ビフィズス菌の β ガラクトシダーゼの基質特異性の多様性：
腸内生育環境での β -ガラクトシド代謝の理解に向けて

Viborg Alexander Holm

東京大学大学院農学生命科学研究科
FAX: +81-03-5841-5151, E-mail: ahv@ahv.dk

(受付日: 2015年1月8日, 受理日: 2015年1月30日)

キーワード: GH42, 糖鎖の利用, 腸内細菌, 代謝特性, 基質特異性

要 約

Bifidobacterium 属には健康促進効果のある腸内細菌が含まれており、それらは食品または宿主であるヒトに由来する β -ガラクトシドを好んで代謝する。腸内環境における β -ガラクトシド代謝をより深く理解するために、ヒト腸管由来のビフィズス菌が持つ糖質加水分解酵素ファミリー42 (GH42) の β -ガラクトシダーゼを対象として、バイオインフォマティクス、生化学、構造生物学的手法による研究を行った。GH42 β -ガラクトシダーゼは、腸内に存在する β -ガラクトシドの多様性と複雑性に依拠して、非常に多様な基質特異性を示す。このような多様性はGH42 β -ガラクトシダーゼの分子系統樹からも明らかであり、そこでは機能に応じて分岐が起きている。我々はGH42で初めて機能と構造を対応させた解析を行い、それらの基質特異性の多様性は活性中心の近くのループ領域のわずかな違いにより獲得されていることを明らかにした。一つのビフィズス菌株の中には多様な基質特異性を持つ複数のGH42 β -ガラクトシダーゼが存在し、菌種によってそのパターンは大きく異なることから、ビフィズス菌にとって β -ガラクトシド代謝の多様性が重要なことがわかる。

A. はじめに

ヒト消化管の複雑な微生物群は「腸内細菌叢」と呼ばれ、ヒトの健康における重要性が強く認識されつつある(1)。腸内細菌叢の変化と進化において、糖鎖の代謝は重要な因子である(2)。 β -ガラクトシドを含む難分解性の糖鎖(3)は、ヒトの母乳(4)、腸管上皮細胞を覆うムチン糖タンパク質(5)、牛乳(6)、野菜、果実、穀物などの植物由来の食品(7, 8)に豊富に含まれており、特に興味深い。さまざまな形の β -ガラクトシドが豊富に存在するのに対応して、腸内細菌はそれに適した代謝を持つと考えられ、そのことは腸内細菌が特定の糖鎖にチューニングされた酵素群を持つことからわかる(9)。

優勢な腸内共生細菌である *Bacteroides* 属(10) はゲノム中に多糖の利用に関する単一の遺伝子座を持ち、食品中のキシログルカンのような β -ガラクトシドを含む多糖を特異的かつ完全に代謝する能力がある(11, 12)。より短い β -ガラクトオリゴ糖には、もともと遊離のオリゴ糖として存在するものもあるが、上記のような多糖分解能を持つ微生物（一次分解者）の菌体外酵素により切断された状態で二次分解者に提供される経路もあると考えられる。 β -ガラクトオリゴ糖は代表的な善玉菌であるビフィズス菌により好んで発酵・代謝されることが示されている(13)。

ヒト腸内に棲息するビフィズス菌種の代謝はその環境に適応している。例えば、*B. longum* subsp. *infantis* はヒト母乳オリゴ糖 (HMO) の分解のスペシャリストであり(14)、*B. bifidum* は、ヒト腸管上皮細胞を覆っている糖タンパク質で

あるムチンに由来するオリゴ糖を利用するように進化してきた唯一のビフィズス菌である(15)。

β -ガラクトシド代謝は、主にCAZyデータベースで糖質加水分解酵素ファミリー42 (GH42) に分類されている β -ガラクトシダーゼが担っている(16)。近年、*B. longum* subsp. *infantis* のGH42 β -ガラクトシダーゼ (Bga42A) がHMOのラクト-N-テトラオース (LNT) の加水分解と利用における鍵酵素であることが発見され(17)、その菌の代謝の特性(14)によく対応していることが明らかになった。それに加えて、いくつかのビフィズス菌由来の酵素で生化学的解析がなされている(18, 19)。一方、我々が研究を開始した時点では、GH42 β -ガラクトシダーゼの立体構造は、極限環境細菌である *Thermus thermophilus*(20) と *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*(21) の酵素で報告されていたが、これらの詳細な機能解析はなされていない。

