

ビフィズス菌の特異的糖資化機能の解明と利用

熊谷 英彦 (京都大学大学院生命科学研究所統合生命科学専攻教授)

1. 緒言

ビフィズス菌はヒトを始めとする動物の腸管内に広く棲息し¹⁾、腸管の感染防禦²⁾、免疫機能の増強やガン予防³⁾、あるいは酢酸や乳酸産生による整腸作用⁴⁾などの有益な作用を宿主にもたらす。また本菌は母乳栄養児の腸管下部における最優先菌であり⁵⁾、それらと人工乳栄養児との間には下痢などの罹患率に大きな差があることが知られている⁶⁾。したがって、本菌は乳児の健康維持に重要な役割を演じていると考えられている。

このような母乳についての研究に端を発し、腸管内でビフィズス菌の生育を特異的に支持するいわゆる「ビフィズス因子」に関する研究が行われ、幾つかのオリゴ糖が報告されている⁷⁻¹⁴⁾。さらに、本菌をヒト腸管内で増殖させることを目的として、多くの種類のオリゴ糖が、食品添加あるいは製剤の形で実用化されている。本菌の健康への好影響を裏付ける研究結果としては、本菌が腸管内での病原性細菌の増殖を抑えたり^{15,16)}、腸管上皮細胞への病原性大腸菌の接着を阻止したりすることが報告されている¹⁷⁾。

本報告者らの研究室では、成人ヒト糞便より単離し、光岡の方法¹⁸⁾に基づいて同定したビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* 203を用いて、糖代謝について詳細な研究を行ってきた。そして本菌が、腸内棲息菌の中でビフィズス菌に特異的な β -フコシダーゼ活性をもつことを明らかにしている¹⁹⁾。このことは逆にフコースを含むオリゴ糖は腸内ではビフィズス菌にのみ加水分解され、炭素源とし

て利用されることを示唆するものである。そこで、この β -フコシダーゼ活性を有する酵素をビフィズス菌から精製し、その性質を解明、さらに本酵素の遺伝子のクローニング、大腸菌高発現株の作製などを行い、ビフィズス因子の酵素の合成への有効利用を検討した。さらに本菌の α -ガラクトシダーゼについても精製と性質の解明、遺伝子のクローニングと解析を行った。

2. *Bifidobacterium breve*の β -グルコシダーゼ

ビフィズス菌 *B. breve* 203の β -グルコシダーゼは β -D-グルコシド水解放活性 (図 1A) の他に腸内細菌の中ではビフィズス菌に特異的とされる β -D-フコシド水解放活性 (図 1A) をも有する。また本酵素には、 β -D-フコシル基のみを他の単糖に転移させる糖転移活性 (図 1B) も認められている²⁰⁾。そこで、 β -グルコシダーゼの生産性を上げるため、セロビオースを単一炭素源として本菌を長期にわたって馴養し、 β -グルコシダーゼ及び β -フコシダーゼ両活性が著しく上昇した馴養株 *B. breve clb* を得た^{21,22)}。さらにこの馴養株 *B. breve clb* より電気泳動的に単一な精製酵素標品を得た²²⁾。得られた精製酵素を用いて各種酵素化学的性質を調べたところ、本酵素は分子サイズ 50キロダルトンのモノマータンパク質で、基質特異性その他から *B. breve* 203から得られた酵素²³⁾ と同等であることが確認された。

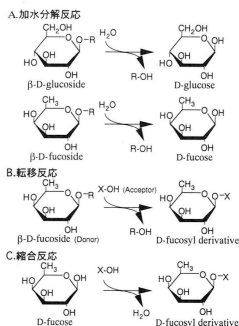


図1 *B. breve* の β -グルコシダーゼが触媒する反応

3. ビフィズス菌 β -グルコシダーゼの大腸菌での発現

B. breve clb より得た精製酵素標品を用いて本酵素 N 末端 アミノ酸配列を30残基決定した²²⁾。このアミノ酸配列の一部をもとに本酵素構造遺伝子の塩基配列の一部を類推し、20-mer, 128種類のオリゴヌクレオチドミクスチャーを合成して、本酵素遺伝子に対するプローブとした。ベクターとして pUC18を用い、これに制限酵素で部分的に消化した *B. breve clb* のゲノム DNA をインサートして組換えプラスミドを作製した。これを用

