた後、オーブントースターで担体上に生成物のスポットが視認できるまで（1～2分間）加熱した。

コントロールとして酵素を加えていない反応液と、生成物を用いた。なお、本章では生成物の一つである Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal を入手できなかったため、Gal のみを生成物として用いた。

本章で用いた展開溶媒には 1-butanol:acetic acid:純水を 2:1:1 の比率(34)で展開の 30 分前に混合して用いた。呈色液は 0.2 g diphenylamine に 0.2 mL aniline、1 mL phosphoric acid、10 mL acetone を加え、呈色直前（5 分以内）に溶解・混合した (<http://www.cchem.berkeley.edu/rsgp/TLCStainGeneralReference.pdf>、18 番目のレシピ)。

#### 1.1.2.13. 分子量測定とオリゴマー状態の検証

ゲルろ過クロマトグラフィーに用いた Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade にサンプルと同様に 10 倍希釈した分子量マーカー (Gel Filtration Standard、Bio-rad) 500  $\mu$ L をロードし、溶出時間とマーカーの分子量の対数をプロットし、検量線を作製した。これに目的サンプルの溶出時間を照らし合わせ、分子量を算出した。算出した分子量とモノマー鎖の分子量の理論値から、水溶液中での分子量を推定した。

#### 1.1.2.14. 熱安定性試験 (thermal shift assay)

熱安定性試験には StepOne Real time PCR system (Applied Biosystems) と付属されているシステム制御ソフトウェアを用いた。20 mg/mL タンパク質溶液から 2 倍ずつ段階希釈した溶液 25  $\mu$ L (ブランク含め全 8 条件) に 1x ROX Dye (ThermoFischer Scientific) を加え装置に入れ、25～99°C の温度勾配を掛け、605 nm での蛍光をモニタリングした。蛍光度の微分値 (任意単位) が最も高かった時の温度を目的タンパク質の融解温度 ( $T_m$  値) とした。

なお、Tris-HCl では熱の変動によって pH が変わりやすいので、段階希釈には 0.1 M HEPES-NaOH pH 7.0 を用いた。

#### 1.1.2.15. Pre-Crystallization Test (PCT)

結晶化スクリーニングに最適なタンパク質濃度を決定するため、pre-crystallization test (PCT、Hampton Research) を使った。取扱説明書の通りの手順で濃度検討を行った ([https://hamptonresearch.com/uploads/support\\_materials/HR2-140\\_142\\_User\\_Guide.pdf](https://hamptonresearch.com/uploads/support_materials/HR2-140_142_User_Guide.pdf))。結晶化プレートには Intelli-plate の 96 穴プレート (Art Robbins Instruments) を使い、シッティングドロップ蒸気拡散法で試験を行なった。リザーバータンクには沈殿剤溶液を 60  $\mu$ L ずつ加えた。ドロップウェルでは精製タンパク質溶液 0.5  $\mu$ L と沈殿剤溶液を 0.5  $\mu$ L 混合し、シールで密閉した。インキュベーションは結晶化スクリーニングと同じ 20°C で、30 分間行った。各条件での沈殿の有無を顕微鏡で観察し、スクリーニングに最適なタンパク質濃度を判断した。顕微鏡は SZX7 (OLYMPUS)、カメラは DP12 (OLYMPUS) を用いた。

#### 1.1.2.16. 結晶化スクリーニング

PCT で最適とされた濃度で、PCT と同じ要領で結晶化スクリーニングを行った。スクリーニングキットには JCSG Core Suite I、II、III、IV (Nextal Technologies) を用いた。20°C にインキュベート後、最初の週は毎日、その後一ヶ月経過するまでは週に一度、その後は月に一度結晶化プレートを観察し、結晶の有無を確認した。

#### 1.1.2.17. 結晶化条件の最適化

結晶化スクリーニングで結晶の出現を確認した後、得られた結晶化条件に近傍条件で新たに結晶化実験を行い、結晶の質の向上を試みた。条件の振り方は以下のように 2 次元 (②のみ 3 次元) に実行することを基本とした。なお、状況に応じて条件の振り方を替えている。

- ① 初期結晶化条件を基にタンパク濃度を 2.5 µg/mL ずつ 4 条件、沈殿剤濃度を polyethylene glycol (PEG) なら 2% ずつ、塩なら 0.2 M ずつ 4-6 条件。
- ② ①で最も良い条件を基に、沈殿剤の他に塩が含まれている場合、塩 0.02 M ずつ 4 条件、沈殿剤濃度を PEG なら 1% ずつ、塩なら 0.1 M ずつ 4 条件。  
沈殿剤の他に緩衝液が含まれている場合、pH 0.3 ずつ 4 条件、沈殿剤濃度を PEG なら 1% ずつ、塩なら 0.1 M ずつ 4 条件。  
3 枚の結晶化プレートで同様の条件を用意し、4、20、30°C でインキュベートした。
- ③ ②で最も良い条件にバッファーが含まれていない場合、その条件に 0.1 M MES-NaOH pH 6.0、MES-NaOH pH 6.5、HEPES-NaOH pH 7.0、HEPES-NaOH pH 7.5、Tris-HCl pH 8.0、Tris-HCl pH 8.5 のいずれかを加えて 6 条件、沈殿剤濃度を②と同様に振って 4 条件。  
塩が含まれていない場合、その条件に Hampton Research の Salt Option にある塩 48 種類（本キットには 49 条件あるが、プレートのウェル数に合わせるため、結晶化の条件の中でも珍しい印象のある nickel (II) chloride hexahydrate を除いた）を、濃度を 0.2 M に固定して加えた。
- ④ ③で最も良い条件を基に、抗凍結剤 (glycerol, trehalose, 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD)、ethylene glycol, sucrose) をそれぞれ終濃度 5%、10%、20% で添加になるように添加し、沈殿剤濃度を②と同様に振って 4 条件。
- ⑤ ④で最も良い条件を基に、沈殿剤濃度を②と同様に振って 4 条件、シード（後述、1.1.2.18 節を参照）の濃度 1 倍から 10 倍ずつ段階希釈して 8 条件。更に状況に応じて microseed matrix screening (MMS、後述、1.1.2.18 節を参照) を行なった。

なお、各ステップで結晶化の再現を困難に感じた際はシードを添加して再度試みた。

他にも目的タンパク質のリガンドとなり得る物質を 10、20、100 mM 加えて共結晶化などを試みた。また、AgaBb673 については Additive Screen による結晶質向上のための添加剤の探索を、Hampton Research の取扱説明書 ([https://hamptonresearch.com/uploads/support\\_materials/HR2-428\\_Binder.pdf](https://hamptonresearch.com/uploads/support_materials/HR2-428_Binder.pdf)) に沿って行なった。

#### 1.1.2.18. シーディング

結晶化の再現性向上と結晶の質を改善させるため、シーディングを行った。シード作製の手順は Hampton Research の Crystal Growth 101 Seeding に記載されている「contemporary method」([https://hamptonresearch.com/uploads/cg\\_pdf/CG101\\_Seeding\\_2020.pdf](https://hamptonresearch.com/uploads/cg_pdf/CG101_Seeding_2020.pdf)) に基づいて作製した。ただし、以下の点について変更した。

- 結晶粉碎に用いるプローブは Till et al., *JoVE*, 2013(53) に基づき、パスツールピペットの先端を熱して作製した。
- 粉碎した結晶の採取はドロップ上で沈殿剤溶液を 10 µL ピペッティングして行った。
- ボルテックスによる粉碎はボルテックス 30 秒、冷却 30 秒のサイクルを計 6 回繰り返して行った。
- シードを用いた結晶化ではタンパク溶液 0.6 µL、沈殿剤溶液 0.4 µL、シード 0.2 µL の順で仕込んだ。

なお、シーディングは一般的な、結晶が得られた条件に近い条件にシードを加える手法と、スクリーニングキットの条件にシードを加える microseed matrix screening (MMS) を行なった(54)。後者の場合、最初の結晶が得られた条件の沈殿剤 (PEG、硫酸アンモニウム、または MPD) に合わせ、Nextal Biotechnologies の PEGs Suite、AmSO4s Suite、MPDs Suite を模した自作のキットを用いた。

#### 1.1.2.19. X 線回折強度データ収集

X 線回折強度データ測定は、茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の放射光施設 Photon Factory (PF) の実験ステーション NW12A、NE3A、BL1A、BL5A、そしてスイスにある Swiss Light Source の実験ステーション X06SA、X06DA で行った。結晶中の氷の生成の防ぐため、結晶を、抗凍結剤を含んだ結晶化溶液に数秒間ソーキングした。急激な条件の変化による結晶の損傷を抑えるべく、抗凍結剤の濃度が 2、10、20% の溶液を用意し、段階的に濃度が上がる形でソーキング

を繰り返した。なお、結晶化条件に既に抗凍結材が入っている場合は、その条件より高い濃度の溶液から段階的にソーキングした。また、壊れやすい結晶については抗凍結剤の濃度 10%、あるいは 5% まで上げたところでソーキングを止めた。その後、結晶の放射線による損傷を防ぐため 100 K の液体窒素内で瞬間凍結した。結晶をすくい取るにはクライオループ (Hampton Research)、結晶の輸送や保管に Unipuck (Hampton Research) と 3.6 L サイズのドライシッパー SC 2/4V (MVE) を用いた。測定は施設に備わっている装置やロボット、制御システムを用いて 100 K クライオストリーム中で、波長 1.000 Å の X 線を照射し収集した。

#### 1.1.2.20. 結晶構造解析

ここでは特記のない限り、プログラムをデフォルトの設定で利用した。また、私が自ら取得した回折データの他に赤間恵氏 (2012 年度修士課程修了) のデータも用いた。まず XDS で X 線回折データの指数付、積分、スケーリングを行った(55)。その後、CCP4 software suite 中のプログラム Aimless でデータ削減、主に CC1/2 の値を参考に以降の解析に最適な分解能を統計的に決定した(56)。本章では目的タンパク質の類似構造が決定されていなかった為、結晶格子内に重原子が含まれているとされているデータセットを用いてまず Crank2 のパイプラインで、実験的に単波長異常分散法 (SAD 法) で位相決定(57)し、作製されたモデルを Phaser で Native 条件のデータセットに分子置換した(58)。モデルの自動構築を Buccaneer で行い(59)、Coot を用いて手動でモデルを修正した(60)。手動でのモデル修正は、①まず目視でモデルと電子密度マップの比較し、自動構築時のモデルに謝りがないか確認する、②モデルがマップに重なる様に位置を直す、③Ramachandran plot にて外れ値を示しているアミノ酸の位置を、電子密度マップから外れない形で微調整する、④Geometry analysis (幾何学的分析) を基に同様の微調整を行う、⑤Check/delete waters で正しくモデルが組み立てられていない水分子を修正または削除する、という手順で行なった。リガンドの探索には、Coot の Find ligand ツールを用いた。リガンドのモデルは、PDB に登録されているものは 3 letter code を基に取り込み、そうでないものは Coot の Ligand Builder ツールを用いて作製した。最後に構造の自動精密化に Phenix program suite の phenix.refine を用いた(61, 62)。Omit map の作製には Polder map を利用した。得られた構造の描画には PyMOL (Schrödinger) を用いた。

最初の構造が決定した後、Aimless で処理した後、分子置換 (Phaser)、手動モデル修正 (Coot)、構造精密化 (phenix.refine) の手順で構造解析を行なった。

#### 1.1.2.21. クライオ電子顕微鏡観察用グリッドの作製

本操作は KEK 構造生物学研究センター (SBRC) の安達成彦特任准教授、川崎政人准教授の協力のもと行なった。

観察用グリッドには holey carbon grid (Quantifoil, Cu, R1.2/1.3, 300 mesh、和貴研究所)を用いた。卓上放電装置 (PIB-10、株式会社真空デバイス) 内で 11 mA、30 秒間放電することで観察用グリッドを親水化した後、18°C、湿度 100% に設定した Vitrobot Mark IV (ThermoFischer Scientific) 内部に垂直に固定した。固定されたグリッドに AgaBb1180 溶液を 3  $\mu$ L アプライした。AgaBb1180 溶液は、一粒子が 2 量体であると想定して、粒子濃度 20  $\mu$ M (4.93 mg/mL) になる様に調製した。ブロッキングにより濾紙でグリッド両面から挟み込んで水分を吸着した上で液体エタンに浸して瞬間凍結した。この時、blotting time は 5 秒、blotting force は 15 に設定した。凍結したグリッドを液体窒素に浸した loading station 上で O-ring に C-clip で固定し、これを観察用グリッド (オートグリッド) とした。

#### 1.1.2.22. 粒子画像の撮影

本操作は KEK SBRC の安達成彦特任准教授、川崎政人准教授の協力のもと行なった。

顕微鏡は KEK SBRC のクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica (加速電圧 200 kV、ThermoFischer Scientific) を、検出器は Falcon 3EC (ThermoFischer Scientific) を用い、操作は TEM User Interface(63)および EPU (ThermoFischer Scientific) 上で行った。輸送用 NanoCab を用いて作製した観察用グリッドをクライオ電子顕微鏡内にロードし、EPU 上でグリッドの様子を観察した。グリッドを覆う氷の膜の暑さとグリッドの孔 (ホール) 内で観察できる粒子の形状および数を確認し、粒子画像の撮影に適したホール

を探索した。撮影に適したホールについて粒子画像の連続測定を行なった。撮影の倍率は 120k であった。

#### 1.1.2.23. 粒子画像のプロセッシング

本操作は KEK SBRC 守屋俊夫特任准教授、池田聡人博士によりなされた。

撮影した 433 枚の粒子画像は、照射した電子量で重み付けした上で MotionCor2(64)を用いて平均化された。重み付けしていない画像から、CTFFIND4(65)および Gctf(66)を用いて contrast transfer function (CTF) 計算により分解能推定した。CTF により 4.2 Å より高い分解能を示した画像が採用された。この時点で画像中に氷の結晶が観察された画像は手動で取り除かれた。

以上により選定された 413 枚の画像から crYOLO(67)を用いて粒子が拾い上げられた。粒子の 2次元分類、*ab initio* なマップの再構築、粒子の 3次元分類、マップの 3次元精密化、CTF による精密化、Bayesian polishing は RELION 3(68)を用いて行われた。1 pixel を 3.52 Å とし 64 × 64 pixel のボックスサイズでスケールアップしつつ、重み付けした画像から直径 120 Å のマスクを用いて 45,335 個の粒子が抽出され、この粒子を用いて 2次元分類が 3 回行なわれた。良好に分類できた 26,366 粒子 (43 クラス) を用いて *ab initio* 再構築を行い、得られたマップに C1 対称を課し 3次元分類のモデルが作製された。良好に分類された 17,535 個の粒子と C1 対称を基に粒子画像および粒子体積の 3次元精密化が行われた。得られたモデルを用いて 2次元分類した粒子に対して再度 3次元分類を行った。良好に分類された 22,077 粒子に対して C2 対称を課し、3次元精密化を行なった。最後に 1 pixel を 1.10 Å とした 352 × 352 pixel のボックスサイズで再スケールされた。アラインメントにより複製されてしまった、あるいはスケールアップによってボックスからはみ出てしまった粒子は除外された。選抜した 21,156 個の粒子を用いて、C2 対称の下、3次元の自動精密化が行われた。

得られたマップの描画には Chimera (UCSF) を用いた。

#### 1.1.2.24. 系統樹

目的配列を BLASTp (NCBI) に入力し、Reference proteins データベース (refseq\_proteins) に対してホモログの検索を行った。検索にヒットした配列を使って T-coffee (M-coffee、Center of Genomic Regulation of Barcelona) で multiple sequence alignment (MSA) を行なった。出力ファイルを MEGA X に取り込み maximum likelihood アルゴリズム、bootstrap 1000 の設定で系統樹を作製した。系統樹をより見やすくするため、データを iTOL v6(69)で変換し、Illustrator (Adobe) で編集した。

### 1.1.3. 結果

#### 1.1.3.1. T7-tag\_AgaBb700 コンストラクトの構造

まず、前任者である赤間恵氏が取得した回折データの再解析を行った。前任者は T7-tag\_AgaBb700 コンストラクトの位相決定を目標に Native での条件の他に、水銀、臭素、白金、オスmiumに結晶をソーキングし、照射する X 線の波長を振り回折データを取得していた。しかし当時は位相決定に至らなかった。構造決定に用いられた 2 つのデータセットの統計値を表 1-1-12 で示す。

表 1-1-12. T7-tag\_AgaBb700 のデータセットおよび精密化の統計値。測定は赤間恵氏（2012 年度修士課程修了）によって行われた。括弧内は最外殻の値を示す。

	K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> derivative	Native
<b>Data collection statistics</b>		
X-ray facility	KEK-PF NW12A	KEK-PF AR-NW12A
Wavelength (Å)	1.0715	1.0000
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Unit-cell parameters</b>		
a, b, c (Å)	71.702, 126.578, 190.955	70.557, 12.056, 196.787
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	47.74-3.16 (3.33-3.16)	48.04-1.96 (1.99-1.96)
Total reflections	452,013	938,714
Unique reflections	30,616	125,599
Completeness (%)	100 (100)	100 (100)
Multiplicity (%)	14.8 (15.0)	7.5 (7.5)
Mean I/σ(I) (%)	16.0 (3.9)	15.3 (3.1)
R <sub>merge</sub> (%)	13.0 (85.3)	8.2 (58.9)
CC <sub>1/2</sub>	99.8 (92.7)	99.7 (89.8)
<b>Refinement statistics</b>		
Resolution range (Å)		48.04-1.96
No. of reflections		125,504
R/R <sub>free</sub> (%)		18.4/21.4
<b>r.m.s. from ideal values</b>		
Bond lengths (Å)		0.007
Bond angle (°)		0.985
<b>Ramachandran plot (%)</b>		
Preferred		94.22
Allowed		4.94
Outlier		0.84

再解析の際、複数あるデータセットを Crank2 (CCP4i2) および Autosol (Phenix) などの実験的位相決定パイプラインにかけたところ、5 mM K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> に 28 時間ソーキングした条件で、Crank2 を SAD 仕様に設定し、サブストラクチャーを探索する shelxd の処理で 1910 回のトライアルの末に、各トライアルのスコアが CC < 30、CC weak < 15 と CC > 35、CC weak > 20 の 2 つのグループに分布が別れた (図 1-1-4. A)。これは結晶格子内でサブストラクチャー (重原子) が正しく認識されたことを示す。その後、パイプライン上で自動モデル構築を 127 サイクル繰り返すことで、Figure of Merit (FOM) が 0.92、R が 0.25、R<sub>free</sub> が 0.33 に到達し、初期位相が決定されたと判断した (図 1-1-4. B)。

白金ソーキング後に得た回折データは分解能が 3.16Å と低く、詳細なアミノ酸コンホメーションを判断するのが困難であったため、Crank2 が作製した初期的な T7-tag\_AgaBb700 のモデルを、Phaser を用いて Native のデータに分子置換し、モデル構築、精密化を経て T7-tag\_AgaBb700 の構造を決定した。

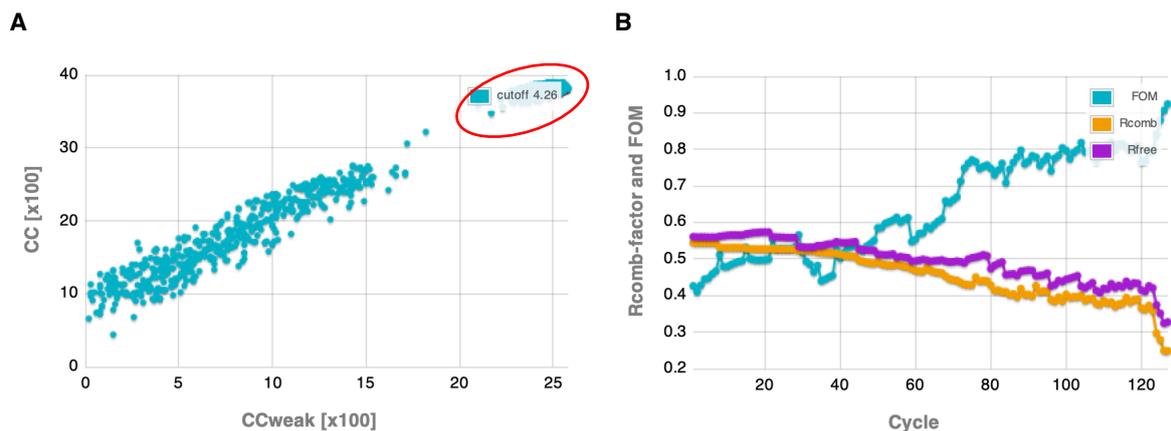


図 1-1-4. **A.** shelxd によるサブストラクチャー探索の結果を示した CC vs weak CC プロット。高いスコアに該当する点を赤で示す。**B.** Crank2 内の Buccaneer のモデル構築サイクルの結果を示したプロット。

AgaBb の全体的な構造は、11 回転した右巻きの平行  $\beta$ -helix を中心構造としている。この  $\beta$ -helix は、2つの小さな  $\beta$ -barrel domain ( $\beta$ -barrel 1、 $\beta$ -barrel 2) に囲まれている (図 1-1-5. A)。非対称単位内では AgaBb は  $\beta$ -helix の下流にあるループが別のプロトマーと絡まることで 2 量体を形成していた (図 1-1-5. B、C)。これは前任者、赤間恵氏がゲルろ過クロマトグラフィーの溶出時間から推測したオリゴマー状態と合致する。また PISA(70)を用いて結晶構造から生理的なアセンブリを推測したところ、水溶液中では結晶格子内と同じ 2 量体構造を組むとされた。

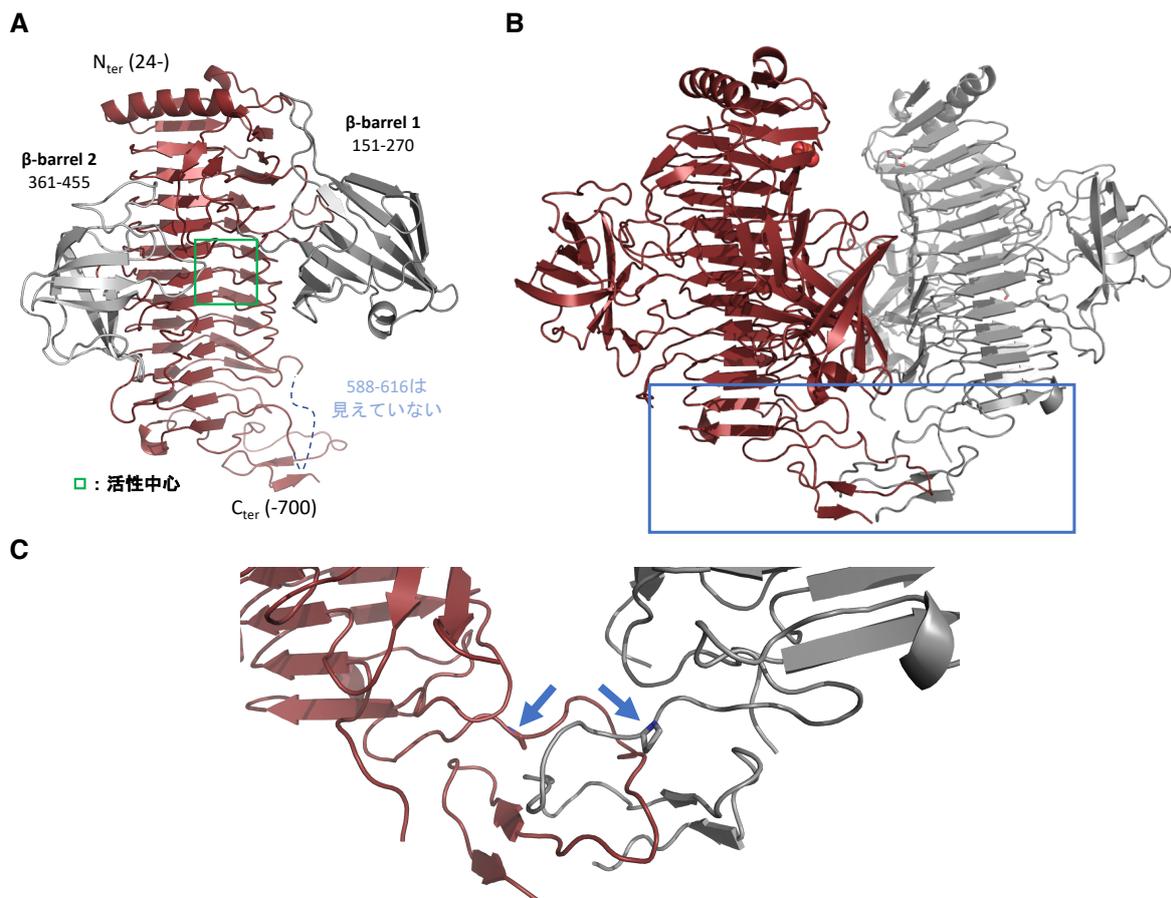


図 1-1-5. **A.** T7-tag\_AgaBb700 モノマーの構造。構造の主体となる  $\beta$ -helix を赤、左右の  $\beta$ -barrel を灰色で示す。活性中心を緑の枠で、モデルが組めていない領域を破線で示す。**B.** 非対称単位内の T7-tag\_AgaBb700 の 2 量体の構造。各プロトマーをそれぞれ赤と灰色で、プロトマー間の相互作用領域を青枠で示す。**C.** パネル B 青枠の拡大図。P673 を青い矢印で示す。

T7-tag\_AgaBb700 を既報の PdGH110B (配列同一性 27.9%) の構造と比較したところ、全長のおよそ半分である 358 の C $\alpha$  原子の重ね合わせに成功し、平均二乗偏差値 (RMSD 値) は 1.181 Å であった。これは T7-tag\_AgaBb700 と PdGH110B が部分的に類似していることを示す (図 1-1-6. A)。また、PdGH110B も 2 量体を形成する (図 1-1-6. B)。しかし、これは T7-tag\_AgaBb700 の  $\beta$ -barrel 2 にあたる領域の  $\alpha$ -helix が別のプロトマーの  $\beta$ -barrel 1 と相互作用することで成り立っている。T7-tag\_AgaBb700 にはこの  $\alpha$ -helix が存在しないため、PdGH110B と同様の結合様式を持たない。

PdGH110B は galactobiose (Gal- $\alpha$ 1,3-Gal) との複合体構造が報告されている。T7-tag\_AgaBb700 と PdGH110B を重ね合わせることで、AgaBb の -1、+1 サブサイトをおおよそ特定した (図 1-1-6. C)。また Fuc が入り得る +1' サブサイトも暫定した。

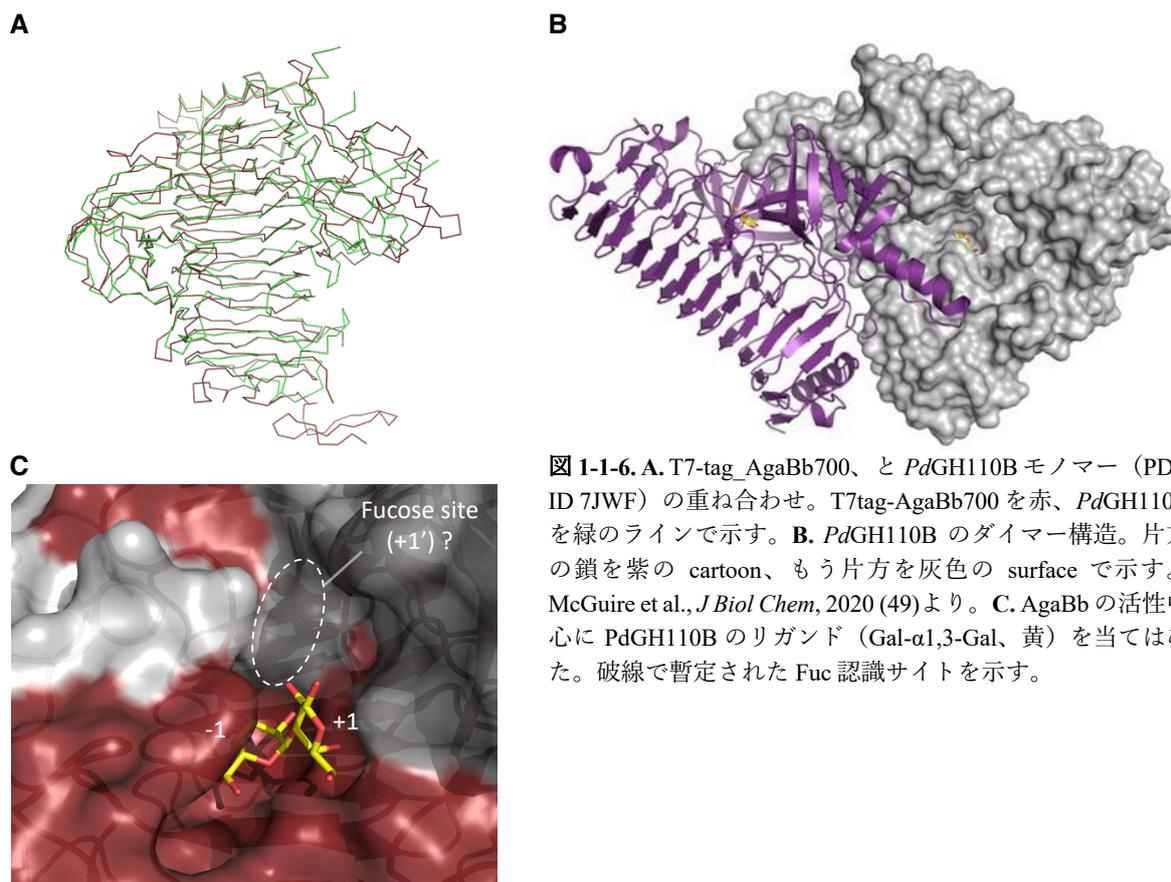


図 1-1-6. A. T7-tag\_AgaBb700、と PdGH110B モノマー (PDB ID 7JWF) の重ね合わせ。T7tag-AgaBb700 を赤、PdGH110B を緑のラインで示す。B. PdGH110B のダイマー構造。片方の鎖を紫の cartoon、もう片方を灰色の surface で示す。McGuire et al., *J Biol Chem*, 2020 (49)より。C. AgaBb の活性中心に PdGH110B のリガンド (Gal- $\alpha$ 1,3-Gal、黄) を当てはめた。破線で暫定された Fuc 認識サイトを示す。

### 1.1.3.2. リガンド存在下での T7-tag\_AgaBb700 コンストラクトの結晶化

実験的に Fuc 認識サイトを視認するべく T7-tag\_AgaBb700 のリガンドとの複合体構造の取得を目指し、目的タンパク質の異種発現、精製、結晶化を行なった。

より大量のタンパク質を獲得するべく、培養、発現条件の詳細な条件検討の末、前任者の条件を表 1-1-13 のように変更した。

表 1-1-13. 前任者と本研究での T7-tag\_AgaBb700 の発現条件の比較。

	2012 年度修士課程修了 赤間恵修士論文より	本研究
大腸菌発現株	BL21 CodonPlus(DE3) RIL	Rosetta2 (DE3)
誘導後の培養温度	37°C	30°C
IPTG 濃度	0.5 mM	0.1 mM
培養時間	3 時間	20 時間

この条件で 1.5 L スケールで培養を行い、前任者と同様の系で Ni-IMAC、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにて目的酵素を精製した。SDS-PAGE では最終的に T7-tag\_AgaBb700 の分子量に該当する 74.7 kDa の位置に他のバンドよりはるかに濃いバンドが確認され、結晶化に十分な精製純度に達したと判断した (図 1-1-7)。タンパク量は培養液 1 L 辺あたり 25 mg 程度獲得した。なお、前任者はゲルろ過クロマトグラフィーで精製した際は、溶出時間がダイマー化した T7-tag\_AgaBb700 の分子量に相当するとしていたが、本研究で精製した際は単量体である計算がされ、前任者の再現が得られなかった (後述、1.1.3.4 節を参照)。

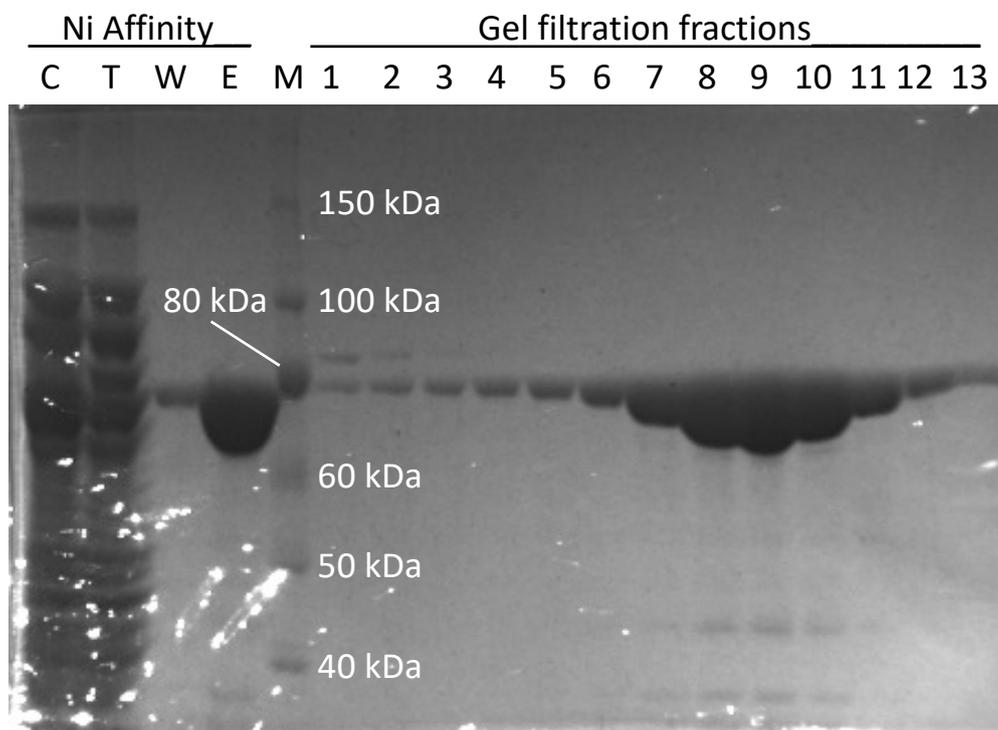


図 1-1-7. T7-tag\_AgaBb700 の Ni-IMAC 精製後およびゲルろ過精製後の各フラクションの SDS-PAGE。C：祖酵素液；T：Ni-IMAC 精製の素通り画分；W：Ni-IMAC 精製の洗浄溶液；E：Ni-IMAC 精製の溶出液；M：分子量マーカー。

Pre-crystallization Test (PCT) を行なった結果、5 mg/mL が結晶化スクリーニングに最適であるとされた。前任者は研究していた当時、同様の試験を行い、37.8 mg/mL が最適としており、これも再現が取れなかった。そこで、結晶化スクリーニングを 5 mg/mL と 37.8 mg/mL の両方で、溶液に 10 mM Gal と 10 mM Fuc を加えて行なった。しかし結晶は得られなかった。また、前任者が当時、結晶化に成功した 2 条件 (条件①：1.6 M ammonium sulfate、0.1 M HEPES-NaOH pH 7.5、0.1 M NaCl；条件②：1.26 M ammonium sulfate、0.1 M Tris-HCl pH 8.5、0.1 M lithium sulfate) で、条件を振って結晶化を試みた。結果、沈殿やクリアドロップについては同様の挙動が見られたが、結晶化には至らなかった (表 1-1-14、表 1-1-15)。また、タンパク質の保存溶液も以下の 4 種類に替えて検討した。しかし、保存溶液による結晶化の違いはほとんど見られなかった。

- ① 5 mM MOPS pH 7.0、5% glycerol (前任者が使っていた条件)
- ② 5 mM MOPS pH 7.0 (glycerol を夾雑物になると仮定して①から取り除いた条件)
- ③ 5 mM sodium acetate pH 6.0 (pH を等電点 5.11 に寄せた条件)
- ④ 5 mM sodium acetate pH 6.0、5% glycerol (沈殿を抑えようと③に glycerol を加えた条件)

表 1-1-14. T7-tag\_AgaBb700 の結晶化条件①の検討。沈殿が出現した条件を灰色で示す。

条件①の精密化		Ammonium sulfate					
		1.2 M	1.4 M	1.6 M	1.8 M	2.0 M	2.2 M
HEPES- NaOH pH	6.8						
	7.0						
	7.2						
	7.4						
	7.6						
	7.8						
	8.0						
8.2							

表 1-1-15. T7-tag\_AgaBb700 の結晶化条件②の検討。沈殿が出現した条件を灰色で示す。

条件②の精密化		Ammonium sulfate					
		1.2 M	1.4 M	1.6 M	1.8 M	2.0 M	2.2 M
Tris-HCl pH	7.8						
	8.0						
	8.2						
	8.4						
	8.6						
	8.8						
	9.0						
	9.2						

### 1.1.3.3. T7-tag\_AgaBb673 コンストラクトの構造解析

図 1-1-5. C にあるように T7-tag\_AgaBb700 の結晶構造では C 末端が絡まることでタンパク質の 2 量体化が成り立っており、これは水溶液中でも同じオリゴマー状態を持つと PISA によって予想されている。一方、本研究では水溶液中の T7-tag\_AgaBb700 の 2 量体化は実現できていない（後述、1.1.3.4 節を参照）。そこで、C 末端の絡まりが結晶化の再現に影響しているとの仮説を立て、C 末端をさらに削った T7-tag\_AgaBb673 コンストラクトを作製した。T7-tag\_AgaBb673 を大腸菌で異種発現させ、粗酵素液の組成を SDS-PAGE で T7-tag\_AgaBb700 と比較した。その結果、T7-tag\_AgaBb700 はこれまでどおり 74.7 kDa の位置にバンドが見え、T7-tag\_AgaBb673 はそれよりわずかに下に泳動し、72.2 kDa と予想される位置に目的バンドが確認された。

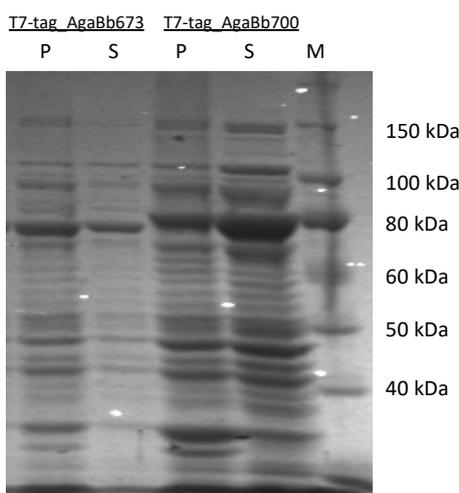


図 1-1-8. T7-tag\_AgaBb673 と T7-tag\_AgaBb700 の粗酵素液の SDS-PAGE。P：不溶画分；S：粗酵素液（可溶画分）；M：分子量マーカー

少量での発現検討で、本コンストラクトでは表 1-1-14 の条件から更に誘導後の温度を 25°C に下げた方がより多く目的タンパク質が取れると判断し、その条件で 1.5 L スケールで培養、タンパク質精製を行なった (図 1-1-9)。精製時、陰イオン交換クロマトグラフィーでは NaCl 濃度が約 200 mM に到達した段階で目的タンパク質が溶出された (図 1-1-9. A)。ゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE では 72.2 kDa の位置に他のバンドよりはるかに濃いバンドが確認され、結晶化に十分な精製純度に達したと判断した (図 1-1-9. B)。タンパク量は培養液 1 L あたり 20 mg 程度獲得した。

結晶化に先立って PCT ではタンパク質濃度 5 mg/mL がスクリーニングに最適であると判断された。また、本研究ではリガンドとの複合体構造の取得を目的としているため、結晶化スクリーニングの際にタンパク質溶液に 20 mM Gal を加えた。

結晶化スクリーニングの結果、インキュベート開始から 3 日経過したところで計 16 の条件でウニ状の、一次元的に成長する結晶が得られた (表 1-1-16)。沈殿剤はいずれ PEG3350 から 8000 であり、バッファーの pH が 5.0~6.5、塩は acetate または tartrate を含んだ条件が多い印象が得られた。さらに、精製時の陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたサンプルと用いていないサンプルを比較したところ、いずれも同じ条件で結晶が得られたが、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた場合の方が大きい結晶が得られた (図 1-1-10)。そのため、以降は陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたサンプルで結晶化を行なった。

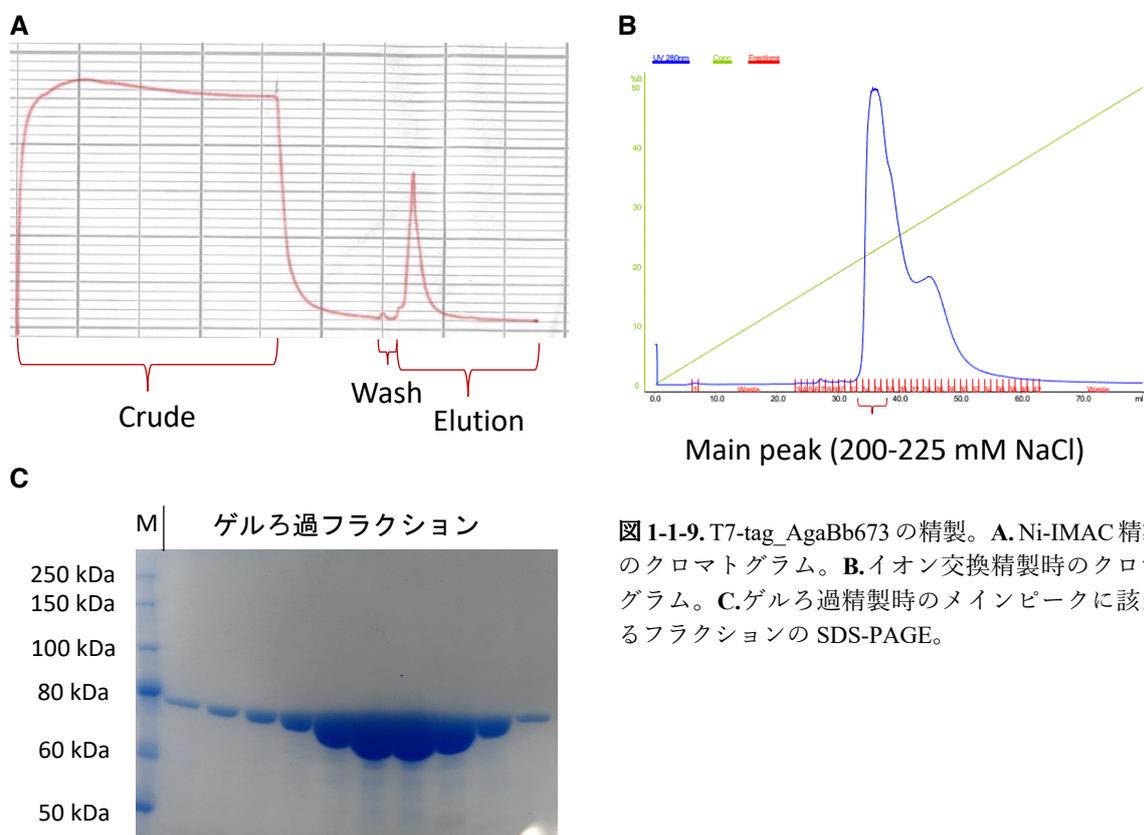


図 1-1-9. T7-tag\_AgaBb673 の精製。A. Ni-IMAC 精製時のクロマトグラム。B. イオン交換精製時のクロマトグラム。C. ゲルろ過精製時のメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE。

表 1-1-16. T7-tag\_AgaBb673 の結晶化スクリーニング時のヒット条件。黄色で示した条件は図 1-1-10 の結晶に該当する。ここではインキュベート期間は全て 3 日である。

沈殿剤	バッファー	塩
20% (w/v) PEG3350		0.2 M potassium acetate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M magnesium acetate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M disodium tartrate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M calcium acetate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M ammonium acetate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M sodium acetate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M sodium iodide
20% (w/v) PEG3350		0.2 M potassium chloride
20% (w/v) PEG3350		0.2 M lithium chloride
20% (w/v) PEG3350		0.2 M di-ammonium tartrate
20% (w/v) PEG8000	0.1 M sodium cacodylate pH 6.5	0.2 M magnesium acetate
20% (w/v) PEG6000	0.1 M MES-NaOH pH 6.5	1.0 M lithium chloride
20% (w/v) PEG8000	0.1 M MES-NaOH pH 6.0	0.2 M calcium acetate
10% (w/v) PEG6000	0.1 M citric acid pH 5.0	
20% (w/v) PEG3350		0.2 M magnesium formate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M lithium acetate

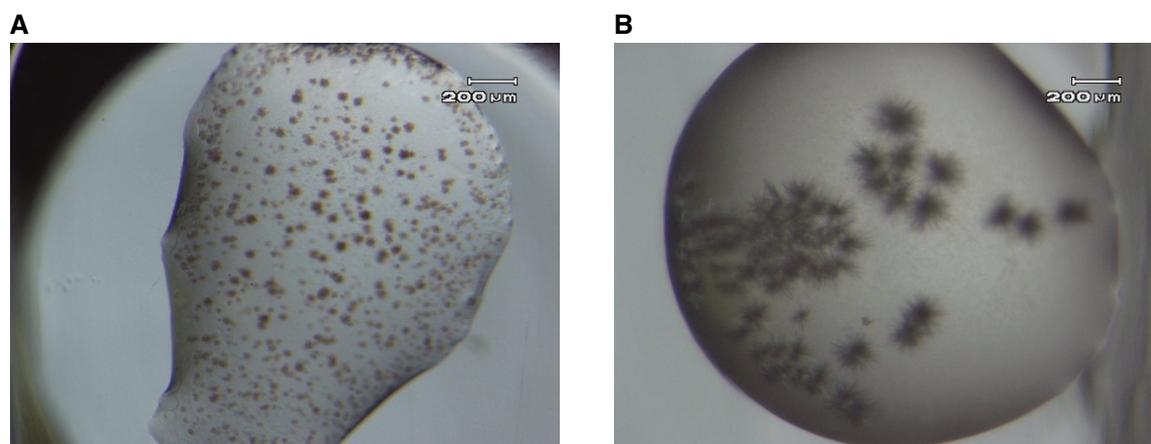


図 1-1-10. T7-tag\_AgaBb673 の結晶。A. 陰イオン交換を使用しなかった場合。結晶化条件は 20% PEG3350、0.2 M di-sodium tartrate。B. 陰イオン交換を使用した場合。結晶化条件は 10% PEG6000、0.1 M citric acid pH 5.0。

自作の結晶化溶液で条件の最適化を試みたが、結晶化の再現は得られなかった。そこで再現性と結晶質改善を目指し、PEGs Suite を模した自作のキットを用いて MMS を行なった。その結果、インキュベートしてから 1 日でこれまでとは違う、2 次元的に成長する結晶が 5 つの条件で得られた (表 1-1-17)。これらとは別にウニ状の結晶が多数の条件で得られた。

表 1-1-17. T7-tag\_AgaBb673 の MMS のヒット条件。黄色の条件が以降で用いた条件である。

沈殿剤	バッファー	塩
15% (w/v) PEG20000	0.1 M MES-NaOH pH 6.5	
20% (w/v) PEG3350		0.2 M potassium iodide
20% (w/v) PEG3350		0.2 M ammonium iodide
20% (w/v) PEG3350		0.2 M lithium acetate
20% (w/v) PEG3350		0.2 M di-sodium tartrate

特に再現性の良かった 15% PEG20000、0.1 M MES-NaOH pH 6.5 の条件 (図 1-1-11. A) で、シードを植え継ぎつつ通常の条件最適化を行なった。また最適化の過程で 20 mM Gal の他に 20 mM または 100 mM Fuc、20 mM GlcNAc など、他のリガンドも加えたり、糖を加えずに結晶化を試みたところ、Gal を含まない条件では結晶は出現しなかった。最終的に最も良質な結晶が得られたのはタンパク質濃度 15 mg/mL、7% PEG20000、0.1 M MES-NaOH pH6.3、シードを  $10^5$  倍希釈した条件で、ブレード

クラスター状の結晶が得られた (図 1-1-11. B)。Additive Screen による添加剤の探索も行なったが、これによる結晶質の向上は見られなかった。

結晶を針で一枚一枚はがし、抗凍結剤を含んだ溶液にソーキング、X 線回折実験を行なった。いくつもの結晶を X 線に照射したが、唯一、リガンドに 20 mM Gal、抗凍結剤に 10% ethylene glycol を用いた条件で、分解能 3.50 Å の X 線回折像が得られた (表 1-1-18、図 1-1-12)。

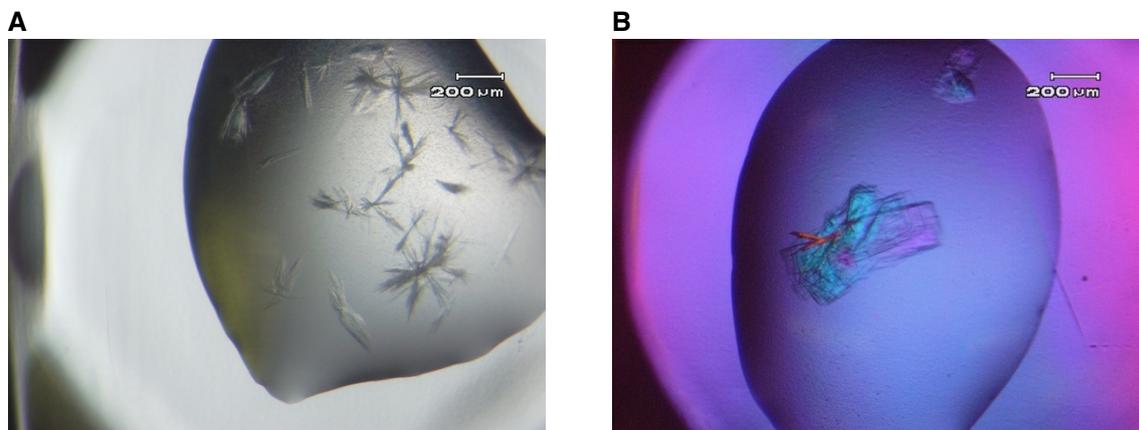


図 1-1-11. MMS で得た T7-tag\_AgaBb673 の結晶。A. 結晶化条件最適化前。B. 結晶化条件最適化後。偏光板で観察することで複数の板が重なっているのがわかる。

表 1-1-18. T7-tag\_AgaBb673 のデータセットおよび精密化の統計値。括弧内は最外殻の値を示す。

T7-tag_AgaBb673	
<b>Data collection statistics</b>	
X-ray facility	KEK-PF BL1A
Wavelength (Å)	1.0800
Space group	$P2_1$
<b>Unit-cell parameters</b>	
a, b, c (Å)	63.340, 73.154, 177.968
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 91.38, 90.00
Resolution (Å)	47.88-3.50 (3.83-3.50)
Total reflections	72,012
Unique reflections	20,908
Completeness (%)	100 (100)
Multiplicity (%)	3.4 (3.5)
Mean $I/\sigma(I)$ (%)	3.1 (1.3)
$R_{\text{merge}}$ (%)	0.855 (1.622)
$CC_{1/2}$	
<b>Refinement statistics</b>	
Resolution range (Å)	47.88-3.50
No. of reflections	20,908
$R/R_{\text{free}}$ (%)	22.6/29.1
<b>r.m.s. from ideal values</b>	
Bond lengths (Å)	0.012
Bond angle (°)	1.330
<b>Ramachandran plot (%)</b>	
Favored	86.99
Allowed	10.69
Outlier	2.32

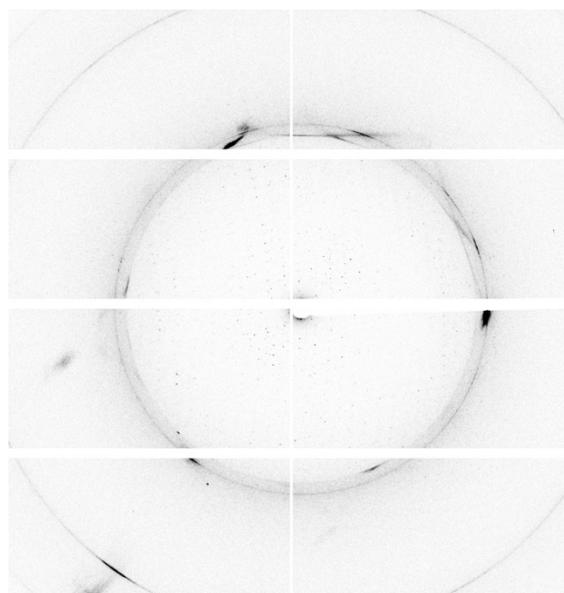


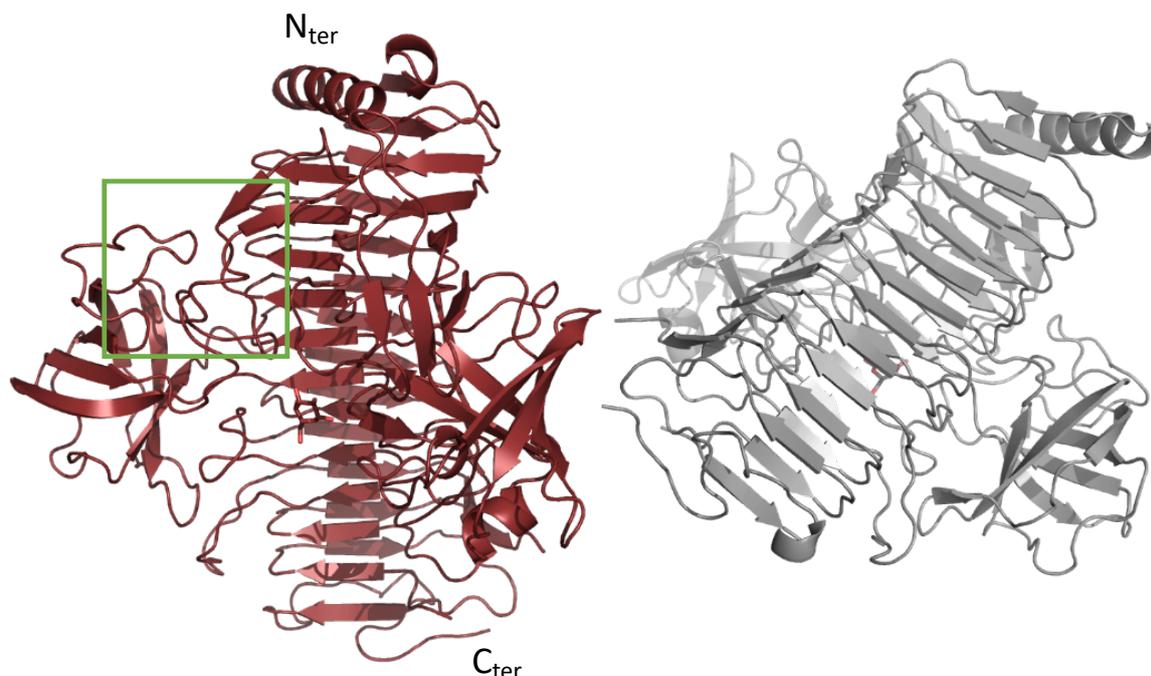
図 1-1-12. T7-tag\_AgaBb673 結晶の X 線回折像

得られたデータセットに T7-tag\_AgaBb700 のプロトマーから C 末端の不要な部分を削除したモデルを分子置換し、精密化を行なった。解かれた構造の非対称単位は 2 分子であったが、T7-

tag\_AgaBb700 にあった C 末端の絡まりは解消されていた (図 1-1-13. A)。活性中心には Gal と思しき電子密度マップが確認できた。周囲には酸性触媒残基 D351、塩基性触媒残基候補の D328 と D352、そして+サブサイトを形成する N90、R270、Q331、N335、R475、W509、E511 が視認でき、Gal が-1 サブサイトに入っていることが示された。しかし、分解能が低いいため正確な向きやコンホメーションは判断できなかった (図 1-1-13. B)。

これ以降、何度か新しい結晶を X 線に照射したが、より良い分解能の回折像は得られなかった。

A



B

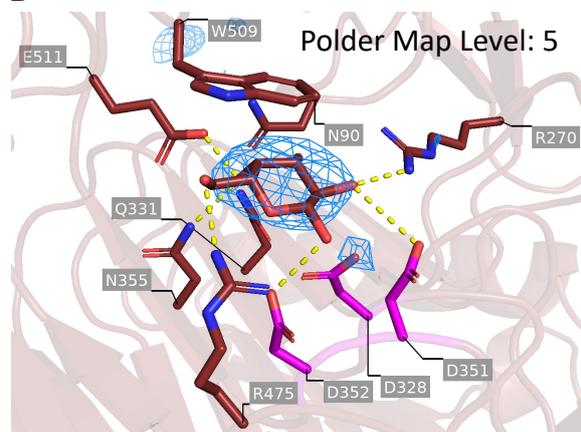


図 1-1-13. A. 非対称単位内の T7-tag\_AgaBb673 二分子。各モノマーを赤と灰色で、活性中心を緑枠で示す。B. 活性中心内の Gal。触媒残基と推定されている 3 残基をピンクで表している。Gal に当たる Polder map (5 $\sigma$ ) を青のメッシュで示す。

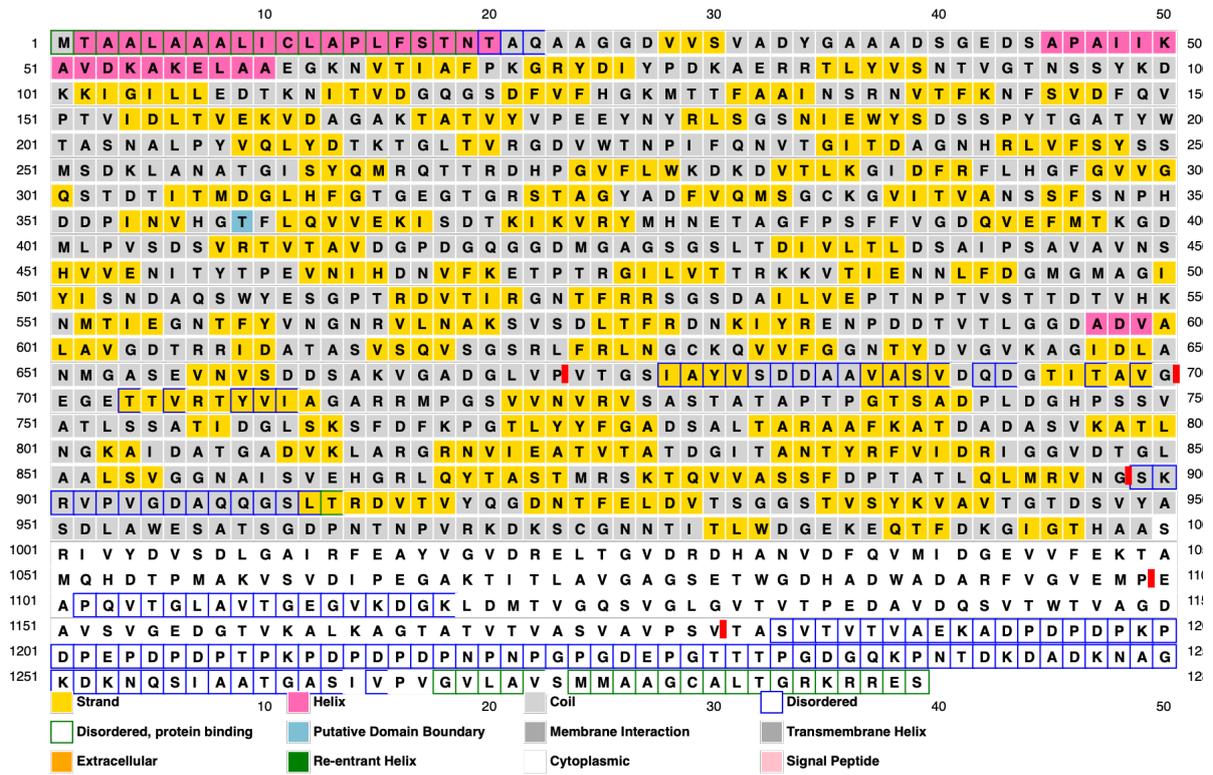
#### 1.1.3.4. 良質な結晶の取得を目指したコンストラクトの再検討

熱安定性の高いタンパク質や保存条件ほど結晶化に適していることが知られている(71)。そこで、より良質な AgaBb の結晶を得るべく複数のコンストラクトを作製し、熱安定性の高いタンパク質が得られないか検証した。加えて活性測定と分子量測定も行なった。コンストラクトは以下の点を考慮して再検討した。

- ① N 末端の T7-tag は結晶構造では見えず、またゆらぎの大きい領域であると想定して除去した。
- ② PSIPRED、Disopred にて AgaBb 配列上でゆらぎの大きい配列を予測し、2 次構造などを考慮した上でコンストラクトをカットした (図 1-1-14. A)。決定した切断部位は AgaBb のドメイン境界と凡そ合致した (図 1-1-14. B)。

- ③ C末端の His<sub>6</sub>-tag が揺らぎ結晶化に影響する可能性がある（2020年度修士課程修了、塚原茜 修士論文より）。そこでC末端の His<sub>6</sub>-tag を除去し、代わりにN末端に SHT 配列を付加した（1.1.2.2.要参照）。
- ④ ③が成功する確証がなかったため、C末端の His<sub>6</sub>-tag を残したコンストラクト（SHT は未使用）も作製した。

**A**



**B**

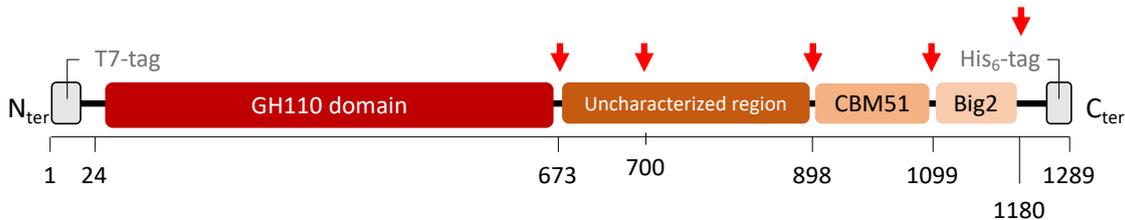


図 1-1-14. (A) PSIPRED、Disopred による AgaBb の 2 次構造およびディスオーダー領域の予測。コンストラクトを切断したところを赤で示す。(B)AgaBb の全長コンストラクトのドメイン構成。赤い矢印で (A) の切断部位を示す。

これにより SHT\_AgaBb673、SHT\_AgaBb700、SHT\_AgaBb898、SHT\_AgaBb1099、SHT\_AgaBb1180、AgaBb673、AgaBb700、AgaBb898、AgaBb1099、AgaBb1180 の全 10 種類のコンストラクトを作製し、少量で大腸菌に異種発現させ、粗酵素液の組成を SDS-PAGE に確認した（図 1-1-15）。なお、SHT が付加されたコンストラクトについては N 末端の His<sub>10</sub>-tag が Ni-IMAC に適応しているか確かめるべく、バッチ法による小スケールでの精製を行なった。いずれのコンストラクトでも溶出画分で目的のバンドがあり、His<sub>10</sub>-tag が正しく機能していることを確認した。

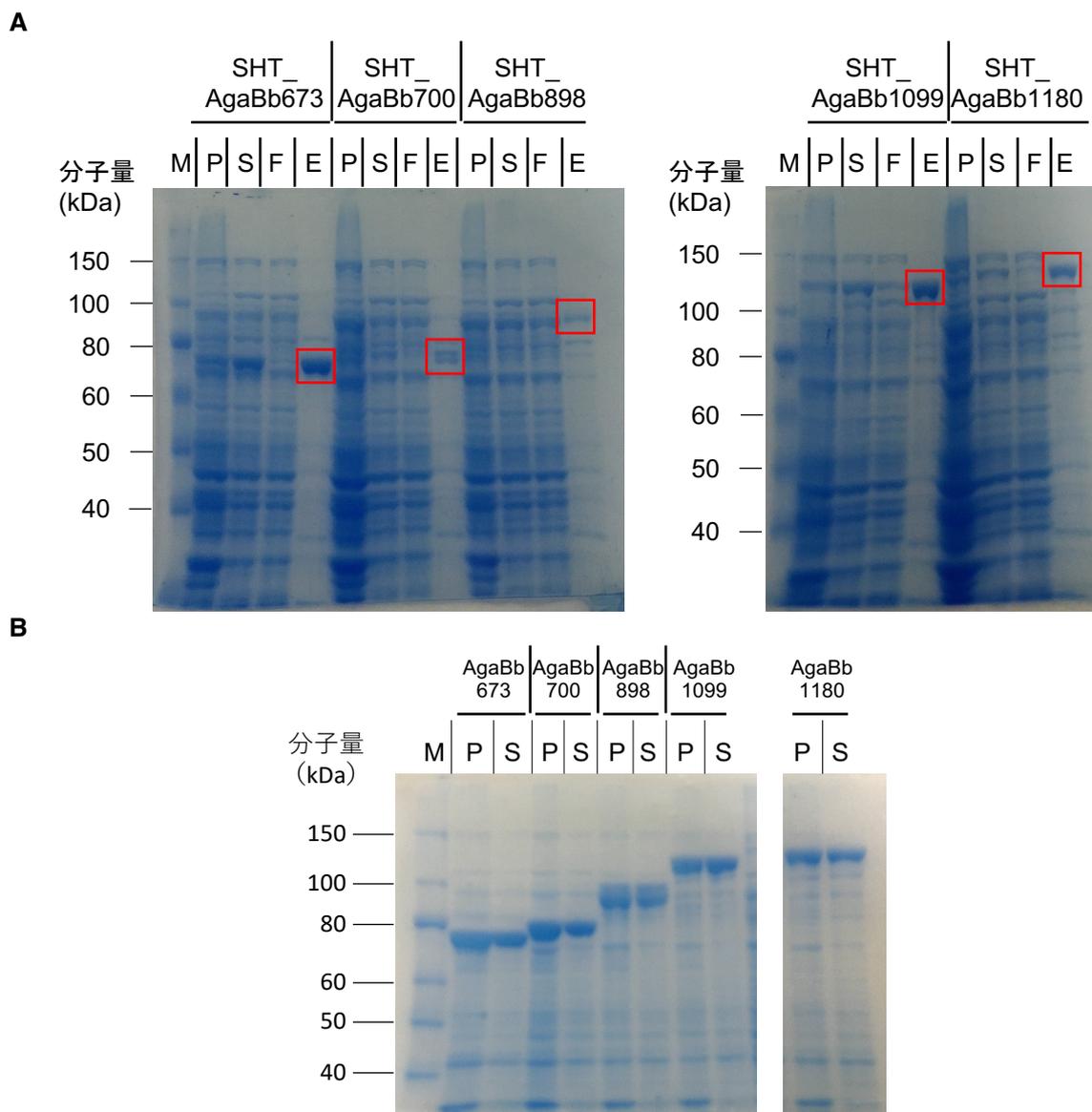


図 1-1-15. 少量培養後の AgaBb 各コンストラクト異種発現の SDS-PAGE。A. SHT を付加したコンストラクト。目的のコンストラクトに該当するバンドを赤枠で示す。B. SHT を付加していないコンストラクト。M: 分子量マーカー; P: 不溶画分; S: 可溶画分 (粗酵素液); F: バッチ精製素通り画分; E: バッチ精製溶出液

SHT を付加した 5 つのコンストラクトについて 1.5 L スケールで培養を行い、Ni-IMAC 精製、TEV プロテアーゼ処理を行った。しかしこの時点でタンパク質の収量が 10 µg 以下と低く、この条件では結晶化を行うのは困難であると判断し、以降の実験を断念した。

残る 5 つのコンストラクトについて 150 mL スケールで培養、Ni-IMAC、ゲルろ過クロマトグラフィーを行い高純度で 2~5 mg ほどの精製タンパク質を獲得した (図 1-1-16)。なお、ここでは過剰なタンパク質のロスを避けるべく陰イオンクロマトグラフィーは行わなかった。

検量線を基に各コンストラクトの分子量を算出した結果、AgaBb673、AgaBb700、AgaBb898、AgaBb1099 は単量体、AgaBb1180 は 2 量体であると予想された (図 1-1-17)。ドメイン構成 (図 1-1-14. B) と照らし合わせることで、免疫グロブリン様ドメイン Big2 がダイマー化に関わることが示唆された。

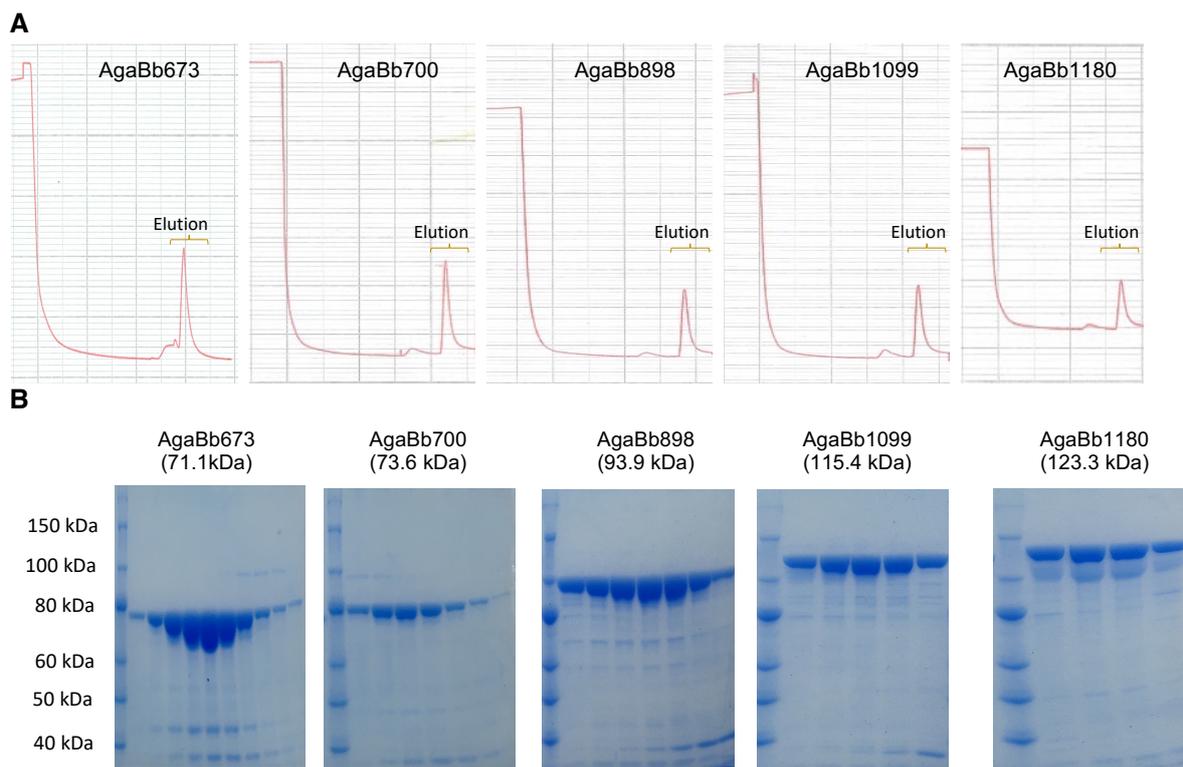
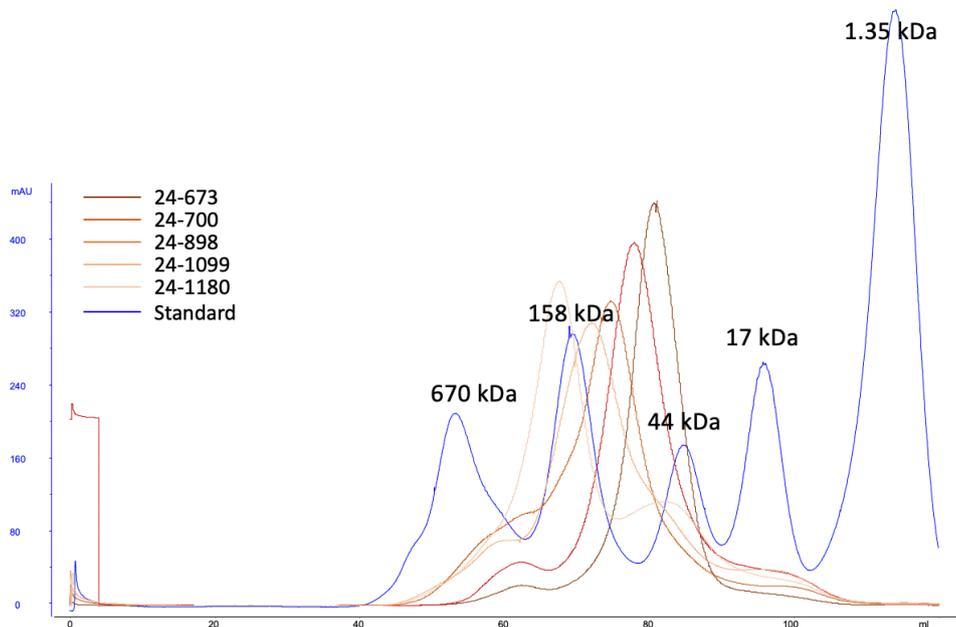


図 1-1-16. 熱安定性試験に向けた各コンストラクトの Ni-IMAC クロマトグラム (A) とゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE (B)。



コンストラクト	AgaBb673	AgaBb700	AgaBb898	AgaBb1099	AgaBb1180
モノマー分子量 (kDa)	71.1	73.6	93.9	115.4	123.3
分子量測定値 (kDa)	57.0	70.0	88.5	109.8	240.6
オリゴマー状態	モノマー				ダイマー

図 1-1-17. AgaBb の各コンストラクトと分子量マーカのゲルろ過クロマトグラムと算出された分子量と推定オリゴマー状態。

いずれのコンストラクトでも AgaBb の本来の B 型血液型抗原に対する  $\alpha$ -galactosidase 活性があることが、TLC で確認できた (図 1-1-18)。

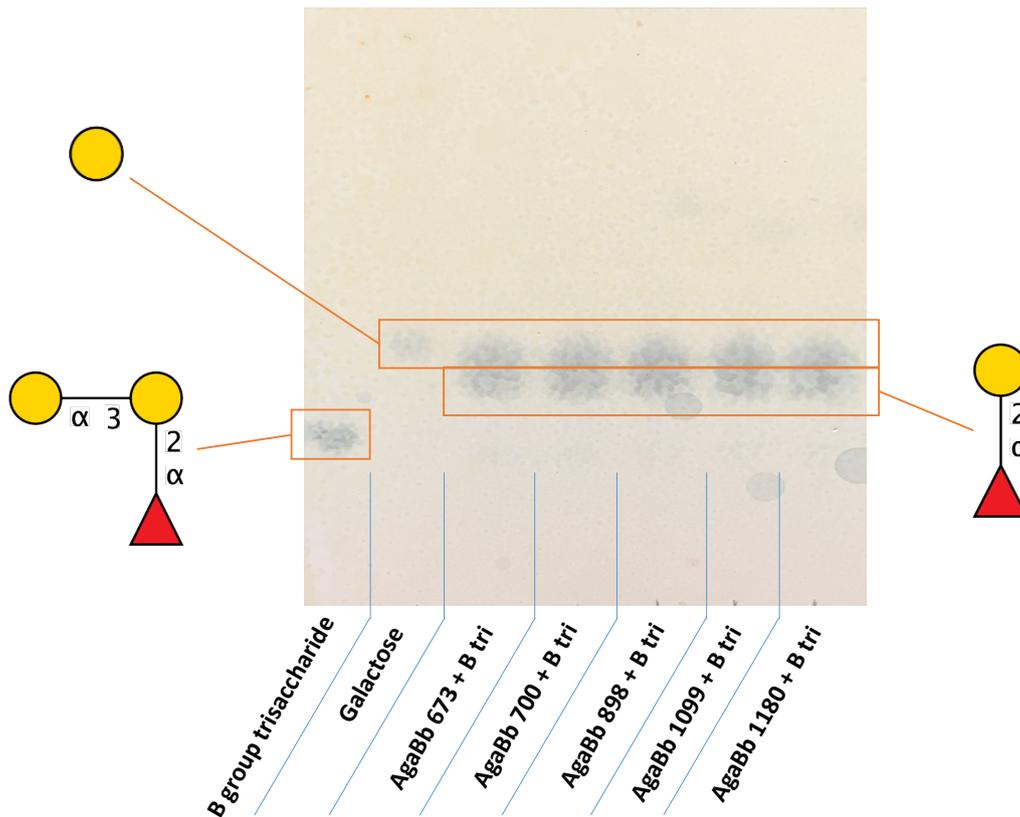


図 1-1-18. AgaBb の各コンストラクトの TLC 活性測定。各スポットに該当する糖構造は Wakinaka et al., *Glycobiology*, 2012(34)の結果と比較して判断した。糖の模式図は SNFG に基づく。

