

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 30日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780094

研究課題名（和文）：ビフィズス菌の $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖代謝機構に関わる糖質分解酵素群の解析研究課題名（英文）：Analysis of the glycosidases on the metabolism of  $\beta$ -L-arabinooligosaccharides in *Bifidobacteria*.

研究代表者：藤田 清貴 (Fujita Kiyotaka) 鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号：20381189

研究成果の概要（和文）：

$\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖は、植物細胞壁に含まれるエクステンシンの糖タンパク質糖鎖である。本研究では、ビフィズス菌(*Bifidobacterium longum*)からクローニングした $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群( $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ・新規 $\beta$ -L-アラビノビオシダーゼ・新規 $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ)の諸性質を解明した。また、*B. longum*における $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解代謝経路を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

$\beta$ -L-Arabinooligosaccharides are found in the sugar chains of extensin observed in plant cell wall fractions. In this study, we cloned and characterized  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, novel  $\beta$ -L-arabinobiosidase and novel  $\beta$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. Furthermore, we revealed a novel degradation pathway for  $\beta$ -L-arabinooligosaccharides in *B. longum*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：糖質分解酵素・糖鎖・プレバイオティクス・ $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖・ビフィズス菌・腸内細菌・エクステンシン・資化性

1. 研究開始当初の背景  
糖鎖の機能性を調べる上で糖質分解酵素は重要な研究ツールである。しかし、これまで

$\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解酵素に関しては、その酵素活性の報告すらなかった。そこで、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の探

素とその機能解析を目的とした研究課題を提案した。

## 2. 研究の目的

ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 由来の  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解に関わる酵素群  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (HypAA)・ $\beta$ -L-アラビノビオシダーゼ (HypBA2)・ $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1) の諸性質とビフィズス菌における  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の資化性を解析することで、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖のビフィズス菌における分解代謝機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

*B. longum* からクローニングした HypAA 遺伝子 (BLLJ\_0213)・HypBA2 遺伝子 (BLLJ\_0212)・HypBA1 遺伝子 (BLLJ\_0211) を大腸菌で発現させ、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖及びエクステンシンやポテトレクチン等のハイドロキシプロリン (Hyp) が豊富な糖タンパク質 (HRGP) に対する基質特異性や酵素化学的諸性質の解析を行った。また、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖を炭素源とした資化性試験と誘導生産された酵素群の活性測定を行った。

## 4. 研究成果

$\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の糖鎖構造は  $\beta$ -結合のアラビノフラノース (Araf) で構成された  $\beta$ -Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -Araf-Hyp (Ara<sub>3</sub>-Hyp) 及びその非還元末端に  $\alpha$ 1,3 結合で Araf が付加された Ara<sub>4</sub>-Hyp である。我々は、これまで存在が知られていなかった  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解に関与する遺伝子クラスターをビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum* JCM1217 株) のゲノム中に見出した (図 1a)。HypAA と HypBA2 は、C 末端に FIVAR 領域と膜貫通領域を有していたことから菌体表層に局在する酵素であると予想され、HypBA1 は既知の構造モチーフを持たない菌体内酵素と予想された (図 1b)。

