ビフィズス菌由来の B 型血液型抗原に特異的な GH110 α1,3-galactosidase AgaBb の構造解析

鹿島騰真 [1,2]，芦田久 [3]，伏信進矢 [1,2]
[1] 東京大学大学院 農学生命科学研究科，[2] 東京大学 微生物学科イノベーション連携研究機構，
[3] 近畿大学 生物理工学部

Structural insight into a bifidobacterial GH110 α1,3-galactosidase specific for type B blood group antigen

Toma KASHIMA[1,2], Hisashi ASHIDA[3], Shinya FUSHINOBU[1,2]
[1] School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
[2] Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo
[3] Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University

Abstract

ビフィズス菌は大腸内に定着・増殖し，ヒトの健康増進に貢献するために様々な糖質加水分解酵素（Glycoside Hydrolase，GH）を保有している。中でも *Bifidobacterium bifidum* 由来の GH110 α1,3-galactosidase（AgaBb）は腸管粘膜のムチン糖タンパク質や赤血球細胞表面の B 型血液型抗原を特異的に分解し，O 型抗原（H 抗原）を生成するため，輸血や異種移植への応用が期待されている。我々は AgaBb の構造解析を行い，その分子機能の一端を解明した。本稿では 2021 年度量子ビームサイエンスフェスタ学生奨励賞の発表内容に沿って，研究成果の一部を紹介する。

1．はじめに – 乳児大腸内でのビフィズス菌の炭素源

乳児の腸内はビフィズス菌優勢である。これは主要な種である *Bifidobacterium bifidum*，*B. longum subsp. longum*，*B. breve*，*B. longum subsp. infantis* が母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖や腸管粘膜のムチン糖鎖を糖質源にして増殖，定着しているからである [1]。ヒトミルクオリゴ糖やムチン糖鎖は非常に多彩な糖構造を有しており，これを分解して取り込むためにビフィズス菌はいくつもの糖質加水分解酵素（Glycoside hydrolase，GH）を独自に進化させてきた [2, 3]。ヒトの主要な善玉菌であるビフィズス菌の増殖メカニズムを分子レベルで解明していくことは学術的にも応用研究においても興味深い。我々はビフィズス菌が独自に進化させた新規糖質関連酵素の研究を進めている。以降では代表的な分解経路の一例として，ムチン糖鎖，特に硫酸化 Core 2 *O*-glycan の分解経路に着目する [4]。

1-1. *B. bifidum* JCM 1254 株の硫酸化 Core 2 *O*-glycan の代謝経路

Fig. 1A に硫酸化 Core 2 *O*-glycan の糖構造を簡略的に示す。*B. bifidum* は 4 つの膜結合型 GH，すなわち GH110 α1,3-galactosidase（AgaBb），GH95 α1,2-fucosidase（AfcA），GH2 β-galactosidase（BbgIII），GH20 β-*N*-acetyl-6-sulfo-glucosaminidase（BbhII）を使って糖鎖から単糖を切り出していく。その後，GH101 endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase（EngBF）が糖ペプチド結合を加水分解することで galacto-*N*-biose（Gal-β1,3-GalNAc，GNB）が遊離する。その後，GNB は菌体内に取り込まれ，GH112 lacto-*N*-biose/galacto-*N*-biose phosphorylase（GLNBP）によって単糖に分解される [4]。これらの酵素のほとんどは先行研究で構造解析がなされ，その独自性が示された。しかし唯一，この分解経路の最上流にある AgaBb について報告がなかった。そこで我々は AgaBb の X 線結晶構造解析を行うことにした。

1-2. AgaBb は B 型抗原に特異的な血液型変換酵素である

AgaBb はムチン糖鎖のエピトープ部分にある Gal-α1,3-(Fuc-α1,2-)-Gal という分岐型の 3 糖構造に特異性を示す [5]。この糖構造は B 型血液型抗原として知られており，赤血球の表面にある血液型決定基と同じものである。AgaBb はこれに作用することで非還元末端の Gal を遊離するが，残るエピトープ構造は H 抗原，すなわち O 型の血液型抗原になる（Fig. 1B）。O 型の血液は理論上 Rh（+）のヒトになら誰にでも輸血できるため，AgaBb は血液型変換酵素として輸血や異種移植で応用できる可能性があり，バイオメディックスの分野で注目されている。AgaBb はその特異性から B 型血液型抗原のフコースを認識しないと活性を持たないと考えられるが，近縁ホモログで構造が解かれていなかったため，その認識様式は不明であった。AgaBb の構造を決定することで認識様式が明らかになり，タンパク質工学的に医療分野でのアプリケーションに適した酵素の設計などの可能性が見込まれる。

