

アラビアガム分解能をもつビフィズス菌の
新規な糖質加水分解酵素

才新 直子

目次

Abstract	1
第一章 序論.....	3
1.1. 腸内菌叢	3
1.2. <i>Bifidobacterium</i> 属の特徴	3
1.3. プロバイオティクスとプレバイオティクス.....	4
1.4. <i>Bifidobacterium</i> 属の糖質加水分解酵素	5
1.5. ビフィズス菌の食物繊維分解能	6
1.6. ガム類, 特にアラビアガムの特徴	6
第二章 実験方法	9
2.1. 試薬類	9
2.2. 菌株と培養条件及び菌抽出液の調製	9
2.3. 酵素活性の測定	10
2.4. 酵素の精製.....	12
2.5. 分子量測定	14
2.6. タンパク質の質量分析	14
第三章 結果と考察.....	15
3.1. <i>Bifidobacterium</i> 属の食物繊維分解性.....	15
3.2. <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 7052 の糖質加水分解酵素活性	15
3.3. α -ガラクトシダーゼについて	24
3.3.1. 二種の α -ガラクトシダーゼ (X と I) の精製.....	24
3.3.2. 質量分析法による α -ガラクトシダーゼの同定	28
3.3.3. 基質特異性.....	36
1) 4NP-グリコシド化合物に対する基質特異性.....	36

2) ミカエリス定数 K_m , 及び最大反応速度 V_{max}	36
3.3.4. pH, 温度, 化合物の影響.....	37
1) pH による影響.....	37
2) 温度の影響.....	39
3) 金属イオン及び EDTA に対する影響.....	39
3.3.5. 糖転移活性.....	43
3.3.6. α -ガラクトシダーゼの考察.....	43
3.4. β -ガラクトシダーゼについて.....	50
3.4.1. 精製と分子量測定.....	50
3.4.2. 質量分析法による β -ガラクトシダーゼの同定.....	54
3.4.3. pH, 温度, 化合物の影響.....	54
3.4.4. 基質特異性と糖転移活性.....	60
3.4.5. β -ガラクトシダーゼの考察.....	63
3.5. α -グルコシダーゼについて.....	66
3.5.1. 精製と分子量測定.....	66
3.5.2. 質量分析法による α -グルコシダーゼの同定.....	70
3.5.3. 基質特異性.....	78
3.5.4. pH, 温度, 化合物の影響.....	78
3.5.5. 糖転移活性.....	81
3.5.6. α -グルコシダーゼの考察.....	89
第四章 結論.....	91
謝辞.....	93
参考文献.....	94

Abstract

Novel glycoside hydrolases found in *Bifidobacterium* species grown on gum arabic

Naoko Saishin

Background Bifidobacteria are Gram-positive anaerobic bacteria and are known to have beneficial effects on human health. Analysis of bifidobacterial genomes has revealed that there are several gene clusters composed of genes encoding a few glycoside hydrolases, a sugar transport system, and a transcriptional regulatory protein. Such gene clusters seem to be involved in metabolism of oligosaccharides and polysaccharides which are utilized as energy and carbon sources for the growth of bifidobacteria. Utilizable saccharides and glycoside hydrolases relating to their metabolism still remain to be investigated.

Aim To understand physiological and probiotic functions of bifidobacteria, glycoside hydrolases acting in the cytosol were purified, characterized, and attempted to be used to synthesize novel saccharides and beneficial compounds for human and animal health.

Methods Several species of *Bifidobacterium* isolated from human were grown with some gums used as food additives. Standard assay of glycoside hydrolase activity was performed with 4-nitrophenyl (4NP)-glycopyranoside. Galactose released by hydrolysis of saccharides was determined by the method with 3,5-dinitrosalicylate, and glucose released from saccharides was assayed using a glucose determination kit. Transglycosylation activity was detected by thin layer chromatography. Five enzymes were purified by ordinary methods including gel filtration, ion exchange and hydrophobic chromatographies, and polyacrylamide gel electrophoresis. Amino acid sequences of enzymes were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and tandem MS.

Results Among the tested gums gum arabic was found to be used as a carbon source for growth of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 7052. The strain JCM 7052 grown on gum arabic showed high specific

activities of α - and β -galactosidases, and α -glucosidases. These enzymes were purified and found to be novel enzymes. α -Galactosidase purified from the cells grown gum arabic was named α -GalX and that from the cells grown on glucose was α -GalI. The gene encoding α -GalX was not found in any genomes of *Bifidobacterium* species except *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052, while α -GalI was identified to be the *aga* gene product. α -GalX and α -GalI showed the highest hydrolyzing activities against 4NP- α -galacto-pyranoside at pH 7.5-8.0, although α -galactosidases purified from other organisms had activity optima at pH 5.5-6.0. Both enzymes hydrolyzed the α -1,6-galactoside bond of raffinose and stachyose, but not gum arabic. Transglycosylation activity was observed from 4NP- α -galactopyranoside to saccharides in each enzyme.

β -Galactosidase purified from the cells grown on gum arabic was identified to be a homologue of the *lacAI* gene product which is active against β -1,3-galactoside linkages but not against the β -1,4-linkage of lactose. This enzyme showed transglycosylation from 4NP- β -galactopyranoside to other saccharides.

Two α -glucosidases purified from the cells grown gum arabic were able to hydrolyze α -1,6-glucoside bonds but not α -1,4-glucoside linkages, indicating that both enzymes belong to oligo- α -1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10). Production of ethyl- α -D-glucoside by using α -1,6-glucosidase was found for the first time.

Conclusion The five enzymes purified from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 showed novel properties of their enzymatic functions. All of the enzymes had transglycosylation activity to produce oligosaccharides, and α -glucosidases synthesized ethyl- α -D-glucoside. These compounds would be utilized as cosmetic ingredients and food additives beneficial for stimulation of bifidobacterial growth and of human and animal health.

第一章 序論

1.1. 腸内菌叢

ヒトを含む動物の腸内には多種多様な微生物が生息しており、これを腸内菌叢とよんでいる。腸内菌叢はヒトや動物の健康と密接な関係があると考えられ、その構成微生物の研究は、嫌気的な分離・培養方法が確立された 1960 年代以降に急速に進み、ヒトだけでなく多くの動物の腸内菌叢の構成や、宿主との相互作用について飛躍的な理解をもたらした。腸内菌叢は多くの場合、糞便中の菌の種類と菌数を測定して調べており、総菌数はヒトの糞便 1 グラム当たり約 10^{11-12} 個である[1]。ヒトの腸内菌叢から 400 種以上の細菌が分離培養されており、*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* を含む *Streptococcus* などの乳酸菌群, *Bacteroides*, *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌), *Veillonella*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Megasphaera*, *Mitsuokella* などの嫌気性細菌, *Escherichia coli* (大腸菌), *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌), *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) などの通性嫌気性細菌などが主要な構成細菌である。他に *Candida* などの酵母類も見出されている。これらの菌のなかで, *S. aureus*, *E. coli*, *C. perfringens*, *Bacteroides*, *P. aeruginosa* は、食品などのタンパク質をアミンや有機酸、アンモニアなどに分解する腐敗菌や病気の原因となる病原菌などに分類される。さらに、生物の分類に分子生物学の手法が導入されることによって、ヒトの腸内には現在用いられている培養法では増殖できない細菌が多数存在することが示されている[2, 3]。

1.2. *Bifidobacterium* 属の特徴

Bifidobacterium 属は、ヒト、動物、昆虫の腸管に常在するグラム陽性桿菌であり、現在では 34 菌種に分類されると考えられている[4]。本菌の特長として、宿主の種類および宿主の年齢層によって分布が異なることが挙げられるが、その機序や意義はほとんど解明されていない。腸内常在菌である *Bifidobacterium* 属は病原性微生物の増殖抑制、抗突然変異性、抗発癌性の効果、下痢の防止、免疫獲得、そして、血清コレステロール減少を促進する等が報告されている[4]。

Bifidobacterium 属は G+C 含量の高い (55-67%) グラム陽性の偏性嫌気性細菌で、*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* などと同じ *Actinomycetales* 目に属する[5]。*Bifidobacterium* 属 34 種のうち、大部分は哺乳動物の腸管から分離されたも

ので、二、三の種がヒトの膣や口腔から分離されたものである[6]。ヒトでは *Bifidobacterium* 属は先ず新生児の無菌の腸管に住み着き、母乳栄養児で優勢となるが、離乳後は *Bacteroides* 属や他の菌属によって凌駕される[7, 8]。菌叢形成の過程は、腸内微生物に対する免疫の獲得だけでなく食餌中の抗原に対する免疫の発達にとって重要で[9]、免疫による抵抗性が欠如すると食物アレルギーや慢性の炎症をもたらすと考えられている。

最近 *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium suis* が同一の種であることが示され、各々 *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *suis* に再分類された[10, 11]ので、本論文では、従来 *B. longum* として用いていた菌種を *B. longum* subsp. *longum* と記すことにする。

1.3. プロバイオティクスとプレバイオティクス

Bifidobacterium 属は母乳栄養の新生児の腸内で最優勢菌 (10^{10-11} /糞便 1 g) となり、離乳期以降は最優勢ではなくなるものの、老齢期に至るまで糞便 1 g に 10^{8-10} 程で腸内に生息している[12]。母乳栄養児の成長や健康の維持・改善に重要な役割を果たしている有用菌とみることができる。食品や食品成分がヒトの生命活動の促進に役立つことが明らかとなり、特定の健康改善や栄養改良の目的を達成することが可能な食品が特定保健用食品として認定されるようになった。このような機能性食品に、プロバイオティクス、プレバイオティクスがある。

プロバイオティクスは「腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く生菌添加物」[13]であり、プレバイオティクスは「選択的に結腸内の単一または限られた数の細菌の成長あるいは活動を刺激することによって宿主に有益な効果を与え、宿主の健康を増進する難消化性食品成分」[14]と定義される。*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* は乳酸や他の有機酸を生産して腸内を酸性にすることからプロバイオティクスの定義と合致し、これらの有用細菌の増殖を促進するオリゴ糖や食物繊維はプレバイオティクスと考えることができる。

プロバイオティクスとしての *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* には次のような有益な効果が知られている。炭水化物の代謝による酢酸・乳酸の生成にともなう腸内 pH の低下，腐敗および病原菌の増殖抑制，腸内感染からの保護，便秘の改善，下痢の予防，乳糖不耐症の緩和，ビタミン生産，免疫の賦活化，アレルギー改善などである [4, 7-9, 13]。

1.4. *Bifidobacterium* 属の糖質加水分解酵素

2002 年に Schell らは *B. longum* subsp. *longum* 種で初めて多糖類を加水分解する酵素の遺伝子クラスターが 8 個あることを報告した[15]。2016 年迄にゲノム情報が公開された *Bifidobacterium* の菌種は 49 種である。先行した *B. longum* subsp. *longum* の NCC2705 株と DJO10A 株のゲノム DNA の塩基配列[15, 16]には， α -ガラクトシダーゼ， β -ガラクトシダーゼ， α -アラビノシダーゼ， α -グルコシダーゼ， β -グルコシダーゼ， α -マンノシダーゼなどの糖質加水分解酵素の遺伝子が 40 種余りと，加リン酸分解酵素の遺伝子が 2, 3 種見つかっている。

また，Hinz らにより *Bifidobacterium longum* が細胞外で多糖類を加水分解して生じたオリゴ糖を，細胞内へ取り込み，単糖へ分解する機序が明らかにされた[17]。それは，まず細胞表面に結合した加水分解酵素により多糖類が三糖または四糖にまで分解され，続いて，生成した三糖類または四糖類は細胞膜の ATP-Binding Cassette (ABC) のアミノ酸配列をもつ輸送体によって，ATP のエネルギーを利用して細胞内に取り込まれる(細菌の ABC 輸送体は，基質を結合して捕捉する膜タンパク質，膜貫通型のパーミアーズ，及び ATP 結合タンパク質から構成されており，糖質の他，アミノ酸，ペプチド，抗生物質などを細胞内外へ能動輸送する。)そして細胞内に取り込まれた三糖類または四糖類は，細胞内の糖質加水分解酵素によって単糖にまで分解され，エネルギー源や菌体成分の合成原料として利用されるというものである。

これらのことから，*Bifidobacterium* 属は種々のオリゴ糖や多糖類を多種類の糖質加水分解酵素の作用によって利用していると予想される。しかし，*Bifidobacterium* 属，な

かでも *B. longum* subsp. *longum* の糖質加水分解酵素についてはあまり調べられていなかった。最近になって炭水化物の利用に関連する新規な酵素ラクト-N-ビオースホスホオリラーゼ，エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ，N-アセチルヘキソサミン-1-キナーゼが *B. longum* subsp. *longum* で見出され，精製されて性質が調べられた [18-20]。これらの酵素の他，*B. longum* subsp. *longum* から精製されて性質が調べられたのは α -ガラクトシダーゼ[21]， β -ガラクトシダーゼ[22, 23]の他， α -アラビノフラノシダーゼであり[24]，その他の遺伝子にコードされた糖質加水分解酵素の性質や生理的な役割は未解明のままであった。

1.5. ビフィズス菌の食物繊維分解能

食物繊維である多糖類は一種類または二種類の結合様式で形成されているが，ガム類は二種類以上の結合様式で形成されている。このため，ガム類の分解を調べることによって，糖質加水分解酵素，及び糖質加リン酸分解酵素に関する多くの知見を得ることが可能と考えられる。

Crocianiら[25]はビフィズス菌 29 種について，単糖類，多糖類，糖タンパク質ムチン，及びガム類に対する分解能を報告している。ビフィズス菌のうち，ガム類を分解できるものは殆どが *B. longum* 種であり，調べられた *B. longum* 種 20 株のうち，12 株がアラビアガムを分解し，2 株がローカストビーンガムを分解するが，グアガムを分解する株はなかった。しかし，低分子グアガムについては調べられていない。

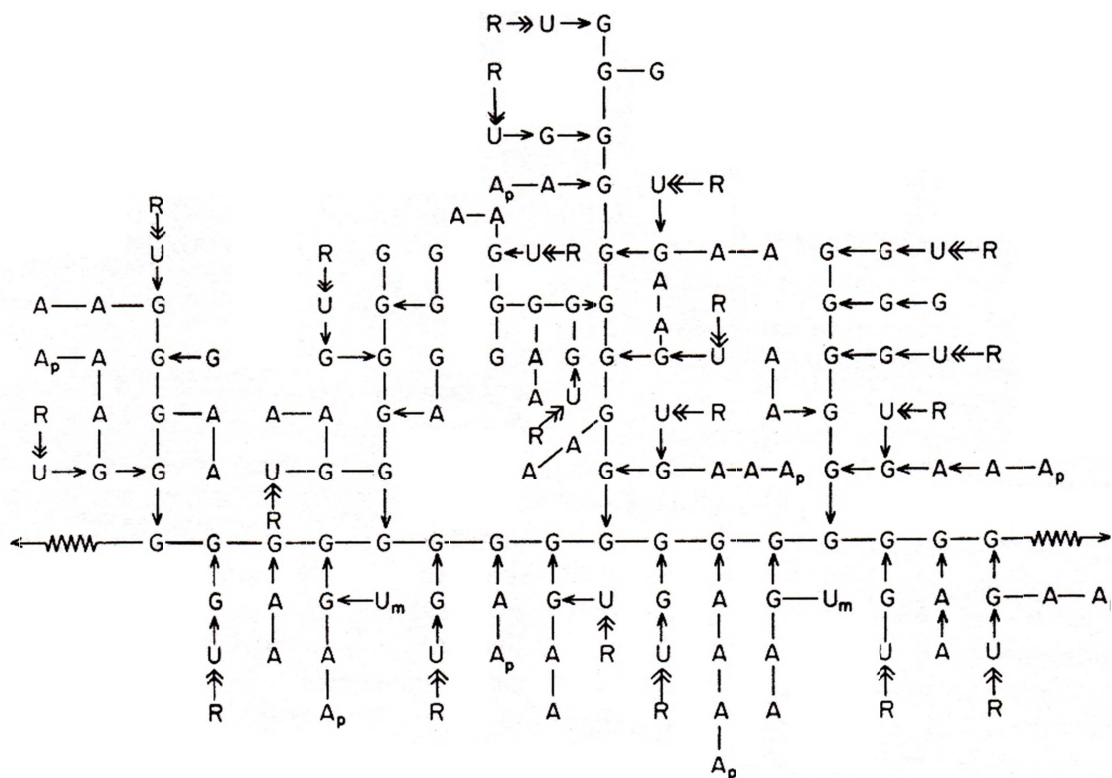
そこで，本研究では，食物繊維の中でも特にガム類に着目した。

1.6. ガム類，特にアラビアガムの特徴

グアガムとローカストビーンガムは β -1,4 結合した主鎖のマンノース 2 分子に対してガラクトース 1 分子が側鎖に α -1,6 結合している。マンノースとガラクトースの構成比率はグアガムが 1:2，ローカストビーンガムが 1:3~4 で，サンファイバーはグアガムを低分子化したものである。アラビアガムはアラビノガラクトタン(AG, 90%)，アラビノガラクトタンタンパク質複合体(AGP, 10%)，糖タンパク質(1%)の 3 つの主成分から成る複合多糖類である。

AGPの炭水化物ブロックとAGの成分は類似しており、ガラクトース(40%)、アラビノース(30%)、グルクロン酸(15%)、ラムノース(12%)から成る。Fig. 1に示すように、主鎖は β -1,3結合のガラクトタンで、これに分岐した側鎖をもつ構造をしている[26]。そして、六つの結合様式—ガラクトシル β -1,3結合、ガラクトシル β -1,6結合、アラビノフラノシル β -1,3結合、アラビノピラノシル α -1,3結合、グルクロニル β -1,6結合、ラムノシル α -1,4結合—で形成されている難消化性の食物繊維である。水溶性が非常に高く、食品添加物の安定剤、増粘剤、錠剤のコーティング剤として広く使用されている[27]。

本研究では食物繊維であるガム種を炭素源として増殖するビフィズス菌を、研究室で保有する *Bifidobacterium* 属の菌種・菌株の中から同定し、さらに、その分解に関与すると予想される酵素を精製してその性質を調べ、酵素の利用について検討することを目的とした。



G = D-galactopyranose; A = L-arabinofuranose; A_p = L-arabinopyranose; U = D-glucuronic acid; U_m = D-4-O-methylglucuronic acid; R = L-rhamnose; glycosidic bonds: — = β-1,3-; → = β-1,6-; ⇨ = α-1,4-.

Fig. 1. Possible structural fragment of gum arabic (from C. A. Street and D. M. W. Anderson, *Talanta*, 30, 887-893 (1983))

第二章 実験方法

2.1. 試薬類

アラビアガム (*Acacia senegal* 由来), ローカストビーンガム, グアガム, ラフィノースは和光純薬工業(株)から購入した。4-nitrophenyl (4NP)-グリコシド, メリビオース, スタキオース, ツラノース, マルトース, メレジトース, マルトトリオース, セロビオース, アミロース(じゃが芋由来)はシグマ-アルドリッチ(株)(St. Louis, USA)より入手した。サンファイバー(低分子グアガム, 分子量約 20,000)は太陽化学(株)より提供して頂いた。イソマルトース, パノースは(株)林原から購入した。他の化学物質は特級の試薬で和光純薬工業(株)から購入した。

2.2. 菌株と培養条件及び菌抽出液の調製

本研究で使用した次の菌株は国立研究開発法人 理化学研究所 バイオリソースセンターの Japan Collection of Microorganisms (JCM) から入手した。

Bifidobacterium adolescentis JCM 1275, *Bifidobacterium angulatum* JCM 7096, *Bifidobacterium animalis* JCM 1190, *Bifidobacterium bifidum* JCM 1255, *Bifidobacterium breve* JCM 1192, *Bifidobacterium catenulatum* JCM 1194, *Bifidobacterium gallicum* JCM 8224, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* JCM 1222, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217, *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052, *B. longum* subsp. *longum* JCM 7053, *B. longum* subsp. *longum* JCM 7055, *B. longum* subsp. *longum* JCM 7056, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 1200。また, *B. longum* subsp. *longum* 105-A は加納康正先生(京都薬科大学)より分与された。

培養は次に示す部分改変した *Bifidobacterium* 培地を用いて 37°C で嫌気的に行った。

改変 *Bifidobacterium* 培地 1 L 中: ポリペプトン(日本製薬), 10 g; 魚肉エキス(和光純薬株式会社), 5 g; イーストエキス(東洋イースト), 5 g; K₂HPO₄, 3 g; アスコルビン酸

Na, 10 g; L-システイン塩酸塩, 0.5 g; Tween 80, 1 ml. pH を 2 N NaOH で 6.8 に調整した。必要に応じてグルコース, アラビアガム, グアガム, サンファイバーやローカストビーンガム (各 10 g/l)を炭素源として添加した。

嫌氣的培養はブチルゴム栓を付けた試験管に CO₂ を 3-5 分間通気するか, 或いは培地をスクリュキャップのついた瓶の口まで満たすことによって行った。

各炭素源を含む培地中で 1 晩培養させた前培養液を 1% 容量ずつ接種し, 一定の培養時間の間隔で集菌した。培養液は光路長 10 mm のキュベットを用いて分光光度計 (Hitachi UV-1900) で 660 nm の吸光度を測定した。培養液の吸光度が 0.5 以上であった場合は, 0.85% の NaCl で 0.5 未満になるように希釈して測定した。菌は 4°C で 15 分間, 18,000-20,000 x g で遠心分離し, 0.85% NaCl で 3 回洗浄して使用時まで -20°C で保管した。

菌は 4 倍容の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で懸濁した。菌懸濁液は氷中で 5 分または 10 分間, 20 kHz, 140 W で超音波処理 (TOMY Ultrasonic Disruptor UD-200, Japan) し, 4°C で 20 または 30 分間, 20,000 x g で遠心分離を行い, 上清を菌抽出液とした。

2.3. 酵素活性の測定

糖質加水分解活性の標準測定に 4NP-グリコシドを基質として用いた。反応液 1.0 ml 中に, 酵素液, 80 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), 1 mM 4NP-グリコシドを含み, 30°C で 5 分間反応後 0.2 M Na₂CO₃ を 0.5 ml 添加して反応を停止した (α -グルコシダーゼの活性測定時は pH 6.0 のリン酸カリウム緩衝液を使用し, 40°C で 10 分間反応させた)。生じた 4-ニトロフェノールの量を 400 nm の吸光度で測定し, 吸光係数 18.3 mM⁻¹ cm⁻¹ をモル数の計算に用いた。酵素活性の 1 unit は 1 分間当たり 1 μ mol の 4-ニトロフェノールを生成する酵素の量と定義した。

ガラクトースを含有する多糖類を加水分解する酵素活性は反応液中に生成された還元糖を 3,5-ジニトロサリチル酸法[28]を用いて, 540 nm の吸光度を測定することにより

定量した。ガラクトースを検量線作成に用いた。反応液 50 μ l に酵素液, 80 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), 基質として 100 mM のラフィノース, スタキオース, ラクトースまたは 0.5% アラビアガムを含み, 30°C で 60 分間反応させた。酵素活性の 1 unit は多糖から 1 分間当たり 1 μ mol の還元基を生成する酵素の量と定義した。

グルコースを含有する多糖類を加水分解する酵素活性は, グルコース分析キット LabAssay™ Glucose (和光純薬工業(株))を用いて測定した。グルコースを検量線作成に用いた。反応液 50 μ l には酵素液, 80 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 基質として 20 mM の二糖類または三糖類 (トレハロース, イソマルトース, パラチノース, イソマルトトリオース, パノース)を含み, 40°C で 5 分間反応させた。その他の多糖類を基質とした時は 40°C で 30 分間反応させた。反応液を 5 分間沸騰水中で加熱して反応を停止させた。

糖転移活性の反応生成物は Silica gel 60 (Merck Ltd., Germany)を用いた薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した。 α -及び β -ガラクトシダーゼの糖転移反応は反応液 1.0 ml 中に 0.2 U の酵素液, 80 mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.0), 15 mM 4NP- α -D-ガラクトピラノシド又は 4NP- β -D-ガラクトピラノシド, 80 mM 多糖類を含み, 37°C で 1, 6, 12 時間又は 1, 6, 24 時間反応させた。糖は展開溶媒として *n*-ブタノール:酢酸:水 (5:4:1)を用いた。

α -グルコシダーゼの糖転移反応は, 同一のグリコシドがグルコース供与体と, 受容体の両方になる場合, 反応液 1.0 ml 中に 0.14-0.22 U 酵素液, 80 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 0.4 M グルコシド(イソマルトース, トレハロース, パラチノース, イソマルトトリオース, パノース)を含み, 35°C で, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間反応させた。

パラチノースからアルコール類へのグルコース転移反応は, 反応液 1.0 ml 中に 0.2 U 酵素液, 80 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 1.0 M アルコール類(1-プロパノール, 2-プロパノール, エタノール, 1-ブタノール, 1-ヘキサノール, 1-オクタノール), 0.5 M パラチノースを含み, 35°C でグルコシド間の転移活性と同じ間隔の反応時間で実施した。1-ブタノール, 1-ヘキサノール, 1-オクタノールを用いる場合, 難水溶性のアルコールが