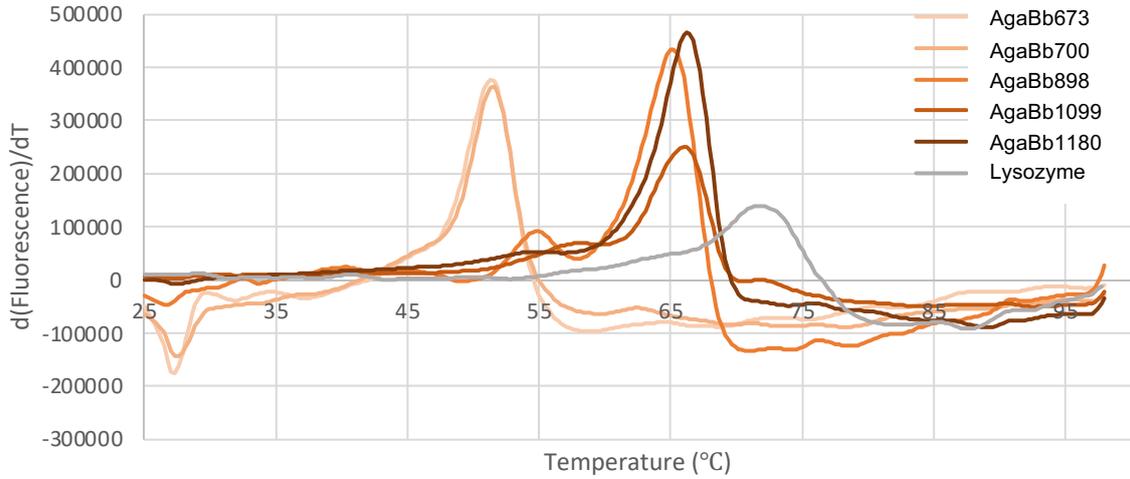
熱安定性試験の結果、いずれのコンストラクト濃度に応じてピークの高さに変化が見られた。20 mg/mL で各コンストラクトの  $T_m$  値を比較した結果、AgaBb673 と AgaBb700 がそれぞれ 51.32°C と 51.57°C だったのに対し、AgaBb898、AgaBb1099、AgaBb1180 は 62.25°C、65.89°C、66.22°C と、15°C 近く高い値が示された (図 1-1-19)。これにより、5 つのコンストラクトの内、未解析領域を有する AgaBb898、AgaBb1099、AgaBb1180 が結晶化に最も適していると判断した。

#### 1.1.3.5. AgaBb1099 と AgaBb1180 の結晶化

熱安定性試験で高い  $T_m$  値を示した AgaBb1099 と AgaBb1180 を 1.5 L スケールで培養、精製を行った。

AgaBb1099 については陰イオン交換クロマトグラフィーで NaCl 濃度 200 mM あたりで目的タンパク質が溶出された。ゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE では 115.4 kDa の位置に目的タンパク質のバンドが見え、高純度の AgaBb1099 タンパク質の獲得に成功した (図 1-1-20)。タンパク量は培養液 1 L あたり 50 mg 獲得した。

### Derivative Reporter



	AgaBb673	AgaBb700	AgaBb898	AgaBb1099	AgaBb1180	Lysozyme
Tm 値 (°C)	51.32	51.57	65.25	65.89	66.22	71.63

図 1-1-19. AgaBb の各コンストラクトの熱安定性試験。プロットは温度の上昇に対するタンパク質変性マーカーによる蛍光度の微分値を表している。表に Tm 値を示す。ここでは Lysozyme とポジティブコントロールとして用いており、測定された Tm 値は文献値に近い値だった(71)。

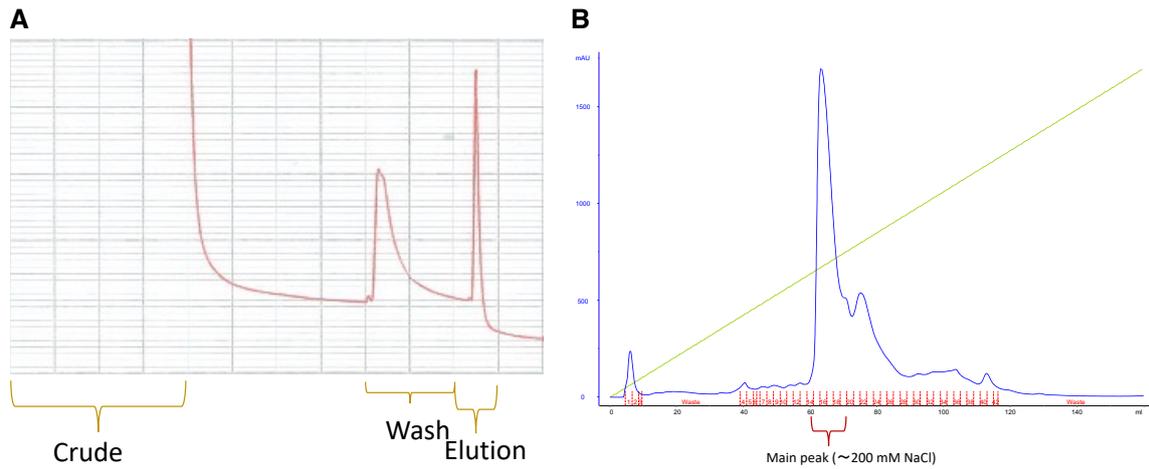
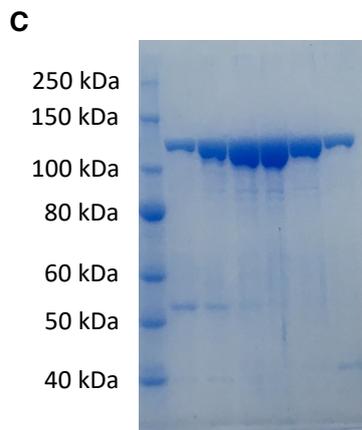


図 1-1-20. AgaBb1099 の精製。A. Ni-IMAC 精製時のクロマトグラム。B. 陰イオン交換精製時のクロマトグラム。C. ゲルろ過精製時のメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE。



AgaBb1180 については、目的タンパク質と夾雑物を分ける試みで、2つのペリスタポンプを直列に接続することで破碎バッファーに imidazole の濃度勾配をかけて精製を行なったが、想定よりも早く目的タンパク質が溶出されたため、夾雑物との分離は上手く行かなかった。また、イオン交換クロマトグラフィーの際にメインピークとマイナーピークの高さが近かったため、SDS-PAGE で各ピークの組成を確認し、NaCl 濃度 200 mM あたりで溶出された peak 1 で目的タンパク質が多量に確認された。ゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE では 123.3 kDa の位置に目的タンパク質のバンドが見え、高純度の AgaBb1180 タンパク質の獲得に成功した (図 1-1-21)。タンパク量は培養液 1 L あたり 30 mg 獲得した。

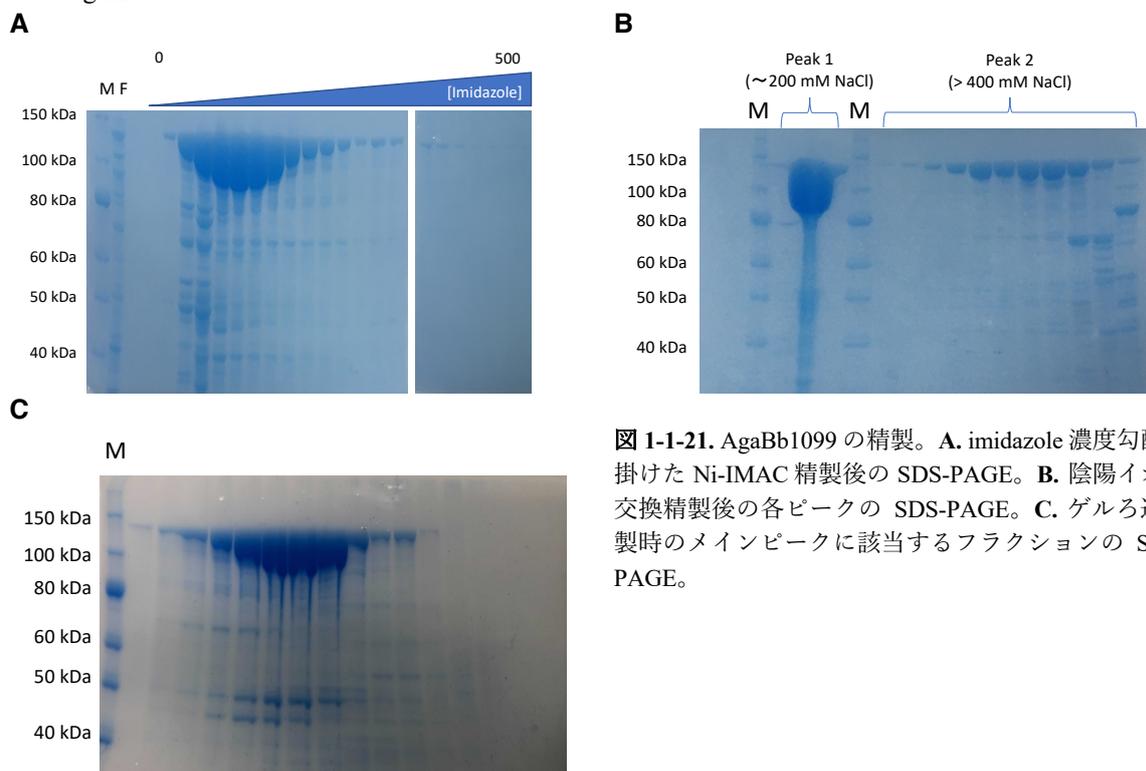


図 1-1-21. AgaBb1099 の精製。A. imidazole 濃度勾配を掛けた Ni-IMAC 精製後の SDS-PAGE。B. 陰陽イオン交換精製後の各ピークの SDS-PAGE。C. ゲルろ過精製時のメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE。

PCT により、いずれのコンストラクトもタンパク濃度 20 mg/mL が結晶化スクリーニングに最適であると判断された。

結晶化スクリーニングでは AgaBb1180 の結晶は得られなかった。しかし、AgaBb1099 についてはインキュベート期間 1 週間で 4 つの条件で結晶が得られた。更に、結晶核の形成を促すべく、結晶化プレート を 20°C から 4°C に移したところスクリーニングを開始して 3 週間後には更に 5 つの条件で結晶が得られた (表 1-1-19)。得られた結晶条件のほとんどは 20% (w/v) PEG3350 を沈殿剤として含んでおり、塩には thiocyanate、citrate、iodide を用いたものが多かった。また 20°C でインキュベートしている際は sodium、4°C では potassium を陽イオンとして含んだ条件で結晶が頻繁に観察された。ヒット条件の中でも特に結晶が大きく成長した 20% (w/v) PEG3350、0.2 M sodium thiocyanate の条件 (図 1-1-22. A) で、自作の溶液を用いて条件の最適化を行ない、タンパク濃度 15 mg/mL、14% (w/v) PEG3350、0.2 M sodium tartrate、 $10^3 \sim 10^5$  倍希釈したシード溶液、リガンドとして 20 mM Gal、100 mM Fuc、抗凍結剤として 10% ethylene glycol、5% MPD、または 20% sucrose を加えた条件が、結晶の形状的に最適であった。

瞬間凍結し、結晶を X 線に照射したところ、最大分解能 5 Å を記録した (図 1-1-22. B)。これは構造解析に行うには不十分であり、更なる条件検討を行う必要性が示唆された。

表 1-1-19. AgaBb1099 の結晶化スクリーニング時のヒット条件。色付きの条件は図 1-1-10 の結晶に該当する。

沈殿剤	塩・バッファー	温度	インキュベーション期間
20% (w/v) PEG3350	0.2 M ammonium iodide	20°C	1 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M tri-sodium citrate	20°C	2 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M sodium thiocyanate	20°C	3 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M di-ammonium tartrate	20°C	5 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M tri-potassium citrate	4°C	21 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M potassium thiocyanate	4°C	21 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M potassium iodide	4°C	21 日
20% (w/v) PEG3350	0.2 M tri-ammonium citrate	4°C	21 日
20% (w/v) PEG6000	1.0 M lithium chloride, 0.1 M citric acid pH 5.0	4°C	21 日

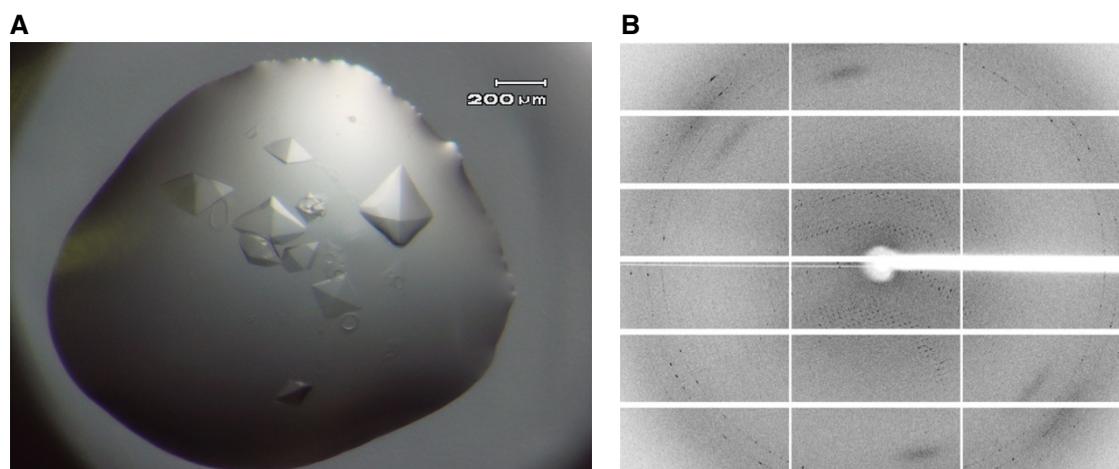


図 1-1-22. AgaBb1099 の結晶(A) と回折像 (B)。

### 1.1.3.6. AgaBb1180 のクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析

水溶液中での CBM51 の、GH110 ドメインに対する向きや方向の変化、そして真のオリゴマー状態を見定めるべく、クライオ電子顕微鏡を用いて AgaBb1180 の単粒子構造解析を行なった。精製酵素溶液を専用グリッドにアプライし、液体エタン中で瞬間凍結したものをクライオ電子顕微鏡で観察したところ、氷がグリッドの左から右にかけて厚くなっていた (図 1-1-23. A)。グリッド中央で厚みの異なる grid square をいくつか拡大し観察したところ、それぞれで比較的均一に氷が貼られていた。そこから更に Foil を拡大し、密集した AgaBb の粒子を視認した (図 1-1-23. C)。

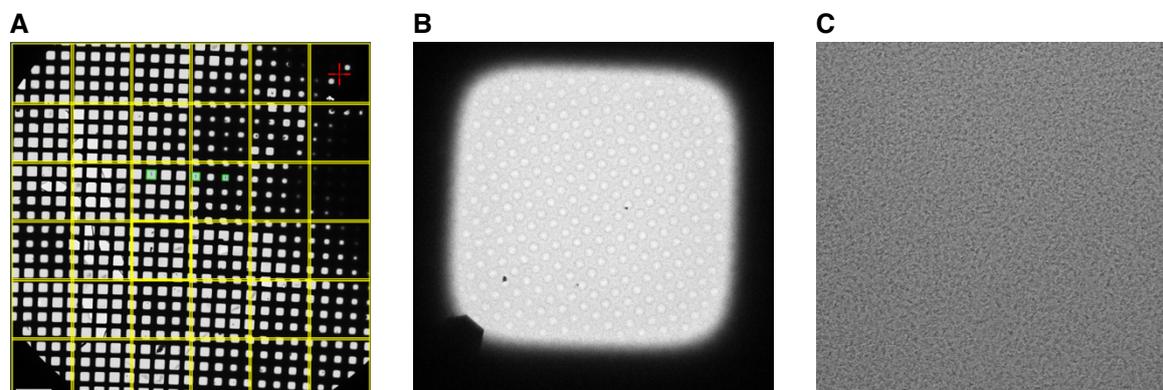


図 1-1-23. AgaBb1180 のクライオ電子顕微鏡画像。A. グリッドの全体像。B. Grid square の拡大図。C. Foil の拡大図。

この観察を踏まえて、本サンプルについて連続測定を行なった。データ収集およびプロセッシングの統計値を表 1-1-20 に纏めた。測定されたデータの解析の過程で抽出された 26,366 の粒子が 43 のクラスに 2 次元的に分類された (図 1-1-24)。この時点で 2 量体に見えるクラスと、別角度から見た 2 量体なのか単量体なのか判断の難しいクラスが見られた。

図 1-1-20. クライオ電子顕微鏡単粒子解析データ収集、プロセッシングの統計値。

Dataset	AgaBb1180 Cryo-EM structure
<b>Data collection and processing</b>	
Microscope	FEI Talos Arctica
Voltage (kV)	200
Detector	Falcon 3EC
Magnification	120 k
Pixel size (Å/pixel)	0.88
Automation software	EPU
Total exposure (e-/Å <sup>2</sup> )	66.49
Exposure rate (e-/Å <sup>2</sup> frame)	1
Number of frames	50
Defocus range (estimated by Gctf)	-1 to -2.5
Number of collected micrographs	433
Number of selected micrographs	413
Number of particles for 2D classification	45,335
Number of particles for 3D classification	26,366
Number of particles for 3D refinement	21,156
Map global resolution (Å)	
Masked FSC 0.143	3.91

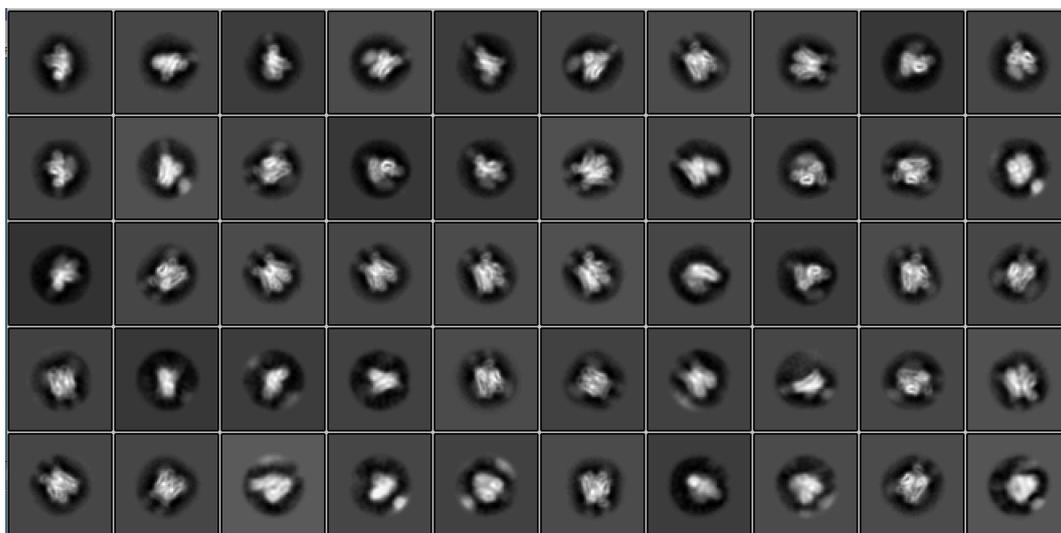


図 1-1-24. AgaBb1180 の 2 次元分類。

これを基に初期的なモデルを作製し、3次元分類を行ったところ、大きく 4 つのクラスに分けられ (図 1-1-25)、特に class002 と class004 はそれぞれ単量体と 2 量体のモデルであるように見えた。また、角分布に偏りがあり、モデルの上部と下部に当たる角度で十分な粒子数が観察できていないことが解った。

class001                      class002                      class003                      class004

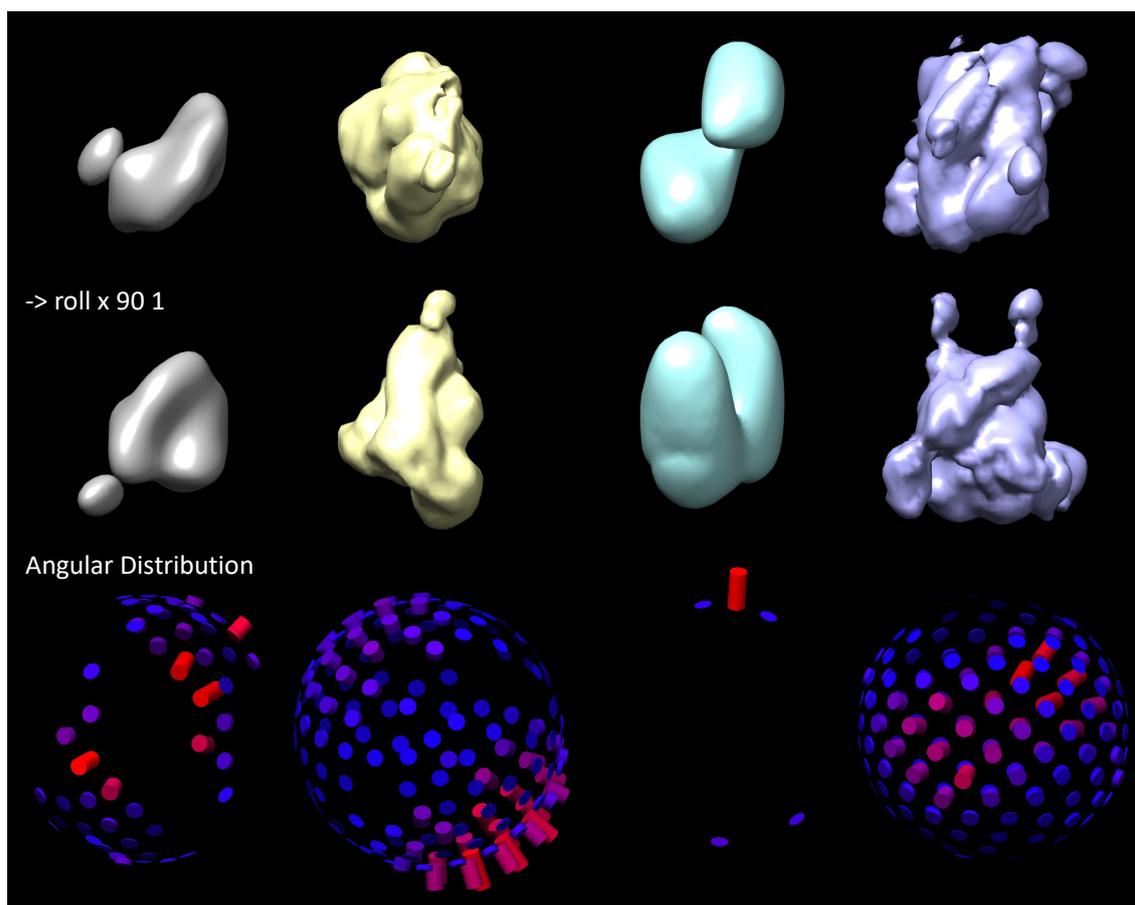


図 1-1-25. AgaBb の 3 次元分類。上段と中段は 2 つの角度から見たマップ。下段は各クラスの角分布を 3 次元的に表したグラフであり、赤くなっている角度で粒子が多く観察されたことを示す。

Class004 のモデルを基に再度粒子の 2 次元分類、3 次元分類、 $C_2$  対称性を考慮して 3 次元精密化を繰り返すことで最終的なマップを作製した (図 1-1-26. A)。全体の分解能は gold-standard Fourier shell correlation (FSC) の閾値 0.143 と、分解能はマスクを補正後の FSC の交点を基に 3.91 Å とである判断された (図 1-1-26. B)。しかし、3 次元 FSC では全体の FSC と比較して Z 軸の FSC が高く、Y 軸の FSC が顕著に低かった (図 1-1-26. C)。これは Y 軸から観察したマップの分解能が低いことを意味する。また、球形度の値が 0.729 と基準値の 0.95 を大きく下回った。よって、概算されて分解能ほど明瞭にマップは見えておらず、マップからアミノ酸主鎖を視認する事は出来ない。さらに AlphaFold2 (1.1.4.1 要参照) で作製した AgaBb1180 のモデルもマップにモデルを上手く当てはまらない (図 1-1-26. D)。

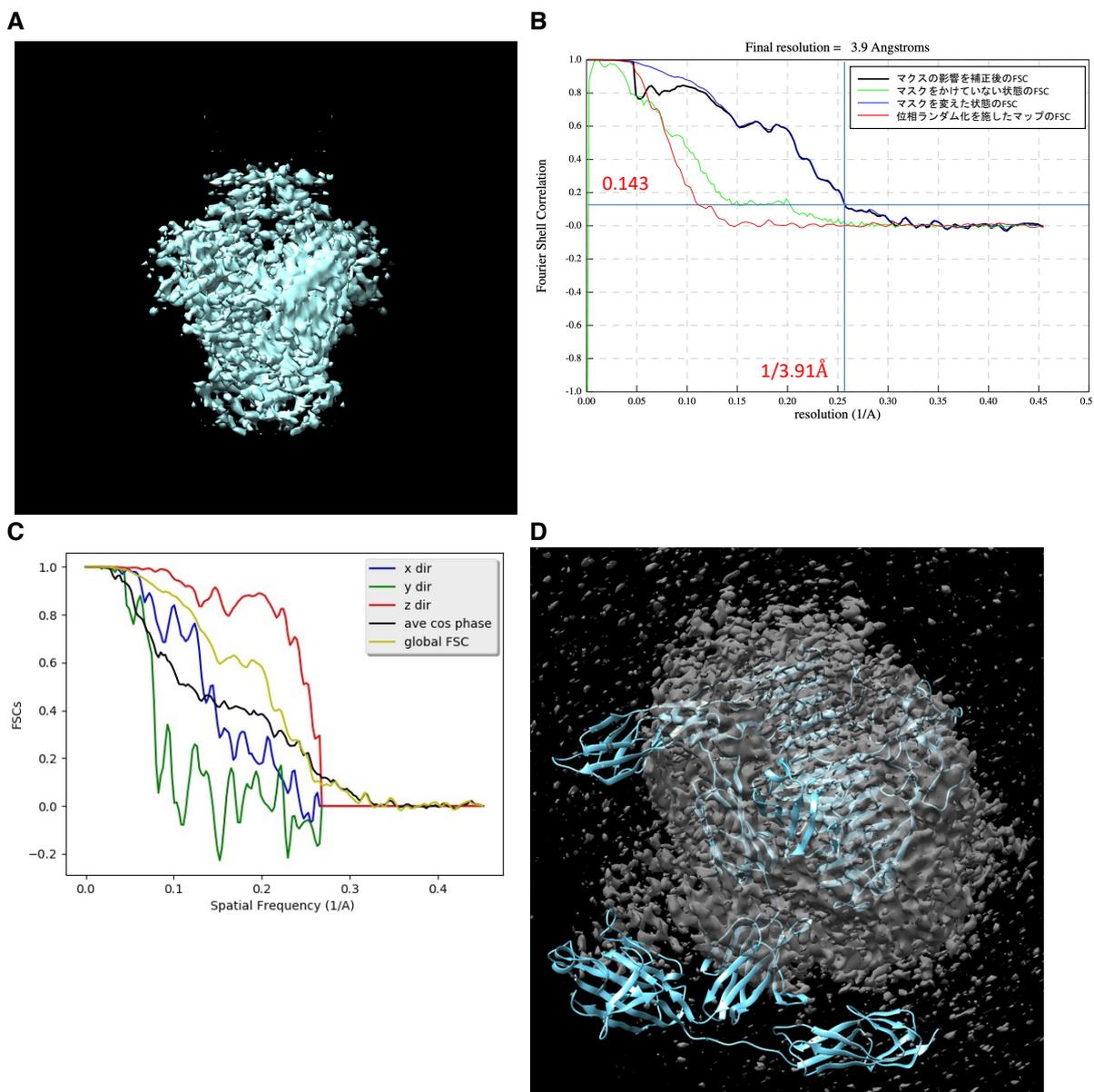


図 1-1-26. **A.** AgaBb1180 のクライオ電子顕微鏡マップ。**B.** 3.91 Å のクライオ電子顕微鏡マップの FSC カーブ。ここでいうマスクは溶媒領域とタンパク質を見分けるために定義されたものを指す。**C.** 3 次元 FSC カーブ。**D.** AlphaFold2 で作製した AgaBb1180 のモデル (シアン) とクライオ電子顕微鏡マップ (灰) の重ね合わせ。

## 1.1.4. 考察

### 1.1.4.1. AgaBb の結晶構造決定

本研究では AgaBb の GH110 活性ドメインの構造決定に成功した。これは AgaBb が属する GH110 subfamily A では初である。既報の構造で最も近い構造は *Pseudoaltermonas distincta* U2A 由来の PdGH110B (配列同一性 27.09%) だが、重ね合わせを試みたところ、同じ GH ファミリーにも関わらずタンパク質主鎖の半分でしか重ね合わせができなかった。また、AgaBb と PdGH110 はどちらも結晶構造中では 2 量体を組んでいたが、それぞれでダイマー化に起因する領域 (AgaBb の  $\beta$ -helix 下流にあるループ、PdGH110B の  $\beta$ -barrel 2 の  $\alpha$ -helix) が保存されていないため、プロトマー間の結合様式が異なった。これにより AgaBb の結晶構造は新規性の高いものであることが示唆された。ただし、結晶化に用いた AgaBb のコンストラクトには 2 量体化に関わるドメインは存在せず、アーティファクトである可能性が示唆された (後述)。

AgaBb では酵素の基質・生成物との複合体構造は取得できておらず、PdGH110B との構造比較から活性中心の -1、+1 サブサイトを推測している。一方、AgaBb の構造解析では  $\alpha$ -galactosidase 活性に不可欠な Fuc を認識するとされている +1 サブサイトが重要視されているが、これは現時点では視認できていない。図 1-1-5. C で示した AgaBb と PdGH110B の構造から切り出した galactobiose のモデルに更に Fuc を加え、エネルギー最小化を行ったモデルを作製した (図 1-1-27)。このモデルでは R270 のグアニジノ基が Fuc の 2 位と 3 位のヒドロキシ基とそれぞれ 2.4 Å と 2.9 Å の距離に、E380 のカルボキシ基が 3 位と 4 位のヒドロキシ基とそれぞれ 2.4 Å と 2.3 Å の距離にあった。これらの残基が Fuc の認識に関わることを構造生物学的に証明するべくコンストラクトの再検討などを行い、複合体構造の取得に挑戦した。しかし、結晶はできるものの、現時点で良質な X 線回折像は得られていない。今後、以下の手法を用いて更に結晶化の条件検討を繰り返す必要がある。

1. AgaBb1099 について、Additive Screen (Hampton Research) により結晶の質を改善し得る添加剤を探索する。また、ヒットした結晶化条件に JCSG+ (Nextal Biotechnologies) や Crystal Screen (Hampton Research) のような sparse matrix screening kit の溶液を少量混合する添加剤探索の手法が報告されている (72)。
2. まだ結晶化スクリーニングを行っていない AgaBb898 コンストラクトでスクリーニングを試みる。
3. AlphaFold2(45) で作製した AgaBb の高品質な予測モデルを基にコンストラクトを再検討する。AgaBb の予測モデルは全体的に local-distance difference test (IDDT) のスコアが高いが、モデルの作製に先立った MSA で用いられた配列の数は 1000 以下と少ない (図 1-1-28. A)。特に GH110 活性ドメインと CBM51 の中間配列については 100 を切っている。また活性ドメイン以外は predicted aligned error (PAE) が部分的に高く、モデルの信憑性が疑われる (図 1-1-28. B)。しかし、各ドメイン内では PAE が低いため、ドメイン間の境界は正確に捉えていると考えられる。これまで作製してきたコンストラクトは予測モデル上では AgaBb673 と AgaBb1099 以外はドメインの中間部分で配列が切断されており、これはドメインの安定化や揺らぎに影響している可能性がある (図 1-1-28. C-E)。

また構造解析とは別に、Fuc と相互作用すると予想されている残基の変異体、E380A、E380Q、R270A を作製し、野生型との比活性を求めれば、Fuc の認識におけるこれらの残基の重要性を示すことができるかもしれない。

1.1.1.1. で述べたように、GH110 の塩基性触媒残基として 2 つの Asp が候補に挙げられているものの、それぞれの具体的な働きは把握できていない。これは先行研究でいずれの残基に変異を加えても同様の活性の低減が見られたため、どちらが塩基性触媒残基なのか断定できないためである。今後 NMR での反応のモニタリングや quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) 法などの手法を組み合わせれば、これを突き止めることができるかもしれない。

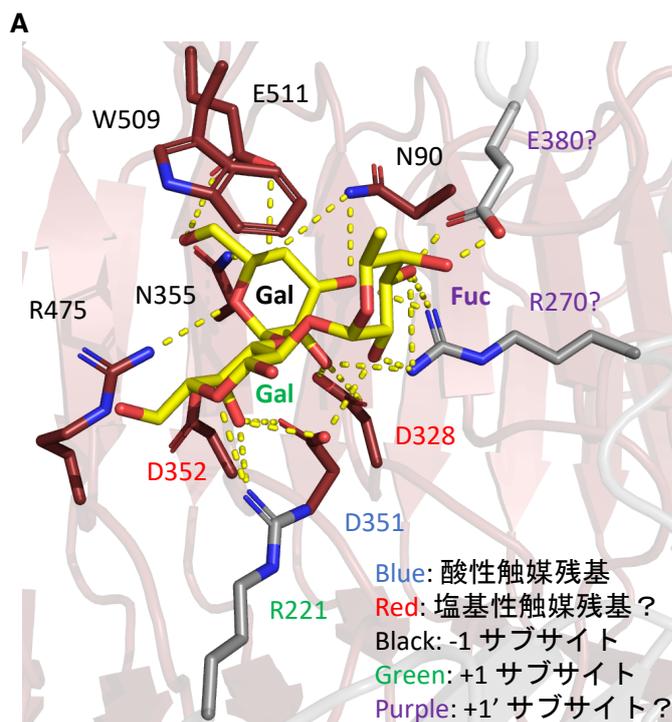
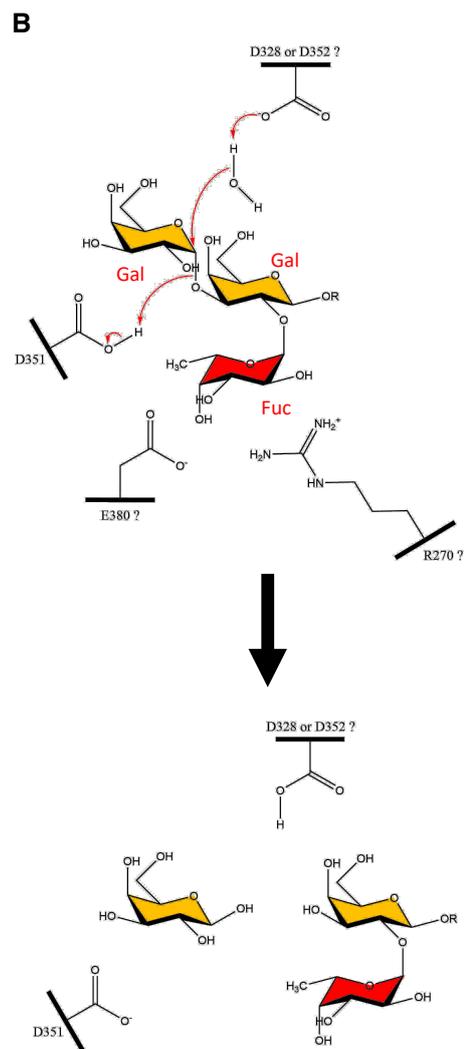
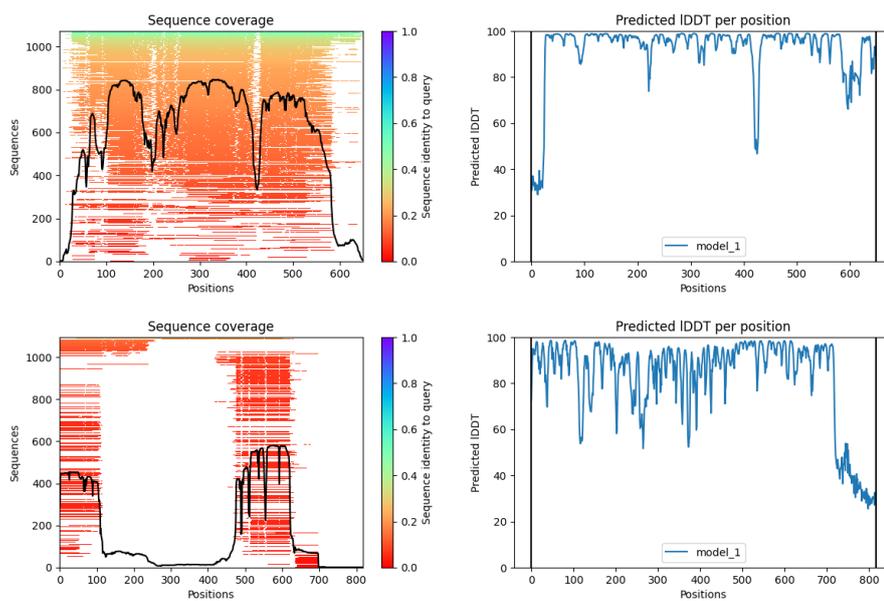
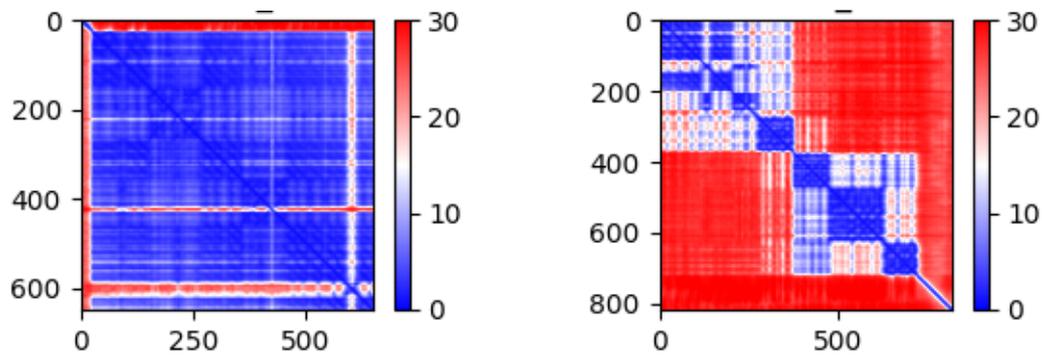
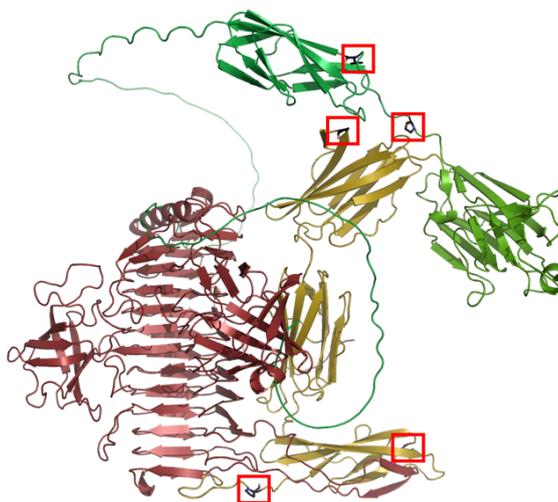
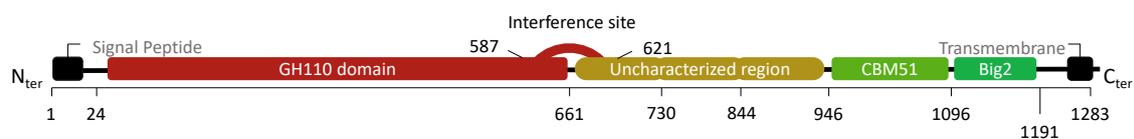


図 1-1-27. **A.** AgaBb の活性中心に B 型血液型抗原をはめ込んだモデル。β-helix のアミノ酸残基を赤、β-barrel を灰色、糖を黄色、水素結合を破線、-1、+1、+1'サブサイトに該当するアミノ酸と糖をそれぞれ黒字、緑字、紫字、酸性触媒残基を青字、推定塩基性触媒残基を赤字で示す。**B.** AgaBb の B 型血液型抗原加水分解反応機構の模式図。



**A****B****C****D**

次ページに続く

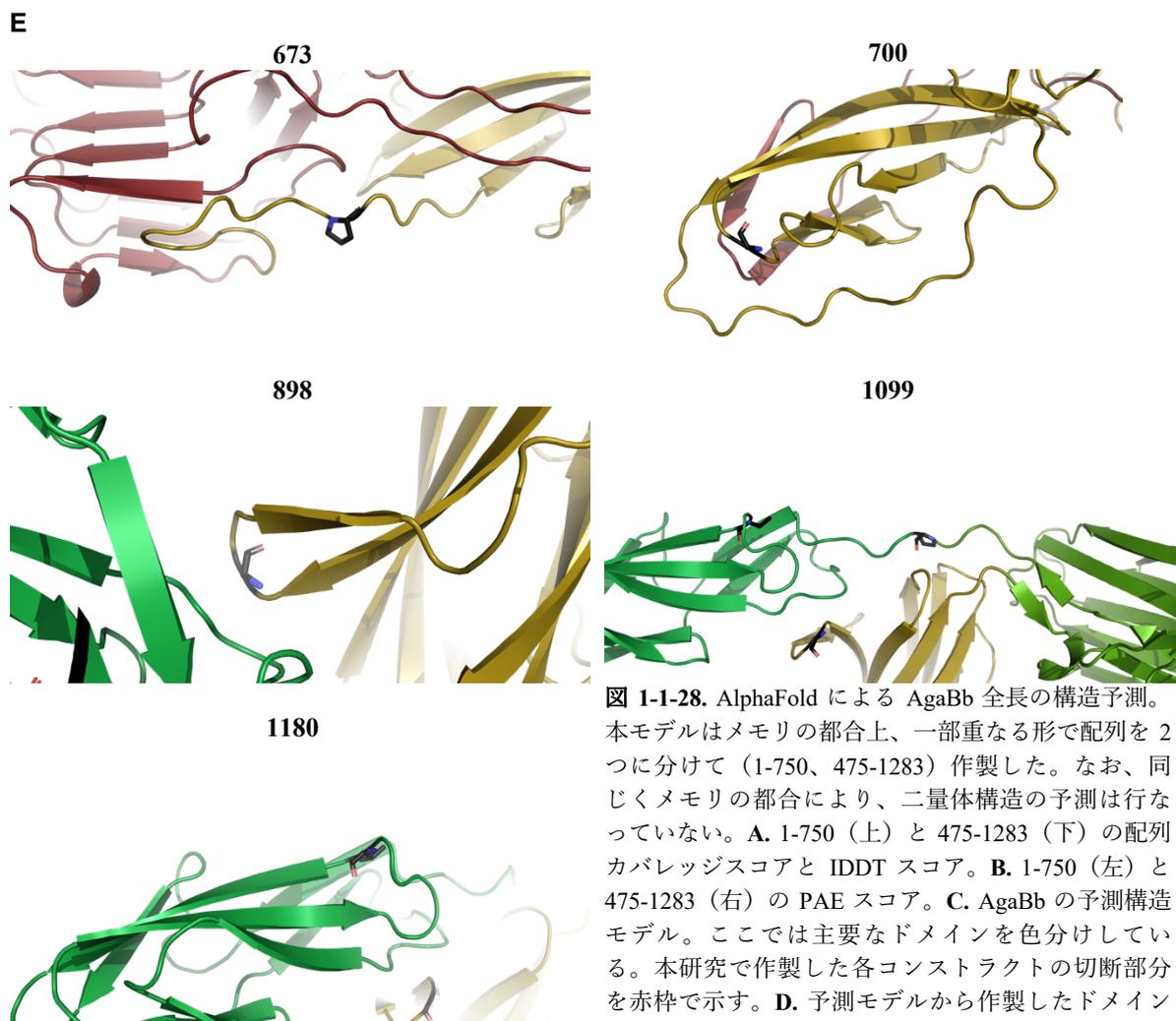


図 1-1-28. AlphaFold による AgaBb 全長の構造予測。本モデルはメモリの都合上、一部重なる形で配列を 2 つに分けて (1-750、475-1283) 作製した。なお、同じくメモリの都合により、二量体構造の予測は行なっていない。A. 1-750 (上) と 475-1283 (下) の配列カバレッジスコアと IDDT スコア。B. 1-750 (左) と 475-1283 (右) の PAE スコア。C. AgaBb の予測構造モデル。ここでは主要なドメインを色分けしている。本研究で作製した各コンストラクトの切断部分を赤棒で示す。D. 予測モデルから作製したドメイン構造の模式図。E. 本研究で作製した各コンストラクトの切断部分 (黒) の拡大図。

#### 1.1.4.2. AgaBb の安定化に関わる配列の発見

結晶化に向けたコンストラクト再検討の際に行なった熱安定性試験の結果により、AgaBb673、AgaBb700 より AgaBb898、AgaBb1099、AgaBb1180 の方が熱安定的であることが分かった。これは、これまで未解析とされていた GH110 ドメインと CBM51 ドメインの間 200 残基 (図 1-1-28. D) が AgaBb の安定性に重要であることを示している。

この領域の配列を基に系統樹を作製した (図 1-1-29)。作製に用いられた配列同一性 31.69% 以上、 $e$ -value  $7 \times 10^{-10}$  以下の 102 の配列中、*B. bifidum* のものが 45 個あり、過半数を占めていた。次に多かったのは腸内細菌が多く属する *Ruminococcus* 属で、22 の配列が含まれていた。また DBcan metaserver(73)によるドメインアサインメントによると、系統樹に用いられた 102 の配列の内 91.25% が GH110 と CBM51 の中間に位置することが分かった。これは GH110 ドメインと CBM51 ドメインの間 200 残基がタンパク質全長を安定化させるために *B. bifidum* はじめ腸内細菌が独自に進化させたものであることを示している。

しかしながら安定化に関わる構造要因は現時点では不明であり、より正確にデザインしたコンストラクトや変異体で熱安定性を検証すればさらに詳細な知見が得られるかもしれない。コンストラクトについては、本領域が図 1-1-28. C にあるように 3 つの  $\beta$ -sandwich ドメインからなっているため、まず各ドメインを切除して実験を進めることが重要である。

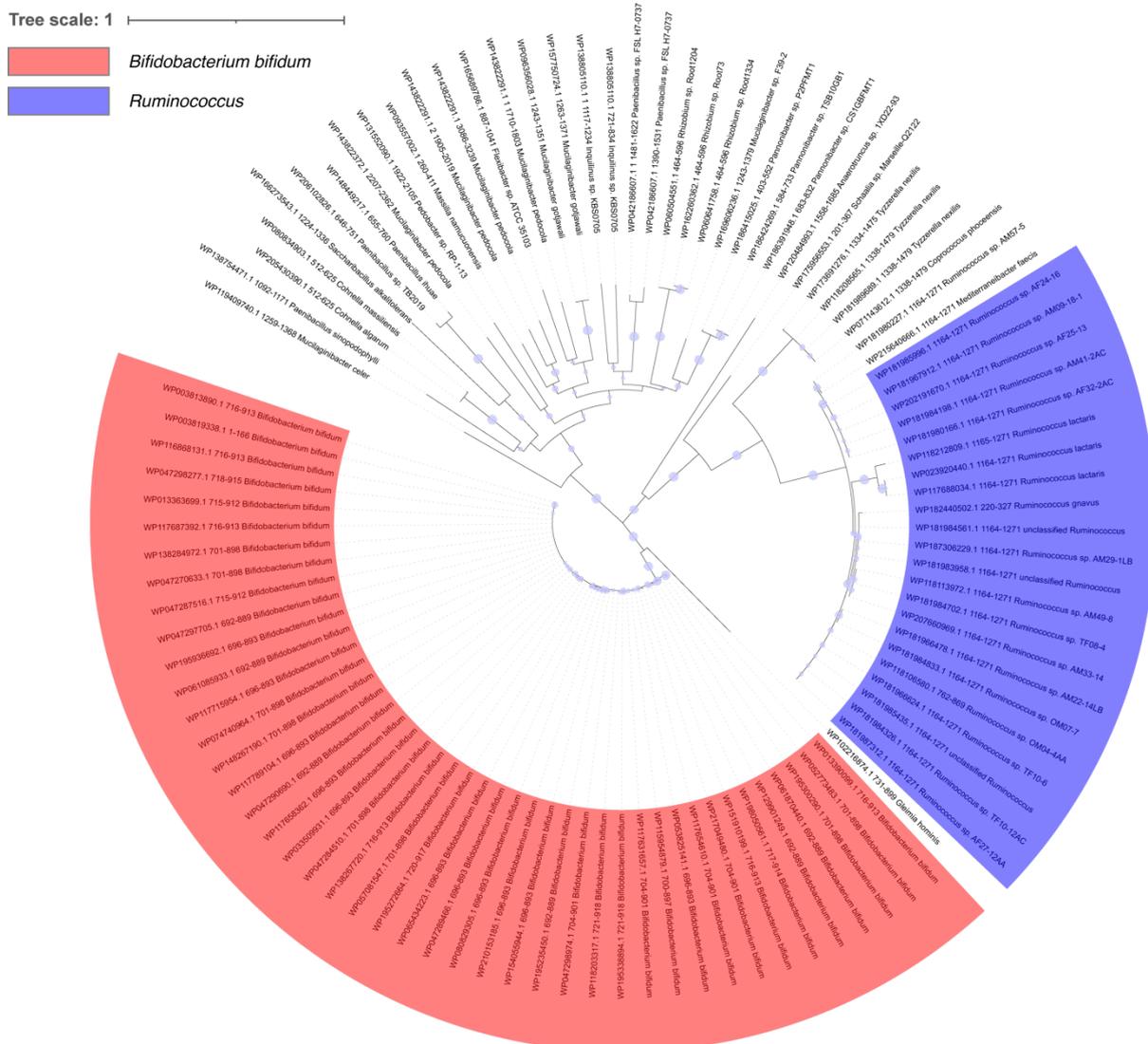


図 1-1-29. AgaBb の安定化に関わる配列ホモログの系統樹。青丸は Maximum-Likelihood 解析時の Bootstrap の頑健性 (Robustness、50~100%) を示す。

### 1.1.4.3. AgaBb のダイマー化とマルチプルドメイン構造の柔軟性について

ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量測定 (図 1-1-17) の結果、AgaBb673、AgaBb700、AgaBb898、AgaBb1099 は単量体、AgaBb1180 は二量体であることが明らかとなった。これは免疫グロブリン様ドメインである Big2 が二量体化に関わっていることを示している (図 1-1-28. D)。免疫グロブリン様ドメインがタンパク質間相互作用に寄与しているという報告は存在する(74-76)。また AgaBb は糖質代謝経路に関わる膜結合型タンパク質群の一つであり、各タンパク質間で相互作用し超分子複合体を形成すれば基質・生成物を受け渡し効率的になる可能性が見受けられる。よって AgaBb の免疫グロブリン様ドメインがタンパク質間相互作用に関わる事は、ビフィズス菌の生理機能上メリットがあり、十分にあり得る。AgaBb とムチン糖鎖代謝経路の他の GH と *in vitro* で混合し、分子量の変化をモニタリングすればこの仮説を実証できる。

T7-tag\_AgaBb700 の結晶構造から活性ドメインの下流にある配列が二量体化に関わる可能性も示唆されたが、上記の通り AgaBb700 は水溶液中では単量体であるため、結晶構造内のオリゴマー化はパッキングによるアーティファクトであると推測している。

仮に二量体化する場合、AgaBb の活性ドメインと CBM の空間的な位置関係が気になるところである。また、CBM に対する触媒モジュールの向きや方向は 2 つのドメイン間の配列によって変化できるものであるとされている(77)。これを構造生物学的に示すべく、AgaBb1180 の結晶化およびクライ

オ電子顕微鏡単粒子解析を試みた。結晶化はスクリーニングの時点で成果が得られなかったものの、クライオ電子顕微鏡では 2 次元分類、3 次元分類の時点で単量体とは二量体が確認された。ゲルろ過クロマトグラフィーではシングルピークが見られたため、2 種類のオリゴマー状態に別れた理由としては保存時の変性、グリッド作製のタンパク質構造への損傷などが考えられるが、割合としては二量体構造の方が 80.24% (3 次元精密化に用いられた粒子の数から計算した) と多かった。現時点では粒子の向きの偏りによるアーティファクトがあり、明瞭なマップは得られていない。粒子の向きの偏りは溶液中で粒子が密集していたことが原因であり、タンパク質濃度を検討して再度測定に臨めばより良質なマップが得られるであろう。AgaBb については今後も研究を続ける必要がある。

#### 1.1.4.4. 血液型変換と異種移植における GH110 の応用研究について

GH は、糖鎖構造のリモデリングに有用な酵素である。複雑な糖鎖の構造決定や、ファブリー病などのリソソーム蓄積症の酵素補充療法における治療薬として広く用いられており(78)、万能血液型(O 型)の赤血球(79)やブタ前十字靭帯などの異種移植(80)など、バイオメディカル製品の生産に利用できる可能性がある。後者の用途では、酵素が制限された基質特異性、高い比活性を持ち、中性 pH を含む通常の生理的条件下で機能することが重要である。過去に多くの研究者が、動物からヒトへの異種移植に使用する組織に  $\alpha$ -galactosidase を使用し、動物の多くの複合糖質に見られる  $\alpha$ 1,3-Gal 残基の除去を検討してきた。この方法は、糖鎖を合成する酵素を発現しない組織や組織由来の細胞性製品にとって特に魅力的である(81)。

過去に異種移植用酵素としてコーヒー生豆由来の GH27  $\alpha$ -galactosidase を用いた臨床研究が報告された(80)。この酵素は至適 pH が酸性であり、 $\alpha$ 1,3-Gal 末端オリゴ糖に対する活性が弱く、ブタ前十字靭帯の  $\alpha$ 1,3-Gal 残基の除去に酵素濃度を  $\sim 3$  mg/ml まで上げる必要があった。また、GH27  $\alpha$ -galactosidase は  $\alpha$ 1,4-Gal 残基にも作用するため、糖脂質に見られる Gal- $\alpha$ 1,4-Gal- $\beta$ 1,4-Glc-セラミド構造に作用する恐れが示唆された。これとは別に GH4 の  $\alpha$ -galactosidase も異種移植へ利用可能な酵素の候補に挙げられたが、アノマー保持型 GH 特有の糖転移反応が生じ、*in vivo* では想定された糖構造とは別のものが生成される恐れが考えられた。

他にも GH109 (47)や GH39 + GalNAc deacetylase (82, 83)を用いた A 型血液型抗原の分解、GH98 endo- $\alpha$ -galactosidase による A/B 型抗原の 3 糖構造の除去(84)、ブタの  $\alpha$ 1,3-Gal 転移酵素のノックアウト株の作成(85)などが検討されている。特に後者については、糖転移酵素を欠失させたにも関わらず、別の酵素によって Gal- $\alpha$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Glc- $\beta$ 1-セラミドが合成されることにより、臓器表面の抗原を完全に除去できないなどの課題が残されている(86)。

GH110 Subfamily A は、B 型血液型抗原を特異的に認識する  $\alpha$ -galactosidase として、異種移植に用いる動物組織の生産量を大幅に向上させる可能性が 2000 年代後半に示された。発見された当初から GH110 酵素のほとんどは中性の pH で高い活性を持つとされていた(47, 48)が、安定性向上を目指したバッファー検討などが未だになされており(87, 88)、私の知る限り実際の応用には至っていない。

本研究では *B. bifidum* JCM1254 株由来 GH110 AgaBb の構造解析を目指した。その一環で GH110 活性ドメインの下流にあるドメインがタンパク質の熱安定化に大きく寄与していることを突き止めた。今後、この酵素の構造基盤を詳細に解明することで、タンパク質工学的なアプローチによる GH110 の安定性向上と血液型変換・異種移植への応用などの展開が期待できる。

最後に図 1-1-30 に本研究の実験フローチャートを示す。

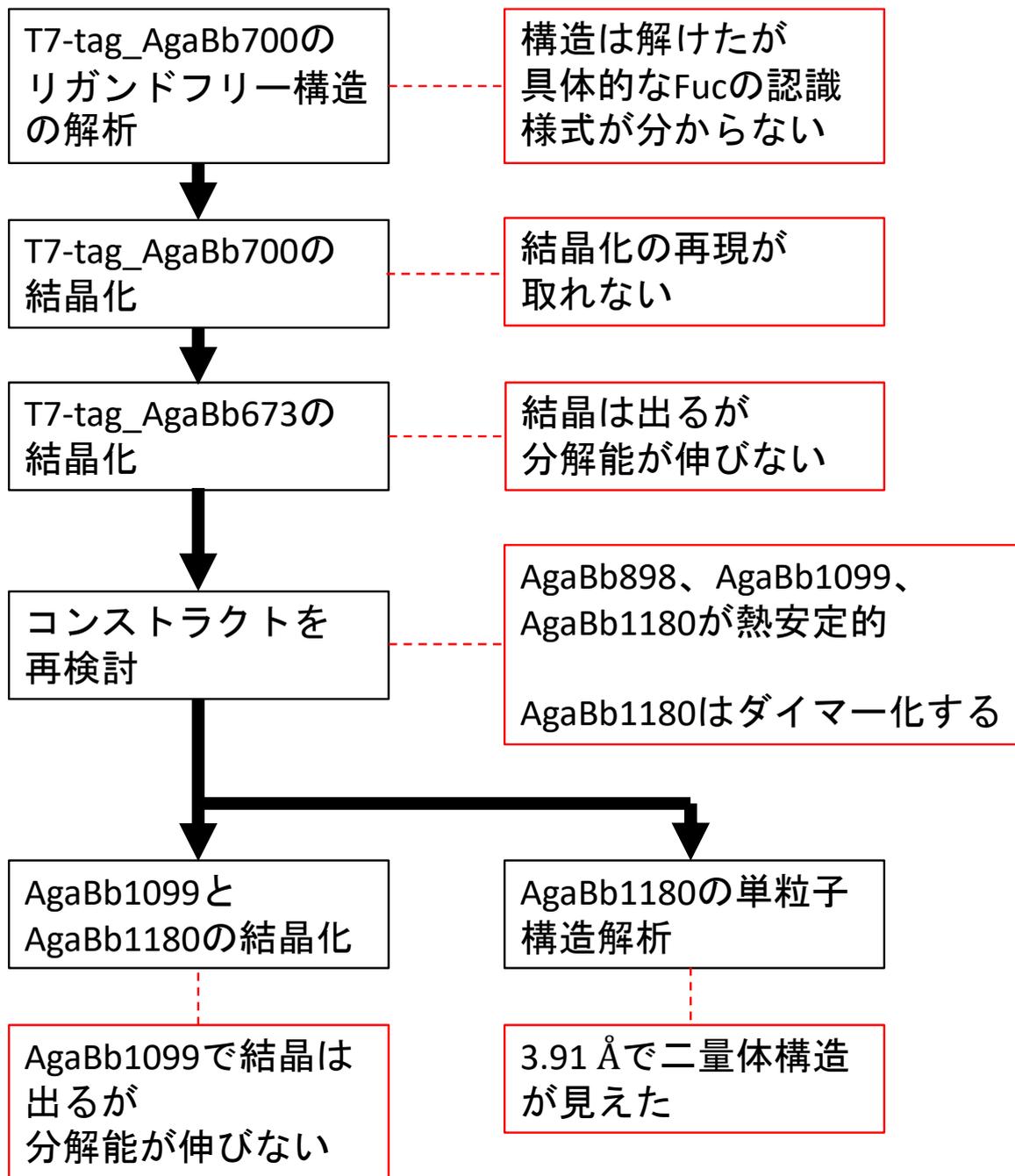


図 1-1-30. B 型血液型抗原に特異的な GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb の構造解析における実験フローチャート。実験内容の黒枠、各実験で至った結論を赤枠で示す。

## 第2章—ムチン糖鎖や HMO の修飾糖分解酵素 GH95 $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA に付属する新規 CBM の構造解析

### 1.2.1. はじめに

本章ではムチン糖鎖や HMO の修飾糖分解酵素 GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA に付属する新規 CBM の構造解析について述べる。序論としてムチン糖鎖と HMO に含まれる Fuc、GH95 AfcA の最新の機能解析について概説した上で、本研究の目的、方法、結果、考察について詳細に論ずる。

#### 1.2.1.1. ムチン糖鎖と HMO に含まれる Fuc について

糖鎖の非還元末端にある、 $\alpha$ 1,2、 $\alpha$ 1,3、 $\alpha$ 1,4 結合した Fuc は、受容体タンパク質を介した哺乳類の細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている(89)。また、癌をはじめとするヒトの疾患では、フコシル化の異常が見られることが明らかになっている(90)。他にも *Campylobacter jejuni* が H 抗原と、そして *Helicobacter pylori* がアドヘジンという特異的な受容体タンパク質を用いて Le<sup>b</sup> 抗原 [Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$ 1,3-(Fuc- $\alpha$ 1,4-)GlcNAc] と結合し、宿主上皮細胞への感染を促進している(91, 92)。このように糖鎖末端の Fuc は、ヒトをはじめとする高等真核細胞の組織間、そしてヒトを取り巻く環境生物の生理活性の要となっている。

ABO 式血液型の H 抗原 (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal) は、ムチン糖タンパク質に豊富に存在 (図 1-0-1) し、腸内細菌の存在に応答して  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase 2 (FUT2) をコードする遺伝子が関与する経路で合成される(93)。またムチンに加え、HMO にも別の形で豊富に含まれている。

ヒトの母乳は 4.5%の脂質、0.8-0.9%のタンパク質、0.2%のミネラル、そして 6.9-7.1%の糖質から成っている(94)。その糖質の構成は、80%はラクトース (Gal- $\beta$ 1,4-Glc、lactose、Lac)、20%は HMO である。HMO は腸の低い pH にも耐性があり、また、ヒトの消化酵素によって分解を受けないことにより、そのまま消化管下部まで到達してビフィズス菌に利用されうる(57)。

HMO には 19 のコアグループが知られている。コア構造は、Lac に、ラクト-N-ビオース I (Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc、lacto-N-biose I、LNB) または N-アセチルラクトサミン (Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc、N-acetyllactosamine、LacNAc) が結合したものの組み合わせで構成され、これらに Sia または Fuc が結合することで、160 種類以上もの HMO 糖構造が形成される(96)。中でも最も主要な糖構造を図 1-2-1 に示す。LNB を含むオリゴ糖を type I、LacNAc を含むオリゴ糖を type II と呼ぶが、ヒトの母乳は type I オリゴ糖の含有量の方が type II よりも高い(97)。また、HMO の 70%には Fuc が付加されている(32)。

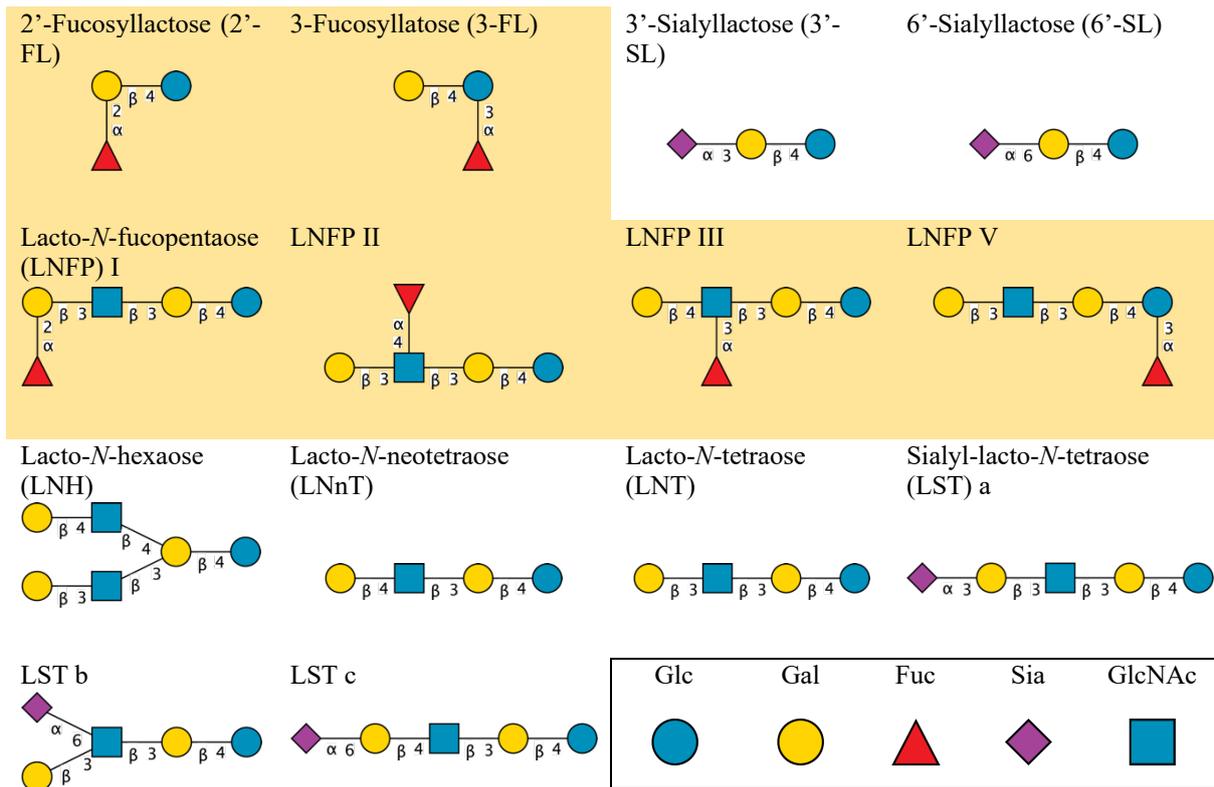


図 1-2-1. HMO で見られる主要な糖構造。Fuc を含む糖構造を黄色で示す。糖の表記は SNFG に基づく。Smilowitz et al., *Annu Rev Nutr*, 2015 (98)より改変。

### 1.2.1.2. GH95 $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA について

先述でわかるように乳児の大腸内は Fuc 含有糖質を多く含んでおり、ビフィズス菌はこれを炭素源・エネルギー源としている。GH95 AfcA は 2004 年に京都大学大学院の片山高嶺教授らによって発見された。AfcA は HMO の主要構造の一つである 2'-フコシルラクトース (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$ 1,4-Glc、2'-fucosyllactose、2'-FL) やムチンの血液型糖鎖 (ABO 抗原、Lewis 抗原) の非還元末端に結合した Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal 結合を特異的に加水分解する  $\alpha$ 1,2-fucosidase である(35)。AfcA は、H 抗原に Gal 残基がさらに修飾されている B 型血液型抗原のフコシル結合を加水分解することができないため、GH110 AgaBb (第 1 章) と協調的に働くことでこの糖構造の資化が成り立っていると考えられる。さらに pNP- $\alpha$ -Fuc に対して活性を持たないため、Fuc が Gal と  $\alpha$ 1,2 結合していることが特異性において重要であると示唆されている。

AfcA は N 末端からシグナルペプチド、新規 CBM (後述、1.2.1.3 節を参照) を含む N 領域、GH95 活性ドメイン (M 領域)、ペプチドグリカンとの相互作用によってタンパク質を安定化すると予想されている免疫グロブリン様ドメインを含んだ C 領域、そして膜結合ドメインからなる菌体外膜結合型 GH である (図 1-2-2)。



図 1-2-2. GH95 AfcA のドメイン構造。Katayama et al., *J Bacteriol*, 2004 (35)より改変。

## GH95 の反応触媒メカニズム

AfcA はじめ GH95 の酵素はアノマー反転型の反応機構を有する。また 2'-FL に対する  $k_{cat}$  および  $K_m$  値は、それぞれ 0.091 mM および  $160 \text{ s}^{-1}$  と決定された(35)。

AfcA の M 領域の結晶構造は既に決定されている(40)。触媒ドメインは、GH-L (GH15, GH65, GH125) や GH94 のものとよく似た ( $\alpha/\alpha$ )-barrel fold を有している (図 1-2-3. A)。GH-L と GH95 のメンバーは基質の  $\alpha$ -結合に作用するが、GH94 は  $\beta$ -結合に作用する。この構造から GH95 は Asp で活性化された Asn が一般塩基性触媒残基として働き、一般酸性触媒触媒の役割を正規の Glu のカルボキシル基が担うという、ユニークな反応機構を有していると考えられている。特に AfcA では、E566 と N423 が、それぞれ一般酸性触媒残基と一般塩基性触媒残基として同定されている。E566 は N421 と水素結合しており、この水素結合は、E566 の側鎖を脱離する Gal の 2 位のヒドロキシ基に向けて配向させるのに重要であると考えられている。N423 は隣接する D766 によって活性化され、求核性の水分子を活性化する (図 1-2-3. B)。このカルボン酸を介したアミド基の活性化は、GH18、GH20、GH25、GH56、GH84、GH85 のメンバーが有する、隣接基を参加させる基質補助型メカニズムと類似している (第 3 章参照)。これらの 4 つの残基は、このファミリーのメンバーに共通しており、Ala や Gly で置換すると、活性が  $10^3$  倍から  $10^5$  倍に低下する。

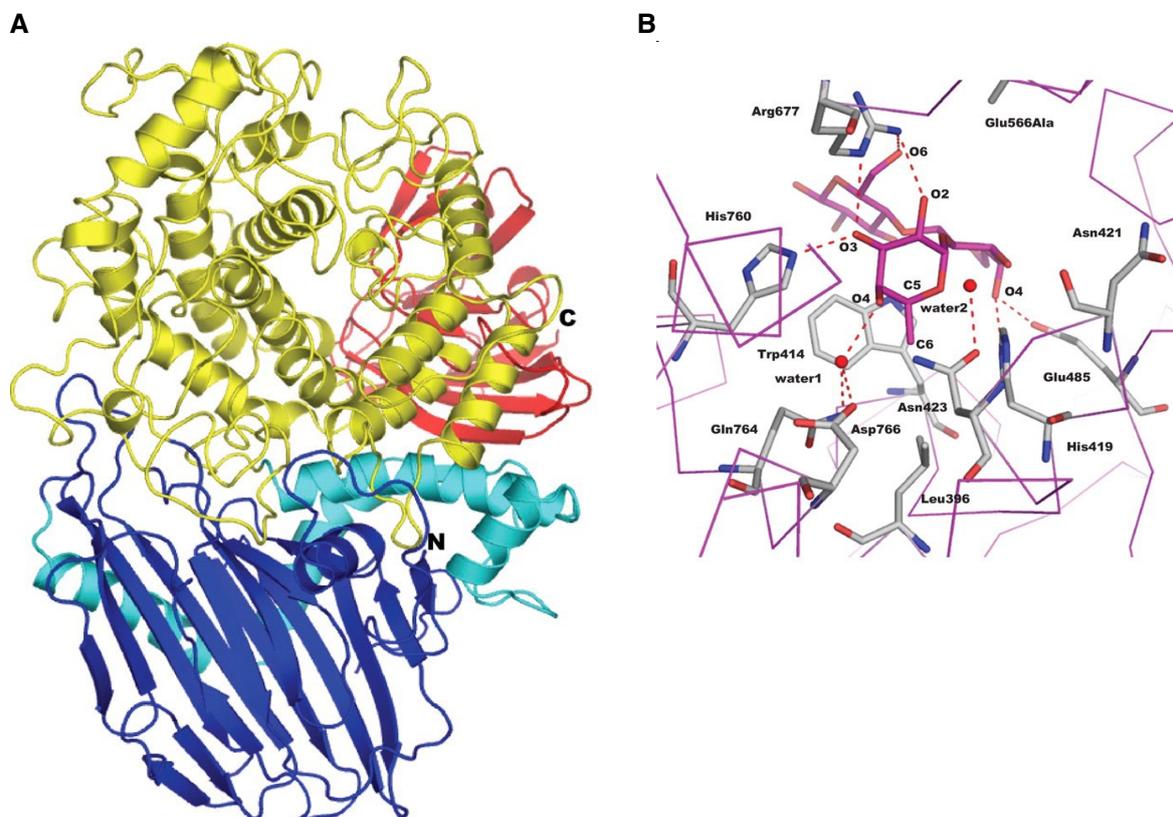


図 1-2-3. A. AfcA の GH95 活性ドメイン (M 領域) の全体構造。超 2 次構造を色分けし、N 末端と C 末端の位置を示す。B. 活性中心内の 2'-FL とその周囲残基。ここでは E566 を Ala に変異させている。2'-FL (スティック) とタンパク質主鎖 (ライン) をマゼンタ、アミノ酸側鎖を灰色、水分子を赤い球、水素結合を破線で示す。Nagae et al., *J Biol Chem*, 2007(40)より。

### 1.2.1.3. N 領域の機能について

京都大学の片山高嶺教授、加藤紀彦助教らにより N 領域の機能解析が行われた。2'-FL とブタ胃ムチン (porcine gastric mucin, PGM) を基質として、ドメインを切除して AfcA の Fuc 遊離活性を測定したところ、PGM に対する AfcA の活性は、N ドメイン依存的に増強されることが明らかになった。なお、2'-FL に対する活性は影響を受けなかった (図 1-2-3. A)。また N ドメイン単体に対する ITC により N 領域には Fuc 含有糖質が結合するサイトが 2 つ存在することが示唆された (図 1-2-3. B)。これにより AfcA の N 領域にはタイプ C の CBM が含まれていることが明らかとなった。

