

糖タンパク質糖鎖の加水分解酵素に関する研究

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	藤田,清貴
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	6巻1号
掲載ページ	p. 30-36
発行年月	2016年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





—受賞論文—

The Study of the Glycoside Hydrolases Acting on Sugar Chains of Glycoproteins*

糖タンパク質糖鎖の加水分解酵素に関する研究*

藤田清貴 (ふじた きよたか)^{1, **}

Kiyotaka Fujita^{1, **}

¹ 鹿児島大学農学部生物資源化学科
890-8580 鹿児島市郡元 1-21-24

¹ Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University
21-24 Korimoto 1, Kagoshima, 890-8580, Japan

要旨: ハイドロキシプロリン (Hyp) が豊富な糖タンパク質 (HRGP) と総称されるエクステンシンやアラビノガラクトタン-プロテイン (AGP) は、 β -アラビノオリゴ糖鎖やII型アラビノガラクトタン鎖などのHyp-結合型糖鎖が付加された植物糖タンパク質である。HRGPは、ビフィズス菌の中でも特に *Bifidobacterium longum* を選択的に増やすことができることが知られていたが、その分解代謝経路は不明であった。2002年に *B. longum* のゲノム配列情報が開示され、多くの糖質分解酵素の存在が明らかにされると共に、多くの機能未知タンパク質の存在も明らかにされた。筆者らは、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼのC末端配列の相同性を利用することで、*B. longum* から β -L-アラビノピオシダーゼや β -L-アラビノフラノシダーゼなどの β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群および、エキソ- β -1,3-ガラクトナーゼや β -1,6-ガラクトナーゼなどのII型アラビノガラクトタン分解酵素群を発見した。これにより、*B. longum* におけるHRGP分解代謝経路の全容を明らかにすることができた。

キーワード: エクステンシン, アラビノガラクトタン-プロテイン, HRGP, ビフィズス菌, 糖質加水分解酵素***

1. はじめに

エクステンシンやアラビノガラクトタン-プロテイン (AGP) は、ハイドロキシプロリン (Hyp) 結合型糖鎖を有する糖タンパク質であり、Hyp-Rich Glycoprotein (HRGP) と総称される。HRGPは植物に普遍的に存在し、セルロースやヘミセルロース、ペクチンと共に植物細胞壁を構成している。エクステンシンには、 β -結合のL-アラビノフラノース (Araf) で構成されたAraf β 1,2Araf β 1,2Araf β -Hyp (Araf β -Hyp) および、その非還元末端に α -1,3結合でArafが付加されたAraf α -Hypなどの β -アラビノオリゴ糖鎖が付加されている^{1,2)}。一方、AGPには、 β -1,3-ガラクトタン主鎖と β -1,6-ガラクトタン側鎖により構成されたII型アラビノガラクトタン鎖 (II型AG) が付加されている。II型AGは、さらにArafやラムノースなどで修飾されることで複雑な糖鎖構造を形成している。HRGPは、ヘミセルロースやペクチンなどの植物多糖と同様に、ヒトの消化酵素では分解されない食物繊維の1つである。資化性試験によって、乳幼児から成人までの大腸に常在するビフィズス菌の代表菌種である *Bifidobacterium longum* が、アラビアガムやカラマツ由来のII型AGを選択的に資化することが明らかに

されていた^{3,4)}。このため、HRGPは *B. longum* を選択的に増やすことができる「プレバイオティック糖タンパク質」といえる。しかし、*B. longum* における β -アラビノオリゴ糖鎖やII型AGに対する分解酵素群は報告されていなかった。2002年に *B. longum* NCC2705株のゲノム配列情報が開示され、植物多糖の分解に関与する多くの糖質分解酵素の存在と共に、多くの機能未知タンパク質の存在も明らかにされた⁵⁾。

本総説では、*B. longum* のゲノム配列情報を利用したHRGP分解酵素群の発見の経緯と、HRGPが「プレバイオティック糖タンパク質」として *B. longum* を選択的に増やす仕組みについて紹介したい。

2. エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼのクローニング

筆者は、2001年に日本学術振興会特別研究員として京都大学の分子応答機構学研究室に赴任し、山本憲二先生 (現 石川県立大学) の下で、Asn-結合型糖鎖分解酵素であるGH85 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖転移活性に関する研究を行った⁶⁾。同時に、Ser/Thr-結合型

* 本原稿は、日本応用糖質科学会平成27年度大会の奨励賞受賞講演で一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 099-285-8639, Fax. 099-285-8639, E-mail: kfujita@ms.kagoshima-u.ac.jp)

*** Key words: extensin, arabinogalactan-protein, HRGP, Bifidobacteria, glycoside hydrolase

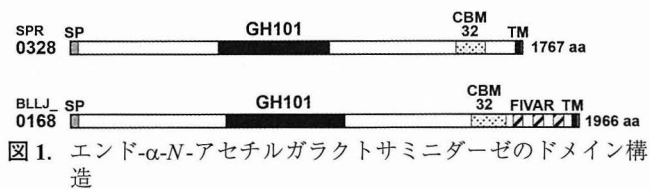


図 1. エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼのドメイン構造

SP, シグナルペプチド; CBM32, 糖結合モジュール 32; TM, 膜貫通領域.

