

乳酸菌由来多分岐デキストランの分解に関与するタンパク質の構造と機能に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2024-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 駿太郎 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/0002000669

学位論文

乳酸菌由来多分岐デキストランの分解に関与するタンパク質の
構造と機能に関する研究

2023年12月

静岡大学 創造科学技術大学院

自然科学系教育部 バイオサイエンス専攻

中村 駿太郎

目次

略語表	3
第1章 緒論	6
1.1. 糖質加水分解酵素	6
1.2. 多糖資化遺伝子群	10
1.3. デキストラン	12
1.4. デキストラン分解酵素	14
第2章 <i>F. johnsoniae</i> 由来 GH65 α -1,2-グルコシダーゼの構造機能解析	17
2.1. 緒言	17
2.2. 材料と方法	24
2.2.1. 試薬類	24
2.2.2. 多分岐デキストランの調製	25
2.2.3. 大腸菌での異種発現および精製	27
2.2.4. 酵素反応	32
2.2.5. 反応速度論パラメータの算出	35
2.2.6. 反応産物のアノマー分析	36
2.2.5. X線結晶構造解析	37
2.2.6. アラインメントと系統解析	39
2.3. 結果	40
2.3.1. FjGH65A の発現および精製	40
2.3.2. FjGH65A の基質特異性	41
2.3.3. FjGH65A の反応産物のアノマー分析	45
2.3.4. FjGH65A の X線結晶構造解析	48
2.3.5. FjGH65A の全体構造	50
2.3.6. FjGH65A の活性部位	55
2.3.7. FjGH65A と GH-L clan 酵素との比較	62
2.3.8. FjGH65A のイソマルトース複合体構造	64
2.4. 考察	66
2.5. 小括	74
第3章 多分岐デキストラン分解に関与するタンパク質の構造機能解析	75
3.1. 緒言	75
3.2. 材料と方法	78
3.2.1. 試薬類	78
3.2.2. qRT-PCR	78
3.2.3. 大腸菌での異種発現および精製	81

3.2.4. 酵素反応.....	83
3.2.5. FjDexUL GHs による多分岐デキストランに対する相乗効果.....	86
3.2.6. X 線結晶構造解析.....	87
3.2.7. アフィニティ電気泳動.....	89
3.2.8. 等温滴定カロリメトリー (ITC).....	89
3.3. 結果.....	90
3.3.1. FjDexUL 遺伝子産物の発現と精製.....	90
3.3.2. 炭素源の違いによる FjDexUL 遺伝子発現量の違い.....	93
3.3.2. FjGH66 の機能解析.....	95
3.3.3. FjGH66 の立体構造.....	98
3.3.4. FjDex31A のイソマルトオリゴ糖に対する活性.....	103
3.3.5. FjGH97A の機能解析.....	106
3.3.6. FjDexUL GHs の多分岐デキストランに対する相乗効果.....	109
3.3.7. FjDusD と FjDusE の糖結合能の解析.....	113
3.4. 考察.....	122
3.5. 小括.....	128
総括.....	129
参考文献.....	131
発表論文.....	148
謝辞.....	149

略語表

AgGD	<i>Arthrobacter globiformis</i> 由来グルコデキストラナーゼ
B-1299 α -グルカン	<i>Leuconostoc citreum</i> B-1299 株由来 α -グルカン
B-1355 α -グルカン	<i>L. citreum</i> B-1355 株由来 α -グルカン
BSA	bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
BsGGP	<i>Bacillus selenitireducens</i> 由来 2-O- α -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ
CAZymes	carbohydrate-active enzymes, 糖質関連酵素
CBB	coomassie brilliant blue
CBM	carbohydrate binding module, 糖結合モジュール
CITase	cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase
CsKP	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> 由来コージビオースホスホリラーゼ
Dus	dextran utilization system, デキストラン資化機構
EC	enzyme commission
FjDex31A	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> 由来 GH31 エンドデキストラナーゼ
FjDexUL	<i>F. johnsoniae</i> のデキストラン資化遺伝子群
FjDusC	<i>F. johnsoniae</i> 由来 Dus の推定糖トランスポーター
FjDusD	<i>F. johnsoniae</i> 由来 Dus のオリゴ糖結合タンパク質
FjDusE	<i>F. johnsoniae</i> 由来 Dus の多糖結合タンパク質
FjDusR	<i>F. johnsoniae</i> 由来 Dus の推定転写調節因子
FjGH65A	<i>F. johnsoniae</i> 由来 kojibiose hydrolase
FjGH66	<i>F. johnsoniae</i> 由来デキストラナーゼ
FjGH97A	<i>F. johnsoniae</i> 由来グルコデキストラナーゼ
G2G2G6G	6-O- α -kojitriosylglucose
G2G6G	6-O- α -kojibiosylglucose
GH	glycoside hydrolase, 糖質加水分解酵素
GHxx	glycoside hydrolase family xx, 糖質加水分解酵素ファミリー xx

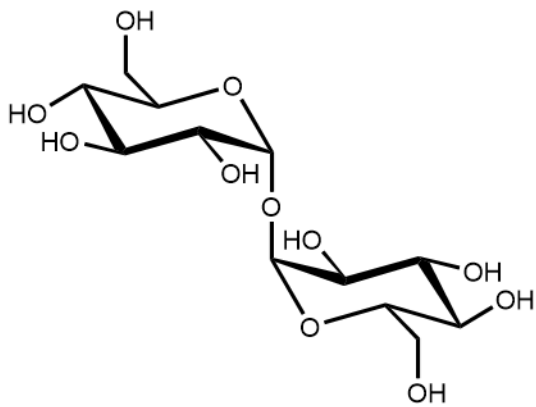
GOD-POD	glucose oxidase-peroxidase, グルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ
GP	glycoside phosphorylase, 糖質加リン酸分解酵素
Gal	galactose, ガラクトース
Glc	glucose, グルコース
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー
HTCS	hybrid two-component systems
IGn	重合度 n のイソマルトオリゴ糖
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
ITC	isothermal titration calorimetry, 等温滴定カロリメトリー
LB	Luria-Bertani
LbMP	<i>Levilactobacillus brevis</i> 由来マルトースホスホリラーゼ
MdDDE	<i>Microbacterium dextranolyticum</i> 由来 dextran α -1,2-debranching enzyme
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
PCR	polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
PGGHG	protein α -glucosyl-1,2- β -galactosyl-L-hydroxylysine α -glucosidase
PUL	polysaccharide utilization loci, 多糖資化遺伝子群
PspAG97A	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. K8 由来 GH97 酵素
S-32 α -グルカン	<i>L. citreum</i> S-32 株由来 α -グルカン
S-64 α -グルカン	<i>L. citreum</i> S-64 株由来 α -グルカン
SAD	single wavelength anomalous dispersion, 単波長異常分散
Sus	starch utilization system, 澱粉資化機構
SusB	<i>B. thtaiotaomicon</i> 由来 GH97 グルコアミラーゼ
SusG	<i>B. thtaiotaomicon</i> 由来 GH13 α -アミラーゼ
TCEP	tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
TLC	thin-layer chromatography, 薄層クロマトグラフィー
TLSMD	translation/libration/screw motion determination

TbKP	<i>Thermoanaerobium brockii</i> ATCC 35047 由来コージビオース ホスホリラーゼ
TpDex	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> 由来デキストラナー ゼ
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TtGA	<i>Thermoanaerobacterium themosaccharolyticum</i> 由来グルコア ミラーゼ
YcjT	<i>Escherichia coli</i> K-12 由来コージビオースホスホリラーゼ
pNP-Glc	<i>p</i> -nitrophenyl α -glucopyranoside
rmsd	root mean square deviation
α -GlcF	α -D-glucopyranosyl fluoride

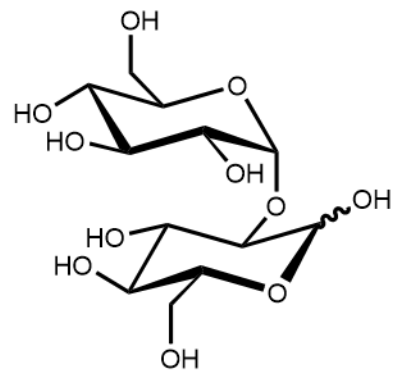
第1章 緒論

1.1. 糖質加水分解酵素

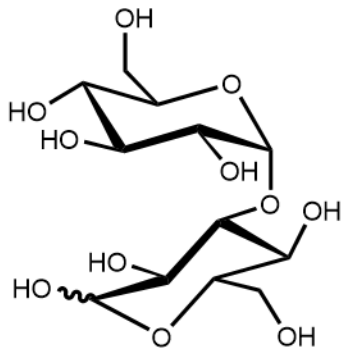
D-グルコースは天然に存在する単糖の中で最も多く、ほとんど全ての生物において解糖系を通じてエネルギー源として利用されている。この単糖は主にオリゴ糖または多糖として自然界に存在する。ほとんどの D-グルコースはピラノース型で存在しており、グリコシド結合を介して他の単糖の水酸基と結合する。2つのグルコースが α -グリコシド結合で結合したグルコ2糖は、トレハロース (α -D-Glc-(1 \leftrightarrow 1)- α -D-Glc)、コージビオース (α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-D-Glc)、ニゲロース (α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)-D-Glc)、マルトース (α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)、イソマルトース (α -D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-Glc) がある (図 1-1)。さらにグルコ2糖には β -グルコースを含むと11個の異性体が存在し、化学的性質が異なる。グルコオリゴ糖やグルカンは様々な性質や生理的機能を有している。例えば、 α -D-グルコースが α -(1 \rightarrow 4)-で結合した主鎖に、 α -(1 \rightarrow 6)-グリコシド結合の分岐で構成されている澱粉は、植物のエネルギー貯蔵物質として機能しており、ヒトは澱粉をアミラーゼなどの加水分解酵素によってグルコースにまで分解し、解糖系、クエン酸回路、電子伝達系で代謝し、ATPを合成する (Kötting et al., 2010)。また、D-グルコースは真核生物のN型糖鎖のプロセッシングにおいて、タンパク質の品質管理に重要な役割を果たしている (Kleizen and Braakman, 2004)。さらに、一部の細菌では菌体外多糖として α -グルカンを生成しており、宿主と細菌の相互作用や免疫調節において重要な役割を果たすことが知られている (Chandra et al., 2011; Kalscheuer et al., 2019)。



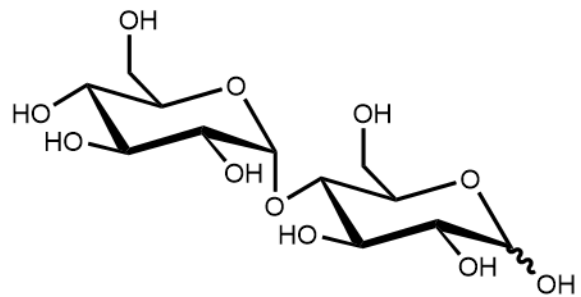
トレハロース
(α -D-Glc-(1↔1)- α -D-Glc)



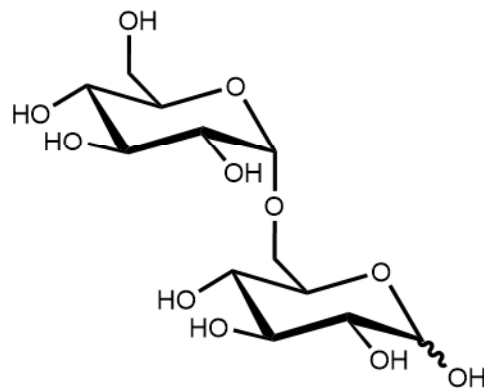
コージビオース
(α -D-Glc-(1→2)-D-Glc)



ニゲロース
(α -D-Glc-(1→3)-D-Glc)



マルトース
(α -D-Glc-(1→4)-D-Glc)



イソマルトース
(α -D-Glc-(1→6)-D-Glc)

図 1-1. α -グルコ 2 糖の構造式

トレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトースの化学構造式を示した。

天然に存在する多種多様な糖質の生合成や分解には糖質関連酵素 (carbohydrate-active enzyme, CAZyme) が関わっている。CAZyme は Henrissat らによりアミノ酸配列の相同性に基づいて分類されており、糖質加水分解酵素 (GH) (Henrissat, 1991; Henrissat and Bairoch, 1993)、糖転移酵素 (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003)、多糖リアーゼ (Lombard et al., 2010)、糖質エステラーゼ (Biely, 2012)、CAZyme として働く酸化還元酵素 (Levasseur et al., 2013)、糖結合モジュール (CBM) (Boraston et al., 2004) の各種ファミリーが設立され CAZY データベースに登録されている (<http://www.cazy.org/>) (Lombard et al., 2014)。GH は CAZY データベース内で最も多くのファミリー数を有しており、2023 年 12 月現在で GH187 まで設立されている (一部ファミリーは削除されている)。また、立体構造、触媒残基、反応機構の類似性が認められるファミリーは上位分類である clan にまとめられている (Henrissat and Bairoch, 1996)。現在は GH-A clan から GH-R clan まで設立されている。GH ではこれまで澱粉を分解するアミラーゼ、セルロースを分解するセルラーゼ、キチンを分解するキチナーゼ、*N* 型糖鎖や *O* 型糖鎖の分解に関与する GH など、多くの基質特異性を有する酵素が報告されており、EC (enzyme commission) 番号 (EC 3.2.1.-) で分類される酵素活性は 200 以上ある。近年、ゲノム解析技術の向上により、様々な生物のゲノムが解読され、多くの機能未知な推定糖質関連酵素の遺伝子の存在が明らかになっている。よって、機能未知の GH は豊富に存在すると考えられる。

GH は加水分解機構の違いによりアノマー保持型酵素とアノマー反転型酵素に分けられる (Davies and Henrissat, 1995)。アノマー保持型酵素では生成物のアノマーが基質と同じであるのに対して、アノマー反転型酵素では生成物のアノマーが基質のそれと反転する。一般的にどちらの反応機構でも触媒残基は 2 つのカルボキシル基を有する酸性アミノ酸残基 (Asp または Glu) である。アノマー保持型酵素の反応機構では触媒残基が求核触媒残基と一般酸/塩基触媒残基として働き、共有結合中間体を介した 2 段階の反応により基質を加水分解する。アノマー反転型酵素の反応機構では触媒残基は一般酸触媒残基と一般塩基触媒として働き、1 段階の反応により基質を加水分解する (図 1-2)。

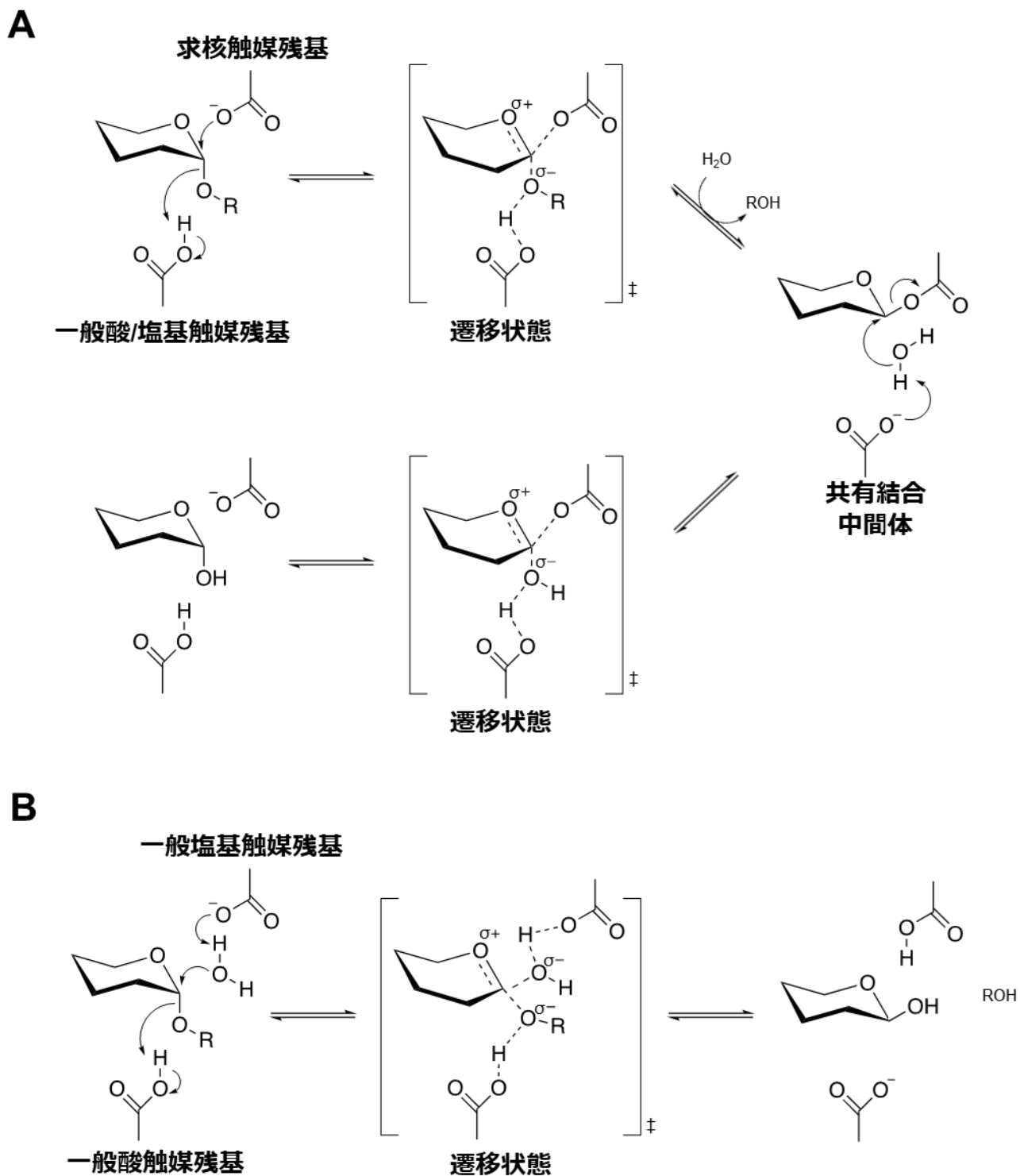


図 1-2. 典型的な糖質加水分解酵素の反応機構

(A) アノマー保持型加水分解酵素の反応機構。求核触媒残基と一般酸/塩基触媒残基による 2 段階の反応。(B) アノマー反転型加水分解酵素の反応機構。一般酸触媒残基と一般塩基触媒残基による 1 段階の反応

1.2. 多糖資化遺伝子群

細菌は、その生息環境に応じて、GH や多糖リアーゼなど様々な酵素を産生し、糖質を分解、資化している。中でも Bacteroidota 門に属する細菌は特定の多糖の認識と分解、分解産物の輸送を組織的に行う遺伝子群 (Polysaccharide Utilization Loci, 多糖資化遺伝子群, PUL) を有している。PUL は主に細胞表面の糖結合タンパク質、糖トランスポーター、糖質分解酵素、転写制御因子などのタンパク質をコードしている (Grondin et al., 2017)。PUL の研究は 30 年以上前に Salyers らがヒトの腸内細菌である *Bacteroides thetaiotaomicron* の澱粉資化機構 (Starch Utilization System, Sus) を発見したことから始まった (Anderson and Salyers, 1989; Martens et al., 2009; Shipman et al., 2000)。Sus は転写制御因子である SusR、TonB 依存性トランスポーター (SusC)、オリゴ糖結合タンパク質 (SusD)、多糖結合タンパク質 (SusE, SusF)、菌体外で働く GH ファミリー13 (GH13) α -アミラーゼ (SusG)、ペリプラズムで働く GH13 α -アミラーゼ (SusA) と GH97 グルコアミラーゼ (SusB) で構成されている (D'Elia and Salyers, 1996; Foley et al., 2016; Tancula et al., 1992)。これらのタンパク質は協働して澱粉を捕捉し、細胞表面でマルトオリゴ糖に分解し、ペリプラズムに取り組み、D-グルコースにまで分解する (図 1-3) (D'Elia and Salyers, 1996; Reeves et al., 1996; Shipman et al., 1999; Smith and Salyers, 1991)。転写調節因子である SusR はペリプラズムでマルトースを認識し、各 Sus タンパク質の遺伝子発現量の上昇を引き起こす (D'Elia and Salyers, 1996)。その後、*B. thetaiotaomicron* を含む多くの Bacteroidota 門細菌から様々な PUL が報告されている。2023 年 12 月現在、2,065 の Bacteroidota 門細菌から推定も含め 68,500 の PUL が PUL データベース (<http://www.cazy.org/PULDB/>) に登録されている (Terrapon et al., 2018)。近年、フルクタン、キチン、ヘミセルロース、ペクチン、グリコサミノグリカン、N 型糖鎖、ムチン型 O 型糖鎖などを標的とする PUL がいくつか報告され、新規な活性を有する GH が多数見つかっている (Cartmell et al., 2017; Crouch et al., 2022; Larsbrink et al., 2016; Martens et al., 2008; Naas et al., 2014; Ndeh et al., 2017; Rogowski et al., 2015; Sonnenburg et al., 2010)。このように、植物の細胞壁多糖や動物の糖鎖を標的とした PUL の報告は増えている一方で、細菌の菌体外多糖を標的とした PUL の報告はほとんどない。

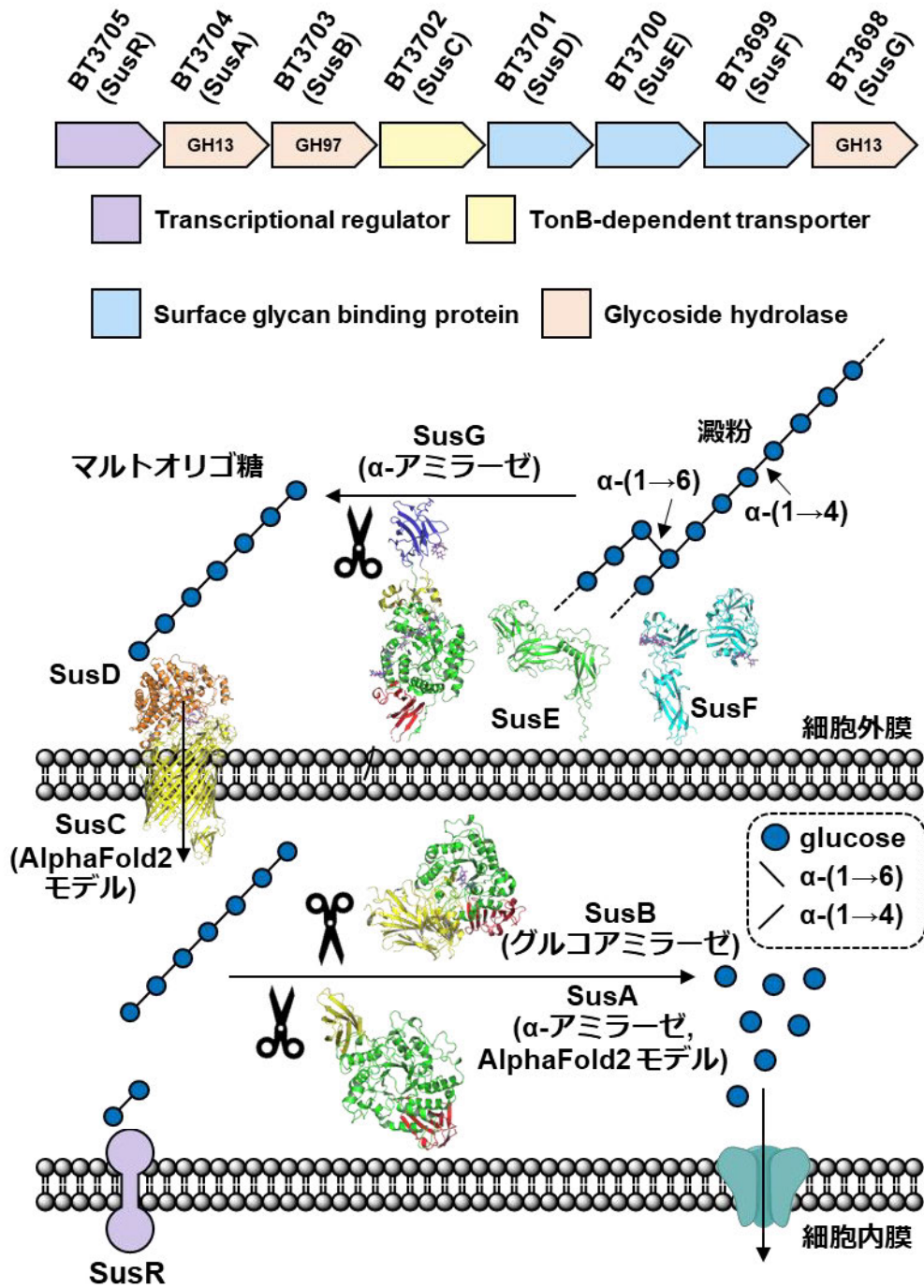


図 1-3. *B. thetaiotaomicron* の澱粉資化機構

澱粉は澱粉結合タンパク質 SusE、SusF によって細胞表面で認識される。認識された澱粉は SusG によって加水分解され、マルトオリゴ糖が生成される。マルトオリゴ糖は SusC/D によってペリプラズム内に取り込まれる。取り込まれたマルトオリゴ糖は SusA や SusB によってグルコースにまで分解される。

1.3. デキストラン

デキストランは D-グルコースが α -(1→6)-結合した主鎖で構成されており、*Leuconostoc* 属や *Streptococcus* 属などの細菌によって合成される菌体外多糖である (Li et al., 2020; Jeanes et al., 1954)。また、菌株や菌種によっては α -(1→2)-や α -(1→3)-結合の分岐を有する多分岐デキストランも報告されている (図 1-4) (Kim and Robyt, 1995; Smith et al., 1994)。デキストランは *Leuconostoc* 属などの乳酸菌ではグルカンスクラーゼによって合成され、*Gluconobacter oxydans* ではデキストランデキストリナーゼによって合成される。グルカンスクラーゼとデキストランデキストリナーゼは、それぞれスクロースとマルトオリゴ糖という異なる基質を用いて、 α -(1→6)-結合の伸長を触媒する (Gangoiti et al., 2018; Sadahiro et al., 2015)。また、グルカンスクラーゼは、その酵素反応の特異性の違いにより、 α -(1→6)-結合だけでなく、 α -(1→3)-や α -(1→2)-結合も生成することが知られている。最もよく研究されているデキストランは *L. mesenteroides* NRRL B-512F 由来のものであり、これは 95%の α -(1→6)-結合と 5%の α -(1→3)-結合の分岐鎖で構成されている (Sloan et al., 1954)。デキストランの分岐の種類や割合は物理化学的な特性の多様性をもたらすことが知られており、分岐の程度を大きくすると、水への溶解度が低下する (Smith et al., 1994)。*L. citreum* B-1299 株は細胞外と細胞内の両方にグルカンスクラーゼを発現し、 α -(1→6)-結合の主鎖に α -(1→2)-結合の分岐を多く含み、 α -(1→3)-結合の分岐を少量含む多分岐デキストラン (B-1299 α -グルカン) を合成する (Kim and Robyt, 1995)。*L. citreum* NRRL B-1355 株は、 α -(1→6)-と α -(1→3)-結合からなる多分岐デキストランとオルタナンを合成する (B-1355 α -グルカン) (Smith et al., 1994)。製糖工場のラインから分離された *L. citreum* S-32 株と S-64 株も多分岐デキストランを合成する (S-32 α -グルカンと S-64 α -グルカン)。¹³C-NMR 分析の結果、S-32 α -グルカンには α -(1→6)-結合に加えて α -(1→3)-結合が 30%含まれており、酵素処理による解析から、 α -(1→2)-グルコシド結合も含まれていることが分かった (Funane et al., 2003; Miyazaki et al., 2023)。また、S-64 α -グルカンは 24%の α -(1→2)-、24%の α -(1→3)-、9%の α -(1→4)-結合を含むことが知られている (Funane et al., 2003)。

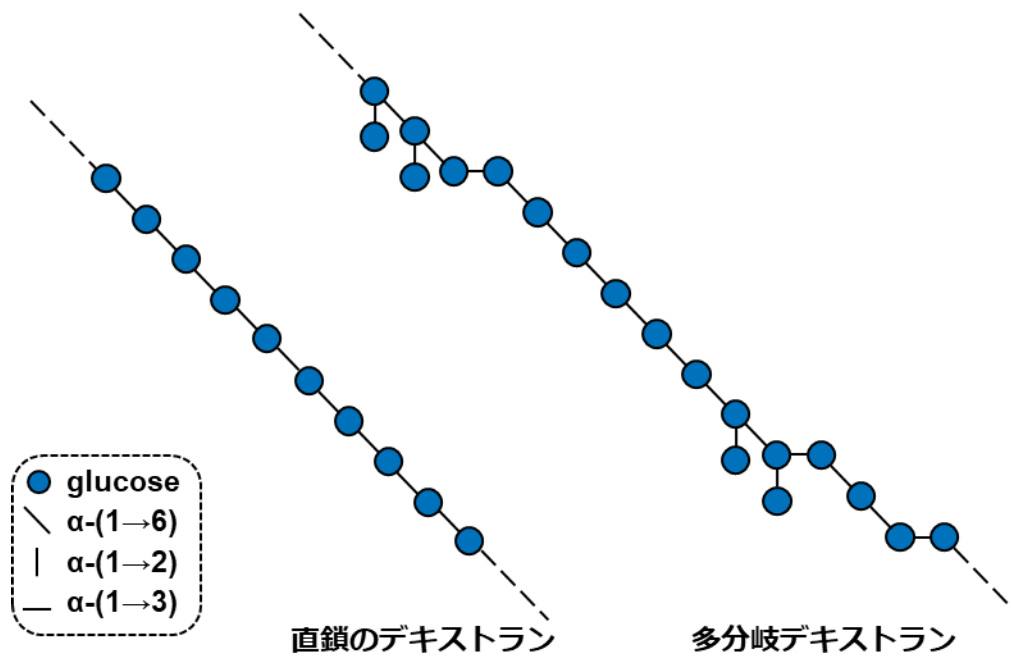


図 1-4. 直鎖のデキストランと多分岐デキストランの模式図

グルコースの表記は Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>) (Lewis et al., 2023) に基づく。

1.4. デキストラン分解酵素

デキストラン分解酵素の研究は1940年代に輸液として利用しているデキストランの構造を解明し、合成することを目的として始まった (Ingelman, 1948)。製糖業界では収穫したサトウキビ中のデキストランや製糖工場内の微生物によるデキストランの生成によるスクロース収量の低下を防ぐためにデキストラン分解酵素の処理が行われている (Rodríguez Jiménez, 2009)。また、デキストランは虫歯の原因と考えられている歯垢の成分であることからデキストラナーゼは医薬品の分野においても利用されている (Khalikova et al., 2005)。

デキストラン分解酵素は様々な細菌や真菌で見出されており、エンド型酵素とエキソ型酵素に分けられる。エンドデキストラナーゼ (EC 3.2.1.11) はデキストランの α -(1 \rightarrow 6)-結合をランダムに加水分解し、様々な鎖長のイソマルトオリゴ糖を生成する。CAZy データベースの分類によれば、エンドデキストラナーゼは GH31、49、66 の3つのファミリーに分類されており、それぞれのファミリー間に配列相同性は無い (Gozu et al., 2016; Larsson et al., 2003; Suzuki et al., 2012)。エキソ型のデキストラナーゼとしては GH13 のデキストラングルコシダーゼ (Hondoh et al., 2008) と GH15 と GH97 のグルコデキストラナーゼ (グルカン 1,6- α -グルコシダーゼ, EC3.2.1.70) (Li et al., 2016; Oguma et al., 1996)、GH27 のイソマルトデキストラナーゼ (グルカン 1,6- α -イソマルトシダーゼ, EC3.2.1.94) (Torii et al., 1946)、GH49 のデキストラン 1,6- α -イソマルトトリオシダーゼ (EC3.2.1.95) (Mizuno et al., 1999) があり、デキストランの非還元末端に作用してグルコース、イソマルトース (IG2)、イソマルトトリオース (IG3) (IGn、重合度 n のイソマルトオリゴ糖) を生成する (表 1-1)。多分岐デキストランの分岐を加水分解する酵素は *Microbacterium dextranolyticum* (Yokota et al., 1993) (以前は *Flavobacterium* sp. M-73) 由来の dextran α -1,2-debranching enzyme (MdDDE, EC 3.2.1.115) と α -1,3 highly branched dextran hydrolase のみが知られている (Kobayashi et al., 1978; Mitsuishi et al., 1979; Mitsuishi et al., 1980; Mitsuishi et al., 1984; 小林ら, 2004)。既報のデキストラン分解酵素は主鎖の α -(1 \rightarrow 6)-結合を加水分解するものが多く、多分岐デキストランの分解に関わる酵素の構造や機能の知見は非常に少ない。自然界には多様な分岐を有するデキストランが存在するにも関わらず、これらの多分岐デキストランが生物によっていかに分解され、代謝されているかは明らかになっていない。

表 1-1. デキストラン分解酵素

酵素名 (EC 番号)	エンド型/エキソ型	CAZy	反応機構	参考文献
デキストラナーゼ (3.2.1.11)	エンド型	GH31	アノマー保持型	Gozu et al., 2016
		GH49	アノマー反転型	Larsson et al., 2003
		GH66	アノマー保持型	Suzuki et al., 2012
デキストラングルコシダーゼ (3.2.1.-)	エキソ型	GH13	アノマー保持型	Hondoh et al., 2008
グルコデキストラナーゼ (3.2.1.70)	エキソ型	GH15	アノマー反転型	Oguma et al., 1996
		GH97		Li et al., 2016
イソマルトデキストラナーゼ (3.2.1.94)	エキソ型	GH27	アノマー保持型	Torii et al., 1946
デキストラン 1,6- α -イソマルトトリオシダーゼ (3.2.1.95)	エキソ型	GH49	アノマー反転型	Mizuno et al., 1999
Dextran α -1,2-debranching enzyme (3.2.1.115)	エキソ型	GH65	アノマー反転型	Kobayashi et al., 1978

Flavobacterium johnsoniae は好気性グラム陰性土壌細菌で、1947年にイギリスの土壌から単離された (Stanier, 1947)。*F. johnsoniae* は Bacteroidota 門に属し、キチンを含む様々な多糖類や、カゼインやゼラチンのようなタンパク質を分解することができることが報告されている (Stanier, 1947)。*F. johnsoniae* は 2009年にゲノムが解読され、約 250 種類の推定糖質関連酵素 (GH, 糖転移酵素, 多糖リアーゼ, 糖質エステラーゼ) と約 40 種類の PUL を有することが分かった (McBride et al., 2009)。2016年に *F. johnsoniae* ゲノムから GH31 で初めてのエンドデキストラナーゼ (FjDex31A) が見出され、その後、立体構造も解明された (Gozu et al., 2016; Tsutsumi et al., 2020)。FjDex31A 遺伝子近傍には推定転写調節因子 (FjDusR)、推定糖トランスポーター (FjDusC)、推定糖結合タンパク質 (FjDusD, FjDusE)、3 種類の推定 GH (FjGH65A, FjGH97A, FjGH66) が存在することからこの遺伝子群が菌体外多糖であるデキストランを資化する PUL (FjDexUL) であると考えられた (図 1-5)。本研究では FjDexUL に着目し、各遺伝子産物について分子生物学、生化学、構造生物学的解析を行い、*F. johnsoniae* が菌体外多糖を資化するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

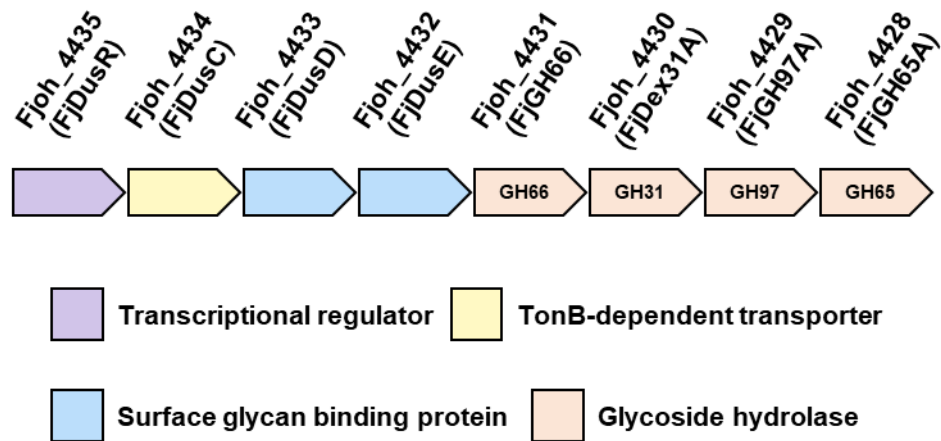


図 1-5. *F. johnsoniae* の推定デキストラン資化遺伝子群

転写制御因子を紫色、TonB 依存性トランスポーターを黄色、糖結合タンパク質を青色、GH をオレンジ色で示した。

第2章 *F. johnsoniae* 由来 GH65 α -1,2-グルコシダーゼの構造機能解析

2.1. 緒言

本章では FjDexUL に存在する GH65 酵素 (FjGH65A) に着目した。GH65 は、オリゴ糖や多糖の α -グルコシド結合に作用する GH と糖質加リン酸分解酵素 (GP) から構成されている。GP は多糖やオリゴ糖のグリコシド結合を可逆的に加リン酸分解して糖 1-リン酸を生成する酵素である (Kitaoka and Hayashi, 2002)。GP は α -グルコース 1-リン酸などの糖 1-リン酸とアクセプター基質から逆反応を利用することでオリゴ糖合成をすることが可能である (Nakai et al., 2010; Sawangwan et al., 2009)。この GP の逆反応は、非常に厳密な位置選択性を有しており、オリゴ糖の選択的合成を可能としている。また、2つの GP を組み合わせて反応させることにより高価な糖 1-リン酸を調製することなく豊富な天然の糖質から直接オリゴ糖合成することが可能になっている (Ohdan et al., 2007; Suzuki et al., 2009)。このように GP は製造可能なオリゴ糖のバリエーションを広げることができるため注目されている。GP は GH3、GH13、GH65、GH94、GH112、GH130、GH149、GH161 などの GH ファミリーに存在する。このうち GH65 (Kitaoka, 2015)、GH94 (Park et al., 2000)、GH112 (Hidaka et al., 2009)、GH130 (Kawahara et al., 2012; Senoura et al., 2011)、GH149 (Kuhadomlarp et al., 2018)、GH161 (Kuhadomlarp et al., 2019) は様々な基質に対して活性を示すアノマー反転型 GP に分類されており、GH65 以外のアノマー反転型 GP は β -グリコシド結合に対して活性を示す。

全ての GH65 GP は細菌から報告されており、加リン酸分解を触媒する。GH65 GP の反応機構は、一般酸/塩基触媒残基によるアノマー反転型の加水分解機構に類似している (図 2-1)。GH65 GP ではトレハロース (Eis and Nidetzky, 1999; Saito et al., 1998)、コージビオース (Chaen et al., 1999; Yamamoto et al., 2006; Yamamoto et al., 2011)、ニゲロース (Nihira et al., 2012^a; Nihira et al., 2014^a)、マルトース (Ehrmann and Vogel, 1998; Fitting and Doudoroff, 1952) に対して活性を示すことが報告されており、 β -グルコース 1-リン酸とグルコースを生成する。その他、トレハロース-6-リン酸ホスホリラーゼ (Andersson et al., 2001)、3-*O*- α -D-グルコピラノシル-L-ラムノースホスホリラーゼ (Nihira et al., 2012^b)、2-*O*-グルコピラノシルグリセロールホスホリラーゼ (Nihira et al., 2014^b)、 α -1,3-オリゴ-D-グルカンホス

ホリラーゼ (Nihira et al., 2014^a) などが知られている。いくつかの GH65 GP の立体構造は決定されており、N 末端の β -サンドイッチドメイン、リンカー領域、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造の触媒ドメイン、C 末端の β -シートドメインの 4 つの領域から構成されている (Nakai et al., 2013)。これらの構造から、GH65 GP のリン酸結合に必須な 2 つの連続したセリン残基と一般酸触媒残基が同定された (Egloff et al., 2001; Okada et al., 2014) (図 2-2)。一方、GH65 GH は真核生物でしか見つかっておらず、これまでに 2 種類の酵素しか報告されていない。真菌由来のトレハララーゼは酸性条件下で活性を示すが、その詳細な基質特異性や生理機能については明らかになっていない (Destruelle et al., 1995; Liu et al., 2007)。Protein α -glucosyl-1,2- β -galactosyl-L-hydroxylysine α -glucosidase (PGGHG) は、約 40 年前に *Homo sapiens* と *Gallus gallus* で見出された。PGGHG はコラーゲンのヒドロキシリジン残基に結合した 2 糖単位 (Glc- α -(1 \rightarrow 2)-Gal) からグルコースを遊離する。これらの酵素は 2-O- α -D-glucopyranosyl-O- β -D-galactopyranosylhydroxylysine と IV 型のコラーゲンに対して高い活性を示した (Hamazaki and Hotta, 1979)。PGGHG の遺伝子は最近同定され、GH65 ファミリーのメンバーとして分類されることが分かった (Hamazaki and Hamazaki, 2016)。しかし、GH65 GH の立体構造は報告されておらず、その反応機構は不明である。

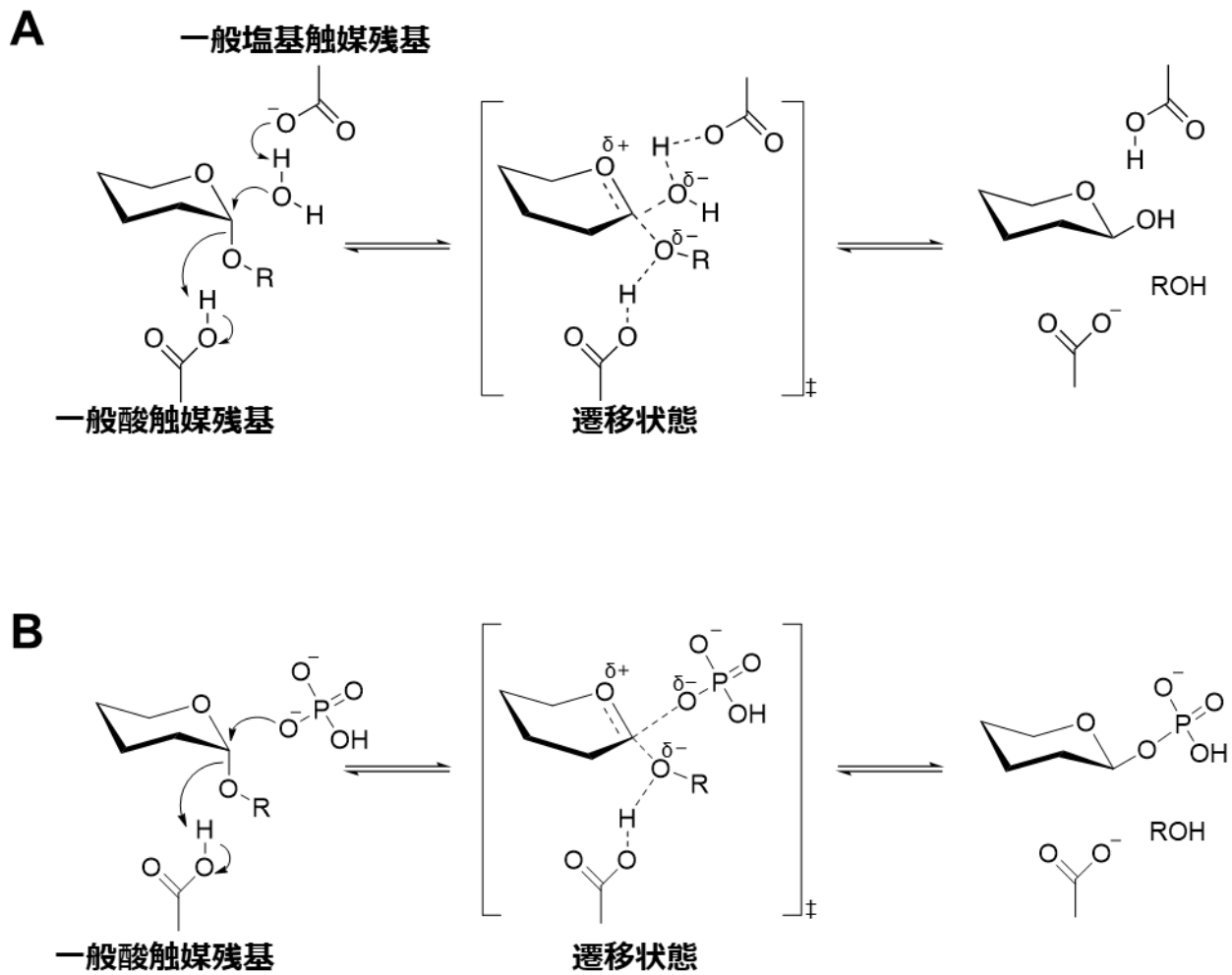


図 2-1. アノマー反転型の糖質加水分解酵素と糖質加リン酸分解酵素の反応機構
 (A) アノマー反転型加水分解酵素の反応機構。一般酸触媒残基と一般塩基触媒残基による 1 段階の反応。(B) アノマー反転型ホスホリラーゼの反応機構。一般酸触媒残基と無機リン酸による 1 段階の反応。

