

博士論文（要旨）

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

平成 22 年度入学 伊藤 佑

指導教員 伏信 進矢

目次

目次	2
略語	4
序章 ビフィズス菌と糖質加水分解酵素	6
1. はじめに	7
2. ビフィズス菌	7
3. 糖質関連酵素データベース CAZy (Carbohydrate Active enZymes)	7
3. 1. GH ファミリーの分類	8
3. 2. GH の一般的な反応機構	8
3. 3. GH の反応機構の例外	9
3. サブサイトの定義	9
4. 図表	11
第一章 <i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM1254 由来	
GH20 ラクト- <i>N</i> -ビオシダーゼ (LNBase) の X 線結晶構造解析	15
1. 序	16
1. 1. ミルクオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharides: HMO)	16
1. 1. 1. HMO とは	16
1. 1. 2. HMO とビフィズス菌	17
1. 1. 3. ビフィズス菌の LNB/GNB に特異的な HMO 代謝経路	18
1. 1. 4. ミルクオリゴ糖の製造と利用法	18
1. 2. LNBase	19
1. 2. 1. 本研究で用いた LNBase	19
1. 2. 2. LNBase の実用化	19
1. 2. 3. LNBase の分類	20
1. 3. Cremer-Pople 法	22
1. 4. 本研究の目的と成果	23
2. 方法	24
2. 1. LNBase の発現、精製、結晶化	24
2. 1. 1. C 末端への His タグの付加	24
2. 1. 2. N 末端への His タグの付加	26
2. 1. 3. Native LNBase(N-His)の大量培養と精製	26
2. 1. 4. Native LNBase(N-His)の結晶化	28
2. 1. 5. Se-Met LNBase(N-His)の発現、精製、結晶化	29
2. 2. 短いコンストラクトの LNBase の発現、精製、結晶化	30
2. 2. 1. 短いコンストラクトの作製とそれらの活性測定	30
2. 2. 2. Native LNBase(B1)の大量培養と精製と結晶化	32
2. 2. 3. Se-Met LNBase(B1)の発現、精製、結晶化	32
2. 2. 4. LNB チアゾリンとの共結晶化	33
3. 結果	34
3. 0. はじめに	34
3. 1. LNBase の発現、精製、結晶化 ①	34
3. 1. 1. C 末端への His タグの付加	34
3. 1. 2. N 末端への His タグの付加	34
3. 1. 3. Native LNBase(N-His)の大量培養と精製 ①	35
3. 1. 4. Native LNBase(N-His)の結晶化 ①	35
3. 1. 5. Se-Met LNBase(N-His)の発現、精製、結晶化 ①	36

3. 2. 短いコンストラクトの LNBase の発現、精製、結晶化 ②	38
3. 2. 1. 短いコンストラクトの作製とそれらの活性測定	38
3. 2. 2. Native LNBase(B1)の大量培養・精製・結晶化	38
3. 2. 3. Se-Met LNBase(B1)の発現、精製、結晶化	39
3. 2. 4. LNB チアゾリンとの共結晶化	39
3. 3. X 線結晶構造解析	39
3. 3. 1. LNB 複合体	40
3. 3. 2. LNB チアゾリン複合体	41
3. 4. LNBase の構造	42
3. 4. 1. 二量体構造	42
3. 4. 2. 単量体構造	42
3. 4. 3. LNBase の活性中心	43
3. 4. 4. LNBase と GH20 β -HexNAcase の比較	43
4. 考察	45
4. 1. 変異体解析	45
4. 2. C-ドメイン	45
4. 3. LNB のコンフォメーション	49
4. 4. LNBase の生物学的意義	51
5. 図表	52

第二章

引用	97
謝辞	173

略語

2'-FL : 2'-フコシルラク トース、Fuc- α 1,2-Gal- β 1,4-Glc

β -HexNAcase : β -*N*-acetylhexosaminidase

BL : Beam Line

CAZy : 糖質関連データベースの名称、Carbohydrate Active enZymes

CBM : Carbohydrate-Binding Module、糖質結合ドメイン

CE : Carbohydrate Esterase、糖質エステラーゼ

DDW : deionized distilled water、滅菌超純水

DspB : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 由来

β -1,6-*N*-acetylglucosaminidase (dispersin B)

Fuc : フコース

Gal : ガラクトース

GalNAc : *N*-アセチルガラクトサミン

GenA : *Streptococcus gordonii* 由来 *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase

GDL : δ -lactone (2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone)

GH : Glycosyl Hydrolase、糖質加水分解酵素

Glc : グルコース

GlcNAc : *N*-アセチルグルコサミン

GLNBP : GNB/LNB ホスホリラーゼ

GNB : ガラクト-*N*-ビオース、Gal- β 1,3-GalNAc

GT : Glycosyl Transferase、糖転移酵素

HsHexA : *Homo sapiens* 由来 *N*-acetyl- β -glucosaminidase ($\alpha\beta$ ダイマー)

HsHexB : *Homo sapiens* 由来 *N*-acetyl- β -glucosaminidase ($\beta\beta$ ダイマー)

HMO : ヒトミルクオリゴ糖

IFG : GalNAc-isofagomine

Lac : ラクトース、Gal- β 1,4-Glc

LB : Luria-Bertani

LacNAc : *N*-アセチルラク トサミン、Gal- β 1,4-GlcNAc

LNB : ラクト-*N*-ビオース、Gal- β 1,3-GlcNAc

LNBbase : ラクト-*N*-ビオシダーゼ

LNDFH I : ラクト-*N*-ジフコヘキサオース I、

Fuc- α 1,2-Gal- β 1,3-(Fuc- α 1,4-)GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc

LNFP I : ラクト-*N*-フコペンタオース I、

Fuc- α 1,2-Gal- β 1,3-GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc

LNnT : ラクト-*N*-ネオテトラオース、Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc

LNT : ラクト *N*-テトラオース、Gal- β 1,3-GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc

MAD : Multiple wavelength Anomalous Dispersion

NAG : *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)

NGA : *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc)

NGT : NAG チアゾリン

PDB : Protein Data Bank

PF : Photon Factory、シンクロトロン放射光実験施設

PL : Polysaccharide Lyase、多糖リアーゼ

pNP : *p*-ニトロフェニノール

RMSD : Root Mean Square Diviation

SAD : Single wavelength Anomalous Diffraction

Se-Met : セレノメチオニン

SmChb : *Serratia marcescens* 由来 chitobiase

SpHex : *Streptomyces plicatus* 由来 *N*-acetyl- β -glucosaminidase

序章

ビフィズス菌と糖質加水分解酵素

1. はじめに

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 (glycoside hydrolase: GH) 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。

ビフィズス菌はヒトの健康を促進するプロバイオティクス腸内細菌である。本研究の対象は、ビフィズス菌から発見された難分解性オリゴ糖分解酵素である。プレバイオティクス製造などの産業的に応用できる可能性を持つ重要な酵素と言える。しかし、その可能性を広げるためには酵素の反応機構を解明することが必要である。なぜなら、酵素を産業などへ応用しようとする際には、反応機構に基づいた開発をすることが近道になり得るからである。本研究では2つの酵素の反応機構について深く踏み込んで実験し議論した。酵素の働きを理解する上でも反応機構を分子レベルで明らかにすることは大変に重要である。GH の反応機構は研究が進んでおり多くの知見が蓄積している。それらを元に、本研究では、第一章では GH の中で例外的な反応機構について記す。本研究が GH の、ひいては酵素学のより深い理解に貢献出来るものと期待する。

2. ビフィズス菌

ビフィズス菌は健康な成人や乳幼児の小腸下部から大腸の腸管に生息するグラム陽性の偏性嫌気性菌で、多形性を示す(1)。宿主に対して整腸作用や免疫調節作用などの良い影響を与えることが知られている(2,3)。ビフィズス菌は乳酸以外に酢酸やアルコールなども産生するヘテロ乳酸菌に分類され、bifid shunt と呼ばれる特殊な解糖系を持つ(4,5) (図 0-1)。

宿主が摂取した糖成分は宿主自身による消化吸収や消化管上部に生息する腸内細菌によって消費される。ビフィズス菌が生息する消化管下部には腸内細菌が容易に分解し吸収し得る糖成分はほとんど届かない。そのため、ビフィズス菌は糖を最大限有効利用するための多様な糖分解酵素を有すると考えられる。

3. 糖質関連酵素データベース CAZy (Carbohydrate Active enZymes)

糖質関連酵素のデータベースである CAZy についての概略を記す。糖質関連酵素は、IUBMB による酵素命名法に従って命名されている (例: α -アミラーゼ、 β -ガラクトシダーゼなど)。しかし、この命名法は基質特異性に基づいたものであり、酵素の反応機構や特徴を反映していない。そのため、B. Henrissat らは、糖質関連酵素 (Carbohydrate Active enzymes; CAZymes) を、アミノ酸配列の相同性に基づいて“ファミリー”に分類した (CAZy (<http://www.cazy.org/>)) (6,7)。CAZy では、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、クラス毎にさらに細かいファミリーに分類されている (表 0-1) (図 0-2)。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(8)。

- ・同様の立体構造を持つ。
- ・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る。以下には CAZy 最大のクラスである GH ファミリーについて記す。

3. 1. GH ファミリーの分類

GH は、GH1 から GH133 までのファミリーに分類されている (2013 年 12 月現在) (表 0-2) (9)。このうち、GH21, GH40, GH41, GH60, GH61, GH69 は、一度酵素が分類されたものの、他のファミリーとの関連が明らかになり、再分類されたことから、欠番となっている。さらに、ファミリー縦断的に、フォールドに基づいた Clan 分類 (GH-A から GH-N) がなされている。セルラーゼ系やアミラーゼ系の酵素群はそれぞれ GH1~GH12 と GH13~GH15 に、リゾチームは GH22~GH25 に分類されている。

3. 2. GH の一般的な反応機構

グリコシド結合を加水分解する酵素の大部分は活性中心に 2 つの酸性アミノ酸残基を持ち、それらが関与する標準的な 2 つの反応機構のいずれかに従う。反応の前後で糖のアノマー炭素のコンフォメーションが変わるか否かで分類される。アノマー反転型 (inverting) の単一置換機構とアノマー保持型 (retaining) の二重置換機構の 2 種類の反応機構に大別される。

アノマー反転型の一般的な反応機構 (図 0-3 上)

2 つの酸性アミノ酸がそれぞれ一般酸触媒、一般塩基触媒として働く。S_N2 反応が 1 回起こる。

- ①一般塩基性触媒によって脱プロトン化して活性化した水分子がアノマー炭素に求核攻撃する。
一般酸触媒が脱離基にプロトンを供与する。
- ②オキソカルベニウムイオン様の遷移状態を経て、反応産物が解離し加水分解反応が完了する。

アノマー保持型の一般的な反応機構 (図 0-3 下)

2 つの酸性アミノ酸がそれぞれ一般酸/塩基触媒、求核性触媒として働く。S_N2 反応が 2 回起こる。

- ①求核性触媒がアノマー炭素へ求核攻撃し、一般酸/塩基触媒が酸触媒として働き、脱離基にプロトンを供与する。
- ②求核性触媒と糖が共有結合を形成するアシル中間体が出来た。この時アノマー炭素は一時的に反転する。
- ③一般酸/塩基触媒が塩基触媒として働き、脱プロトン化して活性化した水分子がアシル中間体のアノマー炭素に対し求核攻撃することによって、反応産物が解離し加水分解反応が完了する。この時アノマー炭素は再び反転するので、アノマー炭素のコンフォメーションは当初の状態に

戻る。

①と②の間、②と③の間にはオキシカルベニウムイオン様の遷移状態を経る。S_N2 反応が一度起こるとアノマーが反転するが、保持型機構では S_N2 反応が 2 回起こる（二重置換）ためアノマーが保持される。①から②までが 1 段階目（グリコシル化）であり、②から③までが 2 段階目（脱グリコシル化）である。アノマー保持型機構は②における共有結合中間体が形成される点が大きな特徴である。

3. 3. GH の反応機構の例外

上で述べたように、一般的に GH の触媒残基はカルボキシル基を持つアミノ酸 2 組であるが、いくつかの例外がある(10)。アノマー保持型 GH には求核性触媒残基がカルボキシル基を持つアミノ酸ではないものが 2 つある。GH18, 20, 56, 84, 85, 103 に分類される特定のβ-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ（β-HexNAcase）と、GH33, 34, 83 のシアリダーゼである。

まず後者の GH33, 34, 83 のシアリダーゼは、求核性触媒が Tyr である。GH33, 34 では Tyr-Asp dyad、GH83 では Tyr-Glu dyad が形成されることにより、隣の Asp や Glu が Tyr の求核性を高める。

次に前者だが、特定のβ-HexNAcase は substrate-assisted（基質補助型）反応と呼ばれる反応機構をとる（図 0-4）。substrate-assisted 反応では、1 つの酸性アミノ酸が一般酸／塩基触媒として働くが、アセトアミド基を持つ基質自体が自らに求核攻撃をし、中間体としてオキサゾリオン、もしくはオキサゾリニウムイオンを生成するのが特徴である。一般酸／塩基触媒は Glu である。また、もう一つの触媒残基である Asp は基質の非還元末端糖の C-2 アセトアミド基の窒素原子と水素結合することによって、アセトアミド基を一定の方向にしたり、オキサゾリニウムイオン中間体を保持して安定化したりする。GH18 と GH20 では触媒残基の Glu と Asp は隣り合っている。反応は以下のように進む。

- ①Asp によって分極された *N*-アセチルヘキソサミンの 2-アセトアミド基の中のカルボニル基の酸素原子がアノマー炭素を求核攻撃することで安定な中間体であるオキサゾリニウムイオンが形成する。オキサゾリニウムイオン中間体は、アノマー保持型の一般的な反応機構におけるアシル中間体に相当するものである。この時、一般酸／塩基触媒の Glu が一般酸触媒として働き、プロトンを供与された脱離基が遊離する。
- ②一般酸／塩基触媒の Glu が一般塩基触媒として働くことで活性化された水がアノマー炭素を再び求核攻撃することによって、反応産物が出来る。

3. サブサイトの定義

一般的に多糖の分解酵素の活性中心には、糖鎖構造を認識する部位が複数箇所ある。糖質加水分解酵素では、このような基質認識部位をサブサイトと表現する。グリコシド結合の切断が起こ

る部位を基準（ゼロ）とし、還元末端側の糖結合部位をサブサイト+1, +2, +3, . . . 、また、非還元末端側をサブサイト-1, -2, -3, . . . と表す(11) (図 0-5)。

4. 図表

表 0-1 CAZy の分類 (2013 年 12 月現在)

触媒能による分類 (Class)	一次構造に基づく 分類 (Family)	立体構造に基づく 分類 (Clan)
糖質加水分解酵素 (Glycoside Hydrolase: GH)	GH1 ~ GH133	GH-A ~ GH-N
糖転移酵素 (Glycosyltransferase: GT)	GT1 ~ GT94	GT-A、GT-B
多糖リアーゼ (Polysaccharide Lyase: PL)	PL1 ~ PL23	
糖質エステラーゼ (Carbohydrate Esterase: CE)	CE1 ~ CE 16	
補助活性 (Auxiliary Activity: AA)	AA1 ~ AA10	
糖質結合モジュール (Carbohydrate Binding Module: CBM)	CBM1 ~ CBM67	

表 0-2 GH ファミリーの分類

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
	62	63	64	65	66	67	68		70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133							

GH21, GH40, GH41, GH60, GH61, GH69 は欠番。

cyan は結晶構造報告済みのファミリーである。

本研究では GH20, 127 に属する酵素を対象とした。

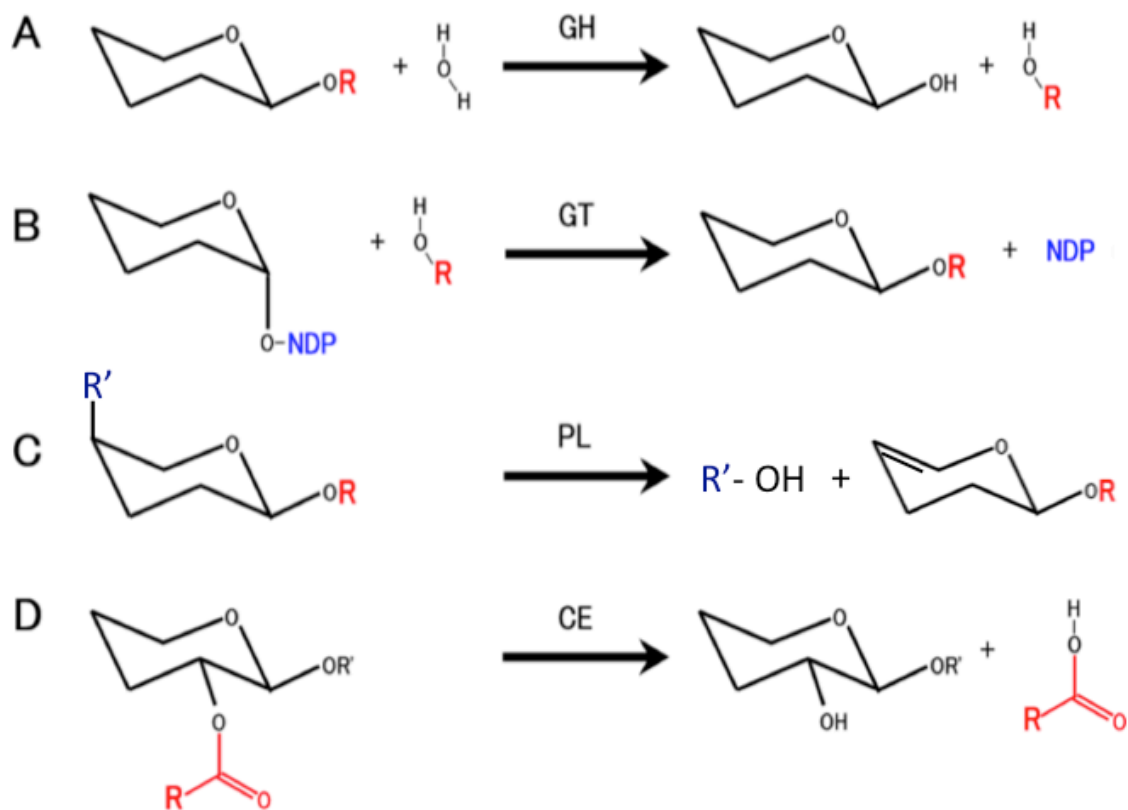


図 0-2 各クラスの糖質関連酵素の典型的な触媒反応

A：糖質加水分解酵素（GH）

糖－糖間のグリコシド結合、または糖－非糖のグリコシド結合を加水分解する。

B：糖転移酵素（GT）

糖受容体（R-OH）の糖(R)に対し、特異的な糖供与体(糖核酸)から糖が転移し、新たなグリコシド結合ができる。

C：多糖リアーゼ(PL)

一般塩基性触媒がβ水素を引き抜くβ脱離反応で糖鎖が分解されるため、反応産物の糖には二重結合ができる。

D：糖エステラーゼ(CE)

Oアセチル基、またはNアセチル基を遊離する。

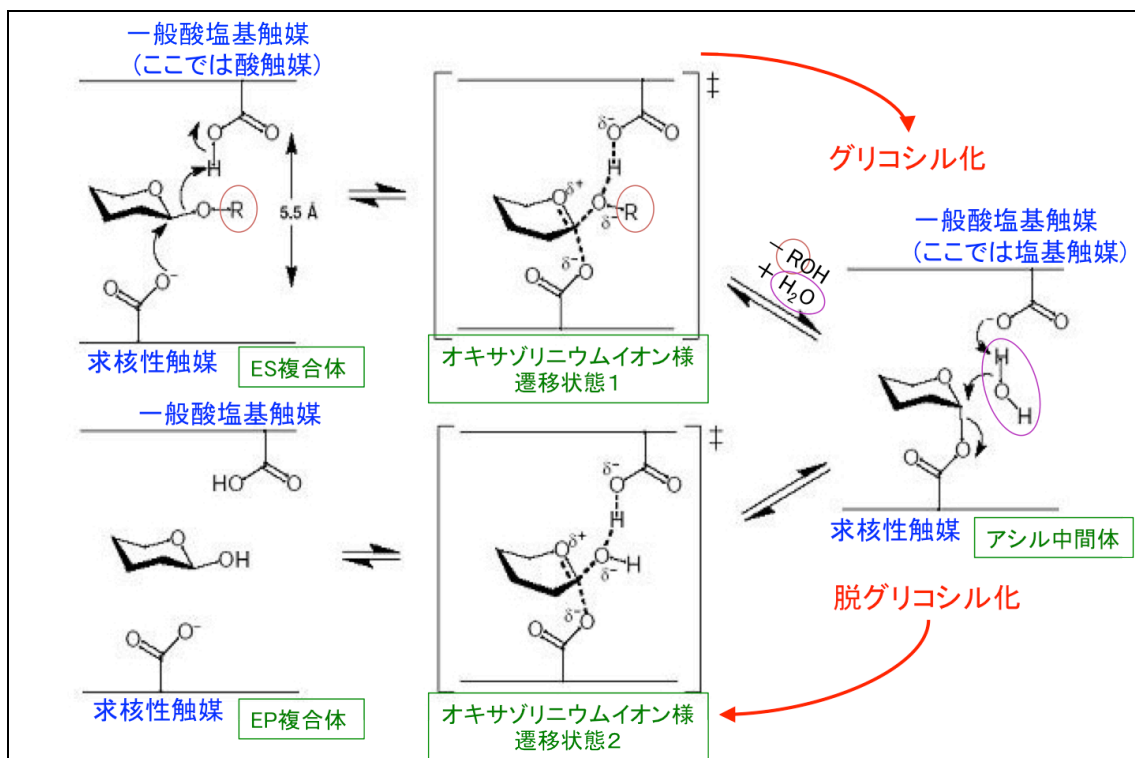
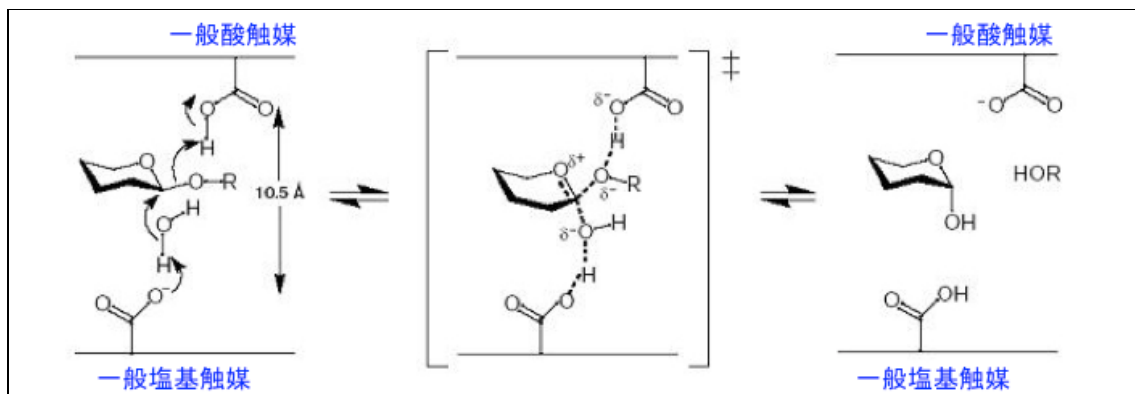


図 0-3 GH の反応機構

上：反転型機構、下：保持型機構

R: 脱離基

CAZy (http://www.cazy.org/fam/ghf_INV_RET.html) より改変して転載。

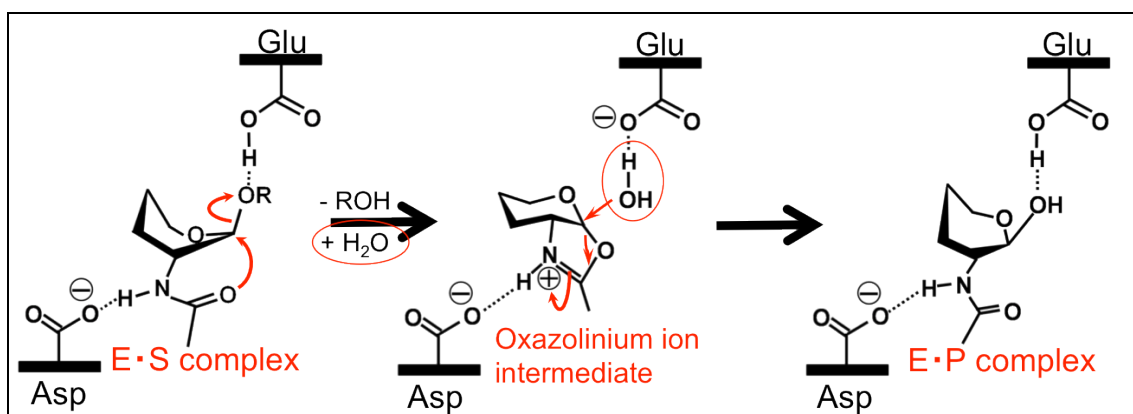


図 0-4 substrate-assisted 反応

本研究の結果、図 1-36 のように、反応機構中の糖のコンフォメーション変化が分かった。

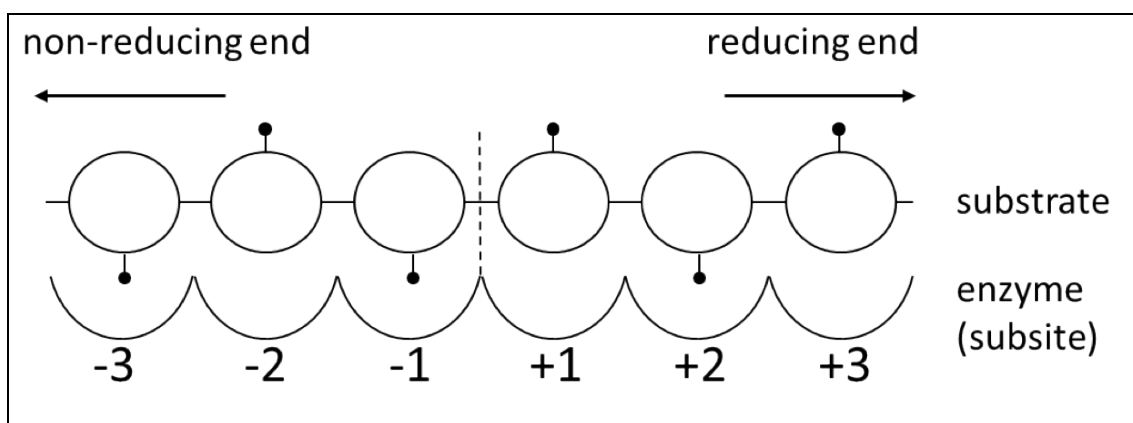


図 0-5 糖質加水分解酵素の基質結合部位（サブサイト）の定義

第一章

Bifidobacterium bifidum JCM1254 由来

GH20 ラクト-*N*-ビオシダーゼ (LNBase) の X 線結晶構造解析

1. 序

1. 1. ミルクオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharides: HMO)

1. 1. 1. HMO とは

哺乳動物は、仔に対して自ら乳（ミルク）を分泌して与える。泌乳初期に限定されて生合成・分泌される乳は、特に「初乳 (colostrum)」と呼ばれ、「常乳 (normal milk)」とは区別される。初乳は常乳と比較して成分的に大きく異なっている。初乳には、多量の様々な免疫抗体 (immoglobulin: Ig) に加えて、ラクトース (Gal-β1,4-Glc: **Lac**) 以外にも多種多様な「ミルクオリゴ糖 (milk oligosaccharide)」と呼ばれる特殊な糖質が含まれている。

ヒトの母乳（人乳）においては、全泌乳期に渡り、ミルクオリゴ糖（ヒトミルクオリゴ糖、human milk oligosaccharide: **HMO**）が 100 種類以上存在することが知られている(13)。人乳は約 7%の糖質を含むが、そのうちの 80%を **Lac**、20%を 130 種類から成る **HMO** が占めている。その量は常乳では 12~13 g/L、初乳では 22~24 g/L を占め、脂質、タンパク質に次ぐ 3 番目の固形物である。また、人乳の固体含有物の 2%を 130 種以上からなる **HMO** が占めている(14)。

HMO は還元末端に **Lac** を有する (図 1-1)。主要な **HMO** は、**Lac** を基本単位とし、**Lac** にラクト・N-ビオース (Gal-β1,3-GlcNAc: **LNB**) または N-アセチルラクトサミン (Gal-β1,4-GlcNAc: **LacNAc**) が結合した構造をとる。さらに、それらを L-フコース (**Fuc**) やシアル酸 (**Sia**) が修飾したものも存在する。**HMO** の中では以下の 4 種類が代表的であり、全ての **HMO** の 25-33%を占めている。

- 2'-Fucosyllactose (Fuc-α1,2-Gal-β1,4-Glc: **2'-FL**)
- Lacto-N-fucopentaose I
(Fuc-α1,2-Gal-β1,3-GlcNAc-β1,3-Gal-β1,4-Glc: **LNFP I**)
- Lacto-N-difucohexaose I
(Fuc-α1,2-Gal-β1,3-(Fuc-α1,4-)GlcNAc-β1,3-Gal-β1,4-Glc: **LNDFH I**)
- Lacto-N-tetraose (Gal-β1,3-GlcNAc-β1,3-Gal-β1,4-Glc: **LNT**)

これらのうち 2'-FL 以外の 3 種類は **LNB** を有している。このように **LNB** 単位の含有量が高いことが、他種のミルクオリゴ糖とは異なる **HMO** の特徴である。**LNB** (Gal-β1,3-GlcNAc-β1-) を含むオリゴ糖を **タイプ I 型糖鎖**、**LacNAc** (Gal-β1,4-GlcNAc-β1-) を含むオリゴ糖を **タイプ II 型糖鎖** という。人乳中ではタイプ I 型の **LNT** や **LNFP I** の方が、タイプ II 型よりも含有量が高い(15)。一方、種々の哺乳動物の乳中に含まれるオリゴ糖を分析した結果、一部の霊長類（チンパンジー、ボノボ、オランウータン）のミルクオリゴ糖は、タイプ I 型オリゴ糖よりも、タイプ II 型オリゴ糖の方が優先的に含まれていた(16)。また、ゴリラ、フクロテナガザルや霊長類以外の哺乳動物では、**LNB** を含むオリゴ糖は見つからなかった(16)。タイプ I 型とタイプ II 型の共存、並びにタイプ I 型の優先性は、他種のミルクオリゴ糖とは異なる、**HMO** の際立った特徴である。

帯広畜産大の浦島らは、この結果を以下のように考察している。すなわち、進化の過程で、ヒトの乳児は、他の哺乳動物の乳児よりも未熟で、病原菌に感染するリスクが高くなったが、LNBを含むタイプI型オリゴ糖を好むビフィズス菌と共生することで、乳児の生存に有利に働いたと考えられる。

1. 1. 2. HMO とビフィズス菌

グラム陽性嫌気性細菌であるビフィズス菌は、ヒトの腸内で細菌叢を形成し、健康を促進する様々な効果を示す。このような人体内で良い影響を与える生きた微生物、または、それらを含む食品をプロバイオティクスという。一方、プロバイオティクス腸内細菌を増殖させる効果をもつ難消化性食物繊維及びオリゴ糖などの物質を、プレバイオティクスという。

ビフィズス菌は、特に乳児の健康にとって重要である。腸内にビフィズスフローラとして定着し、下痢などの病気を引き起こす病原性細菌の感染を防ぐ。20世紀初頭まで、母乳栄養乳児の方が人工乳（粉ミルク）栄養乳児よりも感染症にかかりにくかった。母乳栄養乳児では出生後1週間以内にビフィズス菌優勢の腸内細菌叢が形成され、ビフィズス菌叢は腸内細菌叢の95～99.9%に達することが知られている。一方、人工乳で育てられた乳児の腸内におけるビフィズス菌占有率は、母乳栄養乳児に及ばない。人工乳は、オリゴ糖としてLacしか含まない牛乳を原料としている。これらのことから、HMOがビフィズス菌を増殖させ、感染を防御していると考えられてきた。そのため、HMOはビフィズス菌の生育因子、すなわちビフィズス因子であるとされていた。現在の人工乳には、ラクチュロースなどのビフィズス因子が添加されているため、人工乳栄養乳児の健康状態は以前よりも良好である。しかし、それでも、乳児の腸内フローラの組成はビフィズス菌90%、エンテロバクテリア10%にしかない(17)。

ところで、乳児の腸内で優勢なビフィズス菌の多くは、HMOの構成成分の1つであるLNBによる生育が可能である(18)。*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*の4つの菌株、また、*B. pseudocatenulatum*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. pseudolongum*の3菌株の一部は、HMO代謝経路に重要なGNB/LNBホスホリラーゼ (GLNBP) (後述)の存在とLNBによる生育が可能であることが確認されている。ただし、*B. pseudocatenulatum*はGLNBPの存在は確認出来なかった。一方、大人の腸内で優勢な、*B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. thermophilum*の6つの菌株ではLNBで生育出来ないことが分かっている。

また、LNBを遊離するラクト-N-ビオシダーゼ (LNBase) 活性を持っているビフィズス菌の種類は多くなく、*B. bifidum*と*B. longum*の一部で確認されているのみである(表1-1)(19)。

ところで、*B. bifidum* JCM1254株、*B. longum* subsp. *infantis*、*B. breve*の3種はそれぞれ異なる方法でHMOを利用していると考えられている(図1-2)。まず、*B. bifidum* JCM1254株は、いくつかの膜結合型の菌体外酵素を持っていることが分かっている(5)。これらの菌体外酵素によってHMOからLNBが遊離し、菌体内に取り込まれると考えられる。一方、*B. longum* subsp. *infantis*は3糖以上のオリゴ糖を丸ごと菌体内に取り込み、菌体内に多数あるグリコシ

