

<平成 22 年度助成>

## 母乳オリゴ糖に作用するビフィズス菌の酵素 ～分子機能の解明とプレバイオティクス開発への応用～

片山 高嶺

(石川県立大学生物資源工学研究所)

### 緒 言

母乳栄養児の腸管では、授乳開始後速やかにビフィズス菌優勢な腸内細菌叢（ビフィズスフローラ）が形成される。このビフィズスフローラの形成には、人乳に含まれるオリゴ糖（母乳オリゴ糖）が関与していることが50年以上も前から指摘されてきたが、その分子基盤は不明なままであった。申請者は最近、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* が母乳オリゴ糖資化に関わるユニークな代謝経路を有することを見出すと共に、この経路を構成する遺伝子群のホモログが腸内細菌の中でもある種のビフィズス菌にしか存在しないことを明らかとした。このことは、母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成の謎を解明する大きな手がかりとなると考えている。

本研究では、ビフィズス菌の母乳オリゴ糖資化経路の生理的意義を理解すること、経路上の酵素の構造機能解析を行うこと、また、その酵素を機能改変することで真のプレバイオティクスである母乳オリゴ糖を精密酵素合成することを目標とした。

### 乳児型ビフィズス菌による母乳オリゴ糖資化様式

一般に、乳児糞便からは *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* および *B. longum* subsp. *longum* の4種のビフィズス菌が単離される（以降、乳児型ビフィズス菌と総称する）。これらの菌種が実際に母乳オリゴ糖をどのように資化するかについて調べた。分娩後30日～120日（平均年齢33歳、妊娠期間36～40週）の母親から集めた母乳より

中性オリゴ糖画分を調整し、単一炭素源として培地に添加してビフィズス菌を培養した。菌の生育はOD<sub>600</sub>で測定し、経時的にその培養液を回収した。遠心分離によって培養上清を得た後、2-アミノ安息香酸でオリゴ糖を蛍光ラベル化し、HPLCにて分析した。使用したカラムはAmide-80（Tosoh）で、内部標準としてはイソマルトペンタオースを使用した。

使用した乳児型ビフィズス菌のうち、*B. bifidum* および *B. longum* subsp. *infantis* は母乳オリゴ糖培地で良く生育したが（OD<sub>600</sub> > 1.5）、*B. breve* および *B. longum* subsp. *longum* はわずかにしか生育しなかった（OD<sub>600</sub> < 0.5）（図1）。

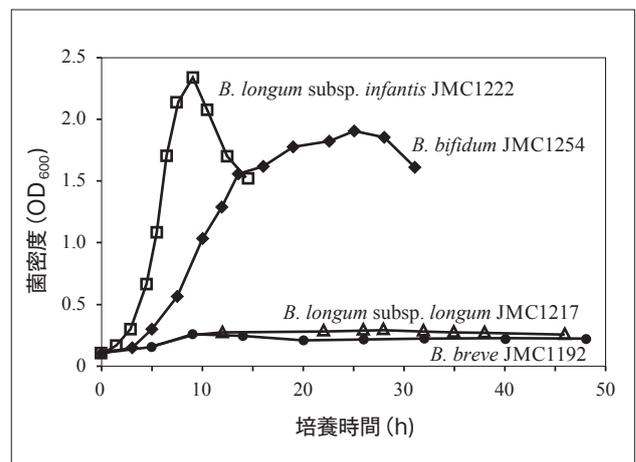


図1. 母乳オリゴ糖培地での乳児型ビフィズス菌の増殖

*B. bifidum* の培養上清では、分泌型 1,2- $\alpha$ -L-フコシダーゼおよびラクト-N-ビオシダーゼによって2'-フコシルラクトースおよびラクト-N-テトラオースが速やかに分解され、それに伴いL-フコース、ラクト-N-ビオースIおよびラクトースの濃度が上昇した（図2）。ここで注目すべきは、

