

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 31 年度博士課程 入学  
氏名 鹿島 騰真  
指導教員名 伏信 進矢

### 論文題目

#### ビフィズス菌の新規糖質関連酵素の構造機能解析

腸内細菌は宿主が摂取する食物の消化を助け、ヒトの健康に貢献している。中でもビフィズス菌は出生後から腸内に留まり、免疫力向上や病原菌の定着、感染の予防等に寄与する善玉菌の代表格である。ビフィズス菌が生息している小腸下部と大腸には、澱粉などの易消化性糖質はほとんど届かない。この貧栄養環境下で増殖する手段として、ビフィズス菌は細胞表面や菌体内で様々な糖質関連酵素を発現している。これにより、宿主や他の細菌が利用しにくいヒトミルクオリゴ糖 (human milk oligosaccharide、HMO)、腸管粘膜のムチン糖鎖や食物繊維などの難消化性糖質から炭素源・エネルギー源を獲得している。一方で宿主の食習慣には年齢、地域、部族、文化など様々なファクターが影響する。特に乳児と成人では摂取する難消化性糖質の種類、ビフィズス菌の種、そして糖質源獲得の戦略が大きく異なる。その一環で、ビフィズス菌は自らが持つ糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase、GH) を独自に進化させてきた。よって、乳児型ビフィズス菌と成人型ビフィズス菌のそれぞれに特有の GH を研究することは重要である。これにより、ヒトとビフィズス菌の共進化を理解し、新たなプレバイオティクスの開発に繋がり、ヒトの健康増進の糧となる。

本論文ではビフィズス菌より発見された、増殖に関わるとされている 6 つの GH の構造からその分子機能の解明を目的とした。これらを 3 部、全 6 章に分けて詳説する。第 1 部では乳児型ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来の、腸管粘膜のムチン糖鎖含有 Core 2 O-glycan 代謝経路に関与する GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase (AgaBb)、GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase (AfcA)、GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase (BbhII) の X 線結晶構造解析および生化学的実験を行なった。第 2 部では成人型ビフィズス菌 *B. dentium* JCM1195 株由来の、カラメル化糖に作用する GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase ( $\alpha$ FFase1) と GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase ( $\alpha$ FFase2) の生化学的実験および X 線結晶構造解析を行なった。第 3 部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 X 線結晶構造解析を行なった。

#### **第 1 部 乳児型ビフィズス菌 *B. bifidum* JCM1254 株の Core 2 ムチン糖鎖代謝経路関連酵素の構造機能解析**

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。ビフィズス菌が生息している大腸は Core 2 [Gal- $\beta$ 1,3-(GlcNAc- $\beta$ 1,6)-GalNAc] という母核構造が伸長、分岐、修飾されたムチン糖鎖が豊富である。ビフィズス菌はこれを認識することで定着し、また様々な膜結合型 GH を利用して複雑な糖構造から糖質源を獲得している。本論文はその中でも *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来の 3 種類の GH (AgaBb、AfcA、BbhII) について研究を行なった。

GH110  $\alpha$ 1,3-galactosidase (AgaBb) は、近畿大学の芦田久教授らによって発見された、ムチン糖鎖の末端構造である B 型抗原 3 糖 [Gal- $\alpha$ 1,3-(Fuc- $\alpha$ 1,2)-Gal] に特異的な GH である。これは現在、糖

質関連酵素データベース CAZy の GH ファミリーの中でも AgaBb が属する GH110 サブファミリー-A 固有の基質特異性である。他の糖構造には活性を示さないことから B 型抗原 3 糖の Fuc を認識しないと  $\alpha$ 1,3-galactosidase 活性を持たないと考えられているが、基質の認識様式の詳細は不明であった。本研究では白金を用いた単波長異常分散法により AgaBb のリガンドフリー構造を決定した。AgaBb の全体構造は  $\beta$ -helix を主体とし、側面に小さな  $\beta$ -barrel domain を 2 つ有していた。配列同一性 27% の *Pseudoalteromonas distincta* U2A 株由来 PdGH110B との構造比較により Gal- $\alpha$ 1,3-Gal が入る -1、+1 サブサイトを形成する候補残基を確定した。また、B 型抗原 3 糖の Fuc が E380 と R270 と相互作用した形が最もあり得るコンフォメーションであると考えられた (図 1)。