糖鎖分解酵素であるエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼのクローニングに関する研究に携わることになった。その当時、*Streptococcus pneumoniae* 由来のエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、組換え酵素として市販されていたが、配列情報は明らかされていなかった。このため、2001年に公開されていた *S. pneumoniae* のゲノム配列情報を利用し、190 kDa の分泌タンパク質⁷⁾という情報を頼りに遺伝子の推定を試みた結果、SPR0328 が候補遺伝子として浮上した (図 1)。この Blast 検索を行ったところ、*B. longum* NCC2705 株から相同配列を有する BL0464 (BLLJ_0168) が見出された (括弧内には 2011 年に公開された *B. longum* JCM1217 株の遺伝子番号を示す)。研究室に保存されていた *B. longum* JCM1217 株にも酵素活性が確認されたことから、クローニングと発現解析を行った結果、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼであることが明らかになった⁸⁾。BLLJ_0168 は、C 末端領域に糖結合モジュール (CBM) 32, FIVAR, 膜貫通領域を有する菌体表面局在型の酵素であった (図 1)。本酵素は、新規糖質分解酵素として糖質関連酵素データベース CAZy の糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 101 に登録された。本酵素によって腸粘膜ムチンなどから遊離された Gal β 1,3GalNAc (GNB) は、ヒトミルクオリゴ糖由来の Gal β 1,3GlcNAc (LNB) と共に、*B. longum* の GNB/LNB 経路によって分解代謝されることが、食品総合研究所の北岡本光先生のグループによって明らかにされた⁹⁾。

3. β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の発見

2004年に助手として、鹿児島大学農学部の実験糖質化学研究室に赴任した。本研究室では、澱粉を中心とした植物多糖とその分解酵素に関する研究が行われていたため、ビフィズス菌由来の植物多糖分解酵素に関する研究を行う上での試薬や機器は十分揃っている状況であった。BLLJ_0168 の C 末端領域との相同性が見られた BLLJ_0212 は機能未知タンパク質であったが、アラビナンやキシランを分解する酵素が属す GH43 の触媒ドメインを持つ BLLJ_0213 と隣接していた (図 2)。このため、BLLJ_0212 がアラビナンなどの植物多糖を切断する新規糖質分解酵素である可能性に期待して機能解析を行うことにした。

3.1 β -L-アラビノピオシダーゼと α -L-アラビノフラノシダーゼ

BLLJ_0212 を大腸菌で発現させた後、研究室に保存さ

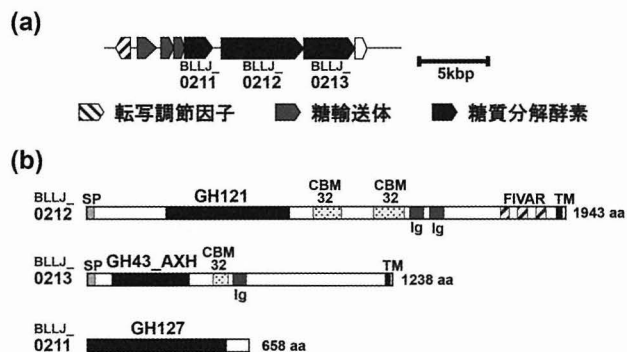


図 2. β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の遺伝子クラスターとドメイン構造

(a) β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群の遺伝子クラスター、(b) BLLJ_0211, BLLJ_0212, BLLJ_0213 のドメイン構造。Ig は Ig 様ドメイン。

れていた様々な植物多糖に作用させた結果、Megazyme 社製のテンサイ由来のアラビナンからアラビノピオースが遊離した。しかしながら、その収率は 0.02% であり NMR に必要な 1 mg を調製するのも困難な状況であった。クローニングを開始してから 2 年後の 2008 年 12 月になって、アラビノピオースの構造が Araf β 1,2Araf (β -Araf β) であることを明らかにすることができた。しかし、アラビナンにおける β -Araf β 構造の存在は報告されておらず、収率もあまりにも低いことから、他の植物多糖の混入の可能性を考えた。“ β -L-Araf-(1 \rightarrow 2)- β -L-Araf” を Google 検索した結果、エクステンシンやナス科レクチンの糖タンパク質糖鎖である β -アラビノオリゴ糖鎖の構造解析に関する文献を見つけることができた¹⁰⁾。このため、BLLJ_0212 はアラビナンに混入していたエクステンシンに作用したものと予想し、ニンジン由来のエクステンシンから調製した β -アラビノオリゴ糖鎖である Araf β -Hyp に作用させたところ、 β -Araf β の遊離を確認することができた¹⁰⁾。BLLJ_0212 は、 β -アラビノオリゴ糖鎖を加水分解する初めての酵素として β -L-アラビノピオシダーゼと命名され、EC 3.2.1.187 と GH121 に登録された。また、GH43 の AXH サブファミリーに属す BLLJ_0213 は、Araf β -Hyp を特異的に切断する α -L-アラビノフラノシダーゼであった。なお、各酵素の詳細については過去の総説を参照されたい^{11,12)}。