いて宿主大腸菌 DH5 α を形質転換して *B. breve clb* のゲノムライブラリー約15万コロニーを作成し、先のプローブを用いてスクリーニングしたところ10個のポジティブクローンを得た。これらのポジティブクローン中、2個のクローンに β -グルコシダーゼ及び β -フコシダーゼ両活性が認められたため、酵素活性の高い方の株を OK1 と命名した。

組換え大腸菌株 OK1 から得た組換えプラスミド pOK1a (*B. breve clb* のゲノム DNA 4.2kbp を有していた)を用いてサブクローニングを行ったところ、1.9kbp の *PvuII-EcoRI* 断片を有する pOK1e まで本酵素活性が認められた。この *PvuII-EcoRI* 断片の全塩基配列を決定したところ、1380bp からなるオープンリーディングフレームを見出し、ここには460アミノ酸残基から成る分子量51,513ダルトンのタンパク質がコードされていた²³⁾。この値は電気泳動で決定された精製酵素タンパク質の分子量の値とよく一致していた。

本酵素のアミノ酸配列とデータベースの β -グルコシダーゼのアミノ酸配列との相同性を検討した結果、本酵素はセルラーゼファミリー²⁴⁾の中の BGA サブファミリーに属していた。図2には他起源由来の BGA サブファミリーに属する β -グルコシダーゼの活性中心とされている配列を示し、相同性が高い部分は反転で示した²⁵⁾。Asn-Glu-

<i>Bifidobacterium breve</i>	115	VTLYH	WDL	PQ	124	--165	ITNEP	WCS	AH	174
<i>Microbispora bispora</i>	147	PTLYH	WDL	PQ	156	--193	ITNEP	WVA	AF	202
<i>Agrobacterium sp.</i>	123	ATLYH	WDL	PL	131	--168	ITNEP	WCA	AV	177
<i>Thermotoga maritima</i>	117	ATLYH	WDL	PF	126	--165	ITNEP	WVA	AI	174
<i>Bacillus polymyxa</i>	117	CTLYH	WDL	PQ	126	--162	ITNEP	WCI	AF	171
<i>Clostridium thermocellum</i>	117	ITLYH	WDL	PQ	126	--163	ITNEP	PGV	VS	172
<i>Avena sativa</i>	187	ITLPH	WDL	PQ	196	--235	ITNEP	PHS	FC	244
<i>Zea mays</i>	192	ITLPH	WDL	VP	201	--242	ITNEP	PQT	FT	253
<i>Erwinia herbicola</i>	128	ITLYH	WDL	PE	127	--182	LINEP	PVE	VA	191

図2 BGA サブファミリーに属する *B. breve*/203 および他種由来 β -グルコシダーゼの活性中心とされているアミノ酸配列の比較

アミノ酸配列で保存性の高い部分は反転で示した。高度に保存されている His-Asn-Glu-Pro モチーフは太字で示し、モチーフの中でも酵素の活性発現に特に重要な役割を持つアミノ酸残基は矢印で示した。

表1 無細胞抽出液中の酵素活性の比較

菌株名	比活性 (munits/mg タンパク質)	
	β -グルコシダーゼ	β -フコシダーゼ
<i>Bifidobacterium breve</i> clb	316	250
OK1e(pOK1e/DH5 α)	25500	22200
pUC18/DH5 α	0	0

