

ビフィズス菌由来母乳オリゴ糖分解酵素の 合成酵素への転換による母乳オリゴ糖の合成

山田 千早

東京大学大学院農学生命科学研究科 特任研究員

(現 日本学術振興会 特別研究員PD)

緒 言

オリゴ糖は腸内の『善玉菌』を増やすことで腸内環境を改善するプレバイオティクスとして注目を浴びている。特に母乳中に含まれる種々のオリゴ糖(母乳オリゴ糖)は出生後間もない乳幼児の腸内にビフィズス菌を増殖・定着させるために機能していることがわかってきた。母乳オリゴ糖は3個以上の単糖が結合して複雑な構造をした240種類以上の糖化合物からなる混合物である。そのうち4種類が50%を占め、代表的なオリゴ糖として知られている。母乳オリゴ糖の主要な構成ユニットはラクト-*N*-ビオースI (LNB; Gal-β1,3-GlcNAc)であり、北岡らのグループによりLNBの合成がGNB/LNBホスホリラーゼ (GLNBP) を用いて安価で大量生産可能になった¹⁾。これを基に母乳オリゴ糖の合成法開発への道が開かれた。

オリゴ糖を合成する方法は上述したホスホリラーゼを用いる方法以外に糖質加水分解酵素を合成酵素へと改変し、合成基質と組み合わせることで糖を合成するものがある²⁾。本研究では、母乳オリゴ糖を加水分解する酵素のひとつであるラクト-*N*-ビオシダーゼを改変し、ラクト-*N*-テトラオースを合成することを目的とした。ラクト-*N*-ビオシダーゼは母乳オリゴ糖からLNBを切り出す活性を持ち(図1)、ビフィズス菌がLNBを取り込み資化するために重要な酵素として知られている³⁾。これまでに2種類のラクト-*N*-ビオシダーゼが報告されてお

り、最初に報告されたGlycoside hydrolase family 20に属するLnbB (*Bifidobacterium bifidum*由来)は、-1サブサイトのGlcNAcのアセチル基が求核攻撃をするという基質補助型のグリコシダーゼである⁴⁾。基質補助型のLnbBを合成酵素として用いるためには高価なオキサゾリン基質が必要となる。最近報告されたもう一つのLnbX (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*由来)はアノマー保持型のグリコシダーゼである⁵⁾。保持型グリコシダーゼは合成酵素への改変例が多いことから、本研究では保持型のラクト-*N*-ビオシダーゼ(LnbX)を変異型合成酵素(グライコシターゼ)へと機能改変させることで母乳オリゴ糖を高回収率で合成することを目的とした。このような変異型合成酵素を用いた方法は糖転移活性を利用した方法に比べ高い回収率となることが期待される。

我々はLnbXの触媒ドメインの立体構造をLNBとの複合体の状態で決定している(投稿論文準備中)。-1サブサイトのGlcNAcアノマー炭素付近に酸性アミノ酸残基がいくつか存在しており、C1から最も近い位置にD418があり、D411はグリコシド結合の酸素原子から3 Åの位置にあったことから、D418が求核触媒残基、D411が酸/塩基触媒残基であると思われた。しかし、D411はGlcNAc(-1)のC1から3 Å離れており、その間に水分子が存在していたことから水を介してプロトンを受け渡すGrotthuss機構であることが示された(図2、