分離しない様に反応液に 0.1% Tween 80 を加えた。反応後、5 分間沸騰水中で加熱し反応を停止して遠心分離を行った。そして反応液の上清と標準とする糖類をシリカゲル板上に 0.5 μ l 又は 1.0 μ l スポットし、展開溶媒 2-プロパノール:1-ブタノール:水 (2:2:1)で 2 回展開した。展開後のシリカゲル板に 5%または 10%の硫酸を含むエタノールを噴霧し、130°Cで 15 分加熱して反応生成物を検出した。

精製酵素の熱安定性測定は酵素(約 0.2 U/ml)の入った試験管を 40, 45, 50, 55°C の恒温槽に置き、時間毎に酵素液を一部取り出して反応液に加えて行った。 α -及び β -ガラクトシダーゼは 30°Cで、 α -グルコシダーゼは 40°Cで酵素活性を 4NP- α -D-ガラクトピラノシド, 4NP- β -D-ガラクトピラノシド, または 4NP- α -D-グルコピラノシドを基質として測定した。

タンパク質濃度の測定は、菌または菌抽出液については Lowry 法で、酵素の精製では Coomassie brilliant blue (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて行った。牛血清アルブミンを検量線作成に用いた。

すべての測定は 3 回ずつ行った。

2.4. 酵素の精製

α -ガラクトシダーゼと β -ガラクトシダーゼは菌抽出液の調製、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーの順に進めた。

α -グルコシダーゼは菌抽出液の調製、硫酸分画、ゲルろ過の後、イオン交換クロマトグラフィーを 2 回行ってから、疎水性クロマトグラフィーを行った。以下に詳細を述べる。

菌体は 4 倍容の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2)で懸濁した。菌懸濁液を氷上で 5 分間、20 kHz, 140 W で超音波処理(TOMY Ultrasonic Disruptor UD-200, Japan)し、4°Cで 30 分間、20,000 $\times g$ で遠心分離を行い、上清を菌抽出液とした(Step 1. Crude extract)。(NH₄)₂SO₄ の 30-70%飽和で得られた沈殿を 50 mM Tris-HCl(pH 7.2)で溶解した(Step 2. Ammonium sulfate fraction)。このタンパク質を 0.1 M NaCl を含有

する 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) で平衡化した Sepharose 4B カラム(2.5 x 90 cm) (GE Healthcare, Sweden)に乗せ, 同じ緩衝液で流速 0.3 ml/min または 0.4 ml/min で溶出し, 酵素活性を含む溶出液をまとめた (Step 3. Sepharose 4B)。続いて 0.1 M NaCl を含有する 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)で平衡化した Q-Sepharose カラム(1.5 x 5 cm または 10 cm) (GE Healthcare, Sweden) に吸着させ, α -及び β -ガラクトシダーゼは NaCl 濃度勾配 0.1-0.7 M (流速 0.5 ml/min), で溶出し, 酵素活性を示す溶出液を得た (Step 4. Q-Sepharose)。 α -グルコシダーゼは Sepharose 4B の活性画分を冷水で 10 倍に希釈し, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)で平衡化した Q-Sepharose に吸着させ, NaCl 濃度勾配 0.1-0.32 M (流速 0.3 ml/min)で溶出した後, 再び活性溶出液を希釈してイオン交換クロマトグラフィーのカラムに吸着させて 2 回目の溶離を行った。 α -及び β -ガラクトシダーゼの精製では, この溶出液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 1.84 M になるように加え, 1.84 M として, の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含有する 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)で平衡化した Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow カラム (1.5 x 4 cm または 5 cm) (Amersham Biosciences, Sweden)に吸着させ, 酵素は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の濃度勾配 1.84-0 M の変化 (流速 1 ml/min) で溶出した。同様のカラムを用いて α -グルコシダーゼを, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度勾配 1.1-0.7 M で流速 0.5 ml/min で溶出した。得られた酵素溶出液を遠心濾過チューブ Vivaspin 4 (Sartorius, Germany)を用いて脱塩すると共に, タンパク質を濃縮した(Step 5. Butyl-S Sepharose)。

α -ガラクトシダーゼ X の精製では, 最後に CHT Ceramic Hydroxyapatite Type I 40 μm のカラム(1.5 x 3 cm) (Bio-Rad Laboratories, USA)へ吸着し, リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2)を濃度 0.01-0.5 M の範囲で 0.05 M, 5 ml の段階勾配により, 流速 1 ml/min で溶出した(Step 6. Hydroxyapatite)。

α -ガラクトシダーゼ I と β -ガラクトシダーゼ, α -グルコシダーゼの精製では, 濃縮した酵素をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含まないポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離した後, ゲルの酵素活性染色 (2 mM 4NP-グリコシドに浸し, 室温で酵素反応し, 黄色を呈する)を行い, 酵素活性を示す部分のゲルを切り出し, 50 mM Tris-HCl

(pH 7.2)に浸漬した。酵素をゲル抽出スピнкаラム(Bio-Rad, USA) を用いて遠心抽出した後、遠心濾過チューブ Vivaspin 4 で濃縮した(Step 6. Native PAGE)。

2.5. 分子量測定

酵素の分子量は SDS 存在下で行う SDS-PAGE と、SDS を加えない Native PAGE によって測定した。SDS-PAGE は 1%(w/v) の SDS を含む 12.5% (w/v) のポリアクリルアミドゲルで行い[29], SDS-PAGE 用のタンパク分子量マーカーとして、 α -及び β -ガラクトシダーゼ用にタンパク分子量サイズマーカー (GE Healthcare, UK), または、 α -グルコシダーゼ用に WAKO PLUS-VIEW™ Protein Size Marker (和光純薬工業(株))を用いた。Native PAGE はポリアクリルアミドの濃度勾配 5-15% (w/v)で行った。Native PAGE 用のタンパク分子量マーカーとして HMW calibration kit (GE Healthcare, UK) (α -及び β -ガラクトシダーゼ用), または NativeMark™ (Invitrogen, USA)(α -グルコシダーゼ用)を用いた。

ゲル内のタンパク質は Coomassie blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, USA)で染色して検出した。

2.6. タンパク質の質量分析

SDS-PAGE ゲル中のタンパク質を, Tanaka らの方法[30]を一部改変してシーケンス用トリプシンで水解した。タンパク質の同定は, ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 解析で行った。これは Ultraflex MS システム (Bruker Daltonik GmbH, Germany) を用いて matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)-mass spectrometry (MS) とタンデム MS (MS/MS) とで行うものである。PMF の結果は Mascot 検索エンジン (<http://www.matrixscience.com/>)を利用して NCBI タンパク質データベースを検索した。PMF の結果と MS/MS の結果を合わせて再検索し, 検索の結果の信頼性を高めた。

第三章 結果と考察

3.1. *Bifidobacterium* 属の食物繊維分解性[31]

最初に *Bifidobacterium* 属の 10 種 15 株について食物繊維分解能を検討した。結果を Table 1 に示した。これらの菌株のうち、ラットから分離された *B. animalis* JCM 1190 株以外はすべてヒト由来のものである。*Bifidobacterium* 属を嫌気培養した結果、糖質を含まない改変 *Bifidobacterium* 基本培地ではどの株も成長しなかった。グルコースを添加とした培地では、試験を行ったすべての株がよく増殖し、8 時間培養後には菌の沈殿が生じ始めた。グアガム、サンファイバー、ローカストビーンガムを炭素源とする培地では増殖が殆どみられなかった。

アラビアガム含有培地で *B. longum* subsp. *longum* のうち JCM 7052 株と JCM 7053 株が増殖したが、他の株 JCM 1217, JCM 7055, JCM 7056, 105-A 及び他の種は増殖しなかった。*B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 株と JCM 7053 株の培養は、JCM 7052 株が 16 時間で、JCM 7053 株が 40 時間で高い濁度に達した。

アラビアガムはガラクトースが β -1,3 結合した主鎖にガラクトースが β -1,6 結合した側鎖が付き、その側鎖には更にアラビノースやラムノース、グルクロン酸が結合している高分子のコアをペプチドで連結した複合多糖である。しかし、アラビアガム分解に働く酵素の研究が殆どなかったことから、アラビアガムのもつ糖の多様な結合を加水分解する新規な糖質加水分解酵素がアラビアガム分解に関わっていると予想して、以後の研究では、アラビアガムを添加した培地でよく増殖する *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 を用いることにした。

3.2. *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 の糖質加水分解酵素活性

B. longum subsp. *longum* JCM 7052 をアラビアガムを含む培地で培養し、対数増殖期に集菌した。アラビアガムを加水分解して還元基を生成する酵素活性を菌体と菌抽出液で測定したところ、菌体に $1.65 \pm 0.21 \mu\text{mol}/60 \text{ min}/\text{mg}$ of protein, 菌抽出液に $1.02 \pm 0.06 \mu\text{mol}/60 \text{ min}/\text{mg}$ of protein の比活性であった。しかし、この酵素活性は培

Table 1. Growth of *Bifidobacterium* species on several carbohydrates as carbon source.

<i>Bifidobacterium</i> species	Strain	Cell growth on						Gum locust been
		No sugar	Glucose	Gum arabic	Gum guar	Sunfiber		
<i>B. adolescentis</i>	JCM 1275	—	+	—	—	—	N.D	
<i>B. angulatum</i>	JCM 7096	—	+++	—	±	—	±	
<i>B. animalis</i>	JCM 1190	—	+++	—	±	—	±	
<i>B. bifidum</i>	JCM 1255	—	+	—	±	±	N.D	
<i>B. breve</i>	JCM 1192	—	+	—	—	—	N.D	
<i>B. catenulatum</i>	JCM 1194	—	+++	—	±	—	±	
<i>B. gallicum</i>	JCM 8224	—	++	—	±	—	±	
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	JCM 1222	—	+++	—	±	—	N.D	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM 1217	—	+++	—	—	—	N.D	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM 7052	—	+++	+++	±	—	±	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM 7053	—	+++	++	±	—	±	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM 7055	—	++	—	—	—	N.D	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM 7056	—	++	—	±	±	N.D	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	105-A	—	+++	—	±	—	±	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	JCM 1200	—	++	—	+	±	N.D	

+++ , Cell growth occurred during incubation for 16 h; ++, for 40 h; +, for 64 h; ±, a slight growth during 64 h incubation; — , no growth during 64 h incubation; N.D, not determined.

養上清には全く検出されなかった。これらのことは菌体の細胞表面にアラビアガムに作用する酵素が存在することを示唆している。

アラビアガム、ラクトース、グルコースを各々含有する培地で *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 を培養し、糖質による酵素活性への影響を調べた。各菌抽出液の酵素活性を 4NP-グリコシドを基質として用いて調べたところ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、 α -アラビノフラノシダーゼ、 α -アラビノピラノシダーゼ、 β -フコシダーゼの活性が各々得られた(Table 2)。アラビアガムで培養した菌抽出液には、グルコースで培養したものと比較して α -ガラクトシダーゼが約 10 倍、 β -ガラクトシダーゼが約 4 倍、 α -アラビノフラノシダーゼが約 5 倍、 α -アラビノピラノシダーゼが約 4 倍、 α -グルコシダーゼと β -フコシダーゼが約 2 倍高い比活性が得られた。

4NP-グリコシドの加水分解活性の変動を知るためにアラビアガムで培養して 4, 8, 12, 16, 20 時間後に集菌し、各菌抽出液の活性を測定した。その結果、 α -ガラクトシダーゼの比活性は増殖静止期に高く、少なくとも 12 時間維持された。 β -ガラクトシダーゼの比活性も増殖静止期で最高値が得られた(Fig. 2)。他の酵素の活性は、どの増殖時期でも変動は小さく Table 2 とほぼ同様の値であった。

これらの結果からアラビアガムが *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 株の細胞表面にある未同定の酵素によって加水分解され、その分解産物が細胞質中に取り込まれて α -ガラクトシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼなどによって分解されることが予想された。

B. longum subsp. *longum* の α -ガラクトシダーゼと β -ガラクトシダーゼの研究はこれ迄十分進められていなかった。 α -ガラクトシダーゼについては *B. longum* subsp. *longum* CRL 849 の粗抽出液を用いて報告されているのみである[21]。また、 β -ガラクトシダーゼはグルコースで培養した *B. longum* subsp. *longum* 401 [22]と *B. longum* subsp. *longum* CRC 15708 から精製されているが[23]、サブユニット分子量や糖転移活性、遺伝子などは調べられていない。そこで、アラビアガムで培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から α -ガラクトシダーゼと β -ガラクトシダーゼを精製し、さらにグルコース培養した菌からも α -ガラクトシダーゼを精製して性質を調べることにした。

Table 2. Enzyme activities with 4NP-glycoside in extracts from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on 1% carbohydrate.

Substrate	Enzyme activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) \pm SE (3)		
	Gum arabic	Lactose	Glucose
4NP- α -L-Arabinofuranoside	0.444 \pm 0.095	0.420 \pm 0.041	0.091 \pm 0.012
4NP- α -L-Arabinopyranoside	0.489 \pm 0.083	0.195 \pm 0.047	0.117 \pm 0.003
4NP- α -D-Galactopyranoside	1.960 \pm 0.059	0.404 \pm 0.055	0.176 \pm 0.019
4NP- β -D-Galactopyranoside	1.850 \pm 0.075	0.797 \pm 0.197	0.491 \pm 0.046
4NP- α -D-Glucopyranoside	1.120 \pm 0.116	0.864 \pm 0.125	0.500 \pm 0.052
4NP- β -D-Fucopyranoside	0.319 \pm 0.062	0.084 \pm 0.008	0.148 \pm 0.009

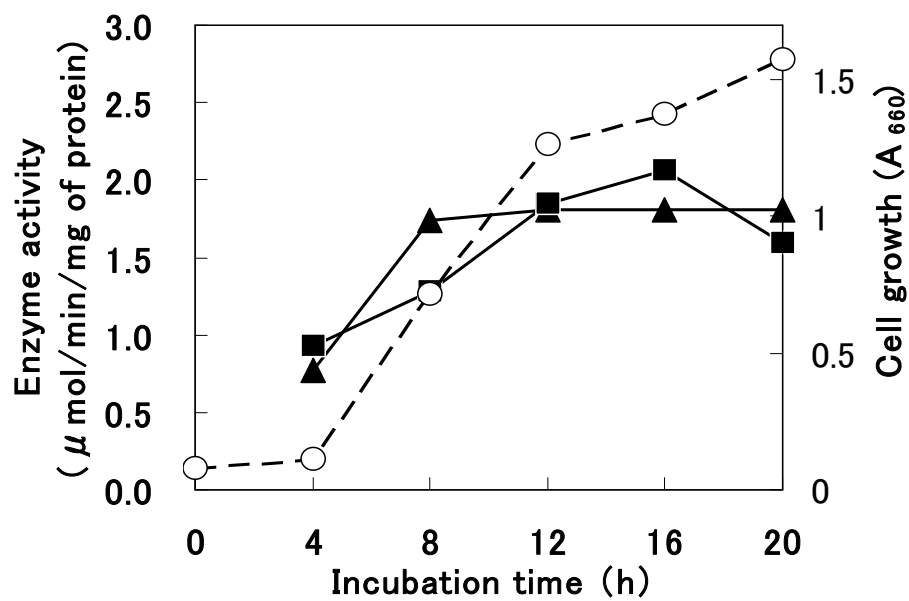


Fig. 2. Enzyme activities during growth of *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 on 1% gum arabic. ○, Cell growth; ▲, 4NP-α-D-galactosidase; and ■, 4NP-β-D-galactosidase.

現在までに α -及び β -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼは *Bifidobacterium* 属の 5 種 15 株で調べられている (Table 3)。

これまでに食物繊維を分解して増殖する能力が腸内細菌に対して調べられており[25, 52, 53], *B. longum* subsp. *longum* 種のいくつかの菌株がアラビアガムで増殖することが知られていたが, アラビアガム分解に働く酵素などについて調べられてこなかった。アラビアガムはその成分としてアラビノガラクトタンを含んでいるが, アラビノガラクトタンには β -1,4 結合したガラクトシドを主鎖とする I 型と, β -1,3 結合したガラクトシドの主鎖に β -1,6 結合したガラクトシドを側鎖としてもつ II 型があり, アラビアガムは II 型である。これまでに I 型のアラビノガラクトタンを分解する細胞外のエンド- β -1,4-ガラクタナーゼ (GH 53) の遺伝子 *galA* が *B. longum* subsp. *longum* NCC 2705 [15]と *Bacillus licheniformis* DSM13 [54]で見つかっており, いずれも β -ガラクトシダーゼの遺伝子 *lacA* の近傍にあることから, 二つの酵素は I 型アラビノガラクトタンの分解系を構成していると考えられる。II 型のアラビノガラクトタンの分解に働く酵素として β -1,3 及び β -1,6 結合したガラクトシル基を加水分解するエキソ- β -ガラクトシダーゼの存在が大根[55]に見つかっている他, カビ *Trichoderma viride* からエンド- β -1,6-ガラクタナーゼ遺伝子がクローン化されている [56]。しかし, これまでに細菌からはアラビアガム分解に働く酵素や遺伝子は同定されておらず, 本研究で初めて *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 株にその存在が示唆された。

Table 3. Properties of α - and β -galactosidases, and α -glucosidases from *Bifidobacteria* *

Species	Strain	Enzyme	Mol. Mass (kDa) SDS/native	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	Accession Number	Gene	GH Family	References
<i>B. adolescentis</i>									
	DSM 20083	α -galactosidase	83/330	6	45	AF124596	<i>aga</i>	31	32
		β -galactosidase	89/350	6	35			2	33
			81/235	6.0	50	AY359872	<i>bgal II</i>	42	34
		α -glucosidase	71/68	6.6	37	AF358444	<i>aglA</i>	13	35
			73/149	6.8	47	AF411186	<i>aglB</i>	13	35
	Int-57	β -galactosidase	-	-	-	AF213175	<i>gal</i>		-
<i>B. bifidum</i>									
	DSM 20082	β -galactosidase	163-190/362	6.5	37-39				36
	DSM 20215	β -galactosidase	112/620	-	-	AJ272131	<i>bif1</i>	42	37
			130/236	-	-	AJ224434	<i>bif2</i>	2	37
			182/360	-	-	AJ224435	<i>bif3</i>	2	37
<i>B. breve</i>									
	203	α -galactosidase	39/330	5.5	-				39
			81/152	5.5	-	DQ267828	<i>aga II</i>	31	40
	YIT 4010	β -galactosidase	75/-	-	-	E05040			41
	UCC2003	α -glucosidase	69/-	5.5	37	ABE96517	<i>agl1</i>	13	42
			70/-	5.5	30	ACM89183	<i>agl2</i>	13	42

Table 3. Continued 1

Species	Strain	Enzyme	Mol. Mass (kDa) SDS/native	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	Accession Number	Gene	GH Family	References
<i>B. breve</i>	UCC2003	α -glucosidase		6.5	37	ABE94823	<i>agl3</i>	13	43
			-	N.D	-	ABE94829	<i>agl4</i>	13	43
			-	7.5	30		<i>melD</i>		44
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>									
	ATCC 15697	α -galactosidase	-	6.0	40				45
		β -galactosidase	-	7.0	40				45
	DSM 20088	β -galactosidase	77/140	-	-	AJ224436	<i>infl</i>	42	37
	HL 96	β -galactosidase	-	-	-	AF192265	<i>bgal I</i>	2	46, 74
		β -galactosidase	-	-	-	AF192266	<i>bgal III</i>	42	46, 74
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>									
	401	β -galactosidase	- /330	6.0	40				22
	CCRC 15708	β -galactosidase	- /357	7.0	50				23
	CRL 849	α -galactosidase	-	5.8	40-45				21
	MB 219	β -galactosidase	-	-		AJ242596	<i>lacZ</i>	2	47
	VMKB 44	α -galactosidase	83/-	-		AF160969	<i>aglL</i>	31	38

Table 3. Continued 2

Species	Strain	Enzyme	Mol. Mass (kDa) SDS/native	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	Accession Number	Gene	GH Family	References
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>									
	JCM 7052	α -galactosidase X	79/150	8.0	40-45				This study [31]
		α -galactosidase I	85/162	7.5	45		<i>Aga X</i>	31	This study [48]
		β -galactosidase	77/110	7.0	50-55		<i>lacA1</i>	42	This study [49]
		α -glucosidase	72/70	5.5-6.0	45-50		<i>aglA1</i>	13	This study [50]
			73/93	5.5-6.0	45-50		<i>aglA2</i>	13	This study [50]

* Modified from the reference [51]

3.3. α -ガラクトシダーゼについて

α -ガラクトシダーゼ (EC 3. 2. 1. 22) はガラクトースが α -1,6 結合した糖質を加水分解してガラクトースを遊離するが (Fig. 3), α -1,6 結合したガラクトースは大豆などに含まれるガラクトオリゴ糖であるメリビオース, ラフィノースやスタキオースなどに存在する。この酵素は哺乳動物, 植物, および微生物菌体内に広く分布している[57-63]。これらの中でも植物中に異なる 2 つのタイプの α -ガラクトシダーゼが知られており, ひとつは酸性環境下で作用し, もう一つは中性またはアルカリ性の条件下で作用する。*B. longum* subsp. *longum* を含むいくつかの *Bifidobacterium* 属の菌種もまた α -ガラクトシダーゼを持っており, 最適 pH が 5.5-6.0 と報告されている (Table 3)。 α -ガラクトシダーゼは通常, 糖鎖を加水分解する酵素として記述されるが, それらのいくつかには加水分解によって遊離する糖を種々の糖類に転移する糖転移活性が見られており, 新しいオリゴ糖を合成する手段として利用し得ることが期待されている。

アラビアガムで培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7025 から α -ガラクトシダーゼを精製した時, Q-Sepharose を用いたイオン交換クロマトグラフィーで二つの α -ガラクトシダーゼ活性が見られた。しかし, その活性は 10 倍の差があった (Fig. 4A)。アラビアガム培養菌から得られる α -ガラクトシダーゼを α -ガラクトシダーゼ X とし, もう一つの α -ガラクトシダーゼをグルコース培養菌から精製し, この酵素を α -ガラクトシダーゼ I とした。

3.3.1. 二種の α -ガラクトシダーゼ (X と I) の精製[31] [48]

α -ガラクトシダーゼ X はアラビアガムで培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から精製し, 結果を Table 4 に示した。Q Sepharose イオン交換クロマトグラフィーにかけたところ, α -ガラクトシダーゼ X は NaCl 濃度 0.53 M で溶出された。

Butyl-S Sepharose6 Fast Flow を用いた疎水性クロマトグラフィーで α -ガラクトシダーゼ酵素活性は 0.86 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を流した時に溶出した。最後にヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーで α -ガラクトシダーゼ X は 0.1 M リン酸塩 (pH 7.2) によって溶出された。Table 4 に示すように, 最終的に α -ガラクトシダーゼ X は 66 倍に精製され, SDS-

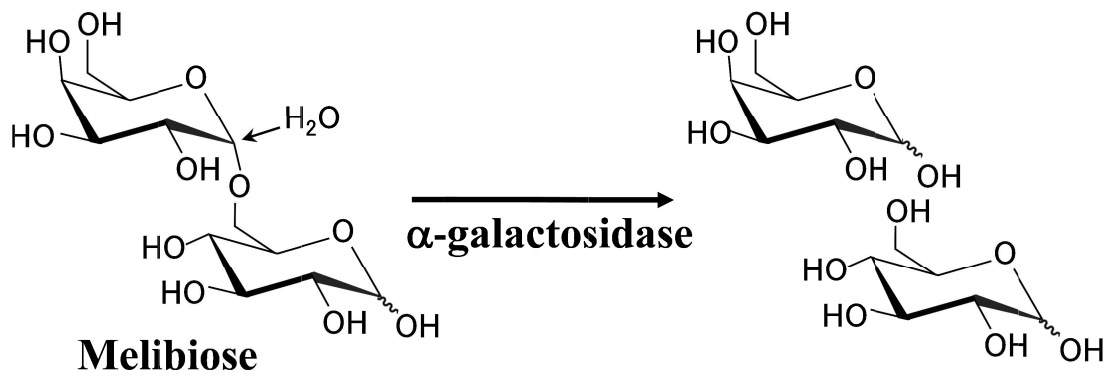


Fig. 3. Hydrolytic reaction catalyzed by α -galactosidase

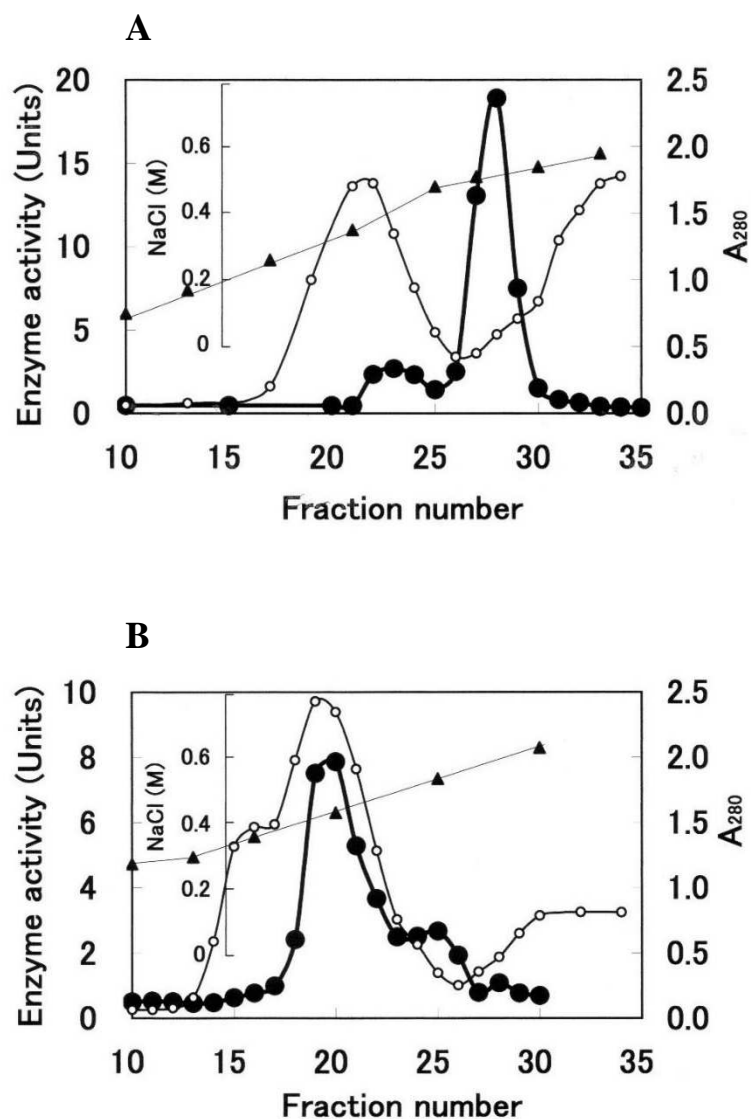


Fig. 4. Ion exchange chromatography on Q Sepharose of α -galactosidases from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052. Enzyme preparations of α -galactosidase obtained by gel filtration with Sepharose 4B were applied on columns (1.5×5 cm) of Q Sepharose and eluted with an NaCl gradient in 50 mM Tris-HCl, pH 7.2. **A**, an enzyme preparation obtained from cells grown on 1% gum arabic; **B**, from cells grown on 1% glucose. ●, α -galactosidase activity; ○, absorbance at 280 nm; ▲, concentrations of NaCl. Each fraction contained 2.4 ml.

