Functional Analysis of Degradative Enzymes for Hydroxyproline-linked β -L-Arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*

Bifidobacterium longum が生産する β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の機能解析

Fujita, Kiyotaka ; Kitahara, Kanefumi ; and Suganuma, Toshihiko

Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

FAX: 81-99-285-8639, E-mail: kfujita@ms.kagoshima-u.ac.jp

(Received on August 31, 2012, accepted on September 13, 2012)

Key Words: *extensin*, *hydroxyproline-rich glycoprotein*, β -L-arabinofuranosides, *Bifidobacterium longum*, *arabinofuranosidase*, *prebiotics*

Abstract

β -L-Arabinofuranosides are hydroxyproline (Hyp)-linked sugar chains of extensin observed in plant cell wall fractions. Despite the broad distribution of β -L-arabinofuranosyl residues in plants, degradative enzymes have not yet been identified. In 2011, we cloned and characterized the first degradative enzymes for Hyp-linked β -L-arabinofuranosides from *Bifidobacterium longum*. These enzymes were composed of a glycoside hydrolase (GH) family 43 α -L-arabinofuranosidase (HypAA) releasing L-arabinose from Ara α 1-3Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -Hyp, a GH121 β -L-arabinobiosidase (HypBA2) releasing Ara β 1-2Ara β (β -Ara $_2$) from Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -Hyp, and a GH127 β -L-arabinofuranosidase (HypBA1) degrading β -Ara $_2$ to L-arabinose. These enzymes are encoded in a conserved gene cluster on several *B. longum* genomes, but not in genome sequences of other intestinal bacteria. Hyp-linked β -L-arabinofuranosides were utilized as carbohydrate sources by *B. longum*. This review presents the functional features of enzymes for Hyp-linked β -L-arabinofuranosides and the predicted metabolic pathway in *B. longum*.

要 約

β -アラビノオリゴ糖鎖は、植物細胞壁に含まれる糖タンパク質であるエクステンシンのハイドロキシプロリン (Hyp) 結合型糖鎖である。しかし、 β -L-アラビノフラノシド結合が植物に広く分布するにもかかわらず、その分解酵素はこれまで報告されていなかった。2011年に、我々は β -アラビノオリゴ糖鎖を分解する酵素群の*Bifidobacterium longum*からのクローニングと性質決定に初めて成功した。本酵素群は、Ara α 1-3Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -HypからL-arabinoseを遊離するGH43 α -L-arabinofuranosidase (HypAA)、Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -HypからAra β 1-2Ara β (β -Ara $_2$)を遊離するGH121 β -L-arabinobiosidase (HypBA2)、遊離された β -Ara $_2$ をL-arabinoseに分解するGH127 β -L-arabinofuranosidase (HypBA1)によって構成されていた。本酵素群は*B. longum*ゲノム上で一つの遺伝子クラスターを形成していたが、他の腸内細菌のゲノム上には保存されていなかった。また、*B. longum*は β -アラビノオリゴ糖鎖を資化することができた。本総説では β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の機能性と*B. longum*で予想される代謝経路について紹介する。

A. Introduction

L-Arabinose residues are the main constituents of sugars in plant cell walls, and they are mostly present in the form of α -L-furanose in polysaccharides such as arabinan, arabinoxylan, and pectic arabinogalactan. Glycoside hydrolases involved in the degradation of α -L-arabinofuranosides are present in 6 glycoside hydrolase (GH) families (GH3, GH43, GH51, GH54, GH62, and GH93) in the CAZy database. In addition, degradative enzymes for α - and β -L-arabinopyranoside linkages were also found in the GH42 and GH27 families, respectively (1,2). On the other hand, β -L-arabinofuranoside linkages constitute sugar chains of hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), which are known

A. はじめに

L-arabinoseは植物細胞壁における主要な構成糖であり、arabinanやarabinoxylanやarabinogalactan等の多糖においてその多くが α -L-フラノース型として存在している。 α -L-アラビノフラノシド (Ara α) 結合を加水分解する酵素は、CAZyデータベースにおいて6グループの糖質分解酵素 (GH) ファミリー (GH3, GH43, GH51, GH54, GH62 および GH93) に分類されている。また、アラビノピラノシド結合に作用する酵素としてGH42 α -L-arabinopyranosidase や GH27 β -L-arabinopyranosidase が報告されている (1,2)。一方、 β -L-アラビノフラノシド結合はハイドロキシプロリン (Hyp) に富む糖タンパク質 (HRGP) であるエクステンシンやナス科レクチ

as extensin and Solanaceae lectins. Extensin is a structural protein that is found in plant cell walls (3,4). Solanaceae lectins contain an extensin-like domain and chitin-binding domains (5,6). In addition to extensin and Solanaceae lectins, arabinogalactan-protein (AGP) is a member of HRGPs, in which hydroxyproline (Hyp) residues are glycosylated with type II arabinogalactans. Extensin and Solanaceae lectins contain repetitive Ser-Hyp₄ motifs with Hyp residues that are *O*-glycosylated with 1-4 arabinofuranosyl (Araf) residues with β -L-arabinofuranosyl linkages. The structures of Ara₃-Hyp and Ara₄-Hyp, which are the major constituents of Hyp-linked β -L-arabinofuranosides in dicotyledons (7), are Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -Hyp and Ara α 1-3Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -Hyp, respectively (8,9). However, despite the broad distribution of Hyp-linked β -L-arabinofuranosides in plant cells, degradative enzymes have not been identified yet.

