

ビフィズス菌の植物由来 β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素の構造解析 Crystallography of bifidobacterial enzymes for degradation of plant β -arabinofuranose-containing glycans

澤野孝太, 丸山瞬, 斎藤圭太, Lixia Pan, 荒川孝俊, 伏信進矢

東京大学大学院農学生命科学研究科、〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
Kota SAWANO, Shun MARUYAMA, Keita SAITO, Lixia PAN, Takatoshi ARAKAWA and
Shinya FUSHINOBU

Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657,
Japan

1 はじめに

「善玉」乳酸菌として有名なビフィズス菌は、難分解性糖質を利用するための、多様な糖質分解酵素を有する。植物が持つ糖タンパク質や多糖には、 β -L-アラビノフラノシド結合を含む糖鎖が存在することが知られていたが、このような結合を分解する酵素は近年まで全く知られていなかった。鹿児島大の藤田らは、*Bifidobacterium longum* JCM1217 株から、植物の β -アラビノオリゴ糖代謝に関わる遺伝子群を発見した[1, 2]。我々はそのうち、糖質加水分解酵素データベース CAZy において GH127 に属する β -L-アラビノフラノシダーゼ HypBA1 の立体構造を報告した[3]。HypBA1 の活性中心には亜鉛原子が存在し、それに配位したシステインが求核触媒として働く非常に珍しいものであった。HypBA1 のホモログ遺伝子は細菌から植物まで幅広く存在し、DUF1680 という大きなタンパク質ファミリーを形成しているが、GH127 に登録されている酵素はそのごく一部である。また、藤田らが発見した新規な β -L-アラビノフラノシド加水分解酵素の中には、同じく新規ファミリーである GH121 に属する β -L-アラビノビオシダーゼ(HypBA2)も存在しているが、その立体構造も分かっていなかった。

本研究では、この分解系を構成する糖質分解酵素およびそのホモログの X 線結晶構造解析を行い、これらの分子機構を原子レベルで詳細に解明することを目的とした。なお、本実験課題を遂行しているうちに、Pfam の DUF1680 は Glyco_hydro_127 (PF07944)に改名された。また、CAZy においては、旧 DUF1680 に属していた酵素のうち一部が新規ファミリーGH146 に分類されることになった(図1)。

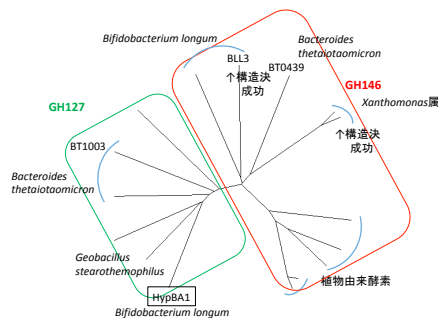


図1 : GH127 と GH146 酵素の分子系統樹

2 実験

ビフィズス菌の β -アラビノオリゴ糖分解経路に属する GH121 HypBA2 および HypBA1 ホモログであり GH146 に属する BLL3 および植物病原菌 *Xanthomonas* 属由来酵素の結晶化を行い、KEK-PF の構造生物学ビームラインを利用して回折測定実験を行った。

3 結果および考察

HypBA2 では SeMet 法により、2.2 Å 分解能の native 構造の決定に成功した。一方、GH146 に属する BLL3 では分解能 1.75 Å で構造決定に成功した。活性部位には Tris 分子が結合しており、HypBA1 とほぼ同じ活性中心を持つことが分かった。さらに、*Xanthomonas* 属由来 GH146 酵素では 2.35 Å 分解能で構造決定に成功した(図2)。

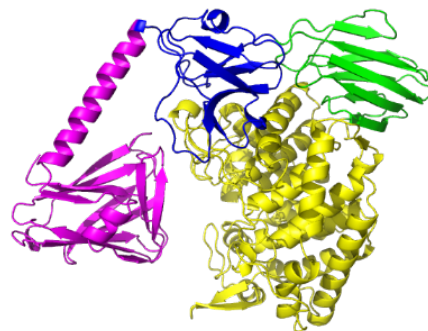


図2 : *Xanthomonas* 属由来 GH146 酵素の構造

BLL3 と *Xanthomonas* 属由来 GH146 酵素の活性中心には、システインとグルタミン酸が配位した金属原子が結合していた。吸収端付近の異常分散データの測定を行い、いずれの酵素においても、高エネルギー側で測定したデータでは強い異常分散ピークを示したが、低エネルギー側で測定したデータではそのピークが消失したことから、この金属が亜鉛原子であることが確認できた。

4 まとめ

HypBA2 では GH121 として初めての立体構造の決定に成功したが、活性部位の一部で構造がディスオーダーしており、基質結合様式および反応機構の解明は今後の課題である。GH146 に属する 2 種類の酵素 (BLL3 と *Xanthomonas* 属由来 GH146 酵素) の構造決定にも成功した。これらの酵素でも活性中心には 3 つのシステインと 1 つのグルタミン酸が配位した亜鉛原子が存在しており、GH127 と共通の活性中心を有することがわかった。

さらに、*Xanthomonas* 属由来 GH146 酵素はこれまでに明らかになっていた二量体で存在するピフィズス菌由来の β -L-アラビノフラノシダーゼとは異なり、単量体で存在していた。また、新たに糖質結合モジュールと構造が類似する新規ドメインの存在が明らかになった。

謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさん、共同研究者の鹿児島大の藤田清貴先生、理研の石渡明弘先生、伊藤幸成先生に感謝いたします。

参考文献

- [1] Fujita *et al.*, *JBC* **286**, 5143 (2011)
- [2] Fujita *et al.*, *JBC* **289**, 5240 (2014)
- [3] Ito *et al.*, *BBRC* **447**, 32 (2014)

成果

1. 澤野孝太、丸山瞬、荒川孝俊、石渡明弘、中村正幸、伊藤幸成、藤田清貴、伏信進矢
「*Xanthomonas* 属細菌由来 β -L-アラビノフラノシダーゼの結晶構造」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

* asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp