

最近の研究から

ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖分解に関わるホスホリラーゼの結晶構造

日高将文, 伏信進矢

東京大学大学院農学生命科学研究科

Crystal structures of a phosphorylase involved in degradation of human milk oligosaccharide by Bifidobacteria

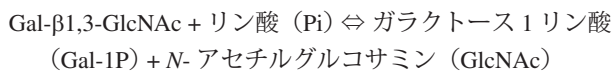
Masafumi HIDAKA, Shinya FUSHINOBU

Department of Biotechnology, The University of Tokyo

1. はじめに

ビフィズス菌は「体に良い」プロバイオティクスとして有名であり、その健康への寄与が科学的に解明されつつある。特に、乳児期には他の病原性細菌に対する感染防御の点などから重要とされている。母乳で育てられている乳児の腸内では出生後1週間以内に急速にビフィズス菌が優勢となり、腸内細菌叢における占有率は99%にまで達する[1]。一方、牛乳を原料とし、ラクチュロースなどの人工的なビフィズス菌増殖因子(プレバイオティクス)が添加された人工乳で育つ乳児の腸内ビフィズス菌占有率は90%程度にしか達しない[2]。つまり、母乳には牛乳中には存在しない、ビフィズス菌を選択的に増殖させる因子があることが分かる。牛乳に含まれるオリゴ糖のほとんどが乳糖(ラクトース: Gal-β1,4-Glc)であるのに対し、ヒトの母乳では約20%がラクトース以外の種々のオリゴ糖であり、これらは総称してヒトミルクオリゴ糖と呼ばれている。ビフィズス菌の増殖因子はヒトミルクオリゴ糖に含まれていることが古くから知られていたが、その正体は謎にまつまっていた。その要因として、ヒトミルクオリゴ糖は3糖以上の複雑な構造を持つ約100種類のオリゴ糖の混合物からなることが挙げられる[3]。

2005年、北岡らはビフィズス菌に新規な糖質分解酵素の遺伝子が存在することを報告した[4]。この酵素はヒトミルクオリゴ糖の構成二糖単位の1つであるラクトNビオース(LNB: Gal-β1,3-GlcNAc)に作用し



を触媒する加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)であり、LNBホスホリラーゼと名付けられた。この遺伝子の近傍には、LNBを菌体内に取り込むトランスポーター[5]や、Gal-1PやGlcNAcをエネルギー源として代謝する酵素遺伝子群[6]が存在した(Fig. 1)。また近年、ビフィズス菌の菌体外酵素中にヒトミルクオリゴ糖を分解するものが数多く見つかってきており[7,8]、LNBを特異的に切り離すラクトNビオンダーゼという酵素も発見された[9]。実際、LNBはビフィズス菌の増殖因子となることも示されており[10]、新規なプレバイオティクスとして有力視されはじ

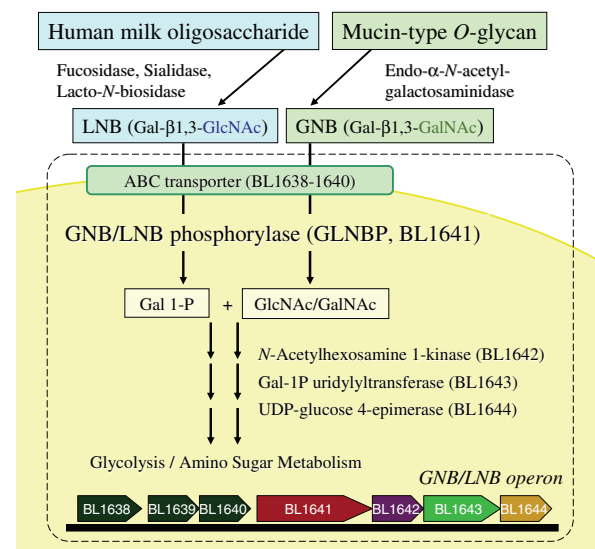


Figure 1 GNB/LNB pathway of Bifidobacteria.