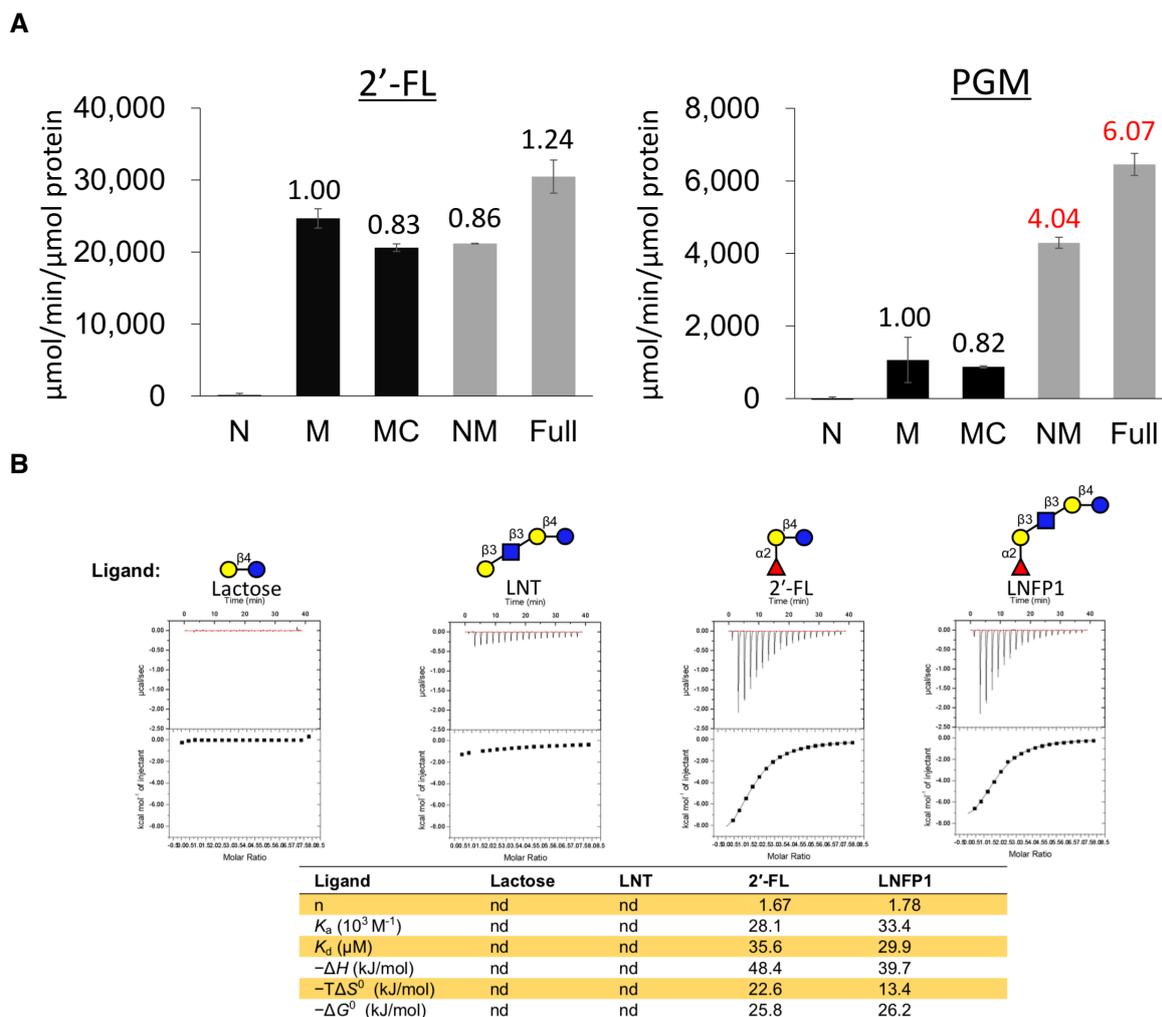


図 1-2-4. A. AfcA 全長および一部ドメインを除去したコンストラクトの活性測定。基質は 2'-FL と PGM を用いている。N、M、C は AfcA の各領域を表している。M ドメイン単体と比較して有意な活性の上昇を示したコンストラクトの比活性を赤字で示す。B. N 領域の各糖質に対する結合特異性を示した ITC データ。下部の表に結合の動力学的パラメーターを示す。糖の表記は SNFG に基づく。桑場ら、2020 年度日本農芸化学会発表資料より。

#### 1.2.1.4. 本研究の目的

AfcA の N 領域は既報の CBM のどれとも配列同一性を示していないため、糖質の結合様式の詳細は一切不明とされている。そこで本研究では AfcA N 領域の結晶構造解析およびリガンドとの複合体構造の決定を主目的とした。

本研究は 2018 年まで私の研究室に在籍していた佐藤真与博士の研究から派生したものである。佐藤博士は AfcA の NM コンストラクトの結晶化に成功したものの、位相決定、構造決定には至らなかった。本研究では当時取得された X 線回折像を利用しているため、後述で佐藤博士の研究データに触れる。

## 1.2.2. 方法

本研究における試薬は特記のない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を用いた。また、液体試薬は予め滅菌したもの、あるいは滅菌された状態で入手したものを利用している。遠心には MX-307 (トミー) を用いた。

また特記のない限り、濃度は全て終濃度である。

### 1.2.2.1. タンパク質の調製

本操作は京都大学大学院 分子応答機構学分野にてなされた。

コンストラクトは図 1-2-5. A に示したものを、pET23a AfcA のプラスミドを基に作製された(35)。AfcA NM-E1142A コンストラクトは AfcA から C 領域を切除し、Ni-IMAC 用に His<sub>6</sub>-tag を付加したものである。また、本研究では AfcA N 領域のリガンドである 2'-FL との複合体構造の取得を目的としているが、M 領域を野生型のまま実験を進めると、GH95 活性ドメインによって結晶化溶液中で 2'-FL の加水分解が触媒されてしまうため、酸性触媒残基 E1142 を Ala に置換し、酵素を失活させている。AfcA N-Nustag コンストラクトは AfcA の N 領域の C 末端に不溶なタンパク質の可溶化を促す Nus-tag と、His<sub>6</sub>-tag を付加したものである。

これらのコンストラクトの遺伝子を導入した pET23a プラスミドを片山高嶺教授らによって作製された BL21 CodonPlus(DE3) RIL  $\Delta lacZ$  株に形質転換し、1.1.2.7.の通りに異種発現を行なった。誘導前に 25°C で培養した後に 0.1 mM IPTG で発現誘導、その後 18°C で更に 48 時間培養し集菌した。精製は、1.1.2.11 に示した Ni-IMAC、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの手順に沿って行なった。なお、ゲルろ過クロマトグラフィー以降の手順はバッファーとして 20 mM Tris-HCl pH 8.0 または 10 mM HEPES-NaOH pH 7.0 を用いた。最後に SDS-PAGE で精製タンパク質の純度を確認した (図 1-2-5. B)。SDS-PAGE は、分子量マーカーが異なる点や、AfcA N-Nustag で染色液に CBB G-250 の代わりに CBB R-250 が用いられた点以外、全て 1.1.2.8. と同じ手順で実行された。

### 1.1.2.2. Pre-Crystallization Test

1.1.2.15 節と同様の方法で行なった。

### 1.1.2.3. 結晶化スクリーニング

1.1.2.16 節と同様の方法で行なった。ただし、AfcA NM-E1142A コンストラクトではタンパク質の量が少なかったため、スクリーニングキットには JCSG Core Suite I のみを用いた。

### 1.1.2.4. 結晶化条件の最適化

1.1.2.17 節と同様の方法で行なった。ただし、AfcA NM-E1142A コンストラクトではタンパク質の量が少なかったため、③と④ (塩、抗凍結剤の添加) は行っていない。

他にも、京都大学大学院 片山高嶺教授、加藤紀彦助教より供与いただいた 2'-FL を用いて共結晶化とソーキングを試みた。共結晶化では結晶化前にタンパク質溶液に 10 mM 2'-FL を加えた。ソーキングでは結晶が形成されているドロップに 10 mM 2'-FL を加え、蒸気拡散を平衡に近づけるために 24 時間、または 48 時間、20°C でインキュベートした。

### 1.1.2.5. シーディング

1.1.2.18 節と同様の方法で行なった。MMS については Nextal Biotechnologies の PEGs Suite を模した自作のキットを用いた。

### 1.1.2.6. X 線回折強度データ収集

1.1.2.19 節と同様の方法で行なった。抗凍結剤には 15% または 20% Ethylene Glycol を用いた。

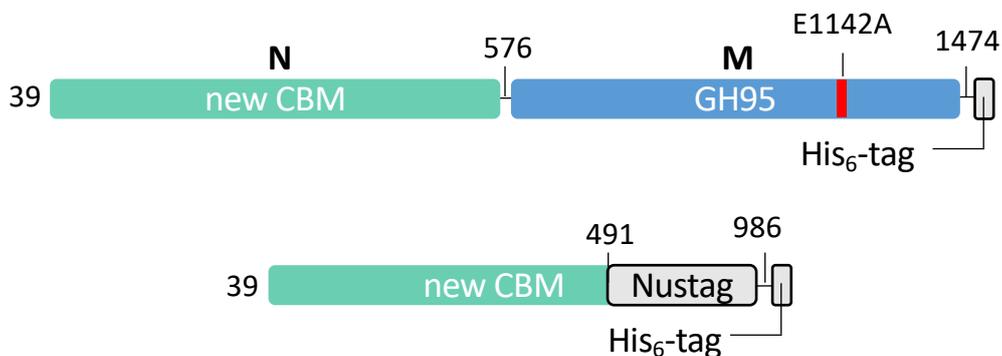
### 1.1.2.7. 結晶構造解析

1.1.2.20 節と同様の方法で行なった。ここでは、私が自ら取得した回折データの他に佐藤真与博士 (2018 年度博士課程修了) のデータも用いた。

### 1.1.2.8. 系統樹

1.1.2.24節と同様の方法で、N1ドメインに対して行なった。ただし、N1ドメインと同じ糖質と結合すると推定されるアミノ酸配列に限定するため、MSA後にN1とN2に共通する結合サイトの残基が保存されていない配列を除外した。その後、配列のリストにN2ドメインの配列を加え、再度M-coffeeでMSAを行ってから系統樹を作製した。

**A**



**B**

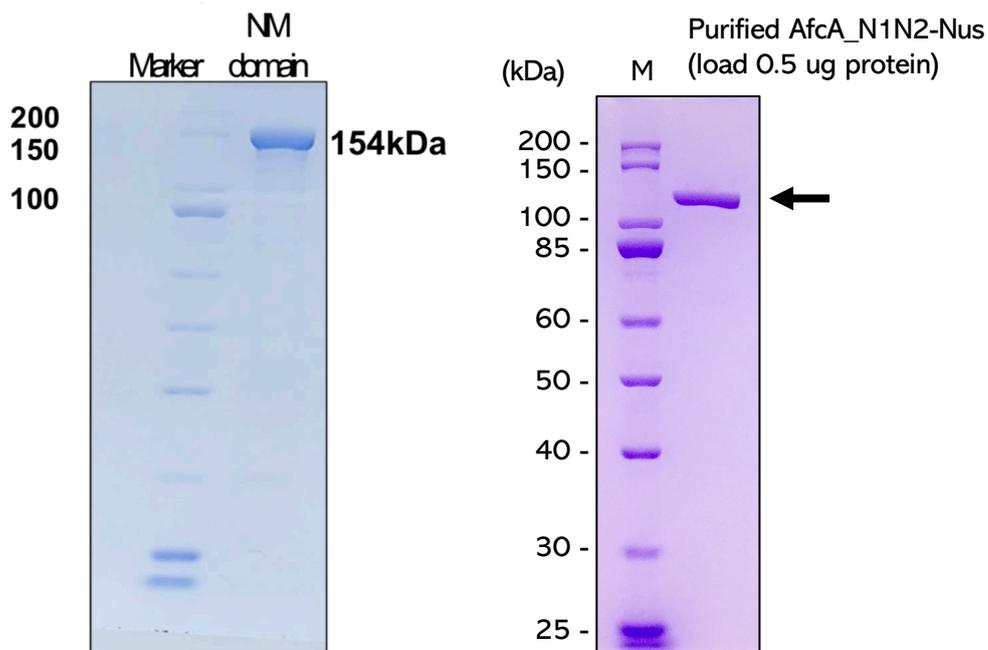


図 1-2-5. 本研究で用いた AfcA のコンストラクト。A. ドメイン構造。B. 精製後の SDS-PAGE。京都大学大学院片山高嶺教授、加藤俊彦助教の資料より。

### 1.2.3. 結果

#### 1.2.3.1. AfcA NM E1142A コンストラクトの構造決定

まず、前任者である佐藤博士が取得した回折データの再解析を行った。佐藤博士は AfcA NM-E1142A のコンストラクトの構造決定を目標に結晶化を行なった。タンパク質濃度 10 mg/mL、0.1 M sodium acetate pH4.6、8% (w/v) PEG4000 という条件で薄い板状の結晶が観察された（後述、図 1-2-7 参照）。位相決定を目指して Native そしてセレノメチオニン (Se-Met) 置換体タンパク質を用いて結晶を作製し、X 線回折データを取得していた。しかし当時は位相決定に至らなかった。構造決定に用いられた 2 つのデータセットの統計値を表 1-2-1 で示す。

表 1-2-1. AfcA NM-E1142A のデータセットおよび精密化の統計値。測定は佐藤真与博士 (2018 年度博士課程修了) によって行われた。括弧内は最外殻の値を示す。

	SeMet derivative	Native
<b>Data collection statistics</b>		
X-ray facility	KEK-PF BL5A	KEK-PF AR-NW12A
Wavelength (Å)	0.9789	1.0000
Space group	C2 2 2 <sub>1</sub>	C2 2 2 <sub>1</sub>
<b>Unit-cell parameters</b>		
a, b, c (Å)	86.25, 282.72, 156.46	86.78, 282.29, 156.41
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	49.36-2.91 (3.02-2.91)	47.44-2.71 (2.79-2.71)
Total reflections	572 668	385,620
Unique reflections	4,244	52,739
Completeness (%)	100 (100)	99.9 (99.4)
Multiplicity (%)	13.5 (13.2)	7.3 (5.9)
Mean I/σ(I) (%)	16.0 (3.9)	12.9 (2.9)
R <sub>merge</sub> (%)	16.6 (76.1)	13.3 (58.7)
CC <sub>1/2</sub>	99.7 (89.5)	95.7 (82.1)
<b>Refinement statistics</b>		
Resolution range (Å)		47.44-2.71
No. of reflections		385,620
R/R <sub>free</sub> (%)		22.2/25.0
<b>r.m.s. from ideal values</b>		
Bond lengths (Å)		0.008
Bond angle (°)		1.143
<b>Ramachandran plot (%)</b>		
Favored		89.51
Allowed		3.26
Outlier		3.05

再解析では、Se-Met 置換体のデータセットを Crank2 で解析したところ、サブストラクチャーを探索する shelxd の処理で 29 回のトライアルの末に、各トライアルのスコアが CC < 30、CC weak < 20 と CC > 55、CC weak > 35 の 2 つのグループに別れた (図 1-2-5. A)。これは結晶格子内でサブストラクチャー (重原子) が正しく認識されたことを示す。その後、パイプライン上で自動モデル構築を 17 サイクル繰り返すことで、FOM が 0.88、R が 0.29、R<sub>free</sub> が 0.35 に到達し、初期位相が決定されたと判断した (図 1-2-5. B)。

Se-Met 置換体より Native の回折データの方が、分解能が高かったため、Crank2 が作製した初期的な AfcA NM-E1142A のモデルを、Phaser を用いて Native のデータに分子置換し、モデル構築、精密化を経て AfcA NM-E1142A の構造を決定した。

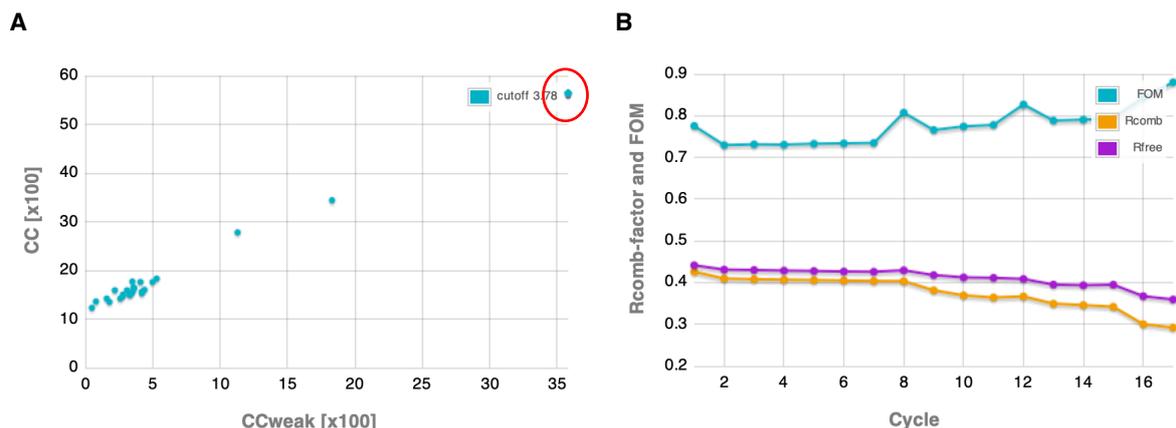


図 1-2-5. **A.** shelxd によるサブストラクチャー探索の結果を示した CC vs weak CC プロット。高いスコアに該当する点を赤で示す。 **B.** Crank2 内の Buccaneer のモデル構築サイクルの結果を示したプロット。

AfcA NM-E1142A の構造は N1、N2、L、そして先行研究で既に構造決定されていた GH95 活性ドメインによって構成されていた (図 1-2-6. A)。N1 と N2 は構造が酷似しており、比較したところ全長 220 または 224 残基のおよそ 2/3 である 178 の C $\alpha$  原子の重ね合わせに成功し、RMSD 値は 0.674 Å であった。これは N1 と N2 が構造的に類似していることを示している (図 1-2-6. B)。また blast2seq で N1 と N2 のアミノ酸配列アラインメント解析を行ったところ、配列同一性 47.51%、e value  $2 \times 10^{-61}$  というスコアからこの 2 つのドメインはホモログ同士であることが明らかになった。図 1-2-4 の ITC では N 領域には結合サイトが 2 つ存在することがわかっていたため、N1 と N2 がそれぞれリガンドと結合するのではないかと仮説が立てられた。

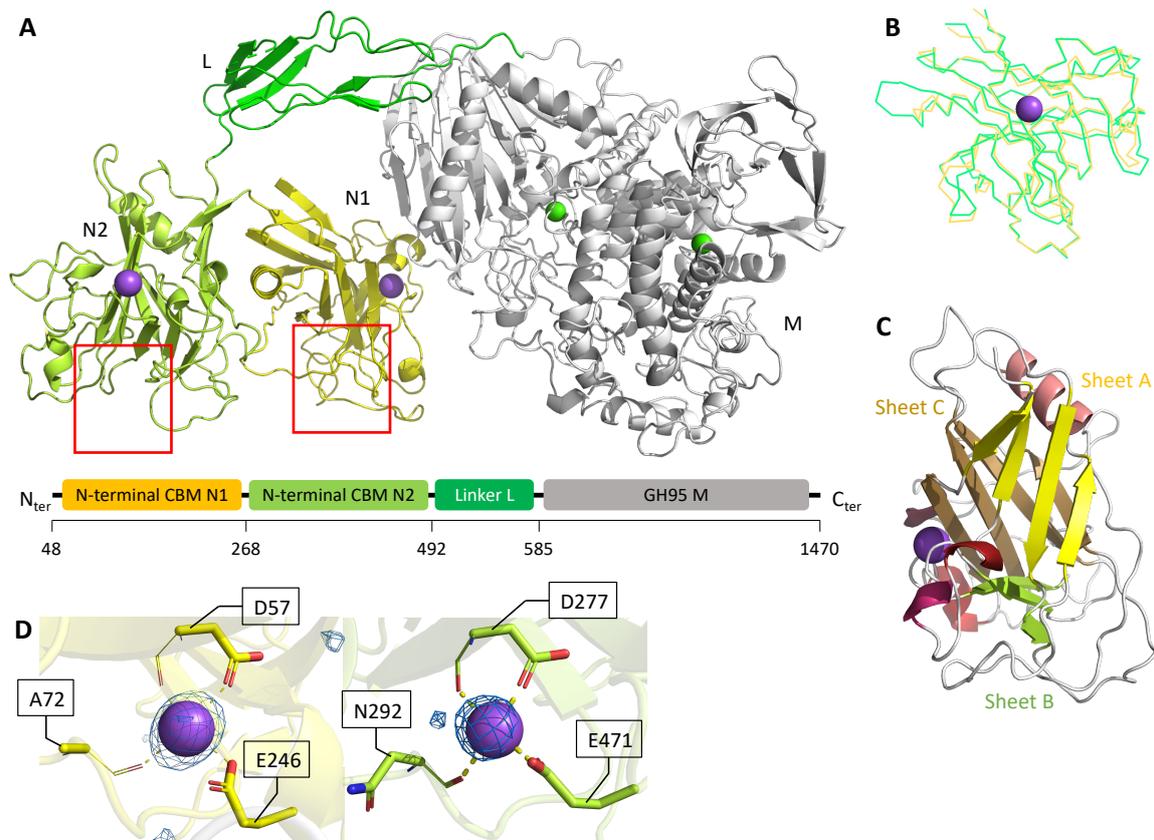


図 1-2-6. **A.** AfcA NM-E1142A の全体構造とドメイン構造。ここでは N1 と黄色、N2 を黄緑、L を緑、GH95 活性ドメインを灰色、Na<sup>+</sup> イオンを紫、Ca<sup>2+</sup> イオンを緑の球で表している。N1 および N2 内での 2'-FL の結合部位を赤枠で示す。 **B.** N1 と N2 の重ね合わせ。ここでは両構造のライン表示を示す。 **C.** N1 の超 2 次構造。ここでは超 2 次構造ごとに色分けしている。 **D.** N1 と N2 内の Na<sup>+</sup> イオンの配位。ここでは Na<sup>+</sup> イオンにあたる polder map (5.0 $\sigma$ ) をメッシュで示す。

N1 と N2 はそれぞれ 4 本の  $\beta$ -strand からなる逆平衡  $\beta$ -sheet が 3 枚、三角柱状に折り畳まれることで基本構造を形成していた (図 1-2-6. C)。その他に短い  $\alpha$ -helix が 4 つ、そして金属イオンが確認された。この金属イオンは Asp の主鎖と側鎖、Glu の側鎖、そして Ala または Asn の主鎖に配位しており、CheckMyMetal サーバー(99)で解析を行ったところ、Na<sup>+</sup>である可能性が高いと示された (図 1-2-6. D)。L ドメインについては部分的に電子密度マップが観察できない部分があったが、 $\beta$ -sandwich 様のリンカー領域であるように見えた。

GH95 活性ドメインは先行研究とで解かれた構造 (PDB ID: 2EAB) と比較したところ、ドメインを構成するアミノ酸 885 残基中 810 の C $\alpha$  原子 (91.5%) の重ね合わせに成功し、RMSD 値は 0.362 Å であった。よって GH95 活性ドメイン単体の構造と NM-E1142A コンストラクト内の活性ドメインは酷似しており、結晶内のパッキングによる構造の変化は見られなかった。

Dali 構造類似性検索(100, 101)にて既報の構造との類似性を調べた。類似性を示した構造 (Z-score > 8.0) はいずれも糖質関連酵素や CBM とは無関係なタンパク質であり、このことから仮に N1 と N2 にリガンドが結合する場合、新規性の高い CBM になることが示唆された (表 1-2-2)。

**表 1-2-2.** Dali サーバーで行なった N1 と N2 の既報の構造との比較結果。N<sub>align</sub> は重ね合わせがされた C $\alpha$  原子の数、%<sub>ident</sub> は配列同一性を示す。

Protein	Source Organism	PDB (chain)	Z score	RMSD (Å)	N <sub>align</sub>	% <sub>seq</sub>
<b>CBM N1</b>						
Bone morphogenic protein 9 growth factor domain	<i>Mus musculus</i>	4YCG (B)	10.4	3.1	135	12
Inhibin beta	<i>Homo sapiens</i>	5HLY (A)	10.2	3.2	129	11
Serine/threonine-protein kinase receptor R3	<i>Homo sapiens</i>	6SF2 (F)	9.9	2.9	122	10
Growth/differentiation factor 8	<i>Homo sapiens</i>	5NTU (A)	9.1	3.4	127	11
Transforming growth factor beta-1	<i>Sus scrofa</i>	5VQF (B)	8.6	3.3	123	10
Integrin alpha-V	<i>Homo sapiens</i>	6UJA (D)	8.5	3.3	128	10
Transforming growth factor beta-1 proprotein	<i>Homo sapiens</i>	6P7J (A)	8.4	3.0	124	12
<b>CBM N2</b>						
Bone morphogenic protein 9 growth factor domain	<i>Mus musculus</i>	4YCG (B)	10.3	3.2	139	12
Serine/threonine-protein kinase receptor R3	<i>Homo sapiens</i>	6SF2 (F)	9.4	3.2	127	13
Inhibin beta	<i>Homo sapiens</i>	5HLY (A)	9.3	3.2	127	8
Growth/differentiation factor 8	<i>Homo sapiens</i>	5NTU (A)	8.8	3.6	126	13
Transforming growth factor beta-1	<i>Sus scrofa</i>	5VQF (B)	8.2	3.0	119	12
Integrin alpha-V	<i>Homo sapiens</i>	6UJA (D)	8.1	3.3	127	12

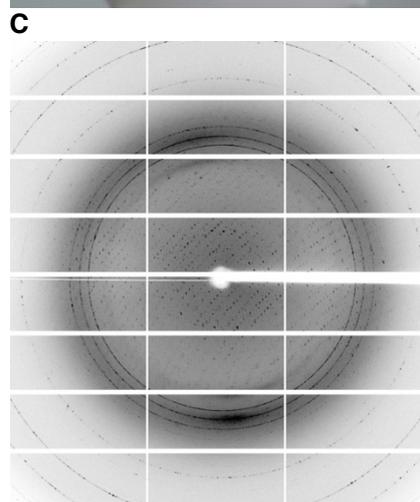
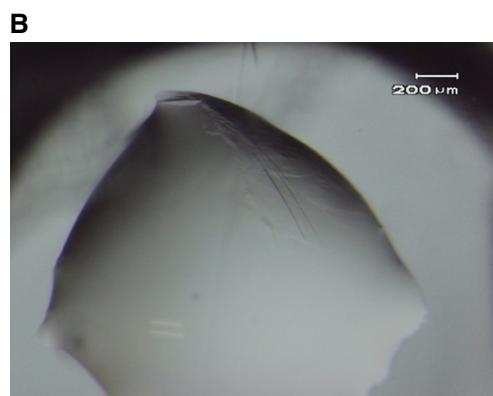
### 1.2.3.2. N1、N2 の 2'-FL との結合様式の同定

N1 と N2 が CBM であることを証明し、リガンドの認識様式を明らかにするべく AfcA と 2'-FL の複合体構造の取得に挑んだ。

結晶化には 2 つのコンストラクト、前任者と同じ AfcA NM-E1142A、そして新しく N-Nustag を用いた。PCT の結果に基づいていずれもタンパク質濃度 10 mg/mL でスクリーニングを行なったが、後者については結晶が得られなかった。AfcA NM-E1142A は 0.1 M sodium citrate pH 5.5、20% (w/v) PEG3000 の条件で結晶が観察された。これは前任者が用いていた条件と異なるが、結晶の形状は同じ薄い板状であった (図 1-2-7. A)。また、結晶化条件の最適化を行なったところ PEG3000 の濃度を 18% (w/v) に下げた方が大きな結晶が得られた (図 1-2-7. B)。

10 mM 2'-FL との共結晶化、ソーキングの両方を検討し、結晶を瞬間凍結、X 線に照射したところ、ほとんどの結晶が破損、または双晶化したものの、結晶出現から 2 ヶ月間インキュベートし、瞬間凍

結の 48 時間前にソーキングした条件で 3.36Å の解析可能な X 線回折像を取得した (図 1-2-7. C、表 1-2-3)。



**表 1-2-1.** AfcA NM-E1142A、2'-FL の複合体構造のデータセットおよび精密化の統計値。括弧内は最外殻の値を示す。

2'-FL complex	
<b>Data collection statistics</b>	
X-ray facility	KEK-PF AR-NW12A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	<i>C</i> 2 2 2 <sub>1</sub>
<b>Unit-cell parameters</b>	
a, b, c (Å)	86.75, 279.27, 156.55
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	49.24-3.36 (3.56-3.36)
Total reflections	184,316
Unique reflections	27,578
Completeness (%)	100 (100)
Multiplicity (%)	6.7 (7.0)
Mean I/σ(I) (%)	5.4 (3.4)
R <sub>merge</sub> (%)	34.0 (59.7)
CC <sub>1/2</sub>	94.2 (85.9)
<b>Refinement statistics</b>	
Resolution range (Å)	49.24-3.36
No. of reflections	184,316
R/R <sub>free</sub> (%)	20.7/27.8
<b>r.m.s. from ideal values</b>	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond angle (°)	1.490
<b>Ramachandran plot (%)</b>	
Favored	83.27
Allowed	11.98
Outlier	4.75

**図 1-2-7.** AfcA NM E1142A の結晶。A. 前任者、佐藤真与博士が作製した結晶。B. 本研究で作製した結晶。C. 2'-FL にソーキングした結晶の X 線回折像。

リガンドフリーの条件で作製したモデルを新しく獲得したデータセットに分子置換し、電子密度マップを観察したところ、2'-FL に当たるマップが GH95 活性中心の他に、N1 と N2 のループ部分で確認された (図 1-2-8. A)。2'-FL を構成する Gal の周囲では N1 と N2 それぞれで W63 と W283 がスタッキング、E66 と E286、D102 と D323、Q61 と Q281、K104 と K325 が水素結合を形成していた。Fuc の周囲では Y76 と Y296、R241 と R466、N1 の K74、R132、そして T195 の主鎖、N2 の D417 が水素結合していた (図 1-2-8. B、C)。

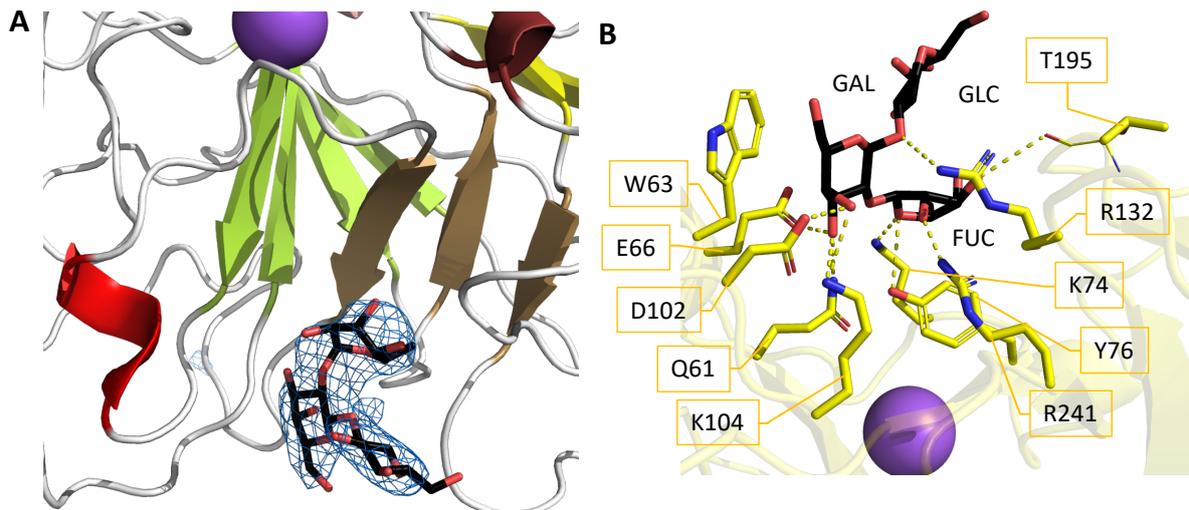
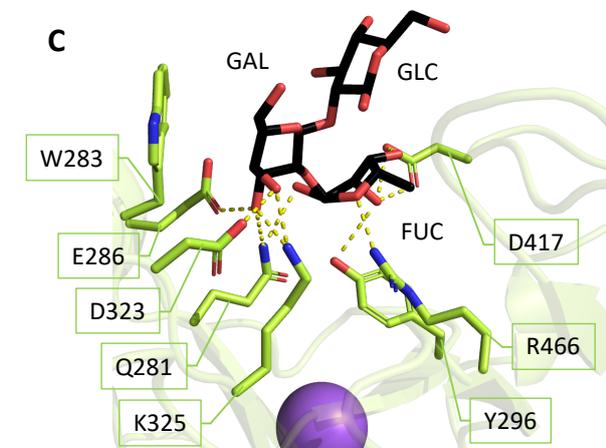


図 1-2-8. AfcA NM-E1142A と 2'-FL の複合体構造。  
 A. N1 内の 2'-FL にあたるポルターマップ (メッシュ、 $5\sigma$ )。ここではタンパク質鎖は図 1-2-6. C と同様に色付けし、糖は黒で示す。**B.-C.** N1 (B) と N2 (C) 内の 2'-FL の周囲残基。ここではタンパク質鎖は図 1-2-6. A と同様に色付けし、糖は黒、水素結合を破線で示す。



## 1.2.4. 考察

### 1.2.4.1. AfcA の N 領域の構造決定

本研究では AfcA NM-E1142A の結晶構造および 2'-FL 複合体構造の決定に成功した。構造内に含まれている N1、N2 ドメインはホモログ同士の CBM であり、構造も類似している。しかし、既報の糖質関連酵素、CBM の構造とは類似性を示しておらず、1.2.1.2 にもあったようにこれまで解析されて来たどの CBM とも配列同一性を示していないことから、N1 と N2 は新規の CBM ファミリーであると考えられる。

N1 と N2 が認識する Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal (H 抗原 2 糖) はムチン糖鎖の非還元末端で頻繁に見られるため、この CBM はタイプ C (exo 型) の CBM である可能性が高い。またその結合サイトは構造のループ部分内に存在した。

本研究で取得した 2'-FL との複合体のデータセットは分解能が 3.36Å と、決して良質なものではなかった。そのため、3 糖の位置や向きがおおよそ解っても、電子密度マップから例えばピラノース環のコンホメーションなどの詳細な情報は得られなかった。高分解能データセットの取得が今後の課題の一つとなるだろう。

N1 と N2 構造内で H 抗原 2 糖の認識に関わる残基を特定したが、これらの残基のリガンド結合における重要度は把握できていない。今後、各残基の変異体を作製し、ITC で解離定数  $K_d$  (また結合定数  $K_a$ ) を求めれば、より正確に分子機能の詳細を捉えられるだろう。

N1 と N2 の近縁ホモログ配列を探索し、系統樹を作製した (図 1-2-9)。その過程で、Blast でホモログとして選抜された 144 の配列の内、118 が N1、そして N2 と同じ結合サイトのアミノ酸残基を共有していた。系統樹の作製に用いられた配列は全て Actinobacteria 門、95 がヒト腸内由来、内 94 の配列が *B. bifidum* 由来であった。ヒト腸内由来以外のものは他の臓器 (血液、腔) または他の哺乳類 (猿類、海獣、ハムスター) の腸内に由来する細菌のものであった。これはビフィズス菌がムチン糖鎖や HMO の代謝の一環でこの CBM を独自に進化させたことを示している。

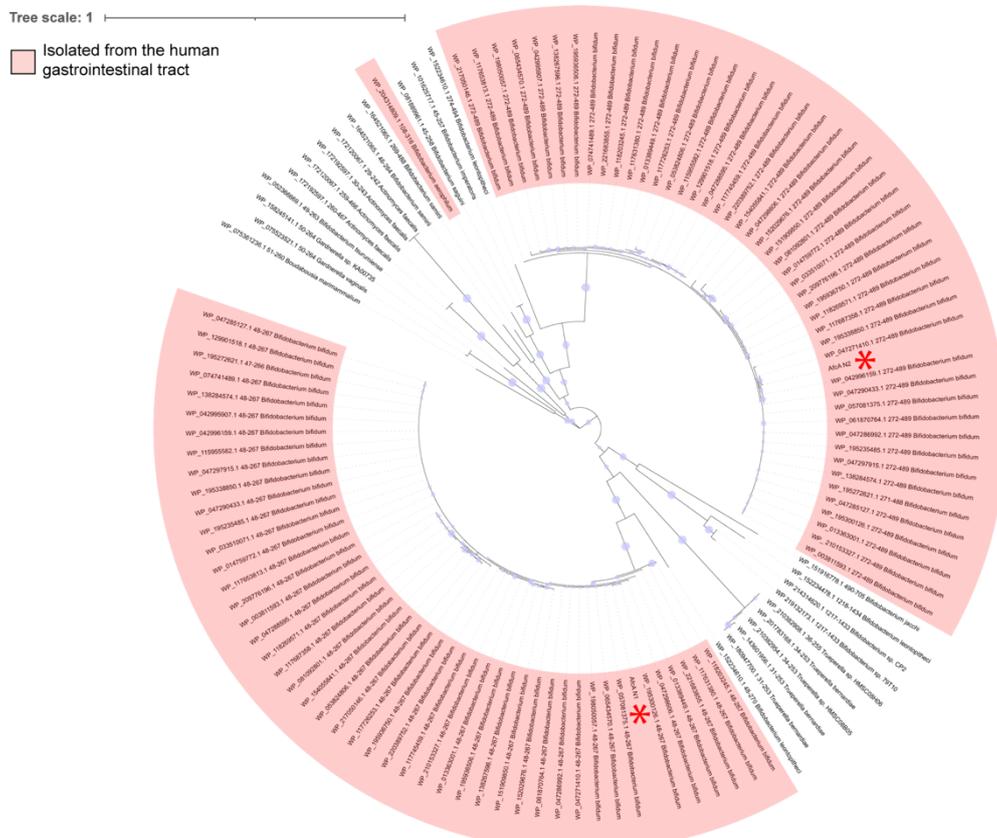


図 1-2-9. AfcA N1 と N2 の配列ホモログの系統樹。N1 と N2 を赤のアスタリスクで示す。青丸は Maximum-Likelihood 解析時の Bootstrap の頑健性 (Robustness、50~100%) を示す。

それとは別にホモログの中で 26 もの配列で結合サイトが保存されていないのは実に興味深い。今後、これらのタンパク質の機能解析を行えば新たな基質特異性を有した CBM を発見できるかもしれない。

#### 1.2.4.2. AfcA の C 領域について

AfcA には本研究で構造解析を行なった N 領域と M 領域の他に、未だ機能未知の C 領域が存在する。C 領域は免疫グロブリン様ドメインで構成されているとされている。AlphaFold2(45)で AfcA の C 領域の構造予測を行なったところ、5 つ  $\beta$ -sandwich が連なった構造モデルが得られた (図 1-2-10. A)。IDDT はモデル全体で 70%以上の高いスコアが得られたが、モデル作製に先駆けた MSA では各ドメインにつき 1000 以下の配列しか用いられていない (図 1-2-10. B)。特に C 末端側の  $\beta$ -sandwich については 100 を切っていた。さらに PAE のスコアは全体的に 30 に近い高い値が出ており、モデルの信憑性が疑われた (図 1-2-10. C)。このような低いスコアは限られた種や属でしか保存されていない配列で見られるため、C 領域がビフィズス菌または腸内細菌特有の配列である可能性が考えられる。いずれにしろ、AlphaFold2 の予測モデルから C 領域の機能を推測するのは難しい。今後、さらなる解析が必要である。

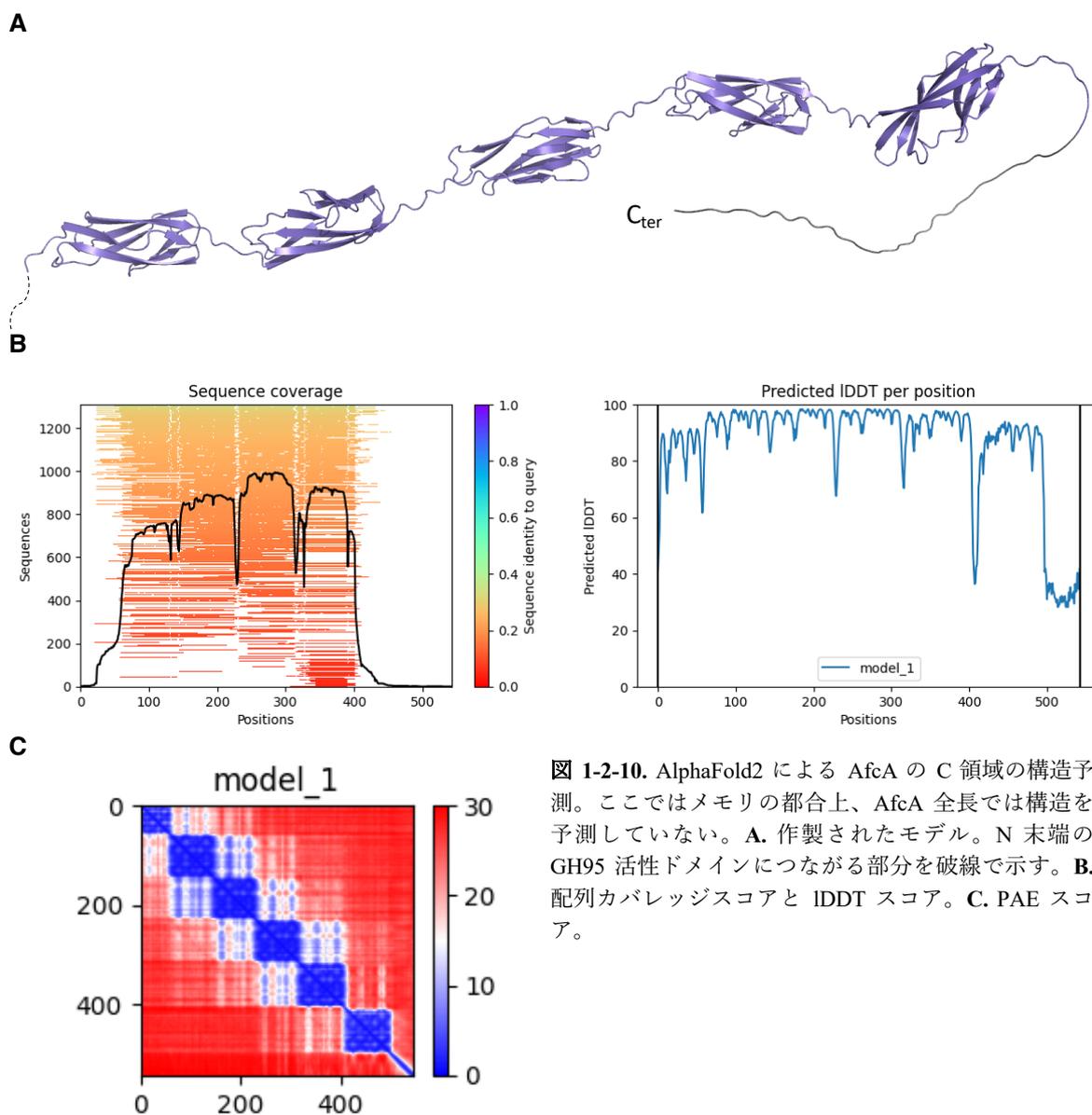


図 1-2-10. AlphaFold2 による AfcA の C 領域の構造予測。ここではメモリの都合上、AfcA 全長では構造を予測していない。A. 作製されたモデル。N 末端の GH95 活性ドメインにつながる部分を破線で示す。B. 配列カバレッジスコアと IDDT スコア。C. PAE スコア。

### 1.2.4.3. 既報の Fuc を認識する CBM について

私の知る限り、糖鎖の Fuc を認識する CBM に関する知見は限られており、既報のものでは CBM47 と CBM51 が主である。

CBM47 は  $\beta$ -sandwich 型であり、構造のループ部分がリガンドを認識するタイプ C の CBM である。*Streptococcus pneumoniae* 由来の GH98 に付属する CBM47 は H 抗原、A 型抗原、Lewis<sup>x</sup> 抗原などの Fuc 含有糖質を認識する。本酵素の遺伝子は *Streptococcus pneumoniae* の Fuc 利用に関わるオペロンに含まれている。これは肺の中でのムチン糖タンパク質の資化、すなわち肺炎レンサ球菌の増殖において重要な役割を担っている病原性因子として認識されている(102)。この知見を基に *Streptococcus mitis* の CBM47 を変異させたところ、新たに Lewis<sup>b</sup> 抗原を認識させることに成功した(103)。Lewis<sup>x</sup> および Lewis<sup>b</sup> 抗原は一部のがん細胞で過剰に発現されていることがあり、組織化学的ながん細胞の標識への応用が検討されている。他にもウナギなどの魚類由来のレクチンにも CBM47 が付属されている(104-106)。多くの魚類は病原性細菌のリポ多糖認識による自然免疫の一環でこのようなレクチンを保有しているが、ヒトの血液型抗原も認識できるため、血液型検査で凝集素として用いられる一面もある。

CBM51、特に CBM51a は GH2、GH27、GH31、GH95、GH98、GH101 に付加されている  $\beta$ -sandwich 型の、A/B 型抗原を認識するタイプ C の CBM である。特に *Clostridium* 属などの腸内細菌や肺炎レンサ球菌のものが盛んに研究されている(50, 107, 108)。

本研究で扱った GH95 AfcA の N 領域にある新規 CBM は上記のものとは一次構造的にも三次元構造的にも異なる、ユニークなフォールディングを有した CBM である。

最後に、図 1-2-11 に本研究における実験フローチャートを示す。

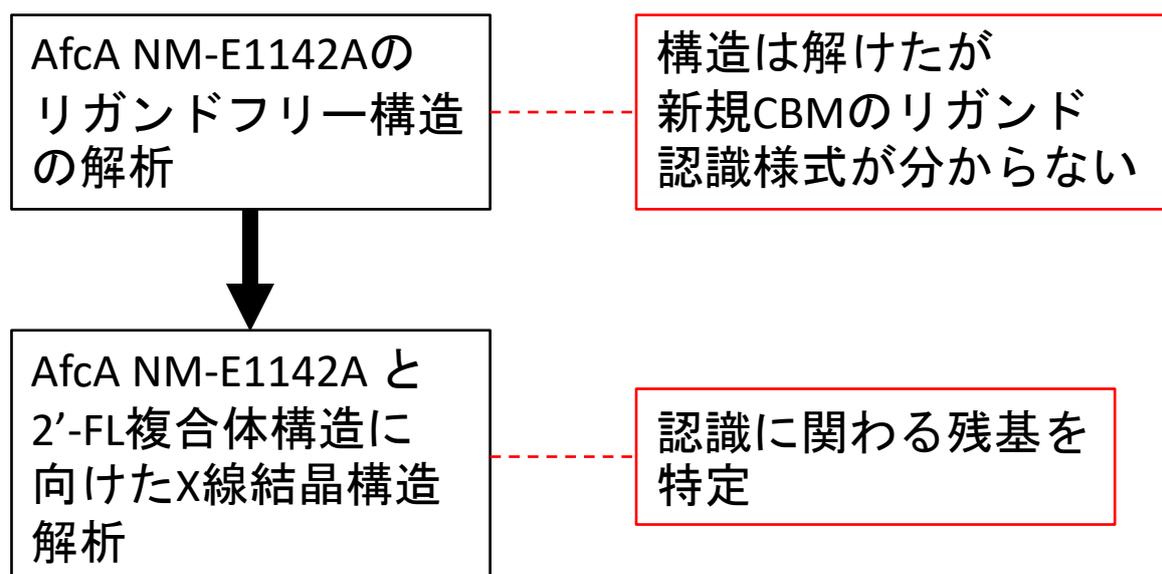


図 1-2-11. ムチン糖鎖や HMO の修飾糖分解酵素 GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA に付属する新規 CBM の構造解析における実験フローチャート。実験内容の黒枠、各実験で至った結論を赤枠で示す。

# 第3章—ムチン糖鎖特有の硫酸化糖質分解酵素 GH20 $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII の阻害に関する 酵素学的・構造生物学的解析

## 1.3.1. はじめに

本章ではムチン糖鎖特有の硫酸化糖質分解酵素 GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII の阻害に関する酵素学的、構造生物学的解析について述べる。序論としてムチン糖鎖の硫酸化と GH20 BbhII、BbhII の結晶構造、GH20 の阻害について概説した上で、研究の目的、方法、結果、考察について論ずる。

### 1.3.1.1. ムチン糖鎖の硫酸化と GH20 BbhII について

先述のようにムチン糖鎖は、タンパク質骨格の Ser/Thr のヒドロキシ基に GalNAc 残基が付加して合成される。糖鎖構造は非常に多彩であり、発現している組織によっても異なるが、ムチン糖鎖内では、 $\alpha$ -および  $\beta$ -結合した GalNAc、Gal、GlcNAc がコア構造を形成している。これらの糖鎖は一般に、type 1 (GNB) および type 2 (LNB) の二糖単位でさらに伸長され、フコシル化、シアリル化、硫酸化によって修飾されている (図 1-0-1)。硫酸化は通常、GlcNAc の 6 位やガラクトースの 3 位に起こる、ヒト由来のムチンの主要な修飾である。

2017年に京都大学大学院の加藤助教らによって *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株の GH20 BbhII が硫酸化 GlcNAc を特異的に加水分解する  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase であることが報告された(37)。BbhII は *B. bifidum* が持つ別の GH20 (BbhI) に比べ、*p*NP- $\beta$ -GlcNAc とラクト-N-トリオース (lacto-N-triose、LNT II) に対して弱い活性を示した(36)が、*p*NP- $\beta$ -GlcNAc3,4diS と *p*NP- $\beta$ -GlcNAc-6S に対しては高い活性を有している。さらに、*p*NP- $\beta$ -GlcNAc3S に対する活性が低かったことから、GlcNAc が 4 位または 6 位に硫酸化修飾されていることが基質認識において重要であることが示唆された。

BbhII は N 末端からシグナルペプチド、CBM32、GH20、約 150 残基の機能未解析領域、免疫グロブリン様ドメイン、そして膜結合ドメインからなる菌体外膜結合型 GH である (図 1-3-1)。

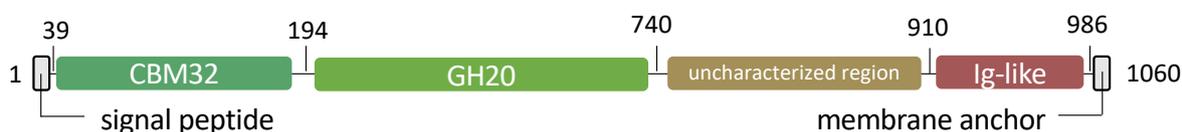
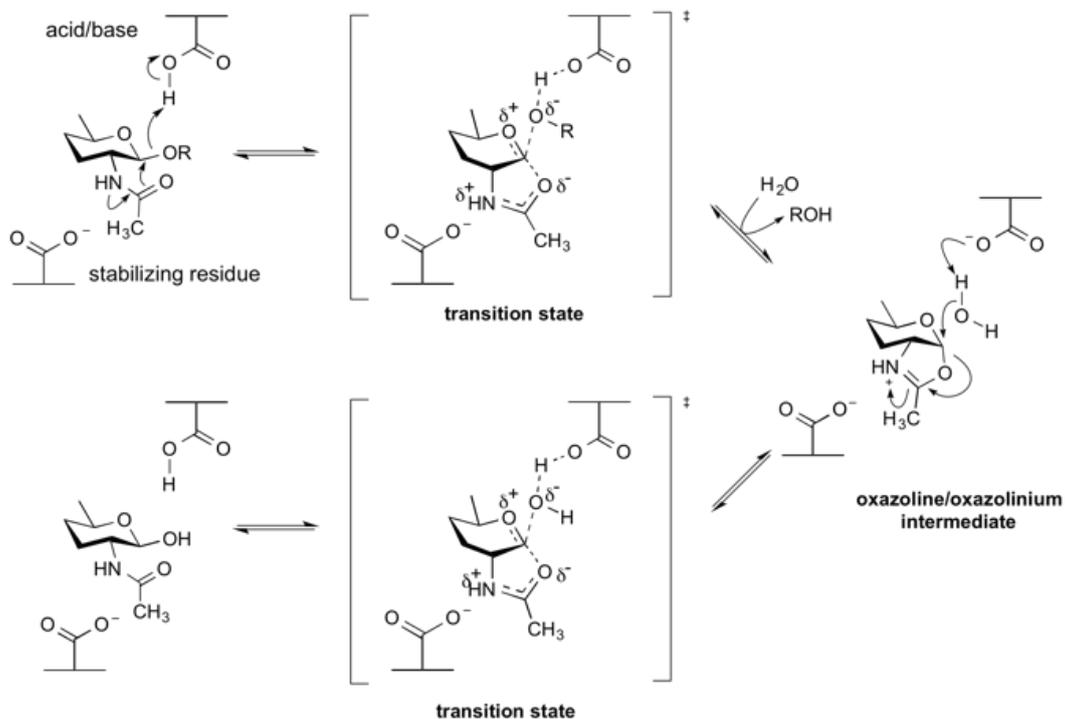


図 1-3-1. GH20 BbhII のドメイン構造。Miwa et al., *Glycobiology*, 2010 (36)より改変。

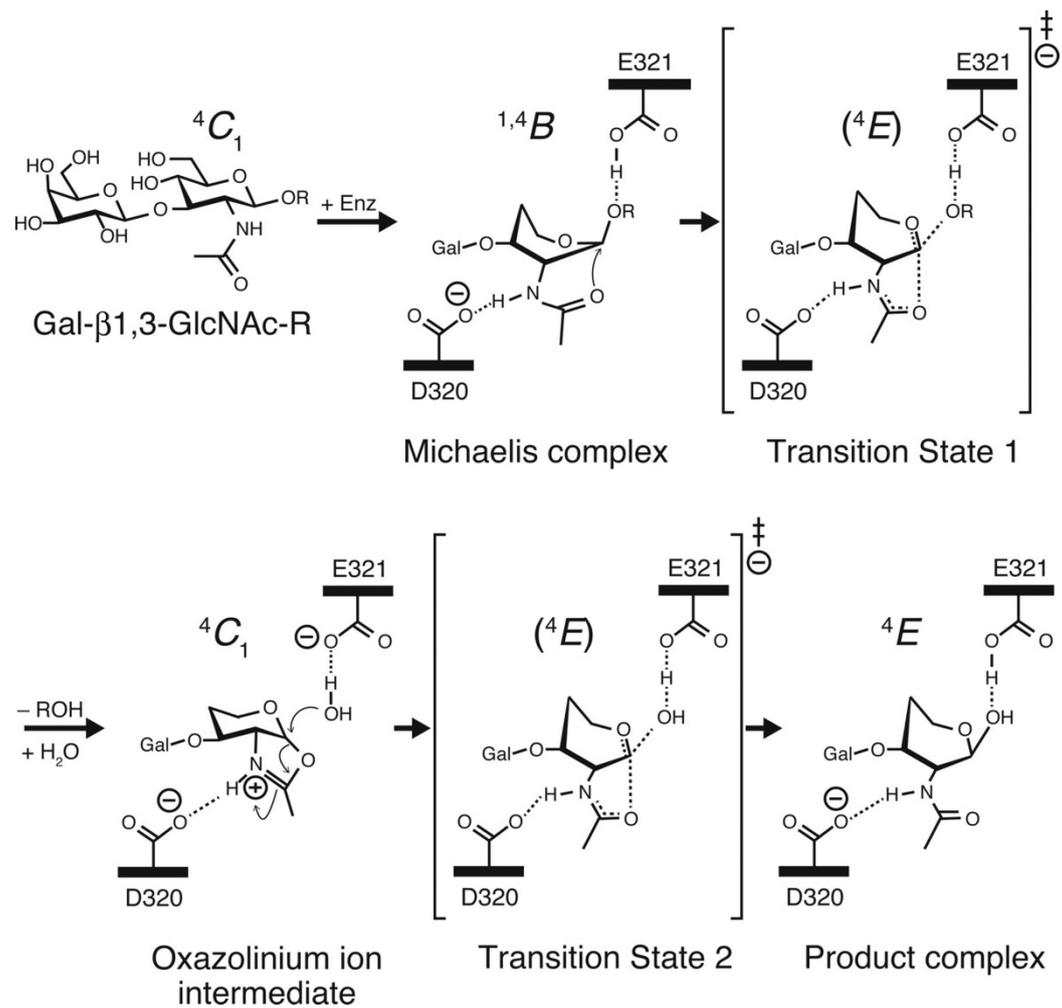
### GH20 の反応触媒メカニズム

GH20 は substrate-assisted (基質補助型反応機構) という、アノマー保持型の中でも例外的な反応機構を有する。基質補助型反応機構は GH18、20、25、56、84、85 に属する、2 位の N-アセチル基 (アセトアミド基) または N-グリコシル基を持つ基質を加水分解する酵素に共通する機構である。これらの酵素は求核性触媒残基を持たず、2-アセトアミド基が分子内求核基として作用するメカニズムを利用している (図 1-3-2. A)。2-アセトアミド基が隣接基に関与することで、オキサゾニリウムイオンの中間体が形成される。このメカニズムは、キチナーゼと天然の阻害剤との複合体の X 線結晶構造 (109)、オキサゾリンの安定なチアゾリン類自体による強力な阻害効果(110)、そして反応性を改変した基質を用いた詳細なメカニズム解析から推定されたものである(111)。

**A**



**B**



次ページに続く

C

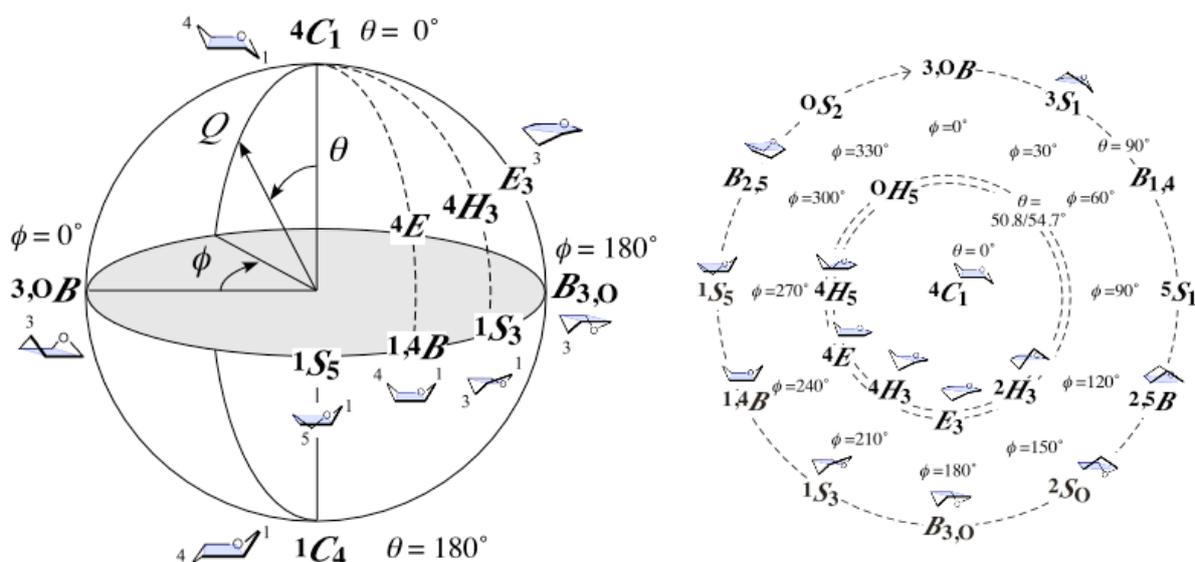


図 1-3-2. A. 基質補助型 GH の反応機構。CAZypedia ([https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_hydrolases](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases)) より。B. *B. bifidum* 由来 GH20 lacto-*N*-biosidase の予想反応経路と GlcNAc のコンホメーション変化。R は遊離する糖質を表している。Ito et al., *J Biol Chem*, 2012 (112)より。C. Cremer-Pople パラメーターにおけるピラノース環のコンホメーションの分類。Cremer-Pople parameter calculator (<http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/CP/>) より。

GH20 の触媒反応では糖のコンホメーションが各段階で変わるとされている。例えば *B. bifidum* 由来の GH20 lacto-*N*-biosidase(112)の場合、LNB に含まれる GlcNAc は以下のようにコンホメーションを変化させる (図 1-3-2. B)。

- ①水溶液中の基質はイス型 ( ${}^4C_1$ )
- ②*N*-アセチル基による求核攻撃時に形成される Michaelis complex ではボート型 ( ${}^{1,4}B$ )
- ③1 回目のオキソカルベニウムイオン様遷移状態では封筒型 ( ${}^4E$ )
- ④オキサゾリニウムイオン中間体ではイス型 ( ${}^4C_1$ )
- ⑤2 回目のオキソカルベニウムイオン様遷移状態では ( ${}^4E$ )
- ⑥反応生成物は封筒型 ( ${}^4E$ )

糖のコンホメーションは3次元ユークリッド空間における極座標である球座標、偏角  $\theta$ 、 $\phi$  と動径  $Q$  で定められた Cremer-Pople パラメーターで示す (図 1-3-2. C)。

GH20 酵素の主要な触媒残基は、保存された Asp-Glu アミノ酸ペアである。この触媒二重構造の上流には、一次配列ではコンセンサスとなっている H-X-G-G モチーフが存在する。Glu は一般酸塩基触媒残基として機能している。Asp は通常のアノマー保持型反応機構と異なり、求核性触媒残基ではないが、速度論的および結晶学的に *N*-アセチル残基を方向付け、分極することが明らかとなっている (113)。この残基は、中間体の *N*-アセチル基を脱プロトン化し、中性のオキサゾリン中間体を形成することで一般的な塩基として機能するか、あるいは正電荷のオキサゾリニウムイオン中間体を静電的に安定化させることができる。基質の *N*-アセチル基は、3つの保存された Trp によって形成された疎水性ポケットに結合している。この3つの Trp は、コンパクトなポケットを形成しており、拡張した *N*-アシル側鎖を容易に収容することはできない。

#### CBM32 について

CBM32 は非常に多様なリガンド特異性を持っている CBM であり、これはファミリー全体の顕著なアミノ酸配列の多様性に反映されている。これまで Gal(114)、Lac(115)、ラミナリン、1,6 グルカン (116)、 $\beta$  マンナン(117)、ポリガラクトuron酸(118)、GalNAc、LacNAc、II 型 H 抗原(119)、GlcNAc、

GlcNAc- $\beta$ 1,3-GalNAc、GlcNAc- $\beta$ 1,2-mannose(120)、GlcNAc- $\alpha$ 1,4-Gal(121)など様々な糖質との相互作用が報告されてきた。

### 1.3.1.2. BbhII の結晶構造

GH20 の結晶構造が初めて発表されたのは 1996 年であり、機能に関する知見がこれまで多く積み重ねられてきた(122)。

しかし、 $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase の生化学的解析にまつわる文献は極めて希薄であり、結晶構造は解かれていない。また、既報の構造のみでは硫酸基の認識様式を特定できなかった。私が在籍している研究室の山田千早助教と京都大学大学院の片山高嶺教授、加藤紀彦助教の共同研究により、BbhII の免疫グロブリン様ドメインを除去したコンストラクトと GlcNAc-6S の複合体構造が決定された(図 1-3-3. A、B)。

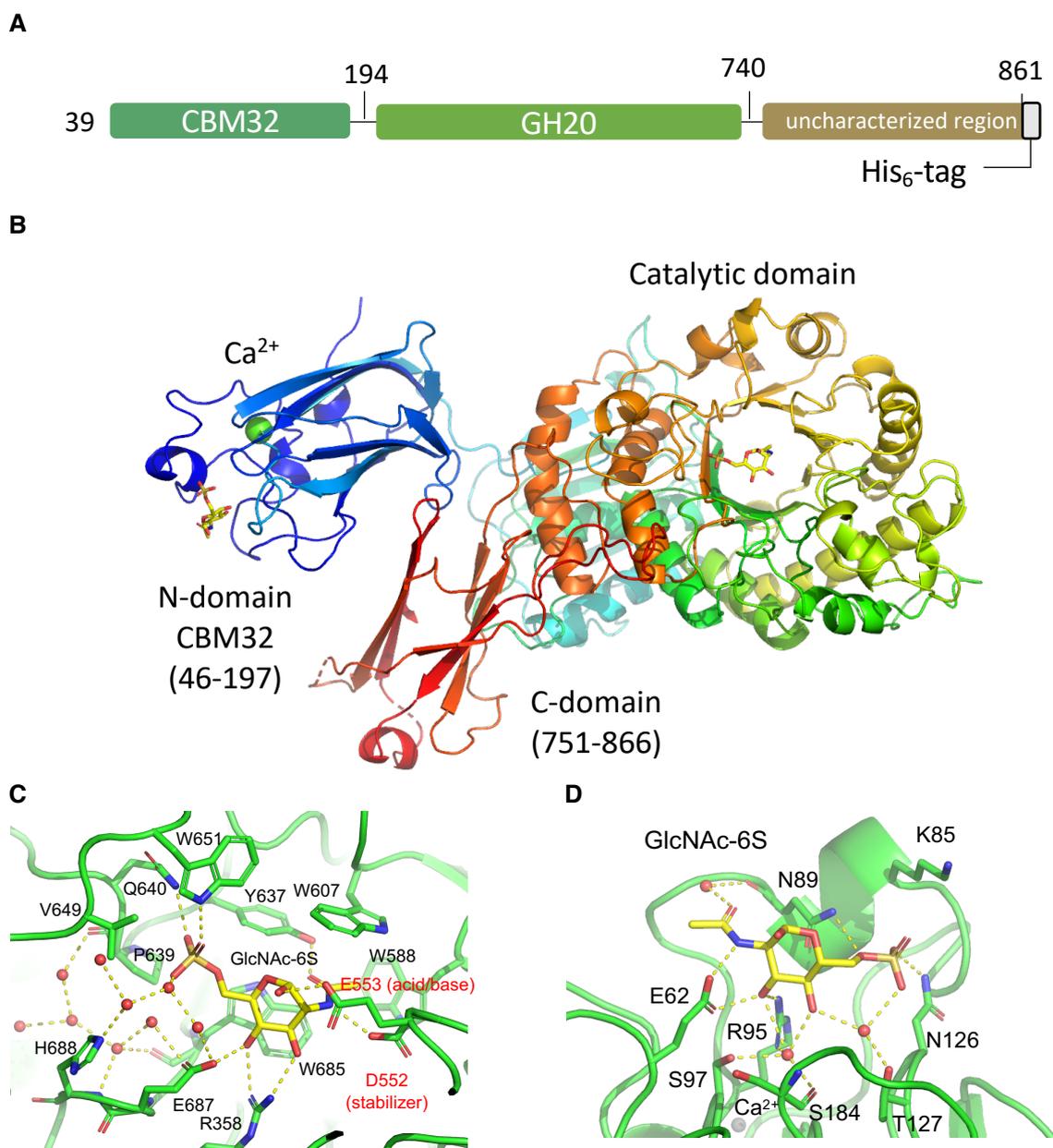


図 1-3-3. A. 結晶化に用いられた BbhII のコンストラクト。B. BbhII と GlcNAc-6S の複合体構造。タンパク質のモデルをレインポー (N 末端が青、C 末端が赤) で示す。C. 活性中心内の GlcNAc-6S と周囲残基。D. CBM32 内の GlcNAc-6S とその周囲残基。C と D ではタンパク質を緑、糖を黄色、水分子を赤、Ca<sup>2+</sup>イオンを灰色、水素結合を破線、触媒残基を赤字で示す。

GH20 活性ドメインは  $\beta$ -sandwich、活性ドメインは2本の  $\alpha$ -helix と7本の  $\beta$ -strand からなる逆平行  $\beta$ -sheet、そして  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel fold ドメインで構成された、GH20 では典型的な構造をしていた。C 末端には機能未解析ドメインがあり、これは結晶構造中では一部切断されていたが、それぞれ3本と4本の  $\beta$ -strand からなる2枚の逆平行  $\beta$ -sheet による  $\beta$ -sandwich 様の構造を有していた。Dali サーバーでの構造比較(100, 101)ではヒト由来の interleukin 4 受容体 ( $Z$  score = 7.0、RMSD = 2.7 Å、配列同一性 6%) が最も近い構造であるとされた。スコアが極めて低い ( $Z$  score < 8.0) ことから新しいフォールドの可能性が示唆された。活性中心では GlcNAc を認識する残基は既報の GH20 の構造と近い一方、硫酸基は Q640、W651 との水素結合、そして複雑な水素結合ネットワークからなる E687 と H688 との相互作用による独特な様式によって認識されていた (図 1-3-3. C)。CBM32 でもループ領域内で N89、N126、そして水分子を介した T127 との水素結合というこれまでにない形で硫酸基が認識されていた (図 1-3-3. D)。

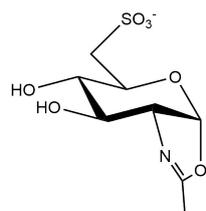
### 1.3.1.3. $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-*N*-acetylglucosaminidase の阻害剤

GH20 の基質補助型反応機構では従来のアノマー保持型と異なり、オキサゾリン中間体が形成される。これまでこの中間体構造や遷移状態での GlcNAc のピラノース環コンフォメーションを模した競合阻害剤がいくつか開発され、最も代表的なものとして NAG-thiazoline、PUGNAc、LOGNAc、NHAcDNJ、NHAcCAS、NHAc-Australine などが挙げられる(123)。BbhII が硫酸化された GlcNAc を含む基質にしか作用しないことから、競合阻害剤も硫酸化されていなければ活性ポケット内で安定しないのではないかと考えられた。

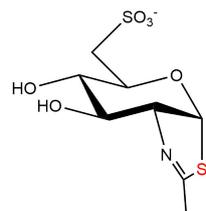
西オーストラリア大学の Keith Stubbs 准教授らにより新しく6位が硫酸化された *N*-acetylglucosamine-thiazoline (NAG-thiazoline-6S、NAGT-6S) と PUGNAc-6S が化学的に合成された。NAGT-6S ではオキサゾリン中間体構造の酸素が硫黄に置換されている (図 1-3-4. A)。PUGNAc-6S では GlcNAc-6S の1位のヒドロキシ基が amino *N*-phenyl carbamate に置換されており、アノマー炭素が窒素とイミン結合していることでピラノース環のコンフォメーションが制限され、触媒反応時の糖の遷移状態を模していると考えられている (図 1-3-4. B)。

### 1.3.1.4. 本研究の目的

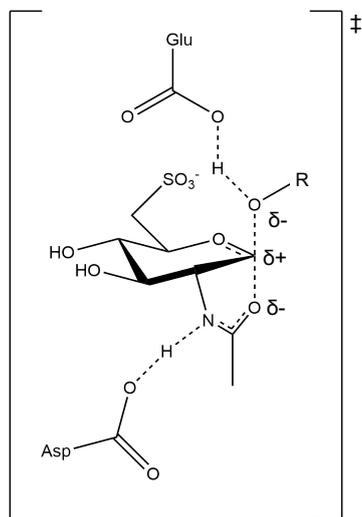
*N*-acetylhexosaminidase の阻害剤、特に PUGNAc は血糖値上昇効果などの薬理学的効果が知られている薬品である。よって NAGT-6S や PUGNAc-6S も同様に製薬の分野における有用性が期待できる。しかし、その阻害効果は本酵素では検証されていなかった。そこで本研究では、NAGT-6S や PUGNAc-6S の BbhII に対する阻害効果を酵素学的に解析した。加えて結晶構造解析を用いて酵素内での阻害剤のコンフォメーションの可視化を試みた。

**A**

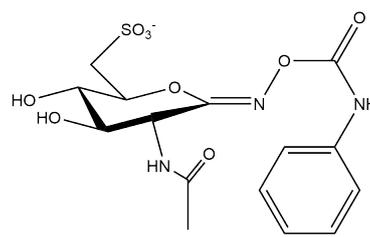
GlcNAc-6S oxazoline intermediate



NAGT-6S

**B**

hydrolysis transition state



PUGNAc-6S

図 1-3-4. A. GlcNAc-6S のオキサゾリン中間体 (左) と NAGT-6S (右) の構造比較。Thiazoline の窒素を赤字で示す。B. 加水分解触媒時の GlcNAc のオキソカルベニウム遷移状態 (左) と PUGNAc-6S (右) の構造比較。

### 1.3.2. 方法

本研究における試薬は特記のない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を用いた。また、液体試薬は予め滅菌したもの、あるいは滅菌された状態で入手したものを利用している。遠心には MX-307 (トミー) を用いた。

また特記のない限り、濃度は全て終濃度である。

#### 1.3.2.1. 阻害剤、基質と発現プラスミド

PUGNAc-6S および NAGT-6S は西オーストラリア大学の Keith Stubbs 准教授より供与頂いた。

BbhII の活性測定に用いられた *pNP-GlcNAc-6S* および大腸菌異種発現用プラスミド *pET23b BbhII-His<sub>6</sub>-tag* は京都大学大学院の片山高嶺教授と加藤紀彦助教より供与頂いた (図 1-3-5)。本コンストラクトでは N 末端のシグナルペプチド、C 末端の免疫グロブリン様ドメインと膜結合ドメインが除去されており、代わりに Ni-IMAC 精製用に His<sub>6</sub>-tag が付加されている。

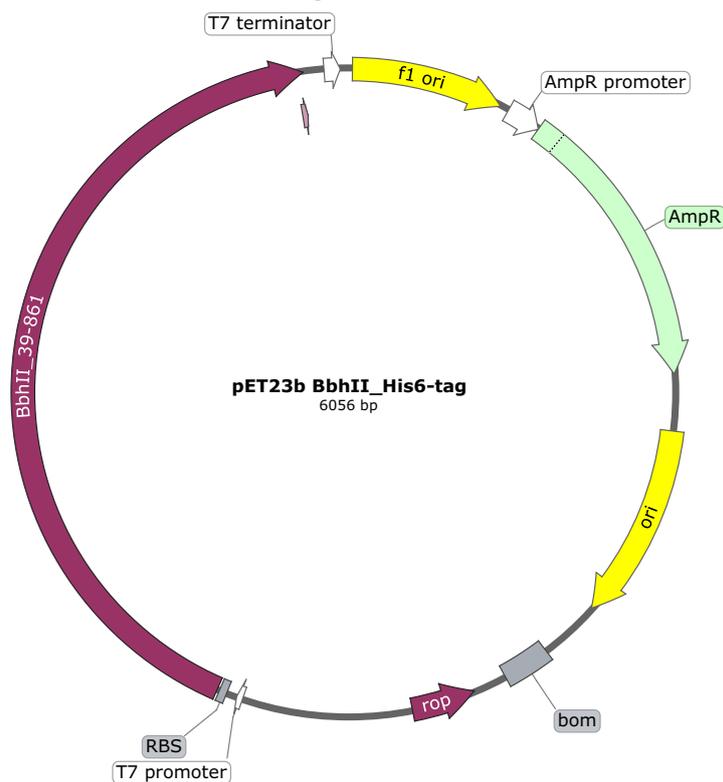


図 1-3-5. *pET23b BbhII\_His<sub>6</sub>-tag* のプラスミドマップ

#### 1.3.2.2. 形質転換

1.1.2.5 節と同様の方法で行なった。

#### 1.3.2.3. プラスミド抽出

1.1.2.6 節と同様の方法で行なった。

#### 1.3.2.4. 発現検討

1.1.2.7 節と同様の方法で行なった。大腸菌発現株には京都大学大学院の片山高嶺教授、加藤紀彦助教より供与頂いた BL21 CodonPlus(DE3) RIL  $\Delta lacZ$  を用いた。抗生物質は 100  $\mu\text{g/mL}$  ampicillin、17  $\mu\text{g/mL}$  chloramphenicol を用いた。破碎バッファーには 50 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 300 mM NaCl を用いた。

### 1.3.2.5. SDS-PAGE

1.1.2.8 節と同様の方法で行なった。本研究では染色液に CBB-G250 の代わりに CBB-R250 を用いた。

### 1.3.2.6. 培養のスケールアップ

1.1.2.10 節と同様の方法で行なった。

### 1.3.2.7. タンパク質の精製

1.1.2.11 節と同様の方法で、ただし Ni-IMAC、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で精製を行なった。破碎バッファーには 50 mM HEPES-NaOH pH 7.0、300 mM NaCl、ゲルろ過バッファーには 20 mM HEPES-NaOH pH 7.0、300 mM NaCl、精製後のバッファー置換には 10 mM HEPES-NaOH pH 7.0 を用いた。

