

グリコシダーゼの機能改変によるプレバイオティックオリゴ糖の効率的合成法に関する研究

芦田 久

京都大学大学院生命科学研究所 准教授

緒 言

ビフィズス菌はヒトの腸管に生息する善玉菌の代表的菌種であり、経口投与により宿主に良い影響を与えるプロバイオティクスとしてもよく知られている。ビフィズス菌は糖質の乏しい腸管下部に適応するために、ヒトの消化酵素により分解されない難消化性の糖質を利用するためのグリコシダーゼを豊富に有している。そのひとつがエンド- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (Endo- α -*N*-acetylgalactosaminidase; EngBF) である。ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* や *B. bifidum* が持つ EngBF は、消化管上皮細胞から産生されるムチンのコア 1 型の O 結合型糖鎖 (Gal β 1-GalNAc α 1-Ser/Thr) に作用し、ガラクト *N* ビオース (Gal β 1-3GalNAc; GNB) を遊離させる^{1,2)}。遊離した GNB は GNB およびラクト *N* ビオース I (Gal β 1-3GlcNAc; LNB) に特異的な ABC 型のトランスポーター³⁾により菌体内に取り込まれ、菌体内の GNB/LNB ホスホリラーゼにより代謝される。 β 1-3 結合のガラクトースは腸内細菌一般に見られる β -ガラクトシダーゼにより分解されにくいいため、この 2 糖はビフィズス菌に選択性の高い増殖因子、すなわちプレバイオティクスとしての応用が期待される。LNB については、*in vitro* の培養実験により、ビフィズス菌を選択的に増殖させる効果があることを確

認している⁴⁾。一方、GNB については現在のところ大量調製が困難であるため、ビフィズス菌増殖効果は未検討であるが、LNB と同等かそれ以上の効果が期待される。なぜなら GNB 代謝の鍵となる ABC 型のトランスポーターの糖結合タンパク質や菌体内の GNB/LNB ホスホリラーゼは GNB の方に特異性が高いからである。

エンド- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼと GNB/LNB トランスポーターは、分布は限られるものの腸内の悪玉菌や日和見感染菌にも見られる。しかしながら、その両者を持ち合わせる菌はほぼビフィズス菌に限定されることが各種の腸内細菌のゲノム情報から明らかである。筆者らは EngBF が糖転移反応を触媒することをすでに見出し⁵⁾、この反応を利用して GNB が他の糖に α 結合した 3 糖を調製すれば、Endo- α -GalNAc-ase と GNB トランスポーターの両方を持つ腸内細菌、すなわちビフィズス菌によってのみ資化される、非常に選択性の高いビフィズス菌増殖因子になりうることが期待される。

最近、筆者らは EngBF の結晶構造を明らかにした(図 1)⁶⁾。そこで、本研究では構造情報に基づく本酵素の機能改変により、糖鎖転移活性の強い変異体酵素を創成することを目的とする。そして、より安価な糖鎖供与体の調製方法を検討し、変異体酵素を組み合わせることによる

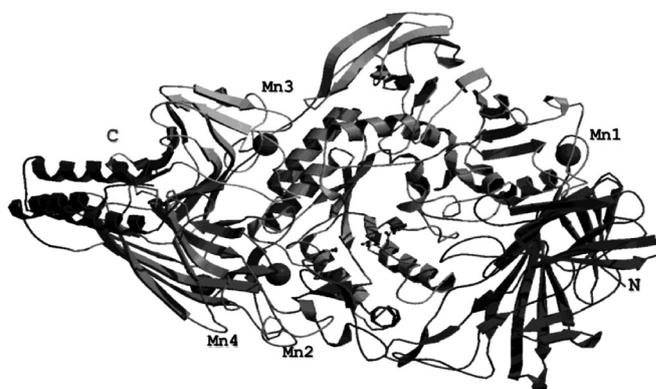


図 1 EngBF の立体構造モデル

プレバイオティックオリゴ糖の実用的生産技術を検討する。

方 法

1. 変異体酵素の作製

Bifidobacterium longum subsp. *longum* JCM 1217 由来 EngBF の全長 1966 アミノ酸のうち 340-1528 アミノ酸部分をコードする遺伝子を含むベクター pET-EngBF-del を鋳型にして部位特異的変異を導入し、各種の変異体酵素を大腸菌 BL21 (λ DE3) で発現させた。酵素は His-Spin Trap (GE Healthcare) と Superdex 200