めた。興味深いことに、種々のほ乳動物の乳中に含まれるオリゴ糖を分析した結果、一部の霊長類(チンパンジー、ボノボ、オランウータン)の乳中にはLNBを含むオリゴ糖が見つかるが優占的ではなく、ゴリラ、フクロテナガザルや霊長類以外のほ乳動物ではLNBを含むオリゴ糖は見つからなかった[11]。LNBを含むオリゴ糖が優占的に存在することが知られているほ乳動物は現在のところヒトのみであり、ヒトとビフィズス菌の共進化の可能性を示す一例と考えられている。

一方、ホスホリラーゼの応用上重要な特長として、逆反応も効率的に触媒するために上手く活用すればオリゴ糖を大量に合成できることが挙げられる。西本と北岡は、ビフィズス菌のLNB代謝酵素を利用して安価なショ糖(スクロース)と甲殻類から大量に得られるGlcNAcを原料として、1kg以上のLNBをワンポットで簡単に合成する技術を開発した[12]。高価かつ貴重だったLNB(試薬会社から購入すれば25mgで8万円を越える)が安価で大量に得られるようになり、今後の糖鎖生物学の進展に大きく貢献することは間違いない。前述のビフィズス菌増殖試験も、この技術で初めて可能になった。

実は、ビフィズス菌のLNBホスホリラーゼは、LNBとよく似た二糖ガラクトNピオース (GNB: Gal- β 1,3-GalNAc) も Gal-1P と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に加リン酸分解できることから、現在ではGNB/LNBホスホリラーゼ (GLNBP) と改名されている [13]。GNBは腸管粘膜に存在する糖タンパク質であるムチンに数多く結合しており、ビフィズス菌はこれを切り出す菌体外酵素も持っている [14]。つまり、ビフィズス菌はこの代謝経路 (GNB/LNB経路と呼ばれている) を用いてヒトミルクオリゴ糖のLNBと腸管ムチンのGNBの両方をエネルギー源としてしていると考えられている (Fig. 1)。この代謝経路はビフィズス菌以外の微生物からはほとんど見つかっていない。ところが不吉なことに、悪玉菌として有名なウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) も GLNBP とよく似た酵素を持っている。しかし幸いなことに (?), ウエルシュ菌の酵素はGNBは効率よく分解するのに対し、LNBはほとんど分解出来ないことから [15], 母乳に含まれるLNBはこの悪玉菌を増殖させることはないと思われる。このように、GLNBPは応用上重要な酵素であるだけでなく、その基質特異性の分子メカニズムを明らかにすることにより腸内細菌のオリゴ糖に対する増殖能を知る手助けにもなる。我々のグループは、このような理由からビフィズス菌のGLNBPの結晶構造解析を行ったが [16], その過程では大変苦労することになった。

2. 結晶化と構造解析における苦労話

GLNBPの結晶は初期スクリーニングで容易に獲得できた。結晶化条件はPEG3350を沈殿剤としCaCl₂を含む条件であったが、結晶が成長するまで約2週間を要した。結晶は非対称単位にGLNBP単量体を含むC2空間群で、2.4 Å分解能のX線回折が得られた。位相はセレノメチオン置換体を用いたMAD法で決定した。ここまでは実に難易度の低い構造解析であったといえる。精密化が終了した立体構造は一見すると α ヘリックスと β シートが繰り返すRossmannフォールドのように見えたが、それらを結ぶループ構造の大部分はディスオーダーした“歯抜け”構造であった。更に我々を悩ませたのはN末端約50残基が“欠失”していたことである。N末端やC末端部分のモデルが組めないことは良くあることだが、GLNBPの場合、N末端部分に相当する位置は隣の非対称単位の分子に塞がれており、N末端部分は存在し得ない状態になっていた。結晶を溶かしてN末端分析するとやはりN末端約50残基がトリミングされていることが分かった。この状態では酵素としての活性も失っており、解析した立体構造は不活性型の構造だったのである。構造決定からこの結論に達するまで約一年を要した。