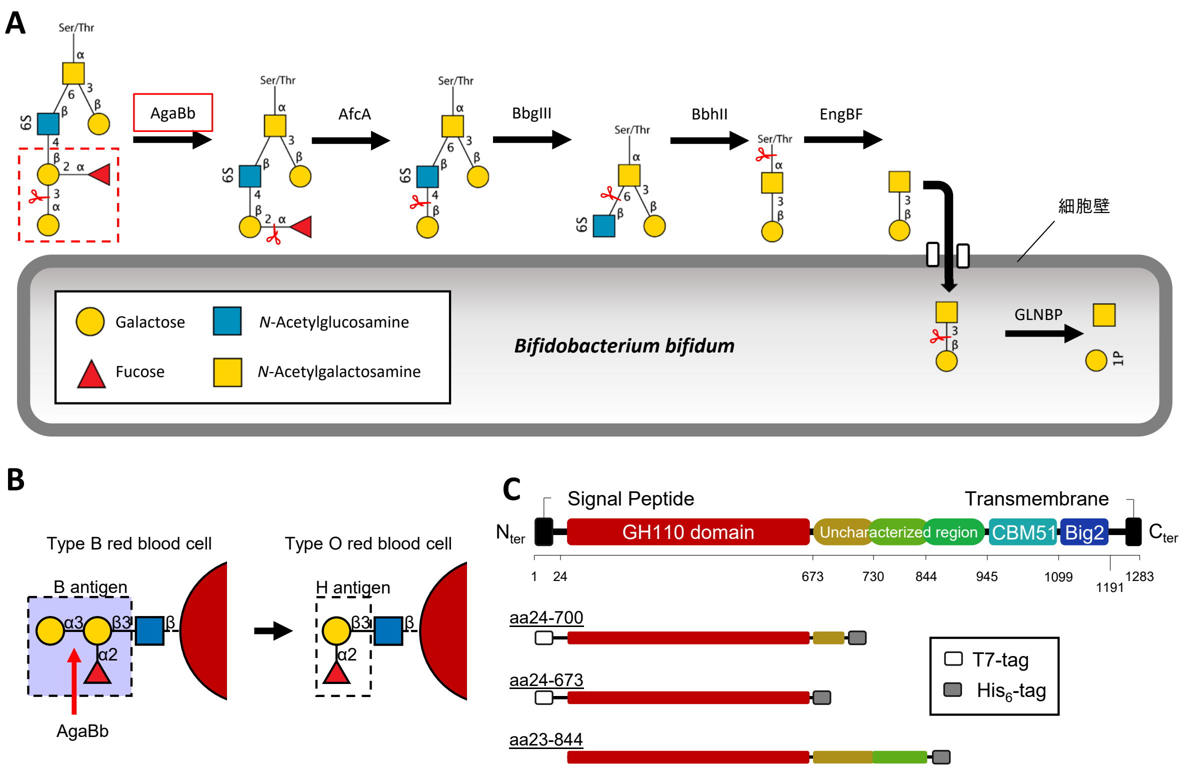

Figure 1 **A.** Degradation pathway of sulfated Core 2 *O*-glycan by *B. bifidum*. AgaBb and its substrate structure are shown with a solid and a dashed box, respectively. **B.** Overview of the blood group conversion by AgaBb. **C.** Domain organization of AgaBb and the construct described in this article. Figures are prepared based on reference [11, 12].