Pro モチーフ中の Glu 残基が活性中心であることがすでに明らかとなっている²⁶⁾。

組換えプラスミド pOK1e で形質転換した大腸菌株 OK1e (pOK1e/DH5 α) の無細胞抽出液は、表1に示すように本酵素活性が非常に上昇しており、本酵素タンパク質の量は可溶性タンパク質の40%に達していた。OK1e からの酵素の精製はビフィズ菌に比べて容易であり、酵素の収量も大幅に増大した²³⁾。すなわち、絶対嫌氣的で複雑な培養条件を必要とし増殖時間も長くなるなど取扱いが困難なビフィズ菌に比べて、好氣的振蕩培養が可能で培地組成も比較的単純で取扱いが容易な組換え大腸菌 OK1e から本酵素が簡便にかつ大量に調製できた。

本酵素が大量に得られたため、本酵素タンパク質の結晶化を試みた。ハンギングドロップ法²⁷⁾により様々な沈殿剤を検討した結果、ポリエチレングリコール6000を用いることで本酵素の結晶を得ることに成功した。

4. オリゴ糖の酵素的合成と腸内細菌類での活性化

糖転移反応は、しばしば2糖類や3糖類の合成に利用される^{28,29)}。しかしながらフコシル転移反応(図1B)を利用した方法では適当なフコシル基供与体がなく、実用的ではなかった。そこで本酵素の縮合反応(図1C)に着目した。この糖縮合反応が利用できればグルコースとフコースを用いた安価なオリゴ糖合成が可能となる。しかし縮合反応は加水分解酵素の本来の反応の逆反応であるため、一般に収率が非常に低い。鰐坂ら³⁰⁾は

固定化酵素を利用した方法を改良し、糖縮合反応により良好な結果を得ている。そこで、ホルミルセルロファインを固定化担体として、これに酵素タンパク質を固定化した。その結果本酵素は固定化操作による活性の低下が若干認められたが、安定性が増し37°Cで10日間放置しても固定する前の値の80%以上の活性が保持されていた。一方、ネイティブな酵素では、37°Cで放置すると急速に失活し始め約1週間で完全に失活していた。

この固定化酵素を充填したカラムに活性炭を充填したカラムを直列につないで図3に示したようなタンデムカラムシステムを作製し、それぞれ1Mのグルコースとフコースの基質混合液をゆっくりと循環させた。酵素の糖縮合反応により生成したオリゴ糖は活性炭カラムに吸着され、未反応の単糖類は再び酵素カラムの方に送ることで反応を連続的に行うことができた。酵素タンパク質の変性を防ぐためにこのシステムを4°Cで4日間運転したのち、活性炭カラムを取り外して水で洗浄し、吸着したオリゴ糖を7.5%エタノールにて溶出させた。酵素カラムにはまた新しい活性炭カラムを連結して運転した。固定化した酵素は4°Cでの使用では殆ど失活せず、2カ月間使用した後も十分な糖縮合活性を示した。活性炭カラムのエタノール溶出画面对し、更に分取用 TLC とゲルろ過を行った。2つの縮合生成物を単離し、最

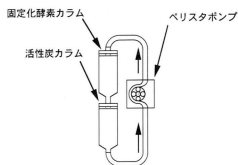


図3 ビフィズ因子、オリゴ糖を酵素合成するためのタンデムカラムシステム

最終的に一方 (Product-1) を460mg (収率として約4.4%), 他方 (Product-2) を400mg (同約3.8%) それぞれ得た。

Product-1 及び-2 の構造を決定すべく、質量分析スペクトルと、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 及びこれらを組み合わせた HMBC (^1H -detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum) による構造解析を行った結果、Product-1は、フコースの1位とグルコースの6位が β 結合しているD-フコシル ($\beta 1 \rightarrow 6$) グルコースであることが明らかとなった²¹⁾。また Product-2 とゲンチオビオースの ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR スペクトラムは全く一致していた。本酵素の糖転移反応を用いてフコシルグルコースを合成するとフコースとグルコースがそれぞれ $\beta 1 \rightarrow 2$, $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 4$, $\beta 1 \rightarrow 6$ 結合したオリゴ糖の

混合物が得られたが²⁰⁾、糖縮合反応を用いて合成すると $\beta 1 \rightarrow 6$ 結合のみが得られた。このことは転移活性よりも縮合活性の方が高い位置選択性を有することを示唆するものであった。