活性型の構造解析を目指して再度結晶化条件の探索を行い、PEG4000, Mg(NO₃)₂を用いた条件を得た。この条件下では早い時には3時間で結晶成長が観察された。この結晶も空間群C2であったが非対称単位に2分子のGLNBP分子を含んでいた。初期に決定したGLNBP構造を

用いて分子置換法により位相決定を試みたがうまくいかなかった (後になって分かったことだが、この結晶のみツインであった)。そこで再度セレノメチオン置換体を用いてMAD法で位相を決定し、ほぼ全長の構造を決定できた。その立体構造はTIMバレルフォールドを有していた (Fig. 2A 参照)。N末端50残基はTIMバレル構造を形成する8組の β/α 構造の1-3組目に相当していた。初期の構造はバレルの一部が壊れた構造を見ていたのである。驚いたことに、GLNBPの構造は*Thermus thermophilus*由来の耐熱性 β -ガラクトシダーゼと最も似た構造を有していた。実はこのガラクトシダーゼの構造は2002年、筆者ら自身が解析した構造である [17]。新規性が高いと思って始めたGLNBPの構造解析が実は自分の解析した構造に一番良く似ていたという、まるで“青い鳥”を思い起こさせるような結果となってしまった。

さて、GLNBPの構造解析の困難はこれだけで終わらなかった。反応特性や基質特異性に関する知見を得るために基質、生成物複合体の作成を試みた。その際問題となったのは、結晶の空間群に再現性がなかったことである。位相決定した時と同じ条件で結晶化を試みたが、得られたのは空間群P1のものばかりであった (外見上空間群C2の結晶と区別がつかず、 $\beta=90.7^\circ$ であるためscalingするまでC2かP1か判別できない)。この空間群では非対称単位に含まれるGLNBPは4分子、精密化すべき残基数も約3,000に増えたが、糖受容体であるGlcNAc, GalNAcの複合体構造は容易に得られた。一方、糖供与体である

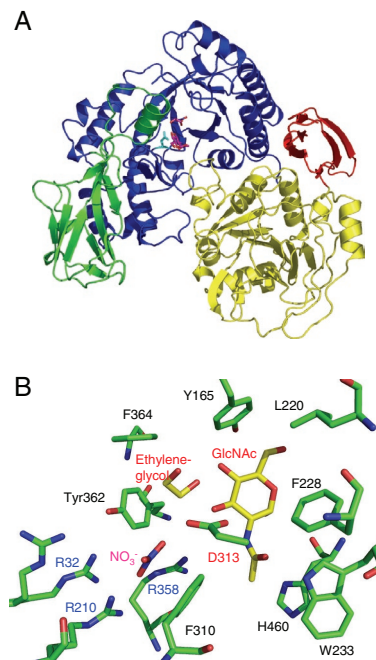


Figure 2

The crystal structure of GLNBP complexed with ethyleneglycol, nitrate (NO₃⁻), and GlcNAc.

Overall (A) and active site (B) views. (A) TIM barrel domain (blue), Ig-like domain (green), α/β domain (yellow), and C-terminal domain (red) are shown. The ligands (magenta) and the catalytic acid residue (D313, cyan) are shown as a stick model. (B) The protein residues (green) and the ligands (yellow) are shown as a stick model.

Gal-1P に関しても様々な化合物との複合体構造解析を試み、約 30 種の結晶についてデータ測定、精密化を行ったが、知見が全く得られなかった。既存のデータを論文にまとめるために、これを最後にと測定した結晶が結局決め手となった。その結晶はエチレングリコール、硝酸イオン (NO₃⁻)、GlcNAc との共結晶であったが、空間群は C2 だった。解析してみると、非対称単位に存在する 2 分子の GLNBP のうち、片方の分子の活性部位に 3 種類のリガンド全てが結合しており (Fig. 2B)、バレルの約半分にあたる N 末端部分約 50 残基が、エチレングリコール分子を挟み込むように大きく構造変化していることが分かった (後述)。すなわち、この分子の N 末端部分が動きやすいためにディスオーダーした結晶が出やすく、活性型の結晶が出にくかったと推察される。

