

ビフィズス菌が有する
アラビノガラクタン-プロテイン分解酵素
の機能解析および代謝機構に関する研究

(Studies on the glycosidases and the assimilative mechanisms of
arabinogalactan-protein on bifidobacteria)

佐々木 優紀

2022 年

目次

第一章 序論.....	1
第二章 <i>Bifidobacterium longum</i> JCM7052 由来新規 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase と菌体内酵素 α -D-galactosidase の酵素学的特性.....	6
第一節 序言.....	6
第二節 実験方法.....	7
第三節 結果.....	20
2-3-1. 菌体表層局在型酵素 GH39 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase のクローニングならびに機能解析.....	20
2-3-2. 菌体内酵素 GH36 α -D-galactosidase のクローニングならびに機能解析.....	49
第四節 考察.....	65
第三章 α 1,4-Araf に作用する α -L-arabinofuranosidase の酵素学的特性と菌体表層酵素の協調作用によるアラビアガム AGP の分解機構.....	71
第一節 序言.....	71
第二節 実験方法.....	73
第三節 結果.....	79
第四節 考察.....	104
第四章 <i>Bi. adolescentis</i> 由来の GH36 β -L-arabinopyranosidase の機能解析.....	109
第一節 序言.....	109
第二節 実験方法.....	111
第三節 結果.....	115
第四節 考察.....	128
第五章 結論.....	130
参考文献.....	134
謝辞.....	145

第一章 序論

腸内細菌と宿主の健康維持や疾病予防との関連性に関する知見が増加しており、腸内細菌叢のバランスは免疫系や代謝系、精神状態にまで影響を与えることが報告されている(1)。ヒトの腸内細菌を構成する菌種としては、主に Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria の4門に属する菌種がほとんどを占めており、Firmicutes 門の *Clostridium* 属、*Eubacterium* 属、*Ruminococcus* 属、*Roseburia* 属、*Blautia* 属、*Dorea* 属、*Faecalibacterium* 属、*Coprococcus* 属、Bacteroidetes 門の、*Bacteroides* 属、*Prevotella* 属、*Parabacteroides* 属、*Alistipes* 属、Actinobacteria の *Bifidobacterium* 属、Proteobacteria 門の *Escherichia* 属などが主な構成菌種として知られている(2)。ビフィズス菌 (*Bifidobacterium* 属細菌) は、ヒトの腸内細菌の主要な構成細菌群の一つであり、「宿主の腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主に良い効果をもたらす生きて微生物を含む食品添加物」と定義されるプロバイオティクスとしてヨーグルトやサプリメントとして広く利用されている。ヒトの腸内では、*Bifidobacterium* 属細菌の優占種が宿主の年齢によって異なり(3, 4)、乳児の腸内では *Bifidobacterium breve*、*Bi. longum* subsp. *infantis*、*B. bifidum* が主に検出されるのに対し、成人の腸内では *Bi. adolescentis*、*Bi. catenulatum*、*Bi. pseudocatenulatum* が検出される。一方、*Bi. longum* subsp. *longum* (*Bi. longum*) は、乳児期から成人期までの幅広い年齢層から検出されている(5)。このような年齢による腸内細菌の分布の違いは、食事の主な栄養源の変化(6, 7)、宿主の免疫系の機能低下、宿主の粘膜の組成の違い(8, 9)などの環境要因によって生じると考えられている。

多様な菌種で構成される腸内細菌叢の個人差は、菌種組成で見ると大きな差があるものの、各細菌種が所持する遺伝子機能で見ると比較的小さいと報告されている(10)。このこ

とは、細菌種の持つ遺伝子機能が腸内細菌叢形成における大きな選択圧になっていることを示唆しており(1)、腸内細菌を理解する上で、それらの遺伝子機能に着目することが不可欠であることを示している。腸内細菌のメタゲノム解析によると、腸内細菌は、他の環境から単離された細菌と比較して COG (Clusters of Orthologous Groups) 分類に基づく「炭水化物の代謝と輸送」を担う遺伝子の割合が高く(11)、腸内環境で宿主の食餌由来のミルクオリゴ糖や未分解多糖類、宿主の粘膜多糖成分を主な栄養源とするために適応進化をしてきたことが窺える。さらに、乳児と成人の腸内マイクロバイオームの比較では、それぞれのライフステージでの主要栄養源に応じた炭水化物代謝遺伝子の特徴的に持っていることから、細菌のヒトの腸内で生存する能力は、食事や宿主由来の糖質分解に関わる糖質関連酵素の存在と関連していることが明らかになってきた(11-15)。

成人では、野菜や穀物、果物、海藻類などから、植物細胞壁など多種多様な難消化性糖質を摂取している。植物細胞壁は主にセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどから構成されており、それらを資化するために腸内細菌種は糖質加水分解酵素 (GH; Glycoside Hydrolase) や多糖リアーゼ (PL; Polysaccharide Lyase)を用いて、それらの糖質を分解・資化している。中でも *Bacteroides* 属細菌、*Prevotella* 属細菌、*Roseburia* 属細菌、*Bifidobacterium* 属細菌は腸内細菌の中で主要な分解者であり(16)、それぞれの細菌種が異なる利用戦略を用いてニッチ(生態的地位)を獲得している。それらの分解代謝産物として菌体外に産生される酢酸、酪酸、プロピオン酸、乳酸などの短鎖脂肪酸 (SCFA) は上皮細胞のエネルギー源として利用されるだけでなく、宿主の抹消組織にて免疫寛容を行う制御性 T 細胞の分化誘導(17)や、免疫グロブリン A (IgA) の機能制御を担っており(18)、宿主の免疫系においても有益な役割を担っていることが分かっている。そのため、これら細菌種の多糖分解機構を明らかにすることは宿主の健康増進、疾病予防にも貢献すると考えられる。近年、

Bacteroides 属細菌において多糖分解を担う多糖利用遺伝子座 (PUL; Polysaccharide Utilization Loci)の各酵素の性質決定が進み、植物多糖においては、フルクタン(19-21)、キシラン(22)、デンプン(23)、II型アラビノガラクトタン(24)、ペクチン(25, 26)、アガロース(27)など多くの分解機構が明らかになってきた。また、*Bifidobacterium* 属細菌は、パンゲノムの 13%以上が COG 分類の「炭水化物の代謝と輸送」を担う遺伝子であり、様々な多糖や糖タンパク質の代謝に関連すると考えられている(28)。これまでに、キシラン(29)や、II型アラビノガラクトタン(30)、アラビナン(31)などの植物多糖の分解機構が明らかになってきた。*Bi. longum* JCM1217 は、25 の GH ファミリーに属する 61 個の糖質加水分解酵素を保有しており、それらは糖質関連酵素データベース (CAZy; Carbohydrate-Active enZymes) (<http://www.cazy.org>) に登録されている。このうち菌体外で作用する酵素に着目すると、それらの酵素は、II型アラビノガラクトタン(30)、エクステンシン(32, 33)、アラビノキシラン(34)、ミルクオリゴ糖(35)、ムチン(36)、アラビナン(31)の分解に関わっていることが明らかにされてきた。このことから、*Bi. longum* は多様な糖源の利用に適応していることが分かってきた。しかし、*Bi. longum* は遺伝子重複や水平伝播によって多様な糖源を利用できる能力を獲得していると考えられているため(28)、菌株によって保有している糖質加水分解酵素に多様性が見られる。このような違いを利用して、資化性に関わる遺伝子を探索する Gene Trait Matching (GTM) 法による遺伝子探索も行われている(15)。本論文の第二章も GTM 法により、II型アラビノガラクトタン構造を持つアラビアガム資化性と非資化性菌の比較ゲノム解析を行うことで、アラビアガム資化性に関わる遺伝子の探索を試みている。

さらに、それら共生細菌同士が協調して分解を行う、クロスフィーディングも近年多く報告されるようになり(37-39)、腸内細菌の複合的な機能が個々の糖質加水分解機構の解明に伴って明らかにされつつある。例えば、*Ba. ovatus* の endo-xylanase はアラビノキシランに

作用してキシロオリゴ糖を生成し、その後 *Bi. adolescentis* ATCC15703 がキシロオリゴ糖を利用して生育している(22)。カラマツ AGP においては、*Ba. cellulosityticus* の endo- β 1,3-galactanase が作用して β 1,3-ガラクトオリゴ糖を生成し、その後 *Bi. breve* UCC2003 が資化するクロスフィーディングを示した (40)。このように、一般的に、*Bacteroides* 属細菌が高分子の多糖類を菌体外で切り出し、低分子化したオリゴ糖を *Bifidobacterium* 属細菌等が利用できるようになる例が多く見られる。

本論文では、植物細胞壁の構成成分の一つであるアラビノガラクトタン-プロテイン(AGP; Arabinogalactan-Protein) に着目している。AGP は、被子植物、裸子植物、コケ植物、藻類などの植物に広く分布しており(41, 42)、エクステンシンと共に、ヒドロキシプロリンが豊富な糖タンパク質 (HRGP; Hydroxyproline-Rich GlycoProteins) に分類される。細胞間認識物質として働き、植物の分化や成長など様々な生理機能に重要な役割を果たしている(43)。AGP の糖鎖構造は、構造の違いから I 型 AG と II 型 AG に分けられる。I 型 AG は主鎖に β 1,4-ガラクトタン骨格を持ち、ペクチンを構成するラムノガラクトツロナン-I の側鎖に見られる。II 型 AG は、主鎖に β 1,3-ガラクトタン骨格と側鎖に β 1,6-ガラクトタン鎖が分岐した構造をとり、植物種によって側鎖に L-アラビノース、L-ラムノース、L-フコース、D-グルクロン酸などの修飾糖が付加し、多様な構造を生んでいる。AGP は細胞壁の構成成分としてはわずかな存在量であるが、マメ科アカシア属の樹木 (*Acacia senegal* (L.) Willdenow) の傷口から得られるガム滲出物は、セネガル種のアラビアガムと呼ばれ、II 型 AG や AGP が構造の主成分となっている。アラビアガムは、L-アラビノフラノース、L-アラビノピラノース、L-ラムノース、L-フコース、グルクロン酸、4-O-メチルグルクロン酸などの修飾糖が付加し、非常に分岐に富んだ構造をとっている(44, 45)。アラビアガムは、優れた乳化特性により、乳化剤や安定剤として用いられる(46)他、ビフィズス菌増殖効果が報告され(47)、プレバイ

オティクスとしても利用されている。ビフィズス菌によるII型AGの資化性については、筆者のグループにより、比較的単純な構造のカラマツ由来II型AG(48)の*Bi. longum* JCM1217における分解機構が明らかにされている(30, 49)。しかしながら、これらの分解酵素群は複雑な分岐構造を持つアラビアガムAGPに対しては作用せず、アラビアガムAGPのビフィズス菌増殖機構は不明であった。

このような背景の中、本研究は「ビフィズス菌が有するアラビノガラクトサン-プロテイン(AGP)分解酵素の機能解析および代謝機構の解明」を目的とし、関連酵素の探索を行った。まず、第二章では、*Bi. longum*のアラビアガムAGP資化に関わる新規糖質加水分解酵素の探索を目的とし、アラビアガム資化性菌と非資化性菌の比較ゲノム解析を行った。その結果、新規糖質加水分解酵素GH39 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase (GAfase)と菌体内酵素GH36 α -D-galactosidaseがコードされた遺伝子クラスターを新たに見出した。本章では各酵素の諸性質について記している。第三章では、GAfase作用後のアラビアガムAGPにおいてさらなる分解を行う α -L-arabinofuranosidase (BlArafE)を見出し、諸性質決定を行った。さらに、培養後の限界分解物の解析と菌体酵素活性測定を行うことで、*Bi. longum*の菌体表層で行われているアラビアガムAGPの分解機構が明らかになったとともに、*Bi. longum*の限界分解物が共生細菌である*Bacteroides*属細菌によって利用されることも見出した。第四章では、*Bi. longum*で利用できない遊離糖のうち、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araの二糖に対して高い基質特異性を示すGH36 β -L-arabinopyranosidaseを*Bi. adolescentis*において見出した。以上のように、本研究では、アラビアガムAGP資化機構に関わる代謝関連酵素の機能解析によって*Bi. longum*の増殖機構の解明に成功するとともに、アラビアガムAGPが腸内環境に共存する微生物の協同作用によって利用される共生関係の存在を明らかにした。

第二章 *Bifidobacterium longum* JCM7052 由来新規 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase と菌体内酵素 α -D-galactosidase の酵素学的特性

第一節 序言

アラビアガム AGP は、ヒトの微生物生態系シミュレーターを用いた研究(50, 51)およびヒトを対象とした *in vivo* 実験(47)では、下行結腸においてビフィズス菌を増加させることが報告されている。特に、分離した *Bifidobacterium* 属細菌を用いた *in vitro* の資化性試験では、特定の *Bi. longum* 菌株と *Bi. adolescentis* 菌株がアラビアガム AGP により増殖することが明らかになっており(52, 53)、*Bi. longum* JCM7052 および JCM7053 はアラビアガム AGP を資化する能力を有することが認められている(54)。しかし、アラビアガム AGP の分解に関与する重要な糖質関連酵素は未だに明らかにされていなかった。

これまでの研究で、アラビアガムと同様に II 型 AG 構造を有するカラマツ AGP に対して作用する酵素を *Bi. longum* JCM1217 から見出した(30, 49)。カラマツ AGP は、菌体表層局在の GH43 サブファミリー 24 (GH43_24) *exo*- β -1,3-galactanase (B11,3Gal)、GH30_5 *exo*- β -1,6-galactobiohydrolase (B11,6Gal)、GH43_22 α -L-arabinofuranosidase (B1ArafA) の協調作用により分解された。しかし、より複雑な側鎖の分岐構造をもつアラビアガム AGP に対してはこれらの分解酵素群が作用しなかった。そこで、筆者はアラビアガム AGP を資化できる特定の *Bi. longum* 株に、アラビアガム AGP を分解する新規酵素が存在すると予測した。

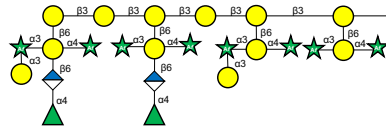
本章では、*in vitro* の資化性試験と比較ゲノム解析により、アラビアガム AGP 資化性菌株と非資化性菌株を比較し、*Bi. longum* のアラビアガム AGP 資化に重要な役割を果たす酵素の同定を試みた。

第二節 実験方法

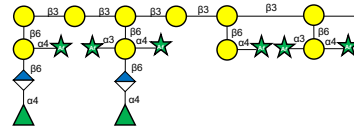
材料

Acacia senegal 由来のアラビアガムと、使用した *pNP* 基質のうち *pNP-β-L-Araf* 以外は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。*pNP-β-L-Araf*は理化学研究所の石渡氏らにより合成された(55)。カラマツ AGP は、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。シュガービートアラビナンおよび小麦アラビノキシランは、Megazyme 社 (Wicklow, Ireland) から購入した。これらの多糖類はエタノール沈殿によって、遊離の単糖や二糖、オリゴ糖を除去して使用した。B 型血液型関連オリゴ糖 (直鎖 B-2 三糖、B 型血液型三糖、B 型血液型五糖) は Dextra Laboratories 社 (Reading, UK)から入手し、アラビアガム AGP 関連オリゴ糖は次の項目で記載の方法で調製した(56)。基質として使用した糖の構造を Fig. 2-1 に示した。

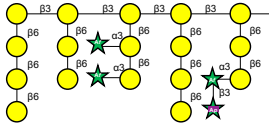
Gum arabic AGP



α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP



Larch AGP



Gum arabic AGP-related oligosaccharides

Substitution on Gal at O6	α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)-		-	
	at O4			
at O3	α -L-Araf(1 \rightarrow 4)-	-	α -L-Araf(1 \rightarrow 4)-	
α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf(1,3)- or β -L-Arap(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf(1,3)-	S5-GA 	S4-GA 	S3-GA 	S3-AA
α -L-Araf(1,3)-	S5-A 	S4-A 	S3-A 	
-	S5 	S4 	S3 	

Blood group B-related oligosaccharides

Liner B-2 trisaccharide	Blood group B trisaccharide	Blood group B pentasaccharide

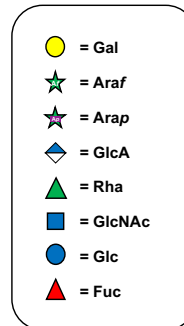


Fig. 2-1. Schematic structure of polysaccharide and oligosaccharides used in this study.

糖分析方法

a) Thin-Layer Chromatography (TLC)

Silica gel aluminum plate 60 (Merck, Darmstadt, Germany) にサンプルをスポットし、*n*-プロパノール：エタノール：水=7：1：2 (v/v/v) で展開後、オルシノール硫酸法により糖を発色させた(57)。

b) High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)

遊離の単糖、二糖、オリゴ糖の分析には、CarboPack PA-1 カラム(ϕ 4 × 250 mm; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) とパルスドアンペロメトリー検出器を用いた。カラムは 30°C に保ち、1.00 mL/min の流速で以下のようにグラジエント溶出した。0~5min: 100% 溶離液 A(100 mM NaOH)、5~30min: 100%→0% 溶離液 A、0%→100% 溶離液 B (500 mM CH₃COONa in 100 mM NaOH)、30~35 min: 100% 溶離液 B、35~45 min: 100% 溶離液 A。

単糖の組成は CarboPack PA-10 カラム (ϕ 4 × 250 mm; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて、18 mM NaOH により 1.0 mL/min の流速でアイソクラティック溶出した。

基質の調製

a) 市販アラビアガム中の遊離オリゴ糖の調製

オリゴ糖 S5-GA、S4-GA、S3-GA、S3-AA (Fig. 2-1) は、Tischer ら(56)の方法に準じて、アラビアガム試薬のエタノール沈殿法による上清から調製した。上清を乾固後、水に溶解し、水で平衡化した Bio-Gel P-2 カラム (ϕ 25 × 830 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで分離した。その後、活性炭カラム (Autoprep FiberAC, Showa Denko, Tokyo, Japan)、Cosmosil Sugar-D カラム (ϕ 4.6 × 250 mm; Nacalai Tesque

Inc., Kyoto, Japan)、Cosmosil PBr カラム (ϕ 4.6 × 250 mm; Nacalai Tesque Inc.) による高速液体クロマトグラフィーを組み合わせ、アラビアガム AGP 由来オリゴ糖を精製した。

さらに、上記の方法で調製した S5-GA、S4-GA、S3-GA に対して、GAfase と BlAga3 処理を行うことによって S5、S3、S5-A、S4-A、S3-A を得た。S5 と S3 は、0.01 mM の S5-GA または S3-GA に GAfase (0.29 μ g/mL) を 37°C で酵素反応させて調製した。S5-A、S4-A、S3-A は、0.01 mM の S5-GA、S4-GA、S3-GA に BlAga3 (8.0 μ g/mL) を 37°C で酵素反応させて調製した。反応物をグラファイトカーボン (GC) カートリッジカラム (InertSep GC column, 2 g/12 mL; GL Sciences, Tokyo, Japan) にロードして、さらなる精製と濃縮を行った。GC カートリッジカラムは、サンプルをロードする前に、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む 80% (v/v) アセトニトリル 10 mL でコンディショニングを行った後、水 8 mL で平衡化した。サンプルをロードした後、オリゴ糖を 0.5% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む 80% (v/v) アセトニトリルで溶出した。溶出液を乾固後、適量の水に溶解し、基質として使用した。

b) ヒドロキシプロリン (Hyp) 結合型アラビアガムの調製と部分酸分解

アラビアガム AGP の Hyp-AG は、既報に基づき、水酸化バリウムを用いたアルカリ処理によって調製した(32, 58)。乾燥した試料を水に溶かし、100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.8) で平衡化した Sephadex G50 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーで分離した。部分酸分解のアラビアガムは Ling ら(59)の論文に記載されている方法により調製した。

c) 菌体酵素生成物 (ピーク X) の酸分解と酵素分解

酸分解は、精製したピーク X に 2 M トリフルオロ酢酸を加え、120°C で 1 時間インキュ

ベートした後、反応混合物を室温まで冷却し、遠心濃縮機によって乾燥させた。このサンプルを2回、水で洗浄後、適量の水で溶解し、HPAEC-PADで分析した。

酵素による加水分解は、*Bi. adolescentis* 由来の GH27 α -D-galactopyranosidase/ β -L-arabinopyranosidase BAD_1525 を用いて行った。精製したピーク X および部分酸分解を用いて単離した α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中で BAD_1525 と 37°C で 16 時間インキュベートした後、反応生成物を上記のように PA-1 カラムを用いて HPAEC-PAD で分析した。

d) GAfase 糖転移物の調製

40%メタノールを含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 40 mL 中で、1%アラビアガム AGP を 0.295 μ g/mL の GAfase とともに 40°C で 16 時間インキュベートして、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の還元末端にメチル基が付加した α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe を調製した。エタノール沈殿後の上澄み液を、活性炭カラムを用いて精製した。同様に、カラマツ AGP をドナー基質として、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe も同様の手順で調製した。¹H および ¹³C NMR スペクトルは、JEOL ECX 400 spectrometer を用いて、D₂O 中、400 MHz で測定した。

培養試験

a) AGP 上での *Bi. longum* の資化性と菌体酵素活性

In vitro 資化性試験に用いた *Bi. longum* は、MCC (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Zama, Japan) 保存菌株から以下の 10 株 (*Bi. longum* MCC00055、MCC00198、MCC00215、MCC00231、MCC00256、MCC00300、MCC00316、MCC00325、MCC00328、MCC00353)

を入手した。*Bi. longum* JCM7052 および JCM1217 は、Japan Collection of Microorganisms (RIKEN Bioresource Centre, Ibaraki, Japan) から入手した。これらの菌株は、AnaeroPack システム (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) を用いて、0.05%の L-システイン塩酸塩を含む de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 培地 (MRS+cys 培地) 中で、嫌氣的条件の 37°Cで前培養した。この前培養菌体を、唯一の炭素源として 1.0%アラビアガム AGP またはカラマツ AGP を含む MRS 培地に植菌し、37°Cで 48 時間、嫌気性条件下で培養した。各培養液の濁度は 600 nm の吸光度を測定して行った。菌体酵素活性を測定するために、菌体ペレットを 5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で洗浄し、-20°Cで保存した。その後、凍結融解したペレットを 1.0%のアラビアガム AGP を含む 2.0 mL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) に再懸濁し、37°Cで 3 日間インキュベートした。その後、上清を HPAEC-PAD で分析した。

b) 遊離二糖を用いた *Bi. longum* の資化性試験

前培養した *Bi. longum* JCM1217 および JCM7052 菌体を、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara、または β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を唯一の炭素源として含む MRS+cys 培地に植菌し、培養条件は上記の AGP の資化性試験と同様とした。48 時間後に 600 nm の吸光度を測定した。さらに、48 時間培養後、培養液を遠心分離し、上清を HPAEC-PAD で分析した。

ゲノム解析とバイオインフォマティクス解析

ゲノム解析は森永乳業 (株) 基礎研究所の小田巻氏と堀米氏の協力により行った。*Bi. longum* 株のゲノム DNA は、キットのプロトコルに従って DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出し、Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、ライブラリーを作成した。ペアエンドシーケンスは、Illumina

MiSeq と MiSeq v3 Reagent Kit (Illumina Inc.) を用いて実施し、少なくとも 100 倍のカバレッジを達成した。CLC Genomics Workbench software package (v8.0; Qiagen)を用いて、コンテイング長 (最小コンテイング長=500 bp) を除くデフォルトの設定で、生のペアエンドリードのクオリティトリミングと *de novo assembly* を行った。オープンリーディングフレームは、DDBJ Fast Annotation and Submission Tool を用いてデフォルトの設定で予測し、アノテーションを行った(60).

GAfase のクローニングならびに諸性質決定

a) 発現プラスミドの構築

BLGA_00340 (GAfase) 遺伝子の PCR 増幅には、*Bi. longum* JCM7052 のゲノム DNA (GenBank Accession No.AP022379) を用いた。

フォワード (5'-AGGAGATATACCATGGAGGAGAATGCGCCAG-3') プライマー

およびリバース (5'-GTGGTGGCTCGAGACCGCTCACGGAGTCGATC-3') プライマー

は、それぞれヌクレオチド 1-16 および 2904-2922 から設計した。上記の下線は、鋳型に相補的なヌクレオチドを表す。このアンプリコンを、In-Fusion HD クローニングキット

(Clontech Laboratories Inc.社、Palo Alto, CA, USA) を用いて、pET-23d ベクター (Novagen 社、Madison, WI, USA) にクローニングした。

b) 組換えタンパクの発現と精製

得られたプラスミドを用い、*E. coli* BL21 (λ DE3) (Genlantis 社、San Diego, CA, USA) を形質転換して、Overnight Express Autoinduction System (Novagen 社) を用いて 25°C で培養した。培養物を遠心分離し、沈殿を BugBuster タンパク質抽出試薬 (Novagen) に懸濁し、

TALON metal-affinity resin (Clontech) を用いて C 末端 His タグ付き GAfase タンパク質を精製した。GAfase を含む 5 mM および 10 mM イミダゾール画分を脱塩し、限外濾過膜 (10kDa MW cut-off (MWCO) ; Millipore Co., Billerica, MA, USA) を用いて濃縮した。

c) 至適条件

酵素活性の至適 pH は、基質としてアラビアガム AGP を用い、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.5~6.0) および 50 mM MES 緩衝液 (pH5.5~7.0) を用いて、pH3.5~7.0 の間で測定した。酵素活性の至適温度は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) を用いて、30~60 °C で測定した。5% トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を停止し、サンプルを HPAEC-PAD で分析し、遊離する α -D-Galp-(1→3)-L-Ara と β -L-Arap-(1→3)-L-Ara の濃度を測定した。

d) 糖転移活性

アラビアガム AGP をドナーに、1-alkanol をアクセプターに用いて、糖転移反応を行った。アクセプターとして 30% メタノール、エタノール、1-プロパノールの存在下で、1.0% のアラビアガム AGP を、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中で 0.295 μ g/mL の GAfase と 40 °C で 2 時間インキュベートした。その後、反応生成物を TLC で分析した。

e) 基質特異性

多糖類に対する基質特異性は、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中で、基質 (1.0%) を 1.47 μ g/mL の GAfase と 40 °C の適切な反応時間でインキュベートすることで評価した。オリゴ糖に対する基質特異性を解析するために、5 μ M の S3-GA、5 μ M の S5-GA、および 10 μ M の S3-AA を、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中の 0.03

$\mu\text{g/mL}$ の GAfase と 45°C の適切な反応時間でインキュベートした。反応は $10\ \mu\text{L}$ の $5\% \text{TCA}$ を加えて終了させ、生成物は HPAEC-PAD で分析した。糖転移物に対する基質特異性を調べるために、 $0.1\ \text{mM}$ $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ および $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ を、 $0.295\ \mu\text{g/mL}$ の GAfase を $40\ \mu\text{L}$ の $50\ \text{mM}$ 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}5.5$) 中、 $45\ ^\circ\text{C}$ で適切な反応時間でインキュベートし、 $10\ \mu\text{L}$ の $5\% \text{TCA}$ を加えて反応を停止した後、生成物を HPAEC-PAD で分析した。酵素活性の $1\ \text{unit}$ は、1 分間に $1\ \mu\text{mol}$ の $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-L-Ara}$ または $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-L-Ara}$ を生成するのに必要な酵素量とした。 $p\text{NP}$ 基質への反応性は $p\text{NP-}\alpha\text{-L-Araf}$, $p\text{NP-}\alpha\text{-L-Arap}$, $p\text{NP-}\alpha\text{-D-Galp}$, $p\text{NP-}\alpha\text{-D-Xylp}$, $p\text{NP-}\alpha\text{-D-Glcp}$, $p\text{NP-}\beta\text{-L-Araf}$, $p\text{NP-}\beta\text{-L-Arap}$, $p\text{NP-}\beta\text{-D-Galp}$, $p\text{NP-}\beta\text{-D-Xylp}$, $p\text{NP-}\beta\text{-D-Glcp}$, $p\text{NP-}\beta\text{-D-GlcA}$ を用いて終濃度 $5\ \text{mM}$ の基質を $1.47\ \mu\text{g/mL}$ の GAfase と $40\ \mu\text{L}$ の $50\ \text{mM}$ 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}5.5$) 中、 37°C で 16 時間インキュベートし、遊離糖を TLC にて分析した。

f) 反応速度論的解析

$0.08125\sim 5.0\ \text{mM}$ $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ および $5.0\sim 40\ \text{mM}$ $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-L-Araf-OMe}$ を用いて GAfase の反応速度パラメーターを決定した。 $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ の場合は、 $50\ \text{mM}$ 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}4.5$) と $0.059\ \mu\text{g/mL}$ GAfase を含む $80\ \mu\text{L}$ の反応混合物を $45\ ^\circ\text{C}$ で 20 分間インキュベートし、 $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-L-Araf-OMe}$ の場合は、 $11.8\ \mu\text{g/mL}$ GAfase を用い、同様の手順で行った。 $20\ \mu\text{L}$ の $5\% \text{TCA}$ を加えて反応を終了し、生成物を HPAEC-PAD で分析した。反応生成物の濃度は、ピーク面積をもとに算出した。

g) 変異体作成

KOD-Plus 変異導入キット (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて、特定のプライマーを

用いて GAfase にアミノ酸の置換や欠失を導入した。DNA シークエンスで変異を確認した後、野生型酵素と同じ手順で変異型酵素を発現・精製した。使用したプライマーを Table 2-1 に記載している。

Table 2-1. The primers for the site-directed and deletion mutagenesis.

Name	Sequence of oligonucleotide primers
GAfase_E194Qmut_for	5'-AGCCGGATGGCGGCAACTGGTACGCT-3'
GAfase_E194Qmut_rev	5'- <u>GGTT</u> GAAACGGCATGAATACAATATTGTC-3'
GAfase_E321Qmut_for	5'- <u>CCAATTC</u> GGCGAACTGCGTGACATGTC-3'
GAfase_E321Qmut_rev	5'-GAGATGTTGATGGCACGCGGCGTGATG-3'
CΔ_Forward_Primer	5'-CTCGAGCACCACCACCACCTG-3'
CΔ355rev (37-781)	5'-CGCACGCGCGGTGGTGACACTCGCCA-3'
CΔ477rev (37-659)	5'-GGAGACCTGGTAGAGCAGCAGCTTGTC-3'
CΔ630rev (37-506)	5'-GACCTCGGCCATATCCCAGTAGATC-3'

The positions of the mutated sequences are underlined.

BlAga3 のクローニングならびに諸性質決定

a) 発現プラスミドの構築

Bi. longum JCM7052 (GenBank Accession No.AP022379) のゲノム DNA を、Fast Pure DNA Kit (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて抽出した。ゲノム DNA を鋳型とした PCR により blAga3 遺伝子を増幅した。

フォワード (5'-AGGAGATATACCATGTTTCCTTCCGTATCGGT-3') プライマー

およびリバース (5'-GTGGTGGTGCTCGAGGACTTTGACGATTTCAA-3') プライマーは、

それぞれヌクレオチド 7-23 および 2132-2148 から設計した。下線部はテンプレートに相補的なヌクレオチドを表す。その後、アンプリコンを、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech

Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いて pET-23d ベクター (Novagen, Madison, WI,

USA) にクローニングした。

b) 組換えタンパクの発現と精製

プラスミドを *E. coli* BL21 (λ DE3) (Genlantis, San Diego, CA, USA) に形質転換し、Overnight Express Autoinduction System (Novagen) を用いて 37°C で培養した。その後、培養液を遠心分離し、得られたペレットを BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) に懸濁した。His タグ付きの BlAga3 タンパク質は、TALON metal-affinity resin (Clontech) を含むカラムで精製した。溶出したタンパク質を含む 50 mM イミダゾール画分を、10kDa カットオフの限外濾過膜 (Millipore Co., Billerica, MA, USA) を用いて脱塩・濃縮した。

c) 至適条件

至適 pH は、1 mM の pNP- α -D-Gal を基質として、以下の緩衝液を用いて pH5.0 から 8.0

の間で測定した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0~6.0)、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0~7.0)、Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0~8.0) を用いて 40°Cで測定した。至適温度は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) を用いて、30°C~55°Cで測定した。いずれの場合も、酵素を添加する前にサンプルを各 pH、各温度で 5 分間プレインキュベートした後、酵素を添加し、20 分間インキュベートした。

d) 糖転移活性

糖転移反応は、*p*NP- α -D-Gal をドナー、1-alkanols をアクセプターとして反応を行った。12.5 mM の *p*NP- α -D-Gal を、アクセプターとして 10%のメタノール、エタノール、または 1-プロパノールを含む 50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 40 μ L 中で、2.0 μ g/mL の BlAga3 とともに 40 °Cで 30 分または 2 時間インキュベートした。反応物を TLC で分析した。

e) 基質特異性

BlAga3 の基質特異性を調べるために、*p*NP 基質、 α 1,3-ガラクトシル、 α 1,6-ガラクトシル、 β 1,3-アラビノピラノシル結合を含むいくつかのオリゴ糖を使用した。使用した基質のうち、一部のオリゴ糖の構造は Fig. 2-1 に示している。*p*NP 基質に対する基質特異性は、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で、5 mM の基質を BlAga3 (最終濃度 2.0 μ g/mL) と 37°Cで 19 時間インキュベートすることで測定し、TLC によって評価した。各基質に対する比活性は、反応混合物は 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で、Table 2-8 の凡例に示すように、適切な時間と BlAga3 酵素の量において 45°Cでインキュベートした。反応混合物の 5 分の 1 になるように 5%トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を終了させ、

希釈した生成物を HPAEC-PAD にて分析した。酵素活性の 1 unit は、1 分間に 1 μmol のガラクトースまたはアラビノースを生成するのに必要な酵素の量と定義した。

f) 反応速度論的解析

基質として 0.1~10 mM $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-L-Ara}$ および 1.0~50 mM ラフィノースを用いて、BlAga3 の反応速度論的パラメーターを決定した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 40 μL 中で、 $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-L-Ara}$ の場合、0.20 $\mu\text{g/mL}$ の BlAga3 を、ラフィノースの場合、0.79 $\mu\text{g/mL}$ の BlAga3 を加え、45°C で 20 分間インキュベートした。10 μL の 5% TCA を加えて反応を終了させ、生成物を HPAEC-PAD で分析した。

第三節 結果

2-3-1. 菌体表層局在型酵素 GH39 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase のクローニングならびに機能解析

2 種類の AGP の *in vitro* 資化性試験と遊離糖解析

カラマツ AGP またはアラビアガム AGP を唯一の炭素源とする培地を用いて *Bi. longum* 12 株の資化性試験を行った。カラマツ AGP では用いた全ての *Bi. longum* 株が生育したが、アラビアガム AGP では *Bi. longum* JCM7052 株と MCC00300 株のみが顕著な生育を示した (Fig. 2-2A)。続いて増殖した菌体を用いて、アラビアガム AGP からのオリゴ糖の遊離活性を測定した (Fig. 2-2B および C)。注目すべきことに、資化性試験で増殖が見られた菌株 (JCM7052, MCC00300) を用いたときにのみ、リテンションタイム 6 分付近で特徴的なピーク (ピーク X) が観察された。

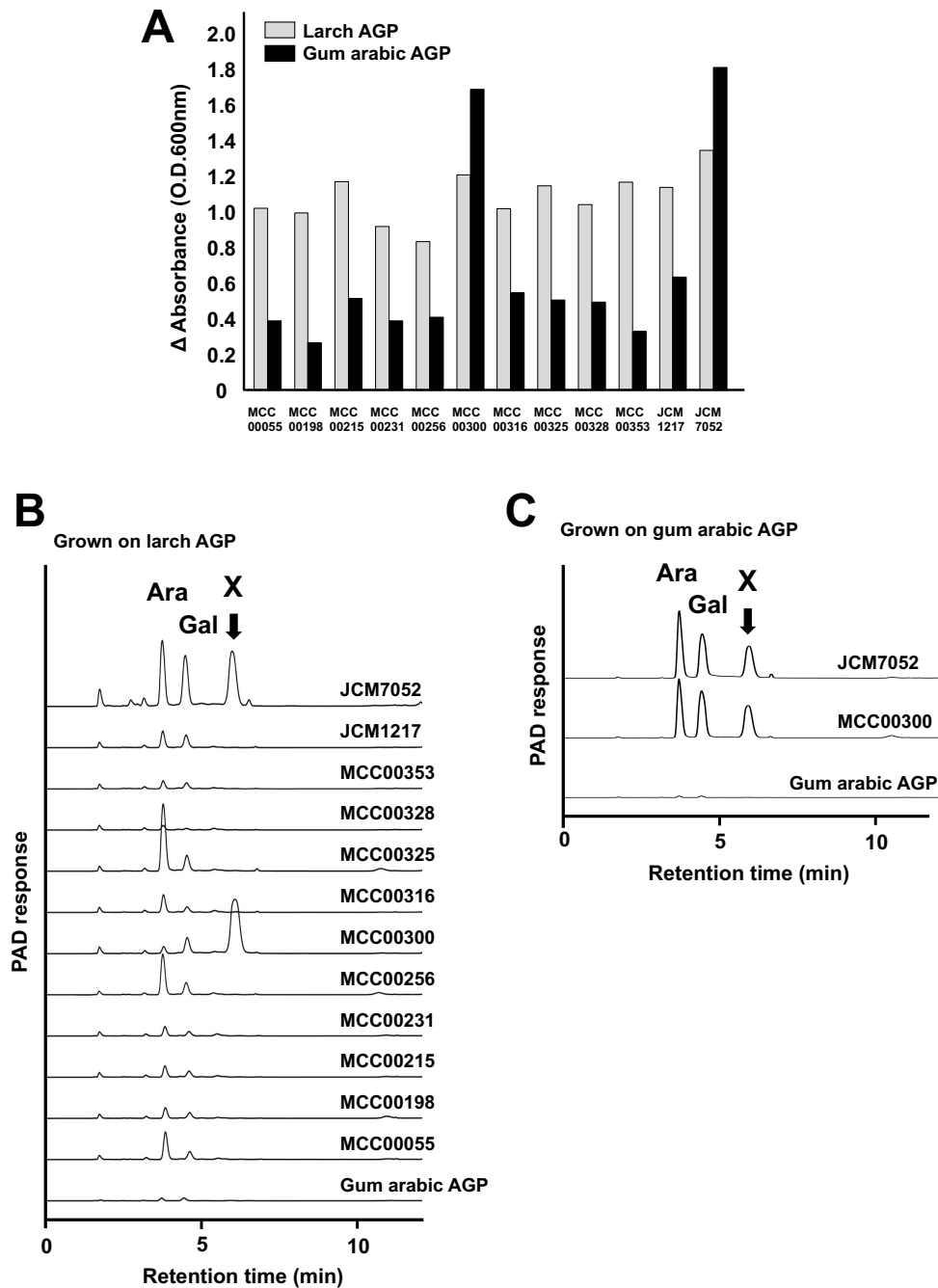


Fig. 2-2. *In vitro* assimilation test and sugar-releasing activity toward gum arabic AGP in *Bi. longum*. (A) Growth of *Bi. longum* strains was monitored in MRS medium containing larch AGP (grey) or gum arabic AGP (black) as the sole carbon source. The absorbance of growth media was calculated by subtracting the absorbance of initial media. (B), (C) Gum arabic AGP was incubated with bacterial cell fractions of *Bi. longum* strains grown in larch AGP (B) and gum arabic AGP (C). Reaction products were analyzed through HPAEC-PAD performed using a PA-1 column. Arrows indicate released sugar (peak X).

ピーク X の糖組成を調べるため、酸加水分解 (Fig. 2-3A) と、*Bi. adolescentis* 由来の GH27 α -D-galactopyranosidase/ β -L-arabinopyranosidase BAD_1525 による酵素分解を行った (Fig. 2-3B)。いずれの場合も、ピーク X は L-アラビノースとガラクトースに 1 : 1 のモル比で分解された。既報により、3-O- α -D-Galactopyranosyl-L-arabinose (α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara) は、部分的な酸加水分解によってアラビアガム AGP から単離されることが分かっていたため (61)、同様に調製を行ったところ、二糖の保持時間はピーク X で観測されたものと一致していた (Fig. 2-3B)。これらの結果から、ピーク X はアラビアガム AGP の側鎖末端に付加した二糖、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara であると考えられた。

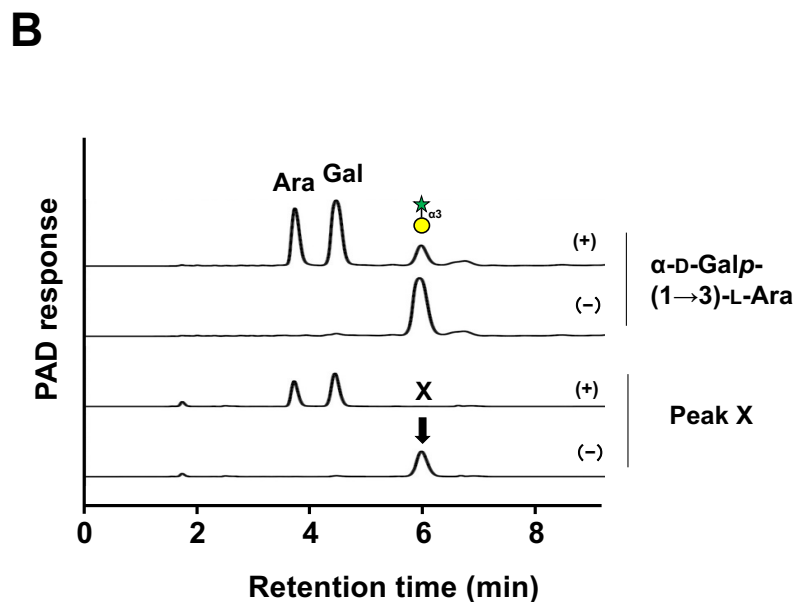
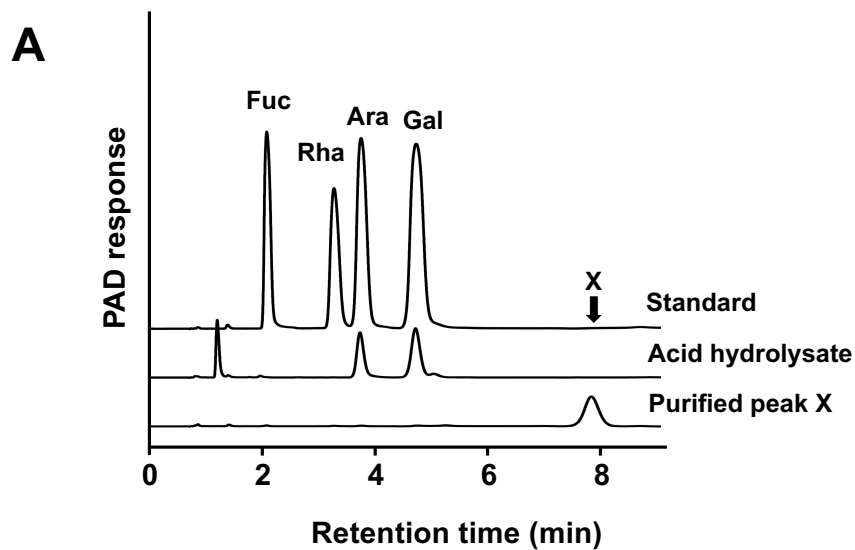


Fig. 2-3. Analysis of the liberated peak X by using acid hydrolysis (A) and enzymatic hydrolysis (B). (A) Purified peak X (bottom) was analyzed by performing acid hydrolysis treatment (middle). The sugar composition was analyzed through HPAEC-PAD by using a PA-10 column. L-Fucose (Fuc), L-rhamnose (Rha), L-arabinose (Ara), and galactose (Gal) were used as standards (top). (B) Peak X and a standard preparation of α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara were incubated with (+) or without (-) GH27 α -D-galactopyranosidase/ β -L-arabinopyranosidase BAD_1525 and then analyzed by performing HPAEC-PAD with a PA-1 column.