得られたフコシルグルコースが、実際に腸内細菌類の中でビフィズス菌にのみ資化されるかどうかについて検討した。表2に示した様々な腸内細菌26菌株をフコシルグルコースを1%含む資化テスト用培地で37°Cで培養し、菌の増殖を610nmの濁度で調べた。コントロールとしてグルコースを1%含む培地でも同様の実験を行った。その結果、本オリゴ糖は試験したビフィズス菌9菌株中8菌株で資化された。ビフィズス菌以外では、*Lactobacillus casei* 1菌株が弱い資化性を示した以外、腸内の悪玉菌とされるバクテロイデスやクロストリジウムの他、腸球菌や大腸菌などでは資

表2 フコシルグルコースの各種腸内細菌による資化性

菌株名	610 nm における濁度		資化判定*
	グルコース	フコシルグルコース	
ビフィズス菌			
<i>Bifidobacterium breve</i> 203	0.97	0.92	+
<i>Bifidobacterium breve</i> clb	0.91	0.99	+
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1192	0.98	0.83	+
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> JCM 1205	1.01	0.80	±
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM 1217	1.12	0.07	—
<i>Bifidobacterium infantis</i> JCM 1222	1.09	0.94	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1254	0.47	0.28	±
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 7004	1.06	0.66	±
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29251	1.05	1.02	+
乳酸桿菌			
<i>Lactobacillus delbruekii</i> IFO 3202	1.81	0.57	—
<i>Lactobacillus casei</i> IFO 3425	1.80	0.89	±
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	1.00	0.18	—
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IFO 13953	1.70	0.10	—
<i>Lactobacillus brevis</i> AKU 1203	1.69	0.04	—
その他の腸内細菌類			
<i>Bacteroides</i> sp.	0.89	0.05	—
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1.70	0.03	—
<i>Clostridium perfringens</i> GAI-0084	1.63	0.03	—
<i>Escherichia coli</i> IFO 3806	1.35	0.05	—
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301	1.54	0.06	—
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 3319	1.67	0.09	—
<i>Enterococcus faecalis</i> IFO 3971	1.70	0.33	—
<i>Eubacterium ventriosum</i>	0.58	0.01	—
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	0.95	0.05	—
<i>Lactococcus lactis</i> IFO 12007	1.40	0.32	—
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	1.10	0.05	—
<i>Staphylococcus aureus</i> AKU 0520	1.16	0.04	—

* グルコース培地での濁度に対して +: 80%以上, ±: 40%以上80%未満, -: 40%未満

化されなかった³¹⁾。これらの結果は、本オリゴ糖が比較的选择性の高いピフィズ因子に成りうる可能性を示唆している。

5. ピフィズ菌における β -グルコシダーゼ遺伝子の発現調節³²⁾

セロビオースによる馴養によって、*B. breve* 203の β -グルコシダーゼ活性が著しく上昇するメカニズムについて検討した。本酵素の精製標品をウサギに感作してポリクローナル抗体を作成し、これを用いて親株 *B. breve* 203及びセロビオース馴養株 *B. breve* clb より調製した無細胞抽出液についてウエスタンブロットを行った。その結果、*B. breve* 203に比べて馴養株 *B. breve* clb では β -グルコシダーゼタンパク質が大量に発現していることが明らかとなった。そこで両株より総RNAを調製し、本酵素ORFに特異的なプローブを用いてノーザンブロットを行ったところ、馴養株 *B. breve* clb では本酵素のmRNAが親株に比べて大量に転写されていることが明らかとなった。次に両株から染色体DNAを調製し、本酵素ORFに特異的なプローブを用いてサザンブロットを行ったところ、両株の遺伝子の制限酵素による切断パターンに差異は認められず、染色体での構造遺伝子の重複はないことが明らかとなった。これらの結果から馴養による酵素活性の上昇は転写レベルでの変化であることが明らかとなった。更に詳細にこの現象を解明するため、親株 *B. breve* 203と馴養株 *B. breve* clb のそれぞれにおいて本酵素構造遺伝子の5'上流域の構造を検討した。その結果、両株とも翻訳開始点より100~130bp上流側にプロモーター配列を認めた。さらに両株の上流域約600bpまでの塩基配列に差異は認められなかった。またプライマーエクステンション法により本酵素mRNAの転写開始点は、両株とも翻訳開始点より94bp上流側のアデニン残基であるこ