3.2 β -L-アラビノフラノシダーゼ

BLLJ_0212 によって遊離された β -Araf β を *B. longum* が利用するためには、単糖のアラビノース (Ara) にまで分解する β -L-アラビノフラノシダーゼが必要である。しかし、この酵素に関しては、酵素活性の存在すら報告されていなかった。そこで、BLLJ_0212 に隣接する機能未知タンパク質 BLLJ_0211 の解析を行った結果、 β -Araf β を切断する β -L-アラビノフラノシダーゼであることを明らかにした¹³⁾。 β -L-アラビノフラノシダーゼは、新規糖質分解酵素として EC 3.2.1.185 と GH127 に登録された。さらに、東京大学の伏信進矢先生のグループによって結晶構造解析が行われ、求核基をシステインとする初めての糖質分解酵

素であることが明らかにされた¹⁴⁾。現在、CAZy データベースの GH127 ファミリーには 763 遺伝子が登録され、Pfam データベースの機能未知タンパク質 DUF1680 ファミリー (Glyco_hydro_127 に名称変更) には 4702 遺伝子が登録されている。本遺伝子は、腸内細菌や土壌細菌などの原核生物だけでなく、糸状菌や植物などの真核生物にも保存されている。一方、基質となる β -Araf 構造は、 β -アラビノオリゴ糖鎖として緑藻類から陸上植物まで広く存在が確認されているだけでなく¹⁵⁾、イネ由来の AGP¹⁶⁾ やキヌア由来のアラビナン¹⁷⁾、ラムノガラクトロナン II¹⁸⁾ の非還元末端にもその存在が報告されている。このため、Glyco_hydro_127 に登録されている遺伝子の多くが β -Araf 構造を分解する酵素をコードしている可能性は高いと考えている。2013 年に *p*-nitrophenyl β -L-arabinofuranoside (*p*NP- β -Araf) が、 β -L-アラビノフラノシダーゼによって切断されることが確認された¹⁹⁾。もしも *p*NP- β -Araf が市販されていれば、 β -L-アラビノフラノシダーゼは筆者らが研究を始める前に見つけていたものと思われる。

β -L-アラビノフラノシダーゼのクローニングに関する論文は、2011 年に掲載されたものの¹⁹⁾、Glu-338 と 366 の変異体を取り違えて記載したことを原因として 2013 年に取り下げられ、2014 年に再掲載となった²⁰⁾。思い込みと確認不足が招いた結果であった。

4. II 型アラビノガラクトタン分解酵素群の発見

II 型 AG 分解酵素に関しては、主鎖の β -1,3-ガラクトタン鎖を切断するエキソ- β -1,3-ガラクタナーゼと、側鎖の β -1,6-ガラクトタン鎖を切断する β -1,6-ガラクタナーゼが知られていた。これらの酵素遺伝子のクローニング解析は、埼玉大学の円谷陽一先生と小竹敬久先生^{21,22)}、食品総合研究所 (現 琉球大学) の金子哲先生^{23,24)}、大阪府立大学の阪本龍司先生^{25,26)} によって一段落した後であった。また、2011 年に *B. longum* JCM1217 株のゲノム配列情報が公開されたため²⁷⁾、新しい酵素を探索する上でのハードルは大きく低下した。BLLJ_1840 は、既知のエキソ- β -1,3-ガラクタナーゼと 27~28% のアミノ酸同一性を示し、BLLJ_1841 は、既知の β -1,6-ガラクタナーゼと 20~24% のアミノ酸同一性を示した。これらも、C 末端に CBM32 や膜貫通領域を有する菌体表層局在型の酵素と予想された (図 3)。既知の酵素との相同性は低いものであったが、両酵素が隣接していたことから、II 型 AG 分解酵素群に間違いないと信じてクローニングと発現解析を行った。

4.1 エキソ- β -1,3-ガラクタナーゼ

組換え BLLJ_1840 をカラマツ由来の II 型 AG に作用させたところ、ガラクトース (Gal), Gal β 1,6Gal (β 1,6Gal₂), β 1,6Gal₃, β 1,6Gal₄, α -1,3 結合を有する Araf で修飾された β 1,6Gal₃ (Araf α 1,3Gal₃)、さらに β -1,3 結合を有する L-ア