### 1.3.2.8. BbhII の阻害活性測定

PUGNAc-6S および NAGT-6S による BbhII 活性の阻害は、*p*NP-GlcNAc-6S からの *p*NP 遊離を連続的にモニタリングし、検証した。2 µg/mL の BbhII、100 mM クエン酸ナトリウム (pH5.5)、0.2-1.0 mM *p*NP-GlcNAc-6S、0-100nM PUGNAc-6S または 0-250nM NAG-thiazoline-6S を混合し、37°C で反応させた。5 分ごとに反応液 5 µL を分注し、0.1 M 水酸化ナトリウムを 20 µL 加えて触媒反応を停止、*p*NP を発色させた。反応停止後の溶液の 405nm の吸光度を、Synergy H1 プレートリーダー (バイオテック・ジャパン) で測定し、遊離 *p*NP の濃度を求めた。反応時間と遊離 *p*NP 濃度から初速度を求め、SigmaPlot 12.0 の酵素キネティクスツールを用いて、*S-v* プロットを Michaelis-Menten 式に当てはめた。また逆数 *S-v* プロットも作製した。

なお、阻害活性測定に用いた酵素、基質濃度は予め、PUGNAc-6S または NAGT-6S 非存在下で濃度を振り、反応時間 40 分にかけて *p*NP の直線的な遊離が観測できる条件を検討し、決定した。

### 1.3.2.9. Pre-Crystallization Test

1.1.2.15 節と同様の方法で行なった。

### 1.3.2.10. 結晶化スクリーニング

1.1.2.16 節と同様の方法で行なった。本研究では阻害剤との複合体構造を目的としていたため、スクリーニング前にタンパク質溶液に 1 mM PUGNAc-6S あるいは 1 mM NAGT-6S を加えた。NAGT-6S に至っては濃度を 2.5、5、10 mM に振って、JCSG Core I でスクリーニングを行なった。

### 1.3.2.11. 結晶化条件の最適化

1.1.2.17 節と同様の方法で行なった。ただし、本研究ではタンパク質濃度、沈殿剤濃度、バッファーの pH のみを検討した。シーディングおよび MMS は行なっていない。

### 1.3.2.12. X 線回折強度データ収集

1.1.2.19 節と同様の方法で行なった。

### 1.3.2.13. 結晶構造解析

1.1.2.20 節と同様の方法で行なった。本研究では BbhII の全体構造が先行研究で既に決定されていたため、Aimsless で処理した後、分子置換 (Phaser)、手動モデル修正 (Coot)、構造精密化 (phenix.refine) の手順で構造解析を行なった。

### 1.3.3. 結果

#### 1.3.3.1. PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果

少量での発現検討の末、誘導前の温度を 25°C、誘導後の温度を 18°C、IPTG 未添加で 44 時間培養した条件で最も多く目的タンパク質を発現していた。そのため、この条件で大量培養、そしてタンパク質精製を行なった。ゲルろ過精製後の SDS-PAGE では分子量 89.7 kDa の位置に高純度で目的タンパク質のバンドが確認された (図 1-3-6)。最終的に培養液 1 L あたり 30 mg 程度の BbhII 精製タンパク質が得られた。

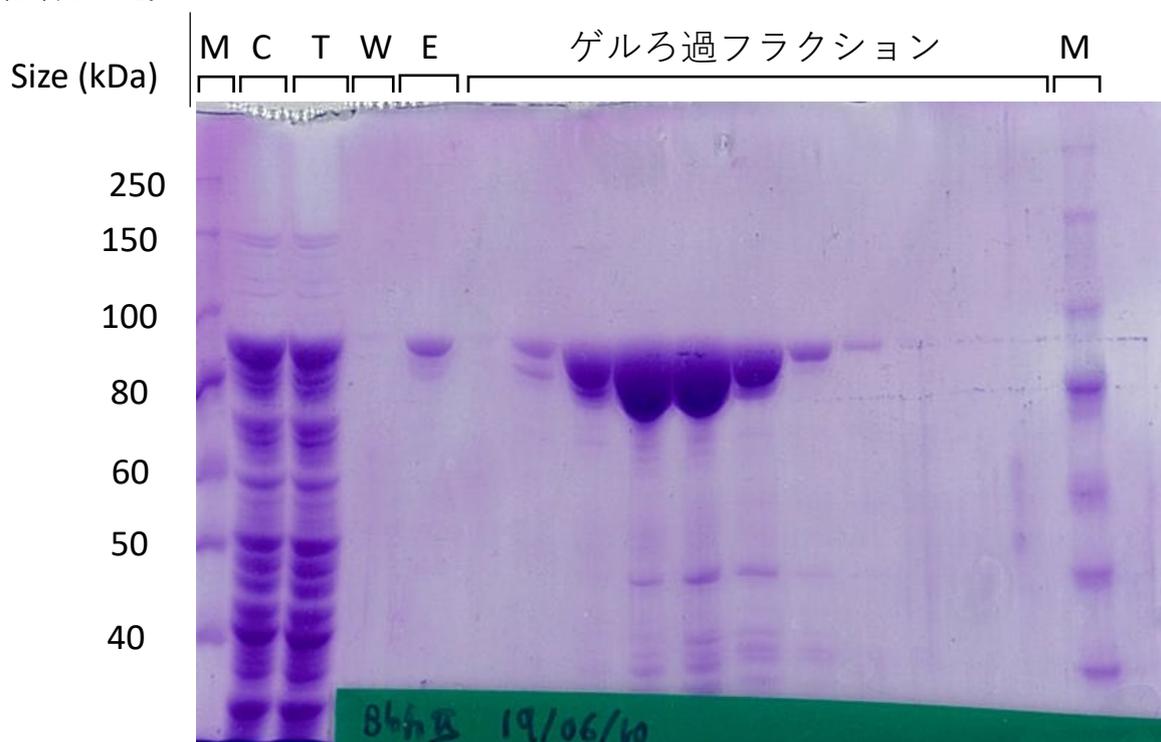


図 1-3-6. BbhII の Ni-IMAC 及びゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE。M：分子量マーカー；C：粗酵素液；T：Ni-IMAC 素通り画分；W：Ni-IMAC 洗浄液；E：Ni-IMAC 溶出液

BbhII 酵素濃度 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、基質基質である *p*NP-GlcNAc-6S の濃度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mM) を検討、固定した上で反応液に PUGNAc-6S または NAGT-6S を加え、阻害活性測定を行なった。PUGNAc-6S では 0-100 nM の領域で、NAGT-6S では 0-250 nM で阻害剤の濃度に応じた有意な反応初速度の減少が確認された。初速度を基に *S-v* プロットを作製し、Michaelis-Menten 式にフィッティングさせることで阻害定数  $K_i$  を算出した。また逆数 *S-v* プロットを引いたところ、各阻害剤濃度の直線が基質濃度 0 mM のところで交わっていた。これは阻害剤を添加すると  $V_{max}$  は変動しないが見かけの  $K_m$  値が増大することを示しており、このことから PUGNAc-6S と NAGT-6S は競合阻害によって BbhII の活性を阻害していることが明らかになった (図 1-3-7)。阻害定数及び動力学的パラメーターは表 1-3-1 の通りである。

表 1-3-1. 阻害剤非存在下、PUGNAc-6S または NAGT-6S 存在下での BbhII の *p*NP-GlcNAc-6S 加水分解活性の動力学的パラメーター

阻害剤	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_i$ (nM)	阻害 メカニズム
PUGNAc-6S	$0.115 \pm 0.014$	$32.3 \pm 0.7$	$15.4 \pm 1.9$	競合阻害
NAGT-6S	$0.122 \pm 0.016$	$32.6 \pm 0.8$	$52.3 \pm 7.2$	競合阻害

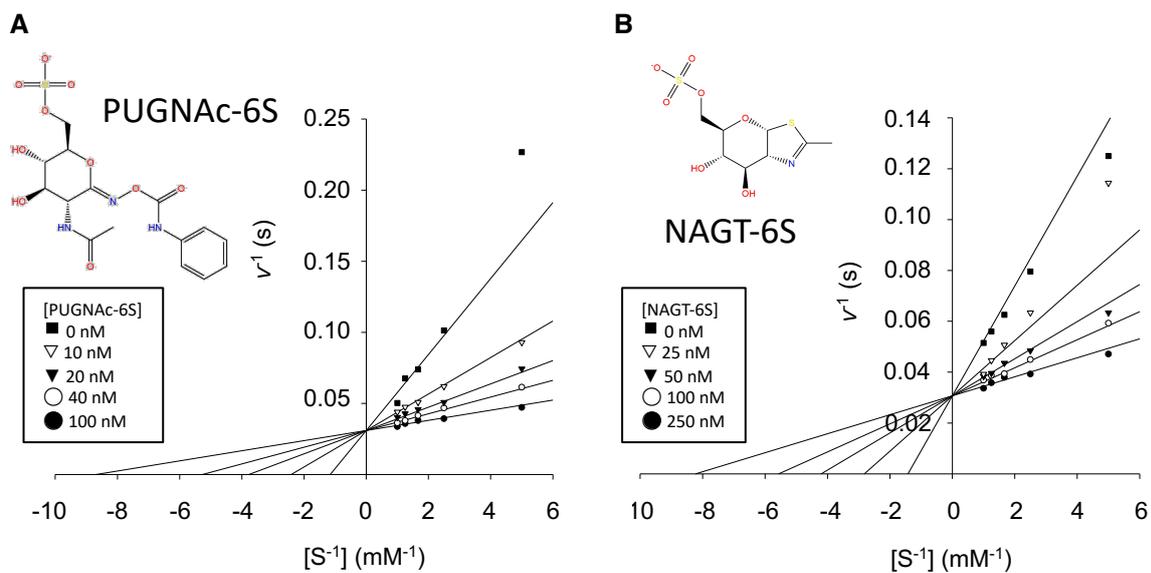


図 1-3-7. PUGNAc-6S (A) と NAGT-6S (B) 存在下での BbhII の活性測定。ここでは逆数  $S$ - $v$  プロットを示す。各プロットの左上に阻害剤の構造式を示す。

### 1.3.3.2. BbhII と PUGNAc-6S の複合体構造の獲得

阻害剤が提唱されている様式で酵素活性を阻害しているか確かめるべく、BbhII と阻害剤の複合体構造獲得を試みた。タンパク質濃度を 10 mg/mL に固定し、PUGNAc-6S または NAGT-6S を添加して結晶化スクリーニングを行なった。

NAGT-6S 存在下では結晶が得られなかったが、1 mM PUGNAc-6S 存在下では 0.1 M sodium citrate pH 5.5、20% (w/v) PEG3000 で、インキュベーション期間 3 日で板状の結晶が得られた (図 1-3-8. A)。この条件を基に条件の最適化を試みたが、本来の条件で得た結晶が最も良質であった。抗凍結剤の検討では、トレハロース以外の条件では結晶が 5 分以内で溶解した。またトレハロースでは 1.1.2.19 で示したように 20% の濃度まで上げて凍結すると、クライオーループに霜が付き、結晶が壊れてしまった。そこで、本サンプルについてはトレハロースの濃度を 25% まで上げてから凍結することで 2.23 Å の分解能で X 線回折データセットの獲得に成功した (図 1-1-8. B、表 1-3-2)。

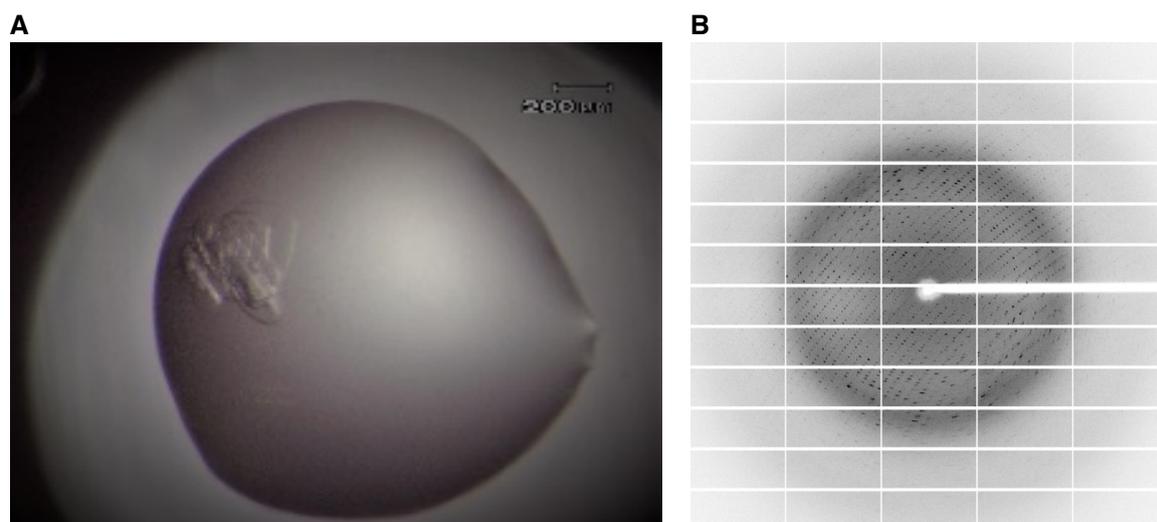


図 1-3-8. 1 mM PUGNAc-6S 存在下で得られた BbhII の結晶 (A) と X 線回折像 (B)。

表 1-3-2. BbhII、PUGNAc-6S 複合体構造のデータセットおよび精密化の統計値。括弧内は最外殻の値を示す。

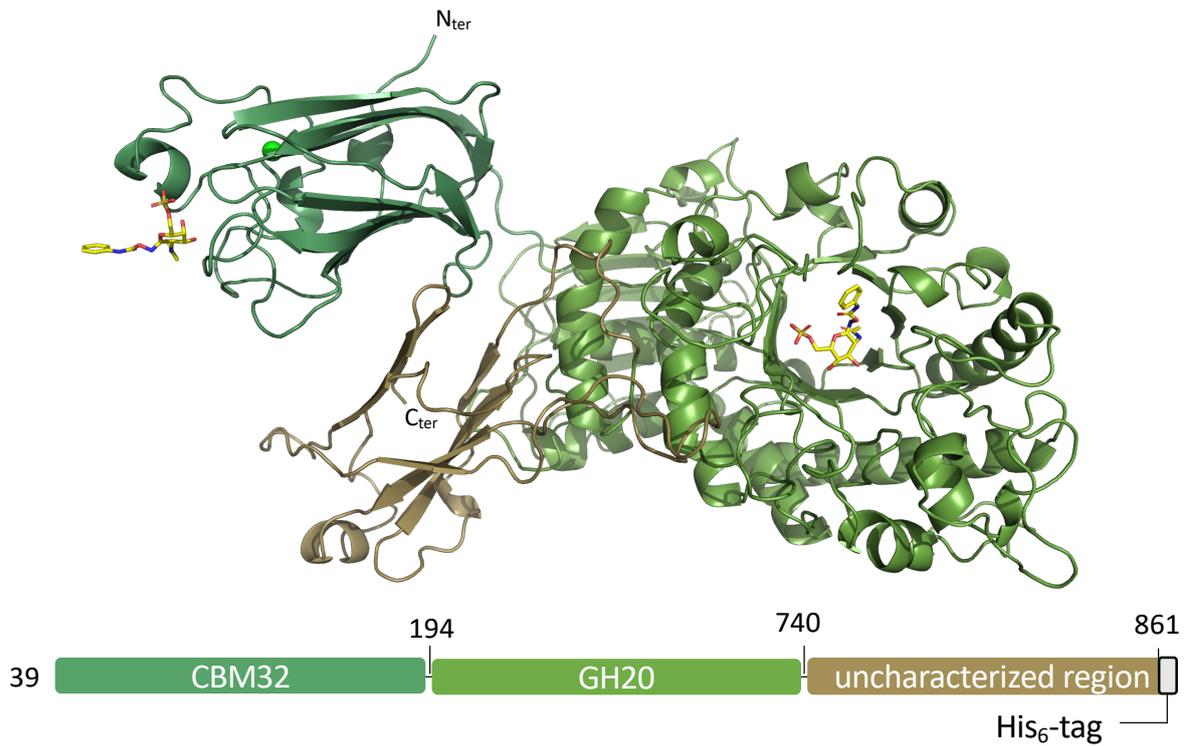
PUGNAc-6S complex	
<b>Data collection statistics</b>	
X-ray facility	KEK-PF BL5A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	$P2_1$
<u>Unit-cell parameters</u>	
a, b, c (Å)	77.40, 58.95, 84.35
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 91.70, 90.00
Resolution (Å)	48.31-2.23 (2.30-2.23)
Total reflections	125,797
Unique reflections	37,545
Completeness (%)	99.9 (99.8)
Multiplicity (%)	3.4 (3.3)
Mean I/ $\sigma$ (I) (%)	6.6 (2.1)
$R_{\text{merge}}$ (%)	12.3 (54.2)
$CC_{1/2}$	0.991 (0.796)
<b>Refinement statistics</b>	
Resolution range (Å)	48.31–2.23
No. of reflections	37,329
$R/R_{\text{free}}$ (%)	0.180/0.214
<u>r.m.s. from ideal values</u>	
Bond length (Å)	0.008
Bond angle (°)	1.505
<u>Ramachandran plot (%)</u>	
Favored	97.41
Allowed	2.21
Outlier	0.37

先行研究で解かれた BbhII の構造を分子置換のモデルに用いて位相を決定した (図 1-3-9. A)。先行研究の構造と新しく解いたものを比較したところ、全長配列の内、743 の  $C\alpha$  原子 (全体の 85.70%) のアラインメントがなされ、RMSD は 0.224 Å と極めて低かった。このことから結晶化条件の違いやリガンドの違いによる構造変化はないと考えられた。

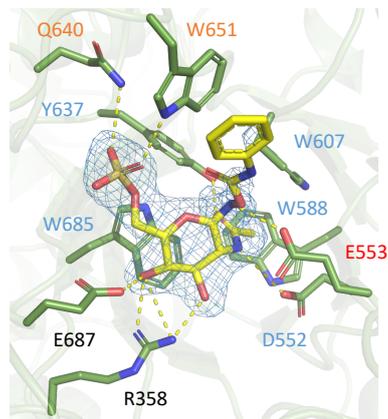
電子密度マップを観察したところ、リガンドと思しきマップを活性中心、そして CBM32 ドメイン内で確認した。活性中心では D552、W588、W607、W685、Y637 が *N*-アセチル基と、Q640 と W651 が硫酸基と、R358、E687 が Glc の 3 位と 4 位のヒドロキシ基と相互作用することで、先行研究で解かれた BbhII と GlcNAc-6S 複合体と同様の形でリガンドが活性中心と結合するようになっていた (図 1-3-9. B)。それに加え GlcNAc-6S にはない、PUGNAc-6S のアノマー炭素とイミン結合している窒素と酸塩基性触媒残基 E553 が 2.9 Å と、水素結合できる距離にあった。Dali サーバーによる構造比較(100, 101)では *Streptomyces coelicolor* 由来の GH20  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase が最も高い構造類似性 (PDB ID : 4C7G ; Z-score : 45.7, RMSD : 2.0 Å、アラインメントされた 465 残基中で配列同一性 29%) を示した (図 1-3-9. C)。活性中心では糖の GlcNAc に当たる部位を認識する残基 (R358、Y367、D552、W588、W607、W651、W685、E687) は保存されていたが、硫酸基の認識に関わる Q640 は BbhII にしか存在しなかった。

CBM32 では E62 が PUGNAc の *N*-アセチル基と、N89 と N126 が硫酸基と、N89、R95 が Glc の 3 位と 4 位のヒドロキシ基と水素結合していた。さらに W183 によるスタッキング、K85 の炭素鎖が加わることによって結合ポケットが形成されており、BbhII と GlcNAc-6S 複合体と同様の形でリガンドが結合していた (図 1-3-9. D)。

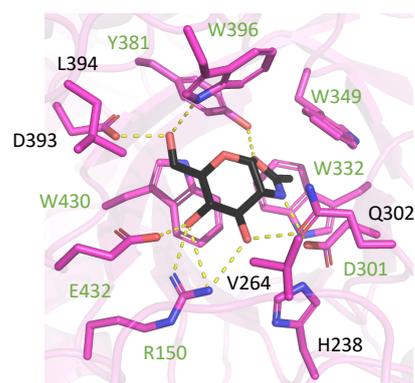
A



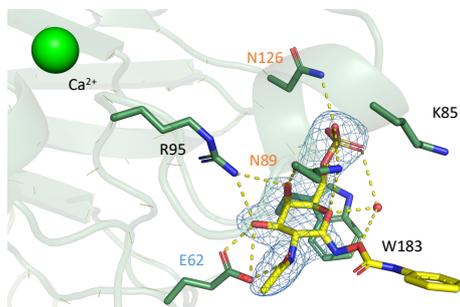
B



C



D



E

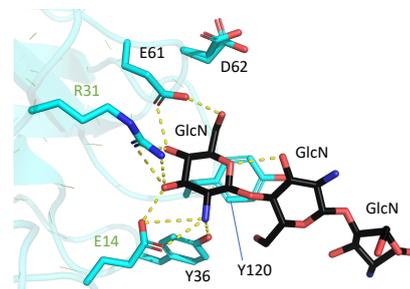


図1-3-9. A. BbhII、PUGNAc-6S複合体の全体構造。ここではタンパク質をドメイン毎に色分けし、PUGNAc-6Sを黄色で示す。B. GH20 ドメイン活性中心の拡大図。C. GH20 ドメインと類似構造の *Streptomyces coelicolor* 由来 GH20 E302Q 変異体の oxazoline 複合体 (PDB ID : 4C7G) の活性中心。D. CBM32 の糖結合サイトの拡大図。E. CBM32 ドメインと類似構造の *Paenibacillus fukuinensis* 由来 CBM32 のキトサン複合体 (PDB ID : 4DD8) の結合サイト。B、D では PUGNAc-6S を黄色、Ca<sup>2+</sup> イオンを緑の球、水素結合を破線、硫酸基を認識する残基をオレンジの文字、Glc を認識する残基を青字、酸塩基性触媒残基を赤字で示す。C、E では糖を黒、水素結合を破線、BbhII で保存されている残基を緑字で示す。

Dali サーバーによる構造比較では *Paenibacillus fukuinensis* 由来のキトサン結合型 CBM32 が最も高い構造類似性 (PDB ID : 4ZZ8 ; Z-score : 19.9, RMSD : 1.5 Å、アライメントされた 128 残基中で配列同一性 31%) を示した (図 1-3-9. E)。しかし、Z-score が 8 を超えているにもかかわらず、結合部位では R95 と E62 以外は保存されておらず、特に硫酸基付近の残基が異なることがリガンドの認識の違いに影響すると考えられた。またリガンド結合部位付近には金属イオンの電子密度マップが観察された。配位、B-factor を考慮した CheckMyMetal(99)による解析と、GlcNAc-6S 複合体から  $\text{Ca}^{2+}$  イオンであると判断した。

なお、PUGNAc-6S の *N*-phenyl 基に当たる電子密度マップは、活性中心と CBM32 のいずれでも観察できなかった。これはタンパク質構造内に *N*-phenyl 基を安定化させる因子が含まれていないからだと考えられる。

Cremer Pople ツール (<http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/CP/>) を用いてピラノース環のコンホメーションを検証したところ、活性中心では  $B_{3,0}(\varphi, \theta, \varrho: 180.037^\circ, 86.083^\circ, 0.471)$  のボート型、CBM32 では  ${}^4C_1(\varphi, \theta, \varrho: 214.11^\circ, 5.892^\circ, 0.512)$  のイス型のコンホメーションを取っていた (図 1-3-10)。

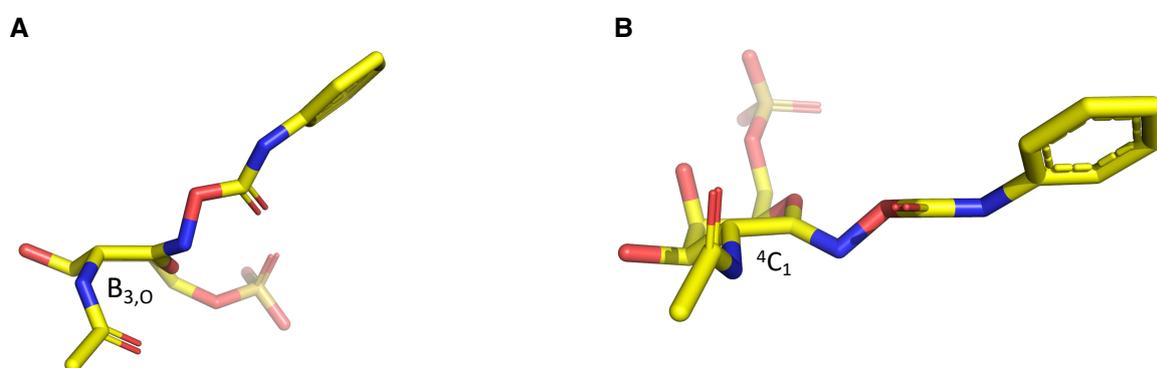


図 1-3-10. GH20 ドメインの活性中心内 (A) と CBM32 の糖結合サイト内 (B) の PUGNAc-6S の糖のコンホメーション。アノマー炭素が手前右に来るように表している。

### 1.3.4. 考察

#### 1.3.4.1. PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果

本研究では GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase に対し PUGNAc-6S 及び NAGT-6S の阻害効果を検証し、いずれも数十 nM 単位の強い競合阻害を示した。

その一方で、京都大学大学院の片山高嶺教授、加藤紀彦助教の研究により PUGNAc-6S はビフィズス菌資化試験用培地 (BM 培地) 中で分解されることが明らかとなった (図 1-3-11. A)。PUGNAc は実際に医薬品としても使われている、極めて安定な試薬だが、その誘導物質である例えば Gal- $\beta$ 1,3-PUGNAc-6S (*B. bifidum* 由来 GH20 lacto-N-biosidase の阻害剤(112, 123)) はリン酸存在下で分解することが知られており、PUGNAc-6S についても同様であると考えられる。

NAGT-6S については培地中でも安定であり (図 1-3-11. B)、NAGT-6S 存在下での *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 によるブタ胃ムチンの資化試験が MALDI-TOF/MS を用いて行われた。その結果、非硫酸化糖については小さな変化しか見られなかったが、NAGT-6S の濃度に応じて硫酸化糖の分解が阻害され、培地中の糖の組成が変わった (図 1-3-11. C)。これにより、*in vivo* でも NAGT-6S の BbhII 阻害剤としての効力が証明された (京都大学 片山高嶺教授、加藤紀彦助教、未発表資料より)。

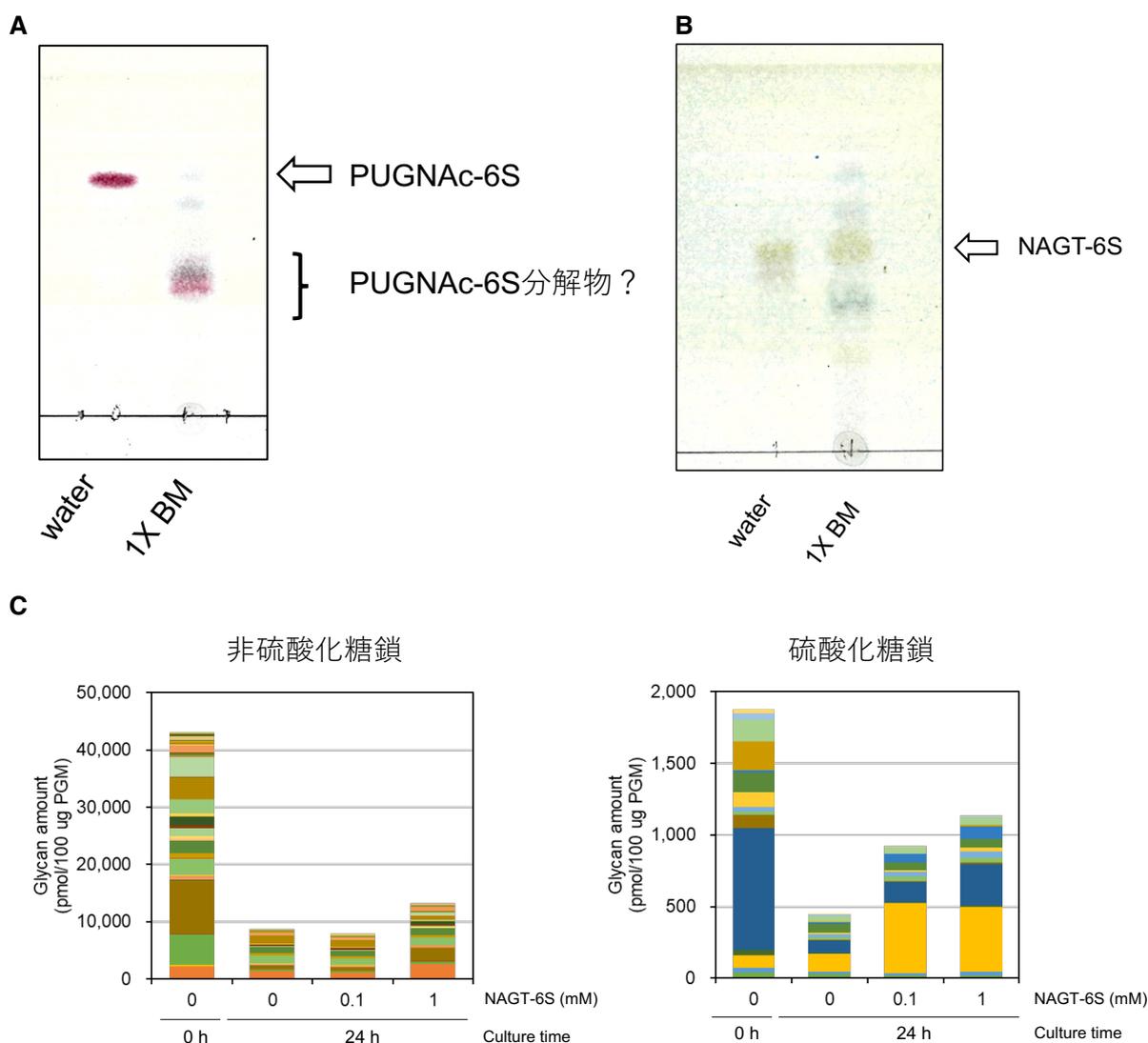


図 1-3-11. A-B. PUGNAc-6S (A) と NAGT-6S (B) の水中、そして BM 培地中での安定性を示した TLC。C. MALDI-TOF/MS で測定した NAGT-6S 存在下で *B. bifidum* を、PGM を糖質源とした時の糖鎖全体量の比較。NAGT-6S の濃度を 0 から 1 mM まで振り、24 時間培養した後、非硫酸化糖 (左) と硫酸化糖 (右) に分けて測定した際の結果を示す (京都大学 片山高嶺教授、加藤紀彦助教、未発表資料より)。

### 1.3.4.2. PUGNAc-6S と NAGT-6S による GlcNAc-6S 加水分解反応中間構造ミクラーについて

PUGNAc-6S と NAGT-6S はそれぞれ GlcNAc-6S 加水分解触媒反応時に形成されるオキソカルベニウム遷移状態の構造とオキサゾリンの構造を模することで BbhII の反応を阻害するとされてきた。

本研究では BbhII とその阻害剤の複合体構造を取得することで、阻害剤が本来の構造を活性中心中で取っているのか検証を試みた。現時点で BbhII と NAGT-6S の複合体構造の取得には成功していないが、PUGNAc-6S では CBM32 ドメイン中で <sup>4</sup>C<sub>1</sub>、活性中心中で B<sub>3,0</sub> というコンホメーションを取ることを突き止めた。

一方で、かつて Ito et al., *J Biol Chem*, 2012 (112)にて *B. bifidum* 由来の GH20 lacto-*N*-biosidase (LnBb) の LNB 加水分解触媒反応機構の糖のコンホメーション変化について詳細に言及された (図 1-3-2. C)。BbhII は LnBb と同じ GH20 に属するため、同様の反応機構を追うと考えられるが、本機構で糖がポート型のコンホメーションを取るの Michaelis complex の段階のみであり、<sup>1,4</sup>B という PUGNAc-6S で見られたコンホメーションとは別のものを組んでいる。これは PUGNAc-6S が本来想像していたコンホメーションを取らない特性を持っているからなのか、BbhII が厳密に LnBb と同様の反応機構を有していないからか、結晶化の際のパッキングによる影響なのか、いくつか仮説が立てられる。今後、分子動力学シミュレーションなどのデータと組み合わせることでコンホメーション変化について追求していく必要がある。

### 1.3.4.3. BbhII 阻害剤の他の GH20 β-6-SO<sub>3</sub>-*N*-acetylglucosaminidase 阻害の可能性について

PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果の検証は本研究が初となる。GH20 β-6-SO<sub>3</sub>-*N*-acetylglucosaminidase は BbhII 以外にも他の微生物でも発見されているが、酵素学的に詳細に研究されているのは BbhII のみである(37)。その一方で、BbhII は既報の GH20 β-6-SO<sub>3</sub>-*N*-acetylglucosaminidase、例えば *Prevotella* sp. RS2 とは低い配列同一性 (28%) を示しており、系統学的にも *B. bifidum* 特有の酵素であることが解っている (図 1-3-12)。よって本研究で扱った阻害剤が他の GH20 β-6-SO<sub>3</sub>-*N*-acetylglucosaminidase に同様に作用するのか、その認識様式が同じなのかは現時点では不明であり、今後これを追求していけば、阻害剤 (特に NAGT-6S) を用いたビフィズス菌、腸内細菌、そして他の生態系による糖質資化能力のコントロールが実現できるかもしれない。

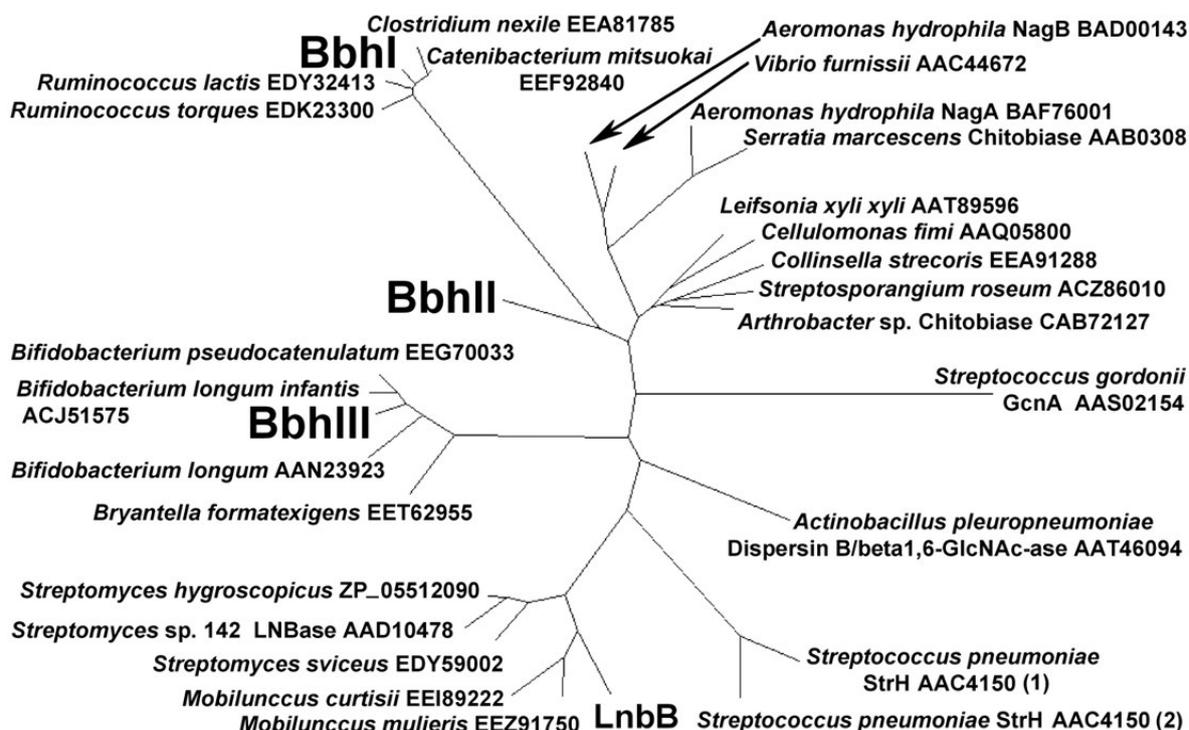


図 1-3-12. *B. bifidum* 由来の GH20 とそのホモログの系統樹。BbhI、BbhII、BbhIII、LnBb、それぞれで基質特異性が異なることが明らかとなっている。Miwa et al., *Glycobiology*, 2010 (36)より。

最後に図 1-3-13 に本研究の実験フローチャートを示す。

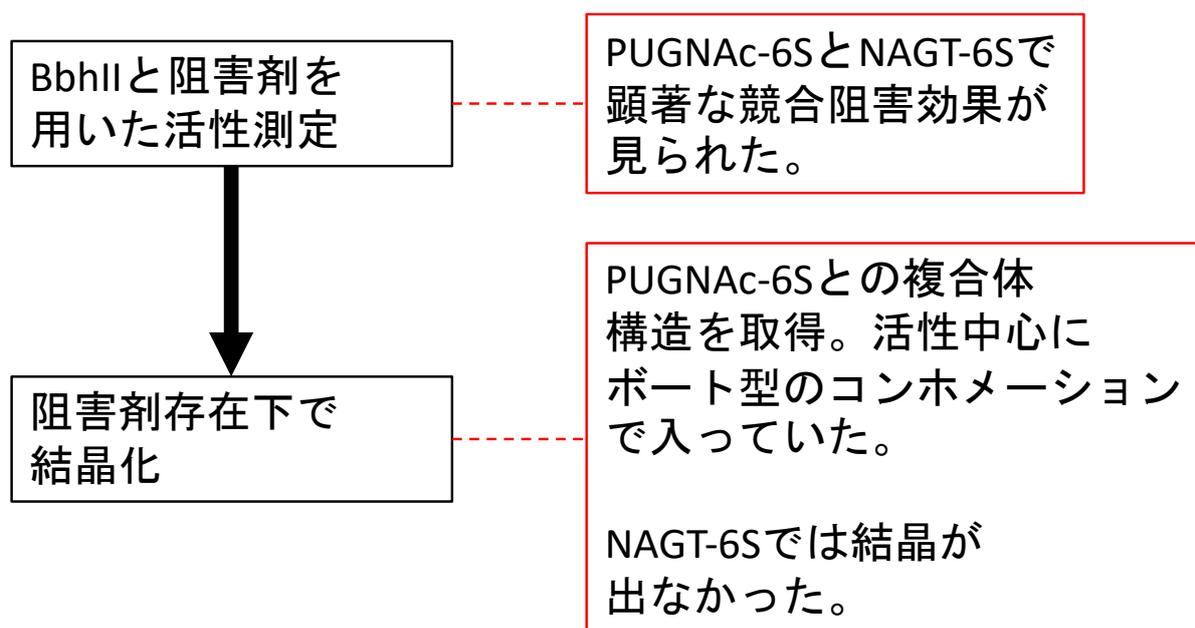


図 1-3-13. ムチン糖鎖特有の硫酸化糖質分解酵素 GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII の阻害に関する酵素学的・構造生物学的解析における実験フローチャート。実験内容の黒枠、各実験で至った結論を赤枠で示す。

## 第 2 部

成人型ビフィズス菌 *Bifidobacterium dentium* JCM1195 株の  
カラメル化糖に作用する酵素群の構造機能解析

# 第1章—環状フルクトース2糖を合成する GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase $\alpha$ FFase1 の構造機能解析

## 2.1.1. はじめに

本章では成人型ビフィズス菌 *B. dentium* JCM1195 株のカラメル化糖に作用する酵素群、そして環状フルクトース2糖を合成する GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase  $\alpha$ FFase1 の研究を扱う。それに先立ち、序論として  $\alpha$ -D-フルクトフラノシド糖質、そして  $\alpha$ FFase1 の機能について概説した上で、本研究の目的、方法、結果、考察について論ずる。

### 2.1.1.1. $\alpha$ -D-フルクトフラノシド糖質について

イヌリン型フルクタンやフラクトオリゴ糖は、 $\beta$ 2,1 結合した D-フルクトクラノース (D-fructofuranose、D-Fruf) によって構成され、プレバイオティクスとして注目されている(124, 125)。近年の研究では、イヌリンがヒトの腸内細菌叢の形成に重要であることが注目されている(126, 127)。イヌリンや  $\beta$ 2,6 結合型レバンなどの天然植物由来のフルクタンは、すべて  $\beta$  結合型ポリマーである(128)。フラクタン、フラクトオリゴ糖、スクロースの  $\beta$ -D-Fruf を加水分解または糖転移する酵素は、GH32 と GH68 に分類されている(129)。 $\beta$ -D-Fruf 結合に作用する酵素 ( $\beta$ -D-fructofuranosidase および  $\beta$ -D-fructotransferase) は広く研究されている(130)。しかし、 $\alpha$ -D-Fruf 結合に作用する酵素については知見が限られている。

### Difructose dianhydride (DFA) とその合成系

DFA は、2つのフルクトースユニットが還元末端で相互に結合した環状二糖類の総称である。この二糖類は、フルクトースを含む食品のカラメル化によって生成される(131)。ショ糖から作られる市販のカラメルには約 18%の割合で DFA が含まれている(132)。また、現代のヒトは食品の加熱調理の過程で非酵素的な脱水反応によって形成された  $\alpha$ -D-Fruf 結合を含む糖質を日常的に摂取していることが示唆される。様々な DFA の中でも、DFA III ( $\alpha$ -D-Fruf-1,2':2,3'- $\beta$ -D-Fruf) と DFA IV ( $\beta$ -D-Fruf-2,6':6,2'- $\beta$ -D-Fruf) は、ヒトの健康に様々な有益な効果をもたらすとされている(133)。DFA III を形成する inulin fructotransferase を用いて、チコリのイヌリンから DFA III を工業的に生産する方法が確立され、日本国内で販売されるようになった(134, 135)。また、レバンやイヌリンから DFA IV や DFA I ( $\alpha$ -D-Fruf-1,2':2,1'- $\beta$ -D-Fruf) を特異的に産生する微生物酵素が多数同定されている(136)。DFA IV を生成する GH32 levan fructotransferase (137)は、分子内トランスフルクトシル化を触媒するが、これは GH でよく見られるアノマー保持型反応機構から派生する機構によるものである(138)。一方、DFA III を生成する GH91 inulin fructotransferase は、反転した分子内トランスフルクトシル化を触媒し、結果としてリアーゼ反応を起こす。GH91 には DFA I-forming inulin fructotransferase (139)や DFA III hydrolase (140)も含まれる。DFA III-forming inulin fructotransferase (141)と DFA III hydrolase(142)で提案された反応機構は、一般的なアノマー反転型反応機構と一致している。GH91 は一度、PL19 に再分類されたが、GH23、GH102、GH103、GH104 の溶解性トランスグリコシダーゼと機構的に類似していることから、GH91 に戻された(143)。

GH32 や GH91 とは別にイヌロビオース (D-Fruf- $\beta$ 2,1-D-Fru、inulobiose) から DFA I を生成する酵素が 1980 年代に *Aspergillus fumigatus* から発見された (21, 22)。この酵素は、加水分解逆反応 (脱水縮合) によって  $\alpha$ -D-Fruf 結合の形成を触媒するもので、IUBMB により difructose-anhydride synthase とされている。しかし、この酵素をコードする遺伝子は特定されていない。

### 2.1.1.2. $\alpha$ FFase1 について

ヒトの腸内細菌叢に含まれる数種のビフィズス菌は、熱処理によって Glc と Fruf から得られる D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc 上で生育することが示されており(144)、これらの種には  $\alpha$ -D-fructofuranosidase が存在することが示唆されていた。

鹿児島大学の藤田清貴准教授らにより *B. dentium* JCM1195 株から新規の  $\alpha$ -D-fructofuranosidase、 $\alpha$ FFase1 が発見された。 $\alpha$ FFase1 はアルキル化配糖体 D-Fruf- $\alpha$ -Me とアラビノフラノース

(arabinofuranose、Araf) 誘導体である D-Araf- $\alpha$ -Me に対して加水分解反応を示した。またカラメル化糖に含まれる D-Frup- $\beta$ 2,1-D-Fru から diheterolevulosan II (DHL II) への、また inulobiose から DFA I への脱水縮合を平衡的に触媒する (図 2-1-1)。

$\alpha$ FFase1 は機能未知ドメイン DUF2961 からなるシングルドメインの菌体内 GH である。PDB に配列同一性 36% の遠縁ホモログで、構造ゲノミクスの一環で解析された *Bacteroides uniformis* 由来 BACUNI\_00161 (PDB ID: 4KQ7) が登録されている。

### 2.1.1.3. 本研究の目的

$\alpha$ FFase1 は既報の GH のどれとも配列同一性を示さない。また PDB に登録されている遠縁ホモログについてその分子機能の研究がされていないため、この構造から反応触媒メカニズムを同定するのは困難である。そこで本研究では、酵素学的手法、NMR、X 線結晶構造解析、動力学シミュレーションを組み合わせ、 $\alpha$ FFase1 の分子機能の決定を目指した。

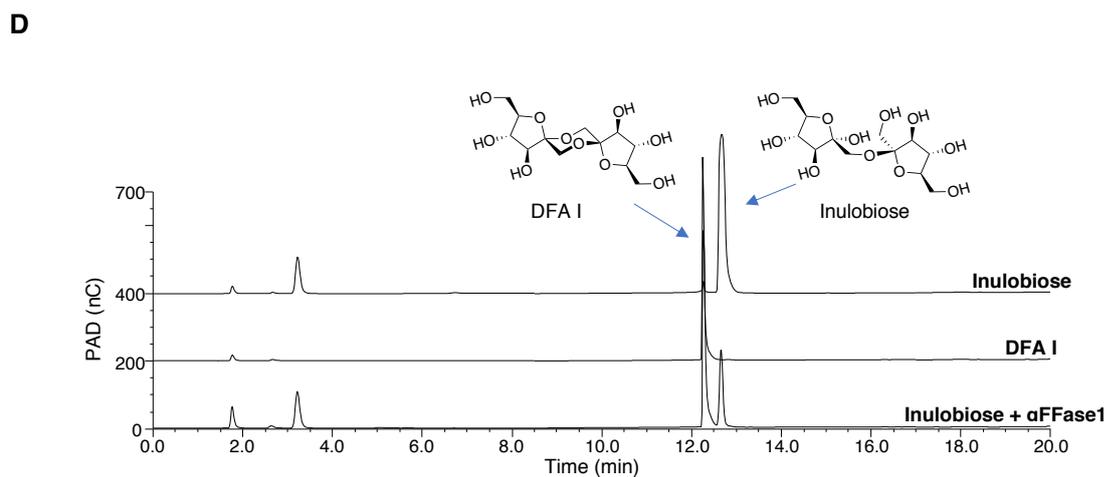
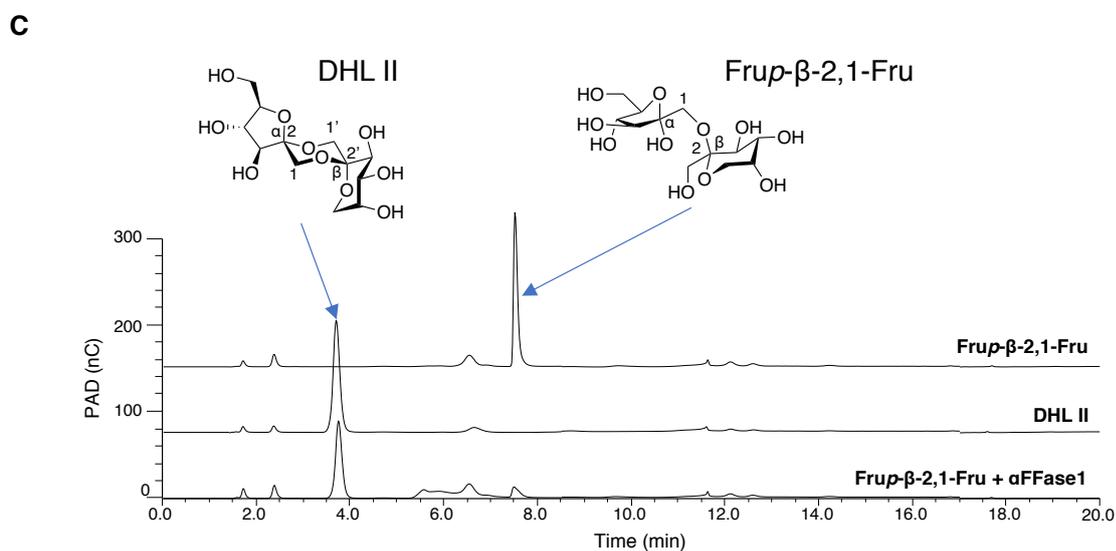
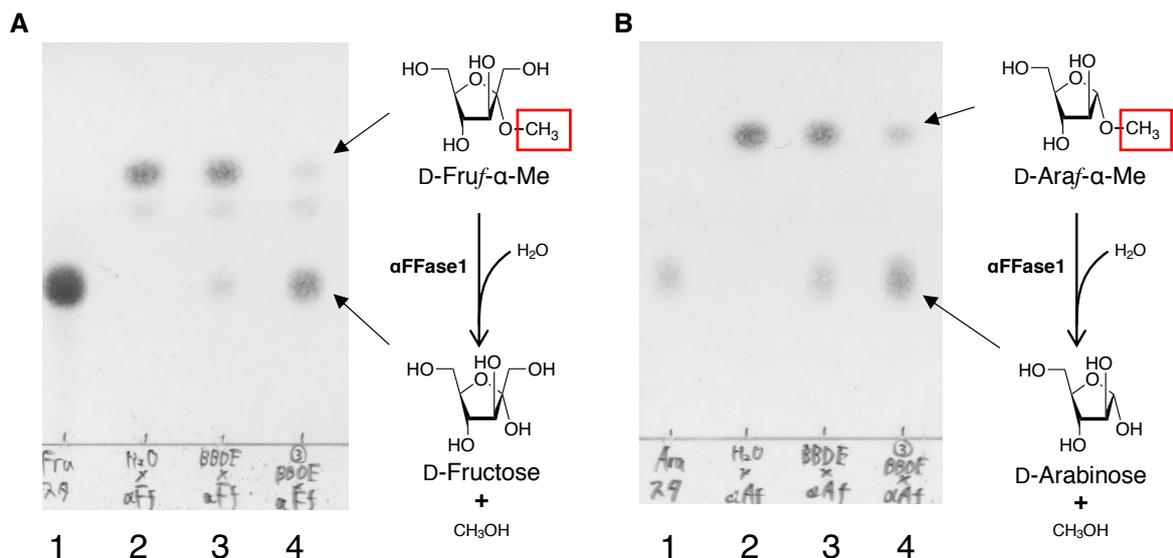


図 2-1-1. αFFase1 の触媒反応。A-B. D-Fruf-α-Me (A) と D-Araf-α-Me (B) を αFFase1 で処理した際の薄層クロマトグラフィー。加水分解時に遊離するメチル基を赤枠で示す。レーン 1 は生成物 (Fruf または Araf)、レーン 2 は基質 (D-Fruf-α-Me または D-Araf-α-Me)、レーン 3 は基質を αFFase1 と 100 分、レーン 4 は 3 日間、37°C でインキュベートした反応液に該当する。(C) Frup-β-2,1-Fru (上)、DHL II (中)、および αFFase1 で 37°C、一晩処理した Frup-β-2,1-Fru (下) の HPAEC-PAD クロマトグラム。(D) Inulobiose (上)、DFA I (中)、および αFFase1 で 37°C、一晩処理した Inulobiose (下) の HPAEC-PAD クロマトグラム。

## 2.1.2. 方法

本研究における試薬は特記のない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を用いた。また、液体試薬は予め滅菌したもの、あるいは滅菌された状態で入手したものを利用している。遠心には MX-307（トミー）を用いた。

また特記のない限り、濃度は全て終濃度である。

### 2.1.2.1. 基質と発現用プラスミド

pNP- $\alpha$ -D-Araf は理化学研究所の石渡明弘博士より供与頂いた。

D-Fruf- $\alpha$ -Me、inulobiose、DFA I、そして大腸菌異種発現用プラスミド pET23d  $\alpha$ FFase1\_His6-tag は鹿児島大学 藤田清貴准教授より供与頂いた（図 2-1-2）。

本コンストラクトは野生型  $\alpha$ FFase1 の C 末端に Ni-IMAC 精製用に His<sub>6</sub>-tag が付加されたものである。

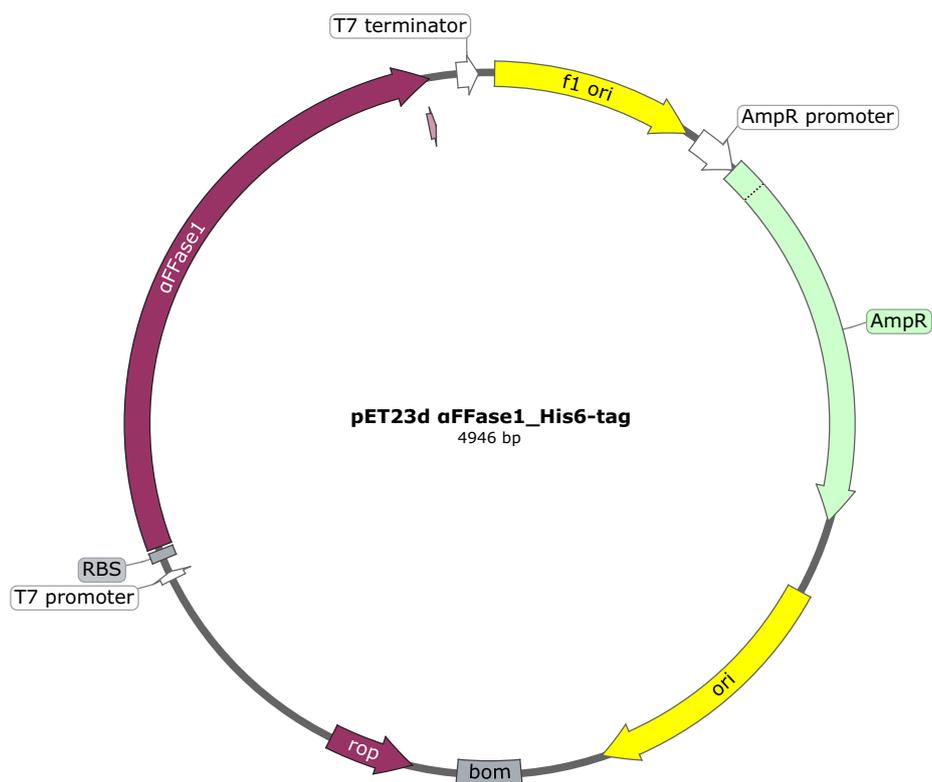


図 2-1-2. pET23d  $\alpha$ FFase1\_His6-tag のプラスミドマップ

### 2.1.2.2. 形質転換

第一部 1.1.2.5 節と同様の方法で行なった。

### 2.1.2.3. プラスミド抽出

第一部 1.1.2.6 節と同様の方法で行なった。

### 2.1.2.4. 発現検討

第一部 1.1.2.7 節と同様の方法で行なった。大腸菌発現株には BL21(DE3) (Agilent) を用いた。抗生物質は 100  $\mu$ g/mL ampicillin を用いた。破碎バッファーには 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM NaCl を用いた。

### 2.1.2.5. SDS-PAGE

第一部 1.1.2.8 節と同様の方法で行なった。

### 2.1.2.6. 培養のスケールアップ

第一部 1.1.2.10 節と同様の方法で行なった。

### 2.1.2.7. タンパク質の精製

第一部 1.1.2.11 節と同様の方法で行なった。本章ではタンパク質の精製を Ni-IMAC、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で行なった。結晶化条件の最適化の一環として、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた検討も行なった。

破碎バッファーには 50 mM Tris-HCl pH 7.0、300 mM NaCl、ゲルろ過バッファーには 25 mM Tris-HCl pH 7.0、300 mM NaCl、ゲルろ過精製後のバッファー置換に 10 mM Tris-HCl pH 7.0、300 mM NaCl を用いた。

変異体（後述、2.1.2.18 節を参照）については第一部 1.1.2.9 節のバッチ法による精製を一部改変して行なった。具体的には、150 mL 培養から得た菌体を破碎バッファー 16 mL で懸濁した後に、0.5 mm ガラスビーズを 4 mL 分加え、4°C で 15 分間 Cute mixer CM-1000 (EYELA) で高速振盪した。これを菌体破碎物とし、高速 (13,000 rpm 以上)、45 分間遠心し、上清 (粗酵素液) を、予め 15 mL チューブ内で破碎バッファーを用いて洗浄した cOmplete His-tag resin 500  $\mu$ L に加え、1 時間、4°C で転倒混合した。その後、5 分間、500 xg で遠心し、上清 (素通り画分) を除去した。次に破碎バッファー 1.5 mL でレジンを懸濁し、5 分間、500 xg で遠心し、上清を除去するというサイクルを 3 回繰り返した。同様の手順を破碎バッファー + 5 mM imidazole 1.5 mL で 1 回行なった。500  $\mu$ L 破碎バッファー + 500 mM imidazole でレジンを懸濁し、5 分間、4°C で転倒混合した。最後に 5 分間、500 xg で遠心し、上清を Amicon Ultra centrifugal filter device MWCO 10,000 で濃縮、0.22  $\mu$ m 孔径の親水性 Ultrafree スピンフィルターで微粒子や沈殿物を除去し、SDS-PAGE や変異体活性測定（後述、2.1.2.8 節および 2.1.2.9 節を参照）に用いた。

### 2.1.2.8. *p*NP- $\alpha$ -D-Araf を用いた活性測定

$\alpha$ FFase1 の *p*NP- $\alpha$ -D-Araf に対する加水分解活性は *p*NP 遊離を連続的にモニタリングし、検証した。0.1  $\mu$ g/mL の  $\alpha$ FFase1、100 mM sodium acetate pH 6.0、0.5-7.5 mM *p*NP- $\alpha$ -D-Araf を混合し、37°C で反応させた。5 分ごとに反応液 5  $\mu$ L を分注し、0.1 M 水酸化ナトリウムを 20  $\mu$ L 加えて触媒反応を停止、*p*NP を発色させた。反応停止後の溶液の 400 nm の吸光度を、Synergy H1 プレートリーダーで測定し、遊離 *p*NP の濃度を求めた。反応時間と遊離 *p*NP 濃度から初速度を算出し、SigmaPlot 12.0 の酵素キネティクスツールを用いて、*S*-*v* プロットを Michaelis-Menten 式に当てはめ、動力的パラメーターを求めた。

変異体（後述、2.1.2.18 節を参照）については基質濃度を 2.5 mM に固定して、野生型と同様に測定を行なった。

### 2.1.2.9. Inulobiose と DFA I を用いた活性測定

本操作は、SigmaPlot 12.0 による解析以外、鹿児島大学の藤田清貴准教授らによって HPAEC-PAD (CarboPack PA-1 カラム、Thermo Fischer Scientific) を用いてなされた。5  $\mu$ g/mL の  $\alpha$ FFase1、50 mM sodium acetate pH 6.0、2-10 mM inulobiose または 12.5-30 mM DFA I を混合し、37°C で反応させた。反応液を経時的にカラムにアプライし、以下のように濃度勾配を掛けた。

- 0-5 分：100%の 0.1 M NaOH
- 5-30 分：0-100%の 0.5 M 酢酸ナトリウム、0.1 M NaOH
- 30-35 分：100%の 0.5 M 酢酸ナトリウム、0.1 M NaOH。

標準試料から作製した検量線を基に、クロマトグラムのピーク面積から基質・生成物の濃度を求めた。時間の経過による反応生成物濃度の変化を基に初速度を算出し、SigmaPlot12.0 の線形曲線回帰ツールを用いて *S*-*v* プロットを解析、動力的パラメーターを求めた。

変異体（後述、2.1.2.18 節を参照）については inulobiose の濃度を 10 mM に固定して、野生型と同様に測定を行なった。

#### 2.1.2.10. <sup>1</sup>H NMR によるグリコシド結合の加水分解における初期生成物の立体化学の検証

本操作は理化学研究所の石渡明弘博士によってなされた。

D<sub>2</sub>O 中に懸濁した 10 mM *p*NP- $\alpha$ -D-Araf に 50  $\mu$ g/mL  $\alpha$ FFase1 を添加した。 $\alpha$ FFase1 の保存溶液は予め 10 mM sodium phosphate pH 6.0 に置換した。反応混合物の <sup>1</sup>H NMR スペクトルは、ECX400 スペクトロメーター（日本電子、東京、日本）を用いて、経時的に 400 MHz で、37°C で記録した。反応初期の生成物（D-Ara）のアノマー型は、D-Ara の標準 <sup>1</sup>H NMR スペクトルとの比較から判断した。

基質を inulobiose、または DFA I に置き換え、また  $\alpha$ FFase1 の保存溶液を D<sub>2</sub>O に懸濁した 10 mM sodium phosphate pH 6.0 に置換し、同様の実験を行なった。

#### 2.1.2.11. 薄層クロマトグラフィー（TLC）

第一部 1.1.2.12 節と同様の方法で行なった。バッファーには sodium acetate pH 6.0 を用いた。本章では TLC を EDTA による酵素の失活、金属阻害、糖転移反応を検証するため用いており、目的に応じて反応液の組成を変えている。

糖転移反応では表 1-1-12 の組成表に沿って  $\alpha$ FFase1、sodium acetate pH 6.0、基質（*p*NP- $\alpha$ -D-Araf、D-Fruf- $\alpha$ -Me、inulobiose、または DFA I）を混合し、さらに 20% メタのノール、エタノール、または 1-プロパノールを添加、24 時間、37°C でインキュベートしたものを TLC プレートにアプライした。

EDTA による酵素の失活の検証では、予め  $\alpha$ FFase1、sodium acetate pH 6.0、EDTA を混合、24 時間、4 °C でインキュベートした溶液に *p*NP- $\alpha$ -D-Araf、または inulobiose を加え、さらに 2 時間、37°C でインキュベートしたものを TLC プレートにアプライした。濃度は inulobiose 添加後、表 1-1-12 と同じになるように、また EDTA の濃度が 0、1、10、100 mM になるように調製した。反応時間を時間単位で振ったところ、2 時間で EDTA 非存在下の条件で触媒反応が平衡に達したことから、この反応時間を採用した。

金属阻害では、予め  $\alpha$ FFase1、sodium acetate pH 6.0、2 価イオンを混合、24 時間、4 °C でインキュベートした溶液に inulobiose を加え、さらに 24 時間、37°C でインキュベートしたものを TLC プレートにアプライした。濃度は inulobiose 添加後、表 1-1-12 と同じになるように、また 2 価イオンの濃度が 1 mM になるように調製した。

基質には *p*NP- $\alpha$ -D-Araf、D-Fruf- $\alpha$ -Me、inulobiose、DFA I、バッファーには sodium acetate pH 6.0 を用いた。

展開溶媒には 1-butanol:2-propanol:純水を 10:5:4 の比率で展開の 30 分前に混合したものをを用いた。呈色液は 10 mL 10% sulfuric acid に 0.1 g iron(III) chloride を懸濁し、そこにエタノールに懸濁した 6% orcin を 1 mL 加え、呈色直前（5 分以内）に混合したものをを用いた (<http://www.cchem.berkeley.edu/rsggrp/TLCStainGeneralReference.pdf>、217 番目のレシピ)。

#### 2.1.2.12. Pre-Crystallization Test

第一部 1.1.2.15 節と同様の方法で行なった。

#### 2.1.2.13. 結晶化スクリーニング

第一部 1.1.2.16 節と同様の方法で行なった。

#### 2.1.2.14. 結晶化条件の最適化

第一部 1.1.2.17 節と同様の方法で行なった。最適化の過程で、リガンドとの複合体取得のためタンパク質溶液に 10-100 mM Ara、Fru、inulobiose、DFA I を添加した。また E270A、E291Q 変異体（後述、2.1.2.18 節を参照）でも同様の実験を行なった。

#### 2.1.2.15. シーディング

第一部 1.1.2.18 節と同様の方法で行なった。

### 2.1.2.16. X線回折強度データ収集

第一部 1.1.2.19 節と同様の方法で行なった。

### 2.1.2.17. 結晶構造解析

第一部 1.1.2.20 節と同様の方法で行なった。ただし、初期位相の決定には自動分子置換プログラム MORDA(145)、自動モデル構築に Phenix program suite の phase and build(61, 62)を用いた。

### 2.1.2.18. αFFase1 遺伝子への部位特異的変異体導入と変異体タンパク質の調製

QuickChange Primer Design ツール (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) でデザインした表 2-1-1 のプライマー対を用いて、第一部 1.1.2.3 節、1.1.2.4 節、1.1.2.5 節、1.1.2.6 節の方法で PCR、DpnI 処理、形質転換、プラスミド抽出、シーケンス解析を行なった。本研究では PCR の伸長時間は、いずれのプライマーでも 2 分半であった。

目的の変異が導入されていることを確認した上で、プラスミドを BL21 (DE3) または BL21 Star (DE3) (Thermo Fischer Scientific) に形質転換し、野生型と同様に、少量培養で発現を確認した。その後、培養スケールを 150 mL まで上げ、2.1.2.7 の通りに精製を行なった。

表 2-1-1. αFFase1 部位特異的変異導入に用いたプライマー対。変異導入部分を下線で示す。

Object	Sequence
E85A mutation	5' -GCTCCGGTGATGG <u>CG</u> ATTCACCCGGCA-3' 3' -CGAGGCCACTACCGCTAAGTGGGCCGT-5'
E85Q mutation	5' -GGCTCCGGTGATG <u>C</u> AGATTCACCCGGC-3' 3' -CCGAGGCCACTACGTCTAAGTGGGCCG-5'
K147A mutation	5' -CCGTTAATGTATCGCTC <u>GC</u> GCCGGAGGAAGCAGGAAA-3' 3' -GGCAAATTACATAGCGAGCGCGGCCTCCTTCGTCCTTT-5'
W267A mutation	5' -GCACTTCCAAGGAAGTGCGTGGGGAGAAGGCAAC-3' 3' -GTTGCCTTCTCCCCACGCACTTCTTGGGAAGTGC-5'
Y187A mutation	5' -TAACGAGTTGCCGTTCA <u>T</u> TCTGGCCTTCAACATCGACTATGAAATG-3' 3' -ATTGCTCAACGGCAAGTAAGACCGGAAGTTGTAGCTGATACTTTAC-5'
Y187F mutation	5' -GAGTTGCCGTTCA <u>T</u> TCTGTCTTCAACATCGACTATGAA-3' 3' -CTCAACGGCAAGTAAGACAAGAAGTTGTAGCTGATACTT-5'
E270A mutation	5' -GGAAGTTGGTGGGGAG <u>C</u> AGGCAACGATATGTTTC-3' 3' -CCTTCAACCACCCCTCGTCCGTTGCTATACAAG-5'
E270Q mutation	5' -CCAAGGAAGTTGGTGGGGACAGGGCAACGATATGTTTC-3' 3' -GGTTCCTTCAACCACCCCTGTCCCGTTGCTATACAAG-5'
E291A mutation	5' -AACGGCACCGGTA <u>C</u> TGCGGATTAATTTCAACCATG-3' 3' -TTGCCGTGGCCATGACGCCAATAAAAGTTGGTAC-5'
E291Q mutation	5' -GAGTTTGAACGGCACCGGTA <u>C</u> AGGATTAATTTCAA-3' 3' -CTCAAACCTGCCGTGGCCATGAGTCCATAAAAGTT-5'
D292A mutation	5' -GGCACCGTACTGAGG <u>C</u> TATTTCAACCATGCC-3' 3' -CCGTGGCCATGACTCCGAATAAAAGTTGGTACGG-5'
D292N mutation	5' -ACGGCACCGGTA <u>G</u> AGATTAATTTCAACCATGCC-3' 3' -TGCCGTGGCCATGACTCTTAATAAAAGTTGGTACGG-5'
W298A mutation	5' -GATTATTTCAACCATGCGCGGGTATGCAGCGCAATGC-3' 3' -CTAATAAAGTTGGTACGGCGCCATACGTCGCGTTACG-5'

### 2.1.2.19. タンパク質の定量

変異体のタンパク質量が少なく、Nanodrop 2000c による 280 nm 吸光度に基づいたタンパク質の定量で十分正確に測れない可能性を踏まえ、ビスシコニン酸 (bicinchoninic Acid, BCA) 法による定量法を採用した。BCA protein assay kit (Pierce) も用いて、波長 562 nm の吸光度を測定した。標準タンパク質として、bovine serum albumin (Sigma Aldrich) を用いて、50-250 μg/mL の範囲で検量線を作製した。

### 2.1.2.20. 分子動力学シミュレーション

本操作は東京大学大学院の清水謙多郎教授と寺田透准教授によってなされた。

分子動力学 (molecular dynamics、MD) シミュレーションは、 $\alpha$ FFase1- $\beta$ -D-Fruf 複合体、 $\alpha$ FFase1-inulobiose 複合体、 $\alpha$ FFase1-DFAI 複合体の3つのモデルについて行った。Inulobiose と DFAI の複合体構造は、結晶構造が解かれている  $\beta$ -D-Fruf 複合体構造のリガンドを置き換えて作製した。複合体の各初期構造では、6 量体構造全体を使用し、リガンドはすべてのプロトマーに結合させ、各プロトマーの N 末端と C 末端には、それぞれアセチル基と N-メチル基を結合させた。プロトン化の状態は、水素結合ネットワークに基づいて決定し、特に His16、His207、His262 は N $\delta$ 1 原子で、His344 は N $\delta$ 1 と N $\epsilon$ 2 の両方をプロトン化させた。他のヒスチジン残基は N $\epsilon$ 2 原子をプロトン化させた。これらの修正を行った後、構造を立方体の水の中に浸し、水の面とタンパク質の原子の間に 10 Å の最小距離を確保した。また、システムの正味の電荷がゼロになるように K<sup>+</sup>イオンを加えた。各システムの寸法は 151×151×151 Å で、6つの同一のタンパク質鎖、6つの同一のリガンド、102個の K<sup>+</sup>イオン、および約 88,000 個の水分子から構成されていた。タンパク質とイオンには、Amber ff14SB force field パラメーター(146)を用いた。リガンドには GLYCAM 06j(147)を、水には TIP3P モデル(148)を使用した。エネルギーの最小化と平衡化を行った後、プロダクション MD を 1  $\mu$ s で実行した。MD シミュレーションの間、温度は速度スケーリング法(149)を用いて 300 K に、圧力はベレンゼン弱結合法(150)を用いて 1.0×10<sup>5</sup> Pa に維持した。水素原子の結合長は、LINCS アルゴリズム(151, 152)を用いて、2 fs の時間ステップで拘束した。静電相互作用は、粒子メッシュエバルト法を用いて計算した(153)。すべての MD シミュレーションは、Gromacs 2020(154)を用いて行い、10 ps ごとに座標を記録した。

#### 2.1.2.21. 系統樹

第一部 1.1.2.24 節と同様の方法で行なった。ただし、 $\alpha$ FFase1 と同様の活性を有すると推定されるアミノ酸配列に限定するため、MSA 後に  $\alpha$ FFase1 の活性中心 (-1、+1 サブサイト) の残基が保存されていない配列を除外した。その後、再度 M-coffee で MSA を行ってから系統樹を作製した。

## 2.1.3. 結果

### 2.1.3.1. $\alpha$ FFase1 酵素活性の動力的パラメーター

少量での発現検討の末、0.1 mM IPTG で発現誘導し、25°C で 20 時間培養した条件で最も多く目的タンパク質が得られたため、この条件で大量培養、そしてタンパク質精製を行なった (図 2-1-3)。ゲルろ過精製後の SDS-PAGE では分子量 53.0 kDa の位置に高純度で目的タンパク質のバンドが確認された (図 2-1-3. C)。最終的に培養液 1 L あたり 50 mg 程度の  $\alpha$ FFase1 精製タンパク質が得られた。

なお、本サンプルについては結晶化の条件検討の一環で Ni-IMAC 後に陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたサンプルとそうでないサンプルで比較を行った。陰イオン交換クロマトグラフィーでは NaCl が 290 mM に到達したところで目的タンパク質が溶出された (図 2-1-3. B)。

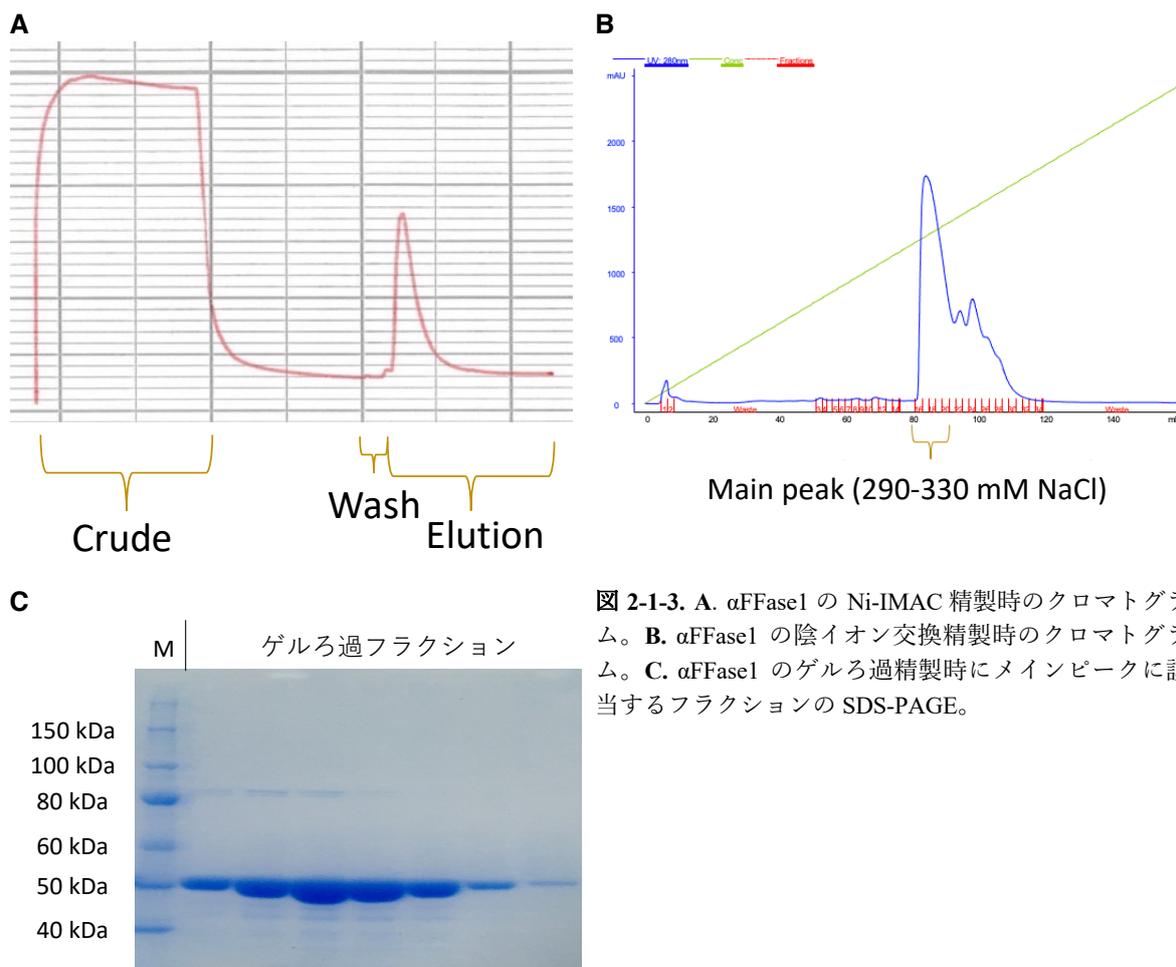


図 2-1-3. A.  $\alpha$ FFase1 の Ni-IMAC 精製時のクロマトグラム。B.  $\alpha$ FFase1 の陰イオン交換精製時のクロマトグラム。C.  $\alpha$ FFase1 のゲルろ過精製時にメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE。