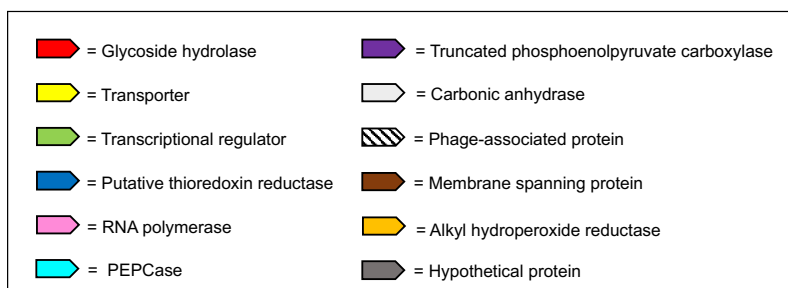
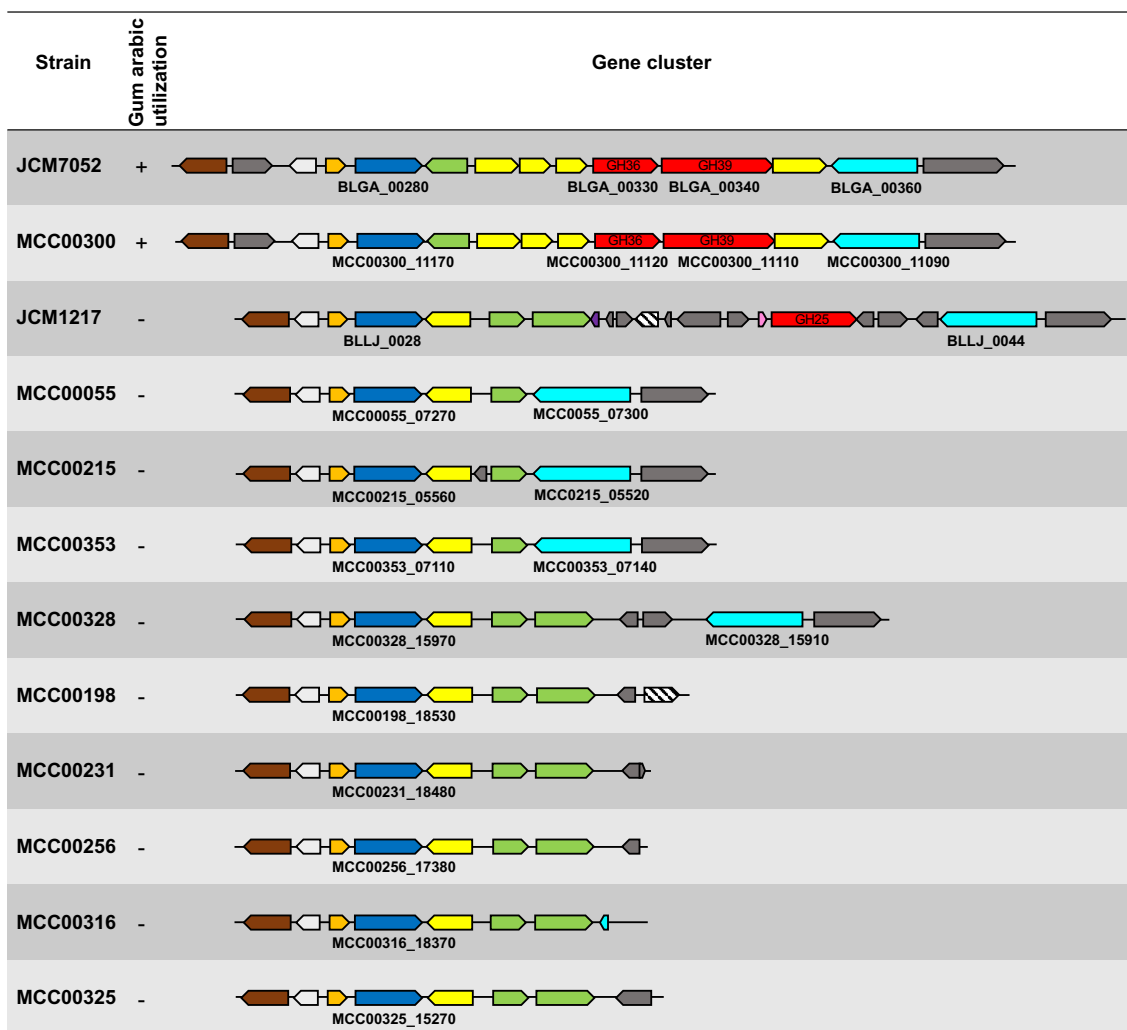
比較ゲノム解析

アラビアガム AGP の資化性に関係する遺伝子群を同定するために、*Bi. longum* Morinaga Culture Collection (MCC) の 10 株のゲノム配列を解析した。新たに決定した *Bi. longum* の各ゲノムの一般的な特徴を Table.2-2 に示した。JCM1217 株と JCM7052 株を加えた 12 株の *Bi. longum* のゲノムを比較解析した結果、アラビアガム AGP 資化性株である *Bi. longum* JCM7052 と MCC00300 にのみ保存されている遺伝子群 [BLGA_00290-BLGA_00350 (*Bi. longum* JCM7052), MCC00300_11100-MCC00300_11160 (*Bi. longum* MCC00300)] が見つかった (Fig. 2-4)。そこで筆者は、この遺伝子クラスターをアラビアガム分解に関わる候補遺伝子とした。

Bi. longum JCM7052 におけるこの遺伝子クラスターは、2 つの糖質加水分解酵素 (BLGA_00330 および BLGA_00340)、Lac-I 型転写制御因子 (BLGA_00290)、および ABC トランスポーター (基質結合タンパク質 (BLGA_00300)、2 つの ABC トランスポーターパーミアーゼ (BLGA_00310 および BLGA_00320)、ATP 結合タンパク質 (BLGA_00350) をコードする遺伝子から構成されていた。さらに、JCM7052 の候補遺伝子群は、MCC00300 の候補遺伝子群 (MCC00300_11100-MCC00300_11160) と 100% のカバレッジで 100% の同一性を示した。これらの遺伝子群は、アラビアガム AGP 非資化性株では数種類の遺伝子で置き換えられているか欠損していることが確認された。

strain	predicted genome size(bp)	No. of contigs	Genome coverage	Longest contig(bp)	N50 (bp)	GCcontent (%)	Number of CDSs:	Average Protein Length:	Coding Ratio (%)	Number of rRNAs:	Number of tRNAs:	Number of CRISPRs:	GenBank accession number
MCC00055	2,359,453	32	148	466,664	206,828	60	1,988	345.6	87.4	1	55	0	BNGW01000001-BNGW01000032
MCC00198	2,376,223	31	117	455,357	196,098	60	1,961	349.1	86.4	2	57	1	BNGX01000001-BNGX01000031
MCC00215	2,273,332	46	129	321,922	191,908	60	1,859	352.7	86.5	2	55	0	BNGY01000001-BNGY01000046
MCC00231	2,260,497	26	134	430,851	195,315	60	1,903	345.2	87.2	1	55	0	BNGZ01000001-BNGZ01000026
MCC00256	2,303,257	19	136	629,731	194,057	60	1,868	358	87.1	2	54	2	BNHA01000001-BNHA01000019
MCC00300	2,386,319	36	115	298,479	196,638	60	2,002	344.4	86.7	3	56	0	BNHB01000001-BNHB01000036
MCC00316	2,382,226	42	140	348,466	199,840	60	1,926	358.4	86.9	2	56	1	BNHC01000001-BNHC01000042
MCC00325	2,379,733	33	144	382,034	196,066	59	1,951	351.4	86.4	3	55	1	BNHD01000001-BNHD01000033
MCC00328	2,379,295	42	137	324,734	129,110	60	2,017	341.2	86.8	1	62	0	BNHE01000001-BNHE01000042
MCC00353	2,388,394	55	131	283,096	118,028	60	2,004	345.3	86.9	2	56	0	BNHF01000001-BNHF01000055

Table 2-2. General features of each of the *Bi. longum* subsp. *longum* draft genome.



5 kbp

Fig. 2-4. Comparison of gene cluster involved in assimilation of gum arabic AGP in *Bi. longum* JCM7052 with corresponding gene clusters in JCM1217 and 10 MCC strains used in this study.

BLGA_00340 (GenBank ID: BBV22623.1) は、GH39 のメンバーとしてアノテーションされており、推定シグナルペプチド、触媒ドメイン、2つの糖結合モジュール (CBM) ファミリー35ドメイン、ガラクトース結合ドメイン、バクテリアの免疫グロブリン (Ig) 様ドメイン、および膜貫通ドメインを含んでいた (Fig. 2-5A)。様々なタンパク質に存在する Ig 様ドメインの普遍的な機能は明らかでないものの、*Clostridium thermocellum* 由来の GH9 cellobiohydrolase CbhA においては、触媒活性部位のコンフォメーションに影響を与える可能性があることが報告されている(62)。注目すべきは、BLGA_00340 の触媒領域は、GH39 の他の既に性質決定された酵素の触媒領域とは低い相同性 (25%未満) を示したことである。BLGA_00340 の触媒領域は、ルーメン嫌気性真菌 *Neocallimastix frontalis* 由来の GH39 の α -L-(β -1,2)-arabinofuranobiosidase (NF2152)や D-galacto-(α -1,2)-L-arabinosidase (NF2523)、GH39 の β -xylosidase と低い相同性を示した。BLGA_00340 の系統解析では、GH39 の β -xylosidase よりも NF2152 や NF2523 と系統学的にやや近い関係にあった。この相同遺伝子は、*Bi. adolescentis* (配列同一性 63.8%)、*Bi. catenulatum* (63.8%)、*Bi. pseudocatenulatum* (60.0%) など、他の成人型ビフィズス菌種にも保存されていた (Fig. 2-5B)。

さらに、幅広い年齢層の日本人から回収した糞便サンプルから分離された他の *Bi. longum* MCC 株 ($n = 113$) の 4.42%に BLGA_00340 のホモログ遺伝子が存在することを見出した(63)。また、BLGA_00340 の相同遺伝子は、NCBI データベースに登録されている *Bi. longum* の 6.84% ($n = 307$)に保存されていた。さらに、BLGA_00340 の相同遺伝子は、NCBI データベースの *Bi. adolescentis* 株 ($n = 57$) の 7.02%、*Bi. catenulatum* 株 ($n = 8$) の 12.5%、*Bi. pseudocatenulatum* 株 ($n = 77$) の 23.4%に保存されていた。

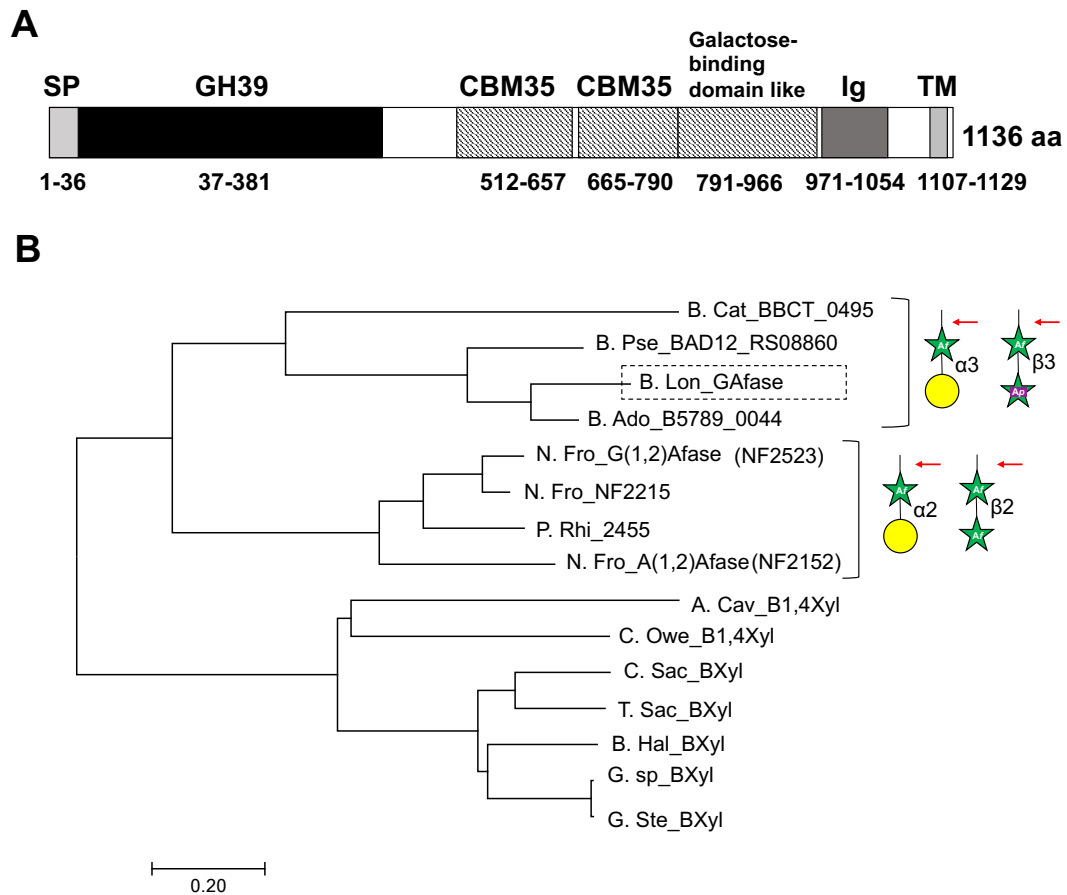


Fig. 2-5. Gene clusters and phylogenetic relationships of BLGA_00340 (GAfase gene). (A) Domain structure of GAfase. Domain structures were predicted using SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and InterPro servers (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). The overall structure comprises the signal peptide (SP), the GH39 catalytic domain, two CBM35 domains, a galactose-binding domain-like region, an Ig-like domain (Ig), and the transmembrane (TM) domain. (B) Phylogenetic tree of GAfase and GH39 family members. The homologous proteins were derived based on the hypothesized protein from the *Bifidobacterium* species and the characterized proteins GH39 D-galacto-(α -1,2)-L-arabinosidase (G(1,2)Afase), α -L-(β -1,2)-L-arabinofuranobiosidase (A(1,2)Afase), and β -xylosidases. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method and the aligned sequences. For construction of the tree, the program MUSCLE was implemented in MEGA7 software (64). GAfase is enclosed in the dashed-line box. The characterized enzymatic activities or locus tags are shown alongside the abbreviated names of the organisms as follows: B. Cat_BBCT_0495, *Bifidobacterium catenulatum* BBCT_0495 (GenBank ID: BAR01463.1); B. Pse_BAD12_RS08860, *Bi. pseudocatenulatum* BAD12_RS08860

(WP_065438160.1); B. Lon_GAfase, *Bi. longum* GAfase; B. Ado_B5789_0044, *Bi. adolescentis* B5789_0044 (WP_080863062.1); N. Fro_G(1,2)Afase, *Neocallimastix frontalis* NF2523 D-galacto-(α -1,2)-L-arabinosidase (ASF57709.1); N. Fro_NF2215, *N. frontalis* NF2215 (ASF57708.1); P. Rhi_2455, *Piromyces rhizinflatus* PR2455 (ASF57710.1); N. Fro_A(1,2)Afase, *N. frontalis* NF2152 α -L-(β -1,2)-L-arabinofuranobiosidase (ASF57707.1); A. Cav_B1,4Xyl, *Aeromonas cavie* β -1,4-xylosidase (BAA95685.1); C. Owe_B1,4Xyl, *Caldicellulosiruptor owensensis* β -1,4-xylosidase (ADQ03734.1); C. Sac_BXyl, *C. saccharolyticus* β -xylosidase (ABP67986.1); T. Sac_BXyl, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI (AAA27369.1); B. Hal_BXyl, *Bacillus halodurans* β -xylosidase (BAB04787.1); G. sp_BXyl, *Geobacillus* sp. β -xylosidase (WP_020755811.1); G. Ste_BXyl, *G. stearothermophilus* β -xylosidase (ABI49941.1). Arrows beside the phylogenetic tree indicate cleavage sites of disaccharide-releasing enzymes.

GAfase のクローニングならびに発現

組換え BLGA_00340 タンパク質 (「3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase (GAfase)」と命名) は、N 末端のシグナルペプチドと、C 末端側の Ig 様ドメインと膜貫通ドメインの 162aa (CA162) を除いて設計した。この組換えタンパク質は、25°C で可溶性タンパク質として高発現し、C 末端の His タグを用いて精製した。組換え GAfase は、SDS-PAGE で見かけの分子量が 102kDa の単一バンドとして確認され、これは計算上の分子量 101,871Da と一致した (Fig. 2-6)。

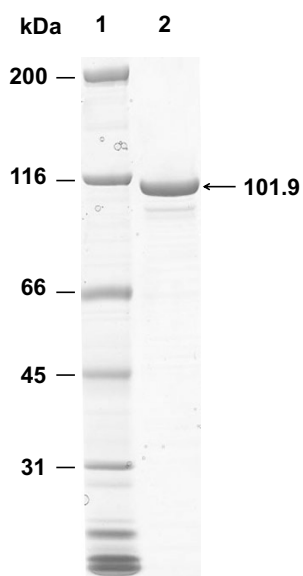


Fig. 2-6. SDS-PAGE analysis of recombinant GAfase. Purified GAfase was electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, molecular size marker; lane 2, purified GAfase. Arrow: target protein at expected molecular size.

GAfase の諸性質

GAfase の多糖分解活性を調べるために、アラビアガム AGP、カラマツ AGP、シュガービートアラビナン、小麦アラビノキシランを基質として用いた (Fig. 2-7)。組換え GAfase は、主にアラビアガム AGP から α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を遊離し、これは菌体酵素を用いた際に遊離するピーク X と一致した。また、GAfase はアラビアガム AGP とカラマツ AGP から 3-O- β -L-arabinopyranosyl-L-arabinose (β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara) を遊離した。 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 構造は、糖組成分析、酵素処理、および AGP 構造に関連する過去の研究(30)に基づいて推測された。また、シュガービートアラビナンからは少量の β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara が検出されたが、小麦アラビノキシランからは検出されなかった (データは示していない)。GAfase の相対活性は、アラビアガム AGP への活性を 100% とすると、カラマツ AGP で 10.2%、シュガービートアラビナンで 0.198% であった (Table 2-3)。GAfase 活性の至適 pH と至適温度は、アラビアガム AGP を基質とした測定した結果、それぞれ 4.5 と 45~50°C であった (Fig. 2-8)。

多糖に作用させた際にどの程度遊離糖が生じるかを測定するために、AGP およびシュガービートアラビナンを過剰量の GAfase と 3 日間インキュベートした。アラビアガム AGP から遊離された α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の量は、それぞれ 9.36%(w/w) と 1.87%(w/w) であり、カラマツ AGP の場合、遊離された β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の量は 1.24%(w/w) であった。また、アラビナンから遊離される β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の量は、わずか 0.153%(w/w) であることがわかった。

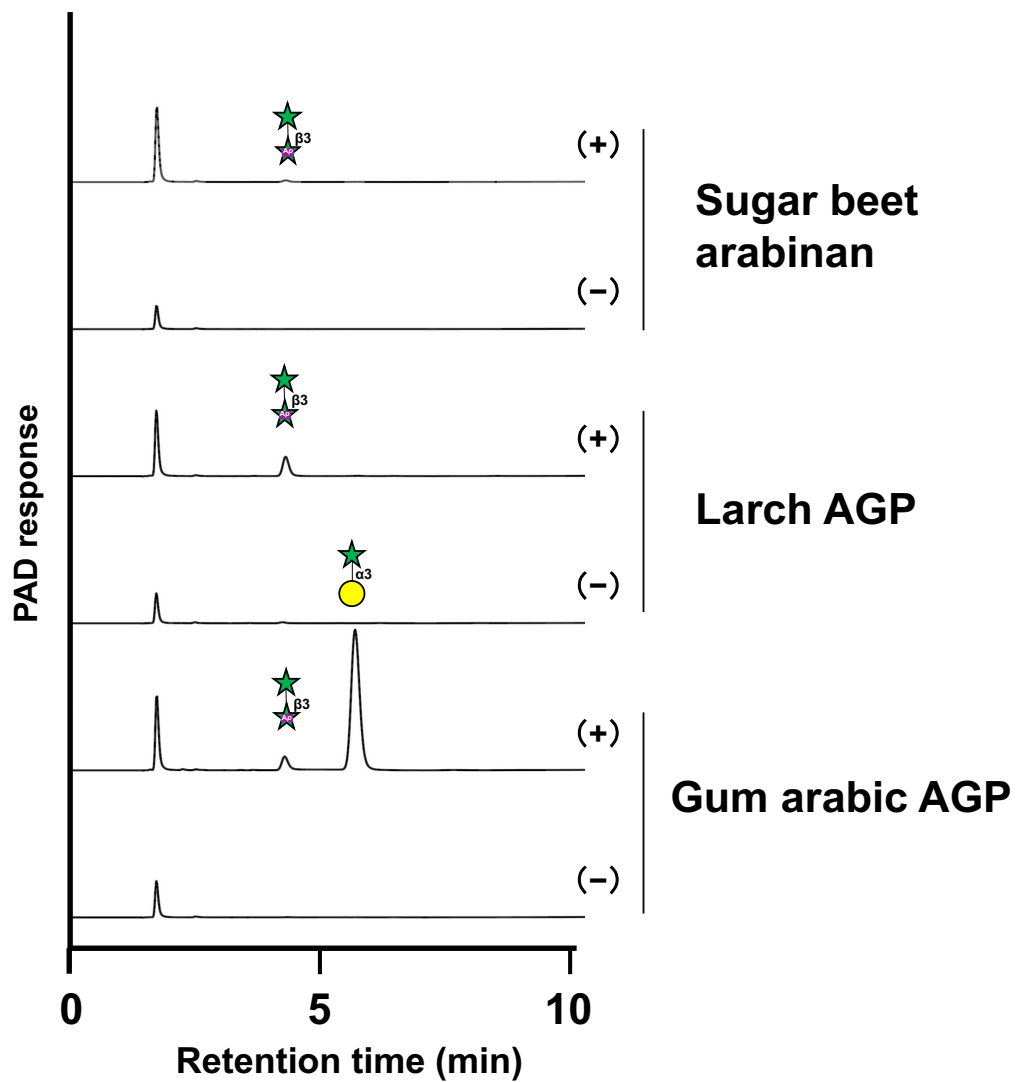


Fig. 2-7. HPAEC-PAD analysis of GAfase reaction with polysaccharides. Gum arabic AGP (bottom), larch AGP (middle), and sugar beet arabinan (top) were incubated with (+) or without (-) GAfase at 37°C for 16 h.

Table 2-3. Substrate specificity of GAfase toward polysaccharides.

	Specific activity (Units/mg)	Relative activity (%) ^a
Gum arabic AGP	13.3	100
Larch AGP	1.35	10.2
Sugar beet arabinan	0.0263	0.198
Wheat arabinoxylan	Trace	Trace

^aRelative activity was expressed as the percentage of the activity toward gum arabic AGP.

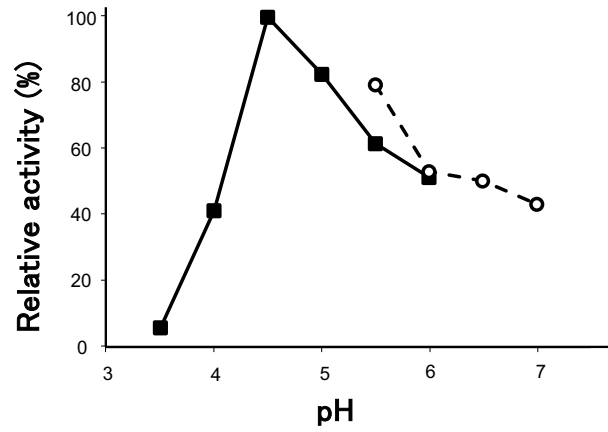
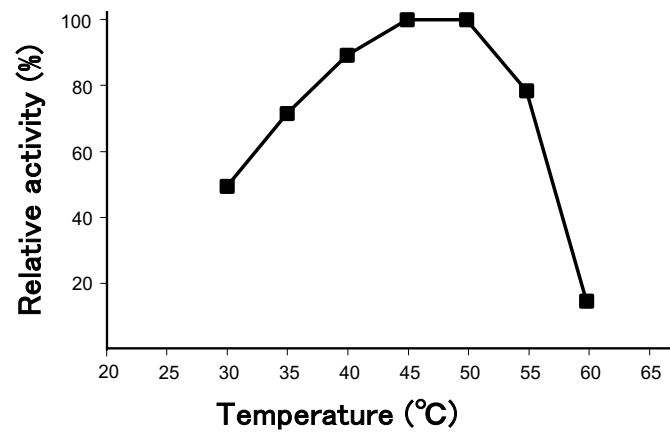
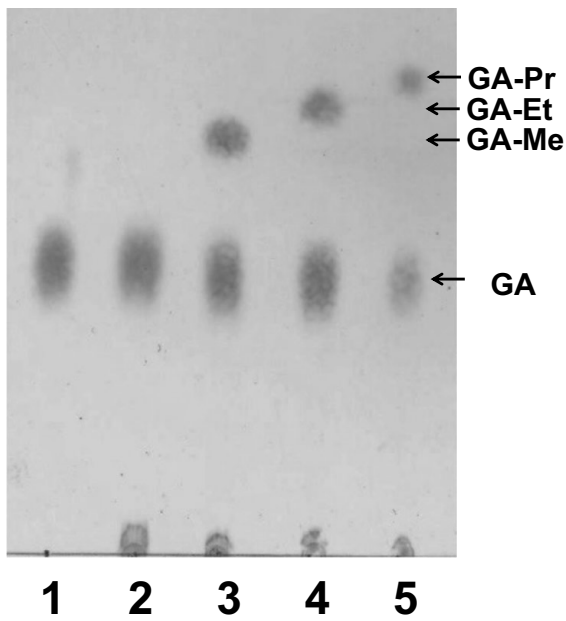
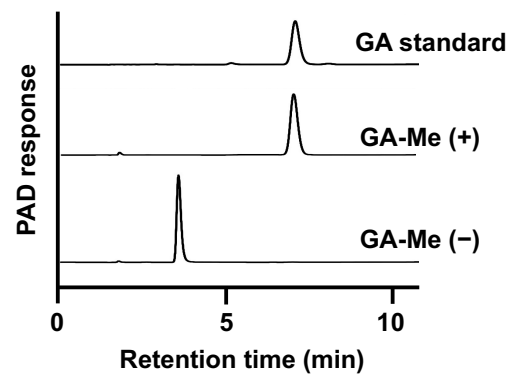
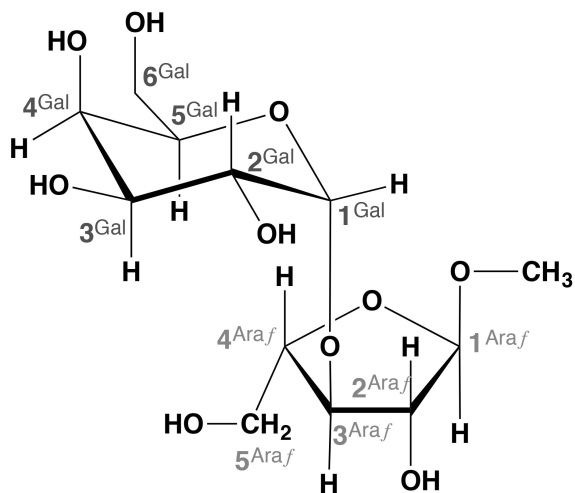
A**B**

Fig. 2-8. Effects of pH and temperature on GAfase activity.

(A) pH dependence of GAfase activity at 45°C for 20 min, measured in sodium acetate buffer (closed squares) or MES buffer (open circles). (B) Temperature dependence of GAfase activity measured at pH 4.5 for 20 min.

GAfase の糖転移活性を評価するために、GAfase を、30%メタノール、エタノール、1-プロパノールの存在下でアラビアガム AGP と反応させ、TLC を用いて糖転移物を観察した (Fig. 2-9A)。30%メタノールで反応させて精製した糖転移物 (α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe) は、GAfase 処理によって α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に加水分解された (Fig. 2-9B)。さらに、 ^1H 、 ^{13}C 、2D-NMR を含む核磁気共鳴 (NMR) 解析を行うことで、糖転移物の構造を同定した (Fig. 2-9C、D、Table 2-4)。アノマーのプロトン信号の多重度 (4.98 ppm のシングレット) が methyl α -L-arabinofuranoside (65) と一致したことから、メタノールが α アノマーの形で転移したことがわかった。さらに、異核間多数結合コヒーレンス (HMBC) スペクトルに、GalpH1 (δ 5.02) /ArafC3 (δ 83.65)、ArafH3 (δ 3.98) /GalpC1 (δ 82.92)、ArafH1 (δ 4.96) /ArafC4 (δ 82.92) のクロスピークが存在することから、ガラクトピラノシドユニットがアラビノフラノシドユニットの C-3 に結合していることが明らかになった。こうして、糖転移物は α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe と同定され、GAfase がアノマー保持型の糖質加水分解酵素であることがわかった。さらに、30%メタノール環境下でカラマツ AGP 由来の糖転移物も、 ^1H および ^{13}C NMR を用いて β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe と同定された (Fig. 2-10, Table 2-5)。

A**B****C**

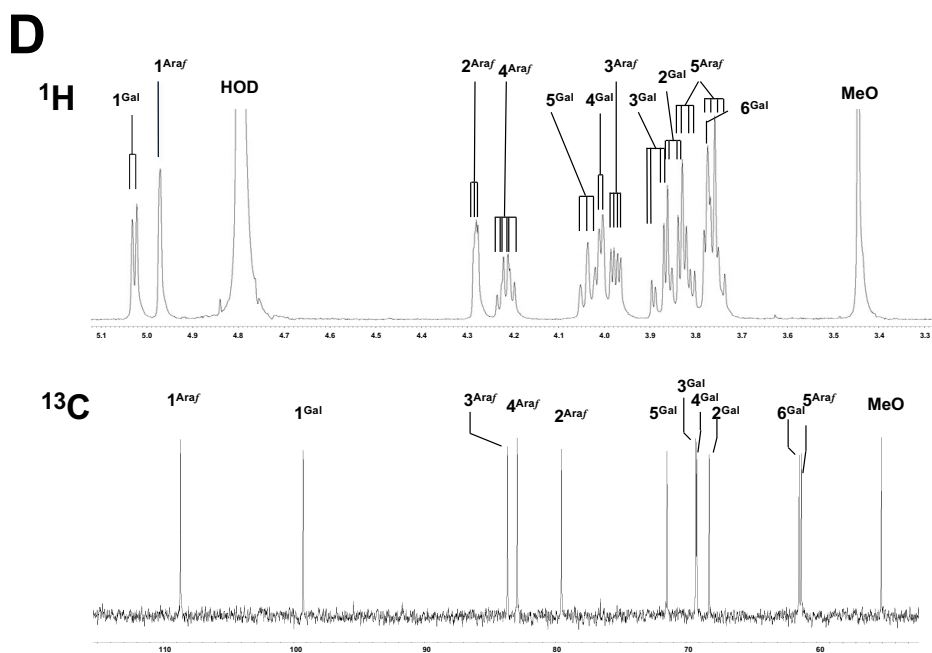


Fig. 2-9. Transglycosylation activity of GAfase in the presence of 1-alkanols. (A) Thin-layer chromatography analysis of reaction products. GAfase was incubated with gum arabic AGP in the absence of 1-alkanols (lane 2) or in the presence of 30% methanol (lane 3), ethanol (lane 4), or 1-propanol (lane 5) at 37°C for 16 h. Lane 1, α -D-Galp-(1→3)-L-Ara standard. (B) Purified α -D-Galp-(1→3)- α -L-Araf-OMe was incubated with (+) or without (-) GAfase at 37°C for 16 h. α -D-Galp-(1→3)-L-Ara was used as the standard. (C) The chemical structure of α -D-Galp-(1→3)- α -L-Araf-OMe. (D) ¹H and ¹³C NMR spectra of α -D-Galp-(1→3)- α -L-Araf-OMe in D₂O at RT. The chemical shifts are listed in Table 2. Abbreviations: GA, α -D-Galp-(1→3)-L-Ara; Me, methyl; Et, ethyl; Pr, propyl.

Table 2-4. Assignment of signal in ^1H and ^{13}C NMR spectra of $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ in D_2O at 400 MHz at RT. (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)

Galp	1	2	3	4	5	6	
^1H	5.02	3.82	4.03	4.01	4.04	3.77	3.77
3J	d 4.1	dd 10.5, 4.1	dd 10.5, 2.6	d 2.6	t 6.4	d 6.4	d 6.4
^{13}C	99.28	68.23	69.18	69.25	71.46	61.19	
1J	175						
Araf	1	2	3	4	5		OMe
^1H	4.96	4.28	3.98	4.22	3.82	3.76	3.44
3J	s	dd 2.8, 1.4	dd 6.0, 2.8	dt 5.6, 3.2	dd 12.8, 3.2	dd 12.8, 5.6	
^{13}C	108.67 ^d	79.52	83.65 ^a	82.92 ^{b, c}	61.35		55.0 ^c
1J	176						

^aHMBC cross peak of enhancement at 83.65 ($\text{C}^{\text{Araf}3}$) by the irradiation at 5.02 ($\text{C}^{\text{Galp}1\text{-H}}$) was observed.

^bHMBC cross peak of enhancement at 82.92 ($\text{C}^{\text{Galp}1}$) by the irradiation at 3.98 ($\text{C}^{\text{Araf}3\text{-H}}$) was observed.

^cHMBC cross peaks of enhancement at 55.00 (MeO) and 82.92 ($\text{C}^{\text{Araf}4}$) by the irradiation at 4.96 ($\text{C}^{\text{Araf}1\text{-H}}$) were observed.

^dHMBC cross peak of enhancement at 108.67 ($\text{C}^{\text{Araf}1}$) by the irradiation at 3.44 (MeO) was observed.

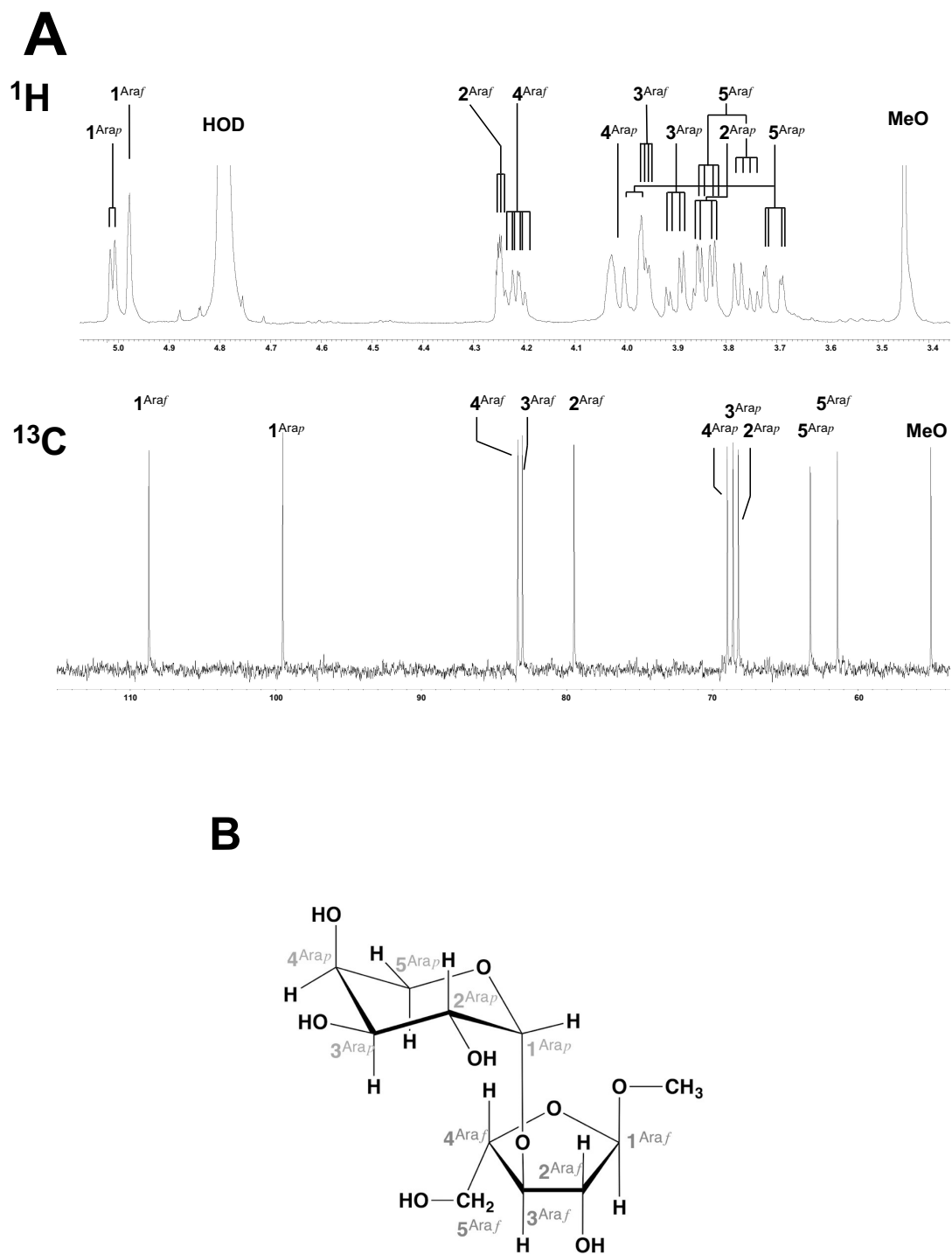


Fig. 2-10. ^1H and ^{13}C NMR spectra of $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$.

(A) ^1H and ^{13}C NMR spectra of $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ in D_2O at RT. (B) Chemical structure of $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$. The chemical shifts are listed in Table 5.

Table 2-5. Assignment of signal in ^1H and ^{13}C NMR spectra of $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ in D_2O at 400 MHz at RT. (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)

Arap	1	2	3	4	5		
^1H	5.02	3.84	3.90	4.03	3.98	3.71	
3J	d 4.0	m	td 10.0, 3.2	m	d 12.8	dd 12.8, 2.4	
^{13}C	99.5 ^a	68.2	68.6	69.0	63.3 ^c		
1J	176.1						
Araf	1	2	3	4	5	OMe	
^1H	4.98	4.25	3.96	4.22	3.84	3.76	3.45
3J	s	m	m	td 5.6, 4.0	dd 12.8, 3.6	dd 12.8, 5.6	
^{13}C	108.7 ^b	79.5	83.1	83.4 ^d	61.4		55.0
1J	175.8						

^aHMBC cross peak of enhancement at 99.5 (C^{Arap1}) by the irradiation at 3.96 ($\text{C}^{\text{Araf3-H}}$) was observed.

^bHMBC cross peak of enhancement at 108.7 (C^{Araf1}) by the irradiation at 3.45 (MeO) was observed.

^cHMBC cross peak of enhancement at 63.3 (C^{Arap5}) by the irradiation at 5.02 ($\text{C}^{\text{Arap1-H}}$) was observed.

^dHMBC cross peaks of enhancement at 83.4 (C^{Araf4}) by the irradiation at 3.45 ($\text{C}^{\text{Araf1-H}}$) were observed.

アラビアガム AGP における GAfase の切断部位を特定するために、アラビアガム AGP から調製した Hyp-AG の ^1H NMR 分析を行った (Fig. 2-11)。アノメリックプロトンの化学シフトは、既報(66)に基づいて割り当てた。また、糖転移物である $\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ と $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ に基づいて、5.56 ppm に $[\beta\text{-L-Arap-(1}\rightarrow\text{3)}]$ 、5.59 ppm に $[\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)}]$ を割り当てた。また、Hyp-AG を GAfase で処理すると、 $[\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow\text{3)}]$ と $[\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)}]$ に対応する 5.85 ppm と 5.59 ppm の 2 つの ^1H ピークが消失することがわかった。これらの NMR 解析から、GAfase はアラビアガム AGP 構造の $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}$ ガラクトシル側鎖の非還元末端から $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-Ara}$ を遊離していることが明らかになった。さらに、5.94 ppm の ^1H ピークが著しく減少し、5.81 ppm の ^1H ピークが増加していることも確認された。これは、GAfase によって $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow\text{3)-}$ が除去されたことにより、末端の $\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow\text{4)-}$ のケミカルシフトが影響を受けたものと考えられる。このようなピークのシフトは、アラビアガム AGP の末端の $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}$ 構造の除去によっても観察された(66)。

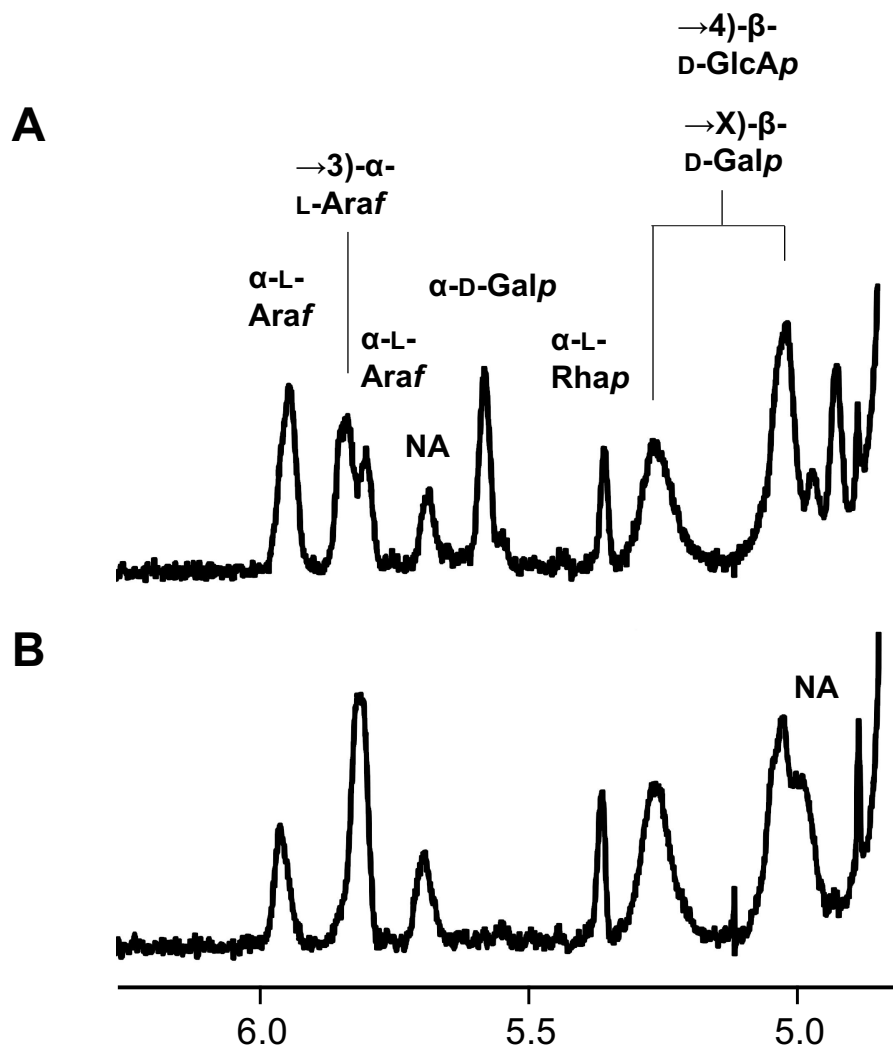


Fig. 2-11. ^1H NMR spectra of Hyp-AG treated without (A) or with (B) GAfase. Linkages shown are in reference to corresponding chemical shifts assigned previously (66). NA indicates a non-assigned peak.

GAfase のオリゴ糖に対する反応性を調べるために、市販アラビアガム試薬に含まれる遊離のオリゴ糖から、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-構造を持つオリゴ糖 (S3-GA、S5-GA) と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-構造を持つオリゴ糖 (S3-AA) を調製した (Fig. 2-1)。(Fig. 2-12)。

GAfase によって、S3-GA と S3-AA は、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara または β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と、 α -L-Araf-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Gal (S3)に分解された。S5-GA は α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と、 α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 6)-[α -L-Araf-(1 \rightarrow 4)]- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-Gal (S5) に分解された。

S5-GA と S3-GA は、S3-AA よりも作用しやすい基質であった (Table 2-6)。また、GAfase が β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf よりも α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf を基質として適することは、糖転移物を基質として用いた速度論的解析の結果からも示された (Table 2-7)。 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe の k_{cat}/K_m 値は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe の k_{cat}/K_m 値より 594 倍も高かった。さらに、GAfase は *p*NP- α -L-Araf やその他の *p*NP 基質に対しては反応性を示さなかった (Fig. 2-13)。これらの結果から、GAfase は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)-構造よりも、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)-構造を認識する *exo* 型の酵素であることが示唆された。本酵素は、その反応性の新規性が認められた結果、新たな EC 番号 EC 3.2.1.215 が付与された。

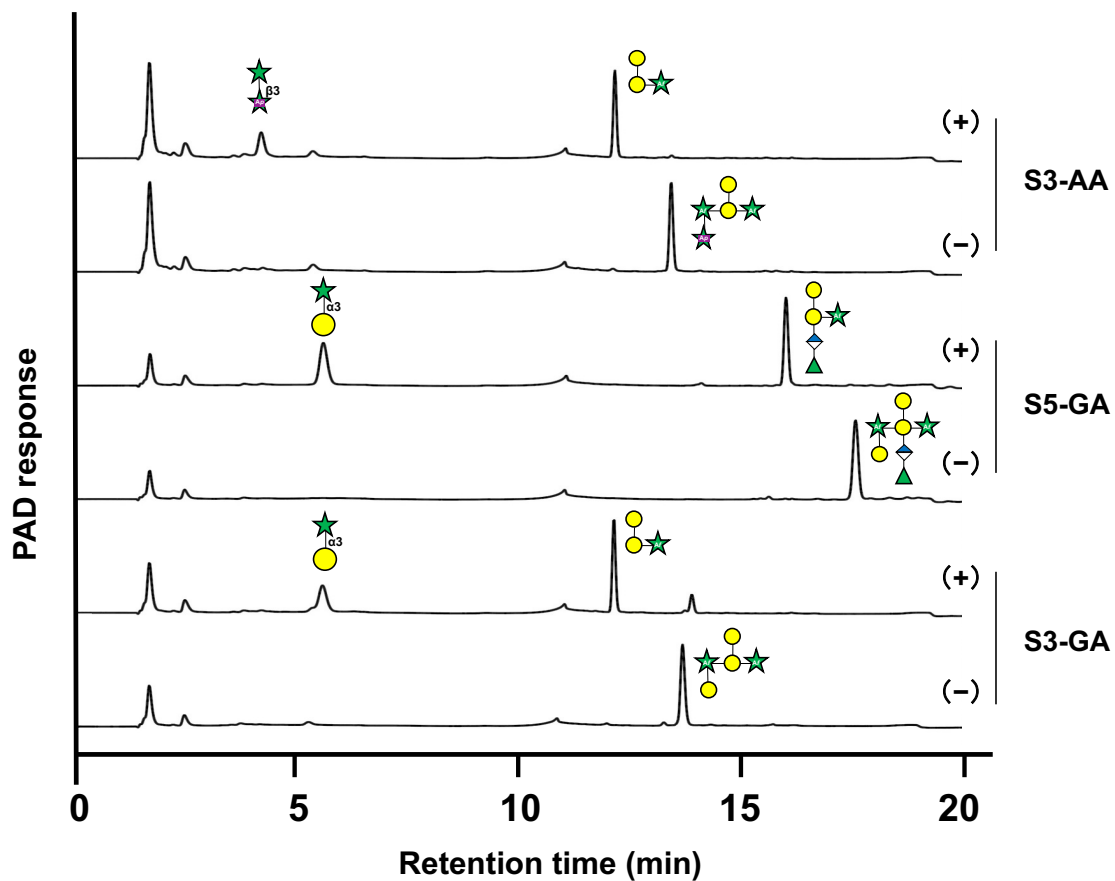


Fig. 2-12. HPAEC-PAD analysis of GAfase reaction with oligosaccharides derived from gum arabic AGP. S3-GA, S5-GA, and S3-AA were incubated with (+) or without (-) GAfase at 37°C for 16 h.

Table 2-6. Substrate specificity of GAfase toward oligosaccharides.

	Specific activity (Units/mg)	Relative activity (%) ^c
S3-GA ^a	2.85	61.9
S5-GA ^a	4.61	100
S3-AA ^b	0.0197	0.426

^aThe substrate concentrations were 5 μ M.

^bThe substrate concentration was 10 μ M.

^cRelative activity was expressed as the percentage of the activity toward S5-GA.

Table 2-7. Kinetic parameter of GAfase on transglycosylation products.

	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$)
α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe	0.633 \pm 0.01	199 \pm 3.60	315
β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe	22.8 \pm 1.39	12.1 \pm 0.349	0.530

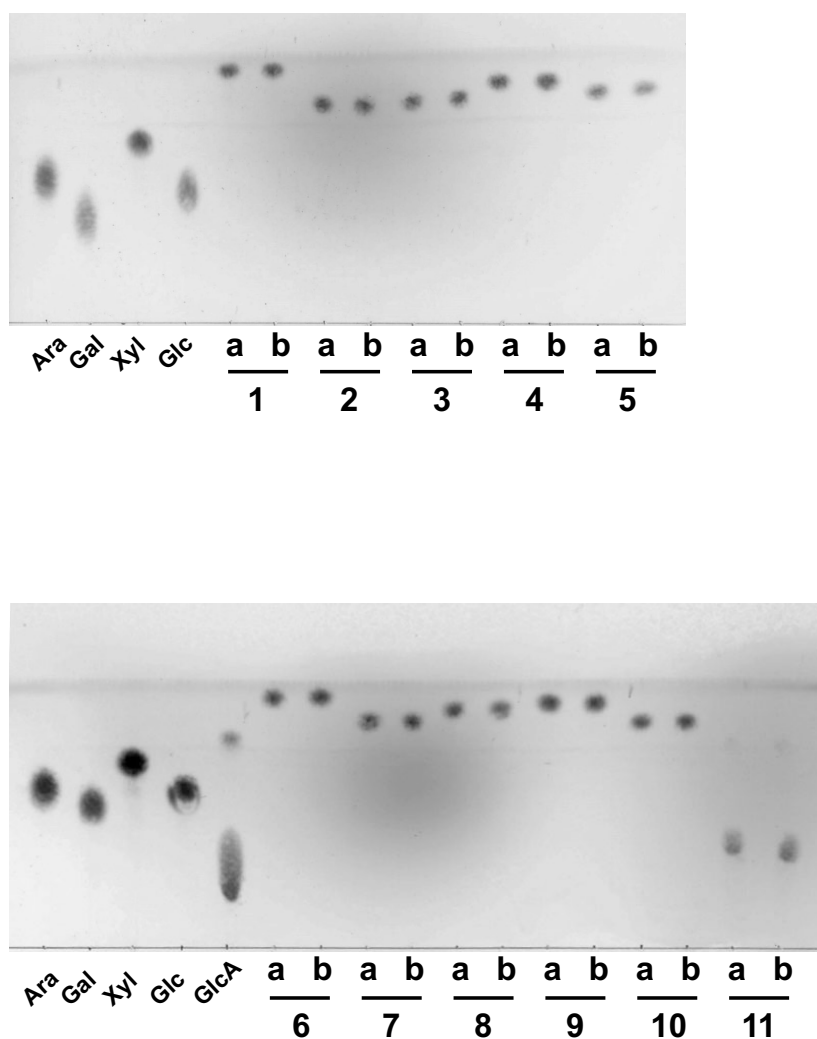


Fig. 2-13. TLC analysis of GAfase reaction with *pNP* substrates. The following *pNP* substrates were incubated in the absence (a) or presence (b) of GAfase: *pNP*- α -L-Araf (lane 1), *pNP*- α -L-Arap (lane 2), *pNP*- α -D-Galp (lane 3), *pNP*- α -D-Xylp (lane 4), *pNP*- α -D-Glcp (lane 5), *pNP*- β -L-Araf (lane 6), *pNP*- β -L-Arap (lane 7), *pNP*- β -D-Galp (lane 8), *pNP*- β -D-Xylp (lane 9), *pNP*- β -D-Glcp (lane 10), and *pNP*- β -D-GlcA (lane 11); L-arabinose (Ara), D-galactose (Gal), D-xylose (Xyl), D-glucose (Glc), and D-glucuronic acid (GlcA) were used as standards.

部位特異的変異導入

GH39 α -L-(β -1,2)-arabinofuranobiosidase (NF2152)、D-galacto(α -1,2)-L-arabinosidase (NF2523)、および GAfase は、 α -L-アラビノフラノシド結合を二糖単位で加水分解するという類似した特徴を持つ。既報に基づいて、NF2152 の Glu-155 と Glu-254 は、それぞれ酸塩基触媒残基と求核触媒残基として予測された(67)。NF2152 の活性部位に存在する触媒残基と他のいくつかの重要なアミノ酸残基は、GAfase でも保存されていた (Fig. 2-14A)。そこで、部位特異的変異導入法を用いて、GAfase の Glu-194 および Glu-321 の Gln 置換体を構築し、GAfase の対応する残基の重要性を評価したところ、E194Q および E321Q 変異体は、アラビアガム AGP に対して酵素活性を示さなかったことから、GAfase においてもこれらのアミノ酸残基は触媒残基として働いていることが推定された。また、CBM ドメインの重要性を評価するために、C 末端ドメインを欠いた C 末端欠損変異体、C Δ 355 (37-781, 745 aa)、C Δ 477 (37-659, 623 aa)、C Δ 630 (37-506, 470 aa) を構築した。これらの欠失変異体は可溶性タンパク質として発現したが、アラビアガム AGP および α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe に対しては酵素活性を示さなくなった (データ省略)。

A

	<u>His52</u>	<u>Iyr53</u>	<u>Arg76</u>	<u>Gln86</u>	<u>Gln87</u>	<u>Asp110</u>	<u>Asp113</u>	<u>Trp118</u>	<u>Tyr120</u>	<u>Asn154</u>	<u>Glu155</u>	<u>Glu254</u>	<u>Trp288</u>	<u>Trp289</u>	<u>Asn291</u>
N. Fro_A(1,2)Afase	H	Y	R	Q	Q	E	D	W	Y	N	E	E	W	W	V
N. Fro_NF2215	L	Y	R	Q	H	D	D	W	Y	N	E	E	W	W	V
N. Fro_G(1,2)Afase	L	Y	R	Q	H	D	D	W	Y	N	E	E	W	W	N
P. Rhi_2455	L	Y	R	Q	H	L	D	W	Y	N	E	E	W	W	T

	<u>Leu64</u>	<u>Iyr65</u>	<u>Gln96</u>	<u>His97</u>	<u>Asn119</u>	<u>Asp122</u>	<u>Trp127</u>	<u>Iyr129</u>	<u>Asn193</u>	<u>Glu194</u>	<u>Glu321</u>	<u>Trp353</u>
B. Lon_GAfase	L	Y	Q	H	N	D	W	Y	N	E	E	W
B. Pse_BAD13_RS04075	L	Y	Q	H	Y	D	W	Y	N	E	E	W

B

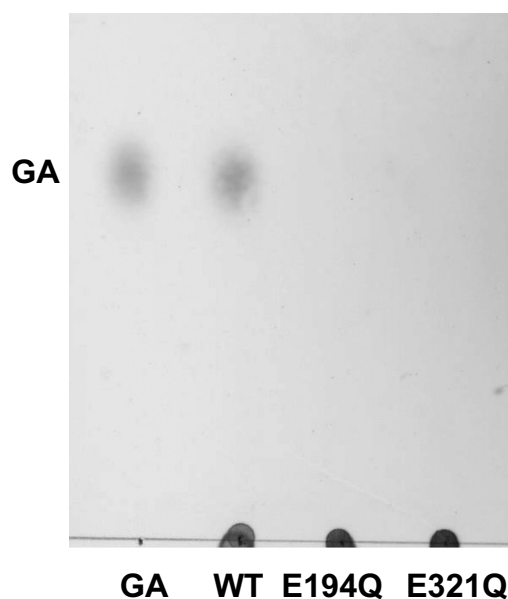


Fig. 2-14. Site-directed mutagenesis of predicted catalytic-site residues of GAfase. (A) Comparison of amino acids involved in catalytic sites of GH39 rumen fungal enzymes with corresponding amino acids in GAfase. Amino acid numbers shown in the upper and lower halves of the figure are for *N. frontalis* NF2152 α -L-(β -1,2)-L-arabinofuranobiosidase and GAfase, respectively. Residues include those that line the surface of the -1 and -2 subsites of GH39 rumen fungal enzymes. The amino acids that constitute the -2 subsite are underlined(67). Red and green columns: catalytic and non-conserved residues, respectively. (B) TLC analysis of reaction products of GAfase Wild type (WT), E194Q and E321Q mutants with gum arabic AGP. Standard: α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara (GA).

2-3-2. 菌体内酵素 GH36 α -D-galactosidase のクローニングならびに機能解析

GAfaseと隣接する BLGA_00330 (BlAga3) のクローニングならびに諸性質を決定した。BlAga3 は 716 個のアミノ酸をコードする 2151 bp のヌクレオチドからなる ORF を含み、推定分子量は 79,587 Da であった (Fig. 2-15)。精製した組換え BlAga3 は、SDS-PAGE で見かけの分子量が 80 kDa の単一バンドとして確認され、これは計算上の分子量 80,490 Da に相当した。

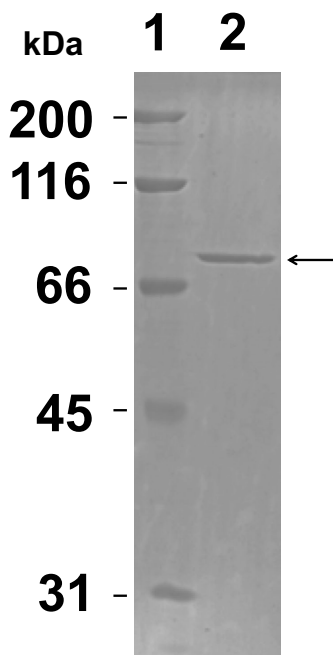


Fig. 2-15. SDS-PAGE analysis of recombinant BlAga3.

Purified BlAga3 was electrophoresed on a 10 % polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, molecular size marker; lane 2, purified BlAga3. Arrow indicates target protein at the expected molecular size.

α 結合のガラクトシル糖鎖は、ラフィノース、メリビオース、スタキオース、ロリオース、ガラクトマンナン、アラビノガラクトン、血液型 B 型抗原などの天然オリゴ糖、多糖、複合糖質に存在する。 α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) は、末端の α -ガラクトースの加水分解を触媒し、CAZy データベースに基づくと、GH4、GH27、GH31、GH36、GH57、GH97、GH110 の 7 つの GH に分類される。特に、GH36 α -D-galactosidase は、古細菌(68)、細菌(69-71)、真菌(72-75)および植物(76-78)からこれまでに見つかり、広く分布している。ビフィズス菌由来の GH36 α -D-galactosidase は現在までに、*Bi. longum* NCC2705(79)、*Bi. longum* DJO10A(80)、*Bi. bifidum* NCIMB41171(70)、*Bi. adolescentis* DSM20083(81, 82) および *Bi. breve* 203(71)由来の酵素がクローニングおよび機能解析がなされてきた。また、以前、Saishin らはアラビアガム AGP により誘導される *Bi. longum* JCM7052 から菌体内 α -D-galactosidase を精製した(54)が、アラビアガム AGP 資化における α -D-galactosidase の役割は不明のままであった。

Bi. longum JCM7052 は、BLGA_00330 (blAga3)、BLGA_18610 (blAga2)、BLGA_18750 (BlAga1) の三つの GH36 α -D-galactosidase 候補遺伝子をコードしている(83)。これまでの研究から、BlAga1 は α -(1 \rightarrow 6)-ガラクトシル結合を持つラフィノース、メリビオース、スタキオースの資化に関与していると考えられている(84-86)。BlAga2 は、*Bi. breve* UCC2003 の MelE (BlAga2 と 99%の identity) の研究から、 α -(1 \rightarrow 4)または α -(1 \rightarrow 3)のガラクトシル結合を持つ α -ガラクトビオースを分解する可能性が高いと考えられる(85)。BlAga3 は、BlAga1 と 39.9 %の配列同一性 (カバレッジ: 83 %) を示したが、BlAga2 との類似性はなかった。BlAga3 は性質決定された配列の中で、*Streptomyces* sp. S27 ACCC41168 (GenBank ID: ACN78885.1) 由来の GH36 α -D-galactosidase と 84%のカバレッジで 47.0%の配列同一性を示した(87)。signalP 4.1 および InterPro サーバーによると、3 つの α -D-galactosidase 候補遺伝子

は、推定シグナルペプチドと末端膜貫通ドメインを欠いており、細胞内酵素であることが示唆された。これら *Bi. longum* JCM7052 由来の三つの GH36 α -D-galactosidase と、*Bifidobacterium* 属細菌由来の GH36 の α -D-galactosidases のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成した (Fig. 2-16)。サブファミリーの分類を示した先行研究(88)に基づくと、BlAga1 と BlAga2 は、それぞれ GH36 のサブファミリー I と II に分類されると考えられた。上記のこれまでに性質決定された *Bifidobacterium* 属細菌由来の GH36 の α -D-galactosidase 中で、*Bi. breve* 由来の Aga と MelE を除くほとんどが GH36 のサブファミリー I に分類された。これらの酵素のアミノ酸配列のアラインメントを行ったところ、BlAga3 は、他の GH36 と同様に求核触媒酸基 (D452)、酸/塩基触媒残基 (D519)、基質結合に関与する残基 (D340 と D341) が保存されていた(82) (Fig. 2-17)。さらに、BlAga3 の触媒ドメインには、サブファミリー I の α -D-galactosidase に特徴的な“C-x-x-G-x-x-R モチーフ”が保存されていたことから、BlAga3 は、GH36 サブファミリー I に分類された。しかし、既知の *Bifidobacterium* 属由来の GH36 α -D-galactosidase とはやや系統学的に離れているため、BlAga3 はさらにサブファミリー Ib に分類された。

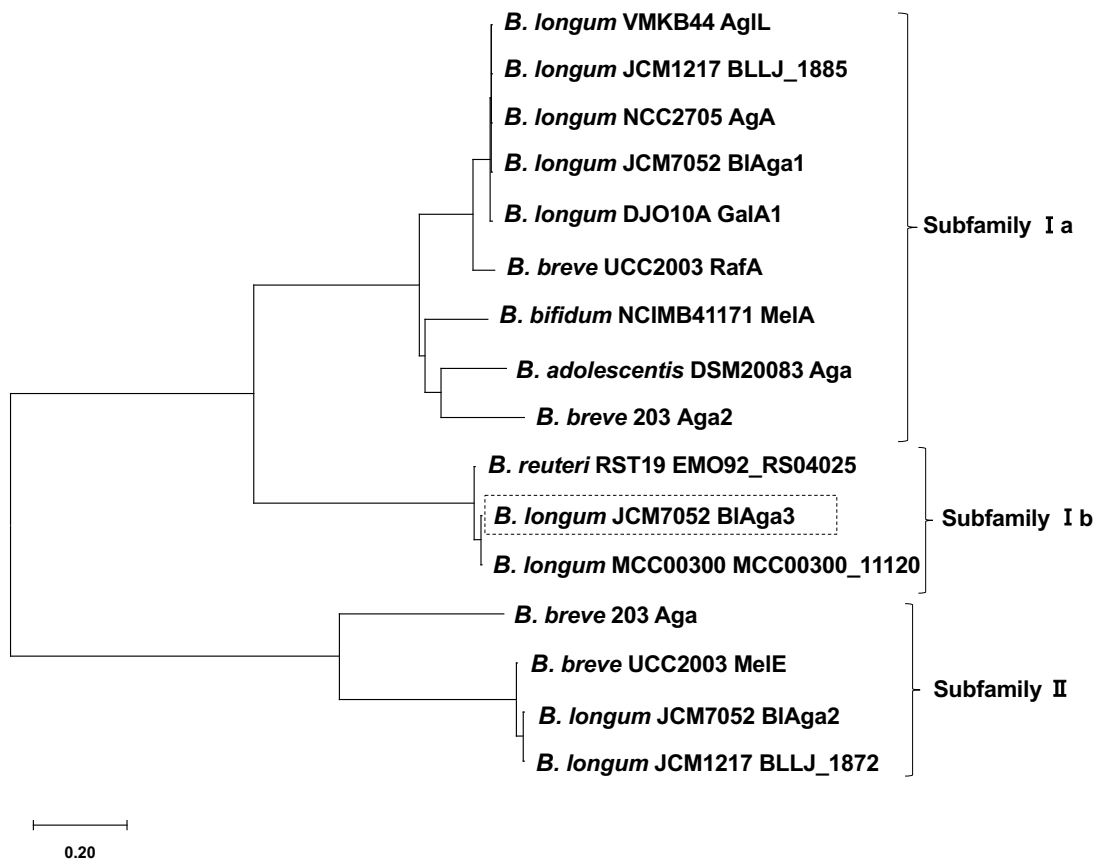


Fig. 2-16. The phylogenetic relationships of bifidobacterial GH36 α -D-galactosidases.

The phylogenetic tree of BIAga3 with homologous proteins from bifidobacteria was constructed by the neighbor-joining method using the aligned sequences; for the construction, the program Clustal W was implemented in the MEGA7 software. The protein names or locus tags are shown alongside *Bifidobacterium* strains as follows: *B. adolescentis* DSM 20083 Aga (GenBank ID: AAD30994.2), *B. bifidum* NCIMB 41171 MeIA (ABD96085.1), *B. breve* 203 Aga (AAK96217.2), *B. breve* 203 Aga2 (ABB76662.1), *B. longum* DJO10A GalA1 (ACD98928.1), *B. longum* NCC2705 AgA (AAN25312.1), *B. longum* VMKB44 AgIL (AAG02023.1), *B. breve* UCC2003 RafA (ABE96531.1), *B. breve* UCC2003 MeIE (ABE96518.1), *B. longum* MCC00300 MCC00300_11120 (GHM70820.1), *B. reuteri* strain RST19 EMO92_RS04025 (WP_150335335.1), *B. longum* JCM1217 BLLJ_1872 (BAJ67536.1), *B. longum* JCM1217 BLLJ_1885 (BAJ67549.1), *B. longum* JCM7052 BIAga3 (BBV22622.1), *B. longum* JCM7052 BIAga1 (BBV24464.1), and *B. longum* JCM7052 BIAga2 (BBV24450.1). BIAga3 characterized in this study is enclosed in the dashed-line box.

B. longum NCC2705 Aga 1 MAENTSTFTGAAADGTALTA VAVYLTQPAANVAIGLVFAGSDLPHIVHWGRPLAKPDTLLAA
B. longum VMKB44 AgIL 1 MAENTSTFTGAAADGTALTA VAVYLTQPAANVAIGLVFAGSDLPHIVHWGRPLAKPDTLLAA
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 1 MAENTSTFTGAAADGTALTA VAVYLTQPAANVAIGLVFAGSDLPHIVHWGRPLAKPDTLLAA
B. longum JCM7052 BIAGA1 1 MAENTSTFTGAAADGTALTA VAVYLTQPAANVAIGLVFAGSDLPHIVHWGRPLAKPDTLLAA
B. longum DOJ10A GalA1 1 MAENTSTFTGAAADGTALTA VAVYLTQPAANVAIGLVFAGSDLPHIVHWGRPLAKPDTLLAA
B. breve UCC2003 RafA 1 MAQNTATFTGTAADGTALTA YLVQFLANVAIGLVAGDLPRIIHWGRPLSNPETLLAA
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 1 -MSLIECRHGAADGTALTA YAEQPAADVAFALVFAGHGLPRFVHWGRPLAAPTGLAA
B. adolescentis DSM20083 Aga 1 -MTLIQTFHGTAASNGTELTAVYAEQAAAAFAALVFEGSDLPHFVHWGRPLTAPETVINT
B. breve 203 Aga2 1 --MAIMDFHGSSSRGEDTHVYVEQRDARSAFFAFATVDRELPHIVHWGRPLSDPRTLVAA
B. longum JCM7052 BIAGA3 1 -----MLPSPVSVPGELTRIALSDVHAGDDLPNVALLSTDDPTAYADAPESTERAVPLL
B. longum JCM7052 BIAGA2 1 -----MIAETCPITVVRTVTAHIDTGRAVYGEQASATCELPVEAVTIVPESCE
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 1 -----MIAETCPITVVRTVTAHIDTGRAVYGEQASATCELPVEAVTIVPESCE
B. breve UCC2003 MeIE 1 -----MIAETCPITVVRTVTAHIDTGRAVYGEQASATCELPVEAVTIVPESCE
B. breve 203 Aga 1 -----MTKRLLEITSVTAHTECC-----PTGERS

B. longum NCC2705 Aga 61 YDALKPQRVSGALDDTAWPSILPTQAESWIGEQRVVLRRAGVELFPKFTVTNIEAGGVLE
B. longum VMKB44 AgIL 61 YDALKPQRVSGALDDTAWPSILPTQAESWIGEQRVVLRRAGVELFPKFTVTNIEAGGVLE
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 61 YDALKPQRVSGALDDTAWPSILPTQAESWIGEQRVVLRRAGVELFPKFTVTNIEAGGVLE
B. longum JCM7052 BIAGA1 61 YDALKPQRVSGALDDTAWPSILPTQAESWIGEQRVVLRRAGVELFPKFTVTNIEAGGVLE
B. longum DOJ10A GalA1 61 YDALKPQRVSGALDDTAWPSILPTQAESWIGEQRVVLRRAGVELFPKFTVTNIEAGGVLE
B. breve UCC2003 RafA 61 YDALKPQRVSGALDDTAWPSILPTQAESWIGEQRVVLRRAGVELFPKFTVTNIEAGGVLE
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 60 YDALRQRVSGALDETAWPSILPTQAESWIGAPRLDTRRAGVTEFCFTVTCFAIR----
B. adolescentis DSM20083 Aga 60 FDALRQRVSGALDYTAWPSILPTQAESWIGSDRFDVRRIGVELECKEQVTDLKAETVAA
B. breve 203 Aga2 59 VDALARQRVSGALDETAWPSILPTQAESWIGAPRFBVVRAGGVELECRFTVTVDRIIDGGA
B. longum JCM7052 BIAGA3 56 TTHALNTFRFRGLRG--ERITVDDAEDEASEADFAALMQLGGWTPREFAIAQEPFVSDRR
B. longum JCM7052 BIAGA2 48 DECTSSAGTGGDAQVRLWRIDVNAHAPQPKDRAAAFQEQQAFEPHHAIIVS-----
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 48 DECTSSAGTGGDAQVRLWRIDVNAHAPQPKDRAAAFQEQQAFEPHHAIIVS-----
B. breve UCC2003 MeIE 48 DECTSSAGTGGDAQVRLWRIDVNAHAPQPKDRAAAFQEQQAFEPHHAIIVS-----
B. breve 203 Aga 25 DMSIPLDAAELRKTGNLIEISVHAHVPEV----FLEHATFQPGCSIIVS-----

B. longum NCC2705 Aga 121 ATLDAVSGESYTDVAGHARATGPPVRVPGVIIVTARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. longum VMKB44 AgIL 121 ATLDAVSGESYTDVAGHARATGPPVRVPGVIIVTARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 121 ATLDAVSGESYTDVAGHARATGPPVRVPGVIIVTARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. longum JCM7052 BIAGA1 121 ATLDAVSGESYTDVAGHARATGPPVRVPGVIIVTARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. longum DOJ10A GalA1 121 ATLDAVSGESYTDVAGHARATGPPVRVPGVIIVTARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. breve UCC2003 RafA 121 ASDLVSGCDSYTDVTRARATGPPANVPGVAITARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 116 --QDERCGVDVSDGVDGAHHTVTTQCPVWVVTASDAEQGVELSHTAEILLPGGLVLRQKATV
B. adolescentis DSM20083 Aga 120 GKTYTVAEKDGYPSW--SVASEPDKQTEPTIVTARDEEQGVEVEWHLELLPGGLVLRQKATV
B. breve 203 Aga2 119 -----TVSADAEQGVRLWRCELRRESGLVLRQKATV
B. longum JCM7052 BIAGA3 114 -----IAYRAVDESAGLELGTELESILAGGSIRIRHTL
B. longum JCM7052 BIAGA2 99 -----ITMAGVDSGND--DTMLAFLYQHKEWWMRP--
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 99 -----ITMAGVDSGND--DTMLAFLYQHKEWWMRP--
B. breve UCC2003 MeIE 99 -----ITMASVDSGND--DTMLAFLYQHKEWWMRP--
B. breve 203 Aga 72 -----CALPRYSRPAQGTPIILCLYQHKEWWMRP--

B. longum NCC2705 Aga 181 TNIEFGADAG--AFLEIGKIELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. longum VMKB44 AgIL 181 TNIEFGADAG--AFLEIGKIELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 181 TNIEFGADAG--AFLEIGKIELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. longum JCM7052 BIAGA1 181 TNIEFGADAG--AFLEIGKIELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. longum DOJ10A GalA1 181 TNIEFGADAG--AQLEIGKIELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. breve UCC2003 RafA 181 TNIEFGAEAGAEAFLEIGKIELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 174 RNLFAAGNLP-TEDLEVGKVELGFPLPESAGEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. adolescentis DSM20083 Aga 178 TNIEFG-----EFLEIGKIELAFSVADANEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. breve 203 Aga2 150 VNMIR-----AEELEIGTVELAFVADMTTEILTTGHHLRERSPQRQPLTVGRFEKFPQL
B. longum JCM7052 BIAGA3 146 TNIRADS-----PYVVOGLDVSVPLADNQTELLDFTGGRHREPRQRHTIACGITSSEFR
B. longum JCM7052 BIAGA2 126 -----TWVRTPELPEREQQLLRNN----DAEDAELVVLVAICGTD--
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 126 -----TWVRTPELPEREQQLLRNN----DAEDAELVVLVAICGTD--
B. breve UCC2003 MeIE 126 -----TWVRTPELPEREQQLLRNN----DAEDAELVVLVAICGTD--
B. breve 203 Aga 100 -----TWSVFADVPEREQQLVWTKTRRTRYKGGVREQHWVLLAASDGE--

B. longum NCC2705 Aga 239 AGRPDFDASLLLTAGVPGFGFEHGDAYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. longum VMKB44 AgIL 239 AGRPDFDASLLLTAGVPGFGFEHGDAYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 239 AGRPDFDASLLLTAGVPGFGFEHGDAYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. longum JCM7052 BIAGA1 239 AGRPDFDASLLLTAGVPGFGFEHGDAYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. longum DJO10A GalA1 239 AGRPDFDASLLLTAGVPGFGFEHGDAYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. breve UCC2003 RafA 241 AGRPDFDASLLLTAGVPGFGFEHGEAYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 233 AGRPDFDASLLLTAGEPGFGFEHGEVYSVHVWGSNGSVLSAERLPYTTGVIGGGELLFGG
B. adolescentis DSM20083 Aga 232 IGRPDFDASLLLTAGEHGFGEHGNVYSAHVAWSNGSVLSAERLPYTTGVIGGSEVLFEGG
B. breve 203 Aga2 204 VGRPDFDSLLLNVRPGFGFEHGDVYSVHVVAWSNGSVLSAERLPYTTGVIGGSEVLFEGG
B. longum JCM7052 BIAGA3 200 WGRPGFEG-FLFVAGTPGDFEFAHGSVLMVQPAWSGNELVYVQRDMAQIATVSA GELLFEG
B. longum JCM7052 BIAGA2 164 -IRADFSGQFATES-----DDTALRLVLSNRRVGRRTTLCDTA
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 164 -IRADFSGQFATES-----DDTALRLVLSNRRVGRRTTLCDTA
B. breve UCC2003 MeIE 164 -IRADFSGQFATES-----DDTALRLVLSNRRVGRRTTLCDTA
B. breve 203 Aga 142 -CRALIRGCATDAAG-----AAGGALAVDSSTNRVQQTSLDGLA

B. longum NCC2705 Aga 299 EVTLIAGPG-EGQNSYDTPWLFSGSYG-DGLNEIAARFHSYVRSLSLHPLFSG-----RPV
B. longum VMKB44 AgIL 299 EVTLIAGPG-EGQNSYDTPWLFSGSYG-DGLNEIAARFHSYVRSLSLHPLFSG-----RPV
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 299 EVTLIAGPG-EGQNSYDTPWLFSGSYG-DGLNEIAARFHSYVRSLSLHPLFSG-----RPV
B. longum JCM7052 BIAGA1 299 EVTLIAGPG-EGQNSYDTPWLFSGSYG-DGLNEIAARFHSYVRSLSLHPLFSG-----RPV
B. longum DJO10A GalA1 299 EVTLIAGPG-EGQNSYDTPWLFSGSYG-DGLNEIAARFHSYVRSLSLHPLFSG-----RPV
B. breve UCC2003 RafA 301 EVTLDDAAGEGQSSYETPWLFGSFG-DGLNEIAARFHSYVRSLSLHPLFSG-----RPV
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 293 EATLARGE-----TYTTPWLYGSYG-DGLNEIAARFHDYVRSCHETLAVLP-----REV
B. adolescentis DSM20083 Aga 292 EVGLEHG-----ESYTPWLVGSYG-EGLENEASRFHCYTRRVRHDWLDVHGIAPKRPV
B. breve 203 Aga2 264 EVTLICADG--DDNRYTTPWLYGSYG-EGFENEASRFHNEIRATHAQWRALGVAEKPREV
B. longum JCM7052 BIAGA3 259 EIVLRQGE-----SYATPWIMVIAASNSGLDGAASLHQWRERSIPAPRRQP-----V
B. longum JCM7052 BIAGA2 200 AYIACASD-----PYMAIRAATQTAARQLGIRTRKBRFFPDALTGLG-----
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 200 AYIACASD-----PYMAIRAATQTAARQLGIRTRKBRFFPDALTGLG-----
B. breve UCC2003 MeIE 200 AYIACASD-----PYMAIRAATQTAARQLGIRTRKBRFFPDALTGLG-----
B. breve 203 Aga 180 LIYARGGD-----PYALIEQCVTATWRRLPVGPKSLRRFPEALRGGF-----

Substrate binding

B. longum NCC2705 Aga 351 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAADSGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. longum VMKB44 AgIL 351 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAADSGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 351 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAADSGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. longum JCM7052 BIAGA1 351 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAADSGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. longum DJO10A GalA1 351 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAADSGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. breve UCC2003 RafA 354 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAASGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQISQDV
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 341 ILNLTWEAVYFDHNFDTLALADKAADSGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. adolescentis DSM20083 Aga 346 ILNLTWEAVYFNHNDTTLALADKAASGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQISQDV
B. breve 203 Aga2 321 ILNLTWEAVYFCHFDTLALADKAASGVER--FVVDGWFSGRRDDTSLGLDWQIAQDV
B. longum JCM7052 BIAGA3 306 VLNVTWEGVFDHNFDTLLELARRAAASGVER--VVLDDGWFHLLRRDDHAGLGLDWVDFDV
B. longum JCM7052 BIAGA2 242 -WCTWDSLGRDVNEQATVNKMEEFQAKHVPISWVLIDDGWSNTDRTKELLDFGADRQRF
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 242 -WCTWDSLGRDVNEQATVNKMEEFQAKHVPISWVLIDDGWSNTDRTKELLDFGADRQRF
B. breve UCC2003 MeIE 242 -WCTWDSLGRDVNEQATVNKMEEFQAKHVPISWVLIDDGWSNTDRTKELLDFGADRQRF
B. breve 203 Aga 222 -WCTWDSLGRQVSESGTLAKMEFKAKQVPSVSWVLIDDGWSQTR--NNKLTGFGADPTRF

B. longum NCC2705 Aga 409 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILSPTAGRLPLQGRTO
B. longum VMKB44 AgIL 409 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILSPTAGRLPLQGRTO
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 409 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILSPTAGRLPLQGRTO
B. longum JCM7052 BIAGA1 409 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILSPTAGRLPLQGRTO
B. longum DJO10A GalA1 409 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILSPTAGRLPLQGRTO
B. breve UCC2003 RafA 412 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILSPTAGRLPLQGRTO
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 399 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILRPTANRLPMQGRSQ
B. adolescentis DSM20083 Aga 404 WPDGPKSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDVARNHDPDWILKPTANRLPMQGRTO
B. breve 203 Aga2 379 WPDGDHSLKALADYVHAKGMEFGLWFEPEMVNPDSDMYRPHDPDWILRPTAHLRPMQGRNQ
B. longum JCM7052 BIAGA3 364 WPEG---LHFLVDFVHEGGMQFGLWFEPEMVNPDSDLYRPHDPDWLQAAP--RTPILQRHO
B. longum JCM7052 BIAGA2 301 PHGLAHTTIALLKTHYGVRSVGVWQAEQGYWNGLDESGVAAASCPAITITANGCLIPGSR
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 301 PHGLAHTTIALLKTHYGVRSVGVWQAEQGYWNGLDESGVAAASCPAITITANGCLIPGSR
B. breve UCC2003 MeIE 301 PHGLAHTTIALLKTHYGVRSVGVWQAEQGYWNGLDESGVAAASCPAITITANGCLIPGSR
B. breve 203 Aga 279 PQGLAHTTIDVLKQDYGVRSVGVWQAEQGYWGGVDFSDAFKERRYVFEFLPGGMTVPSAQ

B. longum NCC2705 Aga 469 QVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFPGS--RRSGRPVAVHA
B. longum VMKB44 AgIL 469 QVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFPGS--RRSGRPVAVHA
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 469 QVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFPGS--RRSGRPVAVHA
B. longum JCM7052 BIAGA1 469 QVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFPGS--RRSGRPVAVHA
B. longum DJO10A GalA1 469 QVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFPGS--RRSGRPVAVHA
B. breve UCC2003 RafA 472 QVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFPGS--RRSGRPVAVHA
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 459 QVLDLTLN-----PDAYRYIYHDSIDALVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFBAVS--FRTGRPAVHG
B. adolescentis DSM20083 Aga 464 QVLDLTLN-----PDAYRYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFBAVS--FRTGRPAVHN
B. breve 203 Aga2 439 QVLDLTLN-----PDAYRYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFBAVS--FRTGRPAVHG
B. longum JCM7052 BIAGA3 420 TVLDLTLN-----PDAFDYIYGCMDQLVGEGLGIDYIKWDHNKLVTFBAVS--FRTGRPAVHG
B. longum JCM7052 BIAGA2 361 -----AQQPAQFWDADWDELAEAGVDFVKVDSQSSTSVMVR----GTESYGE
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 361 -----AQQPAQFWDADWDELAEAGVDFVKVDSQSSTSVMVR----GTESYGE
B. breve UCC2003 MeIE 361 -----AQQPAQFWDADWDELAEAGVDFVKVDSQSSTSVMVR----GAESYGE
B. breve 203 Aga 339 PAWDMFVDGECLSEYGCERFRWWRWSEEALANAGVDFVKVDSQSSTMSVLTR----CAQSYGT

C-x-x-G-x-x-R *1

B. longum NCC2705 Aga 522 QTLAVYNIFFRGLKTAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. longum VMKB44 AgIL 522 QTLAVYNIFFRGLKTAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 522 QTLAVYNIFFRGLKTAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. longum JCM7052 BIAGA1 522 QTLAVYNIFFRGLKTAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. longum DJO10A GalA1 522 QTLAVYNIFFRGLKTAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. breve UCC2003 RafA 525 QTLAVYNIFFRGLKTAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 512 QTLAVYRMRFDLEVAHPGLEIESCASSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. adolescentis DSM20083 Aga 517 QTLAVYRIFRFDLKAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. breve 203 Aga2 492 QTLAVYRIFRFDLKAHPGLEIESCSSGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. longum JCM7052 BIAGA3 474 QTVAYYRILDKLRADFEDLEWESCASGGGRVDLGILEHADRIWVSDCVDPVERADIQRYT
B. longum JCM7052 BIAGA2 404 ATWGRHICALDEVTSRRFGGALINCMG-MAPEYWHRRPSSPITRSDDYLFHPNPDSLGEHL
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 404 ATWGRHICALDEVTSRRFGGALINCMG-MAPEYWHRRPSSPITRSDDYLFHPNPDSLGEHL
B. breve UCC2003 MeIE 404 ATWGRHICALDEVTSRRFGGALINCMG-MAPEYWHRRPSSPITRSDDYLFHPNPDSLGEHL
B. breve 203 Aga 395 LLMR-HRAVDLAASAFFFNALINCMG-MAPEYWHRRPSSPITRSDDYLFHPNPDSLGEHL

*2

B. longum NCC2705 Aga 582 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. longum VMKB44 AgIL 582 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 582 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. longum JCM7052 BIAGA1 582 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. longum DJO10A GalA1 582 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. breve UCC2003 RafA 585 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 572 SLLVPPAMMGEHVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. adolescentis DSM20083 Aga 577 SLLVPEMIGEHEVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. breve 203 Aga2 552 SLLVPEMIGEHEVGASPAHSTQRATSQELRMAMAFFGHMGIENWLLKEPDEALAKLAVWV
B. longum JCM7052 BIAGA3 534 VQNTAEYELCAHHSIQPTSQGTGRITYSVAFRATAVHSHSFGIEWDITKASDADTQELASWV
B. longum JCM7052 BIAGA2 463 IQNAYCALIMGELYHCDWDMFWTEHPPHARVHAWLRLLSGGPVYCSDACGHTDAVLRDLE
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 463 IQNAYCALIMGELYHCDWDMFWTEHPPHARVHAWLRLLSGGPVYCSDACGHTDAVLRDLE
B. breve UCC2003 MeIE 463 IQNAYCALIMGELYHCDWDMFWTEHPPHARVHAWLRLLSGGPVYCSDACGHTDAVLRDLE
B. breve 203 Aga 453 IENAYCSLIMGELYHCDWDMFWTKHPDARVHAWLRLLSGGPVYCSDALGHTDPELTKPEF

B. longum NCC2705 Aga 642 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. longum VMKB44 AgIL 642 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. longum JCM1217 BLLJ_1885 642 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. longum JCM7052 BIAGA1 642 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. longum DJO10A GalA1 642 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. breve UCC2003 RafA 645 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. bifidum NCIMB41171 MeIA 632 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. adolescentis DSM20083 Aga 637 AEFKKHRDWFADITCVHADSNDPAVRLDGMVMPNRDAAIYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. breve 203 Aga2 612 DAYKRRHADFAGHTVHVHDAADPAVRVDGVSASGERAVYRFTQLTTSQTYPAAPVHLP
B. longum JCM7052 BIAGA3 594 VVYKARRDLHSGREVRILVADPAVLAHGVVAADGSRALIAHVQYEESSENREAVLRVLP
B. longum JCM7052 BIAGA2 523 ABDGTLPRPDEPAREVIAISLLNDEPHTDYALGVTAREGAEQVIAFVGLRRQFQIGIITAS
B. longum JCM1217 BLLJ_1872 523 ABDGTLPRPDEPAREVIAISLLNDEPHTDYALGVTAREGAEQVIAFVGLRRQFQIGIITAS
B. breve UCC2003 MeIE 523 ABDGTLPRPDEPAREVIAISLLNDEPHTDYALGVTAREGAEQVIAFVGLRRQFQIGIITAS
B. breve 203 Aga 513 EDGVLTHPDEGVGMFVIGSLLSDFVHSVTPVIGVRNTRFGEVLLFVGLNIAAVQSAHTPA

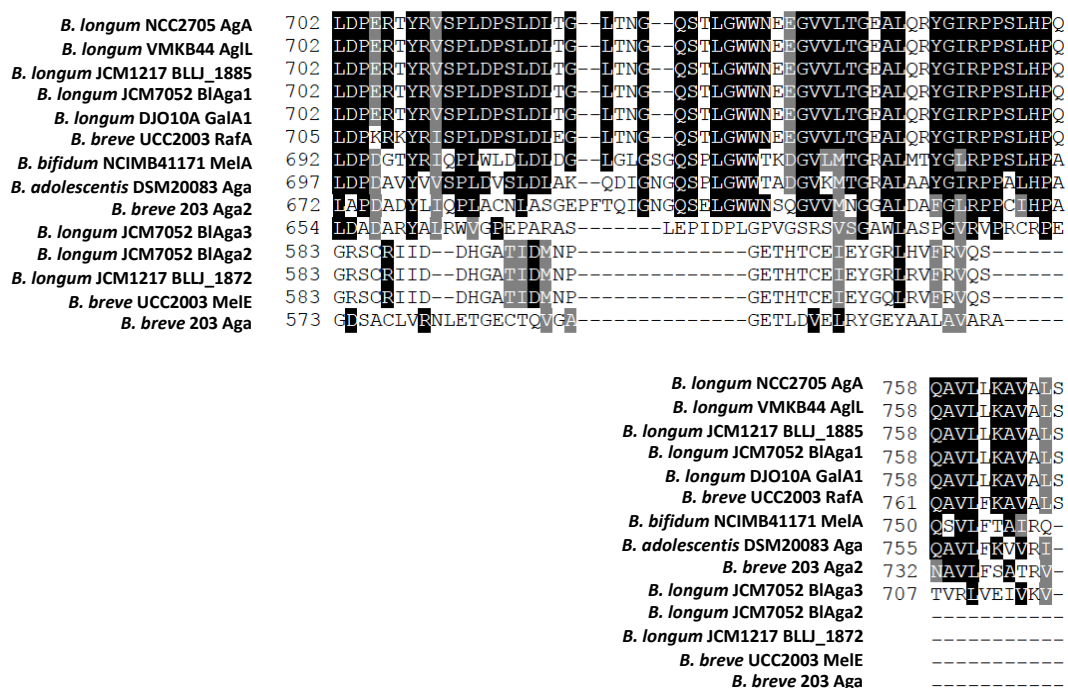


Fig. 2-17. Multiple alignment of amino acid sequences of BIAGA3 and related enzymes.