10/300 GL (GE Healthcare) により精製し、Microcon YM-10 を用いて濃縮、脱塩およびバッファー置換をおこなった。精製標品は SDS-PAGE で純度を確認した。

2. 転移反応

Gal β 1-3GalNAc α 1-pNP (3.3 mM) を 500 mM Glc 存在下で 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で EngBF と反応させた。反応液を Shodex Asahipak NH2P-50 4E カラムを用いた順相 HPLC に供し、アセトニトリル：水 (3:1) で溶出し、溶出されたアミノ糖を 214nm の吸収をモニターすることで生成した加水分解産物 (2 糖) と

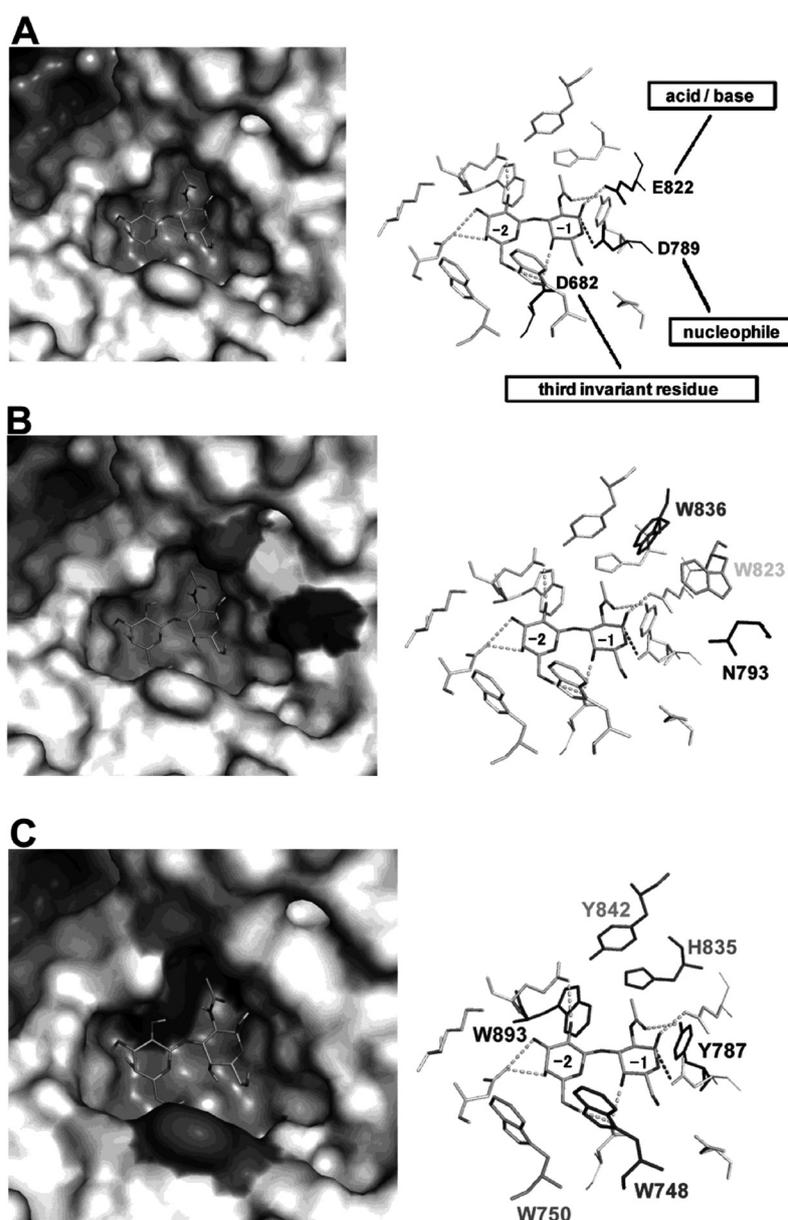


図2 EngBFの活性中心付近のアミノ酸残基
A. 触媒残基；B. 第一変異導入候補残基；C. 第二変異導入候補残基。

糖転移産物(3糖)を定量した。TLC分析は、シリカゲルプレート(Merck)を用いて、1-ブタノール:酢酸:水(2:1:1)で展開し、ジフェニルアミン-アニリン試薬で糖を発色させた。