とが明らかとなった。さらにプロモーター配列の5'上流側にはcAMP-CRP結合部位に相同性の高い配列が、また、転写開始点より約30bp下流側には大腸菌の *lac* リプレッサーが結合する配列に相同性の高い配列を認めた。さらにcAMPによる本酵素mRNA転写量への影響を検討したが、コントロールと有意な差は見られなかった。これらの結果より、セロビオースの馴養による本酵素活性の上昇は遺伝子の調節領域の変異によるものではないことが明らかになった。本酵素の発現調節には何らかのDNA結合タンパク質が関与していると推測され、馴養の現象もその調節タンパク質における何らかの変化によるものと考えられた。

6. *Bifidobacterium breve* の α -ガラクトシダーゼ

従来より腸内ガス発生の原因となる膨満因子として問題にされてきた大豆オリゴ糖も、良好なピフィズ因子であることが近來の研究により明らかになってきた。そこで本研究において大豆中に含まれるオリゴ糖であるラフィノースなど、 α -D-ガラクトシル基を有するオリゴ糖を炭素源としてピフィズ菌を培養したところ、菌体内に α -ガラクトシダーゼが特異的に強く誘導生成することを見出した。この結果より、本酵素がピフィズ菌の増殖にとって重要な役割を果たしていると考え、 α -ガラクトシル基を有するオリゴ糖の代謝機構についての詳細な解明を目的として、本酵素を精製し、酵素化学的性質を明らかにすると共に、本酵素の遺伝子解析を行った。

B. breve 203を、ラフィノースを炭素源とする培地で培養すると、菌体中の α -ガラクトシダーゼ活性がグルコース培地で菌体を培養した場合の活性と比べて約50倍程高くなることを見出した。そこで、ラフィノースを炭素源として生育させた本菌の無細胞抽出液より α -ガラクトシダーゼを

様々なカラムクロマトグラフィーによって単タンパク質にまで精製し、諸性質を検討した。精製酵素は約80kDaのサブユニットをもつ分子サイズ約160kDaのホモダイマーのタンパク質であり、熱に対して、比較的安定な酵素であった。また、 α -ガラクトシル基に対して特異性が高く、 β -ガラクトシル基や α -N-アセチルガラクトサミンル基は加水分解しなかった。

7. α -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニング

本酵素の遺伝子のクローニングをショットガン法で行った。すなわち、ゲノムDNAを制限酵素で部分分解した後、ベクターに組み込み大腸菌DH5 α に導入した。ラフィノーズ資化反応を指標にしたスクリーニング法によって得られたポジティブクローンは、本酵素遺伝子を含む約8 kbのDNA断片を持っており、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子が、大腸菌内で発現していることを確認した。さらにサブクローニングの後、活性を発現する約5.5kbのインサート断片についてその塩基配列を決定した。2,319bpの長さを持つORF1は推定分子量約76kDaのタンパク質をコードしており、精製 α -ガラクトシダーゼのそれとほぼ一致した。また他起源の同酵素とコンセンサスのある配列部分が見出されている。さらにこのORFの上流域にはCcpA結合部位と相同性の高い配列が見られた。

CcpAは、グラム陽性細菌において知られている糖代謝の発現調節機構においてレセプターとして機能するDNA結合タンパク質であることから本酵素のORFの発現はCcpAによって制御されている可能性が示唆された。