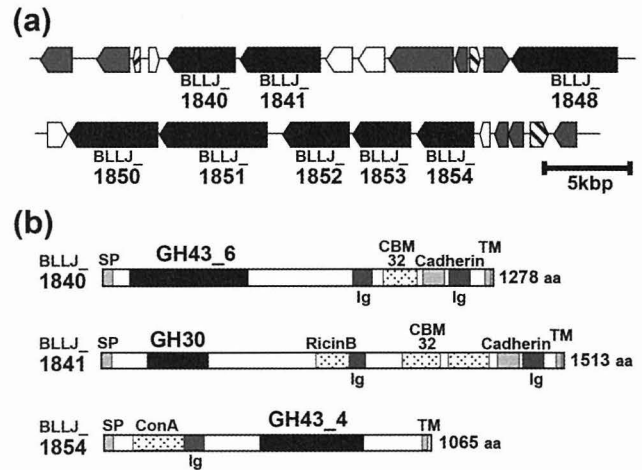


図 3. II 型 AG 分解酵素群の遺伝子クラスターとドメイン構造

(a) II 型 AG 分解酵素群の遺伝子クラスター、(b) BLLJ_1840, BLLJ_1841, BLLJ_1854 のドメイン構造。ConA は ConA 様レクチンドメイン、RicinB は Ricin 型レクチンドメイン、Cadherin は Cadherin 様ドメイン。

ラビノピラノース (Arap) で修飾された Arap β 1,3Araf α 1,3Gal₃ が遊離した。このため、既知の酵素と同様に側鎖をバイパスして β -1,3-ガラクトタン主鎖を非還元末端側から切断する GH43_6 エキソ- β -1,3-ガラクタナーゼであることが明らかになった²⁸⁾。既知の酵素では側鎖を除去した β -1,3-ガラクトタンに対する反応性が最も高いのに対して、BLLJ_1840 は β -1,6-ガラクトタン側鎖を有する II 型 AG に対して高い反応性を示した。

4.2 β -1,6-ガラクタナーゼ

組換え BLLJ_1841 を β -1,6-ガラクトオリゴ糖 (β 1,6Gal₃, β 1,6Gal₄) に作用させたところ、非還元末端側からの β 1,6Gal₂ の遊離が確認された。このため、既知の酵素と同様に β -1,6-ガラクトタン側鎖を切断する GH30 β -1,6-ガラクタナーゼであることが明らかになった。ただし、既知の酵素と異なり Gal の遊離が見られないという特徴を示した。そこで、大根 AGP 由来の長鎖の β -1,6-ガラクトタンである β 1,6Gal₇ や β 1,6Gal₈ を基質として遊離糖の解析を行った結果、非還元末端側からの β 1,6Gal₂ の遊離が確認された。このため、BLLJ_1841 は、II 型 AG の β -1,6-ガラクトタン側鎖から 2 糖単位で β 1,6Gal₂ を遊離させる酵素であると考えられる。

4.3 α -L-アラビノフラノシダーゼと β -L-アラビノピラノシダーゼ

組換え BLLJ_1854 を Araf α 1,3Gal₃ に作用させたところ、Ara の遊離が確認できた。本酵素は、カラマツ由来の II 型 AG だけでなく、アラビナンからも Ara を遊離した。一方、*p*NP- α -Araf に対する反応性は極めて低かった。このため、本酵素は α -1,3 結合の Araf を切断する GH43_4 α -L-アラビノフラノシダーゼであると考えられる。

また、II 型 AG 分解酵素群によって遊離されたオリゴ糖の菌体内での分解に関わると予想された BLLJ_1823 の解

析を行った結果, Arap β 1,3Araf α 1,3Gal $_3$ に作用する GH27 β -L-アラビノピラノシダーゼであった²⁹⁾. 既知の酵素の多くは pNP- β -Arap と pNP- α -Gal の両方に作用するが, 本酵素は pNP- β -Arap のみに作用するという特徴を示した. しかし, *B. longum* JCM1217 株の培養菌体からの酵素活性は検出されず, 転写量の増加も見られなかったため, JCM 1217 株では機能しない酵素であると考えられる.

5. *B. longum* の HRGP 分解代謝システム

5.1 *B. longum* における HRGP 分解代謝経路

β -アラビノオリゴ糖鎖および II 型 AG 分解酵素群の解析を基に, *B. longum* における HRGP 分解代謝経路を予想した (図 4).

エクステンシンの β -アラビノオリゴ糖鎖は, 菌体表層に局在した GH43_AXH α -L-アラビノフラノシダーゼ (BLLJ_0213) と GH121 β -L-アラビノピオシダーゼ (BLLJ_0212) の働きにより Ara と β -Araf $_2$ に分解される. β -Araf $_2$ は, ABC 型糖輸送体 (BLLJ_0208-0210) を介して菌体内に取り込まれ, GH127 β -L-アラビノフラノシダーゼ (BLLJ_0211) の作用により Ara に分解された後, 代謝されるものと考えられる.

