

ヒトミルクオリゴ糖分解酵素ラクト-N-ビオシダーゼのX線結晶構造解析

伊藤佑, 伏信進矢

東京大学大学院農学生命科学研究科

Crystal structures of GH20 lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*

Tasuku ITO, Shinya FUSHINOBU

Department of Biotechnology, The University of Tokyo

Abstract

ラクト-N-ビオシダーゼは、ヒトミルクオリゴ糖からビフィズス菌の生育因子を遊離する糖質加水分解酵素として注目されていたが、その立体構造は未知であった。本研究ではラクト-N-ビオシダーゼのX線結晶構造解析を行い、構造中のリガンドのコンフォメーションから、本酵素の反応機構における基質のコンフォメーション変化の推定を可能にした。さらに、本酵素のビフィズス菌の生態における位置付けを考察した。

1. はじめに

1-1 ヒトミルクオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharides; HMO)

HMOとは、ヒトの母乳に含まれる、ラクトース (Gal-β1,4-Glc) 以外のオリゴ糖のことである [1]。HMOは乳児の腸内にビフィズス菌を定着させ、乳児の健康を促進するプロバイオティクス効果を持っている。ヒトの母乳には約7%の糖質が含まれているが、そのうち80%をラクトースが、20%をHMOが占めている。HMOは約130種類のオリゴ糖からなる複雑な混合物であり、ラクトースを基本骨格として、ラクト-N-ビオース (Gal-β1,3-GlcNAc; LNB) あるいはN-アセチルラクトサミン (Gal-β1,4-GlcNAc; LacNAc) が結合し、さらにそこにシアル酸やフコースが結合した構造をとる。HMOは、LNBを含むタイプI型、LacNAcを含むタイプII型に大別される。HMOの構造は多種多様だが、その中でも代表的なものの1つにタイプI型のラクト-N-テトラオース (Gal-β1,3-GlcNAc-β1,3-Gal-β1,4-Glc; LNT) がある。母乳中には、LNBを含むタイプI型のオリゴ糖がタイプII型よりも多く含まれている。これは、哺乳類、類人猿の中でもヒトにしか見られない特徴であることが分かっている。

1-2. HMOとビフィズス菌

乳幼児の腸管によく見られるビフィズス菌のうち、*Bifidobacterium bifidum* JCM1254株、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*、*Bifidobacterium breve*の3種はそれぞれ異なる方法でHMOを利用して考えられている。まず、*B. bifidum* JCM1254株は、いくつかの膜結合型の菌体外酵素を持っていることが分かっている。これらの菌体外酵素によってHMOからLNBが遊離し、菌体内に取り込まれると考えられる。一方、*B. longum* subsp. *infantis*は3糖以

上のオリゴ糖を丸ごと菌体内に取り込み、菌体内に多数あるグリコシダーゼによってHMOを分解することが知られている [2]。また、*B. breve*は他の腸内細菌が分解したオリゴ糖や単糖を取り込んでいると考えられている。

1-3. ビフィズス菌のLNB/GNBに特異的なHMO代謝経路

1-2節で述べたうち、膜結合型菌体外酵素を利用する、*B. bifidum* JCM1254株のHMO分解経路についてFig. 1に示す [3]。ラクト-N-ビオシダーゼ (LNB) は、膜結合型菌体外酵素として分泌され、ラクト-N-テトラオースからLNBを遊離する。一方、LNBと同じ分泌酵素であるendo-α-GalNAc-aseは、腸内粘膜の糖タンパク質に豊富に含まれるムチンからガラクト-N-ビオース (Gal-β1,3-GalNAc; GNB) を切り出す。GNBはHMOには存在しないが、LNBと構造的に良く似ている。LNBとGNBは、これらに特異的なトランスポーターにより菌体内に取り込まれ、菌体内でGNB/LNBに特異的なホスホリラーゼによ