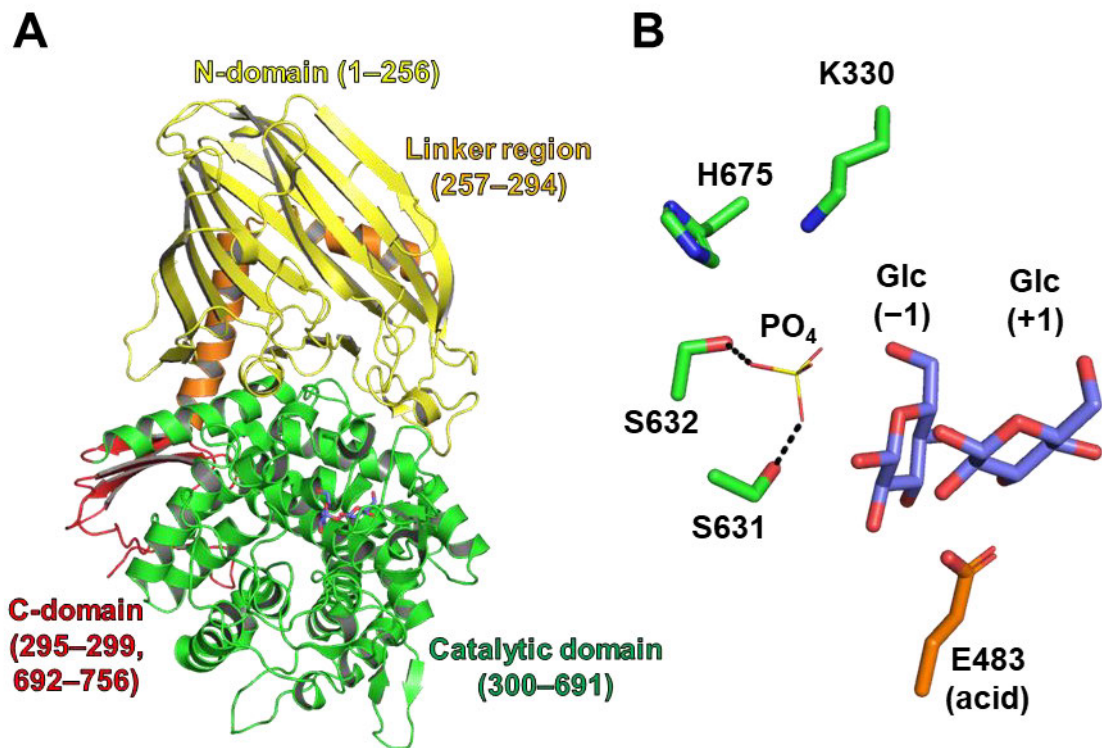


図 2-2. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 由来のコージビオースホスホリラーゼ (CsKP) の立体構造

(A) CsKP の全体構造。緑色が触媒ドメイン、黄色が N ドメイン、オレンジ色が Linker 領域、赤色が C ドメインを示す。(B) CsKP のリン酸結合部位のスティックモデル。黄色がリン酸、緑色が周辺のアミノ酸残基、オレンジ色が一般酸触媒残基、藍色がグルコースを示す。

F. johnsoniae のゲノムには Fjoh_4428 (FjGH65A)、Fjoh_1401、Fjoh_2641 の 3 種類 GH65 タンパク質が存在する。Fjoh_2641 は Fjoh_4428 と 88% のアミノ酸配列相同性を有しているが、Fjoh_2641 の N 末端側のアミノ酸残基が Fjoh_4428 よりも 273 残基短くなっていた (図 2-3)。そのため、Fjoh_2641 はタンパク質として機能を果たせなくなった偽遺伝子と示唆された。これらの 3 種類のタンパク質と既報の GH65 酵素と比較すると Fjoh_1401 は *Levilactobacillus brevis* 由来のマルトースホスホリラーゼ (LbMP) と 47% のアミノ酸配列の相同性を示した。FjGH65A は既報の細菌由来 GH65 酵素と最大 28% (*Thermoanaerobacter brockii* 由来のコージビオースホスホリラーゼに対して) の相同性であった。また、既報の GH65 酵素と Fjoh_1401、Fjoh_2641 (偽遺伝子)、FjGH65A のアミノ酸配列を用いて分子系統樹を作成したところ FjGH65A は GP のクラスターや GH のクラスターとは異なるクラスターに位置していた (図 2-4)。そのため、FjGH65A は新規な基質特異性を有する GH65 酵素ではないかと予想された。本章では FjGH65A の構造と機能の解明を目的とした。

```

Fjoh_4428 1 MLCGSNYLYGQDPWKLSDPKPSNNYGETVANGMIGIISPEPLKVKEVVLGTYDIYKRGRVSSFIPNYNLLNMKLAFNGESVQTYNI
Fjoh_2641 .....

Fjoh_4428 91 NNYKQELDMRNGAFTGSFQPKDLATVYYSYALRHLPCHIMMVVNINTQRDTEINVENLLETFPSSLNQQNYFQNIITNTHVNIPLLSVA
Fjoh_2641 .....

Fjoh_4428 181 FTPTGRSKIIVNSNTFLFDEGKKLQPEILHRMNDADMHAMSFDDKKIKAGKTYSFALIGSLISSDHINDPYNEAERLIYAALEGKSRLLNR
Fjoh_2641 .....

273番目
↓
Fjoh_4428 271 HMQEWNNSLWQSDIQVEGDPQAQDDRSMLYHLYSFTRKSTLSLSPSPMGLSGLGYNGHVFDTEIWMFPPMLLLHPEIAKSMIEYRQRLD
Fjoh_2641 1 ...MRNSLWQSDIQVEGDPQAQDDRSMLYHLYSFTRKSTLSLSPSPMGLSGLGYNGHVFDTEIWMFPPMLLLHPEIAKSMIEYRQRLD

Fjoh_4428 361 AARKKAAIYCYDGAMPWESADSGAETTPVNALTGAFEHHTGDVAIAAWQYYLVTGDKEWLKEKGGWPIKATAEFWASRVKNDKGEYE
Fjoh_2641 88 AARKKAAIYCYDGAMPWESADSGAETTPVNALTGAFEHHTGDVAIAAWQYYLVTGDKEWLKEKGGWPIKATAEFWASRVKNDKGEYE

Fjoh_4428 451 IKNVVADEWAENIDNNAYTNGAIRNLQYASKCAVLGVAPKEWLIADKILISKMSNGVTRHDSYTDQNKQADANLLAYPLKLIIT
Fjoh_2641 178 IKNVVADEWAENIDNNAYTNGAIRNLQYASKCAVLGVAPKEWLIADKILISKMSNGVTRHDSYTDQNKQADANLLAYPLKLIIT

Fjoh_4428 541 DKQIERDLKYYETKIPQSDTPAMTQAIFSLYSRLGSDQAYHWFKDAYPNLNPPFRVIAECKGGENPYEATGAGGVLOAVMFGGGL
Fjoh_2641 268 DRNQIERDLKYYETKIPHSSTPAMTQAIFSLYSRLGSDQAYHWFKDAYPNLNPPFRVIAECKGGENPYEATGAGGVLOAVMFGGGL

Fjoh_4428 631 DIDAAGGKIQVKSFLPKNKKLTIKCGEKKTFVLIH
Fjoh_2641 358 DIDGGGKIQVKSFLPKNKKLTIKCGEKKTFIKTQ

```

図 2-3. Fjoh_4428 と Fjoh_2641 の比較

Fjoh_4428 と Fjoh_2641 のアミノ酸配列を Clustal Omega を用いてアラインメントを作成し、ESPrift 3.0 を用いて作図した。273 番目のアミノ酸残基を赤矢印で示した。

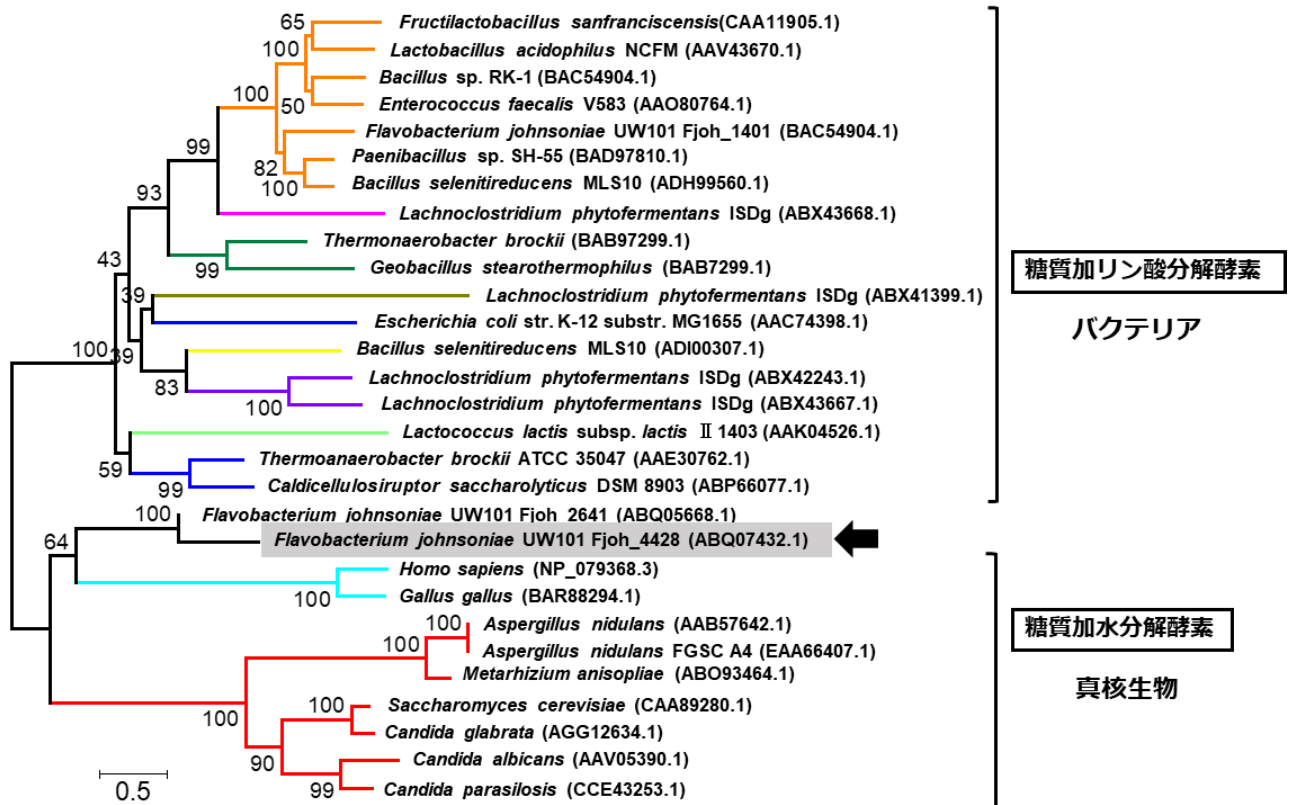


図 2-4. FjGH65A と GH65 タンパク質の分子系統樹

FjGH65A と GH65 タンパク質の分子系統樹。黒矢印は FjGH65A を示す。オレンジ色はマルトースホスホリラーゼ、ピンク色は α -1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ、緑色はトレハロースホスホリラーゼ、茶色は 3-O- α -グルコピラノシル-L-ラムノースホスホリラーゼ、黄色は 2-O-グルコピラノシルグリセロールホスホリラーゼ、紫色はニゲロースホスホリラーゼ、黄緑色はトレハロース-6-リン酸ホスホリラーゼ、青色はコージビオースホスホリラーゼ、水色は protein α -glucosyl-1,2- β -galactosyl-L-hydroxylysine α -glucosidase、赤色はトレハラーゼを示す。各酵素の GenBank ID はそれぞれの学名の後ろに示した。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 試薬類

試薬類は特に断りが無い限り富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。コージビオースは Carbosynth (Compton, Berkshire, UK) から購入し、イソマルトースと β -D-グルコピラノース 1-りん酸二ナトリウム (β -G1P) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。コージトリオース、コージテトラオース、コージペンタオース、6-O- α -kajibiosylglucose、(G2G6G)、6-O- α -kijitriosylglucose (G2G2G6G) は新潟大学の中井博之准教授と新潟工科大学の仁平高則准教授に合成していただいた。 α -D-Glucopyranosyl fluoride (α -GlcF) はメタノールに溶解した 100 mM の 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl Fluoride (Merck Millipore, Massachusetts, USA) を 5 M のナトリウムメトキシド (メタノール溶液) と室温で 30 分間反応させアセチル基を脱保護し、遠心エバポレーター (CVE-2000, EYELA, Tokyo, Japan) によりメタノールを蒸発させた。脱保護の確認は薄層クロマトグラフィー (TLC) により行った (図 2-10)。

2.2.2. 多分岐デキストランの調製

B-1299 α -グルカンと B-1355 α -グルカンは元 実践女子大学の小林幹彦教授から御恵与いただいた。また、*L. citreum* S-32 株と S-64 株から多分岐デキストラン (S-32 α -グルカンと S-64 α -グルカン) を調製した (Funane et al., 2003)。*L. citreum* S-32 株と S-64 株は山梨大学の舟根和美教授から分譲していただいた。*L. citreum* S-32 株と S-64 株の凍結乾燥菌体を表 2-1 に示す固体培地に穿刺培養し、30°Cで24時間培養した。増殖した菌体を表 2-1 に示す 20 mL (100 mL の三角フラスコ) 液体培地に植菌し、24時間培養した。その前培養液 2 mL を表 2-2 に示す 250 mL (500 mL の三角フラスコ) の液体培地に植菌し、24時間培養した。その培養上清を遠心分離 (5000×g, 4°C, 15 min) により回収した。培養上清に等量のエタノールを加えて転倒混和し、多分岐デキストランを沈殿させた。遠心分離 (5000×g, 4°C, 15 min) を行い、上清を捨てた。沈殿に超純水を加え、その懸濁液に等量のエタノールを加えて、遠心分離 (5000×g, 4°C, 15 min) した。同様の操作を2回繰り返した。最後に超純水で沈殿を洗浄し、遠心分離 (5000×g, 4°C, 15 min) を行い、上清を除いた。沈殿は凍結乾燥機 (FDU-1100, EYELA, Tokyo, Japan) で乾燥させて、以降の実験で使用した。培地 250 mL あたり約 1.5 g の多分岐デキストランが得られた。

表 2-1. *L. citreum* S-32 株と S-64 株培養用培地
培地の組成 (100 mL)

スクロース	2 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
ポリペプトン	250 mg
酵母エキス	500 mg
Stock solution I*	1 mL
寒天粉末 (固体培地の場合のみ)	1.5 g
pH 7.4	

* Stock solution I は 0.1% NaCl、2.0% MgSO₄ · 7H₂O、0.1% FeSO₄ · 7H₂O、0.1% MnCl₂ · 4H₂O の混合溶液。

培地はオートクレーブ滅菌 (121°C, 15min) して使用した。

表 2-2. 多分岐デキストラン生産培地

培地の組成 (100 mL)

スクロース	2 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
ポリペプトン	250 mg
酵母エキス	500 mg
Stock solution II*	1 mL

pH 7.4

* Stock solution II は 0.5% CaCl₂ · 2H₂O、0.1% NaCl、0.1% MgSO₄ · 7H₂O、0.1% MnCl₂ · 4H₂O の混合溶液。

全ての培地成分をオートクレーブ滅菌 (121°C, 15min) して使用した。

2.2.3. 大腸菌での異種発現および精製

FjGH65A の遺伝子は (Genbank ID, ABQ07432.1) は研究当初、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Peterson et al., 2011) によって N 末端に疎水性アミノ酸残基を含むものの、シグナル配列を持たないと予測された。本研究では、FjGH65A 遺伝子の 39 bp 上流に別の開始コドン候補を発見した (図 2-5)。その翻訳産物は RefSeq データベースで見つかった配列 (WP_044048041.1) と一致し、23 アミノ酸残基のシグナル配列 (Met1-Ser23) を有すると予測された。アミノ酸残基の番号は本論文では WP_044048041.1 に従っている。

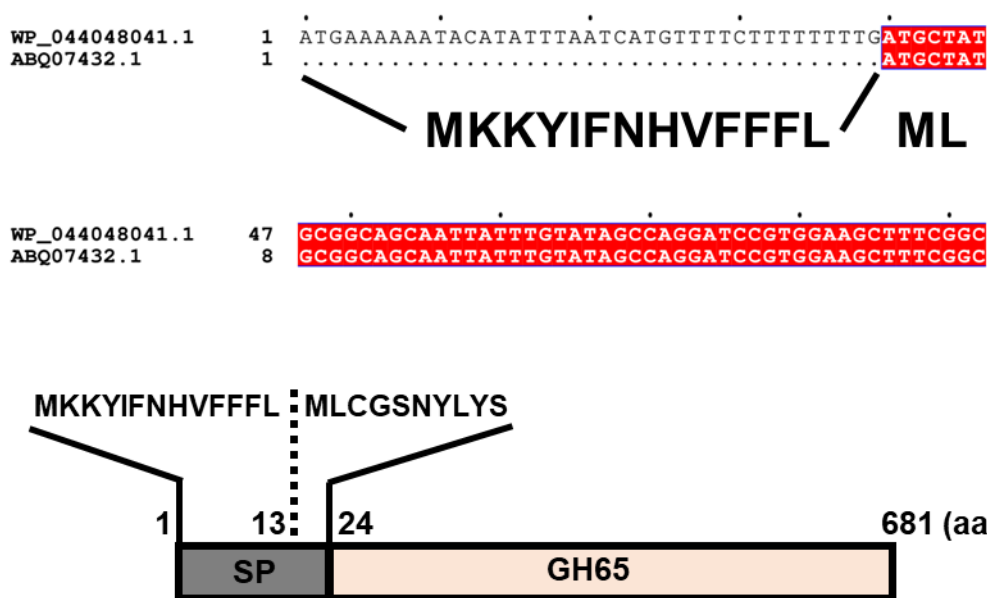


図 2-5 FjGH65A のシグナル配列の予測

データベースに登録されている FjGH65A 遺伝子 (WP_044048041.1 と ABQ07432.1) を Clustal Omega を用いてアラインメントを作成し、ESPrnt 3.0 を用いて作図した。予測されたシグナル配列のアミノ酸残基を一文字表記で示した。

F. johnsoniae NBRC 14942 (ATCC 17061, UW101) は表 2-3 に示す固体培地にて 30°C で 48 時間培養し、シングルコロニーを獲得した。FjGH65A の配列 (Genbank ID, ABQ07432.1) を参考にプライマー (FjGH65A Δ 13-NheI-F, FjGH65A-XhoI-R, 表 2-4) を用いて、*F. johnsoniae* から KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan) によるコロニーダイレクト PCR により増幅した。PCR の反応溶液の組成は表 2-5 に記載した。反応溶液を 94°C で処理し、[98°C を 10 秒、54°C を 10 秒、68°C を 7 分] を

30 サイクル行った。増幅した DNA を *NheI* と *XhoI* で処理し、pET28a(+) (Merck Millipore, Massachusetts, USA) に挿入したプラスミド pET28a-FjGH65A Δ 13 を作製した。シグナル配列 (Met1-Ser23) を除いた FjGH65A の配列を pET28a-FjGH65A Δ 13 を鋳型にしてプライマー (FjGH65A-F, FjGH65A-R, 表 2-4) を用いて KOD FX Neo によるインバース PCR により増幅した (表 2-5)。増幅した DNA を用いて、プラスミド pET28a-FjGH65A を構築した。触媒残基変異体は pET28a-FjGH65A を鋳型として、プライマー (E472Q-F, E472Q-R, E616Q-F, E616Q-R, 表 2-4) を用いて同様にインバース PCR により増幅した。これらのプラスミドを用いて、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。得られたシングルコロニーを 50 μ g/mL カナマイシン (Merck Millipore, Massachusetts, USA) を添加した 10 mL (100 mL の三角フラスコ) の Luria Bertani (LB: 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 培地に植菌し、37°C、24 時間、120 rpm でバイオシェーカー BR-53FP (Taitec, Saitama, Japan) を用いて前培養を行った。10 mL の前培養液を 1 L (3 L のバッフル付き三角フラスコ) の LB 培地に加え、OD₆₀₀ が 0.6–0.8 になるまで 37°C、120 rpm で培養し、終濃度 0.1 mM になるように isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Merck Millipore, Massachusetts, USA) を加え、20°C、24 時間、120 rpm で発現誘導を行った。誘導後の培養液を 500 mL 分ずつ集菌し、上清を捨て、30 mL の 300 mM NaCl、20 mM imidazole を含む 20 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-HCl バッファー (pH 7.5) を加え、15 分間の超音波破碎を行った。遠心分離 (20640 \times g, 4°C, 30 min) して上清を移した。オープンカラムに 5 mL の Ni-Sepharose excel (GE Healthcare, Chicago, America) を加え、50 mL の超純水を加え洗浄した。20 mL の 300 mM NaCl、20 mM imidazole を含む 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) を加えてカラムの平衡化を行った。そこに FjGH65A の発現誘導を行った大腸菌の可溶性画分をカラムに加えた。吸着後、平衡化に用いたバッファーを加え、280 nm における吸光度が 0.01 以下になるまで洗浄を行った。洗浄後、20 mL の 300 mM NaCl、100–500 mM imidazole を含む 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) を加えて素通り画分を回収した。精製後、10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色で精製の確認を行った。また、250 mM imidazole 溶出画分を Amicon ultra 30,000 (Merck Millipore, Massachusetts, USA) を用いた限外濾過によって 150 mM NaCl を含む 20 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) に置換した。置換した FjGH65A を HiPrep

16/60 Sephactyl S-200 HR (GE Healthcare, Chicago, America) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。溶出バッファーには 150 mM NaCl を含む 20 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) を使用した。ゲル濾過クロマトグラフィーは ÄKTAexplorer システム(GE Healthcare, Chicago, America) を使用して行い、標準物質として Thyroglobulin (669 kDa)、Ferritin, (440 kDa)、Aldolase (158 kDa)、Conalbumin (75 kDa)、Ovalbumin (44 kDa) を用いた。マーカーは ExcelBand All Blue Broad Range Plus Protein Marker (SMOBIO, Hsinchu, Taiwan) を使用した。酵素濃度は ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) を用いて計算したモル吸光係数 (FjGH65A, $18640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に基づき 280 nm での吸光度を NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で測定することで算出した。

表 2-3. *F. johnsoniae* 培養用培地

培地の組成 (100 mL)

ポリペプトン	1 g
酵母エキス	1.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
寒天粉末	1.5 g
pH 7.0	

全ての培地成分をオートクレーブ滅菌 (121°C, 15min) して使用した。

表 2-4. 使用したプライマー

	Sequence (5'→3')
FjGH65AΔ13-NheI-F	TTTGCTAGCCTATGCGGCAGCAATTATTTG
FjGH65A-XhoI-R	TTTTCTCGAGTTAATGAGTTAGTACAAAAGTC
FjGH65A-F	GCAGCCATCAGGATCCGTGGAAGCTT
FjGH65A-R	GATCCTGATGGCTGCCGCGCGGCAC
E472Q-F	TCGTTGCAGCAGATCAATGGGCTGAAAATA
E472Q-R	TATTTTCAGCCCATTTGATCTGCTGCAACGA
E616Q-F	TCAGGGTCATTTCACAATGCAAGGGAGGGA
E616Q-R	TCCCTCCCTTGCAATTTGATGAAATGACCCTGA

制限酵素認識部位は下線で示した。

変異導入したアミノ酸のコドンは四角で囲んだ。

表 2-5. PCR 反応液の組成

試薬	液量	終濃度
2× PCR Buffer for KOD FX Neo	10 μL	1×
2 mM dNTPs	10 μL	0.4 mM
10 μM Forward Primer	0.6 μL	0.3 μM
10 μM Reverse Primer	0.6 μL	0.3 μM
テンプレート	コロニー	
	プラスミド DNA X μL	プラスミド DNA 約 20 ng/20 μL
KOD FX Neo	0.4 μL	1U/20 μL
滅菌水	20-X μL	Up to 20 μL
計	20 μL	

X μL は酵素反応に使用するプラスミド DNA の濃度によって異なる。

2.2.4. 酵素反応

基質として α -グルコ 2 糖を用いた場合、FjGH65A の加水分解活性は、以下の反応条件で TLC によって分析した。10 mM の基質 (トレハロース, コージビオース, ニゲロース, マルトース, イソマルトース) と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の FjGH65A を 30°C で 10 分間反応させた。反応溶液の組成を表 2-6 に示した。反応液と標準物質 (グルコース, マルトオリゴ糖, β -G1P) を TLC アルミシート シリカゲル 60 F254 に 1.5 μL スポットし、1-ブタノール : エタノール : 水 = 5 : 5 : 2 の展開溶媒で展開した。そのプレートをドライヤーで乾燥させた後、5% (v/v) の硫酸を含むメタノール溶液を噴霧した後、ホットプレート (Corning, Tokyo, Japan) を使用し、加熱することで検出した。

表 2-6. TLC 用の酵素反応の組成

試薬	液量	終濃度
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FjGH65A	2 μL	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
100 mM オリゴ糖	2 μL	10 mM
100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5)	2 μL	10 mM
超純水	14 μL	
計	20 μL	

トレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、コージトリオース、コージテトラオース、コージペンタオース、デキストラン 40,000、デキストラン 200,000、B-1299 α -グルカン、B-1355 α -グルカン、S-32 α -グルカン、S-64 α -グルカン、可溶性澱粉に対する FjGH65A の比活性を算出するために、グルコース C-II テストキット (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて、グルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ法 (GOD-POD 法) により遊離グルコースを定量した。GOD-POD 法の反応条件を以下に記載した。また、以降の実験でも同様の手法で行った。酵素反応溶液 50 μL に発色試薬 (ムタロターゼ, グルコースオキシダーゼ, ペルオキシダーゼ, 4-アミノアンチピリン, フェノール, アスコルビン酸オキシダーゼ) を 100 μL 加え、37°C で 15 分間反応させた。グルコースオキシダーゼによってグルコースが酸化されると同時に生じる過酸化水素、4-アミノアンチピリン、フェノールがペルオキシダーゼの作用によって

酸化縮合し、赤色色素を生成する。この赤色色素を 505 nm の波長で測定することで反応溶液中のグルコース濃度を算出した。酵素反応は、100 µg/mL (コージビオースを除く α-グルコ 2 糖)、1 µg/mL (コージビオース)、50 µg/mL (その他の基質) の FjGH65A、1 mM オリゴ糖または 1% (w/v) 各種多糖、50 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) を含む 50 µL の反応混合液を 30°C でインキュベートした。反応溶液の組成は表 2-7 に示した。30 分間インキュベートした後、5 分間煮沸して反応を停止させた。ニゲロースは中性条件下で熱処理すると β-脱離反応が起こる可能性があるため (Chiku et al., 2020)、ニゲロースを基質として用いた場合は酵素反応溶液の 2 倍量の 0.5 M Na₂CO₃ を加えて反応を停止させた。

表 2-7. 酵素反応の組成

試薬	液量	終濃度
1 mg/mL FjGH65A (コージビオースを除く α-グルコ 2 糖)	5 µL	100 µg/mL
10 µg/mL FjGH65A (コージビオース)		1 µg/mL
500 µg/mL FjGH65A (その他の基質)		50 µg/mL
10 mM オリゴ糖または 10% (w/v) 多糖	5 µL	1 mM または 1% (w/v)
100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5)	25 µL	50 mM
超純水	15 µL	
計	50 µL	

pH による影響を明らかにするために、1 µg/mL の FjGH65A を含む McIlvaine バッファー (pH 3.0–8.0) 中、30°C で 10 分間、1 mM のコージビオースを用いて酵素反応を行った。また、温度による影響を明らかにするために、10 µg/mL の FjGH65A を含む 50 mM のクエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 中で、1 mM コージビオースを基質として、25–70°C で 10 分間酵素反応を行った。pH 安定性を測定するために、5 µL の 9 mg/mL の FjGH65A と 45 µL の 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 3.5–6.0)、100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0–9.0)、100 mM グリシン-NaOH バッファー (pH 9.0–11.0) を混合し、4°C で 17 時間インキュベートした。インキュベーション後、FjGH65A の濃度を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) で 10 µg/mL に希釈した。温度安定性を測定するために、100 µg/mL の FjGH65A を、150 mM NaCl を含む 20 mM クエン

酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) 中、4–60°Cで 30 分間インキュベートした。残存活性は、1 µg/mL の FjGH65A、1 mM のコージビオース、および 50 mM のクエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) を含む 50 µL の混合溶液中で、30°Cで 10 分間反応した。全ての反応は、反応溶液を 5 分間煮沸して停止させた。生成グルコース量を GOD-POD 法で定量した。酵素反応溶液の組成は表 2-8 に示した。

表 2-8. 酵素反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
10 µg/mL FjGH65A	5 µL	1 µg/mL
10 mM コージビオース	5 µL	1 mM
Mcllvaine バッファー (pH3.0–8.0) (至適 pH)	25 µL	
100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH5.5) (至適温度, pH 安定性, 温度安定性)		50 mM
超純水	15 µL	
計	50 µL	

2.2.5. 反応速度論パラメータの算出

FjGH65A のコージオリゴ糖、G2G6G、G2G2G6G に対する反応速度論パラメータは 50 mM クエン酸ナトリウムバッファ (pH 5.5) を用い、少なくとも 4 つの濃度の基質 (0.1–2 mM コージビオース, 0.1–2 mM コージトリオース, 0.2–3 mM コージテトラオース, 0.2–5 mM コージペンタオース, 0.2–2 mM G2G6G, 0.2–5 mM G2G2G6G) の条件で行った。使用した FjGH65A の濃度は、コージビオース、コージトリオース、コージテトラオース、G2G6G に対しては 1 µg/mL (13 nM)、コージペンタオース、G2G2G6G に対しては 10 µg/mL (130 nM) であった。反応は 30°C で 2 分間行い、反応停止は 100°C で 5 分間行った。遊離したグルコースの量は、グルコース C-II テストキットを用いて GOD-POD 法により定量した。各酵素反応を 3 回行った。反応速度論パラメータは、KaleidaGraph (Synergy Software) を用いた非線形回帰分析により算出した。反応溶液の組成は表 2-9 に示した。

表 2-9. 酵素反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
10 µg/mL または 100 µg/mL FjGH65A	5 µL	1 µg/mL または 10 µg/mL
10 mM コージビオース、コージトリオース、 コージテトラオース、コージペンタオース、 G2G6G、G2G2G6G	X µL	0.1–5 mM
100 mM クエン酸ナトリウムバッファ (pH 5.5)	25 µL	50 mM
超純水	50–X µL	Up to 50 µL
計	50 µL	

X µL は酵素反応に使用する基質濃度によって異なる。

2.2.6. 反応産物のアノマー分析

コージビオースと α -GlcF の加水分解生成物のアノマーは順相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。酵素反応は、30°Cで 100 mM の各基質と 100 μ g/mL の FjGH65A を含む 50 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 中で行った。反応溶液の組成は表 2-10 に示した。反応時間は、基質としてコージビオースを用いた場合、30 秒、1 分、2 分、3 分、4 分、5 分、6 分間行い、基質として α -GlcF を用いた場合、10 分、35 分、60 分、180 分間行った。反応溶液の内 40 μ L を反応終了後直ちに TSK-GEL amide-80 column (4.6 mm \times 250 mm ; Tosoh, Tokyo, Japan) に供し、80% (v/v) アセトニトリルを用いて流速 1.2 mL/min、25°C で溶出した。生成物は示差屈折率検出器 (RID-10A, Shimazu, Kyoto, Japan) を用いて検出した。標準物質である α -グルコース (Merck Millipore, Massachusetts, USA) と β -グルコース (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) は 100 mM に調製し、40 μ L 注入し、同様に測定した。

表 2-10. 酵素反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
1 mg/mL FjGH65A	5 μ L	100 μ g/mL
1 M コージビオースまたは α -GlcF	5 μ L	100 mM
100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5)	25 μ L	50 mM
超純水	15 μ L	
計	50 μ L	

2.2.5. X線結晶構造解析

FjGH65A (30 mg/mL) はハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°Cで結晶化させた。結晶化条件のスクリーニングは Crystal Screen、Crystal Screen 2、PEG/Ion Screen、PEG/Ion 2 Screen キット (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) を用いて行った。タンパク質溶液 1 μ L に 12% (w/v) PEG3350 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA)、0.3 M Ammonium citrate tribasic (pH 7.0)、0.01 M Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) からなるリザーバー溶液を等量混合することで結晶を調製した。抗凍結剤として 20% (v/v) エチレングリコールまたは 30% (w/v) グルコースを含むリザーバー溶液で結晶を保護し、液体窒素中で急速凍結した。また、IG2 との複合体構造の決定のため 10 mM IG2 を含むリザーバー溶液に 1 分間浸した。位相決定のために、結晶を凍結保護の前に 10 mM KAuCl₄ を添加したリザーバー溶液に 20°Cで 16 時間インキュベートした。X線回折強度測定は NW12A ビームラインと BL5A ビームライン (Photon Factory, Tsukuba, Japan) を利用して行った。1 秒間の X線照射を 0.5 度の振動角で行い、得られた 720 枚の回折像から XDS (Kabsch, 2010) を用いて格子定数および空間群を決定した。初期位相の決定は KAuCl₄ にソーキングした単結晶を用いた単波長異常分散法 (SAD 法) により行い、CCP4i (Winn et al., 2011) に搭載されている位相決定プログラム Phaser (McCoy et al., 2007) を用いた。FjGH65A のリガンドフリー構造、グルコースとの複合体構造、IG2 との複合体構造は分子置換プログラム MOLREP (Vagin et al., 2010) を用いて決定した。手動でのモデル構築には COOT (Emsley et al., 2010) により行い、精密化には REFMAC5 (Murshudov et al., 2011) と Translation/Libration/Screw Motion Determination (TLSMD) (Painter et al., 2006) を使用した。立体構造の図は PyMol (<https://pymol.org/2/>, Schrödinger LLC, New York) を用いて作成した。構造類似性の検索は Dali サーバーを用いて行った (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>) (Holm, 2020)。X線回折強度測定に関するパラメータは表 2-11 にまとめた。

表 2-11. FjGH65A の X 線回折強度測定と精密化に関するパラメータ

	KAuCl ₄ derivative	Apo	Glucose complex	IG2 complex
Data collection				
Beamline	PF-AR NW12A	PF-AR NW12A	PF-AR NW12A	PF-BL5A
Wavelength (Å)	1.0402	1.0000	0.9795	1.0000
Space group	C2	C2	C2	C2
Unit cell				
<i>a, b, c, (Å)</i>	121.3, 194.8, 110.4	122.8, 194.0, 111.7	123.5, 194.2, 112.0	123.0, 194.2, 111.9
<i>β</i> (°)	113.5	116.6	116.6	116.3
Resolution range (Å)	50–2.0 (2.11–2.00)	50–1.54 (1.62–1.54)	50–1.40 (1.48–1.40)	48.54–1.56 (1.59–1.56)
Total reflections	1,016,744	2,319,581	3,073,386	2,007,211
Unique reflections	154,913	342,453	451,842	326,516
Completeness (%)	98.2 (96.2)	99.7 (99.4)	98.0 (96.6)	98.2 (97.0)
<i>R</i> _{merge}	0.087 (0.744)	0.050 (0.916)	0.060 (0.755)	0.072 (0.947)
CC _{1/2}	0.999 (0.982)	0.999 (0.846)	0.999 (0.810)	0.999 (0.813)
Mean <i>I</i> / <i>σ</i> (<i>I</i>)	11.6 (1.9)	19.9 (2.3)	15.6 (2.4)	13.2 (2.0)
Redundancy	6.6 (6.4)	6.8 (6.7)	6.8 (6.5)	6.1 (6.0)
Figure of merit	0.260			
Refinement statistics				
Resolution (Å)		1.54	1.40	1.56
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}		0.170/1.192	0.156/0.170	0.187/0.211
No. of atoms				
Protein		15958	15862	15993
Ligand		104	144	189
Water		1452	1668	1414
Mean <i>B</i> factor (Å ²)				
Protein		30.6	26.4	28.8
Ligand		33.4	24.2	34.5
Water		35.4	32.5	33.0
RMSD ^a				
bond lengths (Å)		0.009	0.009	0.0148
bond angles (°)		1.501	1.526	1.974
Ramachandran plot				
Favored (%)		96.7	97.2	96.60
Outliers (%)		0	0	0
Clashscore		1.98	1.7	3.27

^a Root mean square deviation

2.2.6. アラインメントと系統解析

タンパク質のアミノ酸配列は Clustal Omega (Sievers et al., 2011) を用いてアラインメントし、ESPrpt 3.0 (Robert and Gouet, 2014) を用いて作図した。また、系統解析のために、タンパク質のアミノ酸配列を MUSCLE (Edgar, 2004) を用いてアラインメントし、得られたアラインメントを MEGA7 (Kumar et al., 2016) を用いて最尤法により系統樹を作成した。ブートストラップ検定は 1000 回行った。

2.3. 結果

2.3.1. FjGH65A の発現および精製

FjGH65A は単一バンドに精製できた (図 2-6A)。E472Q および E616Q 変異体も同様に精製した (図 2-6B)。また、ExPASy の Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist et al., 1994) を用いて理論分子量を計算すると、76.4 kDa であった。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果から FjGH65A は溶液中での分子量は約 433 kDa であり、このタンパク質は溶液中で 6 量体であることが示唆された (図 2-6C)。組換え FjGH65A は 500 mL の培養液当たり、約 25 mg 得ることができた。

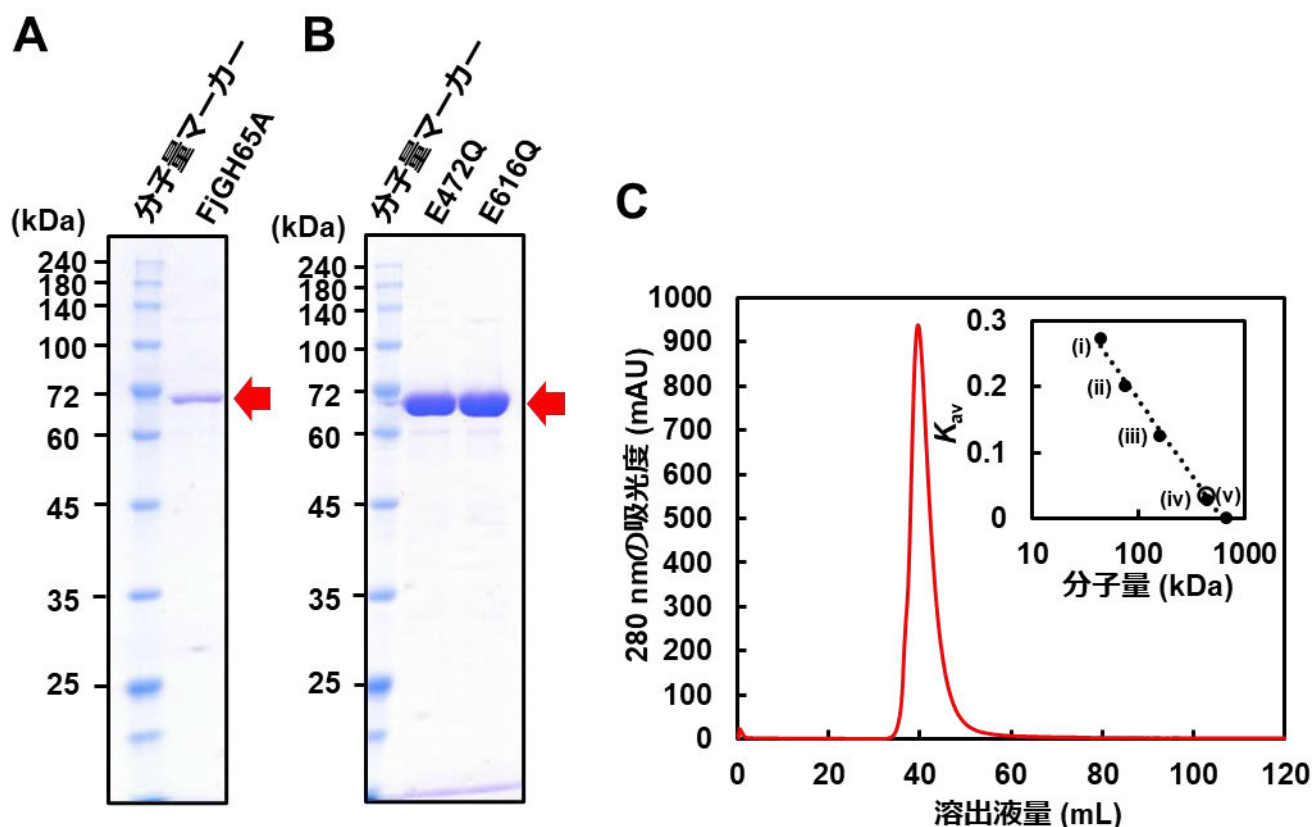


図 2-6. FjGH65A の発現と精製

(A) 精製した FjGH65A の SDS-PAGE 解析。赤矢印は FjGH65A を示す。(B) 精製した FjGH65A 触媒残基変異体の SDS-PAGE 解析。赤矢印は各種変異体を示す。FjGH65A のゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムと FjGH65A の分子重量推定のための検量線。●は標準物質 ((i) Ovalbumin, 44 kDa; (ii) Conalbumin, 75 kDa; (iii) Aldolase, 158 kDa; (iv) Ferritin, 440 kDa; (v) Thyroglobulin, 669 kDa)。○は FjGH65A を示す。

2.3.2. FjGH65A の基質特異性

既知の GH65 酵素は α -グルコシドに対して活性を示すことから、FjGH65A の α -グルコ 2 糖に対する活性を解析した。FjGH65A は無機リン酸の有無にかかわらずコージビオースからグルコースを生成したが、他の α -グルコ 2 糖からはグルコースの生成が確認できなかつた (図 2-7)。また、コージビオースの分解産物に β -G1P のスポットが検出できなかつた。これらの結果は、FjGH65A が GP ではなく、 α -(1 \rightarrow 2)-グルコシド結合に特異的な GH であることを示している。GOD-POD 法を用いて生成グルコース量を定量したところ、FjGH65A のニゲロース (0.063 ± 0.006 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) に対する加水分解活性はコージビオース (32.07 ± 1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) よりも微弱であった。また、他の α -グルコ 2 糖に対する活性は検出されなかつた。さらに、FjGH65A はコージトリオースからコージペンタオースまでのコージオリゴ糖も加水分解し、反応速度論解析の結果、長いコージオリゴ糖の $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 値はコージビオースを基質とした場合よりも低かつた (表 2-12)。FjGH65A は、 α -グルコシダーゼの一般的基質である *p*-nitrophenyl α -glucopyranoside (pNP-Glc) に対しては加水分解活性を示さなかつたが、 α -GlcF に対しては加水分解活性を示した (表 2-12)。FjGH65A の至適 pH は 5.5、至適温度は 40°C であり、pH 4.5–9.0 と 50°C までで残存活性 80% 以上を示した (図 2-8)。

FjGH65A は、 α -(1 \rightarrow 6)-結合の主鎖に α -(1 \rightarrow 2)-結合の分岐を含む B-1299 α -グルカン、S-32 α -グルカン、S-64 α -グルカンに対して、弱いながらも加水分解活性 ($(4.33\pm 0.48)\times 10^{-1}$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, $(3.55\pm 0.70)\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, $(3.19\pm 0.73)\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を示した。対照的に、FjGH65A はデキストラン、 α -(1 \rightarrow 6)-結合と α -(1 \rightarrow 3)-結合で構成された B-1355 α -グルカン、可溶性澱粉をほとんど加水分解しなかつた。また、FjGH65A は G2G6G と G2G2G6G を加水分解し、 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 値はそれぞれコージトリオースとコージテトラオースと同等であったが、わずかに低かつた (表 2-12)。これらの結果から、FjGH65A はオリゴ糖の Glc α -(1 \rightarrow 2)-Glc 部分を特異的に認識し、還元末端の認識は比較的緩やかであることが示唆された。