The alignment was created using the Clustal W program. Identical amino acid residues are enclosed in black boxes. The asterisks below the sequence indicate the assumed essential residues associated with the catalysis; *1, a catalytic nucleophile; *2, acid/base catalyst.

酵素活性の至適条件を、1 mM の *p*NP- α -D-Gal を基質として測定したところ、至適 pH と至適温度はそれぞれ 6.0 と 50°C であった (Fig. 2-18)。また、*p*NP 基質に対する基質特異性を測定したところ、BlAga3 は、*p*NP- α -D-Gal に対しては活性を示し、*p*NP- β -L-Arap に対しても弱い活性を示したが、試験した他の *p*NP 基質に対しては活性を示さなかった (Fig. 2-19)。

BlAga3 の基質特異性を調べたところ、天然に存在するオリゴ糖の中で最も適した基質は α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara であった (Table 2-8)。BlAga3 は還元末端にメチル基が付加した α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-OMe にも作用するが、その活性は α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対する活性よりも相対活性が 22.3% と低かった。これは、サブサイト+1 におけるアラビノースがピラン環構造をとることが酵素活性に影響していると考えられる。さらに、BlAga3 は S3-GA と S5-GA には弱い活性を示し、アラビアガム AGP やカラマツ AGP には活性を示さなかった (データ省略)。また、この酵素は血液型 B の直鎖三糖には α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に比べて 17.1% と低い反応性で活性を示したが、血液型 B の分岐型三糖にはほとんど反応しなかった。また、 β 1,3-L-アラビノピラノシル結合に対してわずかに活性を示したものの、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対する酵素活性は、 α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に比べて 0.643% と低かった。この二機能性の酵素は、GH36 や GH27 の酵素で見られる D-Gal と L-Arap の構造的類似性によるものであると考えられる(89)。これらの結果から、BlAga3 は主に α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を切断する α -D-galactosidase であることが示された。BlAga3 は、他の多くのビフィズス菌 GH36 の α -D-galactosidase と同様に、メリビオース、ラフィノース、スタキオースに対しても活性を示したが、その相対活性は α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対してそれぞれ 23.4%、47.7%、3.36% と低かった (Table 2-8)。

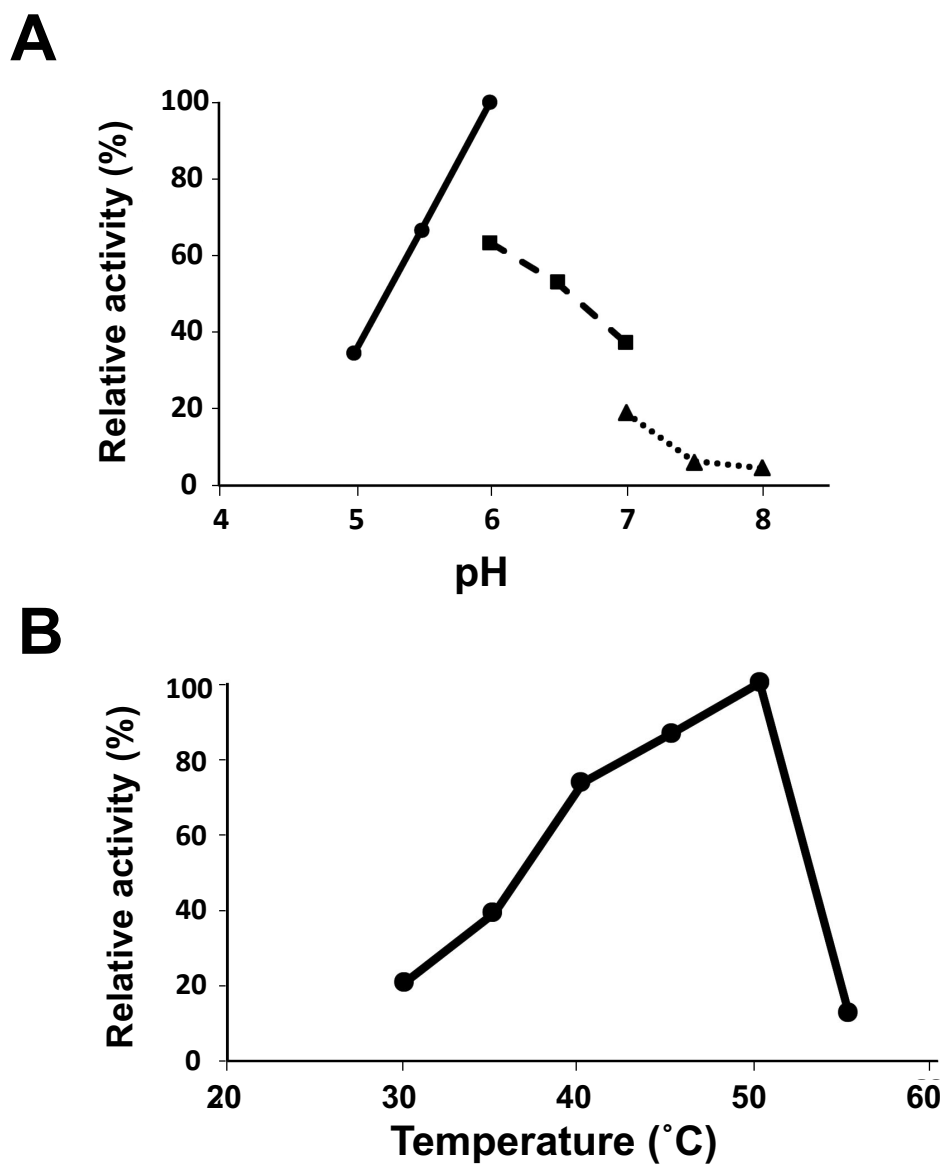


Fig. 2-18. Optimal pH and temperature of BIAga3.

(A) pH dependence of BIAga3 activity in various buffers at 40 °C for 20 min. Sodium acetate buffer (closed circle and solid line), sodium phosphate buffer (closed square and dashed line), and Tris-HCl buffer (closed triangle and dotted line) were used. Enzyme activities are expressed as a percentage of the activity in sodium acetate buffer at pH 6.0. (B) the temperature dependence of BIAga3 activity at pH 6.0 for 20 min. The enzymatic activities are expressed as the percentage of the activity at 50 °C.

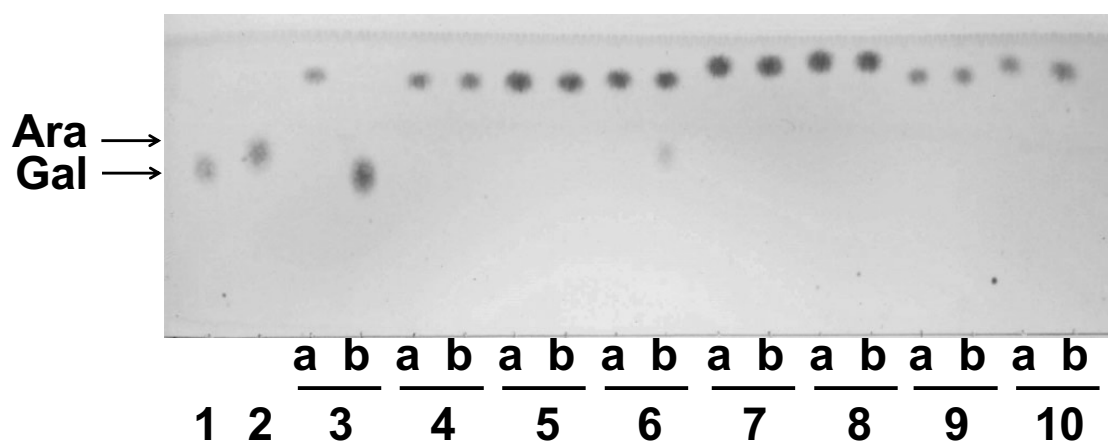
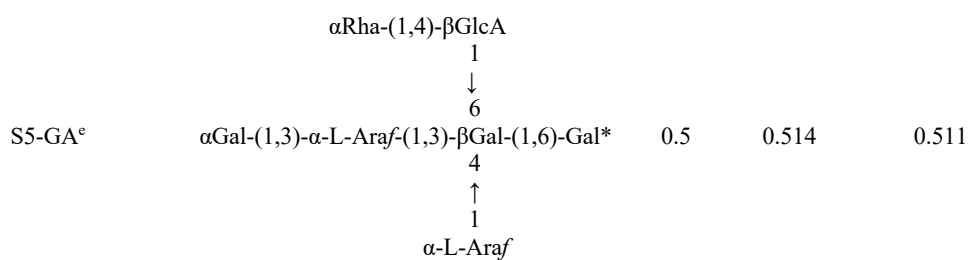
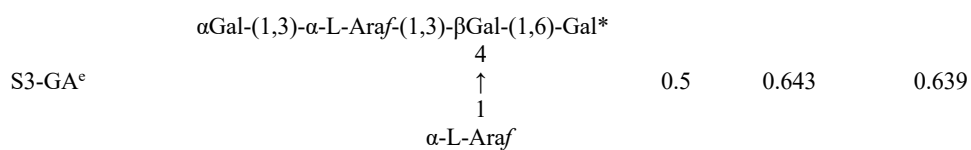


Fig. 2-19. TLC analysis of BLAga3 reactions to *pNP* substrates.

The *pNP* substrates were incubated in the absence (lane a) or presence (lane b) of the recombinant BLAga3 at 37 °C for 16 h. Lane 1, galactose standard; lane 2, L-arabinose standard. *pNP*- α -D-Gal (lane 3), *pNP*- β -D-Gal (lane 4), *pNP*- α -L-Arap (lane 5), *pNP*- β -L-Arap (lane 6), *pNP*- α -D-Xyl (lane 7), *pNP*- β -D-Xyl (lane 8), *pNP*- α -D-Glc (lane 9), and *pNP*- β -D-Glc (lane 10) were used as substrates.

Table 2-8. Substrate specificities of BIARA3.

Substrate	Structure	Conc. (mM)	Specific activity (unit/mg)	Relative activity ^g (%)
α -Gal-(1,3)-L-Ara ^a	α Gal-(1,3)-L-Ara*	2.0	101	100
<i>p</i> NP- α -D-Gal ^a	α Gal- <i>p</i> NP	5.0	337	335
melibiose ^b	α Gal-(1,6)-Glc*	5.0	23.6	23.4
raffinose ^b	α Gal-(1,6)- α Glc-(1,2)- β Fru	5.0	48.0	47.7
stachyose ^b	α Gal-(1,6)- α Gal-(1,6)- α Glc-(1,2)- β Fru	5.0	3.38	3.36
GA-Me ^b	α Gal-(1,3)- α -L-Araf-OMe	2.0	22.4	22.3
β -L-Arap-(1,3)-L-Ara _{c, f}	β -L-Arap-(1,3)-L-Ara*	2.0	0.647	0.643
AA-Me ^c	β -L-Arap-(1,3)- α -L-Araf-OMe	2.0	Trace	Trace
<i>p</i> NP- β -L-Arap ^c	β -L-Arap- <i>p</i> NP	5.0	1.06	1.06
liner B-2 trisaccharide ^d	α Gal-(1,3)- β Gal-(1,4)-GlcNAc*	0.5	17.2	17.1
blood group B trisaccharide ^e	α Gal-(1,3)-Gal* 2 ↑ 1 αFuc	0.5	0.610	0.607
blood group B pentasaccharide ^e	α Gal-(1,3)- β Gal-(1,4)-Glc* 2 3 ↑ ↑ 1 1 αFuc αFuc	0.05	Trace	Trace



*Represents reducing end of the oligosaccharide.

^a 0.099 μg/mL BlAga3 was incubated for 20 min.

^b 0.099 μg/mL BlAga3 was incubated for 2 h.

^c 0.099 μg/mL BlAga3 was incubated for 6 h.

^d 0.020 μg/mL BlAga3 was incubated for 1 h.

^e 0.020 μg/mL BlAga3 was incubated for 5 h.

^f The specific activity was calculated on the value for released L-arabinose by one-half.

^g Relative activity is expressed as the percentage of the activity toward α-D-Gal-(1→3)-L-Ara.

基質として0.1~10 mMの α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Araと1.0~50 mMのラフィノースを用いて、BlAga3の反応の速度論的パラメーターを決定した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) と BlAga3 を含む 40 μ L の反応混合物を 45°C で 20 分間インキュベートした。BlAga3 の濃度は α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の場合、0.20 μ g/ml であり、ラフィノースの場合、0.79 μ g/mL の BlAga3 を反応させた。10 μ L の 5% TCA を加えて反応を終了させ、生成物を HPAEC-PAD で分析した。反応の速度論的パラメーターの比較から、BlAga3 の α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対する K_m はラフィノースに対する K_m より 38.2 倍低く、 α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の k_{cat}/K_m はラフィノースに対するそれより 15.0 倍高いことがわかった (Table 2-9)。このことから、 α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara とラフィノースの基質親和性の違いが活性に寄与していることが示唆された。

Table 2-9. Kinetic parameters of BlAga3.

	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹)
α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara	0.774 \pm 0.014	107 \pm 21	138
raffinose	29.5 \pm 1.0	270 \pm 6	9.17

GAfase が遊離する二糖の資化性試験

GAfase の反応生成物である α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara および β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の資化性を評価するために、*Bi. longum* JCM1217 および JCM7052 を、0.2% の α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara または β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を唯一の炭素源として含む MRS 培地で 48 時間培養した。*Bi. longum* JCM7052 は、48 時間後に α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 上で生育を示したが、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 上では生育しなかった (Fig. 2-20A)。一方、JCM1217 は、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara および β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara のいずれにおいても顕著な成長を示さなかった。培養上清の分析は、これらの結果をさらに裏付けるものであり、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara のピークは JCM7052 でのみ減少し、JCM1217 では減少しなかったが、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara のピークはいずれの場合も減少しなかった (Fig. 2-20B)。

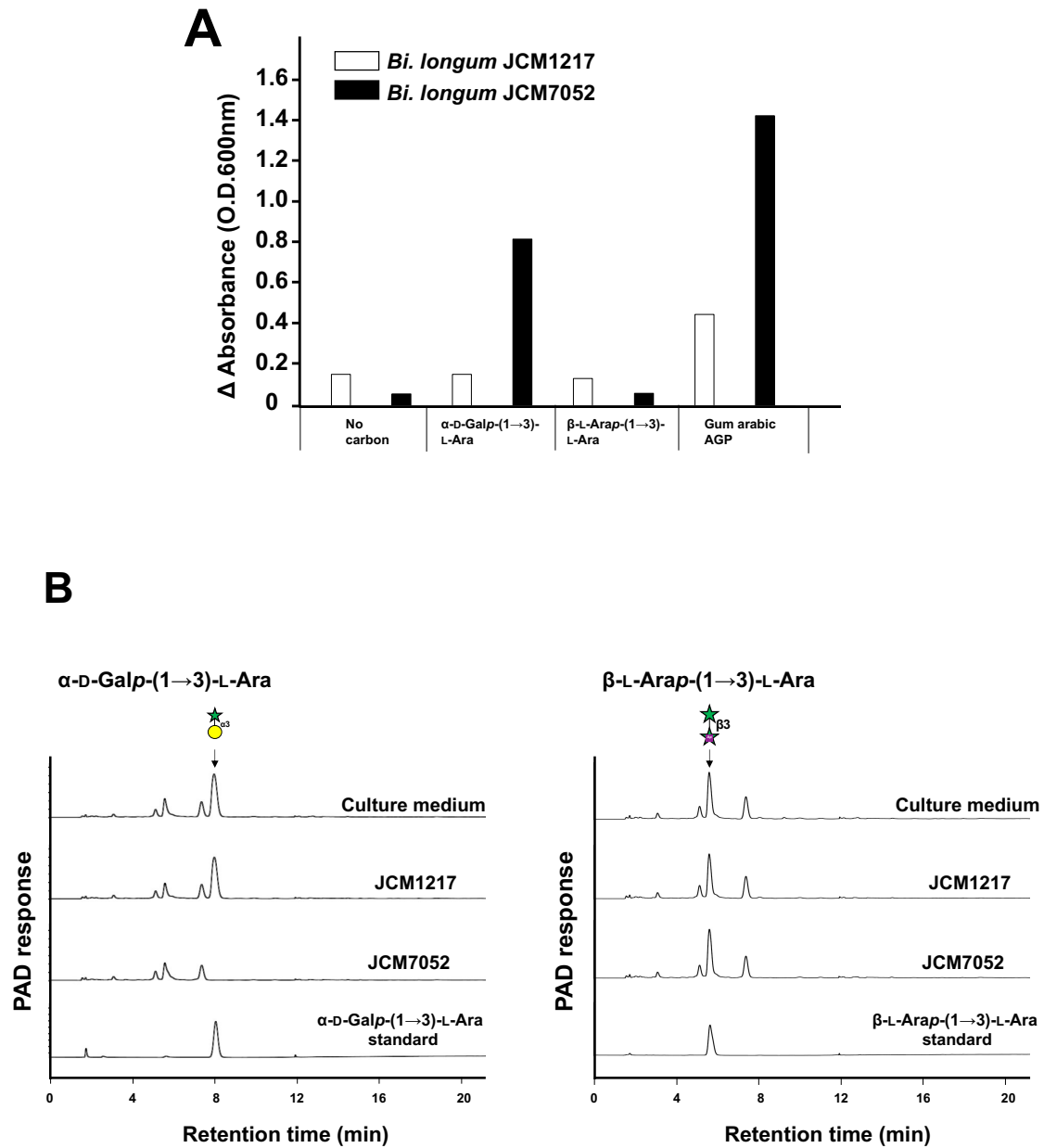


Fig. 2-20. *In vitro* assimilation test of α -D-Galp-(1→3)-L-Ara and β -L-Arap-(1→3)-L-Ara. (A) Growth of *Bi. longum* JCM1217 and JCM7052 strains was monitored in MRS medium containing 0.2% α -D-Galp-(1→3)-L-Ara, β -L-Arap-(1→3)-L-Ara or 2% gum arabic AGP as the sole carbon source. The absorbance of growth media in *Bi. longum* JCM1217 (white) and JCM7052 (black) were calculated by subtracting the values of initial media. (B) HPAEC-PAD analysis of the culture supernatant of α -D-Galp-(1→3)-L-Ara (left) and β -L-Arap-(1→3)-L-Ara (right) after incubated for 48 hours. Purified α -D-Galp-(1→3)-L-Ara and β -L-Arap-(1→3)-L-Ara were used as standards.

第四節 考察

本章では、*Bi. longum* JCM7052 からアラビアガム資化性に関わる遺伝子クラスターを発見し、本遺伝子クラスター上の BLGA_00340 と BLGA_00330 にはそれぞれ菌体表層局在型酵素 GH39 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase (GAfase)と菌体内酵素 GH36 α -D-galactosidase がコードされていることを見出した。

これにより、*Bi. longum* JCM7052 におけるアラビアガム AGP の資化のメカニズムが明らかになった(Fig. 2-21)。まず、GAfase がアラビアガム AGP から α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を遊離し、そのうちの α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara は、ABC 輸送システム (BLGA_00300、00310、00320、00350) を介して細胞内に取り込まれると推定され、細胞内の GH36 α -D-galactosidase (BLGA_00330) が α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を加水分解してガラクトースと L-アラビノースに分解する。これらの単糖は最終的にビフィズス菌が持つ特殊な代謝機構である「ビフィドシャント」を経て異化され、酢酸と乳酸が生成される(90)。*Bi. longum* JCM7052 は α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を炭素源として使用したが、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara は使用しなかったことと、GH36 の α -D-galactosidase (BLGA_00330、BlAga3) が β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara よりも α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対して高い基質特異性を示すことから、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara は利用されずに培地中に残存することが示唆された。ABC 輸送システム (BLGA_00300、00310、00320、00350) が α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を輸送していることを直接示す結果は得られていないため、さらなる転写解析や、基質結合タンパク質候補遺伝子 (BLGL_00300) の機能解析および標的遺伝子変異導入などを行う必要があるものの、同一の遺伝子クラスターにコードされているためアラビアガム AGP 分解物の取り込みに関与していると考えられる。

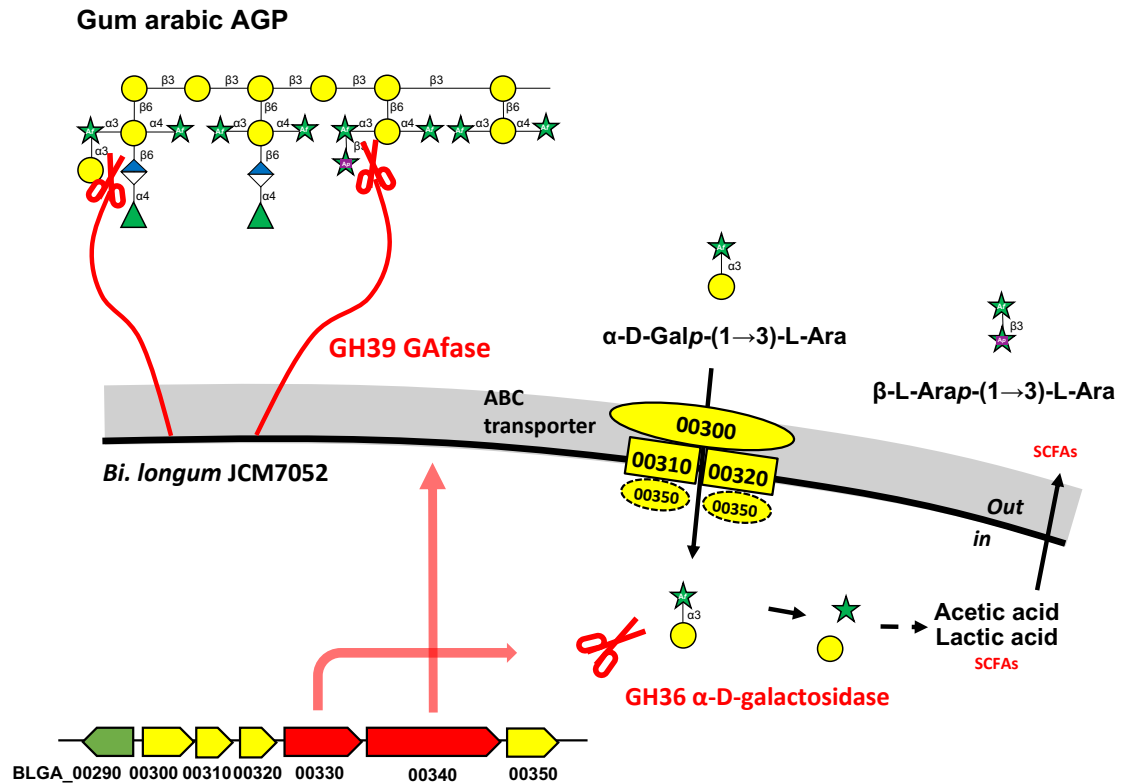


Fig. 2-21. Schematic model of the degrading of gum arabic AGP by *Bi. longum* JCM7052.

GAfase は、GH39 ファミリーに属するアノマー保持型酵素に分類されたが、基質特異性の新規性より、新たな EC 番号 EC 3.2.1.215 が付与された。GAfase や他の成人型ビフィズス菌由来 GAfase ホモログは、既に性質決定された GH39 の β -xylosidase やルーメン嫌気性真菌の酵素とアミノ酸配列の同一性が低く (25%未満)、GH39 メンバーの中では系統的に離れていた。このことから、GAfase を含むタンパク質は GH39 の新しいサブファミリーを構成していると考えられる。アノマー保持型酵素による加水分解反応は、2 つの触媒残基を含む二重置換機構によって進行し、通常、グルタミン酸またはアスパラギン酸のいずれかが触媒アミノ酸残基として用いられる(91)。GH39 の D-galacto(α -1,2)-L-arabinosidase の触媒アミノ酸残基に対応する GAfase の Glu-194 および Glu-321 を Gln で置換すると、酵素活

性が失われることがわかった。そのため、これらの残基が GAfase の触媒残基であると考えられた。GAfase の α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の遊離活性は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の遊離活性の 594 倍高く、GAfase は *p*NP- α -L-Araf を含む試験したどの *p*NP 基質に対しても活性を示さなかった。これらの結果から、GAfase は-1 サブサイトの α -L-Araf を厳密に認識し、酵素活性には-2 サブサイトに対応する α -D-Galp や β -L-Arap の存在が必須であるエキソ型の酵素である可能性が示唆された。 β -L-Arap と α -D-Galp の違いは、ピラノース環の C6 の有無のみである。この構造類似性のため、 β -L-arabinopyranosidase や α -D-galactosidase は、 α -D-Galp や β -L-Arap の両方が基質となることも多い(89, 92)。GAfase もアラビアガム AGP から α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を主に遊離するものの、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara も副次的に遊離する。また、 α -L-(β -1,2)-arabinofuranobiosidase または D-galacto(α -1,2)-L-arabinosidase として性質決定された 4 つの GH39 酵素の-1 および-2 サブサイトに対応するアミノ酸残基を、GAfase のアミノ酸残基と比較した (Fig. 2-14) (67)。GAfase の-2 サブサイトに存在するアミノ酸残基は、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-L-Ara 遊離酵素である D-galacto-(α -1,2)-L-arabinosidase のアミノ酸残基とは異なっていた。さらに、そのアミノ酸残基は、*Bi. pseudocatenulatum* 由来の GAfase ホモログのアミノ酸残基とも異なっていた。筆者らは、*Bi. pseudocatenulatum* 由来の GAfase ホモログは α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara よりも、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を優先的に遊離する酵素であることを明らかにした(未発表データ)。さらに、-2 サブサイトのアミノ酸に部位特異的の変異導入を行った解析によって、GAfase の-2 サブサイトに位置するアミノ酸残基は、 α 1,3 結合した Galp の配向に適している可能性があることが示唆された(未発表データ)。

GAfase は、C 末端領域に 2 つの CBM35 ドメインと 1 つのガラクトース結合ドメイン様スーパーファミリドメインを持つ。現在までに、CBM35 と CBM13 として性質決定されたものは、側鎖を欠く β 1,3-ガラクトタン主鎖に結合するが、未処理のアラビアガム AGP には

結合しないことが示されている(93-95)。例えば、*Phanerochaete chrysosporium* 由来の $\text{exo-}\beta\text{-1,3-galactanase}$ の CBM35 (以前は CBM6 に分類されていた) (GenBank ID: BAD98241.1)は、2つの連続した $\beta\text{-1,3}$ 結合の Galp 残基を認識するのに重要であることが報告されている(93)。

N末端から3番目のドメイン (aa 791-966) は、*Phanerochaete chrysosporium* 由来の CBM35 ドメインと 35%のカバレッジで 34.1%のアミノ酸配列の同一性を示す。GAfase の CBM 欠損変異体を発現させ、可溶化に成功したものの、この変異体は多糖基質であるアラビアガム AGP だけでなく、 $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Araf-OMe}$ に対する酵素活性も完全に消失させた(データ省略)。このことから、GAfase の触媒活性には、C末端の CBM ドメインが必須であると考えられる。これまでの報告によると、モジュラー型酵素の触媒モジュールは独立して機能することが多く(49, 96)、CBM の一般的な機能として、基質(特に多糖基質や不溶性基質)と酵素との相互作用を促進し、触媒活性を高める役割がある。一方、触媒モジュール CtGH5 と CtCBM6 で構成される *Clostridium thermocellum* 由来のアラビノキシラン特異的 xylanase CtXyl5A や、GH26 と CBM35 で構成される *Podspora anserina* 由来の $\beta\text{-}(1,4)\text{-mannanase PaMan26A}$ では、CBM ドメインを欠損した変異体で酵素活性が失われ、CBM と触媒モジュールが独立して機能していない例もあることを示した(97, 98)。これらの酵素の触媒モジュールと CBM ドメイン間に存在するリンカー領域は、触媒モジュールと CBM ドメインと相互作用し、表層に存在する疎水性残基が埋没することにより、可溶化し、コンフォメーションの安定化に寄与している。GAfase の場合、欠損変異体において、タンパク質が可溶化していることが確認されていることから、不溶化による活性の消失ではないと考えられるものの、GAfase の触媒モジュールも CBM との相互作用によって活性型に保たれていた可能性がある。

AGP の構造解析には、 $\text{exo-}\beta\text{-1,3-galactanase}$ (EC 3.2.1.145)、 $\text{endo-}\beta\text{-1,3-galactanase}$ (EC

3.2.1.181)、endo- β -1,6-galactanase (EC 3.2.1.164)、 α -L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40)、 β -L-arabinopyranosidase (EC 3.2.1.88)、 α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)、4-O-methyl- α -glucuronidase (EC 3.2.1.-)、 α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22)、4-O- α -L-rhamnosyl- β -D-glucuronidase (EC 3.2.1.31) など、いくつかの酵素を用いることができ、これらの酵素に加えて、GAfase はアラビアガム AGP の構造解析のための有望なツールとなりうる。GAfase 処理により、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara のアラビアガム AGP 含有量は、それぞれ 9.3%と 1.87%(w/w)であることが分かった。先行研究におけるメチル化分析の結果、アラビアガム AGP には、末端 Gal が 12 mol%、末端 Arap が 1 mol%含まれていた(99)。これらの二糖単位は、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara がほぼ 12:1 のモル比で含まれていると考えられる。さらに、アラビアガム AGP の構造解析の結果も、本研究で報告された実験値を支持している(100)(101)。A-D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 構造はアラビアガム AGP で見つかっている他、アフリカ南部に自生する *Watsonia pyramidata* の球茎のう状部のガム滲出液のキシランの側鎖構造中にも存在する(102-104)。そのため、これらを基質として GAfase が作用する可能性もある。また、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara はカラマツ AGP(105)および小麦 AGP(106)で見つかっている。本研究では、GAfase がシュガービートアラビナンから β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を遊離させる弱い活性を示すことを見出したが、シュガービートアラビナンはこの二糖を含むことがこれまでに報告されていない(32, 67)。AGP は植物細胞壁のペクチンやキシランに共有結合しているため、これら市販の植物多糖類には混入物としてわずかな AGP が含まれていると考えられる(107)。

さらに、菌体内酵素 GH36 α -D-galactosidase において、*Bi. longum* JCM7052 は、BLGA_00330 (blAga3)、BLGA_18610 (blAga2)、BLGA_18750 (BlAga1) の 3 つの GH36 α -D-galactosidase 候補遺伝子をコードしていることが分かった(83)。これまでの研究から、

BlAga1 は α -(1→6)-ガラクトシル結合を持つラフィノース、メリビオース、スタキオースの資化に関与し(84-86)、BlAga2 は、 α -(1→4)または α -(1→3)のガラクトシル結合を持つ α -ガラクトビオースを分解する可能性が高いと考えられた(85)。本研究では、新たに、BlAga3 がアラビアガムの菌体内での分解に関わっていることが明らかになった。

第三章 α 1,4-Araf に作用する α -L-arabinofuranosidase の酵素学的特性と菌体表層酵素の協調作用によるアラビアガム AGP の分解機構

第一節 序言

前章において、*Bi. longum* JCM7052 は菌体表層局在型 GAfase を用いて、アラビアガム AGP を資化していることが明らかになった。アラビアガム AGP の β 1,6-ガラクトシル側鎖末端には GAfase が作用しうる α 1,3-結合の α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara や β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara が存在する他、 α 1,3-または α 1,4-結合の L-Araf や、 β 1,6-結合の α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA が存在している(24, 100)。

Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) データベースに基づくと、*Bi. longum* JCM1217 は 9 つの α -L-arabinofuranosidase をコードし、そのうち 6 つは細胞表層局在型 GH43 で、3 つは菌体内 GH51 の α -L-arabinofuranosidase であった。GH43 の α -L-arabinofuranosidase では、HypAA (BLLJ_0213) が GH43 サブファミリー-29 (GH43_29) ドメインを持ち、 α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- β -L-Araf-(1 \rightarrow 2)- β -L-Araf-(1 \rightarrow 2)- β -L-Araf-Hyp を分解する、 α 1,3-Araf 特異的な α -L-arabinofuranosidase として報告された(33)。BLLJ_1850-BLLJ_1854 は連続して配置されており、我々は以前に、BlArafA (BLLJ_1854) は GH43 サブファミリー-22 (GH43_22) ドメインを持ち、カラマツ AGP の α 1,3-Araf 残基に作用することを報告した(30)。また、BlArafB (BLLJ_1853) は GH43_22 を有し、アラビナン骨格の α 1,5-Araf 結合を加水分解し、BlArafC (BLLJ_1852) は GH43 サブファミリー-27 (GH43_27) を有し、アラビナン側鎖の α 1,2-および α 1,3-Araf 結合を加水分解することが分かっていた(31)。最近、BlArafD (BLLJ_1851) と BlArafE (BLLJ_1850) が協調してアラビノキシランを分解することが見出された (M. Komeno *et al.*, 未発表データ)。BlArafD (BLLJ_1851) は GH43 の中で未分類のサブファミリー-(GH43_UC) と GH43 サブファミリー-26 (GH43_26) ドメインを含んでおり、GH43_UC は

α 1,2-および α 1,3-Araf 二重置換アラビノキシランの α 1,2-Araf 結合に作用し、一方 GH43_26 はアラビナン骨格に作用する。BlArafE (BLLJ_1850) は GH43_22 と GH43_34 のドメインを持ち、GH43_22 はアラビノキシランの α 1,3-Araf 結合に作用することが分かった。しかし、GH43_34 の基質特異性は不明のままであった。

A-L-Araf 構造は、アラビナン (108, 109)、アラビノキシラン(110)、アラビノキシログルカン(111, 112)、アラビノガラクトタン(48, 100, 106)、ヒドロキシプロリン結合型 β -L-アラビノオリゴ糖鎖(113)、ラムノガラクトロン (RG)-II (25)など植物細胞壁の構成成分において、 α 1,2/1,3/1,5-結合で存在している。一方、L-アラビノースの α 1,4-結合は、ペクチンの RG-II 構造ではピラノース型で見られ(25)、植物由来の糖鎖の中ではアラビアガム AGP に α 1,4-Araf 構造が報告されているのみである(56)(101)。この限られた局在性のために α 1,4-Araf 特異的 α -L-arabinofuranosidase は、これまでどの生物においても報告されていないと考えられる。GAfase による α 1,3-結合の α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara や β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の除去は、 α 1,4-Araf に作用する α -L-arabinofuranosidase にとっての立体障害を解消すると考えられた。

本章では、*Bi. longum* JCM1217 菌体酵素と JCM702 菌体酵素を用いた分解性試験により、どちらの菌株にも菌体外に α -L-arabinofuranosidase 活性が見られたことから、両菌株に保存された BlArafE・BlArafB・BlArafA のいずれかが α 1,4-Araf 結合に特異的な α -L-arabinofuranosidase であると予想し、その探索を行った。

第二節 実験方法

基質の調製

a) α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP の調製

α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP は、GAfase の生成物阻害を避けるために、Membrane-enclosed enzymic catalysis (MEEC) アプローチを用いて調製した(114)。アラビアガム AGP (1%) を GAfase (0.120 mg/mL) と透析膜 (サイズ 36; 和光純薬工業株式会社, 大阪) 中で 37°C でインキュベートし、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に対して透析した。その後、エタノール沈殿法により多糖類を沈殿させた。

b) 限界分解物 S4 の調製

カラマツ AGP で培養した *Bi. longum* JCM7052 の菌体画分を、アラビアガム AGP (最終濃度: 5.0%) と 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) と 400 mL 中で 53 時間インキュベートしてオリゴ糖 S4 を得た。エタノール沈殿により遊離オリゴ糖を得て、上清を乾固させた。オリゴ糖 S4 は、水で平衡化した Bio-Gel P-2 カラム (ϕ 25 \times 830 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーと、20 mM リン酸ナトリウム (pH2.5) で溶出する Cosmosil PBr カラム (ϕ 4.6 \times 250 mm; ナカライテスク) を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離した。最後に、水で平衡化した Bio-Gel P-2 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより脱塩した。

NMR 構造解析ならびに MS 解析

凍結乾燥したサンプルは重水 (D₂O) に溶解した。解析は理化学研究所の石渡氏らの協力により以下の条件下で行われた。¹H および ¹³C NMR スペクトルおよび 2D スペクトル

(H-H COSY、HMQC with/without C-H decoupling、HMBC) は、JEOL ECX 400 スペクトロメーター (400 MHz) を用いて、D₂O 中で室温で測定した。MS 分析では、SHIMADZU Kompact MALDI AXIMA-CFR を用いて、2,5-ジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして MALDI-TOF マススペクトルを記録した。ESI-TOF のマススペクトルは、JEOL AccuTOF JMS-T700LCK で、CF₃CO₂Na を内部標準として記録した。

培養試験

a) GAfase 処理アラビアガム AGP を用いた *Bi. longum* の資化性試験と残存糖解析

Bi. longum MCC00300、MCC00055、MCC00198、MCC00231、JCM1217、JCM7052 を *In vitro* での資化性試験に使用した。入手先は第二章に記載した通りである。これらの菌株は、AnaeroPack システム (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) を用いて、0.05% L-システイン塩酸塩を含む MRS+cys 培地で、嫌気性条件下、37°C で前培養した。*Bi. longum* JCM1217 と JCM7052 株のみを用いた試験では、前培養した菌体を、1.0% のアラビアガム AGP または、 α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP を唯一の炭素源として含む MRS 培地に植菌し、嫌気性条件下、37°C で 48 時間培養した。13.5h、18h、22h、39h、48h 経過後の 600 nm の吸光度を測定した。反応は 3 連で行い、平均値と標準偏差を示した。BlArafE の保存性の異なる上記 6 菌株を用いた資化性試験では、1.0% の α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP を唯一の炭素源として含む MRS 培地に植菌し、嫌気性条件下、37°C で 48 時間培養した。8h、12h、23h、48h 経過後の 600 nm の吸光度を測定した。反応は 2 連で行った。培養後の残存糖解析では、 α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP に付加する L-arabinose の存在を調べるために、エタノール沈殿を用いて多糖類画分を分離した。このエタノール沈殿沈殿物を水に溶かし、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液中の 3.66 μ g/mL

の BIArafE と 37°C で 16 時間 インキュベートし、反応生成物を上述の TLC で分析した。

b) *Bacteroides* 属細菌の資化性と菌体酵素活性

In vitro 資化性試験に用いた *Bacteroides* は、Japan Collection of Microorganisms (RIKEN Bioresource Centre, Ibaraki, Japan) から *Bacteroides thetaiotaomicron* JCM5827 (*Ba. the*)、*Ba. caccae* JCM9498 (*Ba. cac*)、*Ba. cellulosilyticus* JCM15632 (*Ba. cell*)、*Ba. ovatus* JCM5824 (*Ba. ova*)、*Ba. vulgatus* JCM5826 (*Ba. vul*)、および *Ba. uniformis* JCM5828 (*Ba. uni*) の六種を入手した。これらの菌株は、変法 GAM 培地 (Nissui Pharmaceutical, Japan) を用いて、37°C の嫌気的条件下で前培養した。前培養した菌体を、S4 を唯一の炭素源として含む最小培地 (最終濃度 0.5% [w/v]) により、37°C の嫌気性条件下で培養した。最小培地の組成は、既報(115) に従い、100 mM KH_2PO_4 、15 mM NaCl、8.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、4 mM L-システイン、200 μM L-ヒスチジン、1.9 μM ヘマチン、100 μM MgCl_2 、1.4 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、50 μM CaCl_2 、1 $\mu\text{g/ml}$ ビタミン K_3 、5 ng/ml ビタミン B_{12} とした。0、6、12、24、48 時間後に 600 nm の吸光度を測定した。実験は 3 連で測定し、平均値と標準偏差を示した。24 時間および 48 時間培養した後の上清の TLC により、残存する S4 を分析した。

α -L-arabinofuranosidase 候補遺伝子 (BIArafA、BIArafB、BIArafE) のクローニングならびに諸性質決定

a) 発現プラスミドの構築

BLLJ_1850 の遺伝子 (BIArafE ; BAJ67514) の PCR 増幅には、*Bi. longum* JCM1217 のゲノム DNA (GenBank Accession No.AP010888.1) を鋳型として用いた。フォワード (BLLJ_1850_for) およびリバース (BLLJ_1850_rev) プライマーは、N 末端のシグナルペ

プチド (aa 1-26) および C 末端の膜貫通領域 (aa 1637-1659) の配列を含まない BlArafE の 88-4899 を増幅するために設計した。使用したプライマーは、Table 3-1 に記載した。BlArafE 遺伝子は、KOD plus ver.2 (Toyobo, Japan)を用いた high-fidelity PCR で増幅し、増幅した断片を pET23b (+) ベクター(Novagen, USA)の *EcoRI* および *XhoI* サイトにライゲーションした。

b) 組換えタンパクの発現と精製

得られたプラスミドを用いて、*E. coli* BL21 (λ DE3) 細胞 (Genlantis, San Diego, CA, USA) を形質転換した後、Overnight Express Autoinduction System (Novagen) を用いて 25°C で振盪培養した。培養した細胞を遠心分離し、得られた培養菌体を BugBuster タンパク質抽出試薬 (Novagen) に懸濁した。N 末端に His タグを持つ BlArafE タンパク質を、TALON metal-affinity resin (Clontech) を含むカラムを用いて精製した。精製された画分は、限外濾過膜 (30kDa MWCO ; Millipore Co., Billerica, MA, USA) を用いて脱塩・濃縮した。また、本研究で用いた組換え BlArafA、BlArafB、Bl1,3Gal は既報に基づいて得た (30, 31)。GAfase、BlAga3 は第二章に記載した方法で得た。

c) 基質特異性

多糖類 (アラビアガム AGP、カラマツ AGP、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP)、アラビアガム AGP 関連オリゴ糖 (S5-GA、S5-A、S5、S4-A、S3-GA、S3-A、S3)、pNP 基質 (pNP- α -L-Araf、pNP- β -D-Xylp) を基質として、組換え酵素の反応性を調べた。多糖類の場合、各基質 (最終濃度 1.0%) を 40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で、2.2 nM BlArafA、2.2 nM BlArafB または 1.4 nM BlArafE と 37°C で 16 時間インキュベ

ートした。アラビアガム AGP 関連オリゴ糖の場合、各基質（最終濃度 0.01 mM）を 100 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）中で 0.88 nM BIarafA、0.90 nM BIarafB または 0.57 nM BIarafE と 37°C、16 時間インキュベートし、反応生成物を TLC または HPAEC-PAD で分析した。

d) 変異体作成と活性測定

KOD Plus mutagenesis kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて、特定のプライマーを用いて BIarafE に D571A および D1197A のアミノ酸置換を導入した (Table 3-1)。その塩基配列は、シーケンスによって確認した。BIarafE_D571A および BIarafE_D1197A 変異体は、BIarafE の野生型酵素（WT）と同様の方法で発現・精製した。変異体酵素の酵素アッセイは、アラビアガム AGP 関連オリゴ糖（S5-GA、S5-A、S5、S4-A）および多糖類（アラビアガム AGP、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP、カラマツ AGP) を用いて測定した。アラビアガム AGP 関連オリゴ糖については、S5-GA、S5-A、S5（最終濃度：0.025 mM）を 100 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）中で 0.80 nM BIarafE_WT、1.1 nM BIarafE_D571A または 0.47 nM BIarafE_D1197A と 37°C で 16 時間インキュベートした。S4-A（最終濃度：0.024 mM）を 20 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）中で、2.1 nM BIarafE_WT、2.9 nM BIarafE_D571A または 1.2 nM BIarafE_D1197A と 37°C で 16 時間インキュベートした。多糖類（最終濃度：1.0%）は、40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）中で、1.0 nM BIarafE_WT、1.4 nM BIarafE_D571A または 0.57 nM BIarafE_D1197A と 37°C で 16 時間インキュベートした。反応生成物は前述のように TLC または HPAEC-PAD で分析した。

Table 3-1. The primers for plasmid construction and site-directed mutagenesis.