ダーゼによって HMO を分解することが知られている(20)。また、*B. breve* は他の腸内細菌が分解したオリゴ糖 (LNB など) や単糖を取り込んでいると考えられている。

1. 1. 3. ビフィズス菌の LNB/GNB に特異的な HMO 代謝経路

HMO は非常に種類が多いため、長い間、HMO のどの部分が真のビフィズス因子として機能しているか不明であった。しかし、2005 年、食品総合研究所の北岡博士らは、LNB 及びガラクト *N* ビオース (Gal-β1,3-GalNAc, **GNB**) に特異的な新規の HMO 代謝経路をビフィズス菌から発見し(17)、GNB/LNB 経路と命名した(21)。北岡らは *B. longum* NCC2705 ゲノム上の遺伝子クラスター (BL1638-BL1644) (22)が、HMO の主要な構成成分である LNB/GNB を取り込み栄養源とする代謝関連遺伝子群であることを明らかにした (図 1-3 下)。特に BL1641 は、そのホモログである *B. longum* JCM1217 の *lnpA* の解析により、HMO 代謝経路の鍵となる新規なホスホリラーゼがコードされていることが明らかになった。すなわち、LNB と GNB を特異的に加リン酸分解する GNB/LNB ホスホリラーゼであり、GLNBP と名付けられた(17,26)。GLNBP は次の反応を触媒する。



一方、2008 年、ビフィズス菌の様々な糖質加水分解酵素について研究を行っていた京都大学の山本らは、*B. bifidum* JCM1254 株から LNBBase の遺伝子をクローニングした(19)。この LNBBase は、LNT を LNB と Lac に分解する活性を有する酵素として見出されたものである (表 1-2)。

以上の経緯によって、膜結合型菌体外酵素を利用するビフィズス菌の HMO 分解経路が明らかになった (図 1-3) (5,11)。LNBBase は、膜結合型菌体外酵素として分泌され、HMO の主要な構成物の 1 つである LNT から LNB を遊離する。一方、LNBBase と同じ分泌酵素である endo-α-GalNAc-ase は、腸内粘膜の糖タンパク質に豊富に含まれるムチンから、O 結合型糖鎖である GNB を切り出す(23,24)。GNB は HMO には存在しないが、LNB と構造的に良く似ている。LNB と GNB は、これらに特異的なトランスポーターにより菌体内に取り込まれ(25)、菌体内で GLNBP によって加リン酸分解されて代謝される(26)。このことから、HMO の構成単位の 1 つである LNB が、ビフィズス菌の重要な生育因子の 1 つだと考えられている。これらの酵素 (タンパク質) はビフィズス菌の HMO 代謝経路の鍵となる酵素であり、構造解析を含め、詳しく研究されている(5)。LNBBase は、この HMO 分解・代謝経路の中にある重要な酵素の 1 つである。

1. 1. 4. ミルクオリゴ糖の製造と利用法

1.1.3 節に記したように、LNB がビフィズス菌の重要な生育因子 (ビフィズス因子) の 1 つであることが明らかにされた。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新たなプレバイオティクス、新しい機能性食品素材としても期待されている。実際に、北岡らによって LNB をキログラム単位で大量生産する実用法が開発されている(28)。一方で、食品

添加物として実用化するには、実際の HMO に出来る限り近いものである方が、より良い効果が期待出来る。しかし、HMO の製造法は現在までほとんどない。LNT と LNnT については、酵素法による合成法が開発されたが、効率が悪く実用的ではない(27)。従って、HMO を食品用途に使用可能なコストで製造できれば、新しい機能性食品素材として有望である。

本研究課題である LNBase の構造解析は、HMO 合成酵素作製を目指す分子デザインのための構造基盤情報を与える点で重要である。さらには、ビフィズス菌の LNB/GNB 経路のより深い理解に繋がるものである。

本研究によって得られる成果からは、新生児に対して理想的なビフィズス菌増殖因子として働いている HMO を、粉ミルク添加剤として人工乳栄養乳児の健康に貢献する食品素材に利用することが期待される。また、昨今種々のオリゴ糖の生理機能が明らかにされており、糖鎖工学の研究領域が注目を集めている。HMO の構成成分には、細胞認識に重要な役割を果たしている糖脂質糖鎖と同じ構造のものもある。そのため、HMO に関連するオリゴ糖が安価に供給されることは、今後の糖鎖工学研究の発展に重要であり、さらには、種々の糖鎖医薬品開発にも繋がると期待される。

1. 2. LNBase

1. 2. 1. 本研究で用いた LNBase

LNBase (EC 3.2.1.140) は、オリゴ糖の非還元末端から LNB を遊離するエンド型のグリコシダーゼである。*B. bifidum* JCM1254 由来の LNBase は全長 1112 アミノ酸からなる(図 1-4)。その産物は分子量約 120 kDa のタンパク質であり、N 末端(残基番号 1-34)にシグナルペプチド、C 末端に膜貫通領域(残基番号 1082-1108)を持つ膜結合型の菌体外酵素である。アミノ酸配列の相同性解析の結果、3 つの異なるドメインから構成されており、N 末端から順に、糖質加水分解酵素ファミリー 20 の触媒ドメイン(残基番号 179-496)、CBM32 ドメイン(残基番号 784-932)、Bacterial Ig like 2 ドメイン(残基番号 960-1041)が存在すると予想された。本研究では、この LNBase の残基番号 41-663 の部分に当たるフラグメントの構造解析を行った。

本酵素の機能解析は既に行われている(29)。LNBase は、LNB- β -pNP と LNT に対してのみ高い活性を示す(表 1-2)。LNT のようなフコシル化などの修飾を受けていないオリゴ糖の LNB 部分に対して特異的に作用すると考えられる。LNB- α -pNP や、フコシル化された HMO、TypeII 型 HMO には全く活性を示さない。また、GNB- β -pNP に対してもほとんど活性を示さない。LNBase の反応機構はアノマー保持型である。また、微弱だが、アルコールに対する糖転移活性と逆反応である縮合反応活性を示す。

1. 2. 2. LNBase の実用化

LNBase は *Streptomyces* sp. 142 から初めて単離され、これは全長 639 アミノ酸からなる(30,31)。タイプ I 型糖鎖に特異的に作用して糖鎖の非還元末端から LNB を遊離するが、タイプ

II 型糖鎖には全く作用しないため、糖タンパク質や糖脂質糖鎖の I 型、II 型構造の判別利用できる。

糖脂質や糖タンパク質の糖鎖は癌や細胞分化で変化する。正常なときはタイプ I 型糖鎖とタイプ II 型糖鎖が同程度存在するが、癌のときはタイプ II 型糖鎖が増える(32)。これを多くの腫瘍マーカーが利用している。そのため、タイプ I 型糖鎖にのみ活性を示す LNBase は有用である。この *Streptomyces* sp. 142 由来の LNBase はタカラバイオ (株) から販売されている。

ただし、この *Streptomyces* 由来の LNBase と、本実験で用いた *B. bifidum* JCM1254 株から単離された LNBase の触媒ドメインとの相同性は 22.3%である。他にも、*Aureobacterium* sp. L-101 や *Lactococcus lactis* などからも LNBase が単離されているが、それらの遺伝子はクローニングされていない。なお、遺伝子のみ公表されている *B. bifidum* NCIMB 41171 由来の putative β -N-acetylglucosaminidase とは 99.0%の相同性がある。

1. 2. 3. LNBase の分類

LNBase は GH20 に分類されている。GH20 には、LNBase と β -N-acetylhexosaminidase (β -HexNAcase) 分類されている (図 1-5)。LNBase は二糖 (LNB) を切り出すが、 β -HexNAcase は単糖 (GlcNAc と GalNAc のどちらか一方、あるいは両方) しか切り出さない (図 1-6)。序章の 2 節(3)項にも記したが、GH20 の酵素は substrate-assisted 反応と呼ばれるアノマー保持型の反応機構をとる (図 1-4)。この反応機構を持つ酵素の強い阻害剤の一つとして GlcNAc チアゾリンがよく用いられる。GlcNAc チアゾリンは、反応中間体であるオキサゾリンのアナログである。GlcNAc チアゾリンに Gal が β 1,3 結合した LNB チアゾリンは、LNBase を強く阻害する(33) (図 1-7)。LNBase の立体構造は決定されていなかったが、 β -HexNAcase の立体構造は多数明らかになっている (図 1-8)。それらの構造は、(β/α)₈フォールドの触媒ドメインからなる。また、N 末端には類似した α/β トポロジーのドメインを持つものが多い。GH20 は GH18 とともに clan GH-K に分類される。以下に立体構造が決定している GH20 β -HexNAcase の代表例を示す。

1. *Serratia marcescens* 由来の chitobiase (SmChb)

SmChb はキチン溶解菌である *S. marcescens* から chitobiose の GlcNAc の β -1,4 結合を加水分解する酵素として単離され、GH20 では初めて結晶構造が明らかになった。モノマーで 4 つのドメインからなり、このうちドメイン II と触媒ドメインであるドメイン III は GH20 酵素に共通のものである(34)。また、SmChb の変異体の構造から、GH20 の反応機構における触媒残基の Asp と Glu の役割が明らかにされた(35)。

2. *Streptomyces plicatus* 由来の N-acetyl- β -glucosaminidase (SpHex)

複合糖質やオリゴ糖、多糖などの非還元末端から GlcNAc/GalNAc β -1,4 結合を遊離する。モノ

マーで N ドメインと GH20 ドメインからなる。GH20 の反応機構における基質のコンフォメーション変化の研究にしばしば用いられてきた。基質の GlcNAc や NAG チアズリン、GalNAc-イソファゴミンなどの阻害剤やアナログとの複合体構造が数多く明らかにされた(36-38)。

3. *Homo sapiens* 由来の N-acetyl- β -glucosaminidase (α -chain, β -chain) (α -chain と β -chain のヘテロダイマーを **HsHexA**、 β -chain のホモダイマーを **HsHexB** と記す。)

HexA、HexB はスフィンゴ糖脂質 (GM₂ ガングリオシド) から GalNAc β -1,4 結合を加水分解するヒト由来の β -HexNAcase としてリソソームから単離された。スフィンゴ糖脂質とは糖脂質ラフトや、シグナル伝達因子 (アポトーシスなど) としての役割をする。

HexA、HexB はダイマーとして存在し、そのモノマー単位である α サブユニットと β サブユニット (相同性 60%) が β -HexNAcase としてそれぞれ別々に GH20 に登録されている。 α サブユニットと β サブユニットのヘテロダイマーを HsHexA、 β サブユニットのホモダイマーを HsHexB と記す。共に N-domain と GH20 ドメインの 2 つのドメインからなる。HexA は活性型であり、GM₂ activator protein (GM2A) が結合する。 α サブユニットの GH20 ドメインにある 4 アミノ酸からなるループが GM2A と相互作用する。GM2A は細胞膜からスフィンゴ糖脂質を運ぶ役割をする。HexS と呼ばれる α サブユニットのホモダイマーも存在するが、これは不活性型である。一方、HexB は β サブユニットのホモダイマーで半活性型である。GM2A との相互作用も出来ない。

GM₂ ガングリオシドは脳や神経組織に存在するが、HexA、HexB に欠損があると分解されずに蓄積し、有害量に達すると致命的な遺伝性神経疾患を引き起こす。 α サブユニットに欠陥があるとテイ-サックス病になり、 β サブユニットに欠陥があるとサンドホッフ病になることが分かっている(39-41)。

4. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 由来の

β -1,6-N-acetylglucosaminidase (dispersin B) (**DspB**)

DspB は、バイオフィームを作る歯周病原性細菌 *A. actinomycetemcomitans* 由来の GlcNAc の β -1,6 結合を切断する β -HexNAcase である(42)。バイオフィームを構成する成分には GlcNAc のポリマーが多く含まれる。DspB は、バイオフィームの凝集を防いだり、バイオフィームを脱離して広げたりする役割を持つと考えられる。モノマーであり GH20 ドメインのみからなる。他の GH20 β -HexNAcase と異なり、 β -1,6 結合を切断するため、活性中心では、他の GH20 β -HexNAcase とは異なる方向が広がっている。

5. *Streptococcus gordonii* 由来の N-acetyl- β -D-glucosaminidase (**GcnA**)

S. gordonii は、虫歯や歯垢を形成する細菌であり、心内膜炎の病原菌の 1 種である。虫歯や歯周病、抜歯などで菌が体内に侵入し、血流に乗って心臓に感染すると、心臓の内膜、特に弁膜で繁殖し炎症 (=心内膜炎) を起こす。感染巣を生じた部分での弁膜の破壊や敗血症が起き、最

終的には心不全となる。感染巣はフィブリンや血小板などで‘かさぶた’のようになっており、その‘かさぶた’の中で *S. gordonii* は GcnA を分泌して細胞の糖タンパクを遊離し栄養としている。

ホモダイマーでリガンドフリーと GlcNAc チアゾリン複合体の構造が明らかになっている(43)。全体構造は N 末端から domain I, domain II(GH20 domain), domain III(dimer interface) の 3 つのドメインからなる。domain I、domain II は LNBase の N-domain と GH20 domain と重なったが、C-domain と domain III は全く異なっていた。 β -1,4 結合を切断する。

6. *Paenibacillus* sp. TS12 由来の β -hexosaminidase (**PsHex**)

細菌としては初めてスフィンゴ糖脂質を分解する β -HexNAcase が 2 種類(相同性 70%) 単離された。その片方の β -HexNAcase の C 末端を削った不活性型の PsHex の構造が明らかになっている[Sumida, 2009 #25]。C 末端を削っているため、N ドメインと GH20 ドメインの 2 つからなる。構造的にはヒトの β -HexNAcase の α サブユニット(HsHexA)と非常に類似していた。ただし、ヒトの β -HexNAcase は分枝したスフィンゴ糖脂質に作用するが、この β -HexNAcase は直鎖状のものに幅広く作用する。これは、PsHex の活性中心付近に HsHexA にはないループがあり、大きな基質の侵入を妨げていることが原因である。

構造が明らかになっている PsHex は C 末端を削ったものであるが、界面活性剤存在下では活性を回復する。このことから、C 末端は基質との結合に関わっていると考えられる(4.1 節にて考察)。

1. 3. Cremer-Pople 法

多くの糖は、溶液中での安定な形として、椅子型コンフォメーションを取るが、糖質加水分解酵素の中での反応においては、椅子型以外の様々なコンフォメーションを取り得る(図 1-9)。IUPAC 命名法では IUPAC の命名法では、通常の椅子型コンフォメーションは、4 位が上にあり 1 位が下がった、チェアという意味で、 4C_1 と呼ぶ。その他、ボート、スキューボート、ハーフチェア、エンベロープの合計 38 種類のコンフォメーションが定義されている。

これらのコンフォメーションを定量的に表すために、Cremer と Pople は、これらをパラメータ化した。Cremer-Pople 法は、6 員環構成原子の 3 次元ユークリッド空間座標をフーリエ変換し極座標系に射影することによって、糖ピラノース環状配座を定量的に表現する手法である(45)。一般的に、3 次元ユークリッド空間における極座標である球座標 (**Cremer-Pople parameter; 動径 Q 、偏角 θ 、 ϕ**) と、疑似回転図(北極から球座標を投影)が用いられる(46)。 θ , ϕ , Q からなる極座標系によって表される Cremer-Pople parameter によって、38 個全てのコンフォメーションを球面上に配置することが出来る。38 種類の内訳は、2 個のチェア ($\theta = 0^\circ$ or 180°)、6 個のボート ($\theta = 90^\circ$)、6 個のスキューボート(skew-boat; $\theta = 90^\circ$)、12 個のハーフチェア(half-chair; $\theta = 50.8^\circ$)、12 個のエンベロープ(envelope; $\theta = 54.7^\circ$)である。

1. 4. 本研究の目的と成果

LNBBase はその糖転移反応を上昇させるような変異を導入することによって、プレバイオティクスである HMO の合成に用いることが出来る可能性がある。本研究では、そのような変異体を作製する上での構造基盤情報を与えるため、LNBBase の X 線結晶構造解析を行った。

本研究では、LNBBase と LNB、LNB チアゾリンとの共結晶の構造を明らかにした。二糖を切り出す酵素としては GH20 で初めてである。さらに、今回明らかになった結晶構造中の LNB、LNB チアゾリンのコンフォメーションを基に、GH20 の反応機構における基質のコンフォメーション変化を、Cremer-Pople 法を用いて議論した。最後に、ビフィズス菌の HMO 代謝における LNBBase の重要性を考察した。

2. 方法

2. 1. LNBase の発現、精製、結晶化

試薬

本研究に用いた試薬は、特に記さない限り、和光純薬工業株式会社、SIGMA の特級試薬を用いた。

培地

大腸菌の培養にはオートクレーブ滅菌した LB 培地を用いた。小スケール培養は試験管に 5.5 mL の LB 液体培地を入れて 25°C で行った。大量培養は 5 L 容三角フラスコに 1.5 L の LB 液体培地を入れて 25°C で行った。pET28b-LNBase に対しては終濃度 50 µg/ml のカナマイシンを添加した。タンパク質誘導時には終濃度 1.0 mM の IPTG を添加した。また、用いた LB 平板培地に含まれる抗生物質の終濃度も上記と同様である。

2. 1. 1. C 末端への His タグの付加

- ① pET23a-LNBase と pET28b を LaboPass™ Mini (COSMO) を用いてミニプレップした。
- ② ①で得られた pET23a-LNBase をテンプレートにして、KOD-plus DNA Polymerase (TOYOBO) を用いた PCR を行った。用いたプライマーは、N 末端の制限酵素サイトを *Nco* I にするプライマー (**ΔNdeI *Nco*I up primer**) と、C 末端の終止コドンにサブレッサー変異を入れたプライマー (**ΔStop EcoRI low primer**) で、以下の通りである。また、PCR の条件は以下の通りである。

ΔNdeI <i>Nco</i> I up primer	CATG CCATGG ATAGTGCAGCCGGGTA
ΔStop EcoRI low primer	GGAATTCT CCG TCGCTGACCAGGTCAG

PCR mix for KOD-plus DNA Polymerase	(µL)
Double Distilled water	34.5
KOD Plus Buffer	5.0
2 mM dNTPs	5.0
25 mM MgSO ₄	2.0
10 µM upper primer	0.75
10 µM lower primer	0.75
Template DNA	1.0
KOD plus (DNA pol)	1.0

PCR cycle		30 cycles
98°C	2 min	
98°C	30 sec	
65°C	30 sec	
68°C	1 min	
68°C	7 min	
4°C	∞	

- ③ ①で得られた pET28b と②で得られた生成物に対して、制限酵素 *Nco* I と *Eco* RI を加え 37°C でインキュベートした。これによって前者からはベクターが、後者からはインサートが作製された。制限酵素を混ぜた割合は下表の通りであり、これ以降の実験における制限酵素処理も同様にした。

Restriction reaction mix	
10 × Reaction Buffer	1.0
Sample	6.0
Restriction enzyme #1	0.50
Restriction enzyme #2	0.50
Double Distilled water	5.0

- ④ ③での生成物をそれぞれ PCR Purification kit (QIAGEN) で精製し、エタノール沈殿を行った。
- ⑤ ④での生成物を混合し、Ligation high (TOYOBO) を添加して室温で 1 時間静置することによって、ライゲーションを行った。
- ⑥ 大腸菌 XL10-Gold に形質転換し、カナマイシン入り LB 平板培地に塗布した。
- ⑦ □で得られたコロニーに対して、以下の条件でコロニーPCRを行った。

Colony PCR mix (Hybrid polymerase)	(μL)
Double Distilled water	82
10 × Buffer	10
10 mM dNTPs	1.0
50 mM MgSO ₄	3.0
10 μM upper primer	1.5
10 μM lower primer	1.5
Hybrid polymerase	1.0
Template Colony	

Colony PCR cycle		} 30 cycles
96°C	2 min	
96 °C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

- ⑧ ⑦で得られたコロニーを培養し、プラスミド (pET28b-LNBase (C-His)) をミニプレップした後、大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus に形質転換した。
- ⑧で得られた菌体の小スケール培養を行い、その発現タンパクに対して、HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) を用いたバッチ法によってヒスチジインタグが付加されているかどうかを確認した。

2. 1. 2. N 末端への His タグの付加

- ① pET23a-LNBase と pET28b をミニプレップし、それぞれに 2 種類の制限酵素 *Nde* I と *Eco* RI を同時に加え 37°C でインキュベートした。前者からインサート、後者からベクターが作製された。
- ② それぞれ LaboPass™ PCR (COSMO) で精製し、エタノール沈殿を行った。
- ③ インサート 3.8 μL とベクター 1.2 μL を混合し(モル比は、インサート: ベクター = 4:1)、Ligation high (TOYOBO) 5 μL (インサート+ベクターと等量) を添加して室温で 1 時間静置することによって、ライゲーションした。
- ④ 大腸菌 XL10-Gold に形質転換し、カナマイシン入り LB 平板培地に塗布した。
- ⑤ 得られたコロニーを培養し、プラスミド (pET28b-LNBase (N-His)) をミニプレップした後、大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus に形質転換した。
- ⑥ ⑤で得られた菌体の小スケール培養を行い、その発現タンパクに対して、HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) を用いたバッチ法によってヒスチジインタグが付加されているかどうかを確認した。

2. 1. 3. Native LNBase(N-His)の大量培養と精製

大量培養

- ① pET28b-LNBase (N-His) を形質転換した大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus 株のグリセロールストックより 5.5 ml LB 培地に植菌、37°C で振盪培養した。(前培養)
- ② ①5.5 mL を 1.5 L LB 培地に植菌し、25°C で約 12 時間振盪培養した。(本培養)
- ③ 終濃度 1.0 mM の IPTG を添加し、再び 25°C で約 18 時間振盪培養した。
- ④ 培養液を回収し、5000 rpm、25 分間の遠心によって集菌した。
- ⑤ 大量培養して集菌した組換え大腸菌体 (培養液 3 L) を 150 mL の 50 mM HEPES-NaOH (pH7.5) に懸濁した。
- ⑥ 超音波破碎機 SONIFIER 250D (BRANSON)を用いて菌体を破碎した。
PULSE 1 s、DUTY 50%、OUTPUT CONTROL 6 の出力レベルで、30 分間行った。
- ⑦ ①を 12000 rpm、45 分間遠心し、上清の可溶性画分を 0.45 μm のフィルターを用いて濾過した。これを粗酵素液 (クルード) とした。

精製

・Ni-IMAC (immobilized-metal affinity chromatography)

この精製の制御にはペリスタポンプを用いた。

- ① Ni-NTA SuperFlow (QUIAGEN)のレジン 5 mL を C-16/20 カラム(Amersham)に充填し、50 mM HEPES-NaOH (pH7.5) で平衡化した。

- ② 粗酵素液を①にアプライし、300 mM NaCl、30 mM イミダゾール入りの 50mM HEPES-NaOH (pH7.5) で非吸着画分を溶出した。
- ③ 300 mM NaCl、300 mM イミダゾール入りの 50mM HEPES-NaOH (pH7.5) で吸着画分を溶出した。
- ④ LNBase 画分を 50mM HEPES-NaOH (pH7.5) に透析。その後、0.45 μ m のフィルターを用いて濾過した。

以降の精製の制御には ÄKTA purifier (GE Healthcare) を用いた。

・陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

- ① 50mM HEPES-NaOH (pH7.5) で平衡化した Mono Q 10/100 GL (GE Healthcare) (1CV = 8 mL) に、上記の LNBase 画分をアプライした。
- ② 50mM HEPES-NaOH (pH7.5) から、1M NaCl 入りの 50 mM HEPES-NaOH (pH7.5) へ塩濃度の 5 CV のリニアグラディエント法で溶出した。この際、ÄKTA の機能により、自動で 0.6 ml ずつ分画した。プレッシャーアラームは 4.2 MPa、流速 2.0 mL/min に設定した。
- ③ LNBase 画分を回収し、VIVASPIN (sartorius) を用いて濃縮し、同時に 250 mM NaCl 入りの 50 mM HEPES-NaOH (pH7.5) に置換した。その後、0.45 μ m のフィルターを用いて濾過した。

・ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

- ① 250 mM NaCl 入りの 50 mM HEPES-NaOH (pH7.5) で平衡化した HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) (1 CV = 120 mL) に、上記の LNBase 画分をアプライした。
- ② 250 mM NaCl 入り 50 mM HEPES-NaOH (pH7.5) を 1.25 CV 流して溶出した。この際、ÄKTA の機能により、自動で 3 ml ずつ分画した。プレッシャーアラームは 0.5 MPa、流速 0.7 mL/min に設定した。
- ③ LNBase 画分を回収し、Amicon Ultra (Millipore) を用いて濃縮し、同時に 5 mM HEPES-NaOH (pH7.5) に置換した。

また、標準タンパク質 (sigma MWGF1000kit) をアプライし、分子量の測定も行った。標準タンパク質として、Thyroglobulin (669 kDa)、Apoferitin (443 kDa)、 β -Amylase (200 kDa)、BSA (66 kDa)、Carbonic Anhydrase (29 kDa) を用いた。溶出体積と分子量の関係を用いて、検量線を作成した。それを基に LNBase の溶液中での分子量を推測した。

各精製段階のサンプルを少量保存しておき、SDS-PAGE や活性測定、タンパク定量を以下の

ように行い、精製表を作成した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は、Laemmli の方法(47)に従った。ゲル濃度は 10%とし、電気泳動後のタンパク質の検出には Quick CBB により染色を行った。分子量マーカーは Protein mixture (GE Healthcare)または Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD) を用いた。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BCA 法により算出した。BCA working reagent (PIERCE) とサンプルを混合し、60°C で 30 分間 incubate した後、562 nm の吸光を測定した。標準タンパク質として BSA を用い、0 mg/ml、0.050 mg/ml、0.15 mg/ml、0.20 mg/ml、0.25 mg/ml、0.30 mg/ml の濃度で検量線を作成した。

活性測定

活性測定用の可溶性基質として、合成基質である pNP-β-LNB を用いた。LNBBase により、*p*-ニトロフェノールが遊離し、400 nm の吸光を呈する。本研究では、pNP 濃度 0 mM、0.010 mM、0.050 mM、0.10 mM、0.15 mM、0.20 mM、0.30 mM で検量線を作成した（図 1-1）上で、以下の方法で測定した。なお、これ以降の実験でも同様にした。

- ①0.2 mM pNP-β-LNB 100 μL、50mM HEPES-NaOH (pH7.5) 90 μL の混合液を 32°C でブレインキュベートした。
- ②①をセルに入れ、0.1 mg/ml の酵素液 10 μL を添加し、ピペットでよく攪拌した。
- ③温度が 32°C に保たれている分光光度計を用いて、波長 400 nm における吸光度の変化を 15 秒間隔で 7 分間測定し、その傾きから初速度を求め、比活性を計算した。

2. 1. 4. Native LNBBase(N-His)の結晶化

サンプルの調製

Pre-Crystallization Test Kit (Hampton Research) (PCT)を用いて結晶化に最適なタンパク質濃度を求めたところ、約 35 mg/mL となった。Amicon Ultra (Millipore)を用いて濃縮した。

結晶化条件のスクリーニング

結晶化用ロボット HYDRA II (MATRIX)を用いて結晶化スクリーニングを行った。インテリプレート (Art Robbins)を使用したシッティングドロップ法で、タンパク溶液とリザーバー溶液を 0.3 μL ずつ混ぜ、1 つのドロップを作った。ロボットによる結晶化後、クリアテープでシールをして密封した。20°C のインキュベーター内に静置し、毎日、結晶の有無や成長を観察した。以下の結晶化スクリーニングキットを用いた。

- Crystal Screen I & II
- Wizard I & II & III
- Structure Screen I & II
- Cryo kit / Basic kit

- Extension kit
- Precipitant Synergy I & II
- Nextal jCSG +suite
- JBScreen Basic I~IV
- JBScreen Classic 1~9

2. 1. 5. Se-Met LNBase(N-His)の発現, 精製, 結晶化

発現ベクター及び菌株

発現ベクターは **pET28b-LNBase (N-His)**、発現菌株はメチオニン要求株の大腸菌 **B834** を用いた。

大量培養、精製、結晶化

- ① メチオニン要求株の大腸菌 B834 に **pET28b-LNBase (N-His)** を形質転換した後、グリセロールストックより 5.5 mL LB 培地に植菌、37°C で振盪培養した。(前培養)
- ② 以下に挙げたものを混合して LeMaster 培地を作った。
 - Wako Core 培地を DDW 900 mL に溶解してオートクレーブしたもの
 - グルコースを DDW 100 mL に溶解してオートクレーブ滅菌したもの
 - L-Se-Met 25 mg, MgSO₄·7H₂O 250 mg, FeSO₄·7H₂O 4.2 mg を DDW 15 mL に溶解し MILLEX - GP 0.22 mm Filter Unit で滅菌したもの
 - ビタミン液 (SIGMA KAO and MICHAYLUK VITAMIN SOLUTION) 10 mL
 - 終濃度 50 µg/mL のカナマイシン
- ③ ①の前培養液から集菌した後、Core 培地に懸濁し遠心・集菌した。これを 3 回繰り返して LB 培地を取り除いた。
- ④ ③で得られた菌体を再度 Core 培地に懸濁して、②の LeMaster 培地に植菌し、25°C で振盪培養した。(本培養)
- ⑤ 以降は NativeLNBase に対して行ったのと同様の方法で精製し、結晶化した。

X 線回折強度データの収集

回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK-PF)の実験ステーション BL6A と NW12A で行った。結晶を、抗凍結剤 (クライオプロテクタント) である 20%グリセロールを含むリザーバー液に浸透させた後、クライオループ (Hampton Research) を用いてすくい取り、100 K のクライオストリーム中において瞬間的に凍結して測定した。NativeLNBase は波長 1.0000 Å、Se-Met LNBase は 0.97920 Å、0.97939 Å、0.96416 Å で回折データを収集した。

回折強度データの処理

得られたデータは、プログラムパッケージ HKL2000(48)を用いて処理した。処理に用いたスクリプトは、HKL2000 のマニュアルに従った。

2. 2. 短いコンストラクトの LNBase の発現、精製、結晶化

2. 2. 1. 短いコンストラクトの作製とそれらの活性測定

プライマーの設計

pET28b-LNBase (N-His) をテンプレートとし、元のコンストラクトの N 末端には *Nde*I サイトを、C 末端に *Eco*RI サイトを入れ、且つそれぞれを 4~5 残基短くするようにプライマーを設計した。これらのプライマーは、委託合成により入手した。

NdeI up A	GGGAATTCCATATGGATAGTGCAGCCGGGTAC
NdeI up B	GGGAATTCCATATGGGGTACAGTGCCACGGCTCCC
NdeI up C	GGGAATTCCATATGGCTCCCGTGAATCTCACCCGC
EcoRI low 1	CCGGAATTCTCAGTCGCTGACCAGGTCAG
EcoRI low 2	CCGGAATTCTCAAGCCGGGAAGTGAAGCGACGGT
EcoRI low 3	CCGGAATTCTCAGACGGTGCCAGCGGCGGGACGATG
EcoRI low 4	CCGGAATTCTCAGGGACGATGGGTCTCCAGATC
EcoRI low 5	CCGGAATTCTCACAGATCGATGTTCTGCTCGTTG

(赤文字は制限酵素サイト)

以下では、例えば、“*Nde*I up A” と “*Eco*RI low 1” をプライマーに用いて出来るコンストラクトを “A1” などと呼ぶ。

まずは、7 種類コンストラクト A1(コントロール)、A2、A3、A4、A5、(以上は C 末のみを削ったもの) B1、C1、(以上は N 末のみを削ったもの) を作製した (ベクターは pET28b)。

TA クローニング

①pET28b-LNBase (N-His) を template として以下のように PCR を行い、インサートを作製した。

PCR mix for TA cloning	(μ L)
Double Distilled water	37.8
10 \times Buffer	5
10 mM dNTPs	4
10 μ M upper primer	1.0
10 μ M lower primer	1.0
easy A taq polimerase	0.2
Template DNA	1.0

PCR cycle		} 30 cycles
96°C	5 min	
96 °C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

- ②インサートを LaboPass™ PCR (COSMO) で精製した。
- ③インサート 4.5 μ L と T-ベクター0.5 μ L を混合し(モル比は、インサート: ベクター = 4:1)、
Ligation high (TOYOBO) 5 μ L (インサート+ベクターと等量) を添加して室温で 1 時間静置することによって、ライゲーションした。
大腸菌 XL10-Gold に形質転換した。
- ④終濃度50 μ g/mlのアンピシリン入りLB平板培地に、100 mMのIPTG 20 μ L と20 mg/mLの X-Gal 50 μ Lを塗布した上で、③を塗布した。
- ⑤④で得られた白コロニーをコロニーPCR した。
- ⑥⑤で得られたコロニーを培養し、ミニプレップした後、得られたプラスミドが目的の変異を持つかどうかを、DNA シークエンサーCEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) を用いて、塩基配列を決定することで確認した。
- ⑦⑥で得られたプラスミドと、あらかじめミニプレップしていた pET28b に対し、それぞれに 2 種類の制限酵素 *Nde* I と *Eco* RI を同時に加え 37°C でインキュベートした。前者からインサート、後者からベクターが作製された。
- ⑧それぞれ LaboPass™ PCR (COSMO) で精製し、エタノール沈殿を行った。
- ⑨インサート 4.5 μ L とベクター 0.5 μ L を混合し (モル比は、インサート: ベクター = 4:1)、
Ligation high (TOYOBO) 5 μ L (インサート+ベクターと等量) を添加して室温で 1 時間静置することによって、ライゲーションした。
- ⑩大腸菌 XL10-Gold に形質転換し、カナマイシン入り LB 平板培地に塗布した。
- ⑪⑩で得られたコロニーを培養し、コンストラクト **A1, A2, A3, A4, A5, B1, C1** が組込まれたプラスミド (pET28b) をもつミニプレップした後、大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus に形質転換した。
- ⑫⑪で得られた菌体の小スケール培養を行い、その発現タンパクに対して、HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) を用いたバッチ法によってヒスチジンタグが付加されているかどうかを確認した。に形質転換し、カナマイシン入り LB 平板培地に塗布した。
- ⑬得られたコロニーを培養し、プラスミドをミニプレップした後、大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus に形質転換した。
- ⑭⑬で得られた菌体の小スケール培養を行い、その発現タンパクに対して、HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) を用いたバッチ法によってヒスチジンタグが付加されているかどうかを確認した。

