Structure and Reaction Mechanism of GH20 Lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum**

ビフィズス菌由来 GH20 ラクト-*N*-ビオシダーゼの立体構造と反応機構*

(2014 年 2 月 13 日受付；2014 年 2 月 25 日採択)

伊藤 佑¹, 片山高嶺², Mitchell Hattie³, 櫻間晴子²,
和田 潤⁴, 鈴木龍一郎¹, 芦田 久⁵, 若木高善¹, 山本憲二²,
Keith A. Stubbs³, 伏信進矢^{1, **}

(いとう たすく, かたやま たかね, みっちえる はってー, さくらま はるこ,
わだ じゅん, すずき りゅういちろう, あしだ ひさし, わかぎ たかよし,
やまもと けんじ, きーす すたぶす, ふしのぶ しんや)

Tasuku Ito,¹ Takane Katayama,² Mitchell Hattie,³ Haruko Sakurama,² Jun Wada,⁴
Ryuichiro Suzuki,¹ Hisashi Ashida,⁵ Takayoshi Wakagi,¹ Kenji Yamamoto,²
Keith A. Stubbs³ and Shinya Fushinobu^{1, **}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻
113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 石川県立大学生物資源工学研究所
921-8836 石川県野々市市末松 1-308

³ 西オーストラリア大学

⁴ 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

⁵ 近畿大学生物理工学部
649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 93

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

² Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University
Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

³ School of Chemistry and Biochemistry, University of Western Australia
35 Stirling Highway, Crawley, WA 6009, Australia

⁴ Graduate School of Biostudies, Kyoto University
Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

⁵ Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science
and Technology, Kinki University
Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

要旨：ラクト-*N*-ビオシダーゼ (LNBase) は、乳児の腸内で優勢なビフィズス菌が有するヒトミルクオリゴ糖分解酵素であるが、その立体構造はこれまで未報告であった。本研究では *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 由来の GH20 に属する LNBase の触媒ドメインの X 線結晶構造解析を行い、反応産物 (ラクト-*N*-ビオース) と阻害剤 (LNB チアゾリン) との共結晶の構造を共に分解能 1.8Å で決定した。その結果、活性中心での二糖に対する基質認識の詳細が明らかになった。さらには、結晶構造中のサブサイト (-I) における糖のコンホメーションから、GH20 の反応機構におけるピラノース環のコンホメーション変化を推定した。

キーワード：ビフィズス菌、ヒトミルクオリゴ糖、ラクト-*N*-ビオシダーゼ、糖質加水分解酵素ファミリー 20***

1. はじめに

1.1 ビフィズス菌とその糖質の利用

ビフィズス菌はヒトの小腸下部から大腸に生息するグラム陽性の絶対嫌気性菌であり、多形性を示す。また、ビ

フィズス菌はヘテロ乳酸菌であり、酢酸などを産生して病原菌の増殖を抑える善玉菌として知られている¹⁾。宿主のヒトにおいて食物由来の糖質の多くは小腸で吸収されるため、ビフィズス菌が生息する小腸下部から大腸にはほとんど届かないと考えられる。したがって、食物由来の様々な

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成 25 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 03-5841-5151, Fax. 03-5841-5151, E-mail: asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

*** Key words: *Bifidobacterium bifidum*, human milk oligosaccharides, lacto-*N*-biosidase, glycoside hydrolase family 20

難分解性オリゴ糖を有効利用するために、ビフィズス菌は多様な難分解性オリゴ糖分解酵素を持つ。難分解性オリゴ糖の1例として、ヒトの母乳由来のオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharides : HMO) が挙げられる^{2,3)}。