Name	Sequence of oligonucleotide primers
BLLJ_1850_for	5'-CCCAAGCTTGATACCACCGATTCATCGGCCGC-3'
BLLJ_1850_rev	5'-GTGCCGCTCGAGGGAGATGACGGCACCCGGCTTCTTG-3'
BLLJ_1850_D571A_for	5'-ACCACGATGATTAAGGCCGA-3'
BLLJ_1850_D571A_rev	5'- <u>TGCGATA</u> ACGGACTTGAC-3'
BLLJ_1850_D1197A_for	5'-CCGTCCATCTTCACCGACC-3'
BLLJ_1850_D1197A_rev	5'- <u>TGCGAT</u> GGCCTGTCCAAC-3'

The positions of the mutated sequences are underlined.

II型 AG 分解酵素群を用いた協調作用

アラビアガム AGP (0.25%) を 40 μ L の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で、20 nM の GAfase、Bl1,3Gal、BlArafE の異なる組み合わせで 37°C、24 時間インキュベートした。反応生成物は HPAEC-PAD で分析した。3 連で行った実験のうち、結果には代表的な 1 つのクロマトグラムを示した。また、菌体酵素活性を測定するために、カラマツ AGP 上で増殖した *Bi. longum* JCM1217 および JCM7052 の凍結融解した菌体ペレットを、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液中で、1.0%アラビアガム AGP または α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP と 37°C、16 時間インキュベートし、反応生成物を HPAEC-PAD で分析した。

第三節 結果

α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP を用いた *in vitro* 培養試験

Bi. longum JCM1217 と JCM7052 について、1.0%の α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP と未処理のアラビアガム AGP を用いて *in vitro* の資化性試験を行った。注目すべきことに、未処理のアラビアガム AGP で資化性を示さなかった JCM1217 は、 α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP で JCM7052 と同等の生育を示した (Fig. 3-1A)。

そこで、資化性に関連する酵素を調べるために、 α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP に対して、カラマツ AGP を含む MRS+cys 培地で培養した JCM1217 および JCM7052 培養菌体を反応させた (Fig. 3-1B)。JCM1217 培養菌体の反応生成物には、アラビアガム AGP に作用させた時と比較して、 α -D-Galp-(1→3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP に作用させた時は、オリゴ糖 S4 が増加し、S3-GA と S5-GA の分解物である S3 と S5 のピークに対応するオリゴ糖も見られた。また、顕著なアラビノース遊離量の増加が確認されたことから、GAfase が作用したことで、JCM1217 にも保存されている α -L-arabinofuranosidase や II 型 AG 主鎖をエキソ型で分解する *exo*- β 1,3-galactanase (BI1,3Gal) が作用しやすくなったことが示唆された。そこで、始めに GAfase 処理後のアラビアガム AGP に作用しうる α -L-arabinofuranosidase の特定を試みた。

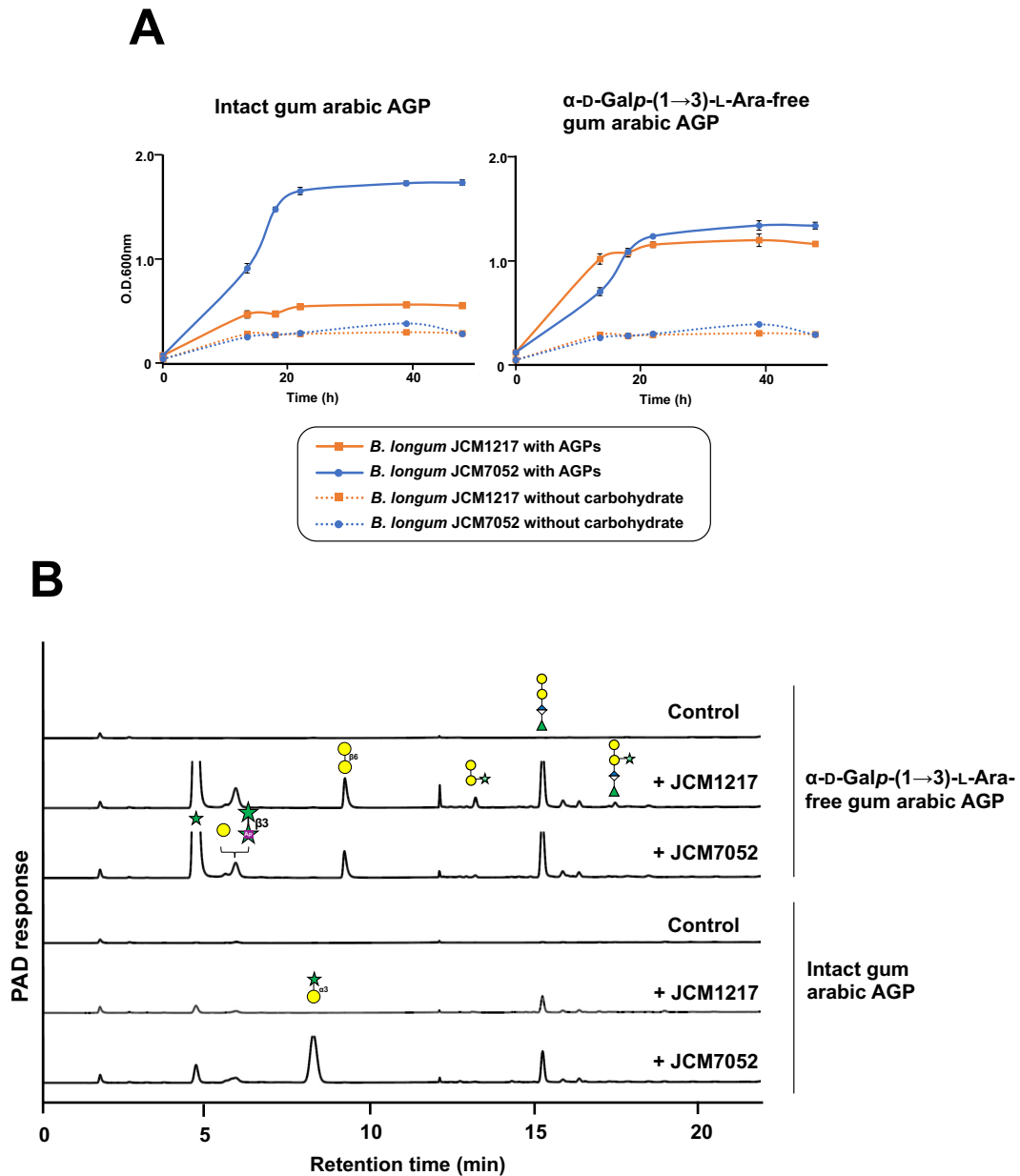


Fig. 3-1. *In vitro* assimilation test performed using α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP. (A) Growth profiles of *Bi. longum* JCM1217 and JCM7052 on gum arabic AGP (left) and α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP (right). Error bars indicate standard deviation ($n = 3$). (B) Intact gum arabic AGP and α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP were incubated with bacterial cell fractions of *Bi. longum* JCM1217 or JCM7052 grown in larch AGP. Reaction products were analyzed by performing HPAEC-PAD with a PA-1 column.

α 1,4-Araf 特異的な α -L-arabinofuranosidase の探索

Bi. longum JCM1217 株には II 型 AG の分解に関わる遺伝子クラスターの周辺に GH43 の α -L-arabinofuranosidase 遺伝子が 5 つ連続して並んでいる (Fig. 3-2A)。その遺伝子クラスターの中で、*Bi. longum* JCM1217 と JCM7052 に共通して見られる α -L-arabinofuranosidase は BlArafA、BlArafB、BlArafE であり、BlArafC と BlArafD は JCM7052 では保存されていなかった。 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP からのアラビノース遊離活性は JCM1217 と JCM7052 にどちらにおいても確認されたので、2 つの菌株に共通して保存される *BlArafA*、*BlArafB*、*BlArafE* を候補遺伝子とした。*BlArafA* と *BlArafB* においては既に性質決定が行われているため、本論文では *BlArafE* のクローニングならびに詳細な機能解析を行った。

BlArafA、*BlArafB*、*BlArafE* は共通して、N 末端側にシグナルペプチド、C 末端側に膜貫通領域を持ち、GH43_22、LamininG (LamG)、バクテリアの Ig 様ドメインが保存されている菌体表層局在型の酵素であった (Fig. 3-2B)。LamG ドメインの機能は不明であるが、GH43 の触媒ドメインと共に存在していることも多く、*Ruminiclostridium josui* 由来の α -L-arabinofuranosidase (RjAbf43A) において Laminin G-3 が糖結合モジュールとして機能しているという報告もある(116)。また、*BlArafE* は、GH43 サブファミリー-22 (GH43_22) と GH43_34 の 2 つの触媒ドメインを含むマルチドメインの α -L-arabinofuranosidase であった。*BlArafE* の 2 つの触媒ドメイン (GH43_22、GH43_34) と、これまでに性質決定された GH43 モジュールとで分子系統樹を作成した (Fig.3-2C)。*BlArafE* の GH43_34 モジュールは、*Ruminiclostridium josui* 由来の *exo*- α 1,5-arabinofuranosidase (117) と最も高い同一性 (57% の同一性) を持ち、GH43_22 モジュールは *Bi. adolescentis* 由来の β -xylosidase (118) と最も高い同一性 (51% の同一性) を持っていた。また、*BlArafE* の GH43_22 モジュールは、*BlArafA* お

よび BIArafB とそれぞれ 35% および 33% の相同性を有していた。

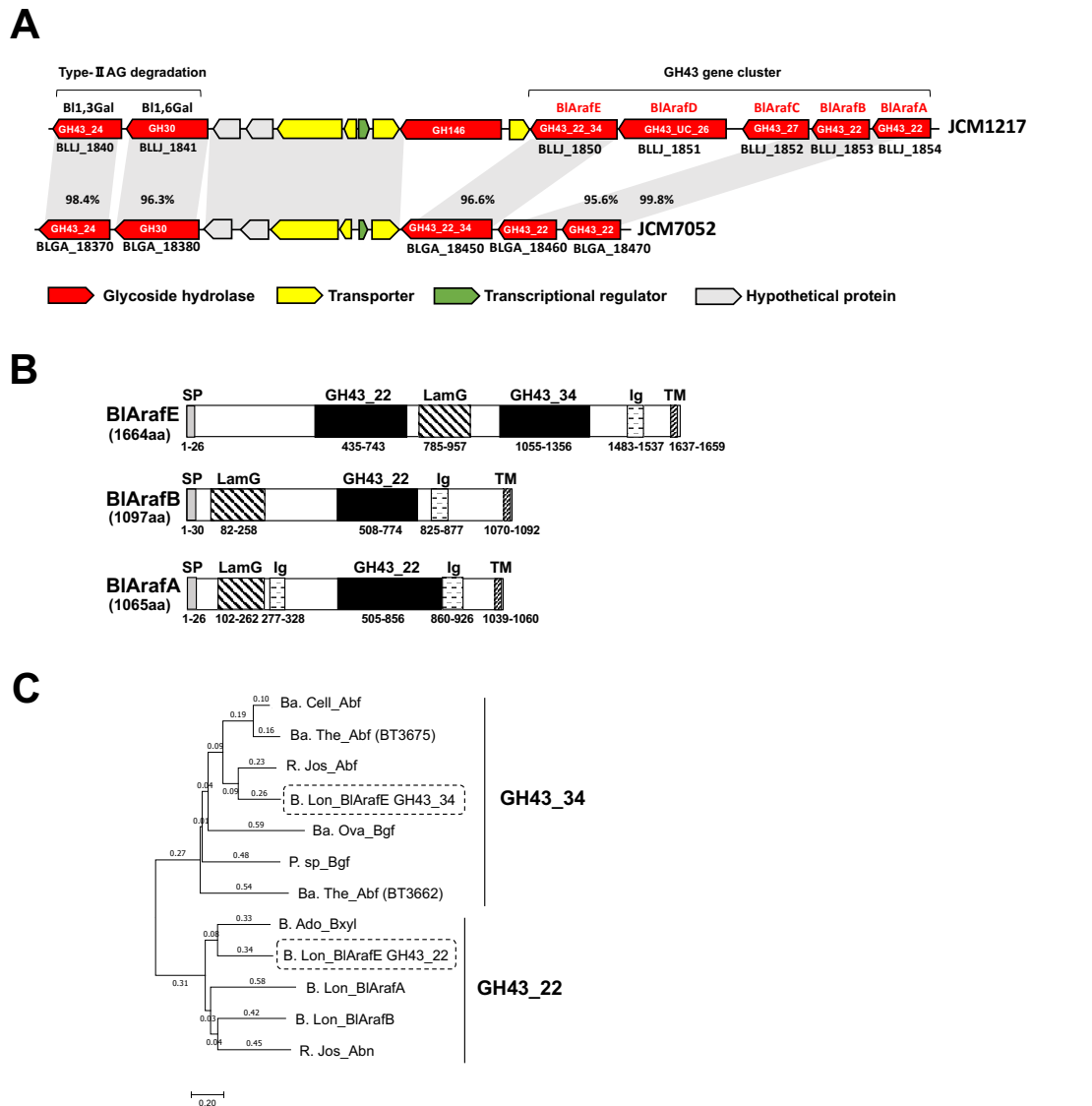


Fig. 3-2. Structural feature of the α -L-arabinofuranosidase candidates. (A) Gene clusters in *Bi. longum* JCM1217 and JCM7052 involved in the degradation of type-II AG. The arrowheads (with names below) indicate genes annotated in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database. The GHs in the Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) database are shown inside the red arrowheads. Light gray bars indicate orthologous regions (>95% identity). (B) Domain structure of BIArafE, BIArafB, and BIArafA. Domain structures were predicted using SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) servers. (C) Phylogenetic tree of GH43_34 and GH43_22 domains of BIArafE. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method and the aligned sequences. For the construction of

the tree, the program MUSCLE was implemented in MEGA7 software. GH43_34 and GH43_22 domains of BlAraF are enclosed in the dashed-line box. The characterized enzymatic activities or protein names are shown alongside the abbreviated names of the organisms as follows: Ba.

Cell_Abf, *Ba. cellulosityticus* α -L-arabinofuranosidase (GenBank ID: ALJ58905.1); Ba. The_Abf (BT3675), *Ba. thetaiotaomicron* α -L-arabinofuranosidase encoded by BT3675 (AAO78780.1); R. Jos_Abf, *Ruminiclostridium josui* exo- α 1,5-arabinofuranosidase (BBA94052.1); Ba. Ova_Bgf, *Ba. ovatus* β -D-galactofuranosidase (ALJ48250.1); P. sp_Bgf, *Paenibacillus* sp. β -D-galactofuranosidase (ACS99115.1); Ba. The_Abf (BT3662), *Ba. thetaiotaomicron* α -L-arabinofuranosidase encoded by BT3662 (AAO78780.1); B. Ado_Bxyl, *Bi. adolescentis* β -xylosidase (BAF40308.1); B. Lon_BlAraFA, *Bi. longum* JCM1217 BlAraFA (BAJ67518.1); B. Lon_BlAraFB, *Bi. longum* JCM1217 BlAraFB (BAJ67517); R. Jos_Abn, *R. josui* arabinanase (BBA94052.1).

組換え酵素 BIArafE は、N 末端のシグナルペプチド (aa1-26) と C 末端の膜貫通領域 (aa1637-1659) を除く領域を発現させ、25°Cで可溶性タンパク質として高発現したので、C 末端の His タグを用いて精製した。SDS-PAGE で見かけの分子量が 175 kDa のバンドが確認され、計算上の分子量と一致した(Fig. 3-3)。

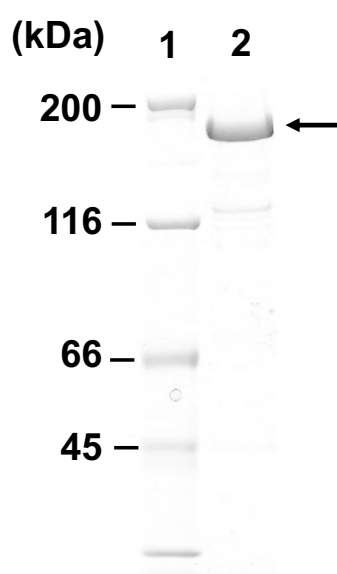
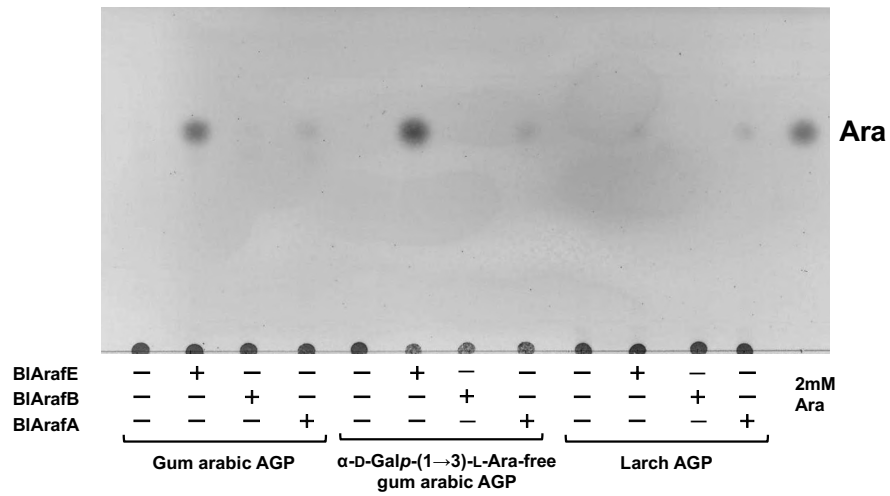
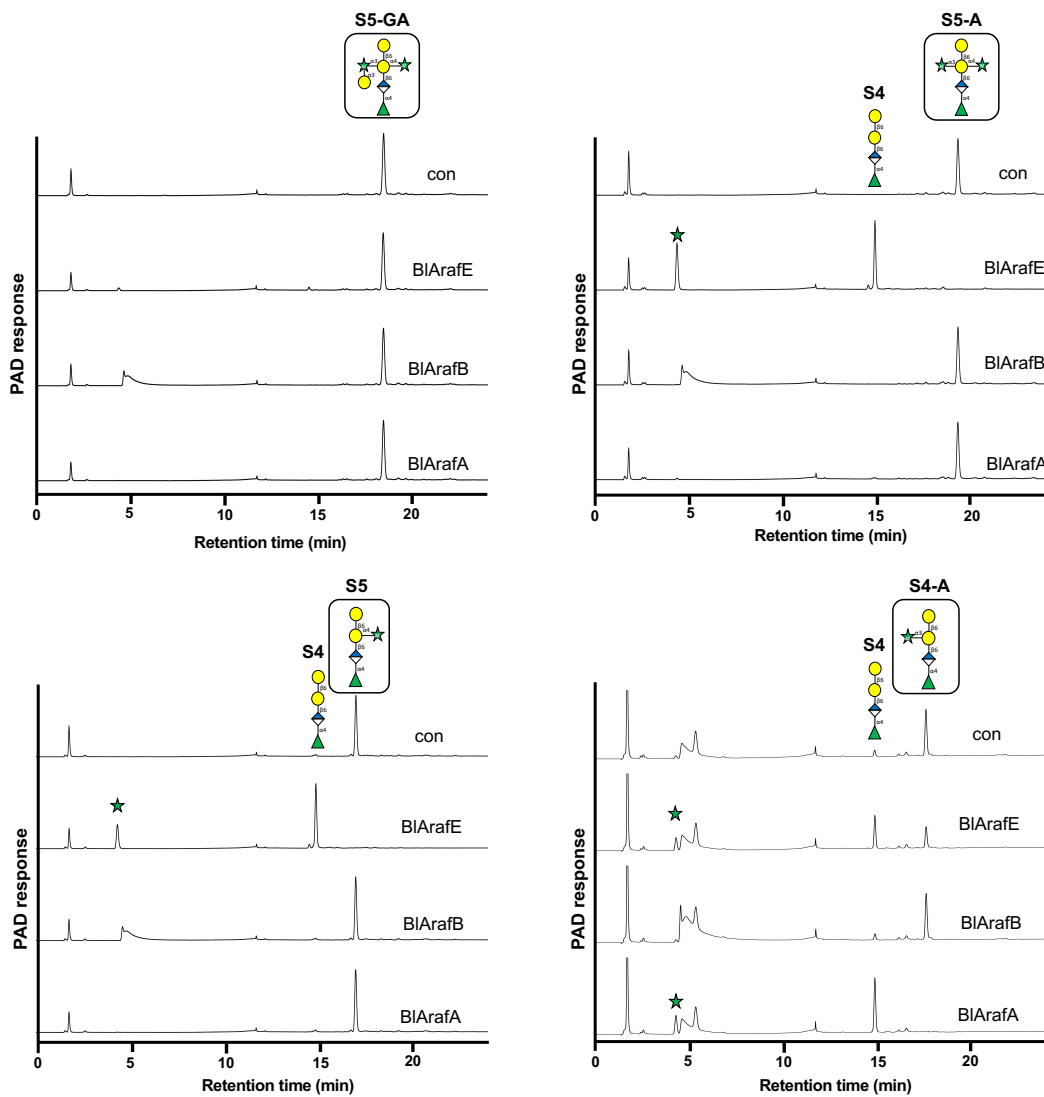


Fig. 3-3. SDS-PAGE analysis of recombinant BIArafE. Purified BIArafE WT was electrophoresed on a 5–20% gradient polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, molecular size marker; lane 2, purified BIArafE_WT. Arrow indicates target protein at expected molecular size.

BlArafE の基質特異性を BlArafB および BlArafA と比較するために、それらの組換え酵素をアラビアガム AGP、カラマツ AGP および α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP と反応させ、遊離糖を TLC で分析した (Fig. 3-4A)。その結果、BlArafE と BlArafA は試験したすべての多糖類から L-アラビノースを遊離したが、BlArafB は遊離しないことが分かった。特に、BlArafE はアラビアガム AGP と α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を含まないアラビアガム AGP から使用した 3 つの酵素の中で最も多くの L-アラビノースを遊離した。これらの酵素の基質特異性をより詳細に評価するために、アラビアガム AGP の側鎖を構成するいくつかのオリゴ糖を用いて酵素反応を行い、遊離糖を HPAEC-PAD で分析した (Fig. 3-4B)。使用したオリゴ糖基質の構造モデルは Fig. 2-1 に示している。その結果、S5 では BlArafE のみが α 1,4-Araf の加水分解活性を示し、BlArafB や BlArafA では活性を示さないことがわかった。さらに、BlArafE は S5-A を S4 と Ara に分解したことから、BlArafE は α 1,4-Araf と α 1,3-Araf の両方に作用することがわかった。興味深いことに、S5-GA のように S5-A の α 1,3-Araf 部分を α 1,3-Gal でキャップした場合、BlArafE は α 1,4-Araf に作用しなかった。これは、GAfase による α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の除去や、他の α -D-galactosidase による α -D-Galp キャップ構造の除去が、BlArafE の立体障害を解消することを示している。一方、BlArafA は S4-A の α 1,3-Araf に対して活性を示したが、S5-A のように側鎖の β -D-Gal が O3 位と O4 位で α -L-Araf で二重修飾されている場合は α 1,3-Araf に作用できなかった。また、BlArafB は α 1,3-Araf、 α 1,4-Araf に対して加水分解活性がないことが分かった。同様に、S3-GA、S3-A、S3 のように側鎖中の β -D-Gal の O6 位が α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA に修飾されていないオリゴ糖に対する基質特異性の解析を行った (Fig. 3-4C)。その結果、 α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA が修飾していない場合でも、BlArafE のみが S3-A および S3 に対して活性を示し、O6 位の修飾は BlArafE の活性に影響を与えないことが示された。

A**B**

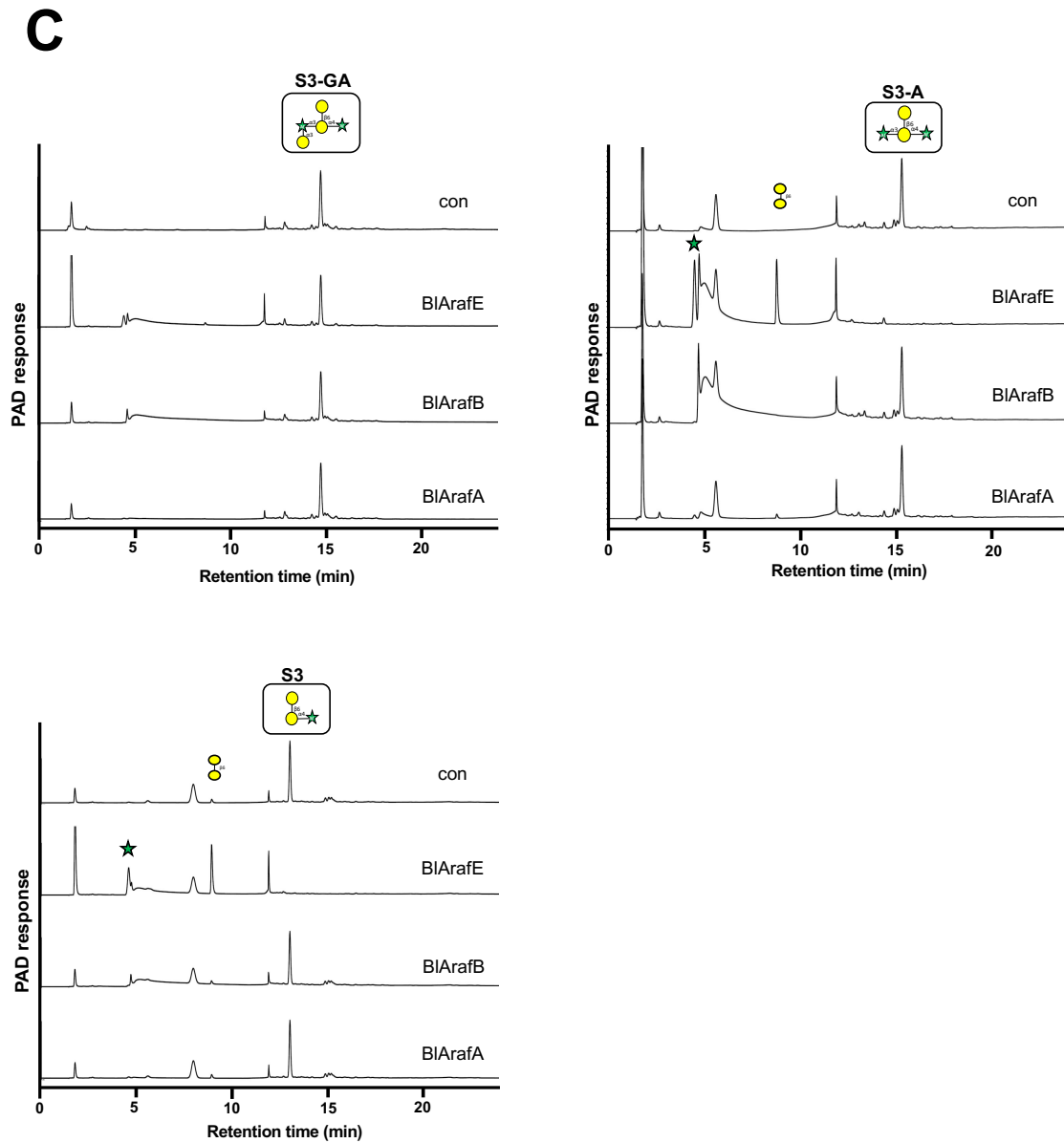


Fig. 3-4. Substrate specificities of BlArafE, BlArafB, and BlArafA. (A) TLC analysis of α -L-arabinofuranosidases reaction with AGPs. Gum arabic AGP, α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP, and larch AGP were incubated with either BlArafE, BlArafB, or BlArafA at 37 °C for 16 h. (B) HPAEC-PAD analysis of α -L-arabinofuranosidases reaction with gum arabic AGP-related oligosaccharides. S5-GA, S5-A, S5, and S4-A were incubated with either BlArafE, BlArafB or BlArafA at 37 °C for 16h. (C) HPAEC-PAD analysis of α -L-arabinofuranosidases reaction with gum arabic AGP-related oligosaccharides. S3-GA, S3-A, S3 were incubated with either BlArafE, BlArafB or BlArafA at 37 °C for 16h.

BlArafE の 2 つの触媒ドメインの機能解析

BlArafE の各触媒ドメインは、これまでに性質決定された GH43 の酵素と同様に、触媒反応に重要な「一般酸触媒」、「一般塩基触媒」、「一般酸触媒の pKa モジュレーター」の役割を担う 3 つの推定酸性アミノ酸残基を保存していた(119)。ここでは、BlArafE の 2 つの触媒ドメインのそれぞれの機能を調べるために、GH43_22 ドメインと GH43_34 ドメインのそれぞれの「一般酸触媒の pKa モジュレーター」の推定残基である Asp-571 と Asp-1197 を Ala に部位特異的変異導入して酵素活性を測定した。

BlArafE の変異体も BlArafE の野生株と同様の手順で発現、精製した。SDS-PAGE で見かけの分子量 175kDa のバンドが確認され、計算上の分子量と一致した(Fig. 3-5)。

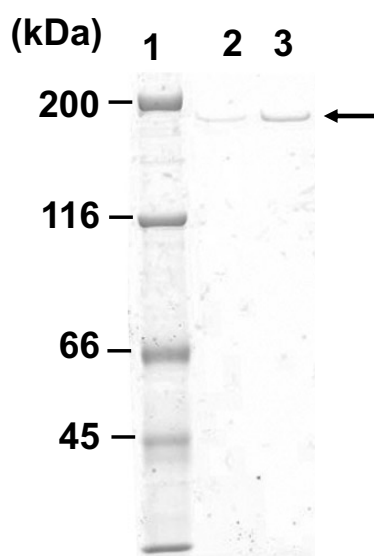
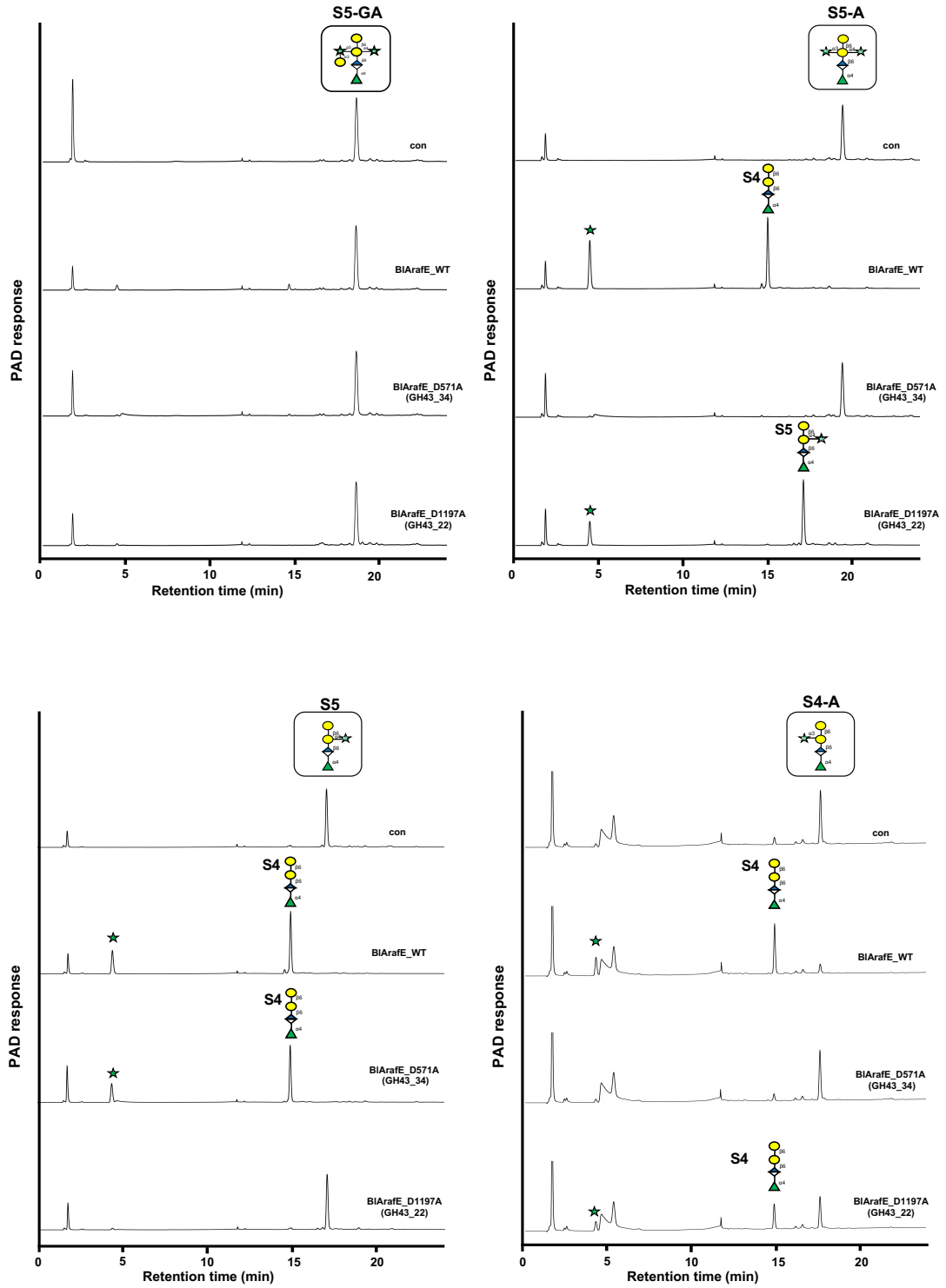


Fig. 3-5. SDS-PAGE analysis of recombinant BlArafE mutants. Purified BlArafE mutants were electrophoresed on a 5–20% gradient polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, molecular size marker; lane 2, purified BlArafE_D571A; lane 3, purified BlArafE_D1194A. Arrow indicates target protein at expected molecular size.

アラビアガム AGP の側鎖に存在する α 1,3-Araf および α 1,4-Araf に対する各ドメインの基質特異性を評価するために、側鎖を構成するオリゴ糖 (S5-GA、S5-A、S5、S4-A) を基質として用いた。BlArafE_D1197A 変異体 (GH43_22 活性型) は、S5-A の α 1,3-Araf と α 1,4-Araf の二重置換構造や、S4-A などの α 1,3-Araf の単置換構造に対して酵素活性を示し、S5 の α 1,4-Araf には活性を示さなかった (Fig. 3-6A)。詳細な反応速度論的解析を行っていないものの、S4-A に対する酵素活性が S5-A が完全に分解される条件下でも完全に分解しきれていなかったことから、GH43_22 の活性型は、基質として単置換された S4-A よりも二重置換された S5-A が適すると考えられた。このことから、BlArafE の GH43_22 は α 1,3-Araf 特異的であり、近傍に α 1,4-Araf の分岐が存在していても作用できるということが分かった。一方、D571A 変異体 (GH43_34 活性型) は、S5 の α 1,4-Araf に作用して S4 に分解されるが、S4-A の α 1,3-Araf には作用せず、S5-A の α 1,3-Araf や α 1,4-Araf にも作用しなかった。このことから、GH43_34 は α 1,4-Araf 特異的で、 α 1,3-Araf の分岐が近傍に存在していると作用できないことが分かった。また、S5-GA は、WT の BlArafE でも変異体でも加水分解されなかった。以上のことから、アラビアガム AGP の側鎖を構成するオリゴ糖の一つである S5-A を S4 まで分解するためには、まず GH43_22 が α 1,3-Araf に作用し、次いで GH43_34 が α 1,4-Araf に作用することで起こることが分かった (Fig. 3-6B)。また、BlArafE が S5-GA から S4 に分解するためには、まず GAfase の作用か、 α -D-galactosidase により α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara や α -D-Gal を除去することが必要である。

GH43_22 と GH43_34 の各活性型を用いて、アラビアガム AGP、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP、カラマツ AGP と反応させた (Fig. 3-6C)。各ドメインの基質特異性の違いに基づいて、本反応で得られた結果は AGP の構造においていくつかの考察を与えた。GH43_22 の活性型は、アラビアガム AGP から、L-アラビノースを遊離した (Fig. 3-6C)。

これは、アラビアガム AGP の側鎖には α -D-Gal でキャッピングされていない α 1,3-Araf 残基が一定数存在していることを示している。さらに、GH43_34 の活性型は、アラビアガム AGP からは L-アラビノースをほとんど遊離せず、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP からは L-アラビノースをより多く遊離した。このことは、アラビアガム AGP が、 β -D-Gal の O4 位にのみ α -L-Ara が単置換された S5 のような構造をほとんど持たず、S5-GA は側鎖の主要な構造成分の一つであることを示している。この結果は既報とも一致する(24)。さらに、GH43_34 の活性型はカラマツ AGP から L-アラビノースを遊離することができなかった。これは、GH43_34 が α 1,3-Araf 残基に対して活性を持たず、カラマツ AGP には単置換の α 1,4-Araf が存在しないことを示している。アラビアガム AGP または α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP に帯する酵素作用について Fig. 3-7 にまとめた。

A

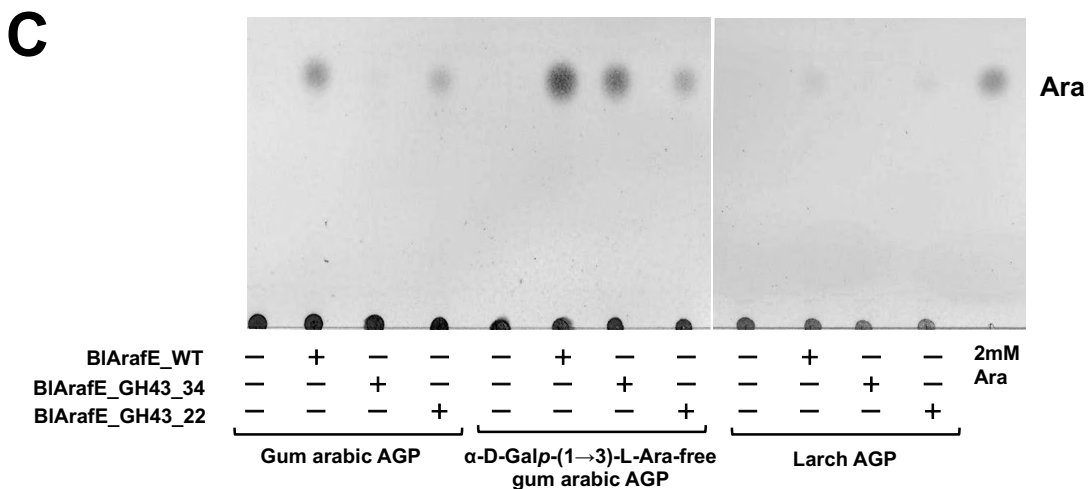
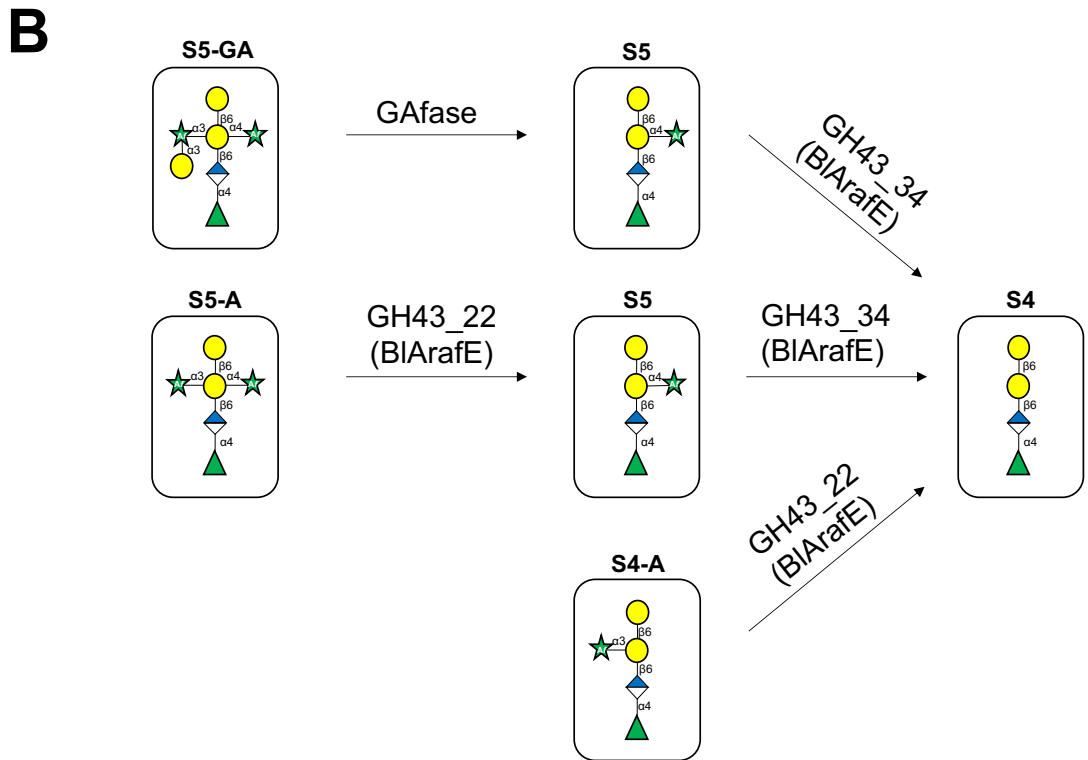


Fig. 3-6. Substrate specificities of GH43_22 and GH 43_34 domains of BIArafE. (A) HPAEC-PAD analysis of the reaction products with gum arabic AGP-related oligosaccharides. S5-GA, S5-A, S5, and S4-A were incubated with either wild-type of BIArafE (WT), D571A mutant (GH 43_34 active form) or D1197A mutant (GH 43_22 active form) of BIArafE at 37 °C for 16h. (B) Schematic model of the mode of action of GH43_22 and GH 43_34 domains of BIArafE. (C) TLC analysis of the reaction products with AGPs. Gum arabic AGP, α -D-Galp-(1→3)-L-Ara-free gum arabic AGP, and larch AGP were incubated with either wild-type of BIArafE, GH 43_34 active form, or GH 43_22 active form of BIArafE at 37 °C for 16h.