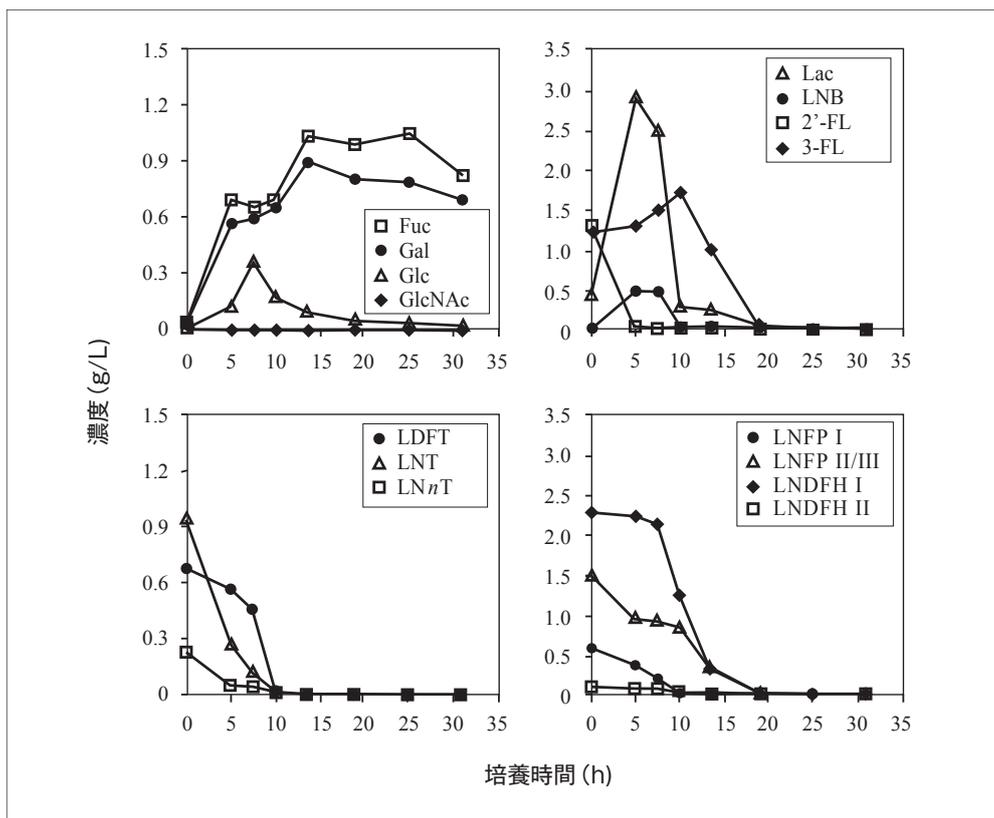


図2. *B. bifidum* による母乳オリゴ糖分解

細胞が旺盛に増殖を開始する対数増殖期の初期にも関わらず、ラクト-N-ビオース I (1.3 mM) およびラクトース (6.7 mM) が培養上清に残されていたことである (2'-フコシルラクトースとラクト-N-テトラオースの初濃度はそれぞれ 3.0 mM と 1.6 mM)。また、培養の後期にはすべての母乳オリゴ糖が分解されたが、L-フコースおよびガラクトースが消費されないままに培養上清に残っていた。これらのことは、実際の腸管内では *B. bifidum* によって分解された母乳オリゴ糖が他の菌に分配されていることを示唆している。*B. longum* subsp. *infantis* の培養上清では、対数増殖期にほぼすべての母乳オリゴ糖が消失し、その後、単糖がわずかに検出された (データ非掲載)。このことから、本菌は母乳オリゴ糖をそのままの形で細胞内に取り込んでいることが明らかとなり、このことは、本菌の母乳オリゴ糖分解に関わる酵素がすべて細胞質に局在していること (次項参照) と良く一致した。*B. breve* および *B.*

*longum* subsp. *longum* はラクト-N-テトラオースのみを資化した (データ非掲載)。

以上のことから、乳児型ビフィズス菌においては菌種間で母乳オリゴ糖資化様式が異なることが明らかとなった。母乳オリゴ糖資化能は腸内細菌の中でも乳児型ビフィズス菌にのみ検出されるが、その限られた能力が *Bifidobacterium* 属という 1 つの属の中でも多様な方法で獲得されてきたということは非常に興味深いことである。また、乳児型ビフィズス菌がラクト-N-テトラオースを優先的に資化する能力を有していたことは特筆すべきことである。というのも、ラクト-N-テトラオースはヒトの母乳中に最も多く含まれるコア構造で有り、霊長類を含む他の哺乳類には存在しないか、存在してもごく微量である。つまり、これらのことはヒトとビフィズス菌が共進化してきたことを示唆しており、ヒトはその乳児期にビフィズス菌と積極的に共生する戦略を取ってきたと考えられた。