精製酵素を用いて活性測定を行った。 $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf では加水分解時の  $p$ NP の遊離と反応液の発色から、inulobiose と DFA I では平衡反応が進む際の、HPAEC-PAD クロマトグラムのピーク面積の変化から初速度を求め、 $S$ - $v$  プロットに対するカーブフィッティングを行なった。 $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf では Michaelis-Menten 式に当てはめ、動力的パラメーターを求めることができた (図 2-1-4. A) が、inulobiose と DFA I については基質濃度に応じて直線的な初速度の上昇が見られた。これは  $K_m$  値が極めて高いからであるためであり、基質濃度の都合上、飽和状態での反応が測定できないため、Michaelis-Menten 式への当てはめは困難であると考えた。そこで  $S$ - $v$  プロットを線形曲線回帰で直線に当てはめ、その傾きから  $k_{cat}/K_m$  を求めた (図 2-1-4. B-C)。

比較すると、 $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf 加水分解に対する比活性は inulobiose 脱水縮合の約 50 倍、DFA I 加水分解の約 100 倍であった。

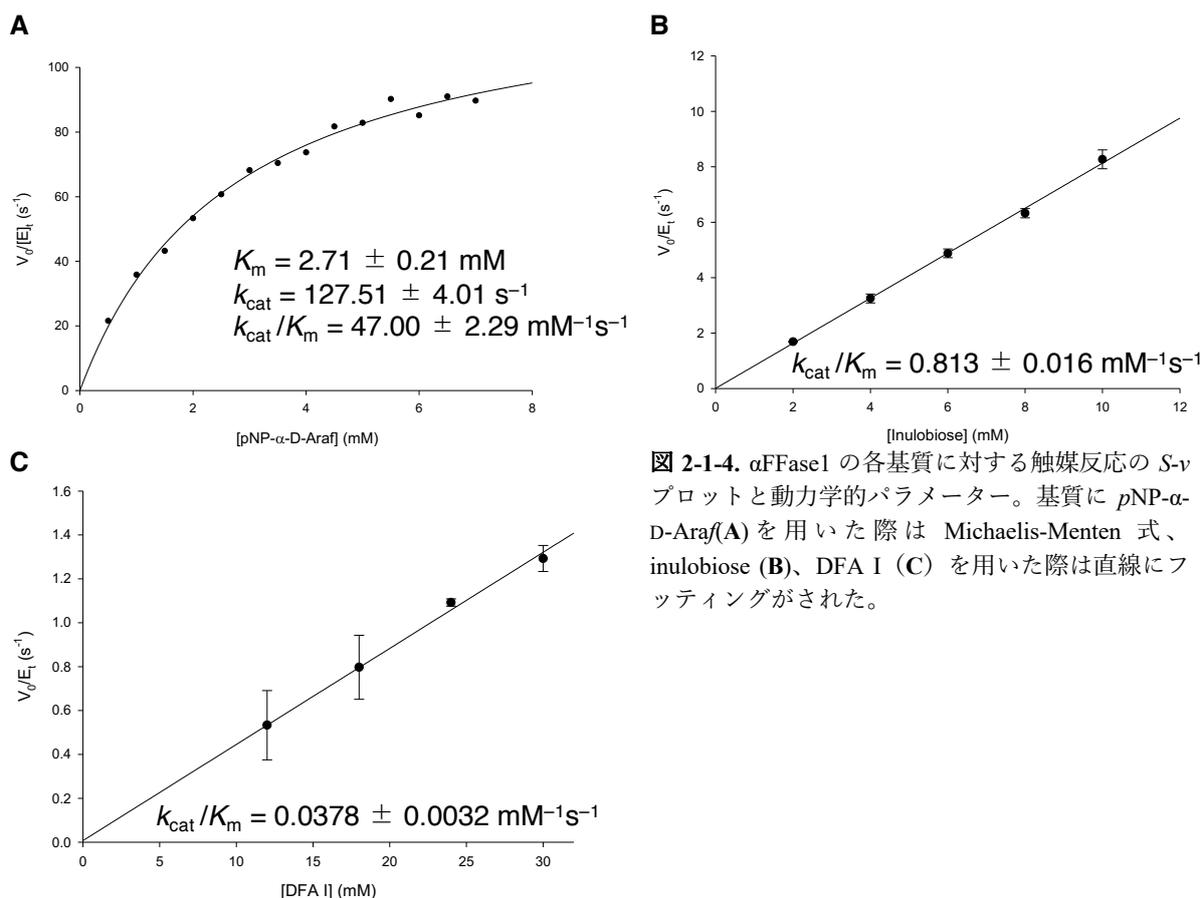


図 2-1-4.  $\alpha$ FFase1 の各基質に対する触媒反応の  $S$ - $v$  プロットと動力学のパラメーター。基質に  $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf(A) を用いた際は Michaelis-Menten 式、inulobiose (B)、DFA I (C) を用いた際は直線にフィッティングがされた。

### 2.1.3.2. $\alpha$ FFase1 による反応触媒メカニズムの同定

$^1\text{H}$  NMR による各基質に対する  $\alpha$ FFase1 の反応触媒メカニズムの同定を試みた。

基質に  $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf を用いた際 (図 2-1-5)、アノマー水素シグナル ( $\delta = 6.01 \text{ ppm}$  のダブルット、 $^3J_{\text{H1-H2}} = 1.2 \text{ Hz}$ ) は 1 分以内に消失した。 $\alpha$ -D-Araf の H-1 シグナル ( $\delta = 5.39 \text{ ppm}$  のダブルット、 $^3J_{\text{H1-H2}} = 2.8 \text{ Hz}$ ) は、極めて微弱な  $\beta$ -D-Araf の H-1 シグナル ( $\delta = 5.45 \text{ ppm}$  のダブルット、 $^3J_{\text{H1-H2}} = 4.4 \text{ Hz}$ ) と共に、主要な初期フラノシドとして最初に検出された (図 2-1-5. B)。その後、 $\alpha$ -D-Araf ( $\delta = 5.38 \text{ ppm}$  のダブルット、 $^3J_{\text{H1-H2}} = 3.6 \text{ Hz}$ ) や  $\beta$ -D-Araf ( $\delta = 4.66 \text{ ppm}$  のダブルット、 $^3J_{\text{H1-H2}} = 8.0 \text{ Hz}$ ) などのピラノースのアノマーの H-1 シグナルが観察され、30 分以内に変旋光と環状構造の変換を経て平衡に達した。この結果は、 $\alpha$ FFase1 がアノマー保持型 GH であることを示している。

基質に inulobiose または DFA I を用いた際、両方向で反応の進行を確認した (図 2-1-6)。しかし、化学シフトから inulobiose の還元末端側にある Fru の異性化が見受けられ、脱水縮合時の特定のアノマー型の減少を判断するのは困難であった。逆に DFA I の加水分解の際は生成物のケミカルシフトが小さく、DFA I のケミカルシフトによって部分的に見えていなかったため、特定のアノマー型のピークの増大を視認するのは困難であった。よって  $^1\text{H}$  NMR では inulobiose と DFA I の平衡反応が  $\alpha$ -D-arabinofuranosidase 活性と同じアノマー保持型機構によって進行するか断定できなかった。

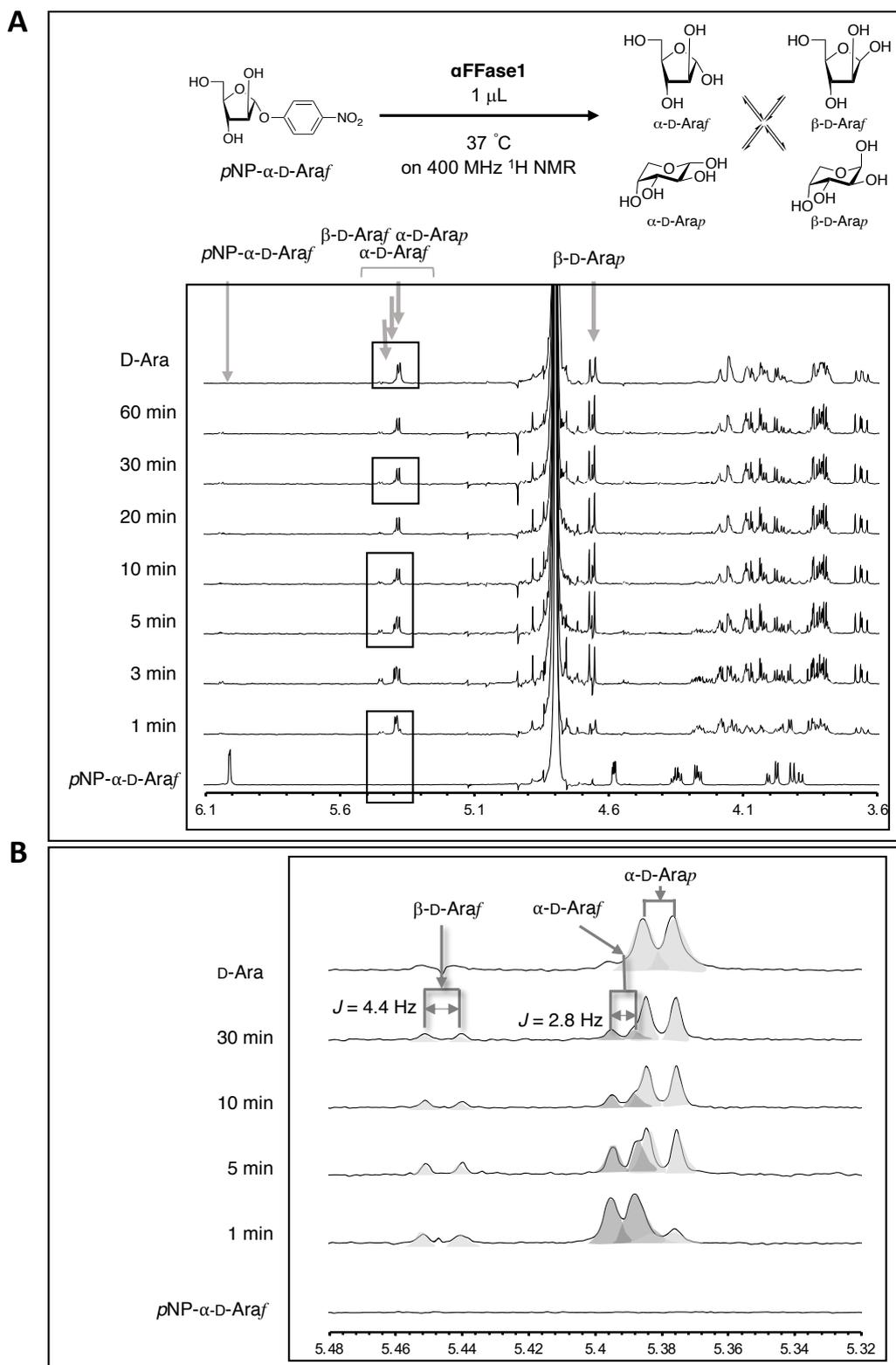


図 2-1-5.  $\alpha$ FFase1 はアノマー保持型機構で反応を触媒する。A. DOH を基準とした  $D_2O$  中の  $pNP$ - $\alpha$ -D-Araf に対する活性をモニターした  $^1H$  NMR スペクトル。B.  $\alpha$ -D-Arap の H1 を基準としたパネル A で囲んだ部分の拡大図。 $pNP$ - $\alpha$ -D-Araf、 $\beta$ -D-Araf、 $\alpha$ -D-Araf、 $\alpha$ -D-Arap、 $\beta$ -D-Arap のアノマー位の C1-H における特徴的な化学シフトと J-カップリング定数を矢印で示す。各ピークに該当するアノマー型は標準試薬 (D-arabinose) との比較を基に、理化学研究所 石渡明弘博士によって決定された。

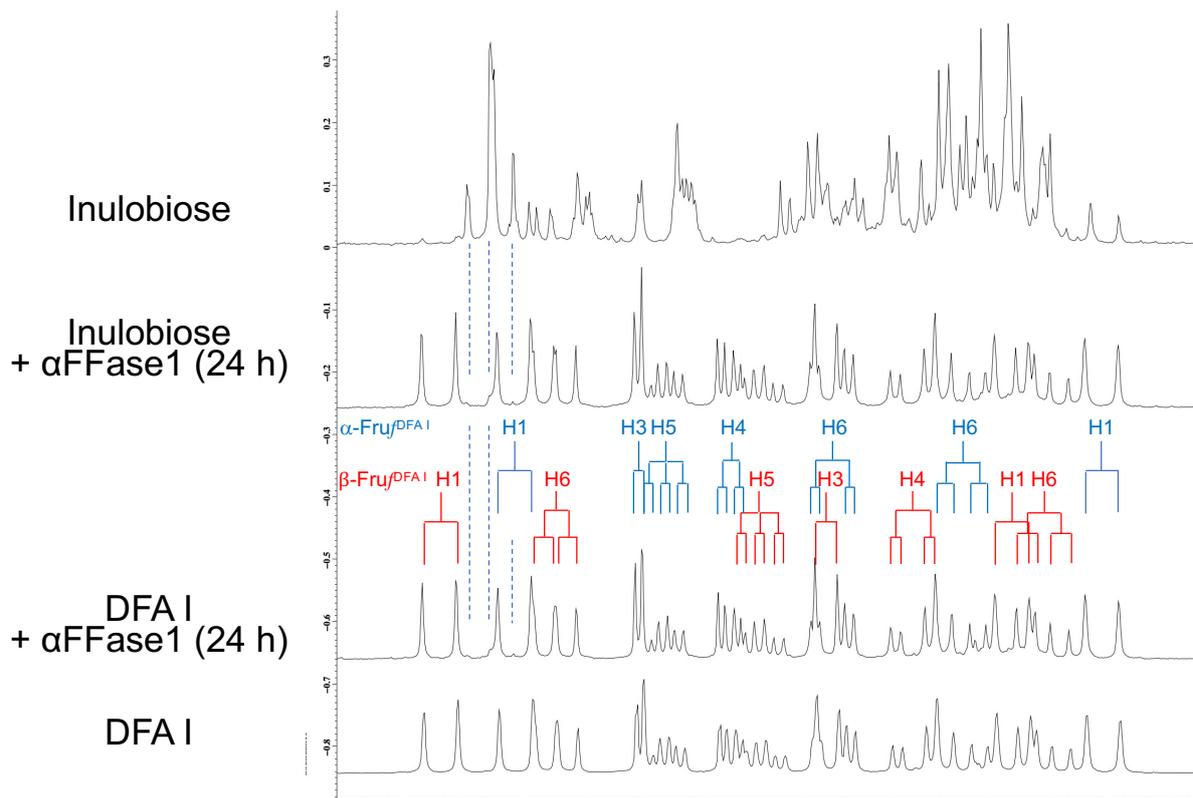


図 2-1-6. Inulobiose (上) または DFA I (下) を  $\alpha$ FFase1 で処理して平衡に達したときの、inulobiose および DFA I に対する  $\alpha$ FFase1 の反応の NMR モニタリング。反応は、 $D_2O$  (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0) 中、 $37^\circ C$  で 24 時間、400 MHz  $^1H$ -NMR でモニタリングした。DFA I の  $\alpha$  Fruf と  $\beta$  Fruf にあたるケミカルシフトをそれぞれ青と赤で、触媒反応が平行に達した後に見える inulobiose のマイナーケミカルシフトを破線で示す。

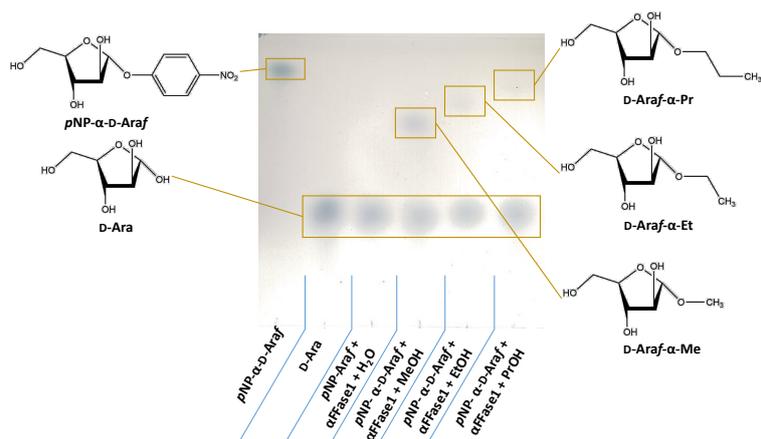
アノマー保持型の GH では反応溶液中に有機溶媒を加えることで、2 回目の求核攻撃（グリコシドペプチドに対する求核攻撃）で水分子が有機溶媒に置換され、アルキル配糖体が生成される。これを糖転移反応と呼ぶが、この減少を基に  $\alpha$ FFase1 の各基質に対する触媒反応がアノマー保持型であるか、TLC で検証した (図 2-1-7)。

基質に  $pNP$ - $\alpha$ -D-Araf を用いた場合、メタノール、エタノール、1-プロパノールを添加した条件でアルキル配糖体に当たるスポットが確認された。これにより、 $\alpha$ -D-arabinofuranosidase 活性はアノマー保持型機構によって進行することが確認された。これは  $^1H$ -NMR の反応モニタリングの結果と合致する。

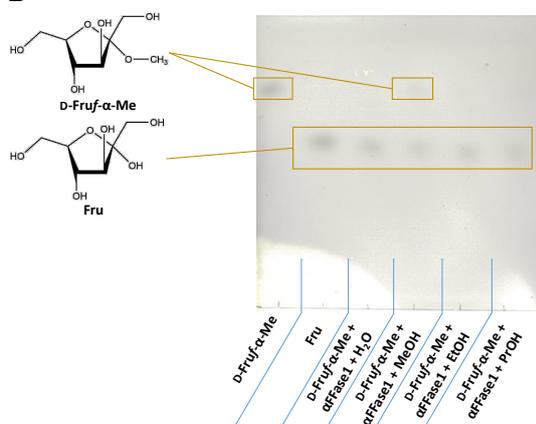
基質に  $D$ -FruF- $\alpha$ -Me を用いた場合、エタノール、1-プロパノールでは Fru のスポットしか見られなかったが、メタノールを添加した条件でアルキル配糖体のスポットが見られた。しかし、この条件では基質と生成物が同じであるため、未反応の基質のスポットである可能性があり、糖転移が起きたと断言できなかった。

基質に inulobiose または DFA I を用いた場合、いずれの条件でもアルキル配糖体のスポットは見られなかった。よって  $^1H$ -NMR と同様に、糖転移反応の観測では inulobiose と DFA I の平衡反応、そして  $\alpha$ -D-fructofuranosidase 活性についても  $\alpha$ -D-arabinofuranosidase 活性と同じアノマー保持型機構で反応が進行しているのか断言できなかった。

A



B



C

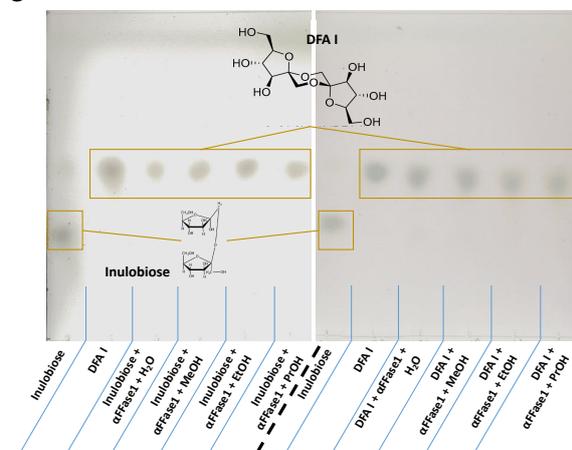


図2-1-7.  $\alpha$ FFase1の糖転移反応の検証。基質として  $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf (A)、D-Fruf- $\alpha$ -Me (B)、inulobioseまたはDFA I (C) を用いて検証した。MeOH: メタノール; EtOH: エタノール; PrOH: 1-プロパノール

### 2.1.3.3. $\alpha$ FFase1の結晶構造

$\alpha$ FFase1は既報の糖質関連酵素のいずれとも配列同一性を示していないため、一次構造(アミノ酸配列)から触媒に関わり得る残基を特定出来なかった。そこで三次元構造からこれを特定するべく、 $\alpha$ FFase1の結晶化を行った。

PCTで最適とされたタンパク質濃度 10 mg/mLで結晶化スクリーニングを行なった結果、50の条件で結晶が得られた。ヒット条件は沈殿剤にPEG3000-8000、またはMPDを用いている以外、際立った傾向は見られなかった。特に20%PEG3350、0.2 M di-sodium tartrateで得た歪な太いトゲ状の結晶(図2-1-8. A)は、条件の最適化を行わず、5-10%MPDを抗凍結剤に用いて瞬間凍結し、X線に照射したところ、1.96Åの分解能の回折像が得られた(図2-1-8. B、表2-1-2)。

獲得したデータセットを自動分子置換プログラムMORDAにかけた。配列同一性11.3%から37.01%の遠縁ホモログ構造が分子置換のモデルに用いられ、その中で $\alpha$ FFase1と同じDUF2961を有する *Bacteroides uniformis* BACUNI\_00161 (PDB ID: 4KQ7)でZ-score 18.610、Q 0.697、 $R/R_{free}$  0.434/0.471というスコアが得られた。いずれのスコアも初期位相が解かれていることを示していたため( $Z > 8.0$ 、 $Q > 0.5$ 、 $R_{free} < 0.50$ )、このモデルを基に自動モデル構築を行った。試したいいくつかのプログラムの中でPhenix Program SuiteのPhase and Buildで最も良質な結果が得られ、最終的な構造決定に至った。

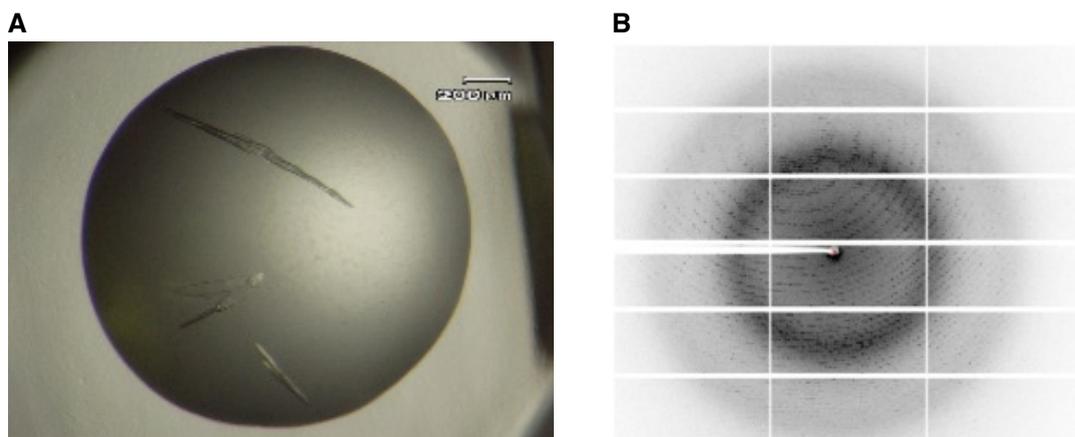


図 2-1-8.  $\alpha$ FFase1 の結晶 (A) と X 線回折像 (B)。

表 2-1-2.  $\alpha$ FFase1 (リガンドフリー、 $\beta$ -D-Araf 複合体、 $\beta$ -D-Fruf 複合体) の X 線回折データセットと構造精密化の統計値。括弧内は最外殻の値を示す。

Data set	$\alpha$ FFase1 ligand free	$\alpha$ FFase1 D-Arabinose complex	$\alpha$ FFase1 D-Fructose complex
Data collection <sup>a</sup>			
Beamline	KEK PF BL-5A	SLS X06SA	SLS X06SA
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell			
a, b, c (Å)	98.55, 156.97, 100.91	98.45, 156.71, 100.85	98.44, 156.30, 100.74
$\beta$ (°)	109.93	110.66	110.09
Resolution (Å)	49.64–1.96 (1.99–1.96)	48.72–1.86 (1.90–1.86)	48.64–1.76 (1.79–1.76)
Total reflections	716,504 (33025)	1,638,158 (78855)	1,948,150 (89388)
Unique reflections	206,183 (10,181)	237,104 (11,654)	279,590 (13,723)
CC <sub>1/2</sub>	0.99 (0.80)	1.00 (0.81)	1.00 (0.78)
Completeness (%)	99.9 (99.9)	100.0 (100.0)	99.3 (98.4)
Multiplicity	3.5 (3.3)	6.9 (6.8)	7.0 (6.5)
Mean $I/\sigma(I)$	10.3 (2.9)	10.9 (2.4)	11.8 (2.4)
$R_{\text{merge}}$	0.098 (0.432)	0.113 (0.774)	0.107 (0.729)
Refinement			
Resolution (Å)	49.64–1.96	48.77–1.86	48.69–1.76
No. of reflections	205,845	237,064	279,569
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ <sup>b</sup>	0.150/0.190	0.171/0.212	0.158/0.195
Number of atoms	24,209	23,591	23,998
Amino acids	21,732	21,768	21,768
Ions	6	6	6
Ligands	36	60	72
Waters	2,423	1,752	2,139
B-factors (Å <sup>2</sup> )			
Amino acids	18.7	28.5	22.0
Ions	13.6	14.5	10.3
Ligands	44.4	26.8	23.6
Waters	25.3	31.67	28.7
RMSD from ideal values			
Bond lengths (Å)	0.010	0.009	0.011
Bond angles (°)	1.617	1.593	1.681
Ramachandran plot (%)			
Favored	95.6	95.3	95.4
Allowed	4.1	4.4	4.3
Outlier	0.3	0.3	0.3
PDB code	7V1V	7V1W	7V1X

非対称単位内には、 $D_3$  二面体対称の六量体構造が含まれていた。この六量体構造は、HPLC-SEC (2.2.3.1 節を参照) と PISA サーバー(70)から示唆された水溶液中のオリゴマー状態に対応していた。非対称単位を構成する各鎖は、すべての鎖ペア間の  $C\alpha$  原子の RMSD が  $0.15 \pm 0.03$  Å (15 ペアで最大  $0.19$  Å) であることから、実質的に同一の構造を持っていた。以降は特記のない限り Chain A について述べる。各モノマーは、 $\beta$ -jelly roll 1 (残基 3-200)、 $\beta$ -jelly roll 2 (201-396)、および C 末端の 51

アミノ酸長の  $\alpha$ -helix (397-448) から構成されており、構造全体を包み込んでいた (図 2-1-9)。2つの  $\beta$ -jelly roll ドメインは、CATH スーパーファミリー 2.60.120.1390 (protein of unknown function DUF2961) に相当していた(155)。モノマー全体の Dali 構造類似性検索(100, 101)により、 $\alpha$ FFase1 は、分子置換のテンプレートとして使用された機能未知タンパク質 BACUNI\_00161 に類似していることが示された (後述)。他にもファージのいくつかのキャプシドタンパク質と弱い構造類似性を示していた (Z score > 8.0)。各  $\beta$ -jelly roll ドメインを Dali サーバーで解析したところ、構造的な類似性を示す GH や CBM は存在しなかった (Z score < 8.0、表 2-1-3)。

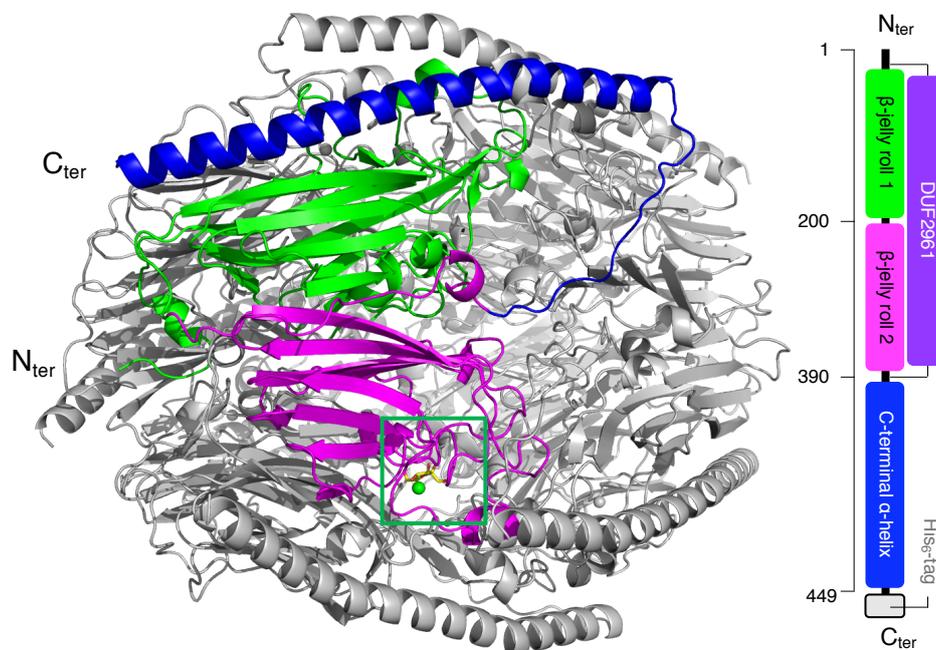


図 2-1-9.  $\alpha$ FFase1 の結晶構造。1つのプロトマーについて、 $\beta$ -jelly roll 1 (緑)、 $\beta$ -jelly roll 2 (マゼンタ)、そしてC-末端の  $\alpha$ -helix (青)と、ドメインごとに色分けしている。活性部位 (緑枠、図 2-1-10 参照) の、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンと  $\beta$ -D-Fruf (後述、図 2-1-10. A 参照) は、それぞれ緑と黄色で示す。右側にドメイン構造を示す。

#### 2.1.3.4. $\alpha$ FFase1 のリガンドとの複合体構造

$\alpha$ FFase1 と類似構造の比較から活性中心を特定するのは困難であった。そこで、リガンド存在下で結晶化を行い、複合体構造の取得を試みた。

D-Araf および D-Fruf についてはリガンドフリーと同じ結晶化条件で、リガンドの濃度を振ったところ、80 mM D-Araf と 20 mM D-Fruf を含んだ条件で得た結晶で、それぞれ分解能 1.86 Å と 1.76 Å の X線回折データセットを取得した (表 2-1-2)。

リガンドフリー構造を分子置換し、電子密度マップを探索したところ、 $\beta$ -jelly roll 2 と隣接する鎖の  $\beta$ -jelly roll 1 の狭間に  $\beta$ -D-Araf、そして  $\beta$ -D-Fruf に当たるマップが観察された (図 2-1-10. A-B)。糖の周囲残基から W267、D292、W298、そして隣接する鎖の Y187 によって活性中心の -1 サブサイトが形成されていると推定した。また、アノマー炭素との位置関係から E291 が求核性触媒残基、E270 が酸塩基性触媒残基であると考えた。また、 $\beta$ -D-Araf と  $\beta$ -D-Fruf は同じ形で活性中心に入っていた。Fruf は inulobiose と DFAI の部分アナログであるため、これら 2 糖も同様に活性中心に入り、 $p$ NP- $\alpha$ -D-Araf と類似した機構で加水分解されることが示唆された。脱水縮合反応については加水分解の逆反応によってなされていると考えられた。

表 2-1-3. Dali サーバーによる  $\alpha$ FFase1 類似構造の検索結果。N<sub>align</sub> : アラインメントされた残基数 ; %<sub>seq</sub> : 配列同一性

Protein	Source organism	PDB (chain)	Z score	RMSD (Å)	N <sub>align</sub>	% <sub>seq</sub>
<b>Full length (3-449)</b>						
Hypothetical protein BACUNI_00161	<i>Bacteroides uniformis</i>	4KQ7 (A)	42.3	2.0	335	36
Coat protein	<i>Sulfolobus turreted icosahedral virus 1</i>	2BBD (B)	13.9	4.0	249	7
Major capsid protein	<i>Enterobacteria phage PRD1</i>	1GW7 (A)	12.7	4.7	243	4
Major capsid protein P2	<i>Pseudoalteromonas virus PM2</i>	2W0C (C)	12.1	3.8	225	8
Major capsid protein	Bacteriophage sp.	5OAC (H)	10.3	4.4	222	8
Major capsid protein	Faustovirus	5J7O (F)	9.0	4.8	239	9
Major capsid protein	<i>Paramecium bursaria</i> Chlorella virus 1	5TIQ (B)	8.4	4.7	241	8
Rifampicin resistance protein	Vaccinia virus WR	3SAM (C)	8.2	5.0	238	5
Major capsid protein	Singapore grouper iridovirus	6OJN (B)	8.1	5.6	230	7
<b><math>\beta</math>-jelly roll 1 (3-200)</b>						
Hypothetical protein BACUNI_00161	<i>Bacteroides uniformis</i>	4KQ7 (A)	20.2	1.5	154	34
VP1	<i>Haloarcula hispanica icosahedral virus 2</i>	6H82 (B)	8.9	2.9	108	12
C381 turret protein	<i>Sulfolobus turreted icosahedral virus 1</i>	4IND (N)	8.8	6.6	109	7
Tripeptidyl-peptidase 2	<i>Drosophila melanogaster</i>	3LXU (X)	8.4	3.5	111	6
Transmembrane EMP24 domain-containing protein 10	<i>Mus musculus</i>	5GU5 (A)	8.1	2.5	93	10
GH84 O-GlcNAcase	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	5FL1 (A)	6.5	4.4	95	13
CBM61	<i>Thermotoga maritima</i>	2XOM (A)	6.5	3.2	105	9
<b><math>\beta</math>-jelly roll 2 (201-390)</b>						
Hypothetical protein BACUNI_00161	<i>Bacteroides uniformis</i>	4KQ7 (A)	25.5	2.2	180	39
GH86 $\beta$ -agarase BuGH86	<i>Bacteroides uniformis</i>	5TA1 (A)	5.6	4.0	108	627

糖の付近に金属イオンと思しき電子密度マップが観察され、配位や B-factor など考慮し CheckMyMetal(99)で解析した結果、Ca<sup>2+</sup>イオンである可能性が高いとされた (図 2-1-10. C)。Ca<sup>2+</sup>イオンは N272、T288 の主鎖、E270 の主鎖、隣接する鎖の N31 と D33、そして 2 つの水分子に配位していた。水分子の 1 つは  $\beta$ -D-Fruf の O5 原子とも水素結合しており、更に Ca<sup>2+</sup>酸塩基触媒残基である E270 の主鎖と相互作用していることから、この Ca<sup>2+</sup>イオンは  $\alpha$ FFase1 の酵素活性に間接的に関わっている可能性が示唆された。

Inulobiose と DFA I については、通常の結晶条件最適化に加え、タンパク質精製時に陰イオン交換クロマトグラフィーのステップを加えた精製純度の向上、リガンド濃度 (10-100 mM)、MMS (Nextal Biotechnologies の PEGs Suite、MPDs Suite を模した自作のキットを用いた)、触媒残基の変異体 E270A、および E291Q を結晶化させるなど、多岐に渡って検討を行った。その結果、様々な条件で良質な X 線回折像を示す結晶が 30 個ほど得られたが、構造解析した結果、リガンドと思しき電子密度マップは得られなかった。そこで  $\beta$ -D-Fruf 複合体のリガンドに DFA I の  $\alpha$ -D-Fruf と重ね合わせて周囲残基を観察したところ、新しく隣接鎖の E85 と K147 が推定される +1 サブサイトを形成する残基の候補として挙げられた。また、-1 サブサイトの Fruf と水素結合する W267 が +1 サブサイトにてスタッキングするように見えた (図 2-1-10. D)。

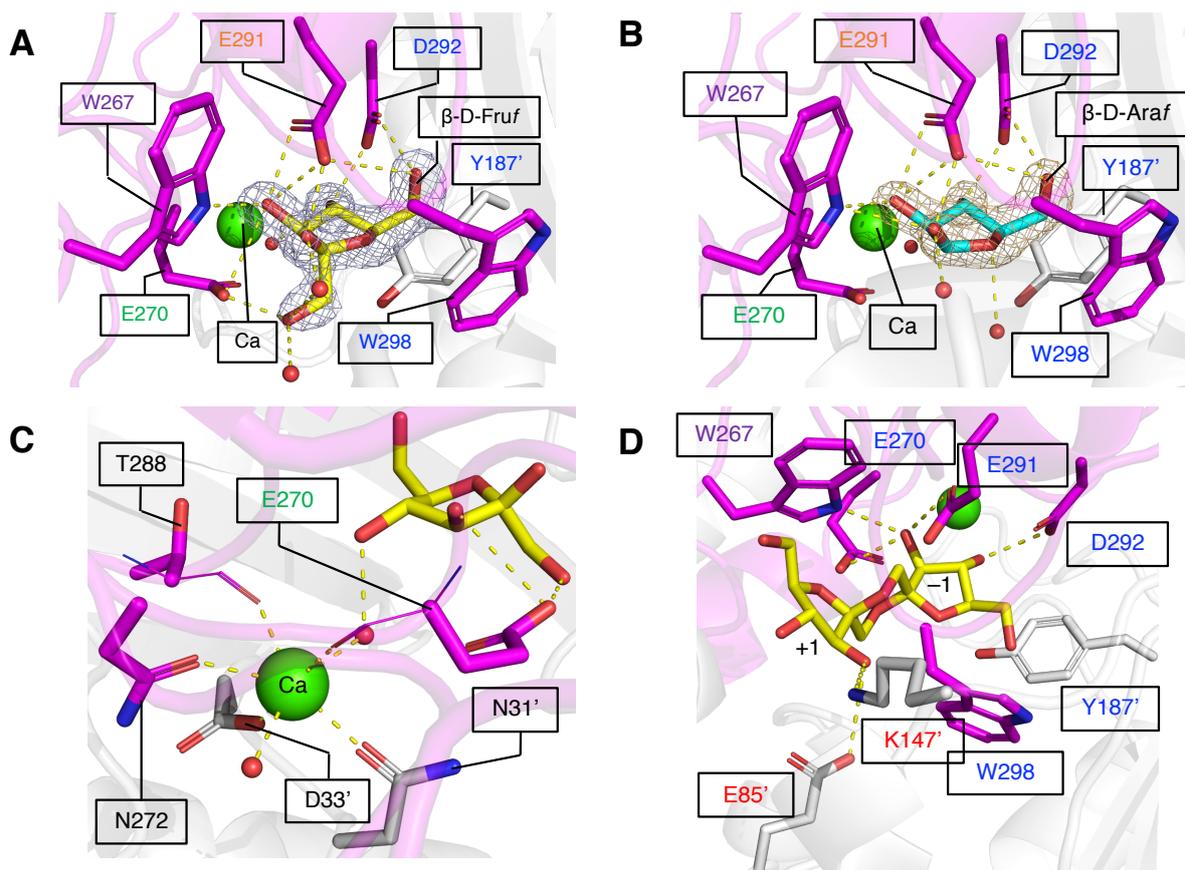


図 2-1-10.  $\alpha$ FFase1 の活性中心。A-B.  $\beta$ -D-Fruf (A, 黄) および  $\beta$ -D-Araf (B, シアン) との複合体の活性部位構造。 $\beta$ -D-Fruf (7.0 $\sigma$ ) と  $\beta$ -D-Araf (8.0 $\sigma$ ) のポルダーマップを青または黄のメッシュで示す。E291 と E270 は、それぞれ触媒の求核性触媒残基と酸塩基性触媒残基であることが示唆されている。C.  $\beta$ -D-Fruf 複合体の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位。 $\text{Ca}^{2+}$  の配位に関与する主鎖基は細いスティックで示す。酸塩基性触媒残基 (E270) の主鎖のカルボニル基が  $\text{Ca}^{2+}$  配位に関与している。D. 活性部位の DFA I 分子をモデル化したもの。パネル A-D では、A 鎖と隣接するサブユニットのタンパク質残基を、それぞれマゼンタと白で示す。また、-1 サブサイトと+1 サブサイトを構成するタンパク質残基は、それぞれ青字と赤字で示す。W267 は-1 サブサイトと+1 サブサイトの両方を形成しており、紫字で示している。E291 (求核性触媒残基) と E270 (酸塩基性触媒残基) は、それぞれオレンジと緑の文字で示す。

### 2.1.3.5. 金属キレーション剤の $\alpha$ FFase1 活性への影響

活性中心付近の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが  $\alpha$ FFase1 の酵素活性に関与しているのか検証するべく、EDTA で  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを脱離させて、TLC で *p*NP- $\alpha$ -D-Araf と inulobiose に対する活性への影響を観察した。残存活性による偽陽性検出を避けるため、反応時間を 2 時間まで短縮して TLC を行なった。EDTA の濃度を 1 から 100 mM まで振ったが、いずれの条件でも顕著な酵素活性が見られた (図 2-1-11. A)。 $\text{Ca}^{2+}$  イオンに配位している周囲残基の関係から、EDTA では  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを脱離できない可能性が示唆された。

### 2.1.3.6. $\alpha$ FFase1 の金属阻害

先行研究により  $\alpha$ FFase1 の至適温度、至適 pH がそれぞれ 50 $^{\circ}\text{C}$  と 5.5 であることが明らかになっていたが、金属イオンによる阻害は検証されていなかった。そこで  $\alpha$ FFase1 を 1 mM の 2 価イオンと 24 時間、4 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした後に inulobiose と反応させたところ、 $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  で反応が阻害されることがわかった。他の 2 価イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) では活性の顕著な阻害は見られなかった (図 2-1-11. B)。

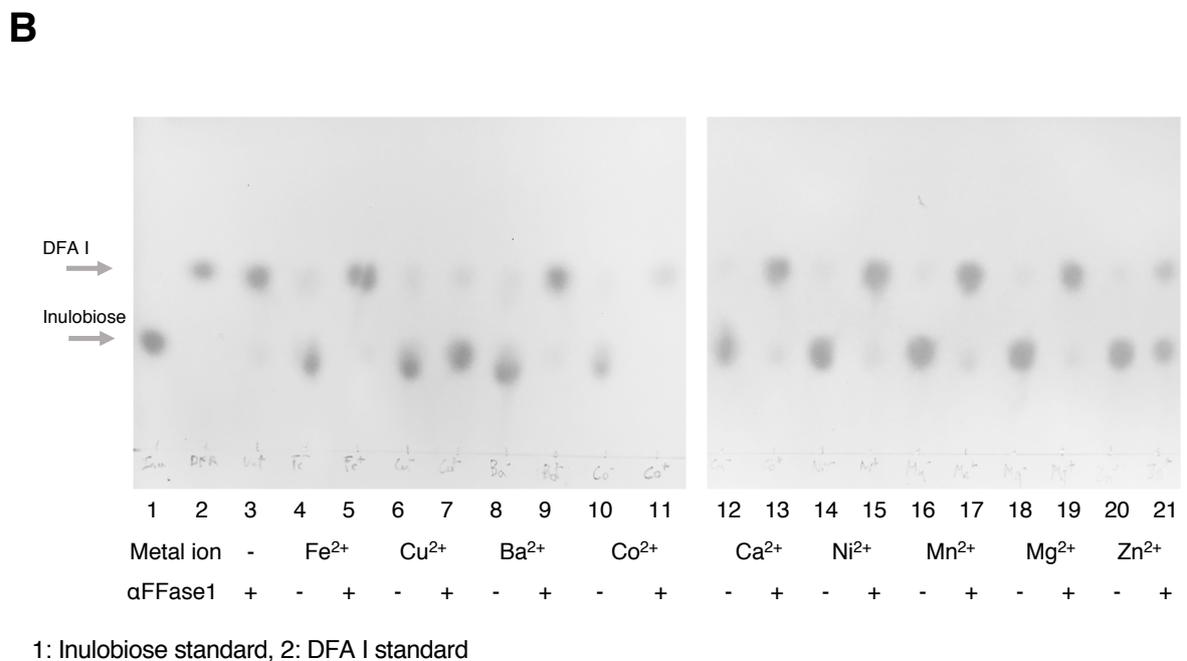
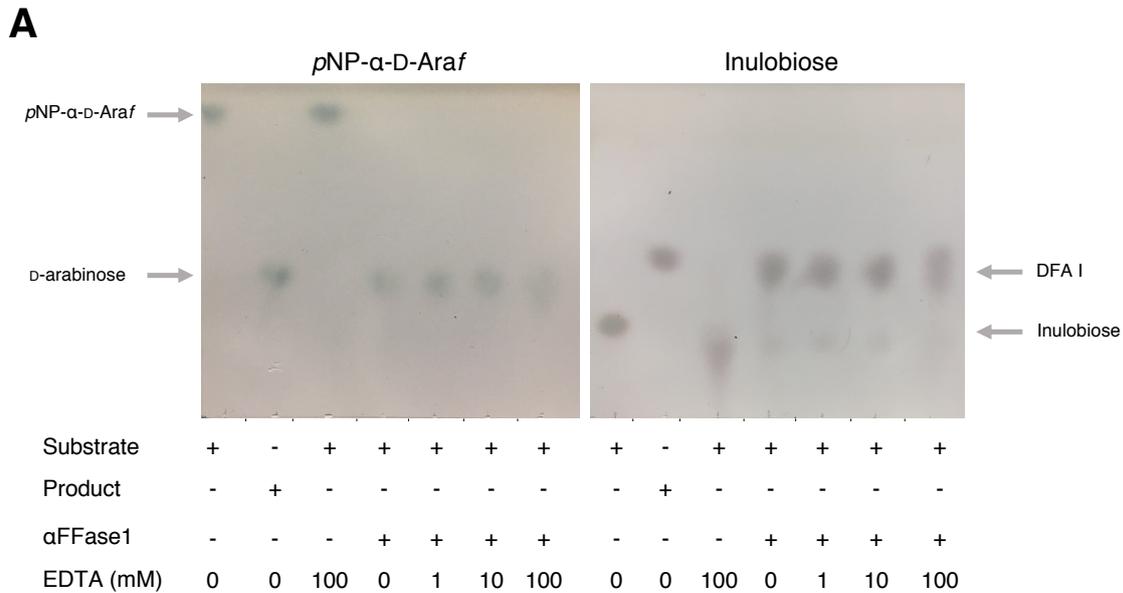


図 2-1-11. A. EDTA による *pNP- $\alpha$ -D-Araf* (左) と inulobiose (右) に対する活性の阻害の有無を示した TLC。B. 2 価イオンによる inulobiose に対する活性の阻害の有無を示した TLC。

### 2.1.3.7. 変異体活性測定

構造解析から特定した活性中心の残基の、活性における重要性を検証するべく、部位特異的変異導入を行った。目的残基を Ala あるいは近しい構造のアミノ酸 (Glu→Gln、Asp→Asn、Tyr→Phe) に置換されるように変異を加え、野生型と同様に BL21 (DE3) に形質転換し、少量で発現誘導をかけた。その結果、目的の変異体の発現がほとんど見られなかった。これは発現株 BL21 Star (DE3) に替えることでクリアした。培養スケールを 150 mL に設定し、異種発現、精製を経て、10 種類の  $\alpha$ FFase1 変異タンパク質を獲得した (図 2-1-11)。取得を目指した変異体の内、W267A、E270Q、E291A については発現が弱く、以降の実験には十分量が得られなかった。

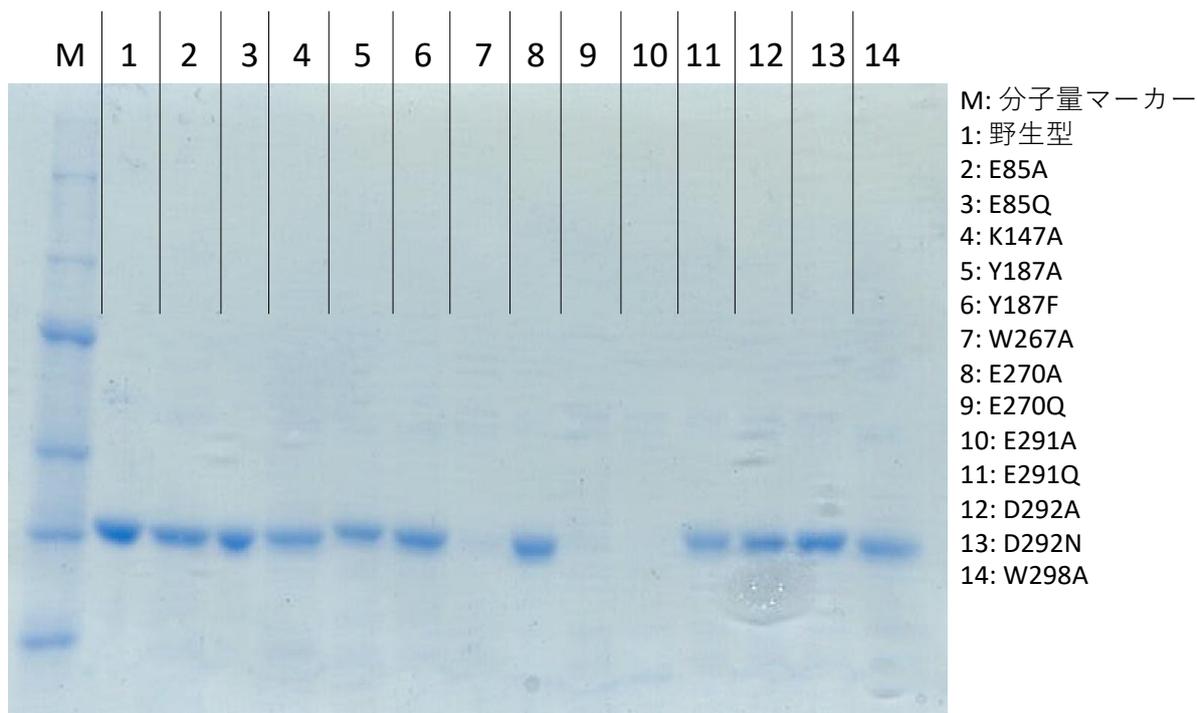


図 2-1-12. 精製後の各変異体の SDS-PAGE

これらの変異体を用いて 2.1.3.1 と同様に、*pNP-α-D-Araf* は  $K_m$  値付近の 2.5 mM、*inulobiose* は 10 mM に濃度を固定して活性測定を行い、野生型に対する相対活性を求めた (図 2-1-13)。触媒残基に関しては、E270A と E291Q 変異体で有意に活性が低下した。また、-1 サブサイトの変異体のほとんどは、両方の基質に対して非常に低い活性を示した。Tyr187 の変異体では、Phe に保存的に置換したもの (Y187F) は活性を維持したが、アラニンに置換したもの (Y187A) ではほとんど活性が見られなかった。W298A は比較的高い活性を示したが、これは W298 の側鎖が -1 サブサイトの形成に直接関与していないためであると考えられる。サブサイト +1 の変異体では、2 つの基質に対する活性に注目すべき違いが見られた。3 つの変異体 (E85A、E85Q、K147A) は、*pNP-α-D-Araf* に対しては野生型とほぼ同等の活性を示したが、*inulobiose* に対しては 5% 以下の活性しか示さなかった。これは、これらの残基が DFAI の β-D-Fru<sub>6</sub> 部分の +1 サブサイトへの正しい結合をサポートしていることを反映していると考えられる。

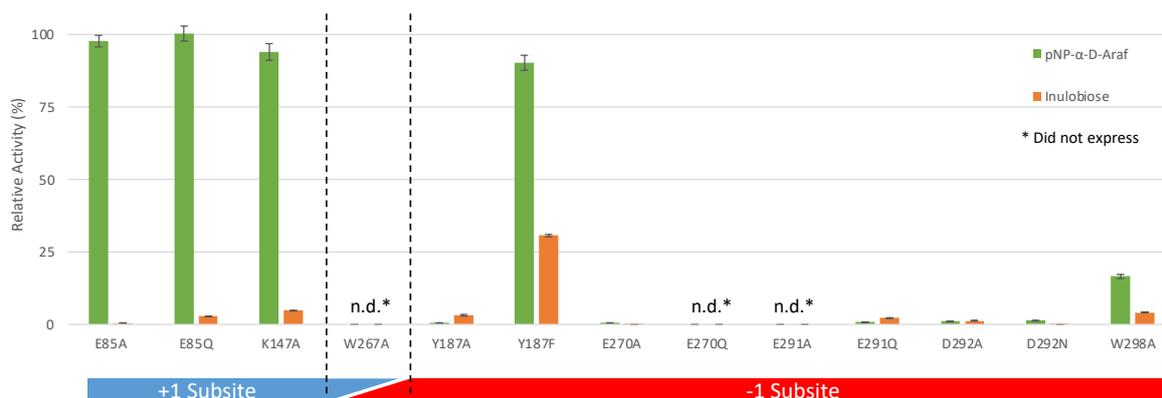


図 2-1-13. αFaseI 変異体の *pNP-α-D-Araf* (緑) と *inulobiose* (オレンジ) に対する野生型との相対活性。下部で各残基に該当するサブサイト (+1 サブサイトは青、-1 サブサイトは赤) を示す。

### 2.1.3.8. 分子動力学シミュレーション

図 2-1-14. A で示す  $\alpha$ Fase1 と  $\beta$ -D-Fruf 複合体構造の断面図を見ると、活性部位は分子内部にあり、大きな内部空洞へのチャンネルが存在するのがわかる。 $\alpha$ Fase1 の動的な特徴を調べるべく、 $\beta$ -D-Fruf 複合体構造を基に inulobiose や DFA I との複合体構造をモデル化し、MD シミュレーションを 1  $\mu$ s 行った。シミュレーションには、鎖 A-F の 6 量体構造を用いて、各活性部位のリガンドをモニターした。A、B、D、E、F 鎖の活性部位にある  $\beta$ -D-Fruf 単糖は、-1 サブサイトと +1 サブサイトの間を行き来した。これらのサブサイトでは、アノマーの C2 原子と求核性触媒残基の間の距離はそれぞれ 3.5Å と 5.0Å であった (図 2-1-15. A)。C 鎖の  $\beta$ -D-Fruf 分子は、400~700ns の間に活性部位から内部空洞へのチャンネルを通して抜け出した (図 2-1-14. B)。F 鎖と D 鎖の inulobiose 分子は、それぞれ 250 ns、930 ns の時点で移動したが、他の鎖の inulobiose 分子は活性部位に留まっていた (図 2-1-15. B)。同様に、C、E、A 鎖の DFA I はそれぞれ 320、550、850 ns の時点で移動したが、他の鎖の DFA I は正規の位置に留まっていた (図 2-1-15. C)。MD シミュレーションの結果、リガンド分子の周りには多くの水分子が存在することがわかった。平均して、7~9 個の水分子がリガンドの 3.5 Å 以内に存在していた (図 2-1-14. C-D)。

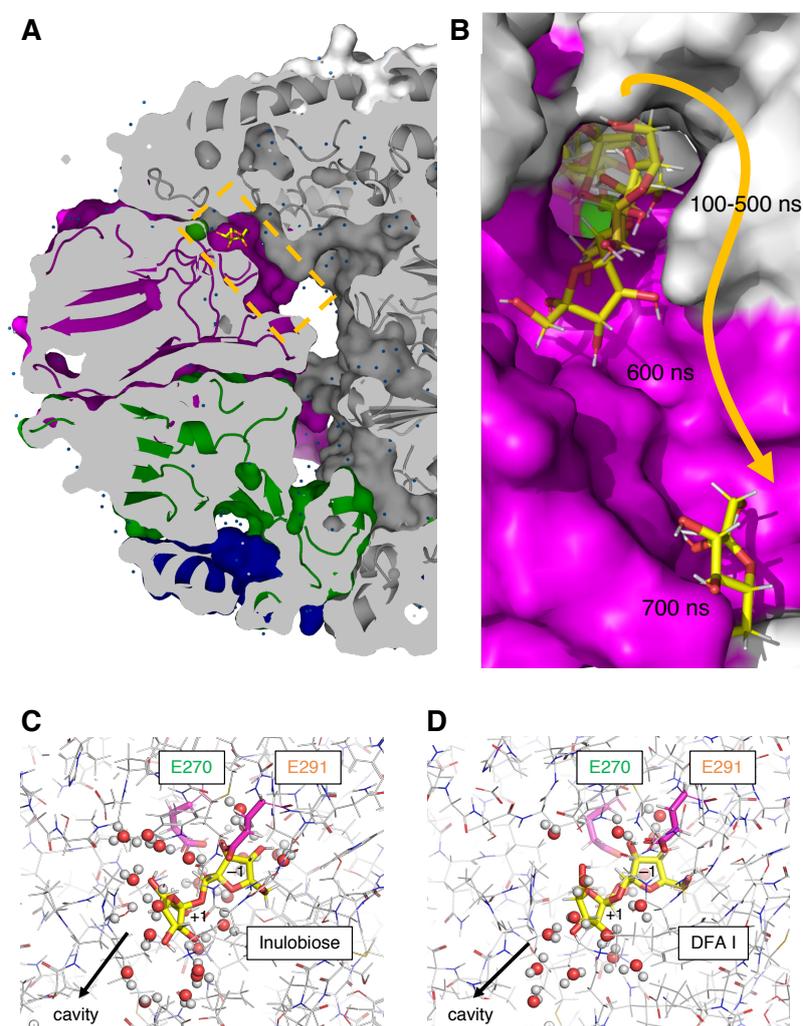


図 2-1-14. 6 量体構造内部の活性部位ポケットと MD 解析。A.  $\beta$ -D-Fruf と複合体を形成した活性部位の断面図。内部空洞へのチャンネルはオレンジの破線で示す。B. MD を実行する際にサブユニット C の活性部位から  $\beta$ -D-Fruf が脱離する様子。100~700 ns のスナップショットを示す。C-D. Inulobiose のサブユニット A (C) および DFA I のサブユニット B (D) の活性部位の 1  $\mu$ s でのスナップショット。5Å 以内の水分子は球で示す。触媒残基の側鎖はマゼンタで示す。

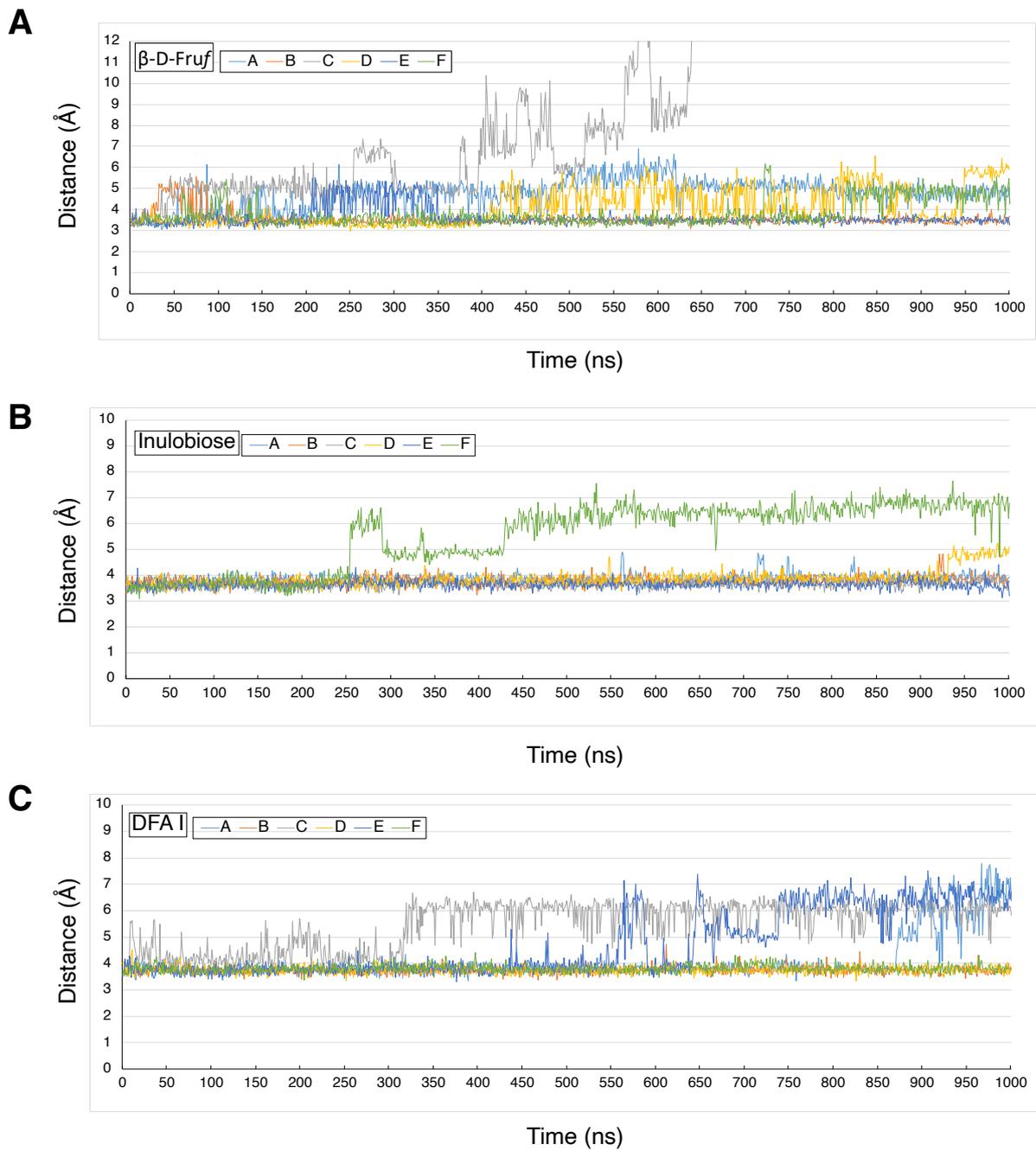


図 2-1-15. MD シミュレーション中の活性部位における配位子の安定性。β-D-Fruf (A)、inulobiose (B)、DFA I (C) との複合体の MD シミュレーション中の、-1 サブサイトの D-Fruf のアノマー炭素 (C2 原子) と E291 (求核性触媒残基) 側鎖の最近接酸素原子との距離の時間変化を、各鎖ごとにプロットした。

## 2.1.4. 考察

### 2.1.4.1. $\alpha$ FFase1 の分子機能

$\alpha$ FFase1 が  $\alpha$ -D-fructofuranosidase 活性を有すること、アノマー保持型反応機構で加水分解反応を触媒すること、結晶構造の-1 サブサイト中でフラノース環が観察されたことから、 $\alpha$ FFase1 による inulobiose から DFA I への環化反応は加水分解の逆反応によって触媒されることが最も現実的であると考え、反応機構を提唱した (図 2-1-16)。(i) Inulobiose の還元末端糖は溶液中で、変旋光によりフラノース/ピラノースおよび  $\alpha$ /アノマー型に変化する。(ii)  $\alpha$ FFase1 の活性サイトは、図 2-1-10. D に示すように、 $\alpha$ -フラノース型を-1 サブサイトに選択的に収容する。また、+1 サブサイトには、D-Fru<sub>p</sub>-2,1-D-Fru のピラノース部分も収容できる (図 2-1-1. C)。E270 は-1 サブサイトにある  $\alpha$ -D-Fru<sub>f</sub> の 2 位のヒドロキシ基へのプロトン供与 (一般酸性触媒作用) に適した位置に、E291 はアノマー炭素 (C2) に求核性触媒残基として働く位置にある。この後、2 位のヒドロキシ基は水分子として基質から放出される。(iii) 分子内転移反応が起こるためには、+1 サブサイト糖のグリコシド結合と C1-C2 結合の回転が必要である。(iv) +1 サブサイトの Fru の 1 位のヒドロキシ基が E270 のプロトン受容 (一般塩基性触媒作用) に適した位置にあると、E291 の脱グリコシル化が促進される。(v) 活性部位での反応後、DFA I はチャンネルを通して  $\alpha$ FFase1 の 6 量体の内部キャビティに放出される (図 2-1-14. A-B)。DFA I と inulobiose の間の順方向と逆方向の反応には、それぞれ水分子の遊離 (縮合) と取り込み (加水分解) が含まれる。MD 解析の結果では、基質は常に水分子に囲まれていた。平衡反応は基質・生成物ペアの比率によって進行方向が変わるが、活性ポケット中にリガンド以外に水分子が多量に入ることから、水分子が存在しても脱水縮合 (水分子の生成) が進み得ることがわかった (図 2-1-14. C-D)。Ca<sup>2+</sup>イオンは、水分子と酸塩基性触媒残基 E270 の主鎖を介した相互作用によって  $\alpha$ FFase1 の基質結合をサポートしている (図 2-1-10. C)。酵素の反応触媒や構造維持に Ca<sup>2+</sup>イオンが直接、あるいは間接的に関与していることは珍しくない。GH の場合、GH13 の  $\alpha$ -amylase に代表されるように、Ca<sup>2+</sup>イオンがタンパク質の安定化に寄与することが多い(156)。他にも GH43  $\alpha$ -L-arabinanase(157)、GH62  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase(158)、GH47 および GH92  $\alpha$ -mannosidase(159, 160)、GH97  $\alpha$ -glucosidase(161)、GH129  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase(162)などがある。 $\alpha$ FFase1 の場合でも、EDTA 処理による酵素の失活が見られなかったものの、Ca<sup>2+</sup>が構造維持や活性に関わる可能性は否めない。

### 2.1.4.2. 新しい GH ファミリーの設立

本研究では、先行研究で真菌での存在が報告されていた DFA I 合成酵素/加水分解酵素の細菌遺伝子を同定した(163, 164)。イヌリンから DFA III と DFA I を生成する酵素 (DFA III- and DFA I-forming inulin fructotransferases) と DFA III hydrolase は、アノマー反転型 GH ファミリー (GH91) に分類されている。DFA III hydrolase は見かけ上、DFA III の  $\alpha$ -D-Fru<sub>f</sub> 結合を切断するが、反応生成物は還元末端に-Fru<sub>f</sub>を持つ inulobiose である。GH91 ファミリーの酵素は、PL 様の機構で-Fru<sub>f</sub>結合に作用する(141, 142)。したがって、 $\alpha$ FFase1 (DFA I synthase/hydrolase) は、GH91 の PL 様アノマー反転型酵素や GH32 の DFA IV-forming levan fructotransferases とは反応が異なる、ユニークなアノマー保持型  $\alpha$ -D-fructofuranosidase である。

$\alpha$ FFase1 は、Pfam データベースの DUF2961(PF11175)ファミリーに属している(165)。*Bacteroides uniformis* 由来の DUF2961、BACUNI\_00161 の結晶構造 (PDB ID: 4KQ7) が構造ゲノミクスプロジェクトの一環で解かれて PDB に公開されているが、この構造から DUF2961 に関する機能的な情報は得られていない。 $\alpha$ FFase1 は、GHに限らず、既知の酵素と配列同一性も構造類似性を示さない。本研究の結果に基づき、CAZy では新しく GH172 ファミリーが設立された (<http://www.cazy.org/GH172.html>)。

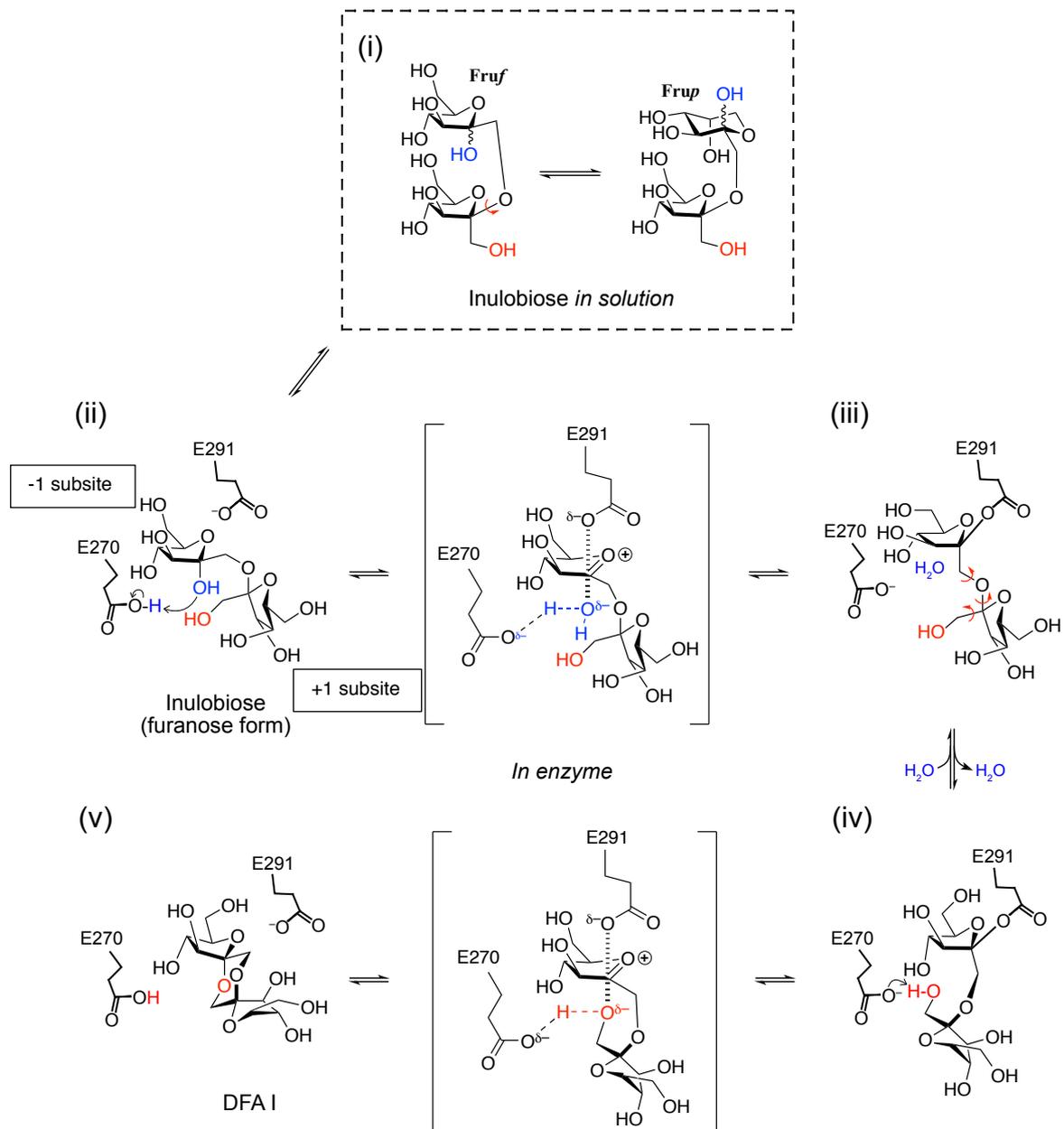


図 2-1-16.  $\alpha$ Fase1 による inulobiose から DFA I への反応機構案。リガンドのコンホメーション変化（赤矢印で示す結合回転）は、活性部位に収まるため、そして脱グリコシル化ステップでの求核攻撃に必須である。

### 2.1.4.3. $\alpha$ Fase1 の代謝における役割の可能性

$\alpha$ Fase1 は  $\alpha$ -D-fructofuranosidase と  $\alpha$ -D-arabinofuranosidase の両方の活性を持っていた。植物の糖鎖に含まれる Araf は L-異性体のみであり、 $\alpha$ -D-Araf はほとんど見られない。例えば、結核菌(166)や *Corynebacterium* 属(167)の細胞壁多糖、*Pseudomonas aeruginosa*(168)のピリン、*Stenotrophomonas maltophilia*(169)のリポポリサッカライド O-抗原などに  $\alpha$ -D-Araf が含まれていることが報告されている。*B. dentium* がヒトの口腔内のプラークや齲蝕(170)、高齢者の糞便(171)から頻りに単離されることを考えると、 $\alpha$ Fase1 の天然基質は、ヒトの食生活に存在する  $\alpha$ -D-Fruf (DFA、DHL) またはジフルクトース化合物 (inulobiose、D-Frup-2,1-D-Fru) であると推測される。酸性イオン交換クロマトグラフィーでの解析によると、D-Fru のカラメル化反応の主な生成物は、DHL II と DFA I である(172)。虫歯や歯垢から分離された *B. dentium* 株はイヌリンを資化せず(170)、代表的な *Bifidobacterium* 5 種 (*B. adolescentis* JCM 1275, *B. longum* JCM 1217, *B. breve* JCM 1192, *B. pseudocatenulatum* JCM 1200, *B.*

*catenulatum* JCM 1194) は *in vitro* で DFA III を利用しなかった(173)。しかし、*B. dentium* JCM 1195 は DFA I を糖質源に生育できることが判明した(鹿児島大学 藤田清貴准教授ら、未発表資料より)。 $\alpha$ FFase1 は、N 末端に分泌シグナル配列を持たないことから、細胞内酵素である可能性が高い。ゲノム上では  $\alpha$ FFase1 の遺伝子は GH32 遺伝子 (BBDE\_2039) ABC トランスポーター遺伝子 (BBDE\_2041-2043) と隣接している(図 2-1-17) ことから、DFA I は菌体内に取り込まれ、 $\alpha$ FFase1 と BBDE\_2039 遺伝子産物(あるいは BBDE\_1523 など、他の GH32) が協調的に働くことで環状糖を単糖に切断している可能性がある。

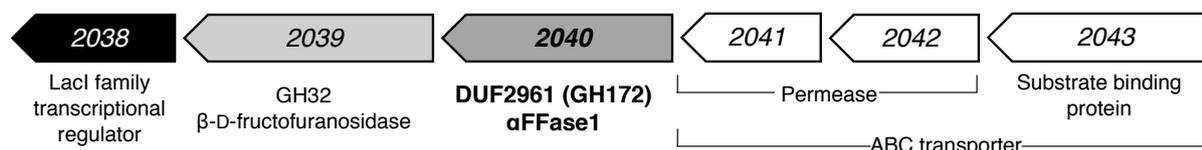


図 2-1-17. *B. dentium* JCM 1195 のゲノムにおける  $\alpha$ FFase1 (BBDE\_2040) とその周辺遺伝子の構成。数字は locus tag (BBDE\_XXXX) に対応する。

#### 2.1.4.4. 微生物における DFA の代謝経路

環状グルコオリゴ糖(シクロデキストリン、環状マルトシル- $\alpha$ 1,6-マルトース、シクロアルテルナンなど)の微生物による代謝は、多くの場合、多糖類を特殊な環状形態に一過性に変化させることで、デンプン獲得競争において有利に働く独占的な代謝経路の一部となっている(174-178)。このような代謝経路は、細胞外酵素による細胞外での環状オリゴ糖の合成、トランスポーターによる細胞膜を越えた取り込み、そして細胞内酵素による分解という3段階で成り立っている。*Arthrobacter ureafaciens* や *Arthrobacter* sp.H65-7 では、細胞外の DFA III-forming inulin fructotransferase と細胞内の DFA III hydrolase による DFA III を介したイヌリンの3段階の代謝経路の存在が示唆されている(136, 179-183)。DFA I に関しては、*Streptomyces davawensis* JCM 4913 が細胞外に GH91 DFA I-forming inulin fructotransferase (BN159\_0187) を持っている(184)。ゲノム中には、細胞内 DFA I synthase/hydrolase (B159\_0193;  $\alpha$ FFase1 と並列同一性 51.4%)と GH32 -D-fructofuranosidase (BN159\_0194)の推定遺伝子が存在しており、*S. davawensis* は DFA I を介した3段階の代謝経路でイヌリンを利用していると考えられる。口腔内細菌や腸内細菌の  $\alpha$ -D-Fruf 含有糖類の代謝系は、人類が火を使って調理をするようになってから出現したのかもしれない。この代謝システムは、*B. dentium* によるむし菌の発生に関与している可能性がある(185)。今後は、 $\alpha$ FFase1 が関与する *B. dentium* の代謝経路と、細菌の生理機能との関連の研究を進めていく必要がある。