Bifidobacteria are strictly anaerobic bacteria that are common in the lower intestinal microflora of humans and animals. *Bifidobacterium longum* is one of the major species of bifidobacteria and is frequently found both in the feces of both infants and adults. In 2002, genome sequence analysis of *B. longum* NCC2705 revealed 7 gene clusters, which are involved in the degradation of oligo- and polysaccharides (10). In particular, 4 of the 7 gene clusters contained 9 candidate genes for α -L-arabinofuranosidase belonging to GH43 and 51. Several reports have indicated that *B. longum* has the ability to grow on various non-digestible plant carbohydrate polymers containing α -L-arabinofuranosyl linkages, *e.g.*, arabinoxylan, arabinogalactan, and arabinan (11–13). The presence of degradative enzymes for plant carbohydrates may reflect the superior ability of *B. longum* to adapt to the intestinal environment.

In this review, we describe the process of the discovery, the functional features of enzymes for Hyp-linked β -L-arabinofuranosides, and the predicted metabolic pathway in *B. longum*. Furthermore, we discuss a carbon-utilization strategy of *B. longum* targeting plant glycoproteins in the gastrointestinal tract.

B. Exploration of a Novel Glycoside Hydrolase in a Hypothetical Protein

Because many genome sequences have been disclosed, cloning techniques based on genome sequence information are important tools for characterizing hypothetical proteins. In 2005, we cloned and characterized a novel GH101 endo- α -N-acetylgalactosaminidase, which is a degradative enzyme for core-1 mucin-type *O*-glycans, from the type strain of *B. longum*, JCM 1217, on the basis of the sequence of a hypothetical protein (BL0464) from *B. longum* NCC2705 (14). BL0464 is an enzyme bound to the bifidobacterial surface, and contains C-terminal FIVAR regions, which are

ンの糖鎖に含まれている。エクステンシンは植物細胞壁に存在する構造タンパク質であり(3,4)、ナス科レクチンはエクステンシン様ドメインと複数のキチン結合領域で構成された糖タンパク質である(5,6)。エクステンシンやナス科レクチンに加えて、II型 arabinogalactan が Hyp に結合した糖鎖を有する arabinogalactan-protein (AGP) も HRGP のメンバーである。エクステンシンやナス科レクチンは Ser-Hyp₄ の繰り返し構造を有しており、その Hyp 残基に β -アラビノオリゴ糖鎖が結合している。その糖鎖構造は β -Araf で構成された Ara β 1-2Ara β 1-2Ara β -Hyp (Ara₃-Hyp) 及びその非還元末端に α 1,3 結合で Araf が付加された Ara₄-Hyp であり(8,9)、Ara₃-Hyp と Ara₄-Hyp が双子葉植物における β -アラビノオリゴ糖鎖の主要な構造である(7)。しかしながら、植物における β -アラビノオリゴ糖鎖の広範囲に及ぶ分布にもかかわらず、その分解酵素の存在は全く知られていなかった。

ビフィズス菌はヒトや動物の大腸に棲息する偏性嫌気性菌である。その中でも、*Bifidobacterium longum* は子供から大人まで全ての年齢層の糞便から分離される主要なビフィズス菌の一つである。2002年に*B. longum* NCC2705のゲノム配列情報が開示され、オリゴ糖や多糖の分解に関わる7つの遺伝子クラスターの存在が予想された(10)。特に、7つのクラスターの内4つはGH43やGH51に属する9つの α -L-arabinofuranosidase 候補遺伝子が含まれていた。*B. longum* は、 α -L-Araf 含有多糖である arabinoxylan や arabinogalactan や arabinan 等の様々な難消化性多糖に対して資化性を示すことが報告されている(11–13)。植物多糖に対する分解酵素の存在は、腸内環境に適応した*B. longum*の優れた能力を反映しているものと考えられる。

本総説では、我々が*B. longum*から β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群を発見した経緯、各酵素の機能特性及び、予想される代謝経路について述べる。さらに、腸内環境において植物糖タンパク質を炭素源として利用する*B. longum*の生存戦略について考察する。

B. 仮想タンパク質からの新規糖質分解酵素の探索

多くのゲノム配列が明らかにされている現在、ゲノム配列情報を利用したクローニング手法は仮想タンパク質の機能解析のための重要なツールである。2005年に我々は、*B. longum* NCC2705の仮想タンパク質BL0464の配列情報を基に、基準株である*B. longum* JCM1217からのムチン型糖鎖分解酵素GH101 endo- α -N-acetylgalactosaminidaseの同定に初めて成功した(14)。BL0464はビフィズス菌表層に局在する酵素であり、そのC末端にFIVAR領域(細菌の細胞壁関連タンパク質に保存された未同定の糖結合領域(15))と膜アンカリング領域を

Fig. 1. Degradative enzymes for Hyp-linked β -L-arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*. A, Gene cluster involved in the degradation of Hyp-linked β -L-arabinofuranosides. The locus tags and gene names of *B. longum* JCM1217 and NCC2705 are shown. B, Structural motives of the enzymes. The name of their motives and their amino acid lengths are shown. SP, signal peptide; Anch, membrane-anchoring region; Big3, Bacterial Ig-like domain (group 3); Big4, Bacterial Ig-like domain (group 4); FIVAR, uncharacterized sugar-binding domain; CBM32, carbohydrate-binding module family 32.