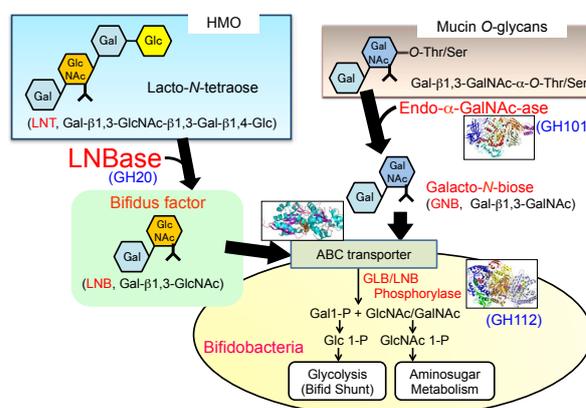


Figure 1 GNB/LNB pathway of Bifidobacteria.

て加リン酸分解されて代謝される。このことから、HMOの構成単位の1つであるLNBが、ビフィズス菌の重要な生育因子の1つだと考えられている。これらの酵素(タンパク質)はビフィズス菌のHMO代謝経路の鍵となる酵素であり、構造解析を含め、詳しく研究されている。LNBaseは、このHMO代謝経路の中にある重要な酵素の1つである。

2. *B. bifidum* JCM1254 由来 LNBase

2-1. LNBaseの基質特異性

LNBaseは、LNTやLNB- β -pNPに対してのみ高い活性を示す[4]。フコシル化などの修飾を受けていない、LNTのようなオリゴ糖のLNB部分に対して特異的に作用すると言える。

2-2. GH20におけるLNBase

LNBaseは β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ(β -HexNAcase)とともに、糖質加水分解酵素(Glycoside Hydrolase, GH)ファミリー20に分類されている。LNBaseは、LNBという2糖を切り出すのに対し、 β -HexNAcaseは β -*N*-アセチルヘキソサミン単糖を切り出す。本研究以前は、GH20では、単糖を切り出す β -HexNAcaseについては、多くの構造が明らかになっていた。しかしながら、2糖を切り出すLNBaseの構造は未知であった。LNBaseと構造が明らかになっている β -HexNAcaseとのアミノ酸配列同一性は最大でも22%であり、立体構造、特に基質結合ポケットのサイズに違いがあることが予想された。

3. LNBaseの結晶構造

3-1. X線結晶構造解析

本研究で用いたLNBaseは、*B. bifidum* JCM1254株からクローニングされた[4]。全長1112残基で、シグナルペプチド、GH20の触媒ドメイン、CBMドメイン、Ig-likeドメイン、膜貫通ドメインなどで構成されている。当初、触媒ドメインのみを含む627アミノ酸からなるコンストラクトを用いていたが、良質な結晶が得られなかった。そこで、それよりさらに短いコンストラクトをいくつか作製した。そのうち、N末端から4アミノ酸だけ短くした623アミノ酸からなるコンストラクトで、硫酸存在下において良質な結晶が得られた。この結晶化条件では、LNBやLNB-チアゾリンが入っていないと結晶が成長しなかった。LNB-チアゾリンは強力な阻害剤であり、LNBaseに対して K_i は125 nMである。LNBは10 mM前後の濃度で結晶が出来たが、LNB-チアゾリンは0.1 mM以下でないと結晶が出来なかった。KEK-PF BL-17Aにおいて、これらの結晶のX線回折データを収集した。Se-SAD法によって位相を決定し、LNBaseとLNB、LNBチアゾリンの共結晶の構造を共に1.8 Åの分解能で決定した[5]。

3-2. 全体構造

LNBaseは溶液中では単量体である。しかし、結晶の非対称単位には2分子入りしており、発現ベクター(pET-28b)由来のN末端His \times 6タグとそれに続く人工配列(21アミノ酸)のうち11アミノ酸の電子密度マップが確認され、そのうち7つのアミノ酸が隣の分子のCドメイン(後述)