## ラクト-N-テトラオース $\beta$ -1,3-ガラクトシダーゼの単離と機能解析

上記の結果より、*B. longum* subsp. *infantis* は優れた母乳オリゴ糖資化能を有していることが明らかとなった。本菌のゲノム上には母乳オリゴ糖分解に関わると推定される遺伝子群がクラスターを形成して存在しており (HMO cluster-1)、比較ゲノムによる解析結果から、本菌種の母乳オリゴ糖資化能は本クラスターの存在によるものであると考えられていた。ところが、本クラスター内の酵素を精製してその基質特異性を調べたところ、母乳オリゴ糖の主要コア構造であるラクト-N-テトラオースには全く作用しないことが明らかとなった。一方、*B. longum* subsp. *infantis* の無細胞抽出液を用いた場合は、ラクト-N-テトラオースからガラクトースの遊離が観察され、このことから HMO cluster-1 とは別の遺伝子座にある  $\beta$ -ガラクトシダーゼが母乳オリゴ糖の分解に重要であることが明らかとなった。なお一般に殆どの  $\beta$ -ガラクトシダーゼは  $\beta$ -1,4 結合に特異的であり、 $\beta$ -1,3 結合に作用する酵素は植物病原菌およびバチルス属細菌由来の 2 例のみが報告されていた。そこで、本菌のゲノム上に存在するすべての  $\beta$ -ガラクトシダーゼホモログを組換えタンパク質として発現させ、その基質特異性について検討を加えた。その結果、Blon\_2016 がラクト-N-テトラオースに特異的に作用する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (ラクト-N-テトラオース  $\beta$ -1,3-ガ

ラクトシダーゼ; Bga42A と命名) であることが明らかとなった (表 1)。本酵素のホモログは乳児型ビフィズス菌にのみ存在しており、このことは上述したヒトとビフィズス菌の共進化を考える上でも興味深い結果である。

## 1,3-1,4- $\alpha$ -L-フコシダーゼの構造機能解析およびフコシルオリゴ糖の精密酵素合成

上記の研究過程において、*B. longum* subsp. *infantis* の HMO cluster-1 内に存在する Blon\_2336 は 1,3-1,4- $\alpha$ -L-フコシダーゼ (*BiAfcB*) をコードしていることが明らかとなった。*BiAfcB* は糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 29 に属しているが、GH29 のメンバーを分子系統樹解析すると 2 種のサブファミリー (GH29-A および GH29-B) に分類されること、またこの分類が基質特異性を良く反映していることを見出した (図 3)。すなわち、GH29-A の酵素は *p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -L-フコピラノシドを含む種々のフコシル結合に作用する (EC 3.2.1.51) のに対し、*BiAfcB* が属する GH29-B の酵素は 1,3/4- $\alpha$ -L-フコシル基を特異的に切断する (EC 3.2.1.111)。この差異の分子基盤を明らかとするため、*BiAfcB* の X 線結晶構造解析を行った。野生型のデオキシフコノジリマイシン (DFJ) 複合体 (WT-DFJ) および触媒残基 2 重変異体のラクト-N-フコペンタオース II (LNFP II) 複合体 (D172A/E217A-LNFP II) の構造をそれぞれ 1.6 Å および 1.8 Å の分解能で決定した。WT-DFJ 複合体では DFJ とエチレンゲ

表 1. *B. longum* subsp. *infantis* 由来 Bga42A の基質特異性

酵素	基質	構造	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Bga42A (Blon_2016)	pNP- $\beta$ -Gal		$6.7 (\pm 0.6) \times 10^{-1}$	$1.1 (\pm 0.0) \times 10^3$	$1.6 (\pm 0.1) \times 10^3$
	pNP- $\beta$ -Fuc				$1.6 (\pm 0.4) \times 10^1$
Bga42A (Blon_2016)	Lac	Gal $\beta$ 1-4Glc	$1.6 (\pm 0.2) \times 10^1$	$9.7 (\pm 0.3) \times 10^1$	$6.1 (\pm 0.5) \times 10^0$
	LacNAc	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	$4.4 (\pm 0.3) \times 10^1$	$1.6 (\pm 0.0) \times 10^1$	$3.8 (\pm 0.2) \times 10^{-1}$
	LNnT	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc			$1.1 (\pm 0.1) \times 10^0$
	LNB	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc	$2.8 (\pm 0.2) \times 10^1$	$8.6 (\pm 0.3) \times 10^1$	$3.0 (\pm 0.2) \times 10^0$
	LNT	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc	$2.2 (\pm 0.3) \times 10^0$	$2.7 (\pm 0.1) \times 10^2$	$1.2 (\pm 0.1) \times 10^2$