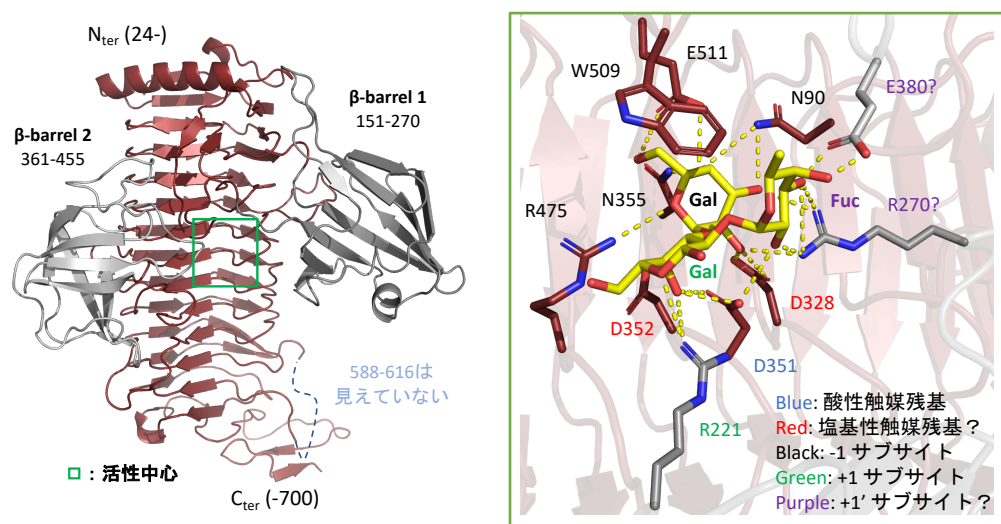


図 1. AgaBb の全体構造と推定されている B 型抗原 3 糖の認識様式

GH95  $\alpha$ 1,2-fucosidase (AfcA) は、ムチン糖鎖、そして同じく乳児型ビフィズス菌の炭素源である HMO に豊富に含まれている Fuc を切り出す GH である。AfcA の活性ドメインについては京都大学の片山高嶺教授らによりその構造と分子機能が詳細に研究されてきた。その一方で、これまで機能未知とされていた N 末端領域が 2'-fucosyllactose (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$ 1,4-Glc, 2'-FL) と結合することが最近明らかとなった。これは N 末端領域に糖質結合モジュール (carbohydrate binding module, CBM) が含まれていることを示すが、既報の CBM と配列相同性がないため、その詳細は不明であった。本研究ではセレンメチオニン置換体を用いた単波長異常分散法により AfcA の N 末端領域と活性ドメインからなるマルチプルドメイン構造をリガンドフリーおよび 2'-FL 複合体として決定した。新しく決定した N 末端領域はタンデムに連なった 2 つの CBM とリンカードメインで構成されていた。2 つの CBM は配列同一性 48% のホモログ同士であった。その構造は 3 枚の逆平行  $\beta$ -sheet、4 つの短い  $\alpha$ -helix、そして 1 つのナトリウムイオンからなる、これまでの CBM にはないユニークな形に折り畳まれていた。2'-FL の Fuc は CBM のループ部分にある 3 つまたは 4 つのアミノ酸と水素結合、Gal は 4 つまたは 5 つの残基と水素結合、さらに Trp のスタッキングによって認識されることが解った。