つまり、GH42に関する機能と構造の研究はいくつか散見されるが、GH42の基質特異性の進化について、分子レベルで代謝の特異性を説明できるような知見はなかった。そこで我々はヒト腸管に棲息するビフィズス菌のGH42 β -ガラクトシダーゼを対象に、バイオインフォマティクス、生化学、構造生物学的手法による研究を行うことにした。

B. 多様な基質特異性を持つビフィズス菌のGH42は、分子系統樹において、その機能に応じて分かれる

B. animalis subsp. *lactis* と *B. longum* subsp. *infantis* 由来のい

くつかのGH42 β -ガラクトシダーゼについて組換え酵素を発現、精製して基質特異性を調べた。

B. longum subsp. *infantis* は3種類のGH42 β -ガラクトシダーゼを持っており、そのうちの一つ (Bga42A) は上述の通り LNT の加水分解に関わっている (17)。一方、残りの二つ (Bga42B と Bga42C) はそれとはアミノ酸配列が大きく異なるが、我々の研究により、Bga42B と Bga42C はそれぞれ牛乳とアラビノガラクトタンに由来する β -ガラクトシドの利用に関わっていることがわかった (22)。この菌が離乳後も腸内細菌叢に存在することは、この結果によって説明できる。

また、*B. bifidum* は、上記の Bga42A と非常によく似た GH42 β -ガラクトシダーゼ (*BbgII*) を持っており、これはバ

イオインフォマティクス解析によりムチン由来の β -ガラクトシドの利用に関わることが示唆された (23)。

一方、プロバイオティクスとして広く利用されている *B. animalis* subsp. *lactis* BI-04 は、上記の Bga42A や *BbgII* とよく似た GH42 β -ガラクトシダーゼ (*BIGal42A*) を持っている。しかし、我々がその基質特異性を調べた結果、*BIGal42A* は、HMO やムチンとは全く違うが構造的には似ている β -ガラクトシドである、植物のアラビノガラクトタンタンパク質を基質とすることがわかった (23)。

CAZy データベース (16) の中からビフィズス菌が持つすべての配列と立体構造が決定されているもの (20, 21, 23) を選んで、GH42 の分子系統樹解析を行った結果 (図1)、こ

図1. ビフィズス菌および構造既知のGH42 β -ガラクトシダーゼの分子系統樹。構造既知もしくは性質が明らかになっているものにマークした。白丸：構造決定されているもの。黒枠の四角：機能解析されているもの。灰色枠の四角：機能が推定されているが実験で検証されていないもの。灰色枠の五角形：機能も構造も明らかになっていないもの。グループ番号は文献22による。

表1. ビフィズス菌由来GH42 β -ガラクトシダーゼの、天然基質もしくは最適な基質に対する加水分解の触媒効率の比較。

Organism	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>		
Enzyme	<i>BIGal42A</i>	<i>BIGal42B</i>	<i>BbgII</i>	Bga42A	Bga42B	Bga42C
Phylogenetic group	3	1	3	3	2	4
Oligosaccharide	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)					
Gal β 1-6Gal	74	— ^d	56	407	—	—
Gal β 1-3GalNAc ^a	—	—	—	—	—	—
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Lac ^b	—	—	—	238	—	—
Gal β 1-4Lac ^b	—	—	—	37	2098	118
L-Araf-branchd Gal β 1-4Gal ^c	—	—	—	—	—	—
Lac ^b	—	—	—	—	—	—

—：未決定。灰色：該当酵素に対する天然基質もしくは最適な基質。^a文献23で示唆された天然に存在する β -ガラクトシド。^bLac：ラクトース (Gal β 1-4Glc)。^c文献22で示唆された天然に存在する β -ガラクトシド。^d未検出 ($10 \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ 以下)。この表には、文献17, 19, 22, 23のデータを含む。