uncharacterized sugar-binding domain conserved in bacterial cell wall-associated proteins (15), and a membrane-anchoring region. Similar to BL0464, BL0420 and BL0421 also contain C-terminal FIVAR and membrane-anchoring regions (Fig. 1). Schell *et al.* (10) predicted that BL0420 and BL0421 may be involved in binding or degrading xylan or hemicellulose. While BL0420 contains a GH43 conserved region, which includes xylosidases and α -L-arabinofuranosidases, BL0421 contains no conserved region to any known glycoside hydrolase in the N-terminus. We hypothesized that BL0421 is a novel glycoside hydrolase that coordinately degrades arabinan or xylan with BL0420 on the bifidobacterial surface. Therefore, we cloned the *hypBA2* gene (BLLJ_0212) of a BL0421 homolog from *B. longum* JCM 1217, as shown in Fig. 1A, and explored potential substrates for the recombinant protein. In various synthetic *pNP* substrates and natural polysaccharides, the enzyme was able to release disaccharide composed of L-arabinose from commercial arabinan and debranched arabinan (16). However, NMR analysis revealed that the structure of the product was Araf β 1-2Araf (β -Ara₂) with β -anomeric configuration, which has never been found in arabinan. Only small amounts of the liberated saccharides (approximately 0.02%) were produced from commercially available sugar beet arabinan. Therefore, we assumed that the β -Ara₂ residue was a contaminant from plant tissues. A literature search for oligosaccharides that contain the Araf β 1-2Araf moiety suggested that Hyp-linked β -L-

含んでいた。我々は新たに、BL0464と同様にC末端FIVAR領域と膜アンカリング領域を有していたBL0420とBL0421に注目した(図1)。Schellら(10)は、BL0420とBL0421がxylanもしくはhemicelluloseに対する結合や分解に関わるタンパク質と予想していた。BL0420はN末端側にxylosidaseや α -L-arabinofuranosidaseが含まれるGH43保存領域を有していたが、BL0421は既知の糖質分解酵素の保存領域を持たない機能未知タンパク質であった。このため、我々はBL0421がビフィズス菌表面にてBL0420と共にarabinanやxylanを分解する新規糖質分解酵素であると予想した。そこで、図1Aに示すようにBL0421のホモログである*hypBA2*遺伝子(BLLJ_0212)を*B. longum* JCM1217からクローニングし、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて基質の探索を行った。数多くの*pNP*基質や多糖類を基質として用いて酵素反応を行った結果、L-arabinoseで構成された二糖が市販のアラビナン及び脱分岐アラビナンから遊離された(16)。しかし、NMR解析により判明したその構造は、アラビナンでは報告されていない β -アノマー構造を有するAraf β 1-2Araf (β -Ara₂)であった。市販のシュガービートアラビナンから得られた遊離糖の収率は0.02%程度であったことから、 β -Ara₂はアラビナンに混入した植物組織に由来すると予想された。そこで、遊離糖のAraf β 1-2Araf構造を基に文献検索を行った結果、ナス科レクチンやエ

Table I. Action of the enzymes on various substrates.

Substrates	HypAA	HypBA2	HypBA1
Ara ₄ -Hyp	+	—	—
Ara ₃ -Hyp	—	+	+
Ara ₂ -Hyp	—	—	+
Ara-Hyp	—	—	+
β-Ara ₂	—	—	+
Potato lectin	+	+	—
Extensin	+	+	—

+, hydrolyzed ; —, not hydrolyzed

Fig. 2. Schematic representation of the hydrolysis of Ara₄-Hyp by HypAA, HypBA2, and HypBA1. The thin arrows indicate the cleavage sites for the enzymes.

arabinofuranosides from Solanaceae lectins and extensin act as substrates for HypBA2.

C. Characterization of β-L-Arabinobiosidase Using Hyp-Linked β-L-Arabinofuranosides

Substrate preparation is the most important part in the characterization of enzymes. Potato lectin and carrot extensin containing Hyp-linked β-L-arabinofuranosides were prepared as described previously (17,18). Furthermore, Hyp-linked β-L-arabinofuranosides were easily prepared by using an alkaline hydrolysis procedure (16). However, the artificial *cis* form of Hyp-linked *O*-glycans was isomerized from the natural *trans* form by alkaline hydrolysis (19), and the *cis* and *trans* conformers were easily separated on an ODS column by fluorescence labeling of Hyp with dansyl chloride (16).

HypBA2 liberated β-Ara₂ from unmodified Ara₃-Hyp but not Ara₄-Hyp or Araβ1-2Araβ-Hyp (Ara₂-Hyp) (Table I, Fig. 2). Hence, we designated HypBA2 as β-L-arabinobiosidase (16). The enzyme exhibited transglycosylation activity toward 1-alkanols with retention of the anomeric configuration. This is the first report of an enzyme that hydrolyzes β-L-arabinofuranosides, which defines a new CAZy family of glycoside hydrolases, GH121.

Thus far, Hyp-linked arabinofuranosides in plants have been analyzed by alkaline hydrolysis and column chromatography. Recently, extensin has been identified as the essential factor in root hair growth (20). HypBA2 has strict substrate specificity for Ara₃-Hyp, and directly liberated β-Ara₂

クステンシンに含まれる β-アラビノオリゴ糖鎖が HypBA2 の 真の基質候補として浮上した。

C. Hyp 結合型 β-アラビノオリゴ糖鎖を用いた β-L-arabinobiosidase の性質決定

酵素の性質決定を行うためには基質の調製が欠かせない。幸い、β-アラビノオリゴ糖鎖を含有するポテトレクチンやニンジンエクステンシンの調製法は確立されていた(17,18)。また、β-アラビノオリゴ糖鎖はアルカリ分解を用いることで簡単に調製することができた(16)。β-アラビノオリゴ糖鎖の Hyp 残基はアルカリ分解により天然型の *trans* 型が一部 *cis* 型に異性化されたが(19)、ダンシルクロリドを用いた Hyp の蛍光ラベル化により、*cis-trans* 異性体は ODS カラムで簡単に分離することができた(16)。

HypBA2 は、Ara₃-Hyp に作用し β-Ara₂ を遊離したが、Ara₄-Hyp や Araβ1-2Araβ-Hyp (Ara₂-Hyp) には作用しなかった(表 I、図 2)。このため、HypBA2 を β-L-arabinobiosidase と命名した(16)。本酵素はアルコールに対して糖転移活性を示すアノマー保持型酵素であった。本酵素は β-アラビノオリゴ糖鎖の β-L-アラビノフラノシド結合を切断する初めての酵素として、CAZy 糖質分解酵素ファミリー GH121 に新たに登録された。

これまで、植物に含まれる β-アラビノオリゴ糖鎖はアルカリ加水分解とカラムクロマトグラフィーを用いて分析されてきた。最近、エクステンシンは根毛の伸長に必須の因子として注目されている(20)。HypBA2 はエクステンシンやポテトレクチンに直接作用し、Ara₃-Hyp 特異的に β-Ara₂ を遊離させ

from carrot extensin and potato lectin (Table I). Therefore, the enzyme can be used to develop a simpler technique to detect and study the role of β -L-arabinofuranosides in plant.