#### 2.1.4.5. 微生物ゲノムにおける $\alpha$ FFase1 ホモログの存在

$\alpha$ FFase1 のホモログの系統解析を行った。触媒ポケット残基が保存されている、現在入手可能な微生物ゲノム中のホモログを手動で選択したところ、Sequence identity > 47.45%、Sequence coverage > 79%、e-value <  $5.0 \times 10^{-128}$  の配列が 120 得られた(図 2-1-18)。系統樹では、主に土壌、植物、哺乳類の腸内から単離された異なるクラスの細菌で構成されていた。これは、 $\alpha$ FFase1 のホモログが野菜のフルクトースポリマーの代謝に関与している可能性と一致している。真菌のゲノムから得られた 16 配列は、細菌とは比較的離れたクレードを構成していた。BBDE\_2040 と 48.6%の配列同一性を持つ *Aspergillus fumigatus* Af293 由来の AFUA\_5G00510 (XP\_748288.1)は、この真菌クラードに含まれており、1980年代に研究された *A. fumigatus* の DFA 合成酵素に対応していることが示唆された(163, 164)。 $\alpha$ FFase1 のホモログは、ビフィズス菌やクロストリジウムクラス (*Dorea*, *Clostridium*, *Faecalimonas*, *Coprococcus*, *Eubacteriales*, *Ruminococcus*) の常在腸内細菌の間で高度に保存されている。これは、カラメル糖を利用するために、DFA I synthase/hydrolase を含む未知の代謝経路がヒト腸内細菌に存在することを示唆している。

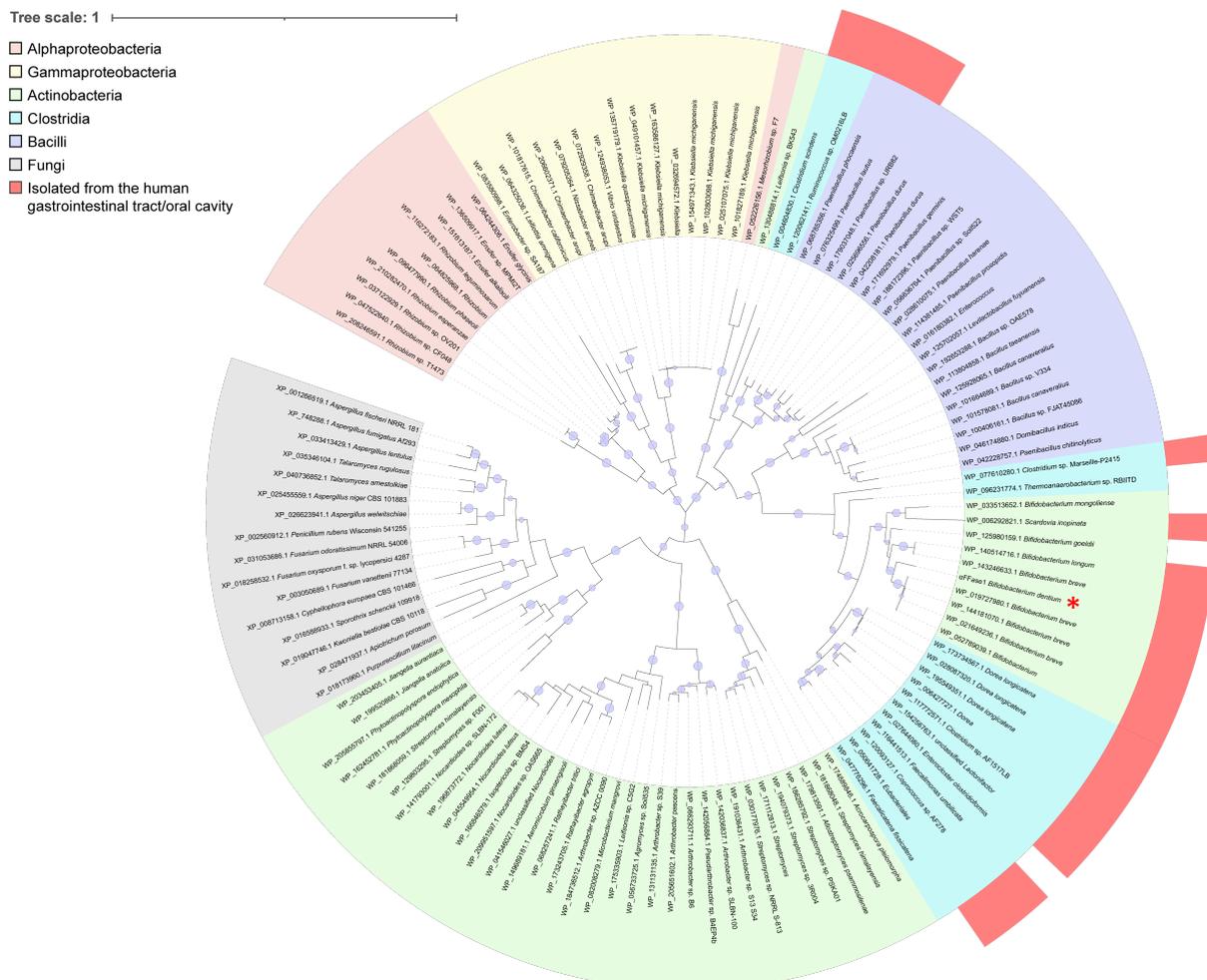


図 2-1-18.  $\alpha$ Fase1 とその近縁のホモログの系統樹。 $\alpha$ Fase1 は赤いアスタリスクで示す。青丸は Maximum-Likelihood 解析時の Bootstrap の頑健性 (Robustness, 50~100%) を示す。

系統樹を  $\alpha$ Fase1 と同様の活性を示すであろうタンパク質に限定して作製したため、最終的に配列同一性や e-value の閾値が高く設定された。 $\alpha$ Fase1 の構造解析の一環で分子置換テンプレートとして用いられた BACUNI\_00161 は配列同一性が低いため、この系統樹には含めなかった。BACUNI\_00161 の C 末端の  $\alpha$ -helix は、2つの三量体を連結して六量体を形成しており (図 2-1-19. A)、そのオリゴマー構造は  $\alpha$ Fase1 とは明らかに異なっている (図 2-1-9)。BACUNI\_00161 の -1 サブサイト推定残基は、2つの触媒グルタミン酸残基を含めて、 $\alpha$ Fase1 とで保存されている (図 2-1-19. B-C)。しかし、Cys304 は -1 サブサイトの Fruf の O2 原子と衝突しているように見え、推定上の +1 サブサイトの残基は保存されていないことから、BACUNI\_00161 は DFA I synthase/hydrolase ではないと考えられる。 $\alpha$ Fase1 は構造内に  $\text{Ca}^{2+}$  が配位しているのに対し、BACUNI\_00161 では  $\text{Na}^{+}$  が当該部位に配位しているようにモデルが作成されている。しかし、他の部位で  $\text{Na}^{+}$  が異様に連なっている点や構造ゲノミクスの一環で解かれた構造であることから、BACUNI\_00161 の結晶構造中の金属イオンの同定には疑わしい節があり、 $\text{Na}^{+}$  が本当に結合しているのか定かではない。

同様に、*Microbacterium arabinogalactanolyticum* 由来の鏡像体アラビナン分解酵素の一つである ExoMA1 (2019 年度修士課程修了、中島千穂 修士論文より) は  $\alpha$ Fase1 と配列同一性 30.42% (Sequence coverage: 73%, e-value:  $5 \times 10^{-40}$ ) を示す遠縁ホモログである (私はこの ExoMA1 の結晶構造位相決定に一役買っている)。ExoMA1 は C 末端に  $\alpha$ -helix を有しておらず、代わりに jelly roll ドメインのループが相互作用することで、水溶液中で 12 量体の三角錐様 (四面体) の構造を形成する (図 2-1-20. A)。ExoMA1 の -1 サブサイト推定残基は、2つの触媒グルタミン酸残基を含めて、 $\alpha$ Fase1 のものと保存されている (図 2-1-20. B)。しかし、N253 と DFA I の  $\beta$ -D-Fruf とでは物理障壁が生じる可能性があるため、ExoMA1 は DFA I synthase/hydrolase ではないと考えられる。また実験的

にも ExoMA1 は  $\alpha$ -D-fructofuranosidase を持っていないことが解っている（藤田清貴、隅田泰生、特開 2019-017358 より）。

この様に  $\alpha$ FFase1 の遠縁ホモログを解析することで新たな基質特異性を持った酵素を発見することができる。以降の研究については第 2 章で述べる。

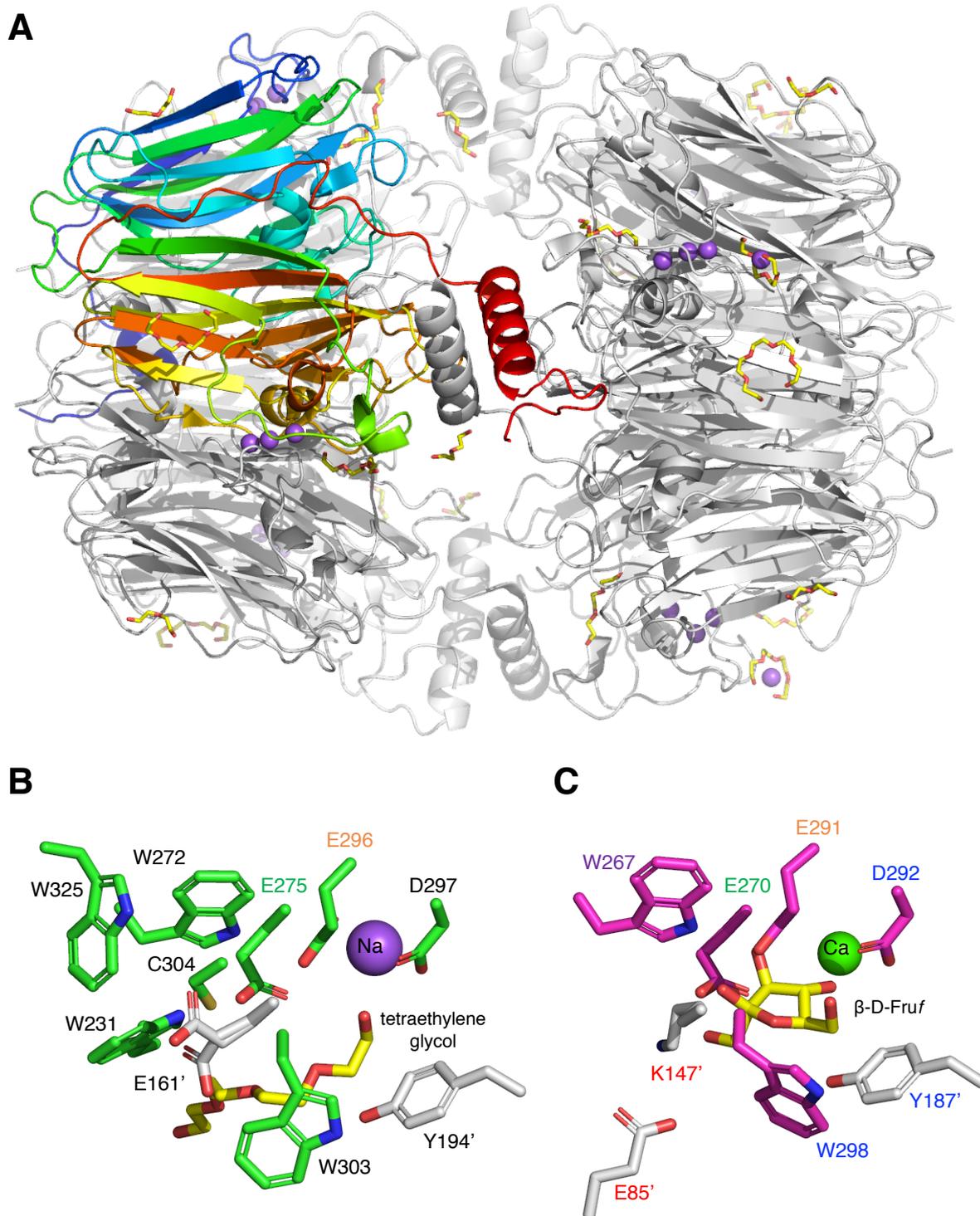
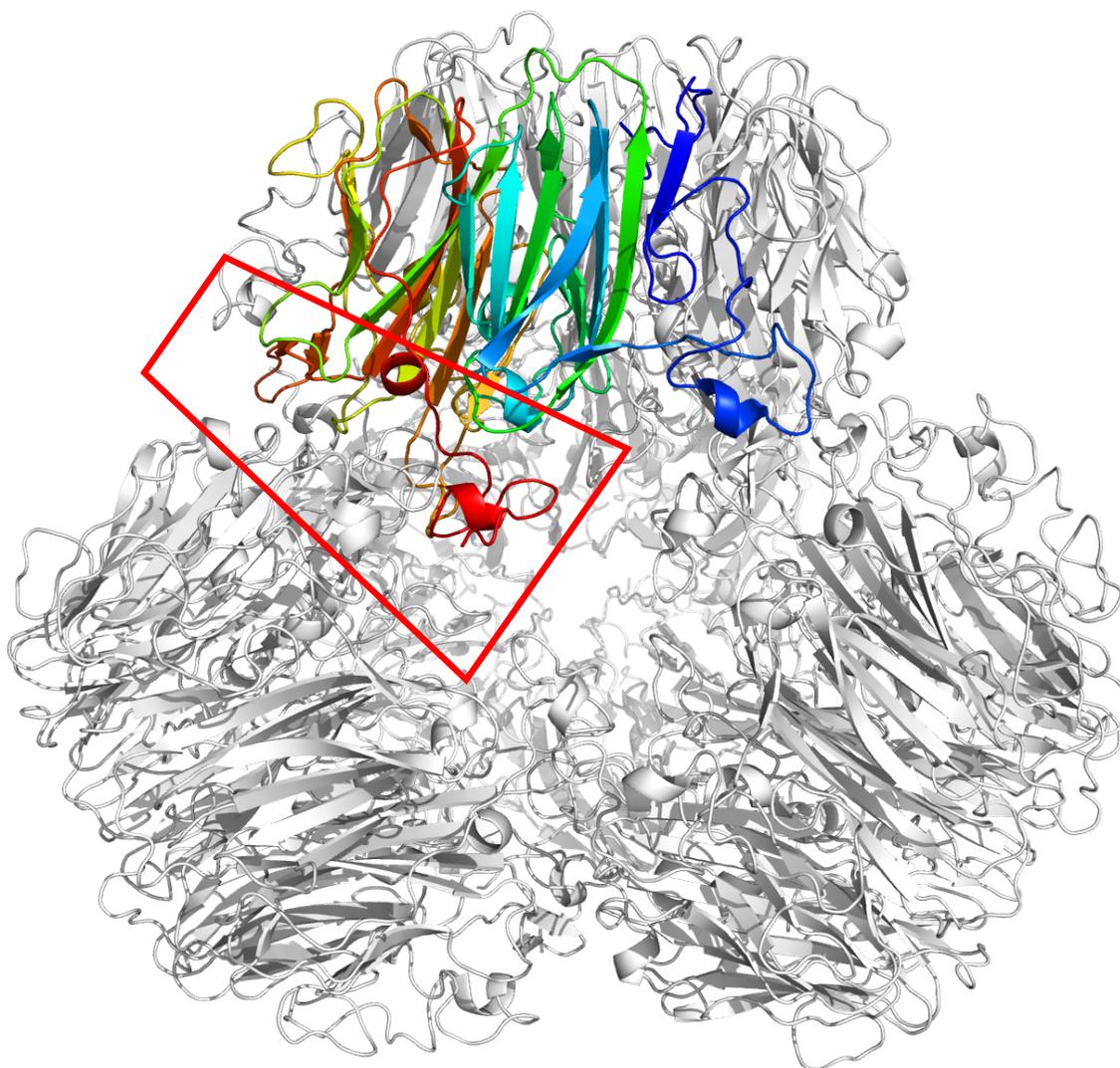


図 2-1-19.  $\alpha$ FFase1 と BACUNI\_00161 の構造比較。A. BACUNI\_00161 の 6 量体構造を結晶学的な対称性を考慮して作製したもの。1 つのプロトマーについて、レインボー（N 末端は青、C 末端は赤）で示す。結合したポリエチレングリコール分子と  $\text{Na}^+$  イオンは、それぞれ黄色と紫で示す。B. BACUNI\_00161 の想定される活性部位。C. 比較のための  $\alpha$ FFase1 の活性部位。隣接するプロトマーの残基は白で示す。



A



B

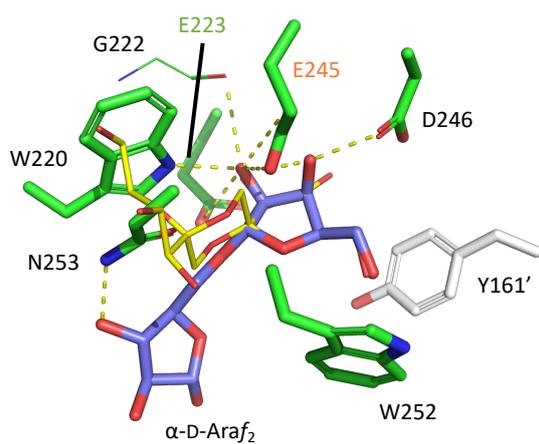


図 2-1-20.  $\alpha$ FFaseI と ExoMA1 の構造比較。A. ExoMA1 の 12 量体構造。1 つのプロトマーについて、レインボー (N 末端は青、C 末端は赤) で示す。プロトマー間の相互作用に関わる  $\beta$ -jelly roll のループ領域を赤枠で示す。B. ExoMA1 の推定される活性部位。ExoMA1 の基質である  $\alpha$ -D-Araf<sub>2</sub> (青) は、 $\alpha$ FFaseI の  $\beta$ -D-Fruf 複合体との重ね合わせを基にモデル内にはめ込んだ。また非還元末端側の  $\alpha$ -D-Araf に DFAI (黄) の  $\alpha$ -D-Fruf を重ね合わせた。隣接するプロトマーの残基は白で、G222 のアミノ酸主鎖を細いスティックで、推定される水素結合を破線で示す。

最後に図 2-1-21 に本研究の実験フローチャートを示す。

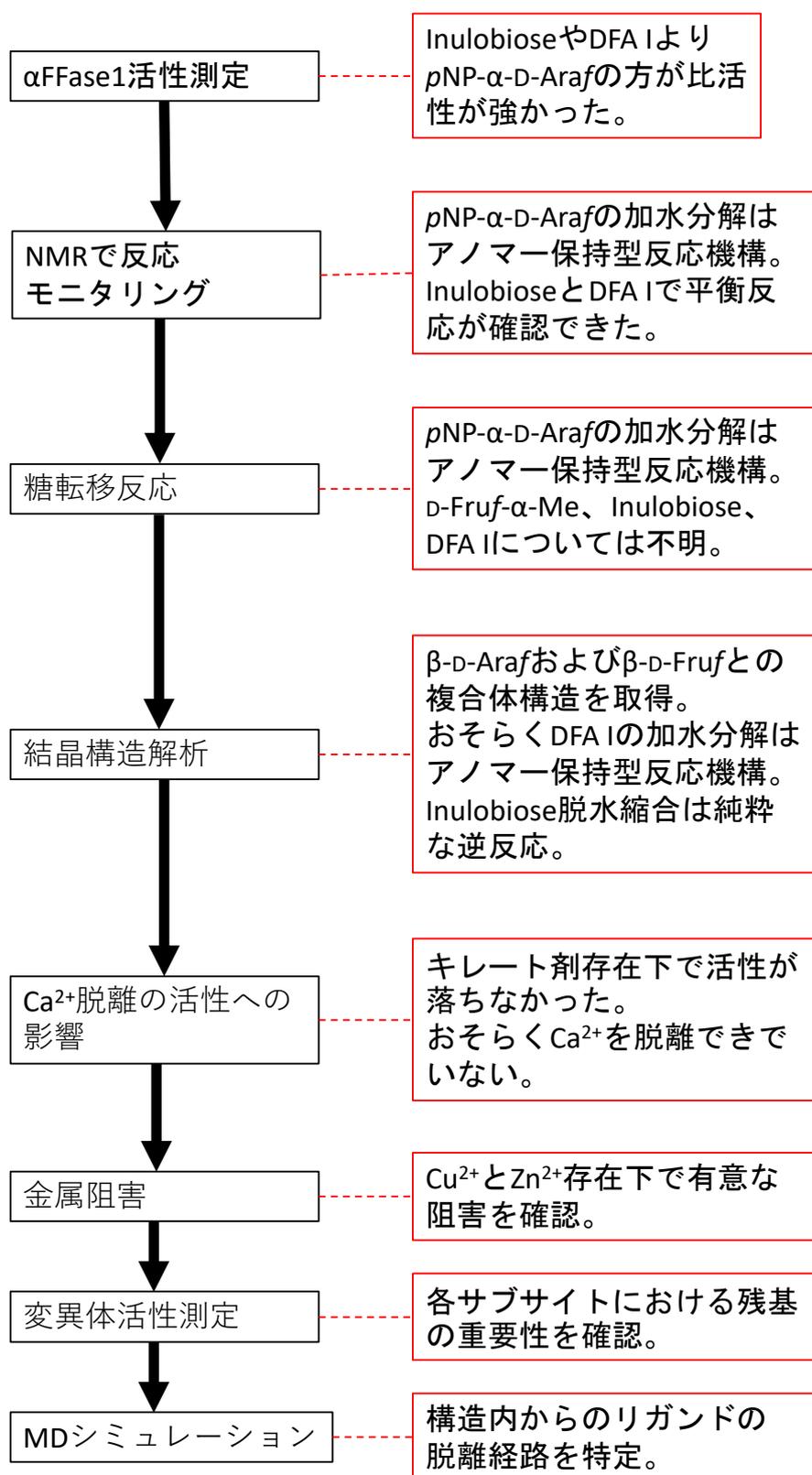


図 2-1-21. 環状フルクトース 2 糖を合成する GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase αFase1 の構造機能解析における実験フローチャート。実験内容の黒枠、各実験で至った結論を赤枠で示す。

## 第2章—カラメル化糖特有の糖質を分解する GH172 $\alpha$ -D-fructofuranosidase $\alpha$ FFase2 の構造解析

### 2.2.1. はじめに

本章ではカラメル化糖特有の糖質を分解する GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase  $\alpha$ FFase2 の構造解析の研究を扱う。それに先立ち、序論として GH172 の基質特異性について概説した上で、本研究の目的、方法、結果、考察について論ずる。

#### 2.2.1.1. GH172 の基質特異性について

第1章で扱った GH172  $\alpha$ FFase1 の研究では  $\alpha$ -D-arabinofuranosidase、 $\alpha$ -D-fructofuranosidase、difructose dianhydride synthase/hydrolase としての分子機能を提唱し、 $\alpha$ FFase1 が天然では2種類の基質・生成物ペアにしか作用しないことが分かった。

一方、図 2-1-18 の系統樹は  $\alpha$ FFase1 活性中心の残基が保存されている配列に絞って作製された。その結果、採用された配列は  $\alpha$ FFase1 とのアライメントスコアが sequence identity > 47.45%、sequence coverage > 79%、e-value <  $5.0 \times 10^{-128}$  と極めて相同性の高いものとなった。これより相同性の低い、活性中心の残基が保存されていない遠縁ホモログを解析すれば、新たな基質特異性を持った GH172 の発見に繋がるかもしれない。実際、私の研究室に在籍していた中島千穂氏（2019 年度修士課程修了）が構造解析していた  $\alpha$ FFase1 の遠縁ホモログ、*Microbacterium arabinogalactanolyticum* 由来の ExoMA1（配列同一性 30.42%）は  $\alpha$ -D-arabinofuranosidase 活性のみを有する点が  $\alpha$ FFase1 と異なる。

#### $\alpha$ FFase2 について

鹿児島大学の藤田清貴准教授らより *B. dentium* JCM1195 由来の別の GH172 酵素である  $\alpha$ FFase2 の機能解析が行われた。本酵素は既知の GH172 と配列同一性が 40% 以下であり、また強い  $\alpha$ -D-fructofuranosidase 活性を有し、 $\alpha$ -Araf 誘導物質（D-Araf- $\alpha$ -Me、pNP- $\alpha$ -D-Araf）に対する活性は弱い（表 2.2.1）。現時点ではカラメル化糖に含まれているとされている D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc に対して弱い加水分解活性を示していることが解っている。D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc を  $\alpha$ FFase2 で一晩処理し、HPAEC-PAD を用いて解析した結果、 $\alpha$ FFase2 未添加の条件と比較してピーク面積が 32% 減少し、それに比例して Glc と Fru にあたるピークが増大した（図 2.2.1）。これ以外の基質は発見されていない。

$\alpha$ FFase2 は  $\alpha$ FFase1 と同様に DUF2961（GH172 活性ドメイン）のシングルドメインにより構成された菌体内 GH である。

#### 2.2.1.2. 本研究の目的

$\alpha$ FFase2 の  $\alpha$ FFase1、ExoMA1 との基質特異性の違いに関わる構造的な要因は不明である。そこで、本研究では  $\alpha$ FFase2 の構造解析を基に GH172 の分子機能比較の実現を試みた。また、D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc 以外の基質が存在し得るのかの検証も試みた。

表 2-2-1.  $\alpha$ FFase2 と既知の GH172 の配列同一性、合成基質に対する活性、天然での機能の比較。アライメント解析は blast2seq で行なった。

	ExoMA1	$\alpha$ FFase1	$\alpha$ FFase2	BACUNI_00161 (PDB ID 4KQ7)
Sequence identity (%)	36.61	30.40	-	31.98
合成基質に対する活性				
D-Araf- $\alpha$ -Me	○	○	$\Delta$	-
pNP- $\alpha$ -Araf	○	○	$\times$	-
D-Fruf- $\alpha$ -Me	$\times$	○	○	-
天然での機能	D 体のアラビナン の分解	DFA I 合成・分解	D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D- Glc の加水分解?	-

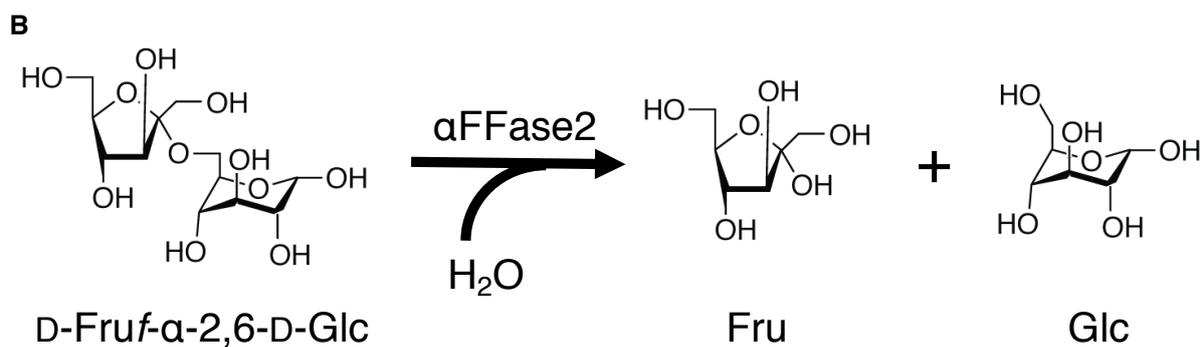
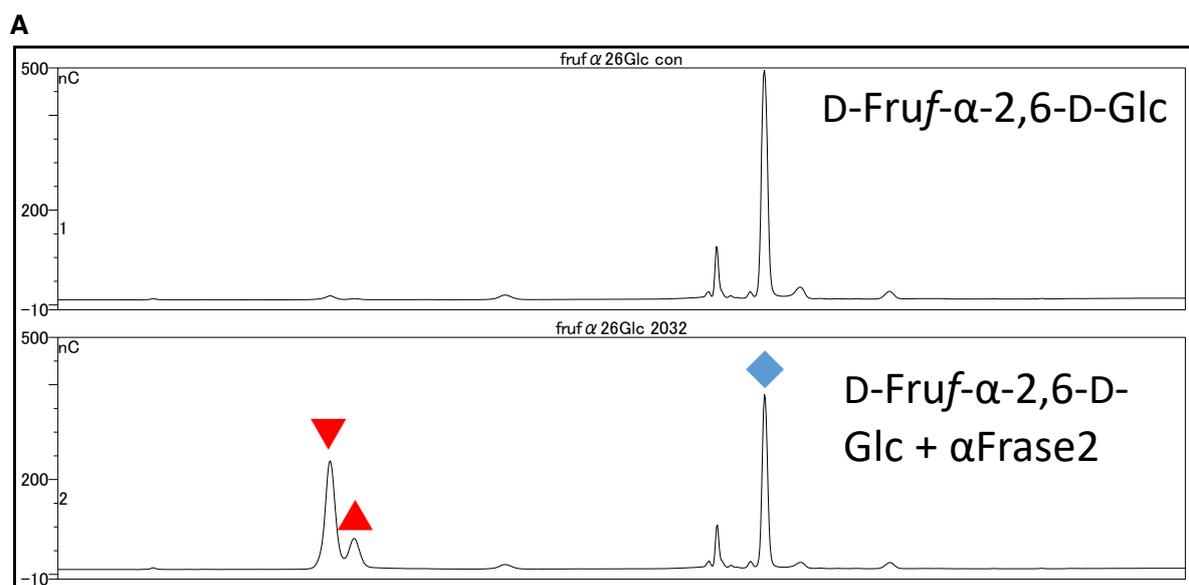


図 2-2-1. **A.**  $\alpha$ FFase2 の D-Fruf- $\alpha$ -2,6-D-Glc に対する加水分解触媒反応を示した HPAEC-PAD のクロマトグラム。基質と生成物に該当するピークをそれぞれ青と赤の印で示す。**B.**  $\alpha$ FFase2 は触媒する反応の化学式。

## 2.2.2. 方法

本研究における試薬は特記のない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を用いた。また、液体試薬は予め滅菌したもの、あるいは滅菌された状態で入手したものを利用している。遠心には MX-307 (トミー) を用いた。

また特記のない限り、濃度は全て終濃度である。

### 2.2.2.1. 基質と発現用プラスミド

大腸菌異種発現用プラスミド pET23d  $\alpha$ FFase2\_His6-tag は鹿児島大学 藤田清貴准教授より供与頂いた (図 2-2-2)。本コンストラクトは野生型  $\alpha$ FFase2 の C 末端に Ni-IMAC 精製用の His6-tag を付加したものである。



図 2-2-2. pET23b  $\alpha$ FFase2\_His6-tag のプラスミドマップ

### 2.2.2.2. 形質転換

第一部 1.1.2.5 節と同様の方法で行なった。

### 2.2.2.3. プラスミド抽出

第一部 1.1.2.6 節と同様の方法で行なった。

### 2.2.2.4. 発現検討

第一部 1.1.2.7 節と同様の方法で行なった。大腸菌発現株には BL21(DE3)を用いた。抗生物質は 100  $\mu$ g/mL ampicillin を用いた。破碎バッファーには 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM NaCl を用いた。

### 2.2.2.5. SDS-PAGE

第一部 1.1.2.8 節と同様の方法で行なった。ただし、 $\alpha$ FFase2 単量体は分子量が低いため、分離ゲルのアクリルアミド濃度を表 2-2-1 のように設定した。

表 2-2-1. 分離ゲルの組成

試薬	液量
40% acrylamide	2.4 mL
滅菌水	3.6 mL
LGB	2.0 mL
25% APS	50 $\mu$ L
TEMED	7.5 $\mu$ L

#### 2.2.2.6. 培養のスケールアップ

第一部 1.1.2.10 節と同様の方法で行なった。

#### 2.2.2.7. タンパク質の精製

第一部 1.1.2.8 節と同様の方法で行なった。本章ではタンパク質の精製を Ni-IMAC、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で行なった。

破碎バッファーには 50 mM Tris-HCl pH 7.0、300 mM NaCl、ゲルろ過バッファーには 25 mM Tris-HCl pH 7.0、ゲルろ過精製後のバッファー置換に 10 mM Tris-HCl pH 7.0、300 mM NaCl を用いた。

#### 2.2.2.8. 分子量測定とオリゴマー状態の検証

水溶液中での  $\alpha$ FFase2 の分子量を正確に測るべく、タンパク質濃度を 20  $\mu$ g/mL 合わせ、10  $\mu$ L 分を Prominence HPLC-SEC システム（島津製作所）にアプライした。カラムは Superdex 200 Increase 5/150 GL（Cytiva）、バッファーは 25 mM HEPES-NaOH pH 7.2、100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.025%  $\beta$ -DDM、0.0025% CHS を用いた。また検量線を作製するために 10 倍希釈した分子量マーカー（Gel Filtration Standard、Bio-rad）、そして比較対象として  $\alpha$ FFase2 の遠縁ホモログである  $\alpha$ FFase1 精製タンパク質、私の研究室に在籍していた中島千穂氏（2019 年度修士課程修了）より分与された *Microbacterium arabinogalactanolyticum* 由来 ExoMA1 精製タンパク質を、それぞれ  $\alpha$ FFase2 と同じ濃度で同量アプライした。

#### 2.2.2.9. Pre-Crystallization Test

第一部 1.1.2.15 節と同様の方法で行なった。

#### 2.2.2.10. 結晶化スクリーニング

第一部 1.1.2.16 節と同様の方法で行なった。

#### 2.2.2.11. 結晶化条件の最適化

第一部 1.1.2.17 節と同様の方法で行なった。

最適化の過程で、リガンドとの複合体取得のためタンパク質溶液に 20 mM Fru を添加した。

#### 2.2.2.12. シーディング

第一部 1.1.2.18 節と同様の方法で行なった。ただし、氷上でシードを冷却したところ、沈殿剤（potassium sodium tartrate）が析出した。析出とシードの溶解を抑えるため、結晶の粉碎時には 3 分間、室温でボルテックスし、以降の作業を速やかに実行した。

#### 2.2.2.13. 結晶の染色

出現した結晶がタンパク質のものなのか、あるいは低分子の結晶なのか確認するべく、結晶溶液中に 0.05% methylene blue を添加し、一晚結晶化を行なった温度でインキュベートした。顕微鏡で結晶の色が濃くなっていることでタンパク質の結晶であることを確認した。

#### 2.2.2.14. X線回折強度データ収集

第一部 1.1.2.19 節と同様の方法で行なった。

#### 2.2.2.15. 結晶構造解析

第一部 1.1.2.20 節と同様の方法で行なった。ただし、初期位相の決定には分子置換プログラム Phaser(58)を用い、自動モデル構築に Buccaneer(59)、ARP/wARP(186)、Phenix program suite の phase and build(61, 62)、構造精密化には REFMAC5(187)と Phenix program suite の phenix.refine を組み合わせて構造決定を試みた。

#### 2.2.2.16. $\alpha$ FFase 2 コンストラクトの再検討

より良質な結晶を獲得するため、 $\alpha$ FFase 2 の N 末端にあるとされるディスオーダー領域を欠失させたコンストラクトを作製した。切断する位置は、AlphaFold2(45)で作製した  $\alpha$ FFase2 の予測構造モデルを参考に判断した。

表 2-1-2 に示したプライマー対を用いて、第一部 1.1.2.3 節、1.1.2.4 節、1.1.2.5 節、1.1.2.6 節の方法で PCR、DpnI 処理、形質転換、プラスミド抽出、シーケンス解析を行なった。PCR の伸長時間は 2 分に設定した。

目的のコンストラクトができていることを確認した上で、プラスミドを BL21 (DE3) に形質転換し、野生型と同様に、少量で発現を確認した。その後、培養スケールを 1.5 L まで上げ、2.1.2.7 の通りに精製を行なった。

表 2-2-2.  $\alpha$ FFase2 の N 末端欠失に用いたプライマー対

Object	Sequence
N-terminal deletion	5' -TAAGAAGGAGATATACCATGAATGCATTGGACGCATTG-3' 3' -CAAATTGAAATTCCTCCTATATGGTACTTACGTAACCTGCGTAACCG-5'

#### 2.2.2.17. クライオ電子顕微鏡観察用グリッドの作製

本操作は、第一部 1.1.2.21 節と同様に KEK 構造生物学研究センター (SBRC) の安達成彦特任准教授、川崎政人准教授の協力のもと行なった。

グリッドに載せた  $\alpha$ FFase2 溶液は、一つの粒子が 3 量体であると想定して粒子濃度が 20  $\mu$ M (2.64 mg/mL) なるように調製した。

#### 2.2.2.18. 粒子画像の撮影

本操作は、第一部 1.1.2.22 節と同様に KEK SBRC の安達成彦の特任准教授、川崎政人の准教授の協力のもと行なった。

## 2.2.3. 結果

### 2.2.3.1. $\alpha$ FFase2 の水溶液中でのオリゴマー状態

少量での発現検討の末、0.1 mM IPTG で発現誘導し、37°C で 20 時間培養した条件で最も多く目的タンパク質が得られたため、この条件で大量培養、そしてタンパク質精製を行なった。ゲルろ過精製後の SDS-PAGE では分子量 44.1 kDa の位置に高純度で目的タンパク質に該当するのバンドが確認された (図 2-2-3)。最終的に培養液 1 L あたり 200 mg 程度の  $\alpha$ FFase2 精製タンパク質が得られた。

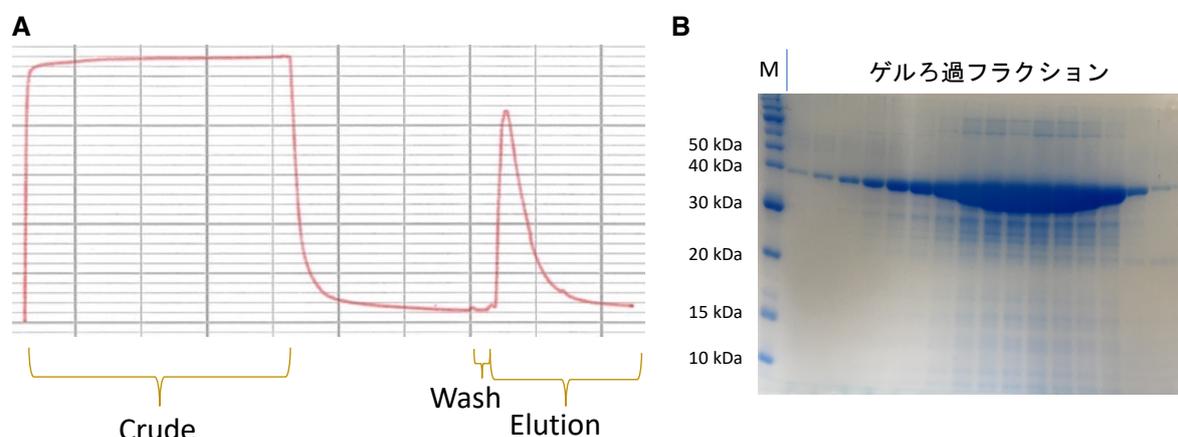


図 2-2-3. A.  $\alpha$ FFase2 の Ni-IMAC 精製時のクロマトグラム。B.  $\alpha$ FFase2 のゲルろ過時にメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE

これまで解析されてきた GH172 タンパク質では、オリゴマー状態がホモログによって異なっていたので、 $\alpha$ FFase2 についても水溶液中の分子量を HPLC-SEC で測定した (図 2-1-4、表 2-2-3)。

検量線を基に計算したところ、比較対象となる  $\alpha$ FFase1 および中島千穂氏 (2019 年度修士課程修了) より分与された *Microbacterium arabinogalactanolyticum* 由来 GH172 ExoMA1 では推定オリゴマー状態がそれぞれ 6 と 7 以上であった。結晶構造から  $\alpha$ FFase1 と ExoMA1 はそれぞれ 6 量体と 12 量体であることが知られており、HPLC-SEC の結果と合致した。 $\alpha$ FFase2 の水溶液中の分子量は 63.6 kDa と、モノマー鎖の理論値の 2 倍近くあり、2 量体以上である可能性が示唆された。これに加え、第 1 章の  $\alpha$ FFase1 の構造から分かるように、GH172 は  $C_3$  回転軸を持ったオリゴマーを基本構造としていることから、 $\alpha$ FFase2 が 3 量体であるとも考えられた。 $\alpha$ FFase2 は既知の GH172 とオリゴマー状態が異なる可能性がある。

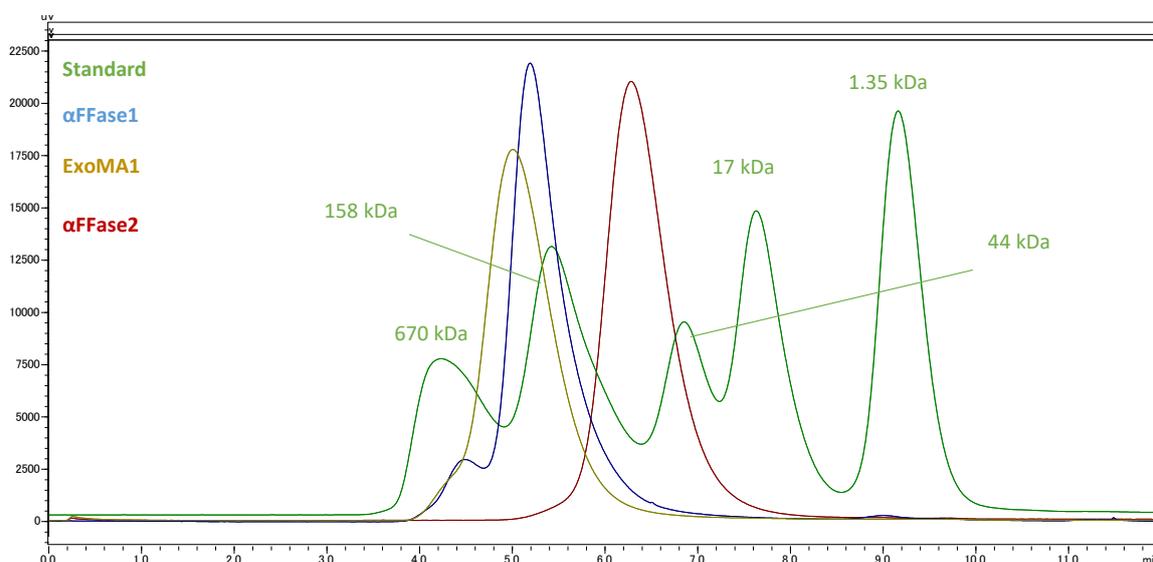


図 2-2-4.  $\alpha$ FFase2 を含む GH172 ホモログの HPLC-SEC クロマトグラム。

表 2-2-3. HPLC-SEC のクロマトグラムから算出された GH172 ホモログタンパク質群 ( $\alpha$ FFase1、 $\alpha$ FFase2、ExoMA1) の分子量と推定されるオリゴマー状態。

	分子量測定値(kDa)	モノマー鎖の分子量理論値 (kDa)	水溶液中での推定オリゴマー状態
$\alpha$ FFase1	240.1	53.0	6
ExoMA1	300.3	42.1	7以上
$\alpha$ FFase2	63.6	44.1	2または3

### 2.2.3.2. $\alpha$ FFase2 の結晶化と X 線結晶構造解析

$\alpha$ FFase2 の全体構造を決定するべく、結晶化を行なった。PCT の結果に基づき 5 mg/mL でスクリーニングを行なった結果、唯一、1.0 M potassium sodium tartrate (K/Na tartrate)、0.1 M MES-NaOH pH 6.0 で球晶が得られた (図 2-2-5. A)。

この条件を基に通常の方法の最適化を試みたが、十分に良質な結晶は得られなかった (図 2-2-5. B)。タンパク質精製時に Ni-IMAC の後に陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてタンパク質の精製純度を向上させたが、これによる結晶質の改善は見られなかった。

更に K/Na tartrate は 0°C では 1.08 M 以上の濃度で析出する ([https://en.wikipedia.org/wiki/Potassium\\_sodium\\_tartrate](https://en.wikipedia.org/wiki/Potassium_sodium_tartrate))。本サンプルの結晶化については室温でも同様に析出する傾向があり、これはバッファーによる影響だと考えられた。

条件検討の一環でシーディングを試みたが、通常の方法ではシード作製時に溶液を氷上で冷却する必要があり、沈殿剤が析出してしまった。そこで、室温でシードを作るメソッドを参考に ([https://hamptonresearch.com/uploads/cg\\_pdf/CG101\\_Seeding\\_2020.pdf](https://hamptonresearch.com/uploads/cg_pdf/CG101_Seeding_2020.pdf)) 結晶の粉碎を室温で3分間行い、段階希釈し、素早く結晶化の条件を整えた。しかし、段階希釈による結晶数の影響は見られず、またシードを入れていない条件と同様の挙動が見られた。このことから、シードが溶解してしまっている可能性が示唆された。こういった経緯もあり、MMS は行っていない。

Additive Screen による結晶質向上のための添加剤の探索を、Hampton Research の取扱説明書 ([https://hamptonresearch.com/uploads/support\\_materials/HR2-428\\_Binder.pdf](https://hamptonresearch.com/uploads/support_materials/HR2-428_Binder.pdf)) に沿って行なった。添加剤を加える条件は 1.1 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6 に固定した。多くの条件で沈殿剤の析出が見られた (図 2-2-5. C-D) が、20 mM chromium (III) chloride、または 20 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) hydrochloride を加えた条件で、インキュベート後3日で小さいながらも形の整った結晶が観察された。メチレンブルーで染色したところ、結晶の色が濃くなり、タンパク質の結晶であることが証明された (図 2-2-5. E-F)。

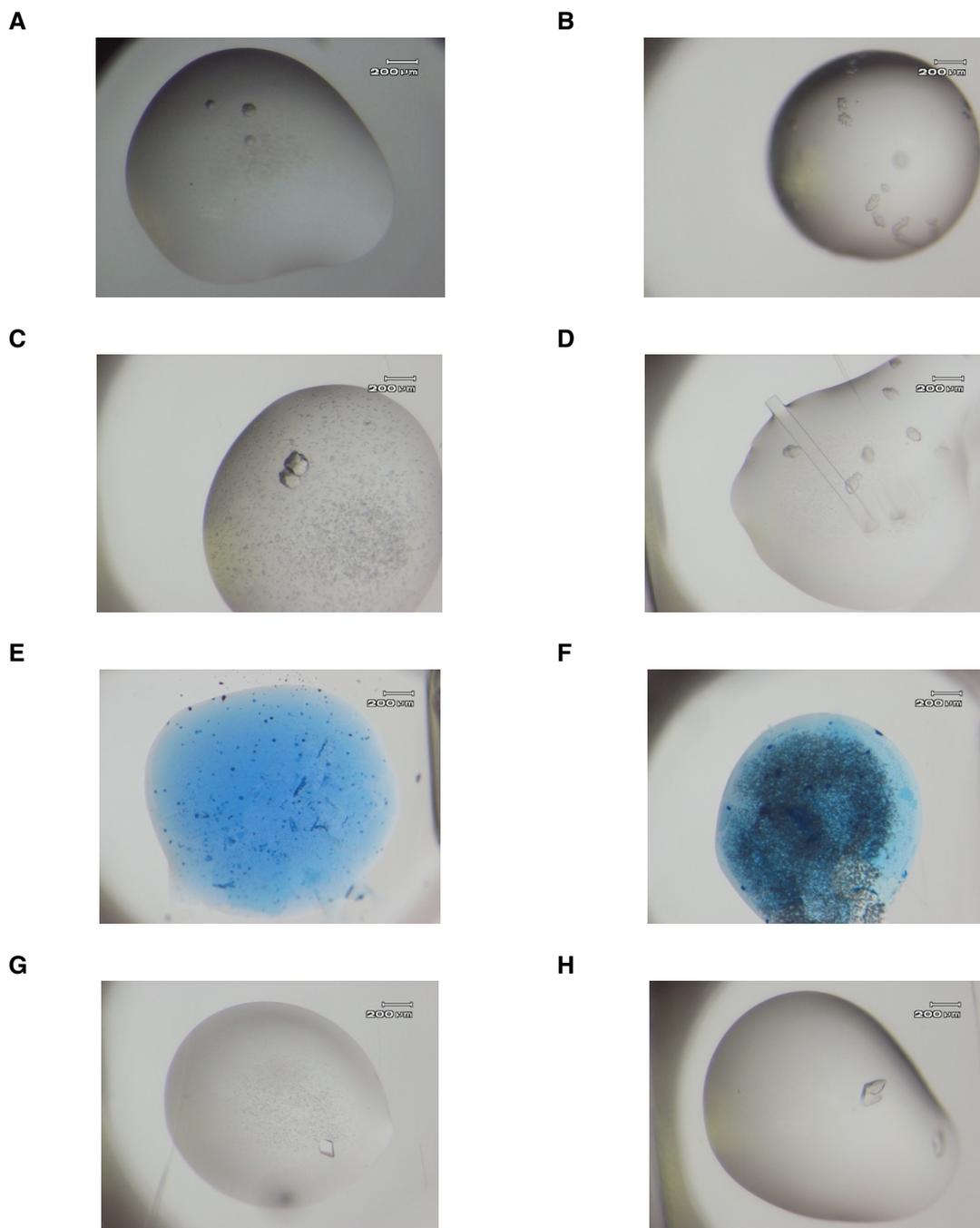
Additive Screen の結果を踏まえて更に条件検討を繰り返したところ、以下の条件で良質な結晶が得られた。

- ① タンパク質濃度 15 mg/mL、1.0 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6、30 mM chromium (III) chloride、20 mM Fru、4 °C で1ヶ月間インキュベート (図 2-2-5. G)
- ② タンパク質濃度 10 mg/mL、0.9 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6、5 mM TCEP hydrochloride、20 mM Fru、4 °C で2週間から1ヶ月間インキュベート (図 2-2-5. H)

これらの結晶を凍結し、X 線に照射したところ、1.96 から 2.80 Å の分解能の回折像が得られた (表 2-2-4)。なお、抗凍結剤には 20% glycerol、20% trehalose、20% MPD、20% ethylene glycol、20% PEG 200 を検討したが、20% trehalose 以外の条件では溶液混合時に析出が発生した。そのため、実際は 20% trehalose のみでしか凍結実験を行っていない。

データ解析時の位相決定には主に分子置換法を用いた。様々なプログラム、モデルの組み合わせを検討した結果、AlphaFold2 で作製した予測構造を Phaser で分子置換した際に最も優良な結果が得られた。非対称単位内では3つのプロトマーが  $C_3$  対称を成す形で解が得られた (図 2-2-6. A)。

しかし、それ以降のモデル構築、構造精密化で  $R/R_{free}$  は減少しなかった。精密化後のモデルのアミノ酸主鎖の大部分については、それに当たる電子密度マップは観察できなかった (図 2-2-6. B)。結論として、本コンストラクトでは  $\alpha$ FFase2 の結晶構造決定には至らなかった。



**図 2-2-5.**  $\alpha$ FFase1 の結晶。**A.** スクリーニング時のヒット条件 (1.0 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 6.0、20°C で3日間インキュベート)。**B.** 通常の結晶化条件最適化で得られた最も良質な結晶 (1.1 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6、20°C で3日間インキュベート)。**C-F.** Additive Screen の結果の例。1.1 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6 に Additive を添加した。**C.** 0.4 M Non-detergent sulfobetaine-211 (NDSB-211) を添加した条件。 $\alpha$ FFase2 の微結晶の中に大きな析出物がある。**D.** 8% v/v 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol で添加した条件。いびつな形をした  $\alpha$ FFase2 の結晶と共に細長い板状の低分子の結晶がある。K/Na tartrate は有機溶媒中では不溶であるため、他の有機溶媒を添加した条件でも同様の結晶が、溶液を混合した直後に出現した。**E.** 20 mM chromium (III) chloride を添加した条件。メチレンブルーで加えたところ、溶液中の微結晶が染まった。**F.** 20 mM TCEP hydrochloride を添加した条件。ドロップ中央の沈殿が目立つが、メチレンブルーで加えたところ、ドロップの縁にある小さな結晶が染まった。**G-H.** 添加剤を加えて条件検討した際に得られた最も良質な結晶。**G.** 1.0 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6、30 mM chromium (III) chloride、20 mM Fru、4°C で1ヶ月間インキュベート。**H.** 0.9 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 5.6、5 mM TCEP hydrochloride、20 mM Fru、4°C で2週間インキュベート。

表 2-2-4.  $\alpha$ FFase2 の X 線回折データセットおよび精密化の統計値。括弧内は最外殻の値を示す。

	chromium (III) chloride ①	chromium (III) chloride ②	chromium (III) chloride ③	TCEP hydrochloride
<b>Data collection statistics</b>				
X-ray facility	KEK PF-AR NE3A	KEK PF BL5A	KEK PF BL5A	SLS X06SA
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	$P2_1 2_1$	$P2_1 2_1$	$P2_1 2_1$	$P2_1$
<u>Unit-cell parameters</u>				
a, b, c (Å)	76.84, 108.11, 124.36	77.09, 106.56, 125.24	76.98, 106.04, 124.96	77.39, 124.77, 111.51
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 91.33, 90.00
Resolution (Å)	48.34-1.96 (2.00-1.96)	48.61-2.61 (2.73-2.61)	48.81-2.80 (2.95-2.80)	48.57-2.74 (2.82-2.74)
Total reflections	493,818	212,400	171,689	193,198
Unique reflections	74,815	32,142	25,272	55,161
Completeness (%)	99.8 (99.7)	99.9 (99.9)	99.9 (99.9)	98.8 (98.8)
Multiplicity (%)	6.6 (6.8)	6.6 (6.8)	6.7 (6.8)	3.5 (3.5)
Mean $I/\sigma(I)$ (%)	6.4 (0.9)	5.0 (1.9)	7.5 (2.0)	2.8 (1.3)
$R_{\text{merge}}$ (%)	0.16 (1.633)	0.509 (5.237)	0.179 (1.022)	0.299 (0.744)
$CC_{1/2}$	0.981 (0.719)	0.938 (0.363)	0.995 (0.895)	0.792 (0.774)
<b>Refinement statistics</b>				
Resolution range (Å)	48.38-1.96	48.65-2.61	48.86-2.80	48.61-2.74
No. of reflections	74,714	32,081	25,760	54,832
$R/R_{\text{free}}$ (%)	40.0/43.5	33.4/39.3	28.0/36.4	30.5/37.9
<u>r.m.s. from ideal values</u>				
Bond length (Å)	0.0068	0.0046	0.0049	0.0046
Bond angle (°)	1.699	1.430	1.441	1.439
<u>Ramachandran plot (%)</u>				
Favored	84.96	81.44	82.06	82.76
Allowed	10.99	12.58	11.43	11.92
Outlier	4.05	5.98	6.51	5.32

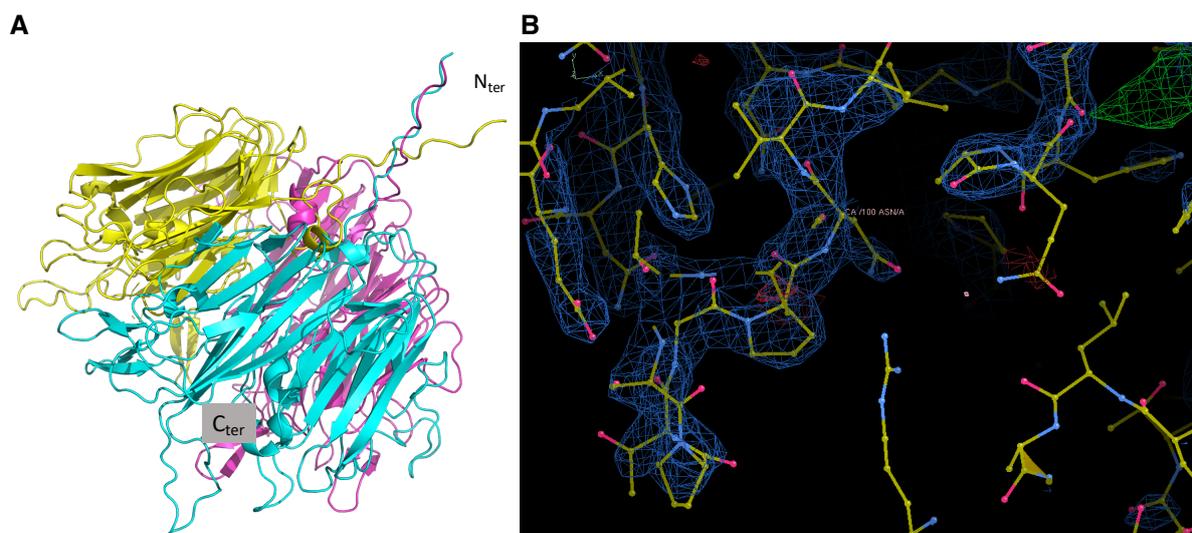


図 2-2-6. A. 結晶①の回折データを基に行った分子置換後の、非対称単位内の  $\alpha$ FFase2、3 量体のモデル。B. 精密化後の電子密度マップ。他の回折データについても同様のモデルとマップが得られた。

### 2.2.3.3. $\alpha$ FFase2 のコンストラクト再検討と結晶化

図 2-2-6. A に示した AlphaFold2 のモデルで解るように、 $\alpha$ FFase2 の N 末端にはゆらぎの大きいディスオーダー領域が存在する。これが結晶化や回折データに影響するとの仮説を立て、欠失することにした。ディスオーダーするであろう 17 残基を欠失させたコンストラクト ( $\alpha$ FFase2  $\Delta$ N) を作製し、大腸菌で、野生型と同じ条件で異種発現することを確認、大量培養、精製し、高純度  $\alpha$ FFase2  $\Delta$ N 精製タンパク質を約 60 mg 獲得した (図 2-2-7)。

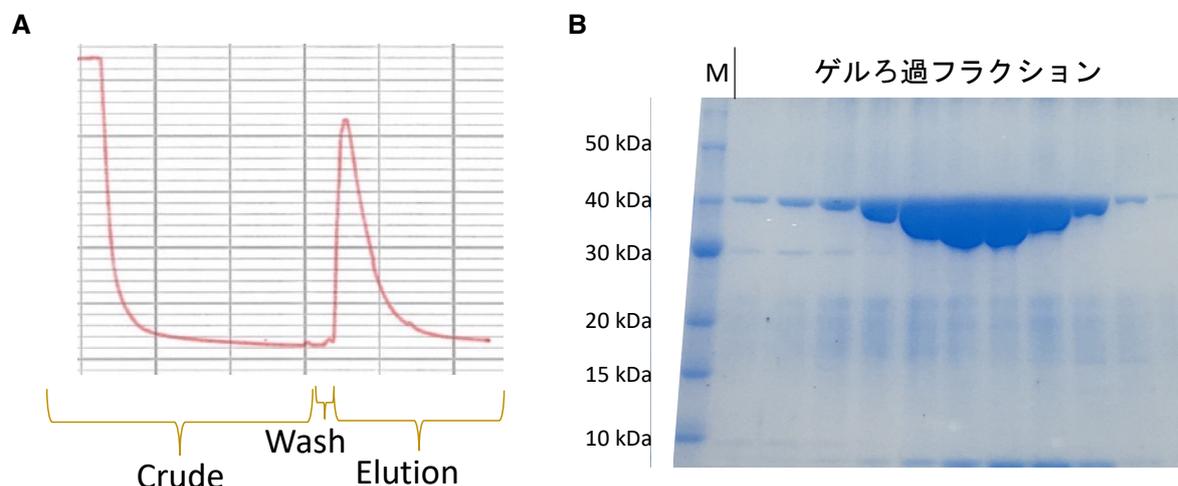


図 2-2-7. A.  $\alpha$ FFase2  $\Delta$ N の Ni-IMAC 精製時のクロマトグラム。B.  $\alpha$ FFase2  $\Delta$ N のゲルろ過精製時にメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE。

PCT の結果に基づき 10 mg/mL でスクリーニングを行なった結果、野生型と同じ条件で球晶が出現した (図 2-2-8)。この結果から N 末端の欠失は  $\alpha$ FFase2 の結晶性に影響しなかったと判断した。

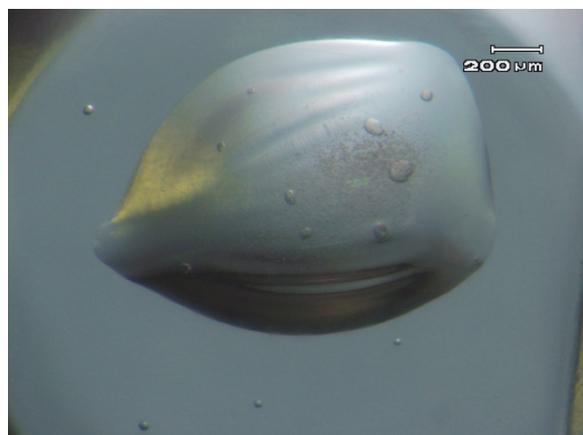


図 2-2-8.  $\alpha$ FFase2  $\Delta$ N の結晶。結晶化条件は 1.0 M K/Na tartrate、0.1 M MES-NaOH pH 6.0。

### 2.2.3.4. クライオ電子顕微鏡による $\alpha$ FFase2 単粒子の撮影

結晶化とは別にクライオ電子顕微鏡での全長版  $\alpha$ FFase2 の全体構造決定を目指した。

グリッド全体でキレイに氷の厚さにグラジエントがかかっていたものの (図 2-2-9. A)、grid square では斑ら模様が見られた (図 2-2-9. B)。更に foil まで拡大したところ、foil の縁にタンパク質が凝集していた (図 2-2-9. C)。これはタンパク濃度が濃すぎたためか、タンパク質の凝集しやすい性質にあるからだと考えられる。この状態では構造解析は困難であると考え、連続測定は行わなかった。

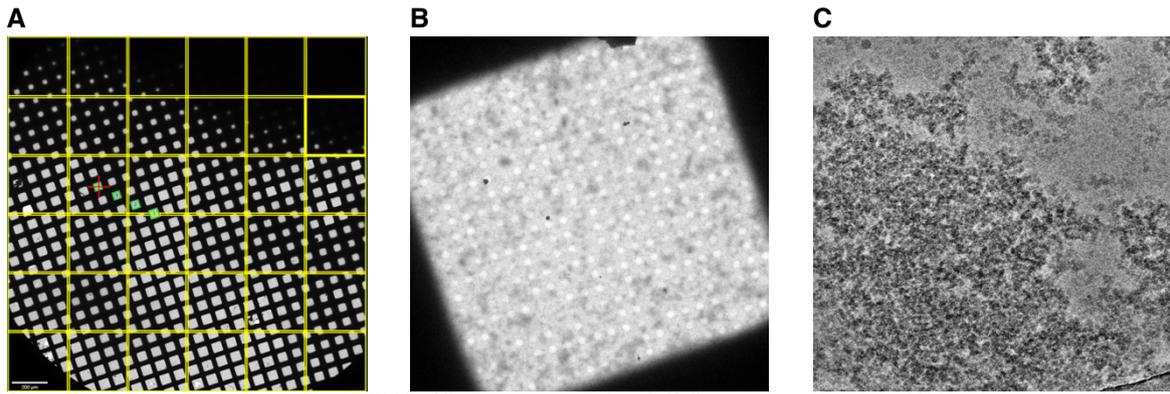


図 2-2-9.  $\alpha$ Fase2 のクライオ電子顕微鏡画像。A. グリッドの全体像。B. Grid square の拡大図。C. Foil の拡大図。

## 2.2.4. 考察

### 2.2.4.1. $\alpha$ FFase2 の構造解析に関する課題

本研究では、GH172 の基質特異性に関する分子的な知見を得るために  $\alpha$ FFase2 の X 線結晶構造解析に挑戦した。結晶を獲得し X 線回折像も得られたが、構造決定には至っていない。今後、指数付、積分の段階でより低い対称性の指定や、Mosflm(188)や DIALS(189)など別のプログラムで再度解析していく必要がある。

HPLC-SEC を用いた分子量測定により  $\alpha$ FFase2 は水溶液中では 63.6 kDa の分子量であると推定された。しかし、結晶格子内には 3 分子を分子置換でき、モデルの  $C_3$  対称構造はホモログである  $\alpha$ FFase1 との比較からも確かなものであると考えられる。 $\alpha$ FFase2 単量体は理論上 44.1 kDa であり、3 量体なら 132.3 kDa になる。分子量が 100 kDa を超えるタンパク質はクライオ電子顕微鏡での単粒子構造解析に適していることから、実際に電子顕微鏡画像を撮影した。凝集していたため、以降の連続測定は行わなかったが、今後、タンパク質濃度やグリッドの種類などを検討することで実際に構造決定できる可能性がある。

### 2.2.4.2. 予測構造から見た $\alpha$ FFase2 の基質特異性

図 2-2-6. A では、AlphaFold2 が作製した  $\alpha$ FFase2 の予測構造を基に分子置換をし、 $C_3$  対称性を持った 3 量体構造が得られた。現時点では結晶構造解析は成功していないが、仮にこの 3 量体構造が解であると仮定し、 $\alpha$ FFase1  $\beta$ -D-Fruf 複合体 (図 2-1-10. B) との比較から  $\alpha$ FFase2 の基質特異性について考察する。

図 2-2-10 に重ね合わせとエネルギー最小化から推定した  $\alpha$ FFase2 活性中心内の D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc の配置を示す。-1 サブサイトの Fruf の周囲には E240、E262、D263、F177'、W269 といった、 $\alpha$ FFase1 でも保存されている残基が視認できた。その一方で新たに G239 と K58 が糖と水素結合する可能性が出てきた。

$\alpha$ FFase1 の生成物である DFA I は、 $\alpha$ FFase2 の構造内では W237 と

S270 と衝突する。これは  $\alpha$ FFase2 が inulobiose や DFA I に作用しないことと合致する。その一方で  $\alpha$ FFase2 は D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc に対して強い基質特異性を示しているにも関わらず、還元末端部分 (Glc) と相互作用し得るアミノ酸残基が見当たらない。

このモデルについては実験的に正否を確かめる必要がある。

### 2.2.4.3. 構造解析における $\alpha$ FFase2 のホモログの検討

本研究では長期に渡って  $\alpha$ FFase2 の構造解析に挑戦し、X 線回折像の獲得に成功したにも関わらず、構造決定できなかった。特に結晶化については chromium (III) chloride または TCEP hydrochloride の添加、K/Na tartrate 析出に対する対策と工夫、更に 2 週間以上のインキュベーション期間を要する、極めて

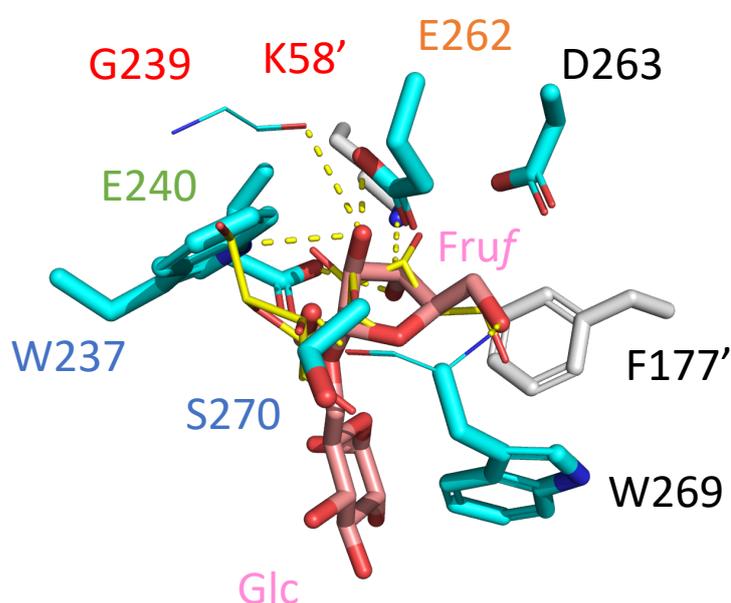


図 2-2-10.  $\alpha$ FFase2 活性中心に入った基質 (D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc) の予想モデル。図 2-2-6. A で示した分子置換後のモデル構造に  $\alpha$ FFase1  $\beta$ -D-Fruf 複合体 (図 2-1-10. B) を重ね合わせた。 $\beta$ -D-Fruf に更に D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc (ピンク) のモデルを重ね合わせ、エネルギー最小化した。比較対象として DFA I (黄) も重ねた。隣接する鎖を白、水素結合を破線、求核性触媒残基をオレンジの文字、酸塩基性触媒残基を緑字、 $\alpha$ FFase1 で保存されていない相互作用残基を赤字、DFA I と干渉する残基を青字で示す。

難しい系を要した。αFFase2 は結晶化、構造解析には不向きなタンパク質の可能性がある。よって今後の構造解析には結晶化し易い近縁ホモログの使用を視野に入れる必要がある。

NCBI の Refseq\_protein (reference proteins database) には αFFase2 と配列同一性 50%以上を示すアミノ酸配列が 649 登録されており、その内 238 はピフィズス菌由来である。中でも *B. longum* の基準株の一つである JCM1217 株は αFFase2 ホモログを 2 つ (BLLJ\_0461 と BLLJ\_1877) を有している (表 2-2-5)。しかし、ゲノムマップ上の周辺遺伝子は明確な遺伝子クラスターを組んでおらず、BLLJ\_0461 と BLLJ\_1877 が認識する糖質を推測することはできない (図 2-2-11)。今後、これらをクローニングし機能解析、構造解析を進めれば、αFFase2 より容易に成果が得られるかもしれない。

表 2-2-5. *B. longum* JCM1217 株由来の αFFase2 近縁ホモログの、αFFase2 とのアラインメントスコア。解析は blast2seq で行なった。

	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
BLLJ_0461	658	658	100%	0.0	82.68%	379
BLLJ_1877	423	423	92%	$2 \times 10^{-152}$	58.36%	372

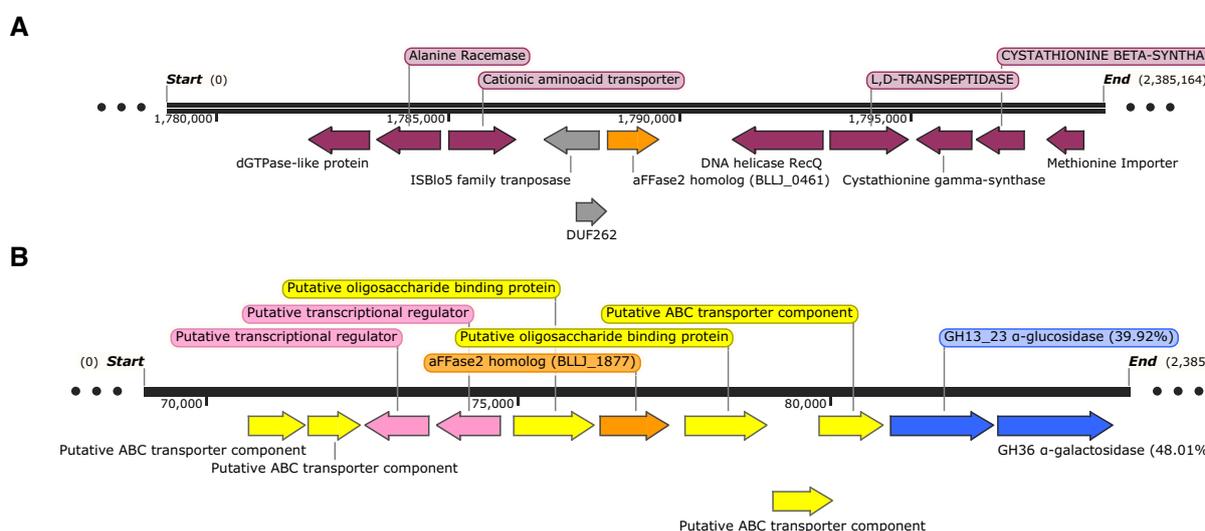


図 2-2-11. αFFase2 ホモログである BLLJ\_0461 (A) と BLLJ\_1877 (B) と、その周辺遺伝子を示した *B. longum* JCM1217 株のゲノムマップ。αFFase2 ホモログをオレンジ、糖質輸送関連遺伝子を黄、発現制御に関わる遺伝子をピンク、糖質関連酵素の遺伝子を青、その他の遺伝子を紫、機能未知遺伝子を灰色で示す。

#### 2.2.4.4. αFFase2 の生理機能

ピフィズス菌の α-D-Fruf 資化能の研究において、現在 inulobiose、DFA I、そして D-Fruf-α2,6-D-Glc が有力な増殖因子とされている。しかし、D-Fruf-α2,6-D-Glc の分解に関わる遺伝子は現時点で報告されていない。αFFase2 の機能解析により、本酵素が D-Fruf-α2,6-D-Glc を加水分解することが明らかとなり、これまで未解明であった D-Fruf-α2,6-D-Glc 資化に関わる可能性が示唆された。

その一方で、D-Fruf-α2,6-D-Glc を αFFase2 で一晚酵素処理しても、HPAEC-PAD では酵素未処理の基質と比較してピーク面積は 32% しか減少しなかった。さらに、図 2-2-10 に示したように予測モデルに D-Fruf-α2,6-D-Glc を当てはめたところ、Glc と相互作用し得る残基は観察されなかった。ここで D-Fruf-α2,6-D-Glc が αFFase2 の真の基質なのか疑問が生じる。酵素が真の基質でない物質に対しても弱い活性を示すことは頻繁に見られる (36, 37)。本酵素で見られる D-Fruf-α2,6-D-Glc に対する活性もそれに該当するのかもしれない。

αFFase2 は自家生成したカラメル化糖 (Fru と Glc の加熱処理によって作られた混合物) には作用しないため、現在 D-Fruf-α2,6-D-Glc 以外の基質候補は存在しない。今後、加熱の時間や方法の再検討や他の α-D-Fruf 含有物質などを視野に真の基質を探索する必要がある。