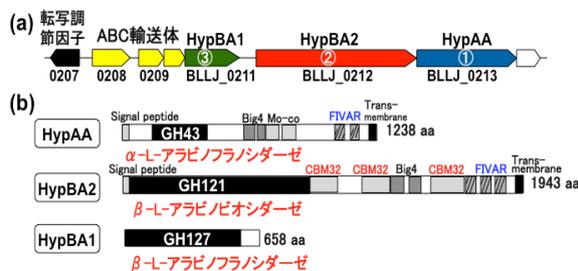


図 1. *B. longum* が有する  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群

(a)  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解に関与する遺伝子クラスター

(b) 分解酵素群の構造モチーフ

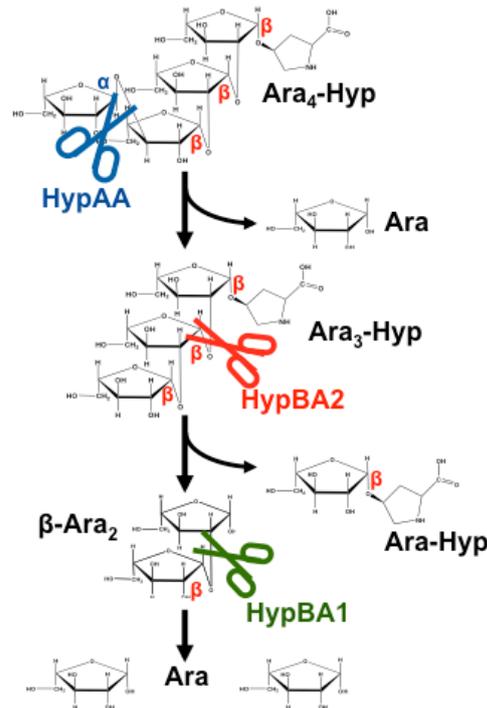


図 2.  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解酵素群による切断様式

表 1.  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の基質特異性

Substrate	HypAA	HypBA2	HypBA1
Ara <sub>4</sub> -Hyp (Araf $\alpha$ Araf $\beta$ Araf $\beta$ Araf $\beta$ Hyp)	+	-	-
Ara <sub>3</sub> -Hyp (Araf $\beta$ Araf $\beta$ Araf $\beta$ Hyp)	-	+	+
Ara <sub>2</sub> -Hyp (Araf $\beta$ Araf $\beta$ Hyp)	-	-	+
Ara-Hyp (Araf $\beta$ Hyp)	-	-	+
$\beta$ -Ara <sub>2</sub> (Araf $\beta$ Araf)	-	-	+
Potato lectin	+	+	-
Extensin	+	+	-

大腸菌で発現させた本酵素群の基質特異性の解析を進めた結果、HypAA は Ara<sub>4</sub>-Hyp の非還元末端に存在する  $\alpha$ 1,3 結合に作用し L-アラビノースと Ara<sub>3</sub>-Hyp に分解する糖質加水分解酵素ファミリー GH43 に属する  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼであり、HypBA2 は Ara<sub>3</sub>-Hyp に作用し  $\beta$ -Ara<sub>2</sub> と Ara-Hyp に分解する  $\beta$ -L-アラビノビオシダーゼであることを明らかにした。そして、HypBA1 は遊離した  $\beta$ -Ara<sub>2</sub> を L-アラビノースに分解する  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼであることを明らかにした (図 2、表 1)。また、Ara<sub>4</sub>-Hyp に分解酵素群を順次加えていくことで、ほぼ完全に L-アラビノースに分解することができた (図 3)。さらに、HypAA と HypBA2 を糖タンパク質であるポテトレクチンやエクステンシンに作用させることで、L-アラビノース及び  $\beta$ -Ara<sub>2</sub> を遊離させることができた (表 1)。