D. Identification of a Novel β -L-Arabinofuranosidase by Expression Analysis of the *hypBA1* Gene

Because HypBA2-released β -Ara₂ should be hydrolyzed by its own enzyme for assimilation, we predicted that *B. longum* has a gene encoding β -L-arabinofuranosidase. The genome sequence of our research strain, *B. longum* JCM1217, was disclosed in 2011 (21). The *hypBA1* gene (BLLJ_0211), which neighbors the *hypBA2* gene (BLLJ_0212), contains a Pfam DUF 1680 domain (Fig. 1). The DUF1680 family (PF07944) is annotated as putative glycosyl hydrolase of unknown function. This family has 943 members distributed among 423 species of bacteria, actinomycetes, fungi, and plants. Therefore, we cloned the *hypBA1* gene from *B. longum* JCM 1217 and characterized the recombinant protein as a novel β -L-arabinofuranosidase (22). The enzyme released L-arabinose from β -Ara₂, Ara-Hyp, Ara₂-Hyp and Ara₃-Hyp, but not from carrot extensin and potato lectin (Table I, Fig. 2). The enzyme also exhibited transglycosylation activity toward 1-alkanols with retention of the anomeric configuration. Because the amino acid sequence of HypBA1 lacks both a secretory signal and a membrane-anchoring region (Fig. 1B), HypBA1 is thought to be an intracellular enzyme that degrades HypBA2-released β -Ara₂. This is the first characterization of a DUF1680 family member, which defines a new CAZy family of glycoside hydrolases, GH127. The DUF1680 family members are widely distributed in bifidobacteria. In particular, *B. longum* JCM 1217 encodes 4 members of the DUF1680 family (BLLJ_0211, BLLJ_1826, BLLJ_1848, and BLLJ_0089). Terminal β -L-arabinofuranosyl residues have been found in AGP from a pollen (23), rhamnogalacturonan-II (24–26), olive arabinan (27), arabinoglucan from *Angelica sinensis* (28), and tomato arabinoxyloglucan (29). Furthermore, β -L-arabinofuranosyl residues were found in yessotoxin from dinoflagellates (30, 31). Therefore, DUF1680 family members are thought to play a role in the effective degradation of several β -L-arabinofuranosyl residues in biopolymers as well as Hyp-linked β -L-arabinofuranosides.

E. Identification of Ara₄-Hyp-specific α -L-Arabinofuranosidase by Expression Analysis of the *hypAA* gene

Ara₄-Hyp as well as Ara₃-Hyp are the major Hyp-linked β -L-arabinofuranosides in the dicotyledon. In the cell walls of dicot plants, Ara₄-Hyp accounts for 33%–75% of the total Hyp residues (7). With regard to potato lectin, Ara₄-Hyp accounts for 47% of the total Hyp residues (32). Since HypBA2 cannot hydrolyze Ara₄-Hyp, α -L-arabinofuranosidase is required for

能力がある (表 I)。このため、本酵素を利用することで植物に含まれる β -アラビノオリゴ糖鎖の存在を簡単に調べることができると考えられる。

D. *hypBA1* 遺伝子の発現解析による β -L-arabinofuranosidase の同定

HypBA2 により遊離された β -Ara₂ が *B. longum* で資化されるためには、自身の酵素により L-arabinose にまで分解される必要がある。このため、我々はその分解酵素である β -L-arabinofuranosidase が *B. longum* にコードされていると予想した。幸い、我々が解析対象としている *B. longum* JCM1217 のゲノム情報が 2011 年に開示され (21)、詳細な解析が可能となった。その候補遺伝子となった *hypBA1* 遺伝子 (BLLJ_0211) は、*hypBA2* 遺伝子 (BLLJ_0212) に隣接しており、Pfam DUF1680 ドメインをコードしていた (図 1)。DUF1680 ファミリー (PF07944) は機能未知の糖質分解酵素であると推定されており、細菌・放線菌・糸状菌・植物など 423 種に保存されている 943 遺伝子が登録されている。そこで、*hypBA1* 遺伝子のクローニングと組換え酵素の性質決定を行った結果、HypBA1 が新規 β -L-arabinofuranosidase であることを明らかにした (22)。本酵素は L-arabinose を β -Ara₂、Ara-Hyp、Ara₂-Hyp、Ara₃-Hyp から遊離したが、ポテトレクチンやエクステンシンから L-arabinose を遊離することはできなかった (表 I、図 2)。また、HypBA2 と同様に本酵素もアルコールに対して糖転移活性を示すアノマー保持型酵素であった。HypBA1 が有する保存領域は DUF1680 ドメインだけであり、シグナルペプチドや膜アンカリング領域を有していない (図 1B)。このため、HypBA1 は HypBA2 によって遊離された β -Ara₂ を L-arabinose に分解する菌体内酵素であると予想された。HypBA1 は DUF1680 ファミリーにおいて初めて性質決定された酵素であり、新規糖質分解酵素ファミリー GH127 に登録された。DUF1680 ファミリーのメンバーはビフィズス菌のほとんど全ての菌種で保存されているが、特に *B. longum* JCM1217 は多くの DUF1680 メンバー (BLLJ_0211, BLLJ_1826, BLLJ_1848, BLLJ_0089) を有している。多糖の非還元末端に存在する β -L-Araf 残基は、花粉由来の AGP (23)、各種 rhamnogalacturonan-II (24–26)、オリーブ由来の arabinan (27)、トウキ由来の arabinoglucan (28) やトマト由来の arabinoxyloglucan (29) でその存在が報告されている。さらに、 β -L-Araf 残基は渦鞭毛藻類由来の配糖体である yessotoxin にも存在している (30, 31)。このため、DUF1680 ファミリーには、Hyp 結合型 β -アラビノオリゴ糖鎖だけでなく、多彩な β -L-アラビノフラノシド結合を切断する酵素が含まれていると考えられる。