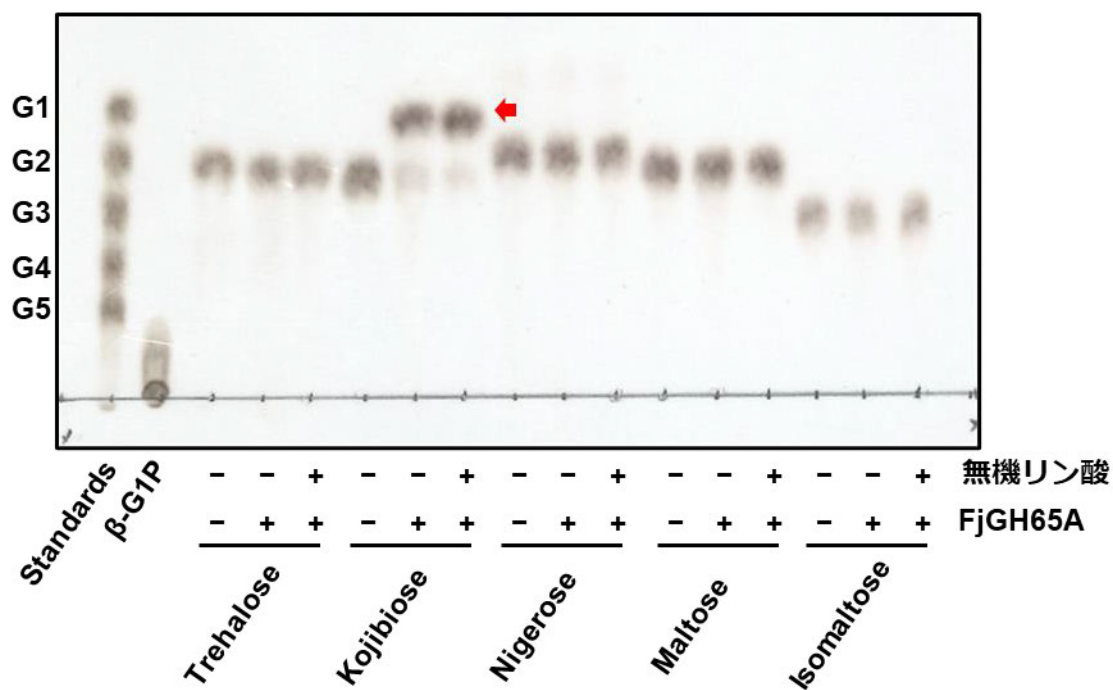


図 2-7. FjGH65A の基質特異性

10 mM の各種 α -グルコ 2 糖を基質として FjGH65A を 30°C で 1 時間作用させた反応溶液を TLC で解析した。赤矢印は生成したグルコースを示す。それぞれの酵素反応溶液、基質混合物、マルトオリゴ糖 (G1, グルコース; G2, マルトース; G3, マルトトリオース; G4, マルトテトラオース; G5, マルトペンタオース)、 β -G1P をスポットし、展開溶媒 (1-ブタノール:エタノール:水=5:5:2) で展開した。

表 2-12. FjGH65A の反応速度論パラメータ

Enzyme	Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	Relative k_{cat}/K_m (%) ^a
FjGH65A	コージビオース	0.28±0.01	108±0.1	399	100
	コージトリオース	0.13±0.01	46.5±0.1	273	68
	コージテトラオース	0.82±0.03	67.5±1.2	94.6	23
	コージペンタオース	0.96±0.10	44.5±1.6	46.3	11
	G2G6G	0.44±0.02	72.8±1.4	212	53
	G2G2G6G	0.83±0.09	59.3±2.2	71.5	18
	α-GlcF	3.1±0.2	56.1±1.8	18.1	4.5
YcjT ^b	コージビオース	1.05	1.1	1.1	
TbKP ^c	コージビオース	0.77	170	220	

^a コージビオースに対する k_{cat}/K_m 値を 100%とした。

^b *Escherichia coli* K-12 由来コージビオースホスホリラーゼ (Mukherjee et al., 2018)

^c *Thermoanaerobium brockii* ATCC 35047 由来コージビオースホスホリラーゼ (Chaen et al., 1999)

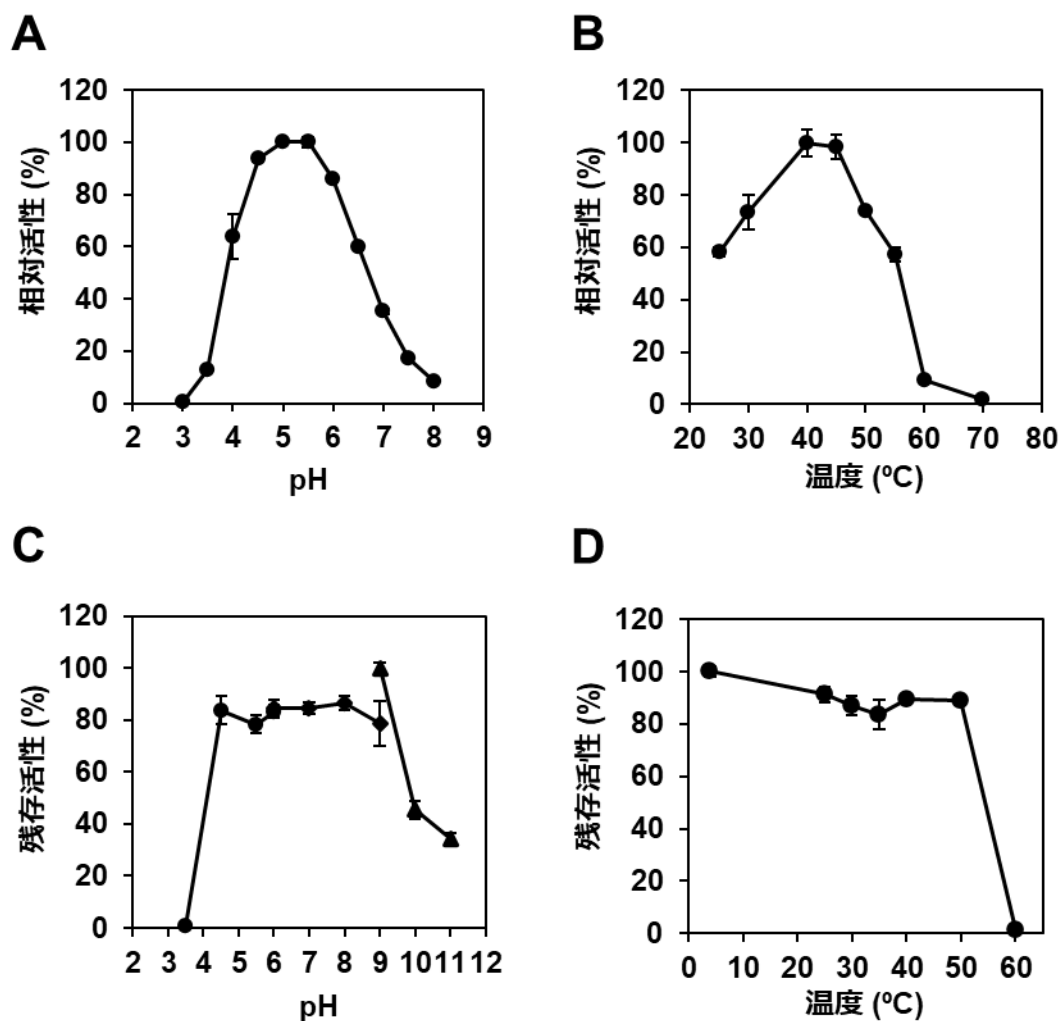


図 2-8. FjGH65A の pH と温度による影響

(A) 至適 pH。(B) 至適温度。(C) pH 安定性。(D) 温度安定性。至適 pH は酵素反応を 30°Cで行い、マッキルベインバッファー (pH 3.0–8.0) を使用した。至適温度は 50 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) を使用し、25°Cから 70°Cで行った。pH 安定性は酵素反応を 30°Cで行い、50 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 3.5–6.0, ●)、50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0–9.0 ■)、50 mM グリシン-NaOH バッファー (pH 9.0–11.0, ▲) を使用した。温度安定性は 50 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) を使用し、30°Cから 70°Cで行った。至適 pH と至適温度は最も高い比活性を示した条件の値 (33.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 15.7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を 100%として相対活性を求めた。pH 安定性と温度安定性は最も高い比活性を示した条件の値 (27.0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 20.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を 100%として残存活性を求めた。

2.3.3. FjGH65A の反応産物のアノマー分析

FjGH65A の反応機構を明らかにするために、コージビオースと α -GlcF に対する FjGH65A による加水分解の初期生成物を順相 HPLC で分析した。 α -グルコースの保持時間は 10.0 分、 β -グルコースの保持時間は 10.5 分であった (図 2-9A)。酵素反応していないコージビオース (反応時間 0 分間) を HPLC で分析すると、保持時間 22 分と 23 分にピークが検出され、面積比はそれぞれ 49% と 51% であった (図 2-9B)。水溶液中の α -コージビオースと β -コージビオースの比が 48.1% と 51.9% であること (Roslund et al., 2008) を考慮すると、22 分のピークは α -コージビオース、23 分のピークは β -コージビオースに相当すると考えられた。反応時間が 0 分と 0.5 分のクロマトグラムを比較すると、保持時間 10.0 分に小さなピーク、10.5 分に大きなピークが出現し、保持時間 22 分および 23 分のピークは減少した (図 2-9B)。また、クロマトグラムのピーク面積からグルコースとコージビオースの量を求めた。これらのプロットの傾きから、FjGH65A は α -コージビオースと β -コージビオースを 1:0.8 の割合で分解し、 α -グルコースと β -グルコースを 1:2.2 の割合で生成することが分かった (図 2-9C, D)。この結果は、FjGH65A がアノマー反転型の反応機構を介してコージビオースを加水分解することを示唆している。しかし、これらの生成物は α/β -コージビオースの非還元末端 α -グルコース残基と還元末端 α/β -グルコース残基の両方に由来するため、両者を明確に区別することは困難だった。そこで、より正確に反応機構を決定するために、基質として α -GlcF を用いた。コージビオースを基質として用いた場合と同様に、反応の初期段階 (反応時間 10 分間) で β -グルコースが蓄積し、 α -グルコースは加水分解反応が進むにつれて遅れて生成した (図 2-10)。これらの結果から、FjGH65A はアノマー反転型の加水分解酵素であると示唆された。

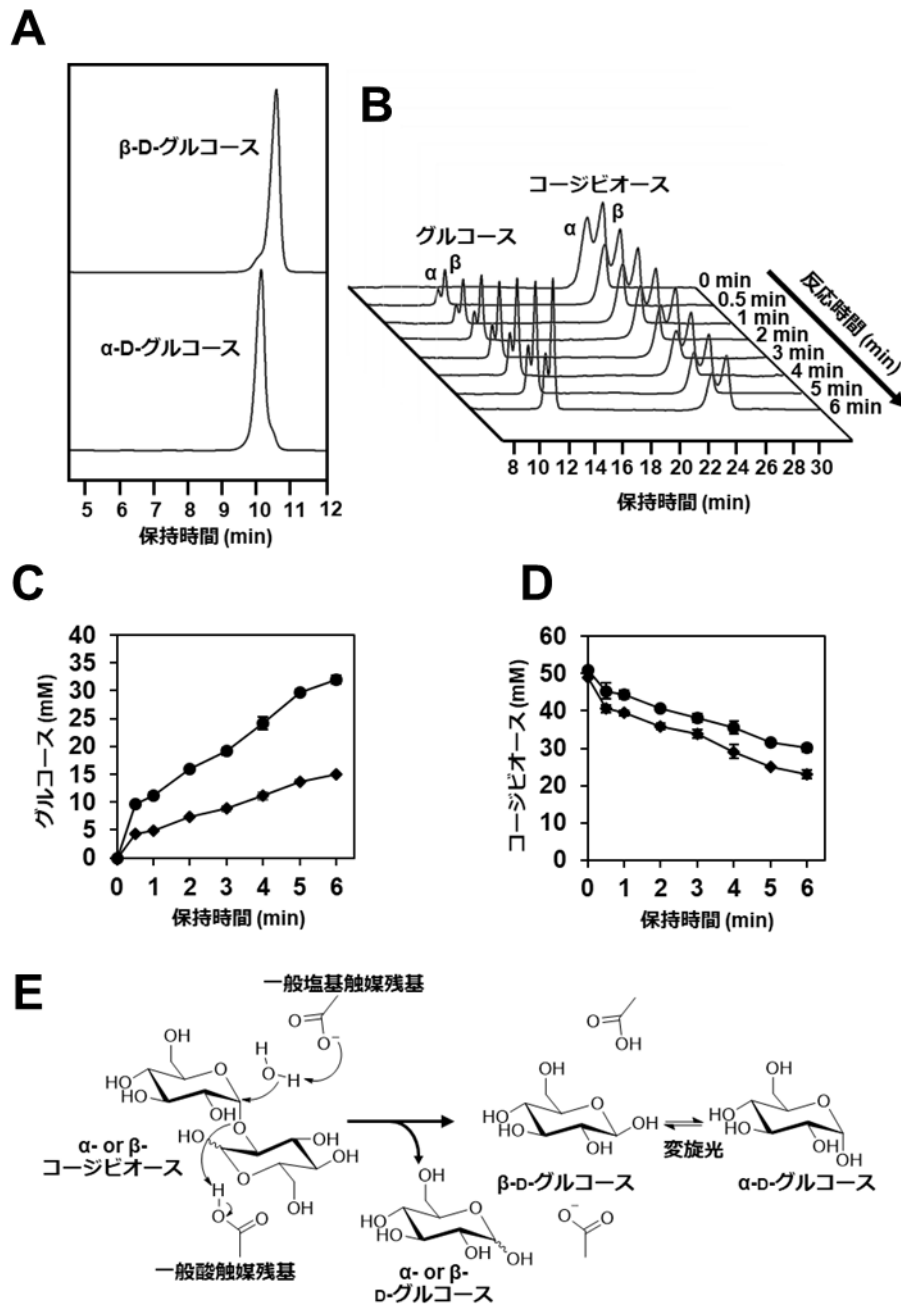


図 2-9. コージビオースの加水分解産物のアノマーの分析

(A) α -D-グルコースと β -D-グルコースの溶出クロマトグラム。(B) FjGH65A とコージビオースとの反応産物を HPLC に供し、アノマーの分析を行なったときのクロマトグラム。(C) 経時変化に伴う α -グルコース (◆) と β -グルコース (●) 量の変化。(D) 経時変化に伴う α -コージビオース (◆) と β -コージビオース (●) 量の変化。(E) FjGH65A によるコージビオースの加水分解の推定反応機構。

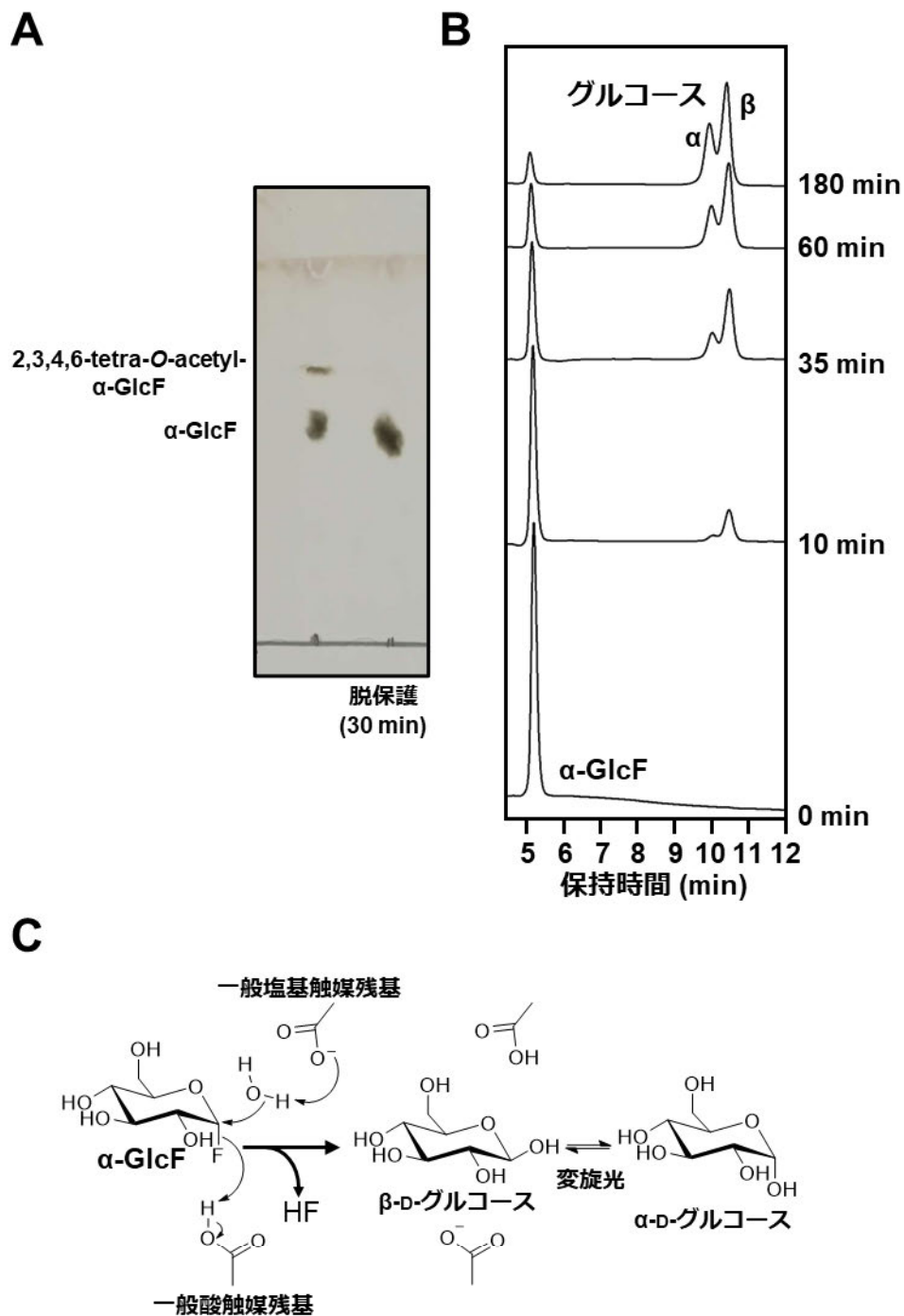


図 2-10. α -GlcF の加水分解産物のアノマーの分析

(A) 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl fluoride のアセチル基の脱保護。(B) α -GlcF を基質に FjGH65A と反応させ、その反応産物を HPLC に供し、アノマーの分析を行なったときのクロマトグラム。(C) FjGH65A による α -GlcF の加水分解の推定反応機構。

2.3.4. FjGH65A の X 線結晶構造解析

FjGH65A の結晶は超純水で 2 倍希釈した PEG/Ion Screen 2 の 22 番 (0.1 M ammonium citrate tribasic (pH 7.0)、10% (w/v) PEG3350) で得られた (図 2-11A)。結晶が得られた条件からさらなる条件検討を行い、1 辺が約 200 μm の結晶を得ることができた (図 2-11B)。作製した FjGH65A の結晶を用いて X 線回折強度の測定を行ったところ、12% (w/v) PEG3350、0.3 M ammonium citrate tribasic (pH 7.0)、0.01 M TCEP の条件で得られた結晶は最高で 1.4 \AA の回折が得られたため、回折データを集めた (図 2-11C)。FjGH65A の結晶は空間群 $C2$ に属しており、Matthew 係数 (V_M) は $2.57 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ で、含水率は 52.1%、結晶学的非対称単位中に含まれる FjGH65A 分子は 3 分子と見積もられた。位相の決定は KAuCl_4 にソーキングした単結晶 (図 2-11D) を用いた SAD 法により行い、FjGH65A の立体構造はリガンドフリー構造、グルコースとの複合体構造、IG2 との複合体構造をそれぞれ 1.54、1.40、1.56 \AA 分解能で決定した。

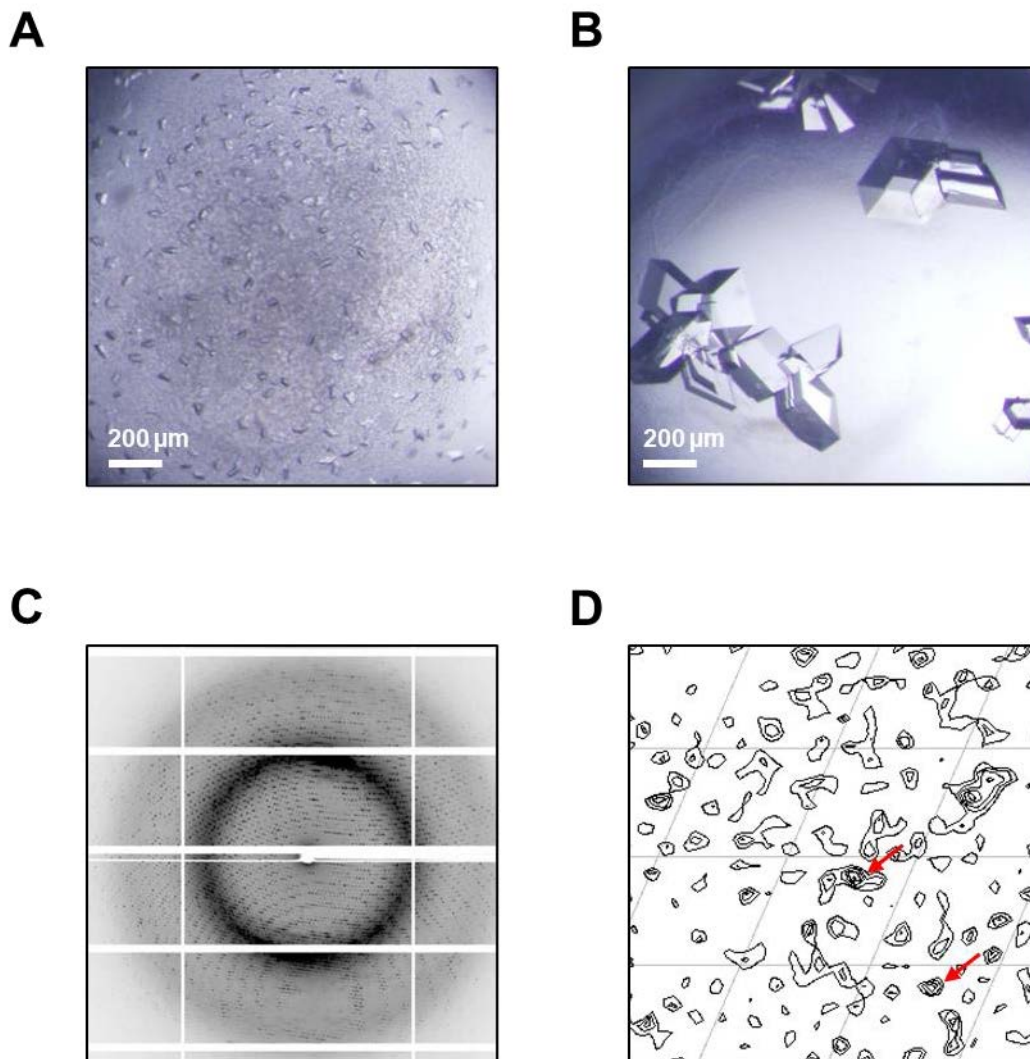


図 2-11. FjGH65A の結晶とその回折像

(A) 初期スクリーニングで得られた FjGH65A の結晶。(B) 結晶化条件を最適化した FjGH65A の結晶。(C) (B) の結晶から得られた X 線回折像。(D) KAuCl_4 をソークした FjGH65A のパターンソン図。赤矢印のピークが重原子の導入を示す。

2.3.5. FjGH65A の全体構造

全 681 アミノ酸残基のうち、His23 から His681 までのモデル構築に成功した。FjGH65A は結晶学的非対称単位中に 3 分子存在し、それぞれを MolA、MolB、MolC とした (図 2-12A)。PISA (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) によるタンパク質の 4 次構造予測とゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定の結果を合わせると、FjGH65A は結晶学的に 2 回回転軸で結ばれた“dimer of trimer”の 6 量体を形成していると考えられた (図 2-12A)。構造既知の GH65 酵素は全て 2 量体であり、FjGH65A における 6 量体形成に寄与するアミノ酸残基は、報告されているどの GH65 酵素にも保存されていなかった (図 2-12B, C) (Egloff et al., 2001; Okada et al., 2014)。FjGH65A の単量体は N 末端の β -サンドイッチドメイン (N ドメイン、23–258 残基)、リンカー領域 (259–294 残基)、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造の触媒ドメイン (301–641 残基)、C 末端の β -シートドメイン (C ドメイン、295–300 残基と 642–681 残基) を有していた (図 2-13)。次に、Dali サーバーを用いて構造類似性検索を行ったところ、GH65 酵素の CsKP (Protein Data Bank (PDB) 3WIR, root mean square deviation (rmsd)=2.3, Z-score=38.8)、*Bacillus selenitireducens* 由来の 2-O- α -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ (BsGGP, PDB 4KTP, rmsd=2.6, Z-score=37.1)、LbMP (PDB 1H54, rmsd=3.2, Z-score=35.6) は、FjGH65A と高い構造類似性を示したが、アミノ酸配列相同性はそれぞれ 28%、23%、19%であった (図 2-14)。*Arthrobacter globiformis* 由来のグルコデキストラナーゼ (AgGD, PDB 1ULV, rmsd=4.2, Z-score=22.0) や *Thermoanaerobacterium thomosaccharolyticum* 由来のグルコアミラーゼ (TtGA, PDB 1LF6, rmsd=4.7, Z-score=21.7) などの GH15 酵素も、アミノ酸配列の相同性はそれぞれ 17%と 20%と低いにもかかわらず、高い構造的類似性を示した (図 2-14)。FjGH65A の N ドメインの構造は報告されている GH65 GP の構造と似ているが、N ドメインのループ (71–78 残基) は LbMP の対応する領域 (62–79 残基) よりも短かった (図 2-15)。このループは“dimer of trimer”の界面に位置し、FjGH65A の 6 量体形成に関与していることが示唆された。また、FjGH65A の C ドメインは 5 本の β -ストランドからなり、他の GH65 GP よりも少なかった。

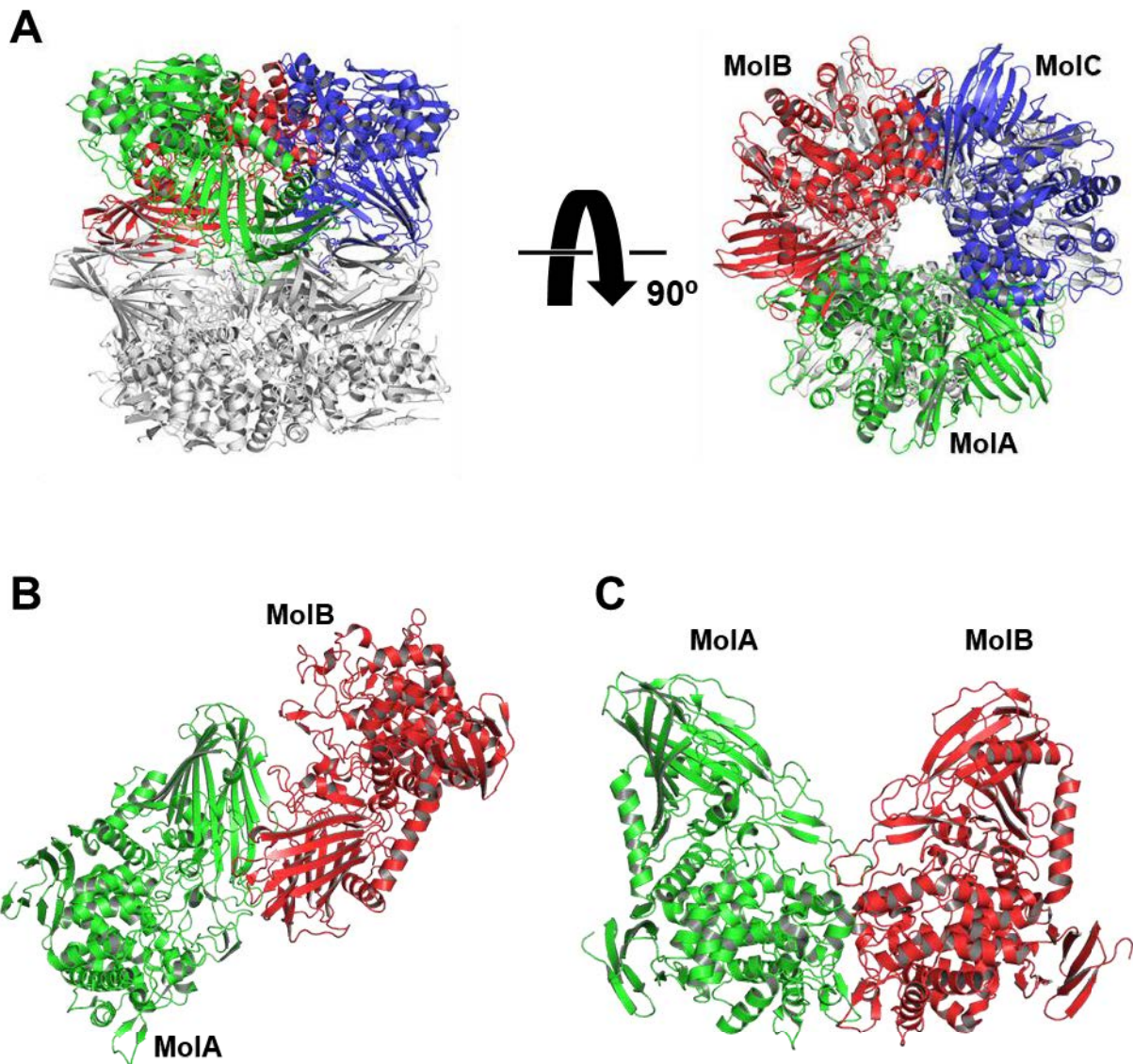


図 2-12. FjGH65A と構造既知 GH65 GP の立体構造

(A) FjGH65A の 6 量体構造。MoIA を緑色、MoIB を赤色、MoIC を青色、2 回回転軸対称の 3 量体を灰色で示した。(B) CsKP の 2 量体構造。(C) LbMP の 2 量体構造。

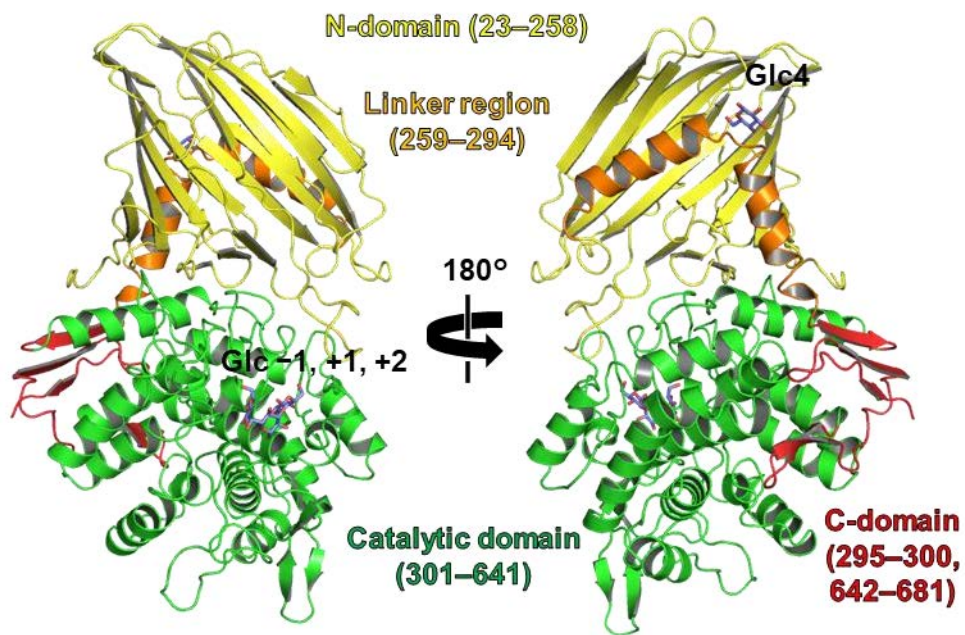


図 2-13. FjGH65A の全体構造

N ドメインは黄色、Linker 領域はオレンジ色、触媒ドメインは緑色、C ドメインは赤色で示した。結合しているグルコースは藍色のスティックモデルで示した。FjGH65A の各ドメインは構造既知の GH65 酵素と比較して決定した。

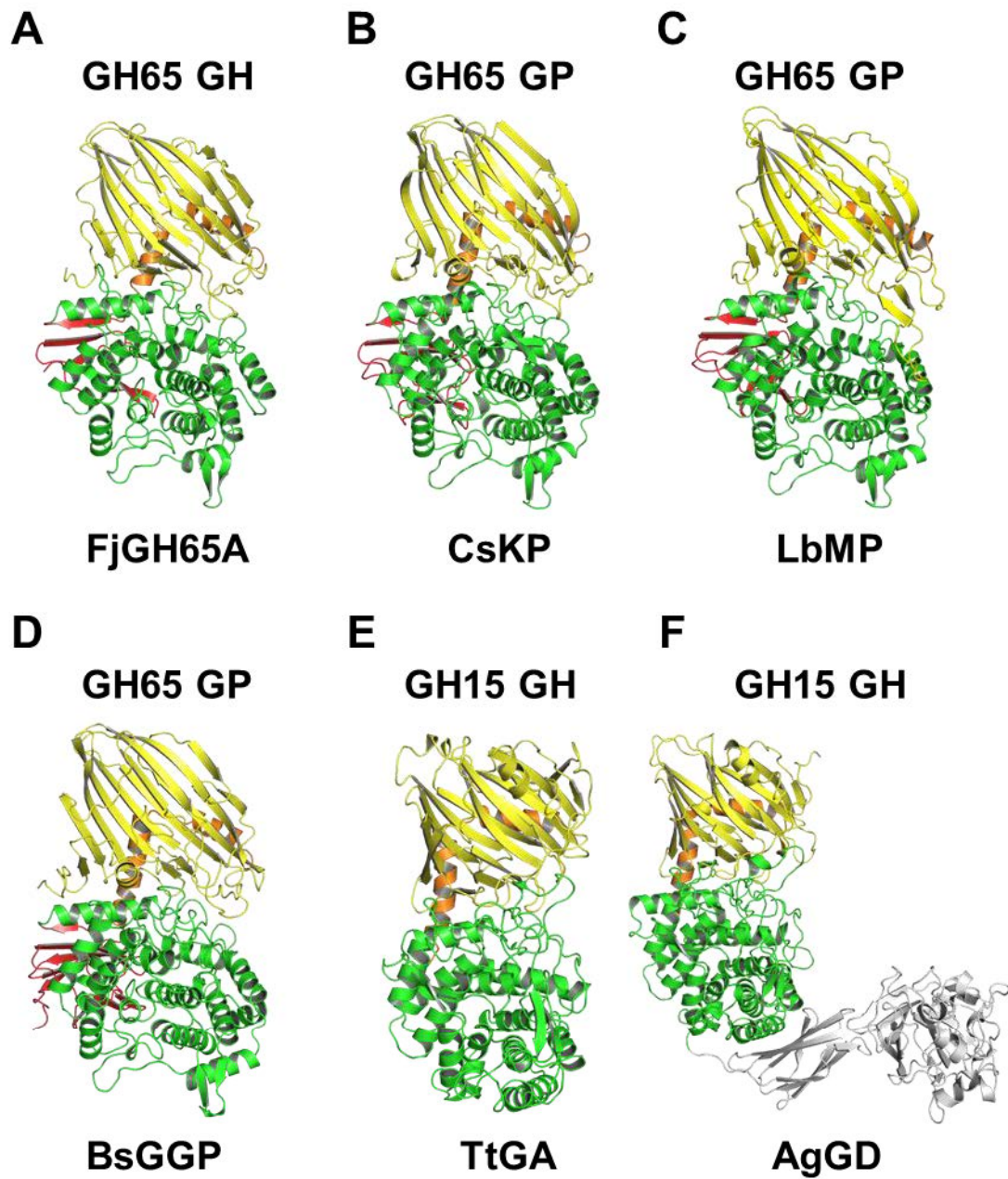


図 2-14. FjGH65A の立体構造および類似した構造を有する酵素

(A) FjGH65A。(B) *C. saccharolyticus* 由来コージビオースホスホリラーゼ。(C) *L. brevis* 由来マルトースホスホリラーゼ。(D) *B. selenitireducens* 由来 2-O- α -グルコシルグリセロールホスホリラーゼ。(E) *T. thomosaccharolyticum* 由来グルコアミラーゼ。(F) *A. globiformis* 由来グルコデキストラナーゼ。

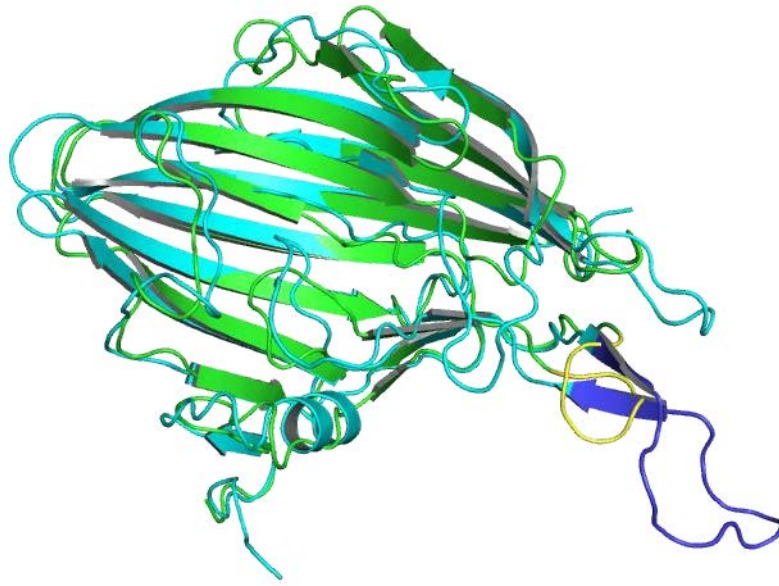


図 2-15. FjGH65A と LbMP の N ドメインの重ね合わせ

FjGH65A の N ドメインを緑色、LbMP の N ドメインをシアンで示した。FjGH65A の N ドメインのループ (71-78 残基) を青色、LbMP の対応する領域 (62-79 残基) を黄色で示した。

2.3.6. FjGH65A の活性部位

FjGH65A の各モノマーは4つのβ-グルコース分子を結合し、そのうちの3つ (Glc-1, Glc+1, Glc+2) は活性部位に観察され (図 2-13, 2-16)、4つ目 (Glc4) はリンカー領域に結合していた (図 2-13, 2-16)。これ以降は主に MolA について記載する。Glc-1、Glc+1、Glc+2、Glc4 の *B factor* はそれぞれ 15.5、14.7、23.4、33.2 Å² であった。Glc-1 はサブサイト-1 に位置し (サブサイトの命名は Davies et al., 1997 に従って行った。) (図 2-17)、水素結合を介して4つのアミノ酸残基 (Trp343, Asp344, Lys538, Gln539) の側鎖と相互作用していた (図 2-17B)。Glc+1 はサブサイト+1 に位置し、Trp391、Glu392、Thr407、Glu472 と水素結合を形成していた (図 2-17B)。サブサイト+2 に位置する Glc+2 は、Trp473 の側鎖と相互作用し、部分的に溶媒側に露出していた (図 2-17B)。コージオリゴ糖がどのように活性部位に結合するかは不明であるが、基質の還元末端は溶媒側に露出していると考えられた。これは、長いコージオリゴ糖に対する活性がコージビオースに対する活性よりも低いことと矛盾しない。同様の現象は SusB でも報告されている。SusB のサブサイト+3 は溶媒側に広がっており、基質との相互作用が少ないため、SusB は長鎖のマルトオリゴ糖よりもマルトトリオースに対して高い活性を示す (Kitamura et al., 2008)。Glc+1 のヒドロキシ基の中で、Glc+1 の O2 原子は Glc1 の C1 原子に最も距離 (3.2 Å) が近かった (図 2-17C)。また、Glc+2 のヒドロキシ基の中で、Glc+2 の O2 原子は Glc+1 の C1 原子に最も距離 (4.0 Å) が近かった (図 2-17C)。さらに、FjGH65A のグルコース複合体構造と CsKP のコージビオース複合体構造 (PDB 3W1Q) を重ね合わせると、Glc+1 の配向が CsKP 中のコージビオースの還元末端のグルコースの配向と類似していることがわかった (図 2-17C)。Glc4 は3量体形成の界面に結合しており、MolA の Leu274 と Glu275 と MolB の Asp478 と Asn466 と水素結合を形成した (Fig. 2-16B, C)

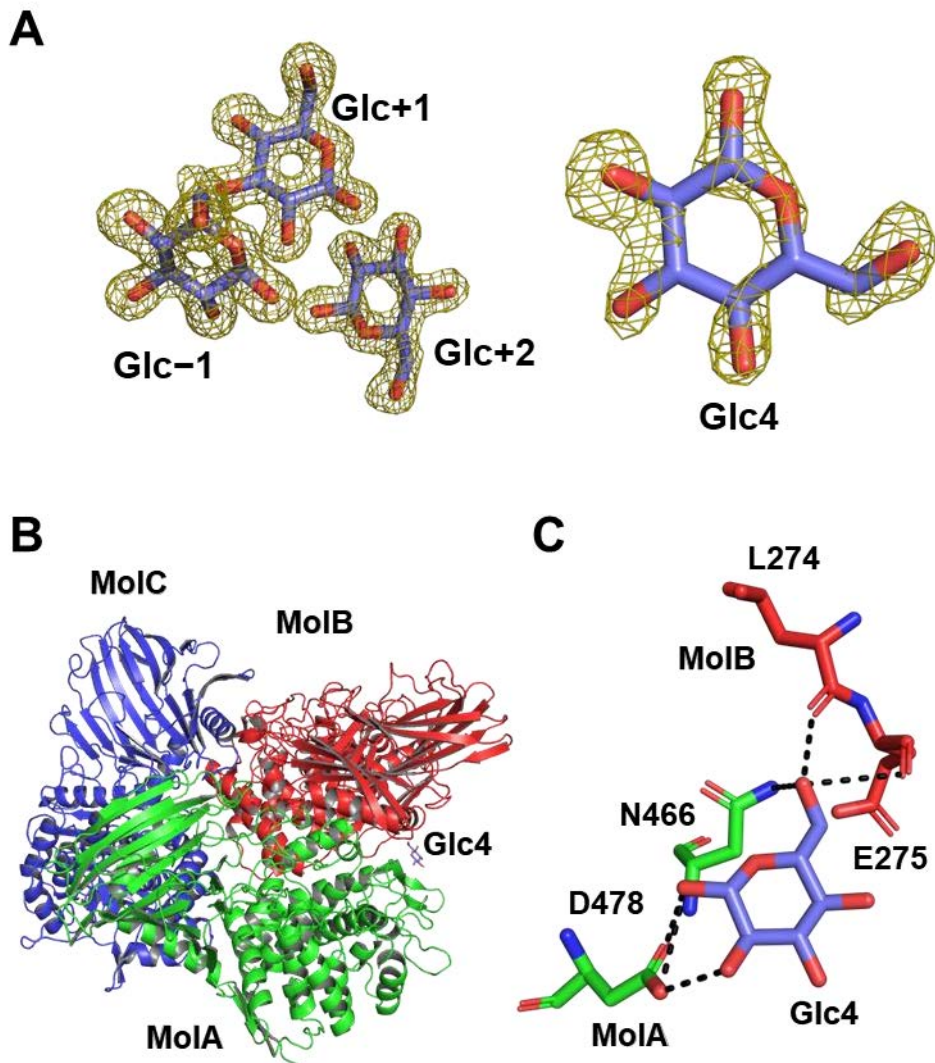


図 2-16. FjGH65A に結合していたグルコース

(A) FjGH65A に結合している β -グルコース (藍色) のスティックモデル。グルコースの F_o-F_c map (3σ) はオリーブ色のメッシュで示した。(B) FjGH65A と Glc4 の立体構造。MoIA を緑色、MoIB を赤色、MoIC を青色で示し、Glc4 を藍色で示した。(C) Glc4 と水素結合をするアミノ酸残基をスティックモデルで示した。MoIA のアミノ酸残基を緑色で示し、MoIB のアミノ酸残基を赤色で示した。Glc4 は藍色で示した。

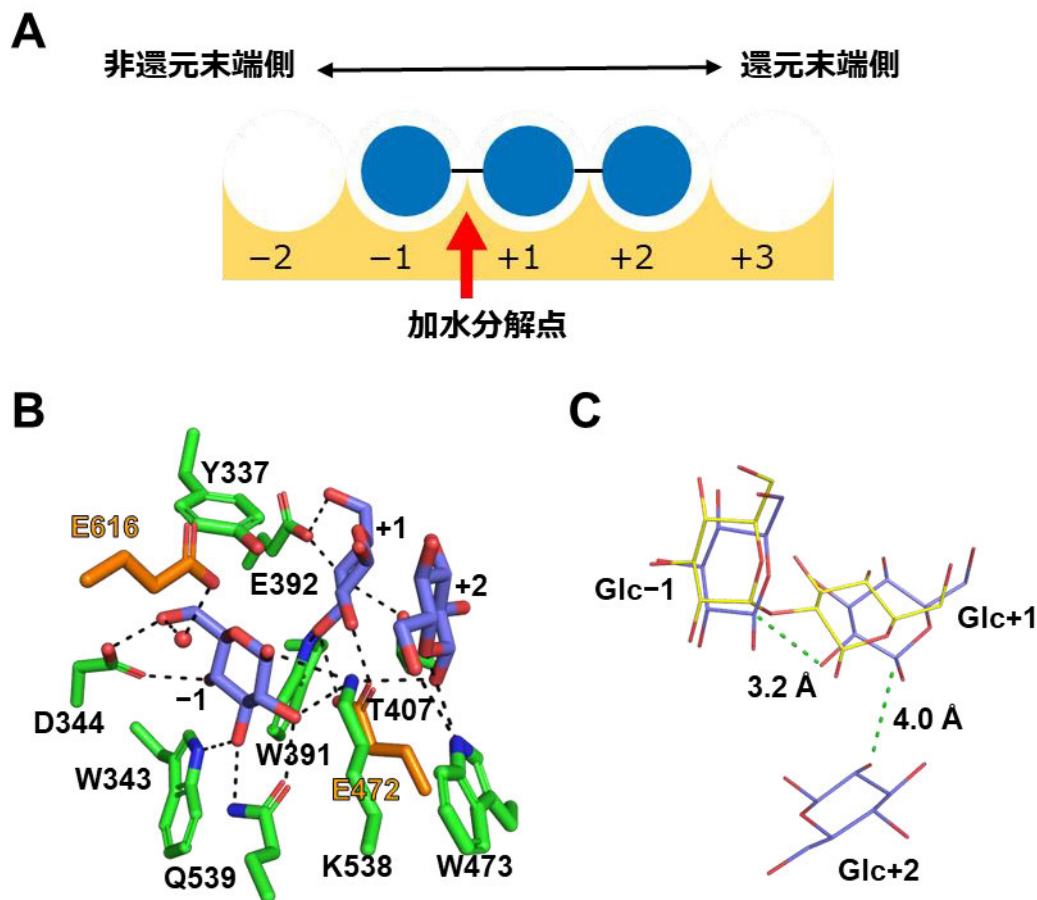


図 2-17. FjGH65A の活性部位

(A) サブサイトの模式図。基質の加水分解点より非還元末端側の糖が結合する部位をサブサイト-側、還元末端側をサブサイト+側と定義する。(B) FjGH65A と β -グルコースとの複合体構造の活性部位。側鎖のアミノ酸残基を緑色で示した。触媒残基と β -グルコースをそれぞれオレンジ色と藍色で示した。水素結合は黒色破線で示した。水分子を赤いスフィアモデルで示した。(C) FjGH65A のグルコース複合体構造と CsKP (PDB 3WIQ) の複合体構造の結合したリガンドの重ね合わせ。グルコース (藍色) とコージビオース (黄色) は細いスティックモデルで示した。Glc2 の O2 と Glc1 の C1 間の距離、および Glc3 の O2 と Glc2 の C1 間の距離を緑色破線で示した。