活性測定

コンストラクト **A1, A2, A3, A4, A5, B1, C1** に対して活性測定 (2.1.3 節に記載) を行った。

熱安定性

- ①あらかじめエッペンチューブに分注しておいた Wild Type の酵素に対して、50 °C の Heat treatment を 0 分、5 分、10 分、15 分、20 分、30 分、40 分間行い、時間が来たら氷上に移した (図 1-20)。
- ②Heat treatment を行ったそれぞれに対して、上記の方法で活性測定を行い、比活性が 0 分時から何%減少したかを調べ、半減期を求めた (図 1-21)。

2. 2. 2. Native LNBase(B1)の大量培養と精製と結晶化

pET28b-LNBase (B1) を用いた大量培養と精製、結晶化の方法は 2.1.3 節と 2.1.4 節と同様である。

2. 2. 3. Se-Met LNBase(B1)の発現, 精製, 結晶化**発現系の確立**

- ① pET28b-LNBase (B1) と pET19b をミニプレップし、それぞれに 2 種類の制限酵素 *Xho* I と *Nco* I を同時に加え 37°C でインキュベートした。前者からインサート、後者からベクターが作製された。
- ② それぞれ LaboPass™ PCR (COSMO) で精製し、エタノール沈殿を行った。
- ③ インサート 3.8 μL とベクター1.2 μL を混合し、Ligation high (TOYOBO) 5 μL を添加して室温で 1 時間静置することによって、ライゲーションした。
- ④ 大腸菌 XL10-Gold に形質転換し、アンピシリン入り LB 平板培地に塗布した。
- ⑤ ④で得られたコロニーを培養し、プラスミド (**pET19b-LNBase (B1)**) をミニプレップした後、大腸菌 B834(DE3)、BL21(DE3)-CodonPlus RIL-X 、BL21-CodonPlus(DE3)-RP-X の三株に形質転換した。
- ⑥ ⑤で得られた菌体の小スケール培養を行い、その発現タンパクに対して、HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) を用いたバッチ法によって His タグが付加されているかどうかを確認した。

大量培養・精製・結晶化

pET19b-LNBase (B1) を形質転換した大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus RIL-X 株を、1.5 節と同様の方法で大量培養した。さらに、1.3 節と同様の方法で精製し、結晶化した。ただし、用いた LeMaster 培地に添加した抗生物質はアンピシリンである。

X 線回折強度データの収集

回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK-PF)の実験ステーション BL17A で行った。Native 結晶は波長 1.0000 Å、Se-Met LNBase は 0.97858 Å で回折データを収集した。得られた回折強度データの処理は 2.1.5.節と同様に行った。

2. 2. 4. LNB チアゾリンとの共結晶化

2.2.3 節までは LNB との共結晶について記述した。この節では LNB のアナログで阻害剤である LNB チアゾリンとの共結晶化について記す。LNB チアゾリンは西オーストラリア大学の Keith Stubbs 博士らによって合成されたものの提供を受けた。

大量培養・精製・結晶化

pET28b-LNBBase (B1) を形質転換した大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus 株を、2.1.5 節と同様の方法で大量培養した。さらに、1.3.節と同様の方法で精製し、2.2.2 節で結晶が得られた時と同じ条件で、LNB チアゾリンとの共結晶化した。

X 線回折強度データの収集と処理

回折強度データの収集は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK-PF)の実験ステーション BL17A で行った。波長 1.0000 Å で回折データを収集した。得られた回折強度データの処理は 2.1.5.節と同様に行った。

解析サーバー

明らかになった構造について、用いた解析サーバーは以下の通りである。

- DALI(49) (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/)
類似したフォールドを持つ立体構造を PDB から検索する。
- Dali pairwise comparison
(http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_lite/start)
- ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>)
- Matthews Probability Calculator (<http://ruppweb.dyndns.org/mattprob/>)
- Cremer-Pople parameter calculator (<http://asfushi.hp.infoseek.co.jp/>)
- Domain Fishing (http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/dom_fish/)

図の作成ソフト

PyMOL(50)を用いた。

3. 結果

3.0. はじめに

石川県立大学の片山高嶺教授は、クローニングした LNBase 遺伝子 (LNBaseORF; 1112 アミノ酸) から触媒ドメインを含む様々なコンストラクトを作製し、それぞれについて活性測定を行った。その結果、最も活性の高かったのがコンストラクト “TK1647” だった (図 1-10)。本研究を始めるに当たり、LNBase (TK1647) の発現プラスミド (pET23a-LNBase) を導入した大腸菌 Rosetta(DE3) (Novagen) のグリセロールストックを片山教授から頂いた。pET23a-LNBase は、TK1647 の 5'末端に *Nde* I、3'末端に *EcoR* I の制限酵素サイトを付加したものを、pET23a (Novagen) のマルチプルクローニングサイトに組み込んだものである (図 1-11 左上)。発現タンパク質は 627 個のアミノ酸残基からなり、分子量は 70.0kDa である。

一般に結晶化条件のスクリーニングには、10 mg/ml 程度の高純度のタンパク質を必要とする。十分な量の LNBase を発現し精製して結晶化することを目的として実験を行った。

3.1. LNBase の発現、精製、結晶化 ①

3.1.1. C 末端への His タグの付加

pET23a-LNBase から pET28b に LNBase 遺伝子を乗せ換え、C 末端部分に 6 残基のヒスチジンタグを付加したプラスミド (pET28b-LNBase (C-His)) (図 1-11 下) を作製し、LNBase の大腸菌による組換え体を作製し、発現、精製、結晶化を試みた。

DNA シークエンサー CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) を用いて塩基配列を決定し、得られたプラスミドに想定外の変異が入っていないことと、His タグが付加されていることを確認した。しかし、HisLink による精製の後 SDS-PAGE を行ったところ、図 1-12 上のように His タグ精製が出来ていなかった。His タグが、何らかの原因でタンパク質のコンフォメーションの内側に入り込んで、Ni とのアフィニティー相互作用ができなくなったと考え、His タグに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。その結果、図 1-13 のようになり、His タグが付いていないことが分かった。プロテアーゼにより切断された可能性などが考えられたが、詳細は不明だった。

3.1.2. N 末端への His タグの付加

pET23a-LNBase から pET28b に LNBase 遺伝子を乗せ換え、N 末端に 6 残基のヒスチジンタグを付加したプラスミド (pET28b-LNBase (N-His)) (図 1-11 右上) を作製し、LNBase の大腸菌による組換え体を作製し、発現、精製、結晶化を試みた。

HisLink による精製の後 SDS-PAGE を行ったところ、図 1-12 中のように His タグによって精製できていた。TLC の結果は図 1-14 上のように活性が確認できた。

3. 1. 3. Native LNBase(N-His)の大量培養と精製 ①

His タグ精製可能であると判断された pET28b-LNBase (N-His) を用いて、Native LNBase の大量培養と 3 種類のカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。精製の各ステップにおける SDS-PAGE とクロマトグラフィーの溶出パターンは図 1-15 のようになった。一連の精製を計 7 回行ったが、いずれも同じ精製パターンだった。精製表は表 1-3 のようになった。

陰イオン交換クロマトグラフィーでは、NaCl が約 600 mM になった段階で溶出、ゲルろ過クロマトグラフィーでは約 76 mL で溶出した。一連の精製を数回行ったが、いずれも同じ精製パターンだった。陰イオン交換クロマトグラフィーではタンパク質の溶出ピークが 2 つに別れた。大きい方を A ピーク、小さい方を B ピークと呼ぶ。どちらも LNBase だった。別々に回収したが、A ピークのみ結晶化を行った。

精製倍率はばらつきがあったが、3 L の大腸菌を培養して約 30 mg の精製 LNBase が獲得出来た。この量は、X 線結晶構造解析を行うための結晶化には十分である。また、ゲルろ過の結果から、LNBase が溶液中で単量体であることが分かった (図 1-16)。

3. 1. 4. Native LNBase(N-His)の結晶化 ①

X 線結晶構造解析によって原子レベルでの構造的基盤を明らかにするためには高分解能の回折を与える結晶を得なければならない。そのため、pET28b-LNBase (N-His) から発現・精製したタンパク質の結晶化スクリーニングを行った。

PCT (Pre-crystallization test) キット (QUIAGEN) を用いて検討した結果、結晶化のタンパク質濃度は約 35 mg/mL が良いことが分かったので、その濃度で LNB を混ぜて結晶化スクリーニングを行った。しかし、いずれの精製タンパク質でも結晶化スクリーニングを行ったが、結晶が全く出ない場合が多かった。結晶が出ても再現性が悪く、X 線解析に進めなかった。結晶化条件の沈殿剤濃度や温度などを検討したが改善しなかった。

ただし、2 回目の精製で得られた結晶 (図 1-17 上) は何度か再現した。条件は下表の通りである。その結晶について、NativeLNBase の X 線データ (表 1-4) が得られた。しかし、それ以降、同じ条件で結晶が出来なくなった。

Sample buffer	5 mM HEPES-NaOH pH7.2
Protein concentration	35.3 mg/ml
Substrate	10 mM LNB
Temperature	20 °C
Method	Sitting drop
Reservoir solution (JBScreen Classic 3-A3)	10% w/v PEG 4000 10%w/v 2-propanol 100 mM sodium citrate pH 5.6
Protein : Reservoir	0.5 µl : 0.3 µl

3. 1. 5. Se-Met LNBase(N-His)の発現、精製、結晶化 ①

【構造因子と位相問題】（日本結晶学会誌 第 48 巻 第 3 号 (2006) p. 179 参照）

電磁波の一種である X 線は、荷電粒子である電子を強制振動させ、そのために X 線にさらされた電子からは入射 X 線と同じ波長の蛍光 X 線が球面波として放出される。単位胞にあるすべての電子の散乱の合成波の式のうち、j 番目の電子の位置 \mathbf{r}_j の関数である次の量を構造因子 $\mathbf{F}(\mathbf{k})$ と定義する。 \mathbf{k} は行路差の方向ベクトルである。

$$\mathbf{F}(\mathbf{k}) = \sum \exp 2\pi i \mathbf{k} \mathbf{r}_j$$

よって、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ からなる系（体積 $d\mathbf{v}$ ）の構造因子は

$$\mathbf{F}(\mathbf{k}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp 2\pi i \mathbf{k} \mathbf{r}_j d\mathbf{v}$$

と書ける。逆フーリエ変換により電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ は

$$\rho(\mathbf{r}) = \int \mathbf{F}(\mathbf{k}) \exp(-2\pi i \mathbf{k} \mathbf{r}) d\mathbf{v}_k$$

と書ける。従って構造因子 $\mathbf{F}(\mathbf{k})$ が分かれば電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ が分かることになる。ここで、X 線回折実験から得られる X 線の強度 $I_{obs}(\mathbf{k})$ は、散乱の 2 乗に比例する ($I_{obs}(\mathbf{k}) \propto |\mathbf{F}(\mathbf{k})|^2$) ので $|\mathbf{F}(\mathbf{k})|$ は求められる。しかし、 $\mathbf{F}(\mathbf{k})$ は複素量なので、

$$\mathbf{F}(\mathbf{k}) = |\mathbf{F}(\mathbf{k})| \exp i\alpha(\mathbf{k})$$

と書ける。ここで、 $\alpha(\mathbf{k})$ を位相と呼び、回折実験から直接は求まらない。

結晶構造解析は、回折強度 $I(\mathbf{h} \ \mathbf{k} \ \mathbf{l})$ より $|\mathbf{F}(\mathbf{h} \ \mathbf{k} \ \mathbf{l})|$ を求めて、これに位相をつけて逆フーリエ変換し、 $\rho(x \ y \ z)$ を求める操作である。】

タンパク質の X 線結晶構造解析を行うには、位相角を求める必要がある。タンパク質結晶の位相決定法として、分子置換法、重原子同型置換法、異常分散法の 3 つがある。分子置換法が使えるのは、そのタンパク質と似たアミノ酸配列を持つタンパク質（通常アミノ酸配列の相同性が 30% 以上）の構造が明らかになっている場合であり、その構造をモデルとして、位相を求めることができる。しかし、LNBase には適切な類似構造が無かったため、分子置換法は使えなかった。そのため、異常分散法を用いることにした。異常分散法では、大腸菌では一般的にメチオニン要求株（B834、BL21(DE3)-CodonPlus-RIL-X、BL21(DE3)-CodonPlus-RP-X など）を用いて、タンパク質中のメチオニンをセレノメチオニン（メチオニン中の硫黄原子がセレン原子になったもの）に置換したセレノメチオニン置換体を用いる。この場合、メチオニンがほぼ 100% の割合でセレノメチオニンに置換されると期待される。SAD 法は 1 つの波長で、MAD 法は複数の波長で、重原子同型置換体中の重原子の異常分散を測定することにより位相角を決める。ここでは、LNBase(N-His)のセレノメチオニン置換体（Se-Met LNBase）を発現、精製、結晶化した。精製表は表 1-3 に示した。

TLC の結果は図 1-14 下のようになり、いずれの発現タンパクについても活性が確認できた。さらに、pET28b-LNBase (N-His) を形質転換した大腸菌 B834(DE3)による発現タンパクについて、HisLink による精製の後 SDS-PAGE を行ったところ、図 1-12 下のようになり His タグによって精製できていた。

3.1.4 節と同じ条件で何度も結晶化を試した。3 カ月後に数個の結晶が得られた。この結晶と 3.1.4 節で得られた NativeLNBase の結晶の X 線回折強度データ測定を行った (表 1-4) (図 1-17 中、下)。

空間群は $C2$ 、単位胞のパラメーターは $a = 235.113 \text{ (\AA)}$ 、 $b = 231.141 \text{ (\AA)}$ 、 $c = 110.891 \text{ (\AA)}$ 、 $a=c=90^\circ$ 、 $b = 102.888^\circ$ であり、分解能 2.9 \AA のデータが得られた。しかし、格子定数が大きく、かつ空間群の対称性が低いため、非対称単位当たり 8 個から 9 個の分子が存在していた。そのため、安定して再現でき、かつ別の空間群を持つ別の結晶化条件を探す必要があった。

さらに、Se-Met LNBase の結晶の X 線回折データ収集の際の、XAFS によって見た異常散乱効果はやや小さいように見えた (図 1-18)。プログラム SnB(52)を用いた結果、どの Se-Met 置換体の結晶からも Se のサイトが見つからなかった。

問題点と解決策

本実験での問題は次の 2 点だった。

- ・再現性のある結晶が得られなかった。
- ・pET28b-LNBase(N-His)による NativeLNBase 結晶の X 線データは得られたが、結晶系が悪く、後のデータ処理が上手くいかなかった。

再現性が高く、かつ別の空間群をもつ、構造解析に適した結晶のできる条件を探す必要があった。具体的な解決策として、以下の二点が考えられた。

まず、1 点目は、精製条件を変えることによって精製後のタンパク質の性質を変えることである。そのため、今までの精製過程の中に疎水カラムを取り入れるなどして精製度を上げたり、逆にカラムを減らしたりした。

2 点目は、タンパク質発現プラスミドの変更である。

- ・コンストラクトの長さを変える。
- ・ホモログを用いる。
- ・タンパク質表面のリジン残基をメチル化する、または、アラニンやアルギニンに変異させる。そのような変異体では結晶系が変わることが知られている(51)。リジンは側鎖が大きく正に荷電しているため、タンパク質同士が反発し合い、結晶になりにくく、たとえ結晶になったとしても対称性が低くなってしまう原因となりうる。

タンパク質の立体構造予測サイト Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) によると LNBase の表面にはリジンが集中しているところがあった。さらに、本実験では、LNBase の結晶ができた条件にはいずれも、クエン酸が入っており、クエン酸がタンパク表面の正電荷を中和していることも考えられた。

このような経緯から、新たな結晶化条件の探索を行うに当たり、まずはコンストラクトを短くすることにした。

3. 2. 短いコンストラクトの LNBase の発現、精製、結晶化 ②

pET28b-LNBase (C-His) は、発現はしたものの His タグ精製が出来なかった。また、pET28b-LNBase (N-His) は、3 種類のカラムクロマトグラフィーによる精製は出来たものの、X 線構造解析に適した結晶が得られなかった。そこで、新たな結晶化条件を探索するため、pET28b-LNBase (N-His) をテンプレートとして、コンストラクトをさらに短くした(図 1-19)。そして、それを用いて発現、精製、結晶化を行った。結果として、ここで得られた結晶により構造解析に成功した。

3. 2. 1. 短いコンストラクトの作製とそれらの活性測定

図 1-20, 図 1-21 のようにして各コンストラクトの比活性と熱安定性を求めた結果、図 1-22 のようになった。C 末端を削ったコンストラクト **A1, A2, A3, A4, A5** は最も高いものでも Wild Type の比活性の半分にも及ばなかった。一方、N 末端を削ったコンストラクト **B1, C1** は、比活性はやや落ちていたものの、結晶化に用いるには十分であった。ただ、**C1** はやや半減期が短く、**B1** よりは熱安定性が低かった。従って今後の実験では **B1** を用いることにした。

3. 2. 2. Native LNBase(B1)の大量培養・精製・結晶化

精製の各ステップにおける SDS-PAGE とクロマトグラフィーの溶出パターンは LNBase(N-His)の場合と同様で、図 1-23 のようになった。陰イオン交換クロマトグラフィーで得られる A ピーク、B ピークの 2 つの溶出ピークを別々に回収し、結晶化した。A ピーク由来のタンパク質からの方が大きい結晶が出来たが、B ピークからのものでも十分な結晶が得られた。精製表は表 1-5 のようになった。

3 L の大腸菌を培養して約 1.0 mg の精製 LNBase が得られた。精製倍率は約 10 倍、収率は約 0.5%だった。得られた精製タンパク質量が少なかったため、7 mg/mL というやや薄いタンパク質濃度でスクリーニングを行った。

その結果、下表の条件で良質な結晶(図 1-24) が得られた。また、LNB (または LNB チアゾリン (3.2.4 節に記述)) の存在下でのみ結晶は得られた。LNB の代わりに Lac や Glc、Gal などを用いても結晶は得られなかった。従って、LNBase と LNB との共結晶になっている可能性が高いと考えられた。結果的には、以下で述べるように LNB との複合体構造を得ることに成功した。また、ソーキングを行ったが、それらとの複合体構造は得られなかった。

Sample buffer	5 mM HEPES-NaOH pH7.2
Protein concentration	7.35~14.0 mg/ml
Substrate	10 mM LNB
Temperature	20 °C, 4 days
Method	Sitting drop
Reservoir solution	0.2 M potassium sodium tartrate tetrahydrate 0.1 M sodium citrate (pH 5.6) 2.0 M ammonium sulfate

3. 2. 3. Se-Met LNBase(B1)の発現, 精製, 結晶化

これまでメチオニン要求性の大腸菌として B834 を用いていたが、[図 1-18](#) に示したように、セレノメチオニンの置換率の低さが懸念されたため、発現菌株の変更を考えた。pET28b-LNBase (B1) のセレノメチオニン置換体の発現系を構築するに当たり、菌株自体がカナマイシン耐性を持つメチオニン要求性の大腸菌株 BL21(DE3)-CodonPlus RIL-X を用いることにした。そのため、カナマイシン耐性の pET28b-LNBase (B1) ではなく、アンピシリン耐性の発現ベクターを作製する必要がある。そこで、pET19b-LNBase(B1)を作製し ([図 1-25](#))、BL21(DE3)-CodonPlus RIL-X に形質転換した。

NativeLNBase と同じ条件で発現、精製、結晶化を行うことが出来た。1 L の大腸菌を培養して約 1.5 mg の精製 LNBase が得られた ([表 1-5](#))。精製倍率は約 5 倍、収率は 0.5% だった。NativeLNBase と同じ条件で結晶が出来た。ここで得られた Se-Met LNBase の結晶と 3.2.2 節で得られた Native LNBase の結晶を用いて X 線回折強度データを収集した。

3. 2. 4. LNB チアゾリンとの共結晶化

3.2.3 節までは LNB との共結晶について記述した。この節では LNB のアナログで阻害剤である LNB チアゾリンとの共結晶化について記す。

当初、LNB の共結晶化の時と同様に LNB チアゾリンの濃度を 10 mM にしたところ、結晶が全く出来なかった。LNBase に対する阻害定数の値 ($K_i = 125 \pm 8$ nM) (33)を参考にして、LNB チアゾリン濃度 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4, 0.5, 1.0M で結晶化を試した。その結果、0.1 mM 以下でのみ結晶が得られた。結晶化条件は下表の通りである。

Sample buffer	5 mM HEPES-NaOH pH7.2
Protein conc.	10 mg/ml
Ligand	0.1 mM LNB チアゾリン
Temp.	20 °C, 4days
Method	Sitting drop
Reservoir solution	0.2 M potassium sodium tartrate tetrahydrate 0.1 M sodium citrate (pH 5.6) 2.0 M ammonium sulfate

3. 3. X 線結晶構造解析

以下に記す X 線回折データ測定結果と精密化の結果を[表 1-6](#) に示した。回折データの質を表わす R_{merge} (目安は 0.4 以下)、S/N 比である Mean $I/\sigma(I)$ 値 (目安は 2 以上)、データの完全性

を表す Completeness 値 (目安は 95%以上) などは全てデータが良質であることを表している。

3. 3. 1. LNB 複合体

データ処理

●Native 結晶 (644 アミノ酸 (うち 21 アミノ酸はベクター由来)、分子量 71807)

波長 1.0000 Å の X 線による回折データを測定し、1.8 Å の高分解能のデータが得られた。空間群は $P2_12_12_1$ 、単位胞のパラメーターは $a = 116.8$ (Å)、 $b = 131.0$ (Å)、 $c = 104.4$ (Å)、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ だった。非対称単位中に含まれるサブユニット数は、単位胞の大きさとタンパク質の分子数から算出される。タンパク質結晶の V_M 値は $1.7 \sim 3.5$ Å³/Da (多くは 2.15 Å³/Da 前後)、溶媒含量は通常は 30~70% (多くは 50 %前後)である。今回、LNBBase が 2 分子含まれていると仮定した場合、 V_M が 2.78 Å³/Da、溶媒含量が 55.77%であったので、非対称単位には 2 分子の LNBBase が含まれると予想された。

●Se-Met 置換体 結晶

X 線を吸収した原子から放出される電子が近傍の他の原子に散乱されて生じる干渉を、XAFS (X-ray Absorption Fine Structure) という。本研究では、セレン原子の吸収端の波長 (0.97974 Å) (表 2-2) 付近の X 線を照射することで起こる蛍光を測定したところ、図 1-26 のようなスペクトルが得られた。これをもとに、MAD 法で一般的に用いられる 3 波長 (Peak 0.97898 Å、Edge 0.9794 Å、Hi-Remote 0.96416 Å) の X 線を Se-Met 置換体の結晶に照射することにした。しかし、Peak、Edge の 2 波長によるデータを収集したところで、結晶の放射線損傷がひどくなった。そのため、Peak のデータをもとに、SAD (single-wavelength anomalous diffraction) 法を用いることにした。

Se-Met LNBBase による、位相の決定と改良、初期モデルの作製

- ①Peak の波長で測定したデータのうち、分解能 2.8 Å までのものを用いて、プログラム SnB(52) によって、直接法により 28 個全てのセレノメチオニンのサイトを決定した。
- ②プログラム SOLVE(53)を用いて X 線の初期位相を決定したところ、位相の確からしさを示す Figure of merit (FOM)は 0.259 であった。FOM は計算された位相と真の位相のずれを表すパラメーターで、0~1 の値で表わされる。全て真の位相の時 1 となる。
- ③プログラム RESOLVE(53)で、Density Modification による位相の改良と、自動モデリングを行った。その結果、FOM は 0.70 まで向上した。さらに、1288 残基中 1032 残基の主鎖および側鎖の構造を決定した。

Se-Met 置換体についてはこれ以上の精密化を行わず、Native LNBBase の構造解析に進んだ。

Native LNBBase のモデルの作製

- ①X 線結晶構造解析の総合ソフトウェアパッケージである CCP4i 内のプログラム Morlep(54)によって、上記で得られた初期モデルを用いて Native LNBBase の分解能 1.8 Å までの回折データから得られた構造因子に対して分子置換することにより、Native LNBBase の初期位相を決定

した。

②プログラム ARP/wARP(55)を用いて、初期構造を自動構築した。

精密化

①CCP4i 内のプログラム Refmac5(56)による自動構造精密化を行った。

②プログラム COOT(57)によって手動構造精密化を行った。得られた $|F_o| - |F_c|$ 電子密度マップから、活性中心に LNB の形がはっきり見えたので、そこに Gal と GlcNAc を入れて、LNB のコンフォメーションを確定した (図 1-27)。

③構造の確からしさを表す R 因子が下がるまで、①から②を繰り返した。

A chain は Ser30 から Ser662、B chain は Ser30 から Val661 までの、LNBase と LNB との共結晶の構造を 1.8Å の分解能で決定した。

構造の妥当性の検証

①X 線回折データと構築したタンパク質立体構造から計算される構造因子との残差を示す R 因子および R_{free} 因子は、それぞれ 16.8%、19.7%であり、十分小さくなっていた。

②得られた構造に対して、RAMPAGE サーバーを利用して、ラマチャンドラプロットを描き、結合角の評価を行ったところ、97.4%の残基が“favoured region”にあり、立体化学的に問題なかった (図 1-28)。構造の議論を行うのに十分な質の構造が得られた。

3.3.2. LNB チアゾリン複合体

データ処理

3.3.1 節と同様に X 線回折データを収集し処理した。分解能は 1.8 Å、空間群は $P2_12_12$ 、単位胞のパラメーターは $a = 116.5$ (Å)、 $b = 131.6$ (Å)、 $c = 104.8$ (Å)、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であった。

LNBase チアゾリンのモデルの作製と精密化

①LNB チアゾリン共結晶の分解能 1.8 Å までの回折データから得られた構造因子に対して、3.3.1 節で得られた LNB 複合体構造を用いて分子置換した。これは CCP4i 内のプログラム Refmac5 の Rigid Body Refinement によって行った。 R 因子及び R_{free} 因子はそれぞれ 23.0%、22.8%だった。

②プログラム COOT によって手動構造精密化を行った。得られた $|F_o| - |F_c|$ 電子密度マップから、活性中心に LNB チアゾリンの形がはっきり見えた。LNB の GlcNAc を GlcNAc チアゾリンに置き換えて、LNB チアゾリンのコンフォメーションを確定した。また、水分子を改めて置き直した。

③Refmac5 によって Restrained Refinement を行った。

A chain は Ser30 から Ser662、B chain は Ser30 から Val661 まで、LNBase と LNB チアゾリンとの共結晶の構造を 1.8 Å の分解能で決定した。

構造の妥当性の検証

① R 因子および R_{free} 因子は、それぞれ 18.2%、21.3%であり、十分小さくなっていた。

②得られた構造に対して、RAMPAGE サーバーを利用して、ラマチャンドラプロットを描き、結合角の評価を行ったところ、98.3%の残基が“favoured region”にあり、立体化学的に問題なかった。構造の議論を行うのに十分な質の構造が得られた。

3. 4. LNBase の構造

3. 4. 1. 二量体構造

非対称単位とは、結晶構造における最小の繰り返し単位で、非対称単位中の構造が結晶学的対称性によって繰り返されることで結晶が形成される。非対称単位中に複数の同一サブユニットが含まれる場合は、それらのサブユニット間ではループの揺らぎや側鎖の向きなどの何らかの構造の違いが生じており、それぞれ独立した構造をとっている。

本研究で用いたコンストラクトの LNBase の分子量は、アミノ酸配列からの理論値が 71.8 kDa、SDS-PAGE からの推定値が 72.4 kDa、ゲルろ過の溶出パターンからの推定値が 64.9 kDa だった。従って、LNBase は溶液中では単量体である。しかし、結晶の非対称単位内にはダイマーとして 2 分子が存在していた (図 1-29)。このコンストラクトには、N 末端側に発現ベクター (pET28) 由来の His×6 タグとそれに続く人工配列 (21 アミノ酸) が付加している。そのうち 11 アミノ酸 (SSGLVPRGSHM、残基番号 30-40) の電子密度マップが確認された。さらに、その中の 7 つのアミノ酸 (SSGLVPR) が隣の分子の C ドメインと相互作用することによって、結晶の非対称単位内でのダイマー形成に関わっていた。このダイマー相互作用はアーティファクトであるが、結晶中での分子のパッキングに関わっており、今回結晶化に用いた短くしたコンストラクト以外では同様の結晶は得られなかったと推察された。A-chain は残基番号 30 から 662 まで、B-chain は残基番号 30 から 661 までの構造を決定した。A-chain と B-chain の構造はほぼ同じであった ($C\alpha$ RMSD = 0.4 Å)。以降、特に言及しない限り、A-chain について記述する。

3. 4. 2. 単量体構造

LNBase の単量体構造 (A-chain) を図 1-30B に示す。LNBase の全体構造は、3 つのドメインで構成されていた。N 末端側から N-ドメイン (残基番号 41-178)、バレルドメイン (残基番号 179-496)、C-ドメイン (残基番号 497-662) と呼ぶ。これらとは別に、N 末端に 6 残基の His タグを付加していたため、ベクター由来の 11 残基を決定した。

●N-ドメイン (残基番号 41-178)

N-ドメインは、2 本の α -ヘリックスを 7 本のストランドからなる β シートが覆う α/β 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。

●バレルドメイン (残基番号 179-496)

GH20 の Catalytic ドメインである。GH20 では基本的に、 β ストランドと α -ヘリックスが交互に 8 回繰り返すバレル構造 (TIM barrel) をとるが、LNBase ではやや崩れていた (図 1-38)。

活性中心では、GH20 に共通して保存している触媒残基の Asp と Glu が LNB と相互作用しており (図 1-32A, C)、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る GH20 に共通して保存している触媒残基の Asp と Glu が LNB と相互作用していた。

●C-ドメイン (残基番号 497-662)

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 β -トレフォイルフォールドをとっていた (図 1-35B) (4.2 節に詳述)。また、欠失すると活性が低下する (図 1-22) ことから安定性に寄与していると考えられた。

3. 4. 3. LNBBase の活性中心

バレルドメインの活性中心には、リガンドの電子密度がはっきり見えた (図 1-27, 1-32A, B)。LNB の GlcNAc のピラノース環は、 4E (IUPAC 命名法(58)による) と呼ばれるコンフォメーションをとっていた (図 1-32C) (4.3 節に詳述)。また、LNB チアゾリンの GlcNAc チアゾリンのピラノース環は 4C_1 のコンフォメーションをとっていた (図 1-32D)。

LNB の GlcNAc と Gal は、それぞれサブサイト(-1)と(-2)に結合しており、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 (図 1-32A)。LNBBase は、このような広範囲に渡る厳密な基質認識によって、高い基質特異性を示すと考えられる。

LNBBase は表 1-2 に示されるような活性を持つ。すなわち、pyridylamino (PA)-LNFP I や PA-LNFP II のようにフコースに修飾された糖を加水分解しない。また、pNP- β -GNB に対しては pNP- β -LNB の 30%の活性しか示さない。GNB は LNB の還元末端の GlcNAc の 4-エピマー (GNB では GalNAc) である。さらに非還元末端に GNB が結合した PA 糖である GA1 に対しては全く活性を示さない。

以上の活性測定の結果は、以下のように構造的に説明される。LNBBase の構造中では、LNB の Gal の C2 位の OH 基が Asn259 と Asp320 の側鎖と水素結合し、また、GlcNAc の C4 位の OH 基が Asp467 の側鎖と水素結合していた (図 1-32A, C)。LNBBase の活性中心には、Gal の C2 位と GalNAc の C4 位の OH 基のある位置にはフコシル基が入るスペースがないと言える。従って、LNBBase はフコシル化などの修飾を受けていないオリゴ糖 (例えば LNT) の LNB 部分に対して特異的に作用すると考えられる。また、GNB の結合した糖に対して弱い活性しか示さないか、あるいは全く示さない理由は、C4 位の OH 基が axial になると Asp467 による認識が弱まるからであると考えられる (図 1-32C)。

3. 4. 4. LNBBase と GH20 β -HexNAcase の比較

全体構造

Dali サーバーにより立体相同性検索をした結果、上位は全て GH20 の β -HexNAcase だった。ここでは、最もよく研究されている *S. plicatus* 由来の β -HexNAcase (SpHex)と LNBBase を比較した。全体構造を比較すると、N ドメインとバレルドメインは SpHex に限らず、どの β -HexNAcase とともに全体的によく似ていた (図 1-30B, C)。しかし、C-ドメインは LNBBase にユ

ニークなドメインであり、ほとんどの GH20 の酵素には存在しなかった (4.2 節に詳述)。

LNBase と SpHex の分子表面図からは、LNBase は 2 糖、SpHex は単糖に適したサイズの基質結合ポケットを持つことが明らかだった (図 1-31A, B)。

プラス側のサブサイト

サブサイト (+1) (+2) などとは今回得られた結晶構造からは確認できなかった。LNB, LNB チアゾリンとの共結晶しか得られず、共結晶に対してラクトースや Gal、Glc をソーキングしたが、それらの糖の電子密度は見えなかった。LNBase は、pNP- β -LNB だけでなく PA-LNT も効率的に加水分解する(29) (表 1-2)。基質のアグリコンを特に認識するわけではないと言える。また、SpHex に比べて LNBase は基質結合ポケットの入り口部分が大きく開いていた (図 1-31A, B)。これは *Streptomyces* sp. 142 由来の LNBase が様々な糖鎖の非還元末端の LNB を遊離することとも矛盾しない(30,31)。LNBase にプラス側のサブサイトが存在するのか不明である。