2. AgaBb の X 線結晶構造解析

2-1. コンストラクトデザイン

AgaBb は N 末端からシグナルペプチド（aa1-24），GH110 活性ドメイン（aa25-673），未解析領域（aa674-944），B 型血液型抗原を特異的に認識し活性ドメインの基質へのアクセスを助ける CBM51（aa945-1096），免疫グロブリン様ドメイン Big2（aa1097-1191），膜貫通領域（aa1192-1283）で構成されている（Fig. 1C）。全長配列は結晶化に適していないためシグナルペプチドと膜貫通領域を取り除き，活性ドメインを残した計 16 のコンストラクトを設計した。配列の切断部分は，研究初期では PSIPRED による 2 次構造予測で disorder している領域を domain boudary であると仮定し，選定していた [6]。AlphaFold2 リリース以降は予測構造から見出した domain boundary を基に選定した [7]。

設計したコンストラクトのうち，11 個が結晶化に十分な量調製できた。NeXtal Biotechnologies 社の JCSG Core I-IV Suite を用いてこれらのコンストラクトの結晶化スクリーニングを行った結果，5 つのコンストラクトの結晶化に成功した。どれも結晶質や再現性に難がある中，aa24-700，aa24-673，aa23-844 コンストラクトで解析実験に十分な質の結晶が得られた。

2-2. AgaBb aa24-700 コンストラクトの結晶構造

AgaBb aa24-700 コンストラクトの結晶はタンパク質濃度 16.1 mg/mL，1.6 M ammonium sulfate，0.1 M HEPES-NaOH pH 7.5，0.1 M NaCl の条件で，5 日間 20°C でインキュベートすることで得られた。抗凍結剤として 10% glycerol にソーキングした上で瞬間冷却し，AR-NW12A で X 線に照射し，分解能 1.96 Å のデータセットを取得した（Fig. 2A）。位相決定には 5 mM potassium tetrachloroplatinate (II) にソーキングした結晶を用いて波長 1.0715 Å の X 線で測定したデータセットにより，単波長異常分散法で決定した（Fig. 2B）。

AgaBb aa24-700 コンストラクトの結晶構造は AgaBb 特有の core β-helix と 2 つの β-barrel（β-barrel 1 および β-barrel 2）で構成されていた。一方 aa587-617 のアミノ酸は観察できず，更に下流の配列は非対称単位中で隣接するサブユニットと絡まっていた（Fig. 2C）。Protein Data Bank in Europe が提供している web サービスである Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies（PISA）による解析ではこの C 末端が絡まった 2 量体構造が biological assembly と判定されたが，ゲルろ過クロマトグラフィーでの分子量測定では aa24-700 コンストラクトは単量体であった [8]。また，前述の回折実験以降，結晶化の再現が取れなくなった。これらのことから C 末端の絡まりは結晶化パッキングによるアーティファクトであり，絡まりが再現できないことが結晶化を妨げていると示唆された。リガンドフリーの構造では酵素メカニズムに関する考察が難しいため，再現

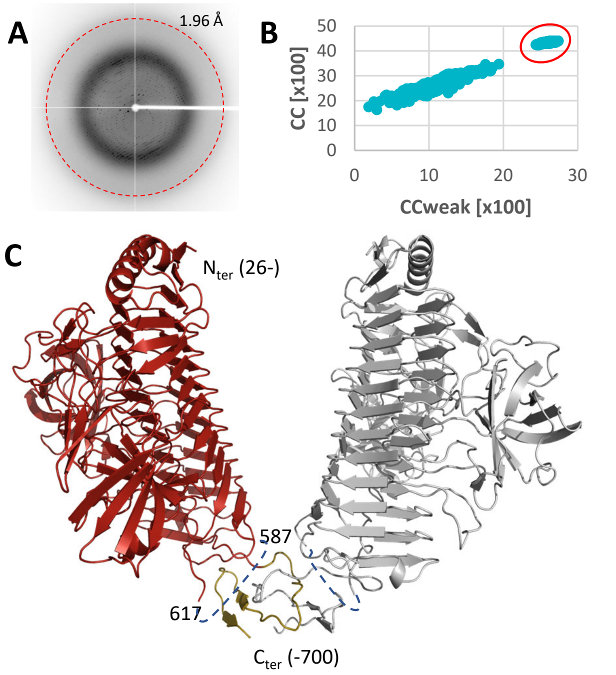

Figure 2 **A.** X-ray diffraction of AgaBb aa24-700 crystal. Outer shell limit is shown with a dashed line. **B.** CC vs weak CC plot showing the results of substructure search by shelxd. **C.** Dimeric structure of AgaBb aa24-700. Preprared based on reference [11].