CsKP のコージビオース複合体構造と LbMP のリガンドフリー構造 (PDB 1H54) を FjGH65A の活性部位に重ね合わせた。Glc-1 と相互作用するアミノ酸残基と一般酸触媒残基 Glu472 は、CsKP と LbMP の両方で保存されていた (図 2-18A)。一方、Glc+1 と相互作用するアミノ酸残基 (FjGH65A では Trp391、Glu392、Thr407) は、FjGH65A と同様にコージビオースに対して作用する CsKP では保存されているが、マルトースに作用する LbMP では保存されていなかった (図 2-18B)。FjGH65A と、真核生物由来の GH65 GH (トレハラーゼと PGGHG) とのアミノ酸配列のアラインメントから、サブサイト-1 残基は完全に保存されているのに対し、サブサイト+1 のアミノ酸残基は異なっていることが示された (図 2-19)。既報の GH65 GP は、リジン、ヒスチジン、2つのセリン残基からなるリン酸結合部位を有する (Egloff et al., 2001; Okada et al., 2014)。CsKP のグルコースとリン酸の複合体構造 (PDB 3WIR) では、リン酸分子は2つのセリンと相互作用をし、ヒスチジンとリジンに囲まれている (図 2-20)。FjGH65A では、2つのセリン残基は Pro575 と Ala576 に、ヒスチジンとリジン残基は Phe625 と Met330 に置き換えられていた (図 2-20)。また、FjGH65A は GH65 GP のリン酸結合部位と立体的に類似した位置に Glu616 を有していた。Glu616 は一般塩基触媒残基として働くのに適した位置にあり、Glu472 は GH65 GH と GP の間で一般酸触媒残基として保存されている (図 2-20)。そこで、各グルタミン酸残基をグルタミンに置換した変異体 E472Q と E616Q を構築し、コージビオースに対する活性を解析したところ、両変異体ともコージビオースに対する活性が野生型の 0.1%以下の活性まで低下した (1.86×10^{-2} $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 5.28×10^{-3} $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)。一次構造のアラインメントに基づくと、Glu616 は GH65 の GH 間で完全に保存されており (図 2-19)、これらのことは Glu616 が FjGH65A の一般塩基触媒残基として働き、加水分解反応に必須であることを示唆している。

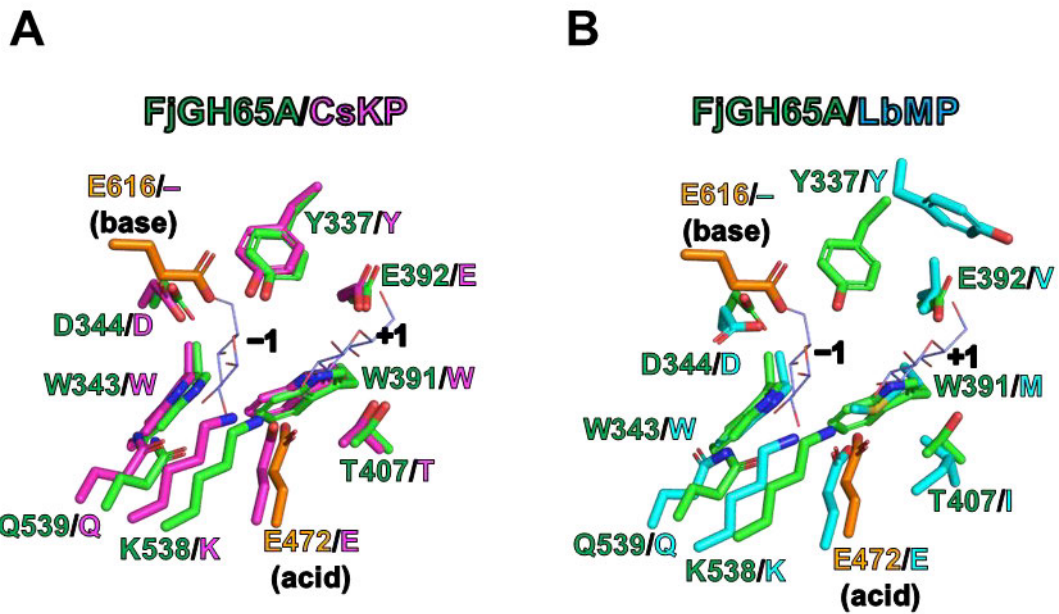


図 2-18. FjGH65A と構造既知 GH65 GP の活性部位の比較

(A) FjGH65A の β -グルコース複合体構造 (緑色) と CsKP の β -グルコース複合体構造 (PDB 3WIR, マゼンタ) の活性部位の重ね合わせ。(B) FjGH65A の β -グルコース複合体構造 (緑色) と BsGGP の β -グルコース複合体構造 (PDB 4KTP, シアン) の活性部位の重ね合わせ。FjGH65A の触媒残基をオレンジ色で示した。

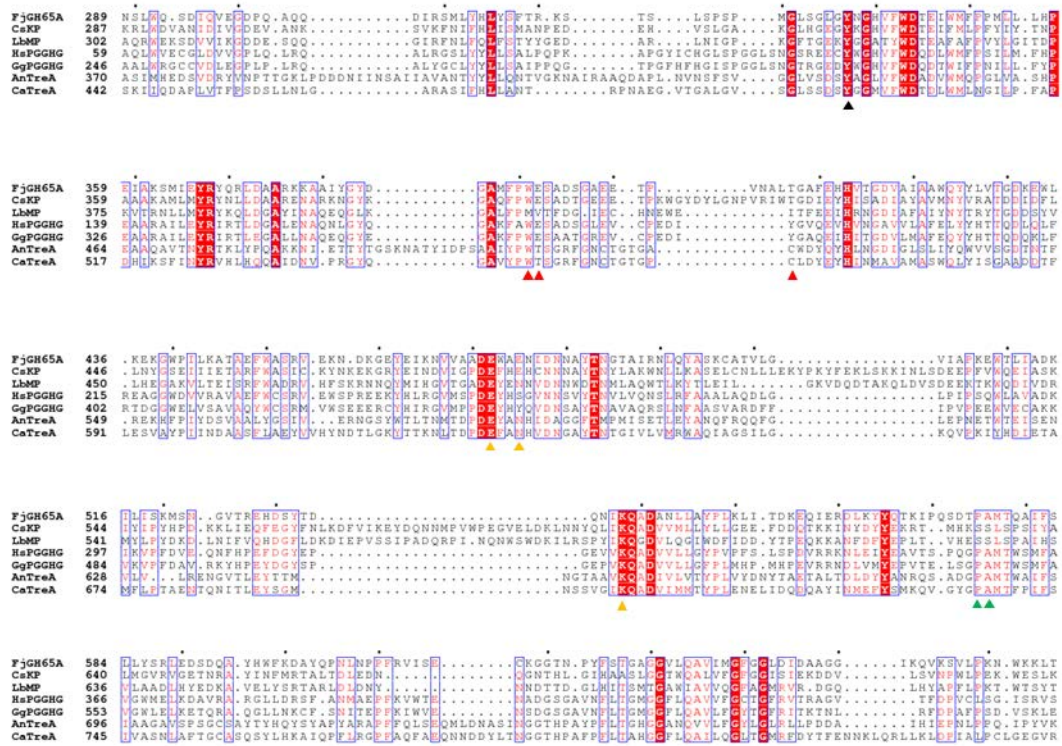


図 2-19. FjGH65A と既報の GH65 酵素とのアラインメント

FjGH65A の Trp391、Glu392 および Thr407 を含む領域と GH65 GP および GH の対応する領域の配列アラインメントと GH65 GP のリン酸結合部位周辺の領域と、FjGH65A を含む GH65 GH の対応する領域の配列アラインメント。Trp391、Gln362、Thr407 に対応するアミノ酸残基は赤い三角形で示した。GH65 GP のリン酸と相互作用するセリン残基と FjGH65A の一般塩基触媒残基に対応するアミノ酸残基を、それぞれ緑と青の三角形で示した。Tyr337 に対応するアミノ酸残基は黒い三角形で示した。使用した略語は以下に記載する。Glu472、Glu475、Lys538 に対応するアミノ酸残基は黄色の三角形で示した。AnTreA, *Aspergillus nidulans* trehalase; CaTreA, *Candida albicans* trehalase; GgPGGHG, *Gallus gallus* PGGHG; HsPGGHG, *Homo sapiens* PGGHG

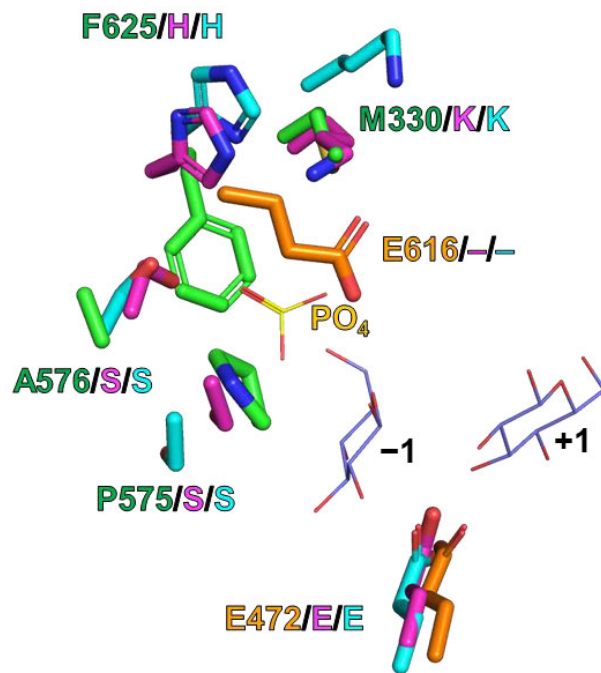


図 2-20. FjGH65A と構造既知 GH65 GP とのリン酸結合部位の比較

GH65 GP と FjGH65A のリン酸結合部位の比較。CsKP (PDB 3WIR、マゼンタ)、LbMP (PDB 1H54、シアン)、FjGH65A (緑色) のリン酸結合部位を重ね合わせた。グルコース (藍色) とリン酸 (黄色) は細いスティックモデルで示した。触媒残基はオレンジ色で示した。

2.3.7. FjGH65A と GH-L clan 酵素との比較

GH15 と GH65 はアノマー反転型の反応機構と $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造の触媒ドメインを共有している。これらの類似性から GH15 と GH65 は共通祖先を持つと考えられ、これらは GH-L clan に分類されている (Egloff et al., 2001)。FjGH65A の全体構造を TtGA のアカルボース複合体構造 (PDB 1LF9) と比較した。TtGA は FjGH65A と同様に、N ドメイン、リンカー領域、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造の触媒ドメインを有している (図 2-21A,B)。FjGH65A と TtGA の触媒残基の $C\alpha$ 原子の重ね合わせを図 2-21C に示した。一般酸/塩基触媒残基は、触媒ドメインの $\alpha 5$ と $\alpha 6$ 間のループ上、および $\alpha 11$ と $\alpha 12$ 間のループ上に位置し、構造的に保存されていた。TtGA では、Asp344 は $\alpha 2$ に位置し、サブサイト-1 に結合したグルコースの O6 との水素結合を介して求核水の捕捉に寄与している (Aleshin et al., 2003)。Tyr337 は TtGA の $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の間に位置し、一般塩基触媒残基 Glu636 と水素結合を形成し、GH15 において高度に保存されており、GH65 でも保存されている (図 2-19)。また、FjGH65A の Glc-1 と TtGA のアカルボースのシクロヘキセンもサブサイト-1 で重なっていた (図 2-21C)。

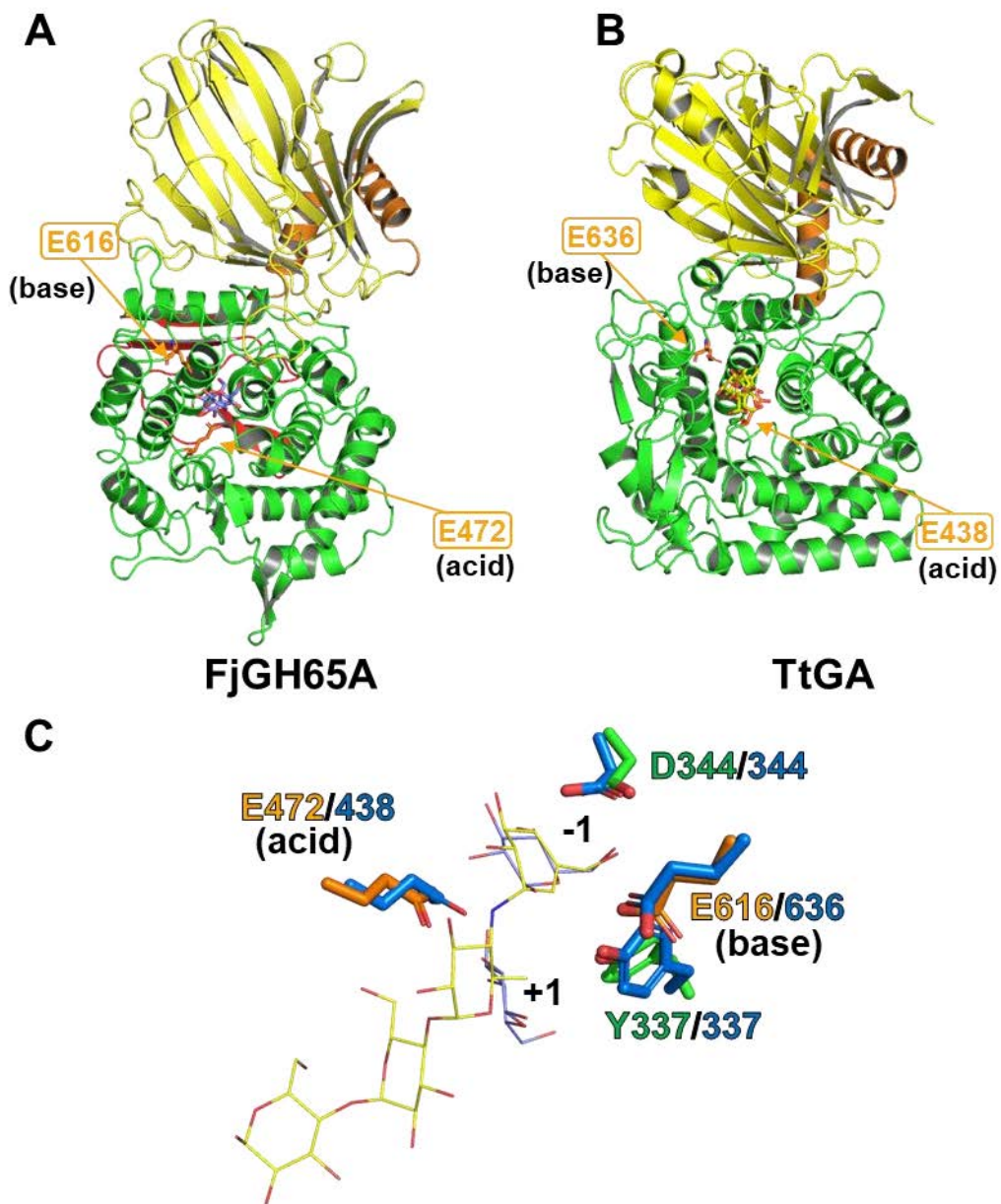


図 2-21. FjGH65A と TtGA の全体構造の比較

(A) FjGH65A のグルコース複合体構造。(B) TtGA のアカルボース複合体構造 (PDB 1LF9)。触媒残基はオレンジ色で示した。(C) FjGH65A と TtGA の活性部位の重ね合わせ。FjGH65A のアミノ酸残基と触媒残基をそれぞれ緑色とオレンジ色で示した。TtGA とアカルボースの残基はそれぞれ青色と黄色で示した。

2.3.8. FjGH65A のイソマルトース複合体構造

FjGH65A がどのようにして G2G6G を認識するのかを明らかにするために、FjGH65A の IG2 複合体構造を 1.56 Å 分解能で決定した (表 2-11)。IG2 複合体構造には、サブサイト+1 と+2 に IG2 が結合していた (図 2-22A)。サブサイト+1 の IG2 の非還元末端のグルコース残基 (Glc+1) は、水素結合を介して Arg74, Glu392, Trp391, Thr407, Glu472 と相互作用していた。サブサイト+2 の還元末端のグルコース残基 (Glc+2) は、水素結合を介して Glu472、Glu475、Lys538 と相互作用していた (図 2-22B)。一般酸触媒残基 Glu472 と Lys538 は GH65 酵素で保存されており、Glu475 は CsKP でのみ保存されていた (図 2-19)。3 分子のグルコースがサブサイト-1、+1、+2 に結合するグルコース複合体構造と IG2 複合体構造を比較すると、Glc+1 の位置は一致していたが、Glc+2 の位置は一致していなかった (図 2-22C)。IG2 の Glc+1 の水酸基のうち、Glc+1 の O2 原子は、グルコース複合体構造のサブサイト-1 にあるグルコースの C1 原子に 2.4 Å の距離で最も近かった (図 2-22C)。また、IG2 の還元末端は溶媒側に向かっているが、非還元末端の Glc+1 の O6 の先が Arg74 によって塞がれているため、FjGH65A はサブサイト+1 に結合するグルコースの 6 位の先にグルコースが結合した基質に対しては加水分解活性を示しにくいと考えられる (図 2-22C)。

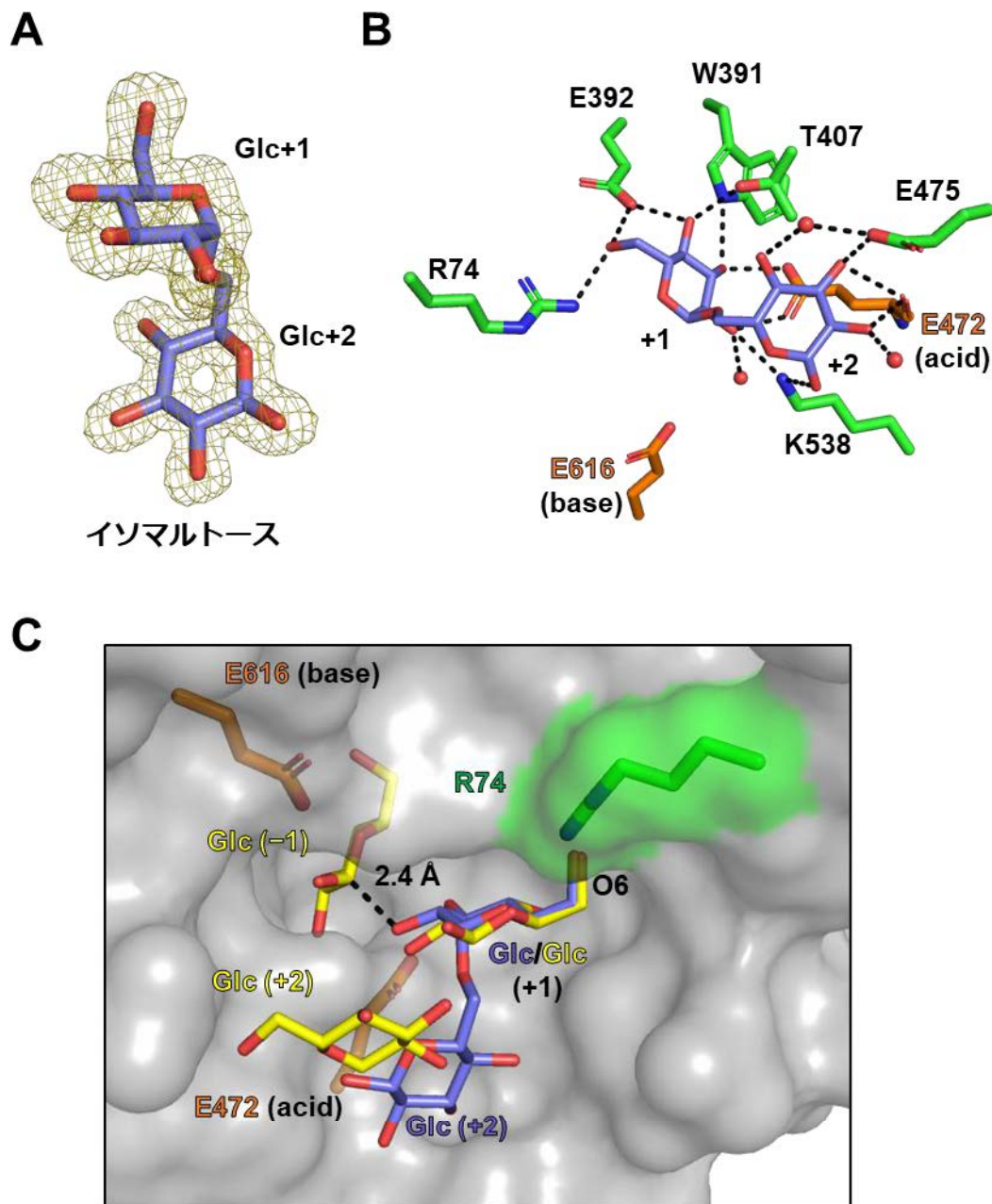


図 2-22. FjGH65A の IG2 複合体構造

(A) FjGH65A に結合している IG2 (藍色) のスティックモデル。IG2 の F_0-F_c map (3σ) はオリーブ色のメッシュで示した。(B) FjGH65A の IG2 結合活性部位。IG2 の周辺アミノ酸残基の側鎖を緑色で示した。触媒残基と IG2 はそれぞれオレンジ色と藍色で示した。(C) FjGH65A 活性部位の分子表面。FjGH65A の分子表面は灰色で示した。FjGH65A のグルコース複合体構造に含まれる 3 つのグルコース (黄色) と IG2 を重ねた。Arg74 は緑色で強調表示されている。Glc+1 の O2 とサブサイト-1 のグルコースの C1 間の距離を黒色破線で示した。

2.4. 考察

FjGH65A は α -1,2-グルコシド結合に厳密な特異性を持ち、コージビオースをよく加水分解した。コージビオースは日本酒や澱粉加水分解物などにごく少量含まれている (Aso et al., 1958; Sato and Ato, 1975; Watanabe and Aso, 1959)。コージビオースやコージオリゴ糖は難消化性や非う蝕原性、ビフィズス菌などの腸内細菌にプレバイオティクス効果を示す (Chaen et al., 2001; Nakada et al., 2003; Sanz et al., 2005)。コージビオースを加水分解する GH はいくつか報告されているが、いずれも他の α -1,X-グルコシドも加水分解する (Kato et al., 2002; Kita et al., 1991; Kitamura et al., 2008; Wongchawalit et al., 2006)。FjGH65A と GH65 コージビオースホスホリラーゼを比較すると、これらの酵素はコージビオースとコージトリオースに対して高い親和性と高い触媒効率を示すことが分かった。(表 2-12) (Chaen et al., 1999; Mukherjee et al., 2018)。FjGH65A は B-1299 α -グルカンに対しては活性が低かったが、 α -(1 \rightarrow 2)-多分岐 α -グルカンの部分構造である G2G6G に対しては活性を示し、コージトリオースに対する親和性と触媒効率に倣った活性を示した (表 2-12)。FjGH65A は、サブサイト+2 がコージビオースを厳密に認識するサブサイト-1 と+1 よりも広いことから、G2G6G のような還元末端に α -(1 \rightarrow 2)-結合以外の α -グルコシド結合を持つオリゴ糖も受容できることが示唆された (図 2-22C)。また、FjGH65A の IG2 複合体構造から、FjGH65A が多分岐デキストランの非還元末端側の α -(1 \rightarrow 2)-グルコシド結合のみを加水分解し、中間の α -(1 \rightarrow 2)-分岐は加水分解できないことが示唆された (図 2-22C, 2-23)。さらに、FjGH65A にはシグナル配列があり、この酵素はペリプラズムあるいは細胞外に局在していると考えられた。従って、FjGH65A は FjDex31A (エンドデキストラナーゼ) (Gozu et al., 2016; Tsutsumi et al., 2020) や推定 GH66 デキストラナーゼなどの周辺遺伝子産物によって α -(1 \rightarrow 2)-分岐デキストランが加水分解された産物であるオリゴ糖の分解に関与していると示唆された。しかし、*F. johnsoniae* における α -(1 \rightarrow 2)-分岐デキストランの資化経路については、さらなる研究が必要であると考えられた。そこで、FjGH65A の周辺遺伝子産物についての研究を行ったので、これについては第 3 章で述べる。

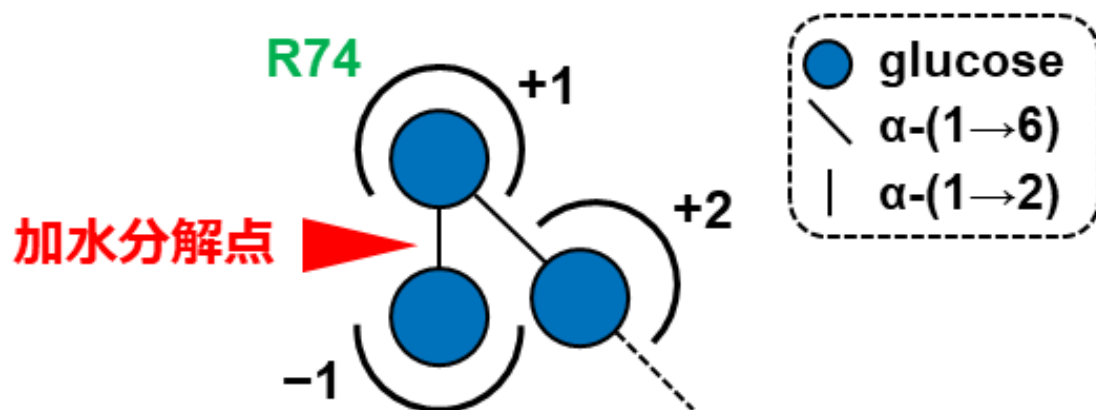


図 2-23. FjGH65A のサブサイトの模式図

グルコースを青色の丸で示した。加水分解点を赤色の三角形で示した。

FjGH65A に結合している Glc4 の結合部位は FjGH65A の 3 量体形成の界面に結合しており $F_o - F_c$ map (3σ) は不明瞭であり、 B -factor も他の結合している β -Glc よりも高かった (図 2-16)。さらに、Glc4 の結合部位のアミノ酸残基は既報の GH65 酵素において保存されていないことから酵素の機能に重要な部位ではないと予想された (図 2-24)。そのため、Glc4 は非特異的な結合によるものではないかと思われる。

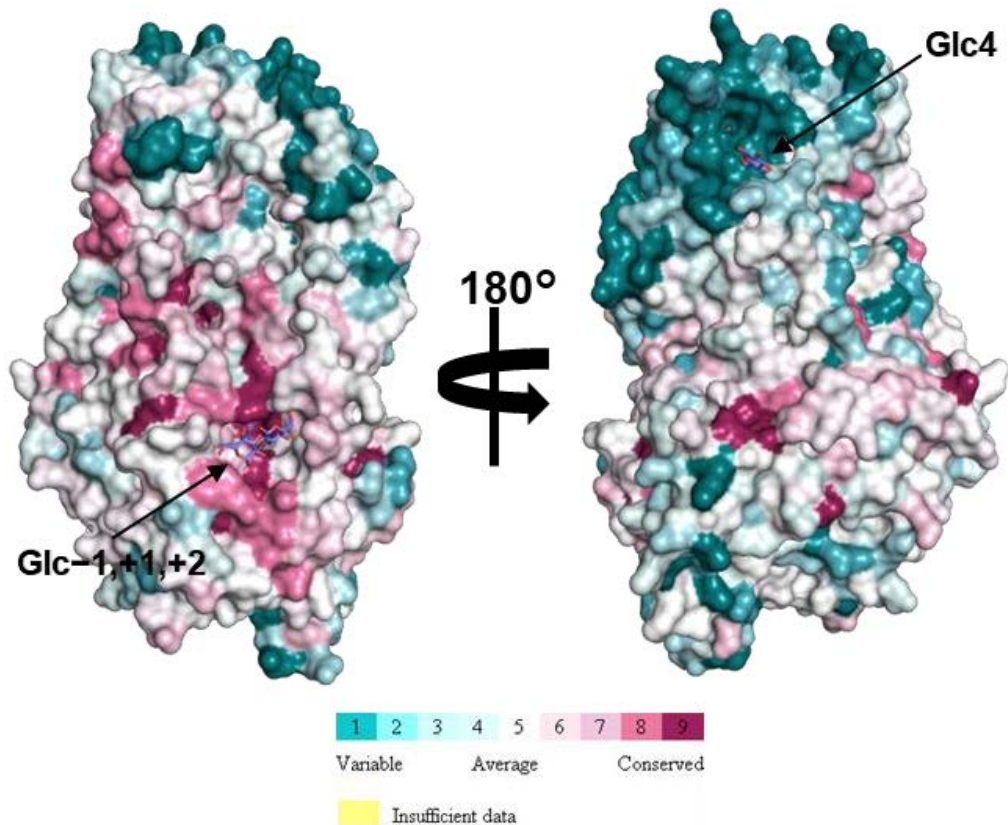


図 2-24. FjGH65A の分子表面のアミノ酸残基の保存性のマッピング

アミノ酸残基の保存性の解析 ConSurf サーバーを用いて作成した (Ashkenazy et al., 2010)。結合したグルコースを藍色で示した。アミノ酸配列は図 2-4 の分子系統樹の作成に用いたものを使用した。

α -(1→2)-グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素はこれまでにいくつか報告されている。mannosyl-oligosaccharide glucosidase (EC 3.2.1.106) は小胞体における *N* 型糖鎖のプロセッシングに関与し、*N* 型糖鎖の前駆体中の Glc α -(1→2)-Glc を加水分解する (Miyazaki et al., 2011; Moremen et al., 1994)。しかしながら、この酵素はコージビオースを加水分解せず、むしろコージビオースによって競合的に阻害される (Bause et al., 1986; Miyazaki et al., 2011)。PGGHG はコージビオースを加水分解できるが、その加水分解活性は α -glucosyl-1,2- β -galactosyl-L-hydroxylsine に対する活性の 20% しかない (Sternberg and Spiro, 1979)。 *M. dextranolyticum* の培養上清から精製した MdDDE (EC 3.2.1.115) は B-1299 α -グルカンの α -(1→2)-分岐を特異的に加水分解し、グルコースを生成するが、コージビオースは加水分解しないと報告されていた (Mitsuishi et al., 1980; Mitsuishi et al., 1984)。2023 年に当研究室は長らく不明であった MdDDE のアミノ酸配列を同定した (Miyazaki et al., 2023)。その結果、MdDDE は FjGH65A と同じ GH65 に分類された。組み換え MdDDE の機能解析を行ったところ、MdDDE は B-1299 α -グルカンに対して高い活性を示した。また、先行研究とは異なり B-1299 α -グルカンに対してよりも低い活性を示したが、コージビオースにも加水分解活性を示した (Miyazaki et al., 2023)。BsGGP は、リン酸存在下で遅い速度でコージビオースを分解し、2 分子のグルコースを生成することが報告されている (Nihira et al., 2014^b)。この反応は直接的な加水分解ではなく、リン酸に依存して進行する。まず、BsGGP はコージビオースから β -G1P を生成する。その次に BsGGP が β -G1P を加水分解してグルコースと無機リン酸を生成する (Nihira et al., 2014^b)。従って、FjGH65A は、既報の α -(1→2)-グルコシド結合を特異的に加水分解する GH とは異なる基質特異性を持つ新規な GH であることが示唆された。本研究に関わる原著論文の発表と同時期 (2021 年) に Desmet らのグループがコージビオースを特異的に加水分解する *Mucilaginibacter malemsis* 由来の GH65 酵素を報告した (De Beul et al., 2021)。本研究成果と合わせて、これらの酵素は kojibiose hydrolase (系統名, kojibiose glucohydrolase (configuration-inverting)) として新しい EC 番号 (EC 3.2.1.216) が付与された。

これまでに真菌由来のトレハラーゼや動物由来の PGGHG を含む GH65 GH の酵素的性質は報告されていたが、一般塩基触媒残基はヒト由来 PGGHG の変異体解析による予測のみで同定されておらず、反応機構も不明であった (Hamazaki

et al., 2016)。本研究では、加水分解の初期生成物のアノマーを解析することで、FjGH65A の反応機構がアノマー反転型であることを明らかにした。また、FjGH65A の結晶構造と変異体解析から、Glu472 と Glu616 がそれぞれ一般酸/塩基触媒残基であることが明らかになった。さらに、GH15 酵素と GH65 GH は、一般酸/塩基触媒残基を含む保存されたアミノ酸残基を持つ共通の活性部位を持つことが示唆された (図 2-21)。このことは、GH15 と GH65 が共通の祖先を共有しているという説を支持している。

GH130 は β -マンノシド結合に活性を示すアノマー反転型の GP と GH を含み、GP と GH の両方の立体構造が報告されている GH ファミリーである (Cuskin et al., 2015; Nakae et al., 2013)。GH130 の β -マンノシドホスホリラーゼでは、無機リン酸と相互作用する塩基性アミノ酸残基は保存されている (Nakae et al., 2013; Tsuda et al., 2015)。対照的に、GH130 β -マンノシダーゼでは、リン酸結合部位に相当する位置に加水分解に関与すると予想される 2 つのグルタミン酸残基が存在する (Cuskin et al., 2015)。さらに、サブサイト-1 を形成するアミノ酸残基は GH130 β -マンノシドホスホリラーゼと β -マンノシダーゼの間で保存されている (Cuskin et al., 2015; Tsuda et al., 2015) (図 2-25)。これらの特徴は FjGH65A と GH65 GP の関係に類似している。

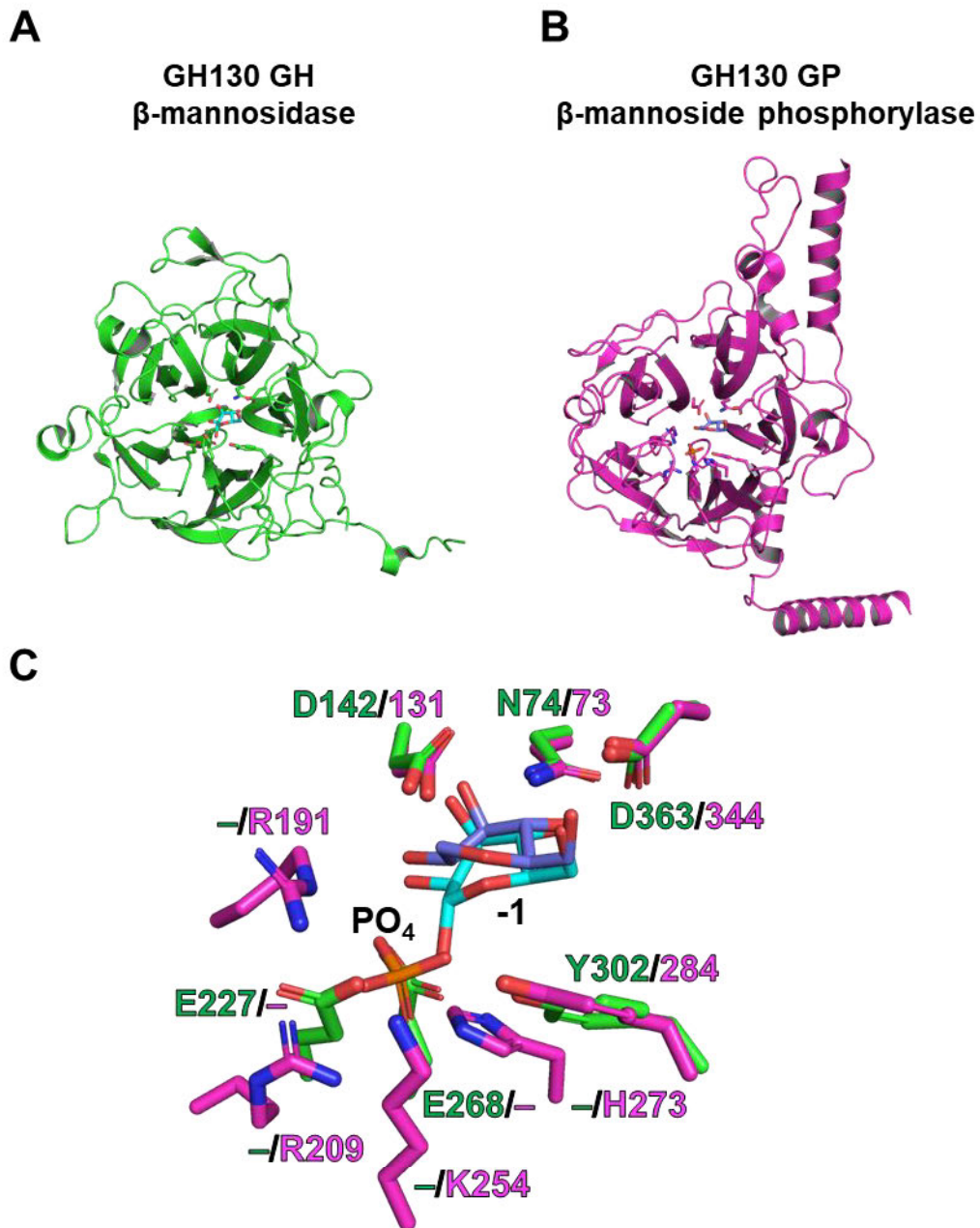


図 2-25. GH130 の GH と GP の活性部位の比較

(A) *B. thetaiotaomicron* 由来 GH130 β-mannosidase の全体構造 (PDB 5A7V)。 (B) *B. fragilis* 由来 GH130 β-mannoside phosphorylase の全体構造 (PDB 3WAS)。 (C) GH130 β-mannosidase (緑色) と GH130 β-mannoside phosphorylase (マゼンタ) の活性部位の重ね合わせ。GH130 β-mannosidase に結合したマンノース (シアン)、GH130 β-mannoside phosphorylase に結合したマンノース (藍色)、リン酸 (オレンジ色) は細いスティックモデルで示した。

近年、新しいペプチドベースの類似性評価アルゴリズムに基づいたタンパク質の機能予測とサブグループ化のためのプログラムである Conserved Unique Peptide Patterns プログラムが CAZymes のために作られた (Barrett et al., 2019; Barrett et al., 2020)。GH65 は GH65:1.1 から GH65.38.1 まで Conserved Unique Peptide Patterns によってグループ化されている (2023 年 11 月現在)。FjGH65A はこの中で GH65:8.1 に分類され、*Elizabethkingia* 属や *Bacteroides* 属由来の GH65 タンパク質もここに属する。GH65:8.1 では一般酸/塩基触媒残基として予測されたグルタミン酸残基は保存されており、リン酸結合部位を形成するアミノ酸残基は保存されていない (図 2-26)。コージビオースの認識に重要な FjGH65A の Trp391 と Glu392 に相当するトリプトファンとグルタミン酸残基も GH65:8.1 で保存されていた (図 2-26)。したがって、GH65:8.1 に分類される GH65 酵素は、FjGH65A と同様の α -1,2-グルコシダーゼである可能性が高い。

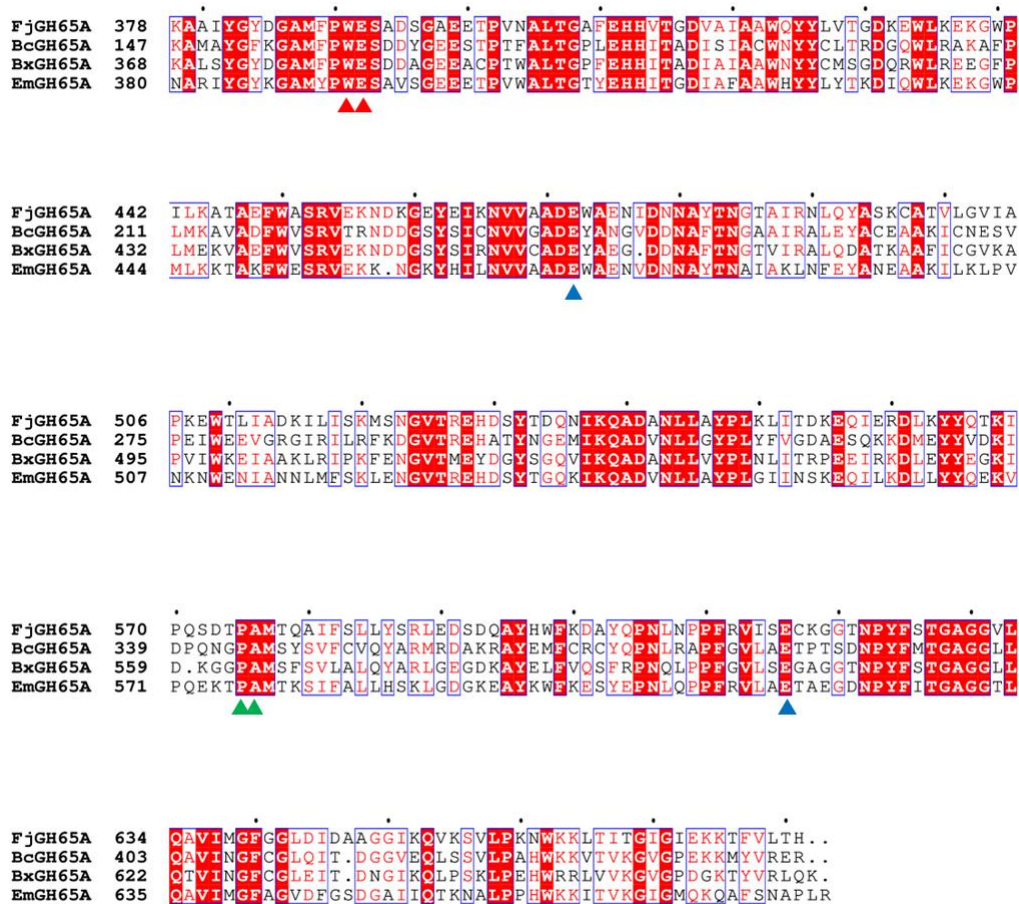


図 2-26. GH65:8.1 に属するタンパク質と FjGH65A とのアラインメント

FjGH65A と GH65:8.1 のアラインメント。Trp391、Gln362、Thr407 に対応するアミノ酸残基は赤い三角形で示した。GH65 GP のリン酸と相互作用するセリン残基と FjGH65A の一般塩基触媒残基に対応するアミノ酸残基を、それぞれ緑色と青色の三角形で示した。Bc, *Bacteroides cellulosilyticus*; Bx, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A; Em, *Elizabethkingia miricola*

2.5. 小括

本章では土壌細菌 *F. johnsoniae* 由来 GH65 タンパク質である FjGH65A の機能と構造を生化学的実験と X 線結晶構造解析を用いて解析した。大腸菌発現系を用いて組換え FjGH65A を調製し、機能解析を行ったところ、FjGH65A は GP ではなく、細菌由来 GH65 酵素で初めての GH であり、グルコースが α -(1 \rightarrow 2)-で結合したコージビオースを特異的に加水分解する GH であった。また、分解産物のアノマーを HPLC によって分析することで、FjGH65A はアノマー反転型の反応機構を介して加水分解反応を触媒することが示された。FjGH65A の立体構造はリガンドフリー構造、グルコース複合体構造、IG2 複合体構造をそれぞれ 1.54 Å、1.40 Å、1.56 Å の分解能で決定した。グルコースはサブサイト-1、+1、+2 に結合しており、IG2 はサブサイト+1 と+2 に結合していた。FjGH65A の全体構造は他の GH65 GP と類似しており、一般酸触媒残基 Glu472 は保存されていた。一方で、FjGH65A では、GH65 GP のリン酸結合部位を形成するアミノ酸配列は保存されていなかった。その代わりに、FjGH65A は一般塩基触媒残基 Glu616 を有していた。Glu616 は既報の GH65 GH で保存されていた。本酵素は kojibiose hydrolase として新しい EC 番号 (EC 3.2.1.216) が付与された。