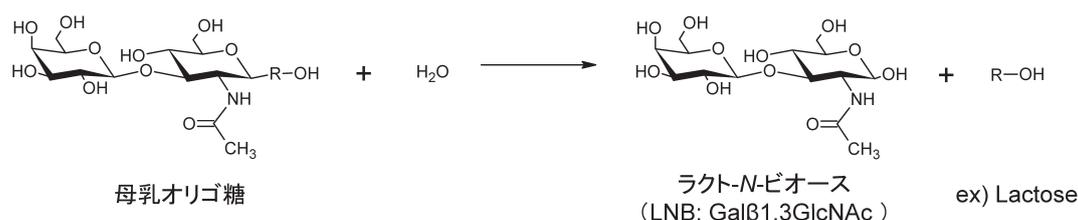


図1 ラクト-*N*-ビオシダーゼの母乳オリゴ糖加水分解反応

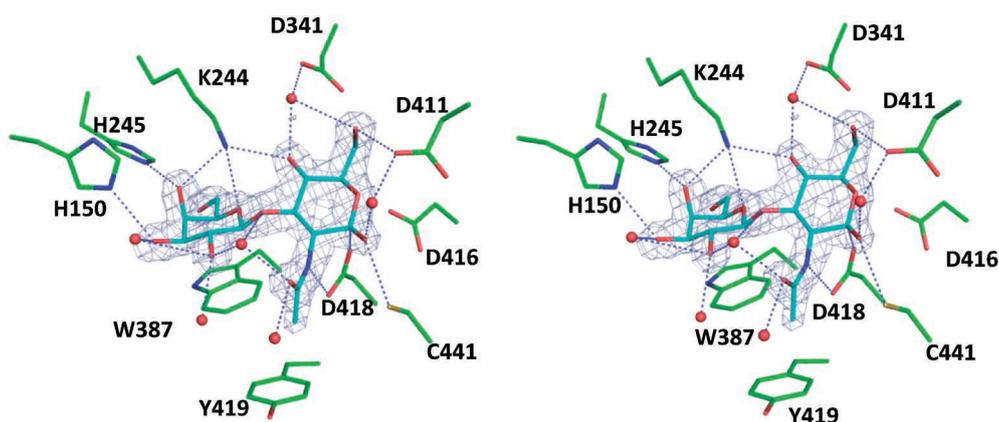


図2 活性中心のアミノ酸残基（求核触媒残基 D418、酸/塩基触媒 D411）

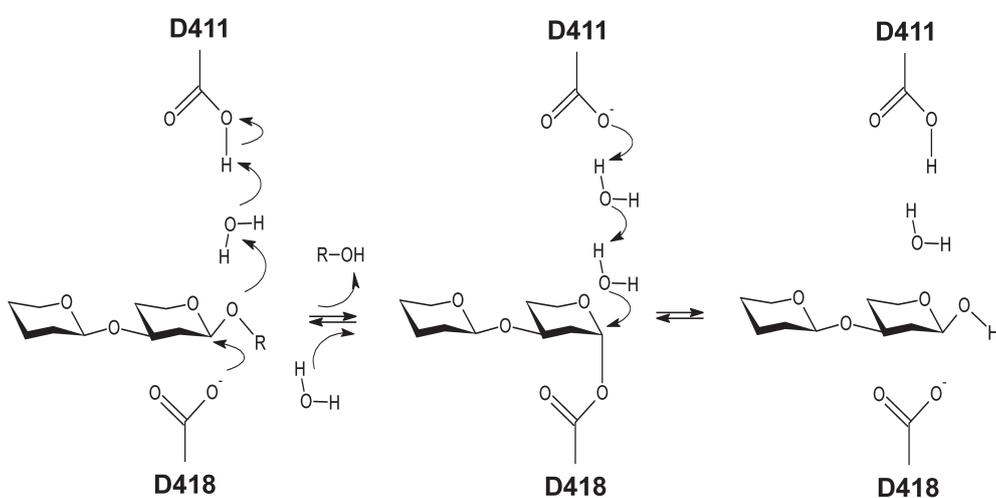


図3 保持型加水分解酵素であるラクト-N-ビオシダーゼ (LnbX) の反応機構

表1 活性中心のアミノ酸残基の変異体活性

	Specific activity (mU/mg)	Relative activity (%)
WT	1,250	100
D411N	1.9	0.15
D411A	2.5	0.20
D418N	4.9	0.40
D418A	2.0	0.16
D411N/D418N	5.7	0.46
D411A/D418A	0.2	0.01
D418G	0.7	0.06
D418S	0.3	0.02

図3)。これらのアミノ酸残基の変異体を作製し精製した酵素の加水分解活性を測定した結果、野生型酵素 (WT) の比活性値よりも100分の1以上活性が低下していたことから、D418とD411が活性に重要なアミノ酸残基であることが示唆された (表1)。

実験方法

LnbXのWTプラスミドを鋳型とし、求核触媒残基であるアスパラギン酸 (D418) に各種のプライマーを用いてPCRを行い変異体プラスミドの作製を行った。変異体プラスミドを専用シャペロンLnbYと共に大腸菌発現株に形質転換後、共発現させ、Ni-NTA (Qiagen) を用いて精製した。変異体酵素の加水分解活性は0.33 mM μ NP-LNB基質を用いて測定した。フッ化LNB合成には、Gal-1Pおよびフッ化GlcNAcを基質とし、GNB/LNBホスホリラーゼ (GLNBP) を1-2 mg/mL添加してpH 7にて37°Cで数時間反応させた。フッ化GlcNAcは石川県立大学の本多裕司准教授より提供していただいた。シリカゲルTLCプレートに反応溶液を1 μ Lスポットし、展開溶媒90% (v/v) アセトニトリルにて展開し、ジフェニルアミンで発色させることでTLCによるフッ化LNBの検出を行った。LNT合成には、その反応溶液に基質となるラクトースと各種変異体酵素を添加して25°Cで24