サブサイト (-1)

図 1-33 では、LNBase の活性中心を、GH20 の中で最も良く研究されている SpHex と比較した(36,38,59)。サブサイト(-1)位の GlcNAc の周囲にある Asp320 と Glu321、Tyr419、Asp467 は、GH20 で極めて保存性が高い (図 1-32, 1-33A, 1-38)。GH20 の触媒残基である Asp320 と Glu321 は LNBase でも保存されていた。Asp320 は遷移状態を安定化する必須の残基であり、Glu321 は一般酸/塩基触媒である(38) (図 0-4, 1-36)。Asp320 は 2-アセトアミド基の窒素原子と、また、Glu321 は 1 位の酸素原子とそれぞれ水素結合していた (図 1-32A, C, 1-33A)。Tyr419 は 2-アセトアミド基のカルボニルの酸素原子と水素結合していた (図 1-32C)。Asp467 は O4, O6 と水素結合していた (図 1-32C, 1-33A)。 β -HexNAcase では Asp467 に対応する残基はほとんどが Glu であり (SpHex では Glu-444)、O4 のみとしか水素結合していない (図 1-33B)。Asp467 との水素結合によって、LNB の GlcNAc の 6 位のヒドロキシメチル基のコンフォメーションが溶液中で最も安定なゴーシュ・ゴーシュ型(60) (図 1-34) に固定されていると考えられる (図 1-32C)。一方、 β -HexNAcase では O6 の配座は一定しない。また、基質と疎水相互作用する His263, Trp373, Trp394, Trp465 は GH20 で極めて保存性が高い (図 1-32, 1-38)。

サブサイト (-2)

LNBase が 2 糖を切り出すことから予想された通り、LNBase の活性中心において、 β 1,3 結合した Gal に特異的なサブサイト(-2)の存在がはっきり確認できた (図 1-33A)。LNBase のサブサイト(-2)で Gal の O4,O3 とそれぞれ水素結合している Gln190, Glu216 が、SpHex ではそれぞれ Arg162、His188 に対応している (図 1-33A, B, C)。SpHex の Arg162、His188 はサブサイト(-2)を遮っている (図 1-33B)。さらに、SpHex には His188 以降に、LNBase には存在しない 6 残基からなるループ (図 1-33B に magenta で表示) があり、ループ中の Asp191 (比較的保存されている (図 1-33C)) などの立体障害によって、サブサイト(-2)に Gal の入るスペースがない。このループはほとんどの β -HexNAcase に存在する。また、LNBase のサブサイト(-2)で Gal の O2,O3 と水素結合している Asn259 は、 β -HexNAcase では Asp や Gln であり基質と相互作用していなかった (図 1-33A, 1-38)。

4. 考察

4. 1. 変異体解析

表 1-7 は石川県立大学の片山高嶺教授から提供を受けた。マイナス側のサブサイトを構成するアミノ酸残基の重要性を調べるために、D320A, D320N, Y419F, H263F (図 1-32A, C) を作製し酵素学的パラメーターを求めた。触媒残基である Asp320 の変異体は K_m が上昇し k_{cat} が著しく低下した。この結果は GH20 の β -HexNAcase での対応する残基の変異体解析の結果とも一致する (SpHex の D313N/A, human HexB の D354N, PsHex の D321N)。Tyr419 は GlcNAc の 2 アセトアミド基の酸素原子と水素結合することで 2 アセトアミド基の位置の固定、ひいては GlcNAc のコンフォメーションに関与している (図 1-32C)。Y419F は比活性の低下により K_m は算出不能になり、 k_{cat} は著しく低下した。His263 はサブサイト(-2)の Gal とサブサイト(-1)の GlcNAc にまたがってスタッキング相互作用している (図 1-32A,B)。H263F は K_m が上昇し k_{cat} が著しく低下した。

4. 2. C-ドメイン

C-ドメインの構造的特徴

N-ドメインとバレルドメインの全体構造は、他の GH20 の β -HexNAcase と良く似ていた (図 1-30B, C)。しかし、C-ドメインは LNBBase にユニークなドメインであり、ほとんどの GH20 の酵素には存在しない。ただし、2 種類の GH20 β -HexNAcase は触媒ドメインの C 末側に触媒ドメインとは異なるドメインを持っている。*Serratia marcescens* 由来の β -Hexase (chitobiase) は 67 アミノ酸からなる Ig-like β -sandwich ドメイン (domain IV) を持ち(34)、また、*Streptococcus gordonii* (GcnA) は 227 アミノ酸からなる α -ヘリックスドメイン (domain III) を持つ(43)。しかし、LNBBase の C-ドメインとは全く似ていない。LNBBase の C-ドメインのうち残基番号 522 以降は、新規の β -trefoil (三つ葉) フォールドと呼ばれる構造だった (図 1-35B)。Dali サーバーによる立体相同性検索の結果、シバフタケ (*Marasmius oreades*) 由来の R 型レクチン (CBM13) (61) (図 1-35C) にやや似ていることが分かった (Z -score = 11.0, RMSD = 2.0 Å for 102 residues)。その一方で、C-ドメインは、アラビノースを結合する CBM42 と良く似た特徴をいくつか持っていた。

β -trefoil フォールドは、4 つのストランドからなる β -ヘアピン (図 1-35E) を持つ構造類似性の高い 3 つのサブドメインからなり、それら 3 つのサブドメインは 3 回対称軸を持つように組み合わせる。LNBBase の C-ドメインも、 α -サブドメイン (残基番号 522-550) , β -サブドメイン (残基番号 551-615) , γ -サブドメイン (残基番号 616-662) からなっていた (図 1-35A, B)。 α -サブドメインと γ -サブドメインの二次構造は不完全であり、1 つまたは 2 つの β ストランドを欠いていた。一方、 β -サブドメインは 4 つの β -ストランドを持つ典型的な β -trefoil フォールドの

サブドメインの体裁を成していた (図 1-35D)。全体としては、C-ドメインは大きく壊れた形をしていた。ところで、 β -サブドメインには、2 つの特徴があった。すなわち、Cys564 (β 2 内)と Cys589 (β 3 直後のループ内)の間にジスルフィド結合の存在と、 β 3 と β 4 の間に α -ヘリックスの存在である (図 1-35B, D)。この 2 つの特徴は、GH54 α -アラビノフラノシダーゼのアラビノース結合ドメイン (CBM42) と同様のものである(62)。CBM42 も部分的に 3 回対称軸を失っており、また、 α サブドメインにはアラビノース結合部がない。ただし、LNBBase の C ドメインは CBM42 よりもずっと壊れた構造だった。

C-ドメインの役割

GH20 の酵素の中には、LNBBase の C-ドメインに相当する部位を持つものがある。*Paenibacillus* sp. TS12 由来の GH20 β -HexNAcase (Hex1) である。しかし、Hex1 は、978 残基中 C 末端側から 476 残基削った部分 (Hex1- Δ C) の立体構造(44)しか明らかになっておらず、C 末端部分 (残基番号 503-978) の立体構造は分かっていない。ただし、Hex1 の C 末端部分は、酵素と糖スフィンゴ脂質 (基質) が、界面活性剤の非存在下で相互作用するのを助けることが活性測定によって示唆されている。Hex1 の C 末端部分と LNBBase の C-ドメインとのアミノ酸同一性はないが、LNBBase の C ドメインも、C ドメインの隣にある CBM32 ドメイン (残基番号 784-932、図 1-4, 図 1-30A) とは別に、基質認識に関わっている可能性はある。LNBBase の C-ドメインと CBM32 ドメインの配列同一性は 21% しかない。腸内細菌の糖質加水分解酵素の CBM32 ドメインは、基質の末端の Gal や GalNAc、または LacNAc や GlcNAc- α 1,4-Gal のような二糖の配列を認識することが示されている (63)。CBM32 の結合特異性は、以前に決定されたものよりも広いと予想されている。LNBBase の CBM32 ドメインは、 β -1,3 結合した Gal や、LNB、またそれ以外の HMO の構成糖に対して結合能を有している可能性がある。従って、C ドメインが CBM32 ドメインよりも厳密な基質認識をしている可能性も否定できない。しかしながら、本研究では C ドメインが糖結合能を有することを示すことは出来なかった。Lac や Gal、Glc、GlcNAc などの様々な糖と共結晶化を試し、またこれらの糖を最大 1 M の高濃度にした溶液に結晶をソーキングしたが、C ドメインに糖の電子密度は見えなかった。ただ、C ドメインは、結晶の非対称単位中で 7 つのアミノ酸と相互作用しておりダイマー形成に関わっていた (図 1-29)。従って、C-ドメインはペプチド結合能を有する可能性がある。また、C-ドメインの C 末端から 5 アミノ酸を欠失したコンストラクト (残基番号 37-658) は活性が大きく低下し、さらに欠失を増やすと完全に活性を失う (図 1-19, 1-22)。さらには、C 末端に His タグを付けるとタンパク質が発現しなかった (図 1-12 上)。これらのことから、C-ドメインは安定性に寄与していると考えられた。

4. 3. LNB のコンフォメーション

GH20 は、substrate-assisted 反応と呼ばれるアノマー保持型の反応機構をとることが分かっている (図 0-4、図 1-36)。まず、Asp によって分極された基質の 2-アセトアミド基の中のカルボニル酸素がアノマー炭素を求核攻撃するとともに、一般酸/塩基触媒の Glu が一般酸触媒として働いて脱離基が外れ、オキサゾリニウムイオン中間体を形成する。その後、一般酸/塩基触媒の Glu が一般塩基触媒として働くことで活性化された水が、アノマー炭素を求核攻撃することによって、反応産物ができる。

糖質関連酵素の反応機構を解析する上で、活性中心において基質である糖分子が触媒反応中にどのような動的挙動をとるかは大変重要である。本研究では、Cremer-Pople parameter を求めることによって (表 1-8、図 1-37)、この GH20 の反応機構における糖のコンフォメーション変化を予想することが出来た (図 1-36)。今回得られた結晶構造中の LNB と LNB チアゾリンはそれぞれ E・P 複合体とオキサゾリニウムイオン中間体に相当する状態である。特に LNB の GlcNAc は 4E と呼ばれる本来不安定であるはずの歪んだコンフォメーションをとっていた (図 1-32C)。現在、GH20 β -HexNAcase の様々な基質 (chitobiose など)、阻害剤 (GlcNAc チアゾリンなど)、反応産物 (GlcNAc など) が他の GH20 β -HexNAcase の結晶構造中に観測されていることが報告されている (表 1-8)。それらの Cremer-Pople parameter (ϕ , θ)を、LNBase の LNB と LNB チアゾリンの GlcNAc の parameter と合わせて、メルカトル法でプロットした (図 1-37)。その結果、GH20 の酵素のサブサイト(-1)に結合する GlcNAc は GH20 の反応機構において、「 ${}^{1,4}B(E \cdot S) \rightarrow {}^4E$ (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ると予測された (図 1-36)。

以下に本研究で明らかになった糖のコンフォメーションの詳細を反応の段階ごとに記す。

<LNB と LNB チアゾリンのコンフォメーション>

今回得られた構造では、非対称単位内に LNBase が 2 分子入っており、chain A,B の両方で、サブサイト(-1)で LNB の GlcNAc が歪んだコンフォメーションをとっていた。GlcNAc の Cremer-Pople parameter を求めると、chain A では $\phi = 247.5^\circ$, $\theta = 63.6^\circ$, $Q = 0.585$ 、chain B では $\phi = 251.4^\circ$, $\theta = 61.4^\circ$, $Q = 0.588$ だった。従って、今回得られた結晶構造中の LNB は 4E ($\phi = 240^\circ$, $\theta = 54.7^\circ$) に近いコンフォメーションをとっている (図 1-37)。一方、LNB チアゾリン の GlcNAc チアゾリンの Cremer-Pople parameter は、chain A で $\phi = 238.5^\circ$, $\theta = 13.3^\circ$, $Q = 0.547$ 、chain B で $\phi = 265.2^\circ$, $\theta = 17.7^\circ$, $Q = 0.595$ だった。これは 4C_1 ($\theta < 23^\circ$) で安定なコンフォメーションだった (図 1-37)。

結晶学的解析と分子シミュレーションによって、 4E は本来溶液中では不安定であることが分かっている(64,65)。LNB の GlcNAc が 4E という歪んだコンフォメーションをとっているのは、周囲のアミノ酸との相互作用によるものである (図 1-32C)。LNB の GlcNAc の 2 アセトアミド基は、3 つの芳香族アミノ酸 (Trp373, Trp394, Trp465) に囲まれている。さらに、Asp320, Tyr419 と水素結合している。このように位置を固定化された 2 アセトアミド基が、GlcNAc の

C1 を持ち上げている。また、Asp467 と O4 が水素結合することによって GlcNAc の C4 が持ち上がった位置に固定されている。

＜ミカエリスコンプレックスのコンフォメーション＞

これまで、GH20 β -HexNAcase と、アグリコンを持つ様々な基質との複合体構造が明らかにされてきた。*S. marcescens* 由来 Chitobiase と chitobiose (GlcNAc- β 1,4-GlcNAc) の E・S 複合体構造が観測されている (図 1-37 左下)。これは、触媒残基の変異体である D539A と E540D を用いてソーキングによって得られた構造である(34)。また、*Streptococcus pneumoniae* 由来の β -HexNAcase である StrH は巨大なマルチモジュールタンパク質であり、N 末モジュール (GH20A) と C 末モジュール (GH20B) からなる(66)。GH20A と二糖、GH20B と四糖、GH20B と四糖からなる分枝糖鎖の複合体構造が報告されている。ここでは、一般酸/塩基触媒の変異体である E361Q (GH20A)、E805Q (GH20B) が用いられている。

これらのサブサイト(-1)に結合した基質の GlcNAc はすべて $229^\circ < \phi < 254^\circ$, $\theta > 66^\circ$ であり、 ${}^{1,4}B$ (理想的には $\phi = 240^\circ$, $\theta = 90^\circ$) に近いコンフォメーションをとっていた。さらには、*Ostrinia furnacalis* 由来の野生型の β -HexNAcase と、その阻害剤である直鎖状の擬似 4 糖との複合体構造も報告されており、TMG-chitotriomycin の非還元末端にある *N,N,N*-trimethyl-D-glucosamine も ${}^{1,4}B$ に近いコンフォメーション ($\phi = 244.2^\circ$, $\theta = 84.5^\circ$) をとっていた。従って、ミカエリスコンプレックスの基質のコンフォメーションは ${}^{1,4}B$ であると考えられる。

＜遷移状態コンフォメーション＞

β -HexNAcase の阻害剤として、 sp^2 混成軌道を持つアノマー炭素有する、遷移状態アナログである δ -ラクトン (PUGNAc) も用いられる。ヒトリソソームの Hex B との複合体構造中では、 δ -ラクトンは 4E ($236^\circ < \phi < 252^\circ$, $48^\circ < \theta < 64^\circ$) に近いコンフォメーションをとっていた(40)。PUGNAc は substrate-assisted 反応を行う酵素に対してだけでなく、GH3 などの典型的な保持型機構をとる β -HexNAcase に対しても強く阻害する。*O. furnacalis* と *Paenibacillus* sp. TS12 由来の β -HexNAcase との複合体構造中では、PUGNAc は 4E から ${}^{1,4}B$ ($240^\circ < \phi < 245^\circ$, $60^\circ < \theta < 78^\circ$) のコンフォメーションをとっていた(67,68)。

この結果は、GH20 の酵素が 4E に近い遷移状態を通ることを強く支持している。保持型 GH の反応中に 2 度起こる遷移状態では、糖のピラノース環の C2, C1, O5, C5 が同一平面上にある、オキシカルベニウムイオン様の状態をとるとされている (図 1-36) ため、矛盾しない。この結果は、GH18 の Chitinase の反応機構に対して行われた QM/MM 計算による基質のコンフォメーション変化予想(69)や、GH84 の O-GlcNAcase の PUGNAc (遷移状態のアナログの阻害剤) を用いた結晶学的解析の結果(70)と一致している。

＜中間体のコンフォメーション＞

GlcNAc チアゾリンと GalNAc チアゾリンは、substrate-assisted 反応の中間体であるオキシゾリニウムイオンと構造的に似ているため、この反応機構をとる GH を特異的に阻害する(71,72)。最近の研究で、非経験的分子動力学 (ab initio molecular dynamic; AIMD) 法を用いて、中間体のコンフォメーションが 4H_3 / 4E / 4H_5 の範囲で歪んでいると予測されている(73)。し

かしながら、GH20 β -HexNAcase ではチアゾリン阻害剤は常に 4C_1 ($\theta < 23^\circ$)に近いコンフォメーションをとる(36,39,41,43,74)。本研究でも LNB チアゾリンのコンフォメーションは 4C_1 だった。これらの豊富な結晶学的データによって、オキサゾリニウムイオン中間体は 4C_1 であると考えられる (36)。

<E・P 複合体のコンフォメーション>

GH20 の β -HexNAcase では、反応産物である GlcNAc や GalNAc との複合体構造がいくつか報告されているが、糖のコンフォメーションや結合様式は様々である。*Paenibacillus* sp. TS12 由来の β -HexNAcase (Hex1) の複合体構造中では、GlcNAc は 4C_1 だったが、GalNAc は ${}^{1,4}B$ だった(67)。また、野生型の SpHex では GlcNAc は 4C_1 だったが、変異体 D313A では GlcNAc は 4C_1 と ${}^{1,4}B$ の両方が観察された。さらに、変異体 D313N では GlcNAc は 4C_1 だったが、野生型で観察された GlcNAc の結合位置から傾いてずれていた(38)。これらの糖は、酵素による基質認識が弱いため、E・S コンプレックスと同等か、あるいは、溶液中での安定状態にあるものと見なせる。

本研究の LNBase では、2つの理由から LNB 中の GlcNAc が 4E に固定されたと推測している。1つ目の理由は、サブサイト(-2)に結合している Gal が LNB を活性中心の最適な位置に固定するアンカーになっていると考えられることである (図 1-32A, 1-33A)。2つ目の理由は、GlcNAc の O4,O6 と Asp467 の間にある水素結合によって、 4E になり、さらに6位のヒドロキシメチル基のコンフォメーションがゴーシュ・ゴーシュ型 (図 1-34) に固定され安定化すると考えられることである (図 1-32C)。この2点は、 β -HexNAcase には見られず、LNBase に特徴的なものである。

GH20 の β -HexNAcase に関する研究と本研究の結果を合わせると、GH20 酵素の中でも LNBase の substrate-assisted 反応における糖のコンフォメーション変化の道筋は、 ${}^{1,4}B$ (E・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・P) のようになると予想される (図 1-36)。

4. 4. LNBase の生物学的意義

B. bifidum JCM1254 がタイプ I 型 HMO を分解する際、LNBase は HMO から LNB を切り出すのに中心的な役割を果たす (図 1-2, 1-3, 1-39A)。しかし、HMO を分解するには、LNBase だけでなく、フコースやシアル酸のような修飾糖を取り除く他の酵素も必要である (図 1-2, 1-39A)。*B. bifidum* JCM1254 からは、LNBase 以外にも HMO 分解に関わる多くの菌体外グリコシダーゼが見つかっている。GH95 1,2- α -L-fucosidase (AfcA)(75,76)、GH29 1,3-1,4- α -L-fucosidase (AfcB)(77,78)、そして GH33 exo- α -sialidase (SiaBb1, SiaBb2)(79)は、それぞれ α 1,2-、 α 1,3/4-結合したフコース、そしてシアル酸修飾された HMO を完全に分解する役割を分けあっている (図 1-2、図 1-39A)。本研究によって、LNBase の構造基盤が明らかになり、基質特異性を考察するための情報が得られた。LNB が別の糖で修飾されていると LNBase

の活性中心に入ることができない。なぜなら、LNBBase は、LNB に特化した基質結合ポケット（サブサイト (-2), (-1)）を持っており（図 1-31）、このポケット内では LNB の全ての OH 基が水素結合で認識されているからである（図 1-32A）。この特徴は、GNB/LNB トランスポーターの糖結合タンパク質（GL-BP）が、修飾されていない LNB を特異的に認識する性質と矛盾しない（25）。GL-BP は、LNB を含む主要な四糖（LNT）に対する結合は弱い（ $K_d = 11 \text{ mM}$ ）のに対し、LNB と GNB に対する結合は強い（ $K_d < 0.09 \text{ mM}$ ）ことが分かっている。LNB は菌体内に取り込まれると、GNB/LNB ホスホリラーゼやその他の酵素によって代謝される（図 1-3）。しかしながら、LNBBase のアグリコンの結合部位（プラス側のサブサイト）は広がっており、様々な官能基が入れるように見える（図 1-31A）。このことから LNBBase は、様々なタイプ I 型 HMO がフコシダーゼとシアリダーゼに処理された後に作用するものであると考えられる（図 1-2, 1-39A）。

さらに、*B. bifidum* JCM1254 は次の 3 つの菌体外酵素を持っている（80）。GH2 β -galactosidase (BbgIII)、GH20 β -HexNAcase (BbhI, BbhII)である。BbgIII と BbhI は、タイプ II 型 HMO である LNT を単糖になるまで完全分解するので、タイプ II 型 HMO を分解するのに重要な役割を果たしていると考えられる（図 1-39B）。また、BbhII は、LNB と LNT の中の β -1,3 結合した Gal は加水分解しないが、 β -1,4、 β -1,6 結合した Gal は加水分解するので、LNBBase が作用した後のタイプ I 型 HMO の完全分解（例えば、LNT から遊離した Lac の分解）に関わっていると考えられる。

以上のことから、LNBBase はタイプ I 型 HMO の LNT から LNB を切り出すこと、また、その作用は菌体内に取り込まれる直前になされるという位置付けが明白である。

B. bifidum JCM1254 に対して、*B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 は LNBBase の遺伝子は持っていないことが分かっている（図 1-2、図 1-40）。*B. longum* subsp. *infantis* のゲノム解析によって、ユニークな遺伝子クラスター（HMO クラスター）が同定されている（81,82）（図 1-40）。この HMO クラスターには、シグナル配列を持たない菌体内の様々なグリコシダーゼが含まれている。GH29 fucosidase、GH95 fucosidase、GH33 sialidase、GH20 β -HexNAcase、GH2 β -galactosidase、さらに少なくとも 4 つの糖トランスポーターの推定遺伝子が HMO クラスター内に見つかっている。GH2 β -galactosidase はラクトースとタイプ II 型 HMO に特異性を示す（83）。さらに、菌体内酵素である GH42 β -galactosidase Bga42A は HMO クラスターから離れているが、LNT に高い特異性を示し、タイプ I 型 HMO に働く唯一の β -galactosidase である。実際、MALDI-FTICR MS 解析によって、*B. longum* subsp. *infantis* を含むいくつかの乳幼児からの単離菌が、3 糖から 8 糖の HMO を丸ごと菌体内に取り込み、菌体内のグリコシダーゼによって内部で分解することが示唆されている（84）。

このように、腸内細菌の最近の研究によって、ビフィズス菌の菌株ごとに異なる HMO 代謝の様式が明らかにされている。ビフィズス菌の菌体外酵素である LNBBase は、先天的に LNBBase を持たない他のビフィズス菌株の HMO 代謝を助けているとも考えられる。

本研究では、サブサイト(-2)において、 β -1,3 結合した Gal を認識するのに重要な残基(Gln190、Glu216 など)を同定した(図 1-33A)。これらの残基が保存されているか否かが、推定遺伝子が LNBase 活性を持つかどうかを予測する重要な指標になる。乳児の腸内細菌がどのように HMO を代謝しているのかをより深く知るためには、そのゲノム内に LNBase が存在するか否かが、重要な情報になりうる。

さらにごく最近、石川県立大学の片山高嶺教授のグループによって、*B. longum* JCM1217 から全く新規な LNBase が発見された(85)。本研究の対象である LNBase とは全く異なる活性化機構を持ち、基質特異性も広い。LNBase に関する研究が今後もより発展していくことが期待される。

5. 図表

表 1-1 様々な細菌の LNB_{ase} 活性

Species	Strain	LNB-releasing activity ^b
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	JCM1275	—
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	JCM7046	—
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	JCM7096	—
<i>Bifidobacterium animalis</i>	JCM10602	—
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	JCM1254	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	JCM1255	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	JCM7004	+
<i>Bifidobacterium breve</i>	JCM1192	—
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	JCM1194	—
<i>Bifidobacterium dentium</i>	JCM1195	—
<i>Bifidobacterium longum</i>	JCM1210	—
<i>Bifidobacterium longum</i>	JCM1217	+
<i>Bifidobacterium longum</i>	JCM1222	—
<i>Bifidobacterium longum</i>	JCM7054	+
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	JCM1200	—
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	JCM1205	—
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	JCM12489	—
<i>Bacteroides ovatus</i>	JCM5824	—
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	JCM5827	—
<i>Clostridium celatum</i>	JCM1394	—
<i>Clostridium hylemonae</i>	JCM10539	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM1290	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM3816	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM3817	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM3818	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM3819	—
<i>Clostridium scindens</i>	JCM6567	—
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	JCM8732	—
<i>Eubacterium limosum</i>	JCM6421	—
<i>Lactobacillus casei</i>	JCM1134	—
<i>Lactobacillus gasseri</i>	JCM1130	—
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	JCM8794	—
<i>Lactobacillus paracasei</i>	JCM1181	—
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	—
<i>Lactobacillus reuteri</i>	JCM1112	—
<i>Propionibacterium acnes</i>	JCM6425	—
<i>Ruminococcus productus</i>	JCM1471	—

^a Overnight culture of each bacterial strain grown in the basal lactose medium was examined for the ability to liberate LNB from lacto-*N*-tetraose. The reaction conditions are described in Materials and Methods.

^b +, detected; —, not detected.

(29)より改変して転載。

表 1-2 本研究で用いた LNBase の酵素活性

Sugar	Substrate ^a	Relative activity (%)
<i>p</i> NP sugars	<u>Galβ1,3GlcNAcβ</u> - <i>p</i> NP (LNB-β- <i>p</i> NP)	100 ^b
	<u>Galβ1,3GalNAcβ</u> - <i>p</i> NP (GNB-β- <i>p</i> NP)	30
	GlcNAcβ- <i>p</i> NP	ND ^c
	GalNAcβ- <i>p</i> NP	ND
	<u>Galβ1,3GlcNAcα</u> - <i>p</i> NP	ND
	<u>Galβ1,3GalNAcα</u> - <i>p</i> NP	ND
PA sugars		
LNT	<u>Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc</u> -PA	100 ^d
GA1	<u>Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glc</u> -PA	ND
LNFP I	<u>Fucα1,2Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc</u> -PA	ND
LNFP II	<u>Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc</u> -PA	ND
LNnT	<u>Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc</u> -PA LacNAc	ND

(29)より改変して転載。

LNBase は、フコシル化などの修飾をうけていない、LNT のようなオリゴ糖の LNB 部分を特異的に遊離する。

表 1-3 Native LNBase(N-His)と Se-Met LNBase(N-His)の精製表

		protein (mg)	activity (U)	Specific Activity (U /mg)	Yield (%)	purification (fold)
2nd try	Crude extract	833	658	0.790	100	1.00
	After Ni affinity	113	419	3.70	13.6	4.68
	After monoQ	85.7	593	6.91	10.3	8.75
	After superdex	25.5	106	4.17	3.06	5.28
3rd try	Crude extract	581	769	1.32	100	1.00
	After Ni affinity	160	813	5.07	27.6	3.83
	After monoQ	50.8	333	6.57	8.73	4.96
	After superdex	32.3	149	4.60	5.56	3.48
4th try (Se-Met)	Crude extract	412	198	0.480	100	1.00
	After Ni affinity	65.1	127	1.96	15.8	4.07
	After monoQ	48.5	115	2.37	11.8	4.94
	After superdex	15.0	35.5	2.37	3.64	4.93

		protein (mg)	activity (U)	Specific Activity (U /mg)	Yield (%)	purification (fold)
5th try	Crude extract	2.04×10^3	1.58×10^3	0.775	100	1.00
	After Ni affinity	108	269	2.49	5.30	3.21
	After ResourcePHE	36.5	206	5.65	1.80	7.29
	After monoQ 1	2.74	17.3	6.31	0.134	8.14
	After monoQ 2	8.29	52.4	6.32	0.407	8.15
	After superdex	8.21	58.7	7.16	0.403	9.24

		protein (mg)	activity (U)	Specific Activity (U /mg)	Yield (%)	purification (fold)
6th try (Se-Met)	Crude extract	336	1.26×10^3	3.74	100	1.00
	After Ni affinity	63.0	427	6.77	18.8	1.81
	After monoQ	16.6	147	8.87	4.94	2.37
	After superdex	7.87	70.0	8.89	2.34	2.38
7th try (Se-Met)	After Ni affinity	6.92	35.8	5.17	100	1.00
	After monoQ	1.81	10.3	5.73	26.2	1.11
	After superdex	0.429	2.72	6.33	6.20	1.22

1 回目の精製表はない。2、3、5 回目は、Native LNBase(N-His) の精製、4、6、7 回目は、Se-Met LNBase(N-His) の精製である。X 線回折データが得られたのは、2、3、4 回目の精製で得られた結晶である。5 回目の精製では別の結晶化条件を探索するため、疎水カラムを追加して精製度を上げたところ、同じ条件で結晶が出た。しかし、再現性が低く、6、7 回目の精製を試みたが結晶は出来なかった。

表 1-4 LNBase(N-His)の X 線回折データ測定結果と精密化の結果

	Native	Selenomethionine		
		Peak	Edge	Remote
Data collection				
Date	2007/11/16		2008/5/20	
Beamline	PF-AR NW12A		PF-AR NW12A	
Space group	<i>C</i> 2		<i>P</i> 2 ₁	
Wavelength (Å)	1.0	0.97920	0.97939	0.96416
Cell dimensions				
unit cell (Å)	a = 235.113	a = 110.224	a = 110.296	a = 110.316
	b = 231.141	b = 202.657	b = 202.812	b = 202.874
	c = 110.891	c = 118.325	c = 118.446	c = 118.508
β (degree)	102.888	100.921	100.917	100.902
Resolution (Å)	50.0-1.80	50.0-2.90	50.0-2.90	50.0-2.90
	(1.86-1.80)	(3.00-2.90)	(3.00-2.90)	(3.00-2.90)
Total reflections	1,955,506	855,296	823,097	861,566
Unique reflections	528,515	112,539	112,753	113,364
Completeness (%)	99.9 (99.8)	100 (100)	100 (100)	99.9 (99.7)
R _{merge} (%)	5.6 (28.8)	8.6 (27.1)	9.4 (36.8)	10.9 (50.9)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	24.1 (3.20)	24.5 (6.45)	20.5 (4.53)	16.6 (2.78)
Redundancy	3.7 (3.5)	7.6 (7.4)	7.6 (7.3)	7.6 (6.6)

非対称単位に 8~9 分子が含まれていた。Se-Met の置換率も低く、位相決定できなかった。

表 1-5 Native LNBase(B1)と Se-Met LNBase (B1)の精製表

		protein (mg)	activity (U)	Specific Activity (U /mg)	Yield (%)	purification (fold)
1st try	Crude extract	1624	779	0.480	100	1.0
	After Ni affinity	208	218	1.05	12.8	2.19
	After monoQ (<u>A peak</u>)	10.2	84.8	8.29	0.630	17.3
	After monoQ (<u>B peak</u>)	29.6	234	7.92	14.2	16.5
	<u>A peak</u> after superdex	0.826	4.95	6.00	0.0509	12.5
	<u>B peak</u> after superdex	8.74	85.6	9.80	0.538	20.4
2nd try	Crude extract	1708	1653	0.968	100	1.0
	After Ni affinity	76	346	4.57	4.40	4.72
	After monoQ (<u>A peak</u>)	9.9	72.3	7.33	0.578	7.6
	<u>A peak</u> after superdex	5.07	52.0	10.2	0.297	10.6

		protein (mg)	activity (U)	Specific Activity (U /mg)	Yield (%)	purification (fold)
3rd try (Se-Met)	Crude extract	325	723	2.23	100	1
	After Ni affinity	24	86.0	3.54	7.5	1.6
	After monoQ (<u>A peak</u>)	3.3	23.1	6.98	1.0	3.1
	After monoQ (<u>B peak</u>)	9.5	83.0	8.74	2.9	3.9
	<u>A peak</u> after superdex	1.67	22.0	13.2	0.52	5.9
	<u>B peak</u> after superdex	5.32	56.9	10.7	1.6	4.8

		protein (mg)	Specific Activity (U /mg)	Yield (%)	purification (fold)
4th try (Native protein for LNB-thiazoline complex)	Crude	1453	0.326	100	1
	After Ni affinity	119	1.08	8.2	3.3
	After monoQ (<u>A peak</u>)	6.13	0.190	0.42	0.58
	<u>A peak</u> after superdex	5.36	1.10	0.37	3.4

1、2 回目は Native LNBase(B1) の精製、3 回目は Se-Met LNBase (B1)の精製である。

1 回目の精製後のスクリーニングで新たな結晶化条件が見つかった。もう一度同じ精製を試み、結晶化条件の精密化などを行った。3 回目の精製でも同じ条件で良質な結晶が得られた。

表 1-6 LNBase(B1)の X 線回折データ測定結果と精密化の結果

Dataset	Selenomethionine-labeled	LNB	LNB-thiazoline
	Peak		
PDB entry		4H0H	4JAW
Data collection statistics			
Wavelength (Å)	0.97898	1.00000	1.00000
Space group	$P2_12_12$	$P2_12_12$	$P2_12_12$
Unit cell (Å)	$a = 117.3$	$a = 116.8$	$a = 116.5$
	$b = 131.6$	$b = 131.0$	$b = 131.6$
	$c = 104.6$	$c = 104.4$	$c = 104.8$
Resolution (Å) ^a	50.0–2.20	50.0–1.80	50.0–1.80
	(2.28–2.20)	(1.86–1.80)	(1.83–1.80)
Total reflections	607,378	1,107,867	1,106,951
Unique reflections	158,438	148,717	150,089
Completeness (%) ^a	100 (99.9)	100 (100)	100 (100)
Redundancy ^a	3.8 (3.8)	7.4 (7.4)	7.4 (7.3)
Mean $I/\sigma(I)$ ^a	14.22(3.41)	27.64 (4.67)	23.97 (4.85)
R_{merge} (%) ^a	10.0 (31.2)	7.9 (28.1)	10.2 (48.5)
Refinement statistics			
Resolution range (Å)		47.51-1.80	43.61-1.80
No. of reflections		141,195	141,665
R -factor/ R_{free} (%)		15.5/19.1	18.2/21.3
RMSD from ideal values			
Bond lengths (Å)		0.028	0.027
Bond angles (°)		2.503	2.365
Average B -factor (Å ²)			
Protein (chain A/B)		16.0/15.7	11.6/11.3
Ligand (chain A/B)		11.5/10.1	11.6/9.12
Water		26.6	12.3
SO ₄ ²⁻		32.3	23.8
Ramachandran plot (%) ^b			
Favored (chain A/B)		97.8/97.3	98.3/98.4
Allowed (chain A/B)		1.7/2.4	1.7/1.4
Outlier (chain A/B)		0.5/0.3	0.0/0.2

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.^b Calculated by RAMPAGE (86).

