

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 22 年度博士課程 進学  
氏 名 伊藤 佑  
指導教員名 伏信 進矢

## 論文題目

ビフィズス菌由来糖質加水分解酵素の構造と機能に関する研究

本論文ではビフィズス菌由来の 2 種類の糖質加水分解酵素に関する研究を行った。第一章では、*Bifidobacterium bifidum* JCM1254 由来のヒトミルクオリゴ糖分解酵素であるラクト *N* ビオシダーゼの X 線結晶構造解析を行った。第二章では、*Bifidobacterium. longum* JCM1217 由来の植物細胞壁分解酵素である $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼの生化学的実験を行った。

### 第一章 *B. bifidum* JCM1254 由来 GH20 ラクト *N* ビオシダーゼ (LNBBase) の X 線結晶構造解析 [1]

ヒトミルクオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharides: HMO) は、人乳に含まれるラクトース以外のオリゴ糖のことである。母乳栄養乳児の方が人工乳栄養乳児よりも腸内細菌叢のビフィズス菌占有率が高いため、HMO にはビフィズス菌の生育因子 (ビフィズス因子) が含まれていることが知られていた。しかし、HMO は複雑な構造を持つ約 100 種類のオリゴ糖の混合物であるため、ビフィズス因子は特定されていなかった。ところが、最近の研究でビフィズス菌特有の HMO 代謝経路が発見され、HMO の構成単位の 1 つである LNB が、ビフィズス因子の 1 つであることが明らかになった。この HMO 代謝経路では、ビフィズス菌は、HMO の主要な構成物の 1 つであるラクト *N* テトラオース (Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Glc, LNT) から、ラクト *N* ビオース (Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc, LNB) を遊離するラクト *N* ビオシダーゼ (LNBBase) を菌体外に分泌し、遊離した LNB を取り込む。LNB は、乳児の腸内にビフィズス菌を定着させ乳児の健康を促

進するプレバイオティクスとしても期待されている。

LNBase は糖質加水分解酵素ファミリー20 (GH20) に属する。現在、GH20 で構造が明らかになっているのは、 $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミン ( $\beta$ -HexNAc) 単糖を切り出す $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ ( $\beta$ -HexNAcase) のみだった。それらと LNBase のアミノ酸相同性は約 20% しかない。LNBase の構造は、2 糖を切り出す GH20 の酵素としては初めてのものである。本研究では、X 線結晶構造解析によって、*B. bifidum* JCM1254 株由来の LNBase の構造基盤情報を得ることを目的とした。

当初、全長 1112 アミノ酸からなる LNBase のうち触媒ドメインを含む 627 アミノ酸からなるコンストラクトを用いたが、構造解析に適した結晶が得られなかった。そこで、N 末端から 4 アミノ酸短くした 623 アミノ酸からなるコンストラクトを作製し、大腸菌による組換え体及びその Se-Met 置換体の発現系を再構築した。発現させたタンパク質を 3 種類のカラムクロマトグラフィーによって精製した。得られたタンパク質は、硫酸アンモニウムを沈殿剤とする条件において、LNB または LNB-チアゾリン存在下でのみ結晶化した。LNB-チアゾリンは反応中間体アナログであり、LNBase の強力な阻害剤である。得られた結晶を用いて、KEK-PF において X 線回折データを収集した。Se-SAD 法により位相を決定し、LNBase と LNB、LNB-チアゾリンの共結晶の構造を共に分解能 1.8 Å で決定し、それぞれ  $R$  factor = 15.5% ( $R_{\text{free}}$  = 19.1%) ,  $R$  factor = 18.2% ( $R_{\text{free}}$  = 21.3%) まで精密化を行った。