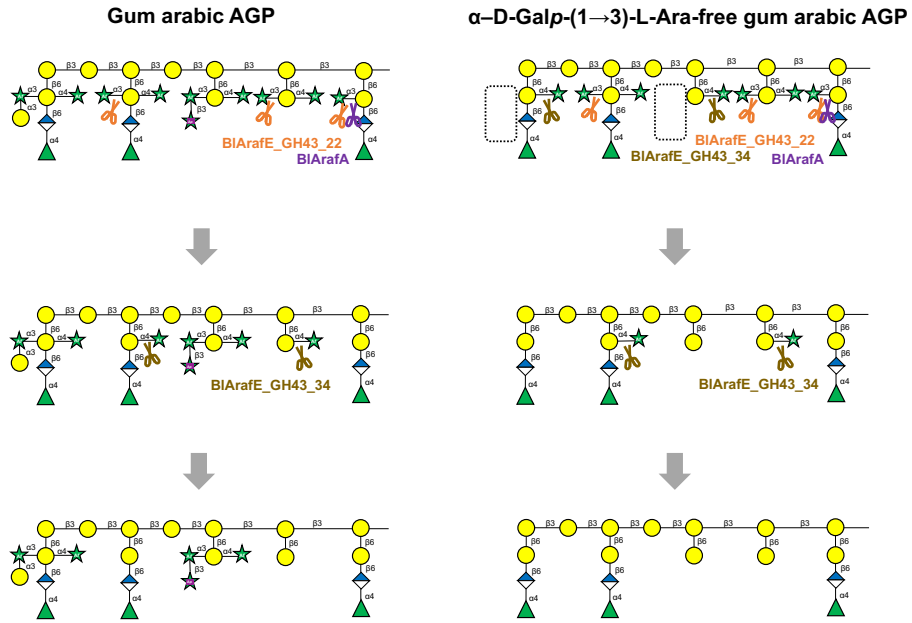


Fig. 3-7. The schematic model of action of BIarafE and BIarafA on gum arabic AGP and α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP.

BlArafEの有無による資化性の違いの検討

GH43 α -L-arabinofuranosidase の遺伝子群 (BLLJ_1850—BLLJ_1854) は、*Bi. longum* の株において様々な保存パターンがある(31)。*BlArafE* 相同遺伝子 (同一性 \geq 50%、カバレッジ \geq 50%) は、NCBI データベースに登録されている *Bi. longum* MCC 株 (67/123 株) の 54.5% に保存されており、GAfase の保有割合 (4.88%、6/123 株) よりも高かった(第二章に記載)。

そこで、*Bi. longum* の *BlArafE* 保持株と非保持株を用いて、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP を唯一の炭素源とする培地上で *in vitro* 資化性試験を行った (Fig. 3-8)。*BlArafE* 保持株である *Bi. longum* JCM7052、MCC00300、JCM1217、MCC00055 は良好に生育したが、非保持株である MCC00198 と MCC00231 は生育しなかった (Fig. 3-8A)。一方、未処理のアラビアガム AGP は、GAfase 保持株である JCM7052 と MCC00300 でのみ資化され、*BlArafE* 保持であっても GAfase 非保持であると良好に生育しなかった (第二章に記載)。培養後の α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP 中に、付加した L-アラビノースが残存しているかを調べるため、*BlArafE* を培養後培地のエタノール沈殿物である多糖画分とインキュベートした。その結果、*BlArafE* 非保持株の培養後培地からは、エタノール沈殿多糖から *BlArafE* を加えたことにより、L-アラビノースを遊離したが、*BlArafE* 保持株のエタノール沈殿多糖からは遊離されなかった (Fig. 3-8B)。このことから、*BlArafE* 保持株は、 α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 除去アラビアガム AGP から L-アラビノースを遊離し、生育に利用していることが示唆された。一般的にも *Bi. longum* 株は L-アラビノースを炭素源として利用できることが知られている(120, 121)。

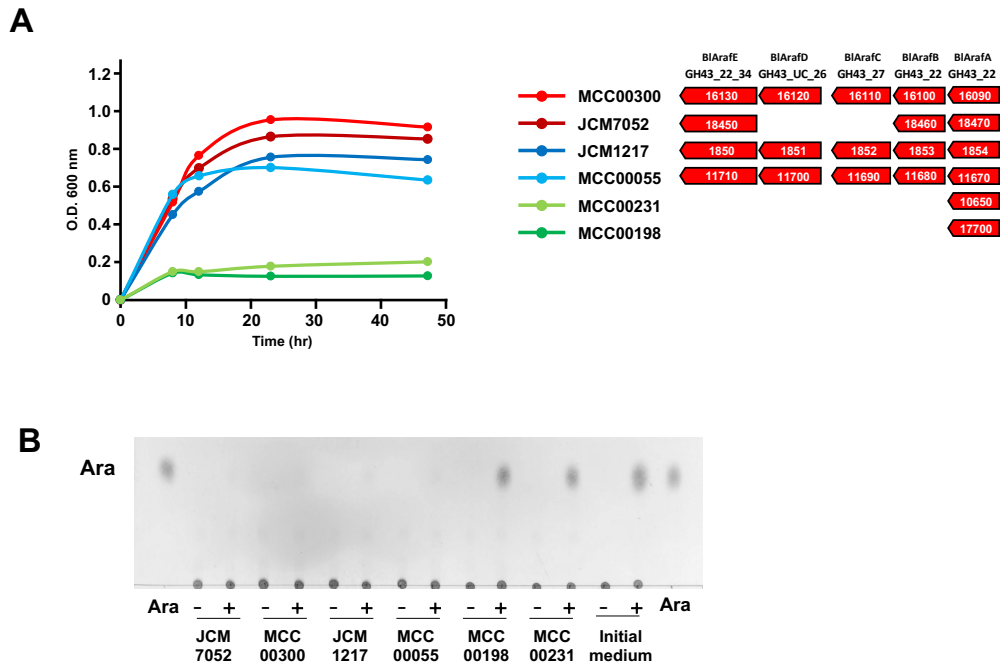


Fig. 3-8. *In vitro* assimilation test performed using α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP.

(A) Growth profile of *Bi. longum* strains cultured in a medium containing α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP ($n = 2$, cell culture biological replicates). The gene clusters of GH43 α -L-arabinofuranosidases in *Bi. longum* strains are shown in the figure. (B) Residual L-arabinose in α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara-free gum arabic AGP after 48 h of culturing *Bi. longum*. TLC analysis of the reaction products by BIArAfE with the ethanol precipitates of the initial medium or cultured media of JCM7052, MCC00300, JCM1217, MCC00055, MCC00198, and MCC00231 at 37°C for 16 h. Reaction products (+) and control samples without BIArAfE (-) were analyzed by TLC.

菌体表層で作用するアラビアガム AGP 分解に関わる酵素の協調作用

アラビアガム AGP を GAfase、B11,3Gal、 α -L-arabinofuranosidases (BlArafE と BlArafA) の異なる組み合わせでインキュベートし、その協調作用を調べた (Fig. 3-9A)。GAfase と BlArafE を組み合わせて作用させると、BlArafE 単独の時よりもアラビアガム AGP から遊離される L-アラビノースの量が 1.64 倍多くなることが分かり、GAfase によって立体障害が除去されることで BlArafE が α 1,4-Araf 結合に作用できるようになっていると考えられた。さらに、GAfase、B11,3Gal、BlArafE を組み合わせて用いることで、L-アラビノース、 β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal、S4 のピークが検出された。この組み合わせは、BlArafE の代わりに BlArafA を用いた GAfase、B11,3Gal と BlArafA の組み合わせで作用させたときよりも、遊離される L-アラビノースおよび S4 の量は、それぞれ 10.5 倍および 13.6 倍高かった。また、GAfase、B11,3Gal、BlArafE を組み合わせて得られた反応生成物のピークは、粗酵素として *Bi. longum* JCM7052 菌体酵素を用いて得られた反応生成物と一致した (Fig. 3-9B)。これらの結果から、アラビアガム AGP は主に *Bi. longum* JCM7052 に存在する 3 種類の菌体表層局在型酵素である GAfase、B11,3Gal、BlArafE の働きにより分解されることが明らかとなった。さらに、*Bi. longum* JCM7052 の培養液には S4 が残存していたが、48 時間後には単糖と二糖は検出されなかった (Fig. 3-9C)。これらの結果は、*Bi. longum* が単糖と二糖を利用し、S4 は利用していないことを示している。

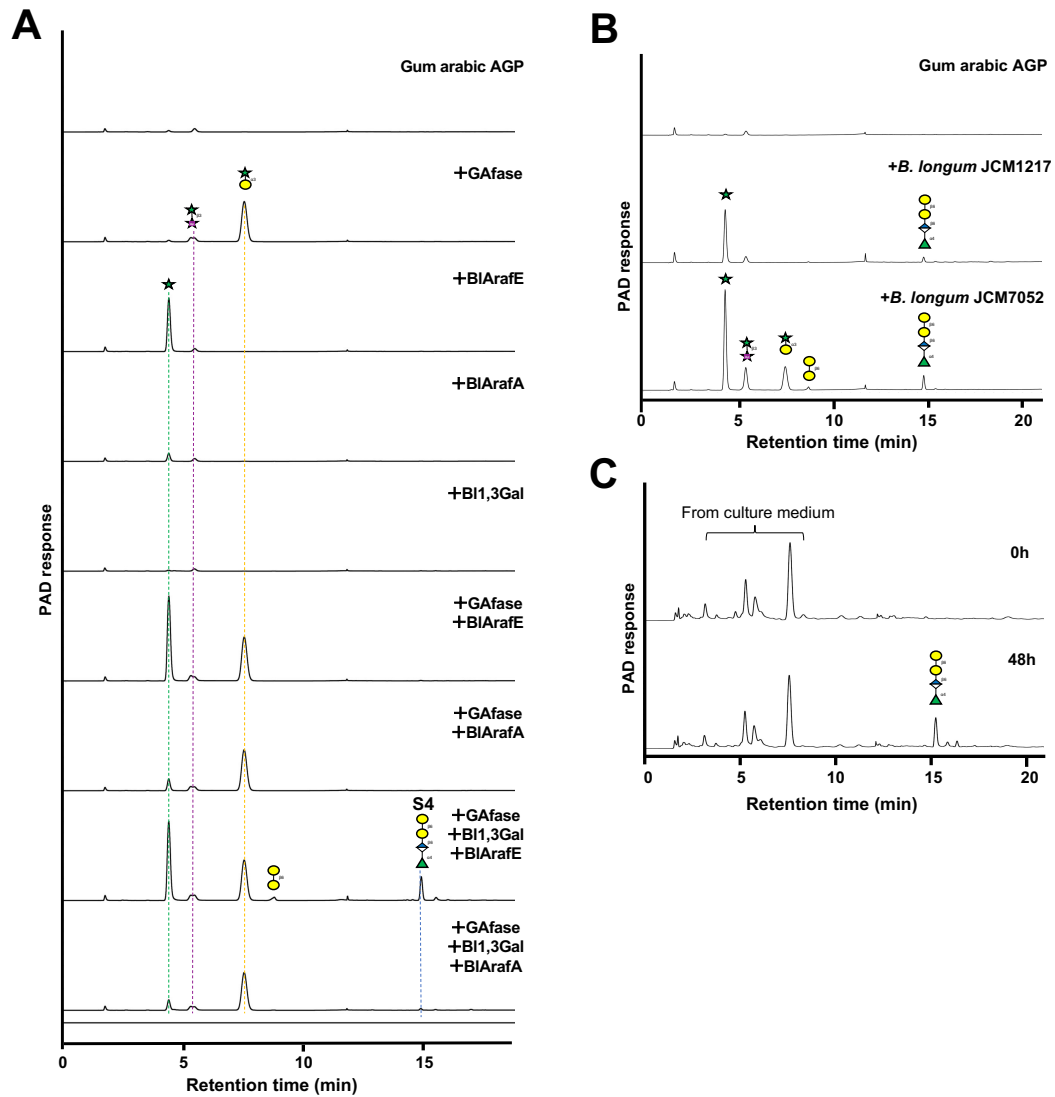
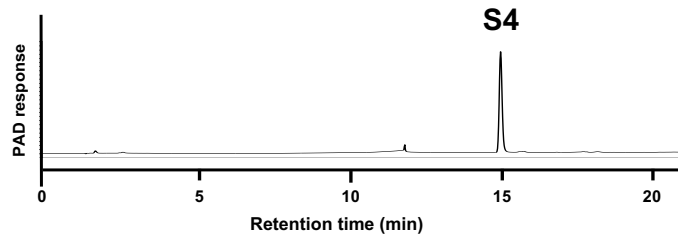
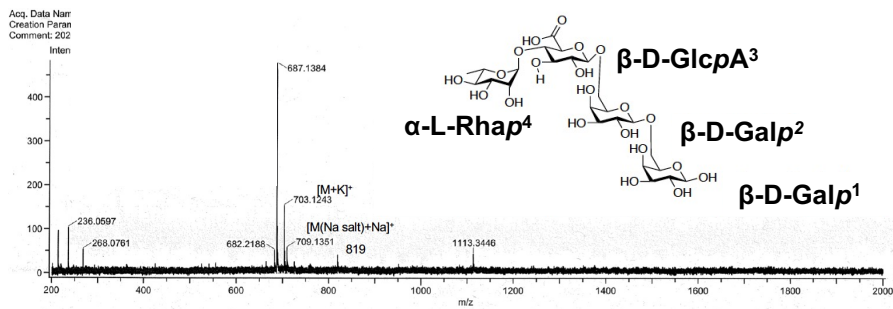
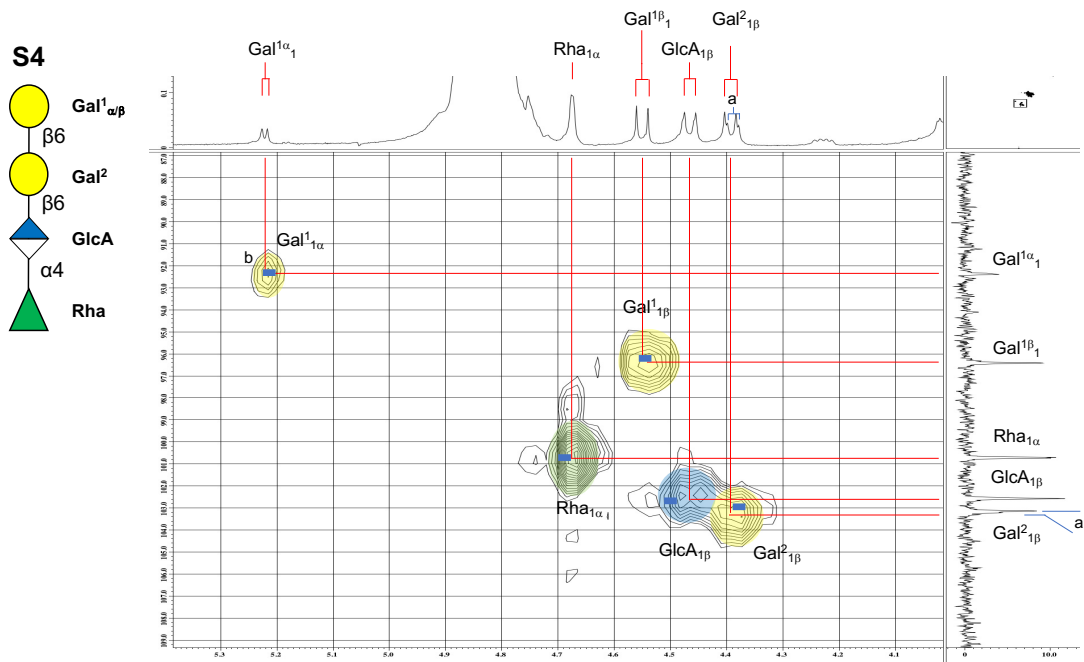


Fig. 3-9. Cooperative degradation of gum arabic AGP by the cell surface-anchoring enzymes in *Bi. longum*. (A) HPAEC-PAD analysis of the combination reactions of type-II AG degradative enzymes (GAfase, BI1,3Gal, BIArafA, and BIArafE) with gum arabic AGP. Gum arabic AGP was incubated at 37°C for 24 h. Data from one representative experiment from three independent experiments is shown. (B) HPAEC-PAD analysis of the reaction products by the bacterial cell fraction of *Bi. longum* JCM1217 or JCM7052 cells with gum arabic AGP. (C) HPAEC-PAD analysis of the initial medium (0 h) and cultured medium (48 h of *Bi. longum* JCM7052 culture) with 1% gum arabic AGP as the sole carbon source.

***Bi. longum* のアラビアガム AGP 限界分解物 S4 の構造決定**

S4 構造を決定するために、アラビアガム AGP を *Bi. longum* JCM7052 菌体とインキュベートし、反応生成物の精製により単一のピークの S4 を得た (Fig. 3-10A)。S4 を MALDI-TOF-MS で分析したところ、 m/z 687.138 に高強度のピークがあり、これは α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal のナトリウム付加物と一致した (calcd for $C_{24}H_{40}O_{21}Na_1 [M+Na]^+$ 687.196) (Fig. 3-10B)。S4 の高分解能 ESI-TOF MS は、糖組成と一致する四糖構造を示した (ESI-TOF HRMS: calcd for $C_{24}H_{40}O_{21}Na_1 [M+Na]^+$ 687.1960, found 687.1958)。さらに、 1H 、 ^{13}C 、heteronuclear multiple bond correlation (HMQC) などの核磁気共鳴 (NMR) 解析を行い、S4 の化学構造を明らかにした (Fig. 3-10C および Table 3-2)。S4 の 1H および ^{13}C の化学シフトおよび結合定数によると、 α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal 構造であり、既報(24)で決定されたものと一致した (Table 3-2)。HMQC スペクトルでは、アノマー領域の重なりが既報(24) と一致していた。さらに、S4 の H-H COSY、HMQC、HMBC、non-decoupled HMQC などの NMR 技術を組み合わせることで、Table 3-2 のようにピークが割り当てられ、S4 の化学構造の妥当性がさらに高まった (Fig. 3-10D)。

A**B****C**

D

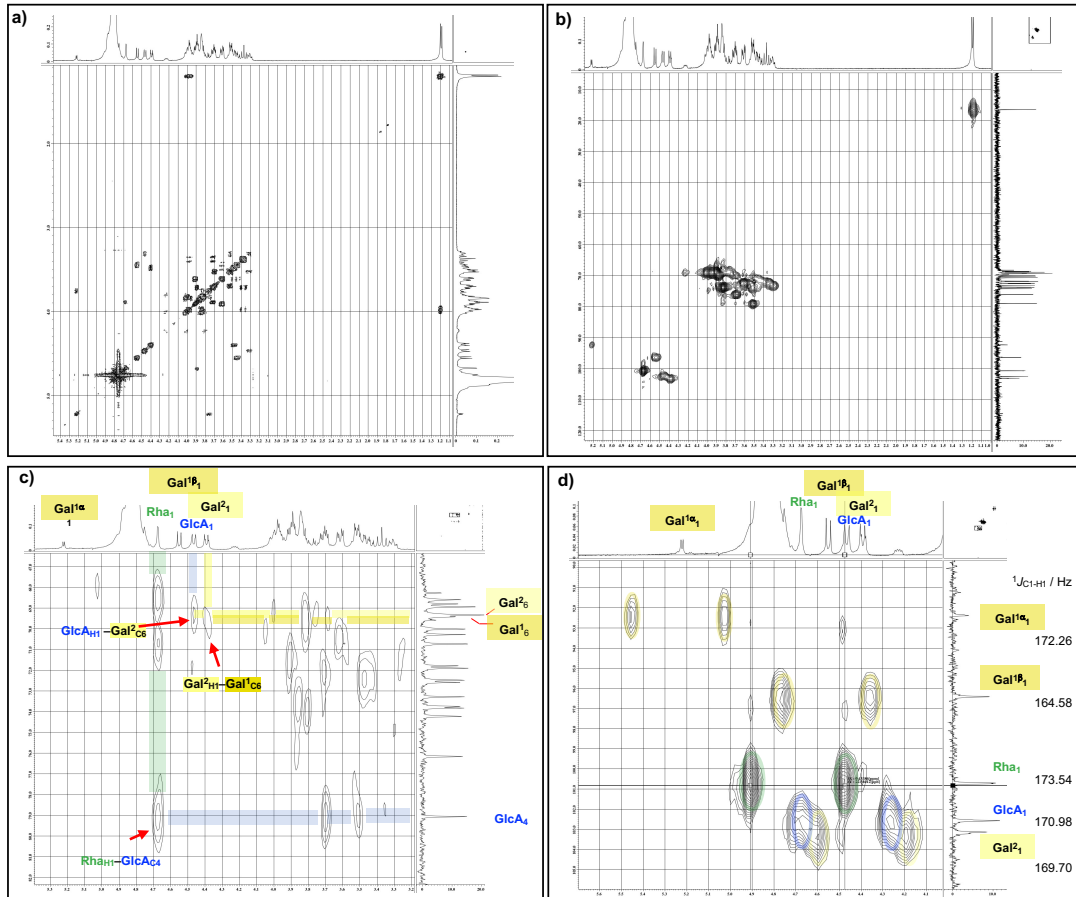


Fig. 3-10. Structural analysis of S4. (A) HPAEC-PAD analysis of the purified S4. (B) Mass spectrometry of S4 and the estimated structure are shown in the figure. (C) Expanded HMQC spectra around anomeric region measured on 400 MHz in D₂O at room temperature at 21°C. ^aDifference between anomers of Gal¹ ($\alpha:\beta$ = approximately 1:3) slightly affected to the conformation of Gal² that was seen in Gal²_{1b}. ^bAssignment of the tetrasaccharide was compared to the HMQC data referenced at the of Gal¹_{1a} indicated in blue bars translated from the data reported by Cartmell *et al.* (24). (D) 2D-NMR spectra were measured on 400 MHz; H-H COSY at 22°C (a), HMQC at 21°C (b), HMBC at 21°C (c), and non-decoupled HMQC at 21°C (d).

Table 3-2. Assignment of signal in ^1H and ^{13}C NMR spectra of S4 in D_2O at 400 MHz at RT. (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)

	H1 ($^3J_{\text{H-H}}$)	H2	H3	H4	H5	H6
$\beta\text{-D-Galp}^1$	4.54 (d 8.4 Hz)	3.44	3.62	3.92	3.85	3.85 4.02
$\alpha\text{-D-Galp}^1$	5.22 (d 4.0 Hz)	3.75	3.85	3.98	4.23	3.77 3.97
$\beta\text{-D-Galp}^2$	4.39 (d 8.4 Hz)	3.48	3.62	3.92	3.85	3.85 4.02
$\beta\text{-D-GlcpA}^3$	4.48 (d 8.0 Hz)	3.30	3.53	3.54	3.70	
$\alpha\text{-L-Rhap}^4$	4.68 (s)	3.88	3.71	3.37	3.97	1.19

	C1 ($^1J_{\text{C-H}}$)	C2	C3	C4	C5	C6
$\beta\text{-D-Galp}^1$	96.4 (164.6 Hz)	71.8	72.6	68.8	73.75	69.3
$\alpha\text{-D-Galp}^1$	92.4 (172.3 Hz)	68.6	68.3	69.3	68.9	69.6
$\beta\text{-D-Galp}^2$	103.1 (169.7 Hz)	70.7	72.5	68.9	73.83	69.3
$\beta\text{-D-GlcpA}^3$	102.6 (171.0 Hz)	73.2	74.2	79.0	76.1	175.3
$\alpha\text{-L-Rhap}^4$	100.7 (173.5 Hz)	70.3	70.0	71.9	68.6	16.5

S4 を用いた資化性試験

Bacteroides 属細菌の中には、S4 構造の分解酵素をコードしている菌種があることが報告されている(24)。そこで S4 を唯一の炭素源とする培地で、いくつかの *Bacteroides* 種の *in vitro* 資化性試験を行った。*Bacteroides thetaiotaomicron* (*Ba. thetaiotaomicron*) JCM5827^T、*Ba. caccae* JCM9498^T、*Ba. cellulosilyticus* JCM15632^T、*Ba. ovatus* JCM5824^T、*Ba. vulgatus* JCM5826^T、*Ba. uniformis* JCM5828^T の 6 種を用いて試験したところ、*Ba. vulgatus* で 600 nm の吸光度の増加が観察された (Fig. 3-11A)。さらに、残存する S4 の分析を行ったところ、*Ba. vulgatus* において 24 時間後にはすでに利用され、培地中から消失したことが確認された。なお、他の *Bacteroides* 株では S4 の消失が見られなかった (Fig. 3-11B)。このことから、*Bi. longum* が遊離して自身は利用できないオリゴ糖(S4)を、共生細菌である *Ba. vulgatus* が利用する可能性のあることが示唆された。*Ba. cellulosilyticus* は未処理のアラビアガム AGP でも増殖するが、*Ba. vulgatus* は増殖せず、endo-β1,3-galactanase を作用した低分子化アラビアガム AGP で良好な生育を示すことが報告されている(24)。このことから *Ba. vulgatus* は多糖よりもオリゴ糖利用の方が適していると考えられた。

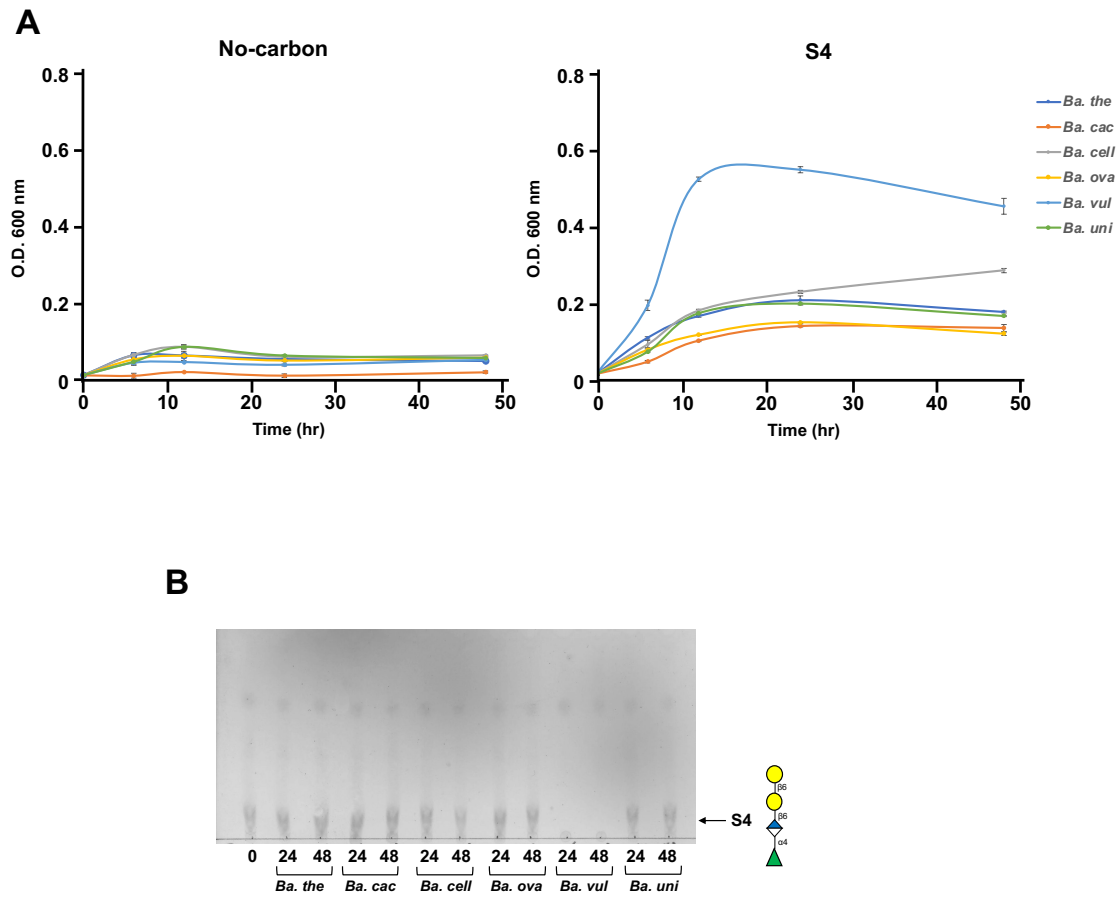


Fig. 3-11. *In vitro* assimilation test of S4 using *Bacteroides* species. (A) Growth of *Bacteroides* species on MM media containing S4 as a sole carbon source (right) and on no-carbon MM media (left). The absorbance of growth media of *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Ba. the*), *Bacteroides caccae* (*Ba. cac*), *Bacteroides cellulosilyticus* (*Ba. cell*), *Bacteroides ovatus* (*Ba. ova*), *Bacteroides vulgatus* (*Ba. vul*), and *Bacteroides uniformis* (*Ba. uni*) were monitored at 0, 6, 12, 24, 48 h ($n = 3$, cell culture biological replicates). Error bars indicate SD ($n = 3$) (B) TLC analysis of the residual S4 after *Bacteroides* species culture at 24 h (24) and 48 h (48) and initial medium without any strains (0). The arrow indicates the position of S4. Data are representative of three independent experiments; one representative experiment is shown.

第四節 考察

本章では、*Bi. longum* JCM1217 が保持するマルチドメイン酵素 BI_{ArafE} (BLLJ_1850) は、アラビアガム AGP 側鎖に存在する α 1,3/1,4-Araf を加水分解する α -L-arabinofuranosidase であることを明らかにした。さらに、同一タンパク質内に存在する 2 つの触媒ドメインのうち、GH43_22 ドメインは、 β -D-Gal の α 1,3-および α 1,4-Araf の二置換構造、 α 1,3-Araf の単置換構造の α 1,3-Araf を加水分解し、GH43_34 ドメインは、 α 1,3-および α 1,4-Araf 二置換構造には作用しないものの、一置換構造の α 1,4-Araf を加水分解することが分かった。また、菌体粗酵素を用いた酵素分解でアラビアガム AGP から生じる遊離糖のピークパターンと、三つの菌体表層局在型酵素 (GAfase、B11,3Gal、BI_{ArafE}) を組み合わせて生じた遊離糖のピークパターンが一致していたことから、*Bi. longum* のアラビアガム AGP 分解は、主に上記の 3 つの菌体表層局在型酵素が次の作用機序で進んでいることが明らかになった。まず、GAfase がアラビアガム AGP の側鎖末端から α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara が遊離する (第二章に記載内容) とともに、BI_{ArafE} の GH43_22 ドメインもアラビアガム AGP 側鎖中の α -D-Gal でキャップされていない α 1,3-Araf 構造に作用し、L-アラビノースを遊離する。このようにして側鎖の β -Gal の O3 位の修飾糖が除去されたことで、次に、BI_{ArafE} の GH43_34 ドメインが α 1,4-Araf に作用できるようになる。その後、主鎖のエキソ型の分解を担う B11,3Gal が作用し、最終的に β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal や L-アラビノースの他、 α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal (S4) のオリゴ糖が生じることが分かった。そのうち、S4 は *Bi. longum* には利用されずに、培地中に蓄積されることも分かった。さらに、本オリゴ糖は *Ba. vulgatus* によって利用されることが見出され、腸内では他の共生細菌によって利用されている可能性が示唆された。模式図を Fig. 3-12 に示した。

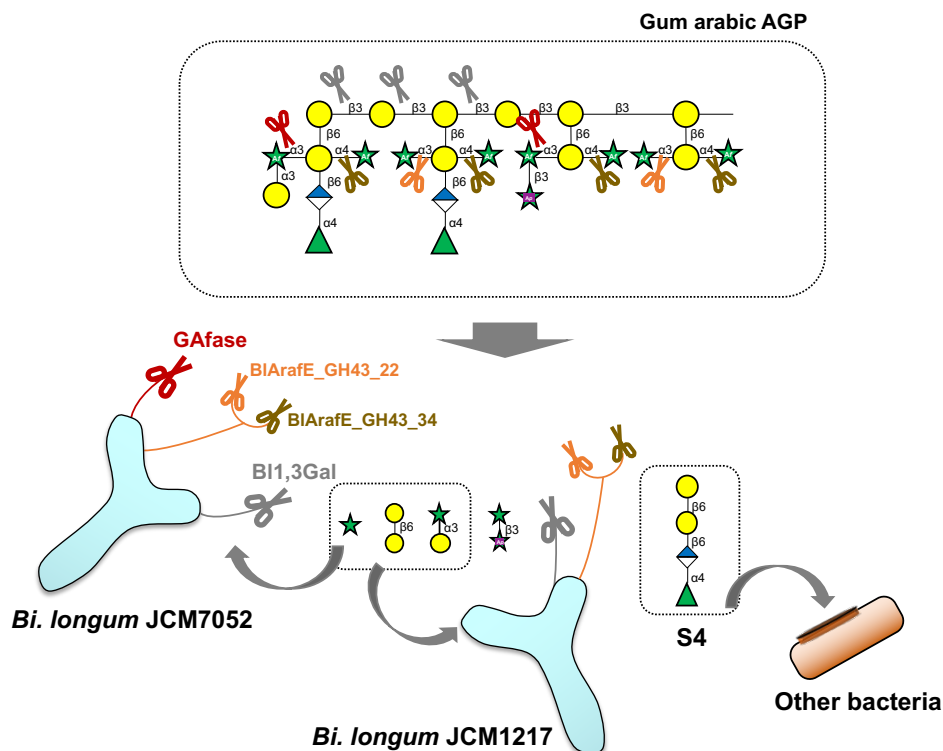


Fig. 3-12. Schematic model of the cooperative degradation of gum arabic AGP by cell-surface enzymes in bifidobacteria and utilization by other commensal bacteria.

GAfase はアラビアガム AGP の資化性に重要な酵素であるが、NCBI のデータベースによると、*Bi. longum* 株の 6.84%にしか保存されていなかった(第二章に記載内容)。これは、アラビアガム AGP の投与によってビフィズス菌が増加するという多くの報告があるに於いては低い保有割合であった。一方で、*Bi. longum* の 54.5%の株が BI1,3Gal を保存しており、広く保存されている遺伝子であった。 α -D-galactosidase が作用すれば、多くの *Bi. longum* が持つ BI1,3Gal が作用でき、遊離したアラビノースを資化することができることから、腸内環境には未同定の分泌型 α -D-galactosidase が存在する可能性があると考えられた。

また、本章ではマルチドメイン酵素 BI1,3Gal のそれぞれの触媒ドメインの機能解析を行うことで、 α 1,4-Araf に作用する酵素を初めて見出した。GH43 酵素の中には、異なるサブファミリーに属する GH43 ドメインを同一タンパク質内に複数持つ酵素が存在する。CAZy データベースを用いた以前の研究(121)では、N 末端から順に GH43_22、GH43_34 を持つ

GH43 タンパク質が 82 個観察され、マルチドメインである GH43 タンパク質の中で最も一般的な組み合わせパターンであった。特に、228 個のマルチドメイン酵素のうち 143 個は C 末端に GH43_34 ドメインを持っており、C 末端の GH43_34 は機能的に重要な役割を担っていると考えられた(121)。しかし、これまで GH43_34 で性質決定された酵素は、CAZy データベースによると下記の四つしか報告されていない。*Ba. ovatus* ATCC 8483 由来の β -D-galactofuranosidase (Bovatus_03644) (122)と *Paenibacillus* sp. JDR-2 由来の β -D-galactofuranosidase (Pjdr2_0435) (123)、*Ba. thetaiotaomicron* VPI-5482 由来の α -L-arabinofuranosidases (BT_3675、BT_3662)である。BT3675 は、アラビアガム AGP の側鎖 β -D-Gal の O3 位が α -L-Araf に単置換された構造に作用し(24)、BT_3662 はブドウ由来のラムノガラクトツロナン(RG)-II (RG-II)の主鎖のガラクトツロン酸の O3 位が α -L-Araf に置換された構造に作用する(113)。また、GH 43_22 で性質決定された酵素は、*Bi. adolescentis* ATCC 15703 由来の β -xylosidase (BAD_1527) (118)、*Bi. longum* JCM1217 由来の α -L-arabinofuranosidase (BlArafB、BlArafA、BlArafE)、*Ruminiclostridium josui* JCM17888 由来 arabinanase 43A (RjAbn43A) (117)の 5 つしか報告されていない。BlArafB はアラビナンの α 1,5-Araf 結合に作用し(31)、BlArafA はII型 AG の α 1,3-Araf 結合に作用する(30)。また、最近、BlArafE の GH43_22 は、 α 1,3-Araf 単置換アラビノキシランに対して分解活性を示すことが分かった (M. Komeno *et al.*、未発表データ)。

本章では、BlArafE の同一タンパク中の GH43_22 と GH43_34 が連続的な反応でアラビアガム AGP の主要側鎖構造である α -L-Araf の二重置換を分解することが明らかになった。BlArafE と同様に、同一タンパク質中に複数の触媒ドメインを持つ酵素がこれまでに性質決定がされている。代表的な、*Caldicellulosiruptor bescii* 由来の CelA (124)や *Flavobacterium johnsoniae* 由来の ChiA (125) はエキソ型とエンド型の酵素触媒ドメインを同一タンパク質中に持ち、分子内相乗効果で難分解性の不溶性基質を分解している。これらの酵素は、同等量の単一触媒ドメインを付加した場合よりも、同一タンパク質中に各ドメインを形成し

た場合の方が高い活性を示す。一方、可溶性基質に関しては、*R. josui* JCM17888 由来のマルチドメイン酵素 Abf43A-Abf43B-Abf43C (GH43_22_26_34) が、GH43_22 (Abf43A) と GH43_26 (Abf43B) を持ち、シュガービートアラビナンを協調的に分解することが示されているが(117)、同一タンパク質に複数のドメインが共存することによる触媒能の向上は見られなかった。BlAraIE の場合、GH43_34 は GH43_22 の作用がないとアラビアガム AGP に対して活性を示さないことから、これら 2 つのドメインが同一タンパク質に共存することで基質との遭遇率が高まり、効率的な分解をもたらすと考えられる。しかしながら、可溶性基質に対して、同一タンパク質に複数のドメインを共存させることでの触媒能の向上を評価するためには、完全長の酵素を加えたときと、切断された単一触媒ドメインの変異体を同等量加えたときとで酵素活性を比較するなどのさらなる研究が必要である。

前章と本章によって明らかになった *Bi. longum* のアラビアガム AGP 増殖機構によると、*Bi. longum* はアラビアガム AGP 主鎖を完全には分解せず、側鎖の修飾糖をより積極的に分解し、糖源を得ていると考えられる。これは、*Bacteroides* 属細菌において報告されたアラビアガム AGP の分解機構とは異なるものであった。*Bacteroides* では、菌体表層局在型の endo- β 1,3-galactanase がアラビアガム AGP の資化において鍵となる酵素であり、高分子量のオリゴ糖や多糖を利用する方が適しており、ペリプラズムには側鎖の修飾糖を分解する補助酵素が多数存在している(24)。このように *Bi. longum* と *Bacteroides* 属細菌がそれぞれアラビアガム AGP を資化するために異なる戦略を用いて、両者はアラビアガム AGP の摂取によってヒト腸内で生育している可能性がある。実際に、pH 制御のバッチ培養試験やアラビアガム AGP のヒトへの投与試験では、アラビアガム AGP の摂取により、*Bifidobacterium* 属細菌だけでなく、*Bacteroides* 属細菌(47, 126)や Bacteroidetes 門の細菌(50)がヒト腸内で増加することが示されている。これらの菌が増殖するのは、上記の個別の増殖機構だけでなく、異なる菌種間でのクロスフィーディングも起こっていることが示唆された。本章において、*Bi. longum* の限界分解物の四糖は *Ba. vulgatus* によって良い炭素源であった。イヌリン、レ

バン、アミロペクチン、アラビアガム AGP など多糖類を用いた過去の研究(20, 21, 24)から、*Ba. vulgatus* は他の *Bacteroides* 属細菌と異なり、多糖類を汎用的に利用するよりも、他の細菌が多糖類から生成するオリゴ糖を利用する方が適すると考えられる。今後、これらの腸内細菌同士の関わり合いを明らかにしていくためには、GAfase、BlArafE、Bl1,3Gal、endo- β 1,3-galactanase などの主要酵素存在下での共培養や pH 制御バッチ培養を用いたさらなる研究が必要であると考えられる。