第3章 多分岐デキストラン分解に関与するタンパク質の構造機能解析

3.1. 緒言

第2章で標的とした FjGH65A はコージビオースやコージオリゴ糖の α -(1→2)-グルコシド結合を加水分解する α -1,2-グルコシダーゼであった。興味深いことに、*fjgh65a* の近傍には *fjdex31a* (エンドデキストラナーゼ) や推定転写調節因子、推定糖トランスポーター、推定糖結合タンパク質の遺伝子が存在していた (図 1-5)。第1章で述べた通り、自然界には α -(1→2)-結合の分岐を有する多分岐デキストランが存在する。よって、FjDexUL は α -(1→2)-分岐を含む多分岐デキストランの資化に関与する PUL であると考えられた。FjGH65A は、B-1299 α -グルカンや S-32 α -グルカンの α -(1→2)-分岐に対してはほとんど活性を示さなかったが、 α -(1→2)-分岐デキストランの部分構造である G2G6G や G2G2G6G に対しては、コージトリオースおよびコージテトラオースに匹敵する活性を示した。これらの結果は FjDexUL に存在する FjGH65A と FjDex31A や他の GH を含む周辺遺伝子産物が、 α -(1→2)-分岐デキストランを分解するために協働しているという仮説を支持した。

FjDexUL は Fjoh_4428-Fjoh_4435 のタンパク質をコードする 8 つの遺伝子からなっており、それぞれ SusR ホモログ (Fjoh_4435, FjDusR)、SusC ホモログ (Fjoh_4434, FjDusC)、SusD ホモログ (Fjoh_4433, FjDusD)、SusE/F ホモログ (Fjoh_4432, FjDusE)、GH66 酵素 (Fjoh_4431, FjGH66)、GH31 エンドデキストラナーゼ (Fjoh_4430, FjDex31A)、GH97 酵素 (Fjoh_4429, FjGH97A)、および GH65 kojibiose hydrolase (Fjoh_4428, FjGH65A) をコードしている。

GH66 にはエンドデキストラナーゼ (EC 3.2.1.11) と cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase (CITase, EC 2.4.1.248) が属している (Suzuki et al., 2014)。FjGH66 は、*B. thetaiotaomicron* および *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 由来のデキストラナーゼ (TpDex) とそれぞれ 47.6% および 39.7% のアミノ酸配列相同性を有していた。さらに、FjGH66 の触媒ドメインには、CITase 特異的 CBM35 ドメイン (環状イソマルトオリゴ糖の生成過程で分子内糖転移反応を促進する) が挿入されていないことから、FjGH66 はデキストラナーゼであると予測された。

GH97 にはアノマー反転型の α -グルコシドヒドロラーゼやアノマー保持型の α -ガラクトシダーや β -L-アラビノピラノシダーゼが分類されている (Gloster et al., 2008; Kikuchi et al., 2017; Kitamura et al., 2008)。FjGH97A は SusB と 69% の配

列相同性を有することから、アノマー反転型の α -グルコシドヒドロラーゼであると予想された。

FjDex31A は GH49 や GH66 のデキストラナーゼとは異なり、デキストランをイソマルトオリゴ糖に加水分解するだけでなく、プルランをイソパノース (α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc-(1 \rightarrow 6)-D-Glc) に加水分解する (Gozu et al., 2016; Tsutsumi et al., 2020)。FjDex31A は IG2 や合成基質である pNP-Glc のような短いオリゴ糖に対しても加水分解活性を示したことから、この酵素が基質によってはエキソ型の GH 特性を持つエンドデキストラナーゼであることが分かった。また、IG2 を基質とした場合に高い糖転移活性を示し、より長いイソマルトオリゴ糖を生成する。さらに、X 線結晶構造解析の結果、FjDex31A は、 β -サンドイッチ構造の N ドメイン、(β/α)₈ バレル構造の触媒ドメイン、proximal C ドメイン、distal C ドメインなど、GH31 酵素の中でよく保存されている 4 つの主要なドメインを含んでいることが明らかになった (図 3-1)。構造既知の GH31 酵素と比較するとエキソ型 GH31 酵素はサブサイト-1 しか持たないが、FjDex31A はサブサイト-1 から -3 を有している (図 3-1)。

第 3 章では遺伝子発現量解析、生化学的解析、X 線結晶構造解析を組み合わせて、FjDexUL 遺伝子の発現量とその産物の生化学的機能を明らかにすることを目的とした。また FjGH97A に関しては当研究室の倉田によって構造機能相関解析が行われた (倉田, 2022)。本章では一部筆者も行った FjGH97 の生化学的性質を記載する。

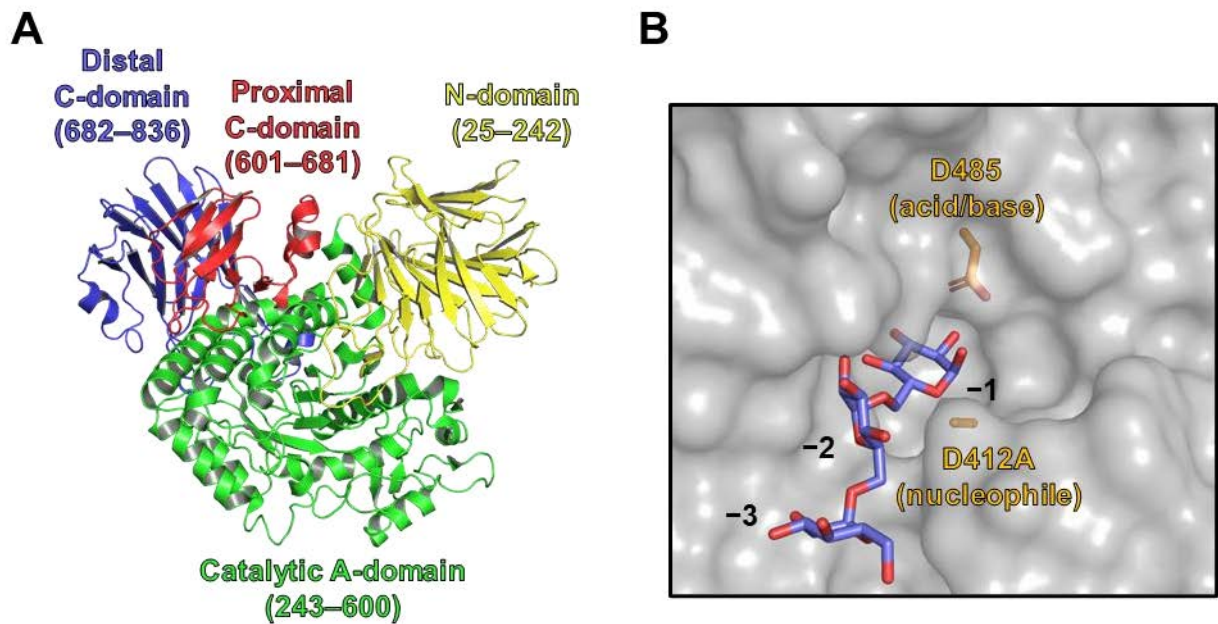


図 3-1. FjDex31A の立体構造

(A) FjDex31A の全体構造。N ドメインは黄色、触媒ドメインは緑色、proximal C ドメインは赤色、distal C ドメインは青色で示した。(B) FjDex31A の活性部位の分子表面モデル。イソマルトトリオースを藍色のスティックモデルで示し、触媒残基をオレンジ色で示した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 試薬類

試薬類は特に断りが無い限り富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) と 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。コージビオース、コージトリオース、ニゲロース、および IG6 は Carbosynth から購入し、IG2、IG3、IG4、IG5、プルランおよびイヌリンは東京化成工業株式会社から購入した。また、IG3、IG4、IG5 は株式会社林原 (Okayama, Japan) から御恵与いただいた。S-32 α -グルカンと S-64 α -グルカンは 2.2.2 の方法で調製した。

3.2.2. qRT-PCR

F. johnsoniae NBRC 14942 (ATCC 17061, UW101) は表 2-3 に示す培地にて 30°C で 48 時間培養した。得られたシングルコロニーを 0.2% 酵母エキスと 0.1% MgSO₄ の 5 mL の液体培地 (表 3-1) に植菌し、30°C、48 時間、130 rpm で前培養した。50 μ L の前培養液を 0.5% (w/v) の糖質 (グルコース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、IG2、可溶性澱粉、プルラン、デキストラン 200,000、S-32 α -グルカン、S-64 α -グルカン) を含む 5ml の液体培地 (表 3-1) に植菌し、30°C、48 時間、130 rpm で振盪培養した。遠心分離 (20,640g, 4°C, 5 min) により培養上清を回収した。RNA 抽出は RNase-free 処理をした実験台や器具を使用して行った。NucleoSpin RNA plus (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて全 RNA を抽出した。NucleoSpin RNA Clean-up (Takara Bio) を用いて残存 DNA を DNase 処理により除去し、NanoDrop 2000c を用いて 260/280 nm および 260/230 nm の吸光度比を算出することにより RNA の質を評価した。その後、1 μ g の RNA を直ちに PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) を用いた逆転写 (37°C で 15 分の後 85°C で 5 秒) によって cDNA を合成した。反応溶液の組成は表 3-2 に示した。*ffdusR*、*ffdusC*、*ffdusD*、*ffdusE*、*ffdex31a*、*ffgh66*、*ffgh97a*、*ffgh65a* の発現量は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を用いた定量 PCR で解析した。反応溶液の組成は表 3-3 に示した。定量 PCR 用のプライマーは、Primer-BLAST サーバー (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて設計した (表 3-4)。PCR のプログラムは Mx3000P システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。PCR の条件は、95°C で 15 秒の熱変性、60°C で 60 秒のアニー

リングと伸長を行った。サイクル数は 40 で行った。データは 16S rRNA 転写発現量で正規化し、発現レベルの変化はグルコースを炭素源とした場合と比較した時の相対値として計算した。全ての実験は 3 連で行った。相対転写産物量の定量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行った。

表 3-1. *F. johnsoniae* 培養用培地*

培地の組成 (100 mL)	
酵母エキス	0.2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
pH 7.0	

*5 mL ずつ分注し、0.5 % (w/v) の糖質を加え、オートクレーブ滅菌 (121°C, 15min) した。

表 3-2. 逆転写の反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
5 × PrimeScript Buffer	4 μL	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μL	
Oligo dT Primer (50 μM)	1 μL	25 pmol
Random 6 mers (100 μM)	1 μL	50 pmol
total RNA	X μL	1 μg
RNase Free dH ₂ O	20-X μL	Up to 20 μL
計	20 μL	

X μL は酵素反応に使用する total RNA の濃度によって異なる。

表 3-3. 定量 PCR の反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
THUDERBIRD [®] Probe qPCR Mix	10 μL	1×
10 μM Forward Primer	1 μL	0.5 μM
10 μM Reverse Primer	1 μL	0.5 μM
50 × ROX reference dye	0.04 μL	0.1×
cDNA	1 μL	
滅菌水	6.96 μL	
計	20 μL	

表 3-4. 使用したプライマー

	Sequence (5'→3') ^a
qRT-PCR 用	
Fj16SrRNA_F	GCAGGATGACGGTCCTATGG
Fj16SrRNA_R	CACGGAGTTAGCCGATCCTT
FjDusR_F	TGTTAGCCTCGAATAGGCGG
FjDusR_R	TGCAAGCGCTCATAGTGATCT
FjDusC_F	CGTCGGCTGTAATGTCCCAT
FjDusC_R	TGATGCTCATTGGCGCAC
FjDusD_F	TTGCGAACCAAATTGAGCGG
FjDusD_R	TTCCCGGTCCTTCGTTATGC
FjDusE_F	CTGTACCATTCTCCGCACCA
FjDusE_R	ATGTCGATACGCCAGAAGCC
FjGH66_F	GTCCTGCTTACGGATGCTGT
FjGH66_R	GAGGATTCAGCTCCGCACT
FjDex31A_F	ACACCAAACACTGCAGCCATCT
FjDex31A_R	GGGATGGGGCTAATTCCGTT
FjGH97A_F	GGAAACATGGCGCAACTACC
FjGH97A_R	TTCCCAGCCTTCGTTCCATC
FjGH65A_F	TGACCCTTCCACGCTTGTAG
FjGH65A_R	AGAAACGGTGGCTAATGGCA
組換えタンパク質発現用	
FjGH66AΔ33-NheI-F	TTTTT <u>GCTAGC</u> GCCGAAGATGCAGTTACTG
FjGH66A-XhoI-R	TTTTT <u>CTCGAG</u> CTATTCAACTACAATCATT
FjGH97AΔ20-NheI-F	TTTTT <u>GCTAGC</u> GATTTAAAATCGCCTGACG
FjGH97A-XhoI-R	TTTTT <u>CTCGAG</u> TCACTTTTTTTTGGCTGCA
FjDusDΔ19-NheI-F	TTTTT <u>GCTAGC</u> AGTGATGATTTTTTAGATA
FjDusD-XhoI-R	TTTTT <u>CTCGAG</u> TAGTAACCTGGATTTTGA
FjDusEΔ28-NheI-F	TTTTT <u>GCTAGC</u> AGCAATGATGATCTTCAGG
FjDusE-XhoI-R	TTTTT <u>CTCGAG</u> TTAGTTGATTGTAAGGACA
FjDusR-PD-NheI-F	TTTTT <u>GCTAGC</u> CAAGGCGGCGAGTTGCTAA
FjDusR-PD-XhoI-R	TTTTT <u>CTCGAG</u> TAAAGACGTTTTCTTTCT

^a 制限酵素認識部位は下線で示した。

3.2.3. 大腸菌での異種発現および精製

組換え FjDex31A の発現プラスミドは東京農工大学の殿塚隆史教授から御恵与いただき、組換え酵素の調製は Gozu ら (Gozu et al., 2016) の方法によって行った。組換え FjGH65A の調製は 2.2.3. の条件で行った。FjGH66、FjGH97A、FjDusD、FjDusE のシグナル配列は SignalP サーバーで評価した (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) (Teufel et al., 2022)。FjDusR のペリプラズムドメイン (PD) は TMHMM サーバーで評価した (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Krogh et al., 2001)。シグナル配列を除いた FjGH66 (GenBank ID, ABQ07435.1)、FjGH97A (ABQ07433.1)、FjDusD (ABQ07437.1)、FjDusE (ABQ07436.1) と FjDusR (ABQ07439.1) の PD の遺伝子は、2.2.3. の条件で培養した *F. johnsoniae* から、KOD ONE DNA polymerase (Toyobo) を用いたコロニーダイレクト PCR により増幅した。PCR の反応溶液の組成は表 3-5 に示した。PCR の条件は [98°Cを 10 秒、52°Cを 5 秒、68°Cを 10 秒] を 30 サイクル行った。使用したプライマーは表 3-4 に示した。増幅された遺伝子産物を、NheI および XhoI を用いて pET28a (+) に組み込んだ。これらのプラスミドを用いて、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。得られたシングルコロニーを 50 µg/mL カナマイシンを添加した 10 mL (100 mL の三角フラスコ) の LB 培地に植菌し、37°C、24 時間、120 rpm でバイオシェーカー BR-53FP を用いて前培養を行った。10 mL の前培養液を 1 L (3 L のバッフル付き三角フラスコ) の LB 培地に加え、OD₆₀₀ が 0.6–0.8 になるまで 37°C、120 rpm で培養し、終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、20°C、24 時間、120 rpm で発現誘導を行った。誘導後の培養液を 500 mL 分ずつ集菌し、上清を捨て、30 mL の 300 mM NaCl、20 mM imidazole を含む 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) を加え、15 分間の超音波破碎を行った。遠心分離 (20640×g, 4°C, 30 min) して上清を移した。オープンカラムに 5 mL の Ni-Sepharose excel を加え、50 mL の超純水を加え洗浄した。20 mL の 300 mM NaCl、20 mM imidazole を含む 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) を加えてカラムの平衡化を行った。そこに各種タンパク質の発現誘導を行った大腸菌の可溶性画分を加えた。吸着後、平衡化に用いたバッファーを加え、280 nm における吸光度が 0.01 以下になるまで洗浄を行った。洗浄後、20 mL の 300 mM NaCl、100–500 mM imidazole を含む 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) を加えて素通り画分を回収した。精製後、10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを

用いた SDS-PAGE を行い、CBB 染色で精製の確認を行った。また、250 mM imidazole 溶出画分を Amicon ultra 30,000 を用いた限外濾過によって 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) バッファーに置換した。FjGH66 は、Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーでさらに精製した。平衡化は 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) で行い、0 から 1 M NaCl までの直線勾配で溶出した。FjGH97A は、Mono S 5/50 GL (GE Healthcare) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでさらに精製した。平衡化は 20 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 7.5) で行い、0 から 1 M NaCl までの直線勾配で溶出した。マーカーはタンパク質マーカー (Nacalai Tesque, M.W. 6,500–200,000) を使用した。酵素濃度は ExPASy ProtParam を用いて計算したモル吸光係数 (FjGH65A: 18640 $M^{-1} cm^{-1}$, FjGH66: 15,295 $M^{-1} cm^{-1}$, FjGH97A: 150,705 $M^{-1} cm^{-1}$, FjDex31A: 192,935 $M^{-1} cm^{-1}$, FjDusD : 82,405 $M^{-1} cm^{-1}$ 、FjDusE : 95,715 $M^{-1} cm^{-1}$) 基づき 280nm での吸光度を NanoDrop 2000c で測定することで算出した。

表 3-5. PCR 反応液の組成

試薬	液量	終濃度
2× KOD One [®] PCR Master Mix	10 μ L	1×
10 μ M Forward Primer	0.6 μ L	0.3 μ M
10 μ M Reverse Primer	0.6 μ L	0.3 μ M
テンプレート	コロニー	
滅菌水	8.8 μ L	
計	20 μ L	

3.2.4. 酵素反応

各種酵素の基質特異性を評価するために、FjDex31A (100 µg/mL) と FjGH66 (100 µg/mL) を 10 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) 中で 10 mM のオリゴ糖または 1% (w/v) 多糖と 30°C で 1 時間反応させた。FjGH97A (100 µg/mL) は Britton-Robinson バッファー (pH 7.0) 中で 10 mM オリゴ糖または 1% (w/v) 多糖と 30°C で 1 時間反応させた。反応液の組成を表 3-6 に示した。反応溶液を TLC で分析した。各サンプル 1.5 µL を Silica Gel 60 (Merck) の TLC プレートにスポットし、ニトロメタン:1-プロパノール:水=4:10:3 で展開した。展開したプレートをドライヤーで乾燥させ、5% (v/v) 硫酸含有メタノール溶液を噴霧し、エコノミーホットプレート (EHP-250N, AS ONE, Osaka, Japan) を使用し、120°C で加熱することで検出した。

表 3-6 TLC 用の酵素反応の組成

試薬	液量	終濃度
100 µg/mL FjDex31A、100 µg/mL FjGH66、100 µg/mL FjGH97A	2 µL	10 µg/mL
100 mM オリゴ糖または 10% (w/v) 多糖	2 µL	10 mM
100 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) (FjDex31A と FjGH66)	2 µL	10 mM
Britton-Robinson バッファー (pH 7.0) (FjGH97A)		
超純水	14 µL	
計	20 µL	

IG2、IG3、IG4、パノース、デキストラン 40,000、デキストラン 200,000、プルラン、S-64 α-グルカン、S-32 α-グルカンに対する FjDex31A および FjGH66 の比活性を算出した。遊離したグルコースはラボアッセイ™ グルコース (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて GOD-POD 法で定量し、遊離した還元糖量は Somogyi-Nelson 法 (Somogyi, 1952; Nelson, 1944) で定量した。Somogyi-Nelson 法の反応条件を以下に記載した。また、以降の実験でも同様の手法で行った。酵素反応溶液 50 µL に Somogyi 試薬 (アルカリ性銅試薬) を 50 µL 加え、100°C で 20 分間静置し、Cu₂O を生成させる。その後、溶液を冷却し、Nelson 試薬 (ヒ素モリブデン酸塩試薬) を 100 µL 加えて常温で 20 分間反応させた。生成したモリブデン青を 520 nm の波長で測定することで還元糖量を算出した。酵素反応は、100

μg/mL FjDex31A または 100 μg/mL FjGH66、4 mM オリゴ糖または 0.5% (w/v) 多糖、50 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) を含む 50 μL の反応溶液で、30°C で行った。酵素反応溶液の組成は表 3-7 に示した。反応は 2–30 分間行い、5 分間煮沸して反応を停止させた。

表 3-7. 酵素反応の組成

試薬	液量	終濃度
1 mg/mL FjDex31A、1 mg/mL FjGH66	5 μL	100 μg/mL
10 mM オリゴ糖または 5% (w/v) 多糖	20 μL または 5 μL	4 mM または 0.5% (w/v)
100 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5)	25 μL	50 mM
超純水	0 μL または 15 μL	
計	50 μL	

至適 pH を決定するために、1 mM pNP-Glc に対して 1 μg/mL FjGH97A を含む Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) で、30°C で 3 分間反応を行った。また、0.5% (w/v) デキストラン 40,000 に対して 10 μg/mL FjGH66 を含む Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) で、30°C で 10 分間反応を行った。FjGH97A の場合、至適温度は 20°C–70°C で、1 μg/mL FjGH97A と 10 mM pNP-Glc を Britton-Robinson バッファー (pH 7.0) 中、3 分間反応させた。FjGH66 の場合、至適温度は 25°C–70°C で、10 μg/mL の FjGH66 と 0.5% (w/v) デキストラン 40,000 を 50 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) 中で 10 分間反応させた。pH 安定性を測定するために、5 μL の 5 mg/mL の FjGH66 と 45 μL の Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) を混合し、4°C で 17 時間インキュベートした。FjGH66 の濃度を 10 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 7.0) で 100 μg/mL に希釈した。温度安定性を測定するために、100 μg/mL の FjGH66 を、10 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 7.0) 中、25–70°C で 30 分間インキュベートした。残存活性は、10 μg/mL の FjGH66、0.5% (w/v) のデキストラン 40,000、および 50 mM の MES-NaOH バッファー (pH 5.5) を含む 50 μL の混合溶液中で、30°C で 10 分間反応した。全ての反応は、5 分間煮沸して停止させた。生成した還元糖を Somogyi-Nelson 法で定量した。酵素反応溶液の組成は表 3-8 と 3-9 に示した。

表 3-8. FjGH97A 反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
10 µg/mL FjGH97A	5 µL	1 µg/mL
5 mM pNP-Glc	10 µL	1 mM
Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) (至適 pH)	25 µL	
Britton-Robinson バッファー (pH 7.0) (至適温度)		
超純水	10 µL	
計	50 µL	

表 3-9. FjGH66 反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
100 µg/mL FjGH66	5 µL	10 µg/mL
5% (w/v) デキストラン 40,000	5 µL	0.5% (w/v)
Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) (至適 pH)	25 µL	
100 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) (至適温度, pH 安定性, 温度安定性)		50 mM
超純水	15 µL	
計	50 µL	

反応速度論パラメータを決定するために、各基質について少なくとも 5 つの濃度で測定し、Enzyme_Kinetics_Calculator (Kitaoka, 2023) を用いて Michaelis-Menten 式にフィッティングした。酵素反応は 0.1–20 mM の IG2、IG3、コージビオース、ニゲロース、マルトースおよび 0.1–2% (w/v) のデキストラン 40,000 とデキストラン 200,000 に対して、10 µg/mL (0.12 µM) の FjGH97A、100 µg/mL (1.5 µM) の FjDex31A、および 10 µg/mL (0.15 µM) の FjGH66 を反応させることで行った。反応は 30°C で 2 分間行った。反応溶液の組成は表 3-10 と 3-11 に示した。各酵素反応は 3 回行った。

表 3-10. FjGH97A 反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
100 µg/mL FjGH97A	5 µL	10 µg/mL
100 mM IG2、IG3、コージビオース、ニゲロース、マルトース	X µL	0.1–20 mM
100 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 7.5)	25 µL	50 mM
超純水	50–X µL	Up to 50 µL
計	50 µL	

X µL は酵素反応に使用する基質濃度によって異なる。

表 3-11. FjDex31A と FjGH66 反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
1 mg/mL FjDex31A、100 µg/mL FjGH66	5 µL	100 µg/mL または 10 µg/mL
10% (w/v) のデキストラン 40,000、 10% (w/v) デキストラン 200,000	X µL	0.1–2% (w/v)
100 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5)	25 µL	50 mM
超純水	50–X µL	Up to 50 µL
計	50 µL	

X µL は酵素反応に使用する基質濃度によって異なる。

3.2.5. FjDexUL GHs による多分岐デキストランに対する相乗効果

FjDexUL GHs が相乗的に多分岐デキストランを分解するかどうかを解析した。酵素反応はそれぞれ 100 µg/ml の FjDexUL GHs (FjGH65A, FjGH97A, FjGH66, FjDex31A)、0.5% (w/v) デキストラン 200,000、S-64 α-グルカン、S-32 α-グルカン、50 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) を含む 50 µL の反応溶液で、30°C で行った。反応溶液の組成を表 3-12 に示した。反応は 10 分間または 24 時間行った。生成したグルコースは GOD-POD 法で定量した。また、反応溶液を TSK-GEL amide-80 column (4.6 mm×250 mm) にアプライし、60% (v/v) アセトニトリルを用いて流速 1.0 mL/min、30°C で溶出した。生成物は示差屈折率検出器 (RID-10A) を用いて検出した。標準物質として 10 mM のグルコース、IG2、IG3、IG4、IG5 の保持時間も同様に測定した。

表 3-12. 酵素反応溶液の組成

試薬	液量	終濃度
各種 1 mg/mL FjGH65A、FjGH97A、FjGH66、FjDex31A	5 μ L	100 μ g/mL each
5% (w/v) 多糖	5 μ L	0.5% (w/v)
100 mM MES-NaOH バッファー(pH5.5)	25 μ L	50 mM
超純水	15 μ L	
計	50 μ L	

3.2.6. X 線結晶構造解析

FjGH66 (20 mg/mL) はハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°Cで結晶化させた。結晶化条件のスクリーニングは Crystal Screen、Crystal Screen 2、PEG/Ion Screen、PEG/Ion 2 Screen キットを用いて行った。タンパク質溶液 1 μ L に 0.1 M Tris-HCl バッファー (pH 8.5 または 9.0)、0.2 M 硫酸リチウム、20% (v/v) PEG 4000 (Hampton Research) からなるリザーバー溶液を等量混合することで結晶を調製した。グルコースおよび IG2 複合体構造の決定のため、FjGH66 の結晶を 10 mM のグルコースまたは IG2 を含むリザーバー溶液に 1 分間浸すことで調製した。また、IG3 複合体構造の決定のため、10 mM IG3 を含むリザーバー溶液を用いて FjGH66 を共結晶化することで結晶を調製した。抗凍結剤として 20% (v/v) グリセロールを含むリザーバー溶液で結晶を保護し、液体窒素中で急速凍結した。X 線回折強度測定は BL5A ビームラインを利用して行った。1 秒間の X 線照射を 0.5 度の振動角で行い、得られた 720 枚の回折像から XDS (Kabsch, 2010) を用いて格子定数および空間群を決定し、CCP4i2 (Potterton et al., 2018) に実装されている AIMLESS を用いてスケーリングした。初期位相の決定は AlphaFold2 モデルを鋳型として、分子置換プログラム MOLREP (Vagin and Teplyakov, 2010) を用いて決定した。手動でのモデル構築には COOT (Emsley et al., 2010) により行い、精密化には REFMAC5 (Murshudov et al., 2011) を使用した。立体構造の図は PyMol を用いて作成した。構造類似性の検索は Dali サーバーを用いて行った。X 線回折強度測定に関するパラメータは表 3-13 にまとめた。AlphaFold2 モデルは全て AlphaFold Protein Structure Database (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) からダウンロードした。

表 3-13. FjGH66 の X 線回折強度測定と精密化に関するパラメータ

	FjGH66 unliganded	FjGH66/glucose	FjGH66/IG2	FjGH66/IG3
Data collection				
Beamline	PF BL5A	PF BL5A	PF BL5A	PF BL5A
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	C2	C2	C2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁
Unit cell				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , (Å)	76.5, 48.4, 155.7	155.2, 48.4, 76.5	153.7, 48.0, 76.5	41.9, 91.1, 137.4
β (°)	103.775	104.405	104.640	90
Resolution range (Å)	47.26–1.85	47.21–1.80	46.86–1.80	45.78–1.18
Total reflections	299826	339941	334449	2165495
Unique reflections	47439	50429	50250	173012
Completeness (%)	99.7 (100.0)	98.3 (97.0)	99.7 (99.3)	99.9 (99.0)
R_{merge}	0.112 (0.875)	0.132 (0.963)	0.121 (0.920)	0.063 (0.975)
$CC_{1/2}$	0.995 (0.870)	0.997 (0.845)	0.997 (0.839)	1.000 (0.804)
Mean $I/\sigma(I)$	10.1 (1.9)	10.3 (2.1)	11.0 (2.3)	19.0 (2.5)
Redundancy	6.3 (6.7)	6.7 (7.0)	6.7 (6.8)	12.5 (12.0)
Refinement statistics				
Resolution (Å)	1.85	1.80	1.80	1.18
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.175/0.230	0.206/0.259	0.208/0.253	0.163/0.190
No. of atoms				
Protein	4373	4367	4398	4386
Ligand/Ion	6/6	36/1	35/1	39/3
Water	355	263	268	540
Mean <i>B</i> factor (Å ²)				
Protein	35.1	29.0	30.7	16.1
Ligand/Ion	38.1/38.1	27.0/29.9	30.9/32.3	15.4/15.7
Water	33.2	26.3	29.8	20.7
RMSD ^a				
Bond lengths (Å)	0.0154	0.0154	0.0083	0.0098
Bond angles (°)	2.151	2.165	1.501	1.648
Ramachandran plot				
Favored (%)	96.49	96.32	98.01	96.69
Outliers (%)	0	0	0.18	0.18
Clashscore	2.91	5.80	3.34	2.42

^a Root mean square deviation

3.2.7. アフィニティ電気泳動

0.5% (w/v) 多糖 (デキストラン 200,000, S-32 α -グルカン, S-64 α -グルカン, 可溶性澱粉, イヌリン) を含む 8% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (SDS 不含有) を用いた。7.5 μ g の FjDusD、5 μ g の FjDusE とウシ血清アルブミン (BSA) を各種ゲルに供し、陽極バッファーとして 0.1 M Tris-HCl バッファー (pH 7.8)、陰極バッファーとして 0.068 M グリシン-Tris-HCl バッファー (pH 8.9) を充填し、80 V、室温で 3 時間、非変性条件下で電気泳動した。タンパク質は CBB で染色した。

3.2.8. 等温滴定カロリメトリー (ITC)

全ての ITC による実験は、25°C に設定された MicroCal iTC200 (Malvern Panalytical Ltd, Enigma Business Park, UK) を用いて行った。滴定は 10 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 7.0) で行った。精製した 0.1 mM の FjDusD と FjDusE をサンプルセルに供し、シリンジに 5 mM の IG5 と IG6、10 mM のコージビオース、コージトリオース、ニゲロース、マルトース、マルトトリオース、IG2、IG3、IG4 を充填した。1 回目の滴定はダミーサイクルとして滴定量は 0.2 μ L とした。その後、150 秒間隔で 2 μ l を 19 回滴定し、滴定の持続時間は 4 秒とした。滴定結果はデータ解析ソフト MicroCal Origin ITC (Malvern Panalytical Ltd,) を使用して分析した。結合定数は、リガンド濃度を変数として、タンパク質のリガンドとの結合部位を一か所 (n=1) として算出した。本実験は少なくとも 3 回行い、平均値と標準誤差を算出した。

3.3. 結果

3.3.1. FjDexUL 遺伝子産物の発現と精製

FjGH66、FjDusD、FjDusE はタイプ II のシグナル配列を持つと予測され、リポタンパク質として細胞外膜に結合している可能性が高い。また、FjDex31A、FjGH97A、および FjGH65A はタイプ I のシグナル配列を持つと予測された。既報の PUL では、タイプ I のシグナル配列を持つ GH はペリプラズムに局在していた (D'Elia and Salyers, 1996; Joglekar et al., 2018; Smith et al., 1991; Sonnenburg et al., 2010)。そのため、FjDex31A、FjGH97A、FjGH65A はペリプラズムに局在している可能性が高い。FjDusR には SusR と同様に 2 か所の膜貫通領域を有すると予想され、PD と細胞質ドメインで構成されていると考えられた (図 3-2)。

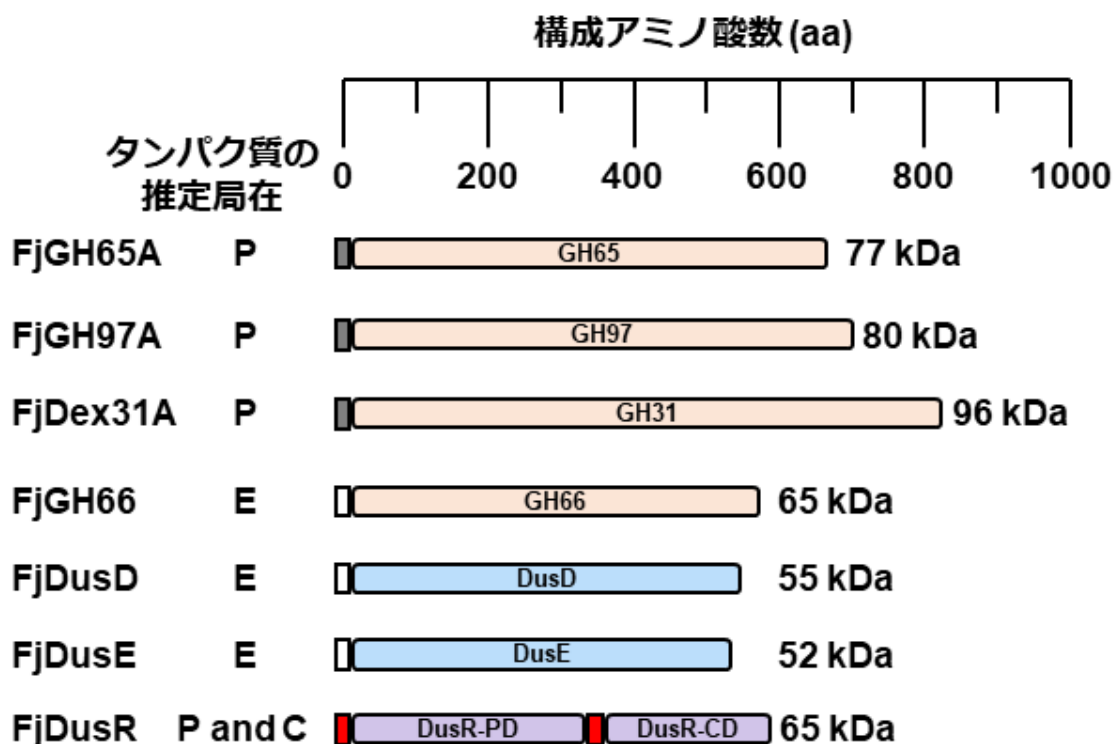


図 3-2. FjDexUL 遺伝子産物の分子量

タイプ I のシグナル配列を白色、タイプ II のシグナル配列を灰色、膜貫通領域を赤色、GH をオレンジ色で、糖結合タンパク質を青色で示した。P はペリプラズム、E は細胞外、C は細胞質、PD はペリプラズムドメイン、CD は細胞質ドメインを示す。

組換え FjGH97A、FjGH66、FjDex31A、FjDusD、FjDusE は各種クロマトグラフィーによって単一バンドに精製できた (図 3-3)。一方で、組換え FjDusR-PD は本研究で構築した発現コンストラクトでは調製することができなかった。

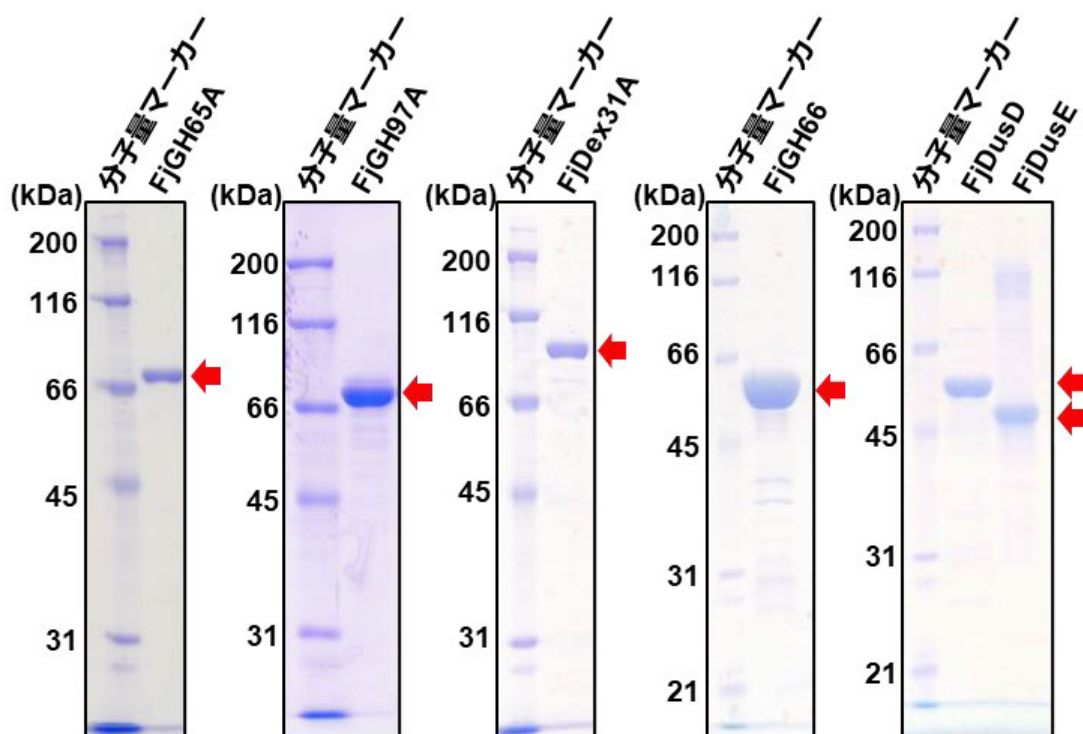


図 3-3. FjDexUL 遺伝子産物の精製

精製した FjDexUL 遺伝子産物の SDS-PAGE 解析。赤矢印は各種精製タンパク質を示す。

PULDB で GH31 と GH66 の遺伝子を含む PUL を検索したところ、*F. johnsoniae* 以外の Bacteroidota 門で 70 個の PUL が見つかった。しかし、これらの PUL のうち、GH65 遺伝子が観察された PUL は 11 個のみであった。また、GH97 タンパク質を含まない PUL もいくつか存在した (図 3-4)。

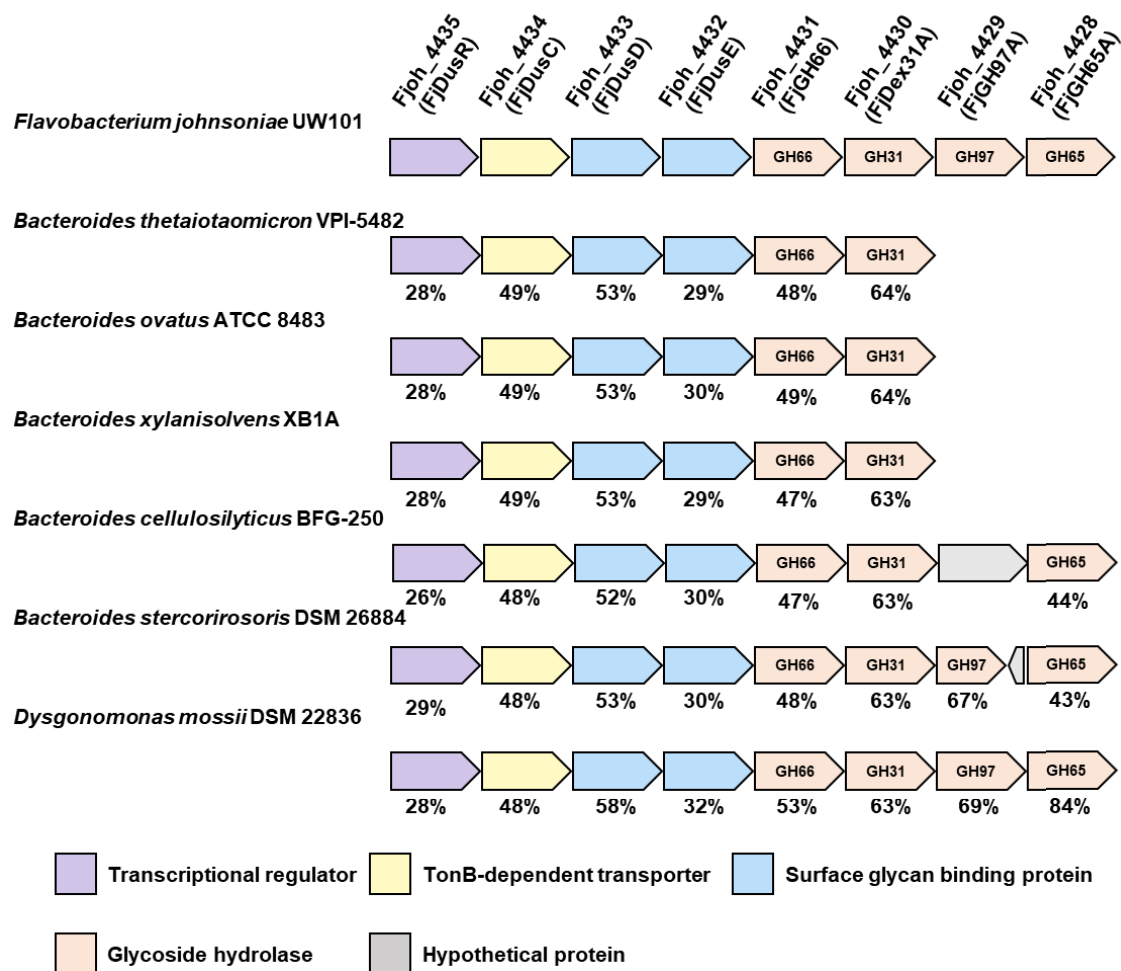


図 3-4. Bacteroidota 門細菌におけるデキストラン資化遺伝子群

FjDexUL と Bacteroidota 門細菌由来の GH66 および GH31 タンパク質の遺伝子を含む PUL の模式図。各 PUL は PULDB から引用した。転写制御因子を紫色、TonB 依存性トランスポーターを黄色、糖結合タンパク質を青色、GH をオレンジ色、機能未知タンパク質を灰色で示した。各タンパク質の FjDexUL タンパク質に対するアミノ酸配列の相同性は、各遺伝子の模式図の下に示した。

3.3.2. 炭素源の違いによる FjDexUL 遺伝子発現量の違い

どのような糖質が FjDexUL 遺伝子の発現を誘導するのかを明らかにするために、*F. johnsoniae* を異なる炭素源を含む培地で培養し、qRT-PCR により FjDexUL 遺伝子の発現量を定量した。S-32 α -グルカンで培養した場合、*ffdusC* の転写発現量はグルコースで培養した場合と比べて 50 倍に増加した (図 3-5)。また、S-64 α -グルカン、デキストラン 200,000、コージビオース、IG2 を炭素源とした場合では、グルコースを炭素源とした場合と比較して、*ffdusC* の発現量は約 10 倍増加した (図 3-5)。一方、可溶性澱粉、プルラン、ニゲロース、マルトースを炭素源として培養した場合は、グルコースで培養した場合と比較して発現量に有意な変化は見られなかった (図 3-5)。さらに、S-32 α -グルカンを炭素源として培養した場合、FjDexUL に存在する全ての遺伝子 (*fjgh65a*, *fjgh97a*, *fjdex31a*, *fjgh66*, *ffdusE*, *ffdusD*, *ffdusR*) の発現量がグルコースを炭素源とした場合と比較すると顕著に上昇した (図 3-5)。