性の高い結晶で複合体構造を取得する必要性があった。そこで問題部分の物理障壁を解消するべく，C 末端をさらに削った AgaBb aa24-673 コンストラクトも用いて再度結晶化を試みた。

2-3. AgaBb aa24-673 コンストラクトの結晶構造

AgaBb aa-24-673 コンストラクトの結晶はまずタンパク質濃度 5 mg/mL，10 % (w/v) PEG6000，0.1 M citric acid (pH 5.0) で種結晶を出し，これを microseed matrix screening（MMS, [9]）に供することで，15% (w/v) PEG20000，0.1 M MES-NaOH (pH6.5) の条件で得られた。MMS には NeXtal Biotechnologies 社の PEGs Suite を模した自作のキットを用いた。リガンドとして 20 mM Gal を添加して共結晶化を試み，また抗凍結剤には 20% ethylene glycol を使用した。BL-1A で X 線に照射した結果，分解能 3.50 Å の回折データが得られ，活性部位の中に Gal の電子密度マップが観察された。しかし，いくら回折実験にトライしてもこれ以上分解能が改善することはなく，また本コンストラクトで得られる結晶は blade cluster 状であり，結晶を単離するのが極めて困難であったため，実験は難航した。酵素学的な考察を行うには分解能 2.0 Å を切るのが望ましく，このコンストラクトではその目的を果たせないと考え，更なるコンストラクトの検討を行い，aa24-844 コンストラクトに行きついた。

2-4. AgaBb aa23-844 コンストラクトの結晶構造

AgaBb aa-23-844 コンストラクトの結晶はまずタンパク質濃度 37.5 mg/mL，10 % (w/v) PEG6000，0.1 M citric acid pH 5.0（タンパク質：リザーバー比は 1:2）で種結晶を出し，これを MMS に供することで，10% (w/v) PEG3350，0.1 M sodium iodide の条件で得られた。MMS には前述の自作のキットを 2 倍希釈したものを用いた。抗凍結剤として 20 % (v/v) PEG300 を用い，BL-1A で回折実験を行ったところ，分解能 2.02 Å の回折データが得られた。

決定した AgaBb aa24-844 コンストラクトの結晶構造は単量体であり，前述の活性ドメインの他に 2 つの β-sandwich（以降 β-sandwich 1 および β-sandwich 2）が視認できた（Fig. 3A）。β-Sandwich 1 は AgaBb aa24-700 コンストラクトで観察できなかった aa587-617 の部分が core β-helix から伸長し，活性ドメインの下流の配列と相互作用することで形作られていた。一方，β-sandwich 2 は core β-helix そして β-barrel 1 と密接に相互作用していた。このことから 2 つの β-sandwich がタンパク質の安定化に寄与している可能性が示唆された。実際，thermal shift assay での解析では β-sandwich 2 を含まないコンストラクトでは変性温度（*Tm* 値）が 50°C 前半だったのに対し，β-sandwich 2 や更に下流のドメインを有するコンストラクトの熱安定