第四章 *Bi. adolescentis* 由来の GH36 β -L-arabinopyranosidase の機能解析

第一節 序言

β -L-arabinopyranosidase (EC 3.2.1.88) は、基質の非還元末端から β -L-Arap 残基を加水分解する反応を触媒し、CAZy データベースに基づく、glycoside hydrolase (GH) family 27 (GH27) と GH97 に含まれている。GH27 の場合、 β -L-arabinopyranosidase は、*Streptomyces avermitilis* (89)、*Fusarium oxysporum* (127)、*Chitinophaga pinensis* (128)、*Geobacillus stearothermophilus* (129)、*Arabidopsis thaliana* (130) 由来のものが既に性質決定されている。また、*Bi. longum* から GH27 β -L-arabinopyranosidase (BLLJ_1823) がクローニングされ、その特性が明らかにされている(92)。さらに、*Bacteroides thetaiotaomicron* から GH97 β -L-arabinopyranosidase がクローニングされている(131)。 β -L-Arap と α -D-galactopyranose (α -Gal) の構造が類似していることから、 α -D-galactopyranosidase (EC 3.2.1.22)は β -L-arabinopyranosidase 活性を持つことも多い。実際に、GH27 や GH97 に属する β -L-arabinopyranosidase のほとんどが α -D-galactopyranosidase 活性を有している。

α -D-galactopyranosidase は、GH4、GH27、GH36、GH57、GH97、GH110 に含まれる。特に、GH36 の α -D-galactopyranosidase は、いくつかの細菌、真菌、植物で性質決定されている。この中で、 β -L-arabinopyranosidase 活性も持つことが報告されている例は、古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来のもののみであるが、 β -L-arabinopyranosidase 活性は弱く、*pNP*- β -L-Arap の K_m は *pNP*- α -D-Gal の K_m の 500 倍高い値を示した(68)。GH36 の α -D-galactopyranosidase は、*Bi. longum* (132)、*Bi. adolescentis* (133)、*Bi. bifidum*、*Bi. breve* などの複数のビフィズス菌種でクローニングされ、性質が明らかにされている(70)。本論文の第二章に記載した BIAga3 もその 1 つである。また、これらの酵素は、新規糖鎖を合成する糖転移活性も有している。*Bi. adolescentis* JCM1275 には既に性質決定されている GH36 の α -D-galactopyranosidase である BAD_1576 も保存しているが、BAD_1528 との配列同一性は 24%であった。本章では、*Bi. adolescentis* JCM1275 由来の BAD_1528 のクローニングおよび

機能解析を行った。

第二節 実験方法

材料

β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal (β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araf-Gal₃) はカラマツ AGP から既報に基づいて調製した(49)。 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara および α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara は、それぞれカラマツ AGP およびアラビアガム AGP の部分酸加水分解によって調製した(61, 134)。 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-arabinitol (β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-ART) は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を水素化ホウ素ナトリウムで還元して調製した。他、使用した試薬や基質等は第二章、第三章で記載の通りである。

β -L-arabinopyranosidase (BAD_1528) のクローニングならびに諸性質決定

a) 発現プラスミドの構築

BAD_1528 遺伝子の PCR 増幅には、*Bi. adolescentis* JCM1275 のゲノム DNA を用いた。フォワード (5'-AGGAGATATACCATGATCAGGCGGTATCT-3') プライマーとリバース (5'-GTGGTGGCTCGAGGCGGATGGCGAAGATGC-3') プライマーは、それぞれヌクレオチド 1-17 と 2387-2403 から設計した。下線部はテンプレートに相補的な配列を示す。続いて、この PCR 増幅断片を、In-Fusion HD クローニングキット (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いて pET-23d ベクター (Novagen, Madison, WI, USA) とライゲーションした。この論文で報告された配列は、DDBJ/GenBank/EMBL Data Bank にアクセッション番号 LC374389 で寄託されている。

b) 組換えタンパクの発現と精製

得られたプラスミドを *E. coli* SoluBL21 (Genlantis, San Diego, CA, USA) に形質転換した後、Overnight Express Autoinduction System (Novagen) を用いて 37°C で培養した。培養液を遠心分離し、得られた菌体を BugBuster タンパク質抽出試薬 (Novagen 社) に懸濁した。

His タグ付きの BAD_1528 は、TALON metal affinity resin (Clontech)を含むカラムでイミダゾール濃度のステップグラジエントで精製した。目的タンパク質の溶出が確認された 10 mM イミダゾール画分を、10kDa カットオフの限外ろ過膜 (Millipore Co., Billerica, MA, USA) を用いて脱塩・濃縮した。

c) 酵素活性

BAD_1528 酵素の加水分解活性を、*pNP-β-L-Arap* を用いて測定した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中に BAD_1528 と 1 mM 基質を含む 200 μL の反応混合物を 40°C で 20 分間インキュベートした。300 μL の 1 M Na₂CO₃ を加えて酵素反応を停止した。遊離した *pNP* の吸光度を 400 nm で測定した。酵素活性の 1 unit は、1 分間に 1μmol の *pNP* を生成するのに必要な酵素量と定義した。各 *pNP* 基質に対する基質特異性を調べるために、10 mM の基質を、40 μL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中で、100 mU/mL の BAD_1528 と 40 °C で 16 時間インキュベートし、反応生成物を TLC によって分析した。

d) 基質特異性

Table 4-1 に示した *pNP* 基質、二糖類、オリゴ糖に対する比活性を以下のように分析した。各基質を 40 μL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中で 300 mU/mL の BAD_1528 とインキュベートした。反応混合物を 40°C で適当な時間インキュベートした後、3 分間煮沸して反応を停止した。反応液を CarboPac PA-1 カラムを用いた HPAEC-PAD で分析した。

e) 反応速度論的解析

BAD_1528 の反応速度パラメーターは、0.5~8.0 mM の *pNP-β-L-Arap*、*pNP-α-D-Gal*、および *β-L-Arap-(1→3)-α-L-Ara* を用いて決定した。各 *pNP* 基質との反応は、反応液の 400 nm の吸光度を測定することにより *pNP* 濃度を測定し、*β-L-Arap-(1→3)-α-L-Ara* との反応は、

HPAEC-PAD により L-アラビノース濃度を測定した。

f) 糖転移活性

*p*NP-β-L-Arap をドナーとし、1-alkanol、単糖類、二糖類、*p*NP-β-L-Arap をアクセプターとして反応させた。1-alkanol 存在下での糖転移反応では、2.5 mM *p*NP-β-L-Arap と 10 %メタノール、エタノール、または 1-プロパノールを含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 40 μL 中で、100 mU/mL の BAD_1528 とともに 40 °C で 2 時間インキュベートした。その後、反応生成物を TLC で分析した。メタノール存在下での糖転移物は、活性炭カラム (Autoprep fiberAC, Showa denko, Tokyo, Japan) で精製し、HPAEC-PAD で分析した。単糖および二糖の存在下での糖転移反応では、アクセプターとして 300 mM のグルコース、ガラクトース、L-アラビノース、またはスクロースを含む 1 mL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中で、2.5 mM *p*NP-β-L-Arap を 40 mU/mL の BAD_1528 とともに、40 °C で 16 時間インキュベートした。反応生成物は活性炭カラムで精製し、HPAEC-PAD で分析した。*p*NP-β-L-Arap 存在下での糖転移反応では、800 μL の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中で、55 mM *p*NP-β-L-Arap を 100 mU/mL の BAD_1528 とともに 40 °C で 5 時間インキュベートした。反応生成物は、30 °C に保った Cosmosil PBr カラム (内径 10 mm, × 250 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を用いた HPLC により精製した。0–2 min, 100 % 溶離液 A (水); 2–30 min, 0–100 % 溶離液 B (90 % アセトニトリル) で 4.7 mL/min の流速で溶出した。溶出液は UV 検出器 (UV-2070; JASCO, Tokyo, Japan) を用いて 254 nm で測定した。その後、糖転移反応物を含む画分を集め、TLC、HPAEC-PAD、MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) を用いて分析した。

菌体酵素活性測定と資化性試験

Bi. adolescentis JCM1275 および JCM15918 は、唯一の炭素源として 2% のグルコースまたはガラクトースを含む MRS+cys 培地で AnaeroPack システム（三菱ガス化学，東京，日本）を用いて嫌気条件下で 37°C で培養した。培養液を 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた菌体を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）で洗浄した。その後、Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) を用いて菌体を超音波処理した。細胞懸濁液を 15,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を *p*NP- β -L-Arap または β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Ara と 37°C で 16 時間インキュベートした後、上述のように TLC および HPAEC-PAD で分析した。

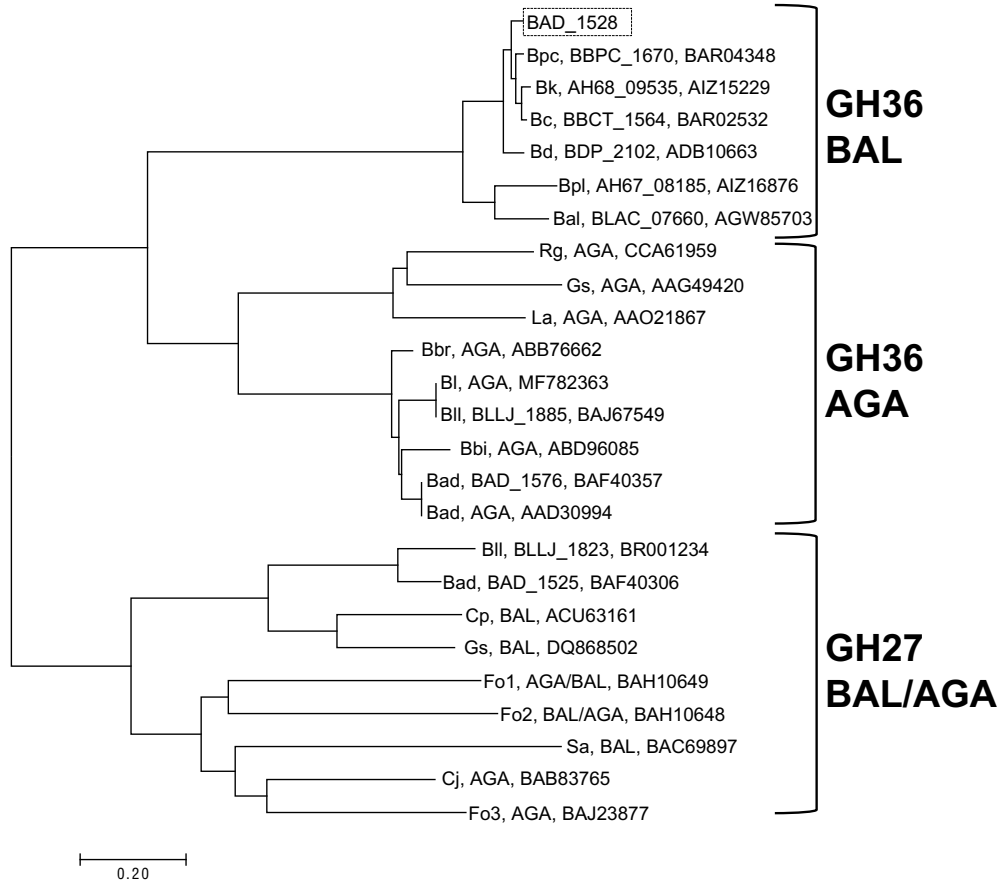
β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Ara の *in vitro* 資化性試験は、0.2% の β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Ara を含む pepton-yeast extract-Fildes (PYF) 培地で行った。*Bi. adolescentis* JCM1275 と JCM15918 の生育を 600 nm の吸光度と pH で測定した。

第三節 結果

BAD_1528 の塩基配列解析と系統学的解析

BAD_1528 は、シグナル P4.1 および InterPro サーバーによると、推定されるシグナルペプチドと末端の膜貫通ドメインを欠いており、この酵素は菌体内に局在することが示唆された。BAD_1528 に相同な遺伝子は、*Bi. animalis* subsp. *lactis* (59%)、*Bi. catenulatum* (81%)、*Bi. pseudocatenulatum* (81%)、*Bi. dentium* (75%)、*Bi. kashiwanohense* (81%)、*Bi. pseudolongum* (58%)といった複数のビフィズス菌種で保存されていた。BAD_1528 の触媒ドメインは、他の性質決定された GH36 の α -D-galactosidase とは系統的に独立しており (21 %~27 %の同一性)、 β -L-arabinopyranosidase/ α -D-galactosidase 活性を有する GH27 の酵素とは離れた位置 (20 %未満の同一性) にあった (Fig. 4-1A)。BAD_1528 は、GH27、GH43、GH51、GH127 に属する複数の L-arabinosidase 候補遺伝子と遺伝子クラスターを形成していた (Fig. 4-1B)。*Bi. adolescentis* JCM15918、BBMN23、22L は、GH27 の β -L-arabinopyranosidase を除き、これらの L-arabinosidase 候補を保存していた。一方、*Bi. longum* は BAD_1528 の相同遺伝子を保存しておらず、他のビフィズス菌は BAD_1528 の相同遺伝子と L-arabinosidase 候補の一部を保存していた。

A



B

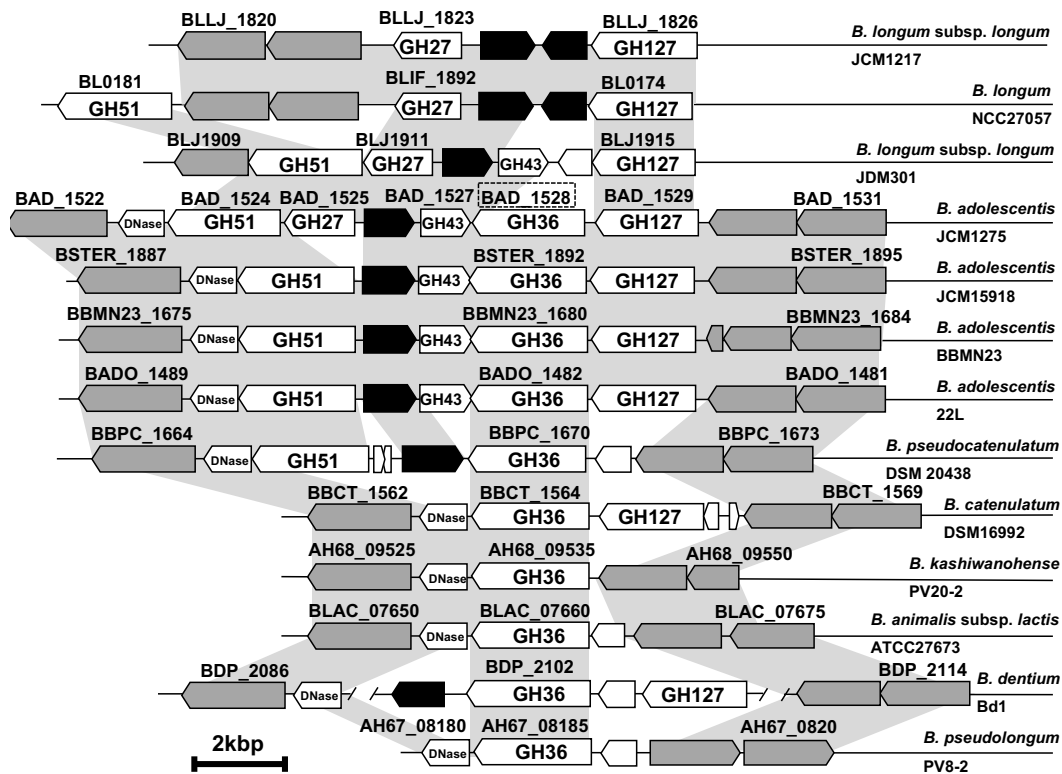


Fig. 4-1. Phylogenetic relationships and gene clusters of BAD_1528.

A, The phylogenetic tree of BAD_1528 with homologous proteins was constructed by the neighbor-joining method using the aligned sequences with the MUSCLE program implemented in MEGA7 software. The locus tag or the characterized enzymatic activities are shown with the abbreviations of the organisms and the GenBank accession numbers. The protein characterized in this study is enclosed in the dash box. The abbreviations of the enzymatic activities and the organisms are as follows: AGA, α -D-galactopyranosidase; BAL, β -L-arabinopyranosidase; Bad, *Bi. adolescentis*; Bal, *Bi. animalis* subsp. *lactis*; Bbi, *B. bifidum*; Bbr, *B. breve*; Bc, *Bi. catenulatum*; Bd, *B. dentium*; Bk, *B. kashiwanohense*; Bl, *Bi. longum*; Bll, *Bi. longum* subsp. *longum*; Bpc, *Bi. pseudocatenulatum*; Bpl, *Bi. pseudolongum*; Cj, *Clostridium josui*; Cp, *Chitinophaga pinensis*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Gs, *Geobacillus stearothermophilus*; La, *Lactobacillus acidophilus*; Rg, *Ruminococcus gnavus*; Sa, *Streptomyces avermitilis*. B, The gene clusters encoding L-arabinosidases in *Bifidobacterium* strains. Genes encoding sugar transporters and transcriptional regulators are depicted in gray and black arrows, respectively. Light gray bars indicate orthologous regions. The white arrows indicate glycoside hydrolase candidates or hypothetical proteins. The numbers of predicted glycoside hydrolases or the predicted enzymatic activities are shown in the white arrows with locus tags. DNase, TatD DNase family protein.

組換え BAD_1528 の調製と性質

組換え BAD_1528 タンパク質は、37°C で可溶性タンパク質として発現した。SDS-PAGE の結果、精製した BAD_1528 タンパク質は、見かけの分子量が 89 kDa の単一バンドとして確認され (Fig. 4-2)、計算上の分子量 88,803 Da と一致した。

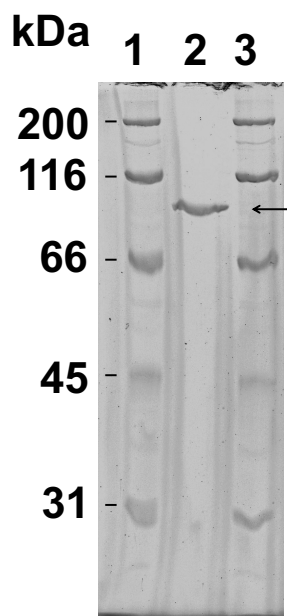


Fig. 4-2. SDS-PAGE analysis of recombinant BAD_1528.

Purified BAD_1528 was electrophoresed on a 10 % polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lanes 1 and 3, molecular size markers; lane 2, purified enzyme. The arrow indicates the band that corresponds to BAD_1528.

次に、*pNP* 基質を用いて BAD_1528 の基質特異性を測定した。BAD_1528 は、*pNP*- β -L-Arap を加水分解し、*pNP*- α -D-Gal に弱く作用したが、他の *pNP* 基質には作用しなかった (Fig. 4-3)。*pNP*- β -L-Arap を用いて BAD_1528 の至適条件を測定したところ、至適 pH は 5.0、至適温度は 40°Cであった (Fig. 4-4)。BAD_1528 の基質特異性を明らかにするために、二糖類、オリゴ糖、多糖類を用いた。その結果、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara が *pNP* 基質を除くと本酵素にとって最良の基質であることが分かった (Fig. 4-5A、Table 4-1)。BAD_1528 は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-ART と α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対しても弱く活性を示したが (それぞれ Fig. 4-5B, C)、これらの比活性は、それぞれ β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対する比活性の 0.0820%と 0.177%であった (Table 4-1)。一方、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araf-Gal₃ の加水分解反応は、検出限界以下であった (Fig. 4-5D)。また、この酵素は、アラビアガム AGP、カラマツ AGP、アラビノキシラン、アラビナンを含むすべての多糖類に対して活性を示さなかった (データ省略)。BAD_1528 の *pNP*- β -L-Arap に対する K_m は 1.48 mM で、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara および *pNP*- α -D-Gal の値のそれぞれ 1/5.9 倍、1/4.0 倍と低く、 k_{cat} は、81.5 s⁻¹ で、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara および *pNP*- α -D-Gal と比べてそれぞれ 11 倍、34 倍高かった (Table 4-2)。結果として、*pNP*- β -Arap の k_{cat}/K_m 値は β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara よりも 62 倍高く、*pNP*- α -D-Gal の k_{cat}/K_m 値と比べて 135 倍高かった。

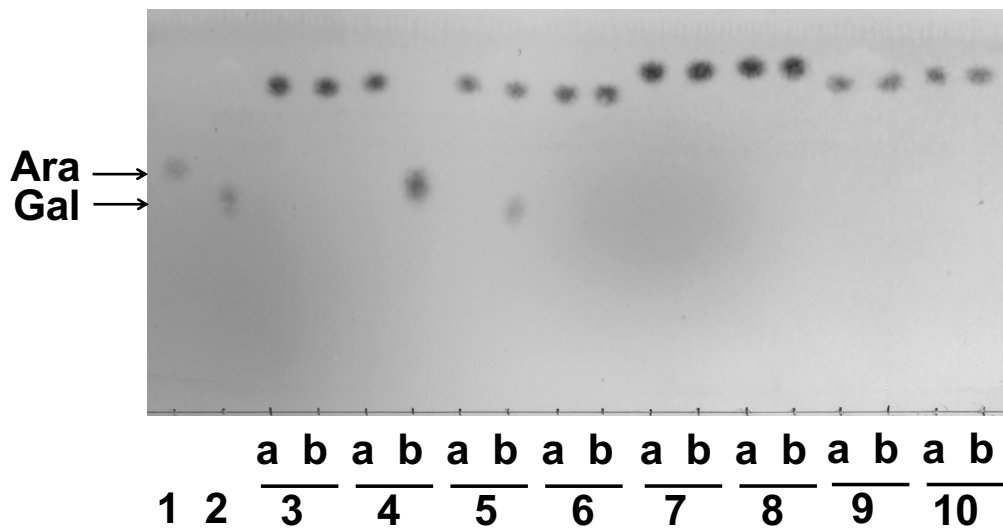


Fig. 4-3. TLC analysis of BAD_1528 reactions with the pNP-substrates.

The pNP-substrates were incubated in the absence (lane a) or presence (lane b) of the recombinant enzyme at 40 °C for 16 h. pNP- α -L-Arap (lane 3), pNP- β -L-Arap (lane 4), pNP- α -D-Gal (lane 5), pNP- β -D-Gal (lane 6), pNP- α -D-Xyl (lane 7), pNP- β -D-Xyl (lane 8), pNP- α -D-Glc (lane 9), and pNP- β -D-Glc (lane 10) were used as substrates. Lane 1, L-arabinose standard; lane 2, galactose standard.

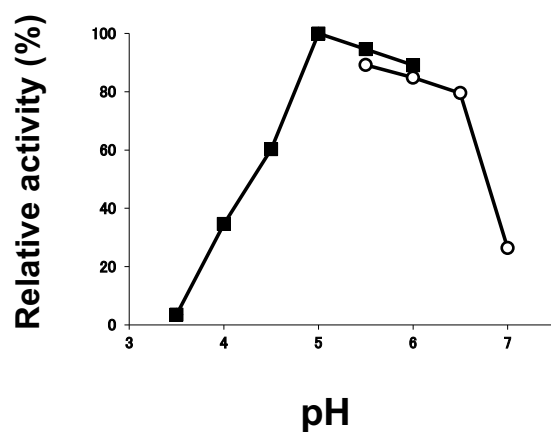
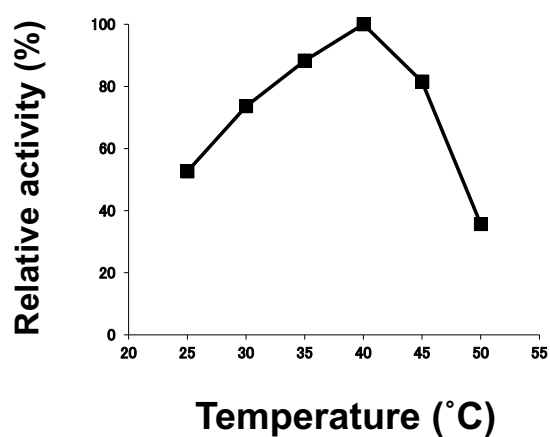
A**B**

Fig. 4-4. Effects of pH and temperature on the activity of BAD_1528.

A, pH dependence of BAD_1528 activity in various buffers at 40 °C for 20 min. Enzyme activities are expressed as a percentage of the activity in acetate buffer at pH 5.0. B, Temperature dependence of BAD_1528 activity at pH 5.0 for 20 min. The enzymatic activities are expressed as the percentage of the activity at 40 °C. Buffers: sodium acetate (closed square) and MES (open circle).

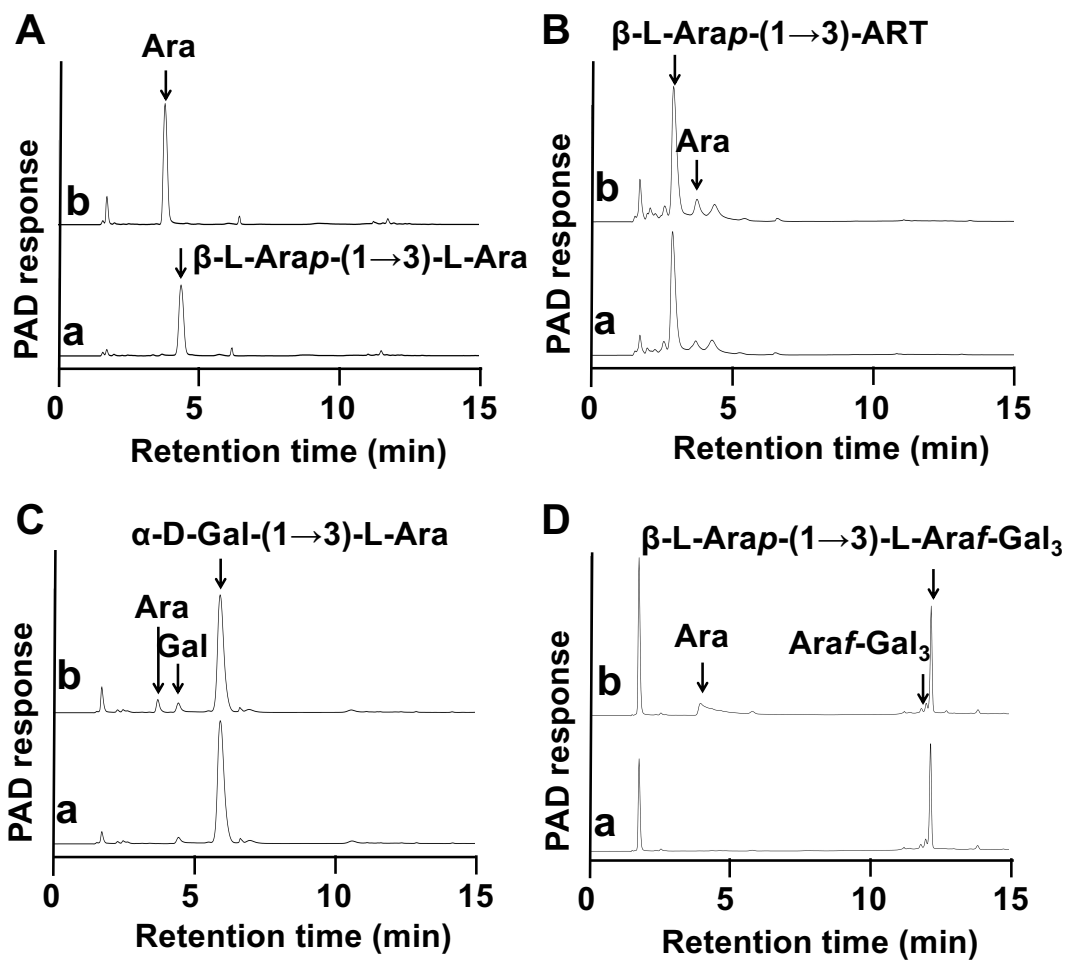


Fig. 4-5. HPAEC-PAD analysis of BAD_1528 reactions with disaccharides and oligosaccharide. β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara (A), β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-ART (B), α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara (C), and β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araf-Gal₃ (D) were incubated with (b) or without (a) BAD_1528 at 40 °C for 16 h.

Table 4-1. Substrate specificities of BAD_1528

Substrate ^a	Specific activity (Units/mg)	Relative activity ^b (%)
<i>p</i> NP- β -L-Arap	46.80	2480
β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara ^c	1.89	100
β -L-Arap- β -L-Arap- <i>p</i> NP ^d	1.07	56.6
β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-ART	0.00155	0.0820
β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araf-Gal ₃	Trace	Trace
<i>p</i> NP- α -D-Gal	0.903	47.8
α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara	0.00335	0.177

^aThe substrate concentrations of *p*NP- β -L-Arap, β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara, β -L-Arap- β -L-Arap-*p*NP, β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-ART, β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araf-Gal₃, *p*NP- α -D-Gal, and α -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-L-Ara were 8.0, 5.0, 0.77, 0.25, 0.25, 8.0, and 0.44 mM, respectively.

^bRelative activity is expressed as the percentage of the activity toward β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara.

^cThe specific activity was calculated on the value for released L-arabinose by one-half.

^dThe specific activity was calculated on the value for released L-arabinose.

Table 4-2. Kinetic parameters of BAD_1528

	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>p</i> NP- β -L-Arap	1.48 \pm 0.04	81.5 \pm 0.51	54.9
β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara	8.69 \pm 1.9	7.66 \pm 1.6	0.881
<i>p</i> NP- α -D-Gal	5.96 \pm 0.03	2.43 \pm 0.01	0.408

糖転移活性

アクセプターとして10%メタノールとエタノールを用いた場合では、糖転移物はTLCで検出されたものの、10%の1-プロパノールをアクセプターとした場合では、糖転移物は検出できなかった (Fig. 4-6A)。メタノールをアクセプターとして得られた糖転移物は、BAD_1528 処理により部分的に加水分解されてL-アラビノースとなった (Fig. 4-6B)。このことから、糖転移物はアノマー配置を保持した Methyl- β -L-Arap であることがわかった。次に、グルコース、ガラクトース、L-アラビノース、スクロース、*p*NP- β -L-Arap を糖転移反応のアクセプターとして使用した。アラビノピラノシル残基はすべてのアクセプターにわずかに転移し (データ省略)、部分精製した生成物はBAD_1528 処理により加水分解された (Fig. 4-7)。このことから、アラビノピラノシル部位は β -アノマー型で結合していることが分かった。これらのデータは、BAD_1528 が幅広いアクセプター特異性を持っていることを示している。特に、精製した β -L-Arap- β -L-Arap-*p*NP は、HPAEC-PAD 上で13.3分に検出され (Fig.4-7E)、*p*NP- β -L-Arap に対応するピーク (保持時間: 15.0 分) とは異なっていた。MALDI-TOF MS では、 β -L-Arap- β -L-Arap-*p*NP の 405.05 m/z の分子イオンピークが観測された (calc. 403.11 m/z)。 β -L-Arap- β -L-Arap-*p*NP の BAD_1528 に対する特異性は高く、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対する特異性と比較して 56.6%であった (Table 4-1)。GH36 の α -D-galactosidase のほとんどは、 α -ガラクトシルの新規糖鎖を合成する糖転移活性を有している (71, 132, 133)。したがって、BAD_1528 は、 β -L-アラビノピラノシルの新規糖鎖を合成する可能性がある。

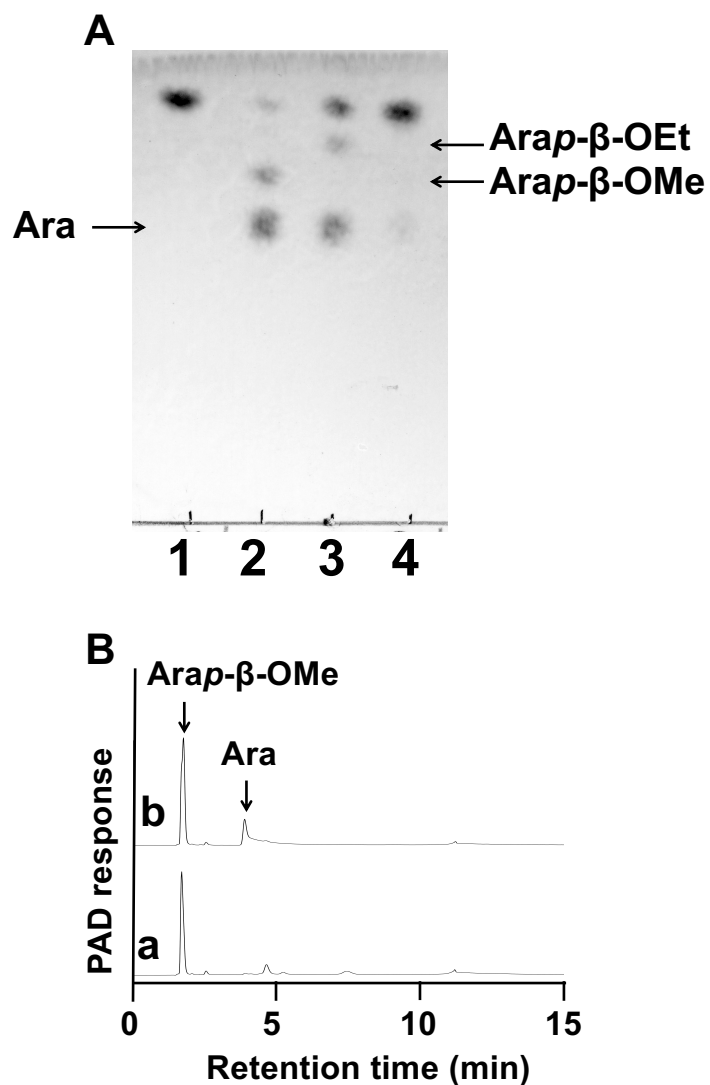


Fig. 4-6. Transglycosylation activity of BAD_1528 in the presence of 1-alkanols. A, BAD_1528 was incubated with *pNP-β-L-Arap* in the presence of either 10 % methanol (lane 2), ethanol (lane 3), or 1-propanol (lane 4) at 40°C for 2 h. Lane 1, *pNP-β-L-Arap* standard. Me, methyl; Et, ethyl. B, Purified *Arap-β-OMe* was incubated with (b) or without (a) BAD_1528 at 40 °C for 16 h.

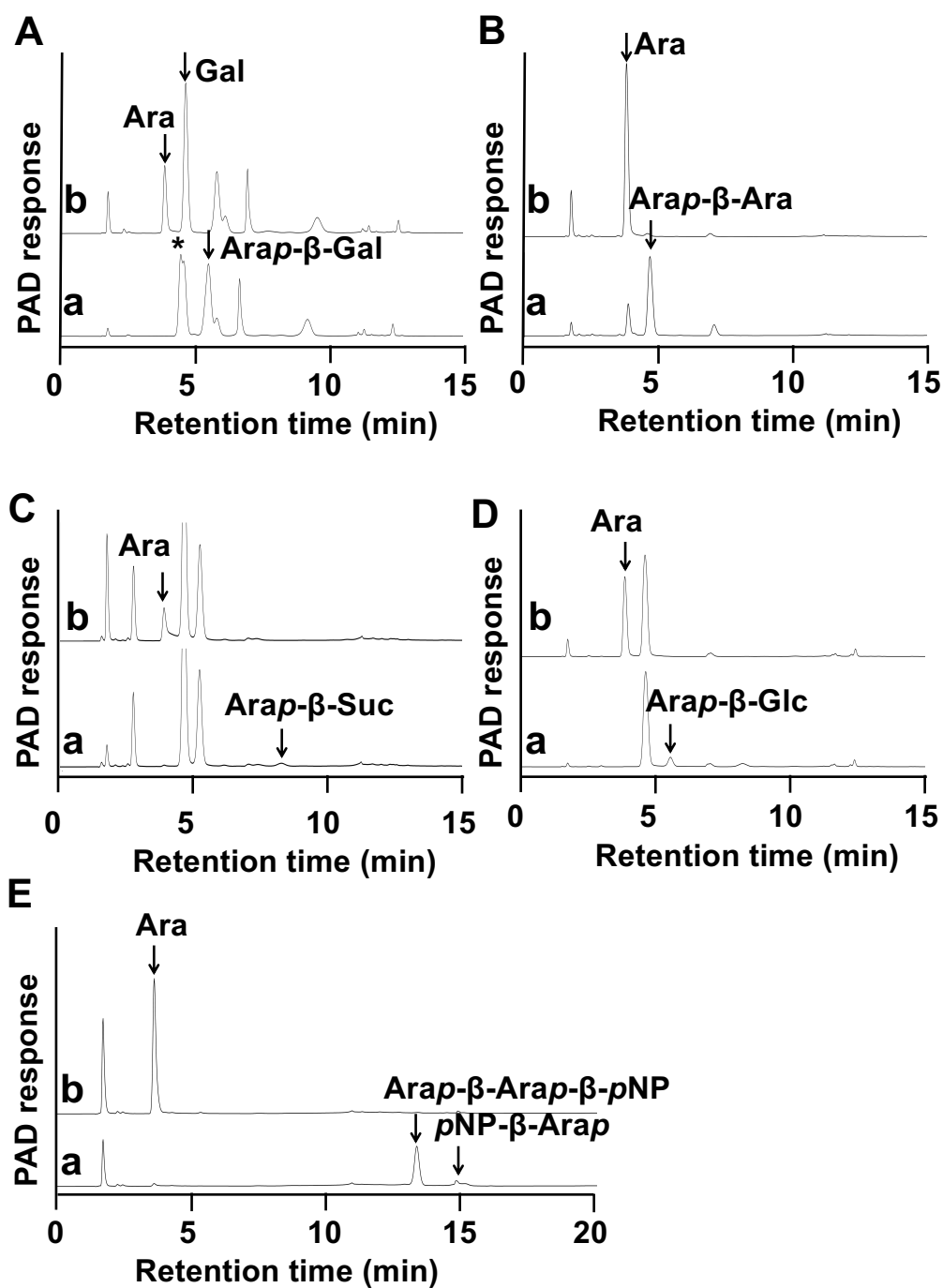


Fig. 4-7. HPAEC-PAD analysis of BAD_1528 reactions with transglycosylation products. *Arap-β-Gal* (A), *Arap-β-Ara* (B), *Arap-β-Suc* (C), *Arap-β-Glc* (D), and β -L-*Arap-β-L-Arap-pNP € were incubated with (b) or without (a) BAD_1528 at 40 °C for 16 h. A shoulder peak indicated by the asterisk was predicted to be *Arap-β-Ara*.*

菌体酵素活性と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の *in vitro* 資化性試験

グルコースとガラクトースを含む培地で培養した *Bi. adolescentis* JCM1275 および JCM15918 の菌体溶解液を粗酵素として用い、*pNP*- β -L-Arap および β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対する分解性試験を行った。その結果、*pNP*- β -L-Arap に対して β -L-arabinopyranosidase 活性が検出された (Fig. 4-8)。さらに、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対しても弱い活性が TLC で検出され、HPAEC-PAD でも遊離した L-アラビノースが検出された (データ省略)。そのため、*Bi. adolescentis* JCM1275 および JCM15918 は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の資化性を有していると予想され、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を唯一の炭素源とした培地にて資化性試験を行ったが、糖源を含まない培地と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を含む培地の間で、生育に明確な違いは見られなかった (データ省略)。さらに、HPAEC-PAD による培養後培地中の β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara ピークの減少も検出されなかった (データ省略)。これらのデータから、今回使用した *Bi. adolescentis* 株では、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を利用できないことが示唆された。

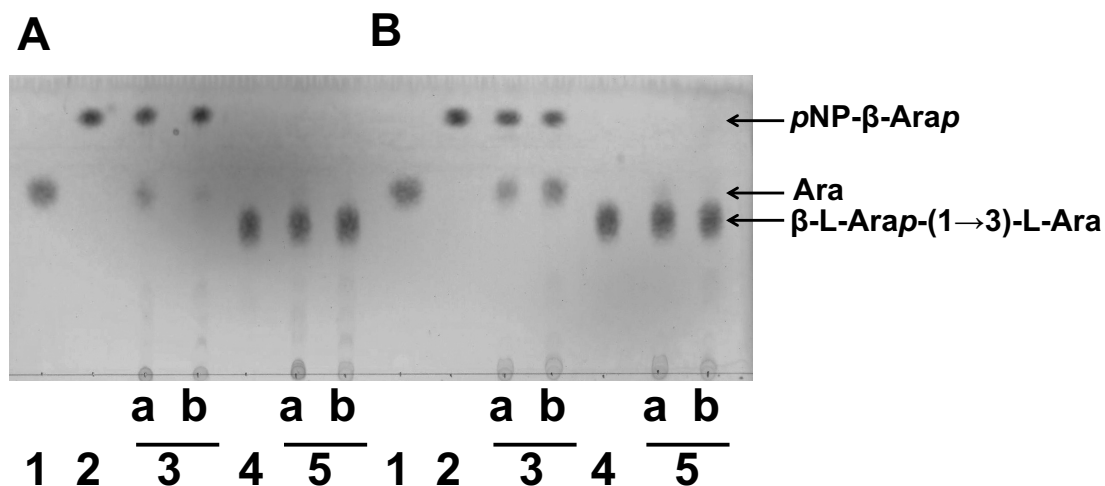


Fig. 4-8. TLC analysis of β -L-arabinopyranosidase activities in *Bi. adolescentis* strains.

The sonicated cell lysates of *Bi. adolescentis* JCM1275 (lane a) and JCM15918 (lane b) cultured in the MRS medium supplemented with glucose (A) or galactose (B) were incubated with *pNP*- β -L-Arap (lane 3) or β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara (lane 5) at 40 °C for 16 h. Lane 1, L-arabinose standard; lane 2, *pNP*- β -L-Arap standard; and lane 4, β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara standard.