表 1-7 LNB_{ase} の変異体解析結果（石川県立大学の片山高嶺先生によるご提供）

Enzyme	$K_m (\times 10^{-6} \text{ M})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\times 10^3 \text{ s}^{-1}/\text{M})$
Wild-type	99 ± 11	15 ± 1	160 ± 10
H263F	120 ± 20	0.15 ± 0.01	1.3 ± 0.1
D320A	130 ± 20	0.0068 ± 0.0005	0.052 ± 0.006
D320N	380 ± 50	0.011 ± 0.001	0.028 ± 0.002
Y419F	— ^b	0.086^c	—

^a Activities of pNP-LNB hydrolysis were measured in 50 mM McIlvaine buffer (pH 4.5) at 30°C.

^b The K_m value was too low to be determined.

^c The $v/[E]_0$ value at 100 μM substrate.

表 1-8 GH20 の結晶構造中のサブサイト(-1)で観測された基質/アナログ/阻害剤の

Cremer-Pople parameter

PDB ID	Ligand ID	Compound	Mutant	Chain	ϕ (°)	θ (°)	Q	Conformation	Source	Reference
4H04	NAG	LNB		A	247.470	63.644	0.585	4E	<i>B. bifidum</i>	This study
4H04	NAG	LNB		B	251.352	61.383	0.588	4E	<i>B. bifidum</i>	
4JAW	NAG	LNB-thiazoline		A	238.5	13.3	0.547	4C_1	<i>B. bifidum</i>	
4JAW	NAG	LNB-thiazoline		B	265.2	17.7	0.595	4C_1	<i>B. bifidum</i>	
3GH5	NAG	GlcNAc			261.633	32.872	0.535	4C_1	<i>Paenibacillus</i>	(67)
3GH7	NGA	GalNAc			233.515	73.927	0.610	${}^{1,4}B$	<i>Paenibacillus</i>	(74)
3SUR	NGT	GlcNAc-thiazoline			265.191	20.827	0.544	4C_1	<i>Paenibacillus</i>	
3SUS	GNL	GalNAc-thiazoline			272.771	21.675	0.529	4C_1	<i>Paenibacillus</i>	
3SUT	OAN	PUGNAc			244.782	71.669	0.642	${}^{1,4}B$	<i>Paenibacillus</i>	
3SUU	OGN	Gal-PUGNAc			240.037	77.549	0.665	${}^{1,4}B$	<i>Paenibacillus</i>	
1C7S	NAG	Chitobiose	D539A		253.513	82.192	0.701	${}^{1,4}B$	<i>S. marcescens</i>	(35)
1C7T	NAG	Chitobiose	E540D		242.568	71.230	0.675	${}^{1,4}B$	<i>S. marcescens</i>	
1QBB	NAG	Chitobiose			249.976	75.197	0.570	${}^{1,4}B$	<i>S. marcescens</i>	(34)
2EPN	NGT	GlcNAc-thiazoline		A	262.954	10.635	0.544	4C_1	<i>S. gordonii</i>	(43)
2EPN	NGT	GlcNAc-thiazoline		B	266.450	16.590	0.529	4C_1	<i>S. gordonii</i>	
1HP5	NGT	GlcNAc-thiazoline			261.955	16.681	0.502	4C_1	<i>S. plicatus</i>	(36)
1JAK	IFG	GalNAc-isofagomine			261.462	23.479	0.486	4C_1	<i>S. plicatus</i>	(37)
1M01	NAG	GlcNAc			280.435	20.601	0.567	4C_1	<i>S. plicatus</i>	(38)
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		A	268.869	22.153	0.500	4C_1	Human HexA	(41)
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		B	267.590	20.312	0.499	4C_1	Human HexA	
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		C	270.334	21.061	0.501	4C_1	Human HexA	
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		D	269.961	21.619	0.501	4C_1	Human HexA	
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		E	268.586	21.297	0.501	4C_1	Human HexA	
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		F	267.868	20.941	0.501	4C_1	Human HexA	
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		G	268.100	21.216	0.502	4C_1	Human HexA	
2GK1	NGT	GlcNAc-thiazoline		H	268.147	21.183	0.500	4C_1	Human HexA	
1NOW	IFG	GalNAc-isofagomine		A	270.925	30.487	0.480	4C_1	Human HexB	(39)
1NOW	IFG	GalNAc-isofagomine		B	273.959	29.040	0.479	4C_1	Human HexB	
1NP0	NGT	GlcNAc-thiazoline		A	270.935	20.738	0.500	4C_1	Human HexB	
1NP0	NGT	GlcNAc-thiazoline		B	262.023	21.024	0.503	4C_1	Human HexB	
1O7A	GDL	GlcNAc- δ -lactone		A	246.079	53.300	0.506	4E	Human HexB	(40)
1O7A	GDL	GlcNAc- δ -lactone		B	240.693	63.850	0.550	4E	Human HexB	
1O7A	GDL	GlcNAc- δ -lactone		C	245.045	48.146	0.512	4E	Human HexB	
1O7A	GDL	GlcNAc- δ -lactone		D	246.349	51.368	0.508	4E	Human HexB	
1O7A	GDL	GlcNAc- δ -lactone		E	236.233	60.229	0.549	4E	Human HexB	
1O7A	GDL	GlcNAc- δ -lactone		F	251.401	51.687	0.511	4E	Human HexB	
3NSN	TMX	TMG-chitotriomycin			244.242	84.479	0.698	${}^{1,4}B$	<i>O. furnacalis</i>	(87)
3OZP	OAN	PUGNAc			243.983	60.045	0.579	4E	<i>O. furnacalis</i>	(68)
2YL8	NAG	GlcNAc- β 1,2-Man	E361Q		229.403	73.325	0.663	${}^{1,4}B$	<i>S. pneumoniae</i> GH20A	(66)
2YL9	NAG	GMMG ^a	E805Q	A	244.339	69.480	0.644	${}^{1,4}B$	<i>S. pneumoniae</i> GH20B	
2YL9	NAG	GMMG ^a	E805Q	B	241.779	75.362	0.671	${}^{1,4}B$	<i>S. pneumoniae</i> GH20B	
2YL9	NAG	GMMG ^a	E805Q	C	238.834	66.265	0.592	${}^{1,4}B$	<i>S. pneumoniae</i> GH20B	
2YL9	NAG	GMMG ^a	E805Q	D	244.105	88.744	0.677	${}^{1,4}B$	<i>S. pneumoniae</i> GH20B	
2YLA	NAG	NGAB2 ^a	E805Q	B	231.112	77.225	0.608	${}^{1,4}B$	<i>S. pneumoniae</i> GH20B	

(次頁に続く)

(前頁からの続き)

^aGlcNAc-β1,2-Man-α1,3-Man-β1,4-GlcNAc

^aBisected glycan GlcNAc-β1,2-Man-α1,3 (GlcNAc-β1,2-Man-α1,6 (GlcNAc-β1,4-))-Man-β1,4-GlcNAc

Cremer-Pople parameter calculator (<http://asfushi.hp.infoseek.co.jp/>)を用いた。

NAG は GlcNAc、NGA は GalNAc、NGT は NAG-thiazoline、IFG は GalNAc-isofagomine、GDL は δ-lactone (2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone) の略称である。

また、ligand 名の後ろの A、B などのアルファベットは結晶の非対称単位に含まれる分子のことである。

図 1-37 でこの表をグラフ化した。

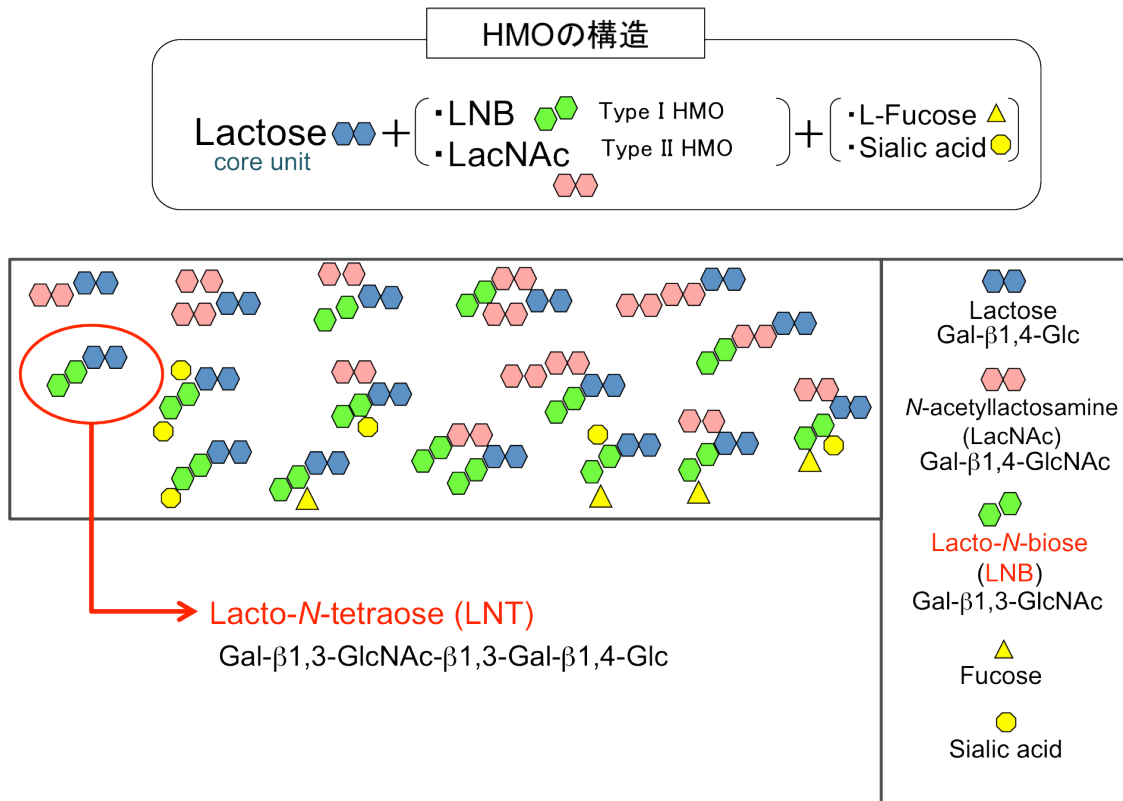


図 1-1 HMO の構造

ヒトの母乳は約 7%の糖質を含む。そのうち 80%を Lactose、20%を 130 種類からなる HMO が占めている。HMO は、ラクトースを基本単位とし、LNB や LacNAc、シアル酸やフコースが結合した、多様な構造を持つ。主要な HMO の 1 つがラクト-*N*-テトラオースであり、LNBase は LNT を基質とする。LNB の構造は図 1-7 に示した。

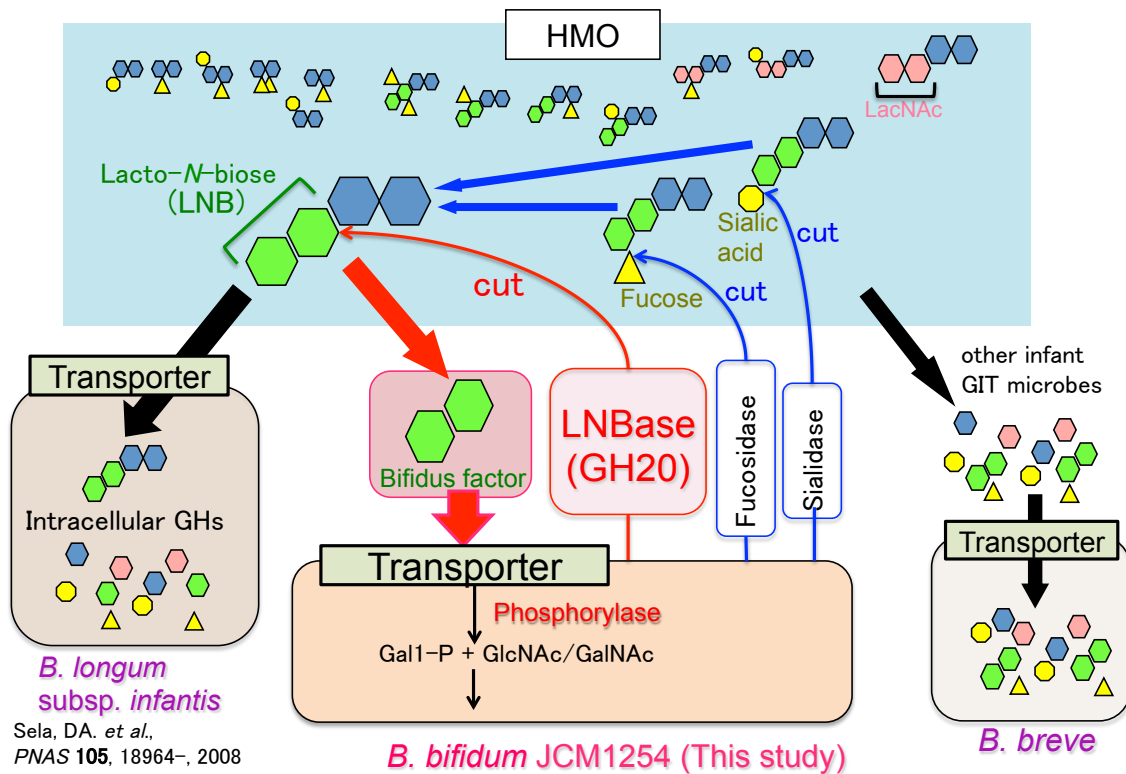


図 1-2 3 種のビフィズス菌の異なる HMO 利用

B. bifidum JCM1254 は、必要に応じてフコシダーゼやシアリダーゼによって LNB 部分の修飾糖を取り除いた上で、LNBase によって LNT のような糖の LNB 部分を遊離し取り込む。一方、*B. longum* subsp. *infantis* は 4 糖以上の HMO を丸ごと取り込み菌体内にある様々なグリコシダーゼによって分解することが分かっている(81)。また、*B. breve* は他の腸内細菌によって分解された糖を取り込んでいると考えられている。

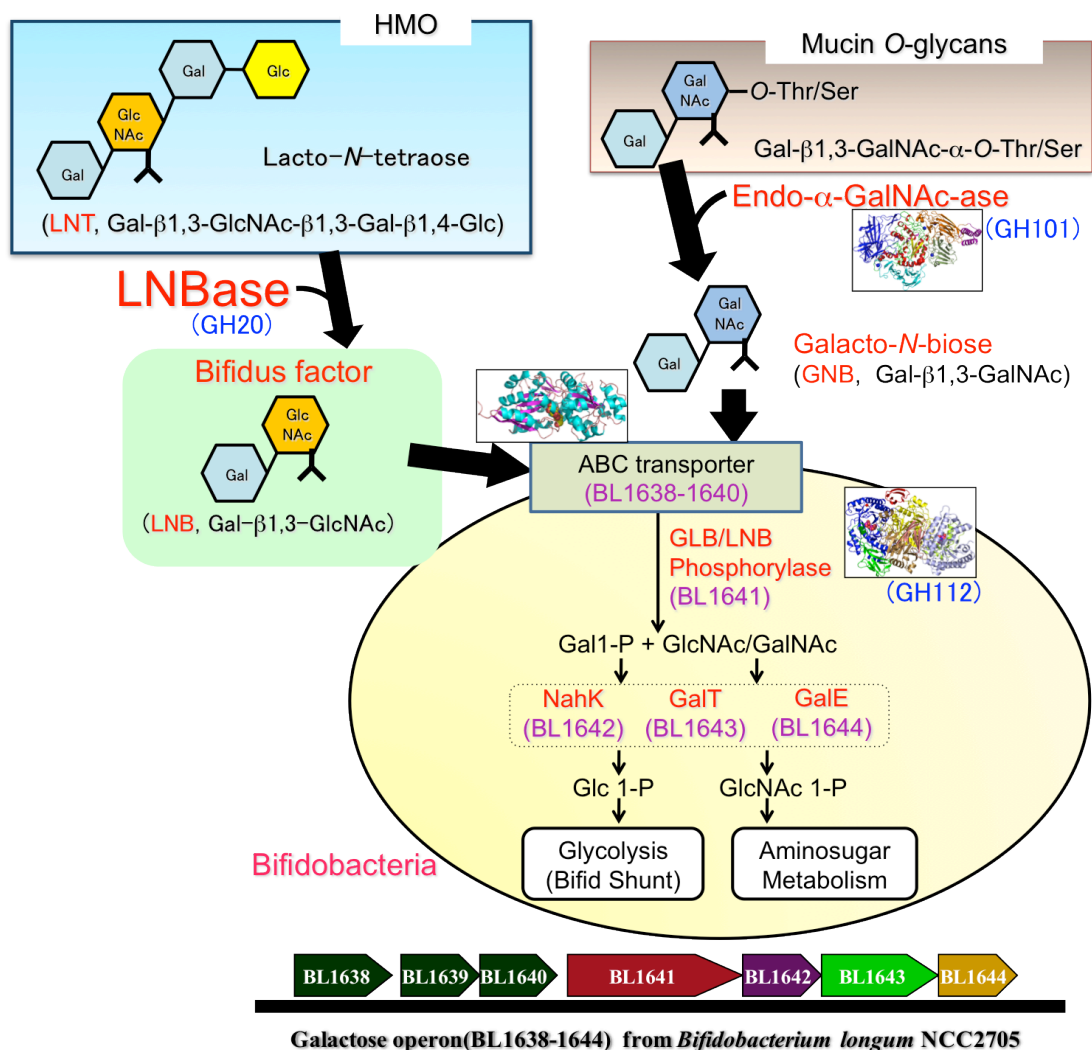


図 1-3 ビフィズス菌の LNB/GNB に特異的な代謝経路

NahK: *N*-acetylhexosamine 1-kinase, GalT: UDP-glucose hexose 1-phosphate uridylyltransferase, GalE: UDP-glucose 4-epimerase.

このオペロン中には LNBase は存在しないが、LNBase を持つビフィズス菌はこの経路を使うと考えられる。

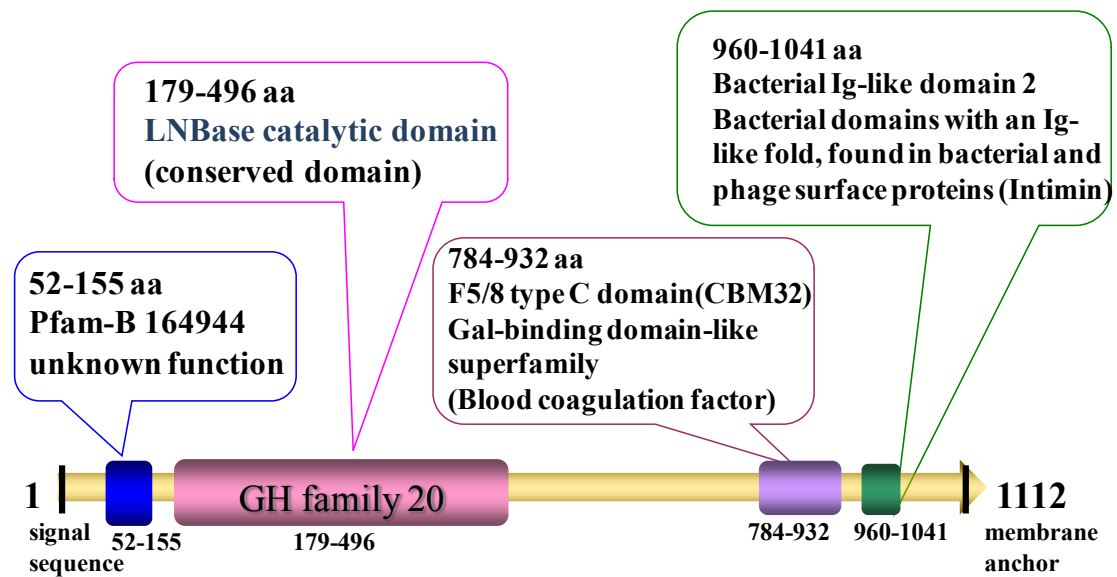


図 1-4 *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株由来の LNBBase のドメイン構成

本研究では、Pfam-B ドメインと GH20 ドメインを含む部分に当たるフラグメントを構造解析した（図 1-30A に改めて記載）。

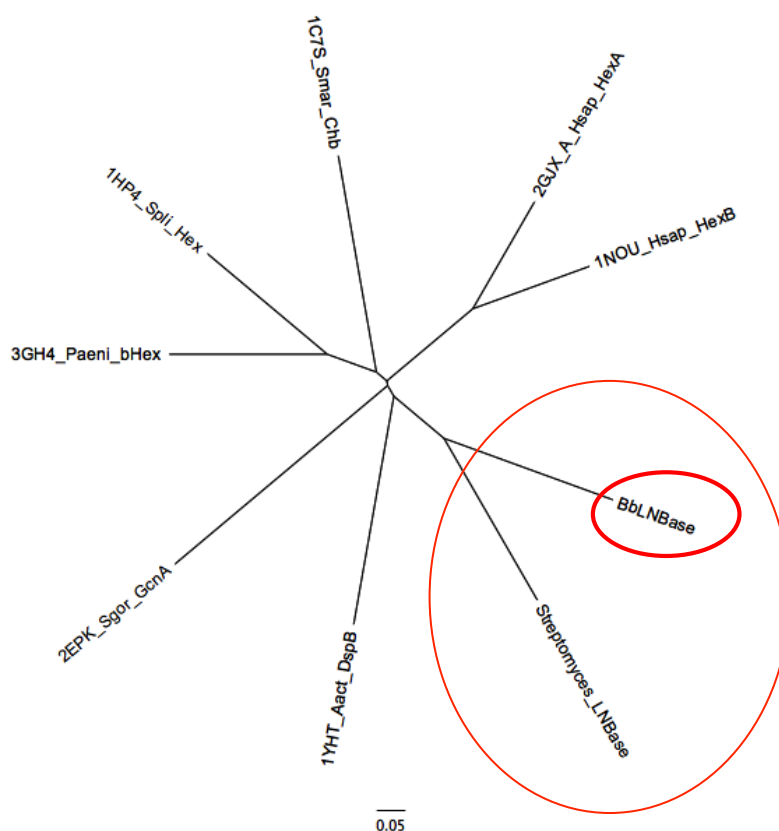


図 1-5 GH20 酵素の系統樹

細い赤丸で囲んだのが LNBase である。太い赤丸は本研究で用いた LNBase である。
β-HexNAcase とは進化的にやや距離がある。

BbLNBase, *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 LNBase;
Streptomyces_LNBase, *Streptomyces* sp. 142 由来の LNBase;
Aact_DspB, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* DspB;
Sgor_GcnA, *Streptococcus gordonii* GcnA;
Paeni_bHex, *Paenibacillus* sp. TS12 PsHex;
Spli_Hex, *Streptomyces plicatus* N-acetyl-β-glucosaminidase;
Smar_Chb, *Serratia marcescens* chitobiase;
Hsap_HexA, *Homo sapiens* HexA α-chain;
Hsap_HexB, *Homo sapiens* HexB β-chain
最初の 4 文字は PDB ID

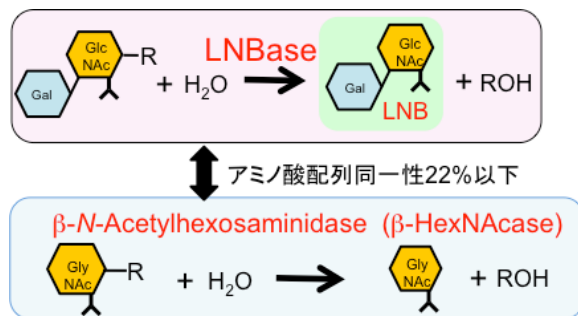


図 1-6 GH20 酵素の反応式

上：LNBBase の加水分解反応…非還元末端から 2 糖である LNB を生成する。

下： β -HexNAcase の加水分解反応…非還元末端の単糖を分解し遊離する。

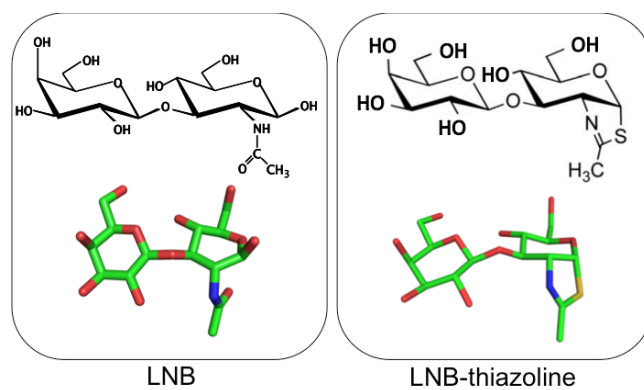


図 1-7 LNB と LNB チアゾリンの構造

左：ラクト-*N*-ビオース (Gal- β 1-3-GlcNAc)

右：LNB チアゾリン (Gal- β 1-3-GlcNAc-thiazoline)

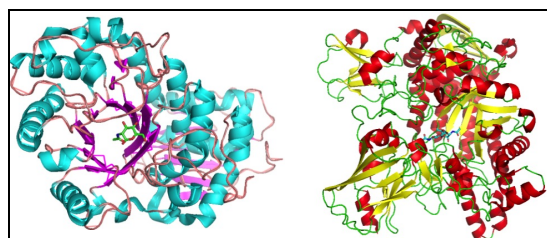


図 1-8 GH20 で立体構造が明らかになっているものの例

左：N-acetyl- β -hexosaminidase from *Streptomyces plicatus* (**SpHex**、PDB: 1M01)

右：chitobiase from *Serratia marcescens* (**SmChb**、PDB: 1C7S)

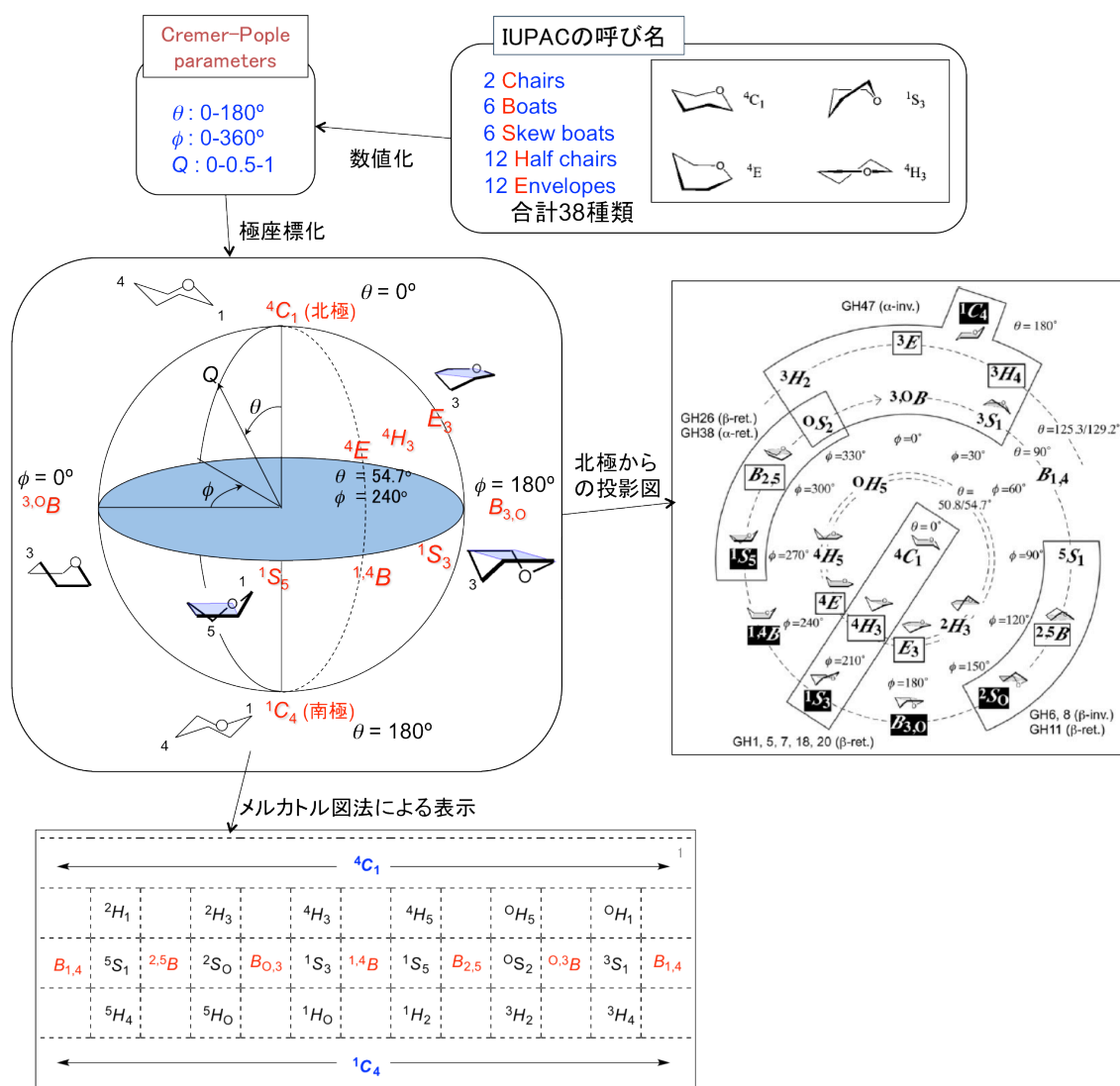


図 1-9 Cremer-Pople パラメーターによる糖のコンフォメーションの表示法

IUPAC 命名法における糖ピラノース環配座を Cremer-Pople parameter に変換すると球座標表示できるようになる。この球座標を'北極'から投影した図や、メルカトル図法による表示もなされる (Cremer-Pople parameter calculator (<http://www.ric.hi-ho.ne.jp/asfushi/>) と CAZypedia(http://www.cazypedia.org/index.php/Conformational_itinerary) より改変して転載)。GH ファミリー毎に、反応の過程で、基質である糖がどのような旅程 (itinerary) でコンフォメーション変化するかが研究されている。一部の GH ファミリーの itinerary が真ん中右図の投影図上で示されている(88)。

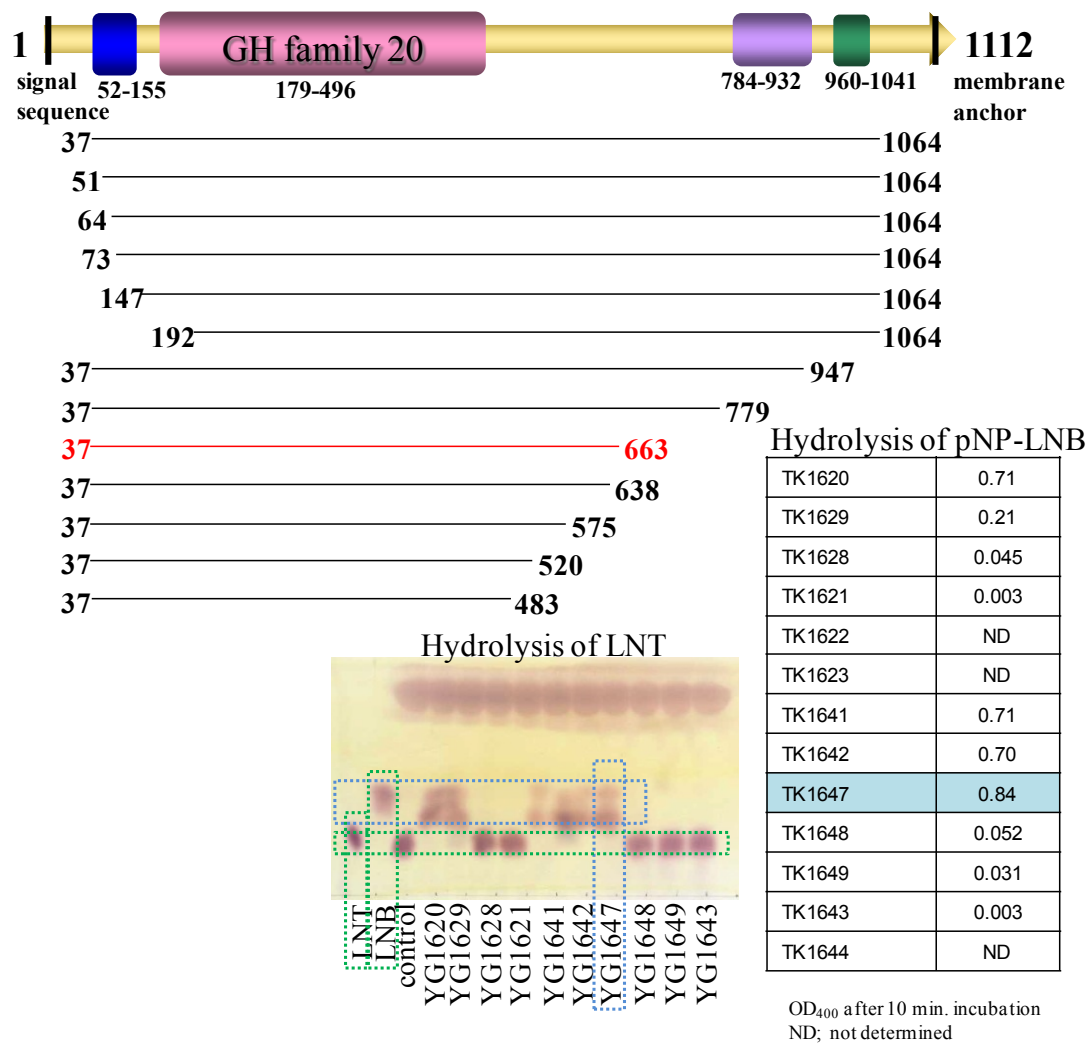


図 1-10 LNBBase 遺伝子からの切り出しとそれぞれの活性比較

片山先生は図のようなコンストラクトを作り、それぞれに対して、TLC や pNP-β-LNB による活性確認を行った。その中で、最も活性が高かった TK1647（残基番号 37-663）の提供を受けた。