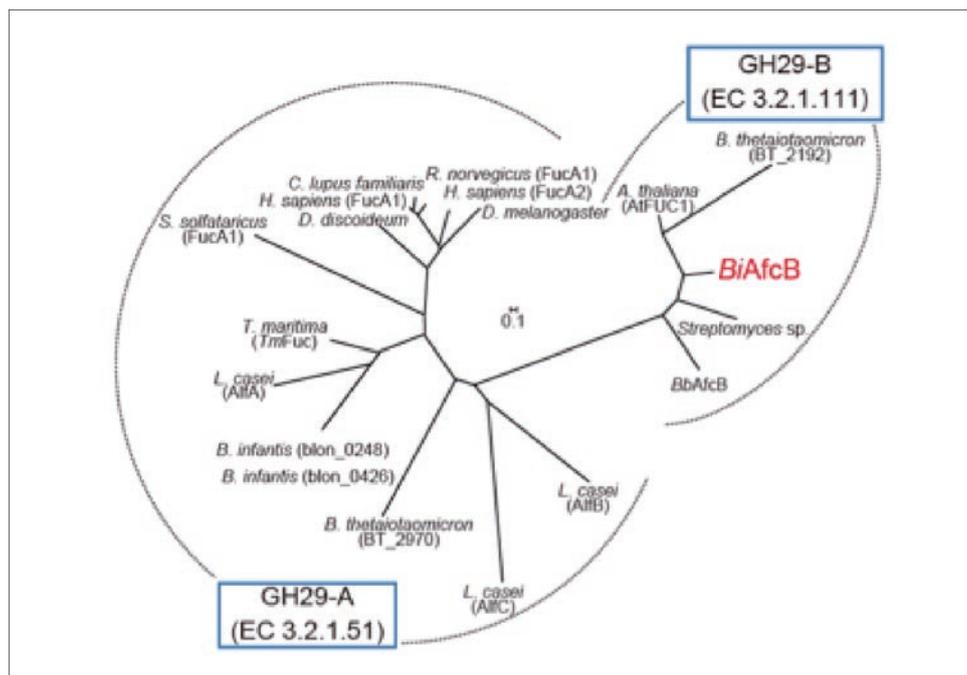


図3. GH29の分子系統樹解析

リコール (抗凍結剤) の、D172A/E217A-LNFP II 複合体ではラクト-N-フコペンタオース II のうちルイス a 構造の電子密度が活性中心において観察された (図4)。興味深いことに、基質結合に伴い活性中心近傍のループが大きく構造変化し、触媒残基が適切な位置に配置される (誘導適合) ことが明らかとなった (図5)。また、BiAfcB はフコースが結合している N-アセチルグルコサミン残基よりも、枝分かれしたガラクトース残基と強く相互作用していた。これらの構造的な特徴は、BiAfcB がルイス a/x のような分岐したガラクトース残基を持つ 3 糖構造によく作用するものの、ガラクトース残基を有しない 2 糖構

造 (Fuc $\alpha$ 1-3/4GlcNAc) には作用しないことと一致した (データ非掲載)。一方、GH29-A に属する *Thermotoga maritima* 由来の酵素 (*TmFuc*) では誘導適合は見られず、また、BiAfcB のガラクトース結合部位に相当する位置には R254 が存在し、基質および触媒残基と水素結合していた。BiAfcB においてガラクトース結合部位を形成しているアミノ酸残基は GH29-B メンバー間で、*TmFuc* の R254 は GH29-A メンバー間でそれぞれよく保存されていた。以上のことから、ガラクトース残基結合部位の有無、また、ガラクトース結合による誘導適合が、GH29-A/B の基質特異性を規定する分子基盤であることが明らかになった。