Table 4. Purification of α -galactosidase X from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on 1% gum arabic.

Purification step	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg of protein)	Yield (%)
1. Crude extract	119	103	0.86	100
2. Ammonium sulfate fraction	26.4	74	2.80	72
3. Sepharose 4B	8.13	63	7.75	61
4. Q Sepharose	1.36	45	33.1	44
5. Butyl-S Sepharose	0.66	24	36.4	23
6. Hydroxyapatite	0.14	8	57.1	8

PAGE で単一のタンパク質を示した(Fig. 5)。この α -ガラクトシダーゼ X は *B. longum* subsp. *longum* 種から初めて精製され α -ガラクトシダーゼである。

続いて *B. longum* subsp. *longum* 種からの二つ目の α -ガラクトシダーゼとして、グルコースで培養した菌体から α -ガラクトシダーゼ I を 8% の収率で単一に精製した (Table 5)。精製の過程で酵素は Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーで 0.43 M NaCl によって溶出され、Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow の疎水クロマトグラフィーで 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によって溶出された。最終段階で SDS を含まない Native PAGE を用いて酵素を分離した。得られた酵素が単一であることを、SDS-PAGE により確認した。

3.3.2. 質量分析法による α -ガラクトシダーゼの同定

SDS-PAGE で α -ガラクトシダーゼ X の分子量は 79 kDa (Fig. 5A)、 α -ガラクトシダーゼ I の分子量は 85 kDa であった(Fig. 6A)。また、濃度勾配 Native PAGE による分子量は α -ガラクトシダーゼ X は 150 kDa (Fig. 5B)、 α -ガラクトシダーゼ I は 162 kDa であった (Fig. 6B)。これらの結果は、*B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 の α -ガラクトシダーゼ X、及び I はともに同一サブユニット二量体であること示唆している。

MALDI-TOF-MS で分析し、得られたペプチドマス・フィンガープリント (PMF) の結果を Fig. 7-1 に示した。この結果を Mascot Search エンジンを用いて NCBI タンパクデータベース検索にかけ、さらに MS/MS の結果、 α -ガラクトシダーゼ X は一本のトリプシン水解産物のアミノ酸配列 (YVLDDGWFHLR) を得た (Fig. 7-2)。このアミノ酸配列は *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 のゲノム (未発表) 中の遺伝子番号 N1-359 と *B. adolescentis* L2-32 ゲノムの BIFADO_00185 (α -ガラクトシダーゼ) に見つかったが、既報の *B. longum* 種のゲノムにはなかった。N1-359 α -ガラクトシダーゼは 716 アミノ酸から成り、分子量は 79588.15 で SDS-PAGE で求めた分子量 79 kDa とほぼ一致した。そのアミノ酸配列は BIFADO_00185 (705 アミノ酸) と 65% の同一性、78% の相同性であった。 α -ガラクトシダーゼ I も MALDI-TOF-MS 分析し、ペプチドマス・フィンガープリント (PMF) の結果 (Fig. 8-1) を Mascot Search エンジンを用いて NCBI タンパクデータベース検索

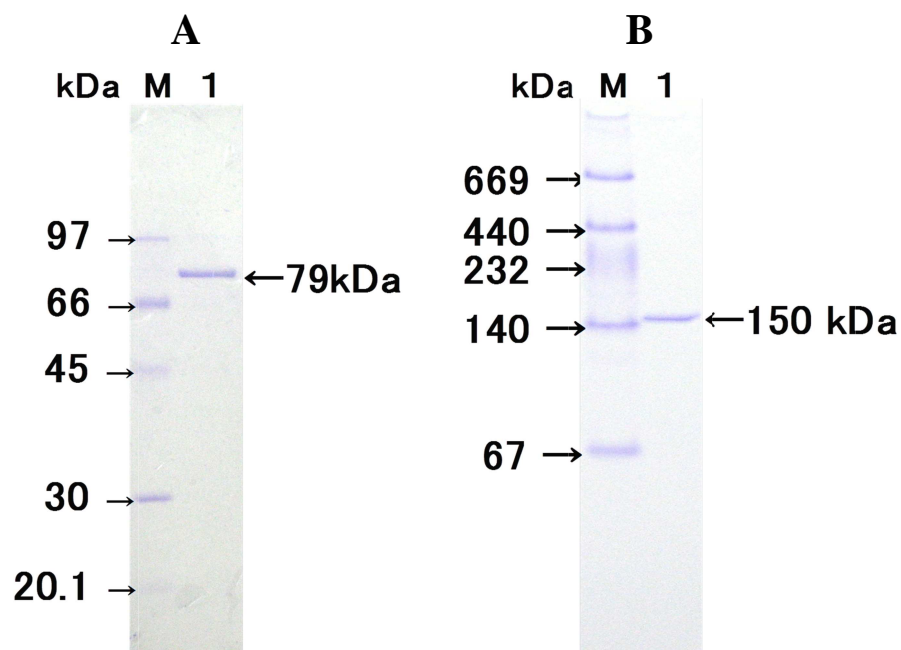


Fig. 5. Molecular mass determination of α -galactosidase X by SDS-PAGE **A** and native gradient PAGE **B**. Lane M, marker proteins; lane 1, purified enzyme. Proteins were stained by Coomassie blue R-250.

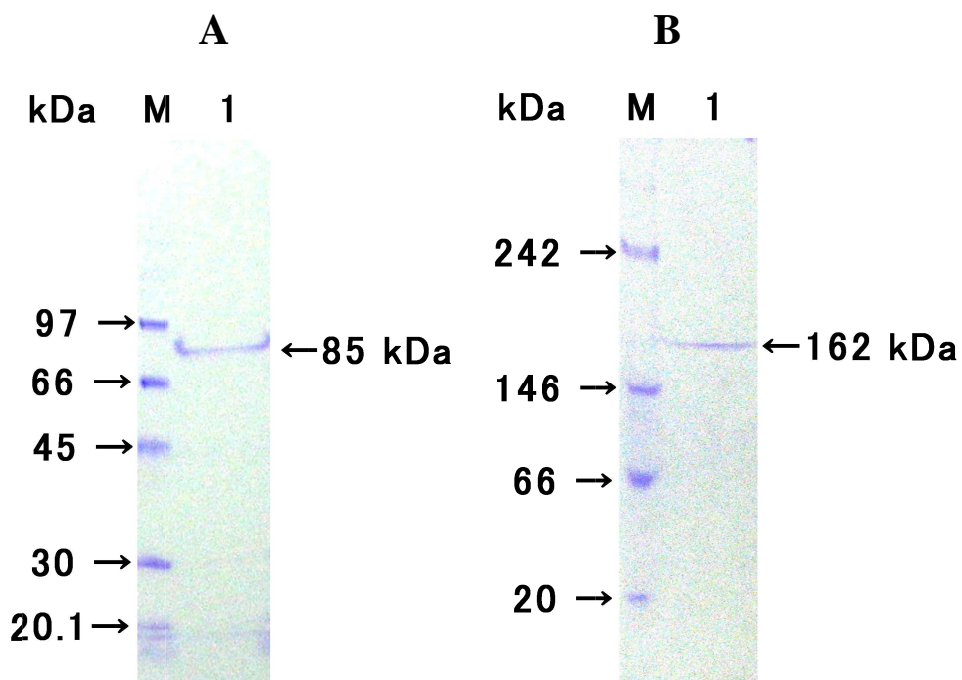


Fig. 6. Molecular mass determination of α -galactosidase I by SDS-PAGE **A** and native gradient PAGE **B**. Lane M, marker proteins; lane 1, purified enzyme. Proteins were stained by Coomassie blue R-250.

Table 5. Purification of α -galactosidase I from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on 1% glucose.

Purification step	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg of protein)	Yield (%)
1. Crude extract	310	40.2	0.130	100
2. Ammonium sulfate fraction	198	30.5	0.154	76
3. Sepharose 4B	150	26.9	0.180	67
4. Q Sepharose	41.9	18.5	0.442	46
5. Butyl-S Sepharose	3.90	4.8	1.22	12
6. Native PAGE	0.18	3.1	17.8	8

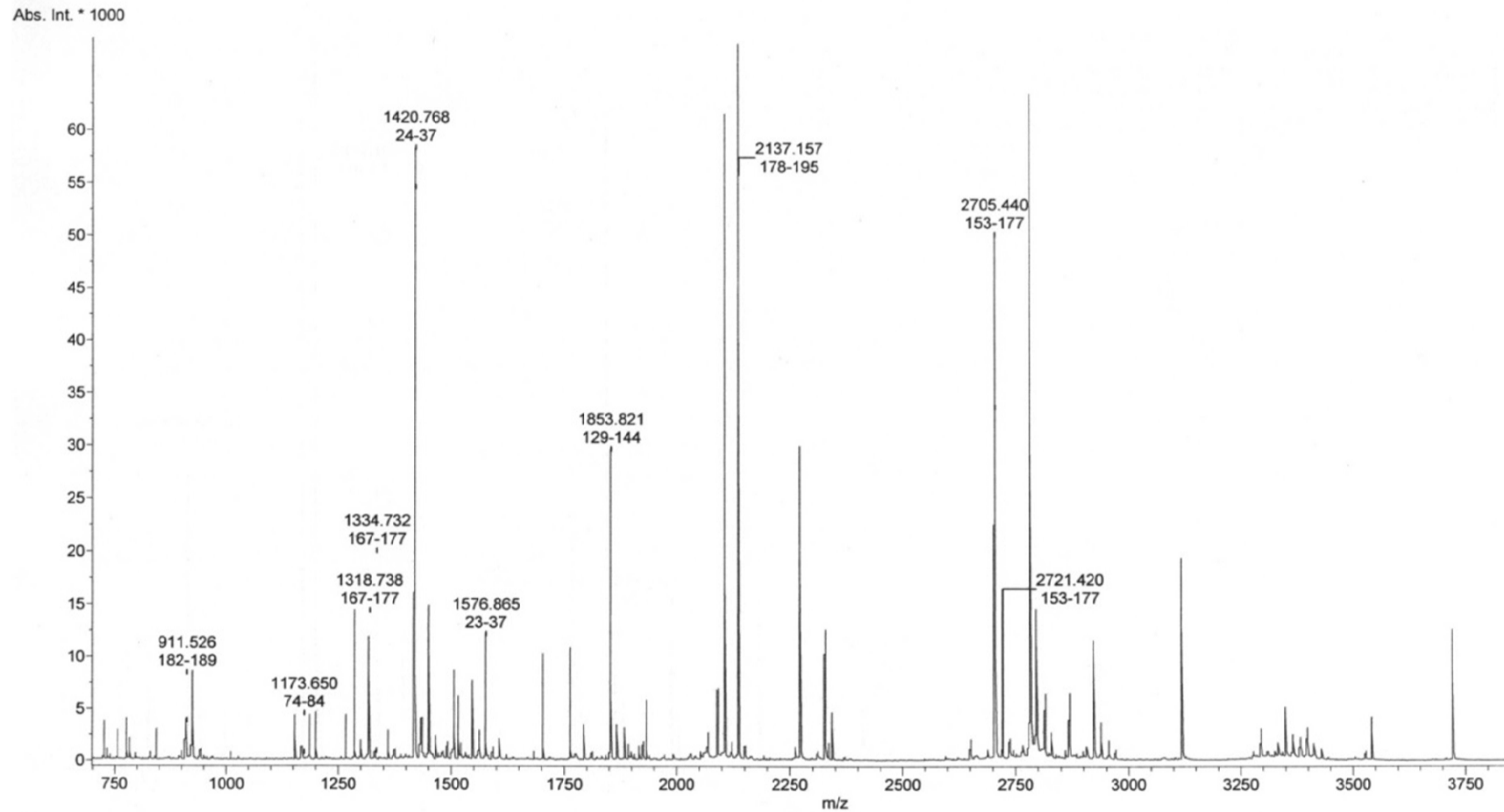


Fig. 7-1. The peptide fingerprinting of α -galactosidase X analyzed by MALDI-TOF-MS.

Figures indicate the molecular masses of peptides produced from the trypsin-digested enzyme (upperparts) and the numbers of amino acid position in the enzyme (underparts) .

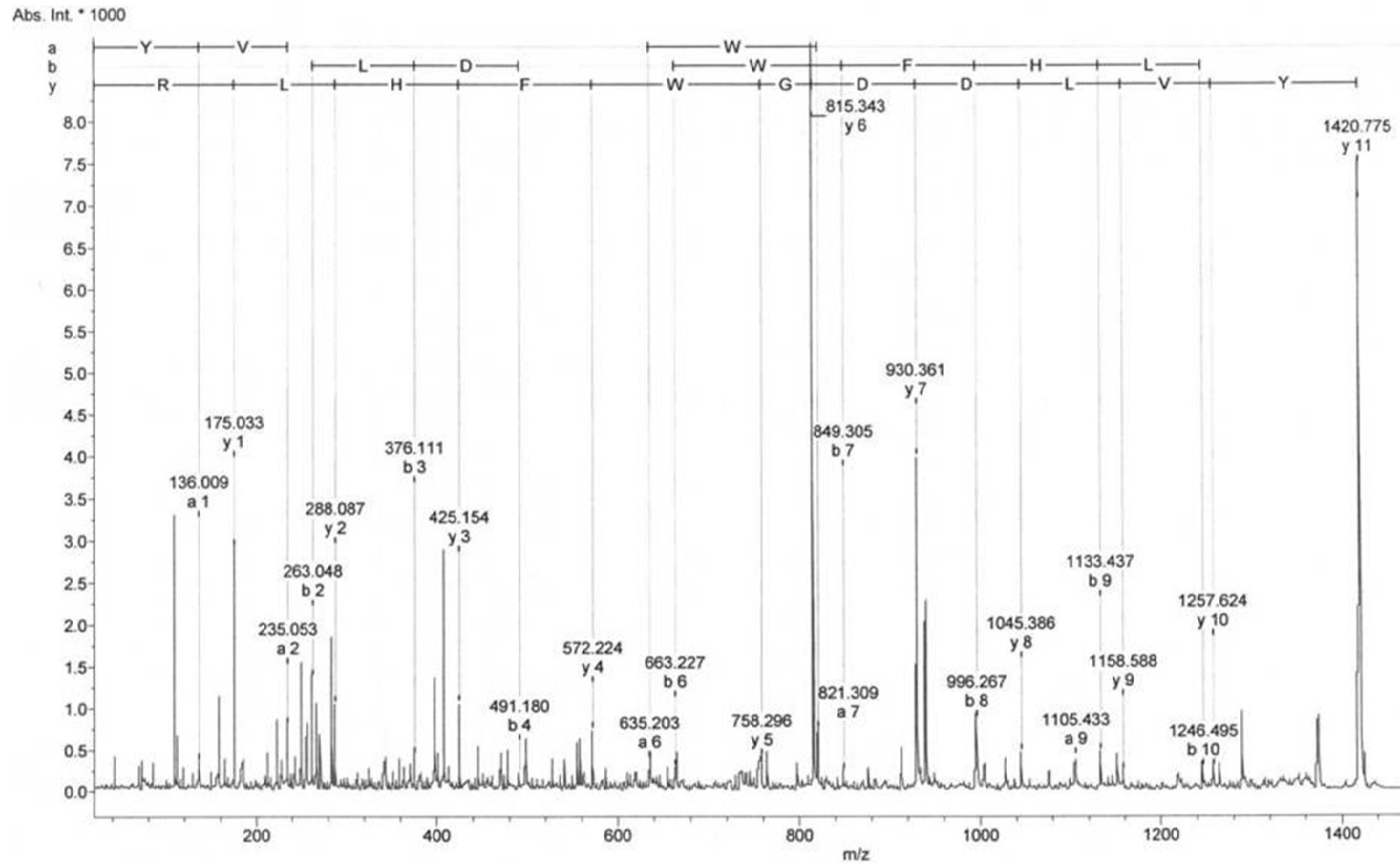


Fig. 7-2. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -galactosidase X.

The molecular ion (m^+ , m/z) 1420.768 in Fig. 7-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

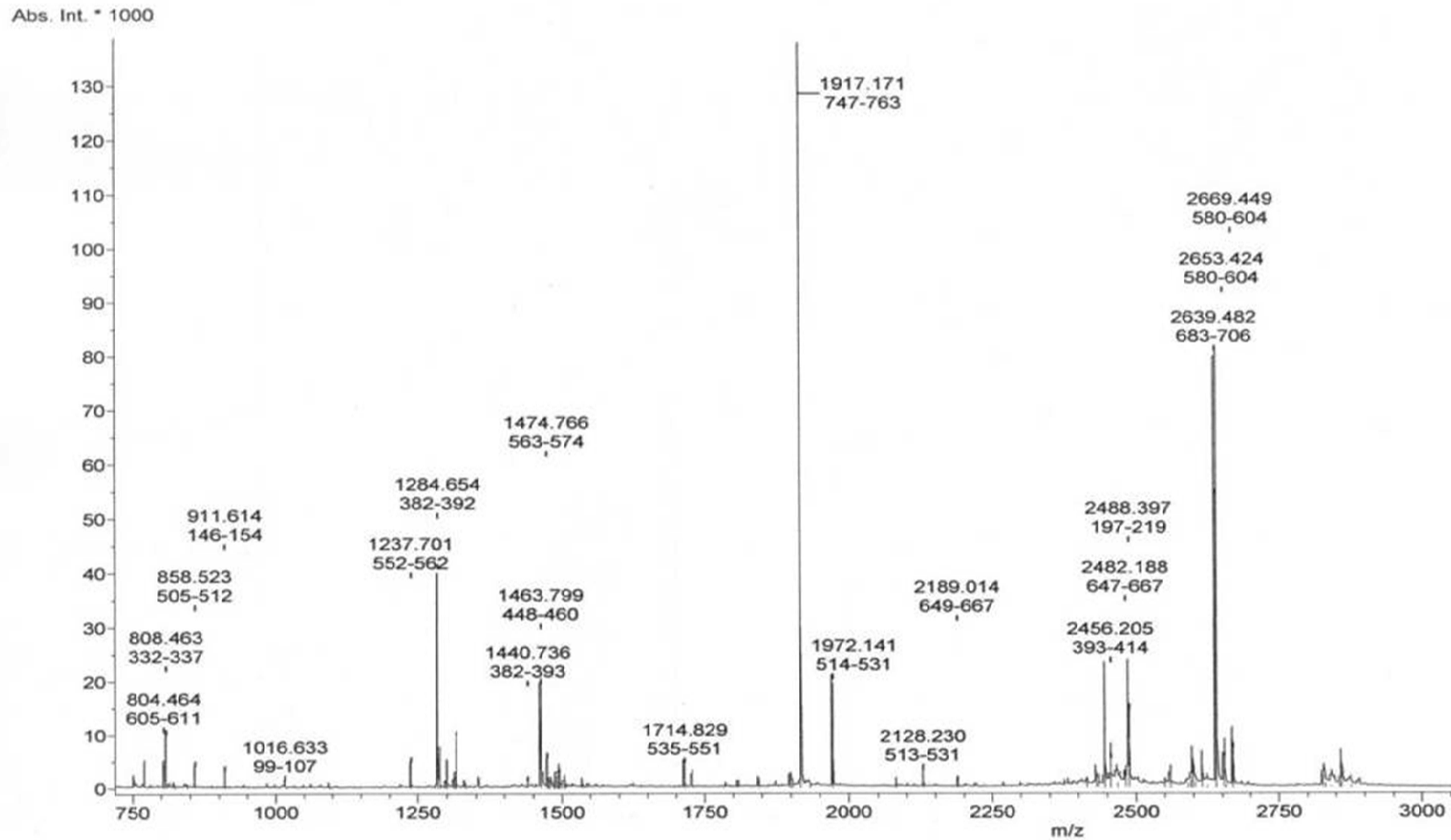


Fig. 8-1. The peptide fingerprinting of α -galactosidase I analyzed by MALDI-TOF-MS.

Figures indicate the molecular masses of peptides produced from the trypsin-digested enzyme (upperparts) and the numbers of amino acid position in the enzyme (underparts) .

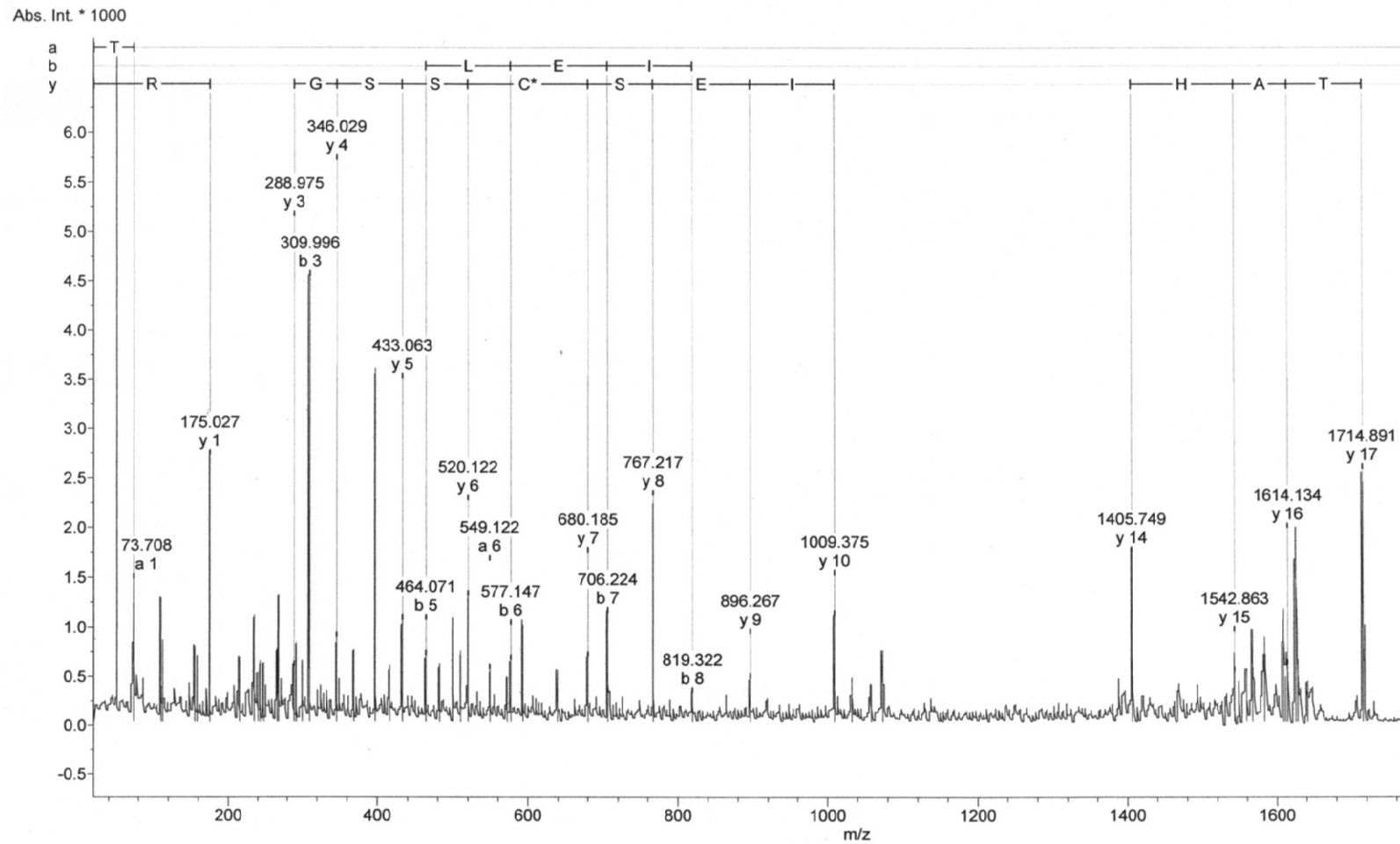


Fig. 8-2A. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -galactosidase I.