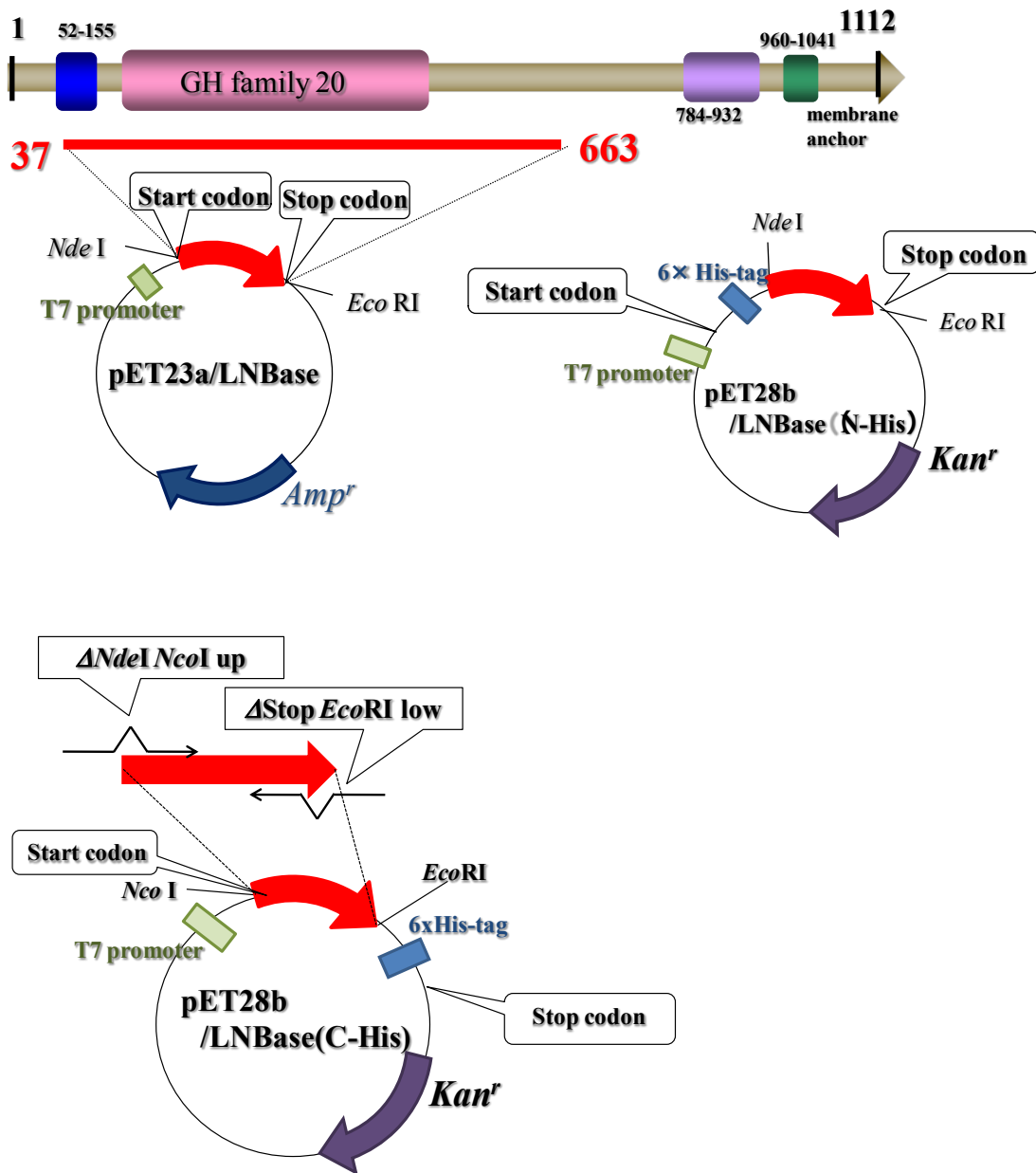


図 1-11 用いた発現プラスミド

左上：片山先生から提供を受けたプラスミド (pET23a-LNBase)

右上：N 末端に His タグを付けたプラスミド (pET28b-LNBase(N-His))

下：C 末端に His タグを付けたプラスミド (pET28b-LNBase(C-His))

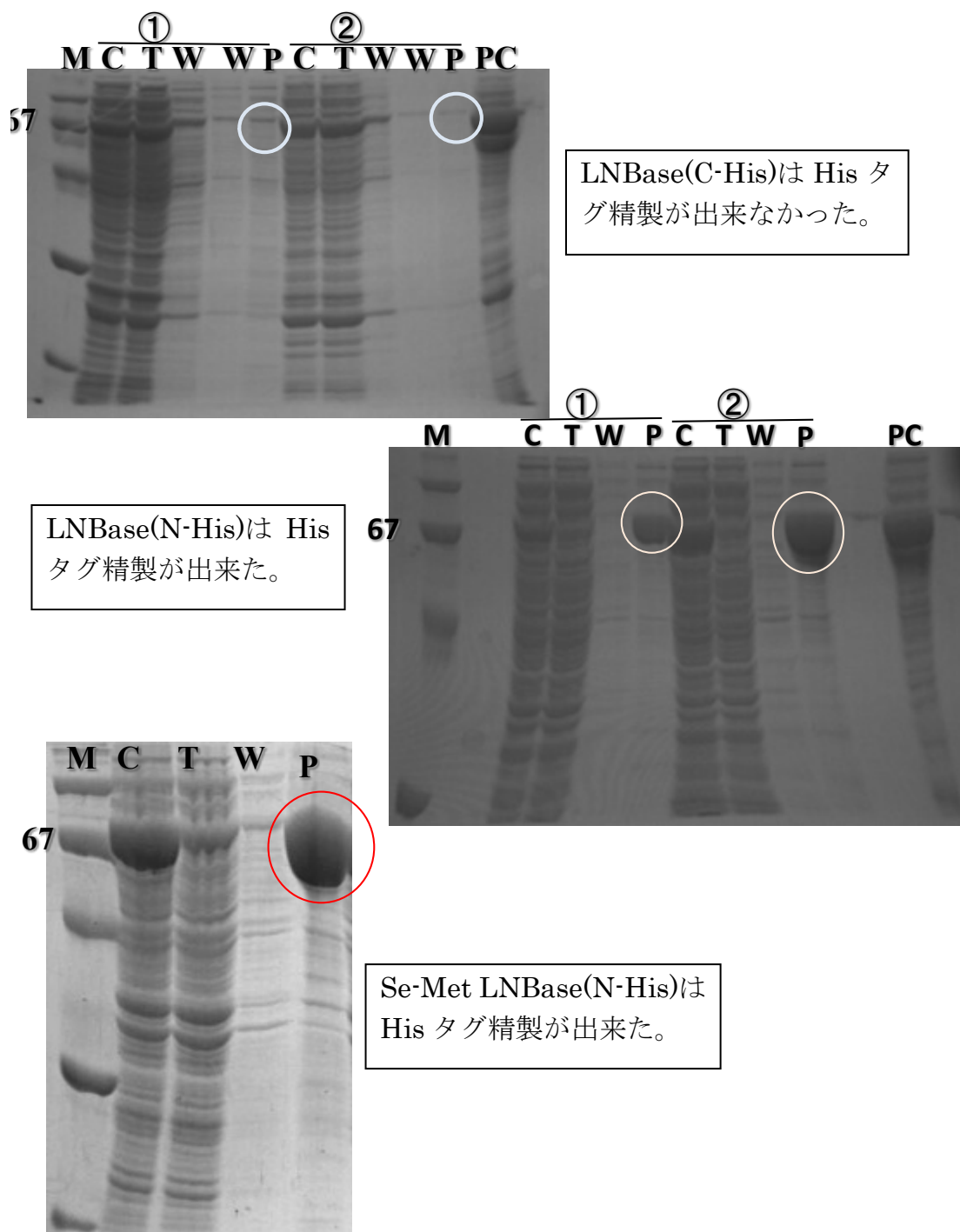


図 1-12 HisLink™ Resin を用いて行ったバッチ法による発現/精製の確認、
LNBBase(C-His) (上)、LNBBase(N-His) (中)、Se-Met LNBBase (下)
M:マーカー、C:クルード、T:フロースルー、W:ウォッシュ、P:ピュア、PC:ポジ
ティブコントロール (ヒスチジンタグのついていない LNBBase のクルード)。

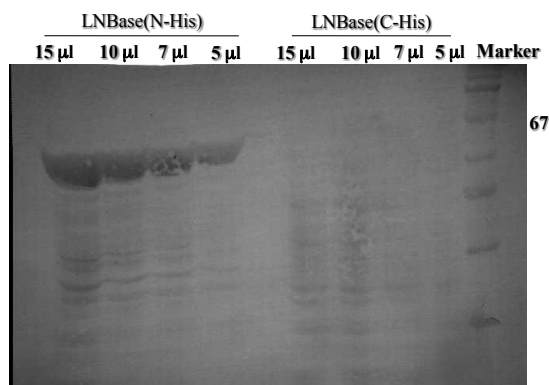


図 1-13 ウェスタンブロッティングの結果
LNBase(C-His)には His タグが付いていなかった。

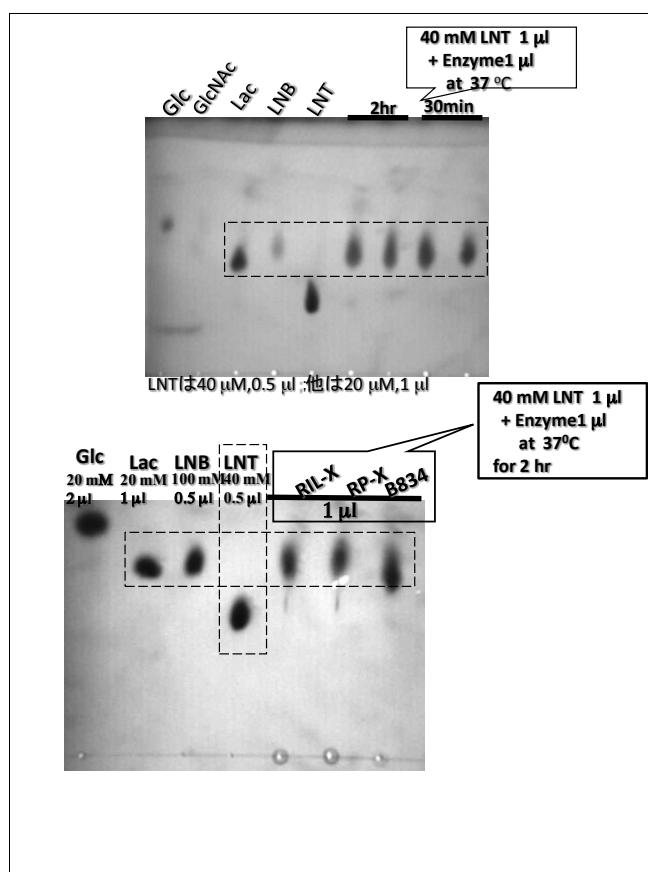


図 1-14 TLC による活性確認
上 : LNBase(N-His)、下 : LNBase(Se-Met)
いずれも LNBase 活性が確認出来た。

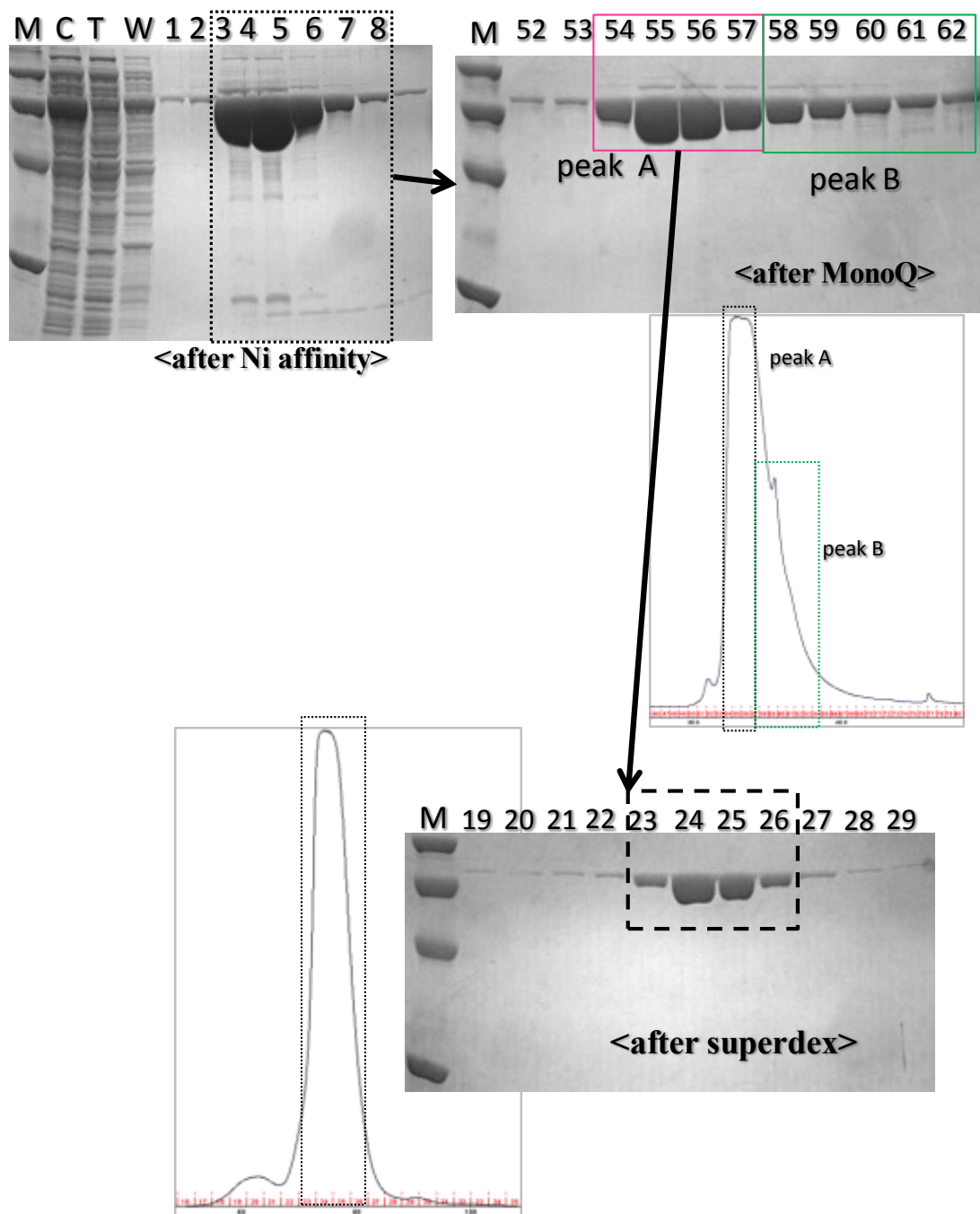


図 1-15 LNBase(N-His)の精製パターン

Ni アフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムの順で精製した。

Protein	MW	logMW	eluted (ml)	stock solution	take (ul)
Thyroglobulin	669000	5.825426	48.3	8mg/ml	230
Apo ferritin	443000	5.646404	54.8	25mg/ml	276
β -Amylase	200000	5.30103	61.6	4mg/ml	460
BSA	66000	4.819544	73.7	10mg/ml	230
Carbonic Anhydrase	29000	4.462398	85.9	3mg/ml	345

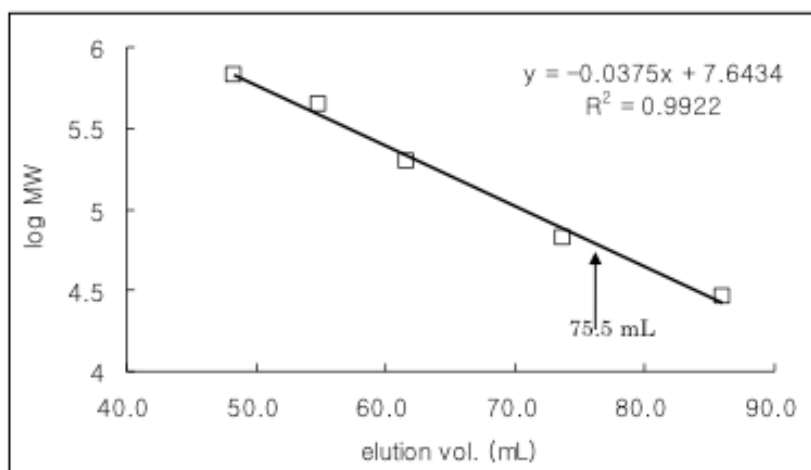


図 1-16 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる
溶出体積に対する分子量の対数プロット

上：用いたマーカーの内容。

下：このプロットから LNBase の分子量は 64.9 kDa (溶出体積 75.5 mL) と見積もられた。

用いた LNBase のフラグメントの分子量の理論値は 70.0 kDa だったので、溶液中では単量体であることが分かった。

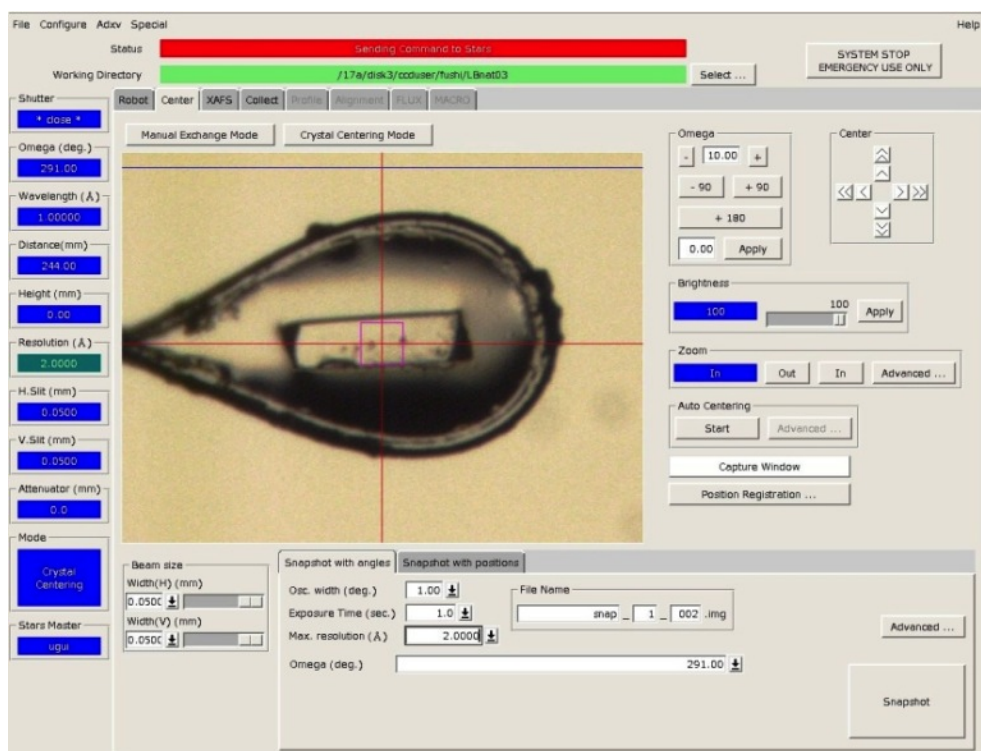
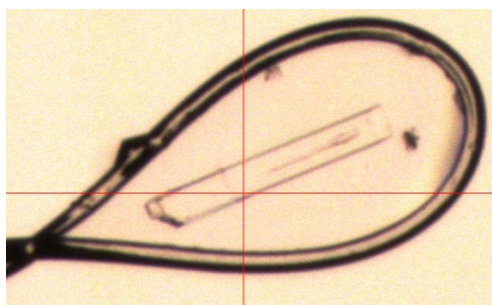
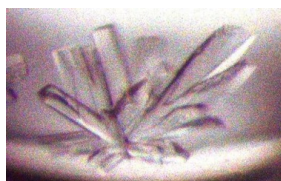


図 1-17 得られた結晶と回折強度データ収集

上：再現性が低く、非対称単位内の分子数が 8~9 個であった Native 結晶、中：クライオ
ループですくった結晶、下：回折強度データ収集中の HKL2000 の画面

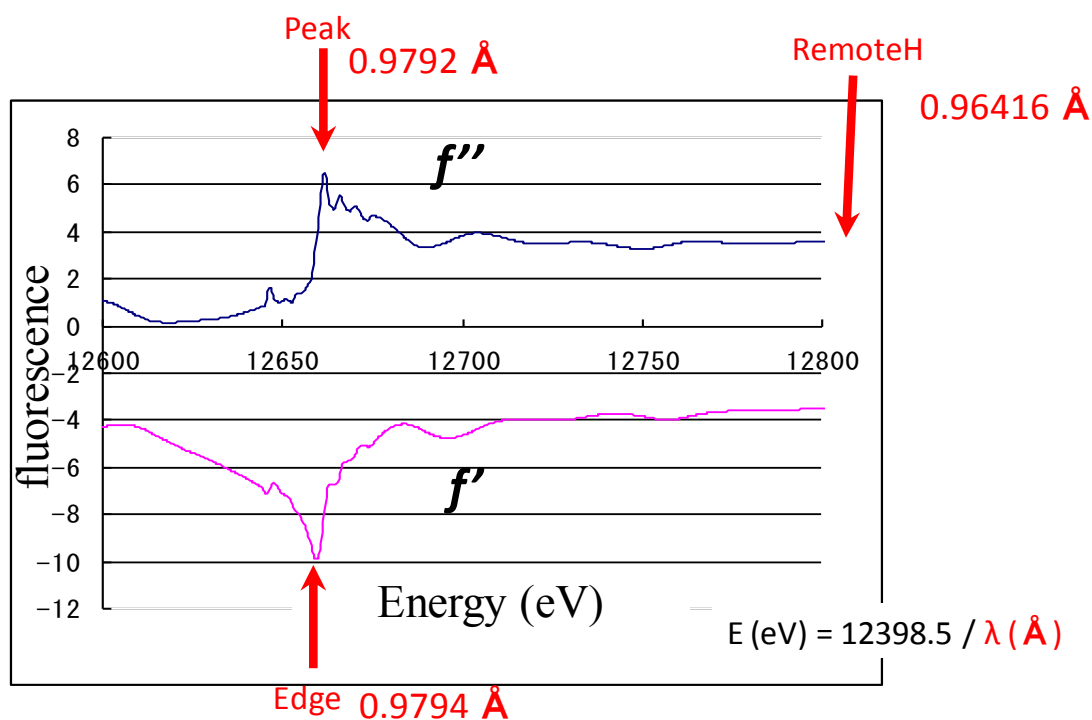


図 1-18 Se-Met LNBase(N-His)結晶に対して Se の吸収端付近の波長の X 線を当てた際の蛍光スペクトル (XAFS データ)

これを基に異常分散効果の大きい 3 波長 (Peak, Edge, Hi-Remote) を選んだ。しかし、位相が決定できなかった。理由は、結晶の非対称単位内に含まれる分子数が 8~9 個と多かったこと、あるいは Se-Met 置換率が低い可能性などが考えられた。

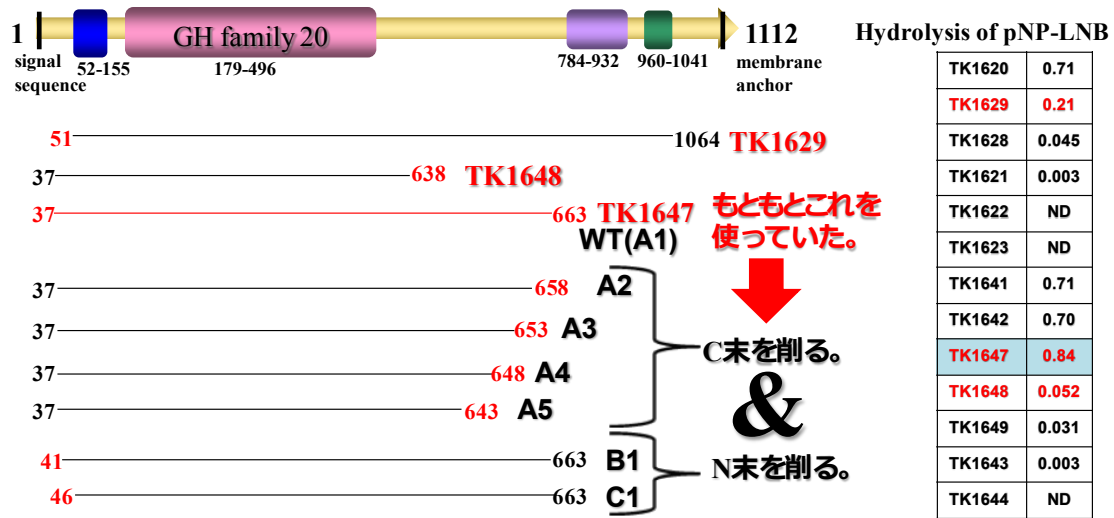


図 1-19 新たなコンストラクトの設計

図 1-10 に示した片山先生が行った実験結果を参考にして、コンストラクトをどこまで削ってよいか決めた。TK1629 から N 末端を残基番号 46 番まで、TK1648 から C 末端を残基番号 643 番まで削ることにした。

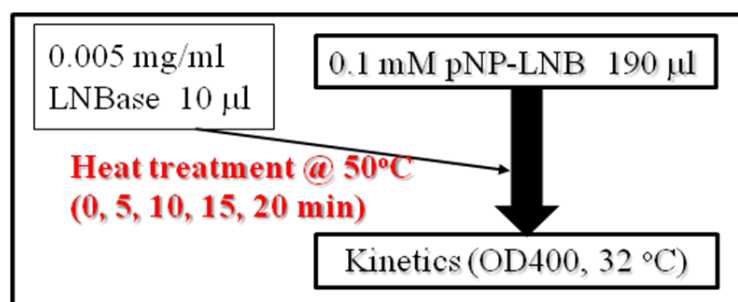


図 1-20 各コンストラクトの熱安定性の測定方法

ここに記した酵素濃度は終濃度である。

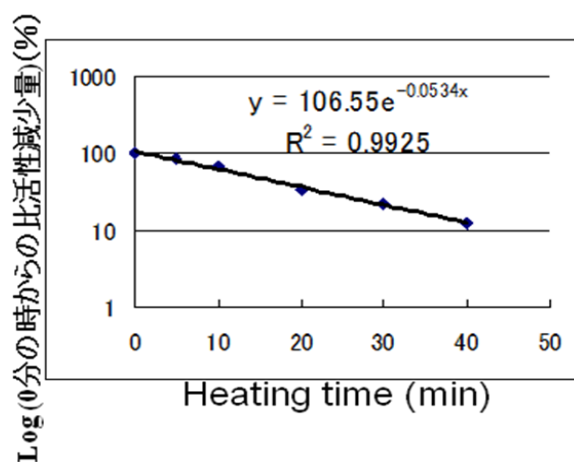


図 1-21 熱処理の時間に対する Wild type の比活性減少量の対数プロット

同様のことを A1、B1、C1 に対しても行い、半減期を求めた。

	U/mg	half-life(min)
WT	2.16±0.39	14.9
A1	1.03	15.2
A2	0.0779	ND
A3	ND	ND
A4	ND	ND
B1	1.96±0.223	17.3
C1	1.62±0.15	11.0