E. *hypAA* 遺伝子の発現解析による Ara₄-Hyp 特異的 α -L-arabinofuranosidase の同定

Ara₄-Hyp は Ara₃-Hyp と同様に双子葉植物における主要な Hyp 結合型 β -アラビノオリゴ糖鎖である。双子葉植物の細胞壁の Ara₄-Hyp の割合は Hyp 残基の 33% から 75% であり (7)、ポテトレクチンの Ara₄-Hyp の割合は Hyp 残基の 47% と報告されている (32)。HypBA2 は Ara₃-Hyp 特異的であるため、Ara₄-Hyp を切断するためには、まず非還元末端に存在する α -L-Araf 残基を α -L-arabinofuranosidase で切断する必要がある。*hypBA2* 遺伝子と遺伝子クラスターを形成する *hypAA*

Fig. 3. Analysis of the products formed by combination of the enzymes. Ara₄-Hyp was incubated without enzymes (A), with HypAA (B), with HypAA and HypBA2 (C), and with HypAA, HypBA2, and HypBA1 (D) at 30°C for 16 h. The reaction products were analyzed by high-performance anion exchange chromatography equipped with a pulsed amperometric detector.

effective degradation of β -L-arabinofuranosides. Since the *hypAA* gene (BLLJ_0213) containing a GH43 domain forms a gene cluster with the *hypBA2* gene (Fig.1), we cloned the *hypAA* gene and characterized the recombinant protein as α -L-arabinofuranosidase (unpublished results). HypAA specifically degraded Ara₄-Hyp to Ara₃-Hyp and L-arabinose (Table I, Fig.2). Furthermore, the enzyme hydrolyzed Arafa1-3Araf disaccharide, but not Arafa1-2Araf, Arafa1-5Araf, or pNP- α -L-arabinofuranoside (unpublished results). Therefore, HypAA is a α 1-3-specific α -L-arabinofuranosidase, which recognizes the Arafa1-3Araf structure of Ara₄-Hyp. In addition, HypAA directly liberated L-arabinose from carrot extensin and potato lectin (Table I). Because HypAA contains a predicted signal peptide and a membrane-anchoring region (Fig.1B), the enzyme might be localized on the bifidobacterial surface and coordinately degrade Ara₄-Hyp with HypBA2.

Next, we examined the synergistic effect of the enzymes on the degradation of Hyp-linked β -L-arabinofuranosides. Ara₄-Hyp was completely degraded in combination with HypAA, HypBA2 and HypBA1 (Fig.3). These enzymes coordinately degrade Ara₄-Hyp to L-arabinose as summarized in Fig.2. Because these enzymes probably have to degrade very crowded β -L-arabinofuranosides on extensin, these enzymes may bind to extensin for subsequent degradation using C-terminal carbohydrate-binding module family 32, Bacterial Ig-like domains, and FIVAR regions (Fig.1B). The gene cluster containing *hypAA*, *hypBA2*, and *hypBA1* was conserved in many strains of *B. longum* subsp. *longum* (JCM1217, NCC2705, BBMN68, F8, and KACC91563) and *B. longum* subsp. *infantis* (157F, ATCC55813, and

遺伝子 (BLLJ_0213) は、 α -L-arabinofuranosidase をコードすると予想された GH43 ドメインを有していた (図1)。そこで、*hypAA* 遺伝子のクローニングと組換え酵素の性質決定を行った結果、本酵素が α -L-arabinofuranosidase であることを明らかにした (未発表データ)。HypAA は Ara₄-Hyp 特異的に作用し、L-arabinose と Ara₃-Hyp に分解した (表I、図2)。また、本酵素は pNP- α -L-arabinofuranoside に作用せず、Arafa1-2Araf、Arafa1-3Araf、Arafa1-5Araf の中では Arafa1-3Araf だけを切断することが確認された (未発表データ)。以上の結果、HypAA は Ara₄-Hyp の Arafa1-3Araf 構造を認識して切断する α -L-arabinofuranosidase であることが明らかとなった。その上、HypAA はエクステンシンやポテトレクチンに直接作用し、L-arabinose を遊離させることができた (表I)。HypAA はシグナルペプチドや膜アンカリング領域を含んでいることから (図1B)、ビフィズス菌の表層に局在し、HypBA2 と協力して Ara₄-Hyp を分解していると考えられる。

次に、我々は β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の相乗効果の検証を行った。HypAA、HypBA2、HypBA1 を Ara₄-Hyp に順次添加した結果、Ara₄-Hyp を完全に L-arabinose に分解することができた (図3)。このため、Ara₄-Hyp は図2に示すような酵素群の協同作用により L-arabinose に分解されていると考えられる。これらの酵素はエクステンシン上の密集した状態で存在する β -アラビノオリゴ糖鎖から糖を遊離する必要があるため、図1Bに示したC末端側の保存領域 (CBM32、Ig様ドメイン、FIVAR領域) の働きによりエクステンシンに結合し、効率的な分解を行っていると考えられる。*hypAA*、*hypBA2*、*hypBA1* により構成された遺伝子クラスターは多くの *B. longum* subsp. *longum* (JCM1217, NCC2705, BBMN68, F8, KACC91563) や *B. longum* subsp. *infantis* (157F, ATCC55813, CCUG52486) に保存されている。また、*B. pseudocatenulatum* は遺伝子クラスターを完全に保存し、*B.*

Fig. 4. Schematic degradative pathway of β -L-arabinofuranosides on extensin in *Bifidobacterium longum*.