3. GNBのDMT誘導体化

GNBはGNB/LNBホスホリラーゼの逆反応を用いて酵素合成されたものを、北岡本光博士(食品総合研究所)より供与いただいた。DMT誘導体化は、DMT-MM(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl 4-methyl morpholinium chloride)とGNBを水溶液中で混合したのち、余剰のDMT-MMと未反応のGNBをSephadex G-25を用いたゲル濾過により除去した。

4. 天然基質を供与体とした転移反応

グリコマクロペプチド(GMP, Tatura Nutritional社製)は(株)メグレ・ジャパンより供与していただいた。GMP(90 mg/ml)はあらかじめSiaBb2(80 μ g/ml)で処理し、シアル酸を切断したのち、透析により除去した。33 mg/mlのアシアロGMPを500 mM Glc存在下で50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)中でEngBFと反応させた。3倍量のエタノールを加え反応を止め、遠心分離により上清を得て、順相HPLCにて分析した。

結 果

1. 糖転移活性の向上したEngBF変異体酵素の創成

EngBFはアノマー保持型の酵素であり、ふたつの酸性触媒残基、すなわち酸塩基触媒残基であるE822と求核残基であるD789が活性中心を形成している(図2A)。酵素反応生成物であるGNB(Gal β 1-3GalNAc)とのドッキング解析の結果、ふたつの触媒残基の近傍にはW836、W823、N793といった側鎖の大きなアミノ酸が存在しており、糖転移反応における受容体基質の進入を阻害していることが予想された(図2B)。そこで、これらのアミノ酸を第一変異導入候補残基群として、それぞれをアラニンに置換した変異体を作製した。Gal β 1-3GalNAc α 1-pNPを供与体基質、Glcを受容体基質として糖転移反応をおこなった結果、W836A変異体が野生型の約1.5倍の糖転移活性を示した。続いて、W836残基を他の全ての種類のアミノ酸に置換した変異体を作製したところ、W836F、W836M、W836Yがそれぞれ野生型の3.7、3.2、3.2倍の糖転移活性を示した。

次に、第二変異導入候補残基群として活性中心周

辺に存在するW748、W750、Y787、H835、Y842、W893に着目し(図2C)、それぞれのアラニン置換体を作製した。糖転移活性を評価したところ、H835A、Y842A、W893Aの3変異体が野生型の3.3、2.5、3.3倍の高い転移活性を示した。これらの残基のアラニン以外の残基への変異では、さらに良い変異体は得られなかったため、第一群の変異と第二群の変異を組み合わせた二重変異体を作製した。その結果、H835A/W836FとW836F/W893Aのふたつの二重変異体が野生型の4.5倍、4.2倍の糖転移活性を示した。糖転移反応の経時変化を調べたところ、特に前者においては早い糖転移反応とともに、転移産物の加水分解反応が抑えられている事が明らかになった(図3)。消費した供与体基質Gal β 1-3GalNAc α 1-pNPに対する糖転移産物の収率は、野生型酵素の19%に対して85%に向上していた。

2. DMT誘導体の糖供与体としての利用

糖やオリゴ糖のDMT(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)誘導体化は、水酸基の保護が不要で、水溶液中でアノマー水酸基への反応が選択的に進行することから、グリコシダーゼの新たな基質として有用である。GNBのDMT誘導体がEngBFの基質になるか否か、また糖転移反応の供与体として適当か否かを評価した。まず野生型酵素を用いて糖転移反応液をHPLCで分析したところ、