3. 加水分解酵素との類似性から分かること

糖質ホスホリラーゼ (EC.2.4.1.-) というのは酵素分類上実にやっかいな存在である [18]。酵素反応そのものは加水分解 (EC.3.2.1.-) ではなく転位反応 (EC.2.4.-) である上に、最も古くから知られる有名な酵素グリコーゲンホスホリラーゼなどは、立体構造が糖転移酵素と良く似ており GT (Glycosyl Transferase) と呼ばれるファミリーに分類される (<http://www.cazy.org>)。ところが、糖質加水分解酵素と良く似た糖質ホスホリラーゼも数多く存在しており、これらは GH (Glycoside Hydrolase) と呼ばれるファミリーに分類される。GLNBP の構造解析に先立つ 2004 年、我々は当時 GT36 に分類されていたホスホリラーゼの立体構造を解き、GH 酵素との類似性を指摘したところ、糖質関連酵素の分類管理者との協議の上、GT36 は削除され新設の GH94 に再分類されることが決定した [19]。以来、糖質ホスホリラーゼの分類は慎重に行わざるを得なくなった。

さて、ここで興味深いのは、GLNBP も耐熱性 β-ガラクトシダーゼも、β-ガラクトシル基に作用する酵素であり、

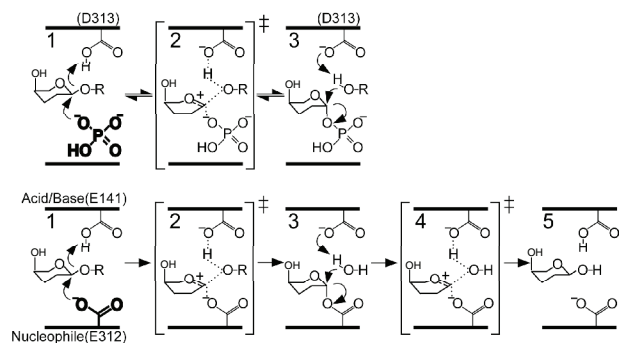


Figure 3
Reaction mechanism of GLNBP (top) and β-galactosidase from *T. thermophilus* (bottom).
The axial O4 hydroxyl of the β-galactosyl moiety is shown. (Top) This enzyme is an anomer-inverting phosphorylase. The catalytic acid is D313. The phosphorolytic reaction is thought to begin with a direct nucleophilic attack by phosphate on the anomeric carbon of the substrate, LNB or GNB. (Bottom) This enzyme is a typical anomer-retaining glycoside hydrolase. The catalytic acid/base and nucleophile residues are E141 and E312, respectively.

立体構造を重ねて見ると、一般酸触媒としてプロトンを渡す残基 (D313 および E141) の位置もきれいに重なることである (Fig. 3)。さらに、GLNBP ではリン酸が求核基として、耐熱性 β-ガラクトシダーゼでは E312 が求核性触媒残基として働くが、これらもほぼ同じ場所に位置することが分かった。両者がガラクトシル基を結合するサイトもほぼ重なる。つまり、ラクトースを加水分解できるこの β-ガラクトシダーゼと、LNB を加リン酸分解する GLNBP は、全体構造も活性中心 (触媒反応機構) も意外によく似ており、共通の祖先酵素から分子進化してきた可能性が高い、ということになる。これらの結果を示したことで、長らく未分類であった GLNBP が含まれるファミリーは GH112 に分類されることが決定した。