GH20  $\beta$ -6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidase (BbhII) は、京都大学の片山高嶺教授、加藤紀彦助教らによって発見された、ムチン糖鎖の 6 位硫酸化 GlcNAc (GlcNAc-6S) を特異的に加水分解する GH である。GH20 はアノマー保持型反応機構を持つ GH の中でも酵素のアミノ酸側鎖の代わりに GlcNAc の N-アセチル基がアノマー炭素に求核攻撃する基質補助型 GH である。この機構に特有のオキサゾリン中間体やオキソカルベニウムイオン様の遷移状態を模した N-acetylglucosaminidase 阻害剤は医薬品として流通しているが、硫酸化糖質を模造した阻害剤は報告されていなかった。本研究では、西オーストラリア大学の Keith Stubbs 准教授によってデザインされた BbhII の阻害剤候補物質、PUGNAc-6S と NAGT-6S の阻害効果を検証した。pNP-GlcNAc-6S を基質とした阻害活性測定の結果、PUGNAc-6S と NAGT-6S は BbhII の加水分解反応に対してそれぞれ阻害定数 ( $K_i$ ) 15.4  $\pm$  1.9 nM と 52.3  $\pm$  7.2 nM の極めて強い競合阻害効果を示した。更に X 線結晶構造解析により決定した BbhII と PUGNAc-6S の

複合体構造から、PUGNAc-6S が活性中心内で  $B_{3,0}$  のポート型のコンホメーションを取っていることが確認された。N 末端の CBM32 ドメインでは  ${}^4C_1$  のイス型のコンホメーションを取っていた。

## 第 2 部 成人型ビフィズス菌 *B. dentium* JCM1195 株由来のカラメル化糖に作用する酵素群の構造機能解析

現在、健康食品やプレバイオティクスとして広く認識されているフルクトオリゴ糖やフルクトンのようなフルクトース分子重合体は植物由来であるため、主に  $\beta$ -D-Fruf で構成され、 $\alpha$ -D-Fruf は含まれていない。一方でショ糖を加熱加工して作られるカラメル化糖には  $\alpha$ -D-Fruf 二糖が含まれており、この構造の糖質は腸内のビフィズス菌や乳酸菌等の善玉菌によって資化されることが解っている。本研究では *B. dentium* JCM1195 株由来の  $\alpha$ -D-Fruf 糖質に作用する酵素群、GH172 difructose dianhydride synthase/hydrolase ( $\alpha$ FFase1) と GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase ( $\alpha$ FFase2) について研究を行なった。

GH172 difructose dianhydride synthase ( $\alpha$ FFase1) はカラメル化糖の Fruf- $\beta$ 2,1-Fruf および Fruf- $\beta$ 2,1-Fruf (inulobiose) から平衡的に diheterolevulosan II (DHL II) と difructose dianhydride I (DFA I) を生成する。これは基質の構造内での脱水縮合反応を触媒することによってなされている。本研究では鹿児島大学の藤田清貴准教授と理化学研究所の石渡明弘博士との共同研究により、 $\alpha$ FFase1 の分子機構の同定と構造解析を行なった。 ${}^1\text{H}$  NMR で合成基質の加水分解反応をモニタリングすることにより、この酵素がアノマー保持型機構によって反応を触媒することが解った。さらに天然基質では反応中間体構造中で非還元末端側にある Fruf の 1 位のヒドロキシ基が求核攻撃することで脱水縮合反応の触媒が成り立っていた。X 線結晶構造解析によって解かれた  $\alpha$ FFase1 と  $\beta$ -D-Araf および  $\beta$ -D-Fruf の複合体構造から DFA I の認識様式が推測された。 $\alpha$ FFase1 は  $D_3$  二面对称構造を持った 6 量体構造であり、各プロトマーは 2 つの  $\beta$ -jelly roll と 1 つの  $\alpha$ -helix で構成されていた。基質はオリゴマー構造内に入り、2 つのプロトマーが協調的にその認識に関わることで活性が成り立っていた (図 2)。更に東京大学の清水謙多郎教授と寺田透准教授の協力により、分子動力学シミュレーションで構造内にある糖の脱離経路を推定した。 $\alpha$ FFase1 は独自の配列、構造、反応機構を有することから、本酵素の研究により糖質関連酵素データベース CAZy では新しく GH172 ファミリーが確立された(1)。