LNBase の全体構造は、3 つのドメインで構成されていた (図 1 左)。まず N 末端ドメインは、2 本の $\alpha$ ヘリックスを 7 本のストランドからなる $\beta$ シートが覆う $\alpha/\beta$ トポロジーで、機能は不明だが GH20 に広く保存されているフォールドであった。次に、触媒ドメインは他の GH20 と同じく ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> バレル構造をとっていた。活性中心では、GH20 に共通して保存されている触媒残基の Asp と Glu が LNB と水素結合しており、さらに、LNB の全ての水酸基が周辺のアミノ酸と水素結合していた。最後に、C 末端ドメインは、Dali サーバーによる立体相同性検索によるとシバフタケ由来のレクチンにやや似ており、少し壊れた $\beta$ -トレフォイルフォールドをとっていた。また、欠失すると活性が低下することから安定性に寄与していると考えられた。

Dali サーバーにより類似フォールドを持つタンパク質を検索した結果、上位は全て GH20 の  $\beta$ -HexNAcase だった。それらと LNBase の構造を重ね合わせたところ、N 末端ドメインと触媒ドメインの全体構造は他の $\beta$ -HexNAcase と全体的によく重なっていたが、C 末端ドメインは LNBase に特徴的なものであることが分かった。また、 $\beta$ -HexNAcase の表面電荷図では、バレル中央の基質結合ポケットには単糖が入るスペースしかないのに対し、LNBase ではバレル中央のポケットに LNB がすっぽりはまっていた (図 1 右)。LNBase は $\beta$ -HexNAcase に比べてサブサイト(-2)に当たる部分が広がっていた。 $\beta$ -HexNAcase では、このサブサイト(-2)に当たる部分を 3 つのアミノ酸が遮っていた。一方で、LNBase のサブサイト(-2)では、これらの 3 つのアミノ酸

は別のアミノ酸に置き変わっていた。さらに、 $\beta$ -HexNAcase に存在する長いループが欠失しており、ここにガラクトースが入るスペースが出来ていた。

今回得られた LNB 複合体の結晶構造中の LNB は E・P 複合体に相当する状態と考えられるが、LNB の GlcNAc は  ${}^4E$  と呼ばれる歪んだコンフォメーションをとっていた。他の GH20 で観測された複数の基質/アナログ/阻害剤の複合体との構造の比較により、このファミリーの酵素のサブサイト(-1)に結合する GlcNAc は、 ${}^1{}^4B(E \cdot S) \rightarrow {}^4E$  (遷移状態 1)  $\rightarrow {}^4C_1$  (オキサゾリニウムイオン中間体)  $\rightarrow {}^4E$  (遷移状態 2)  $\rightarrow {}^4E(E \cdot P)$ 、というコンフォメーション変化を経て切断されると予測された。