4. 基質特異性と大きな構造変化

GlcNAc と GalNAc の複合体が両方得られたことから、LNB と GNB に対する基質特異性の違いの構造的な要因を知ることができた。GlcNAc と GalNAc は O4 ヒドロキシル基がエクアトリアルかアキシャルかの違いだけだが、この近傍に存在する Val162 が最も重要な決定要因であることが見て取れた。実際、ウエルシュ菌が持つ GNB に特異的な酵素ではここが Thr になっており、GalNAc のアキシャル位の O4 ヒドロキシル基と水素結合を作ると予想される。現在、腸内細菌を含むヒトに関連した微生物のメタゲノムプロジェクトが全世界で進行中であり、今後はさらに多くの GLNBP ホモログの遺伝子が見つかると思われる。我々の研究成果は、それらの推定遺伝子産物の基質特異性を推測する上で重要な情報になると期待される。

さて、本研究では、基質フリーの構造に加えて数種類のリガンドとの複合体構造を決定したが、それらの中には明確な構造変化が認められた。大まかに言うと、基質フリー構造では「開いて」いるのに対し、GlcNAc/GalNAc 結合サイトにリガンドが結合すると「半分閉じた」状態になる。さらにリン酸およびガラクトシル基結合サイトにリガンドが結合すると完全に「閉じた」状態になる。Fig. 4 に「開いた」基質フリー構造と「閉じた」エチレングリコール + NO₃⁻ + GlcNAc 複合体の構造をバレルの横から見た図を

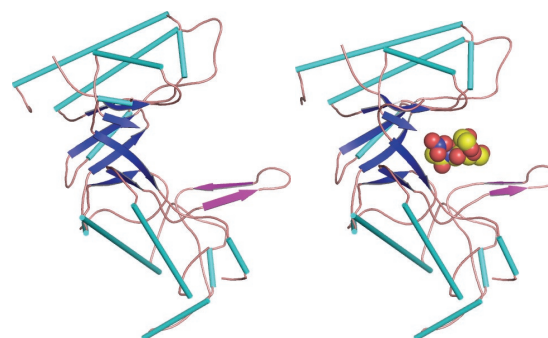


Figure 4
Movement of GLNBP structure on ligand binding.
(Left) "Open" conformation of the ligand-free structure. (Right) "Closed" conformation of the complex structure with ethyleneglycol, NO₃⁻, and GlcNAc. The ligands are shown as a space-filling model.

示す。バレルのほぼ半分が約 10 度回転している様子が見て取れる。その際、リン酸（陰イオン）とその結合サイトに 3 つも存在する正に荷電したアルギニン残基 (Fig. 2B; R32, R210, R358) の間に形成される相互作用が、バレルが閉じる時の driving force になると考えられる。また、ガラクトシル基(この場合エチレングリコールが入っている)と疎水性残基 (Y362, F364) の相互作用が閉じた状態をさらに安定化するようである。TIM バレルは最も一般的なフォールドであり、立体構造が明らかになっているタンパク質の約 10% がこのフォールドを持つと言われている [20]。一般的に TIM バレルはループ部分の長さや配列を変えつつ様々な基質に対する結合サイトを形成しているが、GLNBP の例のように、「無理をして」バレル構造自体を歪めながら基質をくわえ込んでいる様子は、我々の知る限り他に例がない。LNB と GNB はヒトミルクオリゴ糖や腸管ムチンだけでなく、スフィンゴ糖脂質や血液型抗原のような糖脂質など、動物細胞の表面に存在する複合糖質によく見られる基幹構造である。それらを分解する GLNBP およびそのホモログは、基本的にヒトに関連した腸内細菌や感染性の微生物にしか見つかっていない。従って、これらは動物との共生関係の中で微生物が分子進化させてきた比較的「新しい」酵素なのではないかと想像できる。

5. おわりに

ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖代謝経路に関連する酵素として最初に立体構造が報告されたのは、KEK-PF 構造生物学研究センターのグループによって解かれた 1,2- α -L- フコシダーゼである [21]。これは GH95 として初めての立体構造であるだけでなく、特殊な反応機構を有することが示され、非常にインパクトのある知見をもたらした。我々のグループも、PF のビームラインを利用して、GLNBP 以外にも、LNB と GNB を菌体内に取り込む ABC トランスポーターの結合ドメイン [22] や、菌体外でムチン糖タンパク質から GNB を切り出す GH101 エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ [23] の立体構造の決定に成功し、それぞれで興味深い知見を得た。今後も、このユニークかつ面白い代謝経路の分子メカニズムについて、多くのことが明らかになっていくと期待される。