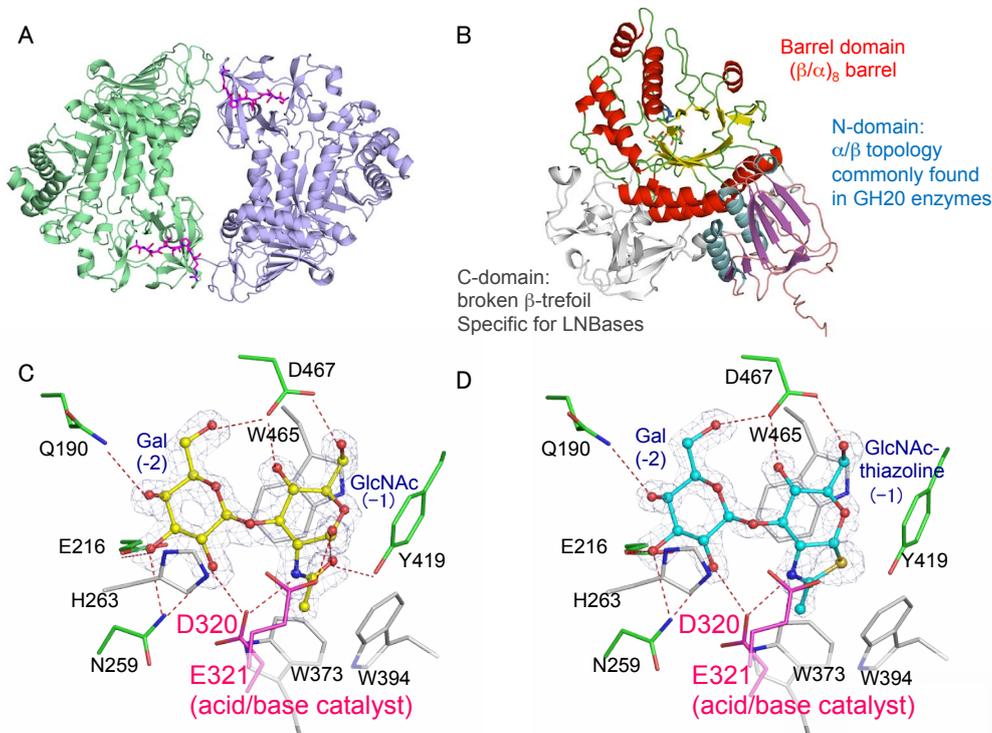


Figure 2
The crystal structure of LNBase. Dimer in the asymmetric unit (A), monomer (B), active centers of LNB complex (C) and LNB-thiazoline complex (D).

と相互作用することによって、結晶の非対称単位内でのダイマー形成に関わっていた (Fig. 2a)。このダイマー相互作用はアーティファクトであるが、結晶中での分子のパッキングに関わっており、今回結晶化に用いたコンストラクト以外では同様の結晶は得られなかったと推察された。

LNBaseの全体構造は、3つのドメインで構成されていた (Fig. 2b)。まず、Nドメインは、機能は不明だが、GH20に広く保存されているフォールドだった。2本の α ヘリックスに、7本のストランドからなる β シートが覆い被さる、 α/β トポロジーをとっていた。次に、バレルドメインは触媒ドメインであり、他のGH20と同じくTIMバレル構造をとっていた。最後に、Cドメインは、シバフタケ由来のレクチン (糖結合タンパク質) にやや似ており、壊れかけた β トレフォイルフォールドをとっていた。しかし、Cドメインへの糖の結合は確認出来なかった。ただ、先述したように、このCドメインは、結晶中で7つのアミノ酸と相互作用しており、ペプチド結合能を有する可能性はあると言える。また、欠失すると活性が低下することから安定性に寄与していると考えられた。Nドメインとバレルドメインの全体構造は、他のGH20の β -HexNAcaseと良く似ていたが、CドメインはLNBaseにしか存在しないユニークなドメインだった。