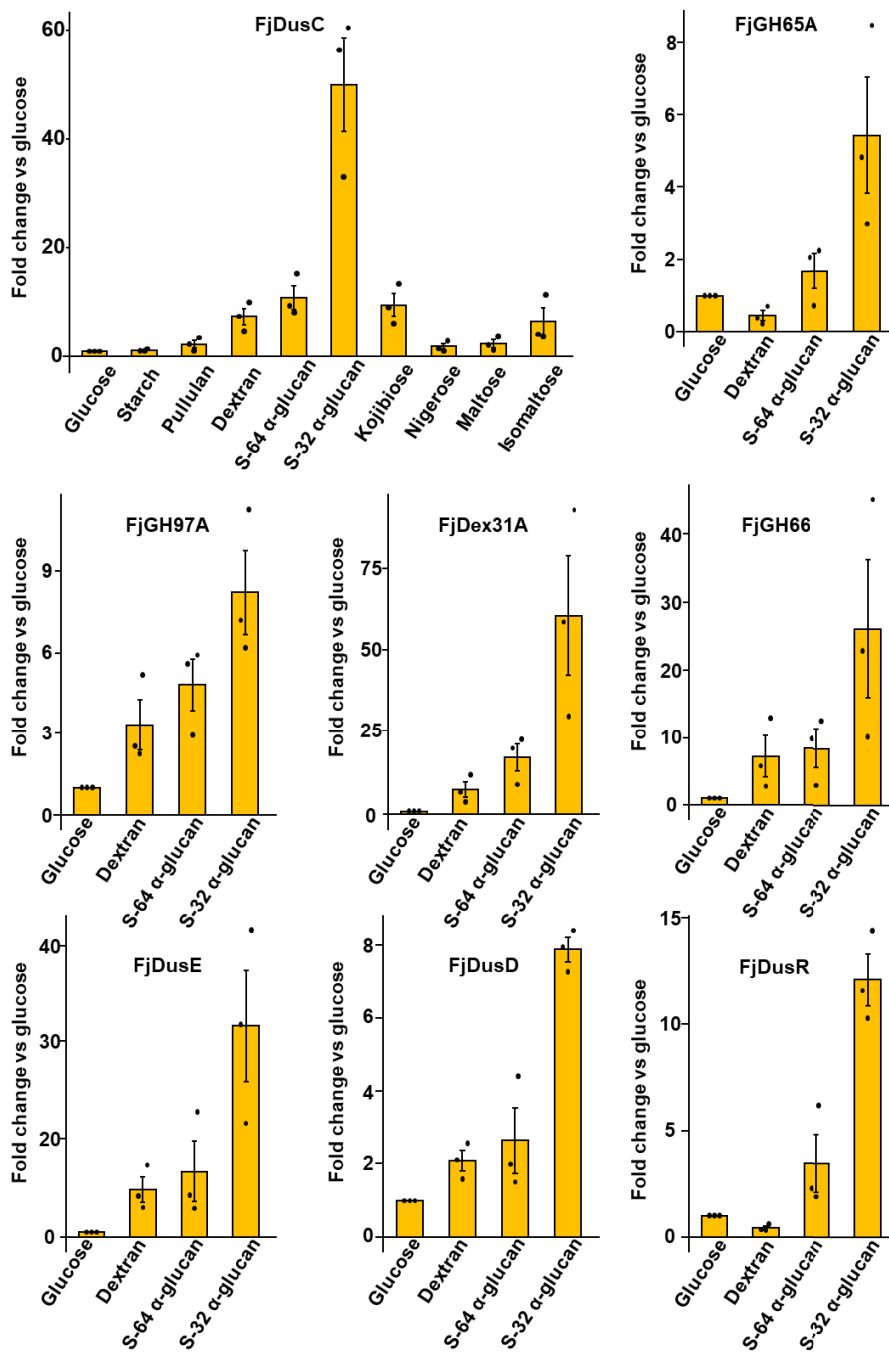


図 3-5. FjDexUL 遺伝子の発現量

グルコース、オリゴ糖、多糖を炭素源として培養した *F. johnsoniae* における FjDexUL 遺伝子の発現量を示した。グルコースを炭素源としたときの発現量を 1 とした。

3.3.2. FjGH66 の機能解析

FjGH66 は、デキストラン 40,000 を基質として用いたとき、pH 5.5 と 45°C で最高の加水分解活性を示し、pH 4.0–11.0 と 40°C までで残存活性 80% 以上を示した (図 3-6)。

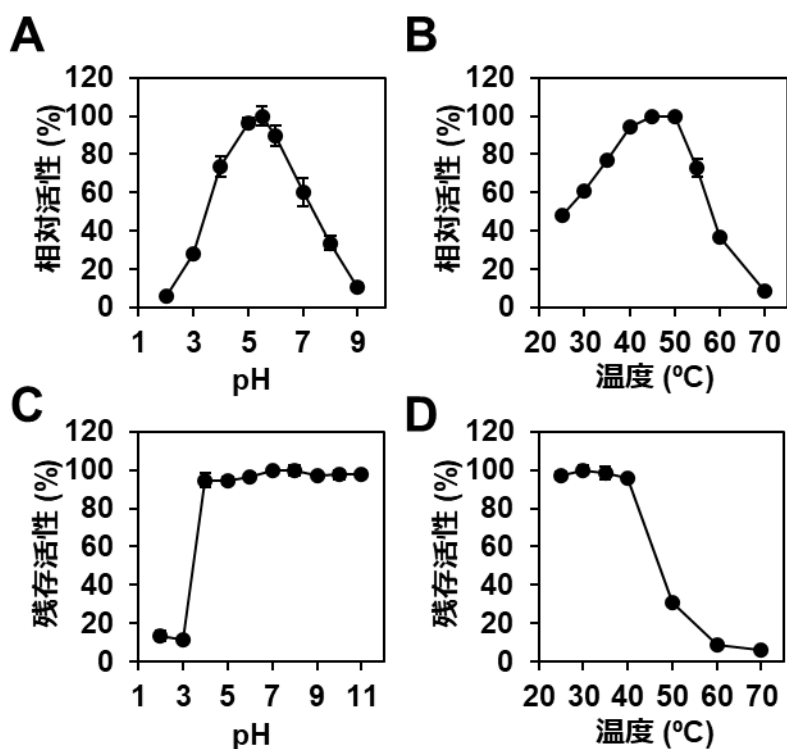


図 3-6. FjGH66 の諸性質

(A) 至適 pH。(B) 至適温度。(C) pH 安定性。(D) 温度安定性。至適 pH は酵素反応を 30°C で行い、Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–9.0) を使用した。至適温度は 50 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) を使用し、25°C から 70°C で行った。pH 安定性は酵素反応を 30°C で行い、Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) を使用した。温度安定性は 50 mM MES-NaOH バッファー (pH 5.5) を使用し、25°C から 70°C で行った。至適 pH と至適温度は最も高い比活性を示した条件の値 (20.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 30.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を 100% として相対活性を求めた。pH 安定性と温度安定性は最も高い比活性を示した条件の値 (21.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 18.7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を 100% として残存活性を求めた。

FjGH66 はデキストラン 40,000 に対して高い加水分解活性を示し、グルコース、IG2、IG3、IG4、IG5 を生成した (図 3-7, 表 3-14)。FjGH66 は IG3、IG4、IG5 をよく加水分解するが、IG2 に対してはほとんど加水分解活性を示さなかった。(図 3-7)。また、FjGH66 は IG3 を基質とした場合、糖転移反応産物と思われるスポットが確認された (図 3-7)。FjGH66 の IG3 と IG4 に対する比活性はデキストランを基質とした場合と比べると約 1000 倍低かった (表 3-14)。FjGH66 は S-32 α -グルカンと S-64 α -グルカンに対しても加水分解活性を示し、グルコースとイソマルトースのスポットと原点より少し上に長鎖の多分岐デキストラン分解産物と思われるスポットが確認できた (図 3-7, 表 3-14)。一方で、可溶性澱粉とプルランに対しては加水分解活性が認められなかった (図 3-7, 表 3-14)。デキストラン 40,000 とデキストラン 200,000 の反応速度論パラメータはほぼ同程度であったが、わずかに差が見られた。したがって、FjGH66 の加水分解活性は基質の分子量に影響されている可能性がある (表 3-15)。

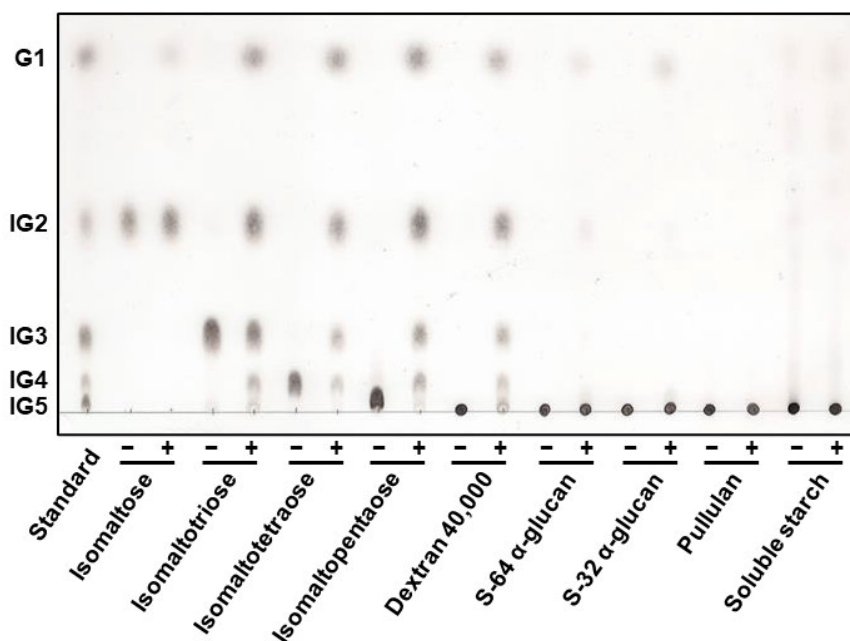


図 3-7. FjGH66 の基質特異性

10 mM の各種オリゴ糖と 1% (w/v) の多糖を基質として FjGH66 を 30°C で 1 時間作用させた反応溶液を TLC で解析した。それぞれの酵素反応溶液、基質混合物、イソマルトオリゴ糖 (G1, グルコース; IG2, イソマルトース; IG3, イソマルトトリオース; IG4, イソマルトテトラオース; IG5, イソマルトペンタオース) をスポットし、展開溶媒 (ニトロメタン:1-プロパノール:水=4:10:3) で展開した。

表 3-14. FjGH66 の比活性

Enzyme	Substrate	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
FjGH66	Dextran 40,000 (0.5% w/v)	21.4 ± 0.47^a
	Dextran 200,000 (0.5% w/v)	13.6 ± 0.63^a
	S-64 α -glucan (0.5% w/v)	$(9.56 \pm 0.52) \times 10^{-2}^a$
	S-32 α -glucan (0.5% w/v)	0.153 ± 0.011^a
	Pullulan (0.5% w/v)	N.D. ^b
	Isomaltose (4 mM)	$(9.12 \pm 0.59) \times 10^{-3}^c$
	Isomaltotriose (4 mM)	$(5.76 \pm 0.17) \times 10^{-2}^c$

^a Somogyi–Nelson 法で還元糖量を定量した。

^b N.D., not detected.

^c GOD-POD 法でグルコース量を定量した。

表 3-15. FjGH66 の反応速度論パラメータ

Enzyme	Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
FjGH66	Dextran 40,000	0.165 ± 0.014^a	49.1 ± 1.81	3.07×10^2
		$(6.62 \pm 0.52 \text{ mg/mL})$		$(7.42 \text{ s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mL})$
	Dextran 200,000	$(2.19 \pm 0.27) \times 10^{-2}^a$	29.7 ± 1.14	1.36×10^3
		$(4.38 \pm 0.54 \text{ mg/mL})$		$(6.78 \text{ s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mL})$

^a デキストランの平均分子量から算出した。

3.3.3. FjGH66 の立体構造

FjGH66 の基質認識機構を解明するため、FjGH66 の X 線結晶構造解析を行った (図 3-8A, B)。FjGH66 のリガンドフリー構造、グルコース複合体構造、IG2 複合体構造、IG3 複合体構造をそれぞれ 1.85 Å、1.80 Å、1.80 Å、1.18 Å の分解能で決定した。FjGH66 は結晶学的非対称単位中に 1 分子存在し、それぞれの構造の活性部位に 1 分子のグルコース、IG2、IG3 が結合していた (図 3-8C)。

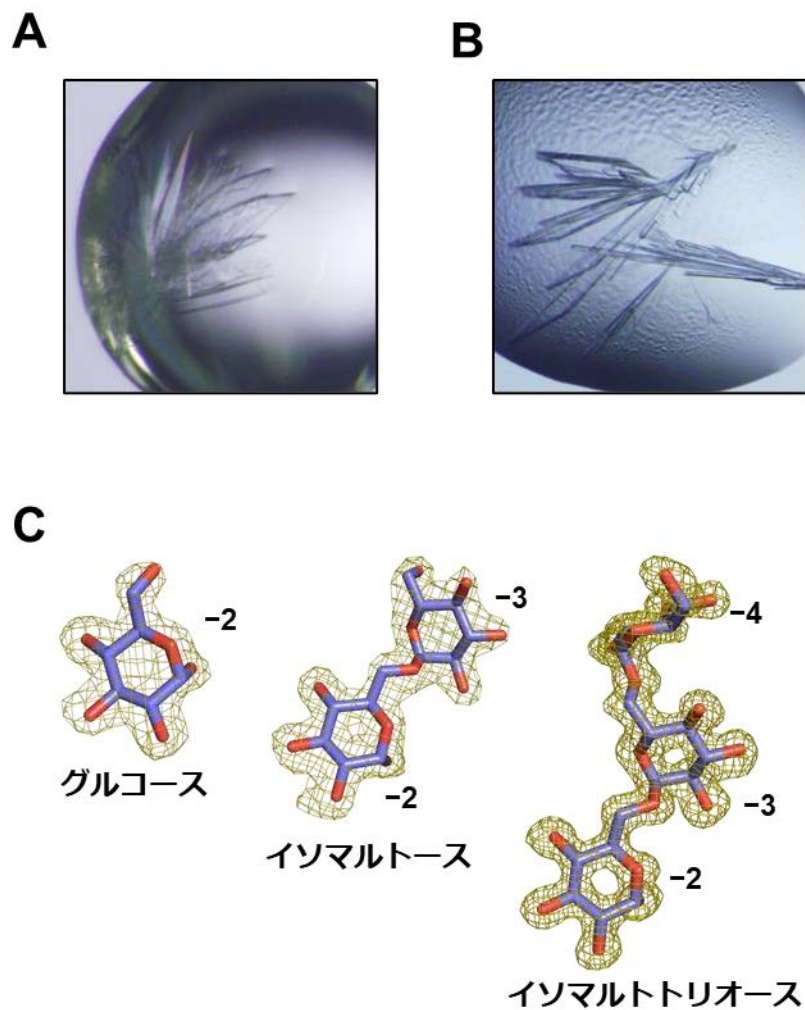


図 3-8. FjGH66 の活性部位に結合したリガンド

(A) FjGH66 の結晶。(B) FjGH66 の IG3 との共結晶。(C) FjGH66 に結合しているグルコース、IG2、IG3 のスティックモデル。リガンドの $F_o - F_c$ map (3σ) はオレンジ色のメッシュで示した。

IG3 複合体構造を除く全ての結晶は空間群 $C2$ に属し、IG3 複合体構造の空間群は $P2_12_12_1$ であった。全ての立体構造の全体構造はほぼ一致した ($\text{rmsd } 0.304 < C\alpha \leq 0.472 \text{ \AA}$)。よって、以降の説明は主に 1.18 \AA 分解能の IG3 複合体構造に基づいて記載する。FjGH66 単量体は N 末端の免疫グロブリン様 N ドメイン (41–126 残基)、 $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造の触媒ドメイン (127–464 残基)、C 末端の β -サンドイッチ C ドメイン (465–586 残基) の 3 つのドメインから構成されていた (図 3-9)。Dali サーバーを用いた構造類似性検索の結果、FjGH66 は TpDex (PDB 5AXG, $\text{rmsd}=1.8$, $Z\text{-score}=49.1$, 配列相同性=40%) に最も類似しており、*Paenibacillus agaridevorans* T-3040 由来の CITase (PDB 3WNO, $\text{rmsd}=1.9$, $Z\text{-score}=46.1$, 配列相同性=33%) や *Streptococcus mutans* 由来のデキストラナーゼ (SmDex, PDB 3VMP, $\text{rmsd}=2.5$, $Z\text{-score}=38.8$, 配列相同性=24%) などとも類似していた (図 3-9)。

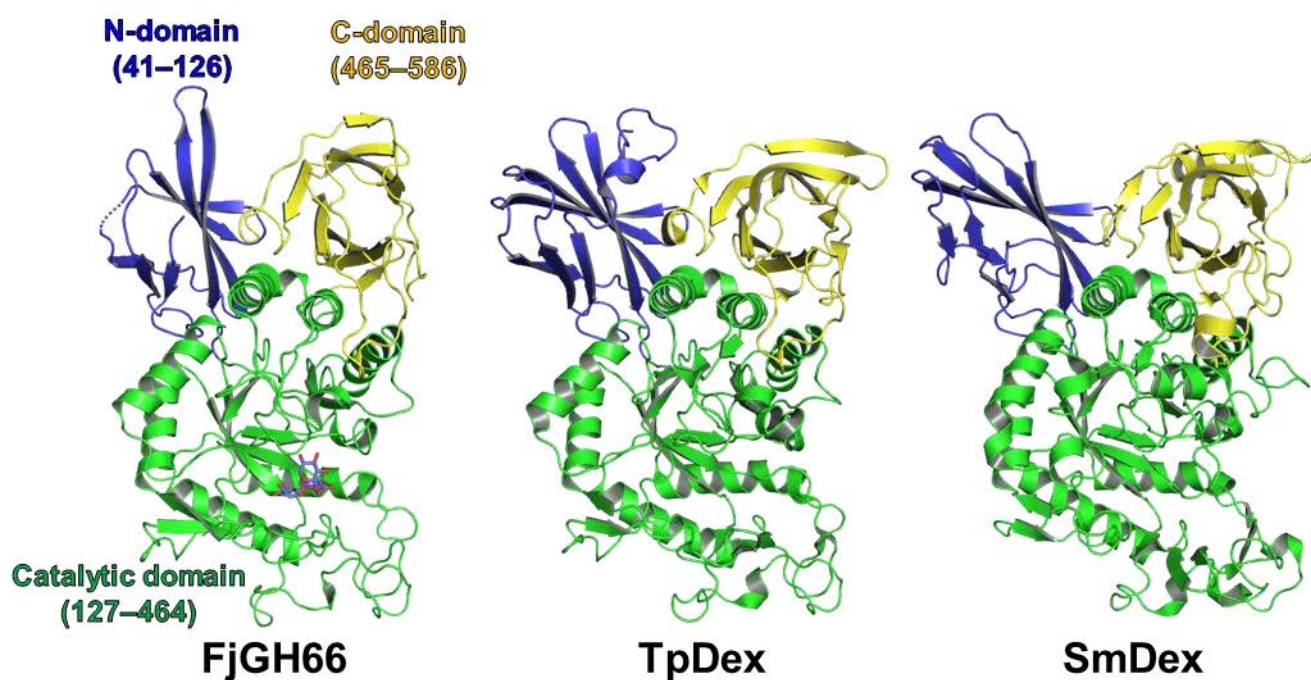


図 3-9. FjGH66 と構造既知 GH66 酵素の全体構造

N ドメインは青色、触媒ドメインは緑色、C ドメインは黄色で示した。結合している IG3 は藍色のスティックモデルで示した。

IG3 はサブサイト-4 から-2 に結合しており、各種グルコースを非還元末端から Glc-4、Glc-3、Glc-2 と命名した。全てのグルコース残基は 4C_1 コンフォメーションであった。FjGH66 の求核触媒残基と一般酸/塩基触媒残基はそれぞれ Asp293 と Glu355 と示唆された (図 3-10)。また、サブサイト-3 から+1 を形成するアミノ酸残基は、FjGH66 と既知 GH66 酵素の間で保存されていた (図 3-11A, B)。FjGH66 が多分岐デキストランを認識できるかどうかを明らかにするために、FjGH66 の構造を TpDex の IG6 複合体構造と重ね合わせた (図 3-11C)。FjGH66 のサブサイト-4 を形成する Phe256 と Gly253 がそれぞれ TpDex では Trp274 と Pro271 となっており、Lys429 のコンフォメーションは TpDex の Lys450 と異なっていた (図 3-11A, B)。また、FjGH66 の Lys429 のコンフォメーションは、リガンドの有無で変化は見られなかった。これらのことから、FjGH66 と TpDex のリガンド複合体構造間で、Glc-4 の配向が異なることが示唆された (図 3-11C)。FjGH66 の基質結合クレフトでは、Glc-4 と Glc-3 の O3 および Glc+1 と Glc+2 の O2 が溶媒側に露出していた (図 3-11C, D)。一方、サブサイト-2 と-1 は他のサブサイトより狭く、Glc-2 と Glc-1 の O2 と O3 の先は塞がれていた (図 3-11C, D)。よって、 α -(1 \rightarrow 2)-または α -(1 \rightarrow 3)-分岐を有するグルコース残基は、サブサイト-2 と-1 には入らない可能性が高いことが示唆された。一方で、FjGH66 は多分岐デキストランの α -(1 \rightarrow 2)-分岐を有するグルコース残基の非還元末端側にある α -(1 \rightarrow 6)-結合を加水分解できる可能性があることが示唆された (図 3-11D)。

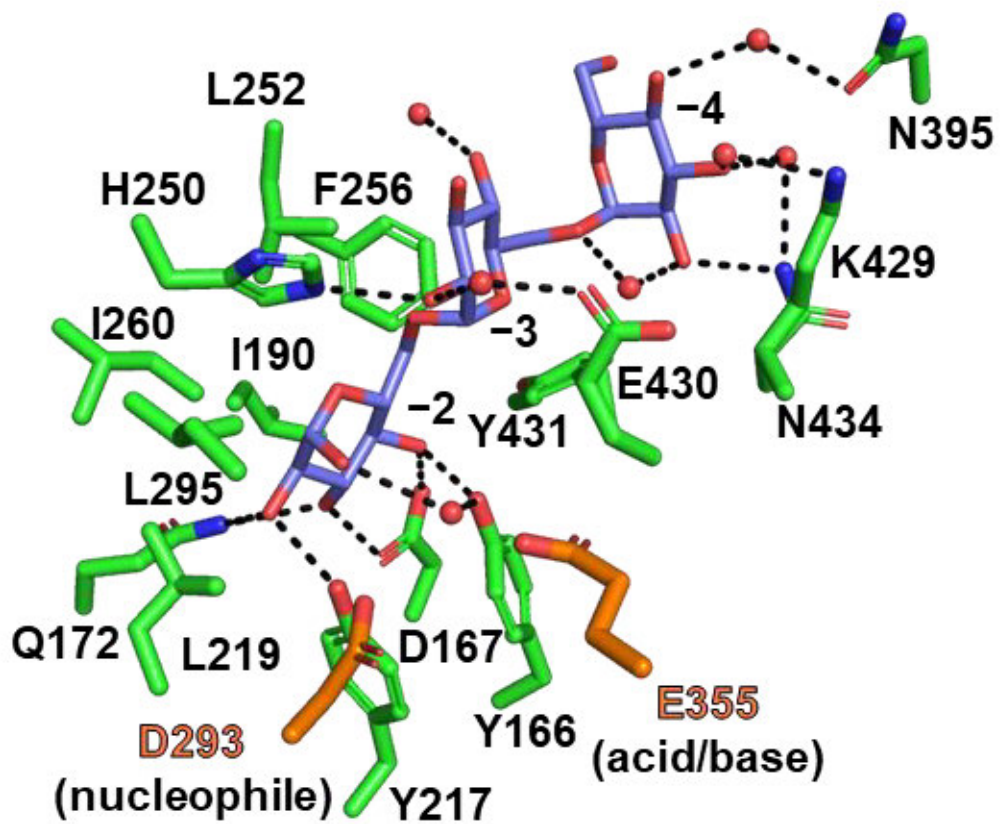


図 3-10. FjGH66 の活性部位

FjGH66 の IG3 複合体構造の活性部位。側鎖のアミノ酸残基を緑色で示した。触媒残基と IG3 をそれぞれオレンジ色と藍色で示した。水素結合は黒破線で示した。水分子を赤いスフィアモデルで示した。

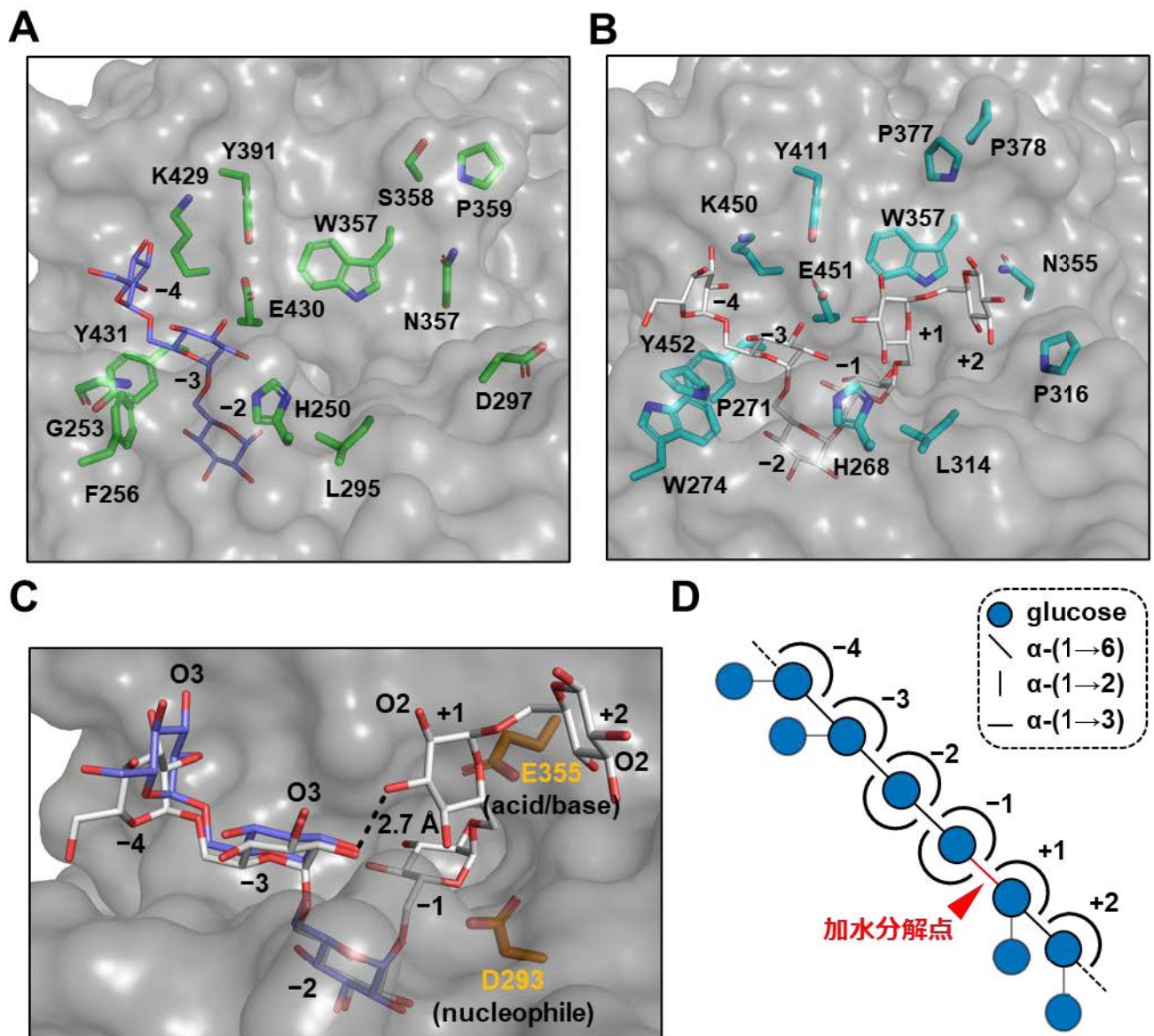


図 3-11. FjGH66 の基質結合クレフトの比較

FjGH66 (A) と TpDex (B) の活性部位の分子表面モデル。FjGH66 と TpDex の分子表面は灰色で示した。アミノ酸残基の側鎖は、FjGH65A を緑色、TpDex をシアン色のスティックモデルで示した。(C) FjGH66 の活性部位の分子表面モデル FjGH66 の分子表面は灰色で示した。IG3 (藍色) および IG6 (白色, TpDex の IG6 複合体構造から引用、PDB 5AXH) はスティックモデルで示した。IG6 の分子内水素結合は黒破線で示した。D, FjGH66 のサブサイトの模式図。グルコースを青色の丸で示した。加水分解点を赤色の三角形で示した。

3.3.4. FjDex31A のイソマルトオリゴ糖に対する活性

組換え FjDex31A は先行研究と同様のエンドデキストラナーゼ活性を有していた (図 3-12)。本研究では FjDex31A が IG3、IG4、多分岐デキストランにどのように作用するかを検討した。FjDex31A は FjGH66 と同様に S-32 α -グルカンと S-64 α -グルカンに対して加水分解活性を示した (表 3-16)。また、FjDex31A は IG3 および IG4 に対して作用し、グルコースを生成した (表 3-16, 図 3-12)。さらに、FjDex31A は IG3 と IG4 に対しては糖転移反応を触媒し、長鎖のイソマルトオリゴ糖を生成した (図 3-12)。IG3 と IG4 に対する FjDex31A の加水分解活性はほぼ同じであり、これらの比活性は IG2 やデキストラン 40,000 に対する比活性と比べてそれぞれ 47 倍と 3 倍高かった (表 3-16)。FjDex31A のデキストラン 40,000 に対する k_{cat}/K_m 値はデキストラン 200,000 に対する k_{cat}/K_m 値の約 2 倍であった (表 3-17)。

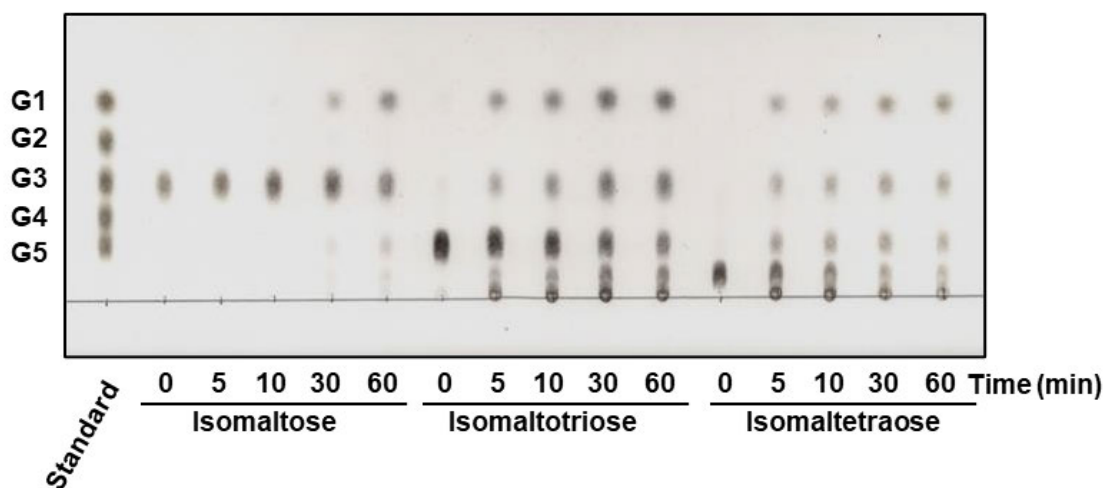


図 3-12. FjDex31A のイソマルトオリゴ糖に対する活性

(A) 10 mM の各種イソマルトオリゴ糖を基質として FjDex31A を作用させた反応溶液を TLC で解析した。それぞれの酵素反応溶液、基質混合物、マルトオリゴ糖 (G1, グルコース; G2, マルトース; G3, マルトトリオース; G4, マルトテトラオース; G5, マルトペンタオース) をスポットし、展開溶媒 (ニトロメタン:1-プロパノール:水=4:10:3) で展開した

表 3-16. FjDex31A の比活性

Enzyme	Substrate	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
FjDex31A	Dextran 40,000 (0.5% w/v)	1.83 ± 0.01^b
	Dextran 200,000 (0.5% w/v)	1.32 ± 0.02^b
	Dextran T-2000 (0.5% w/v) ^a	1.12 ± 0.16^b
	S-64 α -glucan (0.5% w/v)	$(5.89 \pm 0.91) \times 10^{-2}^b$
	S-32 α -glucan (0.5% w/v)	$(9.30 \pm 0.19) \times 10^{-2}^b$
	Pullulan (0.5% w/v) ^a	0.249 ± 0.008^b
	Isomaltose (4 mM) ^a	0.104 ± 0.005^c
	Isomaltotriose (4 mM)	4.94 ± 0.11^c
	Isomaltotetraose (4 mM)	4.46 ± 0.36^c
	Panose (4 mM)	0.109 ± 0.005^c

^a Gozu et al., 2016 から数値を引用した。

^b Somogyi–Nelson 法で還元糖量を定量した。

^c GOD-POD 法でグルコース量を定量した。

表 3-17. FjDex31A の反応速度論パラメータ

Enzyme	Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
FjDex31A	Dextran 40,000	$(4.97 \pm 0.70) \times 10^{-2}^a$	3.79 ± 0.36	76.3
		(1.99 \pm 0.28 mg/mL)		(1.90 $\text{s}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$)
	Dextran 200,000	$(1.59 \pm 0.13) \times 10^{-2}^a$	3.57 ± 0.09	2.24×10^2
		(3.18 \pm 0.26 mg/mL)		(0.841 $\text{s}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mL}$)

^a デキストランの平均分子量から算出した。

3.3.5. FjGH97A の機能解析

3.1.にも記載した通り、この実験は当研究室の倉田が主に担当し、筆者は一部の生化学的解析を行った (倉田, 2022)。FjGH97A の機能は以降の研究で重要なためここに研究結果を記載する。FjGH97A は pNP-Glc に対して pH 7.5、30°C で最も高い加水分解活性を示した (図 3-13)。FjGH97A は α -(1→6)-、 α -(1→4)-、 α -(1→3)-および α -(1→2)-結合のグルコ 2 糖を加水分解したが、トレハロースは加水分解しなかった (図 3-14)。また、デキストラン 40,000 および S-32 α -グルカンからはグルコースの生成のみが観察された (図 3-14)。これらの結果から、FjGH97A は既報の GH97 酵素と同様のエキソ型の酵素であることが示唆された。次に、FjGH97A の α -グルコシド結合を有する基質に対する反応速度論パラメータを算出した。FjGH97A は SusB と異なり、 α -(1→6)-グルコシド結合に対して最も高い k_{cat}/K_m 値を示し、次にニゲロースに対して高い k_{cat}/K_m 値を示した (表 3-18)。また、FjGH97A は SusB と同様、2 糖より 3 糖に対して高い k_{cat}/K_m 値を示した (表 3-18)。さらに、FjGH97A のコージビオースとマルトースに対する k_{cat}/K_m 値は、それぞれ IG3 に対する k_{cat}/K_m 値の約 1/10 と 1/20 であった。*Pseudoalteromonas* sp. K8 由来の GH97 酵素 (PspAG97A) は、デキストラン、IG2、IG3、パノースの α -(1→6)-結合とコージビオースの α -(1→2)-結合に対して高い加水分解活性を示す (Li et al., 2016)。PspAG97A の加水分解活性は IG2 と IG3 でほとんど差はなく、デキストランに対して高い活性を示した。そのため、FjGH97A と PspAG97A は基質特異性が異なることが示唆された。

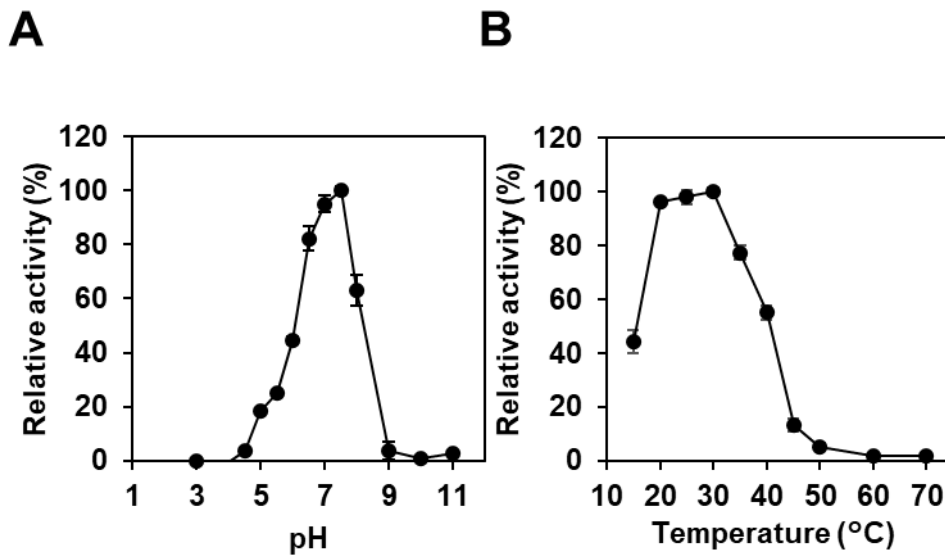


図 3-13. FjGH97A の諸性質

(A) 至適 pH。(B) 至適温度。至適 pH は酵素反応を 30°Cで行い、Britton-Robinson バッファー (pH 2.0–11.0) を使用した。至適温度は Britton-Robinson バッファー (pH 7.0) を使用し、15°Cから 70°Cで行った。至適 pH と至適温度は最も高い比活性を示した条件の値 (7.51 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, 22.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を 100%として相対活性を求めた。

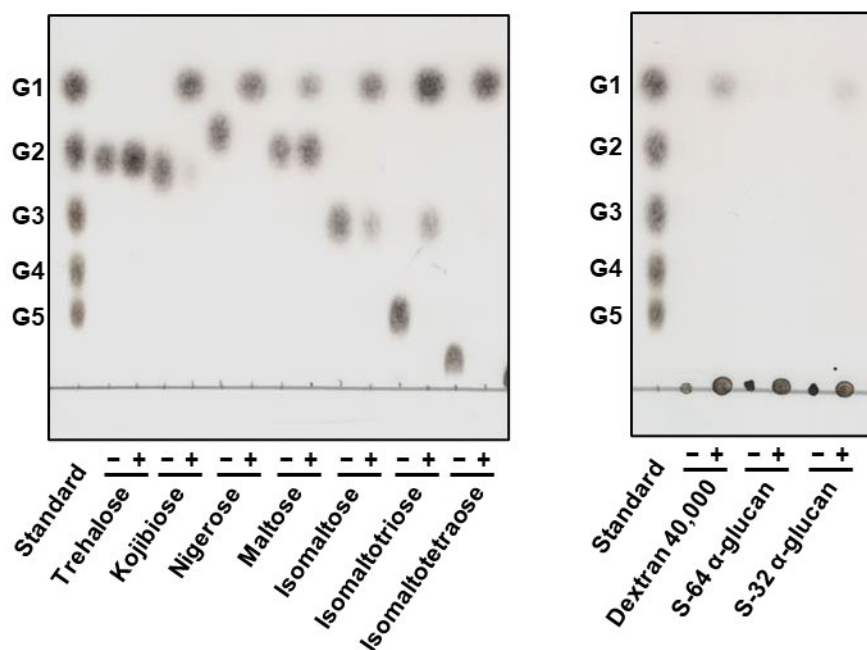


図 3-14. FjGH97A の基質特異性

10 mM の各種オリゴ糖と 1% (w/v) の多糖を基質として FjGH97A を 30°C で 1 時間作用させた反応溶液を TLC で解析した。それぞれの酵素反応溶液、基質混合物、イソマルトオリゴ糖 (G1, グルコース; G2, マルトース; G3, マルトトリオース; G4, マルトテトラオース; G5, マルトペンタオース) をスポットし、展開溶媒 (ニトロメタン:1-プロパノール:水=4:10:3) で展開した。

表 3-18. FjGH97A の反応速度論パラメータ

Enzyme	Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
FjGH97A	Isomaltose	2.47 ± 0.34	56.9 ± 2.8	22.9
	Isomaltotriose	0.692 ± 0.072	45.5 ± 1.2	65.8
	Isomaltotetraose	0.794 ± 0.196	55.8 ± 3.7	70.3
	Kojibiose	3.46 ± 1.86	22.9 ± 5.1	6.61
	Nigerose	2.79 ± 0.71	46.5 ± 4.3	16.6
	Maltose	1.06 ± 0.21	3.00 ± 0.15	2.81

3.3.6. FjDexUL GHs の多分岐デキストランに対する相乗効果

FjDexUL GHs が多分岐デキストランの分解に関して協働するかどうかを明らかにするために、デキストラン 200,000、S-32 α -グルカン、S-64 α -グルカンを基質として FjDexUL GHs を様々な組み合わせで作用させた。S-32 および S-64 α -グルカンに各種 GH を単独で 10 分間作用させてもグルコース生成量は 0.21 mM 以下と低かった。S-32 α -グルカンを FjDex31A、FjGH97A および FjGH65A で 10 分間処理すると、1.20 mM のグルコースが生成された (図 3-15)。FjGH66 を反応に追加すると、グルコース生成量は 1.8 倍 (2.17 mM) に増加した (図 3-15)。この結果から、FjGH66 は FjGH97A や FjGH65A の基質となるオリゴ糖を S-32 α -グルカンから生成することで、グルコース生成量が増加したと考えられる。つまり、FjGH66 は S-32 α -グルカンから α -(1 \rightarrow 2)-または α -(1 \rightarrow 3)-分岐を有するイソマルトオリゴ糖を生成することが示唆された。また、FjGH65A を作用させない場合における S-32 α -グルカンからのグルコース生成量 (1.71 mM) は、FjGH65A を作用させた場合と比較して 21.1%低かった (図 3-15)。興味深いことに、FjGH97A の有無によって最も顕著なグルコース生成量の差が観察された。FjGH97A を作用させることにより、S-32 α -グルカンから生産されるグルコース量は FjGH97A を作用させない場合 (0.666 mM) と比較して 1.50 mM 増加した(図 3-15)。さらに、全ての FjDexUL GHs を S-32 および S-64 α -グルカンに作用させた場合、S-64 α -グルカンから生成されるグルコース量 (0.913 mM) は、S-32 α -グルカンの約半分であった (図 3-15)。これは FjDexUL が他の多分岐デキストランよりも S-32 α -グルカンタイプの構造をよく加水分解することを示唆している。

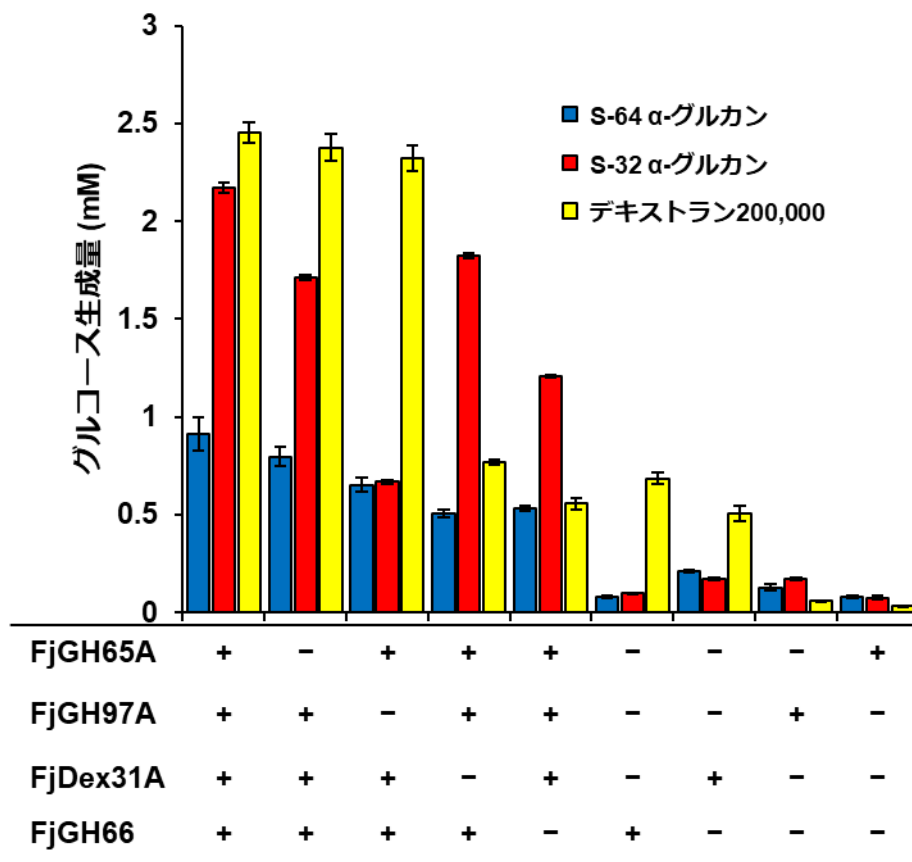


図 3-15. FjDexUL GHs による各種多糖からのグルコース生成量

FjDexUL GHs と各種 α -グルカンを 30°C で 10 分間反応させ、生成したグルコースを GOD-POD 法で定量した。デキストラン 200,000 を黄色、S-32 α -グルカンを赤色、S-64 α -グルカンを青色で示した。

FjDexUL GHs による S-32 α -グルカンの分解産物を順相 HPLC で分析した。本実験ではグルコース、IG2、IG3、IG4、IG5 を分離でき、グルコース、IG2、IG3、IG4 および IG5 の保持時間は、それぞれ 5、6、7.5、9 および 11 分であった (図 3-16A)。S-32 α -グルカンを FjGH66 で処理した場合、グルコース、IG2、IG3 に相当するピークが検出されたが、FjDex31A では、グルコースと IG2 のピークに加え、保持時間 8.5 分にグルコースやイソマルトオリゴ糖とは異なるピークが検出された (図 3-16)。このピークは長時間の酵素反応や FjGH97A の追加処理によっても消失しなかったため、FjDex31A による糖転移反応のマイナーな生成物であると思われる (図 3-16B)。S-32 α -グルカンを 4 種類の酵素で処理すると、FjGH66 によって生成した IG3 のピークは消失し、グルコースのピークが著しく高くなった。この結果は、エキソ型酵素 (FjGH65A と FjGH97A) が S-32 α -グルカンからのグルコース生成に重要な役割を果たしていることを示唆している (図 3-16B)。