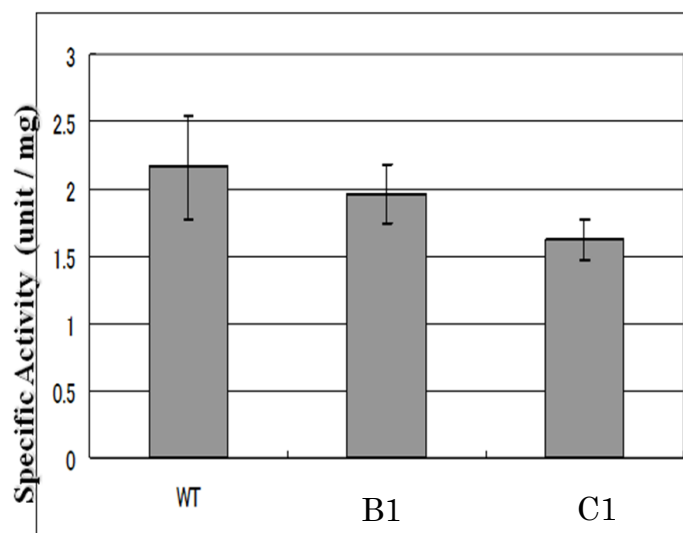


図 1-22 各コンストラクトの比活性と半減期

上 : A1 (コントロール)、B1、C1 以外は活性がほとんどなくなった。

下 : Wild Type、B1、C1 の比活性の棒グラフ。

以下の実験では B1 を用いた。

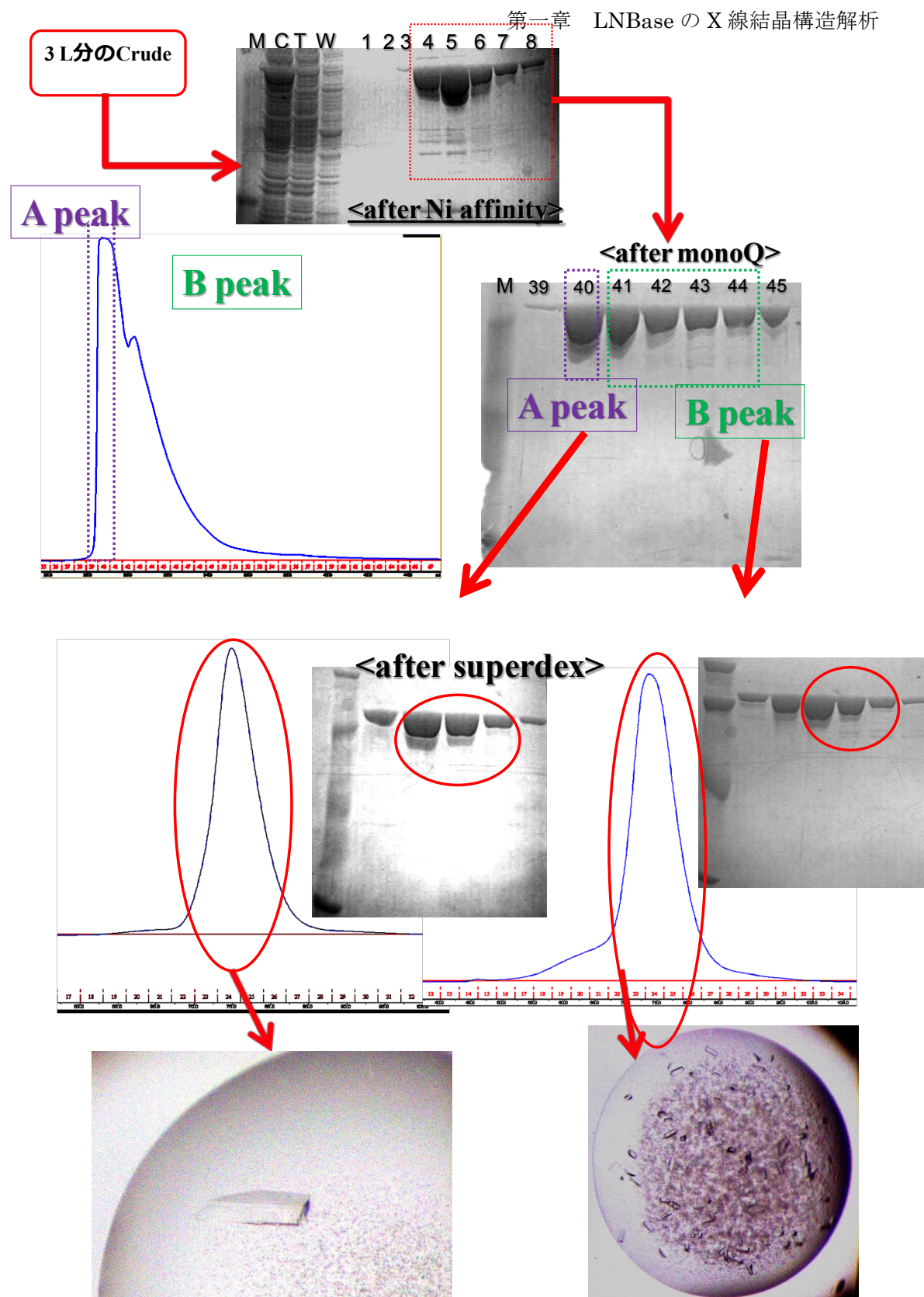


図 1-23 LNBase(B1)の精製パターン

図 1-15 とほとんど同様の精製パターンだが、コンストラクトを短くした結果、良質な結晶が得られた。

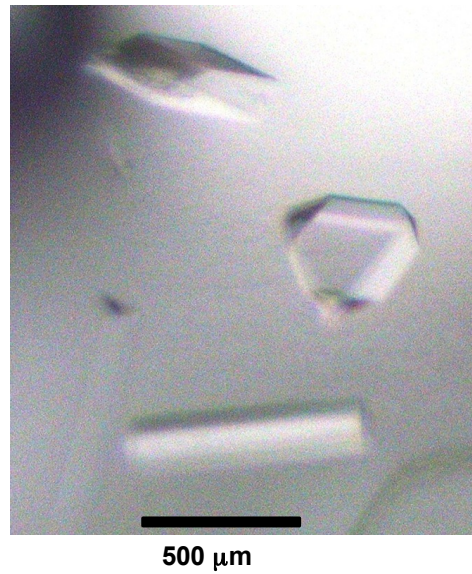


図 1-24 LNBBase の結晶の顕微鏡写真
細長い柱状の結晶だった。

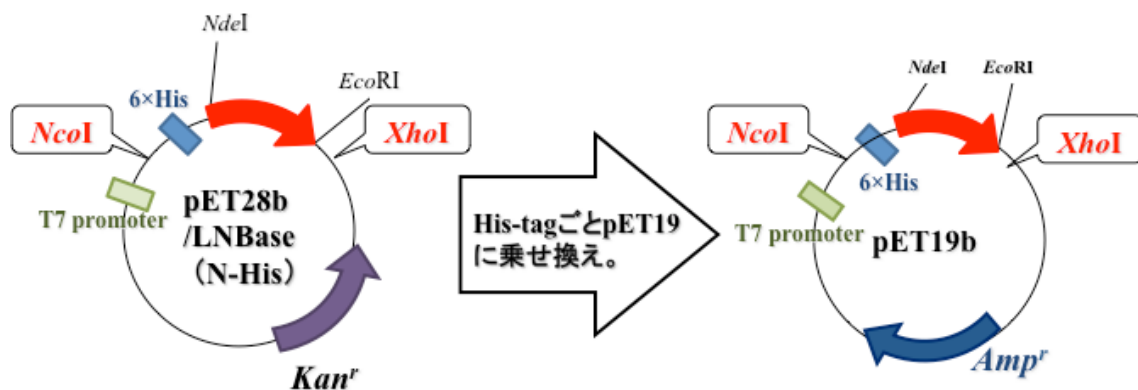


図 1-25 Se-Met LNBBase の発現用に
用いたプラスミド (pET19-LNBBase(B1)) の作製

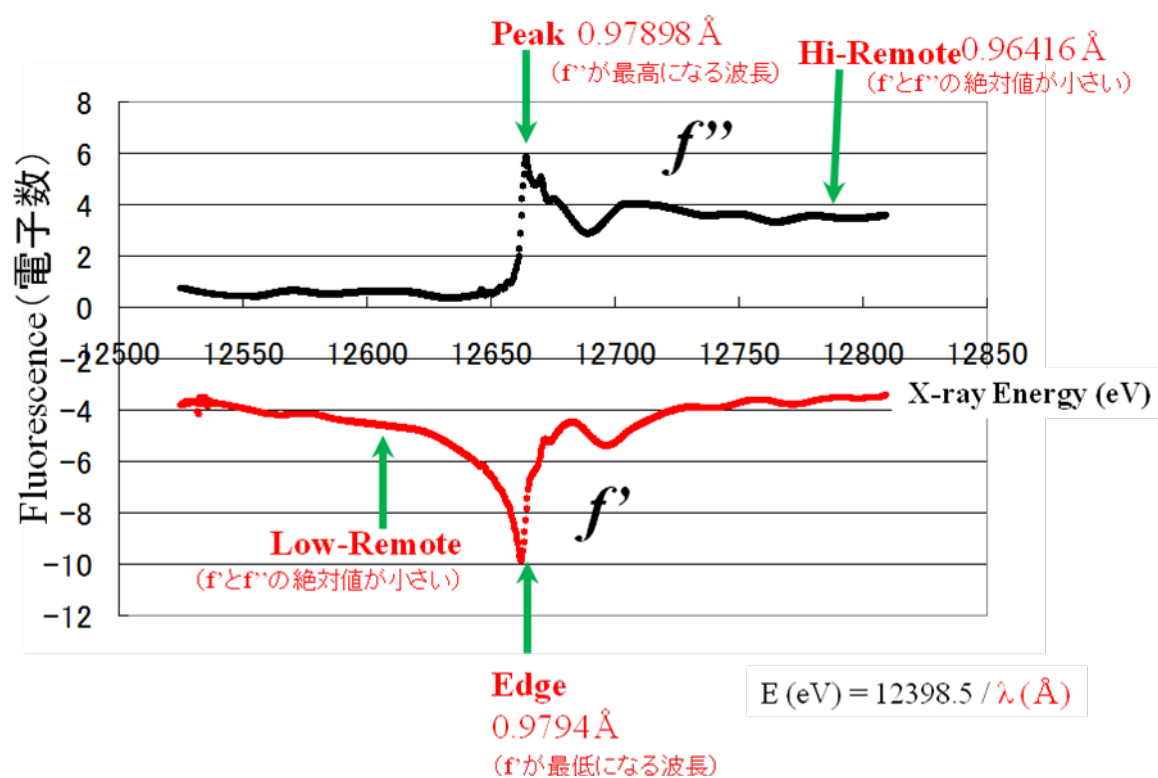


図 1-26 Se-Met LNBase(B1)結晶に対して Se の吸収端付近の波長の X 線を当てた際の蛍光スペクトル (XAFS データ)

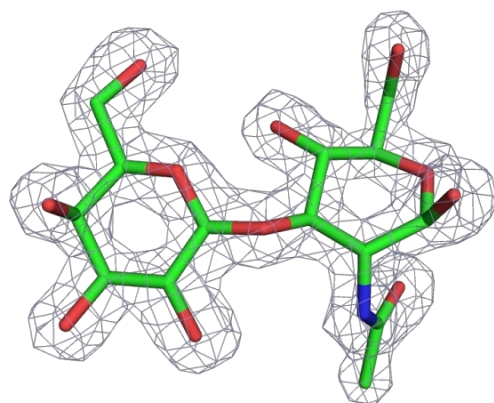


図 1-27 LNB の $|F_o| - |F_c|$ オミットマップ (4.0 σ)

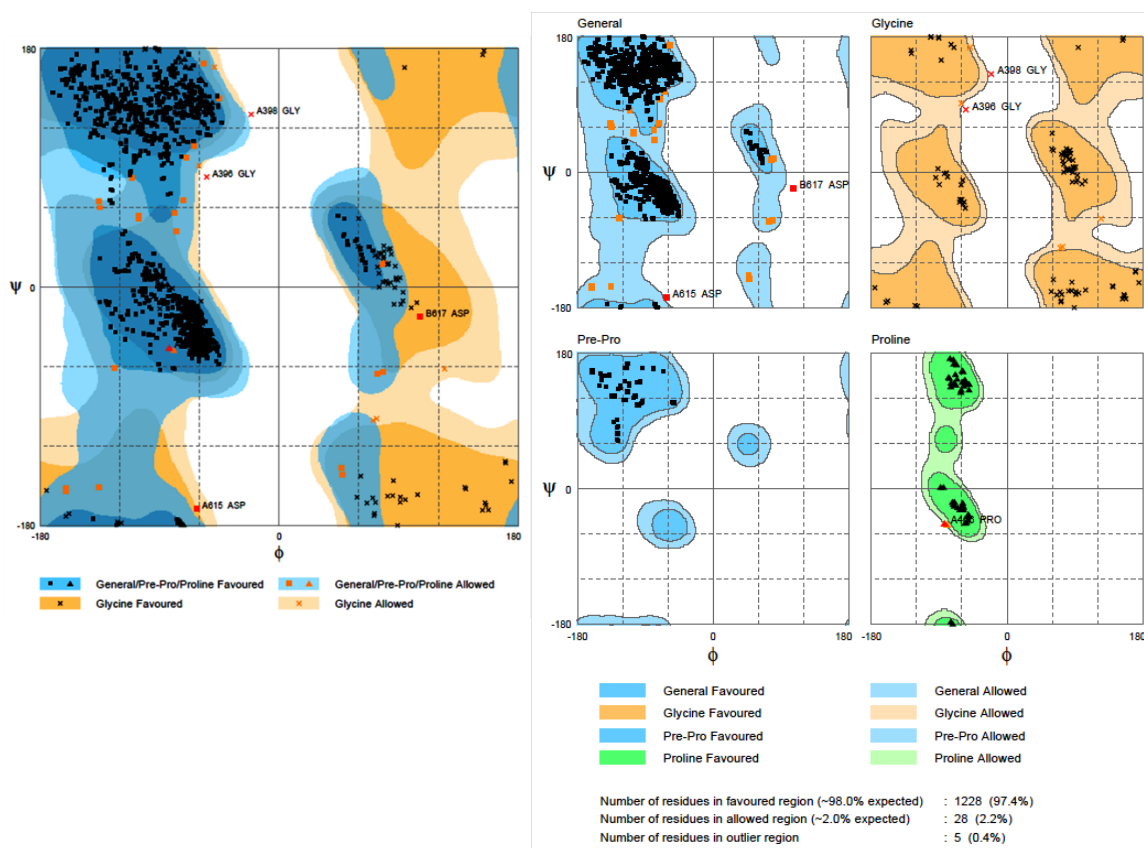


図 1-28 精密化後の LNBBase のラマチャンドランプロット

Favored 97.4%, Allowed 2.2%, Outlier 0.4%であり、立体化学的に正しい構造が得られたことが分かった。

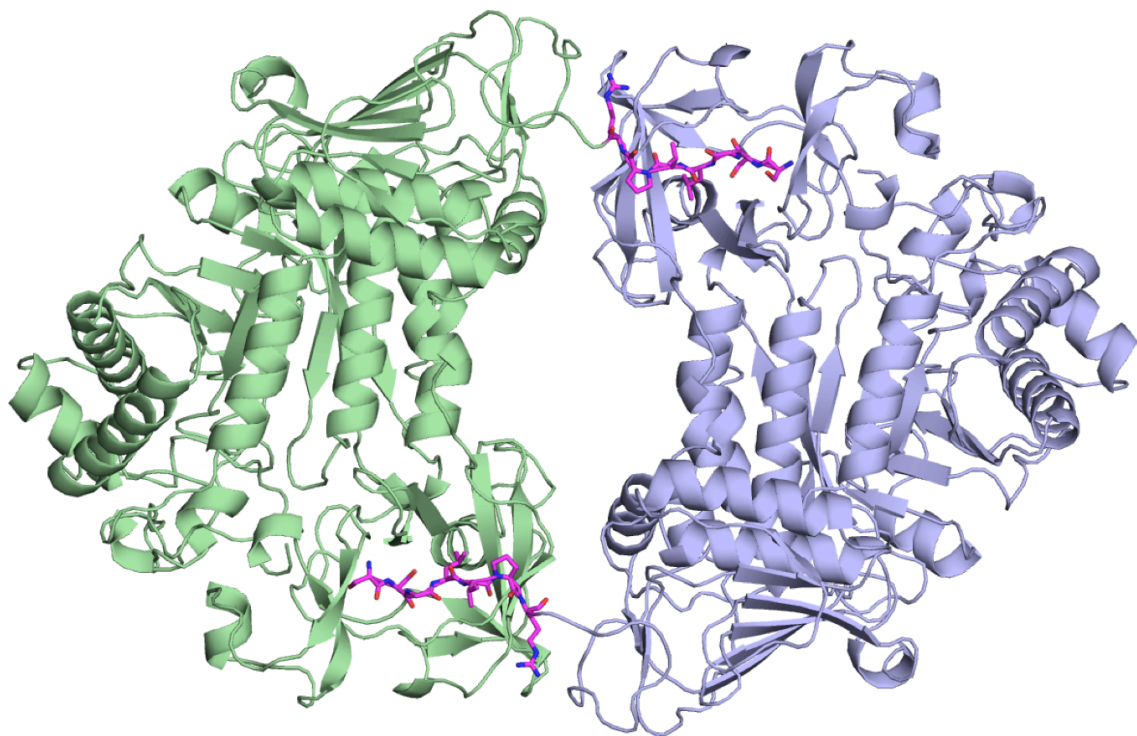
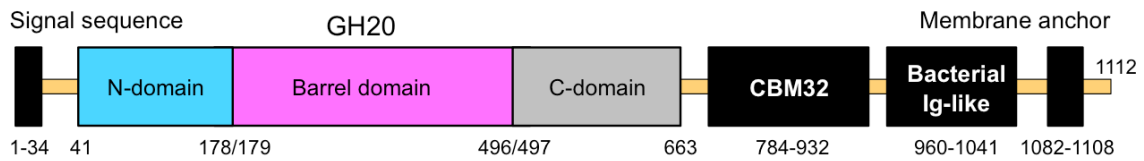


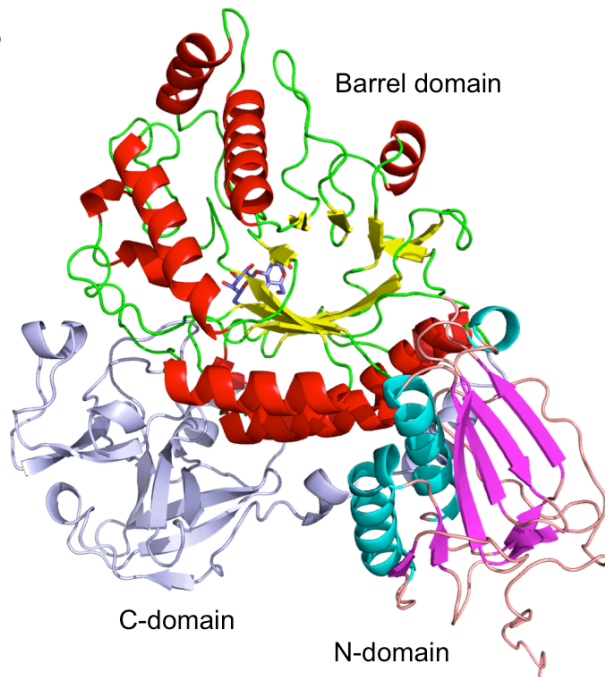
図 1-29 結晶内の 2 量体構造

結晶の非対称単位には 2 分子存在していた。A chain と B chain に構造上の違いはなかった。両者の N 末端（赤丸で囲った部分）は互いの C ドメインと相互作用していた。この相互作用が良い結晶系を作ったと考えられた。

A



B



C

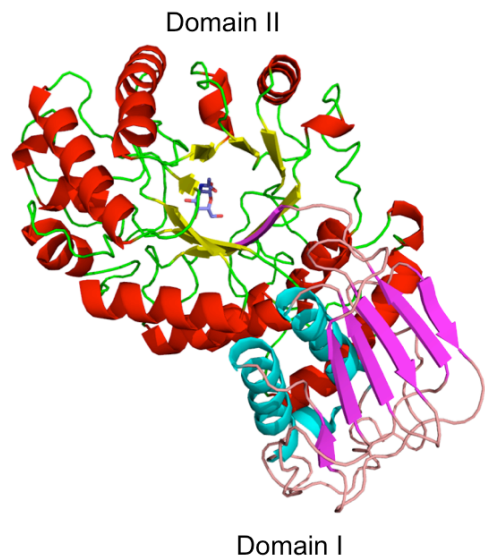


図 1-30 LNBBase の全体構造

A: LNBBase のドメイン構成。結晶化に用いたコンストラクトは残基番号 41-663 である。

B: LNBBase の全体構造。

- ・ N ドメイン (残基番号 41-178) は、ストランドを magenta、 α ヘリックスを cyan で表した。
- ・ バレルドメイン (残基番号 179-496) は、ストランドを yellow、 α ヘリックスを red で表した。
- 中心部にある LNB は blue で表した。
- ・ C ドメイン (残基番号 497-662) は light blue で表した。

C: 最もよく研究されている *S. plicatus* 由来の β -HexNAcase (SpHex)の全体構造。LNBBase には C ドメインがあるため大きい、N ドメインとバレルドメインの全体構造はほとんど同じだった。

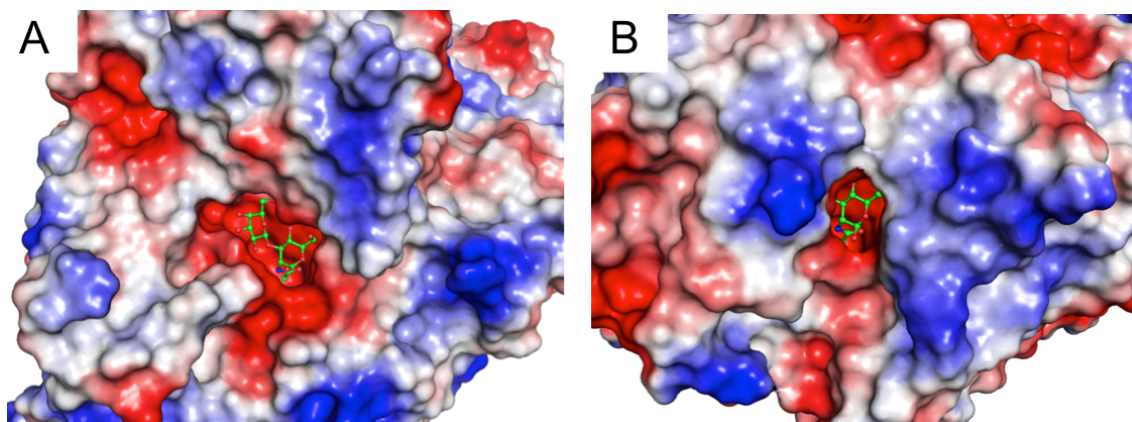


図 1-31 LNBBase (A) と SpHex (B) の表面電荷図

red は負電荷、blue は正電荷を表す。

LNBBase (A) では 2 糖の LNB がすっぽりはまる基質結合ポケットがあるが、SpHex (B) では単糖が入るスペースしかない。

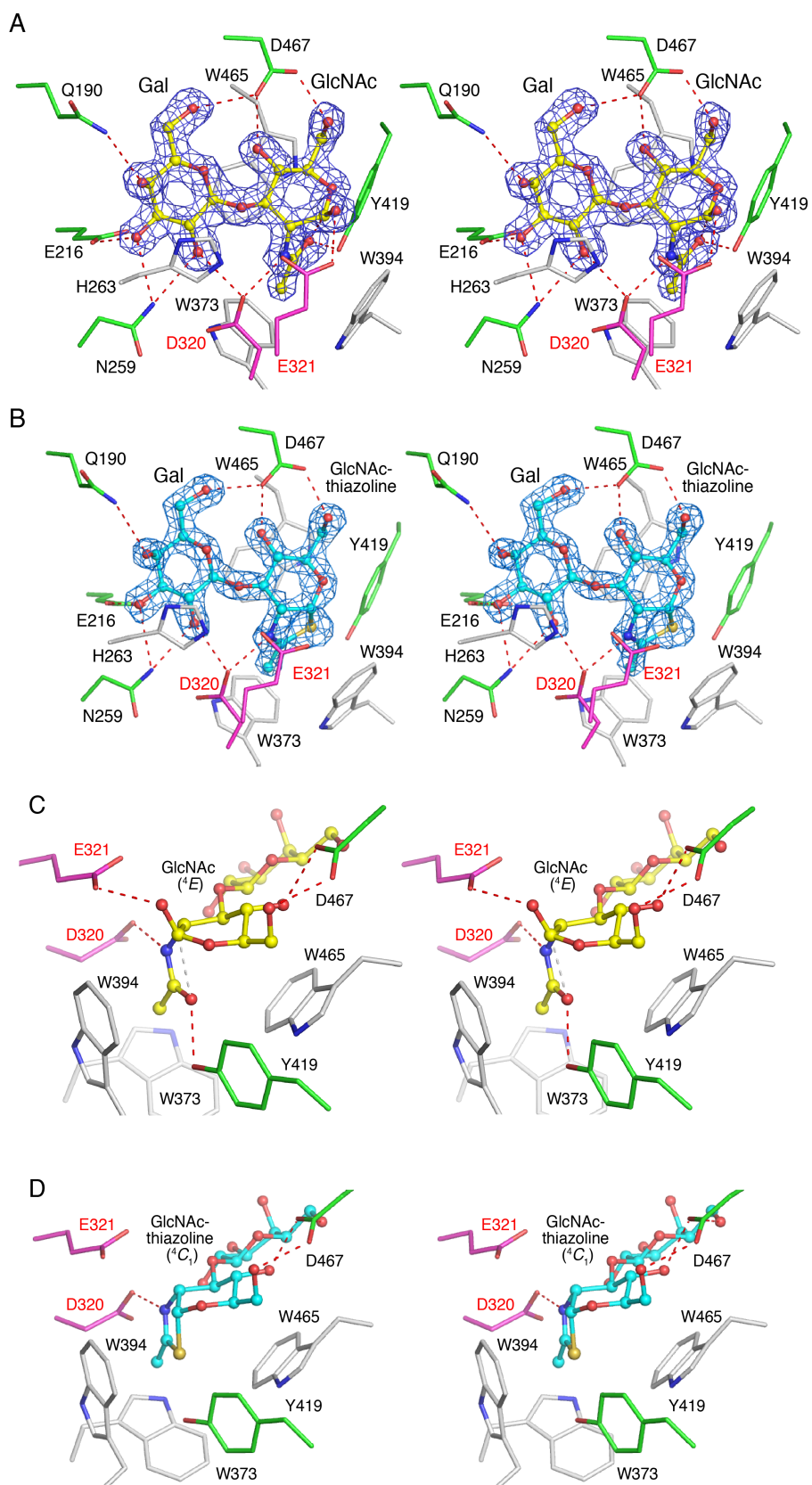


図 1-32 LNBBase の活性中心の $|F_o| - |F_c|$ omit map (次頁に続く)

(前頁続き) **A,B** : LNB (**A**), LNB チアゾリン (**B**)とその|Fo|-|Fc|電子密度マップ (4 σ)。
C,D : LNB の GlcNAc (**C**), LNB チアゾリンの GlcNAc チアゾリン (**D**)のコンフォメーションと、周囲の残基との相互作用。触媒残基である D320 と E321 は magenta、LNB の水酸基と水素結合する残基を green、LNB とスタッキングする残基を silver で表した。全て GH20 で保存されている残基だが、それらが相互作用する糖の水酸基の組み合わせは他の β -HexNAcase と異なっていた。

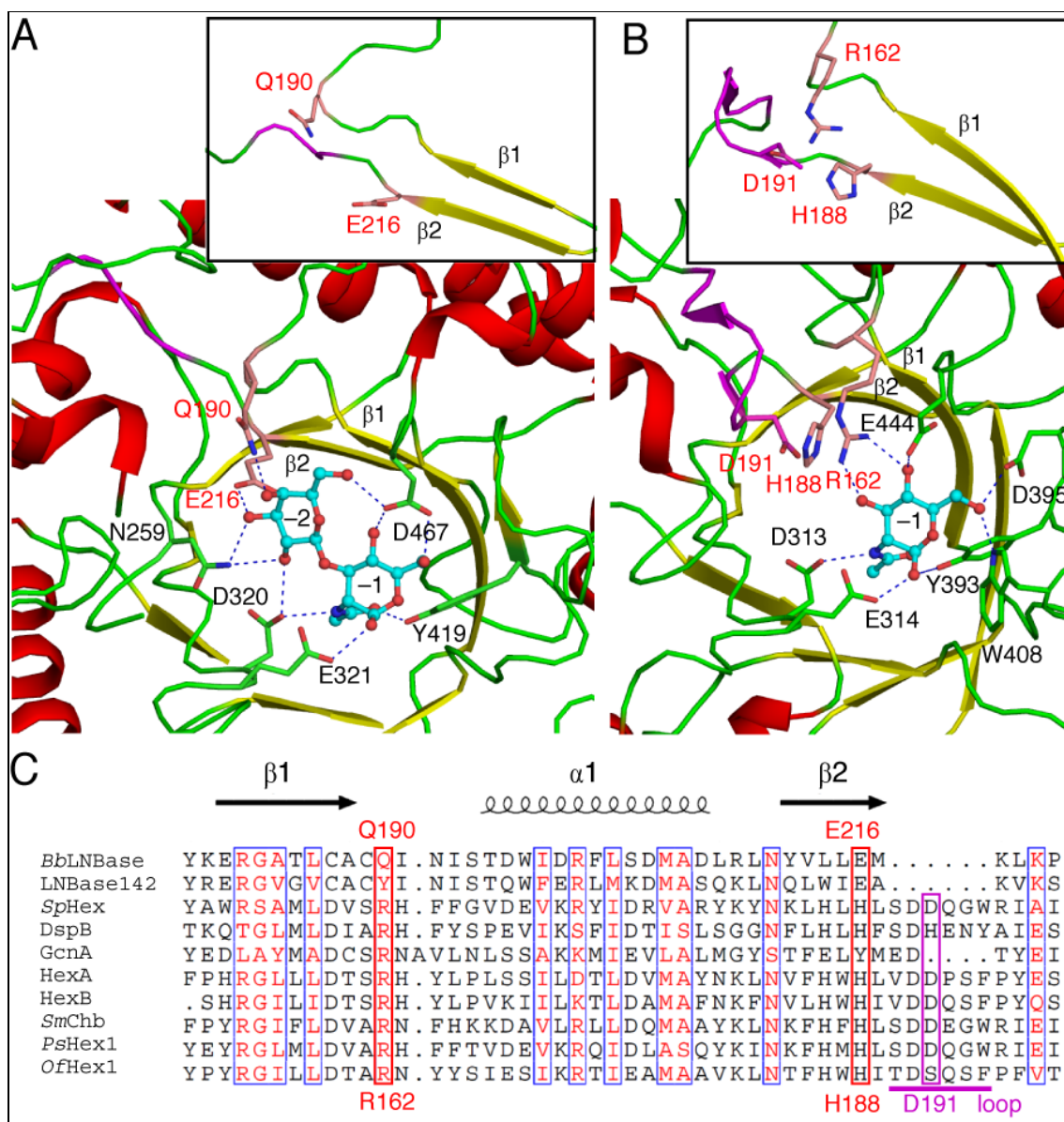


図 1-33 LNBase (A) と SpHex (B) の活性中心

A, B : SpHex にはサブサイト(-2)に当たる部分がなく、Arg162 や His188、さらには Asp191 を含む紫のループに遮られていた。C : サブサイト(-2)に当たる部分の GH20 β -HexNAcase と LNBase のマルチプルアラインメント。全ての配列は図 1-38 に掲載した。

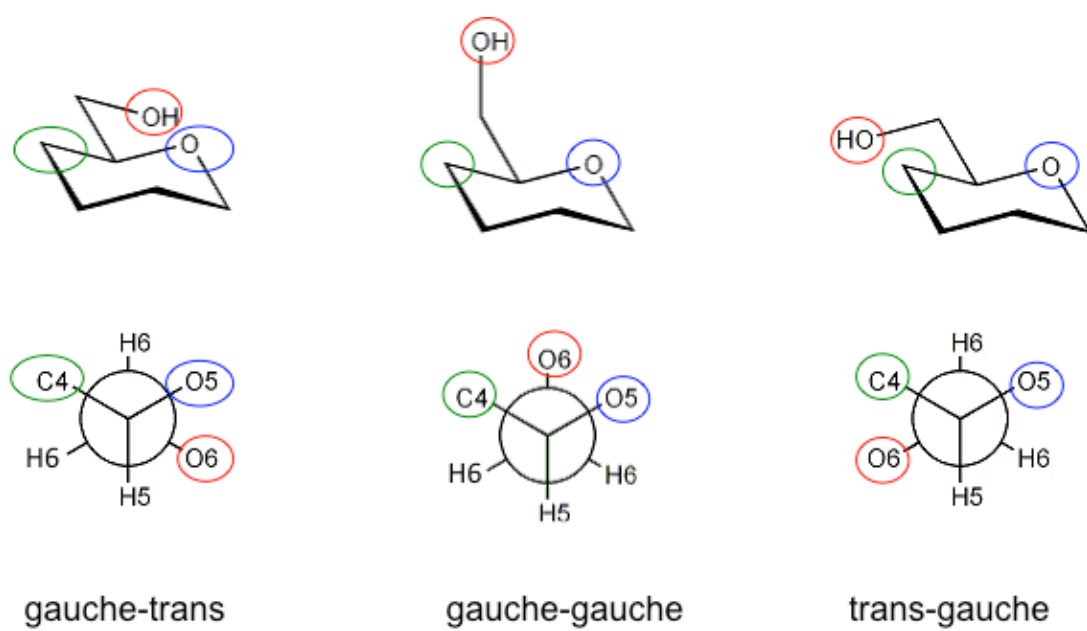


図 1-34 6 位のヒドロキシメチル基のコンフォメーション

ゴーシュ・ゴーシュ型が溶液中では最も安定である。

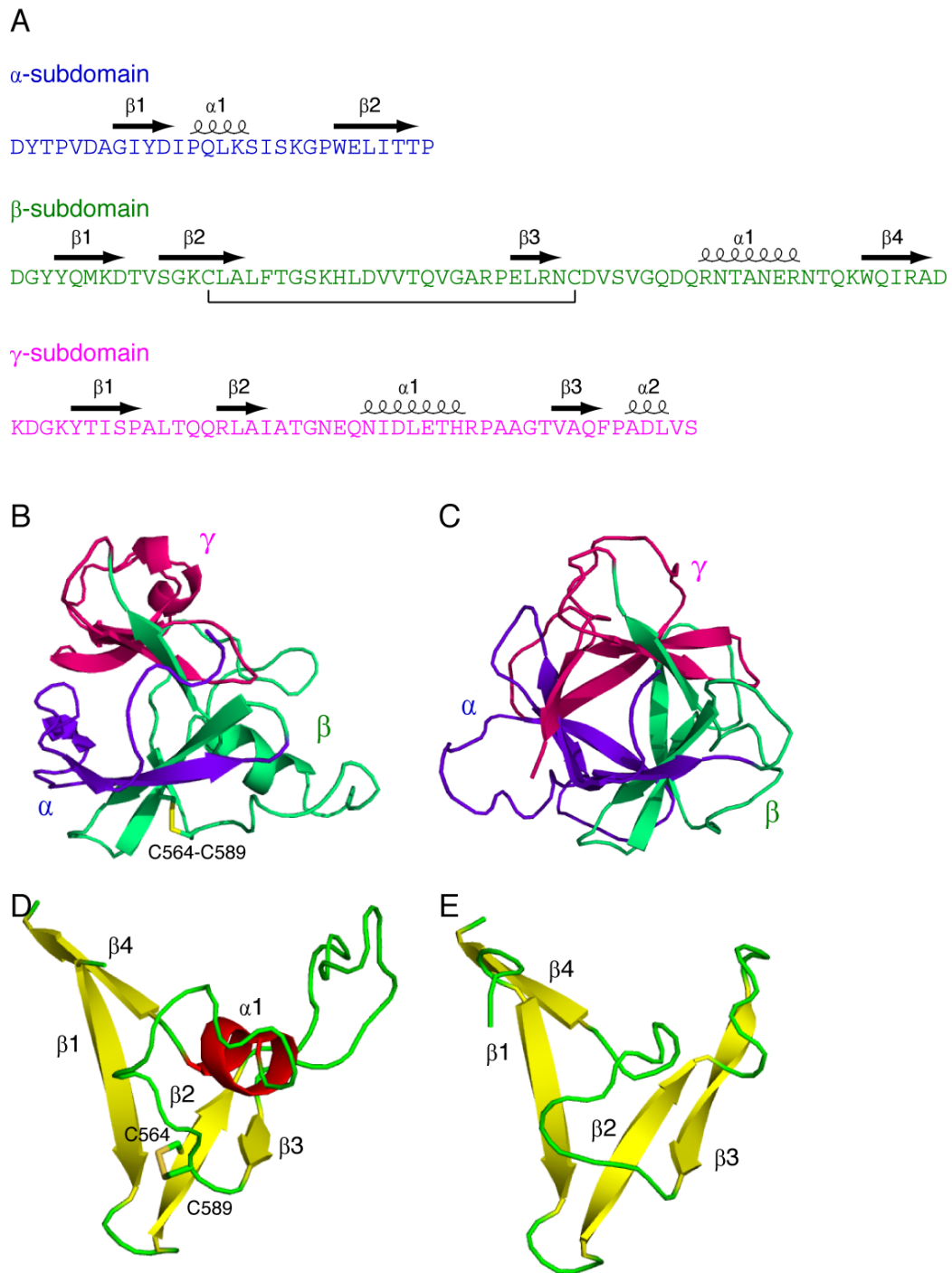


図 1-35 C ドメイン

A : LNBase の C ドメインのサブドメイン構成。

B : LNBase の C ドメインの全体構造。

C : *Marasmius oreades* 由来の R 型レクチンの CBM13 ドメインの構造。

D : LNBase の β -サブドメインの構造。

E : *Marasmius oreades* 由来の R 型レクチンの CBM13 ドメインのサブドメインの構造。

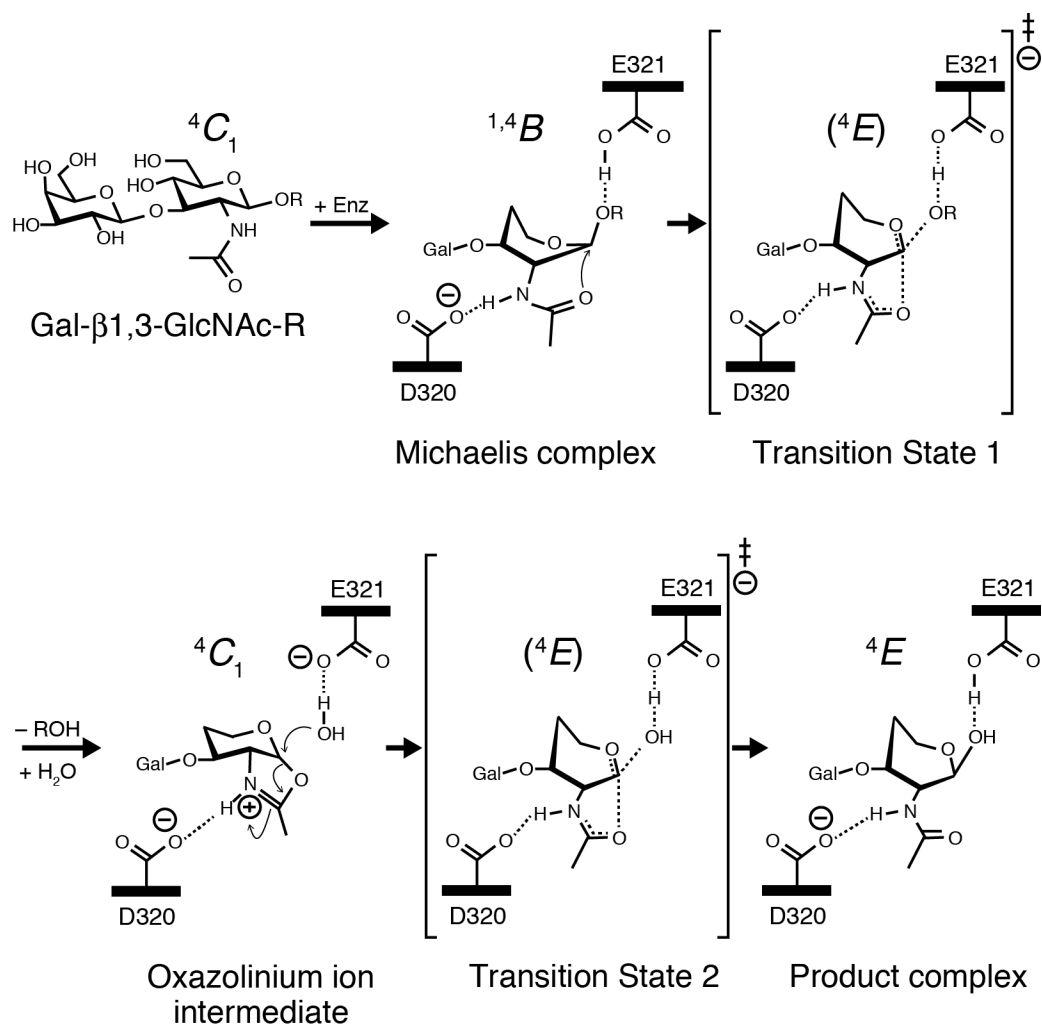


図 1-36 GH20 の反応機構と GlcNAc のコンフォメーション変化

図 0-4 をより詳細に描いた。今回得られた結晶構造中のサブサイト(-1)の GlcNAc は、4 位の炭素原子だけが持ち上がり、他の 1, 2, 3 位の炭素原子と 5 位の酸素原子は同一平面上にある、 4E というコンフォメーションであった。今回得られた構造は E・P 複合体であるため、GH20 の反応の最後では、基質は 4E であると考えられた。図 1-37 に示したように、他の GH20 で観測された複合体中のリガンドのコンフォメーションの Cremer-Pople parameter からも、このコンフォメーション変化は支持される。