3-3. 活性中心

活性中心には、LNBとLNBチアゾリンの電子密度マップがはっきり見えた (Fig. 2c, d)。LNBの非還元末端のGlcNAcのピラノース環は、 4E と呼ばれる、溶液中では不安定であるはずの歪んだコンフォメーションをとっていた。 4E とは、IUPACによる命名法にしたがっており、4位の炭素だけが持ち上がり、他の5つの原子は、ほぼ同一平面上にある、エンベロープ型のことを指す。また、LNB

チアゾリンのコンフォメーションは溶液中でも安定な 4C_1 のイス型であり、これは反応中間体 (オキサゾリン) に相当する。また、LNBaseの活性中心を構成するアミノ酸は、GH20で保存されており、LNBの全ての水酸基が周辺のアミノ酸と水素結合していた。すなわち、LNBのどちらの糖に修飾があっても基質が結合できないことを意味する。これは、LNBaseの、フコシル化されたHMOを分解しないという性質と一致する。触媒残基のAsp320はGlcNAcの2-アセトアミド基のN原子と水素結合していた。また、一般酸/塩基触媒のGlu321はGlcNAcの1位の酸素原子と水素結合していた。

次にLNBaseと同じくGH20に分類される他の酵素と比較した (Fig. 3)。比較対象は、GH20の中で最も良く研究されている *Streptomyces plicatus* 由来の β -HexNAcase (SpHex)[6]である。両者の分子表面図から、LNBaseでは2糖、SpHexでは単糖がそれぞれすっぽりはまるサイズの基質結合ポケットが存在することが分かった (Fig. 3c, d)。LNBaseはSpHexに比べてサブサイト(-2)に当たる部分が広がっている。SpHexでは、このサブサイト(-2)に当たる部分を、3つのアミノ酸 (Arg162, His188, Asp191) が遮っていた (Fig. 3b)。一方で、LNBaseのサブサイト(-2)では、これらの3つのアミノ酸は、別のアミノ酸に置き変わっていた (Fig. 3a)。さらに、SpHexに存在する長いループ (紫色) が欠失しており、ここにガラクトースが入るスペースが出来ていた。