CCUG52486). The gene cluster was also conserved in *B. pseudocatenulatum* as well as in *B. catenulatum* and *B. dentium*, but in the latter 2 organisms, the sequence encoding HypAA was not conserved. In addition, the gene cluster was not found in other gut bacteria (e.g., *Bacteroides*, *Salmonella*, *Clostridium*, and *Escherichia*). Therefore, HRGPs containing β -L-arabinofuranosides are considered candidate prebiotics for bifidobacteria. Interestingly, the gene cluster was conserved in many species of plant-pathogenic *Xanthomonas*. These enzymes may be beneficial for plant infection via the degradation of extensin, which has a role in plant defense.

F. Predicted Metabolic Pathway of β -L-Arabinofuranosides in *B. longum*

β -Ara₂ in PYF medium was utilized as carbohydrate source by *B. longum* JCM 1217 but not by *B. adolescentis* JCM 1275 (22). Furthermore, enzymatic activities of HypAA and HypBA2 were found in *B. longum* whole cells grown in the presence of β -Ara₂, and HypBA1 activity was also found in the cell lysate of *B. longum*. However, these activities were not detected in cultures grown in media containing glucose and L-arabinose. Interestingly, *B. longum* produced not only HypBA1 but also HypAA and HypBA2 by using β -Ara₂ as carbohydrate source. The contiguous genes of *hypBA1* contain candidate genes for ABC transporter proteins (BLLJ_0208-BLLJ_0210) and a LacI-type transcriptional regulator (BLLJ_0207) (Fig.1A). We expect that the expression of this gene cluster was induced by β -Ara₂ in *B. longum*. Furthermore, we found that *B. longum* JCM 1217 utilized Ara₄-Hyp and extensin as carbohydrate source (unpublished

catenulatum と *B. dentium* は HypBA2 と HypBA1 ホモログを有している。一方、*Bacteroides*、*Salmonella*、*Clostridium*、*Escherichia* 等のビフィズス菌以外の腸内細菌は、この遺伝子クラスターを保持していない。このため、 β -アラビノオリゴ糖鎖を有する HRGP は、大腸内においてビフィズス菌だけに利用されるプレバイオティクス候補になると考えられる。興味深いことに、植物病原性を有する *Xanthomonas* 属細菌の多くはこの遺伝子クラスターを保存していた。これらの酵素は、感染防御機能を有するエクステンシンを分解することで植物感染に寄与しているものと考えられる。

F. β -アラビノオリゴ糖鎖の予想される分解代謝機構

β -Ara₂ を炭素源として添加した PYF 培地を用いて *B. longum* JCM1217 及び *B. adolescentis* JCM1275 を培養した結果、*B. longum* では良好な生育が確認されたのに対して、*B. adolescentis* では生育が確認されなかった (22)。さらに、HypAA 及び HypBA2 の酵素活性が β -Ara₂ 存在下で培養した *B. longum* の未破碎菌体から検出され、HypBA1 の酵素活性が破碎菌体から検出された。なお、L-arabinose 及び glucose で培養した *B. longum* では酵素活性が検出されなかった。興味深いことに、炭素源として β -Ara₂ を用いることにより、HypBA1 だけでなく HypAA 及び HypBA2 も生産された。本酵素群をコードする遺伝子クラスターの隣には ABC 輸送体 (BLLJ_0208-BLLJ_0210) や LacI 型転写因子 (BLLJ_0207) の候補遺伝子が含まれている (図 1A)。このため、*B. longum* は β -Ara₂ を用いてこの遺伝子クラスターの発現を誘導していると考えられる。さらに、我々は *B. longum* JCM1217 が Ara₄-Hyp 及びエクステンシンを資化することも確認している (未発表データ)。

results).

Figure 4 shows the proposed metabolic pathway of β -L-arabinofuranosides in *B. longum*. First, β -Ara₂-inducible HypAA and HypBA2 are localized on the surface of the bacteria, and then, HypAA (BLLJ_0213) releases L-arabinose from extensin (Ara₄-Hyp to Ara₃-Hyp). Next, HypBA2 (BLLJ_0212) releases β -Ara₂ from extensin (Ara₃-Hyp to Ara-Hyp). Then, the released L-arabinose and β -Ara₂ are internalized into the bifidobacterial cell by an uncharacterized transport system and predicted ABC transporter proteins (BLLJ_0208-BLLJ_0210), respectively. Next, HypBA1 (BLLJ_0211) degrades β -Ara₂ to L-arabinose. Furthermore, L-arabinose is metabolized to D-xylulose-5-phosphate by L-arabinose isomerase (BLLJ_0342), L-ribulokinase (BLLJ_0340), and L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase (BLLJ_0341).