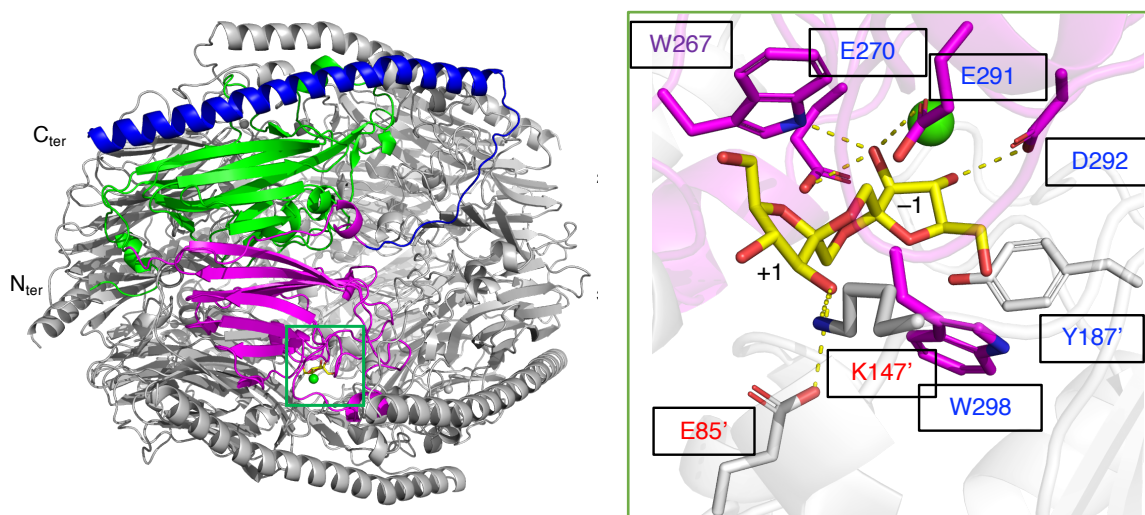


図 2.  $\alpha$ FFase1 の全体構造と推測されている DFA I の認識様式

GH172  $\alpha$ -D-fructofuranosidase ( $\alpha$ FFase2) はカラメル化糖の Fruf- $\alpha$ 2,6-Glc を加水分解する GH とされている。前述の GH172  $\alpha$ FFase1 と配列同一性 30.40% の遠縁ホモログであり、基質特異性が異なる。本研究では  $\alpha$ FFase1 と  $\alpha$ FFase2 の機能の違いに関わる構造因子を特定するべく、 $\alpha$ FFase2 の構造決定を目指した。析出し易い K/Na Tartrate を沈殿剤とし、Additive Screen によって同定された chromium (III) chloride および TCEP hydrochloride を組み合わせた複雑な結晶化の系を確立した。これを最適化することにより最大分解能 1.96 Å の X 線回折データセットを獲得した。

### 第3部 成人型ビフィズス菌 *B. longum* JCM7052 株由来のアラビアガム含有アラビノガラクトン 資化経路関連酵素 GH39 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase GAfase の構造解析

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。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おり、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。*B. longum* JCM7052 株由来の GH39 3-O- $\alpha$ -D-galactosyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (GAfase) は一部の成人型ビフィズス菌に特有の酵素である。GAfase はアラビアガム AG に特有である Gal- $\alpha$ 1,3-L-Ara を切り出す酵素であり、このことからアラビアガム AGP のプレバイオティクス効果における健康科学的に重要な因子であると考えられている。既報の GH39 ホモログと配列同一性が低いため、その基質認識様式の特が難しかった。そこで、本研究では GAfase の構造決定を目指した。緻密な発現検討により酵素の可溶化に最適な異種発現条件を特定し、それを基に精製 GAfase を大量調整した。これを基に得られた結晶から分解能 2.7 Å の X 線回折像を獲得した。

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