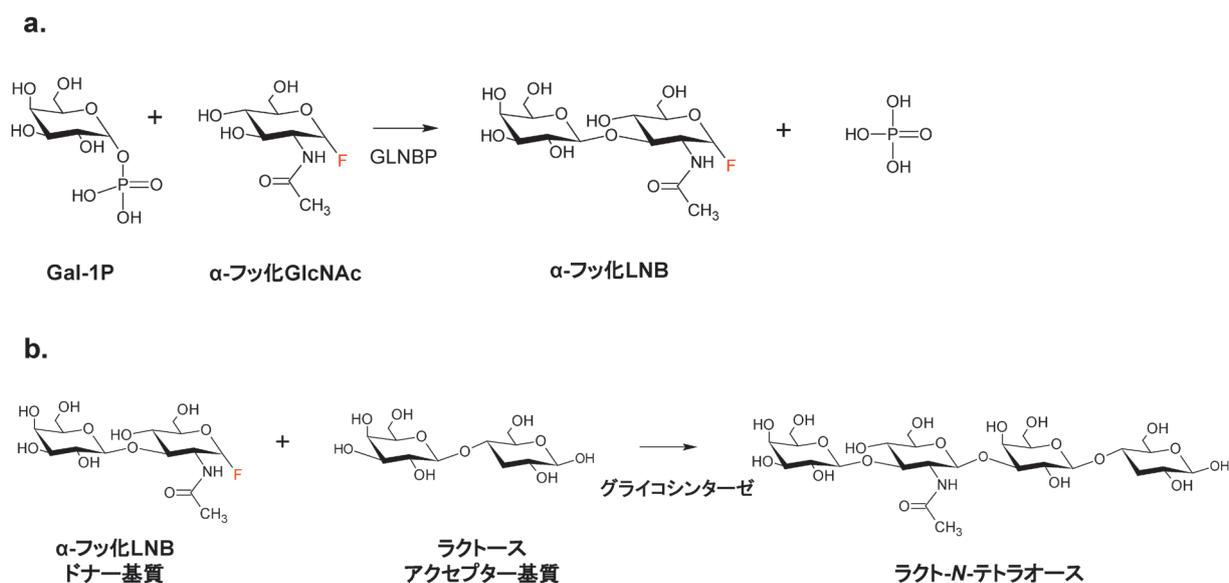


図4 合成酵素へと機能改変させたグライコシターゼを用いたラクト-N-テトラオース合成反応

a. フッ化LNBの合成, b. フッ化LNBからLNTの合成

時間反応させた後、展開溶媒（酢酸：水：ブタノール＝1：1：2）にて展開し、フッ化LNB合成のときと同様に発色させ、LNTが生成されているかどうかを確認した。

結果および考察

1. ガラクトース1リン酸とフッ化GlcNAcからのGNB/LNBホスホリラーゼによるフッ化LNBの合成

まず、LNTの合成に必要な原料であるフッ化LNBの合成を試みた。 α フッ化GlcNAcとGal-1Pを基質とし、通常LNBを合成する際に用いるGNB/LNBホスホリラーゼ（GLNBP）の野生型酵素（WT）または変異体を作用させた（図4a）。TLC分析の結果、LNBより少し上の位置にスポットがみられた（図5a, No. 5）。これはフッ化LNBのスポットと推測され、フッ化LNBが生成した可能性が示された。このような通常の糖合成に用いるWT酵素を使って、フッ化糖を合成する方法は大村らによって報告されている⁶⁾。

2. LnbX グライコシターゼの作成と、フッ化LNBとラクトースからのLNTの合成

保持型酵素では、一般的に、求核触媒残基（アスパラギン酸またはグルタミン酸）を側鎖が小さいアミノ酸（アラニン、グリシン、セリン）に変異することにより、高いグライコシターゼ活性が得られることが報告されている。これは、求核触媒残基の能力を失わせることにより加水分解活性が抑えられつつ、フッ化糖が結合する

スペースが生まれるためであると考えられている。LnbXの二つの触媒残基のうち、求核触媒残基のアスパラギン酸（D418）に部位特異的変異を導入してアラニン、グリシン、セリンに置換し、グライコシターゼの作成を試みた。LnbXの変異体D418A、D418G、D418Sの加水分解活性を測定したところ、WTに対し100分の1以下にまで活性が抑えられていた（表1）。生成したLNTの加水分解活性が抑えられていることから、高い回収率が見込めるのではないかと予想された。