G. Effects of Polysaccharides and HRGPs Containing L-Arabinose on the Growth of *B. longum*

In 2011, Fukuda *et al.* (21) reported that *B. longum* has an advanced ability for fructose uptake and acetate production. The released acetate improved the intestinal defense mediated by epithelial cells and exerted a protective effect against *E. coli* O157:H7 infections in mice. Bifidobacteria metabolize glucose and fructose through a particular metabolic pathway, so-called bifid shunt, and form lactate and acetate via D-xylulose-5-phosphate as major metabolites. L-Arabinose is a poorly absorbed sugar (33) and is scarcely metabolized in humans (34). Therefore, most of the L-arabinose is thought to utilize by intestinal bacteria. Many reports indicate that *B. longum* has the ability to grow in the presence of L-arabinose (12, 35–37). *B. longum* JCM 1217 encodes a number of candidates for the α -L-arabinofuranosidase gene, 11 members of GH43 gene family, and 4 members of GH51 gene family. Furthermore, the strain also encodes 4 members of the DUF1680 family, which are β -L-arabinofuranosidase candidates. Several α - and β -L-arabinofuranoside degradative enzymes in *B. longum* might be involved in L-arabinose acquisition from plant polysaccharides and HRGPs in the large intestine. In fact, gum arabic containing type-II arabinogalactan and AGP are fermented by almost all strains of *B. longum*, but not by the other 28 species of bifidobacteria (11). *B. longum*, which is one of the predominant bifidobacterial species in the large intestine, is thought to contribute to maintaining the health of the large intestine by releasing acetate through metabolism of plant polysaccharides and HRGPs.

H. Future Prospects

Among bifidobacterial species, *B. longum* may have a superior ability for metabolizing plant polysaccharides and HRGPs containing L-arabinose. Many degradative enzymes

これらの結果から予想された β -アラビノオリゴ糖鎖の分解代謝機構を図4に示す。まず、 β -Ara₂により誘導生産されたHypAAとHypBA2は菌体表層に局在し、HypAA (BLLJ_0213)がエクステンシンからL-arabinoseを遊離させる(Ara₄-HypからAra₃-Hyp)。次に、HypBA2 (BLLJ_0212)が β -Ara₂を遊離させる(Ara₃-HypからAra-Hyp)。そして、遊離されたL-arabinoseは未知の糖輸送体によって菌体内に取り込まれ、 β -Ara₂はABC輸送体 (BLLJ_0208-BLLJ_0210)によって取り込まれる。その後、 β -Ara₂は菌体内酵素であるHypBA1 (BLLJ_0211)の作用を受けてL-arabinoseに分解される。さらに、L-arabinoseはL-arabinose isomerase (BLLJ_0342)、L-ribulokinase (BLLJ_0340)、L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase (BLLJ_0341)で構成されるL-arabinose代謝経路を経てD-xylulose-5-phosphateに代謝される。

G. *B. longum*の増殖に及ぼすL-arabinoseを含む多糖やHRGPの効果

2011年に福田ら(21)は、fructoseに対する高い取り込み能力を有する*B. longum*が酢酸を多量に産生し、その酢酸により腸粘膜上皮の抵抗力が増強され、マウスを腸管出血性大腸菌O157:H7による感染死から守っていることを報告した。ビフィズス菌はビフィズス経路と呼ばれる特有の代謝経路を用いて、glucoseやfructoseをD-xylulose-5-phosphateを経て乳酸と酢酸に分解している。ヒトに消化吸収されるこれらの糖質と異なり、L-arabinoseは難吸収性の糖質であり(33)、吸収されてもヒトではほとんど代謝されることはない(34)。このため、その大部分は腸内細菌によって利用されていると考えられる。*B. longum*のL-arabinoseに対する資化性は数多く報告されている(12, 35–37)。*B. longum* JCM 1217は、 α -L-arabinofuranosidaseと予想される11遺伝子のGH43と4遺伝子のGH51をコードしている。さらにこの株は、 β -L-arabinofuranosidaseと予想されるDUF1680ファミリーを4遺伝子コードしている。このため、*B. longum*は、 α -Arafだけでなく β -Araf結合を切断する様々な酵素を使うことで、植物多糖やHRGPからL-arabinoseを獲得していると考えられる。実際に、ビフィズス菌29種の中で*B. longum*だけがII型arabinogalactanやAGPが含まれるアラビアガムを資化することができる(11)。大腸における優勢菌種の一つである*B. longum*は、植物多糖やHRGPを分解代謝することにより酢酸を放出し、大腸の健全性の保持に貢献していると考えられる。

H. 展 望

各種ビフィズス菌の中でも特に*B. longum*はL-arabinoseを含有する植物多糖やHRGPを分解代謝する高い能力を有している。HRGPの主要なメンバーの一つであるAGPの資化

will be required for the fermentation of AGP, which is a major member of HRGPs. However, these enzymes are not clearly identified in *B. longum*. In our future studies, we plan to analyze degradative enzymes for AGP and clarify the importance of HRGPs, which act as prebiotics glycoproteins for *B. longum*.

Acknowledgments

We thank the collaborators for their help in measuring the NMR spectra and providing the substrates. This work was supported in part by JSPS KAKENHI Grant Number 22780094.

のためには多くの分解酵素が必要と考えられる。しかし、*B. longum* が生産する AGP 酵素群は明らかになっていない。今後は、 β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群に加えて AGP 分解酵素群の解析を行うことで、*B. longum* を選択的に増やすプレバイオティクス糖タンパク質である HRGP の重要性を明らかにしたいと考えている。

謝 辞

NMR 解析のサポートや基質の提供をして頂きました共同研究者の皆様に感謝致します。本稿記載の研究の一部は JSPS 科研費 22780094 の助成により実施しました。