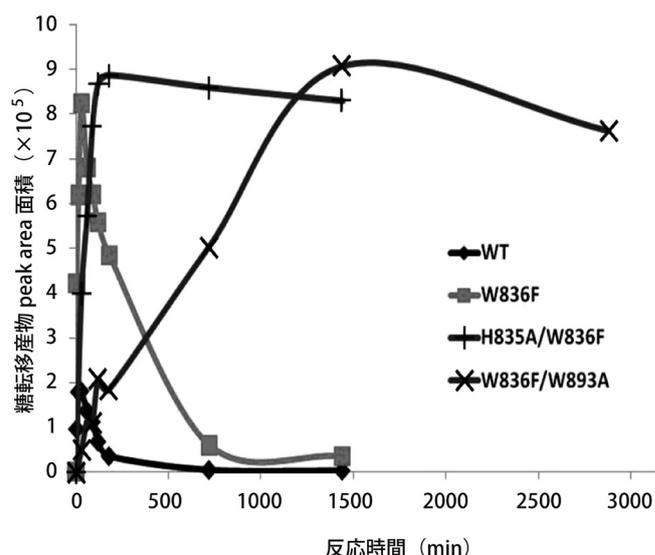


図3 変異体酵素による糖転移反応の経時変化

Gal β 1-3GalNAc α 1-pNPを供与体、Glcを受容体とした糖転移反応液を経時的にサンプリングし、順相HPLCで分析した。糖転移産物である3糖のピーク面積を縦軸に示す。

約 19 分の保持時間に糖転移産物である 3 糖のピークが見られた (図 4A)。TLC で分析したところ、確かに 3 糖の位置にスポットが検出された (図 4B)。次に、野生型、W836F、H835A/W836F、W836F/W893A の 4 種の酵素を用いて糖転移反応の経時変化を見たところ、野生型ではごくわずかの糖転移産物しか検出されないのに対し、W836F では消費した供与体の約 10% の糖転移産物が、H835A/W836F と W836F/W893A の二重変異体酵素では約 50% の糖転移産物が得られ、二重変異体酵素では転移産物の加水分解がきわめてゆるやかであった (図 4C)。

3. 天然糖タンパク質の糖供与体としての利用

化学法によって合成された化合物ではなく、天然に存

在する糖タンパク質や糖ペプチドを利用できれば、安全かつ安価な糖転移産物が得られる。そこでコア 1 型糖鎖を含む糖タンパク質として、グリコマクロペプチド (GMP) に着目した。GMP はチーズ製造中に生成する κ -カゼインの分解物で、チーズホエイの主成分であるが、利用は限定されている。64 アミノ酸からなり、O 結合型糖鎖の付加を受ける可能性のある Ser/Thr を 10 残基有する。糖鎖構造については、シアル酸が 1 残基または 2 残基付加したコア 1 型構造 (\pm Sia α 2-3Gal β 1-3 (\pm Sia α 2-6)GalNAc α 1-Ser/Thr) が主成分で、一部シアリル Tn 構造 (Sia α 2-6GalNAc α 1-Ser/Thr) が含まれる。EngBF はシアリル化されたコア 1 構造には作用しないので、あらかじめシアル酸を除去する必要がある。そこで *B. bifidum* JCM 1254 株のゲノム中を探索したと