文 献

- 1) T. Mitsuoka: *Bifidobacteria Microflora*, **3**, 11 (1984).
- 2) T. Mitsuoka: *Pharmacia*, **5**, 608 (1969).
- 3) T. Mitsuoka: *J. Industrial Microbiol.*, **6**, 263 (1990).
- 4) V. Scardivi & L. D. Trovatielli: *Annu. Microbiol.*, **15**, 19 (1965).
- 5) S. Hori: *New Food Industry*, **25**, 25 (1983).
- 6) K. Kawase, T. Suzuki, I. Kiyosawa, S. Okonogi, T. Kawashima, & M. Kuboyama: *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 25 (1983).
- 7) P. Gyögy, R. W. Jeanloz, H. V. Nicolai, & F. Zilliken: *Eur. J. Biochem.*, **43**, 29 (1974).
- 8) R. Tanaka, H. Takayama, M. Morotomi, T. Kuroshima, S. Ueyama, K. Matsumoto, A. Kuroda, & M. Mutai: *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 17 (1983).
- 9) T. Hidaka, T. Hara, T. Sakaeda, J. Okada, K. Shimada, & T. Mitsuoka: *Riken Flora Symposium*, **4**, 39 (1984).
- 10) Y. Benno, K. Endo, N. Shiragami, K. Sayama, & T. Mitsuoka: *Bifidobacteria Microflora*, **6**, 59 (1987).
- 11) H. Hidaka, T. Eida, T. Adachi, & Y. Saitoh: *Nippon Nôeikagaku Kaishi*, **61**, 915 (1987).
- 12) M. Okazaki, S. Fujikawa, & S. Matsumoto: *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **43**, 395 (1990).
- 13) T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, & T. Mitsuoka: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2157 (1991).
- 14) K. Wada, J. Watabe, J. Mizutani, M. Tomoda, H. Suzuki, & Y. Saitoh: *Nippon Nôeikagaku Kaishi*, **66**, 127 (1992).
- 15) M. Hotta, Y. Okikawa, Y. Morikawa, N. Yamashita, S. Iwata, Y. Satoh, J. Hanada, & R. Tanaka: *Acta Paediatr. Jpn.*, **29**, 160 (1987).
- 16) S. K. Anand, R. A. Srinivasan, & L. K. Rao: *Cultured Dairy Products*, **6**, 8 (1985).
- 17) M.-F. Bernet, D. Brassart, J.-R. Neeser, & A. L. Servin: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4121 (1993).
- 18) T. Mitsuoka: *Zbl. f. Bakt., I. Abt. Orig.*, **210**, 52 (1969).
- 19) T. Tochikura, K. Sakai, T. Fujiyoshi, T. Tachiki, & H. Kumagai: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2279 (1986).
- 20) K. Sakai, T. Tachiki, H. Kumagai, & T. Tochikura: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 313 (1989).
- 21) K. Sakai, M. Tanaka, T. Tachiki, H. Kumagai, & T. Tochikura: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 699 (1987).
- 22) N. Nunoura, K. Ohdan, T. Yano, K. Yamamoto, & H. Kumagai: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 188 (1996).
- 23) N. Nunoura, K. Ohdan, K. Tanaka, H. Tamaki, T. Yano, M. Inui, H. Yukawa, K. Yamamoto, & H. Kumagai: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 2011 (1996).

-
- 24) P. Béguin: *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**, 219 (1990).
- 25) F. Gräbnitz, M. Seif, K. P. Rücknagel, & W. L. Staudenbauer : *Eur. J. Biochem.*, **200**, 301 (1991).
- 26) S. D. Baird, M. A. Hefford, D. A. Johnson, W. L. Sung, M. Yaguchi, & V. L. Seligy : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 1035 (1990).
- 27) J. Jancarík & S. I. I. Kim : *J. Apply. Cryst.*, **24**, 409 (1991).
- 28) L. Hedbys, P. O. Larsson, K. Mosbach, & S. Svensson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 8 (1984).
- 29) K. Suyama, S. Adachi, T. Toba, T. Sohma, C. Hwang, & T. Itoh: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2069 (1986).
- 30) K. Ajisaka & H. Fujimoto: *Carbohydr. Res.*, **185**, 139 (1989).
- 31) N. Nunoura, T. Fujita, K. Ohdan, M. Kiriata, K. Yamamoto, & H. Kumagai: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**(6), 1033 (1997).
- 32) N. Nunoura, K. Ohdan, K. Yamamoto and H. Kumagai: Expression of the β -D-Glucosidase I Gene in *Bifidobacterium breve* 203 during Acclimation to Cellobiose. *J. Ferment. Bioeng.*, **83** (4) 309 (1997).