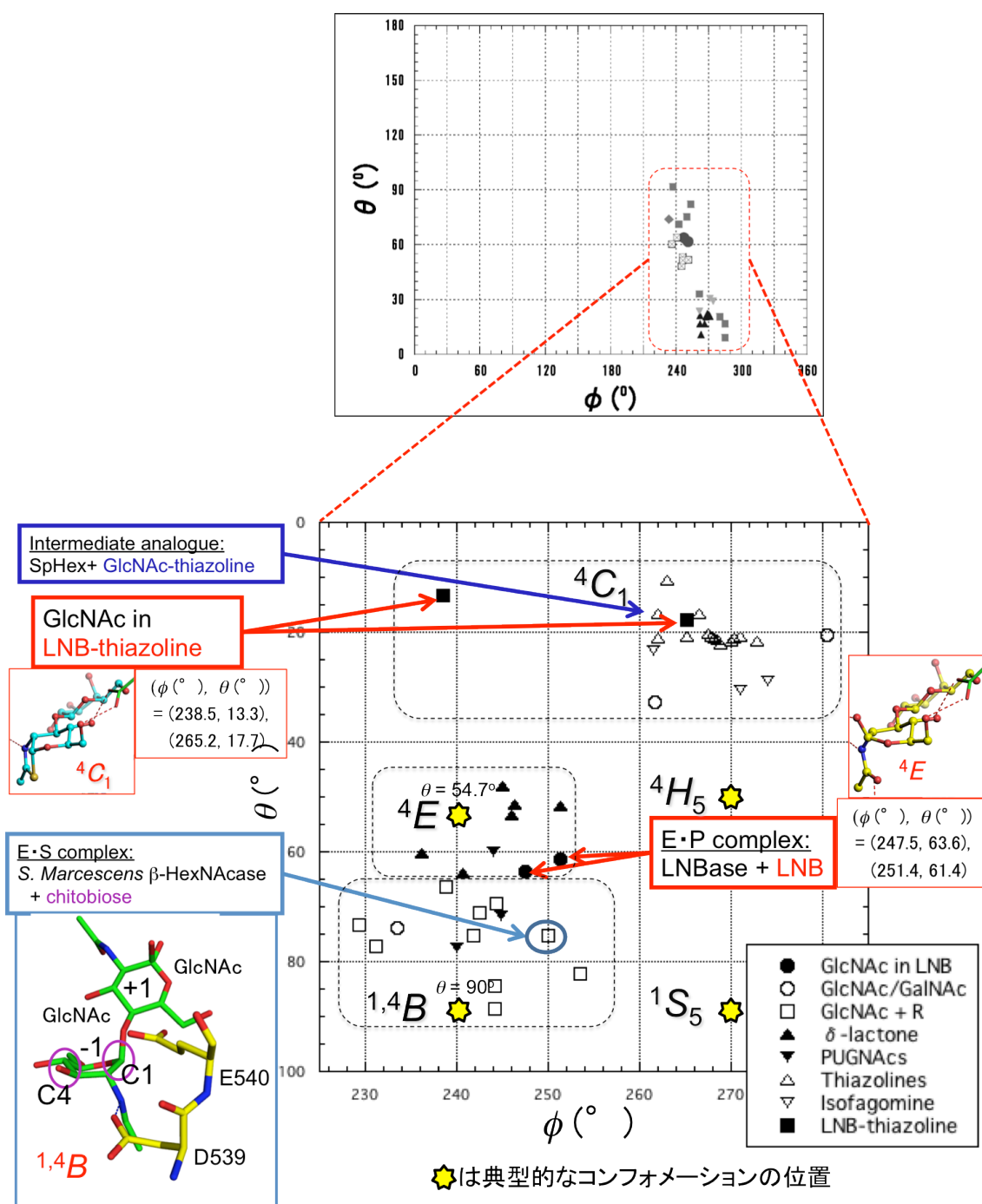


図 1-37 GH20 酵素のサブサイト(-1)でこれまでに観測された糖
(基質/アナログ/阻害剤) のコンフォメーション (メルカトル図法による表示)

表 1-8 の Cremer-Pople parameter をグラフにした。上図のメルカトル図全体の一部を下に拡大した。便宜上下図では縦軸の上下を逆にしてある。黄色い星は典型的なコンフォメーションの位置を示す。 $1,4B$ 、 $4E$ 、 $4C_1$ に集中していた。GH20 は下図 (次頁) のように赤枠内の道筋を通ると予想出来た。

(前頁からの続き)

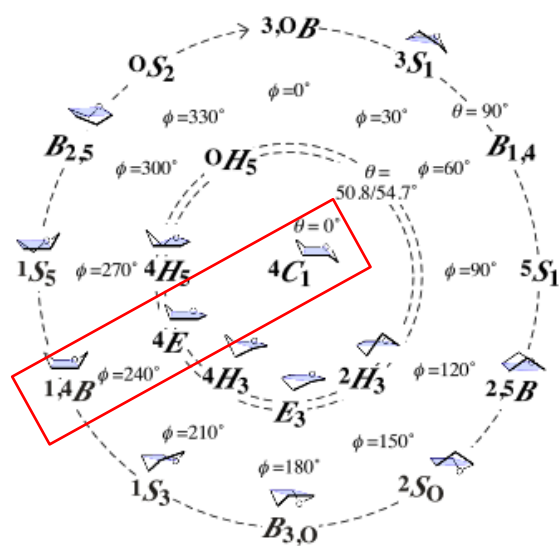
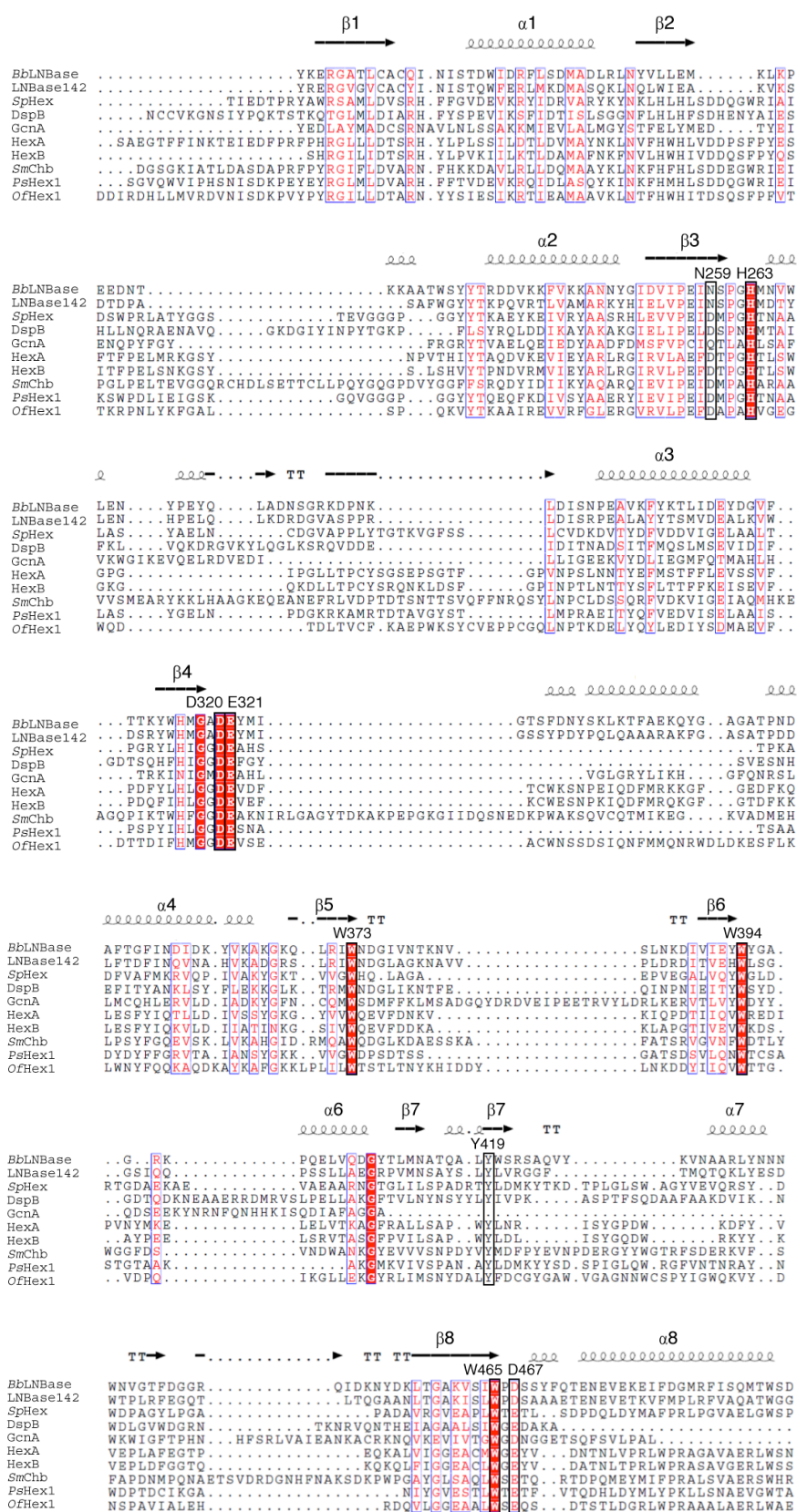


図 1-38 (次頁) 構造既知の GH20 β -HexNAcase と LNBase
のバレルドメインのマルチプルアライメント

LNBase142: *Streptomyces* sp. 142 LNBase,
DspB: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dispersin B,
GcnA: *Streptococcus gordonii* GcnA,
HexA: human lysosomal β -Hexase A,
HexB: human lysosomal β -Hexase B,
SmChb: *Serratia marcescens* chitobiase,
PsHex1: *Paenibacillus* sp. TS12 Hex1,
OfHex1: *Ostrinia furnacalis* β -HexNAcase.

第一章 LNBase の X 線結晶構造解析



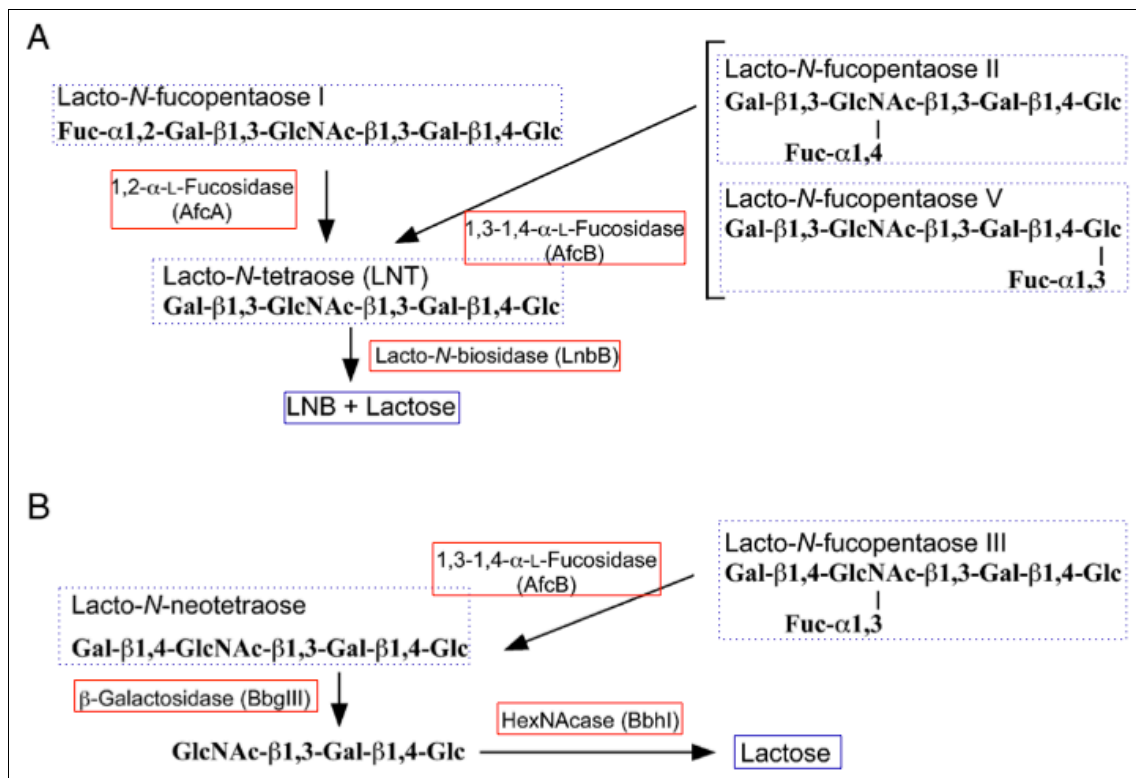


図 1-39 *B. bifidum* JCM1254 における、
タイプ I 型 HMO (A) とタイプ II 型 HMO (B) の分解経路

(5)より改変して引用。

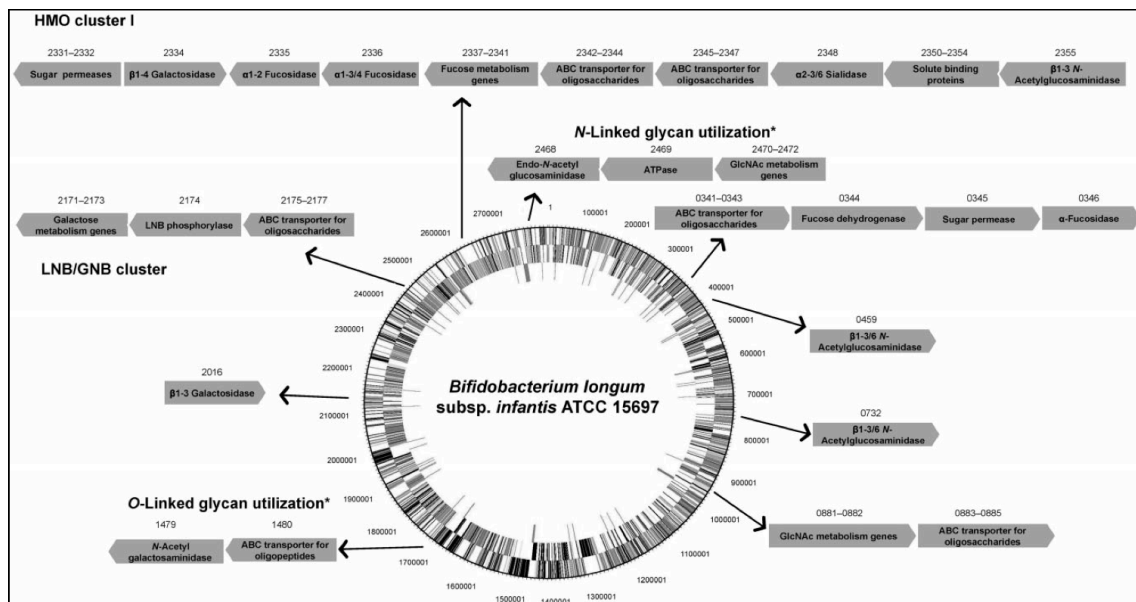


図 1-40 *B. longum* subsp. *infantis* から見出された、
HMO 分解に関わると予想される遺伝子クラスター

(89)より引用。

第二章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

引用

1. Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512-519
2. Hooper, L. V., and Gordon, J. I. (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**, 1115-1118
3. Ouwehand, A., Isolauri, E., and Salminen, S. (2002) The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *European journal of nutrition* **41 Suppl 1**, I32-37
4. Scardovi, V., and L.D., T. (1965) The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **15**, 19-29
5. Fushinobu, S. (2010) Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2374-2384
6. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal* **280 (Pt 2)**, 309-316
7. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal* **293 (Pt 3)**, 781-788
8. Davies, G., and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859
9. Fushinobu, S., Alves, V. D., and Coutinho, P. M. (2013) Multiple rewards from a treasure trove of novel glycoside hydrolase and polysaccharide lyase structures: new folds, mechanistic details, and evolutionary relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
10. Jongkees, S. A., and Withers, S. G. (2013) Unusual Enzymatic Glycoside Cleavage Mechanisms. *Accounts of chemical research*
11. Davies, G. J., Wilson, K. S., and Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *The Biochemical journal* **321 (Pt 2)**, 557-559
12. Suzuki, R., Katayama, T., Kim, B. J., Wakagi, T., Shoun, H., Ashida, H., Yamamoto, K., and Fushinobu, S. (2010) Crystal structures of phosphoketolase: thiamine diphosphate-dependent dehydration mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 34279-34287
13. Urashima, T., Fukuda, K., Kitaoka, M., Terabayashi, T., and Kobata, A. (2011) *Milk oligosaccharides*, Nova Science Publishers, New York
14. Asakuma, S., Urashima, T., Akahori, M., Obayashi, H., Nakamura, T., Kimura, K., Watanabe, Y., Arai, I., and Sanai, Y. (2008) Variation of major neutral

- oligosaccharides levels in human colostrum. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**, 488-494
15. Tadasu Urashima, S. A., Kenji Fukuda. (2008) Biological significance of human milk oligosaccharides. *Milk Science* **56**, 155-176
16. 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* **19**, 499-508
17. Kitaoka, M., Tian, J., and Nishimoto, M. (2005) Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3158-3162
18. Xiao, J. Z., Takahashi, S., Nishimoto, M., Odamaki, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., and Kitaoka, M. (2010) Distribution of in vitro fermentation ability of lacto-*N*-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 54-59
19. 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* **74**, 3996-4004
20. Sela, D. A. (2011) Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. *International journal of food microbiology* **149**, 58-64
21. Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2007) Identification of *N*-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-*N*-biose I/galacto-*N*-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6444-6449
22. Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., and Arigoni, F. (2002) The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14422-14427
23. 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- α -*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biol. Chem.* **280**, 37415-37422
24. 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- α -*N*-acetylgalactosaminidase from

- Bifidobacterium longum*. *Journal of biochemistry* **146**, 389-398
25. Suzuki, R., Wada, J., Katayama, T., Fushinobu, S., Wakagi, T., Shoun, H., Sugimoto, H., Tanaka, A., Kumagai, H., Ashida, H., Kitaoka, M., and Yamamoto, K. (2008) Structural and thermodynamic analyses of solute-binding protein from *Bifidobacterium longum* specific for core 1 disaccharide and lacto-*N*-biose I. *J. Biol. Chem.* **283**, 13165-13173
 26. 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.* **284**, 7273-7283
 27. Murata, T., Inukai, T., Suzuki, M., Yamagishi, M., and Usui, A. T. (1999) Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neotetraose. *Glycoconj J* **16**, 189-195
 28. Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2007) Practical preparation of lacto-*N*-biose I, a candidate for the bifidus factor in human milk. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2101-2104
 29. 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.* **74**, 3996-4004
 30. Sano, M., Hayakawa, K., and Kato, I. (1992) An enzyme releasing lacto-*N*-biose from oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8512-8516
 31. Sano, M., Hayakawa, K., and Kato, I. (1993) Purification and characterization of an enzyme releasing lacto-*N*-biose from oligosaccharides with type 1 chain. *J. Biol. Chem.* **268**, 18560-18566
 32. Seko, A., Ohkura, T., Kitamura, H., Yonezawa, S., Sato, E., and Yamashita, K. (1996) Quantitative differences in GlcNAc:beta1->3 and GlcNAc:beta1->4 galactosyltransferase activities between human colonic adenocarcinomas and normal colonic mucosa. *Cancer Res.* **56**, 3468-3473
 33. Hattie, M., Debowski, A. W., and Stubbs, K. A. (2012) Development of tools to study lacto-*N*-biosidase: an important enzyme involved in the breakdown of human milk oligosaccharides. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **13**, 1128-1131
 34. Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K. S., and Vorgias, C. E. (1996) Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 638-648
 35. Prag, G., Papanikolau, Y., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Petratos, K., and Oppenheim, A.

- B. (2000) Structures of chitobiase mutants complexed with the substrate Di-*N*-acetyl-D-glucosamine: the catalytic role of the conserved acidic pair, aspartate 539 and glutamate 540. *J. Mol. Biol.* **300**, 611-617
36. Mark, B. L., Vocadlo, D. J., Knapp, S., Triggs-Raine, B. L., Withers, S. G., and James, M. N. (2001) Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 10330-10337
37. Mark, B. L., Vocadlo, D. J., Zhao, D., Knapp, S., Withers, S. G., and James, M. N. (2001) Biochemical and structural assessment of the 1-*N*-azasugar GalNAc-isofagomine as a potent family 20 beta-*N*-acetylhexosaminidase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **276**, 42131-42137
38. Williams, S. J., Mark, B. L., Vocadlo, D. J., James, M. N., 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.* **277**, 40055-40065
39. Mark, B. L., Mahuran, D. J., Cherney, M. M., Zhao, D., Knapp, S., and James, M. N. (2003) Crystal structure of human beta-hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J. Mol. Biol.* **327**, 1093-1109
40. Maier, T., Strater, N., Schuette, C. G., Klingenstein, R., Sandhoff, K., and Saenger, W. (2003) The X-ray crystal structure of human beta-hexosaminidase B provides new insights into Sandhoff disease. *J. Mol. Biol.* **328**, 669-681
41. Lemieux, M. J., Mark, B. L., Cherney, M. M., Withers, S. G., Mahuran, D. J., and James, M. N. (2006) Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **359**, 913-929
42. Ramasubbu, N., Thomas, L. M., Ragunath, C., and Kaplan, J. B. (2005) Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Mol. Biol.* **349**, 475-486
43. Langley, D. B., Harty, D. W., Jacques, N. A., Hunter, N., Guss, J. M., and Collyer, C. A. (2008) Structure of *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase (GcnA) from the endocarditis pathogen *Streptococcus gordonii* and its complex with the mechanism-based inhibitor NAG-thiazoline. *J. Mol. Biol.* **377**, 104-116
44. Sumida, T., Ishii, R., Yanagisawa, T., Yokoyama, S., and Ito, M. (2009) Molecular Cloning and Crystal Structural Analysis of a Novel beta-N-Acetylhexosaminidase from *Paenibacillus* sp. TS12 Capable of Degrading Glycosphingolipids. *J Mol Biol*
45. Cremer, D., and Pople, J. A. (1975) A General Definition of Ring Puckering

- Coordinates. *J. Am. Chem. Soc* **97**, 1354-1358
46. G. A. Jeffrey and J. H. Yates (1979) Stereographic representation of the Cremer-Pople ring-puckering parameters for pyranoid rings. *Carbohydr. Res.* **74**, 319-322
 47. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
 48. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods. Enzymol.* **276**, 307-326
 49. Holm, L., and Sander, C. (1995) Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends in biochemical sciences* **20**, 478-480
 50. DeLano, W. L., and Lam, J. W. (2005) PyMOL: A communications tool for computational models. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **230**, U1371-U1372
 51. Czepas, J., Devedjiev, Y., Krowarsch, D., Derewenda, U., Otlewski, J., and Derewenda, Z. S. (2004) The impact of Lys \rightarrow Arg surface mutations on the crystallization of the globular domain of RhoGDI. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 275-280
 52. Rappleye, J., Innus, M., Weeks, C. M., and Miller, R. (2002) SnB version 2.2: an example of crystallographic multiprocessing. *J. Appl. Crystallogr.* **35**, 374-376
 53. Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D* **55**, 849-861
 54. Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025
 55. Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458-463
 56. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**, 240-255
 57. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486-501
 58. Schwarz, J. C. P. (1973) Rules for conformation nomenclature for five- and six-membered rings in monosaccharides and their derivatives. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 505-508
 59. 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* **44**, 12809-12818

60. Kirschner, K. N., and Woods, R. J. (2001) Solvent interactions determine carbohydrate conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10541-10545
61. Grahn, E., Askarieh, G., Holmner, A., Tateno, H., Winter, H. C., Goldstein, I. J., and Krengel, U. (2007) Crystal structure of the *Marasmius oreades* mushroom lectin in complex with a xenotransplantation epitope. *J. Mol. Biol.* **369**, 710-721
62. Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S. (2004) Crystal structure of a family 54 alpha-L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* **279**, 44907-44914
63. 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.*, in press
64. Wada, M., Kibaoashi, K., Nishimoto, M., Kitaoka, M., and Noguchi, K. (2009) 2-Acetamido-2-deoxy-3-*O*-beta-D-galactopyranosyl-D-glucose dihydrate. *Acta Crystallogr. E* **65**, 1781-1782
65. Sattelle, B. M., and Almond, A. (2011) Is *N*-acetyl-D-glucosamine a rigid ⁴C₁ chair? *Glycobiology* **21**, 1651-1662
66. Pluvinaige, B., Higgins, M. A., Abbott, D. W., Robb, C., Dalia, A. B., Deng, L., Weiser, J. N., Parsons, T. B., Fairbanks, A. J., Vocadlo, D. J., and Boraston, A. B. (2011) Inhibition of the pneumococcal virulence factor StrH and molecular insights into *N*-glycan recognition and hydrolysis. *Structure* **19**, 1603-1614
67. Sumida, T., Ishii, R., Yanagisawa, T., Yokoyama, S., and Ito, M. (2009) Molecular cloning and crystal structural analysis of a novel beta-N-acetylhexosaminidase from *Paenibacillus* sp. TS12 capable of degrading glycosphingolipids. *J. Mol. Biol.* **392**, 87-99
68. Liu, T., Zhang, H., Liu, F., Chen, L., Shen, X., and Yang, Q. (2011) Active-pocket size differentiating insectile from bacterial chitinolytic beta-*N*-acetyl-D-hexosaminidases. *Biochem. J.* **438**, 467-474
69. Jitonnorn, J., Lee, V. S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H. A., and Mulholland, A. J. (2011) Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate-assisted catalysis in family 18 chitinases: conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. *Biochemistry* **50**, 4697-4711
70. Rao, F. V., Dorfmueller, H. C., Villa, F., Allwood, M., Eggleston, I. M., and van Aalten, D. M. (2006) Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic *O*-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J.* **25**, 1569-1578
71. Knapp, S., Vocadlo, D. J., Gao, Z., Kirk, B., Lou, J., and Withers, S. G. (1996)

- NAG-thiazoline, an *N*-acetyl-beta-hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6804-6805
72. Amorelli, B., Yang, C., Rempel, B., Withers, S. G., and Knapp, S. (2008) *N*-Acetylhexosaminidase inhibitory properties of C-1 homologated GlcNAc- and GalNAc-thiazolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 2944-2947
 73. Greig, I. R., Zahariev, F., and Withers, S. G. (2008) Elucidating the nature of the *Streptomyces plicatus* beta-hexosaminidase-bound intermediate using ab initio molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17620-17628
 74. Sumida, T., Stubbs, K. A., Ito, M., and Yokoyama, S. (2012) Gaining insight into the inhibition of glycoside hydrolase family 20 exo-beta-*N*-acetylhexosaminidases using a structural approach. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 2607-2612
 75. 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.* **186**, 4885-4893
 76. 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.* **282**, 18497-18509
 77. Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T., and Yamamoto, K. (2009) Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* **19**, 1010-1017
 78. 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* **287**, 16709-16719
 79. Kiyohara, M., Tanigawa, K., Chaiwangsri, T., Katayama, T., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2011) An exo-alpha-sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology* **21**, 437-447
 80. 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* **20**, 1402-1409
 81. Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R.,

- Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M., and Mills, D. A. (2008) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18964-18969
82. Sela, D. A., and Mills, D. A. (2010) Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol.* **18**, 298-307
83. Yoshida, E., Sakurama, H., Kiyohara, M., Nakajima, M., Kitaoka, M., Ashida, H., Hirose, J., Katayama, T., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2012) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different beta-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* **22**, 361-368
84. Barboza, M., Sela, D. A., Pirim, C., Locascio, R. G., Freeman, S. L., German, J. B., Mills, D. A., and Lebrilla, C. B. (2009) Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7319-7325
85. 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.* **288**, 25194-25206
86. Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins* **50**, 437-450
87. Liu, T., Zhang, H., Liu, F., Wu, Q., Shen, X., and Yang, Q. (2011) Structural determinants of an insect beta-N-Acetyl-D-hexosaminidase specialized as a chitinolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* **286**, 4049-4058
88. Fushinobu, S., Mertz, B., Hill, A. D., Hidaka, M., Kitaoka, M., and Reilly, P. J. (2008) Computational analyses of the conformational itinerary along the reaction pathway of GH94 cellobiose phosphorylase. *Carbohydr Res* **343**, 1023-1033
89. Garrido, D., Dallas, D. C., and Mills, D. A. (2013) Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology (Reading, England)* **159**, 649-664

謝辞

本研究を行うに当たり、多くの先生にご指導頂きました。

酵素学研究室の伏信進矢教授は、本研究テーマを与えて下さり、私の研究室生活の最初から最後まで7年に渡って直接ご指導して下さいました。多くのご迷惑をおかけしてしまいましたが、いつもの確な助言をして下さり、正しい方向へ導いて下さいました。この博士論文を提出できるのも、一重に伏信先生のお蔭です。感謝してもし尽くせん。心より深く御礼申し上げます。また、本研究室の祥雲弘文名誉教授、若木高善前教授、荒川孝俊助教には大変お世話になりました。実験する環境を整えて下さり、多くのご助言をして下さいました。心より深く感謝致します。本研究室の皆様にも本当にお世話になりました。特に、林到炫博士には仲良くして頂きました。私に優しく接し、ご指導して下さいました研究室に関わる全ての皆様に心より感謝致します。

LNBaseの研究に関しまして、次の先生が共同研究して下さいました。農研機構 食品総合研究所 酵素研究ユニット長の北岡本光先生、西本完先生、京都大学大学院 生命科学研究科の山本憲二名誉教授、石川県立大学 腸内細菌共生機構学講座の片山高嶺教授、京都大学大学院 農学研究科の桜間晴子助教、京都市産業技術研究所の和田潤博士、秋田県立大学 生物資源科学部の鈴木龍一郎助教、近畿大学 生物理工学部の芦田久教授、西オーストラリア大学の Keith A. Stubbs 博士には大変にお世話になりました。心より深く御礼申し上げます。

最後に、経済面や精神面で支えてくれた私の家族に心より深く感謝致します。

2013 年 12 月