1.2 HMO

ヒトの母乳には約7%の糖質が含まれている。そのうち80%はラクトース、20%はHMOである。HMOは130種類以上の複雑な構造からなる (図1)⁴⁾。HMOはラクトースを基本単位として、そこにラクト-*N*-ビオース (Gal-β 1,3-GlcNAc : LNB) あるいは*N*-アセチルラクトサミン (Gal-β 1,4-GlcNAc : LacNAc) が結合した構造をとる。また、さらにそこにフコースやシアル酸のような修飾糖が結合するものも多い。HMOのうち、LNBを含むものをタイプI型、LacNAcを含むものをタイプII型と呼ぶ。代表的なタイプI型HMOとしてラクト-*N*-テトラオース (Gal-β 1,3-GlcNAc-β 1,3-Gal-β 1,4-Glc : LNT) が挙げられる。ヒトの母乳にはタイプI型のオリゴ糖がタイプII型よりも多く含まれており、これは哺乳類・類人猿の乳の中でもヒトにのみみられる特徴であることがわかっている⁵⁾。近年、乳児の糞便から得られたビフィズス菌の多く (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* など) はHMOを代謝する経路を持つことが明らかになってきた⁶⁾。すなわち、ビフィズス菌はタイプI型HMOを栄養源の1つとしてヒトの腸内に定着し、細菌叢 (ビフィズスフローラ) の形成、ひいては乳児の健康を促進していると考えられる⁷⁾。

1.3 HMO 分解経路と LNBBase

B. bifidum JCM1254 は研究が進んでいるビフィズス菌の1つであり、様々な膜結合型菌体外グリコシダーゼを用いてHMOを分解することがわかっている⁸⁾(図1)。まず、フコースやシアル酸などの修飾糖が、GH95 1,2-α-フコシ

ダーゼ (AfcA), GH29 1,3-1,4-α-フコシダーゼ (AfcB) GH33 α-シアリダーゼ (SiaBb 1, SiaBb 2) によって、遊離されると、フコシル化などの修飾を受けていないLNTのようなオリゴ糖ができる。本研究の対象であるラクト-*N*-ビオシダーゼ (LNBBase) も膜結合型菌体外酵素として分泌され、上記のように生成したLNTなどからLNBを遊離する。一方、腸内粘膜には糖タンパク質であるムチンが豊富に含まれている。多くのビフィズス菌は、LNBBaseと同様に分泌酵素であるGH101 endo-α-GalNAcaseを持ち、ムチン型O-リンク糖鎖のコア構造であるガラクト-*N*-ビオース (Gal-β 1,3-GalNAc : GNB) を遊離する。GNBはHMOには存在しないが、その構造はLNBと類似しており、両者間の違いは還元末端の糖がGlcNAcであるかGalNAcであるかのみである。LNBとGNBはこれらに特異的な糖結合タンパク質を有するABCトランスポーターにより菌体内に取り込まれ、さらに、菌体内でLNBとGNBに特異的なホスホリラーゼによって分解されて代謝される。HMOの構成単位であるLNBは以上のように代謝され、実際にビフィズス菌の生育因子であることも明らかになっている。LNBBaseは、このHMO分解経路中においてLNBそのものを遊離する重要な酵素である。

LNBBaseは糖質加水分解酵素ファミリー20 (GH20) に属する。GH20には、二糖であるLNBを切り出すLNBBaseと、単糖であるβ-*N*-アセチルヘキソサミンを切り出すβ-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (β-HexNAcase) の2種類が分類されている。本研究を開始した時点では、GH20 β-HexNAcaseの結晶構造は多数明らかになっていたが、LNBBaseの構造は報告されていなかった。LNBBaseと構造既知のGH20 β-HexNAcaseとのアミノ酸配列同一性は最大で22%であり、両者は構造的に大きな違いを有すると予想されたため、本研究ではLNBBaseの構造生物学的な知見を得ることを目的とした。

図1. ビフィズス菌 (*B. bifidum* JCM1254 など) のヒトミルクオリゴ糖分解経路

2. *B. bifidum* JCM1254 由来 LNBase の X 線結晶構造解析

2.1 X 線結晶構造解析

本研究対象の LNBase は、*B. bifidum* JCM1254 株からクローニングされた⁸⁾。全長 1,112 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 (図 2(A))。LNBase は、LNT や LNB- β -pNP に対して高い活性を示すが、LNB 部分がフコシル化された HMO には活性を示さない。触媒ドメインのみを含む 623 アミノ酸からなるコンストラクト (残基番号 41–663) を発現ベクターに組み込み N 末に His タグを付けた。大腸菌で LNBase (41–663) を発現し、3 種類のカラムクロマトグラフィーで精製した。得られた LNBase (41–663) は、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るときにのみ結晶が成長した。LNB-チアゾリンは、LNBase の反応中間体 (オキサゾリニウムイオン) のアナログで強力な阻害剤である。KEK-PF において、これらの結晶を用いて X 線回折実験を行い、Se-SAD 法による位相決定の後、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⁹⁾。