AGP の II 型 AG は, GH43_6 エクソン- β -1,3-ガラクトナーゼ (BLLJ_1840), GH30 β -1,6-ガラクトナーゼ (BLLJ_1841), GH43_4 α -L-アラビノフラノシダーゼ (BLLJ_1854) の作用により, 単糖から 4 糖程度の短いオリゴ糖鎖に分解される. オリゴ糖は, 複数の ABC 型糖輸送体 (BLLJ_0446-0448) を介して菌体内に取り込まれ, 菌体内酵素の GH42 β -ガラクトシダーゼ (BLLJ_0443) および GH51 α -L-アラビノフラノシダーゼ (BLLJ_0045) の作用により単糖にまで分解された後, 代謝されるものと考えられる.

5.2 *B. longum* の菌体表層局在型酵素に共通する C 末端配列の役割

大腸内で *B. longum* が酵素を分泌した場合, *B. longum* 自身が利用する前に拡散して他の菌の増殖を助けることになってしまう. このため, 酵素群の菌体表層への局在化は, *B. longum* にとって HRGP の効率的な切断と取り込みが期待できる有効な手段である. ただし, *B. longum* の菌体表層において HRGP を切断するためには, グラム陽性細菌であるピフィズス菌の細胞壁の表層から触媒領域を露出させる必要がある. ピフィズス菌の細胞壁の厚さは, *B. pseudolongum* で 200 nm, *B. thermophilum* で 50 nm とされている³⁰⁾. ペプチド結合の長さは 0.36 nm とされているため, 550 から 150 アミノ酸程度のリンカーがあれば細胞膜から細胞表層に届くという計算になる. 実際は, 各ドメインが高次構造を形成した上で数珠つなぎに並ぶため, これよりも長いアミノ酸配列を必要とする. 図 2 と図 3 に示すように, BLLJ_1854 を除けば触媒領域は N 末端側に位置している. このため, 菌体表層に触媒領域を露出させるための十分な長さが確保されていると考えられる. また, CBM32 は, 酵素が作用する基質に対する親和性が高いようである^{31,32)}. このため, *B. longum* は, HRGP 分解酵素群に付加されている CBM32 の働きにより HRGP を菌体表層付近に安定的に保持することで, 効率的な糖の切り出しができるのであろう. BLLJ_1841 に含まれる RicinB ドメインや BLLJ_1854 に含まれる ConA 様ドメインもレクチンドメインであることから, CBM32 と同様に HRGP への結合に関与しているものと思われる.

5.3 *B. longum* に広く保存された HRGP 分解酵素遺伝子群

現在, KEGG データベース上で完全ゲノム配列が公開されている *B. longum* subsp. *longum* 9 菌株の中で, β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群は 6 菌株にコードされ, II 型 AG 分解酵素群は 8 菌株にコードされている (表 1). しかし, *B. longum* subsp. *longum* 以外のピフィズス菌には, II 型 AG 分解酵素群はほとんど見られない. これまでに, 各種ピフィズス菌の中で *B. longum* と一部の *B. adolescentis* だけが II 型 AG を利用して生育できることが報告されていた³⁴⁾. 表 1 に示すように, II 型 AG に対する分解酵素遺伝子と資化性の傾向が一致することから, この遺伝子群の存在が分解代謝の鍵を握っていると考えられる. 筆者らも, 資化性試験と培養菌体の酵素活性測定および, 転写量解析を組み合わせることにより, *B. longum* JCM1217 株が II 型 AG の存在下で分解酵素群を転写誘導し, II 型 AG を効率的に分解することを確認している²⁸⁾. 一方, β -アラビノオリゴ糖鎖分解酵素群に関しては, *B. catenulatum* や *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis* の一部で遺伝子クラスターが保存されている他, 多くのピフィズス菌において BLLJ_0211 ホモログが保存されている (表 1). このため, β -アラビノオリゴ糖鎖は, 比較的多くのピフィズス菌に