第四節 考察

本章では、BAD_1528 が天然の基質に由来する β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara に対して加水分解活性を示す GH36 で初めての β -L-arabinopyranosidase であることを明らかにした。この酵素は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Araf-構造を含むオリゴ糖や多糖に対してはほとんど活性を示さず、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-ART に対しては弱い活性を示した。ピラノース環の形はフラノースの形よりも熱力学的に安定であることから、水溶液中では β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara はピラノースの形で β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Arap として存在していると考えられる。BAD_1528 は、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Arap 構造を認識する新規の *exo*- β -L-arabinopyranosidase である。Fig. 4-1B に示した複数のビフィズス菌種において、相同遺伝子 (BAD_1528 との同一性 59.3~81.3%) が保存されていたことから、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 分解酵素はほぼ全てのビフィズス菌種に存在すると考えられている。 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara は、部分的な酸加水分解により調製することができるが、遊離の状態での存在はこれまで報告されていなかった。本研究では、*Bi. longum* JCM7052 由来の GAfase がアラビアガム AGP やカラマツ AGP から β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を遊離することを示した (第二章に記載)。 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 構造は、アラビアガム AGP やカラマツ AGP、小麦 AGP の側鎖末端でのみ存在が報告されている。また、小麦 AGP において、末端の Arap はガラクトース鎖の伸長の停止シグナルとして機能しているという報告があり、他の AGP にも β -L-Arap を側鎖末端に持つ可能性はある。興味深いことに、*Bi. longum* JCM1217 菌体から β -L-arabinopyranosidase 活性は見られず、GH27 の β -L-arabinopyranosidase (BLLJ_1823) は遺伝子発現の転写制御が行われていない偽遺伝子であると予測された(92)。*Bi. longum* JCM1217 はII型 AG 分解に関わる酵素群を保持していることから、AGP は、複数のビフィズス菌種が協力しながら資化している可能性があると考えられた。

Bi. adolescentis には、アラビノキシランオリゴ糖を分解するユニークな α -L-arabinofuranosidase がいくつか報告されている。GH43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase

AXHd3 (BAD_0301) (135, 136)や、 α -L-Arafが1つのキシロース残基に二個所置換している構造から C3 結合アラビノシル残基のみを遊離する GH51 α -L-arabinofuranosidase (BAD_1524)(136)、単置換されたキシロース残基からアラビノシル残基を遊離する AXHm23 (BAD_0423)(136)などが存在する。さらに、 α 1,5-アラビノオリゴ糖に特異的な GH1 α -L-arabinofuranosidase (BAD_0156) を有している(137)。また、BAD_1528 の近傍遺伝子として、BAD_1525 が GH27 α -D-galactopyranosidase/ β -L-arabinopyranosidase であり、BAD_1527 が GH43 α -L-arabinofuranosidase であり、また BAD_1529 が GH127 β -L-arabinofuranosidase であることを明らかにした (未発表データ)。

L-アラビノースは、ビフィズス菌種によって利用能が異なるものの、いくつかのビフィズス菌種が糖質源として利用できる。本研究では、*Bi. adolescentis* 株は、細胞内に β -L-arabinopyranosidase 活性が存在するにもかかわらず、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を糖質源として生育しなかったことから、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara は L-アラビノースと同様に *Bi. adolescentis* にとって良好な糖質源ではないと考えられる。Pastell ら(120)は、キシロオリゴ糖の L-アラビノース残基の除去には α -L-arabinofuranosidase が必要であるが、*Bi. adolescentis* は遊離された L-アラビノースを利用せず、*Bi. longum* など他のビフィズス菌が利用する可能性があると報告している。その結果、*Bi. adolescentis* の豊富な L-arabinosidase は、他のビフィズス菌種にエネルギー源となる L-アラビノースを供給することで、ビフィズス菌の共生に重要な役割を果たしていると考えられる。また、これらの酵素は、植物のオリゴ糖を細胞内で分解するためのアクセサリ酵素であると予測されている。アラビノキシラン分解において、 α -L-arabinofuranosidase が β -xylanase と相乗効果を発揮するという報告がいくつかある(138-140)。したがって、オリゴ糖から L-アラビノースを遊離させることは、他の酵素が基質にアクセスしやすくするために重要である。以上のように、これらの多くの L-arabinosidase が *Bi. adolescentis* に保存されていることは、生存戦略上において重要な意義があると考えられる。

第五章 結論

本研究では、アラビアガム AGP 資化機構に関わる代謝関連酵素の機能解析によって *Bi. longum* の増殖機構を解明するとともに、アラビアガム AGP が腸内環境に共存する細菌の協同作用によって利用される共生関係の存在を明らかにした。予想される一連の分解および資化機構を Fig. 5-1 に示している。

第二章では、アラビアガム AGP 資化性菌と非資化性菌の比較ゲノム解析によって、*Bi. longum* JCM7052 から、アラビアガム AGP の側鎖末端に存在する α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara の二糖を遊離する GH39 3-O- α -D-galactosyl- α -L-arabinofuranosidase (GAfase) を初めて見出した。さらに、菌体内に取り込まれ、菌体内で作用する GH36 α -D-galactosidase の機能を明らかにし、*Bi. longum* のアラビアガム AGP 分解機構を解明した。

第三章では、GAfase 処理により上述の二糖を除去したアラビアガム AGP に対して、更なる分解を行う α -L-arabinofuranosidase (BlArafE) を見出した。BlArafE は GH43 サブファミリー 22 (GH43_22) と GH43_34 の二つの触媒ドメインを同一タンパク質内に持つマルチドメイン酵素であった。各触媒ドメインの基質特異性解析により、GH43_22 と GH43_34 はそれぞれ α 1,3-L-Araf と α 1,4-L-Araf に作用し、アラビアガム AGP 側鎖に存在する L-arabinose を逐次分解することを明らかにした。 α 1,4-Araf に作用する α -L-arabinofuranosidase は初めての発見である。また、アラビアガム AGP を炭素源として用いた *Bi. longum* JCM7052 培養後の限界分解物として、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara と α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal (S4) のオリゴ糖が培地中に蓄積されることを見出した。さらに、S4 が一部の *Bacteroides* 属細菌によって利用されることを見出し、アラビアガム AGP が腸内環境に共存する細菌の協同作用によって利用されることを明らかにした。さらに、第四章では、*Bi. longum* と同じ腸内環境に生息する *Bi. adolescentis* 由来の GH36 β -L-arabinopyranosidase のクローニングならびに酵素学的特性の解析を行い、 β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara 分解に対して高い

基質特異性を示すことを明らかにした。しかし、*Bi. longum* JCM7052 の GAfase によって遊離した β -L-Arap-(1 \rightarrow 3)-L-Ara を *Bi. adolescentis* は資化することはできず、他に最適な基質が存在する可能性があることが示唆された。

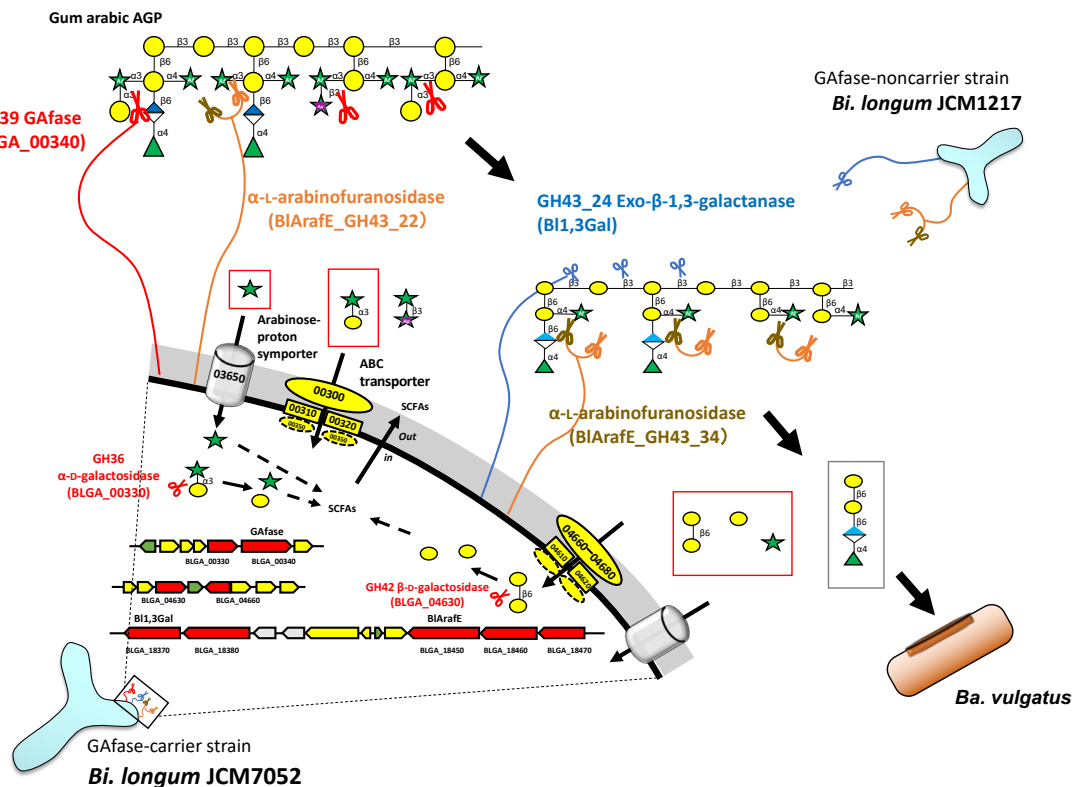


Fig. 5-1. Schematic model of the degrading of gum arabic AGP by *Bi. longum* and utilization of limited product by *Bacteroides vulgatus*.

Bi. longum JCM1217 は糖質関連酵素データベース (CAZy; Carbohydrate-Active enZymes) (<http://www.cazy.org>) に基づくと、25 の GH ファミリーに属する 61 個の糖質加水分解酵素が登録されている。このうち、トランケートされ、機能が失われていると考えられる遺伝子が 8 個存在しているため、53 個の糖質加水分解酵素が機能していると考えられる。また、シグナルペプチドを持ち、菌体外または菌体表層に局在していると予測される酵素は 17 個であり、そのうち 3 つはファージゲノムによって運ばれた GH23 や GH25 のファミリーに属するリゾチームである可能性が高いため、残りの 14 個が菌体外で多糖やオリゴ糖を

分解するために利用しているものであると考えられる。本研究で、*Bi. longum* JCM1217 の菌体表層局在型酵素 BI_{ArafE} の機能が新たに解明されたことにより、*Bi. longum* JCM1217 の菌体外で働く糖質加水分解酵素の全体像が明らかになった (Fig. 5-2)。それらは、アラビノガラクトタン (BI_{1,3Gal}、BI_{1,6Gal}、BI_{ArafA}、BI_{ArafE}) (30)、エクステンシン [HypAA、HypBA2、BLLJ_0089 (β -L-arabinofuranosidase)] (32, 33)、アラビノキシラン (XynD、BI_{ArafD})(34)、ミルクオリゴ糖 (LnbX) (35)、ムチン (EngBF) (36)、アラビナン [BI_{ArafB}、BI_{ArafC}、BLLJ_1848 (β -L-arabinofuranosidase)] (31)の分解に関わる酵素群である。以上のように、*Bi. longum* はヒトミルクオリゴ糖 (母乳) から多種多様な食物繊維 (固形食) までの幅広い利用能を持っているため、乳児から成人の腸管にまで生息可能であると考えられる。このことは、母乳から固形食への食性変化が起こる時期の腸内細菌叢において、どちらの資化能も持つ *Bi. longum* が Keystone 種として機能していることを強く示唆している。今後は、離乳期に着目して、*Bi. longum* と他の細菌と共生関係の調べることによって、腸内細菌叢形成と植物性多糖の関連性を糖代謝の観点から明らかにしていきたい。

さらに、アラビアガム AGP やカラマツ AGP の分解に関わる酵素が明らかになったことにより、本酵素を他の植物由来の AGP の多種多様な糖鎖構造を解明するためのツールとして利用できることが期待できる。AGP は植物の生理機能において、細胞増殖、分裂、生殖成長、体細胞胚形成、木部分化、非生物学的ストレス反応、ホルモン、シグナル伝達等を担う(141)ため、これらの糖鎖構造を明らかにすることは、これらの植物の生理機能の分子機序を解明する上で重要な知見となり得ると考えられる。また、AGP の分解を担う酵素が遺伝子レベルで明らかになったことにより、プレバイオティクス投与時に効果が得られる人 (レスポnder) と得られない人 (ノンレスポnder) を糖代謝酵素遺伝子の有無で判断することができる可能性もあると考えられる。このような腸内細菌叢形成と関連遺伝子の知見の積み重ねは、個人対応型のプレシジョン栄養学のための基盤構築に貢献する。今後、プレシジョン栄養学に基づいた食物繊維やオリゴ糖のオーダーメイドプレバイオティクスの

提供を行っていくことで、医療費削減や健康長寿社会を実現できると考える。

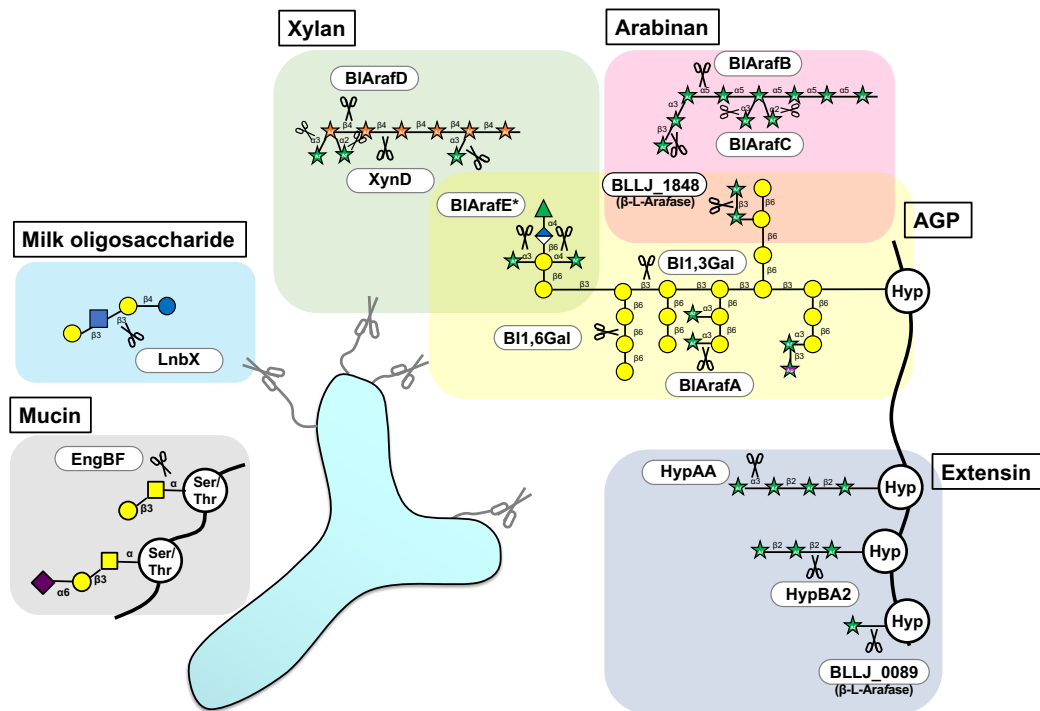


Fig. 5-2. The function of extracellular enzymes in *Bi. longum* JCM1217. Asterisk indicates the enzymes studied in this study.

参考文献

1. 服部正平. 2016. ヒトマイクロバイオーーム研究最前線 : 常在菌の解析技術から生態、医療分野、食品への応用研究まで (第1編: 大島健志郎). NTS.
2. 服部正平. 2014. ヒト腸内マイクロバイオーーム解析のための最新技術. 日本臨床免疫学会会誌 37:412-422.
3. Mitsuoka T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 3:11-28.
4. Kato K, Odamaki T, Mitsuyama E, Sugahara H, Xiao JZ, Osawa R. 2017. Age-related changes in the composition of gut *Bifidobacterium* species. *Curr Microbiol* 74:987-995.
5. Turrone F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, Kerr C, Hourihane J, Murray D, Fuligni F, Gueimonde M, Margolles A, De Bellis G, O'Toole PW, van Sinderen D, Marchesi JR, Ventura M. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One* 7:e36957.
6. Milani C, Lugli GA, Duranti S, Turrone F, Mancabelli L, Ferrario C, Mangifesta M, Hevia A, Viappiani A, Scholz M. 2015. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. *Sci Rep* 5:15782.
7. Odamaki T, Horigome A, Sugahara H, Hashikura N, Minami J, Xiao JZ, Abe F. 2015. Comparative genomics revealed genetic diversity and species/strain-level differences in carbohydrate metabolism of three probiotic bifidobacterial species. *Int J Genomics* 2015:567809.
8. Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen SJ. 1999. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol Lett* 172:61-64.
9. He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hosoda M, Benno Y, Salminen S. 2001. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr Microbiol* 43:351-4.
10. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480-484.
11. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 14:169-181.
12. 日本ビフィズス菌センター. 2011. 腸内共生系のバイオサイエンス. 丸善出版.
13. Shepherd ES, DeLoache WC, Pruss KM, Whitaker WR, Sonnenburg JL. 2018. An exclusive metabolic niche enables strain engraftment in the gut microbiota. *Nature* 557:434-438.
14. Milani C, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. 2016. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Appl Environ Microbiol* 82:980-991.

15. Arboleya S, Bottacini F, O'Connell-Motherway M, Ryan CA, Ross RP, van Sinderen D, Stanton C. 2018. Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains. *BMC Genom* 19:33.
16. El Kaoutari A, Armougom F, Gordon JI, Raoult D, Henrissat B. 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 11:497-504.
17. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504:446-450.
18. Takeuchi T, Miyauchi E, Kanaya T, Kato T, Nakanishi Y, Watanabe T, Kitami T, Taida T, Sasaki T, Negishi H. 2021. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature* 595:560-564.
19. Sonnenburg ED, Zheng H, Joglekar P, Higginbottom SK, Fירbank SJ, Bolam DN, Sonnenburg JL. 2010. Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* 141:1241-52.
20. Rakoff-Nahoum S, Coyne Michael J, Comstock Laurie E. 2014. An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Curr Biol* 24:40-49.
21. Rakoff-Nahoum S, Foster KR, Comstock LE. 2016. The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature* 533:255-259.
22. Rogowski A, Briggs JA, Mortimer JC, Tryfona T, Terrapon N, Lowe EC, Basle A, Morland C, Day AM, Zheng H, Rogers TE, Thompson P, Hawkins AR, Yadav MP, Henrissat B, Martens EC, Dupree P, Gilbert HJ, Bolam DN. 2015. Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nat Commun* 6:7481.
23. Koropatkin NM, Martens EC, Gordon JI, Smith TJ. 2008. Starch catabolism by a prominent human gut symbiont is directed by the recognition of amylose helices. *Structure* 16:1105-15.
24. Cartmell A, Munoz-Munoz J, Briggs JA, Ndeh DA, Lowe EC, Basle A, Terrapon N, Stott K, Heunis T, Gray J, Yu L, Dupree P, Fernandes PZ, Shah S, Williams SJ, Labourel A, Trost M, Henrissat B, Gilbert HJ. 2018. A surface endogalactanase in *Bacteroides thetaiotaomicron* confers keystone status for arabinogalactan degradation. *Nat Microbiol* 3:1314-1326.
25. Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, Luis AS, Baslé A, Gray J, Venditto I, Briggs J, Zhang X, Labourel A. 2017. Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature* 544:65-70.
26. Luis AS, Briggs J, Zhang X, Farnell B, Ndeh D, Labourel A, Baslé A, Cartmell A, Terrapon N, Stott K. 2018. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides. *Nature microbiology* 3:210.
27. Pluvinage B, Grondin JM, Amundsen C, Klassen L, Moote PE, Xiao Y, Thomas D, Pudlo NA,

- Anele A, Martens EC. 2018. Molecular basis of an agarose metabolic pathway acquired by a human intestinal symbiont. *Nature communications* 9:1-14.
28. Milani C, Lugli GA, Duranti S, Turrone F, Bottacini F, Mangifesta M, Sanchez B, Viappiani A, Mancabelli L, Taminiu B, Delcenserie V, Barrangou R, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. 2014. Genomic Encyclopedia of Type Strains of the Genus *Bifidobacterium*. *Appl Environ Microbiol* 80:6290-6302.
 29. Ejby M, Fredslund F, Vujicic - Zagar A, Svensson B, Slotboom DJ, Abou Hachem M. 2013. Structural basis for arabinoxylo - oligosaccharide capture by the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI - 04. *Mol Microbiol* 90:1100-1112.
 30. Fujita K, Sakamoto A, Kaneko S, Kotake T, Tsumuraya Y, Kitahara K. 2019. Degradative enzymes for type II arabinogalactan side chains in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:1299-1310.
 31. Komeno M, Hayamizu H, Fujita K, Ashida H. 2019. Two novel α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* belonging to glycoside hydrolase family 43 cooperatively degrade arabinan. *Appl Environ Microbiol* 85:e02582-18.
 32. Fujita K, Sakamoto S, Ono Y, Wakao M, Suda Y, Kitahara K, Suganuma T. 2011. Molecular cloning and characterization of a β -L-arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. *J Biol Chem* 286:5143-50.
 33. Fujita K, Kitahara K, Suganuma T. 2012. Functional analysis of degradative enzymes for hydroxyproline-linked β -L-arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*. *Trends Glycosci Glycotechnol* 24:215-224.
 34. Savard P, Roy D. 2009. Determination of differentially expressed genes involved in arabinoxylan degradation by *Bifidobacterium longum* NCC2705 using Real-Time RT-PCR. *Probiotics Antimicrob Proteins* 1:121-9.
 35. Sakurama H, Kiyohara M Fau - Wada J, Wada J Fau - Honda Y, Honda Y Fau - Yamaguchi M, Yamaguchi M Fau - Fukiya S, Fukiya S Fau - Yokota A, Yokota A Fau - Ashida H, Ashida H Fau - Kumagai H, Kumagai H Fau - Kitaoka M, Kitaoka M Fau - Yamamoto K, Yamamoto K Fau - Katayama T, Katayama T. 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. doi:D - NLM: PMC3757183 [Available on 08/30/14] OTO - NOTNLM.
 36. Fujita K, Oura F, Nagamine N, Katayama T, Hiratake J, Sakata K, Kumagai H, Yamamoto K. 2005. Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J Biol Chem* 280:37415-22.
 37. Falony G, Calmeyn T, Leroy F, De Vuyst L. 2009. Coculture fermentations of *Bifidobacterium* species and *Bacteroides thetaiotaomicron* reveal a mechanistic insight into the prebiotic effect of

- inulin-type fructans. *Appl Environ Microbiol* 75:2312-2319.
38. Degnan BA, Macfarlane GT. 1995. Arabinogalactan utilization in continuous cultures of *Bifidobacterium longum*: Effect of co-culture with *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe* 1:103-12.
 39. Singh RP. 2019. Glycan utilisation system in *Bacteroides* and *Bifidobacteria* and their roles in gut stability and health. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:7287–7315
 40. Munoz J, James K, Bottacini F, Van Sinderen D. 2020. Biochemical analysis of cross - feeding behaviour between two common gut commensals when cultivated on plant - derived arabinogalactan. *Microbial biotechnology* 13:1733-1747.
 41. Jermyn M, Yeow YM, Woods E. 1975. A class of lectins present in the tissues of seed plants. *Funct Plant Biol* 2:501-531.
 42. Ichinose H, Kotake T, Tsumuraya Y, Kaneko S. 2008. Arabinogalactan-proteins degrading enzymes. *J Appl Glycosci* 55:149-155.
 43. Seifert GJ, Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol* 58:137-161.
 44. Street CA, Anderson DM. 1983. Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other *Acacia* gum exudates. *Talanta* 30:887-93.
 45. Aalbers F, Turkenburg JP, Davies GJ, Dijkhuizen L, Lammerts van Bueren A. 2015. Structural and functional characterization of a novel family GH115 4-*O*-methyl- α -glucuronidase with specificity for decorated arabinogalactans. *J Mol Biol* 427:3935-46.
 46. Patel S, Goyal A. 2015. Applications of natural polymer gum arabic: a review. *Int J Food Prop* 18:986-998.
 47. Calame W, Weseler AR, Viebke C, Flynn C, Siemensma AD. 2008. Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *Br J Nutr* 100:1269-1275.
 48. Goellner EM, Utermoehlen J, Kramer R, Classen B. 2011. Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. *Carbohydr Polym* 86:1739-1744.
 49. Fujita K, Sakaguchi T, Sakamoto A, Shimokawa M, Kitahara K. 2014. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* exo- β -1,3-galactanase, an enzyme for the degradation of type II arabinogalactan. *Appl Environ Microbiol* 80:4577-4584.
 50. Terpend K, Possemiers S, Daguet D, Marzorati M. 2013. Arabinogalactan and fructooligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Environ Microbiol Rep* 5:595-603.
 51. Daguet D, Pinheiro I, Verhelst A, Possemiers S, Marzorati M. 2016. Arabinogalactan and fructooligosaccharides improve the gut barrier function in distinct areas of the colon in the

- Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *J Funct Foods* 20:369-379.
52. Crociani F, Alessandrini A, Mucci MM, Biavati B. 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int J Food Microbiol* 24:199-210.
 53. Salyers AA, West SE, Vercellotti JR, Wilkins TD. 1977. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl Environ Microbiol* 34:529-533.
 54. Saishin N, Yamamoto I. 2009. α -Galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* JCM 7052 grown on gum arabic. *J Biol Macromol* 9:71-80.
 55. Kaothip S, Ishiwata A, Ito T, Fushinobu S, Fujita K, Ito Y. 2013. Preparation of *p*-nitrophenyl β -L-arabinofuranoside as a substrate of β -L-arabinofuranosidase. *Carbohydr Res* 382:95-100.
 56. Tischer CA, Gorin PAJ, Iacomini M. 2002. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. *Carbohydr Polym* 47:151-158.
 57. Holmes EW, O'Brien JS. 1979. Separation of glycoprotein-derived oligosaccharides by thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 93:167-70.
 58. Mahendran T, Williams PA, Phillips GO, Al-Assaf S, Baldwin TC. 2008. New insights into the structural characteristics of the arabinogalactan-protein (AGP) fraction of gum arabic. *J Agric Food Chem* 56:9269-9276.
 59. Ling NXY, Pettolino F, Liao ML, Bacic A. 2009. Preparation of a new chromogenic substrate to assay for β -galactanases that hydrolyse type II arabino-3,6-galactans. *Carbohydr Res* 344:1941-1946.
 60. Tanizawa Y, Fujisawa T, Nakamura Y. 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34:1037-1039.
 61. Aspinall GO, Knebl MC. 1986. The location of α -D-galactopyranose residues in gum arabic. *Carbohydr Res* 157:257-260.
 62. Kataeva IA, Uversky VN, Brewer JM, Schubot F, Rose JP, Wang B-C, Ljungdahl LG. 2004. Interactions between immunoglobulin-like and catalytic modules in *Clostridium thermocellum* cellulosomal cellobiohydrolase CbhA. *Protein Engineering Design and Selection* 17:759-769.
 63. Odamaki T, Bottacini F, Kato K, Mitsuyama E, Yoshida K, Horigome A, Xiao JZ, van Sinderen D. 2018. Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human lifespan. *Sci Rep* 8:85.
 64. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-4.
 65. Pitson SM, Voragen AG, Beldman G. 1996. Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. *FEBS Lett* 398:7-11.
 66. Maruta A, Yamane M, Matsubara M, Suzuki S, Nakazawa M, Ueda M, Sakamoto T. 2017. A novel α -galactosidase from *Fusarium oxysporum* and its application in determining the structure of the gum arabic side chain. *Enzyme Microb Technol* 103:25-33.

67. Jones DR, Uddin MS, Gruninger RJ, Pham TTM, Thomas D, Boraston AB, Briggs J, Pluvinage B, McAllister TA, Forster RJ, Tsang A, Selinger LB, Abbott DW. 2017. Discovery and characterization of family 39 glycoside hydrolases from rumen anaerobic fungi with polyspecific activity on rare arabinosyl substrates. *J Biol Chem* 292:12606-12620.
68. Brouns SJ, Smits N, Wu H, Sniijders AP, Wright PC, de Vos WM, van der Oost J. 2006. Identification of a novel α -galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 188:2392-2399.
69. Cao Y, Huang H, Meng K, Yang P, Shi P, Wang Y, Luo H, Zhang Z, Wu N, Yao B. 2008. Cloning and functional expression of an α -galactosidase from *Yersinia pestis biovar Microtus* str. 91001. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:2203-2205.
70. Goulas T, Goulas A, Tzortzis G, Gibson GR. 2009. A novel α -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: gene molecular cloning and heterologous expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:471-7.
71. Zhao H, Lu L, Xiao M, Wang Q, Lu Y, Liu C, Wang P, Kumagai H, Yamamoto K. 2008. Cloning and characterization of a novel α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal- α -1,4 linkage. *FEMS Microbiol Lett* 285:278-83.
72. Ademark P, de Vries RP, Häggglund P, Ståhlbrand H, Visser J. 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an α - galactosidase and a β - mannosidase involved in galactomannan degradation. *Eur J Biochem* 268:2982-2990.
73. Nakai H, Baumann MJ, Petersen BO, Westphal Y, Hachem MA, Dilokpimol A, Duus JO, Schols HA, Svensson B. 2010. *Aspergillus nidulans* α -galactosidase of glycoside hydrolase family 36 catalyses the formation of α -galacto-oligosaccharides by transglycosylation. *FEBS J* 277:3538-51.
74. Mi S, Meng K, Wang Y, Bai Y, Yuan T, Luo H, Yao B. 2007. Molecular cloning and characterization of a novel α -galactosidase gene from *Penicillium* sp. F63 CGMCC 1669 and expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 40:1373-1380.
75. Margolles-Clark E, Tenkanen M, Luonteri E, Penttilä M. 1996. Three α -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur J Biochem* 240:104-111.
76. Carmi N, Zhang G, Petreikov M, Gao Z, Eyal Y, Granot D, Schaffer AA. 2003. Cloning and functional expression of alkaline α - galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *The Plant Journal* 33:97-106.
77. Lee R-H, Lin M-C, Chen S-C. 2004. A novel alkaline α -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Mol Biol* 55:281-295.
78. Lee RH, Hsu JH, Huang HJ, Lo SF, Chen SC. 2009. Alkaline α -galactosidase degrades thylakoid membranes in the chloroplast during leaf senescence in rice. *New Phytol* 184:596-606.
79. Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium*

- longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci USA 99:14422-7.
80. Lee JH, Karamychev VN, Kozyavkin SA, Mills D, Pavlov AR, Pavlova NV, Polouchine NN, Richardson PM, Shakhova VV, Slesarev AI, Weimer B, O'Sullivan DJ. 2008. Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. BMC Genom 9:247.
 81. Susanne Leder WH, Stefan P. Marx. 1999. α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. Curr Microbiol 38:101–106.
 82. Hinz SWA, Doeswijk-Voragen CHL, Schipperus R, van den Broek LAM, Vincken J-P, Voragen AGJ. 2006. Increasing the transglycosylation activity of α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 by site-directed mutagenesis. Biotechnol Bioeng 93:122-131.
 83. Yamamoto I, Ueno Y, Geshi M, Inagaki Y, Odamaki T, Fujita K. 2021. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM7052. Microbiol Resour Announc 10:01193-20.
 84. Saishin N, Ueta M, Wada A, Yamamoto I. 2010. Purification and characterization of α -galactosidase I from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 7052. J Biol Macromol 10:13-22.
 85. O'Connell KJ, Motherway MOC, O'Callaghan J, Fitzgerald GF, Ross RP, Ventura M, Stanton C, van Sinderen D. 2013. Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. Appl Environ Microbiol 79:6280-6292.
 86. Ejby M, Fredslund F, Andersen JM, Žagar AV, Henriksen JR, Andersen TL, Svensson B, Slotboom DJ, Abou Hachem M. 2016. An ATP binding cassette transporter mediates the uptake of α -(1,6)-linked dietary oligosaccharides in *Bifidobacterium* and correlates with competitive growth on these substrates. J Biol Chem 291:20220-20231.
 87. Cao Y, Yuan T, Shi P, Luo H, Li N, Meng K, Bai Y, Yang P, Zhou Z, Zhang Z, Yao B. 2010. Properties of a novel α -galactosidase from *Streptomyces* sp. S27 and its potential for soybean processing. Enzyme Microb Technol 47:305-312.
 88. Fredslund F, Hachem MA, Larsen RJ, Sorensen PG, Coutinho PM, Lo Leggio L, Svensson B. 2011. Crystal structure of α -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: insight into tetramer formation and substrate binding. J Mol Biol 412:466-80.
 89. Ichinose H, Fujimoto Z, Honda M, Harazono K, Nishimoto Y, Uzura A, Kaneko S. 2009. A β -L-arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis* is a novel member of glycoside hydrolase family 27. J Biol Chem 284:25097-106.
 90. Liu D, Wang S, Xu B, Guo Y, Zhao J, Liu W, Sun Z, Shao C, Wei X, Jiang Z, Wang X, Liu F, Wang J, Huang L, Hu D, He X, Riedel CU, Yuan J. 2011. Proteomics analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705 growing on glucose, fructose, mannose, xylose, ribose, and galactose. Proteomics 11:2628-38.

91. McCarter JD, Withers GS. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4:885-892.
92. Shimokawa M, Kitahara K, Fujita K. 2015. Characterization of a β -L-arabinopyranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *J Appl Glycosci* 62:1-6.
93. Ichinose H, Yoshida M, Kotake T, Kuno A, Igarashi K, Tsumuraya Y, Samejima M, Hirabayashi J, Kobayashi H, Kaneko S. 2005. An exo- β -1,3-galactanase having a novel β -1,3-galactan-binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 280:25820-9.
94. Ichinose H, Kuno A, Kotake T, Yoshida M, Sakka K, Hirabayashi J, Tsumuraya Y, Kaneko S. 2006. Characterization of an exo- β -1,3-galactanase from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol* 72:3515-23.
95. Sakamoto T, Ishimaru M. 2013. Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5201-13.
96. Saito K, Viborg AH, Sakamoto S, Arakawa T, Yamada C, Fujita K, Fushinobu S. 2020. Crystal structure of β -L-arabinobiosidase belonging to glycoside hydrolase family 121. *PLoS One* 15:e0231513.
97. Correia MA, Mazumder K, Bras JL, Firbank SJ, Zhu Y, Lewis RJ, York WS, Fontes CM, Gilbert HJ. 2011. Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J Biol Chem* 286:22510-20.
98. Couturier M, Roussel A, Rosengren A, Leone P, Stalbrand H, Berrin JG. 2013. Structural and biochemical analyses of glycoside hydrolase families 5 and 26 β -(1,4)-mannanases from *Podospora anserina* reveal differences upon manno-oligosaccharide catalysis. *J Biol Chem* 288:14624-35.
99. Sims IM, Furneaux RH. 2003. Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. *Carbohydr Polym* 52:423-431.
100. Goodrum LJ, Patel A, Leykam JF, Kieliszewski MJ. 2000. Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins. *Phytochemistry* 54:99-106.
101. Nie SP, Wang C, Cui SW, Wang Q, Xie MY, Phillips GO. 2013. A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*). *Food Hydrocoll* 31:42-48.
102. Shaw D, Stephen A. 1966. Structure of a polysaccharide found in the corm-sacs of *Watsonia pyramidata* (andr.) stapf. *Carbohydr Res* 1:400-413.
103. Lelliott C, Atkins E, Juritz J, Stephen A. 1978. Conformation of the gummy polysaccharide from corm sacs of *Watsonia pyramidata*. *Polymer* 19:363-367.
104. Shaw DH. 1965. A survey of some South African plant gums with special reference to the chemistry of *Watsonia* corm polysaccharide. University of Cape Town.
105. Ponder GR, Richards GN. 1997. Arabinogalactan from Western larch, Part III: alkaline degradation revisited, with novel conclusions on molecular structure. *Carbohydr Polym* 34:251-

- 261.
106. Tryfona T, Liang HC, Kotake T, Kaneko S, Marsh J, Ichinose H, Lovegrove A, Tsumuraya Y, Shewry PR, Stephens E, Dupree P. 2010. Carbohydrate structural analysis of wheat flour arabinogalactan protein. *Carbohydr Res* 345:2648-2656.
 107. Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J, Yuan C, Hao Z, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ, Mohnen D. 2013. An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell* 25:270-87.
 108. Levigne SV, Ralet M-CJ, Quémener BC, Pollet BN-L, Lapierre C, Thibault J-FJ. 2004. Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers. *Plant Physiol* 134:1173-1180.
 109. Westphal Y, Kühnel S, de Waard P, Hinz SW, Schols HA, Voragen AG, Gruppen H. 2010. Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydr Res* 345:1180-1189.
 110. Virkki L, Maina HN, Johansson L, Tenkanen M. 2008. New enzyme-based method for analysis of water-soluble wheat arabinoxylans. *Carbohydr Res* 343:521-529.
 111. Vincken J-P, Wijsman AJ, Beldman G, Niessen WM, Voragen AG. 1996. Potato xyloglucan is built from XXGG-type subunits. *Carbohydr Res* 288:219-232.
 112. York WS, Kumar Kolli VS, Orlando R, Albersheim P, Darvill AG. 1996. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. *Carbohydr Res* 285:99-128.
 113. Lamport DTA, Miller DH. 1971. Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. *Plant Physiol* 48:454-456.
 114. Bednarski MD, Chenault HK, Simon ES, Whitesides GM. 1987. Membrane-enclosed enzymic catalysis (MEEC): a useful, practical new method for the manipulation of enzymes in organic synthesis. *J Am Chem Soc* 109:1283-1285.
 115. Martens EC, Chiang HC, Gordon JI. 2008. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 4:447-457.
 116. Sakka M, Kunitake E, Kimura T, Sakka K. 2019. Function of a laminin_G_3 module as a carbohydrate - binding module in an arabinofuranosidase from *Ruminiclostridium josui*. *FEBS Lett* 593:42-51.
 117. Sakka M, Yamada K, Kitamura T, Kunitake E, Kimura T, Sakka K. 2019. The modular arabinolytic enzyme Abf43A-Abf43B-Abf43C from *Ruminiclostridium josui* consists of three GH43 modules classified in different subfamilies. *Enzyme Microb Technol* 124:23-31.
 118. Amaretti A, Bernardi T, Leonardi A, Raimondi S, Zanoni S, Rossi M. 2013. Fermentation of xylo-oligosaccharides by *Bifidobacterium adolescentis* DSMZ 18350: kinetics, metabolism, and β -xylosidase activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3109-3117.

119. Vandermarliere E, Bourgois TM, Winn MD, Van Campenhout S, Volckaert G, Delcour JA, Strelkov SV, Rabijns A, Courtin CM. 2009. Structural analysis of a glycoside hydrolase family 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase in complex with xyloetraose reveals a different binding mechanism compared with other members of the same family. *Biochem J* 418:39-47.
120. Pastell H, Westermann P, Meyer AS, Tuomainen P, Tenkanen M. 2009. In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem* 57:8598-606.
121. Rivière A, Moens F, Selak M, Maes D, Weckx S, De Vuyst L. 2014. The ability of Bifidobacteria to degrade Arabinoxylan oligosaccharide constituents and derived oligosaccharides is strain dependent. *Appl Environ Microbiol* 80:204-217.
122. Mewis K, Lenfant N, Lombard V, Henrissat B. 2016. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. *Appl Environ Microbiol* 82:1686-1692.
123. Helbert W, Poulet L, Drouillard S, Mathieu S, Loiodice M, Couturier M, Lombard V, Terrapon N, Turchetto J, Vincentelli R. 2019. Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:6063-6068.
124. Brunecky R, Alahuhta M, Xu Q, Donohoe BS, Crowley MF, Kataeva IA, Yang S-J, Resch MG, Adams MW, Lunin VV. 2013. Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. *Science* 342:1513-1516.
125. Mazurkewich S, Helland R, Mackenzie A, Eijsink VG, Pope PB, Brändén G, Larsbrink J. 2020. Structural insights of the enzymes from the chitin utilization locus of *Flavobacterium johnsoniae*. *Sci Rep* 10:1-11.
126. Wyatt GM, Bayliss CE, Holcroft JD. 1986. A change in human faecal flora in response to inclusion of gum arabic in the diet. *Br J Nutr* 55:261-266.
127. Sakamoto T, Tsujitani Y, Fukamachi K, Taniguchi Y, Ihara H. 2010. Identification of two GH27 bifunctional proteins with β -L-arabinopyranosidase/ α -D-galactopyranosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1115-1124.
128. McKee LS, Brumer H. 2015. Growth of *Chitinophaga pinensis* on plant cell wall glycans and characterisation of a glycoside hydrolase family 27 β -L-arabinopyranosidase implicated in arabinogalactan utilisation. *PLoS One* 10:e0139932.
129. Salama R, Alalouf O, Tabachnikov O, Zolotnitsky G, Shoham G, Shoham Y. 2012. The *abp* gene in *Geobacillus stearothermophilus* T-6 encodes a GH27 β -L-arabinopyranosidase. *FEBS Lett* 586:2436-2442.
130. Imaizumi C, Tomatsu H, Kitazawa K, Yoshimi Y, Shibano S, Kikuchi K, Yamaguchi M, Kaneko S, Tsumuraya Y, Kotake T. 2017. Heterologous expression and characterization of an Arabidopsis β -L-arabinopyranosidase and α -Dgalactosidases acting on β -L-arabinopyranosyl residues. *Journal*

- of Experimental Botany 68:4651-4661.
131. Kikuchi A, Okuyama M, Kato K, Osaki S, Ma M, Kumagai Y, Matsunaga K, Klahan P, Tagami T, Yao M, Kimura A. 2017. A novel glycoside hydrolase family 97 enzyme: Bifunctional β -L-arabinopyranosidase/ α -galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. Biochimie 142:41-50.
 132. Oh SY, Youn SY, Park MS, Baek NI, Ji GE. 2018. Synthesis of stachyobifiose using bifidobacterial α -galactosidase purified from recombinant *Escherichia coli*. Journal of agricultural and food chemistry 66:1184-1190.
 133. van den Broek LAM, Ton J, Verdoes JC, Van Laere KMJ, Voragen AGJ, Beldman G. 1999. Synthesis of α -galacto-oligosaccharides by a cloned α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. Biotechnology Letters 21:441-445.
 134. Odonmažig P, Ebringerová A, Machová E, Alföldi J. 1994. Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dahurica* L.). Carbohydr Res 252:317-324.
 135. van den Broek LA, Lloyd RM, Beldman G, Verdoes JC, McCleary BV, Voragen AG. 2005. Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. Appl Microbiol Biotechnol 67:641-7.
 136. Lagaert S, Pollet A, Delcour JA, Lavigne R, Courtin CM, Volckaert G. 2010. Substrate specificity of three recombinant α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. Biochem Biophys Res Commun 402:644-650.
 137. Suzuki H, Murakami A, Yoshida K-i. 2013. Motif-guided identification of a glycoside hydrolase family 1 α -L-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium adolescentis*. Biosci Biotechnol Biochem 77:1709-1714.
 138. Goncalves TA, Damasio AR, Segato F, Alvarez TM, Bragatto J, Brenelli LB, Citadini AP, Murakami MT, Ruller R, Paes Leme AF, Prade RA, Squina FM. 2012. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. Bioresour Technol 119:293-9.
 139. Rasmussen LE, Xu C, Sørensen JF, Nielsen MK, Meyer AS. 2012. Enzyme kinetics and identification of the rate-limiting step of enzymatic arabinoxylan degradation. Biochemical Engineering Journal 69:8-16.
 140. Lagaert S, Pollet A, Courtin CM, Volckaert G. 2014. β -xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation. Biotechnol Adv 32:316-32.
 141. Tan L, Showalter AM, Egelund J, Hernandez-Sanchez A, Doblin MS, Bacic A. 2012. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. Frontiers in plant science 3.

謝辞

本研究の遂行にあたり終始貴重なご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学農学部の藤田清貴准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり丁寧なるご指導、ご鞭撻を頂きました鹿児島大学農学部の北原兼文教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重なご助言を頂きました琉球大学農学部の金子哲教授、また本論文の審査にあたりご助言を頂きました佐賀大学農学部の後藤正利教授、鹿児島大学水産学部の塩崎一弘准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くの共同研究者から分析や材料のご提供のご協力、およびご助言を頂きました。

ビフィズス菌株のご提供、ゲノム解析を行って頂きました森永乳業株式会社の清水(肖)金忠博士、小田巻俊孝博士、堀米綾子博士をはじめとする森永乳業株式会社の基礎研究所の皆様にも厚く御礼申し上げます。

酵素の基質特異性を決定する上で重要な遊離糖の構造解析や、*p*NP 基質のご提供を頂きました、大阪大学大学院理学研究科基礎理学プロジェクト研究センターの伊藤幸成特任教授、理化学研究所の石渡明弘博士に厚く御礼申し上げます。

マルチドメイン酵素(BIArafE)の各ドメインの性質決定において、研究遂行にあたり、的確なご助言とプラスミドのご提供を頂きました近畿大学農学部の芦田久教授に厚く御礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、鹿児島大学連合農学研究科の諸先生方や学会で議論して頂いた諸先生方には多くの貴重なご助言を頂きました。また、応用糖質研究室の諸先輩方、同期諸氏、後輩の皆様にも心から感謝いたします。

2022年3月
佐々木 優紀