4. GH20の反応機構における基質のコンフォメーション変化

多くの糖は、溶液中での安定な形として、椅子型のコンフォメーションを取るが、糖質加水分解酵素の中での反応においては、イス型以外の様々なコンフォメーション

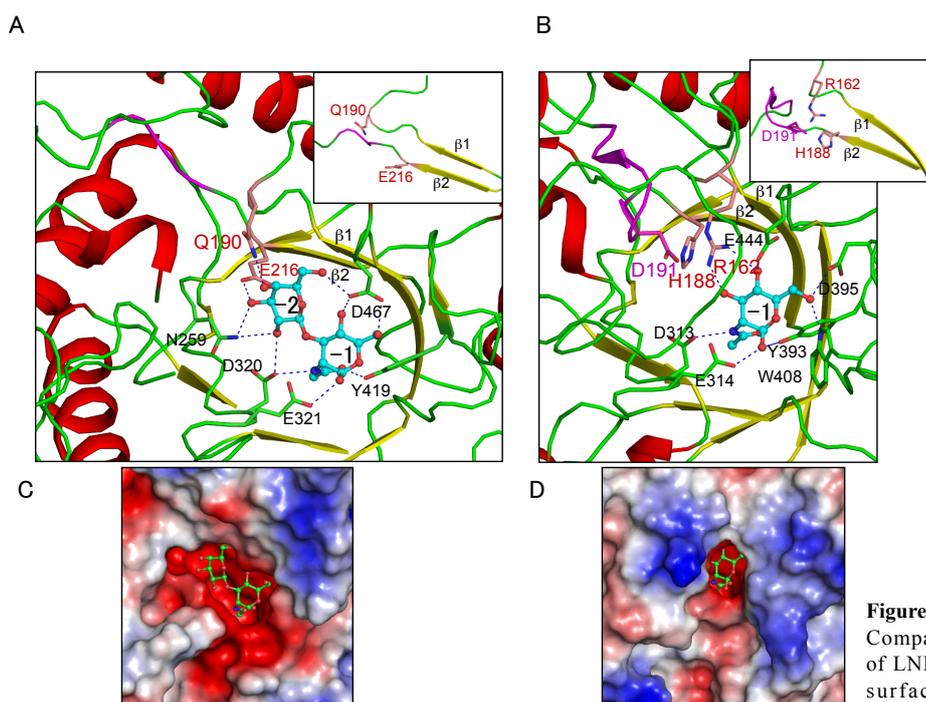


Figure 3
Comparison with GH20 SpHex. Active sites of LNBase (A) and SpHex (B), and molecular surfaces of LNBase (C) and SpHex (D).

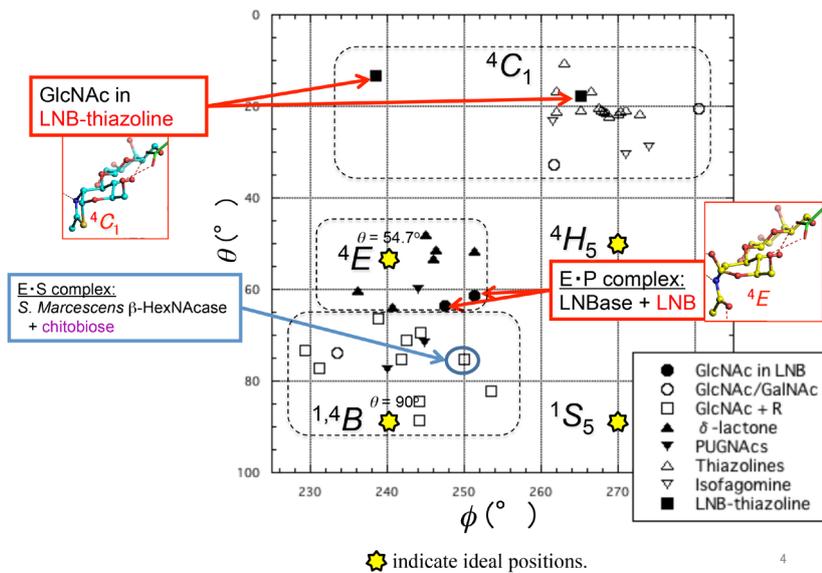


Figure 4
Mercator projection of sugar ring conformations observed in sugars bound to the -1 subsite of GH20 enzymes analyzed by Cremer-Pople parameter.