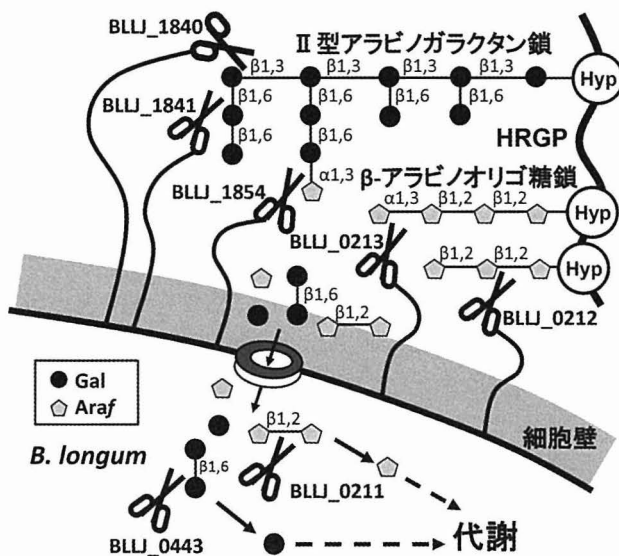


図 4. *B. longum* における HRGP 分解代謝経路

表1. 各種ビフィズス菌に保存された HRGP 分解酵素遺伝子と資化性との関連性

種名	HRGP 分解酵素遺伝子の有無 (遺伝子数/株数)*						資化性試験 (生菌数/株数)**	
	BLLJ_0211	0212	0213	1840	1841	1854	II型 AG	アラビアガム
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	6/9	6/9	6/9	8/9	8/9	9/9	17/20	12/20
<i>B. adolescentis</i>	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/17	1/17
<i>B. catenulatum</i>	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/13	0/13
<i>B. angulatum</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/4	0/4
<i>B. pseudocatenulatum</i>	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/27	0/27
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/10	0/10
<i>B. bifidum</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/25	0/25
<i>B. breve</i>	5/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/16	0/16
<i>B. dentium</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/28	0/28
<i>B. animalis</i>	12/13	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13	0/12	0/12

*KEGG データベース上で 50% 以上のアミノ酸同一性を有するものを相同遺伝子としてカウントした。なお、複数の相同遺伝子を有する菌株は無い。 **文献 3) の資化性試験のデータを元に、明確な生育を示した菌株のみを生菌数としてカウントした。

よって資化されると予想される。

6. プレバイオティック糖タンパク質としての HRGP

増粘多糖類として利用されているカラマツ由来の II 型 AG や、AGP を含むアラビアガムは、*in vitro* での *B. longum* の増殖効果だけでなく、ヒト試験でのビフィズス菌増殖効果が確認されている^{33,34)}。AGP は、大根³⁵⁾や大豆³⁶⁾などの様々な食品の可食部だけでなく、赤ワイン³⁷⁾やコーヒー³⁸⁾のような嗜好品にも含まれている。タロイモには 10% 程の AGP が含まれていると報告されている³⁹⁾。このため、私たちは、野菜や果物、穀物に含まれている AGP を日常的に摂取していることになる。ヒトの消化酵素で分解されずに大腸に届いた AGP は、「プレバイオティック糖タンパク質」として *B. longum* などの一部のビフィズス菌を選択的に増殖させることにより、腸内環境を健全に保つことができる。また、筆者らは、ニンジンから抽出したエクステンシンを単一炭素源として、*B. longum* が生育することを確認している (未発表データ)。このため、エクステンシンも含めた HRGP 全体が「プレバイオティック糖タンパク質」として機能すると考えられる。*B. longum* は、HRGP の分解代謝能力を獲得したことによって、大人の大腸に生息するビフィズス菌の優勢菌種の 1 つになれたのであろう。

一方、各種ビフィズス菌の資化性試験の結果、菌種によって多糖に対する資化性が大きく異なることが明らかにされており、*B. dentium* はグアーガム、*B. adolescentis* はアミロペクチン、*B. bifidum* はムチンを資化できる³⁾。このため、ビフィズス菌は菌種間で異なる糖質獲得戦略を持つことによって共存し合い、激しい生存競争が繰り広げられている腸内環境で一定の勢力を占めることができたのであろう。結局は、ビフィズス菌にまんべんなくエサを与えるという気持ちで、食物繊維が豊富な野菜や穀物を多く摂るバランスの良い食生活を継続することが大切である。

7. 終わりに

「面白い酵素のような気がする」という曖昧な理由で始めた新規糖質分解酵素の探索研究であったが、結果的に *B. longum* における HRGP 分解代謝経路の全容を解明することができた。機能未知タンパク質の機能解明はパズルを解くような作業であり、難易度が高いほど発見の喜びは大きいものであった。多くの共同研究者のサポートと共に、先人達が残してくれた文献情報を簡単に検索できる環境があったからこそ発見に至ることができた。酵素の性質決定においては基質調製が重要であるが、学生時代に香川大学の竹川薫先生 (現 九州大学) の下で行っていた糖鎖調製とラベル化をそのまま使うことができた。基質とは作るものであるという感覚は、今でも役に立っていると思う。ゲノム配列情報は今後も増え続けるであろうが、機能未知遺伝子は誰かが解析しなければ永遠に機能未知である。今もなお分解酵素が報告されていない植物糖鎖は数多く残されている。発見の感動を再び味わうためにも、新しい酵素の探索を続けていきたい。