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科の祥雲弘文教授と若木高善准教授のご指導のもと、農研機構・食総研の北岡本光ユニット長、西本完研究員との共同研究で行われました。また、ビフィズス菌の糖質分解酵素の研究におきましては、京都大学大学院生命科学研究科の山本憲二教授と芦田久准教授、石川県立大学生物資源工学研究所の片山高嶺准教授をはじめとした数多くの共同研究者の皆様にお世話になりました。本研究は生研センター基礎研究推進事業のご援助を得て行われました。最後になりましたが KEK-PF のスタッフのみなさんには、データ測定で大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Benno, Y., Sawada, K. & Mitsuoka, T. *Microbiol. Immunol.* **28**, 975 (1984).
- [2] Bezkorovainy, A. (1989) Ecology of bifidobacteria. In: Bezkorovainy, A., and Miller-Catchpole, R. (eds). *Biochemistry and physiology of bifidobacteria*, CRC Press, Cleveland, Ohio.
- [3] Urashima, T., Asakuma, S. & Messer, M. (2007) Milk oligosaccharides. In: Kamerlong, H. (ed). *Comprehensive Glycoscience*, Elsevier, Amsterdam.
- [4] Kitaoka, M., Tian, J. & Nishimoto, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3158 (2005).
- [5] Wada, J., et al. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 751 (2007).
- [6] Nishimoto, M. & Kitaoka, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6444 (2007).
- [7] Katayama, T., et al. *J. Bacteriol.* **186**, 4885 (2004).
- [8] Ashida, H., et al. *Glycobiology* in press (2009).
- [9] Wada, J., et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3996 (2008).
- [10] Kiyohara, M., Tachizawa, A., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Ashida, H. & Yamamoto, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1175 (2009).
- [11] Urashima, T., et al. *Glycobiology* **19**, 499 (2009).
- [12] Nishimoto, M. & Kitaoka, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2101 (2007).
- [13] Nakajima, M. & Kitaoka, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6333 (2008).
- [14] Fujita, K., et al. *J. Biol. Chem.* **280**, 37415 (2005).
- [15] Nakajima, M., Nihira, T., Nishimoto, M. & Kitaoka, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 465 (2008).
- [16] Hidaka, M., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Wakagi, T., Shoun, H. & Fushinobu, S. *J. Biol. Chem.* **284**, 7273 (2009).
- [17] Hidaka, M., Fushinobu, S., Ohtsu, N., Motoshima, H., Matsuzawa, H., Shoun, H. & Wakagi, T. *J. Mol. Biol.* **322**, 79 (2002).
- [18] Fushinobu, S., Hidaka, M., Miyayama, A. & Imamura, H. *J. Appl. Glycosci.* **54**, 95 (2007).
- [19] Hidaka, M., et al. *Structure* **12**, 937 (2004).
- [20] Sterner, R. & Hocker, B. *Chem. Rev.* **105**, 4038 (2005).
- [21] Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S. & Kato, R. *J. Biol. Chem.* **282**, 18497 (2007).
- [22] Suzuki, R., et al. *J. Biol. Chem.* **283**, 13165 (2008).
- [23] Suzuki, R., et al. *J. Biochem.* in press (2009).

(原稿受付日：2009年6月19日)

著者紹介

日高将文 Masafumi HIDAOKA

東京大学大学院・農学生命科学研究科応用生命工学専攻
博士研究員

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5149 FAX: 03-5841-5152

略歴：2005年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了，2008年より現職。農学博士。

伏信進矢 Shinya FUSHINOBU

東京大学大学院・農学生命科学研究科応用生命工学専攻
助教

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5151 FAX: 03-5841-5151

e-mail: asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴：1997年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程中退，同年より現職。農学博士。