

ビフィズス菌の β ヘリックス型ヒトミルクオリゴ糖分解酵素の全体構造解明 と専用シャペロンによる成熟化機構

Elucidation of whole structure of bifidobacterial β -helix type human milk oligosaccharide-degrading enzyme and its maturation mechanism

山田千早^{1,2}, 荒川孝俊^{1,2}, 伏信進矢^{1,2*}

¹ 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

² 京都大学大学院生命科学研究科、〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Chihaya YAMADA^{1,2}, Takatoshi ARAKAWA¹, and Shinya FUSHINOBU^{1,*}

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

²Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

ビフィズス菌は「善玉」乳酸菌として有名であり、ヒトの健康への寄与が科学的に解明されつつある。ビフィズス菌が棲息する小腸下部から大腸の腸管には、澱粉などの分解されやすい糖質はほとんど届かないため、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。一般的に、ビフィズス菌の糖質分解酵素には他の細菌にはほとんど見られないユニークな酵素が多く、立体構造の新規性も高いものが多い。我々はこれまで人乳に含まれるオリゴ糖のラクトNビオース (LNB; Gal- β 1,3-GlcNAc) 分解経路に関わるビフィズス菌の一連の酵素群の構造・機能解析を行い、その詳細な分子機構を明らかにしてきた。現在ではLNBはビフィズス菌増殖因子であることが証明され、分解酵素の逆反応を利用したLNBの安価な酵素合成法も開発されたことから、新規なプレバイオティクスとして有力視されている。ビフィズス菌によるLNB分解の鍵酵素は、オリゴ糖からLNB部分を切断して遊離する菌体外酵素ラクトNビオシダーゼ (LNBase) である。これまで知られている *Bifidobacterium bifidum* 由来のLNBaseはGH20に属しており、我々はKEK-PFの共同研究課題を利用してその立体構造決定に成功した[1]。一方、ごく最近、*Bifidobacterium longum* から、全く新しいタイプのLNBase (LnbX) が発見された[2]。また、LnbX遺伝子の下流に存在するLnbYは活性発現に必要であり、LnbXの成熟化を助ける分子シャペロンとして機能すると考えられている。本課題ではLnbXとLnbY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。

近年、共同研究者が、*Eubacterium* 属腸内細菌より、LnbXとLnbYが一つのタンパク質にfusionとなった遺伝子を発見した。そこで、このタンパク質 (EuLnbYX)の構造解析も行った。

一方、LnbXのホモログとして、霊長類の腸内から得られたビフィズス菌由来のLnbXホモログ (BsLnbX)、成人の腸内細菌由来のLnbXホモログ (CnLnbX)の構造解析も行った。

2 実験

LnbY単独およびLnbXとLnbYの複合体のタンパク質発現・精製と結晶化を行った。また、各種腸内細菌由来のLnbXホモログの結晶化と構造解析を行った。

3 結果および考察

B. longum 由来のLnbXの結晶構造を *Cell Chemical Biology* 誌に発表した。さらに我々はLnbYおよびLnbXとLnbYの複合体の構造解析を目指して実験を行ったが、構造解析に適した結果は得られなかった。一方で、EuLnbYXで立体構造解析に成功した (分解能1.4 Å)。興味深いことに、このタンパク質のN末端部分はLnbYと弱い配列相同性があり、その立体構造はall α ヘリックスで、これまでに見られない新規なフォールドをとっていた。またこのN末端部分は触媒ドメインの周囲を覆うようにして存在していた。

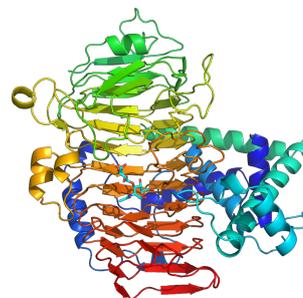


図1 : EuLnbYXの立体構造

BsLnbX と CnLnbX はそれぞれ 2.3 Å および 2.8 Å 分解能で構造決定に成功した (図 2)。

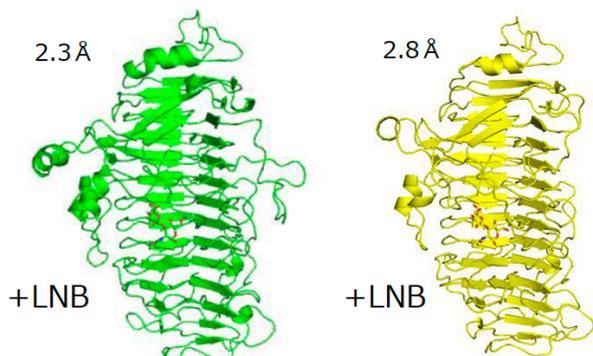


図 2 : 霊長類の腸内ビフィズス菌由来 (左) および成人腸内細菌由来 (右) LnbX ホモログの立体構造

4 まとめ

B. longum 由来の LnbY (および LnbX との複合体) の結晶構造決定には至らなかったが、弱い相同性を持ち同様の機能を持つと予想されるドメインを持つ fusion protein の構造決定に成功した。さらに霊長類の腸内ビフィズス菌由来および成人腸内細菌由来 LnbX ホモログの構造決定に成功した。今後はこれらのタンパク質の機能解析を進めて論文化を目指す。

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、特に SLS でのデータ測定を行っていただいた千田 美紀先生、原田 彩佳博士、そして、後藤愛那博士、片山高嶺先生、Maher Abou Hachem 先生をはじめとする共同研究者のみなさんに感謝いたします。

参考文献

- [1] Ito *et al.*, *JBC* **288**, 11795 (2013)
- [2] Sakurama *et al.*, *JBC* **288**, 25194 (2013)

成果

1. Yamada *et al.*, *Cell Chem. Biol.* **24**, 515-524, 2017
2. 山田千早、片山高嶺、Mitchell Hattie, Keith A. Stubbs, 荒川孝俊、伏信進矢「新規ファミリーに属するビフィズス菌由来ラクト-N-ビオシダーゼの立体構造」*応用糖質科学* **7** (2), 63-68 (2017)
3. 後藤愛那、片山高嶺、山田千早、伏信進矢、櫻間晴子「ラクト-N-ビオシダーゼ (LnbX) の機能から考える母乳オリゴ糖を介したビフィズス菌と母乳栄養児の共生・共進化」*酵素工学ニュース* **78**, 23-28 (2017)