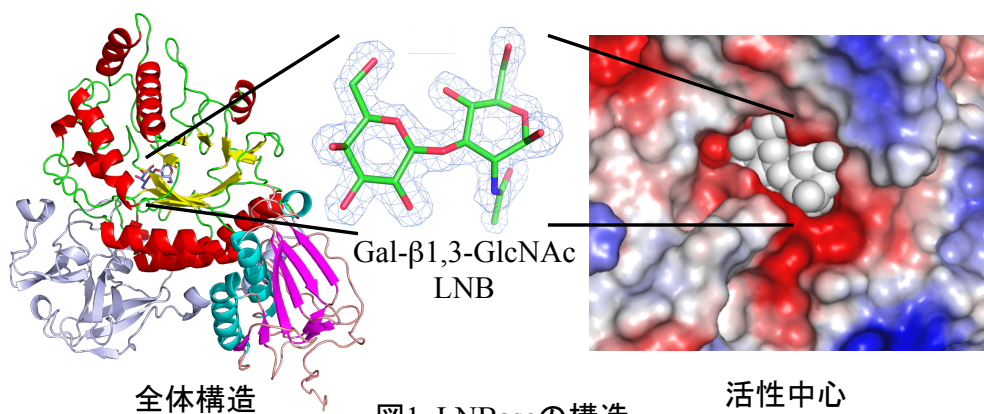


図1. LNBBaseの構造

## 第二章 *B. longum* JCM1217 由来 GH127 $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1) の生化学的実験

植物は、ヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖タンパク質(hydroxyproline-rich glycoproteins: HRGP)を様々な生物学的プロセスに利用している。植物細胞壁には構造タンパク質であるエクステンシンという HRGP が含まれている。エクステンシンは Ser-Hyp<sub>4</sub> モチーフと呼ばれる Hyp を含む繰り返し構造を有しており、その Hyp 残基には最大 4 単位のアラビノフラノース (Araf) からなる $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖 (Araf- $\alpha$ 1,3-Araf- $\beta$ 1,2-Araf- $\beta$ 1,2-Araf- $\beta$ -Hyp: Ara<sub>4</sub>-Hyp) が O 結合している。最近、*B. longum* JCM1217 から Ara<sub>4</sub>-Hyp など分解し取り込む経路の関連遺伝子群が発見された。さらに、ここに含まれる酵素群の中から、 $\beta$ 結合した Araf からなるオリゴ糖に対して分解活性を示す、GH127  $\beta$ -アラビノフラノシダーゼ (HypBA1) と GH121  $\beta$ -アラビノビオシダーゼ (HypBA2) が同定され機能解析された。ところで、Araf は植物細胞壁において arabinan や arabinoxylan, arabinogalactan などの主要な多糖の構成糖であるが、その多くが $\alpha$ 結合しており、 $\alpha$ -Arafase は植物が持つ一般的な酵素としてよく知られている。しかしながら、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖に対して作用する酵素はこれまで報告がなく、HypBA1 と HypBA2 が初めての発見である。また、植物の糖タンパク質のアラビノオリゴ糖鎖を加水分解する酵素としても初めてである。

当研究室では、これらの酵素のうち、HypBA1 の X 線結晶構造解析が行われ、アポ状態と

$\beta$ -L-Araf 複合体の結晶構造がそれぞれ 2.2 Å と 2.0 Å で決定された。複合体構造の活性中心では、1 つの Glu と 3 つの Cys が亜鉛イオンに配位結合しており、そのうちの 1 つの Cys は基質のアノマー炭素を求核攻撃するのに適した向きと位置にあった (図 2)。このことから、HypBA1 では、この Cys が亜鉛イオンに配位することで求核性を帯び、触媒反応に関わるのではないかと考えられた。これは、グリコシダーゼでは全く前例のない反応機構であり、活性中心を構成するアミノ酸の役割や金属の種類の特異性など、様々な側面からの検証が必要とされていた。これを受けて本研究では、この仮説を支持するために活性測定や金属定量などの生化学的実験を行った。共同研究者によって合成された pNP- $\beta$ -Araf [2]を用いて活性測定を行い、変異体解析によって活性中心を構成するアミノ酸の重要性を明らかにした。また、金属原子の吸収端の異常分散測定や金属定量によって、活性中心の金属が亜鉛に他ならないことを確認した。共同研究者による量子化学計算でも、この仮説がエネルギー的に妥当であることが示されている。

HypBA1 は GH127 及び DUF1680 ファミリーに属しており、そのホモログ遺伝子は植物や真菌、細菌などに広く分布している。求核性触媒である Cys 残基は、GH127 と DUF1680 での保存性が極めて高い。従って、HypBA1 と同様の新しい反応機構をとる酵素が植物に関係する多くの生物に利用されていると考えられる。

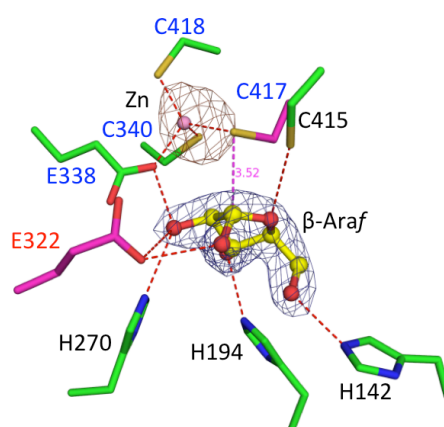


図2. HypBA1の活性中心

1. 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.* **288**, 11795-11806
2. Kaeothip, S., Ishiwata, A., Ito, T., Fushinobu, S., Fujita, K., and Ito, Y. (2013) Preparation of *p*-nitrophenyl  $\beta$ -L-arabinofuranoside as a substrate of  $\beta$ -L-arabinofuranosidase. *Carbohydrate research* **382**, 95-100