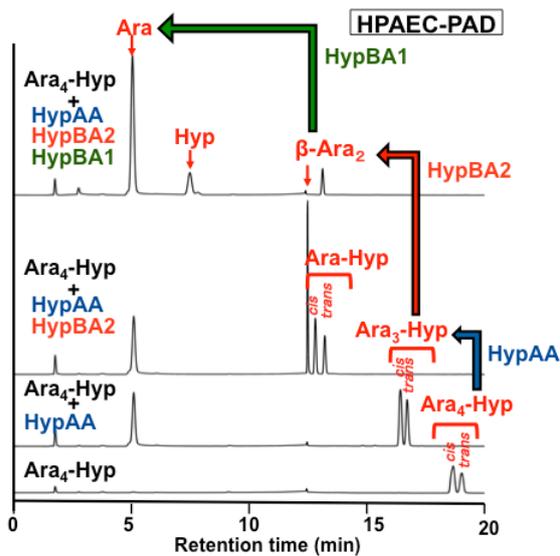


図3.  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の相乗効果

次に、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群のビフィズス菌における役割を明らかにするために資化性試験を行った。供試菌として *B. longum* JCM1217 及び *B. adolescentis* JCM1275、炭素源として Ara<sub>4</sub>-Hyp 及び  $\beta$ -Ara<sub>2</sub> を用いて生育確認を行ったところ、*B. longum* では良好な生育が確認されたのに対して、*B. adolescentis* では生育が確認されなかった。さらに、*B. longum* の洗菌菌体を用いての HypAA 及び HypBA2 の酵素活性と、破碎菌体を用いての HypBA1 の酵素活性が確認された。なお、L-アラビノース及びグルコースで培養した *B. longum* では酵素活性が検出されなかった。*B. adolescentis* JCM1275 のゲノム上には本酵素群がコードされていないことから、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の資化には本酵素群の存在が必要であると考えられる。これらの結果から予想された  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解代謝機構を図4に示す。まず、 $\beta$ -Ara<sub>2</sub> により誘導生産された HypAA と HypBA2 は菌体表層に局在し、エクステンシンから直接 L-アラビノースと  $\beta$ -Ara<sub>2</sub> を切断する。次に、菌体内に取り込まれた  $\beta$ -Ara<sub>2</sub> は菌体内酵素の HypBA1 の作用を受けて L-アラビノースに分解される。そして、L-アラビノースは大腸菌で詳細な解析が行われている L-アラビノース代謝系酵素遺伝子のホモログである L-アラビノースイソメラーゼ (BLLJ\_0342)・L-リブロキナーゼ (BLLJ\_0340)・L-リブロース-5-リン酸-4-エピメラーゼ (BLLJ\_0341) で構成される L-アラビノース代謝経路を経て D-キシロース-5-リン酸に変換された後、酢酸及び乳酸に代謝される。

本研究はこれまで存在が明らかにされていなかった  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の存在を初めて報告したものであり、HypBA2 と HypBA1 が既知の糖質加水分解酵素と全く

相同性を持たない酵素として新規糖質加水分解酵素ファミリー GH121 と GH127 にそれぞれ登録された。また、HypAA が Ara<sub>4</sub>-Hyp 特異的に作用する新規 GH43  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼであることを明らかにした。最近、エクステンシンは根毛の伸長に必須の因子として注目されている (Velasquez, S. M. *et al.*, *Science* **332**, 1401 (2011))。本酵素群は、穏やかな条件でエクステンシンやポテトレクチンから糖鎖を除去できる唯一の酵素であり、エクステンシンにおける  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の役割を研究するための有効なツールになると考えられる。

ヒトの大腸に常在するビフィズス菌の代表菌種である *B. longum* は、 $\alpha$ 結合を持つ L-アラビノース含有多糖であるアラビナンやアラビノキシラン、アラビノガラクトサン等に対して資化性を示すことが報告されている (Van Laere, K. M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1644 (2000))。今回、新たに *B. longum* が  $\beta$ 結合を持つ L-アラビノース含糖タンパク質であるエクステンシンに対しても資化性を示すことを明らかにした。各種ビフィズス菌の中でも特に *B. longum* は食物繊維と称される難消化性の植物多糖や植物糖タンパク質を大腸内で積極的に利用しているようである。今後は、 $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素の詳細な解析を行うと共に、HRGP のもう一つの主要なメンバーであるアラビノガラクトタン-プロテインに対する分解酵素群の解析を行うことで、プレバイオティクスとして作用し大腸内の *B. longum* を選択的に増やす HRGP の重要性を明らかにしたいと考えている。