これらの酵素は由来生物の分類と酵素の機能に対応して分岐していることがわかった (表1)。また、グループ3と4 (グループ番号は文献22による) はいずれも機能と構造がある程度わかっているが、グループ2は機能解析しかなされておらず、一方グループ1は機能も構造もはっきりしないことがわかった。

C. 多様な基質特異性はループ領域のわずかな違いに対応している

GH42 β -ガラクトシダーゼがどのようにして多様な基質特異性を獲得したのかを分子レベルで理解するために、X線結晶構造解析を行った。

その結果、*B. animalis* subsp. *lactis* Bl-04 由来の *B*Gal42A とガラクトースの複合体の結晶構造を決定することに成功した (図2)。これはGH42 β -ガラクトシダーゼとしては構造と機能の関係を初めて明らかにした例であり、基質特異性の多様性は、活性中心の近くのループ領域のわずかな違いにより獲得されていることが明らかになった (23)。ループ領域 (330–340 付近) でのわずかなアミノ酸配列の違いが、サブサイト+1において芳香環を持つ残基によるスタッキング相互作用などの重要な構造的特徴を担っており、これによってグループ3の中での基質特異性の違いを説明することができる (図2Aと2B)。さらに、もう一つのループ (220 付近) が活性部位の近くにあり、そのアミノ酸配列は分子系統樹のグループと基質特異性に対応している。これは、GH42 β -ガラ

クトシダーゼの基質特異性の特徴を端的に示すよい目印である (図2Bと2C)。

D. おわりに

詳細な基質特異性の解析と分子レベルでの知見、そして分子系統樹解析により、生理的に重要な微生物であるビフィズス菌の β -ガラクトシド代謝の違いについて理解を深めることができた。

GH42 β -ガラクトシダーゼの間に基質特異性の違いが存在するという事実は、ビフィズス菌のいくつかの種では β -ガラクトシドの異性体に特異的な分解パターンを示すという観察結果 (24) に合致している。将来的には、特定のグループの善玉菌をターゲットとして、プロバイオティクスおよびプレバイオティクスを組み合わせるような技術への道が開けるだろう。さらに、 β -ガラクトシダーゼの基質特異性と立体構造の特徴の関係を理解することにより、さまざまな β -ガラクトシドに対して異なる代謝を持つ腸内細菌の組成をコントロールできるようになるかも知れない。

謝 辞

著者は日本学術振興会の外国人特別研究員として援助を受けています。研究に関する有用な助言によって私の研究に大いに貢献して下さい、本稿を和訳して頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科の伏信進矢教授に深く感謝いたします。また、素晴らしい共同研究と研究に関する助言を頂きま

図2. GH42 β -ガラクトシダーゼの分子構造。(A) 分子系統樹のグループ3に属し異なる β -ガラクトシドに特異性を持つ酵素の、Gln325–Gly342 ループにおけるアミノ酸配列アラインメント：Bga42AはLNT (Gal β 1–3GlcNAc β 1–3Gal β 1–4Glc) を加水分解する。BbgIIはcore I (Gal β 1–3GalNAc) を基質とする。B1Gal42Aは β 1–6/ β 1–3ガラクトシドを好む (表1)。(B) B1Gal42Aの単量体 (A鎖) と、隣の単量体のドメインAのVal220–Asn225ループ。いずれもグループ3内での保存性で色分けしている (青0%–赤100%)。(C) GH42 β -ガラクトシダーゼで保存性の低いPro217–Asn228ループのアミノ酸配列アラインメント。本図は文献23より改変した。