The molecular ion (m^+ , m/z) 1714.829 in Fig. 8-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

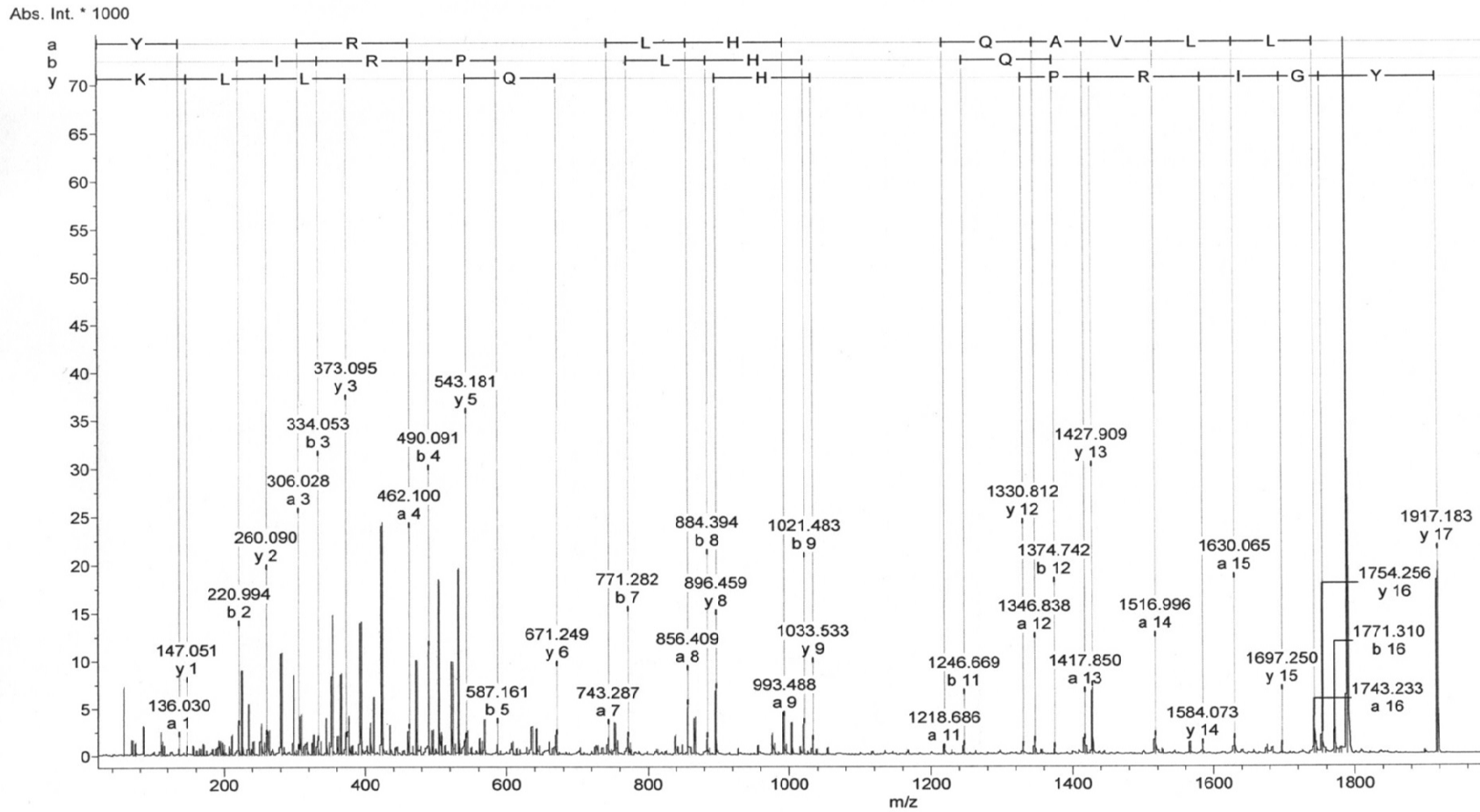


Fig. 8-2B. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -galactosidase I.

The molecular ion (m^+ , m/z) 1917.171 in Fig. 8-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

にかけたところ、Accession number, gi|46190700 と同定された(検索されたペプチドの分子量が、データ中の配列に対応する割合は 33.1%)。さらに MS/MS 分析から、二つのペプチドのアミノ酸配列 TAHPGLEIESCSSGGGR(Fig. 8-2A) と YGIRPPSLHPQQAVLLK(Fig. 8-2B)が同じ gi | 46190700 のアミノ酸配列中の 535-551 番目と 747-763 番目にある、と同定された。このアミノ酸配列は *B. longum* subsp. *longum* DJO 10A のゲノムに見出された α -ガラクトシダーゼ BLD1483 と一致し、JCM 7052 株の N9-45 の α -ガラクトシダーゼと同定された。この α -ガラクトシダーゼは 763 個のアミノ酸から成り、分子量は 83,309 Da と推定され、SDS-PAGE で得られた α -ガラクトシダーゼ I の分子量 85 kDa とほぼ一致する。 α -ガラクトシダーゼ BLD1483 は GH 31 ファミリーに属している。

3.3.3. 基質特異性

1) 4NP-グリコシド化合物に対する基質特異性

精製 α -ガラクトシダーゼ X と α -ガラクトシダーゼ I の基質特異性を 4NP-グリコシド化合物に対して検討したところ、両酵素とも、酵素活性は 4NP- α -D-ガラクトピラノシドに対して得られたのみで、他の 4NP- α -D-グルコピラノシド、4NP- α -D-マンノピラノシド、4NP- α -L-ラムノピラノシド、4NP- α -L-フコピラノシド、4NP- α -L-アラビノピラノシド、および 4NP- α -L-アラビノフラノシドのどの 4NP- α -グリコシドにも作用しなかった。4NP- β -D-ガラクトピラノシドと 4NP- β -D-フコピラノシドでも酵素活性が無かった。

2) ミカエリス定数 K_m , 及び最大反応速度 V_{max}

ミカエリス定数 K_m は酵素反応速度式の両逆数プロットにより求め、4NP- α -D-ガラクトピラノシドに対して、 α -ガラクトシダーゼ X は 0.15 mM, α -ガラクトシダーゼ I は 0.34 mM であった。また、最大反応速度(V_{max}) は、 α -ガラクトシダーゼ X が 5.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein, ガラクトシダーゼ I が 75.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein であった。

ラフィノースとスタキオースも両酵素によって加水分解され、 K_m はラフィノースに対して

α -ガラクトシダーゼ X は 88.3 mM , α -ガラクトシダーゼ I は 15.5 mM, スタキオースに対して α -ガラクトシダーゼ X は 126 mM, ガラクトシダーゼ I は 39.3 mM であった。 α -ガラクトシダーゼ X の V_{max} の値はラフィノースで 45.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein, スタキオースで 60.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein, α -ガラクトシダーゼ I はラフィノースで 22.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein, スタキオースで 28.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein であった。

二つの酵素はメリビオースをガラクトースとグルコースに加水分解できることを TLC によって確認した (Fig. 13, 14)。0.5% のアラビアガムを基質として, pH 7.0, 37°C, 1 時間酵素反応 (4NP- α -D-ガラクトピラノシドの加水分解活性, 7.2 mU を使用) させたが, どちらの酵素も還元基を全く生成せず, アラビアガムを分解しないことが示唆された。

3.3.4. pH, 温度, 化合物の影響

1) pH による影響

精製酵素の最適 pH を pH 5.0 から pH 9.5 または pH 10.0 の範囲で 80 mM の酢酸ナトリウム緩衝液, リン酸カリウム緩衝液, グリシン-NaOH 緩衝液, Tris-HCl 緩衝液の 4 種の緩衝液を用いて, 4NP- α -D-ガラクトピラノシドを基質として測定した。最大活性は α -ガラクトシダーゼ X は pH 8.0 (80 mM グリシン-NaOH) (Fig. 9A), α -ガラクトシダーゼ I は pH 7.5 (80 mM のリン酸カリウム緩衝液, 及びグリシン-NaOH 緩衝液) で得られた (Fig. 9B)。

α -ガラクトシダーゼ活性の pH 依存性を *B. longum* subsp. *longum* の他の株の菌抽出液でも調べたところ, 調べた JCM 1217, JCM 7055, および 105-A のすべての株が α -ガラクトシダーゼ活性を持ち, pH 8.0 で最大活性を示した。これに対して, *B. longum* subsp. *longum* CRL 849 では α -ガラクトシダーゼは pH 5.8 で最大活性を示すと報告されている[21]。また, α -ガラクトシダーゼは他の 3 つの *Bifidobacterium* 属から精製されているが, それらの最適 pH は 5.5-6.0 である (Table 3)。

両酵素は Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.5-9.0) では他の同じ pH の緩衝液に比べて低い活性を示した。(Fig. 9)

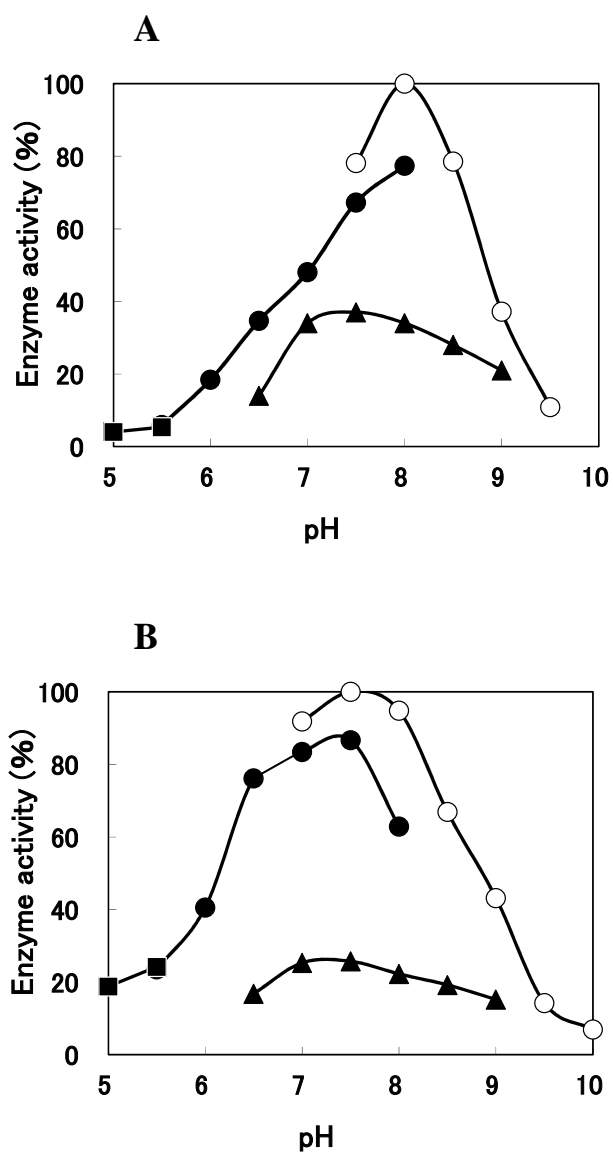


Fig. 9. Effects of pH on the activity of α -galactosidases X (A) and I (B) purified from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052. Buffers used were ■, 80 mM acetate (pH 5.0–5.5); ●, phosphate (pH 6.0–7.0); ○, glycine-NaOH (pH 7.5–10.0); and ▲, 80mM Tris-HCl (pH 6.5–9.0).

2) 温度の影響

最適温度の検討は pH 7.5 で、5 分間の反応条件で行った。 α -ガラクトシダーゼ X は 40-45°C (Fig. 10A), α -ガラクトシダーゼ I は 45°C であった (Fig. 10B)。しかし、 α -ガラクトシダーゼ X は 40-45°C で 5 時間保温した後に活性測定すると活性は顕著に低下していた。この活性低下は 0.15 M 及び 0.3 M の NaCl の添加によりイオン濃度を高めると一部保護されることが分かった。しかしながら、50°C での保温では酵素活性は 30 分後に 30% にまで減少し、0.15 M NaCl の存在下であっても活性は維持されなかった (Fig. 11A)。一方、0.15 M NaCl の存在下で活性測定すると酵素活性は約 10% 阻害された。

α -ガラクトシダーゼ I においても、45°C で 5 時間保温すると活性の低下がみられ、50°C で 5 時間保温すると完全に失活した。また、0.15 M の NaCl を添加すると、 α -ガラクトシダーゼ X と同様に、酵素の安定性は部分的に保護されることが見出された。60°C での保温では、酵素活性は 30 分後に 30% まで減少し、0.15 M NaCl が存在しても活性は維持されなかった (Fig. 11B)。NaCl の存在下で α -ガラクトシダーゼ I がある程度の熱耐性を得ることは、この酵素を工業的に利用する場合、有益であると考えられる。

3) 金属イオン及び EDTA に対する影響

次に化学物質による影響について、1 mM の金属塩化物、及び EDTA 存在下で酵素活性を測定した (Table 6)。 α -ガラクトシダーゼ X の活性は Cu^{2+} によって約 40%、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} によって約 10-15% 阻害された。EDTA による阻害は 10% であり、キレート剤としての効果は低かった。

α -ガラクトシダーゼ I の活性は Cu^{2+} によって約 20% 阻害された。しかし、他の金属イオン Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} は酵素活性に全く影響しなかった。

EDTA は α -ガラクトシダーゼ I の酵素活性に対してキレート剤としての効果は殆どなかった。

これらの結果は、二つの α -ガラクトシダーゼが金属イオンによって受ける影響が異なることを示している。

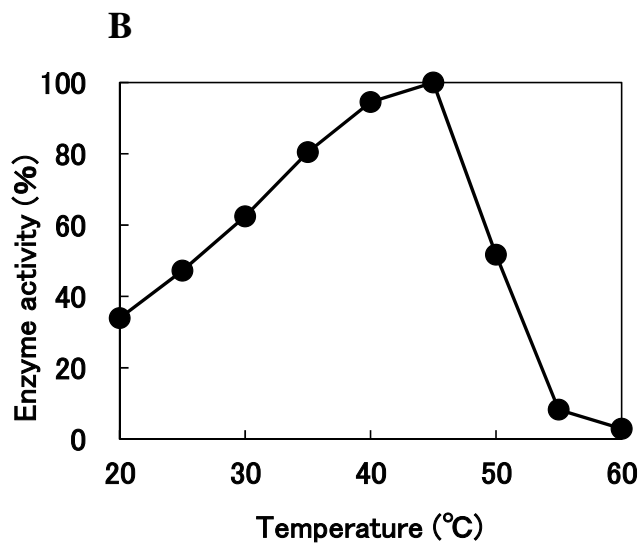
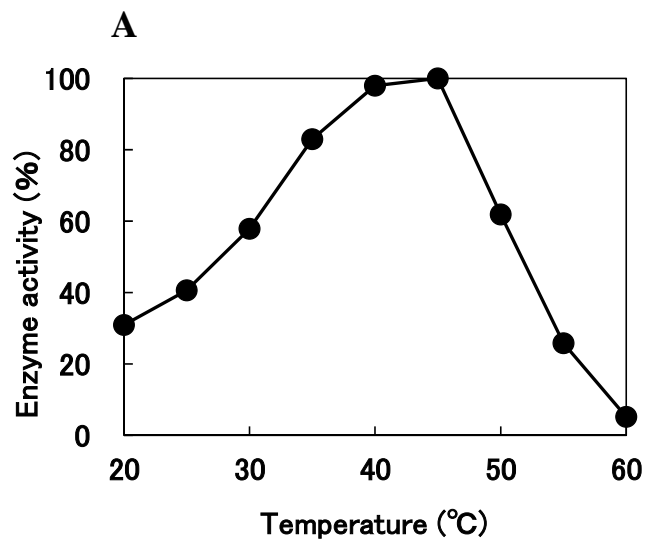


Fig. 10. Effects of temperature on the activity of the purified α -galactosidases X (A) and I (B).

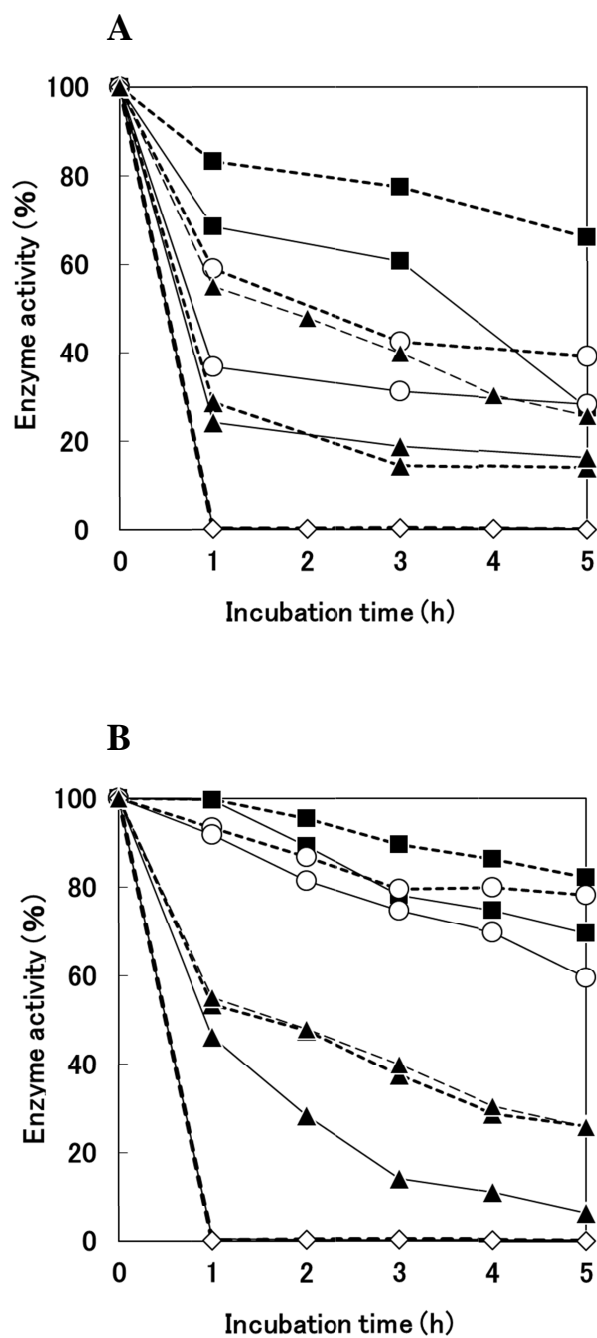


Fig. 11. Effects of temperature on the stability of the purified α -galactosidases X (A) and I (B). Symbols used were ■, 40°C; ○, 45°C; ▲, 50°C; and ◇, 55°C. Solid lines indicate activities in the absence of NaCl, dotted lines in the presence of 0.15 M NaCl, broken lines in the presence of 0.3 M NaCl.

Table 6. Effects of metal ions and EDTA on the hydrolytic activities of purified α -galactosidases X and I. 4NP- α -D-galactopyranoside was used as substrate.

Reagents	Relative activity (%)	
	α -galactosidase X	α -galactosidase I
None	100	100
BaCl ₂	95	98
CaCl ₂	98	103
CoCl ₂	83	104
CuCl ₂	61	83
FeCl ₂	86	105
MgCl ₂	86	105
MnCl ₂	83	106
NiCl ₂	96	105
ZnCl ₂	90	109
EDTA	89	98

Metal chloride salts and EDTA were added at 1 mM.

Garro らは *B. longum* subsp. *longum* CRL 849 からの菌抽出液を用いた時、 Mn^{2+} が酸性 α -ガラクトシダーゼを活性化することを報告している[21]が、このような効果は α -ガラクトシダーゼ X だけでなく、 α -ガラクトシダーゼ I にも見られなかった。

3.3.5. 糖転移活性

α -ガラクトシダーゼには糖転移活性があることが知られている[64-67]。触媒活性の一例を Fig. 12 に示した。ガラクトシル基を転移する活性を、精製した 2 種の α -ガラクトシダーゼが有するかどうかを検討した。4NP- α -D-ガラクトピラノシドとガラクトースまたはメリビオースを含む反応液を TLC で分析したところガラクトース供与化合物の濃度が 20 mM と低いため、僅かであるが新しい糖が検出された。

適当な標準物質が得られず、生成物を同定できなかったが、 α -ガラクトシダーゼ X がラフィノースなどの α -1,6-ガラクトシド結合に基質特異性を持つことから、生成物はガラクトシル α -1,6-ガラクトシド、及びガラクトシル- α -1,6-ガラクトシル- α -1,6-グルコースであると推定された (Fig. 13)。本酵素は *B. longum* subsp. *longum* 種から精製し糖転移活性を検討した最初の α -ガラクトシダーゼである。

α -ガラクトシダーゼ I は 4NP- α -D-ガラクトピラノシドとグルコース、マンノース、スクロース、メリビオース、アラビノース、ガラクチノールを加えた反応液で新しい糖を生成した (Fig. 14)。反応生成物の糖が何かは適切な標準物質を入手できなかったため同定できていないが、本酵素も α -1,6-ガラクトシド結合に特異性を持つことから、生成物は各糖にガラクトースが α -1,6 結合したオリゴマーと考えられる。その場合、グルコース及びスクロースを受容体とした時に生成すると考えられるメリビオースとラフィノース以外はいずれも新規のオリゴ糖である。

3.3.6. α -ガラクトシダーゼの考察

B. longum subsp. *longum* JCM 7052 には少なくとも二種類の α -ガラクトシド加水分解酵素、即ち α -ガラクトシダーゼ X と α -ガラクトシダーゼ I があることを見出した[31, 48]。

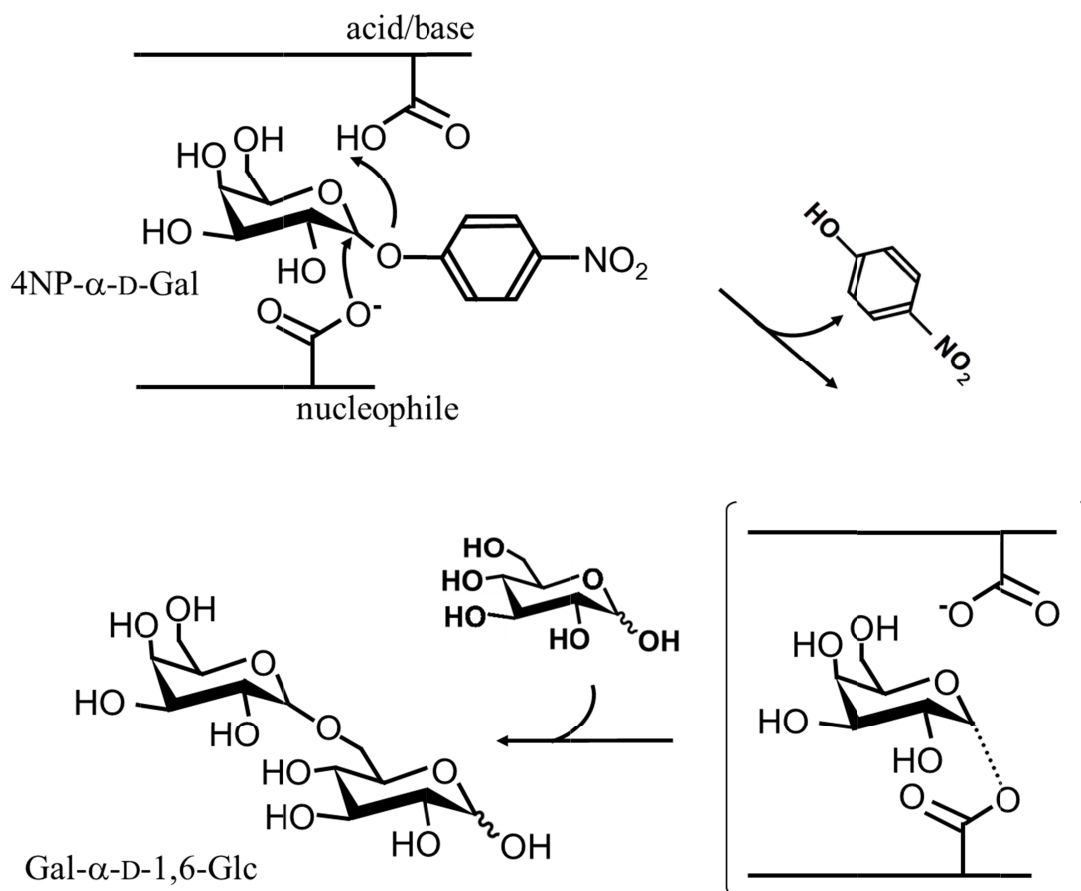


Fig. 12. Transgalactosylation of α -galactosidases X and I. The substrate binds the active site of α -galactosidase, then interacts with an aspartyl residue as nucleophile, which attacks C1 of galactosyl moiety of the substrate. Subsequently, another aspartyl residue serves as acid/base to offer or accept H^+ , resulting in releasing 4-nitrophenol and retaining of the galactosyl moiety in the active site of the enzyme. The galactosyl moiety reacts with water to become galactose (hydrolase), whereas some sugar works as the acceptor to produce galactosyl- α -1,6-glycoside (transgalactosylation).