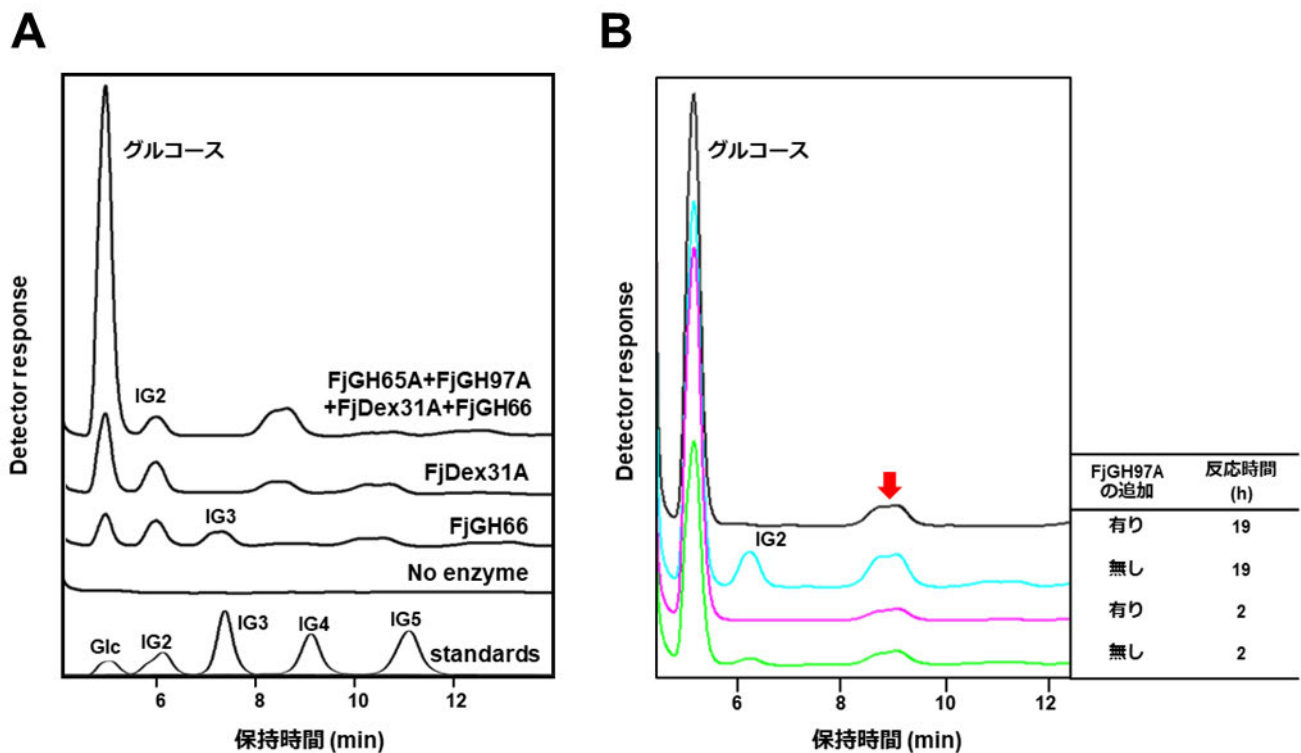


図 3-16. FjDexUL GHs による S-32 α -グルカンの分解産物

(A) FjDexUL GHs と S-32 α -グルカンを 30°C で 24 時間反応した後、反応溶液を TSK-GEL amide-80 column (4.6 mm \times 250 mm) を用いた順相 HPLC で分析した。

(B) FjDexUL GHs と S-32 α -グルカンを 30°C で 2 時間または 19 時間反応した後、反応溶液に FjGH97A を追加で加えて 30°C で 2 時間反応させた。反応溶液を TSK-GEL amide-80 column (4.6 mm \times 250 mm) を用いた順相 HPLC で分析した。赤矢印は FjDex31A による糖転移産物を示す。

3.3.7. FjDusD と FjDusE の糖結合能の解析

FjDusD および FjDusE は SusD スーパーファミリーおよび SusF_SusE スーパーファミリーに属し、SusD および SusF とそれぞれ 24% および 21% の配列相同性を有する。FjDusD と FjDusE の AlphaFold2 モデルを図 3-17 と図 3-19 に示した (Jumper et al., 2021)。FjDusD モデルは、SusD (PDB 3CKC) と同様のテトラトリコペプチドリピートを含み、リガンド結合部位を 1 つ有している可能性が高い (Koropatkin et al., 2008)。FjDusD の AlphaFold2 モデルと SusD および *B. thetaiotaomicron* のレバン資化遺伝子群由来の SusD ホモログ BT1762 の結晶構造 (PDB 6ZAZ) を比較したところ、全体的な構造は類似していた (図 3-17C)。しかし、リガンド結合クレフトの構造は、結合するリガンドによって異なると予想された (図 3-17D, E, F)。また、FjDusD の予測されたリガンド結合クレフトを形成するアミノ酸残基は、他の細菌由来の FjDusD ホモログでほとんど保存されていた (図 3-18)。

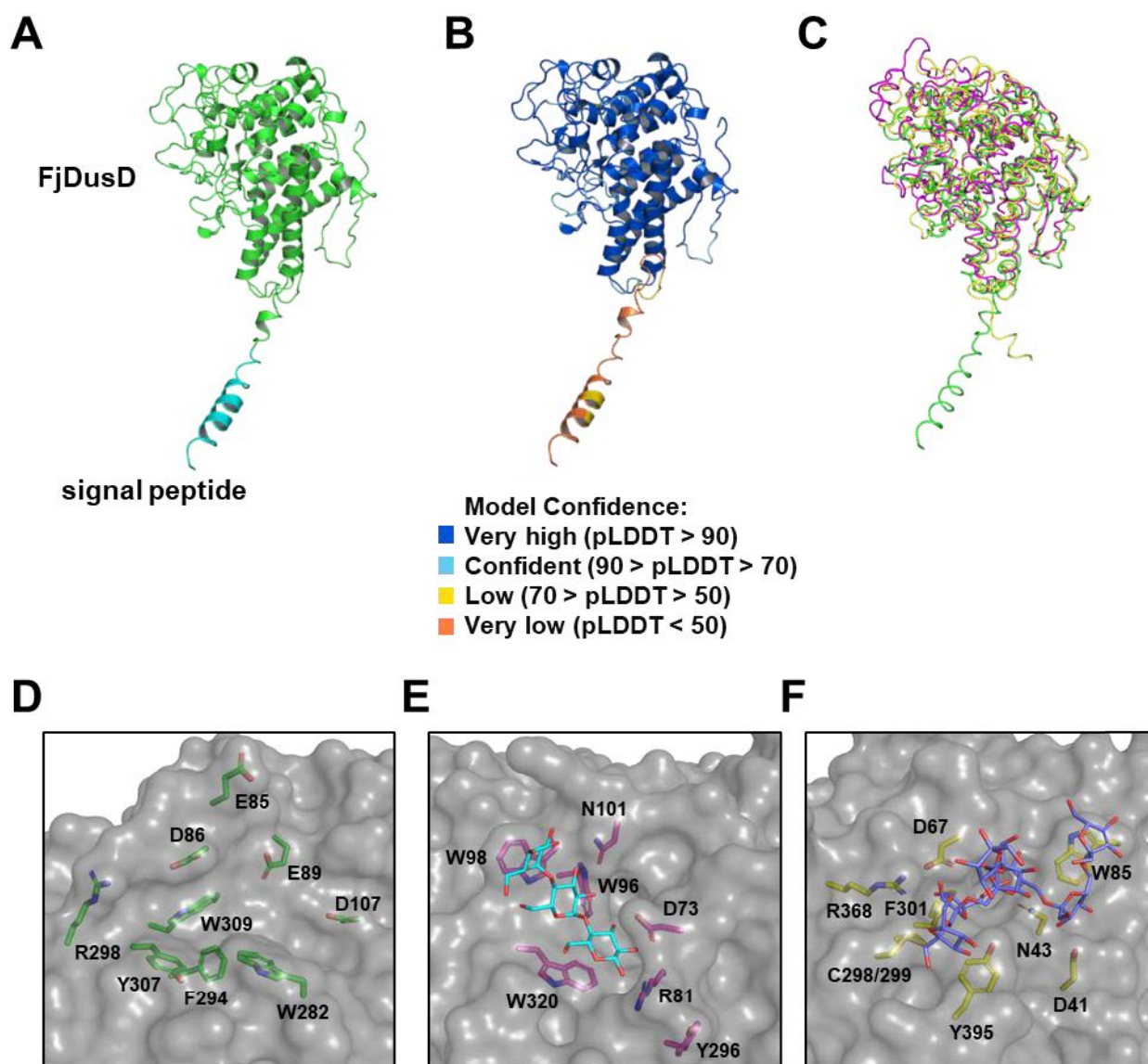


図 3-17. FjDusD の AlphaFold2 モデル

(A) FjDusD の AlphaFold2 モデル。FjDusD のシグナル配列をシアンで示し、他を緑色で示した。(B) FjDusD の pLDDT スコア (<50 オレンジ色, <70 黄色, <90 シアン, >90 青色)。(C) SusD スーパーファミリータンパク質と FjDusD の構造比較。FjDusD モデルを緑色、SusD をマゼンタ、BT1762 (PDB 6ZAZ) を黄色で示した。FjDusD AlphaFold2 モデル (D)、SusD (E)、BT1762 (F) のリガンド結合クレフトの分子表面モデルを灰色で示した。マルトトリオースを水色、 β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 6)- β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 6)- β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 6)-[β -Dfructofuranose-(2 \rightarrow 1)]- β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 6)- β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 6)- β -D-fructofuranose を藍色のスティックモデルで示した。アミノ酸残基の側鎖は、緑色 (FjDusD)、マゼンタ (SusD)、黄色 (BT1762) のスティックモデルで示した。

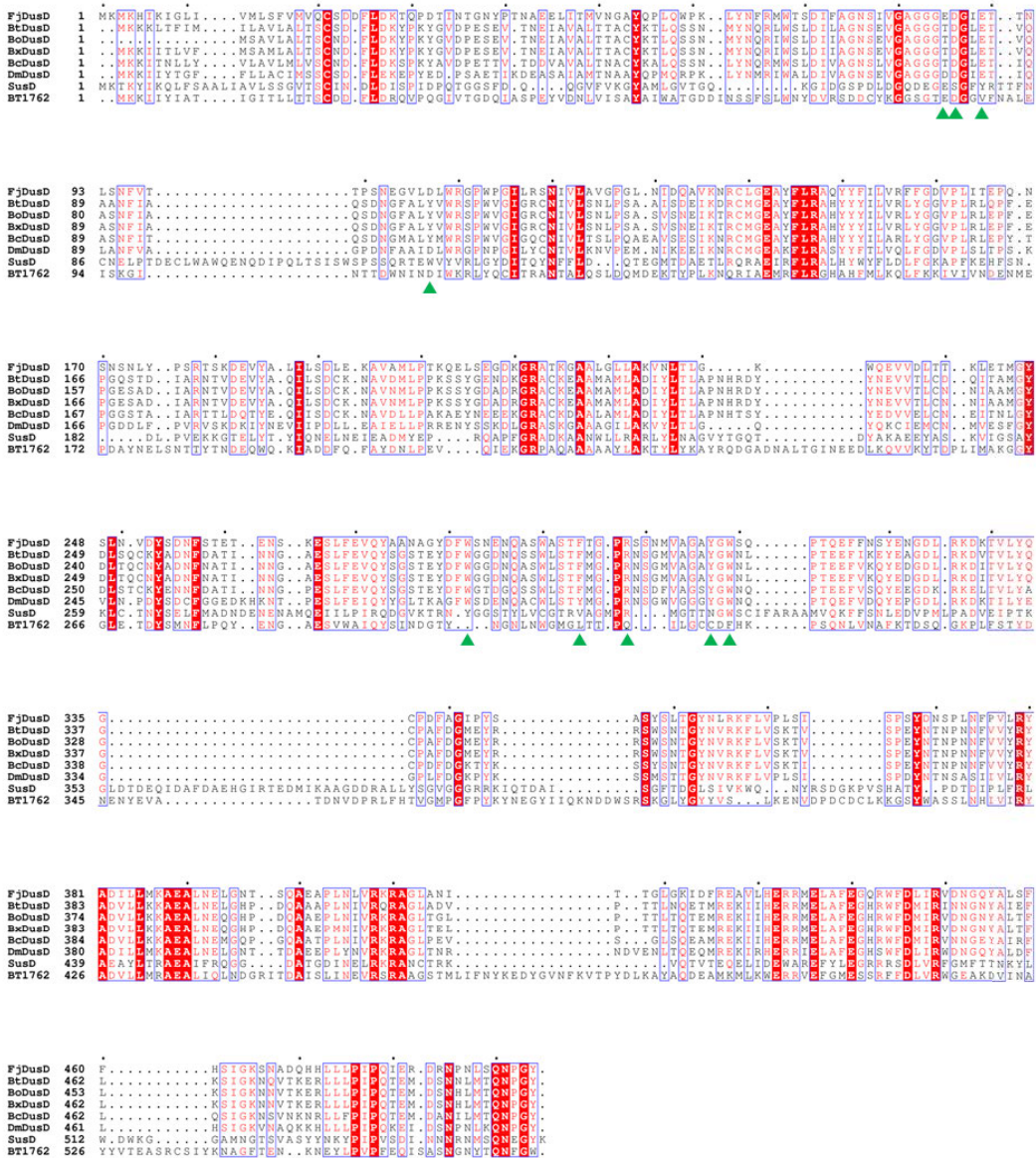


図 3-18. FjDusD とそのホモログとのアラインメント

FjDusD、Bacteroidota 門細菌由来の DusD ホモログ、SusD、BT1762 のアミノ酸配列を Clustal Omega を用いてアラインメントを作成し、ESPrript 3.0 を用いて作図した。使用した略語を以下に記載する。DusD, デキストラン資化遺伝子群の SusD ホモログ; BtDusD, *Bacteroides thetaiotaomicron* DusD; BoDusD, *Bacteroides ovatus* DusD; BcDusD, *Bacteroides cellulosilycus* BFG-250 DusD; BxDusD, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A DusD; DmDusD, *Dysgonomonas mossii* DSM 22836 DusD. FjDusD のリガンド結合クレフトを構成するアミノ酸残基を緑色の三角形で示した。

FjDusE は SusF (PDB 4FE9) と同様に免疫グロブリンスーパーファミリー (Ig) ドメインと 3 つの β -サンドイッチ構造の糖結合モジュール (FjDusEa, FjDusEb, FjDusEc) で構成されており、3 つのリガンド結合部位を持つと考えられる (図 3-19) (Cameron et al., 2012)。FjDusE でリガンド認識を担うアミノ酸残基は、SusF でも部分的に保存されていることがわかった (図 3-20)。FjDusD と FjDusE の糖結合能を明らかにするために、まず、0.5% (w/v) のデキストラン 200,000、S-32 α -グルカン、S-64 α -グルカン、可溶性澱粉、イヌリンを含む 8% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いたアフィニティ電気泳動を行い、FjDusD と FjDusE の各種多糖に対する親和性を解析した。ゲルに含まれる多糖の有無や種類の違いによる FjDusD と FjDusE のバンドの移動度の比較の結果、FjDusE はデキストラン 200,000、S-32 α -グルカン、S-64 α -グルカンに強く結合し、可溶性澱粉には比較的弱く結合をすることが示された (図 3-21)。また、イヌリンとの親和性は観察されなかった。一方、FjDusD はこれらの多糖と有意な相互作用を示さなかった (図 3-21)。そこで、次にオリゴ糖に対する FjDusD の結合能を ITC によって解析した。その結果、FjDusD は IG3、IG4、IG5、IG6 に対して親和性を示し、IG2、コージビオース、コージトリオース、ニゲロース、マルトース、マルトトリオースに対しては親和性が検出出来なかった (図 3-22, 表 3-19)。FjDusD の K_d 値と ΔG 値は、 $IG5 < IG4 < IG6 < IG3$ であった。特に、IG5 が FjDusD と最も高い結合親和性を示し、 K_d と ΔG の値が最も低かった。

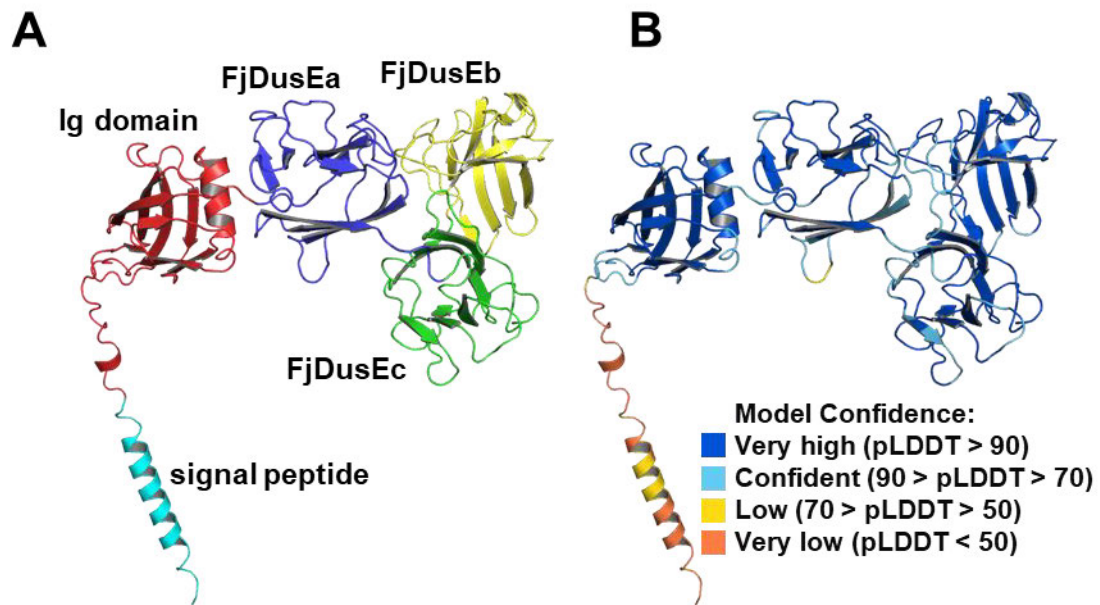


図 3-19. FjDusE の AlphaFold2 モデル

(A) FjDusE の AlphaFold2 モデル。FjDusE のシグナル配列をシアンで示し、Ig ドメインを赤色、FjDusEa を青色、FjDusEb を黄色、FjDusEc を緑色で示した。(B) FjDusE の pLDDT スコア (<50 オレンジ色, <70 黄色, <90 シアン, >90 青色)。

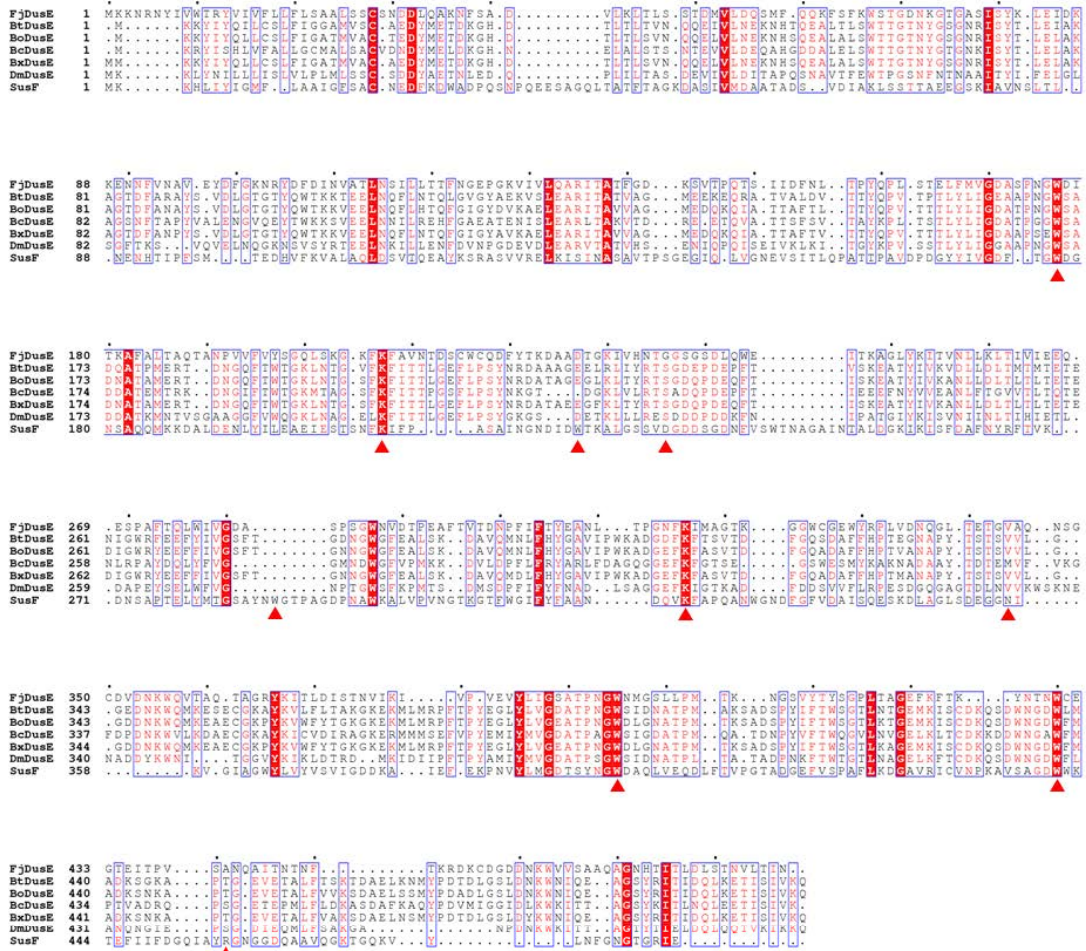


図 3-20. FjDusE とそのホモログとのアラインメント

FjDusE、Bacteroidota 門細菌由来の DusE ホモログ、SusF のアミノ酸配列を Clustal Omega を用いてアラインメントを作成し、ESPrift 3.0 を用いて作図した。使用した略語を以下に記載する。DusE, デキストラン資化遺伝子群の SusE/F ホモログ; BtDusE, *Bacteroides thetaiotaomicron* DusE; BoDusE, *Bacteroides ovatus* DusE; BcDusE, *Bacteroides cellulosilycus* BFG-250 DusE; BxDusE, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A DusE; DmDusE, *Dysgonomonas mossii* DSM 22836 DusE。SusF のリガンド結合に関与するアミノ酸残基を赤色の三角形で示した。

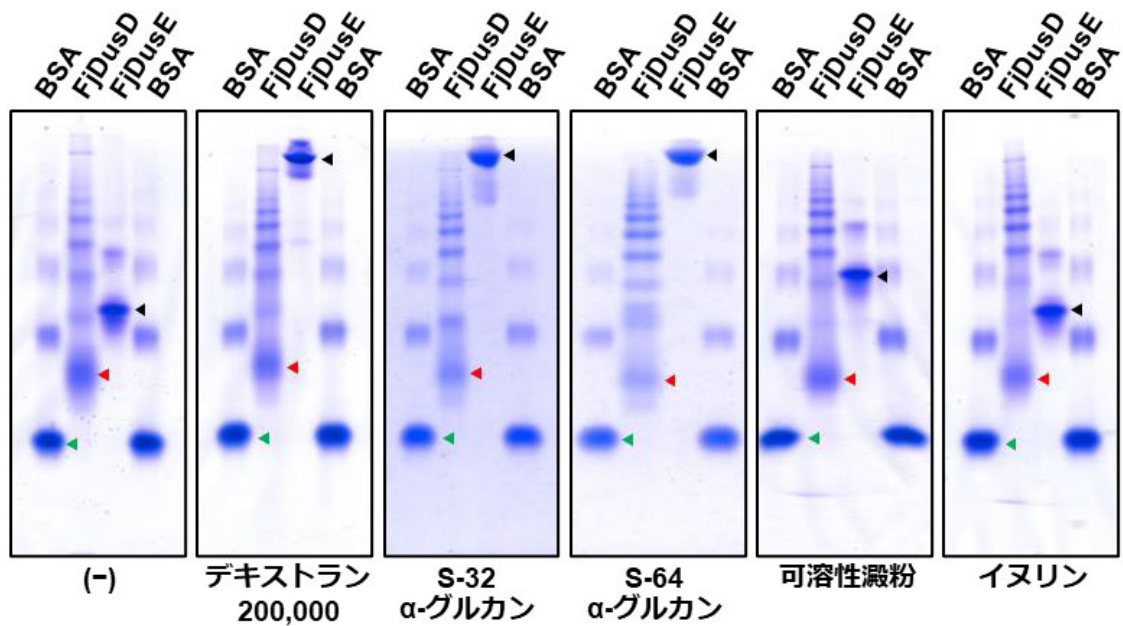


図 3-21. FjDusD と FjDusE のアフィニティ電気泳動

多糖を含まない 8% (w/v) ポリアクリルアミドゲル (-) と 0.5% (w/v) の多糖 (デキストラン 200,000, S-32 α -グルカン, S-64 α -グルカン, 可溶性澱粉, イヌリン) を含むゲルに FjDusD と FjDusE を供し、ネイティブアフィニティゲル電気泳動。ネガティブコントロールとして BSA を用いた。BSA、FjDusD、FjDusE はそれぞれ緑色、赤色、黒色の三角形で示した。

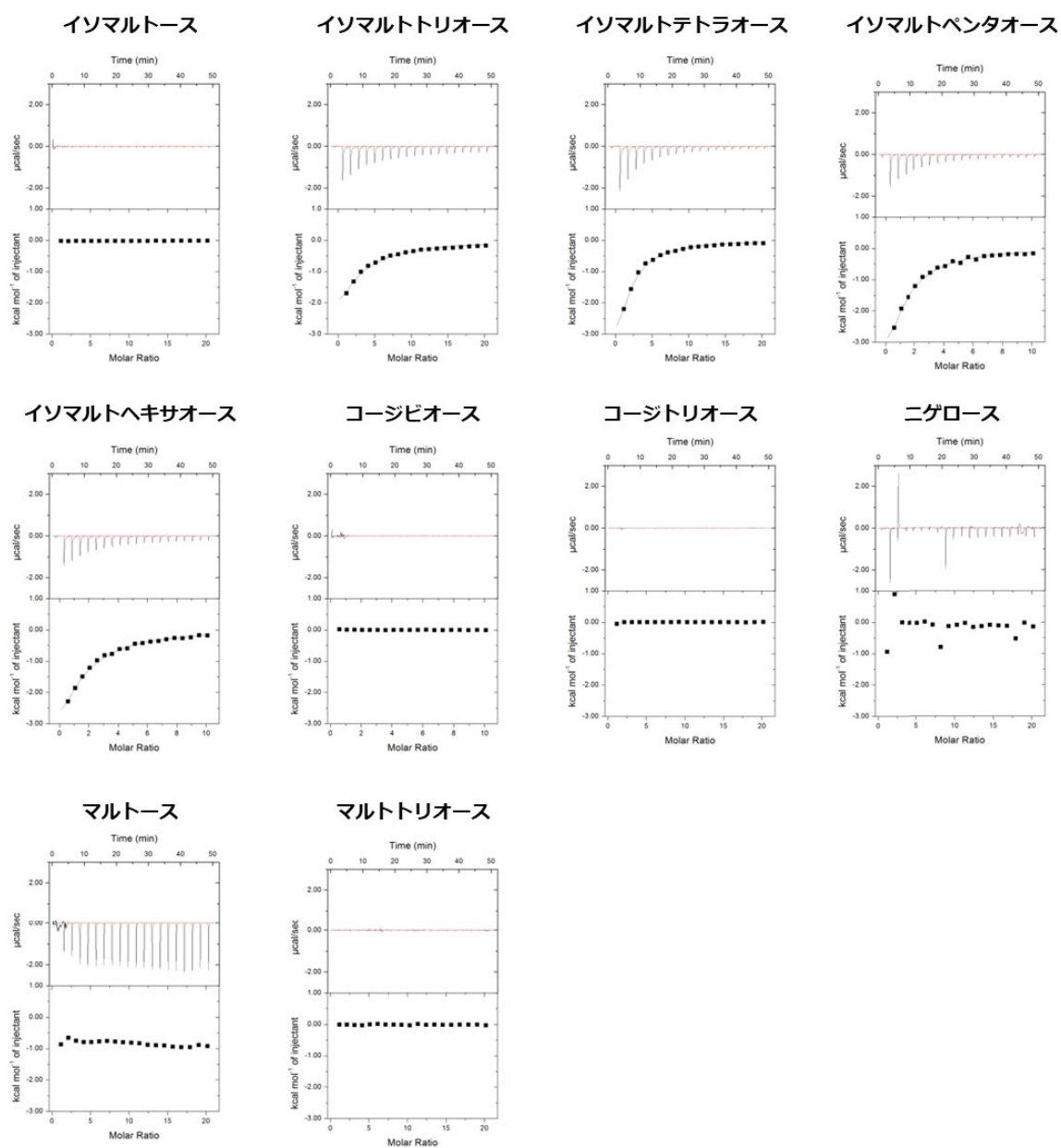


図 3-22. ITC による FjDusD の糖結合能の解析

10 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 7.0) 中、25°C で 0.1 mM FjDusD と各種オリゴ糖を用いて滴定を行った。上のグラフは生の熱シグナルを示し、下のグラフは積算熱量を示す。

表 3-19. FjDusD のグルコオリゴ糖に結合した際の熱力学パラメータ

	K_d (mM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)
Isomaltose	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.
Isomaltotriose	0.621 ± 0.023	-4.37 ± 0.02	-13.3 ± 0.8	8.72 ± 0.79
Isomaltotetraose	0.326 ± 0.014	-4.75 ± 0.03	-10.6 ± 0.3	6.43 ± 0.29
Isomaltopentaose	0.226 ± 0.029	-4.96 ± 0.07	-19.0 ± 3.0	8.15 ± 3.12
Isomaltohexaose	0.467 ± 0.156	-4.46 ± 0.19	-42.1 ± 3.3	37.1 ± 3.17
Kojibiose	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.
Kojitriose	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.
Maltose	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.
Maltotriose	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.
Nigerose	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.

N.B., not binding.

3.4. 考察

本研究により、土壌細菌 *F. johnsoniae* が多分岐デキストランを認識し、FjDexUL GHs によって分解できることが明らかになった。*F. johnsoniae* が多分岐デキストランを資化する機構を図 3-23 に示した。この資化機構では、FjDusE が多分岐デキストランを細胞表面にて捕捉し、FjGH66 が多分岐デキストランから α -(1→2)-または α -(1→3)-分岐を有するイソマルトオリゴ糖を生成する。FjDex31A、FjGH97A および FjGH65A は、ペリプラズムにおいて α -(1→2)-または α -(1→3)-分岐を有するイソマルトオリゴ糖をグルコースに分解する。このような資化機構は、他の多糖を標的とする PUL についても同様の系が報告されている (Grondin et al., 2017; Foley et al., 2016; Martens et al., 2009)。

FjGH66 の酵素学的解析と立体構造解析から、FjGH66 は α -(1→2)-または α -(1→3)-分岐を、サブサイト-1 および-2 を除く全てのサブサイトで受容できることが明らかになった。一般的な GH13 α -アミラーゼは、澱粉中の α -(1→6)-分岐近傍の α -(1→4)-結合を加水分解されにくいとされるが、SusG と *Alicyclobacillus* sp. 18,711 由来の α -アミラーゼの触媒クレフトは α -(1→6)-分岐を有する α -(1→4)-グルカンを受容し、加水分解することが報告されている (Agirre et al., 2019; Arnal et al., 2018)。FjGH66 とは異なり、FjDex31A はデキストランだけでなくイソマルトオリゴ糖にも作用することから、FjDex31A はペリプラズム内に取り込まれたイソマルトオリゴ糖を分解する役割を担っていることが示唆された。興味深いことに、FjDex31A はイソマルトオリゴ糖に対して高い糖転移活性を持っている (Gozu et al., 2016)。FjGH97A が IG2 よりも IG3 や IG4 に対して高い加水分解活性を示すことを考えると、FjDex31A の糖転移活性は FjGH97A が効率よく分解できるイソマルトオリゴ糖の鎖長に調整するために活用されている可能性がある (図 3-23B)。同様のオリゴ糖の鎖長調節システムは、*Lactobacillus acidophilus* などの乳酸菌のマルトオリゴ糖資化遺伝子群でも報告されている (Andersen et al., 2020)。*L. acidophilus* の GH13 1,4- α -グルコシルトランスフェラーゼはマルトオリゴ糖の長さを不均化し、他の GH による分解を促進する。

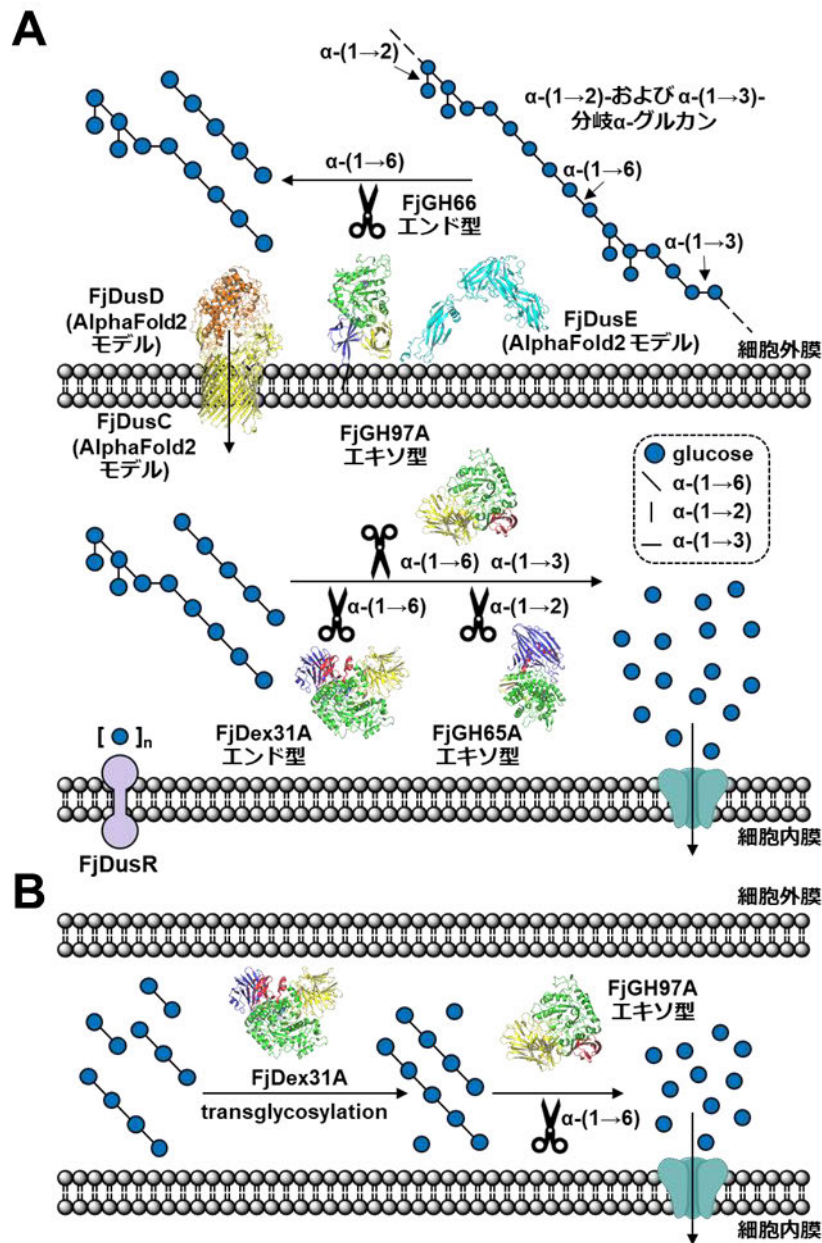


図 3-23. *F. johnsoniae* による多分岐デキストランの資化機構

(A) α -(1→2)-および α -(1→3)-分岐デキストランは FjDexUL GHs によって細胞外およびペリプラズムでグルコースに分解される。(B) FjDex31A の糖転移活性は FjGH97A が効率よく分解できるイソマルトオリゴ糖の鎖長に調整するために活用されている可能性がある。FjDex31A、FjGH65A、FjGH66、FjGH97A は結晶構造を示し、FjDusC、FjDusD、FjDusE は AlphaFold2 モデルを示す。

Bacteroidota 門細菌における PUL 遺伝子の転写制御には、Bacteroidota 門細菌に特異的な 3 つの異なる制御系 (SusR-like regulators, hybrid two-component systems (HTCSs), extracytoplasmic function sigma/anti-sigma factors) が知られている。これらの制御因子は PD を介して生成したオリゴ糖と直接相互作用することによりシグナルを感知する。実際に、マルトースが SusR に結合すると全ての Sus タンパク質の発現量が上昇する (D'Elia and Salyers, 1996; Ravcheev et al., 2013)。*B. thetaiotaomicron* や *B. ovatus* に見られる植物細胞壁多糖を標的とする PUL の HTCS 制御因子の PD は、4 糖から 8 糖の比較的長鎖のオリゴ糖を厳密に認識する (Martens et al., 2011)。*B. ovatus* のオオムギ由来 β -グルカン を標的とする PUL の HTCS 制御因子の PD は、 β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)-D-Glc と β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc に高い親和性を示すが、 β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc とラミナリオリゴ糖には親和性を示さないことが報告された (Martens et al., 2011)。S-32 α -グルカンは FjDexUL 遺伝子の発現量を著しく上昇させた。しかし、デキストラン 200,000、S-64 α -グルカン、コージビオース、IG2 は S-32 α -グルカンほど遺伝子発現量を上昇させなかった。FjDexUL 遺伝子の発現量の上昇は、FjGH66 による多分岐デキストランの分解のしやすさ、FjDusC-FjDusD 複合体による分解産物の取り込みやすさなどの要因に影響される可能性があるため、本研究結果から FjDusR の PD に結合するオリゴ糖の構造を決定することは困難であった。しかしながら、IG2 やコージビオースによっても FjDexUL 遺伝子の発現が誘導されることを考えると、 α -(1 \rightarrow 6)-および α -(1 \rightarrow 2)-結合を含むオリゴ糖が転写制御に関与している可能性が高いことが示唆された。S-32 α -グルカンと比べ、S-64 α -グルカンは α -(1 \rightarrow 4)-結合など他の結合を含み、結合の割合も異なる。S-64 α -グルカンに対する FjGH66 の加水分解活性は S-32 α -グルカンに対する活性よりもわずかに低く、S-64 α -グルカンに対する FjDexUL GHs の相乗効果も低かった。このことは、FjDexUL の遺伝子産物が多分岐デキストランの構造と分岐の頻度の違いを厳密に認識していることを示唆している。

SusD と SusE のホモログの機能については、いくつかの研究で報告されている。SusD の欠損あるいは糖結合部位の変異は、澱粉を炭素源とした場合での *B. thetaiotaomicron* の増殖を阻害した (Anderson and Salyers, 1989; Koropatkin et al., 2008)。SusD は澱粉の分解産物をペリプラズムに取り込むことを助け、マルトヘptaオースより長いマルトオリゴ糖にのみ親和性を示した (Koropatkin et al.,

2008)。本研究では、FjDusD は SusD と同様にオリゴ糖に対する親和性を示したが、アミロースに対して親和性を示した SusD とは異なり、デキストランに対する親和性は検出できなかった (Koropatkin et al., 2009; Luis et al., 2018; Tamura et al., 2021)。FjDusD のように多糖に結合しない SusD ホモログを報告した研究もいくつかある。逆遺伝学的解析と変異体解析によって、SusD ホモログによる多糖の結合は、SusE ホモログ存在下での微生物の生育には必須ではないことが報告されている (Foley et al., 2016; Foley et al., 2018; Luis et al., 2018; Koropatkin et al., 2009; Tamura et al., 2019; Tazuin et al., 2016)。デキストランおよび多分岐デキストランに対する FjDusE の親和性は、FjDusE が細胞表面での多糖の認識に寄与していることを示唆している。本研究では、FjDusD が α -(1 \rightarrow 6)-結合を厳密に認識することを明らかにした。FjDusD が α -(1 \rightarrow 2)-あるいは α -(1 \rightarrow 3)-分岐を持つイソマルトオリゴ糖と結合できるかどうかを評価するためには、さらなる解析が必要である。分岐を有するオリゴ糖と結合する SusD ホモログの例としては *B. thetaiotaomicron* のレバン資化遺伝子群の SusD ホモログ (BT1762) がある。BT1762 は β -(2 \rightarrow 1)-結合の分岐を持つフラクトオリゴ糖と結合する (図 3-17F) (Gray et al., 2021)。また、BT1762 は SusC ホモログ、糖結合タンパク質、GH と複合体を形成し、レバンを分解することが 2023 年に単粒子クライオ電子顕微鏡構造から明らかになった (White et al., 2023)。FjDusD と FjDusE のリガンド認識の分子機構や生理機能を解明するためには、*fdusD* と *fdusE* の欠失株を用いた実験や X 線結晶構造解析や単粒子クライオ電子顕微鏡による立体構造の決定が必要だと思われる。

多分岐デキストランは、小麦のサワードウや発酵製品に含まれる *Leuconostoc* 属や、家禽の消化管に含まれる *Lactobacillus* 属によって菌体外多糖として合成される (Dertli et al., 2013; Dueñas-Chasco et al., 1998; Jeanes et al., 1954)。菌体外多糖は、細菌のコロニー形成、ストレス耐性、宿主と細菌の相互作用、免疫調節において重要な役割を果たすことが報告されている (Sarhini et al., 2011)。本研究により、グラム陰性細菌による α -(1 \rightarrow 2)-および α -(1 \rightarrow 3)-分岐デキストランの資化機構が明らかになったが、これはグラム陽性細菌 *M. dextranolyticum* による α -(1 \rightarrow 2)-分岐デキストラン資化機構とは異なっている。*M. dextranolyticum* は細胞外で α -(1 \rightarrow 2)-分岐を除去した後に主鎖のデキストランを分解し、イソマルトオリゴ糖を細胞質に取り込むが、*F. johnsoniae* は細胞外で多分岐デキストランを分

岐を含んだ状態のオリゴ糖に分解し、ペリプラズムで分岐を含む全ての結合を加水分解する (図 3-24)。 α -(1→2)-および α -(1→3)-分岐デキストランは、ヒトおよび動物由来の消化酵素による加水分解に対して抵抗性を示す (Djouzi et al., 1995)。一方で、*Bifidobacterium* 属や *Bacteroides* 属などの腸内細菌は、 α -(1→2)-分岐デキストランや α -(1→2)-および α -(1→6)-グルコシド結合を含む α -グルコオリゴ糖から、短鎖脂肪酸を産生することができる (Djouzi et al., 1995; Miyamoto et al., 2023; Sarbini et al., 2011)。このように、多分岐デキストランはプレバイオティクス効果を有するのでヒトの腸内環境の健康に貢献できる可能性が高い。本研究の結果から *Bacteroidota* 門細菌のデキストラン資化遺伝子群における GH97 および GH65 遺伝子の有無が、 α -(1→2)-および α -(1→3)-分岐デキストランを代謝できる腸内細菌の指標となりうることが示唆された。

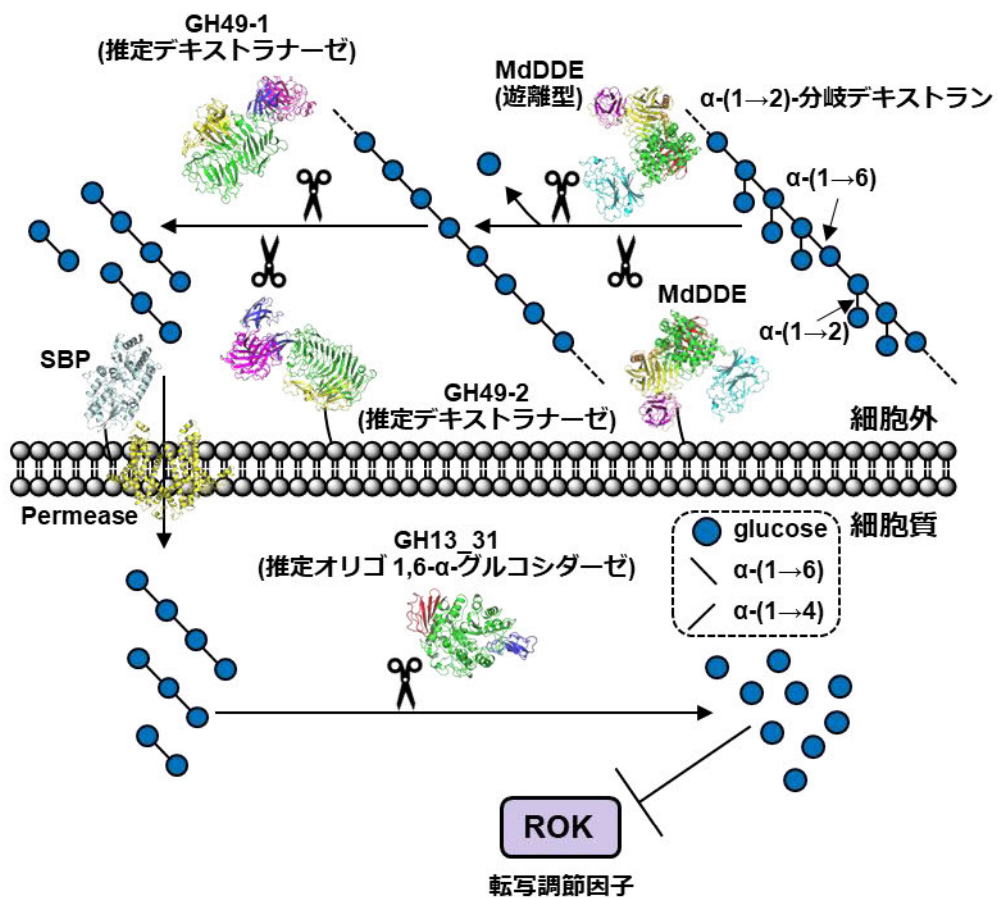
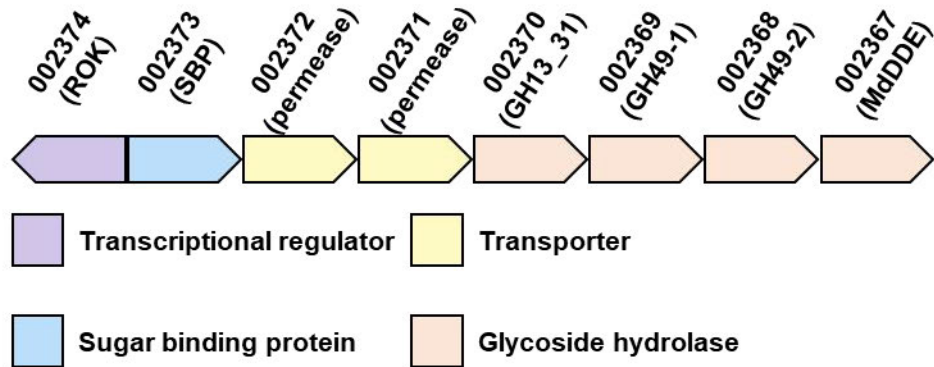