した、デンマーク工科大学システム生物学専攻のピアテ・スベンソン教授とマハー・アブー・ハキーム准教授、農研機構・食品総合研究所の北岡本光博士、コペンハーゲン大学生

化学専攻のレイラ・ロ・レッジョ博士、京都大学の片山高嶺教授に深く感謝いたします。

参考文献

1. Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012) *Science* **336**, 1262–1267.
2. Koropatkin, N., Cameron, E., and Martens, E. (2012) *Natl. Rev.* **10**, 323–335.
3. Cantarel, B. L., Lombard, V., and Henrissat, B. (2012) *PLoS ONE* **7**, e28742.
4. Han, N. S., Kim, T.-J., Park, Y.-C., Kim, J., and Seo, J.-H. (2012) *Biotechnol. Adv.* **30**, 1268–1278.
5. Jensen, P. H., Kolarich, D., and Packer, N. H. (2010) *FEBS J.* **277**, 81–94.
6. Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T., and Messer, M. (2001) *Glycoconj. J.* **18**, 357–371.
7. Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and Mohnen, D. (2001) *Phytochemistry* **57**, 929–967.
8. Vincken, J., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., and Visser, R. G. F. (2003) *Plant Physiol.* **132**, 1781–1789.
9. El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., and Henrissat, B. (2013) *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 497–504.
10. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. L., Batto, J., Bertalan, M., Borrue, N., and Casellas, F. (2011) *Nature* **473**, 174–180.
11. Martens, E. C., Koropatkin, N. M., Smith, T. J., and Gordon, J. I. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 24673–24677.
12. Larsbrink, J., Rogers, T., Hemsworth, G., McKee, L. S., Tauzin, A. S., Spadiut, O., Klintner, S., Pudlo, N. A., Urs, K., Koropatkin, N. M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Kelly, A. G., Cederholm, S. N., Davies, G. J., Martens, E. C., and Brumer, H. (2014) *Nature* **506**, 498–502.
13. Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D. (2011) *Genes Nutr.* **6**, 285–306.
14. Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M., and Mills, D. A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 18964–18969.
15. Turroni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J.-H., Zomer, A., Sánchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G. F., Mills, D., Margolles, A., Kelly, D., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19514–19519.
16. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014) *Nucleic Acids Res.* **42**(D1), D490–D495.
17. Yoshida, E., Sakurama, H., Kiyohara, M., Nakajima, M., Kitaoka, M., Ashida, H., Hirose, J., Katayama, T., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (2012) *Glycobiology* **22**, 361–368.
18. Hinz, S. W. A., van den Brock, L. A. M., Beldman, G., Vincken, J.-P., and Voragen, A. G. J. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 276–284.
19. Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., and Gibson, G. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 1079–1088.
20. Hidaka, M., Fushinobu, S., Ohtsu, N., Motoshima, H., Matsuzawa, H., Shoun, H., and Wakagi, T. (2002) *J. Mol. Biol.* **322**, 79–91.
21. Maksimainen, M., Paavilainen, S., Hakulinen, N., and Rouvinen, J. (2012) *FEBS J.* **279**, 1788–1798.
22. Viborg, A. H., Katayama, T., Abou Hachem, M., Andersen, M. C., Nishimoto, M., Clausen, M. H., Urashima, T., Svensson, B., and Kitaoka, M. (2014) *Glycobiology* **24**, 208–216.
23. Viborg, A. H., Fredslund, F., Katayama, T., Nielsen, S. K., Svensson, B., Kitaoka, M., Lo Leggio, L., and Abou Hachem, M. (2014) *Mol. Microbiol.* **94**, 1024–1040.
24. Peacock, K. S., Ruhaak, L. R., Tsui, M. K., Mills, D. A., and Lebrilla, C. B. (2013) *J. Agric. Food Chem.* **61**, 12612–12619.

著者情報

アレクサンダー・ホルム・ヴィボー：ピアテ・スベンソン教授とマハー・アブー・ハキーム准教授（デンマーク工科大学システム生物学）の指導の元、2014年にデンマーク工科大学で博士号（生化学）を取得。現在は東京大学大学院農学生命科学研究科の伏信進矢教授のグループでポストドクトラルフェロー。学術振興会の外国人特別研究員（欧米短期1年、2014年～）に引き続き外国人特別研究員（2年、2015年～）を受け、GH42の糖質関連酵素の詳細な構造機能相関を研究している。CAZy データベースより容易にデータを取得できる web ツール「CAZy tools」(<http://www.ahv.dk.org>) の開発者でもある。