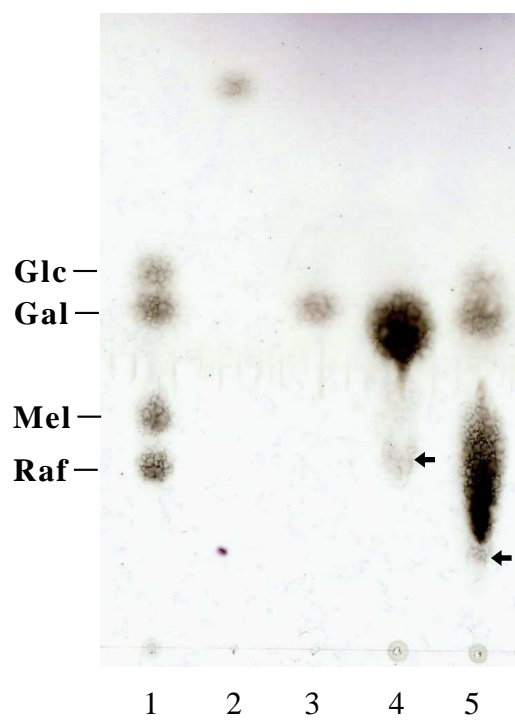


Fig. 13. Transglycosylation activity of α -galactosidase X detected by TLC. Reaction mixtures (1 ml) contained 80 mM K-phosphate buffer (pH 7.0), 15 mM 4NP- α -D-galactopyranoside, 80 mM saccharide as acceptor, and 0.2 units of purified α -galactosidase X, and were incubated at 37°C for 5 h.

Samples were loaded on the lanes: 1, standard sugars galactose (Gal), glucose (Glc), melibiose (Mel), and raffinose (Raf); 2, 4NP- α -D-galactopyranoside; 3, Gal; 4, the reaction mixture containing Gal as the acceptor; 5, Mel as the acceptor. Sugar products were indicated by arrows.

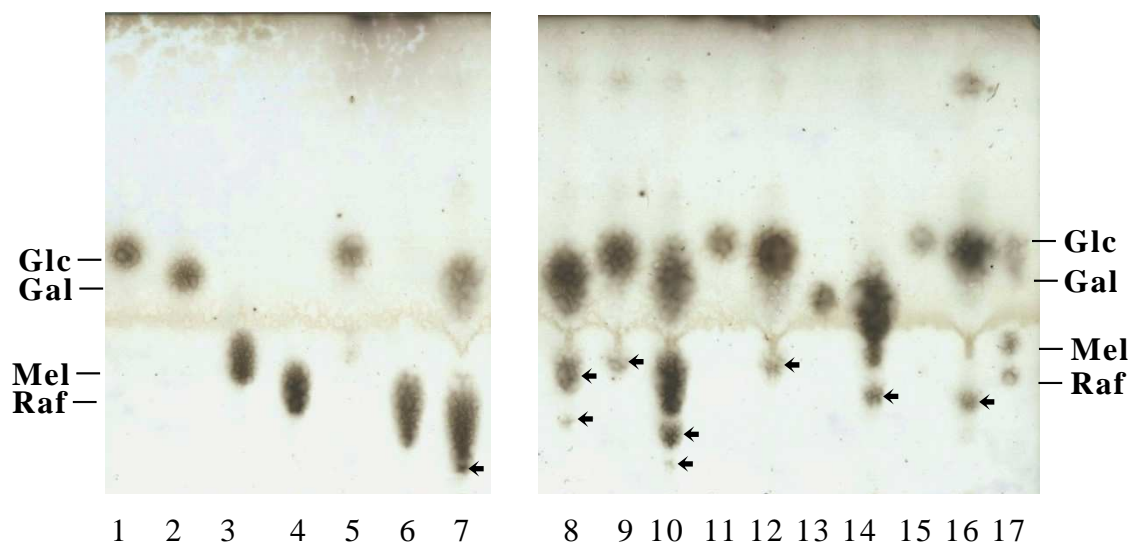


Fig. 14. Transglycosylation activity of α -galactosidase I detected by TLC. Reaction mixtures (1 ml) contained 80 mM K-phosphate buffer (pH 7.0), sugars, and 0.2 units of purified α -galactosidase I, and were incubated for 5 h in 37°C. Sugars in the reaction mixture include 15 mM 4-NP- α -D-galactopyranoside (4NP α Gal) and 80 mM saccharides as acceptor.

On each lane, sugars in the reaction mixture were: 1, glucose (Glc); 2, galactose (Gal); 3, melibiose (Mel); 4, raffinose (Raf); 5, Glc; 6, galactinol (Gol); 7, 4NP α Gal + Gol.; 8, 4NP α Gal + Gal; 9, 4NP α Gal + Glc; 10, 4NP α Gal + Mel; 11, mannose (Man); 12, 4NP α Gal + Man; 13, sucrose (Suc); 14, 4NP α Gal + Suc; 15, arabinose (Ara); 16, 4NP α Gal + Ara; 17, standard mixture (Glc, Gal, Mel, Raf). Sugar products were indicated by arrows.

MALDI-TOF-MS 分析で、 α -ガラクトシダーゼ I は DJO10A 株[16]のゲノムで見出された BLD1483 と NCC 2705 株[15]のゲノムで見出された BL1518 と同じ遺伝子産物であることが示された。 α -ガラクトシダーゼ I はラフィノースとスタキオースに対して高い親和性を示したことから、 α -1,6 ガラクトシド結合を分解することに働くと考えられる。さらに、BL1518 は NCC 2705 株をラフィノースで培養した時、誘導される[68]ことから、 α -ガラクトシダーゼ I は α -1,6-ガラクトシド結合をもつ糖によって誘導される酵素であることが示唆された。

一方、 α -ガラクトシダーゼ X は *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 を炭素源としてアラビアガムで培養した時、高い活性を示した。 α -ガラクトシダーゼ X と同じアミノ酸配列 (YVLDDGWFHLR) を持つタンパク質はこれまでに集積されたゲノムデータには見つからず、JCM 7052 株のゲノムにのみ見つかった。このことは *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 に他の菌株のゲノムには無い、アラビアガムを分解するためのいくつかの遺伝子があり、 α -ガラクトシダーゼ X がそれらの遺伝子産物の一つであることを示唆している。

α -ガラクトシダーゼ I の最適 pH は中性付近の pH 7.5 であり、 α -ガラクトシダーゼ X では pH 8.0 であった。このような性質は、pH 5.8 で最大活性を示す *B. longum* subsp. *longum* CRL 849 から部分精製された α -ガラクトシダーゼ[21]とは異なっている。今までに *Bifidobacterium* の他の種から精製された α -ガラクトシダーゼは、そのほとんどが pH 5.5-6.0 で最適活性を示すものである(Table 3)。ただし、*B. adolescentis* の α -ガラクトシダーゼの糖転移活性は最大活性が pH 7.0-8.0 で得られている[64]。これまでに *Bifidobacterium* からクローン化されている α -ガラクトシダーゼ[40, 64, 66]は BL1518/BLD1483 [15,16]を含めて、GH 31 ファミリーに分類されている。Zhao ら[40]は 4 種の *Bifidobacterium* 属の α -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列は 65-69%が同一であることを示している。GH 31 ファミリーの触媒メカニズムは殆ど明らかになっていないが、好熱性細菌 *Thermotoga maritima* からの α -ガラクトシダーゼの触媒部位にある 2 つのアスパラギン酸残基が、酵素反応に関連していることが確認されている[69]。触媒作用と

構造の関連の更なる研究によって、最適 pH の変動を引き起こすアミノ酸残基が特定されるものと考えられる。

α -ガラクトシダーゼ I は 4NP- α -D-ガラクトピラノシドから、ガラクトース、グルコース、アラビノース、マンノース、スクロース、メリビオース、及びガラクチノールに向けて糖転移活性を示した。 α -ガラクトシダーゼが α -1,6-ガラクトシドを加水分解し、また、新たに α -1,6-ガラクトシドを糖転移によって生成することが知られている[64, 66]。ところが最近、Zhao ら[40] は *Bifidobacterium breve* 203 の α -ガラクトシダーゼが 4NP- α -D-ガラクトピラノシドからメリビオースへとガラクトシル基を転移して、 α -1,4-ガラクトシド結合したオリゴ糖であるガラクトシル- α -1,4-ガラクトシル- α -1,6-グルコースを合成することを示しており、ガラクトシル基転移の産物が数種類ありうることを示唆している。今回、本研究で得られた糖転移反応の生成物が α -1,4-ガラクトシル基か α -1,6-ガラクトシル基のどちらが結合していても、メリビオースとラフィノース以外の生成物は新規のオリゴ糖であり、新糖合成のために本酵素の利用が期待できる。

α -ガラクトシダーゼ I の活性は α -ガラクトシダーゼ X と同様に Tris-HCl 緩衝液で低い活性を示した。Tris の作用はいくつかの酵素で見られており、Vasseur ら[70] は腸の刷子縁にあるスクラーゼ活性の Tris による拮抗阻害を Tris が酵素の活性中心にある 2 つの異なる部位に順番に結合するというモデルで説明した。即ち、活性中心のグルコシル基が結合する部位に Tris のヒドロキシル基が結合し、その結果、活性中心の H⁺ 供与体アミノ酸残基と Tris のアミノ基との相互作用が容易になって、スクラーゼ活性の拮抗阻害が起こるというものである。

最近、Tris は *Bacillus licheniformis* の α -アミラーゼの拮抗阻害剤であり、酵素の活性部位に結合することが示された[71]。これらの知見は、Tris (hydroxymethyl) aminomethane が拮抗阻害剤として糖質加水分解酵素の触媒作用に影響を及ぼすことを示唆しており、注意が必要である。

酵素の工業的な利用は多くの場合、基質の溶解度や反応速度を上げるために高い温度で行われている。そのため、熱による不活性化が頻繁に起こる。本研究で α -ガラク

トシダーゼ X と I 及び β -ガラクトシダーゼが 0.15-0.3 M NaCl の添加により、熱による不安定化が緩和されることが分かった。NaCl はタンパク質表面のアミノ酸残基の相互作用を強め、また、タンパク質の水和性を高めることによってタンパク質の安定性に影響を与える効果をもつ塩の 1 種で[72]、このような効果が酵素の熱安定性を高めたと考えられる。しかしながら、三つの酵素の実験結果から、このような NaCl の性質も、50℃以上の温度ではタンパク質の安定化に影響を及ぼさないように見える。

以上のことから、今回 *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から精製した α -ガラクトシダーゼ X 及び I が、新規な性質を持つ酵素であり、特に α -ガラクトシダーゼ I は新糖合成に役立ち得ると考えられる。

3.4. β -ガラクトシダーゼについて

β -ガラクトシダーゼ(EC 3. 2. 1. 23) は β -D-ガラクトシド結合の加水分解を触媒する他、ガラクトシル基を転移する活性があることが知られている[73]。触媒活性について Fig. 15 に示す。

これまでに *Bifidobacterium* 属では *B. adolescentis* [33, 34], *B. bifidum* [36, 37], *B. longum* subsp. *Infantis* [37, 45, 46, 74, 75], *B. longum* subsp. *longum* [21-23, 47] からの様々な β -ガラクトシダーゼの性質が調べられてきた。糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase, GH) はそれらの構造と機能の特徴から 113 のファミリーに分類されており[76, 77], ラクトースの β -1,4 ガラクトシド結合を分解する β -ガラクトシダーゼは GH 2 ファミリーに分類される。また, GH 42 ファミリーに属する β -ガラクトシダーゼはオリゴ糖の β -ガラクトシド結合に対して作用すると考えられている[78]。アラビアガムで増殖した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 に β -ガラクトシダーゼの高い活性があることを 3.1 で示した[31]。アラビアガムは β -1,3- 及び β -1,6-ガラクトシド結合を持っており[26, 79], この酵素はおそらくアラビアガムの分解に関与していると考えられるので, アラビアガムで培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から β -ガラクトシダーゼを精製して, その特徴について調べた。

3.4.1. 精製と分子量測定

アラビアガムで培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 の菌抽出液から β -ガラクトシダーゼを精製し, 結果を Table 7 に示した。いくつかのクロマトグラフィーで酵素を分離したが, Q-Sepharose を用いたイオン交換クロマトグラフィーでは NaCl 濃度 0.55 M で, Butyl-S Sepharose を用いた疎水クロマトグラフィーでは $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度 1.1 M で β -ガラクトシダーゼが溶出された。精製の最終段階で得られた酵素標品は SDS-PAGE で単一バンドを示した。

酵素の分子量を SDS-PAGE と濃度勾配 Native PAGE によって測定すると, SDS-PAGE では分子量 77 kDa の 1 本のバンドが見られ(Fig. 16A), 濃度勾配 Native

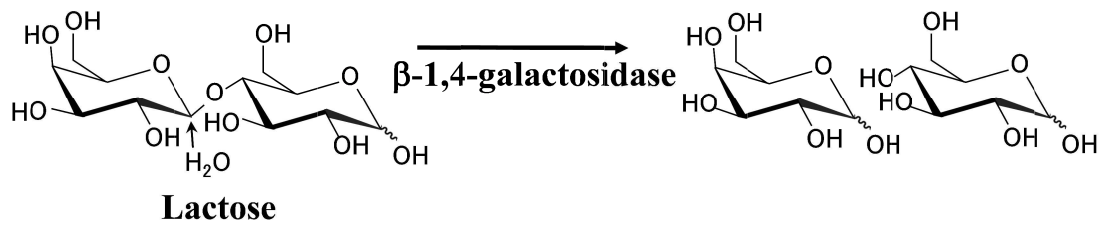
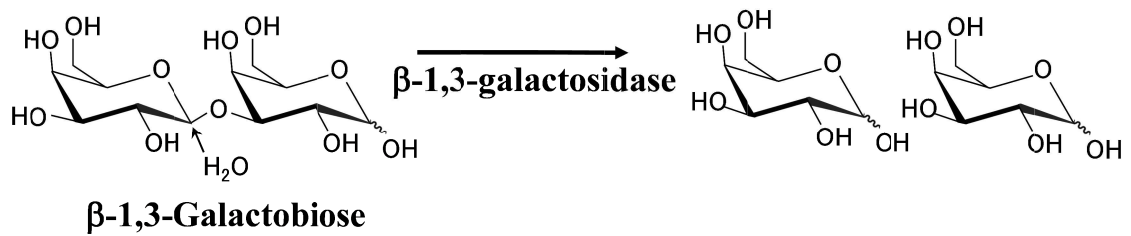


Fig. 15. Hydrolytic reactions catalyzed by β -1,3-galactosidase and β -1,4-galactosidase.

Table 7. Purification of β -galactosidase from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on 1% gum arabic.

Purification step	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg of protein)	Yield (%)
1. Crude extract	283	128	0.45	100
2. Ammonium sulfate fraction	104	72.5	0.70	57
3. Sepharose 4B	73.4	65.2	0.89	51
4. Q Sepharose	26.6	38.1	1.43	30
5. Butyl-S Sepharose	1.76	13.1	7.41	10
6. Native PAGE	0.52	6.3	12.1	5

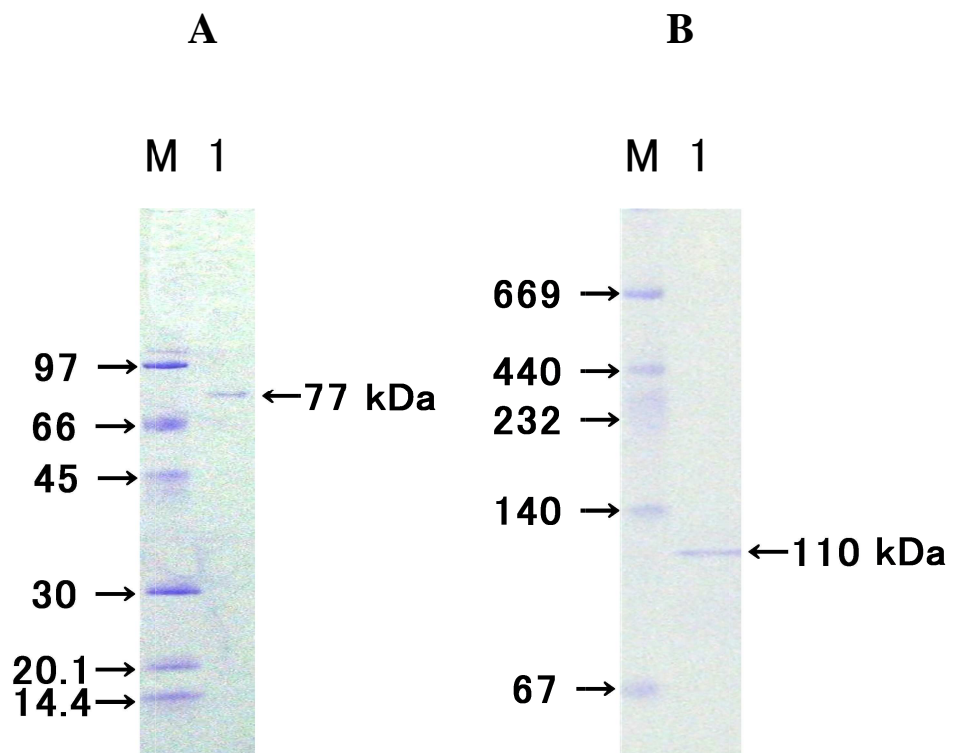


Fig. 16. Molecular mass determination of β -galactosidase by SDS-PAGE (A) and native gradient PAGE (B). Lanes: M, marker proteins; 1, purified enzyme. Proteins were stained by Coomassie blue R-250.

PAGE では 110 kDa の 1 本のバンドが見られた(Fig. 16B)。この結果は酵素が同一サブユニットの二量体であることを示唆している。

3.4.2. 質量分析法による β -ガラクトシダーゼの同定

精製した酵素を MALDI-TOF-MS による PMF 分析にかけて酵素の遺伝子の同定を試みた。PMF の結果(Fig. 17-1)は Accession number, gi | 189439789 との相同性を示し、そのうちの強いシグナルの MS/MS 分析はペプチドのアミノ酸配列 ADETGENHFVFLFNR (分子量 1795.875, アミノ酸配列番号 637-651)(Fig. 17-2A)と LEPEEGVYDFDWLDR (1882.879, 60-74)(Fig. 17-2B)を与えた。

これらの結果から精製した β -ガラクトシダーゼは JCM 7052 ゲノムの遺伝子番号 N3-71 の産物で 691 アミノ酸残基から成り、分子量 77.534 であった。この分子量は SDS-PAGE で測定した 77 kDa とほぼ一致している。同じアミノ酸配列は *B. longum* subsp. *longum* DJO 10A ゲノム [16](BLD 0926)と *B. longum* subsp. *longum* NCC 2705 ゲノムの BL 1168 にも見つかった[15]。N3-71 の β -ガラクトシダーゼは GH 42 ファミリーに属しており、*lacZ* 遺伝子の産物 GH 2 ファミリーとは別の酵素であった。

3.4.3. pH, 温度, 化合物の影響

これらの触媒活性の特徴を調べる実験では、Butyl-S Sepharose の段階まで精製して得られた酵素を使用した。酵素活性の pH 依存性を調べるために、 β -ガラクトシダーゼを 1 mM 4NP- β -D-ガラクトピラノシド, 80 mM リン酸カリウム緩衝液と共に 30°C で 10 分間反応させて酵素活性を測定した。最大活性は pH 7.0 で得られた(Fig. 18)。一方, 80 mM Tris-HCl 緩衝液中での酵素活性は僅かに低い値が得られた(Fig. 18)。

β -ガラクトシダーゼ活性の最適温度は, pH7.0 で 5 分間の反応で 50-55°C であった (Fig. 19A)。耐熱性を調べると, 35°C で 5 時間保温しても酵素活性は変化せず安定していた。40°C 以上で保温した場合, 活性の低下が起こった(Fig. 19B)。0.15 M NaCl を

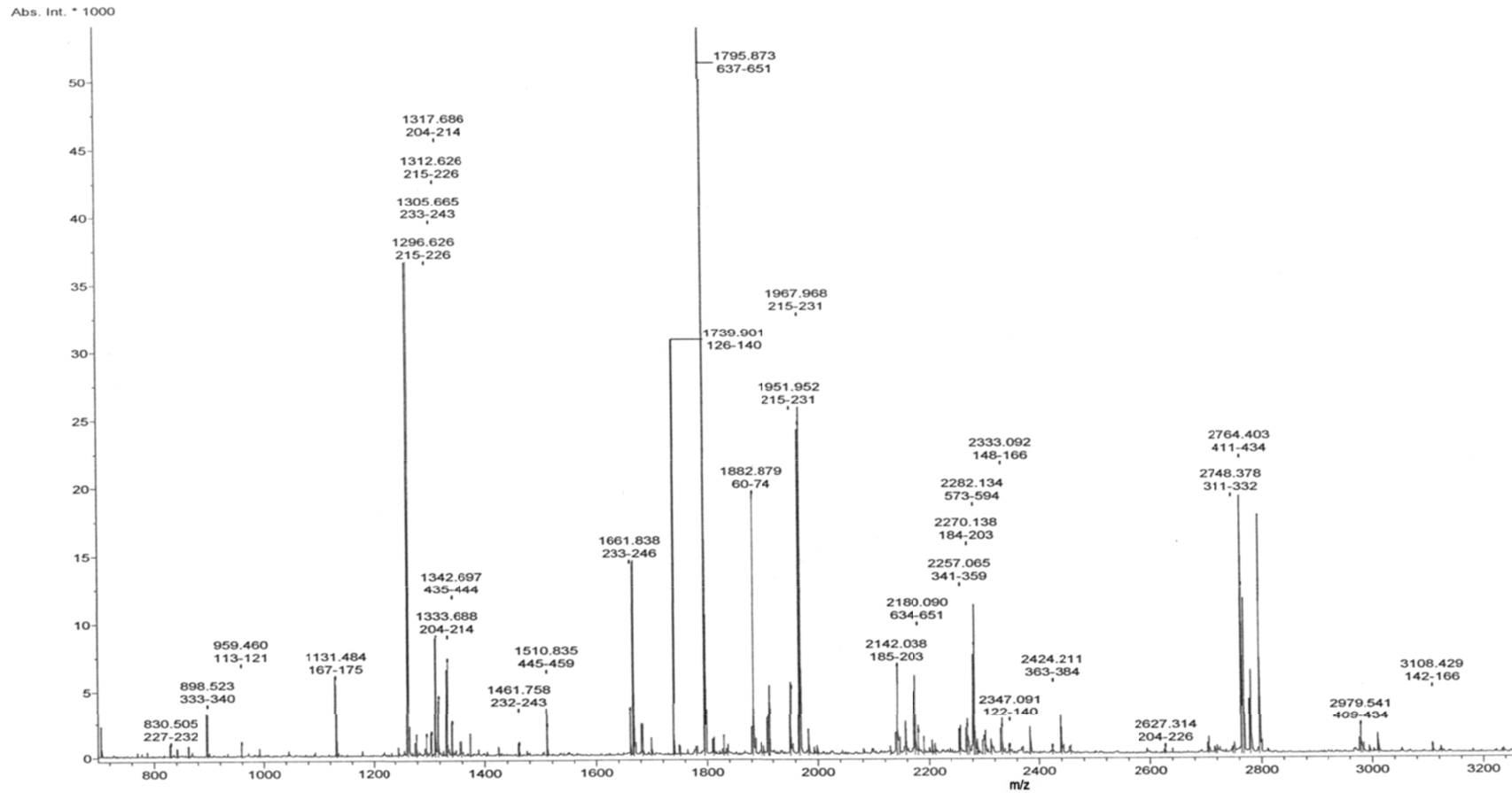


Fig. 17-1. The peptide fingerprinting of β -galactosidase analyzed by MALDI-TOF-MS.

Figures indicate the molecular masses of peptides produced from the trypsin-digested enzyme (upperparts) and the numbers of amino acid position in the enzyme (underparts) .