Studies on Carbohydrates Metabolism Specific to *Bifidobacterium*

Hidehiko Kumagai (Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Bifidobacteria are Gram-positive, non-spore-forming anaerobe, predominant bacteria in the intestinal tract of human and some animals. It is known that they are useful for maintenance of the host's health and have some beneficial effects such as reinforcement of immune functions and prevention of cancer. Moreover, *Bifidobacteria* are considered as a natural drug delivery system (probiotics), because they metabolize sugars to produce acetic acid and lactic acid which inhibit the growth of pathogenic microorganisms in the intestinal tract. Recently, several studies have been made to find an oligosaccharide, Bifidus-factor which is specifically assimilated by *Bifidobacteria*.

In our laboratory, *Bifidobacterium breve* 203 was isolated from human adult feces and this strain was found to produce a novel β -D-glucosidase and α -D-galactosidase. We purified and characterized both enzymes from an acclimatized or induced strain and cloned the genes to examine the mechanism increasing the enzyme activity and to estimate their usefulness to synthesize a Bifidus-factor.

The β -glucosidase (EC.3.2.1.21) activity of *B. breve* 203 was increased by acclimation with cellobiose, successive cultivation on the medium containing cellobiose as the sole carbon source. The enzyme was purified to homogeneity from cell-free extracts of an acclimatized strain of *B. breve* clb. This enzyme had not only β -glucosidase activity but also β -D-fucosidase activity. This enzyme had also transferase activity for the β -D-fucosyl group but not for the β -D-glucosyl group.

Genomic DNA encoding a β -glucosidase, which has β -fucosidase activity, was cloned from *B. breve* 203 clb. The recombinant enzyme was purified and the recovery of enzyme was about 138-fold higher than from *B. breve* 203 clb.

Circulation of a solution of D-fucose and D-glucose through a reaction system consisting of columns, in series of immobilized recombinant β -glucosidase and activated charcoal gave two oligosaccharides. These oligosaccharides were identified to D-fucosyl (β -1-6) D-glucose and gentiobiose (D-glucosyl (β -1-6) D-glucose). The D-fucosylglucose was well assimilated by many *Bifidobacteria* but not by other intestinal bacteria tested.

To elucidate the mechanism of acclimation, the translation and transcription of β -glucosidase gene were examined and marked differences in the expression of the enzyme and the label of its mRNA between *B. breve* 203 and *B. breve* 203 clb found. The transcriptional starting point and promoter and operator regions were assigned.

α -D-galactosidase was purified from *B. breve* 203 grown on raffinose and its gene was

cloned to examine and elucidate a role of the enzyme in the metabolism in detail.

The purified α -galactosidase from *B. breve* 203 had a molecular weight of 160,000 (determined by native-gradient PAGE), and optimum pH was 5.5–6.5. Its stable pH was 5.5–12, and the optimum temperature for activity was 37°C. The enzyme retained 80% of its original activity after incubation for 10min at 60°C. The purified α -galactosidase was specifically active toward α -D-galactosyl moiety.

The α -galactosidase gene was cloned and expressed in *E. coli*. Cell-free extracts from the recombinant had high specific activity which was same as that of *B. breve* 203 grown on raffinose. The 5.5kbp insert fragment in the plasmid pKT12 had two open reading frame, ORF1 and ORF2. ORF1 was 2,018bp long and had a predicted molecular mass of 74,831Da, which was almost identical to the results of SDS-PAGE of the purified α -galactosidase from *B. breve* 203. Amino acid sequence of ORF1 revealed that it had consensus sequence of α -galactosidase from various soueces.