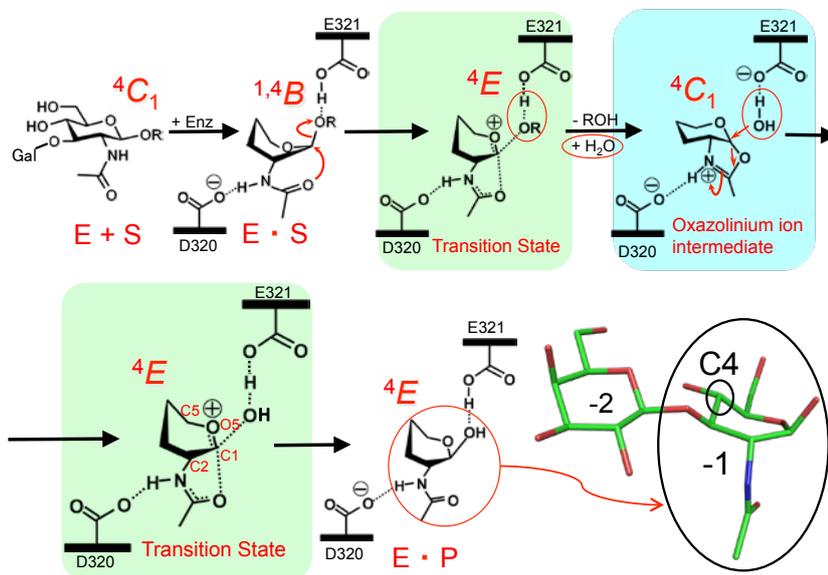


Figure 5
Proposed reaction mechanism of LNBase and possible conformations of the GlcNAc sugar ring.

を取り得る。IUPACの命名法では、通常の椅子型コンフォメーションは、4位が上にあり1位が下がったchairという意味で、 4C_1 と呼ぶ。その他、boat, skew boat, half chair, envelopeの合計38種類のコンフォメーションが定義されている。CremerとPopleは、これらのコンフォメーションを正確に記述するためのパラメータを開発した[7]。Cremer-Pople parameterは θ, ϕ, ρ からなる極座標系であり、38個全てのコンフォメーションを球面上に配置することが出来る。Fig. 4は、その一部分をメルカトル図法で表示したものである。ここに、本研究で得られたLNBとLNBチアゾリンのコンフォメーションをプロットした。それに加えて、他のGH20酵素でこれまでに報告されている複合体の結晶構造中の基質/アナログ/阻害剤のリガンド全てに対して求めたパラメータをプロットした。その結果、全ての場合において ${}^{1,4}B$, 4E , 4C_1 の3種類のコンフォメーションに大別できることが明らかになった。従って、

GH20の反応機構においては、GlcNAcはこの3つのコンフォメーションの間を変化していると予想される。

これを踏まえて、本研究の結果から予想されるLNBaseの酵素の反応機構における糖のコンフォメーション変化についてFig. 5に示す。GH20は、substrate-assisted反応と呼ばれるアノマー保持型の反応機構を経ることが分かっている。まず、Aspによって分極された基質の2-アセトアミド基の中のカルボニル酸素がアノマー炭素を求核攻撃するとともに、一般酸/塩基触媒のGluが一般酸触媒として働いて脱離基が外れ、オキサゾリニウムイオン中間体を形成する。その後、一般酸/塩基触媒のGluによって活性化された水が、アノマー炭素を求核攻撃することによって、反応産物ができる。この反応機構において、E·S複合体では ${}^{1,4}B$ 、オキサゾリニウムイオン中間体では 4C_1 、E·P複合体では 4E に近いコンフォメーションを取ると考えられる。また、2度起こる遷移状態では、オキサカルベニウム

イオン様の状態をとるとされており、そこでは、C1 と O5 の間の結合が 2 重結合性を帯びるために、C2, C1, O5, C5 の 4 つの原子が同一平面上にあるとされている。今回の結果は、GH20 が ⁴E に近い遷移状態を通ることを強く支持している。

5. おわりに

B. bifidum JCM1254 がタイプ I 型 HMO を分解するに当たって、LNBase は HMO から LNB を切り出すのに中心的な役割を果たす。しかし、HMO を分解するには、LNBase だけでなく、フコースやシアル酸のような修飾糖を取り除く他の酵素も必要である。*B. bifidum* JCM1254 から、HMO 分解に関わる多くの菌体外グリコシダーゼが見つかった [3]。GH95 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), GH29 1,3-1,4- α -L-fucosidase (AfcB), そして GH33 exo- α -sialidase (SiaBb1, SiaBb2) は、それぞれ α 1,2-, α 1,3/4- 結合したフコース、そして、シアル酸修飾された HMO を完全に分解する。本研究によって、LNBase の基質特異性を知るための構造基盤が明らかになった。LNB が別の糖で修飾されていると LNBase の活性中心に入ることができない。なぜなら、LNBase は、LNB に特化した基質結合ポケットを持っており、このポケット内では LNB の全てのヒドロキシ基が水素結合で認識されているからである。この特徴は、GNB/LNB トランスポーターの糖結合タンパク質 (GL-BP) が、修飾されていない LNB を特異的に認識する性質とも一致する。LNB は菌体内に取り込まれると、GNB/LNB ホスホリラーゼやその他の酵素によって代謝される。しかしながら、LNBase のアグリコンの結合部位 (+ 側のサブサイト) は広がっており、様々な官能基が入れるようにも見える。このことから LNBase は、様々なタイプ I 型 HMO がフコシダーゼとシアリダーゼに処理された後に作用するものであると考えられる。以上のことから、LNBase はタイプ I 型 HMO の LNT から LNB を切り出すこと、また、その作用は菌体内に取り込まれる直前になされるという位置付けが明白である。