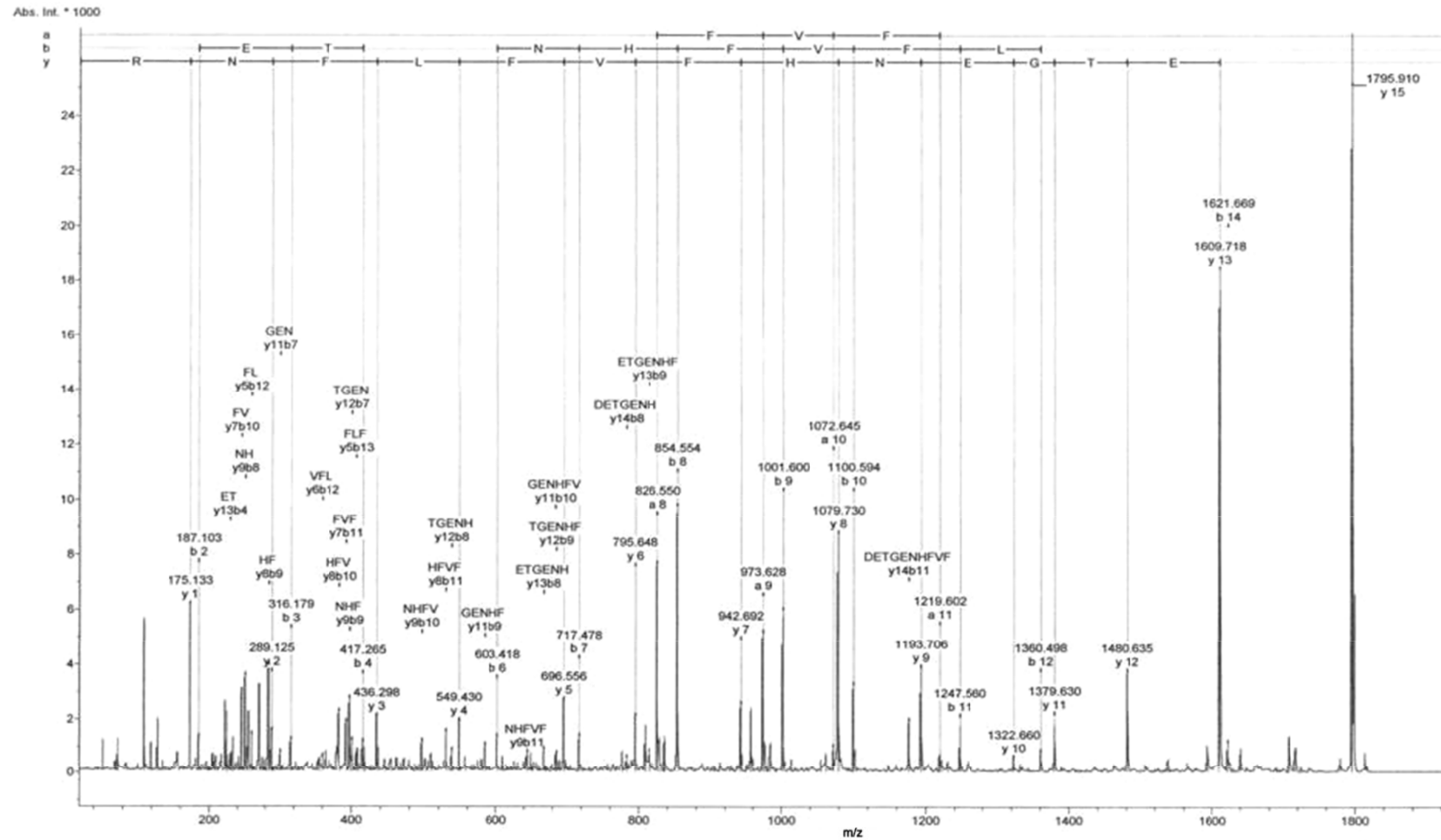


Fig. 17-2A. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested β -galactosidase. The molecular ion (m^+ , m/z) 1795.873 in Fig. 17-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

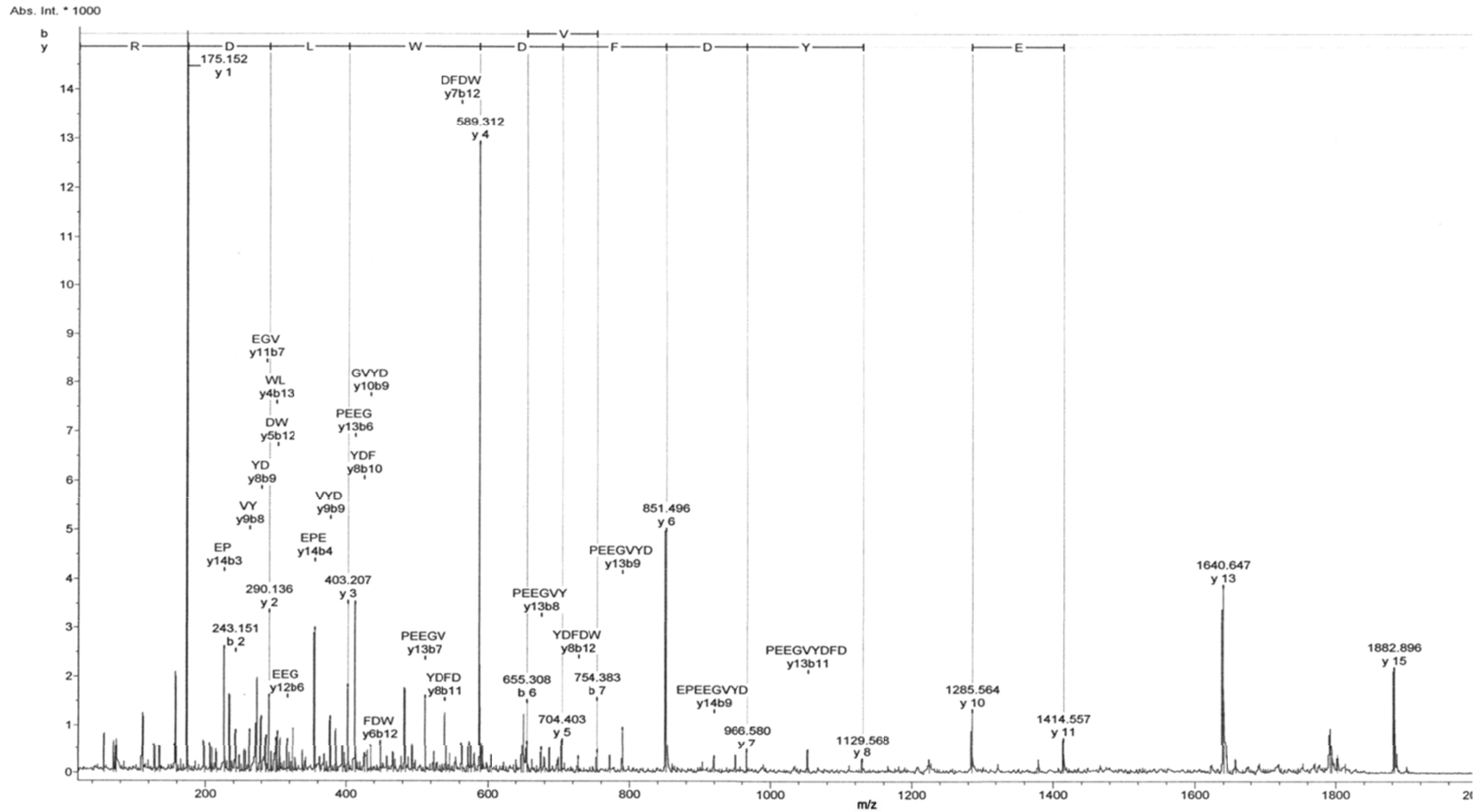


Fig. 17-2B. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested β -galactosidase.

The molecular ion (m^+ , m/z) 1882.879 in Fig. 17-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

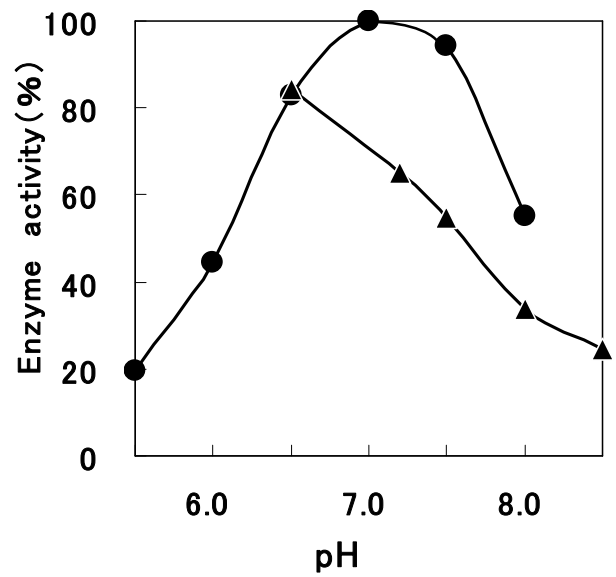


Fig. 18. Effects of pH on the activity of the purified β -galactosidase. Buffers used were, ●, 80 mM K-phosphate (pH 5.5–8.0); and ▲, 80 mM Tris-HCl (pH 6.5–8.5).

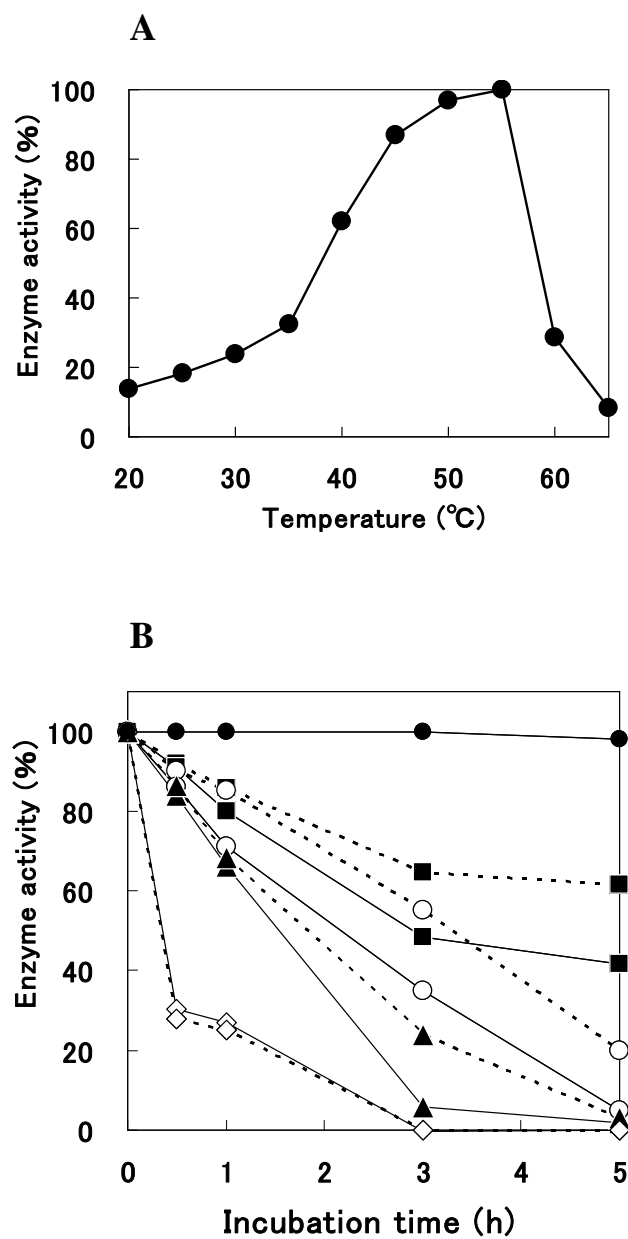


Fig. 19. Effects of temperature on the activity (A) and stability (B) of the purified β -galactosidase. Symbols in (B), ●, 35°C; ■, 40°C; ○, 45°C; ▲, 50°C; and ◇, 55°C. Solid lines indicate activities in the absence of NaCl, and dotted lines in the presence of 0.15 M NaCl.

酵素液に添加すると、酵素の安定化の効果が僅かに見られた。

次に化学物質による影響について、1 mM の金属塩化物、及び EDTA 存在下で酵素活性を測定した (Table 8)。1 mM Cu^{2+} が β -ガラクトシダーゼ活性を 50% 阻害したが Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} は殆ど酵素活性に影響しなかった。10 mM NaCl 及び、10 mM KCl による β -ガラクトシダーゼ活性への影響もなかった。また、金属キレート剤 EDTA による影響もなかった。酵素活性を 20 mM ガラクトース、グルコース、ラクトースの存在下でも測定したところ (Table 8)、ガラクトースは酵素活性を約 60% 阻害し、グルコースは 17%、ラクトースは 19% それぞれ阻害した。ガラクトースによる活性阻害の影響は拮抗阻害であり、阻害定数 K_i は 5.8 ± 0.38 mM であった (Fig. 20)。リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中に加えた Tris 濃度 50 mM で酵素活性は 27%、100 mM で 46% 阻害された。

3.4.4. 基質特異性と糖転移活性

B. longum subsp. *longum* JCM 7052 から精製した β -ガラクトシダーゼは、狭い基質範囲を示した。4NP- β -D-ガラクトピラノシドを加水分解する酵素活性を 100% とした時、2NP- β -D-ガラクトピラノシドに対しては 31%、4NP- β -D-フコピラノシドに対しては 8% の加水分解活性を示した。その他の 4NP- β -D-グルコピラノシドや、4NP- α -L-アラビノフラノシド、4NP- α -D-ガラクトピラノシド、4NP- α -D-グルコピラノシド、4NP- α -D-マンノピラノシド、4NP- α -L-ラムノピラノシド、4NP- α -L-フコピラノシド、に対しては活性を示さなかった。

ミカエリス定数 K_m を酵素反応速度式の両逆数プロット法で求め、4NP- β -D-ガラクトピラノシドに対して 0.42 ± 0.015 mM、2NP- β -D-ガラクトピラノシドに対して 0.78 ± 0.039 mM であった。最大反応速度 V_{max} は 4NP- β -D-ガラクトピラノシドでは 5.21 ± 0.380 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein、2NP- β -D-ガラクトピラノシドを基質とした時は 2.16 ± 0.062 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein であった。

精製した β -ガラクトシダーゼを用いて、ラクトースとアラビアガムに対して pH 7.0、37°C

Table 8. Effects of various reagents on the β -galactosidase activity

Reagents		Relative activity (%)
None		100
BaCl ₂	1 mM	100
CaCl ₂	1 mM	99
CoCl ₂	1 mM	90
CuCl ₂	1 mM	50
FeCl ₂	1 mM	100
MgCl ₂	1 mM	98
MnCl ₂	1 mM	100
NiCl ₂	1 mM	100
ZnCl ₂	1 mM	100
NaCl	10 mM	98
KCl	10 mM	96
EDTA	1 mM	100
Galactose	20 mM	43
Glucose	20 mM	83
Lactose	20 mM	81
Tris*	50 mM	73
	100 mM	54

*Tris(hydroxymethyl) aminomethane

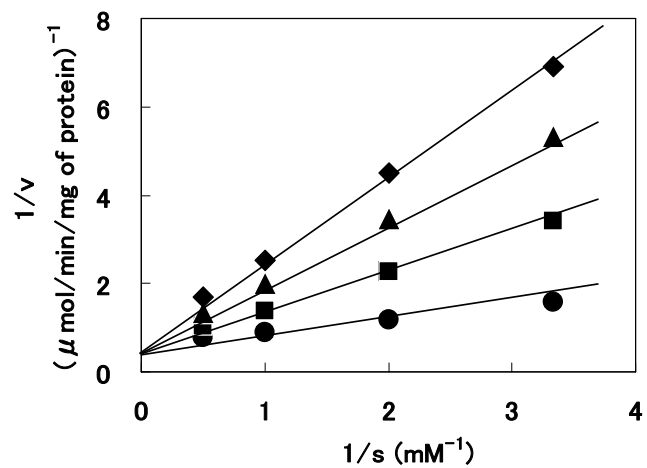


Fig. 20. Inhibitory effects of D-galactose on the activity of the purified β -galactosidase. Double reciprocal plots of α -galactosidase activity against 4NP- β -D-galactopyranoside in the presence of D-galactose. For the enzyme activity assay, K-phosphate buffer (pH7.0) was used. The concentrations of D-galactose were 0 (●), 10 (■), 20 (▲), and 30 mM (◆).

で 1 時間反応させたが加水分解活性は見られなかった。

精製した β -ガラクトシダーゼの糖転移活性分析を前述の TLC で行った。4NP- β -D-ガラクトピラノシドをガラクトシル基の供与体として用いたところ、ガラクトースとメリビオースを受容体とした時に、それぞれ一つずつ生成物が形成された (Fig. 21)。生成物と推定されるガラクトシル- β -1,3-ガラクトース、ガラクトシル- β -1,6-ガラクトース、ガラクトシル- β -1,3-ガラクトシル- α -1,6-グルコース、ガラクトシル- β -1,6-ガラクトシル- α -1,6-グルコースはいずれも市販されておらず、TLC では生成物を同定できなかった。一方、ラクトースからの糖転移活性は確認できず、本酵素がラクトースを加水分解する活性が極めて低いことと符合した。

3.4.5. β -ガラクトシダーゼの考察

β -ガラクトシダーゼをアラビアガムで培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から精製した [49]。MALDI-TOF-MS 分析により、精製した β -ガラクトシダーゼは *B. longum* subsp. *longum* DJO 10A 株と NCC 2705 株のゲノムに見出されている BLD 0926 と BL1168 に相同性の高い酵素であった。この酵素は *lacAI* 遺伝子の産物であり、*lacZ* 遺伝子に由来するものではなく、4NP- β -D-ガラクトピラノシドを加水分解するがラクトースを加水分解する活性は極めて低かった。Cu²⁺は 1 mM の濃度で 50% 阻害したが、それ以外の一価、二価の陽イオンによって、 β -ガラクトシダーゼは活性化も阻害もされなかった。D-ガラクトースが拮抗阻害剤として作用した (Table 8)。

一方、*B. longum* subsp. *longum* 401 から精製された 4NP- β -D-fucoside 加水分解活性をもつ β -ガラクトシダーゼ [22] は、どの陽イオンによっても活性促進されないが、1 mM の CuCl₂ で 90%、ZnCl₂ で 55%、MgCl₂ で 43% 阻害される。この酵素は熱不安定であり、45°C、10 分間で、75% 失活する。また、*B. longum* subsp. *longum* CCRC 15708 から分離された Na⁺ イオンで活性化される β -ガラクトシダーゼ [23] は、ラクトースによって拮抗阻害されるが、ガラクトースでは阻害されない。このように、本研究で精製した β -ガラクトシダーゼは分子量も触媒特性も既報の酵素とかなり異なるもので、新規な

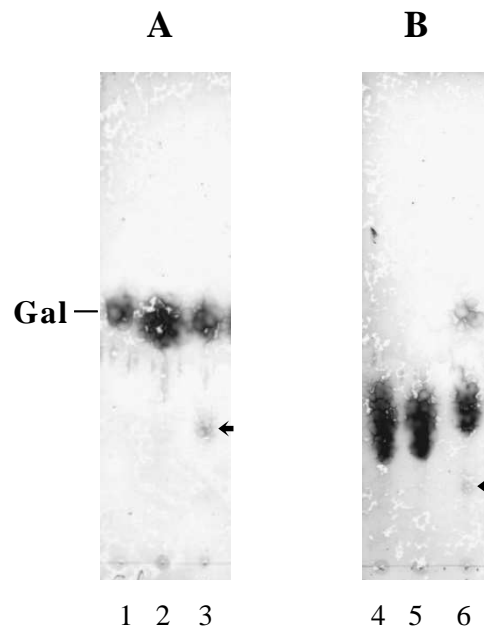


Fig. 21. Transglycosylation activity of β -galactosidase detected by TLC. Reaction mixtures (1 ml) contained 80 mM K-phosphate buffer (pH 7.0), sugars and 0.2 units of purified β -galactosidase, and were incubated at 37°C for 6 h. Sugars in the reaction mixture include 15 mM 4NP- β -D-galactopyranoside (4NP β Gal) and 80 mM saccharide sugars. On the lanes, sugars in the reaction mixture were: 1, 2, galactose (Gal); 3, NP β Gal + Gal; 4, 5, melibiose (Mel); 6, 4NP β Gal + Mel. No. 1, 4 were spotted without incubation. Sugar products were indicated by arrows.

酵素であった。

B. longum subsp. *longum* のゲノム [15,16]には β -ガラクトシダーゼの三つの遺伝子 *lacZ*, *lacA1*, *lacA2* があり, それらの分子量はそれぞれ 114 kDa, 77.4 kDa, 78.9 kDa である。*B. longum* subsp. *longum* NCC 2705 の *lacZ* 遺伝子がラクトース, マルトース, 及びフルクトオリゴ糖によって誘導されることが最近示された [68]。一方, *lacA2* 遺伝子は同じ遺伝子クラスターにある糖の ABC 輸送系の遺伝子と共に, *B. longum* subsp. *longum* LMG 13197 をガラクトオリゴ糖の存在下で培養すると誘導されている[80]。本研究で *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 をアラビアガムで培養すると, β -ガラクトシダーゼ活性は約 4 倍に上昇し [31], アラビアガムで誘導される β -ガラクトシダーゼが *lacA1* 遺伝子の産物であり, GH 42 ファミリーに分類されることがわかった[48]。

この酵素はアラビアガムを加水分解できなかったが, 菌体はアラビアガムを加水分解した [31]。アラビアガムが加水分解されてできるガラクトオリゴ糖は細胞の中に取り込まれると考えられる。もし, 精製した β -ガラクトシダーゼの生理機能の一つが, 菌体内でガラクトオリゴ糖を加水分解することであるのならば, アラビアガムが β -1,3 結合と β -1,6 結合を持つことから, 本菌の β -ガラクトシダーゼは β -1,3 結合, 或いは β -1,6 結合したガラクトシル基に特異的に作用するのではないかと予想される。

4NP- β -D-ガラクトピラノシドからガラクトースとメリビオースへの糖転移活性が見られたが, ラクトースからの糖の転移は見られなかった。推定反応生成物の, ガラクトシル- β -1,3-ガラクトース, ガラクトシル- β -1,6-ガラクトース, ガラクトシル- β -1,3-ガラクトシル- α -1,6-グルコースあるいはガラクトシル- β -1,6-ガラクトシル- α -1,6-グルコースは市販品に見つからず, 新規なオリゴ糖と考えられた。

3.5. α -グルコシダーゼについて

糖質加水分解酵素の中で α -グルコシダーゼはビフィズス菌では *Bifidobacterium adolescentis* [35, 81] と *Bifidobacterium breve* [42, 43]の僅か二種からのみ精製され、その性質が調べられている。 α -1,4 グルコシダーゼと α -1,6 グルコシダーゼの触媒反応を Fig. 22 に示した。

B. adolescentis type a E194 からのマルチトール加水分解酵素として精製されたものは α -1,4-グルコシダーゼである[81]。*B. adolescentis* DSM20083 の酵素 AglA (BaAglA)は二つのグルコース間の α -1,6-グルコシド結合を加水分解するオリゴ-1,6 グルコシダーゼであり、酵素 AglB (BaAglB) は α -1,4 グルコシド結合に対して基質特異性をもつ α -1,4 グルコシダーゼである[35]。

B. breve UCC2003 は酵素 Agl1 (BbAgl1) と酵素 Agl2 (BbAgl2)を含み、これらの酵素は α -1,6-グルコシド結合に基質特異性がみられた[42]。また、同菌株の酵素 Agl3 は α -1,1-, α -1,3-, α -1,4-, α -1,5-の各グルコシド結合を加水分解し[43]、酵素 MelD はメレイトースの α -1,3-グルコシド結合を加水分解する酵素である。[44]。

本研究で *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 をアラビアガム培養すると、 α -グルコシダーゼが α -及び β -ガラクトシダーゼに次いで高い活性を示したことから、 α -グルコシダーゼを精製し、その性質を調べることにした。

α -グルコシダーゼの酵素学的性質のうち、特にヒトの健康維持に有益な効果を及ぼすことが期待されているアルキルグルコシドを生成する糖転移活性に注目した。

3.5.1. 精製と分子量測定

1%のアラビアガムを含む培地で培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から α -グルコシダーゼを精製した。 α -グルコシダーゼの精製のまとめを Table 9 に示した。1 回目の Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーで 4NP- α -D-グルコピラノシドを加水分解する α -グルコシダーゼ活性が 2 つのピークに分かれた(Fig. 23)。NaCl 濃度 0.3 M で溶出した酵素を BlAglA1, 0.2 M で溶出した酵素を BlAglA2 と名付け、各々を

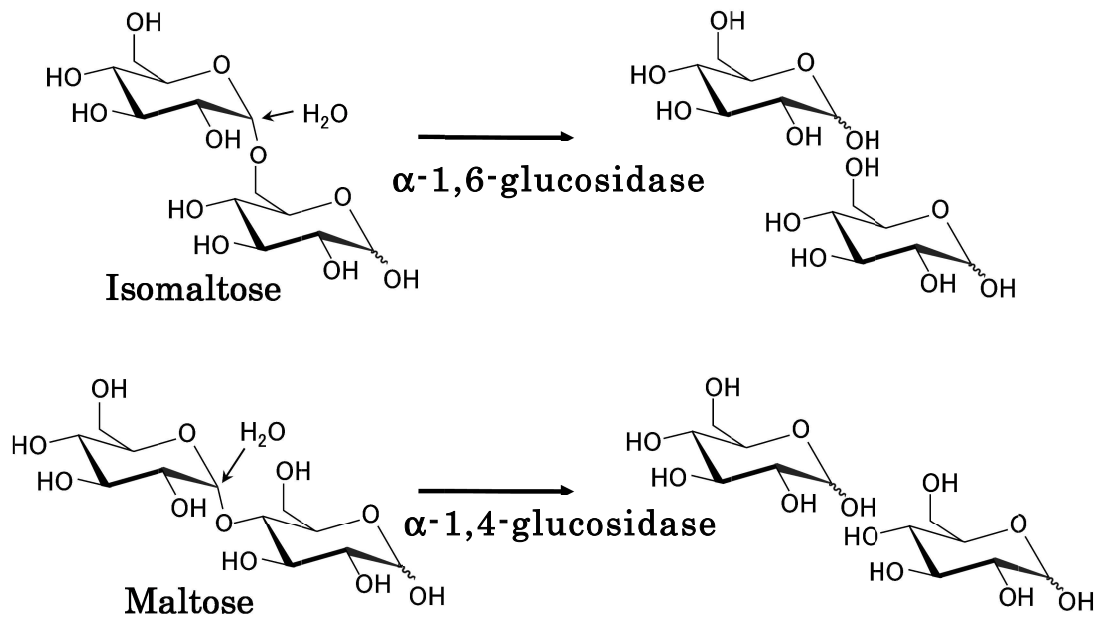


Fig. 22. Hydrolytic reactions catalyzed by α -1,6-glucosidase and α -1,4-glucosidase.