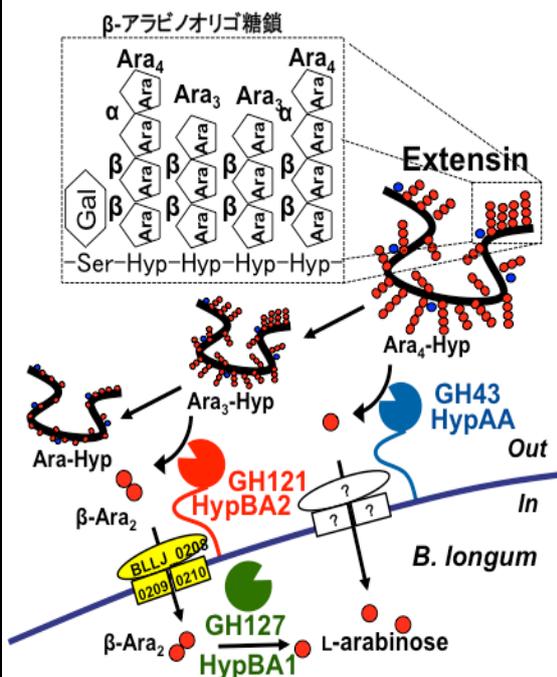


図4 *B. longum* における  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解代謝機構

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Fujita, K., Takashi, Y., Obuchi, E., Kitahara, K., and Suganuma, T.: Characterization of a novel  $\beta$ -L-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: Functional elucidation of a DUF1680 family member. *J. Biol. Chem.*, 286, 38079-38085 (2011) (査読有り).
2. 藤田清貴, 坂元志帆, 小野祐樹, 若尾雅広, 隅田泰生, 北原兼文, 菅沼俊彦: ビフィズス菌由来  $\beta$ -L-アラビノビオシダーゼの機能解析, *応用糖質科学*, 1(2), 153-158 (2011) (査読有り).
3. Fujita, K., Sakamoto, S., Ono, Y., Wakao, M., Suda, Y., Kitahara, K., and Suganuma, T.: Molecular cloning and characterization of a  $\beta$ -L-arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.*, 286, 5143-5150 (2011) (査読有り).

[学会発表] (計9件)

1. 藤田清貴, 奥山千代美, 北原兼文, 菅沼俊彦:  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の *Bifidobacterium longum* に対する増殖促進効果. 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都, 2012. 3. 23)
2. 藤田清貴: ビフィズス菌が生産する  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解酵素群の解析. 日本農芸化学会西日本支部奨励賞講演会 (福岡, 2012. 1. 21)
3. 藤田清貴, 大淵衣里子, 五反田孝平, 北原兼文, 菅沼俊彦: ビフィズス菌による  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の資化性と関連酵素群の解析. 日本応用糖質科学会平成 23 年度大会 (札幌, 2011. 9. 28)

4. Fujita, K., Sakamoto, S., Takashi, Y., Ono, Y., Obuchi, E., Kitahara, K., and Suganuma, T.: Characterization of novel glycosidases involved in the degradation of Hyp-linked oligoarabinosides. 9th CarbohydrateBioengineering Meeting (CBM9), Lisboa, Portugal. May 16th 2011.
5. 藤田清貴, 坂元志帆, 高由香里, 小野祐樹, 大淵衣里子, 北原兼文, 菅沼俊彦:  $\beta$ -アラビノオリゴ糖鎖の分解に関わる新規糖質分解酵素群の機能解析. 日本生物工学会 2010 年度大会 (宮崎, 2010. 10. 29)
6. 藤田清貴, 坂元志帆, 高由香里, 小野祐樹, 若尾雅広, 隅田泰生, 北原兼文, 菅沼俊彦: ビフィズス菌由来  $\beta$ -L-アラビノビオシダーゼの機能解析. 第17回糖質関連酵素化学シンポジウム (静岡, 2010. 9. 17)
7. 藤田清貴, 高由香里, 大淵衣里子, 北原兼文, 菅沼俊彦: ビフィズス菌由来新規  $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼのクローニングと機能解析. 日本応用糖質科学会平成 22 年度大会 (静岡, 2010. 9. 15)

[その他]

ホームページ等

<http://hypba2.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 清貴(FUJITA KIYOTAKA)

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号:20381189