次に、酵素-反応中間体アナログをミミックした α フッ化LNBをドナー基質とし、ラクトースをアクセプター基質として組み合わせ、LnbXグライコシターゼの糖転移反応を触媒させることでLNTの合成を試みた（図4b）。その結果、D418A/G/Sの3つの変異体をそれぞれ作用させた反応液中において、D418Sのみフッ化LNBの消失およびLNTと同じ位置にスポットが検出された（図5b, No. 9）。しかし、フッ化LNB合成の反応溶液をそのまま次の反応に使用しているため、LNTと推測されるスポットは残存Gal-1Pである可能性も残されている。TLC分析だけではLNTかどうか判断できなかったため、今後、HPLCを用いて化合物の同定を行い反応産物がLNTかどうかを調べる。

今回、グライコシターゼとして用いた変異体酵素は3種類であり、それ以外のアミノ酸残基に置換した変異体がLNT合成に適している可能性も考えられるため他の変異体の作製も試みる予定である。

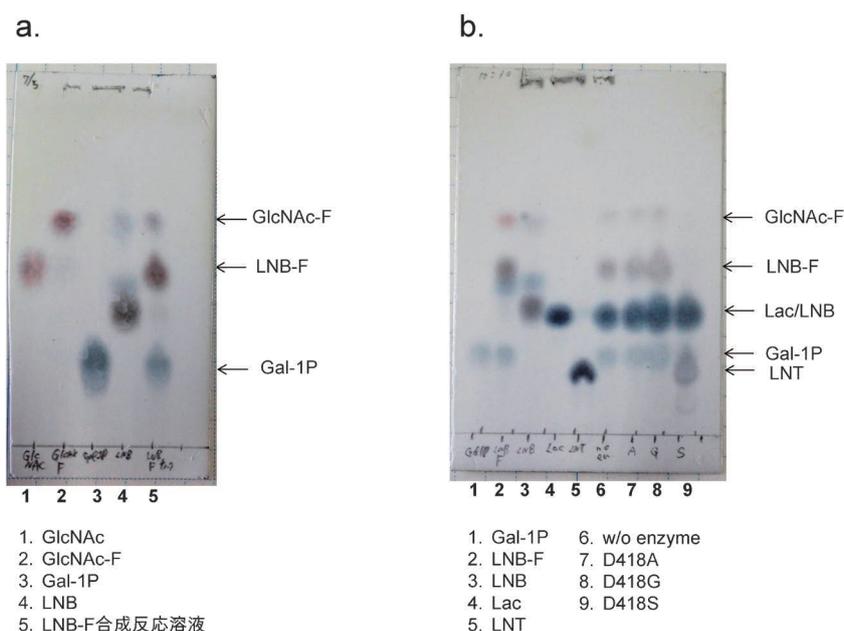


図5 TLC分析

a. フッ化LNBの合成 b. ラクト-N-テトラオースの合成

要 約

ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来のラクト-N-ビオシダーゼを合成酵素へと改変し、合成基質と組み合わせることで、母乳オリゴ糖の基本骨格となるラクト-N-テトラオース (LNT) を合成することを目的として実験を遂行した。合成したフッ化LNBとラクトースを組み合わせ、求核触媒残基の Asp418 をアラニンやグリシン、セリンに置換した LnbX の変異体をグライコシターゼとして作用させた。セリンに置換した変異体を作用させた条件において、LNT と同じ位置にスポットが検出された。今後、生成された化合物の同定を行う予定である。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、助成金を賜りました公益財団

法人三島海雲記念財団および関係者の方々に心より感謝申し上げます。また、本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科 伏信進矢教授、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門 北岡本光博士、京都大学大学院生命科学研究科 片山高嶺教授、石川県立大学 本多裕司准教授らの協力を受けてなされたものです。この場をお借りして感謝致します。

文 献

- 1) M. Nishimoto, M. Kitaoka: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2101–2104, 2007.
- 2) L. F. Mackenzie, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5583–5584, 1998.
- 3) J. Wada, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3996–4004, 2008
- 4) T. Ito, et al.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 11795–11806, 2013.
- 5) H. Sakurama, et al.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 25194–25206, 2013.
- 6) T. Ohnuma, et al.: *Biochem. J.*, **444**, 437–443, 2012.