Table 9. Purification of α -glucosidases from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on 1% gum arabic

Enzyme	Purification step	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg of protein)	Yield (%)
BlAglA1 BlAglA2	1. Crude extract	679	614	0.90	100
	2. Ammonium sulfate fraction	243	283	1.16	46
	3. Sepharose 4B	207	264	1.27	43
BlAglA1	4A. Q Sepharose 1	54.0	155	2.87	25
	5A. Q Sepharose 2	41.3	151	3.66	25
	6A. Butyl-S Sepharose	18.5	136	7.34	22
	7A. Native PAGE	0.29	130	451	21
BlAglA2	4B. Q Sepharose 1	32.4	100	3.09	16
	5B. Q Sepharose 2	21.5	87	4.03	14
	6B. Butyl-S Sepharose	9.9	83	8.45	14
	7B. Native PAGE	0.14	39	284	6

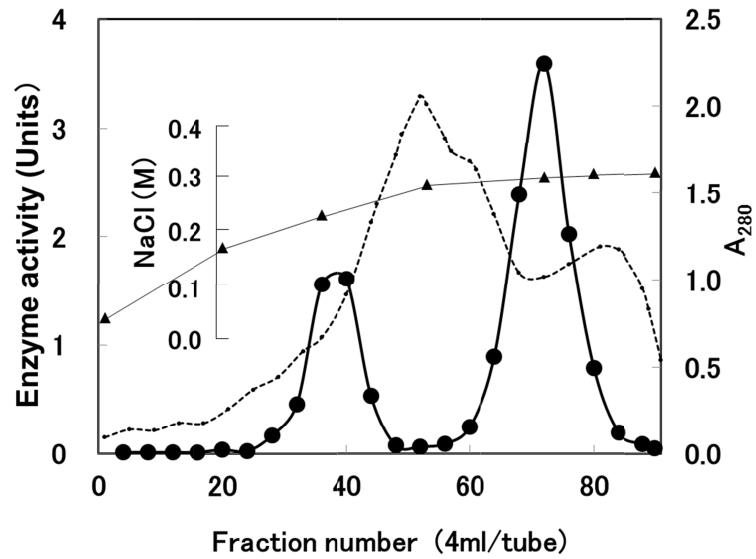


Fig. 23. Ion exchange chromatography on Q Sepharose of α -glucosidases from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052. Enzyme activities were determined with 4NP- α -D-glucopyranoside as substrate. Symbols: ●, Enzyme activity; ▲, NaCl; and ●, A₂₈₀.

2 回目の Q-Sepharose のクロマトグラフィーで精製した。次の Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow 疎水性クロマトグラフィーで酵素 BlAglA1 は Tris-HCl (pH 7.2)中の(NH₄)₂SO₄ 濃度 0.9M で、酵素 BlAglA2 は 1.0 M で溶出した。最後に Native-PAGE によって、各 α -グルコシダーゼは各々 1 本のタンパク質バンドに分離され、その結果、BlAglA1 は 450 倍に、BlAglA2 は 285 倍の精製度になった。

精製した α -グルコシダーゼの分子量は SDS-PAGE で BlAglA1 が 72.0 kDa, BlAglA2 が 72.8 kDa であった(Fig. 24A)。また、Native PAGE では、BlAglA1 の分子量は 70.1 kDa, BlAglA2 の分子量は 92.7 kDa (Fig. 24B)であった。

3.5.2. 質量分析法による α -グルコシダーゼの同定

MALDI-TOF-MS とタンデム MS で分析した結果、BlAglA1 から 2 本のトリプシン水解産物 EGFLTVGEAPGVTAQR と GTPYIYQGEELGMTDAHFR を得た(Fig. 25-1, 25-2A, 25-2B)。BlAglA2 からは、2 本のトリプシン水解産物 HGNATVATGEWNLVAADSEQVYSFR と NAGWASLFFCNHDQPR が得られた(Fig. 26-1, 26-2A, 26-2B)。これら 2 組のペプチド配列を、現在分析中の *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 のゲノムで検索したところ、BlAglA1 から得られた一組のペプチド配列は一つの α -アミラーゼ (N9-59)に見つかり、さらに BlAglA2 からの 2 本のペプチド配列は別の α -アミラーゼ (N9-6)中にみつかった。BlAglA1 は 607 のアミノ酸から成り、68256.70 Da の分子量であった。この分子量は SDS-PAGE (Fig. 24-2A)によって測定した 72.0 kDa と概ね一致している。BlAglA2 は 606 のアミノ酸から成り 68547.12 Da の分子量であった。これは SDS-PAGE (Fig. 24-2A)で測定した 72.8 kDa とほぼ一致する。DDBJ の BLAST 検索に掛けると BlAglA1 と BlAglA2 のアミノ酸配列は *B. longum* subsp. *longum* KACC 91563 の遺伝子産物の BLNIAS 02948 及び BLNIAS 02851 のアミノ酸配列[82]とそれぞれが完全に一致することが分かった。

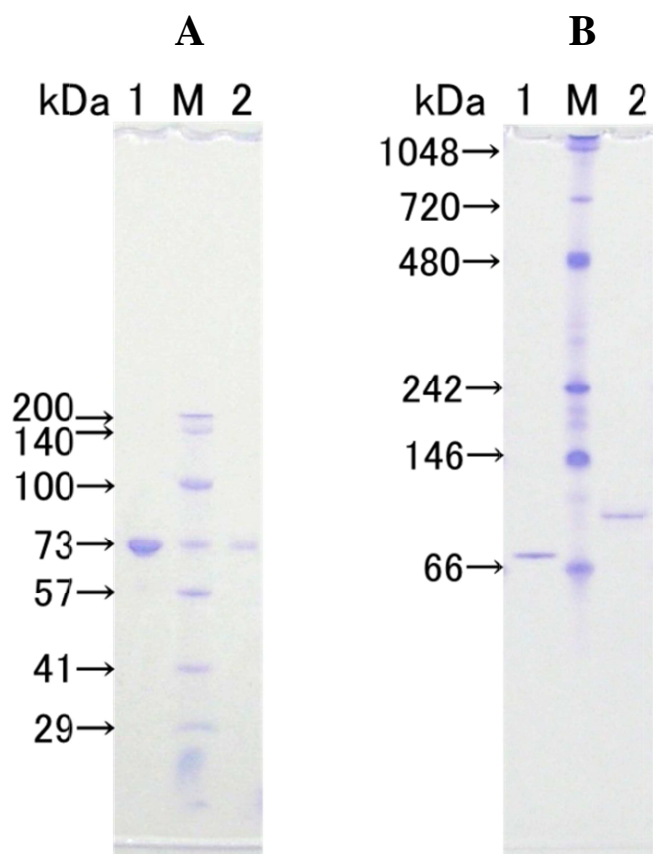


Fig. 24. Molecular mass determination of α -glucosidases by SDS-PAGE (A) and native gradient PAGE (B). Lane M, marker proteins; lane 1, purified B1AglA1; lane 2, purified B1AglA2. Proteins were stained by Coomassie blue R-250.

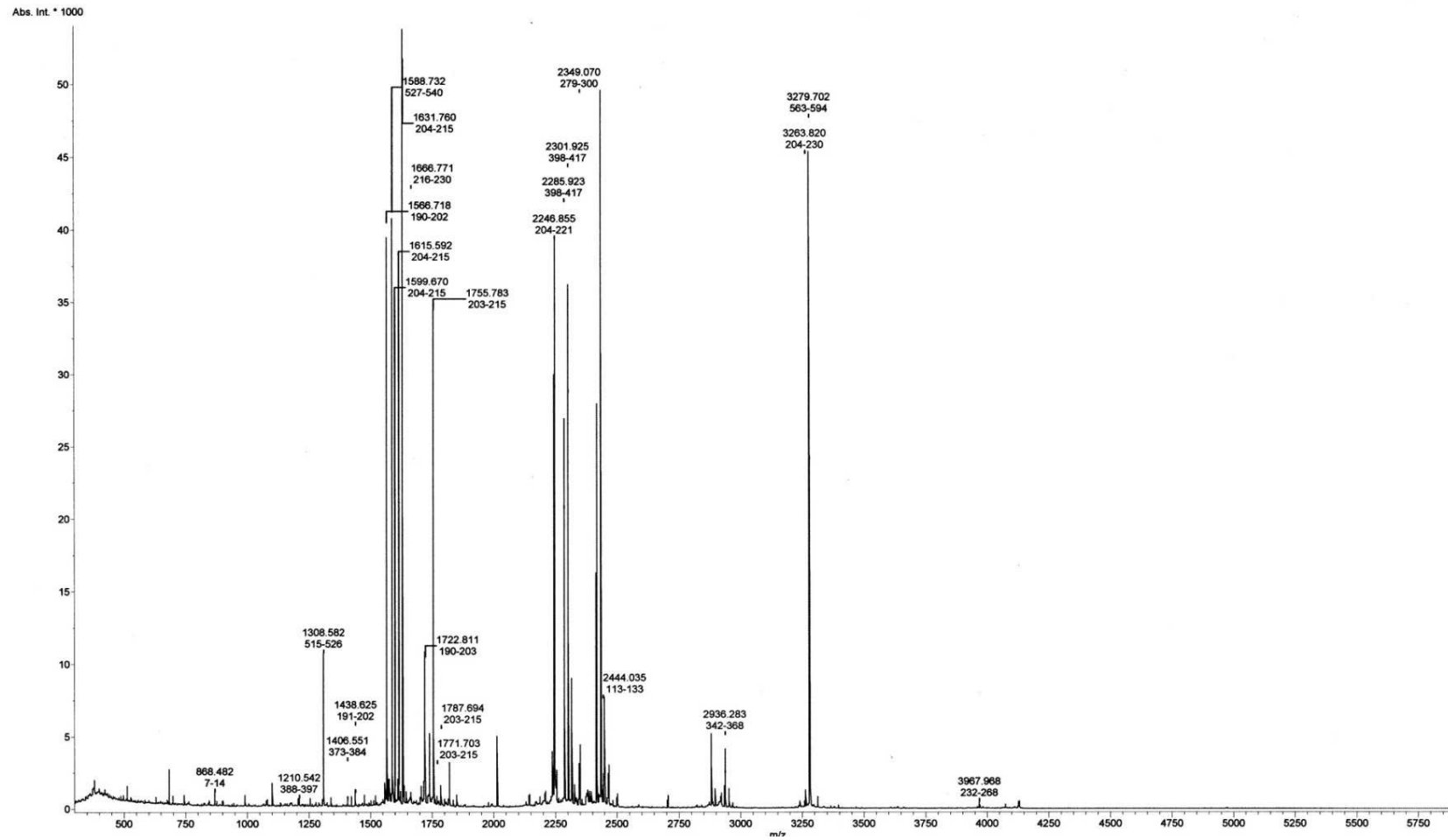


Fig. 25-1. The peptide fingerprinting of α -glucosidase B1Ag1A1 analyzed by MALDI-TOF-MS.

Figures indicate the molecular masses of peptides produced from the trypsin-digested enzyme (upperparts) and the numbers of amino acid position in the enzyme (underparts) .

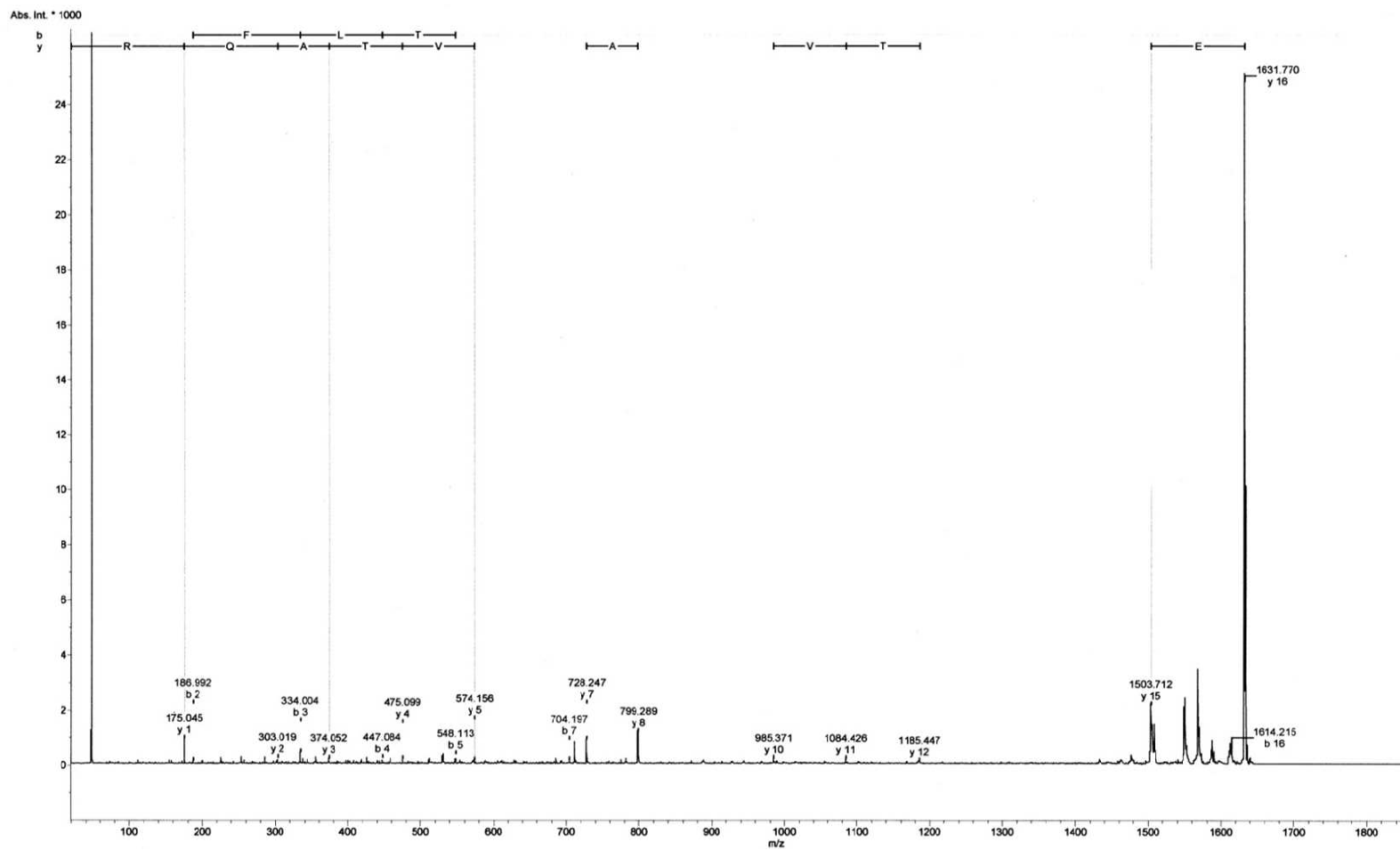


Fig. 25-2A. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -glucosidase BIAG1A1.

The molecular ion (m^+ , m/z) 1631.760 in Fig. 25-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

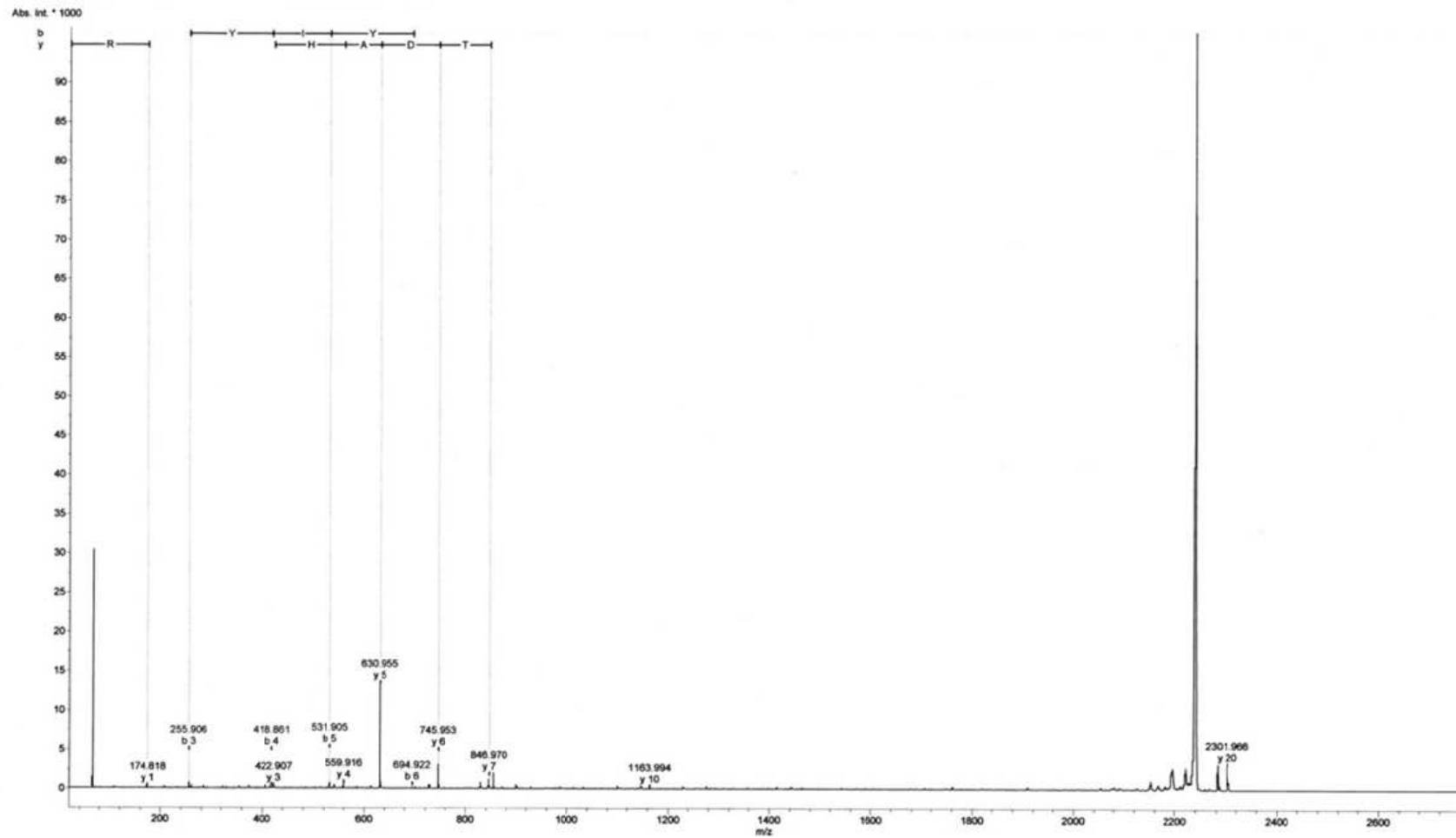


Fig. 25-2B. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -glucosidase B1Ag1A1. The molecular ion (m^+ , m/z) 2301.9250 in Fig. 25-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

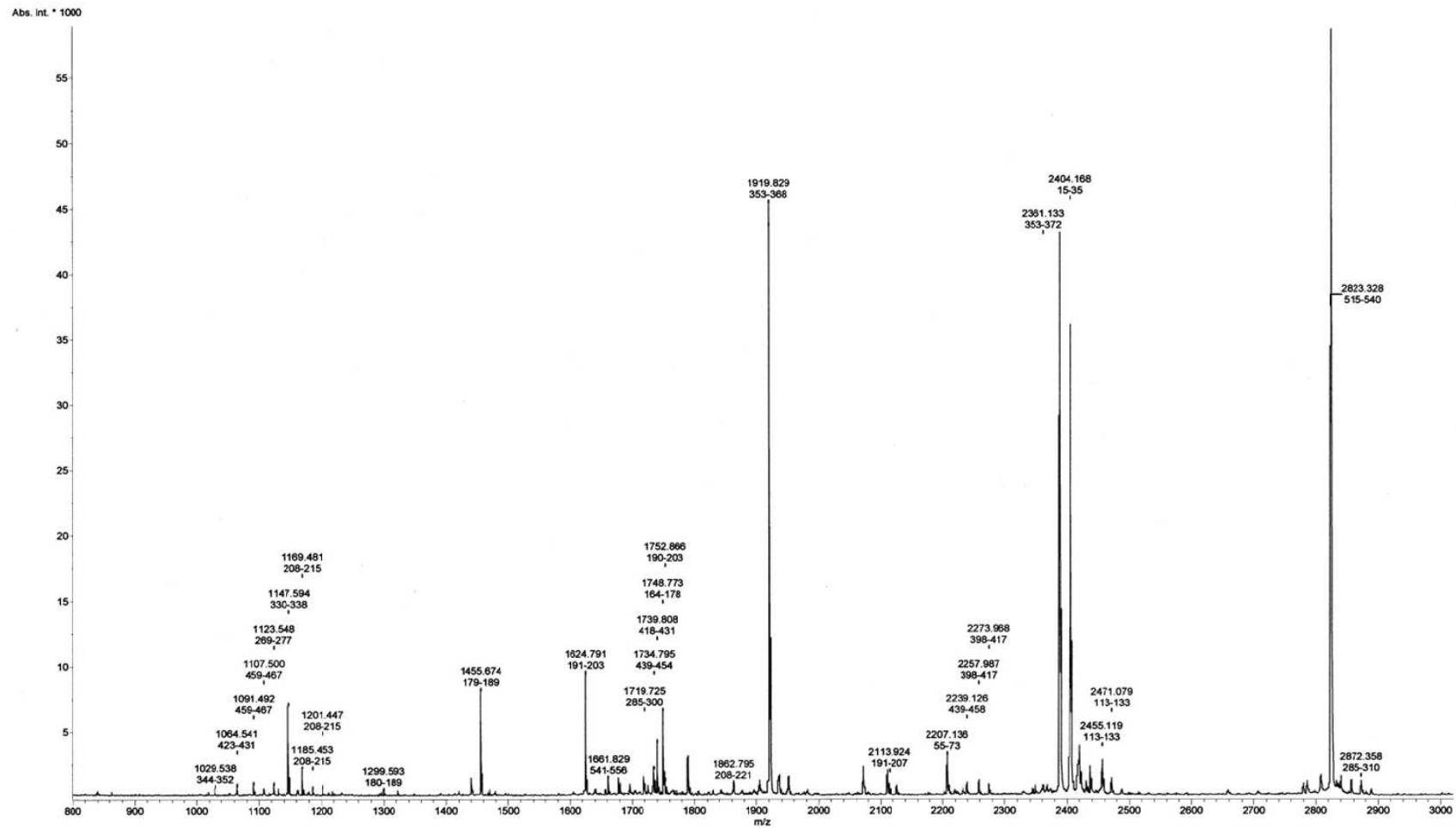


Fig. 26-1. The peptide fingerprinting of α -glucosidase BIAglA2 analyzed by MALDI-TOF-MS.

Figures indicate the molecular masses of peptides produced from the trypsin-digested enzyme (upperparts) and the numbers of amino acid position in the enzyme (underparts) .

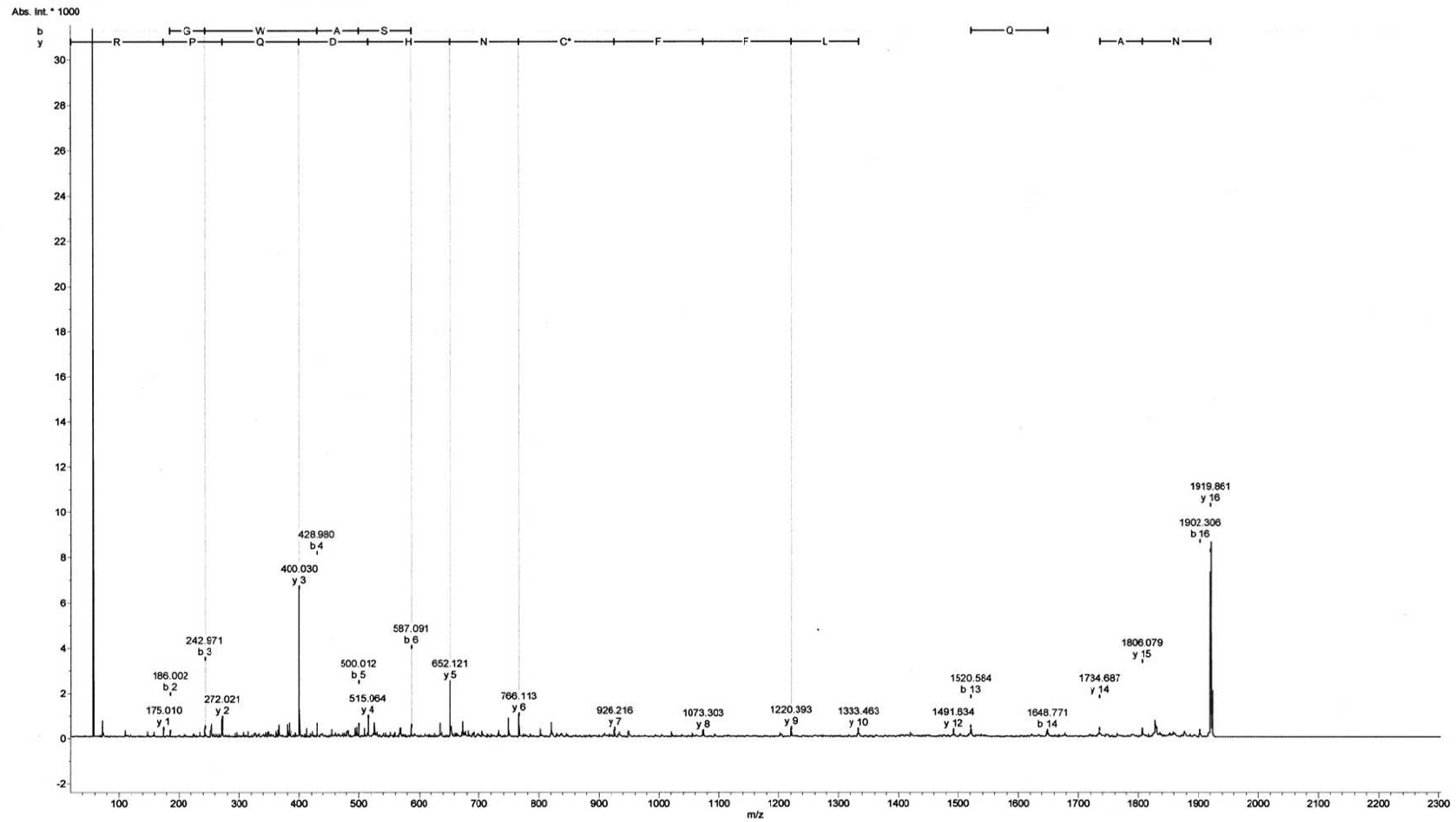


Fig. 26-2A. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -glucosidase B1Ag1A2.