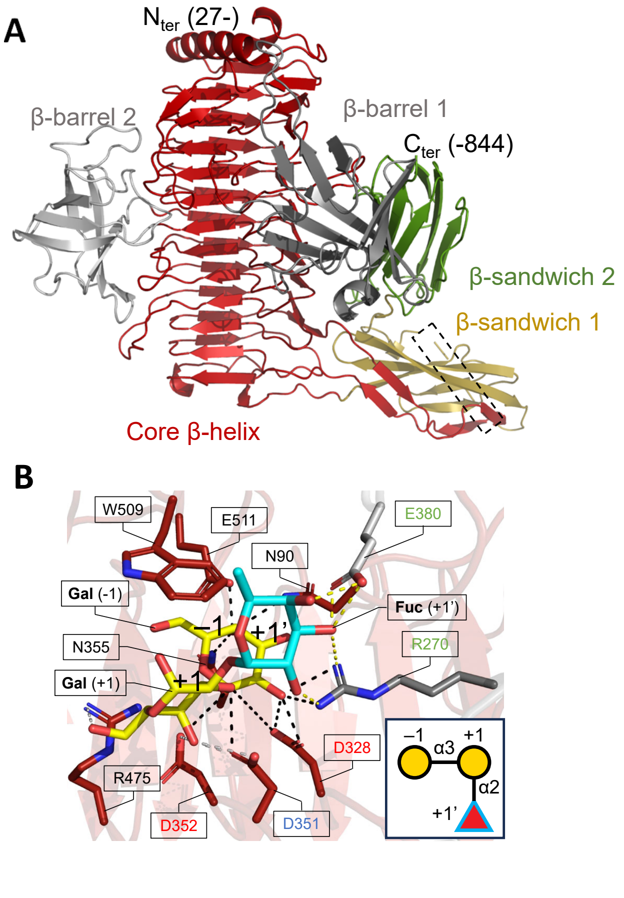

Figure 3 **A**. Overall structure of AgaBb aa23-844. **B.** Blood group B trisaccharide model placed in the active site of AgaBb aa23-844. Prepared based on reference [11].

性は顕著に上昇し，*T*m 値はいずれも 60°C 以上となった。

本コンストラクトの触媒残基に変異を加え，基質であるB 型血液型抗原との共結晶化も試みたが，残念ながら現時点で複合体構造の取得には成功していない。そこで，モデルを作成して基質の結合様式の決定を試みた。AgaBb と配列相同性 27% の遠縁ホモログ PdGH110B では galactobiose（Gal-α1,3-Gal，B 型血液型抗原の部分構造で，Fuc を含まない）との複合体構造が報告されている [10]。AgaBb と PdGH110B を重ね合わせることで B 型血液型抗原のモデルを活性中心に置いた。すると活性に必須である Fuc の周囲に R270 および E380 が水素結合できる位置で視認できた（Fig. 3B）。これらの残基が抗原認識の重要残基であることが示唆された。

3．まとめ

本研究ではビフィズス菌由来の B 型血液型抗原を得意的に H 抗原に加水分解する GH110 α1,3-galactosidase（AgaBb）の構造決定に成功した。これを基に B 型血液型抗原特有のフコースを認識するサイトを推定した。また特定の β-sandwich が酵素の安定性に寄与していることが明らかになった。

本稿は 2021 年度量子ビームサイエンスフェスタの発表内容を基に書いたが，今年度，*Journal of Applied Glycoscience* にて原著論文として発表した [11]。この論文では本稿で示したデータの他にフコース認識サイトの変異体活性測定や β-sandwich 領域の系統解析なども行っている。また本論文は 10 年以上行ってきた研究の賜物である。まだまだ課題は残っており，道のりは長いが，それでもこの論文をきっかけに小さく，確実に一歩前進していると筆者は自負している。この十年間の苦悩についても論文中に述べているので，本稿を通して AgaBb の研究に興味を持った方には是非とも論文も参照してほしい。

4．補遺 – 本稿の執筆にあたって

PF ニュース編集委員会事務局より本稿の執筆依頼を頂いたのは 2022 年 5 月のことである。「量子ビームサイエンスフェスタでの発表内容を基に」という依頼内容であったものの，AgaBb の研究テーマはちょうど論文化を控えていたため，本稿執筆の先送りを決定した。しかし時が経つのは早く，やっと論文投稿にこぎつけたのは 2024 年 3 月であった。サイエンスフェスタ発表当時，まだ初々しい学生であった筆者（鹿島）は，気付けば 3 度の異動を経て三十路の大学教員になっていた。長い間，待たせてしまった関係者各位に対し，この場を借りてお詫び申し上げると共に，改めて執筆の機会を下さったことに感謝の意を唱えたい。

量子ビームサイエンスフェスタ発表時に取り上げたクライオ電子顕微鏡解析について，あまりに予備データとしての意味合いが強いため，本稿，そして本稿執筆の遅延のきっかけとなった論文には載せないことにした。しかし発表以降，新たなデータの獲得に成功しており，本稿に関心を持って頂いた読者の皆様には是非，今後の研究動向をフォローしてほしい。

謝辞

本研究で実施した放射光実験は PF および PF-AR の共同利用実験課題（課題番号：2015G020，2017G089，2019G018）で行われた。また 2021 年度量子ビームサイエンスフェスタの発表で取り上げたクライオ電子顕微鏡データは AMED-BINDS（課題番号：2114，3073，3181，4450）を介して池田聡人博士，稲葉理美博士，守屋俊夫特任准教授，安達成彦准教授，川崎政人准教授のご協力のもと Talos Arctica で測定したものである。各施設にてサポートして下さったスタッフの皆様には深く御礼申し上げる。

最後に本研究で AgaBb の結晶化やＸ線回折データの取得にご協力下さった赤間恵氏（東京大学・当時），荒川孝俊助教（現・東京理科大学），山田千早助教（現・明治大学専任講師）に感謝申し上げる。

引用文献

[1] A. Horigome and T. Odamaki, 化学と生物 **54**, 260 (2016).