図 3-24. *M. dextranolyticum* の α -(1 \rightarrow 2)-分岐デキストラン資化機構

MdDDE によって細胞外で α -(1 \rightarrow 2)-分岐を除去した後に GH49 推定デキストラナーゼが主鎖のデキストランを分解する。生成したイソマルトオリゴ糖は細胞質に取り込まれグルコースに分解される。MdDDE、GH49-1、GH49-2、SBP、Permease、GH13_31 は AlphaFold2 モデルを示す。

3.5. 小括

本章では FjDexUL に存在するタンパク質を標的として、分子生物学、酵素学、構造生物学の実験手法を用いて解析した。*F. johnsoniae* を各種オリゴ糖や α -グルカン を炭素源として培養したときの FjDexUL の各遺伝子発現量を qRT-PCR によって定量したところ、S-32 α -グルカン を炭素源としたときに FjDexUL 遺伝子の顕著な発現量の上昇が観察された。機能既知の FjDex31A と FjGH65A 以外に、FjGH66 と FjGH97A の酵素活性も解析したところ、FjGH66 はエンドデキストラナーゼであり、FjGH97A は α -(1 \rightarrow 6)-結合や α -(1 \rightarrow 3)-結合を有するグルコオリゴ糖を加水分解してグルコースを生成する酵素であった。S-32 α -グルカンに対して FjDexUL GHs (FjGH65A, FjGH97A, FjDex31A, FjGH66) を同時に作用させたところ、それぞれの酵素を単独で作用させた場合と比べて、グルコース生成量が顕著に増加した。また、FjGH66 の立体構造から、いくつかのサブサイトが α -(1 \rightarrow 2)-および α -(1 \rightarrow 3)-分岐を受容できることが明らかになった。FjDusE はデキストランと多分岐デキストランに対して親和性を示したが、FjDusD の多糖に対する親和性は認められなかった。FjDusD は IG3、IG4、IG5、IG6 に親和性を示した。これらの結果から、土壌細菌 *F. johnsoniae* が多分岐デキストランを FjDexUL GHs、FjDusD、FjDusE を利用してグルコースにまで分解できることが明らかになった。

総括

本研究では、*F. johnsoniae* のデキストラン資化遺伝子群である FjDexUL に着目し、FjDexUL に存在する GH や糖結合タンパク質の構造と生化学的性質の解析やその遺伝子の発現量の解析を行った。そこから得られた結果から FjDexUL による乳酸菌由来の菌体外多糖の資化機構を明らかにした。

第 2 章では、既報の GH65 酵素と低いアミノ酸配列相同性を示す *F. johnsoniae* 由来の GH65 酵素 (FjGH65A) の機能と構造を生化学的実験と X 線結晶構造解析を用いて解析した。FjGH65A は加リン酸分解活性を示さず、コージビオースやコージビオース部位を有するオリゴ糖を特異的に加水分解した。また、分解産物のアノマーを HPLC によって分析することで、FjGH65A はアノマー反転型の反応機構を介して加水分解反応を触媒することが示された。FjGH65A の立体構造はリガンドフリー構造、グルコース複合体構造、IG2 複合体構造をそれぞれ 1.54 Å、1.40 Å、1.56 Å の分解能で決定した。FjGH65A の全体構造は他の GH65 GP と類似しており、一般酸触媒残基 Glu472 は保存されていた。一方で、FjGH65A では、GH65 GP のリン酸結合部位を形成するアミノ酸残基は保存されていなかった。その代わりに、FjGH65A は、求核水を活性化するのに必要な一般塩基触媒残基 Glu616 を有していた。これらの結果から、FjGH65A は新規な α -1,2-グルコシダーゼであり、GH65 で最初に発見された細菌由来の GH であることが示された。本研究と同時期に Desmet らのグループが GH65 からコージビオースを特異的に加水分解する GH65 酵素を報告した。本研究の結果と合わせて、これらの酵素は kojibiose hydrolase (系統名, kojibiose glucohydrolase (configuration-inverting)) として新たに EC 番号 (EC3.2.1.216) が付与された。今回の成果は、真核生物由来の GH を含む GH65 GH の反応機構や基質特異性の理解を深めるとともに、GH65 のみならず GP を含む他の GH ファミリーにおける未同定酵素の機能予測に役立つと思われる。

第 3 章では第 2 章で FjGH65A が kojibiose hydrolase であると同定したことで、FjDexUL が α -(1 \rightarrow 2)-分岐デキストランの資化に関与する PUL だと仮説を立てた。本研究では、FjDexUL に存在するタンパク質の遺伝子発現量や機能を網羅的に解析した。S-32 α -グルカン炭素源として *F. johnsoniae* を培養した場合、デキストラン 200,000、可溶性澱粉、 α -グルコ 2 糖と比較して、FjDexUL 遺伝子の発現量が顕著に上昇した。また、FjDexUL GHs は S-32 α -グルカン炭素源を相乗的に分

解した。FjGH66の結晶構造からは、いくつかのサブサイトが α -(1→2)-または α -(1→3)-分岐を受容できることが明らかになった。さらに、2つの糖結合タンパク質 (FjDusD と FjDusE) の機能解析を行ったところ、FjDusDはイソマルトオリゴ糖に、FjDusEはデキストランおよび多分岐デキストランに親和性を示した。これらのことから、FjDexULの遺伝子産物が多分岐デキストランを認識し、分解することが示唆された。Bacteroidota門細菌のデキストラン資化遺伝子群にGH65とGH97の両遺伝子を持つ細菌種は限られていることから、*F. johnsoniae*は多分岐デキストランを資化するためにFjDexULを獲得したと考えられる。細菌は自然界の様々な環境に生育しているが、細菌間の相互作用については不明な点が多い。本研究成果は、自然界における微生物間の多糖を介した複雑な相互作用を分子レベルで理解する上で役立つと思われる。また、乳酸菌が産生する菌体外多糖はプレバイオティクス効果を示し、本研究で見出した酵素遺伝子群は腸内細菌でも保存されている。本研究で多分岐デキストラン分解に関わるタンパク質の構造と機能を明らかにしたことは、今後、多分岐デキストランがプレバイオティクス効果を示す分子機構の解明に繋がることが期待される。多分岐デキストランの構造解析においては、通常、メチル化分析やNMRが使用されている。ただし、構成糖がD-グルコースのみであり、結合様式が多岐にわたるため、正確な分岐位置や割合を特定するのは難しい。この難題に取り組む上で、FjDexUL GHsは有望なツールになると思われる。

参考文献

(独) 農研機構食品総合研究所、(株) 野田産業科学研究所、小林幹彦、小熊哲哉： α -1,3-多分岐デキストラン水解酵素製造法および環状イソマルトオリゴ糖の製造法、特許 3607789 号 2004-10-15.

Agirre, J., Moroz, O., Meier, S., Brask, J., Munch, A., Hoff, T., Andersen, C., Wilson, K.S., Davies, G.J., The structure of the AliC GH13 α -amylase from *Alicyclobacillus* sp. reveals the accommodation of starch branching points in the α -amylase family. *Acta Crystallogr D Struct Biol.*, **75**, 1–7, 2019.

Aleshin, A.E., Feng, P.H., Honzatko, R.B., Reilly, P.J., Crystal structure and evolution of a prokaryotic glucoamylase. *J. Mol. Biol.*, **327**, 61–73, 2003.

Andersen, S., Møller, M.S., Poulsen, J.N., Pichler, M.J., Svensson, B., Lo Leggio, L., Goh, Y.J., Abou Hachem, M., An 1,4- α -glucosyltransferase defines a new maltodextrin catabolism scheme in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **86**, e00661–20, 2020.

Anderson, K.L., Salyers, A.A., Biochemical evidence that starch breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* involves outer membrane starch-binding sites and periplasmic starch-degrading enzymes. *J. Bacteriol.*, **171**, 3192–3198, 1989.

Andersson, U., Levander, F., Rådström, P., Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 42707–42713, 2001.

Arnal, G., Cockburn, D.W., Brumer, H., Koropatkin, N.M., Structural basis for the flexible recognition of α -glucan substrates by *Bacteroides thetaiotaomicron* SusG. *Protein Sci.*, **27**, 1093–1101, 2018.

Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., Ben-Tal, N., ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.*, **44**, W344–W350, 2016.

Aso, K., Shibasaki, K., Nakamura, M., Preparation of kojibiose. *Nature*, **182**, 1303–1304, 1958.

Barrett, K., Hunt, C.J., Lange, L., Meyer, A.S., Conserved unique peptide patterns (CUPP) online platform: peptide-based functional annotation of carbohydrate active enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **48**, W110–W115, 2020.

Barrett, K., Lange, L., Peptide-based functional annotation of carbohydrate-active enzymes by conserved unique peptide patterns (CUPP). *Biotechnol. Biofuels*, **12**, 102, 2019.

Bause, E., Erkens, R., Schweden, J., Jaenicke, L., Purification and characterization of trimming glucosidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **206**, 208–212, 1986.

Biely, P., Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1575–1588, 2012.

Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., Celis, J.E., Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, **15**, 529–539, 1994.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G., Carbohydrate-binding modules : fine tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.*, **382**, 769–781, 2004.

Cameron, E.A., Maynard, M.A., Smith, C.J., Smith, T.J., Koropatkin, N.M., Martens, E.C., Multidomain carbohydrate-binding proteins involved in *Bacteroides thetaiotaomicron* starch metabolism. *J. Biol. Chem.*, **287**, 34614–34625, 2012.

Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., Henrissat, B., A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **326**, 929–939, 1997.

Cartmell, A., Lowe, E.C., Baslé, A., Firbank, S.J., Ndeh, D.A., Murray, H., Terrapon, N., Lombard, V., Henrissat, B., Turnbull, J.E., Czjzek, M., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., How members of the human gut microbiota overcome the sulfation problem posed by glycosaminoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, 7037–7042, 2017.

Chaen, H., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y.: Enzymatic synthesis of kojioligosaccharides using kojibiose phosphorylase. *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 173–176, 2001.

Chaen, H., Yamamoto, T., Nishimoto, T., Nakada, T., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Purification and characterization of a novel phosphorylase, kojibiose phosphorylase, from *Thermoanaerobium brockii*. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 423–429, 1999.

Chandra, G., Chater, K.F., Bornemann, S., Unexpected and widespread connections between bacterial glycogen and trehalose metabolism. *Microbiology*, **157**, 1565–1572, 2011.

Chiku, K., Tsukasaki, R., Teshima, Y., Yoshida, M., Aramasa, H., Nihira, T., Nakai, H., Ono, H., Kitaoka, M., Alkoxy carbonyl elimination of 3-*O*-substituted glucose and fructose by heat treatment under neutral pH. *Carbohydr. Res.*, **496**, 108129, 2020.

Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., Henrissat, B., An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.*, **328**, 307–317, 2003.

Crouch, L.I., Urbanowicz, P.A., Baslé, A., Cai, Z.P., Liu, L., Voglmeir, J., Melo, Diaz, J.M., Benedict, S.T., Spencer, D.I.R., Bolam, D.N., Plant *N*-glycan breakdown by human gut *Bacteroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **119**, e2208168119, 2022.

Cuskin, F., Baslé, A., Ladevèze, S., Day, A.M., Gilbert, H.J., Davies, G.J., Potocki-Véronèse, G., Lowe, E.C., The GH130 family of mannoside phosphorylases contains glycoside hydrolases that target β -1,2-mannosidic linkages in candida mannan. *J. Biol. Chem.*, **290**, 25023–25033, 2015.

D'Elia, J.N., Salyers, A.A., Contribution of a neopullulanase, a pullulanase, and an α -glucosidase to growth of *Bacteroides thetaiotaomicron* on starch. *J. Bacteriol.*, **178**, 7173–7179, 1996.

Davies, G., Henrissat, B., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**, 853–859, 1995.

Davies, G.J., Wilson, K.S., Henrissat, B., Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **321**, 557–559, 1997.

De Beul, E., Jongbloet, A., Franceus, J., Desmet, T., Discovery of a kojibiose hydrolase by analysis of specificity-determining correlated positions in glycoside hydrolase family 65. *Molecules*, **26**, 6321, 2021.

Dertli, E., Colquhoun, I.J., Gunning, A.P., Bongaerts, R.J., Le Gall, G., Bonev, B.B., Mayer, M.J., Narbad, A., Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *J. Biol. Chem.*, **288**, 31938–31951, 2013.

Destruelle, M., Holzer, H., Klionsky, D. J., Isolation and characterization of a novel yeast gene, ATH1, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast*, **11**, 1015–1025, 1995.

Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., Degradation and fermentation of α -gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 117–127, 1995.

Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A.M., Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydr. Res.*, **307**, 125–133, 1998.

D'Elia, J.N., Salyers, A.A., Effect of regulatory protein levels on utilization of starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.*, **178**, 7180–7186, 1996.

Edgar, R.C., MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1792–1797, 2004.

Egloff, M.P., Uppenberg, J., Haalck, L., van Tilbeurgh, H., Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: Unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. *Structure*, **8**, 689–697, 2001.

Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., Maltose metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and heterologous expression of the key enzymes, maltose phosphorylase and phosphoglucomutase. *FEMS Microbiol. Lett.*, **169**, 81–86, 1998.

Eis, C., Nidetzky, B., Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizophyllum commune*. *Biochem. J.*, **341**, 385–393, 1999.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486–501, 2010.

Fitting, C., Doudoroff, M., Phosphorolysis of maltose by enzyme preparations from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, **199**, 153–163, 1952.

Foley, M.H., Cockburn, D.W., Koropatkin, N.M., The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut Bacteroidetes. *Cell Mol. Life Sci.*, **73**, 2603–2617, 2016.

Foley, M.H., Martens, E.C., Koropatkin, N.M., SusE facilitates starch uptake independent of starch binding in *B. thetaiotaomicron*. *Mol. Microbiol.*, **108**, 551–566, 2018.

Funane, K., Matsuo, T., Ono, H., Ishii, T., Gibu, S., Tokashiki, T., Kobayashi, M., Characterization of glucans and glucansucrases from novel *Leuconostoc* strains (including sp. S-51). *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 379–382, 2003.

Gangoiti, J., Pijning, T. and Dijkhuizen, L., Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing α -glucans from starch and sucrose. *Biotechnol. Adv.* **36**, 196–207, 2018.

Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Potts, J.R., Henrissat, B., Davies, G.J., Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora. *Chem Biol.*, **15**, 1058–1067, 2008.

Gozu, Y., Ishizaki, Y., Hosoyama, Y., Miyazaki, T., Nishikawa, A., Tonozuka, T., A glycoside hydrolase family 31 dextranase with high transglucosylation activity from *Flavobacterium johnsoniae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **8**, 1562–1567, 2016.

Gray, D.A., White, J.B.R., Oluwole, A.O., Rath, P., Glenwright, A.J., Mazur, A., Zahn, M., Baslé, A., Morland, C., Evans, S.L., Cartmell, A., Robinson, C.V., Hiller, S., Ranson, N.A., Bolam, D.N., van den Berg, B., Insights into SusCD-mediated glycan import by a prominent gut symbiont. *Nat. Commun.*, **12**, 44, 2021.

Grondin, J.M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D.W., Brumer, H., Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *J. Bacteriol.*, **199**, e00860–16, 2017.

Hamazaki, H., Hamazaki, M.H., Catalytic site of human protein-glycosylgalactosylhydroxylysine glucosidase: Three crucial carboxyl residues were determined by cloning and site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 357–362, 2016.

Hamazaki, H., Hotta, K., Purification and characterization of an α -glucosidase specific for hydroxylysine-linked disaccharide of collagen. *J. Biol. Chem.*, **254**, 9682–9687, 1979.

Henrissat, B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309–316, 1991.

Henrissat, B., Bairoch, A., New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino- acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293**, 781–788, 1993.

Henrissat, B., Bairoch, A., Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **316**, 695–696, 1996.

Hidaka, M., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S., The crystal structure of galacto-N-biose/lacto-N-biose I phosphorylase: a large deformation of a TIM barrel scaffold. *J. Biol. Chem.*, **284**, 7273–7283, 2009.

Holm, L., DALI and the persistence of protein shape. *Protein Science*, **29**, 128–140, 2020.

Hondoh, H., Saburi, W., Mori, H., Okuyama, M., Nakada, T., Matsuura, Y., Kimura, A., Substrate recognition mechanism of α -1,6-glucosidic linkage hydrolyzing enzyme, dextran glucosidase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.*, **378**, 913–922, 2008.

Ingelman, B., Enzymatic breakdown of dextran. *Acta Chem. Scan.*, **2**, 803–812, 1948.

Jeanes, A., Haynes, W.C., Wilham, C.A., Rankin, J.C., Melvin, E.H., Austin, M.J., Cluskey, J.E., Fisher, B.E., Tsuchiya, H.M., Rist, C.E., Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5041–5052, 1954.

Joglekar, P., Sonnenburg, E.D., Higginbottom, S.K., Earle, K.A., Morland, C., Shapiro-Ward, S., Bolam, D.N., Sonnenburg, J.L., Genetic variation of the SusC/SusD homologs from a polysaccharide utilization locus underlies divergent fructan specificities and functional adaptation in *Bacteroides thetaiotaomicron* strains. *mSphere*, **3**, e00185–18, 2018.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, **596**, 583–589, 2021.

Kabsch, W., XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 125–132, 2010.

Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs, Jr, W.R., Guerin, M.E., Prados-Rosales, R., The Mycobacterium tuberculosis capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochem. J.*, **476**, 1995–2016, 2019.

Kato, N., Suyama, S., Shirokane, M., Kato, M., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N., Novel α -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **3**, 1250–1256, 2002.

Kawahara, R., Saburi, W., Odaka, R., Taguchi, H., Ito, S., Mori, H., Matsui, H., Metabolic mechanism of mannan in a ruminal bacterium, *Ruminococcus albus*, involving two mannoside phosphorylases and cellobiose 2-epimerase: discovery of a new

carbohydrate phosphorylase, β -1,4-mannooligosaccharide phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **287**, 42389–42399, 2012.

Khalikova, E., Susi, P., Korpela, T., Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**, 306–325, 2005.

Kikuchi, A., Okuyama, M., Kato, K., Osaki, S., Ma, M., Kumagai, Y., Matsunaga, K., Klahan, P., Tagami, T., Yao, M., Kimura, A., A novel glycoside hydrolase family 97 enzyme: Bifunctional β -l-arabinopyranosidase/ α -galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biochimie*, **142**, 41–50, 2017.

Kim, D., Robyt, J. F., Dextranucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 1050–1056, 1995.

Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., Chiba, S., Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, **9**, 2327–2335, 1991.

Kitamura, M., Okuyama, M., Tanzawa, F., Mori, H., Kitago, Y., Watanabe, N., Kimura, A., Tanaka, I., Yao, M., Structural and functional analysis of a glycoside hydrolase family 97 enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Biol. Chem.*, **52**, 36328–36337, 2008.

Kitaoka, M., Diversity of phosphorylases in glycoside hydrolase families. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 8377–8390, 2015.

Kitaoka, M., Automatic calculation of the kinetic parameters of enzymatic reactions with their standard errors using Microsoft Excel. *J. Appl. Glycosci.*, **70**, 33–37, 2023.

Kitaoka, M., Hyashi, K., Carbohydrate-processing phosphorolytic enzymes. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14**, 35–50, 2002.

Kleizen, B., Braakman, I., Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **16**, 343–349, 2004.

Kobayashi, M., Mitsuishi, Y., Matsuda, K., Pronounced hydrolysis of highly branched dextrans with a new type of dextranase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 306–312, 1978.

Koropatkin, N., Martens, E.C., Gordon, J.I., Smith, T.J., Structure of a SusD homologue, BT1043, involved in mucin O-glycan utilization in a prominent human gut symbiont. *Biochemistry*, **48**, 1532–1542, 2009.

Koropatkin, N.M., Martens, E.C., Gordon, J.I., Smith, T.J., Starch catabolism by a prominent human gut symbiont is directed by the recognition of amylose helices. *Structure*, **16**, 1105–1115, 2008.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L., Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 567–580, 2001.

Kuhaulomlarp, S., Patron, N.J., Henrissat, B., Rejzek, M., Saalbach, G., Field, R.A., Identification of *Euglena gracilis* β -1,3-glucan phosphorylase and establishment of a new glycoside hydrolase (GH) family GH149. *J. Biol. Chem.*, **293**, 2865–2876, 2018.

Kuhaulomlarp, S., Pergolizzi, G., Patron, N.J., Henrissat, B., Field, R.A., Unraveling the subtleties of β -(1→3)-glucan phosphorylase specificity in the GH94, GH149, and GH161 glycoside hydrolase families. *J. Biol. Chem.*, **294**, 6483–6493, 2019.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **7**, 1870–1874, 2016.

Kötting, O., Kossmann, J., Zeeman, S.C., Lloyd, J.R., Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **13**, 321–329, 2010.

Larsbrink, J., Zhu, Y., Kharade, S.S., Kwiatkowski, K.J., Eijsink, V.G.H., Koropatkin, N.M., McBride, M.J., Pope, P.B., A polysaccharide utilization locus from *Flavobacterium johnsoniae* enables conversion of recalcitrant chitin. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 260, 2016.

Larsson, A. M., Andersson, R., Ståhlberg, J., Kenne, L., Jones, T. A., Dextranase from *Penicillium minioluteum*: reaction course, crystal structure, and product complex. *Structure*, **11**, 1111–1121, 2003.

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, **6**, 41, 2013.

Lewis, A.L., Toukach, P., Bolton, E., Chen, X., Frank, M., Lütteke, T., Knirel, Y., Schoenhofen, I., Varki, A., Vinogradov, E., Woods, R.J., Zachara, N., Zhang, J., Kamerling, J.P., Neelamegham, S., SNFG Discussion Group. Cataloging natural sialic acids and other nonulosonic acids (NulOs), and their representation using the Symbol Nomenclature for Glycans. *Glycobiology*, **33**, 99–103, 2023.

Li, W., Fan, H., He, C., Zhang, X., Wang, X., Yuan, J., Fang, Z., Fang, W., Xiao, Y., PspAG97A: A halophilic α -glucoside hydrolase with wide substrate specificity from glycoside hydrolase family 97. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1933–1942, 2016.

Li, X., Wang, X., Meng, X., Diikhuizen, L., Liu, W., Structures, physico-chemical properties, production and (potential) applications of sucrose-derived α -d-glucans synthesized by glucansucrases. *Carbohydr. Polym.*, **249**, 116818, 2020.

Liu, Y., Wang, Z., Yin, Y., Cao, Y., Zhao, H., Xia, Y., Expression, purification, and characterization of recombinant *Metarhizium anisopliae* acid trehalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **54**, 66–72, 2007.

Lombard, V., Bernard, T., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P.M., Henrissat, B., A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochem. J.*, **432**, 437–444, 2010.

Lombard, V., Golaconda, Ramulu, H., Coutinho, P.M., Henrissat, B., The carbohydrate-active enzyme database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, **42**, D490–495, 2014.

Luis, A.S., Briggs, J., Zhang, X., Farnell, B., Ndeh, D., Labourel, A., Baslé, A., Cartmell, A., Terrapon, N., Stott, K., Lowe, E.C., McLean, R., Shearer, K., Schückel, J., Venditto, I., Ralet, M.C., Henrissat, B., Martens, E.C., Mosimann, S.C., Abbott, D.W., Gilbert, H.J., Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides. *Nat. Microbiol.*, **3**, 210–219, 2018.

Martens, E.C., Chiang, H.C., Gordon, J.I., Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe*, **4**, 447–457, 2008.

Martens, E.C., Koropatkin, N.M., Smith, T.J., Gordon, J.I., Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus-like paradigm. *J. Biol. Chem.*, **284**, 24673–24677, 2009.

Martens, E.C., Lowe, E.C., Chiang, H., Pudlo, N.A., Wu, M., McNulty, N.P., Abbott, D.W., Henrissat, B., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Gordon, J.I., Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol.*, **9**, e1001221, 2011.

McBride, M. J., Xie, G., Martens, E. C., Lapidus, A., Henrissat, B., Rhodes, R. G., Goltsman, E., Wang, W., Xu, J., Hunnicutt, D. W., Staroscik, A. M., Hoover, T. R., Cheng, Y. Q., Stein, J. L., Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **21**, 6864–6875, 2009.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658–674, 2007.

Mitsuishi, Y., Kobayashi, M., Matsuda, K., Dextran α -1,2 debranching enzyme from *Flavobacterium* sp. M-73: its production and purification. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2283–2290, 1979.

Mitsuishi, Y., Kobayashi, M., Matsuda, K., Dextran α -(1→2)-debranching enzyme from *Flavobacterium* Sp. M-73. properties and mode of action. *Carbohydr. Res.*, **2**, 303–313, 1980.

Mitsuishi, Y., Kobayashi, M., Matsuda, K., Structures of three α -D-(1→2)-branched oligosaccharides isolated from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran. *Carbohydr. Res.*, **2**, 331–337, 1984.

Miyamoto, J., Shimizu, H., Hisa, K., Matsuzaki, C., Inuki, S., Ando, Y., Nishida, A., Izumi, A., Yamano, M., Ushiroda, C., Irie, J., Katayama, T., Ohno, H., Itoh, H., Yamamoto, K., Kimura, I., Host metabolic benefits of prebiotic exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Gut Micobes*, **15**, 2161271, 2023.

Miyazaki, T., Matsumoto, Y., Matsuda, K., Kurakata, Y., Matsuo, I., Ito, Y., Nishikawa, A., Tonzuka, T., Heterologous expression and characterization of processing α -glucosidase I from *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642. *Glycoconj. J.*, **28**, 563–571, 2011.

Miyazaki, T., Tanaka, H., Nakamura, S., Dohra, H., Funane, K., Identification and characterization of dextran α -1,2-debranching enzyme from *Microbacterium dextranolyticum*. *J. Appl. Glycosci.*, **70**, 15–24, 2023.

Mizuno, T., Mori, H., Ito, H., Matsui, H., Kimura, A., Chiba, S., Molecular cloning of isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **9**, 1582–1588, 1999.

Moremen, K.W., Trimble, R.B., Herscovics, A., Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*, **4**, 113–125, 1994.

Mukherjee, K., Narindoshvili, T., Raushel, F. M., Discovery of a kojibiose phosphorylase in *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry*, **19**, 2857–2867, 2018.

Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., Vagin, A.A., REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 355–367, 2011.

Naas, A.E., Mackenzie, A.K., Mravec, J., Schückel, J., Willats, W.G.T., Eijsink, V.G.H., Pope, P.B., Do rumen Bacteroidetes utilize an alternative mechanism for cellulose degradation? *mBio*, **5**, e01401–14, 2014.

Nakada, T., Nishimoto, T., Chaen, H., Fukuda, S., Kojioligosaccharides: Application of kojibiose phosphorylase on the formation of various kojioligosaccharides. *American chemical society*, 104–117, 2003.

Nakae, S., Ito, S., Higa, M., Senoura, T., Wasaki, J., Hijikata, A., Shionyu, M., Ito, S., Shirai, T., Structure of novel enzyme in mannan biodegradation process 4-O- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase MGP. *J. Mol. Biol.*, **425**, 4468–4478, 2013.

Nakai, H., Dilokpimol, A., Abou Hachem, M., Svensson, B., Efficient one-pot enzymatic synthesis of α -(1 \rightarrow 4)-glucosidic disaccharides through a coupled reaction catalysed by *Lactobacillus acidophilus* NCFM maltose phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, **345**, 1061–1064, 2010.

Nakai, H., Kitaoka, M., Svensson, B., Ohtsubo, K., Recent development of phosphorylases possessing large potential for oligosaccharide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**, 301–309, 2013.

Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A.S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffetto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R.A., Zhu, Y., O'Neil, M.A., Urbanowicz, B.R., York, W.S., Davies, G.J., Abbott, D.W., Ralet, M.C., Martens, E.C., Henrissat, B., Gilbert, H.J., Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, **544**, 65–70, 2017.

Nelson, N., A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375–380, 1944.

Nihira, T., Nakai, H., Chiku, K., Kitaoka, M., Discovery of nigerose phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 1513–1522, 2012^a.

Nihira, T., Nakai, H., Kitaoka, M., 3-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-rhamnose phosphorylase from *Clostridium phytofermentans*. *Carbohydr. Res.*, **350**, 94–97, 2012^b.

Nihira, T., Nishimoto, M., Nakai, H., Ohtsubo, K., Kitaoka, M., Characterization of two α -1,3-glucoside phosphorylases from *Clostridium phytofermentans*. *J. Appl. Glycosci.*, **61**, 59–66, 2014^a.

Nihira, T., Saito, Y., Ohtsubo, K., Nakai, H., Kitaoka, M., 2-*O*- α -D-glucosylglycerol phosphorylase from *Bacillus selenitireducens* MLS10 possessing hydrolytic activity on β -D-glucose 1-phosphate. *PLoS One*, **9**, e86548, 2014^b.

Oguma, T., Kurokawa, T., Tobe, K., Kitao, S., Kobayashi, M., Purification and some properties of glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044. *J. Appl. Glycosci.*, **43**, 73–78, 1996.

Ohdan, K., Fujii, K., Yanase, M., Takaha, T., Kuriki, T., Phosphorylase coupling as a tool to convert cellobiose into amylose. *J. Biotechnol.*, **127**, 496–502, 2007.

Okada, S., Yamamoto, T., Watanabe, H., Nishimoto, T., Chaen, H., Fukuda, S., Wakagi, T., Fushinobu, S., Structural and mutational analysis of substrate recognition in kojibiose phosphorylase. *FEBS J.*, **3**, 778–786, 2014.

Painter, J., Merritt, E.A., Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 439–450, 2006.

Park, J.K., Keyhani, N.O., Roseman, S., Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning, and characterization of a *N*, *N'*-diacetylchitobiose phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33077–33083, 2000.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, **8**, 785–786, 2011.

Potterton, L., Agirre, J., Ballard, C., Cowtan, K., Dodson, E., Evans, P.R., Jenkins, H.T., Keegan, R., Krissinel, E., Stevenson, K., Lebedev, A., McNicholas, S.J., Nicholls, R.A., Noble, M., Pannu, N.S., Roth, C., Sheldrick, G., Skubak, P., Turkenburg, J., Uski, V., von Delft, F., Waterman, D., Wilson, K., Winn, M., Wojdyr, M., CCP4i2: the new graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **74**, 68–84, 2018.

Ravcheev, D.A., Godzik, A., Osterman, A.L., Rodionov, D.A., Polysaccharides utilization in human gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*: comparative genomics reconstruction of metabolic and regulatory networks. *BMC Genomics*, **14**, 873, 2013.

Reeves, A.R., D'Elia, J.N., Frias, J., Salyers, A.A., A *Bacteroides thetaiotaomicron* outer membrane protein that is essential for utilization of maltooligosaccharides and starch. *J. Bacteriol.*, **178**, 823–830, 1996.

Robert, X., Gouet, P., Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.*, **42**, W320–324, 2014.

Rodríguez Jiménez, E., Dextranase in sugar industry: A review. *Sugar Tech.*, **11**, 124–134, 2009.

Rogowski, A., Briggs, J.A., Mortimer, J.C., Tryfona, T., Terrapon, N., Lowe, E.C., Baslé, A., Morland, C., Day, A.M., Zheng, H., Rogers, T.E., Thompson, P., Hawkins, A.R., Yadav, M.P., Henrissat, B., Martens, E.C., Dupre, P., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nat. Commun.*, **6**, 7481, 2015.

Roslund, M.U., Tähtinen, P., Niemitz, M., Sjöholm, R., Complete assignments of the ¹H and ¹³C chemical shifts and JH,H coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.*, **343**, 101–112, 2008.

Sadahiro, J., Mori, H., Saburi, W., Okuyama, M. and Kimura, A., Extracellular and cell-associated forms of *Gluconobacter oxydans* dextran dextrinase change their localization depending on the cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **456**, 500–505, 2015.

Saito, K., Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Fujimoto, S., Takahashi, E., Horinouchi, S., Production of trehalose synthase from a basidiomycete, *Grifola frondosa*, in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 193–198, 1998.

Sanz, M.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A., Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5192–5199, 2005.

Sarbini, S.R., Kolida, S., Naeye, T., Einerhand, A., Brison, Y., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Gibson, G.R., Rastall, R.A., In vitro fermentation of linear and α -1,2-

branched dextrans by the human fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5307–5315, 2011.

Sato, A., Ato, K., Kojibiose (2-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-glucose): isolation and structure. *Nature*, **180**, 984–985, 1975.

Sawangwan, T., Goedl, C., Nidetzky, B., Single-step enzymatic synthesis of (R)-2-*O*- α -D-glucopyranosyl glycerate, a compatible solute from micro-organisms that functions as a protein stabiliser. *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 4267–4270, 2009.

Senoura, T., Ito, S., Taguchi, H., Higa, M., Hamada, S., Matsui, H., Ozawa, T., Jin, S., Watanabe, J., Wasaki, J., Ito, S., New microbial mannan catabolic pathway that involves a novel mannosylglucose phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 701–706, 2011.

Shipman, J.A., Berleman, J.E., Salyers, A.A., Characterization of four outer membrane proteins involved in binding starch to the cell surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.*, **182**, 5365–5372, 2000.

Shipman, J.A., Cho, K.H., Siegel, H.A., Salyers, A.A., Physiological characterization of SusG, an outer membrane protein essential for starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.*, **181**, 7206–7211, 1999.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, 2011.

Sloan, W.J., Alexander, B.H., Lohmar, R.L., Wolff, I.A., Rist, C.E., Determination of dextran structure by periodate oxidation techniques. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4429–4434, 1954.

Smith, K.A., Salyers, A.A., Characterization of a neopullulanase and an α -glucosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1. *J. Bacteriol.*, **173**, 2962–2968, 1991.

Smith, M. R., Zahnley, J., Goodman, N., Glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2723–2731, 1994.

Somogyi, M., Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19–23, 1952.

Sonnenburg, E.D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S.K., Firbank, S.J., Bolam D.N., Sonnenburg, J.L., Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*, **141**, 1241–1252, 2010.

Stanier, R.Y., Studies on nonfruiting myxobacteria: I. *Cytophaga johnsonae*, n.sp., a chitin-decomposing myxobacterium. *J. Bacteriol.*, **53**, 297–315, 1947.

Sternberg, M., Spiro, R.G., Studies on the catabolism of the hydroxylysine-linked disaccharide units of basement membranes and collagens. Isolation and characterization of a rat kidney α -glucosidase of high specificity. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10329–10336, 1979.

Suzuki, M., Kaneda, K., Nakai, Y., Kitaoka, M., Taniguchi, H., Synthesis of cellobiose from starch by the successive actions of two phosphorylases. *N. Biotechnol.*, **31**, 137–142, 2009.

Suzuki, N., Fujimoto, Z., Kim, Y.M., Momma, M., Kishine, N., Suzuki, R., Suzuki, S., Kitamura, S., Kobayashi, M., Kimura, A., Funane, K., Structural elucidation of the cyclization mechanism of α -1,6-glucan by *Bacillus circulans* T-3040 cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12040–12051, 2014.

Suzuki, N., Kim, Y. M., Fujimoto, Z., Momma, M., Okuyama, M., Mori, H., Funane, K., Kimura, A., Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66. *J. Biol. Chem.*, **287**, 19916–19926, 2012.

Tamura, K., Dejean, G., Van Petegem, F., Brumer, H., Distinct protein architectures mediate species-specific beta-glucan binding and metabolism in the human gut microbiota. *J. Biol. Chem.*, **296**, 100415, 2021.

Tamura, K., Foley, M.H., Gardill, B.R., Dejean, G., Schnizlein, M., Bahr, C.M.E., Louise Creagh, A., van Petegem, F., Koropatkin, N.M., Brumer, H., Surface glycan-binding proteins are essential for cereal beta-glucan utilization by the human gut symbiont *Bacteroides ovatus*. *Cell Mol. Life Sci.*, **76**, 4319–4340, 2019.

Tancula, E., Feldhaus, M.J., Bedzyk, L.A., Salyers, A.A., Location and characterization of genes involved in binding of starch to the surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.*, **174**, 5609–5616, 1992.

Tauzin, A.S., Kwiatkowski, K.J., Orlovsky, N.I., Smith, C.J., Creagh, A.L., Haynes, C.A., Wawrzak, Z., Brumer, H., Koropatkin, N.M., Molecular dissection of xyloglucan recognition in a prominent human gut symbiont. *mBio*, **7**, e02134–15, 2016.

Terrapon, N., Lombard, V., Drula, É., Lapébie, P., Al-Masaudi, S., Gilbert, H.J., Henrissat, B., PULDB: the expanded database of polysaccharide utilization loci. *Nucleic Acids Res.*, **46**, D677–D683, 2018.

Teufel, F., Almagro, Armenteros, J.J., Johansen, A.R., Gíslason, M.H., Pihl, S.I., Tsirigos, K.D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1023–1025, 2022.

Torii, M., Sakakibara, K., Misaki, A., Sawai, T., Degradation of α -linked D-gluco-oligosaccharides and dextrans by an isomalto-dextranase preparation from *Arthrobacter globiformis* T6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 459–464, 1976.

Tsuda, T., Nihira, T., Chiku, K., Suzuki, E., Arakawa, T., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Nakai, H., Fushinobu, S., Characterization and crystal structure determination of β -1,2-mannobiose phosphorylase from *Listeria innocua*. *FEBS Lett.*, **589**, 3816–3821, 2015.

Tsutsumi, K., Gozu, Y., Nishikawa, A., Tonozuka, T., Structural insights into polysaccharide recognition by *Flavobacterium johnsoniae* dextranase, a member of glycoside hydrolase family 31. *FEBS J.*, **6**, 1195–1207, 2020.

Vagin, A., Teplyakov, A., Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 22–25, 2010.

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S., AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic. Acids Res.*, **50**, D439–D444, 2022.

Watanabe, T., Aso, K., Isolation of kojibiose from honey. *Nature*, **183**, 1740, 1959.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S.,

Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D*, **67**, 235–242, 2011.

White, J.B.R., Silale, A., Feasey, M., Heunis, T., Zhu, Y., Zheng, H., Gajbhiye, A., Firbank, S., Baslé, A., Trost, M., Bolam, D.N., van den Berg, B., Ranson, N.A., Outer membrane utilosomes mediate glycan uptake in gut Bacteroidetes. *Nature*, **618**, 583–589, 2023.

Wongchawalit, J., Yamamoto, T., Nakai, H., Kim, Y. M., Sato, N., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Saji, O., Chanchao, C., Wongsiri, S., Surarit, R., Svasti, J., Chiba, S., Kimura, A., Purification and characterization of α -glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of its cDNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **12**, 2889–2898, 2006.

Yamamoto, T., Nishio-Kosaka, M., Izawa, S., Aga, H., Nishimoto, T., Chaen, H., Fukuda, S., Enzymatic properties of recombinant kojibiose phosphorylase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ATCC43494. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **6**, 1208–1210, 2011.

Yamamoto, T., Yamashita, H., Mukai, K., Watanabe, H., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Construction and characterization of chimeric enzymes of kojibiose phosphorylase and trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobacter brockii*. *Carbohydr. Res.*, **14**, 2350–2359, 2006.

Yokota, A., Takeuchi, M., Weiss, N., Proposal of two new species in the genus *Microbacterium*: *Microbacterium dextranolyticum* sp. nov. and *Microbacterium aurum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 549–554, 1993.

倉田陸矢 "ファミリー97に属する *Flavobacterium johnsoniae* 由来糖質加水分解酵素の機能と構造の解析" 静岡大学修士論文、2022.

発表論文

A 学位論文申請資格に関わる論文

1) Nakamura, S., Kurata, R., Tonozuka, T., Funane, K., Park, E.Y., Miyazaki, T., Bacteroidota polysaccharide utilization system for branched dextran exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, **299**, 104885, 2023.

2) Nakamura, S., Nihira, T., Kurata, R., Nakai, H., Funane, K., Park, E.Y., Miyazaki, T., Structure of a bacterial α -1,2-glucosidase defines mechanisms of hydrolysis and substrate specificity in GH65 family hydrolases. *J. Biol. Chem.*, **297**, 101366, 2021.

B 学位論文内容に関わる論文（未発表論文やプロシーディングを含む）

1) 中村 駿太郎, 倉田 陸矢, 仁平 高則, 中井 博之, 殿塚 隆史, 舟根 和美, 朴 龍洙, 宮崎 剛壱 デキストラン資化遺伝子群から発見した GH65 α -1,2-グルコシダーゼと関連酵素の構造機能解析 *応用糖質科学* **13**, 124–134, 2023.

2) Miyazaki, T., Tanaka, K., Nakamura, S., Dohra, H., Funane, K., Identification and characterization of dextran α -1,2-debranching enzyme from *Microbacterium dextranolyticum*. *J. Appl. Glycosci.*, **70**, 15–24, 2023.

C その他の論文（上記 A、B 以外の参考論文）

1) Nakamura, S., Miyazaki, T., Park, E.Y., α -L-Fucosidase from *Bombyx mori* has broad substrate specificity and hydrolyzes core fucosylated *N*-glycans. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **124**, 103427, 2020.

2) Miyazaki, T., Miyashita, R., Nakamura, S., Ikegaya, M., Kato, T., Park, E.Y., Biochemical characterization and mutational analysis of silkworm *Bombyx mori* β -1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase and insight into the substrate specificity of β -1,4-galactosyltransferase family enzymes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **115**, 103254, 2019.

謝辞

私の博士論文を完成させるにあたり、多くの方々に支えられ、助けられました。この場を借りて、感謝の意を述べたいと思います。

指導教員である静岡大学 グリーン科学技術研究所 准教授 宮崎剛亜先生に深い感謝の意を表します。6年間の研究生活において、宮崎剛亜先生には実験の直接指導及び原著論文の執筆など細部にわたる指導をしていただきました。また、静岡大学 グリーン科学技術研究所 教授 朴龍洙先生と教授 加藤竜也先生には論文の執筆や研究室生活において大変お世話になりました。さらに、静岡大学 グリーン科学技術研究所 教授 木村浩之先生には本論文の審査にあたり御助言を頂きました。

新潟大学 准教授 中井博之先生および新潟工科大学 准教授 仁平高則先生からは市販されていない貴重なオリゴ糖を合成していただきました。新潟大学 教授北岡本光先生には合成したオリゴ糖の NMR 解析および貴重なご意見をくださいました。山梨大学 教授 舟根和美先生からは多分岐デキストランを生成する菌株をいただきました。東京農工大学 教授 殿塚隆史先生には FjDex31A の大腸菌発現用プラスミドをいただきました。これらのサンプルが無ければ本研究は進みませんでした。また、先生方から原著論文の執筆に関して多くの助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

貴重な多分岐デキストランを御恵与いただきました元 実践女子大学 教授 小林幹彦 先生に感謝申し上げます。また、イソマルトオリゴ糖を御恵与いただきました株式会社林原に感謝申し上げます。

香川大学 准教授 吉田裕美先生には KEK にて吉田先生自身のビームタイムを利用して私のサンプルを解析させていただきました。誠にありがとうございました。また、X 線結晶構造解析の実験をサポートしてくださいました KEK-PF ビームラインスタッフの方々に感謝申し上げます。

常に研究室生活を支えてくださいました静岡大学 生物工学研究室の先輩方、同期、後輩達に感謝いたします。当研究室の卒業生の倉田陸矢君には多くの実験に協力していただきました。また、同期の池谷真里奈さんには 6 年間の研究生活で切磋琢磨することができました。彼女との議論で私の研究の幅が広がったと思います。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に、私を支えてくれた家族と友人に感謝の意を示します。