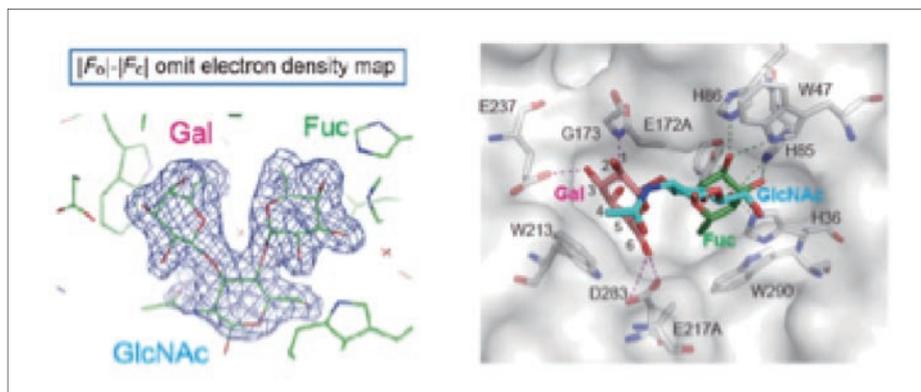


図4. D172A/E217A-LNFP II 複合体の活性中心で観察されたルイス a の 3 糖構造

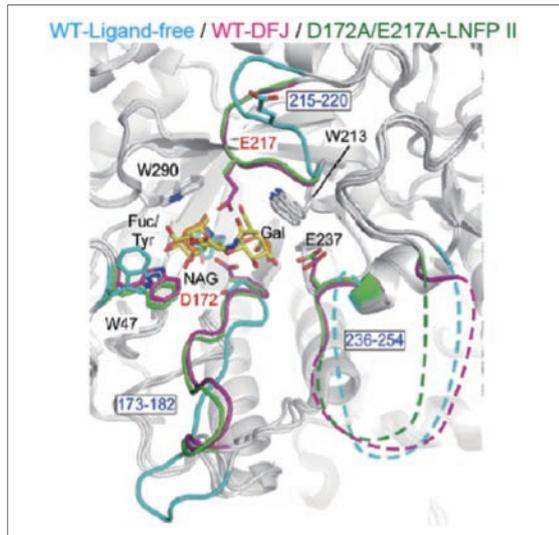


図5. BiAfcB 活性中心で観察された基質結合に伴う誘導適合

次に、本酵素の厳密な基質特異性を利用したフコシルオリゴ糖の精密酵素合成を行った。求核残基のセリン置換体を作製し、 $\beta$ -L-フコシルフルオリドを供与体、ラクト-N-ビオースIもしくはN-アセチルラクトサミンを受容体として反応させたところ、それぞれルイスaおよびルイスxが特異的に合成され、他の副産物は全く生じなかった(図6)。供与体に対する収率は60%であった。これらの結果から、本変異型酵素は極めて高い立体・位置の制御が可能な1,3-1,4- $\alpha$ -L-フコシダーゼであることが明らかとなった。

## まとめ

本研究では、乳児型ビフィズス菌による母乳オリゴ糖資化様式を、それぞれの菌が有する代謝能(酵素機能)とあわせて考察するとともに、母乳オリゴ糖に作用するユニークな酵素の構造機能解析を行った。これらの結果は、母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成機構を解明する上で重要な成果であると考えている。また、変異型酵素を用いて精密なフコシルオリゴ糖合成が可能であることを示した。

今後は、乳児糞便などを使用して、実際の乳児腸管内における母乳オリゴ糖の分解やビフィズス菌遺伝子の発現などを調べることで、更に詳細な検討を行う必要がある。また、変異型酵素を利用した母乳オリゴ糖合成基盤を確立し、将来的には人工乳への添加を可能としたい。

## 謝辞

本研究課題に対し多大なるご支援を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げます。本研究の成果は下記の通り発表しました。

