

ミツバチ腸内細菌 *Frischella perrara* β -フルクトフラノシダーゼの立体構造 Structure of a β -fructofuranosidase from the honeybee gut bacterium *Frischella perrara*

殿塚隆史^{1,*}, 窪田有紗¹, 川合礼華¹, 小菌拓馬¹, 西河淳¹, 藤井匡², 栃尾巧²,

¹東京農工大学大学院農学府, 〒183-8509 府中市幸町 3-5-8

²物産フードサイエンス株式会社研究開発センター, 〒478-0046 知多市北浜町 24-12

Takashi Tonozuka^{1,*}, Arisa Kubota¹, Reika Kawai¹, Takuma Kozono¹, Atsushi Nishikawa¹, Tadashi Fujii², Takumi Tochio²

¹Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu 183-8509, Japan

²Research & Development Center, B Food Science, 24-12 Kitahama-cho, Chita, 478-0046, Japan

1 はじめに

1-kestoseは機能性オリゴ糖として、ビフィズス菌など人の有用腸内細菌の増殖促進作用があることが知られている。興味深いことに、ミツバチに1-kestoseを与えると好んで摂取し、ミツバチに対しても健康維持に効果があることが示されている。*Frischella perrara*はミツバチの腸内細菌で、ミツバチの栄養状態が悪い際に腸内で増殖することが報告されている。*F. perrara*は全ゲノム解析により、 β -フルクトフラノシダーゼの遺伝子を1つだけ有している。我々はこの β -フルクトフラノシダーゼ *FperFFase*の性質を調べたところ、二糖スクロースおよび四糖ニストースには高い分解活性を示したのに対し、三糖1-kestoseには低い分解活性しか示さず、大変特徴的な酵素であることを明らかにした。これを構造の面から考察するため、立体構造解析を行った。

2 実験

FperFFase 遺伝子は大腸菌による発現系によって粗酵素液を調製し、Ni-NTA カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製し、スロンピンによってタグを切断した後陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、結晶化した。X線回折強度データは、高エネルギー加速器研究機構 PF BL-5A ビームラインにて収集した。立体構造の決定は、*Bifidobacterium longum* の酵素 (*BlonFFase*, PDB ID, 3PIG、配列相同性 41%) を鋳型とした分子置換法によった。

3 結果および考察 [1]

FperFFase の全体的な構造は、糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 32 に属する他の酵素と同様、 β -プロペラフォールドから成る触媒ドメインと β -サンドイッチドメインから構成されていた。基質結合部位の構造を、*BlonFFase* と比較した。*BlonFFase* は、三糖1-kestoseに対する活性が二糖スクロースおよび四糖ニストースよりも高く、1-kestoseが最もよい基質であることが報告されている。*BlonFFase*

では Trp78、His132、Phe322 (図 1A 水色) が、1-kestose (図 1A 青) が結合するのに適した基質結合部位を形作っている。これに対し *FperFFase* においては相当するアミノ酸残基は Trp62、His115、Trp297 (図 1B 水色) であり、これらの残基はより狭い空間を形作り、1-kestoseのモデル (図 1B 青) を置くと Trp297 との間に立体障害が生じることが分かった。

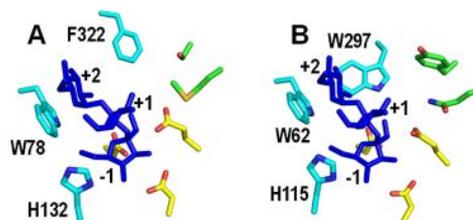


図 1 : (A) *BlonFFase* と 1-kestose の複合体のモデル、(B) *FperFFase* の活性中心に 1-kestose を置いた構造 (黄色 : 触媒残基、緑 : その他主要な残基)

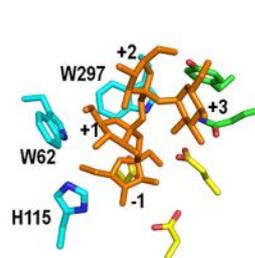


図 2 : *FperFFase* とニストースとの複合体の予想モデル

ニストース (図 2 オレンジ) についてはサブサイト+2 に結合するフルクトースは、1-kestoseのサブサイト+2 に位置するグルコースとはその位置が異なることが示唆された。

4 まとめ

本研究では *FperFFase* の 1-kestose への活性が低いという特徴的な性質について、その構造機能相関を明らかにした。

参考文献

[1] A. Kubota *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**, 2455 (2022).

* tonozuka@cc.tuat.ac.jp