S3-5

The utilization routes of iso maltooligosaccharides by probiotics: an enzymatic and genetic overview.

OM. Abou Hachem¹, M. Møller¹, F. Fredslund¹, J.M. Andersen¹, A. Majumder¹, H. Nakai^{1,2}, S.J. Lahtinen³, J.-G. Yong⁴, T.R. Klaenhammer⁴, R. Barrangou⁵, L., Lo Leggio⁶, B. Svensson¹.

¹Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark. ²Graduate School of Science & Technology, Niigata University, Niigata, Japan. ³DuPont Nutrition and Health, Kantvik, Finland. ⁴Department of Food, Bioprocessing and Nutrition Sciences North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. ⁵DuPont Nutrition and Health, Madison, WI, USA. ⁶Biophysical Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Copenhagen, Denmark.

Isomaltooligosaccharides (IMO, α -1,6-linked glucosides) have been shown to positively stimulate the growth of probiotic lactobacilli and bifidobacteria, and reduce the counts of other commensals e.g. clostridia, thus acting as prebiotics. Remarkably, IMO utilization by the gut microbiota is virtually unexplored, in particular regarding carbohydrate transporters.

We have used genomic, transcriptomic, enzymatic, and biophysical analyses to identify and investigate IMO utilisation in probiotic lactobacilli and bifidobacteria as typified by *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 respectively. Our analysis highlighted the metabolic diversity exhibited by these organisms, and other representatives from the gut niche, regarding transporters and glycoside hydrolases (GHs) deployed for IMO utilisation. Thus, utilization of IMO and maltooligosaccharide (α -1,4) glucosides appears to be linked both at the genetic and transcriptomic level in lactobacilli from the acidophilus group as suggested by RT-PCR and gene landscape analysis. Enzymatically, canonical GH13_31 glucan α -(1,6)-glucosidases active on IMO longer than isomaltose occur widely in lactobacilli including acidophilus group members. Interestingly, however, isomaltose is internalised through a phosphoenolpyruvate transferase system (PTS) and subsequently hydrolysed through a GH4 6P- α -glucosidase.

By comparison, IMO utilization in bifidobacteria is linked to raffinose family oligosaccharide (RFO) utilization loci harbouring GH36 α -galactosidases, GH13 α -glucosidases distantly related to GH13_31 oligo α -(1,6)-glucosidases and a dual specificity ATP-binding cassette transport system active in the uptake of both classes of α -(1,6) glycosides.

Data from this study, providing an experimental basis for understanding selective utilization of non-digestible oligosaccharides in the gut niche, will be presented.

This work is supported by grants from the Danish Council for Strategic Research, Committee for Health, Food and Welfare, the Danish Council for Independent Research Natural Sciences, a H. C. Ørsted Postdoctoral Fellowship (to AM) and PhD stipends from the Technical University of Denmark (to JMA and ME) and Danisco A/S (to JMA).

S3-6

糸状菌由来エンドグリコシダーゼ (Endo-M) のグライコシンターゼ様変異体酵素を活用したシアロ糖タンパク質の化学-酵素合成

立命館大・生命科学¹, 近畿大・生物理工², Univ. of Maryland³, 石川県立大・生物資源⁴

○梅川碧里¹, 芦田久², Lai-Xi Wang³, 山本憲二⁴

【目的】

生体内の多くのタンパク質は糖鎖付加による翻訳後修飾を受けており、その糖鎖構造の違いがタンパク質の機能や安定性などに大きな影響を与えることが知られている。とりわけ、ヒト由来の糖タンパク質のN結合型糖鎖末端に存在するシアル酸は、バイオ医薬品としても用いられているサイトカインなど様々なタンパク質の生体内における生理活性の保持に必須であることから、シアロ糖鎖を有する均一な糖タンパク質を合成する技術が必要とされている。本研究では、糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来のエンドグリコシダーゼ (Endo-M) が有する特異な糖転移活性を向上させたグライコシンターゼ様の変異体酵素を活用して、種々のシアロ糖タンパク質を効率的かつ簡便に合成する手法を開発することを目的とした。

【方法・結果】

大腸菌における Endo-M の組換え発現系を用いて、Endo-M の反応中間体形成の鍵残基である Asn-175 に着目してさまざまな部位特異的な変異体酵素を作製した。その結果、変異体酵素 N175Q は本酵素の反応中間体であるオキサゾリン構造を有する糖鎖を基質として反応させることによって、糖転移生成物を高収率で生成する一方、加水分解しない「グライコシンターゼ様」に機能することを見出した。そこで、ニワトリ卵黄由来のシアロ糖ペプチドを材料としてシアロ糖鎖のオキサゾリン誘導体を酵素的及び化学的手法により合成し、本変異体酵素 N175Q と組み合わせて用いることによって、生理活性ペプチドである PAMP12、SubstanceP への糖鎖付加を試みた。その結果、各々のシアロ糖ペプチドが90%以上の高収率で得られ、またその *in vitro* におけるプロテアーゼ消化に対する抵抗性について解析したところ、糖鎖付加前のペプチド及びシアロ糖鎖を付加したペプチドと比較して顕著に高められることが示された。また、高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質である RNaseB をモデル糖タンパク質として用いて、糖鎖を酵素的に除去した後、本法によるシアロ糖鎖の酵素的付加を試みた結果、シアロ糖鎖にリモデリングされた均一な目的の糖タンパク質が高収率で得られた。