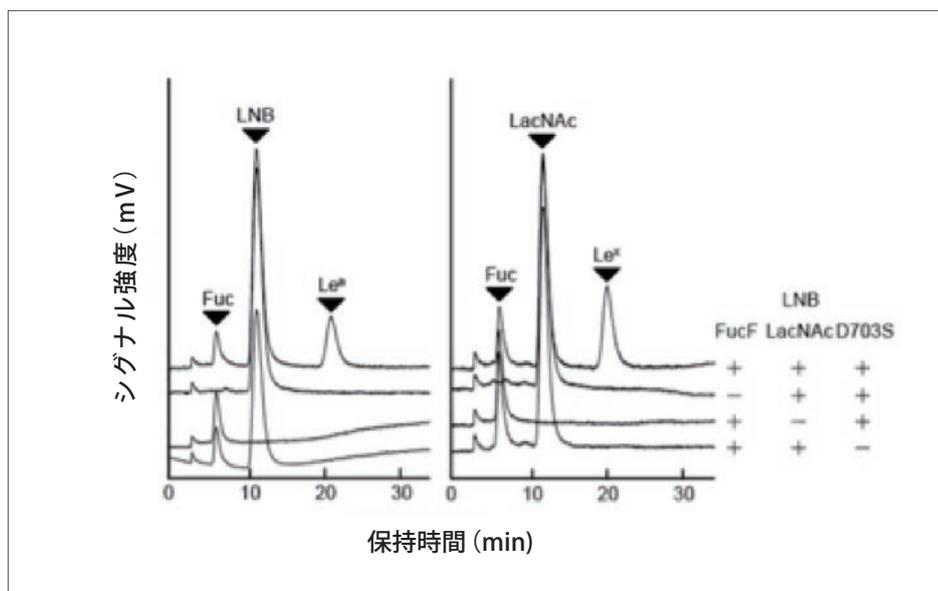


図6. 1,3-1,4- $\alpha$ -L-フコシダーゼによるルイスa/xの精密合成

## 〔原著論文〕

Sakurama H, Fushinobu S, Hidaka M, Yoshida E, Honda Y, Ashida H, Kitaoka M, Kumagai H, Yamamoto K, and Katayama T (corresponding author). (2012). 1,3-1,4- $\alpha$ -L-Fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *Journal of Biological Chemistry*. 287(20):16709-19.

Yoshida E, Sakurama H, Kiyohara M, Nakajima M, Kitaoka M, Ashida H, Hirose J, Katayama T (corresponding author), 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(3):361-368.

Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T (corresponding author), Yamamoto K, Kumagai H, Ashida H, Hirose J, and Kitaoka M. (2011). Physiology of the consumption of human milk oligosaccharides by infant-gut associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 286:34583-34592.

## Infant gut-associated bifidobacteria and human milk oligosaccharides (HMOs)

Takane Katayama

Research Institute for Bioresources and Biotechnology  
Ishikawa Prefectural University

1. The bifidogenic effect of HMOs has long been known, yet the precise mechanism underlying it remains unresolved. I measured the concentration of each neutral HMO during cultivation of infant-gut associated bifidobacteria by using normal-phase high-performance liquid chromatography. *Bifidobacterium bifidum* used secretory glycosidases to degrade HMOs, whereas *B. longum* subsp. *infantis* assimilated all HMOs by incorporating them in their intact forms. *B. longum* subsp. *longum* and *B. breve* consumed lacto-*N*-tetraose only. *B. bifidum* left degraded HMO metabolites outside of the cell even when the cells initiate vegetative growth, which indicates that the different species/subspecies can share the degraded sugars. The predominance of type-1 chains in HMOs and the preferential use of type-1 HMO by infant gut-associated bifidobacteria suggest the coevolution of the bacteria with humans.
2. The ability of *B. longum* subsp. *infantis* to assimilate HMOs has been ascribed to the presence of a gene cluster (HMO cluster-1) contained in its genome. However, because no enzymatic studies have been completed, the metabolism of HMOs by the organism remains ambiguous. I characterized  $\beta$ -galactosidases of this subspecies to understand how the organism degrades type-1 and type-2 isomers of HMOs. The results revealed that, while the Blon\_2334 gene located within the HMO cluster-1 encodes a  $\beta$ -galactosidase specific for lactose and type-2 HMOs, the locus tag Blon\_2016 gene, which is distantly located from the HMO cluster-1, encodes a novel  $\beta$ -galactosidase (Bga42A) with a significantly higher specificity for lacto-*N*-tetraose. Despite the quite rare occurrence in nature of  $\beta$ -galactosidases acting on type-1 chains, the close homologues of Bga42A were present in the genomes of infant-gut associated bifidobacteria. The predominance of type-1 chains in HMOs and the conservation of Bga42A homologues suggest the coevolution of infant-gut associated bifidobacteria with humans.
3. Regiospecific synthesis of glycosyl bonds, especially  $\alpha$ -L-fucosyl linkages, is quite difficult to control. I generated an  $\alpha$ -L-fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into the type-1 and type-2 chains, respectively, *i.e.*, the enzyme specifically accepts the disaccharide structures (Gal  $\beta$ 1-3/4GlcNAc) at the non-reducing ends and attaches a Fuc residue *via* an  $\alpha$ -(1,4/3)-linkage to the GlcNAc. X-ray crystallographic studies revealed the structural basis of this strict regio- and acceptor-specificity, that includes the induced-fit movement of the catalytically important residues, and the difference between the active site structures of 1,3-1,4- $\alpha$ -L-fucosidase (EC 3.2.1.111) and  $\alpha$ -L-fucosidase (EC 3.2.1.51) in the glycoside hydrolase family 29. The glycosynthase developed in this study should serve as a potentially powerful tool to specifically introduce the Lewis a/x epitopes onto labile glycoconjugates including glycoproteins.