謝辞

この度は荣誉ある日本応用糖質科学会奨励賞受賞にあたり、御選考頂きました選考委員会の諸先生方、ならびに御推薦頂きました鮫島吉廣九州支部長 (鹿児島大学名誉教授) をはじめとする九州支部の皆様へ厚く御礼を申し上げます。研究を遂行するにあたり御助言と御支援を頂きました菅沼俊彦先生 (現 放送大学鹿児島学習センター長) ならびに北原兼文先生 (鹿児島大学教授) に厚く御礼申し上げます。また、竹川薫先生 (現 九州大学教授) と山本憲二先生 (現 石川県立大学教授) には糖質分解酵素の研究の世界に導いて頂き感謝しております。さらに、結晶構造解析を行って頂きました伏信進矢先生 (東京大学教授) と基質の合成をして頂きました石渡明弘先生 (理化学研究所) に感謝いたします。また、鹿児島大学理工学研究科の若尾雅広先生と隅田泰生先生には、NMR による β -Araf₂ の構造決定を行って頂きました。この構造が分かったからこそ研究が進展することができたものと感謝しております。

また、本研究に対して助言と基質の提供をして頂きました。北岡本光先生（農研機構食品総合研究所）、金子哲先生（現 琉球大学教授）、阪本龍司先生（大阪府立大学教授）、小竹敬久先生（埼玉大学准教授）に感謝いたします。最後に、本研究を共に行って頂きました応用糖質化学研究室の学生と研究員の皆様に深く感謝いたします。