2.2 LNBase (41–663) の構造

LNBase は溶液中では単量体である (図 2(B))。LNBase (41–663) の全体構造は、3 つのドメインからなる。第 1 に、N ドメインは、機能未知だが、GH20 に広く保存されているフォールドをとっていた。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 フォールドをとっていた。第 2 に、バレルドメインは、GH20 の触媒ドメインであり、他の GH20 と同じく TIM バレルフォールドをとっていた。第 3 に、C ドメインは

LNBase にのみ存在するユニークなドメインであり、壊れかけた β トレフォイルフォールドをとっていた。C ドメインは不完全ではあったが CBM42¹⁰⁾ と同様の 3 つのサブドメインからなっていた。C ドメインへの糖の結合は共結晶法およびソーキング法のいずれにおいても確認できなかったが、部分的にでも欠失すると活性低下に繋がるため、安定性に寄与していると考えられる。

2.3 類似構造との比較

GH20 の中で最も良く研究されているのは *Streptomyces plicatus* 由来の β -HexNAcase (SpHex) である¹¹⁾。LNBase (41–663) と SpHex を比較した (図 2(B), (C))。LNBase (41–663) の N ドメインとバレルドメインの全体構造は SpHex と良く似ている。LNBase のバレルドメインに存在する活性中心には LNB と LNB チアゾリンの電子密度マップがはっきりみえた。また、LNBase では二糖、SpHex では単糖に適した大きさの基質結合ポケットが存在することがわかった。つまり、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 (図 3(A), (B))。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 (図 3(B))。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 (図 3(A))。さらに、SpHex に存在する長いループ (図 3(B) の丸で囲った部分) が欠失しており、ここに Gal が入るスペースができていた。

それに対し、LNBase のサブサイト (-1) を構成するアミノ酸は、GH20 で保存されていた。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おり、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。さらに、LNB のすべての水酸基は周辺のアミノ酸と水素結合していた。これはすなわ

図 2. *B. bifidum* JCM1254 LNBase の触媒ドメインの結晶構造

(A) 全長のドメイン構成, (B) LNBase (41–663) の全体構造, (C) *Streptomyces plicatus* 由来の β -HexNAcase (SpHex) の全体構造。

図3. LNBBase (A) と SpHex (B) の活性中心の比較

図4. IUPACによるピラノース環のコンホメーションの定義と Cremer-Pople パラメータの極座標化

ち、LNTのように修飾糖が全くない基質でなければ結合できないことを意味する。

一方、プラス側のサブサイト (アグリコンの結合部位) は、今回得られた結晶構造からは確認できなかった。さらに、LNB、LNB チアゾリンとの共結晶に対して高濃度のラクトースや Gal, Glc をソーキングしたが、それらの糖の電子密度はみえなかった。LNBBase のアグリコン結合部位と予想される部分は、SpHex に比べて大きく開いていた。また、LNBBase は、*p*NP- β -LNB だけでなくピリジリアミノ化した LNT も効率的に加水分解する⁸⁾。したがって、アグリコンを厳密に認識しているわけではないようである。これは *Streptomyces* sp. 142 由来の LNBBase が様々な糖鎖の非還元末端の LNB を遊離することとも矛盾しない¹²⁾。

3. GH20 の反応機構における糖ピラノース環のコンホメーション変化

3.1 LNB と LNB チアゾリンのコンホメーション

ピラノースの六員環は、溶液中での安定な形として通常はイス型のコンホ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ホメーション

シオンを取り得る。IUPAC の命名法では、chair (C), boat (B), skew boat (S), half chair (H), envelope (E) の合計 38 種類のコンホメーションが定義されている (図 4)。これらのコンホメーションは Cremer-Pople パラメータによって正確に記述できる¹³⁾。このパラメータは θ , ϕ , Q からなる極座標系であり、 Q は通常 0.5 付近の値を取ることから、38 個全ての糖ピラノースのコンホメーションを θ , ϕ の極座標の球面上に配置することができる¹⁴⁾。図 5 は、その一部分をメルカトル図法で表示したものである。本研究では、後述するように、得られた LNB と LNB チアゾリンのコンホメーションをここにプロットした。