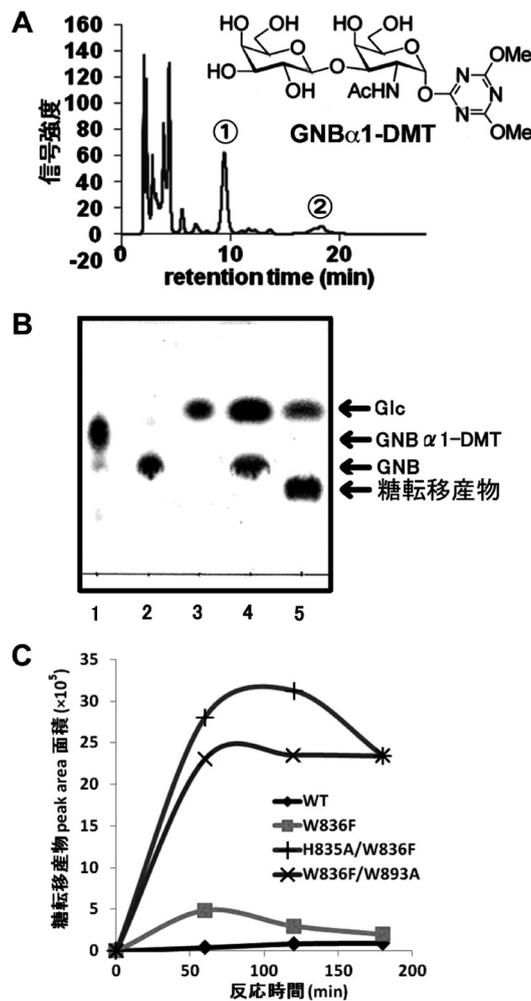


図 4 DMT 誘導体基質を用いた糖転移反応

- A. GNB α 1-DMT を供与体、Glc を受容体とした糖転移反応液の順相 HPLC 分析。ピーク①は加水分解産物、ピーク②は糖転移産物。
 B. 糖転移産物の TLC。レーン 1, GNB α 1-DMT; レーン 2, GNB; レーン 3, Glc; レーン 4, パネル A のピーク①; レーン 5, パネル A のピーク②。
 C. 各種変異体酵素を用いた糖転移反応の経時変化。

ころ GH33 シアリダーゼドメインを持つ遺伝子 *siaBb2* を見出し、これをクローニングし大腸菌でリコンビナント酵素 SiaBb2 を発現させた⁷⁾。野生型 EngBF を GMP に作用させたところごくわずかの GNB しか遊離しなかったが、GMP をあらかじめ SiaBb2 処理することにより GNB の遊離が観察された。GMP の遊離量は、野生型および H835A/W836F 変異体酵素を用いた場合ではほぼ同等であり、GMP 1 g あたり 41 mg の GNB が得られた。しかしながら、H835A/W836F 変異体による GNB の遊離速度は野生型酵素に比べてきわめて遅かった。Glc を受容体に用いた糖転移反応をおこない HPLC で分析したところ、糖転移産物の最大値は野生型酵素と H835A/W836F 変異体酵素で顕著な差は見られなかった。

考 察

EngBF の活性中心付近の、特にアグリコン側の認識に関わることが予想される残基に着目し、各種の変異体酵素を作製し、糖転移活性の向上を試みた。その結果、二重変異体酵素 H835A/W836F において、野生型酵素に比べ著しい転移活性の向上が見られた。転移活性の向上は、合成基質である Gal β 1-3GalNAc α 1-pNP と Gal β 1-3GalNAc α 1-DMT を用いた場合には観察されたが、天然基質であるアシアロ GMP を用いた場合には顕著ではなかった。この理由は、アグリコン側の認識残基を改変しすぎたため、アグリコンが Ser または Thr である天然基質への加水分解作用が低下したためであろうと考え

られる。GMP を供与体基質とする場合には、本研究で作製した多くの変異体酵素を再度検討する必要があると考えられる。

要 約

EngBF の構造情報に基づき活性中心付近のアミノ酸残基をターゲットとした部位特異的変異導入により、糖転移活性の向上した EngBF 変異体を創成することに成功した。最も糖転移活性の強い H835A/W836F 変異体では、使用した供与体基質 Gal β 1-3GalNAc α 1-pNP の 85% が糖転移反応に利用され、糖転移産物の再加水分解はきわめて低く抑えられていた。本変異体酵素のビフィズ菌増殖オリゴ糖合成への応用が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) K. Fujita et al.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 37415-37422, 2005.
- 2) H. Ashida, et al.: *Glycobiology*, **18**, 727-734, 2008.
- 3) R. Suzuki, et al.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 13165-13173, 2008.
- 4) M. Kiyohara, et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73**, 1175-1179, 2009.
- 5) H. Ashida, et al.: *Glycoconj. J.*, **27**, 125-132, 2010.
- 6) R. Suzuki, et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **146**, 389-398, 2009.
- 7) M. Kiyohara, et al.: *Glycobiology*, **21**, 437-447, 2011.