本研究では、サブサイト (-2) において、 β -1,3 結合した Gal を認識するのに重要な残基 (Gln190, Glu216 など) を同定した。これらの残基が保存されているかどうか、推定遺伝子が LNBase 活性を持つかどうかを予測する重要な指標になる。乳児の腸内細菌がどのように HMO を代謝しているのかをより深く知るためには、そのゲノム内に LNBase が存在するか否かが、重要な情報となりうる。

さらにごく最近、石川県立大学の片山高嶺教授のグループによって、*B. longum* JCM1217 から全く新規な LNBase が発見された [8]。本研究の対象である LNBase とは全く異なる活性化機構を持ち、基質特異性も広い。LNBase と HMO をめぐる物語は今後も続いていくものと期待される。

謝辞

京都大学大学院生命科学研究所の山本憲二名誉教授、石川県立大学生物資源工学研究所 (現: 腸内細菌共生機構学

講座) の片山高嶺教授、京都大学大学院農学研究科の櫻岡晴子助教、京都市産業技術研究所の和田潤博士、秋田県立大学生物資源科学部の鈴木龍一郎助教、近畿大学生物理工学部の芦田久教授、西オーストラリア大学の Keith A. Stubbs 博士、農研機構食品総合研究所 酵素研究ユニット長の北岡本光先生、主任研究員の西本完先生には大変お世話になりました。また、KEK-PF のスタッフの方々には大変お世話になりました。皆様に心より深く御礼申し上げます。この研究は生研センター基礎研究推進事業と JSPS 科研費の助成を受けて行われました。

引用文献

- [1] Urashima, T., et al., *Milk oligosaccharides*, in *Oligosaccharides: Sources, Properties and Applications*, N.S. Gordon, Editor., Nova Science Publishers: New York (USA), 1-58. (2011)
 - [2] Sela, D.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 18964-9 (2008)
 - [3] Fushinobu, S., *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 2374-84 (2010)
 - [4] Wada, J., et al., *Appl. Environ. Microbiol*, **74**, 3996-4004 (2008)
 - [5] Ito, T., et al., *J Biol Chem*, **288**, 11795-806 (2013)
 - [6] Mark, B.L., et al., *J Biol Chem*, **276**, 10330-7 (2001)
 - [7] Cremer, D. and J.A. Pople., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1354-1358 (1975)
 - [8] Sakurama, H., et al., *J Biol Chem*, **288**, 25194-206 (2013)
- (原稿受付日: 2013 年 12 月 2 日)

著者紹介

伊藤 佑 Tasuku ITO

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
博士課程 3 年

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5150

e-mail: 6536776822@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴: 2010 年東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻修士課程修了。

最近の研究: ビフィズス菌由来植物細胞壁分解酵素の研究。
趣味: 仮面ライダー鑑賞。

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 教授
〒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 応用生命工学専攻博士課程中退。農学博士。

最近の研究: 各種の酵素の立体構造解析と機能解析。
趣味: ボクシング観戦 (休止中), ポップス音楽収集。