最後に図 2-2-12 に本研究の実験フローチャートを示す。

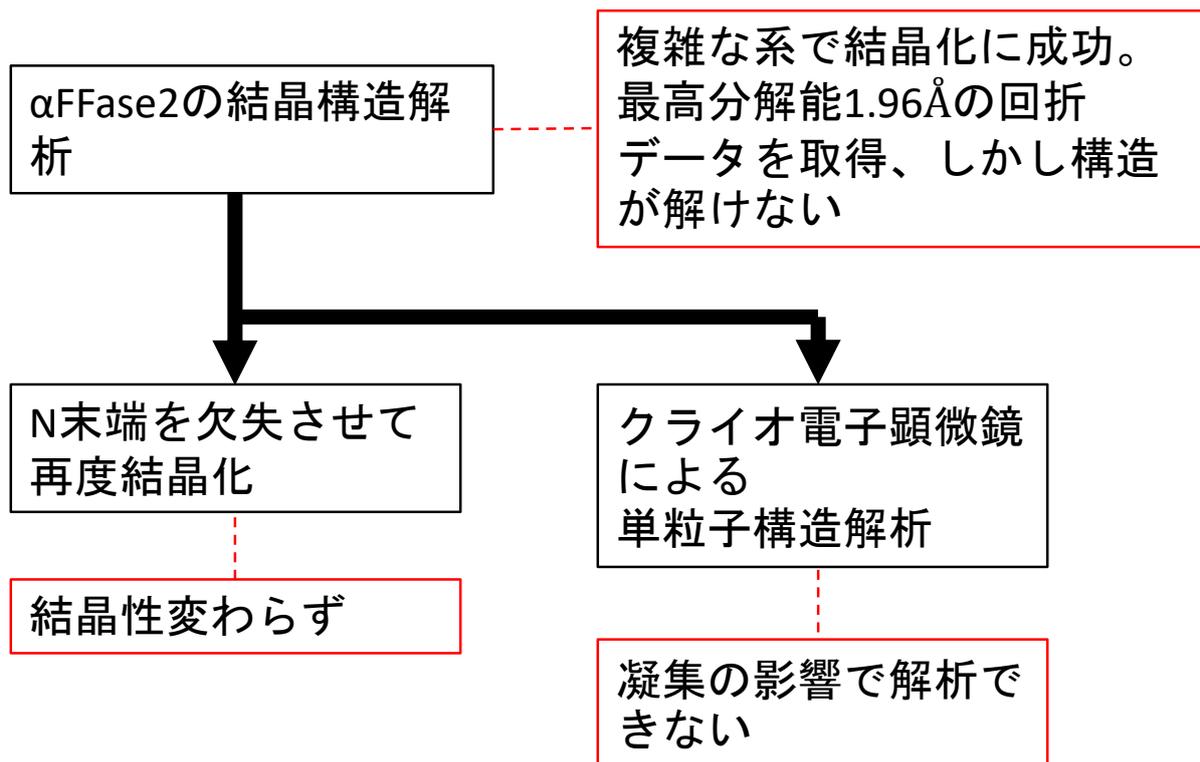


図 2-2-12. カラメル化糖特有の糖質を分解する GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase  $\alpha$ FFase2 の構造解析における実験フローチャート。実験内容の黒枠、各実験で至った結論を赤枠で示す。

### 第3部

成人型ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JCM7052 株の  
アラビアゴム含有アラビノガラクトタン資化経路関連酵素 GH39  
3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GAfase の構造解析

### 3.1.1. はじめに

ここでは成人型ビフィズス菌 *B. longum* JCM7052 株由来のアラビアゴム含有アラビノガラクトタン資化経路関連酵素 GH39 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GAfase の構造解析について述べる。それに先立って、序論としてアラビアゴム由来のアラビノガラクトタンタンパク質 (arabinogalactan protein、AGP)、*B. longum* におけるアラビアゴム AGP の代謝経路、そして GH39 GAfase について概説した上で、本研究の目的、方法、結果、考察について論ずる。

#### 3.1.1.1. アラビアゴム由来の AGP

アラビノガラクトタンタンパク質 (arabinogalactan protein、AGP) は、植物に広く分布する複合プロテオグリカンであり、特殊化や成長など様々な生理機能に重要な役割を果たしている(190)。AGP は主にタイプ II AG 鎖で構成されており、その構造は  $\beta$ 1,3-ガラクトタン鎖の骨格と  $\beta$ 1,6-ガラクトタンの側鎖からなる分岐構造をしている。植物種によって  $\beta$ 1,6-ガラクトタンの側鎖の複雑さが異なる。例えば、アラビアゴムの AGP は L-Araf、L-Arap、L-ラムノース (L-rhamnose、L-Rha)、L-Fuc、グルクロン酸 (glucuronic acid、GlcA)、4-O-メチルグルクロン酸 (GlcA4Me) で高度に修飾されているのに対し(191, 192)、カラマツの AGP は L-Arap と L-Araf で単純に修飾されている(図 3-1-1、95)。

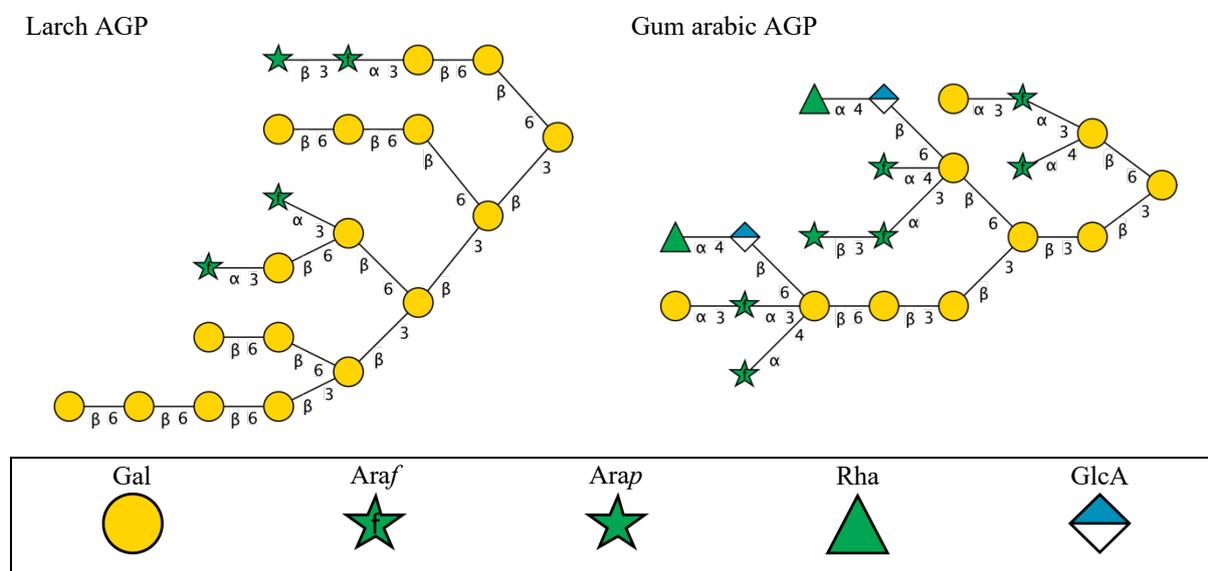


図 3-1-1. カラマツ由来 (左) とアラビアゴム由来 (右) の AGP の糖構造比較。糖の表記は SNFG に基づく。

AGP は、野菜、果物、穀物など、ヒトが日常的に摂取している食物に含まれており(194, 195)、アラビアゴム AGP は乳化や安定化の効果を持つ食品添加剤として一般的に使用されている(6)。さらにアラビアゴム AGP は、ヒトを対象とした *in vivo* 実験の結果から、消化管下部におけるビフィズス菌の菌数を増加させることが報告されている(196–198)。特に、分離したビフィズス菌を用いた *in vitro* の同化試験では、特定の *B. longum* 株と *B. adolescentis* 株がアラビアコム AGP を糖質源として増殖することが明らかになった(199, 200)。また、*B. longum* JCM7052 株および JCM7053 株はアラビアコム AGP を同化することが解っている(201)。

#### 3.1.1.2. *B. longum* におけるアラビアコム AGP の代謝経路について

2021 年に、鹿児島大学の佐々木らにより *B. longum* JCM7052 におけるアラビアコム AGP の代謝経路が提案された(202)。

まず、GH39 GAfase は、細菌細胞表面にてアラビアコム AGP から Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara と L-Arap- $\beta$ 1,3-L-Ara を切り出す。放出された Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara は、ABC 輸送系を介して細胞内に取り込まれた後、細胞内の GH36  $\alpha$ -ガラクトシダーゼによって Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara が加水分解され、Gal と L-Ara に変換される(図 3-1-2)。*B. longum* JCM7052 は Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara を炭素源・エネルギー源として使用するが、L-Arap- $\beta$ 1,3-L-Ara は使用していないことが確認されており、GH36  $\alpha$ -ガラクトシダーゼによって Gal-

$\alpha$ 1,3-L-Ara が分解されていることが示唆されている。残った AGP は GH43 Subfamily 24  $\text{exo-}\beta$ 1,3-galactanase と  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase によって単糖から 4 糖の小さな糖構造に分解される。遊離された糖質の内、Gal- $\beta$ 1,6-Gal は ABC 輸送体を介して菌体内に取り込まれ、GH42  $\beta$ -galactosidase によって単糖に分解される。

以降ではこの代謝経路の最上流にある GH39 GAfase について述べる。

### 3.1.1.3. GH39 GAfase について

GH39 GAfase がアラビアゴム AGP から遊離する Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara はこの糖質特有のものであり、他の AGP には存在しない。実際、甜菜アラビナン、カラマツ AGP、そしてアラビアゴム AGP を GAfase で酵素処理すると、アラビアゴム AGP のみで Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara の遊離が見られる。もう一つの生成物、L-Arap- $\beta$ 1,3-L-Ara はアラビナンや AGP で頻繁に見られる糖構造である。それを踏まえて GAfase の相対活性を検証したところ、アラビアゴム AGP と比較して、カラマツ AGP は 10.2%、甜菜アラビナンは 0.198%であった (図 3-1-3. A)。このことから GH39 GAfase は Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara に強い特異性を持ったアラビアゴム AGP 分解酵素であり、アラビアゴム AGP のプレバイオティクス効果における重要な因子であると言える。

GAfase は N 末端からシグナルペプチド、GH39 活性ドメイン、タンデムに連なった 2 つの CBM35、galactose-binding domain like、ペプチドグリカンとの相互作用によってタンパク質を安定化すると予想されている免疫グロブリン様ドメイン、そして膜結合ドメインからなる菌体外膜結合型 GH である (図 3-1-3. B)。なお、galactose-binding domain like にあたる領域を PDB データベースに対する BLAST 解析を行ったところ、*Acetivibrio thermocellus* 由来の CBM35 と配列同一性 35.58%を示したことから、これも CBM35 かもしれない。

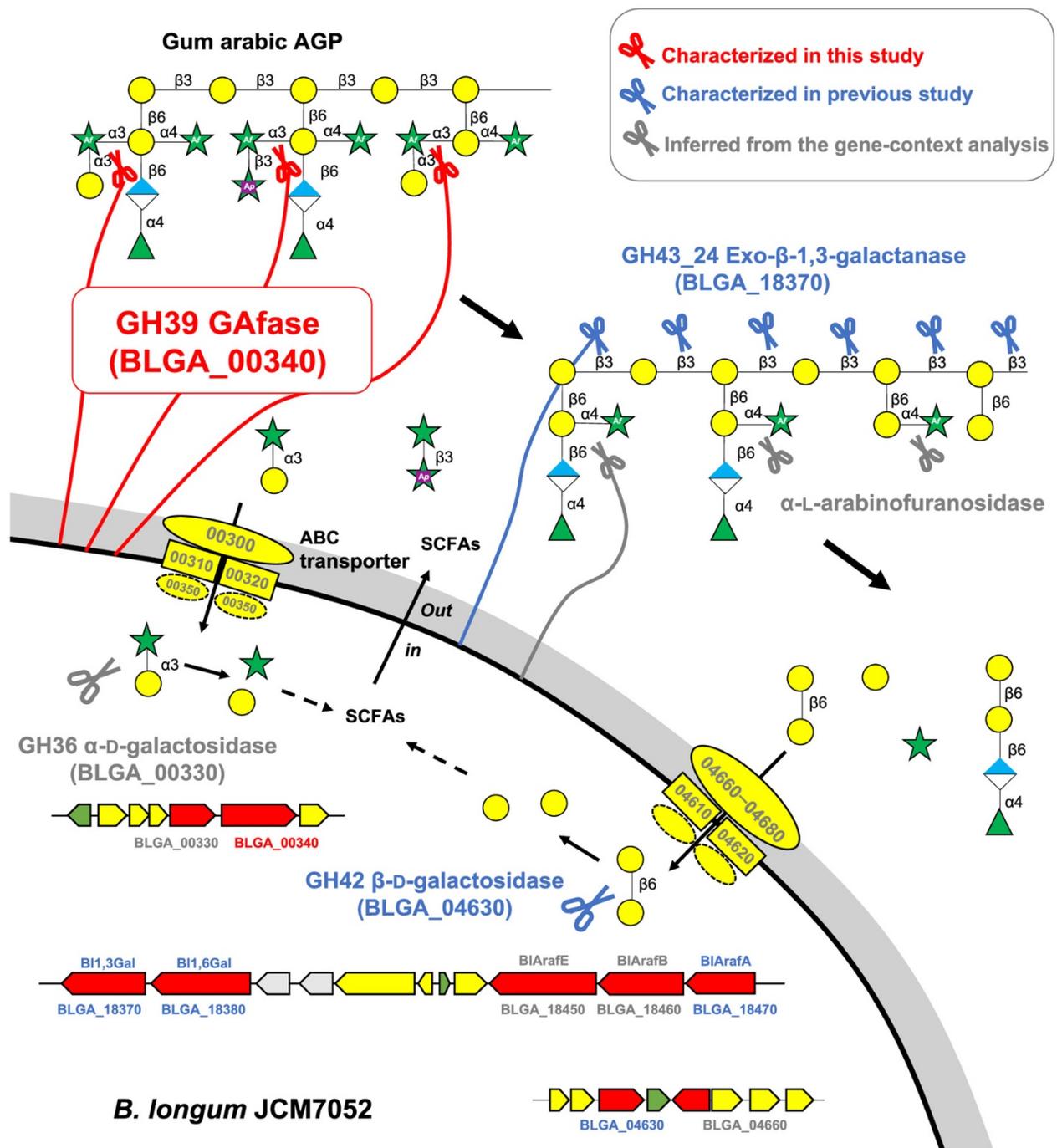


図 3-1-2. *B. longum* JCM7052 のアラビアゴム由来 AGP の代謝経路。ここでは SNFG と異なり、Arap を白く Ap と書かれた赤い星で示す。Sasaki et al., *Appl Environ Microbiol*, 2021 (202) より。

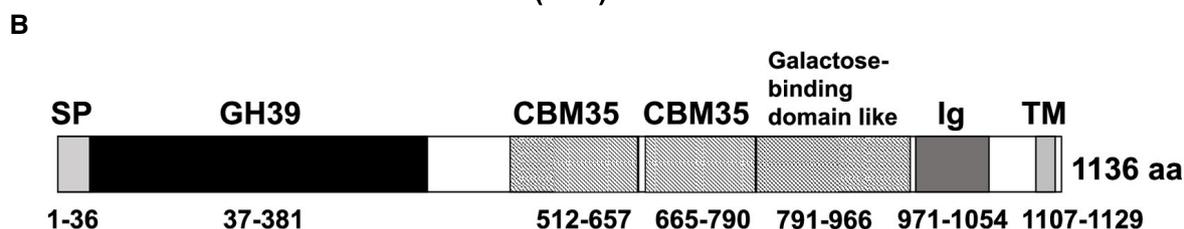
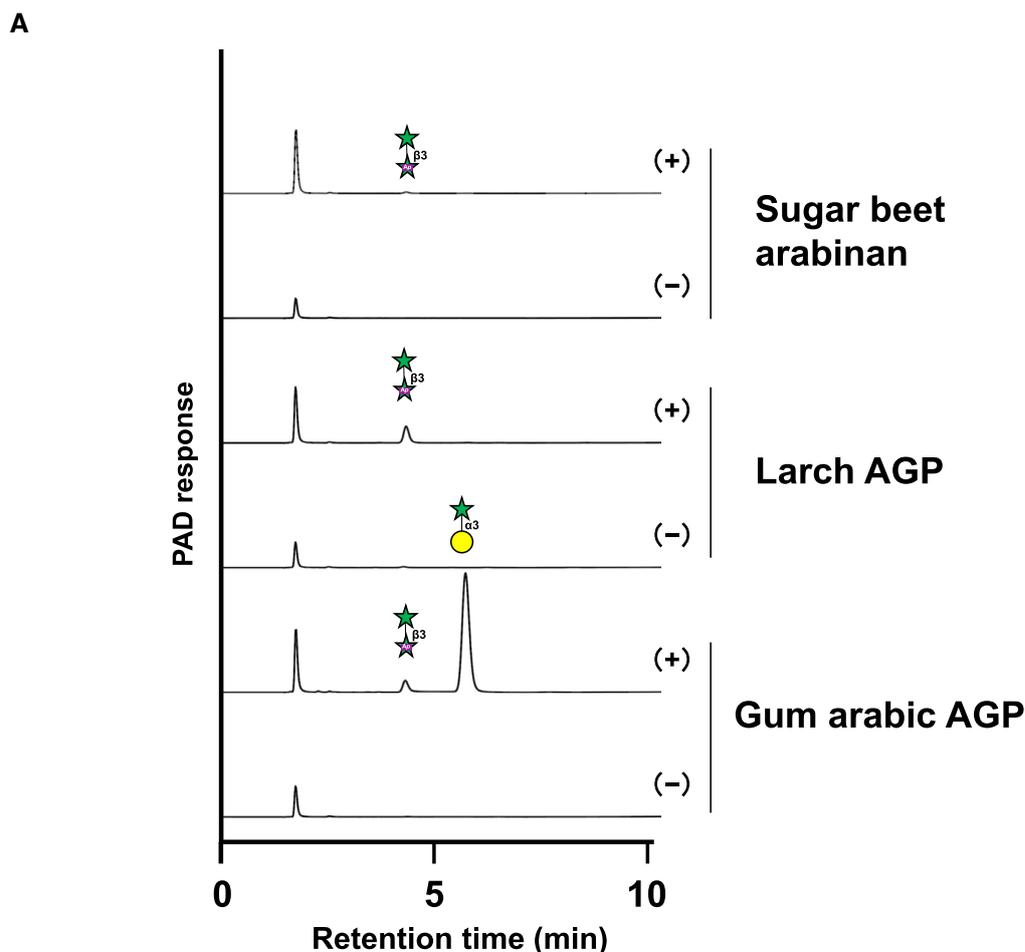


図 3.1.3. A. 甜菜アラビナン（上段）、カラマツ AGP（中段）、アラビアゴム AGP（下段）を GAfase によって酵素処理した際の HPAEC-PAD クロマトグラム。ここでは SNFG と異なり、Arap を白く Ap と書かれた赤い星で示す。B. GAfase のドメイン構造。Sasaki et al., *Appl Environ Microbiol*, 2021 (202)より。

#### GH39 について

GH39 ではこれまで  $\beta$ -xylosidase、 $\alpha$ -L-iduronidase、 $\beta$ -glucosidase、 $\beta$ -galactosidase、xylanase(203)、 $\alpha$ -L- $\beta$ 1,2-arabinobiosidase、Gal- $\alpha$ 1,2-L-arabinofuranosidase(204)が報告されており、GAfase と同様の活性を持つ酵素は確認されていない。よって、本酵素はアラビアゴム AGP から糖質源を取得するためにビフィズス菌が独自進化させたものだと考えられる。

反応機構は、古典的な Koshland の二重置換機構に従うアノマー保持型機構であり、活性化剤や補酵素を必要としない。また求核性触媒残基および酸塩基性触媒残基は 2 つの Glu であるとも特定されている。

結晶構造はこれまで 10 の酵素で報告されており、GH-A に属する ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel fold であることが解っている。しかし、いずれもリガンドフリーや単糖との複合体構造であり、GAfase に類似した認識様式の構造は解かれていないため GAfase の活性ポケットの残基を一次構造（アミノ酸配列）のみから捉えるのは容易ではない。

### CBM35 について

CBM35 は、約 140 アミノ酸からなるタンパク質モジュールであり、様々な異なる特異性を示す細菌特有のファミリーである。これまで報告されてきたものは 4,5 $\Delta$  不飽和ガラクトン酸、GlcA(205)、 $\beta$ 1,4-マンナンの内部領域(206)、 $\beta$ 1,3-ガラクトンの非還元性ガラクトース残基(207)、 $\beta$ -マンナンの骨格に  $\alpha$ 1,6 を結合したガラクトースユニット(208)、 $\alpha$ 1,6-および  $\alpha$ 1,4-グルカン(209, 210)に結合する。

CBM35 は 2 枚の  $\beta$ -sheet がそれぞれ 4 本と 5 本の逆平行な  $\beta$ -strand を含む  $\beta$ -sandwich 構造をとっている。一部の CBM35 では、片方の  $\beta$ -sheet の凹面に糖の結合部位がある。一方、他の CBM35 ではリガンド結合部位は、2 枚の  $\beta$ -sheet をつなぐ役割を果たす「可変ループ部位」に位置している。またこのファミリーでは糖鎖の非還元末端を認識するタイプ C と、糖鎖の中間部分を認識するタイプ B が混在している。よって、本ファミリーでは全体のアミノ配列が保存されていても、結合様式の異なる CBM が存在する。

GAfase の CBM35 については詳細な生化学的解析はまだ行われていない。唯一、GAfase の CBM35、あるいは galactose binding domain like 領域を欠失させると酵素活性が失われ、このことから CBM35 の GAfase 酵素活性における重要性が示唆されている。GAfase の CBM35 は、先述の galactose binding domain like を除いて、既報の CBM35 構造と配列同一性を示していない。galactose binding domain like の遠縁ホモログである *Acetivibrio thermocellus* 由来の CBM35 は可変ループ部位で 4,5 $\Delta$  不飽和ガラクトン酸を認識するタイプ C の CBM である。しかし、アラビアゴム AGP には 4,5 $\Delta$  不飽和ガラクトン酸が含まれていないため、galactose binding domain like は別の糖質を認識すると考えられる。よって、既知の CBM35 構造から GAfase の CBM35 が認識するリガンドやその結合様式は特定できない。

#### 3.1.1.4. 本研究の目的

GAfase の有する GH39 ドメインの基質特異性は既報のものと明らかに異なるが、その詳細な認識様式は不明である。また CBM35 ドメインが認識する糖構造も特定されていない。そこで本研究では構造生物学的観点から各ドメインの認識様式の特定を目指した。

### 3.1.2. 方法

本研究における試薬は特記のない限り、和光純薬工業またはナカライテスクの特級試薬を用いた。また、液体試薬は予め滅菌したもの、あるいは滅菌された状態で入手したものを利用している。遠心には MX-307（トミー）を用いた。

また特記のない限り、濃度は全て終濃度である。

#### 3.1.2.1. 大腸菌異種発現用プラスミド

大腸菌異種発現用プラスミド pET23d GAfase\_His6-tag は鹿児島大学の藤田清貴准教授より供与頂いた（図 3-1-4）。本研究で用いるコンストラクトでは N 末端のシグナルペプチド、C 末端の膜結合領域および免疫グロブリン様ドメインを欠失させており、代わりに Ni-IMAC 精製用に His6-tag が付加されている。

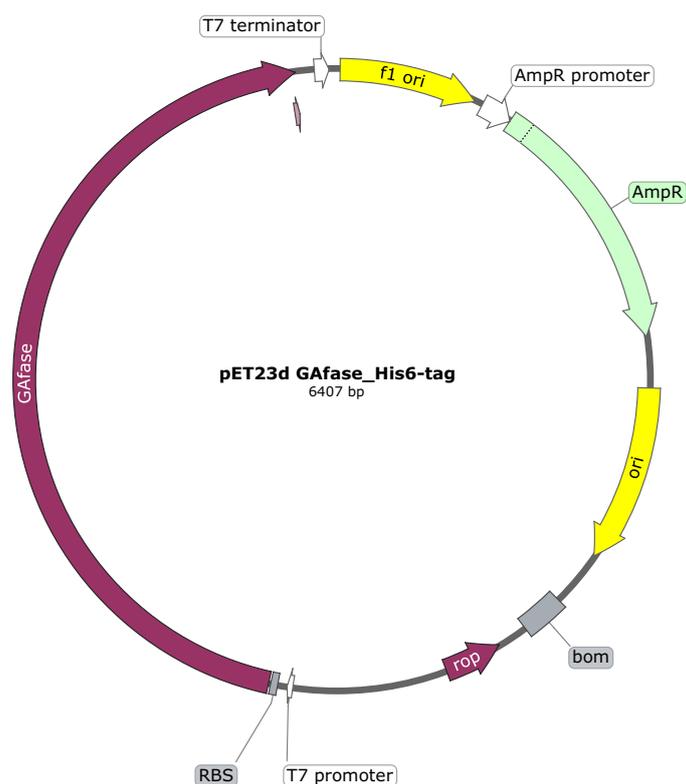


図 3-1-4. pET23d GAfase\_His6-tag のプラスミドマップ

#### 3.1.2.2. 形質転換

第一部 1.1.2.5 節と同様の方法で行なった。

#### 3.1.2.3. プラスミド抽出

第一部 1.1.2.6 節と同様の方法で行なった。

#### 3.1.2.4. 発現検討

第一部 1.1.2.7 節と同様の方法で行なった。大腸菌発現株には BL21(DE3)を用いた。抗生物質は 100 µg/mL Ampicillin を用いた。破碎バッファーには 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl を用いた。

#### 3.1.2.5. 封入体の可溶化

GE Healthcare の”Rapid and efficient purification and refolding of a (histidine)<sub>6</sub>-tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies”を参考に封入体化した GAfase の可溶化を試みた (<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=100>)

[16&assetid=16306](#))。なお、ここでは実行した実験は封入体の可溶化だけであり、その後のタンパク質のリフォールディングは行なっていない。

1. 3.2.1.4と同様に 0.1 mM IPTG で発現誘導後、37°Cで 20 時間培養した。
2. 得られた菌体を 20 mM Tris-HCl pH 8.0、800  $\mu$ L に懸濁し、超音波破碎を行なった。その後、破碎物を 10 分間、13000 rpm で遠心し、上清 (可溶画分、①) と沈殿 (不溶画分) を分けた。
3. 不溶画分を 2 M urea、20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl、2% Triton X-100、600  $\mu$ L に懸濁し、2. と同様に超音波破碎、遠心を行い、上清 (②、③) と沈殿を分けた。これを 2 回行なった。
4. 沈殿物を 20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl、5 mM imidazole、6 M guanidine hydrochloride、1 mL に懸濁させることで封入体を可溶化させた。なお、本来この段階でシステインの酸化を抑えるために 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol を加えるが、GAfase はアミノ酸配列中にシステインを含んでおらず、 $\beta$ -mercaptoethanol を添加していない。これを 15 分間、13000 rpm で遠心し、上清を可溶化させた封入物として回収した (④)。その後、沈殿を再度懸濁した (⑤)。

サンプル①②③④⑤のタンパク質組成を調べるべく、SDS-PAGE を行なった。

### 3.1.2.6. SDS-PAGE

第一部 1.1.2.8 節と同様の方法で行なった。

### 3.1.2.7. 培養のスケールアップ

第一部 1.1.2.10 節と同様の方法で行なった。ただし、本研究については培養スケールを 6L (発現検討時の 1,200 倍) まで上げた。

### 3.1.2.8. タンパク質の精製

第一部 1.1.2.11 節と同様の方法で行なった。本章では Ni-IMAC、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で行なった。バッファーは第一部 1.1.2.11 と異なり、以下のものを用いた：

- 破碎バッファー：50 mM Tris-HCl pH 7.5、200 mM NaCl
- Ni カラム洗浄バッファー：破碎バッファー + 5 mM imidazole
- Ni カラム溶出バッファー：50 mM MES-NaOH pH 6.5、150 mM NaCl
- 陰イオン交換バッファー：25 mM MES-NaOH pH 6.5
- ゲルろ過バッファー：25 mM MES-NaOH pH 6.5、150 mM NaCl
- 精製後のバッファー置換：10 mM MES-NaOH pH 6.5、150 mM NaCl

### 3.1.2.9. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

第一部 1.1.2.12 節と同様の方法で行なった。本章では基質に 5%または 1% arabic gum、バッファーに sodium acetate pH 6.0 を用いた。展開溶媒には 1-propanol:ethanol:純水を 7:1:2 の比率(202)で展開の 30 分前に混合して用いた。呈色液は 10 mL 10% sulfuric acid に 0.1 g iron(III) chloride を懸濁し、そこにエタノールに懸濁した 6% orcin を 1 mL 加え、呈色直前 (5 分以内) に混合したものを用いた (<http://www.cchem.berkeley.edu/rsgrp/TLCStainGeneralReference.pdf>、217 番目のレシピ)。

### 3.1.2.10. 熱安定性試験

第一部 1.1.2.14 節と同様の方法で行なった。

### 3.1.2.11. Pre-Crystallization Test

第一部 1.1.2.15 節と同様の方法で行なった。

### 3.1.2.12. 結晶化スクリーニング

第一部 1.1.2.16 節と同様の方法で行なった。なお、本サンプルについては JCSG Suite Core I、II、III、IV に加え、Nextal Biotechnologies の AmSO4s Suite を模した自作のキットでもスクリーニングを行なった。

### **3.1.2.13. 結晶化条件の最適化**

第一部 1.1.2.17 節と同様の方法で行なった。それに加え、タンパク質溶液と結晶化溶液の比率も条件検討のファクターの一つとして用いた。

また、GAfase の反応生成物の部分アナログである Gal と L-Ara の添加も検討した。

### **3.1.2.14. シーディング**

第一部 1.1.2.18 節と同様の方法で行なった。

### **3.1.2.15. X 線回折強度収集**

第一部 1.1.2.19 節と同様の方法で行なった。

### 3.1.3. 結果

#### 3.1.3.1. GAfase の可溶化条件の検討

本研究を開始する以前から、鹿児島大学の藤田清貴准教授より GAfase は異種発現時、培養スケールをあげると不溶化する傾向があると報告を受けていた。タンパク質の結晶化は、スクリーニングだけでも通常 4 mg の高純度かつ可溶性なタンパク質が必要になってくる。そこで通常の発現条件の検討と並行して、少量で封入体の変性による可溶化を試みた。図 3-1-5 に培養温度検討および培養時間検討と、少量で封入体の可溶化を行なった際の SDS-PAGE を示す。温度検討では 30°C で 20 時間以上培養した際に GAfase の分子量に該当する 101.9 kDa に当たる位置に、不溶画分と可溶画分の両方で太いバンドが得られた。よって通常の条件検討では誘導後 30°C で 20 時間以上培養することが目的タンパク質の大量調製に適しているとした。封入体の可溶化では沈殿物を 20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl、5 mM imidazole、6 M guanidine hydrochloride で懸濁した際に多量の可溶化 GAfase が得られた。

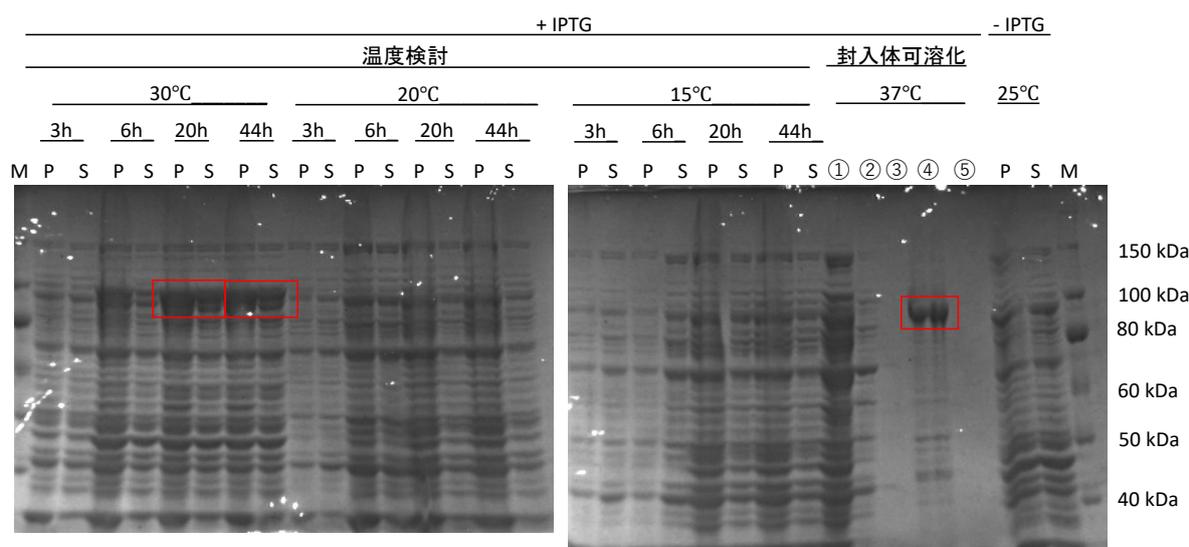


図 3-1-5. GAfase 異種発現の条件検討。ここでは培養温度検討、培養時間の検討、封入体の可溶化を検討した際の SDS-PAGE を示す。GAfase に当たるバンド (101.9 kDa) を赤枠で示す。M：分子量マーカー；P：不溶画分；S：可溶画分。①②③④⑤については 3.1.2.5. を要参照。

封入体から可溶化させたタンパク質は変性しており、これが正しく折り畳まるよう、リフォルディングの条件を検討する必要がある。本研究ではその検討を行っていない。代わりに 30°C で培養した条件を 6 L までスケールアップし、目的タンパク質の大量調製を目指した。

#### 3.1.3.2. GAfase の大量調製

大量培養後の精製には Ni-IMAC、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた (図 3-1-6)。陰イオン交換クロマトグラフィーでは NaCl の濃度勾配をかけ、150 mM 付近でメインピークが溶出された (図 3-1-6. B)。ゲルろ過精製後の SDS-PAGE ではメインピーク中に GAfase の分子量に該当する 101.9 kDa に当たる太いバンドが確認され (図 3-1-6. C)、最終的に培養液 1 L あたり 8 mg の GAfase 精製タンパク質を獲得することに成功した。

生化学的に獲得したタンパク質が GAfase であることを確かめるべく、アラビアゴムに対する活性を TLC で調べた。5% または 1% Arabic Gum を精製タンパク質と混合したところ、タンパク質未添加の条件と比較して、基質濃度に応じて濃さが変わるスポットの出現が確認された (図 3-1-7)。これが GAfase の反応生成物である Gal-β1,3-L-Araf であると想定し、精製したタンパク質が GAfase であると判断した。

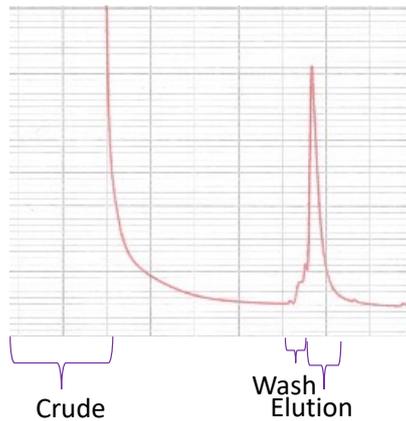
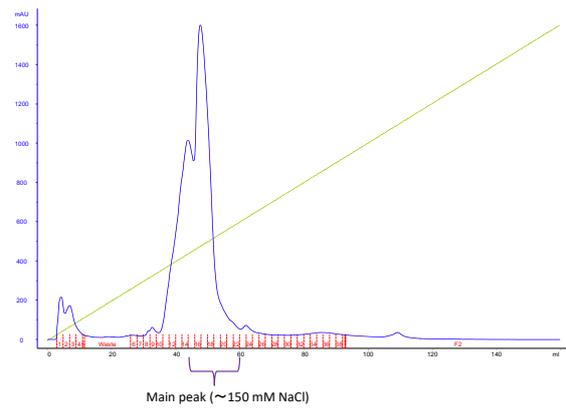
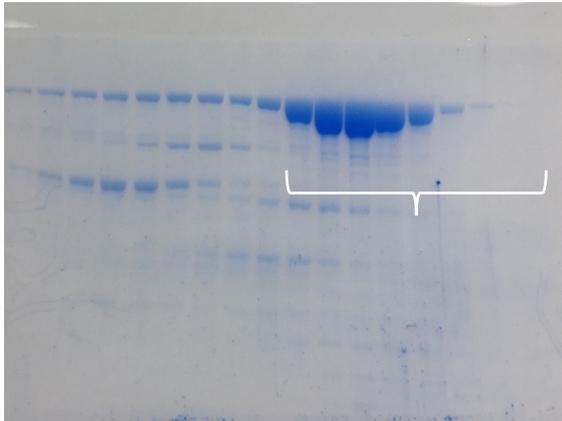
**A****B****C**

図 3-1-6. **A.** GAfase の Ni-IMAC 精製時のクロマトグラム。**B.** GAfase のイオン交換精製時のクロマトグラム。**C.** GAfase のゲルろ過時精製にメインピークに該当するフラクションの SDS-PAGE。**B.** と **C.** では波括弧で示したフラクションを以降の実験に用いた。

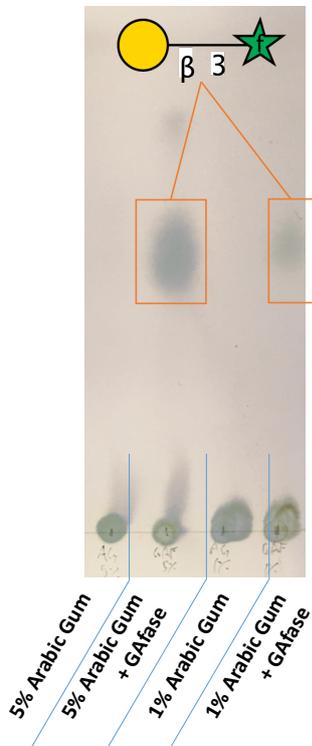


図 3-1-7. GAfase の定性的な活性を示した TLC。GAfase の反応生成物である Gal-β1,3-L-Araf に当たるスポットを枠で示す。

### 3.1.3.3. GAfase の結晶化

GAfase の結晶化に適したタンパク質を検証するべく、熱安定性試験を行なった。最高濃度 20 mg/mL から 2 倍ずつ段階希釈を行い、温度を 25°C から 99°C まで徐々に上げてタンパク質を変性させた。変性マーカーである 1x SYPRO Orange の蛍光度を測定したところ、20 mg/mL、10 mg/mL 以外の条件はタンパク質濃度が低すぎたためバックグラウンドとほぼ同程度の蛍光しか得られなかった。20 mg/mL、10 mg/mL については特定の温度を閾に蛍光度の上昇が見られ、そこ GAfase の変性温度 ( $T_m$  値) であると考えた (図 3-1-8)。微分化した蛍光度の最大値から GAfase の変性温度は 52.05°C であることが解った。 $T_m$  値が高かったことから、GAfase は結晶化に適しているサンプルであることが示唆された。

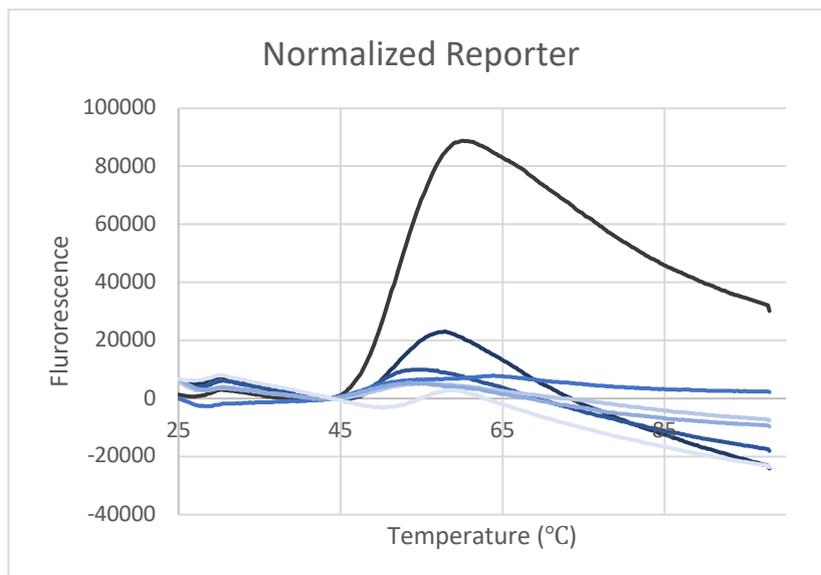
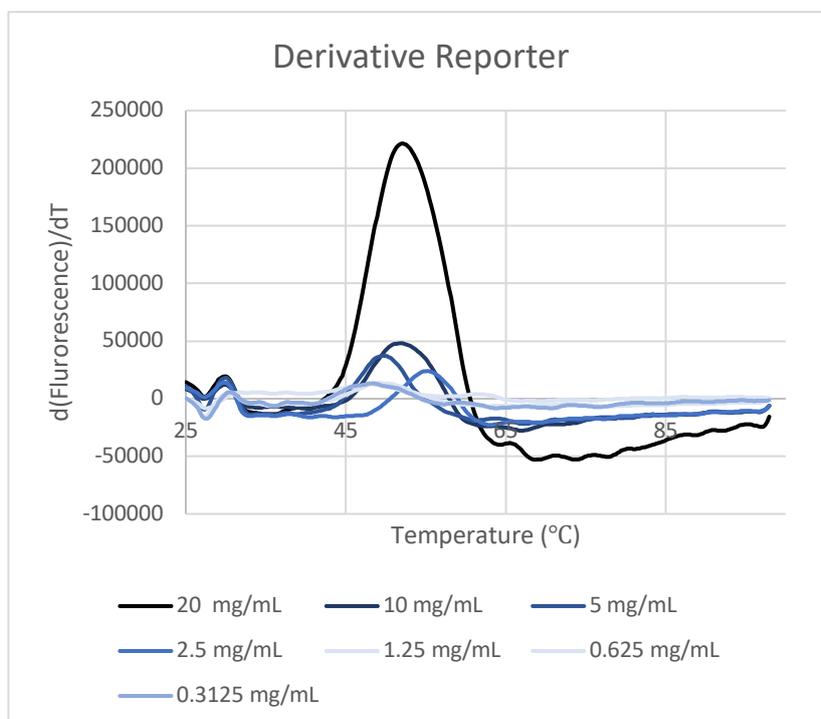
**A****B**

図 3-1-8. GAfase の熱安定性試験。温度上昇に伴うタンパク質変性マーカー (1x SYPRO Orange) の蛍光度 (A) とその微分値 (B) の変化を示す。

熱安定性試験の結果を踏まえ、結晶化前に GAfase の保存バッファーなどの条件検討は不要であると判断した。

PCT で結晶化スクリーニングに最適なタンパク質濃度を検討した。タンパク質濃度を 10 mg/mL から 25 mg/mL まで振り、PCT キットの溶液を混合し、従来の PCT の方法に沿って 30 分間、20°C にインキュベートした。通常、混合溶液内の沈殿物を観察してタンパク濃度を決定するが、GAfase について沈殿が見られなかった。そこで更に 3 日間インキュベートしたところ、タンパク質濃度 15 mg/mL、2.0 M ammonium sulfate、0.1 M Tris-HCl pH 8.5 の条件で微結晶が得られた。

簡易的な条件の最適化として混合するタンパク質溶液と結晶化溶液の比率を振ったところ、0.7 対 0.35 の比率で 100  $\mu$ m 台の薄い板状の結晶を得ることに成功した (図 3-1-9 A.)。

更に結晶化条件を探索すべく、結晶化スクリーニングと MMS を行なった。キットは JCSG Core I、II、III、IV（スクリーニングのみ）と AmSO4s Suite を模した自作のキット（スクリーニングと MMS）を用いた。その結果、16 の条件で様々な形状の結晶が得られた。得られた一部の結晶について条件の最適化を行なったものについて図 3-1-9 に示す（ただし、C と D について現時点で最適化はまだ行っていない）。

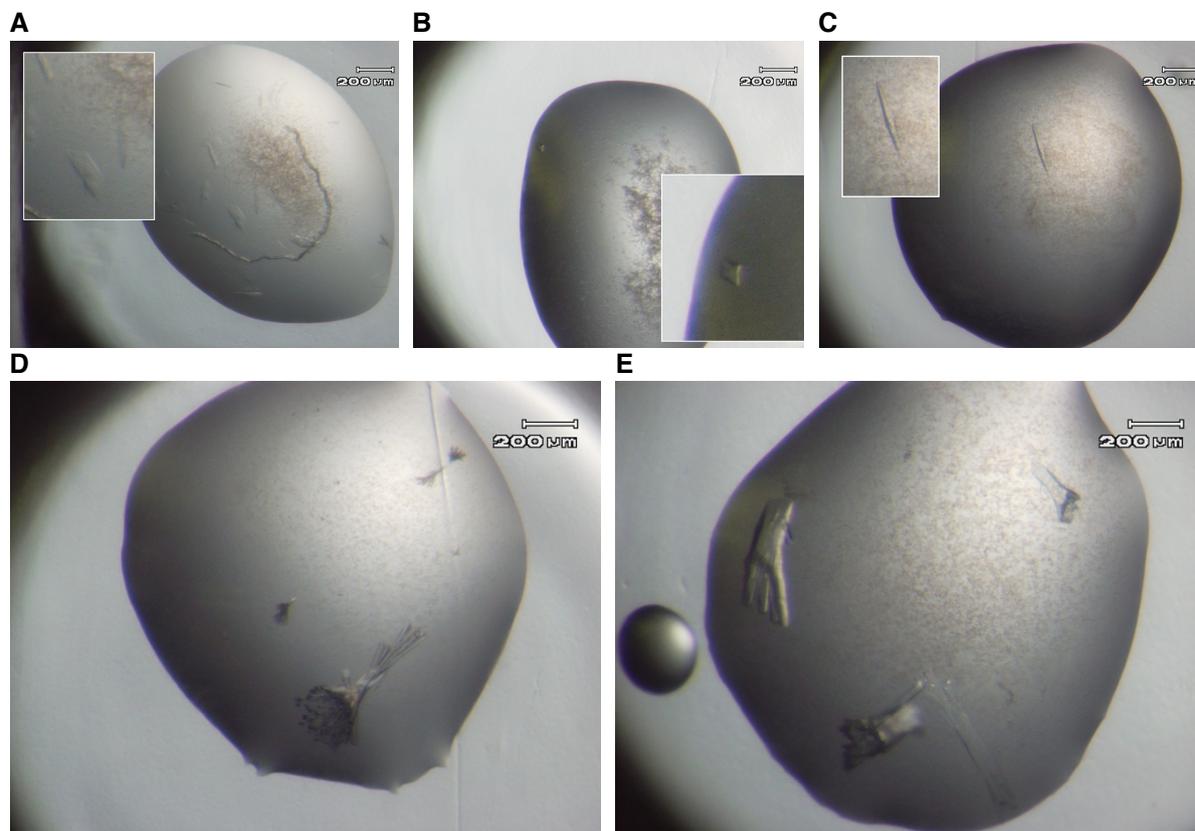


図 3-1-9. GAfase の結晶。結晶化条件は以下の通りである。

- A. 2.0 M ammonium sulfate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 15 mg/mL GAfase, protein/reservoir ratio = 0.7:0.35, 20°C, 3 days
- B. 2.2 M ammonium sulfate, 0.2 M ammonium acetate, 20 mg/mL GAfase, 20 mM Gal, 4°C, 3 days
- C. 20% (w/v) PEG6000, 0.1 M HEPES-NaOH, 20 mg/mL GAfase, 20 mM Gal, 20°C, 3 days
- D. 20% (w/v) PEG3350, 0.2 M lithium nitrate, 15 mg/mL GAfase, 20 mM Gal, 20°C, 1 month
- E. 20% (w/v) PEG3350, 0.2 M magnesium nitrate, 15 mg/mL GAfase, 20 mM Gal, 20°C, 1 month

図 3-1-9. A-C の結晶を瞬間凍結し、X 線を照射した。抗凍結剤には 20% trehalose (A)、20% MPD (B)、20% ethylene glycol (C) を用いた。その結果、図 3-1-9. A の結晶について 2.7 Å 程度の分解能の X 線回折像が得られた（図 3-1-10）。しかし、抗凍結の効果が多分であったため、溶液中に氷の結晶が生じ、アイスリングと共に結晶が損傷し、これ以上の解析はできなかった。

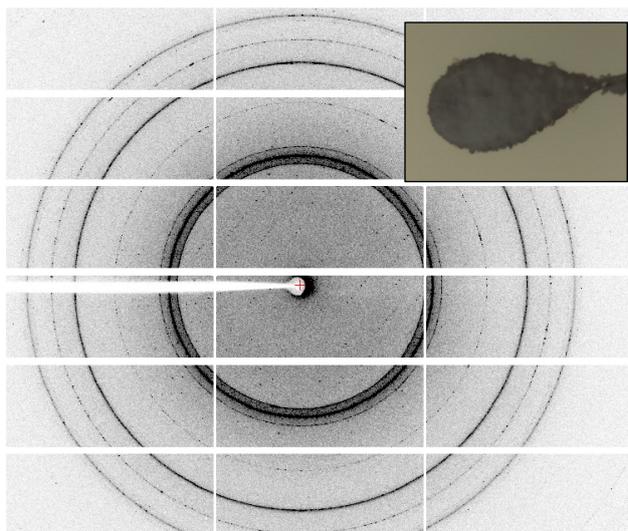


図 3-1-10. GAfase 結晶の X 線回折像。右上に X 線照射時のクライオループの写真を示す。クライオループには氷の結晶による影ができ、回折像全体に氷の結晶の回折（アイスリング）が見られる。回折像中央に直線的に並んでいる GAfase の結晶の回折点が視認できる。

### 3.1.4. 考察

#### 3.1.4.1. GAfase の構造予測

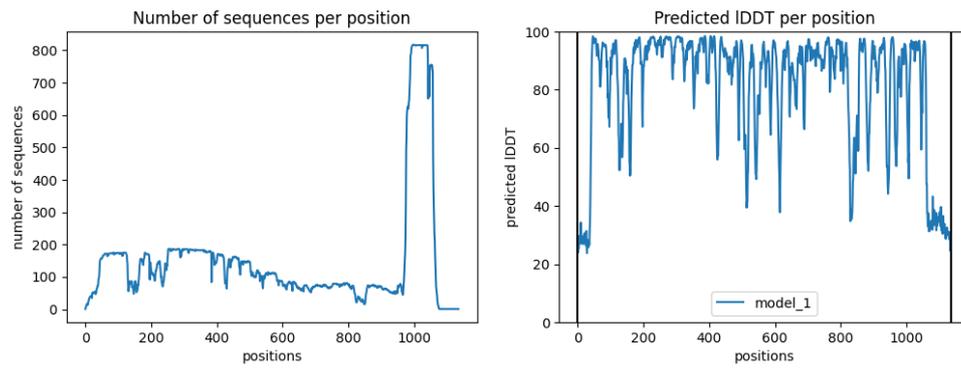
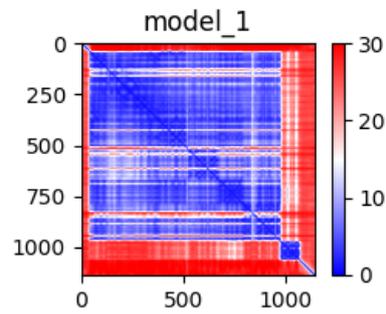
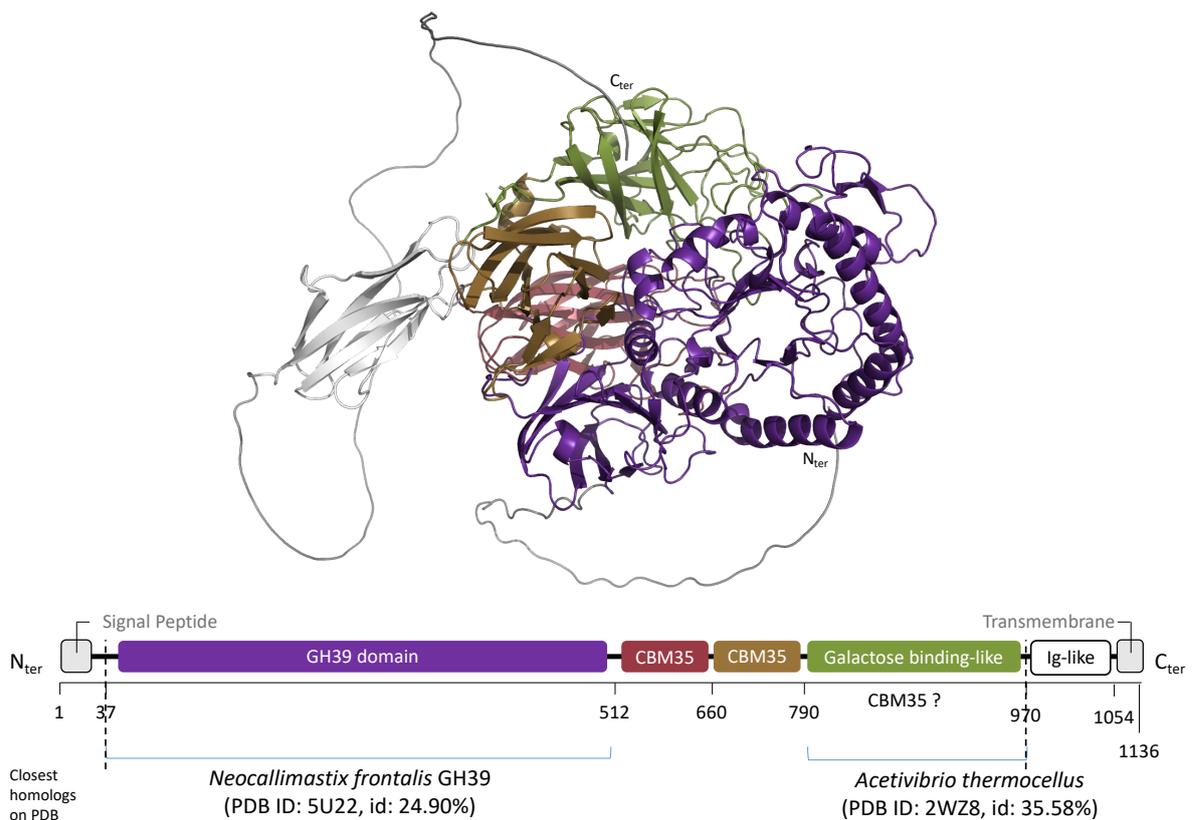
本研究では GAfase の分子機能の解明を目的に、タンパク質の結晶化に取り組んだ。GAfase は菌体内での異種発現中に不溶化しやすい酵素ではあったが、精密な培養時の温度検討、そして培養液量を 6 L までスケールアップする事で結晶化に必要な量のタンパク質を高純度で獲得する事に成功した。また結晶化スクリーニングでも複数の条件で結晶を得る事に成功した。しかし、現時点では構造解析に適した回折データの取得には至っていない。

結晶構造に代わり、AlphaFold2 によって予測された GAfase の予測構造を基に分子機能について考察してみた。図 3-1-11 に GAfase の予測構造を示す。IDDT はモデル全体で 70%以上の高いスコアが得られたが、モデル作製に先駆けた MSA に用いられた配列数は GH39 ドメインでは 200 以下、CBM35 と galactose bindinglike ドメインでは 100 以下と、極めて少なかった。唯一、免疫グロブリン様ドメインで 800 近い配列が用いられたが、一般的に AlphaFold2 の MSA では 1000 以上の配列を用いたものが高い信憑性を示す。それに比べると免疫グロブリン様ドメインに用いられた配列数は少ない (図 3-1-11. A)。PAE のスコアは、配列の末端部分と免疫グロブリン様ドメイン以外は全体的に低かった (図 3-1-11. B)。得られたモデルでは 2 つの CBM35 ドメイン (以降 CBM35\_1 と CBM35\_2 とする) と Galactose binding-like ドメインが GH39 ドメインの一部を覆うように連なっており、密接な位置関係を築いているように見えた (図 3-1-11. C)。

Dali サーバーによる構造比較では、GAfase の GH39 活性ドメインは *Neocallimastix frontalis* 由来の GH39 が構造的に最も類似しているとされた (PDB ID : 5U22, Z score : 43.7, RMSD : 1.9 Å, 配列同一性 25%)。しかしこの酵素についてはリガンドとの複合体構造は報告されておらず、この構造との比較からはリガンドの認識様式に関わる情報は得られない。代わりに *Geobacillus stearothermophilus* 由来の GH39  $\beta$ -xylosidase DNP-Xylp 複合体 (PDB ID : 2BFG, Z score : 24.4, RMSD : 3.4 Å, アライメントされた 389 残基内で配列同一性 9%) と比較した。重ね合わせたところ、Xyl の周囲で GAfase の N193, E194 (PDB ID 2BFG では Ala に変異させている)、H286, E321 に当たる残基が保存されていた (図 3-1-12. A)。これらに L288 と W353 が加わる事によって Gal- $\beta$ 1,3-L-Araf の還元末端側の糖、Arafが入る-1 サブサイトが形成されると考えられた。さらに GAfase では Xyl の 3 位、4 位のヒドロキシ基の先にアミノ酸が存在しない。そこに Gal が入る-2 サブサイトがある可能性が示唆された。CBM35 と Galactose binding-like ドメインは以下のドメインと構造類似性を示した。

- CBM35\_1 : *Niallia circulans* 由来 CBM35 の isomaltoheptaose 複合体 (PDB ID : 3WNM, Z score : 17.8, RMSD : 2.3 Å, アライメントされた 126 残基内で配列同一性 24%、図 3-1-12. B)
- CBM35\_2 : *Acetivibrio thermocellus* 由来 CBM35 の  $\Delta$ -4,5-anhydrogalacturonic acid 複合体 (PDB ID : 2W47, Z score : 16.5, RMSD : 1.8 Å, アライメントされた 118 残基内で配列同一性 18%、図 3-1-12. C)
- Galactose binding-like : *Phanero dontia chryso sporium* 由来 CBM35 の galactose 複合体 (PDB ID : 7BYT, Z score : 16.2, RMSD : 1.7 Å, アライメントされた 118 残基内で配列同一性 23%、図 3-1-12. D)

Galactose binding-like ドメインは図 3-1-11. C で示すように配列同一性では *Acetivibrio thermocellus* 由来の CBM35 に似ているが、構造的には *Phanero dontia chryso sporium* 由来のものの方が類似しているという結果になった。各構造モデルを GAfase の予測構造と重ね合わせてリガンドの周囲残基を表示した。しかし、いずれのドメインでも保存されているアミノ酸残基は存在しなかった (図 3-1-12. B-D)。よって GAfase の CBM と Dali サーバーで検出された CBM は構造的に類似しているが、リガンドの結合様式は全く異なる可能性が示唆された。現時点では GAfase の CBM によるリガンド認識に関わるアミノ酸残基、そして認識される糖の構造は不明である。

**A****B****C**

**図 3-1-11.** AlphaFold による GAfase の構造予測。 **A.** 配列カバレッジスコアと IDDT スコア。 **B.** PAE スコア。 **C.** 作製されたモデル。ここではドメインごとに色分けしている。下部にドメイン構造を示す。破線で本研究で用いられたコンストラクトの切断部分を示す。角括弧で PDB に対する BLASTp 検索でホモログが見つかった領域を示す。

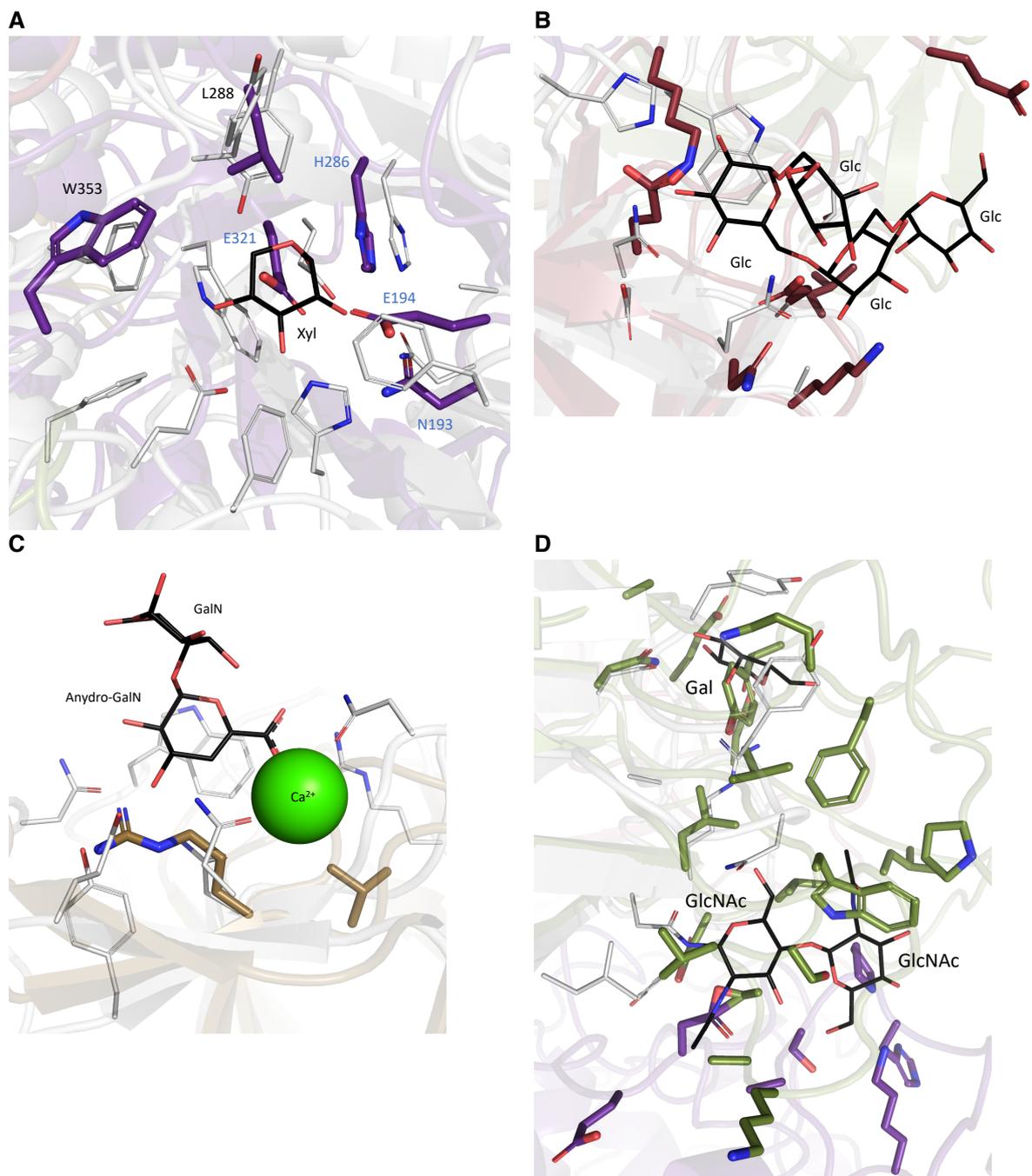


図 3-1-12. GAfase の GH99 活性ドメイン (A)、CBM35\_1 (B)、CBM35\_2 (C)、galactose binding-like ドメイン (D) と類似構造の比較。比較に用いられた構造のアミノ酸残基と糖をそれぞれ白と黒で示す。GAfase と比較対象で保存されている残基を青字で示す。

### 3.1.4.2. 今後の GAfase とリガンドの複合体構造の取得について

本研究では良質な GAfase の結晶が得られた。しかし、いずれの条件でもリガンドには単糖（生成物に部分アナログ）を用いている。GAfase はアラビアゴムから Gal- $\beta$ 1,3-L-Araf を切り出す endo 型の酵素であり、この 2 糖が活性中心に入っている状態が見たい。そこで、GAfase でアラビアゴムを酵素処理し、限外濾過で酵素と糖タンパク質から生成物を分離させて、生成物を含んだ濾液を新たに GAfase と混合する事で複合体構造を得られるかもしれない。

いずれにしろ、GAfase の構造解析は成功する見込みがある。今後さらに実験を続ける必要がある。

### 3.1.4.3. ビフィズス菌以外の細菌によるアラビアゴム AGP の利用について

アラビアゴムはアカシア樹脂とも呼ばれおり、食品の乳化剤や安定剤として用いられる植物の分泌物である。よって、アラビアゴム AGP を資化できる微生物はビフィズス菌に限らず、他の腸内細菌や植物から単離された細菌や土壌菌などが挙げられる。

近年、特に研究されているのは PL42 である。この多糖リアーゼファミリーの酵素群はアラビアゴム AGP 由来のグルクロン酸に  $\alpha$ 1,4-結合したラムノースに特異的な *exo- $\alpha$ -L-rhamonosidase* であることが *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来の酵素で発見された(211, 212)。その活性から当初 GH145 に登録されていたが、その後、細菌 *Bacteroides plebius*(213)および真菌 *Fusarium oxysporium*(214)由来のホモログで  $\alpha$ -L-Rha-1,4- $\alpha$ -D-GlcA に対するリアーゼ活性を示し、これが PL24 と PL25 に類似していることから、PL42 に再分類された。

上記の *Fusarium oxysporium* 由来でもう一つ、GH79 が  $\alpha$ -L-rhamonose-1,4-glucuronidase であることが報告されている(215)。この酵素が認識する糖構造がアラビアゴム AGP に特有であることから、GH79 と PL42 は *Fusarium oxysporium* によるアラビアゴム AGP 資化の重要な因子として協調的に働いていることが示唆されている。

本研究の対象である GH39 GAfase の由来菌である *B. longum* JCM7052 株では  $\alpha$ -L-rhamonose-1,4-glucuronic acid の分解酵素は知られていない。また GH79 と PL42 遺伝子の存在も確認されていない。よって、*B. longum* JCM7052 株は *Fusarium oxysporium* とは全く別の形でアラビアゴム AGP を糖質源していることが考えられる。

最後に図 3-1-13 に本研究の実験フローチャートを示す。

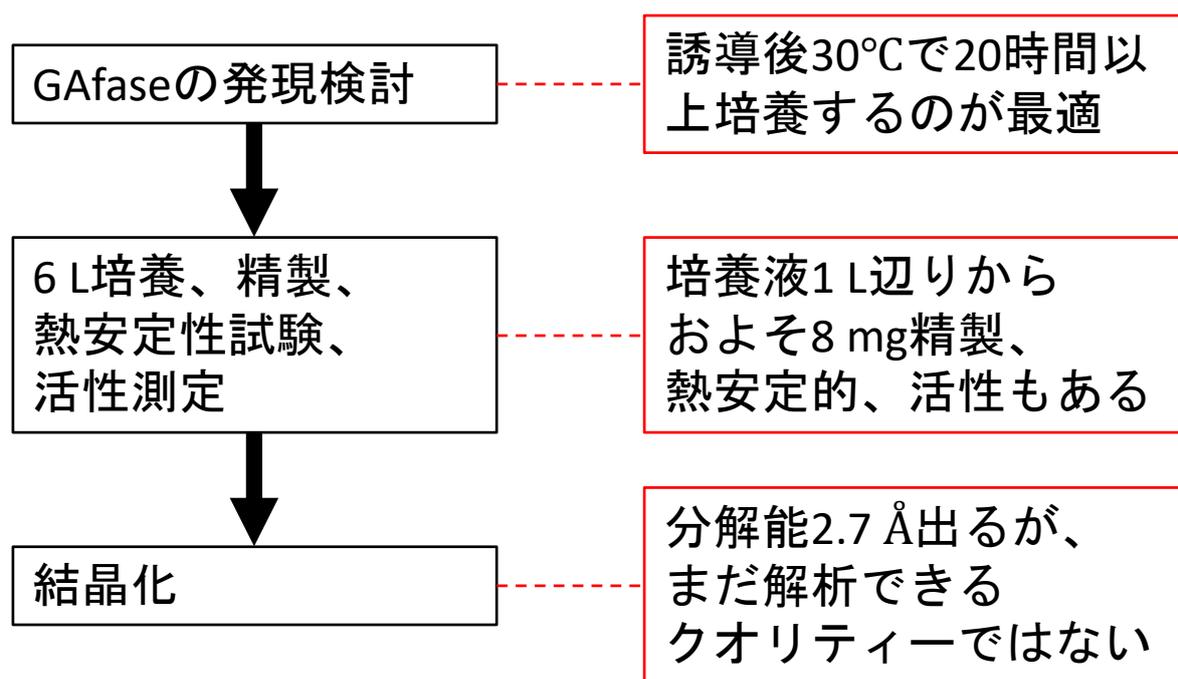


図 3-1-13. アラビアゴム含有アラビノガラクトサン資化経路関連酵素 GH39 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GAfase の構造解析における実験フローチャート。実験内容の黒枠、各実験で至った結論を赤枠で示す。

## 総合討論

ビフィズス菌は独自に進化させた様々な CAZyme を利用することにより貧栄養環境下にある難消化性糖質を分解し、炭素源・エネルギー源を獲得して大腸内に定着・増殖する。本研究では、ビフィズス菌由来の 6 つの新規性の高い GH や CBM の X 線結晶構造解析を主目的とした。これにより、CAZyme のどのアミノ酸残基がどのように糖質と相互作用し、その結果、どのような現象が起こり得るのか推測を立て、更なる機能解析へと繋げた。

第 1 部では、乳児型ビフィズス菌 *B. bifidum* JCM1254 株のムチン含有 Core 2 O-glycan の代謝に関わる 3 つの膜結合型 GH、GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase AgaBb、GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase AfcA 及びその N 末端に付随する新規 CBM、そして GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase BbhII について研究した。

AgaBb は B 型血液型抗原に特異的な GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase である。本研究では AgaBb 活性ドメインのリガンドフリー構造を決定し、遠縁ホモログとの構造比較から B 型血液型抗原を構成する Gal- $\alpha$ 1,3-Gal の認識様式を特定した。また活性に必須であると考えられている B 型血液型抗原の Fuc の認識に関わる残基候補も推定した。それとは別に活性ドメインの下流にある未解析領域が酵素の安定化に関与していることを突き止めた。さらに、全長配列の C 末端側にある免疫グロブリン様ドメインが酵素の二量体化に関わっていると考えられ、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析で二量体構造の可視化の可能性が見出された。GH110 ファミリーは 2007 年に、血液型抗原変換酵素の探索の一環で設立されたファミリーである。医療現場における輸血可能な血液のストック不足は兼ねてから大きな問題となっていた。GH110 の発見は B 型の血液から理論上、Rh+ の患者になら誰にでも輸血できる O 型（万能血液型）の血液ストックを増やすことを可能にすると考えられていた。しかし、実際は酵素の不安定化などの影響により、実用化までの道のりはまだ長い。Fuc 認識サイト推定の裏付けやクライオ電子顕微鏡での高分解能のマップの取得などの課題が残っているが、AgaBb の研究を完遂すれば、バイオメディックスの分野で実用化が期待されている血液型変換酵素の安定化や機能効率化に応用できる知見が得られるかもしれない。

AfcA はムチン糖鎖や HMO の修飾糖である Fuc を遊離させる GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase である。本研究では AfcA の N 末端領域にある新規 CBM とそのリガンドである 2'-FL との複合体構造を決定した。この CBM は既報のものと同配列同一性も構造類似性も示していないことから、本研究で得た成果は GH の活性を助ける糖質結合モジュールの理解における新たな知見である。さらに、この CBM は系統的にビフィズス菌特有である。乳児の大腸内でビフィドームを形成する中で HMO やムチン糖鎖に含まれる Fuc はビフィズス菌が取得できる糖質源の大部分を占めている。フコシル化糖質を認識する CBM はビフィズス菌が乳児腸内で善玉菌の代表格という立ち位置を獲得するのに重要な因子なのかもしれない。

BbhII はムチン糖鎖特有の硫酸化糖質を分解する GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase である。本研究では BbhII の阻害剤候補として化学合成された PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果を酵素学的に解析し、いずれも BbhII の加水分解反応に対して強い競合阻害を示すことが明らかとなった。特に PUGNAc-6S については X 線結晶構造解析により活性中心および CBM32 ドメインへの結合様式を理解することができた。NAGT-6S の方はその安定性とビフィズス菌のムチン資化能への影響が示されたこともあり、複合体構造による分子レベルでの解析が望ましい。硫酸化糖質はムチンの一部に含まれており、ビフィズス菌以外の腸内細菌がこれを糖質源とするのか、またそれに関わる遺伝子等については知見が少ない。阻害剤が他の腸内細菌にどのような影響を及ぼすのか研究を続ければ、腸内環境の制御などが可能になるかもしれない。

本論文では例として Core 2 O-glycan の代謝経路におけるこれらの酵素の働きについて述べたが、*B. bifidum* JCM 1254 株では 77 の CAZymes 遺伝子が発見されている。AgaBb、AfcA、BbhII はこれらの CAZyme と協調的に働くことでムチン糖タンパク質や HMO の多彩な糖構造を分解し、糖質源を獲得している。想定できる CAZymes の組み合わせは多く、*B. bifidum* がどのような組み合わせを優先的に利用しているのか興味深い。

第 2 部では成人型ビフィズス菌 *B. dentium* JCM1195 株のカラメル化糖に作用する酵素、GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase  $\alpha$ FFase1、 $\alpha$ -D-fructofuranosidase  $\alpha$ FFase2 について研究した。

$\alpha$ FFase1 は環状フルクトース 2 糖を平衡的に合成する GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase である。本研究では NMR、X 線結晶構造解析、MD シミュレーション、そして生化学的・酵素学的実験を組み合わせることで酵素のアノマー保持型反応機構、リガンドの認識様式、そしてその脱離経路について詳細な知見が得られた。 $\alpha$ FFase1 は既報の GH と配列同一性、構造類似性を示さないことから、糖質関連酵素データベース CAZy では新たに GH172 ファミリーが設立された。本研究の結果により  $\alpha$ FFase1 の基質・生成物である inulobiose と DFA I が  $\alpha$ FFase1 近縁ホモログを保有する、ビフィズス菌を含む微生物の増殖因子となる可能性が示唆された。

$\alpha$ FFase2 はカラメル化糖に含まれる D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc を分解すると考えられている GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase である。 $\alpha$ FFase1 の遠縁ホモログでありながら基質特異性が異なる。本研究では構造生物学的方法論を通じて  $\alpha$ FFase2 と  $\alpha$ FFase1 の機能の違いについて探求し、同時に D-Fruf- $\alpha$ 2,6-D-Glc 以外の基質候補の探索を目指した。X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡での構造決定を検討したが、いずれも十分な成果を得られていない。研究においてまだ課題が多く残っているが、 $\alpha$ FFase2 の分子機能を詳細に解明できれば、新たなビフィズス菌増殖因子となる  $\alpha$ -D-Fruf 糖質の発見に繋がるかもしれない。

両酵素の由来菌である *B. dentium* は腸内では日和見菌でありながら、口腔内では酢酸を生成し、歯の酸化を促す虫歯の原因菌の一種であると考えられている。特にカラメル化糖は歯に付きやすく、*B. dentium* はこれを構成する  $\alpha$ -D-Fruf 糖質や DFA を獲得するのかもしれない。腸内と口腔内での *B. dentium* の増殖における  $\alpha$ FFase1、 $\alpha$ FFase2 そして  $\alpha$ -D-Fruf 糖質の重要性について興味が尽きない。

第 3 部では成人型ビフィズス菌 *B. longum* JCM7052 株のアラビアゴム含有アラビノガラクトナンタンパク質資化経路関連酵素 GH39 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GAfase の構造解析を目標とし、結晶化に成功した。構造決定に至るにはまだ条件検討を繰り返す必要があるが、結晶性の良いサンプルとして今後の成果に期待ができる。アラビアゴム AGP の糖構造はカラマツのそれよりはるかに複雑であり、ビフィズス菌をはじめとする腸内細菌がこれをどう資化するのか、知見はまだ十分に得られていない。GAfase は一部のビフィズス菌に特有の酵素である上、アラビアゴム AGP に含まれる固有の糖構造に特異性を示す。よって本酵素はアラビアゴム AGP のプレバイティクス効果における重要な因子であると考えられる。

ムチン糖鎖、カラメル化糖、アラビアゴム AGP は、いずれもヒト腸内に存在する、またはヒトが摂取する難消化性糖質の中でも複雑な糖構造を含んでいる。これをビフィズス菌が資化できることは、貧栄養環境下で他の微生物が異化できない糖質源を利用するために進化してきたことと合致する。一方、これらの糖質は食物に含まれる難消化性糖質の一端に過ぎず、天然の食材や加工食品には、私たちがまだ発見していないものも含め、さらに多彩な糖構造が存在する。また、ビフィズス菌をはじめとする腸内細菌がこれらの糖質を増殖因子とする戦略にもまだ理解できていないもの、まだ発見されていないものがある。実際、*B. dentium* で  $\alpha$ FFase1 が発見されるまで DFA I がビフィズス菌の増殖因子になり得るとは考えられていなかった。今後、ビフィズス菌をはじめとする腸内細菌の糖質関連酵素の機能を解明していくことで、食品と腸内環境の関係性を詳細に理解できるようになるだろう。