本研究で得られた共結晶中の LNB と LNB チアゾリンは、活性中心を構成するアミノ酸残基によって厳密に認識されていた。その結果、LNB と LNB チアゾリンの非還元末端のピラノース環はそれぞれ 4E , 4C_1 と呼ばれるコンホメーションをとっていた。LNB チアゾリンのコンホ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。特筆すべきは、LNB の非還元末端の GlcNAc のピラノース環のコンホメーションが 4E であったことである。 4E は、溶液中では不安定であるはずの歪んだコンホメーションである。すな

図5. GH20 酵素のサブサイト (-1) で観測された糖のコンホメーション

LNB チアゾリン (左上小窓) と LNB (右下小窓) のコンホメーションを示した。

図6. GH20 の反応における GlcNAc のコンホメーション変化の予想

わち、4位の炭素だけが持ち上がり、他の5つの原子がほぼ同一平面上にあるエンベロープ型である。LNBのGlcNAcがこのような歪んだコンホメーションをとっているのは、周囲のアミノ酸との緊密な相互作用によるものである(図5小窓)。LNBのGlcNAcの2アセトアミド基は、3つの芳香族アミノ酸(Trp373, Trp394, Trp465)に囲まれている。さらに、Asp320, Tyr419と水素結合している。このように位置を固定化された2アセトアミド基が、GlcNAcのC1を持ち上げている。また、Asp467とO4が水素結合することによってGlcNAcのC4が持ち上がった位置に固定されている。以上のようにLNBのGlcNAc

は 4E になるような相互作用を受けている。本研究で得られたLNBは反応産物であるが、その立体配座は遷移状態に近いものでもないと推察される(後述)。

3.2 GH20 の反応機構

LNBとLNBチアゾリンに加えて、GH20でこれまでに報告されている全ての複合体の結晶構造中の基質/アナログ/阻害剤に対して求めたCremer-Popleパラメータ(θ と ϕ)をプロットした(図5)。その結果、 ${}^{1,4}B$, 4E , 4C_1 の3種類のコンホメーションに大別できることが明らかになった。したがって、GH20の反応機構においては、GlcNAc

はこの3つのコンホメーションの間を変化していると考えられる。LNBaseの反応機構においては、ピラノース環のコンホメーション変化は図6のようになると推察された。GH20の反応は、アノマー保持型の substrate-assisted 機構を経ることが知られている。それによると、まず、Asp 残基によって分極された基質の2-アセトアミド基中のカルボニル酸素がアノマー炭素を求核攻撃する。それとともに、一般酸/塩基触媒の Glu が酸触媒として働いて脱離基が外れる。その結果、オキサゾリニウムイオン中間体が形成する。続いて、一般酸/塩基触媒の Glu が塩基触媒として働くことで水分子が活性化する。その水分子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。本研究の結果、この反応機構において、E・S 複合体では¹⁴B、オキサゾリニウムイオン中間体では⁴C1、E・P 複合体では⁴E に近いコンホメーションを取ると考えられた。ここで2度経由する遷移状態では、オキソカルベニウムイオン様の状態をとると考えられている。そこでは、C1とO5の間の結合が二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。今回の結果は、GH20酵素が⁴Eに近い遷移状態を通ることを強く支持している。

4. おわりに

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。ヒトのメタゲノム解析が大きく進展している現在においては、LNBase 遺伝子の有無はヒトの腸内細菌の HMO 代謝に関する重要な情報となりうる。さらに、本研究では、糖のコンホメーション変化の詳細を、既知の結晶構造を元にして予測することに成功した。多くのタンパク質の結晶構造が公開されている現在においては、そのデータベースをいかに活用していくかが、研究を進めていく上で鍵になるのではないだろうか。

謝辞

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大変お世話になりました。また、KEK-PFのスタッフの方々に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。

文献

- 1) S. Fukuda, H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.M. Clarke, D.L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori and H. Ohno: Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469**, 543–547