[2] L. E. Tailford, E. H. Crost, D. Kavanaugh and N. Juge, Front. Genet. **6**, 81 (2015).

[3] V. Triantis, L. Bode and J. R. J. van Neerven, Front. Pediatr. **6**, 190 (2018).

[4] T. Katoh, M. N. Ojima, M. Sakanaka, H. Ashida, A. Gotoh and T. Katayama, Microorganisms **8**, 481 (2020).

[5] T. Wakinaka, M. Kiyohara, S. Kurihara, A. Hirata, T. Chaiwangsri, T. Ohnuma, T. Fukamizo, T. Katayama, H. Ashida and K. Yamamoto, Glycobiology **23**, 361 (2013).

[6] L. J. McGuffin, K. Bryson, D. T. Jones, Bioinformatics, **16**(4), 404 (2000).

[7] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, *et al.*, Nature **596**, 583 (2021).

[8] E. Krissinel and K. Henrick. J. Mol. Biol. **372**, 774 (2007).

[9] A. D’Arcy, T. Bergfors, S. W. Cowan-Jacob and M. Marsh, Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun. **F70**, 1117 (2014).

[10] B. E. McGuire, A. G. Hettle, C. Vickers, D. T. King, D. J. Vocadlo and A. B. Boraston, J. Biol. Chem. **295**, 18426 (2020).

[11] T. Kashima, M. Akama, T. Wakinaka, T. Arakawa, H. Ashida and S. Fushinobu, J. Appl. Glycosci. **71**, 81 (2024).

[12] T. Kashima, T. Katoh, C. Yamada, T. Katayama, H. Ashida and S. Fushinobu, 応用糖質科学 **13**, 194 (2023).

（原稿受付日：2024 年 9 月 6 日）

著者紹介

鹿島騰真　Toma KASHIMA

東京大学大学院農学生命科学研究科
博士課程学生（現・助教）
〒 113-8657　東京都文京区弥生 1-1-1
e-mail: a-kashimatoma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp
略歴：2022 年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了，2023 年東京大学大学院農学生命科学研究科助教。農学博士。
最近の研究：新規糖質関連酵素の探索および機能構造解析。
趣味：実験，音楽（ロック）

芦田久　Hisashi ASHIDA

近畿大学生物理工学部食品安全工学科
教授
〒 649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
e-mail: ashida@waka.kindai.ac.jp
略歴：1988 年京都大学農学部卒業，2000 年京都大学博士（農学），2012 年近畿大学生物理工学部教授。
最近の研究：糖質関連酵素と糖質の機能に関する研究。
趣味：地中性ゴミムシ類の分類，ジョギング

伏信進矢　Shinya FUSHINOBU

東京大学大学院農学生命科学研究科
教授
〒 113-8657　東京都文京区弥生 1-1-1
e-mail: asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
略歴：2012 年東京大学大学院農学生命科学研究科教授。農学博士。
最近の研究：酵素の構造と機能の研究。

---

* 量子ビームサイエンスフェスタ　学生奨励賞とは？

毎年 3 月に，物質構造科学研究所 (IMSS)，大強度陽子加速器施設（J-PARC），総合科学研究機構（CROSS），PF ユーザーアソシエーション（PF-UA），J-PARC MLF 利用者懇談会が主催する量子ビームサイエンスフェスタ（Quantum Beam Science Festa, QBSF）が開催されます。PF-UA と MLF 利用者懇談会では，この QBSF で筆頭著者としてポスター発表をした学生を対象に，「学生奨励賞」を授与しています。

今年度の QBSF は，2025 年 3 月 12 日～ 14 日につくば国際会議場（エポカルつくば）で開催されます。我こそはという学生さんは奮って発表頂ければ幸いです。2024 年度 QBSF の詳細は以下の URL からご確認ください。
https://www2.kek.jp/imss/qbsf/2024/