それとは別に、本論文では複数の新規性の高い酵素の構造と分子機能を解明した。いずれのサンプルもこれまでにない様式でリガンドを認識していた。今現在、タンパク質工学において酵素の反応改変は極めて挑戦的なテーマとなっている。これは改変酵素が想定通りに折りたたまらない、あるいはリガンドを認識しないからである。分子機能の知見を重ねることで、今後、どのようにタンパク質を人工的にデザインしていけば目的の触媒反応が得られるか、その理解に繋がるかもしれない。新規酵素の分子機能解明の研究は今後も続ける必要がある。

## ビフィズス菌の糖質代謝タンパク質と酵素の構造と進化

これまで私の在籍している研究室をはじめとする世界中の数々の研究チームの努力により、多くのビフィズス菌由来の糖質関連酵素の構造と分子機能の研究がされてきた。

CAZy に初めて登録されたビフィズス菌の GH の構造は *B. adolescentis* DSM20083 株由来の GH13 sucrose phosphorylase である(216)。この酵素の反応機構として、共有結合した酵素-グルコシル中間体形成のリン酸による求核攻撃が提案された。フルクトース含有糖質の代謝に関しては、*B. longum* KN29.1 株由来の GH32  $\beta$ -fructofuranosidase の結晶構造が報告され、5枚羽根の  $\beta$ -propeller 構造を持つ典型的な GH32 型触媒ドメインであることがわかった(217)。この酵素は、*in vitro* でスクロース、1-ケストース、ニストース、イヌリン、ラフィノースからフルクトース残基を遊離させる。イヌリン型フルクタンは豊富な貯蔵多糖類であり、一般的な食物繊維である。 $\beta$ -fructofuranosidase は細胞内に局在していることから、イヌリンオリゴマーが本酵素の生理的基質である可能性が示唆された。

ビフィズス菌は、乳児の腸内細菌叢の中で最も多く存在し、乳児の健康に有益な効果をもたらすとされている(32)。ヒトと乳児の腸内ビフィズス菌の共生関係は、HMO を介して行われている(218)。HMOs は Gal、Glc、GlcNAc、Fuc、Sia からなる複合オリゴ糖である。LNB は豊富な HMO 基幹構造であり、共生の要となるユニットの1つである。LNB を Gal-1P と GlcNAc に分解するホスホリラーゼ遺伝子は、当初 *B. longum* JCM 1217 で発見され、この酵素は GH112 ファミリーの創設メンバーとなっている(219)。この酵素は GNB にも高い活性を示すことから、GNB/LNB phosphorylase (GLNBP) と呼ばれるようになった。GNB は O-結合型糖タンパク質の主要なコア 2 糖単位であり、ヒトの乳脂肪球や消化管粘液中のムチンに存在する。GH112 GLNBP は、LNB 上で増殖可能な乳児腸内関連ビフィズス菌に特有である(220)。GLNBP の立体構造決定は、この酵素の進化的起源の可能性を示唆するものであった(43)。GLNBP の全体構造とドメイン構造は、乳児型ビフィズス菌に広く分布する GH42  $\beta$ -galactosidase と類似している(221)。興味深いことに、GLNBP の活性部位は、GH42  $\beta$ -galactosidase のものと酷似している。GLNBP のリン酸結合部位とプロトンドナーは、それぞれ GH42  $\beta$ -galactosidase の求核性触媒残基と酸塩基性触媒残基と同じ位置にある。したがって、これらのガラクトシド遊離酵素の進化的な関係の可能性が示唆された。GLNBP の触媒ドメインは、リン酸の結合に伴い、 $(\beta/\alpha)_8$  barrel フォールドの大きな変形を伴う閉鎖運動をすることが示唆された。ループの変形ではなく、 $(\beta/\alpha)_8$  barrel の全体構造の変形による基質への複雑な適応は、分子進化のユニークな事例と言える。

*B. infantis* ATCC15697 株の細胞内 GH29 1,3/1,4- $\alpha$ -L-fucosidase AfcB は、3-フコシルおよび4-フコシル化された HMO を効率的に切断する(222)。AfcB の結晶構造から、HMO や他の宿主糖鎖の Lewis<sup>a</sup> および Lewis<sup>x</sup> エピトープとの選択的結合に寄与する Gal 結合部位が発見された。AfcB は、基質認識時に活性中心のループがユニークな形で動くことで、求核性触媒残基と酸塩基性触媒残基を配置する(223)。

*B. longum* と *B. bifidum* は細胞外で糖鎖を分解している(224)。特に、*B. bifidum* は、細胞外 GH が生成する HMO 分解物を共有することで、腸内細菌叢において利他的に働く(225)。例えば、*B. bifidum* JCM1254 株由来の GH95 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase AfcA は、HMO や関連宿主糖鎖の  $\alpha$ 1,2-結合した Fuc を特異的に加水分解する(35)。AfcA の活性ドメインは、GH65 や GH94 の反転型グリコシドホスホリラーゼに酷似している(40)。AfcA の活性部位には2つの Asp 残基が存在し、求核剤となる水分子を活性化することが示唆されるなど、ユニークな特徴を有している。*B. bifidum* は、LNB 含有 (タイプ 1) HMO の分解に、lacto-*N*-biosidase (LnbB) という重要な細胞外酵素を持つ(226)。これは GH20 に属し、LNT の中心の  $\beta$ 1,3-結合を加水分解して LNB と Lac を生産する。LnbB の構造は、通常単糖遊離型 GH20 exo- $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase と異なり、-2 サブサイトを有し、LNB 中の非還元末端側の Gal の収容を可能にしている(112)。GlcNAc の *N*-アセチル基は歪んだコンフォメーションをとり、アノマーの C1 原子に求核攻撃をするコンホメーションをとる。これは GH20 の基質補助型機構特有である。

*B. longum* は、ヒトの成人・高齢者の腸内にも広く分布しているため、乳児の腸管内では特殊な形で環境に適応している(227)。*B. longum* JCM 1217 の細胞外 lacto-*N*-biosidase (LnbX) は、GH20 の LnbB と相同性がないため、GH136 の創設メンバーとなった(228)。LnbX は、 $\beta$ -helix フォールドとアノマー保持型機構を有する(229)。LnbX の活性部位のポケット構造は、長いクレフトを持つ他の  $\beta$ -helix の endo 型 GH とは異なっている。LnbX の進化的起源は謎であるが、このタンパク質フォールド

は、糖鎖結合能を持つバクテリオファージのテールスパイクタンパク質と構造的に類似性を示す。LnbX は、隣接する遺伝子と共発現させないと活性を示さない。*Eubacterium ramulus* の lacto-N-biosidase の相同性から、GH136 酵素はヘテロダイマーか2つのドメインからなる酵素として存在し、第2ドメイン・サブユニットが活性部位構築に寄与する、活性ドメインに特異的なシャペロン様の機能を持つとされている(230)。

腸管粘膜のムチン糖タンパク質は細菌への持続的な栄養供給源としても機能している(231)。ヒトの宿主とムチンに付着する微生物叢が相互に有益な関係を築き、長期的な共進化が成立したと考えられている(232)。*B. longum*、*B. bifidum*、*B. breve* の各菌株は O-結合型ムチン糖鎖に作用する GH を持っている(28)。これまで、3 種類のビフィズス菌ムチン分解酵素の立体構造が報告されている。*B. longum* JCM 1217 株由来の細胞外 GH101 endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase EngBF は、Ser または Thr 残基に  $\alpha$  結合した GNB 二糖を遊離し、LNB/GNB 経路による GNB 異化を可能にする(38)。EngBF の触媒ドメインは、GH13  $\alpha$ -amylase と同様に、部分的に歪んだ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel フォールドを持っている(42)。活性部位にある2つの Trp が誘導結合運動によって GNB 上に重なる(233)。2つ目のムチン分解酵素は、*B. bifidum* JCM 1254 株由来の GH129  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase NagBb で、Tn 抗原から  $\alpha$ -結合した GalNAc を遊離する機能が明らかにされた(234)。NagBb と GH101 の触媒ドメインは類似している。GalNAc の認識は、Ca<sup>2+</sup> と Trp のスタッキングによってなされている(162)。更にごく最近、*B. bifidum* JCM 1254 株由来の GH2  $\beta$ -galactosidase BbgIII の結晶構造が発表された(41)。BbgIII は8つのドメインからなり、GH2 触媒ドメインに対する CBM32 糖鎖結合モジュールの方向が2通りあることがわかった。これは、この酵素の2つの活性、すなわち Lac の加水分解と糖転移とで切り替わる際の構造のスイッチングの可能性を示している。CBM32 ドメインの糖鎖結合部位が、GH2 ドメインと接触するモジュールの反対側の部位にあることから、宿主細胞への定着に関与していると考えられている。

植物から得られる複合糖質は、離乳期に乳児の腸内細菌叢の多様性を拡大させる(235)。離乳期以降、ビフィズス菌の数は減少し、代わりに植物性の難消化性糖質の利用菌の比率が増える。そんな中、人間の多様な食生活は、成人型ビフィズス菌の、あまり一般的ではない植物由来の難消化性糖質に対する独自の代謝経路の進化を促す。*B. longum* JCM 1217 株は、 $\beta$ -結合型アラビノフラノオリゴ糖の利用をコードする遺伝子群を有している(236)。 $\beta$ -アラビノオリゴ糖は、ヒドロキシプロリンリッチ糖タンパク質と呼ばれる植物細胞壁成分に存在し、植物のエキスパンシンやレクチンなどに含まれる。利用系は、 $\beta$ -L-1,2 結合した Araf2 糖 ( $\beta$ -Ara2) を放出する細胞外酵素 GH121  $\beta$ -L-arabinobiosidase HypBA2 と、ABC トランスポーターによって内部化される 2 糖を単糖に分解する細胞内酵素 GH127  $\beta$ -arabinofuranosidase HypBA1 から構成されている(237)。GH121 HypBA2 の触媒ドメインは、いくつかの GH ファミリーに類似した( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> barrel フォールドを有する(238)。活性部位ポケットの3つの酸性残基 (Glu と Asp) は触媒作用に必須である。GH127 HypBA1 の結晶構造から、Cys を求核性触媒残基とする、これまでにない cysteine glycosidase であることが判明した(239)。その触媒ドメインは典型的な ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> barrel 構造をとっているが、触媒部位は3つの Cys と Glu に Zn<sup>2+</sup> が配位したユニークな構造をしている。Cys417 は  $\beta$ -L-Araf のアノマー炭素の近くに位置し、求核性触媒残基となりうるということが同定された。シクロフェリトール型の阻害剤や  $\beta$ -L-Araf をプロモアミド修飾した阻害剤などを用いた詳細な構造生物学的、生化学的機構研究(240)により、HypBA1 の共有結合型グリコシル酵素中間体の構造と触媒反応機構が明らかにされた(241)。

また、他のビフィズス菌の GH の結晶構造も報告されている。*B. longum* KACC 91563 株の GH3  $\beta$ -glucosidase はサポニン代謝に、*B. longum* NCC2705 株の GH5  $\beta$ -mannosidase は N-結合型糖鎖利用に、*B. bifidum* S17 株の GH42  $\beta$ 1,6-galactosidase と GH43 exo- $\beta$ 1,3-galactanase は食物に含まれる  $\beta$ -Gal 含有糖鎖の分解に、それぞれ寄与している。

これらに加えて、本論文ではビフィズス菌由来の4つの GH の研究を通して、新たな構造生物学的・酵素学的知見を獲得した。しかし、糖質利用能が驚くほど広いにもかかわらず、これらの異化経路に関する分子機構的知識はまだ限られており、さらなる研究が必要であると思われる。ビフィズス菌は「善玉菌の代表格」として、様々な宿主、特にヒトと共生関係を築くことに成功している。そのため、ビフィズス菌と宿主との興味深い分子共進化の歴史を明らかにするためには、タンパク質の構造に基づくメカニズムの解釈が不可欠である。

## 参考文献

1. Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015) Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J. Food Sci. Technol.* 10.1007/s13197-015-1921-1
2. Vallejo-Cordoba, B., Castro-López, C., García, H. S., González-Córdova, A. F., and Hernández-Mendoza, A. (2020) Postbiotics and paraprobiotics: A review of current evidence and emerging trends. in *Advances in Food and Nutrition Research*, 10.1016/bs.afnr.2020.06.001
3. Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Perman, J. A., Yolken, R. H., Saavedra, J. M., Bauman, N. A., and Oung, I. (1994) Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 10.1016/S0140-6736(94)91708-6
4. Esber, N., Mauras, A., Delannoy, J., Labelle, C., Mayeur, C., Caillaud, M. A., Kashima, T., Souchaud, L., Nicolis, I., Kapel, N., and Waligora-Dupriet, A. J. (2020) Three Candidate Probiotic Strains Impact Gut Microbiota and Induce Anergy in Mice with Cow's Milk Allergy. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.01203-20
5. Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E. (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 10.1016/S0140-6736(00)04259-8
6. Raman, M., Ambalam, P., Kondepudi, K. K., Pithva, S., Kothari, C., Patel, A. T., Purama, R. K., Dave, J. M., and Vyas, B. R. M. (2013) Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer. *Gut Microbes.* 10.4161/gmic.23919
7. Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., and Yadav, H. (2012) Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp. Diabetes Res.* 10.1155/2012/902917
8. Rossi, M., Amaretti, A., and Raimondi, S. (2011) Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients.* 10.3390/nu3010118
9. Mitsuoka, T. (2014) Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 10.12938/bmfh.33.99
10. Nagpal, R., Kurakawa, T., Tsuji, H., Takahashi, T., Kawashima, K., Nagata, S., Nomoto, K., and Yamashiro, Y. (2017) Evolution of gut Bifidobacterium population in healthy Japanese infants over the first three years of life: A quantitative assessment. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-017-10711-5
11. O'Callaghan, A., and van Sinderen, D. (2016) Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front. Microbiol.* 10.3389/fmicb.2016.00925
12. Duranti, S., Milani, C., Lugli, G. A., Turrone, F., Mancabelli, L., Sanchez, B., Ferrario, C., Viappiani, A., Mangifesta, M., Mancino, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2015) Insights from genomes of representatives of the human gut commensal Bifidobacterium bifidum. *Environ. Microbiol.* 10.1111/1462-2920.12743
13. Chaplin, A. V., Efimov, B. A., Smeianov, V. V., Kafarskaia, L. I., Pikina, A. P., and Shkoporov, A. N. (2015) Intraspecies genomic diversity and long-term persistence of bifidobacterium longum. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0135658
14. Carbohydrate chemistry and biochemistry: structure and mechanism (2008) *Choice Rev. Online.* 10.5860/choice.45-5590
15. Laine, R. A. (1994) Invited commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10$  structures for a reducing hexasaccharide: The Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology.* 10.1093/glycob/4.6.759
16. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 10.1093/nar/gkt1178
17. Van Den Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J. P., and Voragen, A. G. J. (2008) Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* 10.1002/mnfr.200700121
18. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases [1]. *Biochem. J.* 10.1042/bj3160695
19. KOSHLAND, D. E. (1953) STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. *Biol. Rev.* 10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x
20. Teze, D., Shuoker, B., Chaberski, E. K., Kunstmann, S., Fredslund, F., Nielsen, T. S., Stender, E. G. P., Peters, G. H. J., Karlsson, E. N., Welner, D. H., and Hachem, M. A. (2020) The Catalytic Acid-Base in GH109 Resides in a Conserved GGHGG Loop and Allows for Comparable  $\alpha$ -Retaining and  $\beta$ -Inverting Activity in an N-Acetylgalactosaminidase from Akkermansia muciniphila. *ACS Catal.* 10.1021/acscatal.9b04474

21. McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Korner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W., and Withers, S. G. (1996) The pK(a) of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: A <sup>13</sup>C-NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry*. 10.1021/bi9613234
22. Ficko-Blean, E., and Boraston, A. B. (2012) Insights into the recognition of the human glycome by microbial carbohydrate-binding modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10.1016/j.sbi.2012.07.009
23. Ficko-Blean, E., Gregg, K. J., Adams, J. J., Hehemann, J. H., Czjzek, M., Smith, S. P., and Boraston, A. B. (2009) Portrait of an enzyme, a complete structural analysis of a multimodular  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M808954200
24. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., and Davies, G. J. (2004) Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 10.1042/BJ20040892
25. Pires, V. M. R., Henshaw, J. L., Prates, J. A. M., Bolam, D. N., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A., Henrissat, B., Planas, A., Gilbert, H. J., and Czjzek, M. (2004) The crystal structure of the family 6 carbohydrate binding module from *Cellvibrio mixtus* endoglucanase 5A in complex with oligosaccharides reveals two distinct binding sites with different ligand specificities. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M401599200
26. Fujimoto, Z. (2013) Structure and function of carbohydrate-binding module families 13 and 42 of glycoside hydrolases, comprising a  $\beta$ -trefoil fold. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10.1271/bbb.130183
27. Johansson, M. E. V., Holmén Larsson, J. M., and Hansson, G. C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.1006451107
28. Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* 10.3389/fgene.2015.00081
29. Larsson, J. M. H., Karlsson, H., Sjövall, H., and Hansson, G. C. (2009) A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology*. 10.1093/glycob/cwp048
30. Kawashima, H. (2012) Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer. *Biol. Pharm. Bull.* 10.1248/bpb.b12-00412
31. Katoh, T., Ojima, M. N., Sakanaka, M., Ashida, H., Gotoh, A., and Katayama, T. (2020) Enzymatic adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules. *Microorganisms*. 10.3390/microorganisms8040481
32. Sakanaka, M., Gotoh, A., Yoshida, K., Odamaki, T., Koguchi, H., Xiao, J. Z., Kitaoka, M., and Katayama, T. (2020) Varied pathways of infant gut-associated *Bifidobacterium* to assimilate human milk oligosaccharides: Prevalence of the gene set and its correlation with bifidobacteria-rich microbiota formation. *Nutrients*. 10.3390/nu12010071
33. Corfield, A. P. (2015) Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 10.1016/j.bbagen.2014.05.003
34. Wakinaka, T., Kiyohara, M., Kurihara, S., Hirata, A., Chaiwangsri, T., Ohnuma, T., Fukamizo, T., Katayama, T., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2013) Bifidobacterial  $\alpha$ -galactosidase with unique carbohydrate-binding module specifically acts on blood group B antigen. *Glycobiology*. 10.1093/glycob/cws142
35. Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2004) Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J. Bacteriol.* 10.1128/JB.186.15.4885-4893.2004
36. Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2010) Cooperation of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology*. 10.1093/glycob/cwq101
37. Katoh, T., Maeshibu, T., Kikkawa, K. ichi, Gotoh, A., Tomabechi, Y., Nakamura, M., Liao, W. H., Yamaguchi, M., Ashida, H., Yamamoto, K., and Katayama, T. (2017) Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10.1080/09168451.2017.1361810
38. Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., Katayama, T., Hiratake, J., Sakata, K., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2005) Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M506874200
39. Derensy-Dron, D., Krzewinski, F., Brassart, C., and Bouquelet, S. (1999)  $\beta$ -1,3-galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082: Characterization, partial purification and relation to mucin degradation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10.1111/j.1470-8744.1999.tb01142.x

40. Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S., and Kato, R. (2007) Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M702246200
41. Moroz, O. V., Blagova, E., Lebedev, A. A., Rodriguez, F. S., Rigden, D. J., Tams, J. W., Wilting, R., Vester, J. K., Longhin, E., Hansen, G. H., Morkeberg Krogh, K. B. R., Pache, R. A., Davies, G. J., and Wilson, K. S. (2021) Multitasking in the gut: The X-ray structure of the multidomain BbgIII from *Bifidobacterium bifidum* offers possible explanations for its alternative functions. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 10.1107/S2059798321010949
42. 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- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biochem.* 10.1093/jb/mvp086
43. Hidaka, M., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S. (2009) The crystal structure of galacto-N-biose/lacto-N-biose I phosphorylase. A large deformation of a TIM barrel scaffold. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M808525200
44. Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai, H., Yamamoto, K., Kitaoka, M., and Katayama, T. (2016) Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2- $\alpha$ -L-fucosyltransferase. *Glycobiology.* 10.1093/glycob/cww085
45. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohli, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romero-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 10.1038/s41586-021-03819-2
46. Yamamoto, F. I., Clausen, H., White, T., Marken, J., and Hakomori, S. I. (1990) Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature.* 10.1038/345229a0
47. Liu, Q. P., Sulzenbacher, G., Yuan, H., Bennett, E. P., Pietz, G., Saunders, K., Spence, J., Nudelman, E., Levery, S. B., White, T., Neveu, J. M., Lane, W. S., Bourne, Y., Olsson, M. L., Henrissat, B., and Clausen, H. (2007) Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. *Nat. Biotechnol.* 10.1038/nbt1298
48. Liu, Q. P., Yuan, H., Bennett, E. P., Levery, S. B., Nudelman, E., Spence, J., Pietz, G., Saunders, K., White, T., Olsson, M. L., Henrissat, B., Sulzenbacher, G., and Clausen, H. (2008) Identification of a GH110 subfamily of  $\alpha$ 1,3-galactosidases: Novel enzymes for removal of the  $\alpha$ 3Gal xenotransplantation antigen. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M709020200
49. McGuire, B. E., Hettle, A. G., Vickers, C., King, D. T., Vocado, D. J., and Boraston, A. B. (2020) The structure of a family 110 glycoside hydrolase provides insight into the hydrolysis of  $\alpha$ -1,3-galactosidic linkages in l-carrageenan and blood group antigens. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.RA120.015776
50. Gregg, K. J., Finn, R., Abbott, D. W., and Boraston, A. B. (2008) Divergent modes of glycan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M709865200
51. Ojima-Kato, T., Nagai, S., and Nakano, H. (2017) N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 10.1016/j.jbiosc.2016.12.004
52. Hansson, M. D., Rzeznicka, K., Rosenbäck, M., Hansson, M., and Sirijovski, N. (2008) PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Anal. Biochem.* 10.1016/j.ab.2007.12.005
53. Till, M., Robson, A., Byrne, M. J., Nair, A. V., Kolek, S. A., Shaw Stewart, P. D., and Race, P. R. (2013) Improving the success rate of protein crystallization by random microseed matrix screening. *J. Vis. Exp.* 10.3791/50548
54. D'Arcy, A., Bergfors, T., Cowan-Jacob, S. W., and Marsh, M. (2014) Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: What have we learned? *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* 10.1107/S2053230X14015507
55. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
56. Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 10.1107/S0907444913000061
57. Skubak, P., Arac, D., Bowler, M. W., Correia, A. R., Hoelz, A., Larsen, S., Leonard, G. A., McCarthy, A. A., McSweeney, S., Mueller-Dieckmann, C., Otten, H., Salzman, G., and Pannua, N. S. (2018) A new MR-SAD algorithm for the automatic building of protein models from low-resolution X-ray data and a poor starting model. *IUCrJ.* 10.1107/S2052252517017961
58. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 10.1107/S0021889807021206
59. Cowtan, K. (2006) The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta*

- Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 10.1107/S0907444906022116
60. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 10.1107/S0907444910007493
  61. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221
  62. Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., Hintze, B., Hung, L. W., Jain, S., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Poon, B. K., Prisant, M. G., Read, R. J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Sammito, M. D., Sobolev, O. V., Stockwell, D. H., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A. G., Videau, L. L., Williams, C. J., and Adams, P. D. (2019) Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 10.1107/S2059798319011471
  63. Glaeser, R. M., Typke, D., Tiemeijer, P. C., Pulokas, J., and Cheng, A. (2011) Precise beam-tilt alignment and collimation are required to minimize the phase error associated with coma in high-resolution cryo-EM. *J. Struct. Biol.* 10.1016/j.jsb.2010.12.005
  64. Zheng, S. Q., Palovcak, E., Armache, J. P., Verba, K. A., Cheng, Y., and Agard, D. A. (2017) MotionCor2: Anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods.* 10.1038/nmeth.4193
  65. Rohou, A., and Grigorieff, N. (2015) CTFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J. Struct. Biol.* 10.1016/j.jsb.2015.08.008
  66. Zhang, K. (2016) Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* 10.1016/j.jsb.2015.11.003
  67. Wagner, T., Merino, F., Stabrin, M., Moriya, T., Antoni, C., Apelbaum, A., Hagel, P., Sitsel, O., Raisch, T., Prumbaum, D., Quentin, D., Roderer, D., Tacke, S., Siebolds, B., Schubert, E., Shaikh, T. R., Lill, P., Gatsogiannis, C., and Raunser, S. (2019) SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Commun. Biol.* 10.1038/s42003-019-0437-z
  68. Zivanov, J., Nakane, T., Forsberg, B. O., Kimanius, D., Hagen, W. J. H., Lindahl, E., and Scheres, S. H. W. (2018) New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife.* 10.7554/eLife.42166
  69. Letunic, I., and Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. *Nucleic Acids Res.*
  70. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797
  71. Bruce, D., Cardew, E., Freitag-Pohl, S., and Pohl, E. (2019) How to Stabilize Protein: Stability Screens for Thermal Shift Assays and Nano Differential Scanning Fluorimetry in the Virus-X Project. *J. Vis. Exp.* 10.3791/58666
  72. Birtley, J. R., and Curry, S. (2005) Crystallization of foot-and-mouth disease virus 3C protease: Surface mutagenesis and a novel crystal-optimization strategy. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 10.1107/S0907444905007924
  73. Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P. K., Xu, Y., and Yin, Y. (2018) DbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 10.1093/nar/gky418
  74. Qiu, L., and Dhe-Paganon, S. (2011) Oligomeric structure of the MALT1 tandem Ig-like domains. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0023220
  75. van Sorge, N. M., Bonsor, D. A., Deng, L., Lindahl, E., Schmitt, V., Lyndin, M., Schmidt, A., Nilsson, O. R., Brizuela, J., Boero, E., Sundberg, E. J., van Strijp, J. A. G., Doran, K. S., Singer, B. B., Lindahl, G., and McCarthy, A. J. (2021) Bacterial protein domains with a novel Ig-like fold target human CEACAM receptors. *EMBO J.* 10.15252/embj.2020106103
  76. Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1988) The immunoglobulin superfamily - Domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 10.1146/annurev.iy.06.040188.002121
  77. Courtade, G., Forsberg, Z., Heggset, E. B., Eijsink, V. G. H., and Aachmann, F. L. (2018) The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monoxygenase promote localized cellulose oxidation. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.RA118.004269
  78. Desnick, R. J. (2004) Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 10.1023/B:BOLI.0000031101.12838.c6
  79. Goldstein, J., Siviglia, G., Hurst, R., Lenny, L., and Reich, L. (1982) Group B erythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B, and O individuals. *Science (80- ).* 10.1126/science.6274021

80. Stone, K. R., Walgenbach, A. W., Turek, T. J., Somers, D. L., Wicomb, W., and Galili, U. (2007) Anterior Cruciate Ligament Reconstruction With a Porcine Xenograft: A Serologic, Histologic, and Biomechanical Study in Primates. *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.* 10.1016/j.arthro.2006.12.024
81. Luo, Y., Wen, J., Luo, C., Cummings, R. D., and Cooper, D. K. C. (1999) Pig xenogeneic antigen modification with green coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. *Xenotransplantation.* 10.1034/j.1399-3089.1999.00035.x
82. Rahfeld, P., Sim, L., Moon, H., Constantinescu, I., Morgan-Lang, C., Hallam, S. J., Kizhakkedathu, J. N., and Withers, S. G. (2019) An enzymatic pathway in the human gut microbiome that converts A to universal O type blood. *Nat. Microbiol.* 10.1038/s41564-019-0469-7
83. Rahfeld, P., and Withers, S. G. (2020) Toward universal donor blood: Enzymatic conversion of A and B to O type. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.REV119.008164
84. Anderson, K. M., Ashida, H., Maskos, K., Dell, A., Li, S.-C., and Li, Y.-T. (2005) A Clostridial Endo- $\beta$ -galactosidase That Cleaves Both Blood Group A and B Glycotopes. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M414099200
85. Ezzelarab, M., and Cooper, D. K. C. (2005) Reducing Gal expression on the pig organ - A retrospective review. *Xenotransplantation.* 10.1111/j.1399-3089.2005.00236.x
86. Milland, J., Christiansen, D., Lazarus, B. D., Taylor, S. G., Xing, P. X., and Sandrin, M. S. (2006) The Molecular Basis for Gal $\alpha$ (1,3)Gal Expression in Animals with a Deletion of the  $\alpha$ 1,3Galactosyltransferase Gene. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.176.4.2448
87. Gao, H., Li, S., Tan, Y., Ji, S., Wang, Y., Bao, G., Xu, L., and Gong, F. (2013) Application of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase and  $\alpha$ -galactosidase in AB to O red blood cells conversion. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* 10.3109/10731199.2012.724422
88. Gao, H. W., Li, S. B., Bao, G. Q., Zhang, X., Li, H., Wang, Y. L., Tan, Y. X., Ji, S. P., and Gong, F. (2014) Glucose buffer is suitable for blood group conversion with  $\alpha$ -N acetylgalactosaminidase and  $\alpha$ -galactosidase. *Blood Transfus.* 10.2450/2013.0023-13
89. Erbe, D. V., Watson, S. R., Presta, L. G., Wolitzky, B. A., Foxall, C., Brandley, B. K., and Lasky, L. A. (1993) P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* 10.1083/jcb.120.5.1227
90. Shan, M., Yang, D., Dou, H., and Zhang, L. (2019) Fucosylation in cancer biology and its clinical applications. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 10.1016/bs.pmbts.2019.01.002
91. Cabana MD, MPH, M. D., Morrow PHD, A. L., and Sherman MD, FRCPC, P. M. (2019) Evolution of the Intestinal Microbiome: Laying the Foundation for Child Health. *Clin. Advis. Nurse Pract.*
92. Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., and Borén, T. (1998) Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science (80- ).* 10.1126/science.279.5349.373
93. Tong, M., McHardy, I., Ruegger, P., Goudarzi, M., Kashyap, P. C., Haritunians, T., Li, X., Graeber, T. G., Schwager, E., Huttenhower, C., Fornace, A. J., Sonnenburg, J. L., McGovern, D. P. B., Borneman, J., and Braun, J. (2014) Reprogramming of gut microbiome energy metabolism by the FUT2 Crohn's disease risk polymorphism. *ISME J.* 10.1038/ismej.2014.64
94. Belitz, H. D., Grosch, W., and Schieberle, P. (2009) *Food chemistry*, 10.1007/978-3-540-69934-7
95. Wiciński, M., Sawicka, E., Gębalski, J., Kubiak, K., and Malinowski, B. (2020) Human milk oligosaccharides: Health benefits, potential applications in infant formulas, and pharmacology. *Nutrients.* 10.3390/nu12010266
96. Urashima, T., Hirabayashi, J., Sato, S., and Kobata, A. (2018) Human milk oligosaccharides as essential tools for basic and application studies on galectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 10.4052/tigg.1734.1SE
97. Urashima, T., Odaka, G., Asakuma, S., Uemura, Y., Goto, K., Senda, A., Saito, T., Fukuda, K., Messer, M., and Oftedal, O. T. (2009) Chemical characterization of oligosaccharides in chimpanzee, bonobo, gorilla, orangutan, and siamang milk or colostrum. *Glycobiology.* 10.1093/glycob/cwp006
98. Smilowitz, J. T., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., German, J. B., and Freeman, S. L. (2014) Breast milk oligosaccharides: Structure-function relationships in the neonate. *Annu. Rev. Nutr.* 10.1146/annurev-nutr-071813-105721
99. Zheng, H., Cooper, D. R., Porebski, P. J., Shabalin, I. G., Handing, K. B., and Minor, W. (2017) CheckMyMetal: A macromolecular metal-binding validation tool. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 73, 223–233
100. Holm, L., and Laakso, L. M. (2016) Dali server update. *Nucleic Acids Res.* 44, W351–W355
101. Holm, L. (2020) DALI and the persistence of protein shape. *Protein Sci.* 10.1002/pro.3749
102. Boraston, A. B., Wang, D., and Burke, R. D. (2006) Blood group antigen recognition by a Streptococcus pneumoniae virulence factor. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M607620200
103. Lawrence, S. L., Feil, S. C., Holien, J. K., Kuiper, M. J., Doughty, L., Dolezal, O., Mulhern, T. D., Tweten,

- R. K., and Parker, M. W. (2012) Manipulating the lewis antigen specificity of the cholesterol-dependent cytolysin lectinolytin. *Front. Immunol.* 10.3389/fimmu.2012.00330
104. Bianchet, M. A., Odom, E. W., Vasta, G. R., and Amzel, L. M. (2002) A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nat. Struct. Biol.* 10.1038/nsb817
  105. Bianchet, M. A., Odom, E. W., Vasta, G. R., and Amzel, L. M. (2010) Structure and specificity of a binary tandem domain F-Lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). *J. Mol. Biol.* 10.1016/j.jmb.2010.06.018
  106. Vasta, G. R., Mario Amzel, L., Bianchet, M. A., Cammarata, M., Feng, C., and Saito, K. (2017) F-Type Lectins: A highly diversified family of fucose-binding proteins with a unique sequence motif and structural fold, involved in self/non-self-recognition. *Front. Immunol.* 10.3389/fimmu.2017.01648
  107. Higgins, M. A., Ficko-Blean, E., Meloncelli, P. J., Lowary, T. L., and Boraston, A. B. (2011) The overall architecture and receptor binding of pneumococcal carbohydrate-antigen-hydrolyzing enzymes. *J. Mol. Biol.* 10.1016/j.jmb.2011.06.035
  108. Pluvinae, B., Ficko-Blean, E., Noach, I., Stuart, C., Thompson, N., McClure, H., Buenbrazo, N., Wakarchuk, W., and Boraston, A. B. (2021) Architecturally complex O-glycopeptidases are customized for mucin recognition and hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.2019220118
  109. Terwisscha van Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B., and Dijkstra, B. W. (1995) Stereochemistry of Chitin Hydrolysis by a Plant Chitinase/Lysozyme and X-ray Structure of a Complex with Allosamidin: Evidence for Substrate Assisted Catalysis. *Biochemistry.* 10.1021/bi00048a003
  110. Mark, B. L., Vocadlo, D. J., Knapp, S., Triggs-Raine, B. L., Withers, S. G., and James, M. N. G. (2001) Crystallographic Evidence for Substrate-assisted Catalysis in a Bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M011067200
  111. Vocadlo, D. J., and Withers, S. G. (2005) Detailed comparative analysis of the catalytic mechanisms of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from families 3 and 20 of glycoside hydrolases. *Biochemistry.* 10.1021/bi051121k
  112. Ito, T., Katayama, T., Hattie, M., Sakurama, H., Wada, J., Suzuki, R., Ashida, H., Wakagi, T., Yamamoto, K., Stubbs, K. A., and Fushinobu, S. (2013) Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-N-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M112.420109
  113. Williams, S. J., Mark, B. L., Vocadlo, D. J., James, M. N. G., and Withers, S. G. (2002) Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* hexosaminidase plays a critical role in substrate-assisted catalysis by orienting the 2-acetamido group and stabilizing the transition state. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M206481200
  114. Ito, N., Phillips, S. E. V., Yadav, K. D. S., and Knowles, P. F. (1994) Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase. *J. Mol. Biol.* 10.1006/jmbi.1994.1335
  115. Newstead, S. L., Watson, J. N., Bennet, A. J., and Taylor, G. (2005) Galactose recognition by the carbohydrate-binding module of a bacterial sialidase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 10.1107/S0907444905026132
  116. Centeno, M. S. J., Goyal, A., Prates, J. A. M., Ferreira, L. M. A., Gilbert, H. J., and Fontes, C. M. G. A. (2006) Novel modular enzymes encoded by a cellulase gene cluster in *Cellvibrio mixtus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 10.1111/j.1574-6968.2006.00464.x
  117. Mizutani, K., Fernandes, V. O., Karita, S., Luís, A. S., Sakka, M., Kimura, T., Jackson, A., Zhang, X., Fontes, C. M. G. A., Gilbert, H. J., and Sakka, K. (2012) Influence of a mannan binding family 32 carbohydrate binding module on the activity of the appended mannanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.07457-11
  118. Abbott, D. W., Hrynuik, S., and Boraston, A. B. (2007) Identification and Characterization of a Novel Periplasmic Polygalacturonic Acid Binding Protein from *Yersinia enterocolitica*. *J. Mol. Biol.* 10.1016/j.jmb.2007.01.030
  119. Ficko-Blean, E., and Boraston, A. B. (2006) The interaction of a carbohydrate-binding module from a *Clostridium perfringens* N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase with its carbohydrate receptor. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M606126200
  120. Ficko-Blean, E., and Boraston, A. B. (2009) N-Acetylglucosamine Recognition by a Family 32 Carbohydrate-Binding Module from *Clostridium perfringens* NagH. *J. Mol. Biol.* 10.1016/j.jmb.2009.04.066
  121. Ficko-Blean, E., Stuart, C. P., Suits, M. D., Cid, M., Tessier, M., Woods, R. J., and Boraston, A. B. (2012) Carbohydrate recognition by an architecturally complex  $\alpha$ -n-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens*. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0033524
  122. Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K. S., and Vorgias, C. E. (1996) Bacterial chitinase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat. Struct. Biol.* 10.1038/nsb0796-638
  123. Hattie, M., Ito, T., Debowski, A. W., Arakawa, T., Katayama, T., Yamamoto, K., Fushinobu, S., and Stubbs, K. A. (2015) Gaining insight into the catalysis by GH20 lacto-N-biosidase using small molecule

- inhibitors and structural analysis. *Chem. Commun.* 10.1039/c5cc05494j
124. Apolinário, A. C., De Lima Damasceno, B. P. G., De Macêdo Beltrão, N. E., Pessoa, A., Converti, A., and Da Silva, J. A. (2014) Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydr. Polym.* 10.1016/j.carbpol.2013.09.081
  125. Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., and Zamora, S. (2009) Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J. Physiol. Biochem.* 10.1007/BF03180584
  126. Rakoff-Nahoum, S., Foster, K. R., and Comstock, L. E. (2016) The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature.* **533**, 255–259
  127. Delannoy-Bruno, O., Desai, C., Raman, A. S., Chen, R. Y., Hibberd, M. C., Cheng, J., Han, N., Castillo, J. J., Couture, G., Lebrilla, C. B., Barve, R. A., Lombard, V., Henrissat, B., Leyn, S. A., Rodionov, D. A., Osterman, A. L., Hayashi, D. K., Meynier, A., Vinoy, S., Kirbach, K., Wilmot, T., Heath, A. C., Klein, S., Barratt, M. J., and Gordon, J. I. (2021) Evaluating microbiome-directed fibre snacks in gnotobiotic mice and humans. *Nature.* **595**, 91–95
  128. Ritsema, T., and Smeekens, S. (2003) Fructans: Beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 223–230
  129. Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., and Van Den Ende, W. (2009) Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications. *J. Exp. Bot.* **60**, 727–740
  130. Herrera-González, A., Núñez-López, G., Morel, S., Amaya-Delgado, L., Sandoval, G., Gschaedler, A., Remaud-Simeon, M., and Arrizon, J. (2017) Functionalization of natural compounds by enzymatic fructosylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10.1007/s00253-017-8359-5
  131. Mellet, C. O., and Fernández, J. M. G. (2010) Difuctose dianhydrides (DFAs) and DFA-enriched products as functional foods. in *Topics in Current Chemistry*, 10.1007/128\_2010\_50
  132. Defaye, J., and García Fernández, J. M. (1994) Protonic and thermal activation of sucrose and the oligosaccharide composition of caramel. *Carbohydr. Res.* **256**, C1–C4
  133. Saito, K., and Tomita, F. (2000) Difuctose anhydrides: Their mass-production and physiological functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1321–1327
  134. Uchiyama, T., Niwa, S., and Tanaka, K. (1973) Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II. *BBA - Enzymol.* **315**, 412–420
  135. Kikuchi, H., Inoue, M., Saito, H., Sakurai, H., Aritsuka, T., Tomita, F., and Yokota, A. (2009) Industrial production of difuctose anhydride III (DFA III) from crude inulin extracted from chicory roots using *Arthrobacter* sp. H65-7 fructosyltransferase. *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 262–265
  136. Wang, X., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., and Mu, W. (2015) From fructans to difuctose dianhydrides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 175–188
  137. Tanaka, K., Karigane, T., Yamaguchi, F., Nishikawa, S., and Yoshida, N. (1983) Action of levan fructotransferase of *Arthrobacter ureafaciens* on levanoligosaccharides. *J. Biochem.* **94**, 1569–1578
  138. Park, J., Kim, M. Il, Park, Y. D., Shin, I., Cha, J., Kim, C. H., and Rhee, S. (2012) Structural and functional basis for substrate specificity and catalysis of levan fructotransferase. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M112.389270
  139. Seki, K., Haraguchi, K., Kishimoto, M., Kobayashi, S., and Kainuma, K. (1989) Purification and properties of a novel inulin fructotransferase (Dfa i-producing) from *arthrobacter globiformis* s14-3. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2089–2094
  140. Tanaka, T., Uchiyama, T., Kobori, H., and Tanaka, K. (1975) Enzymic hydrolysis of Di-D-fructofuranose 1, 2'; 2, 3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* **78**, 1201–1206
  141. Jung, W. S., Hong, C. K., Lee, S., Kim, C. S., Kim, S. J., Kim, S. Il, and Rhee, S. (2007) Structural and functional insights into intramolecular fructosyl transfer by inulin fructotransferase. *J. Biol. Chem.* **282**, 8414–8423
  142. Yu, S., Shen, H., Cheng, Y., Zhu, Y., Li, X., and Mu, W. (2018) Structural and Functional Basis of Difuctose Anhydride III Hydrolase, Which Sequentially Converts Inulin Using the Same Catalytic Residue. *ACS Catal.* 10.1021/acscatal.8b02424
  143. The CAZyPedia Consortium (2018) Ten years of CAZyPedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology.* **28**, 3–8
  144. Yamamori, A., Okada, H., Kawazoe, N., Muramatsu, K., Onodera, S., and Shiomi, N. (2014) Characteristics of  $\alpha$ -D-Fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 6)-D-glucose Synthesized from D-Glucose and D-Fructose by Thermal Treatment. *J. Appl. Glycosci.* 10.5458/jag.jag.jag-2014\_001
  145. Vagin, A., and Lebedev, A. (2015) MoRDa , an automatic molecular replacement pipeline . *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* 10.1107/s2053273315099672
  146. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713

147. Kirschner, K. N., Yongye, A. B., Tschampel, S. M., González-Outeiriño, J., Daniels, C. R., Foley, B. L., and Woods, R. J. (2008) GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. *carbohydrates. J. Comput. Chem.* **29**, 622–655
148. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935
149. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101
150. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690
151. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472
152. Hess, B. (2008) P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 116–122
153. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L. G. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577–8593
154. Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435–447
155. Dawson, N. L., Lewis, T. E., Das, S., Lees, J. G., Lee, D., Ashford, P., Orengo, C. A., and Sillitoe, I. (2017) CATH: An expanded resource to predict protein function through structure and sequence. *Nucleic Acids Res.* **45**, D289–D295
156. Ban, X., Xie, X., Li, C., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L., Kaustubh, B., and Li, Z. (2021) The desirable salt bridges in amylases: Distribution, configuration and location. *Food Chem.* 10.1016/j.foodchem.2021.129475
157. De Sanctis, D., Inácio, J. M., Lindley, P. F., De Sá-Nogueira, I., and Bento, I. (2010) New evidence for the role of calcium in the glycosidase reaction of GH43 arabinanases. *FEBS J.* 10.1111/j.1742-4658.2010.07870.x
158. Siguier, B., Haon, M., Nahoum, V., Marcellin, M., Burlet-Schiltz, O., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Mourey, L., O’Donohue, M. J., Berrin, J. G., Tranier, S., and Dumon, C. (2014) First structural insights into  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases from the two GH62 glycoside hydrolase subfamilies. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M113.528133
159. Vallée, F., Lipari, F., Yip, P., Sleno, B., Herscovics, A., and Howell, P. L. (2000) Crystal structure of a class I  $\alpha$ 1,2-mannosidase involved in N-glycan processing and endoplasmic reticulum quality control. *EMBO J.* 10.1093/emboj/19.4.581
160. Zhu, Y., Suits, M. D. L., Thompson, A. J., Chavan, S., Dinev, Z., Dumon, C., Smith, N., Moremen, K. W., Xiang, Y., Siriwardena, A., Williams, S. J., Gilbert, H. J., and Davies, G. J. (2010) Mechanistic insights into a Ca<sup>2+</sup>-dependent family of  $\alpha$ -mannosidases in a human gut symbiont. *Nat. Chem. Biol.* 10.1038/nchembio.278
161. Okuyama, M., Yoshida, T., Hondoh, H., Mori, H., Yao, M., and Kimura, A. (2014) Catalytic role of the calcium ion in GH97 inverting glycoside hydrolase. *FEBS Lett.* 10.1016/j.febslet.2014.07.002
162. Sato, M., Liebschner, D., Yamada, Y., Matsugaki, N., Arakawa, T., Wills, S. S., Hattie, M., Stubbs, K. A., Ito, T., Senda, T., Ashida, H., and 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.* 10.1074/jbc.M117.777391
163. Matsuyama, T., Tanaka, K., Mashiko, M., and Kanamoto, M. (1982) Enzymic formation of Di-D-fructose 1,2’; 2,1’ dianhydride from inulobiose by *Aspergillus fumigatus*. *J. Biochem.* 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134051
164. Matsuyama, T., and Tanaka, K. (1989) On the Enzyme of *Aspergillus fumigatus* Producing Difructose Anhydride I from Inulobiose. *Agric. Biol. Chem.* 10.1271/bbb1961.53.831
165. El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., and Finn, R. D. (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**, D427–D432
166. Nigou, J., Gilleron, M., and Puzo, G. (2003) Lipoarabinomannans: From structure to biosynthesis. *Biochimie.* **85**, 153–166
167. Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Lanéelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R., and Daffé, M. (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: Importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology.* 10.1099/00221287-147-5-1365
168. Voisin, S., Kus, J. V., Houlston, S., St-Michael, F., Watson, D., Cvitkovitch, D. G., Kelly, J., Brisson, J. R., and Burrows, L. L. (2007) Glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* strain Pa5196 type IV pilins with mycobacterium-like  $\alpha$ -1,5-linked D-Araf oligosaccharides. *J. Bacteriol.* 10.1128/JB.01224-06

169. Galbraith, L., and Wilkinson, S. G. (1999) Structures of the O21 and O25 antigens of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Carbohydr. Res.* 10.1016/S0008-6215(99)00233-5
170. Modesto, M., Biavati, B., and Mattarelli, P. (2006) Occurrence of the family Bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res.* **40**, 271–276
171. Kato, K., Odamaki, T., Mitsuyama, E., Sugahara, H., Xiao, J. zhong, and Osawa, R. (2017) Age-related changes in the composition of gut Bifidobacterium species. *Curr. Microbiol.* **74**, 987–995
172. Suárez-Pereira, E., Rubio, E. M., Pilard, S., Ortiz Mellet, C., and García Fernández, J. M. (2010) Di-D-fructose dianhydride-enriched products by acid ion-exchange resin-promoted caramelization of D-fructose: Chemical analyses. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1777–1787
173. Kikuchi, H., Nagura, T., Inoue, M., Kishida, T., Sakurai, H., Yokota, A., Asano, K., Tomita, F., Sayama, K., and Senba, Y. (2004) Physical, Chemical and Physiological Properties of Difructose Anhydride III Produced from Inulin by Enzymatic Reaction. *J. Appl. Glycosci.* **51**, 291–296
174. Pajatsch, M., Gerhart, M., Peist, R., Horlacher, R., Boos, W., and Böck, A. (1998) The periplasmic cyclodextrin binding protein cymE from *Klebsiella oxytoca* and its role in maltodextrin and cyclodextrin transport. *J. Bacteriol.* **180**, 2630–2635
175. Hashimoto, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T. (2001) Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. *J. Bacteriol.* **183**, 5050–5057
176. Mori, T., Nishimoto, T., Mukai, K., Watanabe, H., Okura, T., Chaen, H., and Fukuda, S. (2009) Enzymes involved in the biosynthesis and degradation of cyclic maltosyl-maltose in *Arthrobacter globiformis* M6. *J. Appl. Glycosci.* **56**, 127–136
177. Kamionka, A., and Dahl, M. K. (2001) *Bacillus subtilis* contains a cyclodextrin-binding protein which is part of a putative ABC-transporter. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 55–60
178. Light, S. H., Cahoon, L. A., Halavaty, A. S., Freitag, N. E., and Anderson, W. F. (2016) Structure to function of an  $\alpha$ -glucan metabolic pathway that promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Nat. Microbiol.* 10.1038/nmicrobiol.2016.202
179. Tanaka, T., Uchiyama, T., Kobori, H., and Tanaka, K. (1975) Enzymic hydrolysis of Di-D-fructofuranose 1, 2'; 2, 3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131017
180. Uchiyama, T., Tanaka, K., and Kawamura, M. (1988) Enzymic formation of di-D-fructose anhydrides from fructan. *J. Japanese Soc. Starch Sci.* **35**, 113–120
181. Neubauer, A., Walter, M., and Buchholz, K. (2000) Formation of inulobiose from difructose anhydride III catalysed by a lysate from *Arthrobacter ureafaciens* ATCC 21124. *Biocatal. Biotransformation.* **18**, 443–455
182. Sakurai, H., Yokota, A., Sumita, Y., Mori, Y., Matsui, H., and Tomita, F. (1997) Metabolism of DFA III by *Arthrobacter* sp. H65-7: Purification and properties of a DFA III hydrolysis enzyme (DFA IIIase). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 989–993
183. Saito, K., Sumita, Y., Nagasaka, Y., Tomita, F., and Yokota, A. (2003) Molecular cloning of the gene encoding the di-D-fructofuranose 1,2',2',3' dianhydride hydrolysis enzyme (DFA IIIase) from *arthrobacter* sp. H65-7. *J. Biosci. Bioeng.* 10.1016/S1389-1723(03)80058-0
184. Zhu, Y., Yu, S., Huang, D., Zhang, T., Jiang, B., and Mu, W. (2016) Identification of a novel DFA I-producing inulin fructotransferase from *Streptomyces davawensis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **92**, 723–730
185. Ventura, M., Turrioni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M. J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R. S., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G. F., O'Toole, P. W., and Van Sinderen, D. (2009) The bifidobacterium dentium Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genet.* 10.1371/journal.pgen.1000785
186. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S., and Perrakis, A. (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* 10.1038/nprot.2008.91
187. Kovalevskiy, O., Nicholls, R. A., Long, F., Carlon, A., and Murshudov, G. N. (2018) Overview of refinement procedures within REFMAC 5: Utilizing data from different sources. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 10.1107/S2059798318000979
188. Leslie, A. G. W., and Powell, H. R. (2007) Processing diffraction data with mosflm, 10.1007/978-1-4020-6316-9\_4
189. Winter, G., Waterman, D. G., Parkhurst, J. M., Brewster, A. S., Gildea, R. J., Gerstel, M., Fuentes-Montero, L., Vollmar, M., Michels-Clark, T., Young, I. D., Sauter, N. K., and Evans, G. (2018) DIALS: Implementation and evaluation of a new integration package. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 10.1107/S2059798317017235
190. Seifert, G. J., and Roberts, K. (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103801

191. Street, C. A., and Anderson, D. M. W. (1983) Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other acacia gum exudates. *Talanta*. 10.1016/0039-9140(83)80206-9
192. Aalbers, F., Turkenburg, J. P., Davies, G. J., Dijkhuizen, L., and Lammerts Van Bueren, A. (2015) Structural and Functional Characterization of a Novel Family GH115 4-O-Methyl- $\alpha$ -Glucuronidase with Specificity for Decorated Arabinogalactans. *J. Mol. Biol.* 10.1016/j.jmb.2015.07.006
193. Goellner, E. M., Utermoehlen, J., Kramer, R., and Classen, B. (2011) Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. *Carbohydr. Polym.* 10.1016/j.carbpol.2011.07.006
194. Jermyn, M., Yeow, Y., and Woods, E. (1975) A Class of Lectins Present in the Tissues of Seed Plants. *Funct. Plant Biol.* 10.1071/pp9750501
195. Ichinose, H., Kotake, T., Tsumuraya, Y., and Kaneko, S. (2008) Arabinogalactan-proteins Degrading Enzymes. *J. Appl. Glycosci.* 10.5458/jag.55.149
196. Terpend, K., Possemiers, S., Daguët, D., and Marzorati, M. (2013) Arabinogalactan and fructooligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Environ. Microbiol. Rep.* 10.1111/1758-2229.12056
197. Daguët, D., Pinheiro, I., Verhelst, A., Possemiers, S., and Marzorati, M. (2016) Arabinogalactan and fructooligosaccharides improve the gut barrier function in distinct areas of the colon in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *J. Funct. Foods.* 10.1016/j.jff.2015.11.005
198. Calame, W., Weseler, A. R., Viebke, C., Flynn, C., and Siemensma, A. D. (2008) Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *Br. J. Nutr.* 10.1017/S0007114508981447
199. Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., and Biavati, B. (1994) Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 10.1016/0168-1605(94)90119-8
200. Salyers, A. A., West, S. E. H., Vercellotti, J. R., and Wilkins, T. D. (1977) Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/aem.34.5.529-533.1977
201. Saishin, N., and Yamamoto, I. (2009)  $\alpha$ -Galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* JCM 7052 grown on gum arabic. *J. Biol. Macromol.*
202. Sasaki, Y., Horigome, A., Odamaki, T., Xiao, J. Z., Ishiwata, A., Ito, Y., Kitahara, K., and Fujitaa, K. (2021) Novel 3-O- $\alpha$ -D-Galactosyl- $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase for the Assimilation of Gum Arabic Arabinogalactan Protein in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.02690-20
203. Morrison, J. M., Elshahed, M. S., and Youssef, N. (2016) A multifunctional GH39 glycoside hydrolase from the anaerobic gut fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A. *PeerJ.* 10.7717/PEERJ.2289
204. Jones, D. R., Uddin, M. S., Gruninger, R. J., Pham, T. T. M., Thomas, D., Boraston, A. B., Briggs, J., Pluvinage, B., McAllister, T. A., Forster, R. J., Tsang, A., Selinger, L. B., and Abbott, D. W. (2017) Discovery and characterization of family 39 glycoside hydrolases from rumen anaerobic fungi with polyspecific activity on rare arabinosyl substrates. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M117.789008
205. Montanier, C., Van Bueren, A. L., Dumon, C., Flint, J. E., Correia, M. A., Prates, J. A., Firbank, S. J., Lewis, R. J., Grondin, G. G., Ghinet, M. G., Gloster, T. M., Herve, C., Knox, J. P., Talbot, B. G., Turkenburg, J. P., Kerovuo, J., Brzezinski, R., Fontes, C. M. G. A., Davies, G. J., Boraston, A. B., and Gilbert, H. J. (2009) Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.0808972106
206. Bolam, D. N., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B., and Gilbert, H. J. (2004) X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M313317200
207. Ichinose, H., Yoshida, M., Kotake, T., Kuno, A., Igarashi, K., Tsumuraya, Y., Samejima, M., Hirabayashi, J., Kobayashi, H., and Kaneko, S. (2005) An Exo- $\beta$ -1,3-galactanase having a novel  $\beta$ -1,3-galactan-binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M501024200
208. Correia, M. A. S., Abbott, D. W., Gloster, T. M., Fernandes, V. O., Prates, J. A. M., Montanier, C., Dumon, C., Williamson, M. P., Tunnicliffe, R. B., Liu, Z., Flint, J. E., Davies, G. J., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Fontes, C. M. G. A., and Gilbert, H. J. (2010) Signature active site architectures illuminate the molecular basis for ligand specificity in family 35 carbohydrate binding module. *Biochemistry.* 10.1021/bi1006139
209. Suzuki, N., Fujimoto, Z., Kim, Y. M., Momma, M., Kishine, N., Suzuki, R., Suzuki, S., Kitamura, S., Kobayashi, M., Kimura, A., and Funane, K. (2014) Structural Elucidation of the Cyclization Mechanism of  $\alpha$ -1,6-Glucan by *Bacillus circulans* T-3040 Cycloisomaltooligosaccharide Glucanotransferase. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M114.547992
210. Fujimoto, Z., Suzuki, N., Kishine, N., Ichinose, H., Momma, M., Kimura, A., and Funane, K. (2017) Carbohydrate-binding architecture of the multi-modular  $\alpha$ -1,6-glucosyltransferase from *Paenibacillus* sp.

- 598K, which produces  $\alpha$ -1,6-glucosyl- $\alpha$ -glucosaccharides from starch. *Biochem. J.* 10.1042/BCJ20170152
211. Munoz-Munoz, J., Cartmell, A., Terrapon, N., Henrissat, B., and Gilbert, H. J. (2017) Unusual active site location and catalytic apparatus in a glycoside hydrolase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.1701130114
  212. Cartmell, A., Muñoz-Muñoz, J., Briggs, J. A., Ndeh, D. A., Lowe, E. C., Baslé, A., Terrapon, N., Stott, K., Heunis, T., Gray, J., Yu, L., Dupree, P., Fernandes, P. Z., Shah, S., Williams, S. J., Labourel, A., Trost, M., Henrissat, B., and Gilbert, H. J. (2018) A surface endogalactanase in *Bacteroides thetaiotaomicron* confers keystone status for arabinogalactan degradation. *Nat. Microbiol.* 10.1038/s41564-018-0258-8
  213. Munoz-Munoz, J., Ndeh, D., Fernandez-Julia, P., Walton, G., Henrissat, B., and Gilbert, H. J. (2021) Sulfation of arabinogalactan proteins confers privileged nutrient status to *bacteroides plebeius*. *MBio.* 10.1128/mBio.01368-21
  214. Kondo, T., Kichijo, M., Maruta, A., Nakaya, M., Takenaka, S., Arakawa, T., Fushinobu, S., and Sakamoto, T. (2021) Structural and functional analysis of gum arabic L-rhamnose- $\alpha$ -1,4-D-glucuronate lyase establishes a novel polysaccharide lyase family. *J. Biol. Chem.* 10.1016/j.jbc.2021.101001
  215. Kondo, T., Kichijo, M., Nakaya, M., Takenaka, S., Arakawa, T., Kotake, T., Fushinobu, S., and Sakamoto, T. (2021) Biochemical and structural characterization of a novel 4-O- $\alpha$ -l-rhamnosyl- $\beta$ -d-glucuronidase from *Fusarium oxysporum*. *FEBS J.* 10.1111/febs.15795
  216. Sprogøe, D., Van Den Broek, L. A. M., Mirza, O., Kastrop, J. S., Voragen, A. G. J., Gajhede, M., and Skov, L. K. (2004) Crystal Structure of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biochemistry.* 10.1021/bi0356395
  217. Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzynia, I., and Bujacz, G. (2011) Crystal structures of the apo form of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS J.* 10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x
  218. Fushinobu, S. (2010) Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10.1271/bbb.100494
  219. Kitaoka, M., Tian, J., and Nishimoto, M. (2005) Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.71.6.3158-3162.2005
  220. Kiyohara, M., Tachizawa, A., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2009) Prebiotic effect of lacto-n-biose i on bifidobacterial growth. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10.1271/bbb.80697
  221. Ambroggi, V., Bottacini, F., O'Sullivan, J., O'Connell Motherway, M., Linqu, C., Schoemaker, B., Schoterman, M., and van Sinderen, D. (2019) Characterization of GH2 and GH42  $\beta$ -galactosidases derived from bifidobacterial infant isolates. *AMB Express.* 10.1186/s13568-019-0735-3
  222. Sela, D. A., Garrido, D., Lerno, L., Wu, S., Tan, K., Eom, H. J., Joachimiak, A., Lebrilla, C. B., and Mills, D. A. (2012) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697  $\alpha$ -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.06762-11
  223. Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M., Kumagai, H., Yamamoto, K., and Katayama, T. (2012) 1,3-1,4- $\alpha$ -L-Fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M111.333781
  224. Katayama, T. (2016) Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: Human milk oligosaccharides and bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 10.1080/09168451.2015.1132153
  225. Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechei, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., He, F., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S., and Katayama, T. (2018) Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-018-32080-3
  226. 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.* 10.1128/AEM.00149-08
  227. Odamaki, T., Bottacini, F., Kato, K., Mitsuyama, E., Yoshida, K., Horigome, A., Xiao, J. Z., and Van Sinderen, D. (2018) Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human lifespan. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-017-18391-x
  228. Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., and Katayama, T. (2013) Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M113.484733
  229. Yamada, C., Gotoh, A., Sakanaka, M., Hattie, M., Stubbs, K. A., Katayama-Ikegami, A., Hirose, J., Kurihara, S., Arakawa, T., Kitaoka, M., Okuda, S., Katayama, T., and Fushinobu, S. (2017) Molecular

- Insight into Evolution of Symbiosis between Breast-Fed Infants and a Member of the Human Gut Microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chem. Biol.* 10.1016/j.chembiol.2017.03.012
230. Pichler, M. J., Yamada, C., Shuoker, B., Alvarez-Silva, C., Gotoh, A., Leth, M. L., Schoof, E., Katoh, T., Sakanaka, M., Katayama, T., Jin, C., Karlsson, N. G., Arumugam, M., Fushinobu, S., and Abou Hachem, M. (2020) Butyrate producing colonic Clostridiales metabolise human milk oligosaccharides and cross feed on mucin via conserved pathways. *Nat. Commun.* 10.1038/s41467-020-17075-x
231. Bell, A., and Juge, N. (2021) Mucosal glycan degradation of the host by the gut microbiota. *Glycobiology.* 10.1093/glycob/cwaa097
232. Neish, A. S. (2009) Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology.* 10.1053/j.gastro.2008.10.080
233. Gregg, K. J., Suits, M. D. L., Deng, L., Vocadlo, D. J., and Boraston, A. B. (2015) Structural analysis of a family 101 glycoside hydrolase in complex with carbohydrates reveals insights into its mechanism. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M115.680470
234. Kiyohara, M., Nakatomi, T., Kurihara, S., Fushinobu, S., Suzuki, H., Tanaka, T., Shoda, S. I., Kitaoka, M., Katayama, T., Yamamoto, K., and Ashida, H. (2012)  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M111.277384
235. Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., and Martens, E. C. (2012) How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 10.1038/nrmicro2746
236. Fujita, K., Sakamoto, S., Ono, Y., Wakao, M., Suda, Y., Kitahara, K., and Suganuma, T. (2011) Molecular cloning and characterization of a  $\beta$ -L-arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M110.190512
237. Fujita, K., Takashi, Y., Obuchi, E., Kitahara, K., and Suganuma, T. (2014) Characterization of a novel  $\beta$ -l-arabinofuranosidase in *bifidobacterium longum*: Functional elucidation of a duf1680 protein family member. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M113.528711
238. Saito, K., Viborg, A. H., Sakamoto, S., Arakawa, T., Yamada, C., Fujita, K., and Fushinobu, S. (2020) Crystal structure of  $\beta$ -L-arabinobiosidase belonging to glycoside hydrolase family 121. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0231513
239. Ito, T., Saikawa, K., Kim, S., Fujita, K., Ishiwata, A., Kaeothip, S., Arakawa, T., Wakagi, T., Beckham, G. T., Ito, Y., and Fushinobu, S. (2014) Crystal structure of glycoside hydrolase family 127  $\beta$ -l-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10.1016/j.bbrc.2014.03.096
240. Maruyama, S., Sawano, K., Amaki, S., Suzuki, T., Narita, S., Kimura, K., Arakawa, T., Yamada, C., Ito, Y., Dohmae, N., Fujita, K., Ishiwata, A., and Fushinobu, S. (2021) Substrate complex structure, active site labeling and catalytic role of the zinc ion in cysteine glycosidase. *Glycobiology.* 10.1093/glycob/cwab103
241. McGregor, N. G. S., Coines, J., Borlandelli, V., Amaki, S., Artola, M., Nin-Hill, A., Linzel, D., Yamada, C., Arakawa, T., Ishiwata, A., Ito, Y., van der Marel, G. A., Codée, J. D. C., Fushinobu, S., Overkleeft, H. S., Rovira, C., and Davies, G. J. (2021) Cysteine Nucleophiles in Glycosidase Catalysis: Application of a Covalent  $\beta$ -l-Arabinofuranosidase Inhibitor. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 10.1002/anie.202013920

## 補足—AlphaFold2 に関する見解

2021年7月にNature誌にて高精度の構造予測プログラム AlphaFold2 が発表された(45)。AlphaFold2 は、予めトレーニングされた人工知能に MSA を解析させることで、保存残基との物理的な距離を予想し、そこから全体構造を予測するプログラムである。GPU を搭載したコンピューター、あるいは無料版 Google Colab などのオンラインサービスを用いれば、目的タンパク質のアミノ酸配列を用いて 30 分足らずで構造を予測することができる。これを「50 年に一度の歴史的なマイルストーン」と呼ぶ研究者もいる。

予測モデルの精度は MSA に用いられた配列の数に依存するが、多くの場合、分子置換のモデルとして用いられるほど、主鎖も側鎖も実験値に近い形で正確に予測される。本博士論文で扱ったサンプルにおいても AlphaFold2 の予測モデルを参考に考察した。これほど実験値に近ければ、AlphaFold2 は私をはじめとする構造生物学に携わる研究者にとって恐るべき存在なのかという疑問が生じる。これは 2021 年度日本結晶学会若手の会のパネルディスカッションでも取り上げられた大きなトピックである。

確かにタンパク質の構造を決定するのに数ヶ月から数年かかる現在、AlphaFold2 の利用は各分野でコストや時間の削減に繋がる。わざわざタンパク質を結晶化し、放射線を用いた高度な回折実験を行わなくても、分子機能について論じ、創薬について生物情報学的に考察ができる。

しかし、予測はあくまで予測である。現時点で AlphaFold2 のモデルを用いたドッキングに成功した例は報告されていない。AlphaFold2 のモデルは実験値に近くても、厳密に解と同じではなく、よってドッキングのエネルギー安定化の計算にバイアスが生じるからである。私が携わっている新規酵素の構造機能解析の研究ではリガンドがタンパク質のどのアミノ酸残基とどのように相互作用していくのかという点を極め重要視している。リガンドの位置を厳密に予測できない AlphaFold2 はこういった分野ではあまり意味をなさない。また、タンパク質の表面構造や電荷を重視したドラッグデザインの手法でも、AlphaFold2 のモデルは実際の構造と微妙に異なるため、応用するには少なからずハードルがあるだろう。さらにタンパク質の間で相互作用し、超分子複合体を形成することがある。AlphaFold2 は系統学的なタンパク質の進化に基づいたツールのため、系統学的に無関係ヘテロオリゴマーの予測（例えば抗体やシャペロンなど）は得意ではない。

以上により、AlphaFold2 は精度の高い予測構造を作製できるものの、これまで確立されてきたホモロジーモデリング法（Phyre2、SWISS Model、Modeller）と似たような欠点や課題を抱えていると言えるだろう。唯一、分子置換に用いられることが私のような構造生物学と主体としている研究者にとって利点であると言える。これまで新規構造の決定では、重原子を含んだ毒物を用いて実験的に位相情報を取得する必要がある、廃液による環境汚染が懸念点の一つになっていた。また実験作業も容易なものではなく、長い時間を要する（例えば、本博士論文の第 1 部、第 1 章で取り上げた AgaBb は、前任者が実験していた当時から構造決定するまで実に 7 年を要した）。今後は重原子を用いず、AlphaFold2 を活用して構造決定する事により、解析のハイスループット化が目指せる。

現代の構造生物学者のほとんどは構造生物学に限定せず他分野の実験（例えば酵素学実験）も並行して行う事によって、良質な論文や研究成果を生み出している。構造決定は研究の中間点であり、多くの場合その先の考察に必要なデータが求められているため、構造決定に要する時間の短縮は非常に有意義である。よって、AlphaFold2 は今後の構造生物学において有効活用されるであろう。

## 発表論文

1. Kashima, T., Okumura, K., Ishiwata, A., Kaieda, M., Terada, T., Arakawa, T., Yamada, C., Shimizu, K., Tanaka, K., Kitaoka, M., Ito, Y., Fujita, K., and Fushinobu, S. (2021) Identification of difructose dianhydride I synthase/hydrolase from an oral bacterium establishes a novel glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.* 10.1016/j.jbc.2021.101324 (Editors' Pick 選出)

## 学会発表

1. (国際会議・ポスター発表 (コロナウイルス感染拡大の影響により延期)) ○Kashima, T., Okumura, K., Arakawa, T., Ishiwata, A., Ito, Y., Fujita, K., Fushinobu, S., Characterization of novel exo- $\alpha$ -D-arabino/fructofuranosidases from *Bifidobacterium dentium*, degrading caramelized sugar, International symposium on *Bifidobacterium* research、東京、2020年3月
2. (国際会議・ポスター発表) ○Kashima, T., Okumura, K., Arakawa, T., Ishiwata, A., Ito, Y., Fujita, K., Fushinobu, S., Structural characterization of a novel exo- $\alpha$ -D-fructofuranosidase from *Bifidobacterium dentium* that degrades caramelized sugars, 2020 World Conference on Protein Science、北海道、2020年7月
3. (国内学会・ポスター発表) ○鹿島騰真、奥村公喜、荒川孝俊、山田千早、石渡明弘、伊藤幸成、藤田清貴、伏信進矢、カラメル化糖に作用するビフィズス菌の新規 exo- $\alpha$ -D-fructofuranosidase の構造解析、2020年度日本応用糖質科学学会大会、長野、2020年10月 (ポスター賞受賞)
4. (国内学会・ポスター発表) ○鹿島騰真、赤間恵、荒川孝俊、山田千早、芦田久、伏信進矢、ビフィズス菌由来の B 型血液型抗原に特異的な  $\alpha$ -galactosidase の構造解析、2021年度日本結晶学会年会 若手の会、北海道、2021年11月

## 謝辞

私が博士課程期間中に行ってきた研究は、多くの方々の協力なくして成し得なかったものです。

指導教員である伏信進矢教授には、私がダメ元で「酵素学研究室で研究したい」と相談した時から、本博士論文を執筆している今現在までずっとお世話になりました。自分が打ち込めるような研究テーマを与えて下さいました。当初、2 サンプルしか扱わない予定でしたが、私のわがままでサンプルやタスクをドンドン増やしていってしまいました。それでも嫌な顔一つせずに私のやりたいことに協力してもらい、またたくさんご指導下さいました。今、私が自分の研究を好きでいられるのは伏信教授のおかげです。大変感謝しております。

共同研究者の皆様には感謝しております。

近畿大学の芦田久教授は、私の突然のメールやお願ひにも優しく応えて頂き、プラスミド供与等の形で協力して下さいました。また、日本応用糖質科学会、日本結晶学会でもたくさんお話しして下さい、大変勉強になりました。

高エネルギー加速器研究機構の安達成彦特任准教授、川崎政人准教授、守屋俊夫特任准教授、池田聡人博士にはクライオ電子顕微鏡の取り扱いや単粒子構造解析について、全く無知な自分に一から教えて下さいました。データの解析が難しく、一部代わりにやって下さいました。今後、難しいデータ解析も自分でできるように精進したく思っています。

京都大学大学院の片山高嶺教授と加藤紀彦助教には入学前からお世話になっています。片山教授との縁がなければ私は伏信教授の元で学ぶことはできなかつたかもしれません。プラスミドを供与して下さいました。また、データ解析について厳しいご意見もたくさん下さいました。分子応答機構学分野から頂いている研究データはいつも興味深く、大変勉強になりました。

西オーストラリア大学の Keith Stubbs 准教授は新しくデザインされた阻害剤を分与下さいました。ありがとうございました。

鹿児島大学の藤田清貴准教授からは魅力的なサンプルをたくさん頂きました。そのおかげもあり、自分の研究に打ち込むことができました。私の疑問や意見にはいつも冷静に、的確に答えて下さり、大変勉強になりました。私が JBC に論文を投稿できたのは藤田准教授と鹿児島大学の学生陣が築いた研究のバックグラウンドがあったからです。

理化学研究所の石渡明弘博士には基質合成と NMR で大変お世話になりました。特に NMR は本来自分でやりたかったところですが、コロナウィルス感染蔓延防止対策の影響で現地に行けず、代わりにやって下さいました。お会いするといつも奇策に話して下さいました。

新潟大学の北岡本光教授は無水糖質についてたくさんご教授下さり、ディスカッションして下さいました。

生物情報工学研究室の清水謙多郎教授と寺田透准教授は MD シミュレーションをやって下さいました。私がモデル作製に苦戦して頭を抱えていたところ、手を差し伸べて下さり大変助かりました。

醗酵学研究室の勝山陽平准教授はお忙しい中、クライオ電子顕微鏡の単粒子構造解析についてご教示下さいました。

日本農芸化学会、日本応用糖質科学会、日本結晶学会でお会いした先生方、研究者、学生の皆様とは有意義なディスカッションができました。コロナウィルス感染蔓延防止対策の一環で発表、懇親会の殆どがオンライン開催になってしまいましたが、外部の方々と研究についてお話しできて大変楽しかったです。

研究室の山田千早助教からたくさんご教示頂きました。私の方から難しい質問を投げかけても真摯に向き合ってくださいました。実験が難航して心が病んでいた時も話し相手になってもらい、また明るく接して下さい、モチベーションを上げてくれました。息子さんからもたくさん元気をもらいました。

荒川孝俊助教からも、研究の方針、研究費の使い方について、たくさんご意見、ご教示頂きました。

秘書の黒木さんとはあまりお話する機会はありませんでしたが、私が困っていたときにいつも助けて下さいました。

松垣直宏准教授、引田理英助教、原田彩佳助教、研究支援員はじめ、KEK SBRCとSLSのスタッフの皆様には感謝しております。おかげで滞りなく放射光実験施設での実験に取り組みました。

博士課程のOB・OGの皆様には感謝しております。

佐藤優太博士は右も左も分からない私にゼロから実験を教えてくださいました。生意気で面倒な後輩でありながら、優しく冷静に教えてくださいました。

佐藤真与博士は卒業後も研究費の申請書執筆について沢山のアドバイスして下さいました。自分のことで忙しいはずなのに、申請書の下書きを見てもらい、事細かに意見して下さいました。

修士課程で卒業した中島千穂さん、二宮拓太くん、山上陽一郎くん、味木智子さん、高橋芽衣さん、塚原茜さん、福田勇介くん、藤田拓実くんには感謝しています。卒業後も時々話し相手になってもらい、私の気分転換に付き合ってもらっています。

後輩の廖増威くん、荒川啓くん、東條裕紀くん、新田峻平くん、星野菜摘さん、李家漫さん、高橋宏大くん、田中莉奈さん、松本真由子さん、張欣哲さん、藤尾則揮くん、山口雄太くん、福島陸くん、山川凱生くんは、いつも嫌味な先輩の話聞いてくれて、また研究室をいつも盛り上げてくれました。感謝しています。

博士課程期間中ほとんど会えなかったにも関わらず、時々連絡をくれた友達や親戚に感謝します。

他にも博士課程期間中に様々な方々と知り合いお世話になりました。研究を通して関わりを持った全ての方々との出会いに感謝しております。

最後に、大学院に行かせてくれた、これまでどんな時でも応援して支えてくれた親に感謝します。

2021年12月