References

- Kosugi, A., Murashima, K., and Doi, R. H. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 6859–6865.
- Ichinose, H., Fujimoto, Z., Honda, M., Harazono, K., Nishimoto, Y., Uzura, A., and Kaneko, S. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 25097–25106.
- Showalter, A. M. (1993) *Plant Cell* **5**, 9–23.
- Kieliszewski, M. J., and Lamport, D. T. A. (1994) *Plant J.* **5**, 157–172.
- Oguri, S., Amano, K., Nakashita, H., Nagata, Y., and Momonoki, Y. S. (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 2640–2650.
- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Rougé, P., and Peumans, W. J. (2004) *Plant J.* **37**, 34–45.
- Lamport, D. T. A., and Miller, D. H. (1971) *Plant Physiol.* **48**, 454–456.
- Akiyama, Y., Mori, M., and Kato, K. (1980) *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2487–2489.
- Ashford, D., Desai, N. N., Allen, A. K., Neuberger, A., O'Neill, M. A., and Selvendran, R. R. (1982) *Biochem. J.* **201**, 199–208.
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., and Arigoni, F. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14422–14427.
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., and Biavati, B. (1994) *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 199–210.
- Suzuki, Y., Tanaka, K., Amano, T., Asakura, T., and Muramatsu, N. (2004) *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* **73**, 574–579.
- Van Laere, K. M., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A., and Voragen, A. G. (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1644–1652.
- Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., Katayama, T., Hiratake, J., Sakata, K., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 37415–37422.
- Komatsuzawa, H., Ohta, K., Sugai, M., Fujiwara, T., Glanzmann, P., Berger Bachi, B., and Suginaka, H. (2000) *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 421–431.
- Fujita, K., Sakamoto, S., Ono, Y., Wakao, M., Suda, Y., Kitahara, K., and Suganuma, T. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 5143–5150.
- Ciopruga, J., Angstrom, J., Bergstrom, J., Larsson, T., Karlsson, N., Motas, C., Gozia, O., and Teneberg, S. (2000) *J. Biochem.* **128**, 855–867.
- Magliano, T. M. A., and Casal, J. J. (1998) *J. Exp. Bot.* **49**, 1491–1499.
- Bollig, K., Lamshöft, M., Schweimer, K., Marner, F. J., Budzikiewicz, H., and Waffenschmidt, S. (2007) *Carbohydr. Res.* **342**, 2557–2566.
- Velasquez, S. M., Ricardi, M. M., Dorosz, J. G., Fernandez, P. V., Nadra, A. D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancea, M., Verli, H., Pauly, M., Bacic, A., Olsen, C. E., Ulvskov, P., Petersen, B. L., Somerville, C., Iusem, N. D., and Estevez, J. M. (2011) *Science* **332**, 1401–1403.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., and Ohno, H. (2011) *Nature* **469**, 543–547.
- Fujita, K., Takashi, Y., Obuchi, E., Kitahara, K., and Suganuma, T. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 38079–38085.
- Brecker, L., Wicklein, D., Moll, H., Fuchs, E. C., Becker, W. M., and Petersen, A. (2005) *Carbohydr. Res.* **340**, 657–663.
- Mohnen, D. (2008) *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 266–277.
- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., and Doco, T. (2003) *Biochimie* **85**, 109–121.
- Whitcombe, A. J., O'Neill, M. A., Steffan, W., Albersheim, P., and Darvill, A. G. (1995) *Carbohydr. Res.* **271**, 15–29.
- Cardoso, S. M., Silva, A. M., and Coimbra, M. A. (2002) *Carbohydr. Res.* **337**, 917–924.
- Cao, W., Li, X. Q., Liu, L., Yang, T. H., Li, C., Fan, H. T., Jia, M., Lu, Z. G., and Mei, Q. B. (2006) *Carbohydr. Polym.* **66**, 149–159.
- York, W. S., Kumar Kolli, V. S., Orlando, R., Albersheim, P., and Darvill, A. G. (1996) *Carbohydr. Res.* **285**, 99–128.
- Konishi, M., Yang, X., Li, B., Fairchild, C. R., and Shimizu, Y. (2004) *J. Nat. Prod.* **67**, 1309–1313.
- Souto, M. L., Fernández, J. J., Franco, J. M., Paz, B., Gil, L. V., and Norte, M. (2005) *J. Nat. Prod.* **68**, 420–422.
- Kieliszewski, M. J., Showalter, A. M., and Leykam, J. F. (1994) *Plant J.* **5**, 849–861.
- Schutte, J. B., de Jong, J., van Weerden, E. J., and Tamminga, S. (1992) *Br. J. Nutr.* **68**, 195–207.
- Segal, S., and Foley, J. B. (1959) *J. Clin. Invest.* **38**, 407–413.
- Biavati, B., Scardovi, V., and Moore, W. E. C. (1982) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 358–373.
- Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M., and Benno, Y. (2002) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1945–1951.
- Roy, D., and Ward, P. (1990) *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 739–749.

Profile of the Authors

Kiyotaka Fujita is an Assistant Professor at the Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University in Japan. He graduated from the Faculty of Agriculture, Kagawa University and received his Ph. D. from the United Graduate School of Agricultural Sciences, Ehime University in 2001. His research interests are elucidation of the glycosidases for the degradation of plant polysaccharides and HRGPs from intestinal bacteria.

Kanefumi Kitahara is an Associate Professor at Faculty of Agriculture, Department of Biochemical Science and Technology, Kagoshima University in Japan. He graduated from the Graduate School of Agriculture, Kagoshima University and received his Ph.D. in an area of food science and technology from Kyushu University in 1997. His research interests focus on applied chemistry of carbohydrate resources, especially starch and cell wall polysaccharides from root crops.

Toshihiko Sukanuma is Professor at the Faculty of Agriculture and Dean of the United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University. He graduated from the Faculty of Agriculture, Kyoto University in 1972, and obtained a Doctor's degree in Agriculture from the same university in 1978 (Prof. Keitaro Hiromi). His specialty is enzymatic chemistry and biotechnology of starch and plant cell wall degrading enzymes.