文献

- 1) Y. Akiyama, M. Mori and K. Kato: ^{13}C -NMR analysis of hydroxyproline arabinosides from *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2487-2489 (1980).
- 2) D. Ashford, N.N. Desai, A.K. Allen, A. Neuberger, M.A. O' Neill and R.R. Selvendran: Structural studies of the carbohydrate moieties of lectins from potato (*Solanum tuberosum*) tubers and thorn-apple (*Datura stramonium*) seeds. *Biochem. J.*, **201**, 199-208 (1982).
- 3) F. Crociani, A. Alessandrini, M.M. Mucci and B. Biavati: Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 199-210 (1994).
- 4) 堀 牧恵, 若井和也, 木村良太郎, 中桐 理, 高木道浩: コーヒー豆由来アラビノガラクトンの腸内細菌に対する資化性. *日食雑誌*, **24**, 163-170 (2007).
- 5) M.A. Schell, M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M.C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R.D. Pridmore and F. Arigoni: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14422-14427 (2002).
- 6) K. Fujita, K. Kobayashi, A. Iwamatsu, M. Takeuchi, H. Kumagai and K. Yamamoto: Molecular cloning of *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase and some properties of the recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **432**, 41-49 (2004).
- 7) L.R. Glasgow, J.C. Paulson and R.L. Hill: Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 8615-8623 (1977).
- 8) K. Fujita, F. Oura, N. Nagamine, T. Katayama, J. Hiratake, K. Sakata, H. Kumagai and K. Yamamoto: 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**, 37415-37422 (2005).
- 9) M. Nishimoto and M. Kitaoka: Identification of N-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-N-biose I/galacto-N-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6444-6449 (2007).
- 10) K. Fujita, S. Sakamoto, Y. Ono, M. Wakao, Y. Suda, K. Kitahara and T. Saganuma: Molecular cloning and characterization of a β -L-arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. *J. Biol. Chem.*, **286**, 5143-5150 (2011).
- 11) 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: ピフィズス菌由来 β -L-アラビノビオシダーゼの機能解析. *応用糖質科学*, **1**, 153-158 (2011).
- 12) K. Fujita, K. Kitahara and T. Saganuma: Functional analysis of degradative enzymes for hydroxyproline-linked β -L-arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **24**, 215-224 (2012).
- 13) K. Fujita, Y. Takashi, E. Obuchi, K. Kitahara and T. Saganuma: Characterization of a novel β -L-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: Functional elucidation of a DUF 1680 family member. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38079-38085 (2011).
- 14) T. Ito, K. Saikawa, S. Kim, K. Fujita, A. Ishiwata, S. Kaeothip, T. Arakawa, T. Wakagi, G.T. Beckham, Y. Ito and S. Fushinobu: Crystal structure of glycoside hydrolase family 127 β -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **447**, 32-37 (2014).
- 15) D.T.A. Lampert and D.H. Miller: Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom. *Plant Physiol.*, **48**, 454-456 (1971).
- 16) K. Kawaguchi, N. Shibuya and T. Ishii: A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner. *Plant J.*, **9**, 777-785 (1996).
- 17) D. Wefers, C.E. Tyl and M. Bunzel: Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Front. Chem.*, **2**, 100 (2014).
- 18) D. Mohnen: Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 266-277 (2008).
- 19) S. Kaeothip, A. Ishiwata, T. Ito, S. Fushinobu, K. Fujita and Y. Ito: Preparation of *p*-nitrophenyl β -L-arabinofuranoside as a substrate of β -L-arabinofuranosidase. *Carbohydr. Res.*, **382**, 95-100 (2013).
- 20) K. Fujita, Y. Takashi, E. Obuchi, K. Kitahara and T. Saganuma: Characterization of a novel β -L-arabinofuranosidase in *Bifidobacterium longum*: Functional elucidation of a DUF 1680 protein family member. *J. Biol. Chem.*, **289**, 5240-5249 (2014).
- 21) T. Kotake, S. Kaneko, A. Kubomoto, M.A. Haque, H. Kobayashi and Y. Tsumuraya: Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo- β -(1 \rightarrow 6)-galactanase gene. *Biochem. J.*, **377**, 749-755 (2004).
- 22) T. Kotake, K. Kitazawa, R. Takata, K. Okabe, H. Ichinose, S. Kaneko and Y. Tsumuraya: Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a *Irpex lacteus* exo- β -(1 \rightarrow 3)-galactanase gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2303-2309 (2009).
- 23) H. Ichinose, M. Yoshida, T. Kotake, A. Kuno, K. Igarashi, Y. Tsumuraya, M. Samejima, J. Hirabayashi, H. Kobayashi and S. Kaneko: An exo- β -1,3-galactanase having a novel β -1,3-galactan-binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 25820-25829 (2005).
- 24) H. Ichinose, T. Kotake, Y. Tsumuraya and S. Kaneko: Characterization of an endo- β -1,6-galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2379-2383 (2008).
- 25) T. Sakamoto, Y. Taniguchi, S. Suzuki, H. Ihara and H. Kawasaki: Characterization of *Fusarium oxysporum* β -1,6-galactanase, an enzyme that hydrolyzes larch wood arabinogalactan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3109-3112 (2007).
- 26) T. Sakamoto, H. Tanaka, Y. Nishimura, M. Ishimaru and N. Kasai: Characterization of an exo- β -1,3-D-galactanase from *Sphingomonas* sp. 24T and its application to structural analysis of larch wood arabinogalactan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 1701-1710 (2011).
- 27) S. Fukuda, H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.M. Clarke, D.L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori and H. Ohno: Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469**, 543-547 (2011).
- 28) K. Fujita, T. Sakaguchi, A. Sakamoto, M. Shimokawa and K. Kitahara: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* exo- β -1,3-galactanase, an enzyme for the degradation of type II arabinogalactan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 4577-4584 (2014).
- 29) M. Shimokawa, K. Kitahara and K. Fujita: Characterization of a β -L-arabinopyranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 1-6 (2015).
- 30) H. Kudo, N. Kimura, M. Suzuki, K.J. Cheng, J.W. Costerton and T. Mitsuoka: Electron microscopic, biochemical and physiological studies of *Bifidobacterium pseudolongum* SS-24 and *Bifidobacterium thermophilum* SS-19. *Zentralbl. Bakteriol.*, **271**, 263-271 (1989).
- 31) E. Ficko-Blean, C.P. Stuart, M.D. Suits, M. Cid, M. Tessier, R. J. Woods and A.B. Boraston: Carbohydrate recognition by an architecturally complex α -N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens*. *PLoS One*, **7**, e33524 (2012).
- 32) K. Mizutani, V.O. Fernandes, S. Karita, A.S. Luís, M. Sakka, T. Kimura, A. Jackson, X. Zhang, C.M.G.A. Fontes, H.J. Gilbert and K. Sakka: Influence of a mannan binding family 32 carbohydrate binding module on the activity of the appended mannanase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4781-4787 (2012).
- 33) W. Calame, A.R. Weseler, C. Viebke, C. Flynn and A.D. Siemensa: Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *Br. J.*

- Nutr.*, **100**, 1269–1275 (2008).
- 34) C. Cherbut, C. Michel, V. Raison, T. Kravtchenko and M. Severine: Acacia gum is a bifidogenic dietary fiber with high digestive tolerance in healthy humans. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **15**, 43–50 (2003).
- 35) Y. Tsumuraya, K. Ogura, Y. Hashimoto, H. Mukoyama and S. Yamamoto: Arabinogalactan-proteins from primary and mature roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol.*, **86**, 155–160 (1988).
- 36) G.I. Cassab: Arabinogalactan proteins during the development of soybean root nodules. *Planta*, **168**, 441–446 (1986).
- 37) P. Pellerin, S. Vidal, P. Williams and J.M. Brillouet: Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydr. Res.*, **277**, 135–143 (1995).
- 38) R. Redgwell and M. Fischer: Coffee carbohydrates. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18**, 165–174 (2006).
- 39) G. Jiang and L. Ramsden: Characterisation and yield of the arabinogalactan-protein mucilage of taro corms. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 671–674 (1999).