- (2011).
- 2) J.C. Brand-Miller, P. McVeagh, Y. McNeil and M. Messer: Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J. Pediatr.*, **133**, 95–98 (1998).
- 3) D.S. Newburg: Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, **30**, S 8–S 17 (2000).
- 4) T. Urashima, M. Kitaoka, T. Terabayashi, K. Fukuda, M. Ohnishi and A. Kobata: Milk oligosaccharides. in *Oligosaccharides: Sources, Properties and Applications*, N.S. Gordon, ed., Nova Science Publishers, New York, pp. 1–58 (2011).
- 5) T. Urashima, S. Asakuma, F. Leo, K. Fukuda, M. Messer and O.T. Oftedal: The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv. Nutr.*, **3**, 473 S–482 S (2012).
- 6) S. Fushinobu: Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2374–2384 (2010).
- 7) F. Guarner and J.R. Malagelada: Gut flora in health and disease. *Lancet*, **361**, 512–519 (2003).
- 8) J. Wada, T. Ando, M. Kiyohara, H. Ashida, M. Kitaoka, M. Yamaguchi, H. Kumagai, T. Katayama and K. Yamamoto: Bifidobacterium bifidum lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3996–4004 (2008).
- 9) T. Ito, T. Katayama, M. Hattie, H. Sakurama, J. Wada, R. Suzuki, H. Ashida, T. Wakagi, K. Yamamoto, K.A. Stubbs and S. Fushinobu: Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-N-biosidase from Bifidobacterium bifidum. *J. Biol. Chem.*, **288**, 11795–11806 (2013).
- 10) A. Miyanaga, T. Koseki, H. Matsuzawa, T. Wakagi, H. Shoun and S. Fushinobu: Crystal structure of a family 54 α-L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44907–44914 (2004).
- 11) B.L. Mark, D.J. Vocadlo, S. Knapp, B.L. Triggs-Raine, S.G. Withers and M.N. James: Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10330–10337 (2001).
- 12) M. Sano, K. Hayakawa and I. Kato: An enzyme releasing lacto-N-biose from oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8512–8516 (1992).
- 13) D. Cremer and J.A. Pople: General definition of ring puckering coordinates. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1354–1358 (1975).
- 14) G.A. Jeffrey and J.H. Yates: Stereographic representation of the Cremer-Pople ring-puckering parameters for pyranoid rings. *Carbohydr. Res.*, **74**, 319–322 (1979).

質疑応答

[質問]

食総研 北岡

LNBaseの構造からは¹⁴Bが観測されていない。本酵素の反応は他のβ-HexNAcaseのように¹⁴Bを経由すると考えられるのか。

[回答]

ご指摘の通り、LNBaseとLNTなどの基質との複合体構造は得られておりません。しかしながら、本発表中にも示しましたが、サブサイト (-1) の糖のコンホメーションは周囲のアミノ酸残基との相互作用によって決まっています。そしてその相互作用は1位と4位の炭素原子に対してのみ影響しています。つまり、3位にGalが結合しているか否かはコンホメーションに大きく関係することはないと予想されます。したがって、LNBaseにおいても他のβ-HexNAcaseで観測されたものと同様に、¹⁴Bを経由すると考えられます。

[質問] 日大・生資科 袴田

反応機構における Y419 の水素結合の役割は何か。

[回答]

Y419 は、GlcNAc の 2 アセトアミド基のカルボニル酸素の分極に関与しています (図 5)。Y419 の水素結合がなければ分子内求核置換反応は起こらないと考えられます。また、本発表中にデータは示しておりませんが、変異体解析の結果、Y419 F は比活性の低下により K_m は算出不能になり、 k_{cat} は著しく低下しました。したがって、Y419 は反応機構において極めて重要な役割をしていると考えられます。

[質問] 東大院・農生科 中村

MD シミュレーションをやってみてはどうか。

[回答]

ご指摘の通り、計算化学による支持データがあれば、コンホメーション変化の根拠が増えることになると思います。実際に行うならば、LNBase のミカエリスコンプレックスにおいて ^{14}B のコンホメーションがエネルギー的に安定であることを示すための QM 計算を行うことになるかと思っています。