The molecular ion (m^+ , m/z) 1919.8410 in Fig. 26-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

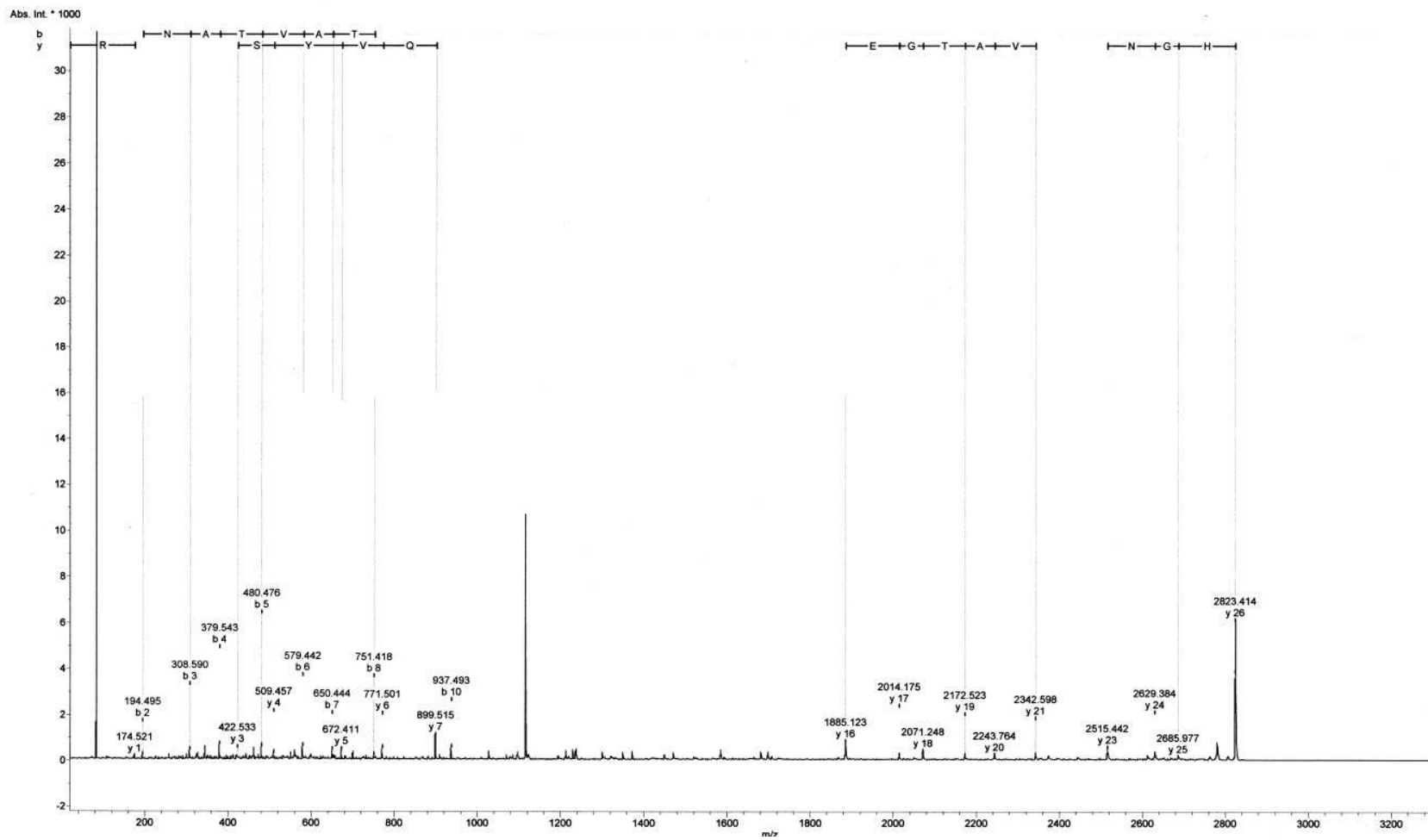


Fig. 26-2B. The tandem mass spectrometry analysis of a peptide obtained from the trypsin-digested α -glucosidase B1Ag1A2. The molecular ion (m^+ , m/z) 2823.3500 in Fig. 26-1 was subjected to MALDI-TOF-MS analysis again.

3.5.3. 基質特異性

BlAglA1 と BlAglA2 は 4NP- α -D-グルコピラノシドに対して加水分解活性を示したが、それ以外の 4NP-グリコシドである 4NP- α -D-ガラクトピラノシド, 4NP- α -D-マンノピラノシド, 4NP- α -L-ラムノピラノシド, 4NP- α -L-フコピラノシド, 4NP- α -L-アラビノピラノシド, 4NP- α -L-アラビノフラノシド, 4NP- β -D-グルコピラノシド, 4NP- β -D-ガラクトピラノシド, 2NP- β -D-ガラクトピラノシド, 4NP- β -D-フコピラノシド, 4NP- β -L-フコピラノシドに対しては加水分解活性を示さなかった。

グルコースを構成要素とする多糖類に対する加水分解活性を, 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で 20 mM の糖を 40°C で, 30 分間反応後, 遊離したグルコースを測定して求めた。(Table 10)。BlAglA1 と BlAglA2 は α -1,6-グルコシド結合をもつイソマルトース, パラチノース, パノースからグルコースを遊離した。二つのグルコース間に α -1,1-グルコシド結合をもつトレハロースも, 分解活性は弱い, 両酵素によって加水分解された。

BlAglA1 と BlAglA2 は α -1,2- β グルコシド結合をもつスクロース, α -1,3 グルコシド結合をもつツラノースとメレジトース, α -1,4 グルコシド結合をもつマルトース, マルトトリオース, アミロースを加水分解しなかった。基質特異性とアミノ酸配列の相同性から BlAglA1 と BlAglA2 がオリゴ-1,6-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.10) であり, 糖質加水分解酵素ファミリー GH13 に属していると考えられる[76, 77]。

4NP- α -D-グルコピラノシド, トレハロース, パラチノース, パノース, イソマルトース, イソマルトトリオース, エチル- α -D-グルコシドに対するミカエリス定数 (K_m) と最大反応速度 (V_{max}) を Table 11. に示した。

3.5.4. pH, 温度, 化合物の影響

精製した BlAglA1 と BlAglA2 の両酵素の最適 pH を pH3.5 から pH 10.0 までの範囲で 80 mM の緩衝液を用いて, 4NP- α -D-グルコピラノシドを基質として測定したところ, 最適 pH は両酵素とも pH 5.5-6.0 (80 mM リン酸カリウム緩衝液) であった (Fig. 27A,

Table 10. Hydrolytic activities of BlAglA1 and BlAglA2 toward some saccharides.

Substrate	Hydrolytic activity	
	BlAglA1	BlAglA2
Disaccharides		
Trehalose	+	+
Sucrose	—	—
Turanose	—	—
Maltose	—	—
Cellobiose	—	—
Lactose	—	—
Palatinose	+	+
Isomaltose	++	++
Melibiose	—	—
Trisaccharides		
Melezitose	—	—
Maltotriose	—	—
Panose	+++	++
Isomaltotriose	+++	+++
Other substrates		
Glycogen	—	—
Amylose	—	—
Amylopectin	—	—

Glucose released after 30 min incubation was determined as described in Materials and Methods. The enzyme used was 63 mU in each reaction. Scales were: —, 0-0.01 mol glucose; +, 0.01-0.05 mol glucose; ++, 0.05-0.10 mol glucose; and +++, 0.10-1.0 mol glucose.

Table 11. Kinetic parameters of BlAglA1 and BlAglA2 purified from *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052.

Substrate	BlAglA1		BlAglA2	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
4NP- α -D-Glucopyranoside	1.5 ± 0.2	122 ± 8.5	2.0 ± 0.1	64.2 ± 0.6
Trehalose	14.3 ± 1.9	1.5 ± 0.4	7.4 ± 0.5	1.3 ± 0.6
Palatinose	32.2 ± 1.5	15.3 ± 2.5	33.5 ± 3.0	16.4 ± 1.8
Isomaltose	35.0 ± 2.2	17.0 ± 1.0	38.6 ± 3.6	22.6 ± 3.7
Panose	38.3 ± 0.7	47.7 ± 2.9	24.1 ± 2.3	31.6 ± 0.6
Isomaltotriose	41.7 ± 0.5	25.3 ± 2.2	43.3 ± 1.0	17.2 ± 1.1
Ethyl- α -D-glucoside	68.6 ± 2.7	24.2 ± 2.8	37.3 ± 3.8	12.0 ± 2.3

The standard assay of enzyme activity was used for 4NP- α -D-glucopyranoside as substrate. Glucose released from the other substrate was determined as described in Materials and Methods. K_m values are expressed as mM, and V_{max} values are expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein. All values are means of three experiments \pm standard errors.

27B)。

最適温度は 4NP- α -D-グルコピラノシドを基質として pH 6.0, 5 分間の測定条件で調べたところ, BIAglA1 では 40-45°C であった (Fig. 28A)。しかし, 熱安定性は保温 40-45°C で 5 時間の中に活性は徐々に低下し, 55°C では 2 時間後に活性は殆ど消失した (Fig. 29A)。BIAglA2 の最適温度は 40-45°C であった (Fig. 28B)。BIAglA2 の熱安定性は BIAglA1 より低く, 55°C に 1 時間置くと活性が失われた (Fig. 29B)。

次に化学物質による影響について, 1 mM の金属塩化物, 及び EDTA 存在下で酵素活性を測定した (Table 12)。Cu²⁺ が BIAglA1 と BIAglA2 の α -グルコシダーゼ活性を約 60% 阻害したが Ba²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ は殆ど酵素活性に影響しなかった。10 mM NaCl 及び, 10 mM KCl による α -グルコシダーゼ活性への影響もなかった。また, 金属キレート剤 EDTA による影響もなかった。

3.5.5. 糖転移活性

α -グルコシダーゼは糖転移活性をもつことが知られている [35, 42, 83, 84]。そこで精製した酵素 BIAglA1 と BIAglA2 の糖転移活性について調べた (Fig. 30)。イソマルトース, パラチノース, イソマルトトリオース, パノースから自己分子への糖転移が起こり, 合成されたオリゴ糖が TLC によって検出された。特に三糖類のイソマルトトリオースとパノースから四糖類と五糖類が生成されることを確認した。イソマルトースをグルコース供与体として利用した時, 生成されたのは明らかにイソマルトトリオースであった。 (Fig. 30, レーン 10 と 11)。このことは, BIAglA1 と BIAglA2 の糖転移活性によって生成した化合物には α -1,6 グリコシド結合していることを示唆している。

アルコールへの転移活性についても TLC によって調べた (Fig. 31)。触媒反応の一例を Fig. 32 に示した。TLC での展開により, 標準物質のエチル- α -D-グルコシドはグルコースより早く移動した。これはアルキルグルコシドがシリカゲル板上でグルコースよりも高い位置に検出されることを示唆している。パラチノースをグルコース供与体とし, エタノール, 1-プロパノール, 2-プロパノール, 1-ブタール, 1-ヘキサノールをグルコース受容体と

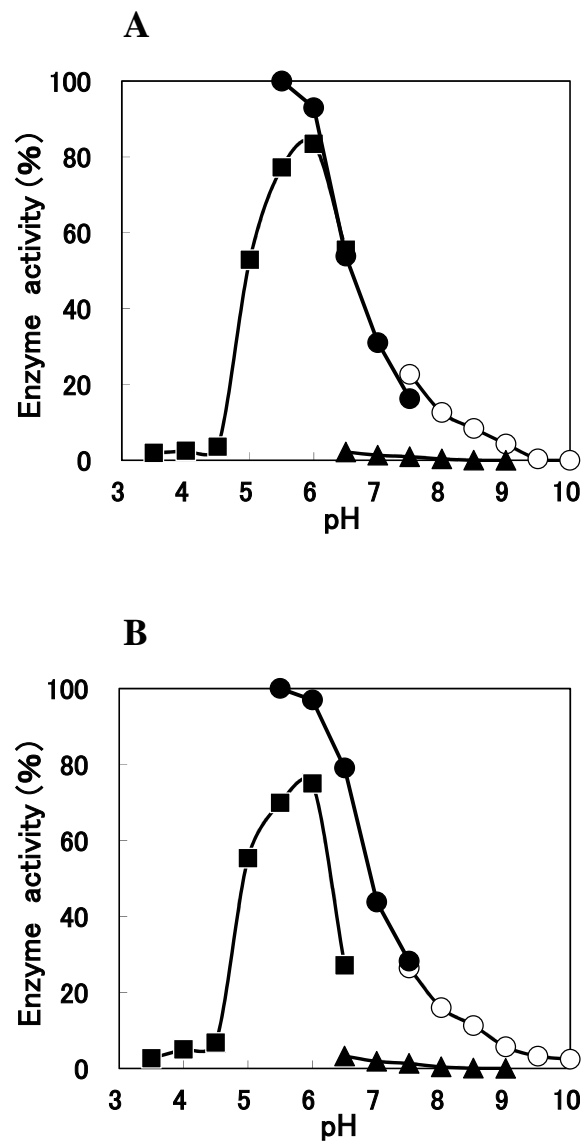


Fig. 27. Effects of pH on the activity of the purified α -glucosidases B1AglA1 (A) and B1AglA2 (B). Buffers used were ■, 80 mM acetate (pH 3.5–6.5); ●, 80 mM K-phosphate (pH 5.5–8.0); ○, 80 mM glycine-NaOH (pH 7.5–10.0); and ▲, 80 mM Tris-HCl (pH 6.5–10.0).

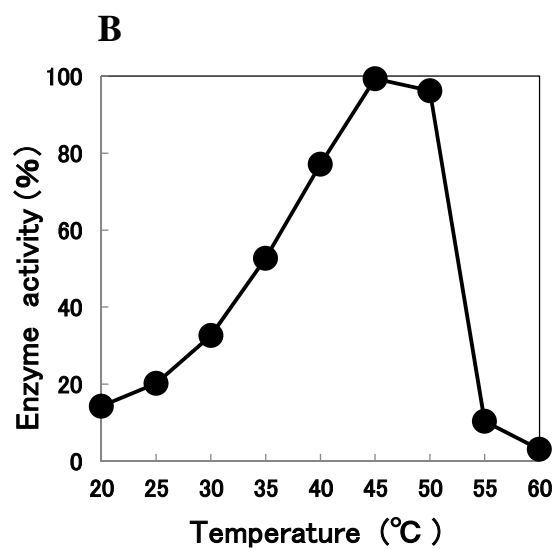
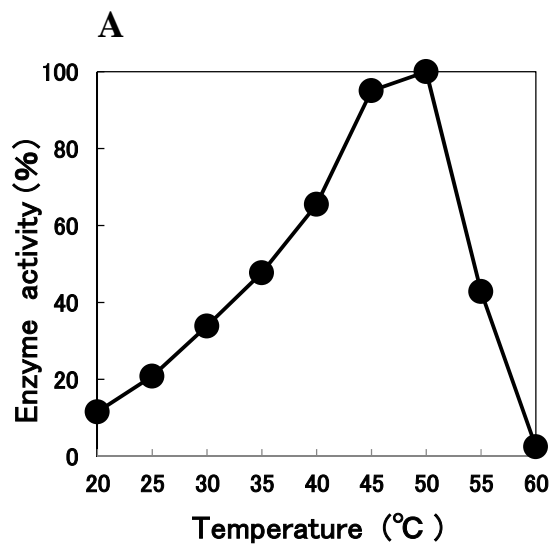


Fig. 28. Effects of temperature on the activity of the purified α -glucosidases B1AglA1 (A) and B1AglA2 (B).

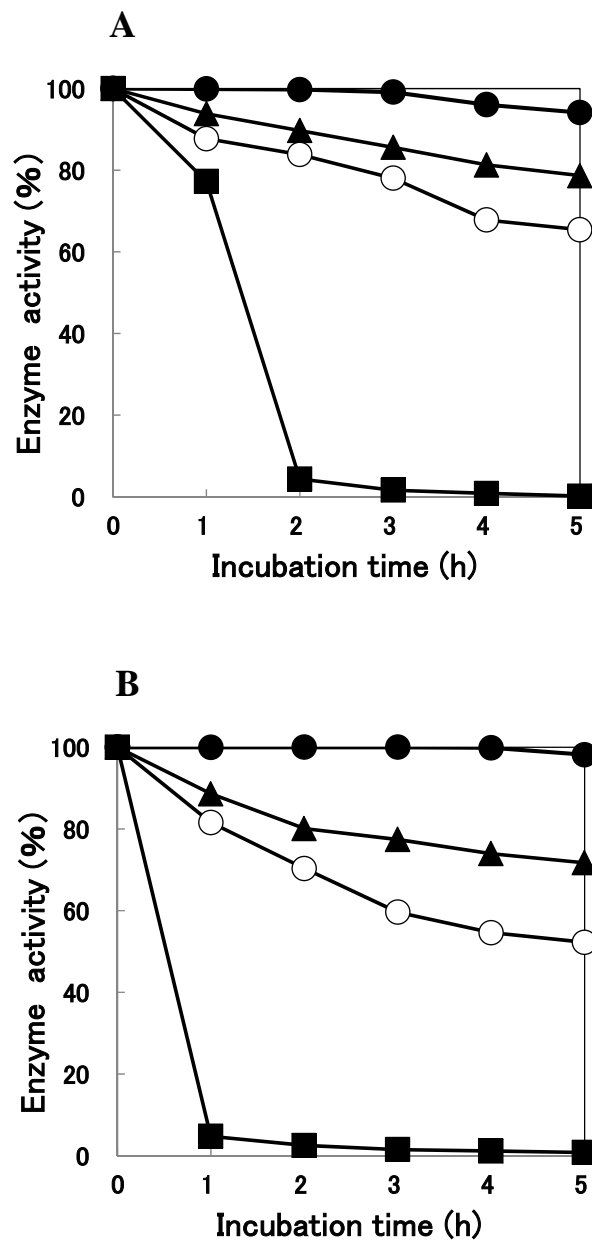


Fig. 29. Effects of temperature on the stability of the purified B1Ag1 (A) and B1Ag12 (B). Enzyme activities were assayed at intervals after incubation at 40°C (●), 45°C (▲), 50°C (○), and 55°C (■).

Table 12. Effects of metal ions and EDTA on the hydrolytic activities of purified B1AglA1 and B1AglA2.

4NP- α -D-Glucopyranoside was used as substrate.

Reagents		Relative activity (%)	
		B1AglA1	B1AglA2
None		100	100
BaCl ₂	1 mM	95	97
CaCl ₂	1 mM	90	89
CoCl ₂	1 mM	86	89
CuCl ₂	1 mM	43	39
FeCl ₂	1 mM	94	96
MgCl ₂	1 mM	90	87
MnCl ₂	1 mM	82	82
NiCl ₂	1 mM	87	89
ZnCl ₂	1 mM	89	92
NaCl	10 mM	97	99
KCl	10 mM	103	101
EDTA	1 mM	99	99

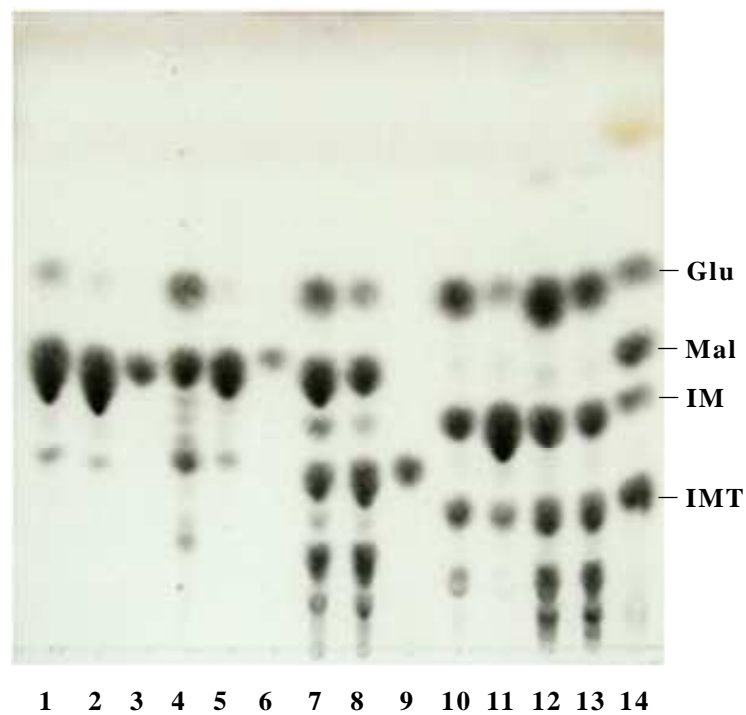


Fig. 30. TLC analysis of the transglycosylation activities of BIAglA1 and BIAglA2. Standard carbohydrates used were trehalose (lane 3), palatinose (lane 6), panose (lane 9), and a mixture of glucose (Glu), maltose (Mal), isomaltose (IM), and isomaltotriose (IMT) (lane 14). The reaction mixtures contained trehalose (lanes 1 and 2), palatinose (lanes 4 and 5), panose (lanes 7 and 8), isomaltose (lanes 10 and 11), and isomaltotriose (lanes 12 and 13). In the reaction mixture BIAglA1 was added in lanes 1, 4, 7, 10 and 12, and BIAglA2 was in lanes 2, 5, 8, 11, and 13.

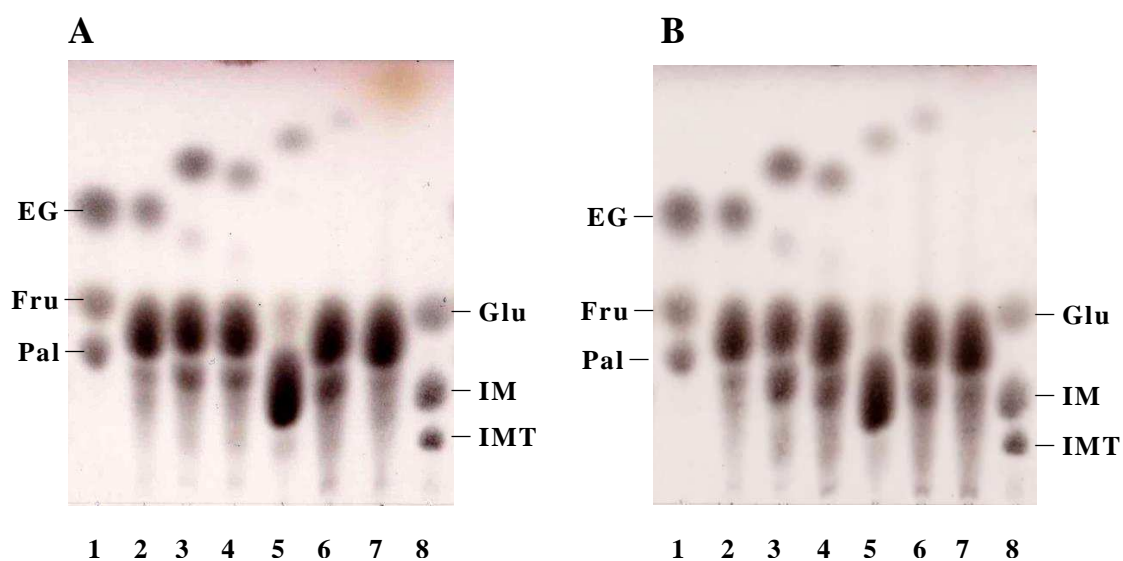


Fig. 31. TLC analysis of the transglucosylation activities of the purified oligo-1,6-glucosidases B1AglA1 (A) and B1AglA2 (B). Standard carbohydrates used were a mixture of ethyl- α -D-glucoside (EG), fructose (Fru) and palatinose (Pal) in lane 1, and that of glucose (Glu), isomaltose (IM), and isomaltotriose (IMT) in lane 8. The reaction mixtures containing each purified enzyme, 500 mM palatinose as a glucosyl donor and the following 1.0 M alcohol: ethanol (lane 2), 1-propanol (lane 3), 2-propanol (lane 4), 1-butanol (lane 5), 1-hexanol (lane 6), and 1-octanol (lane 7).

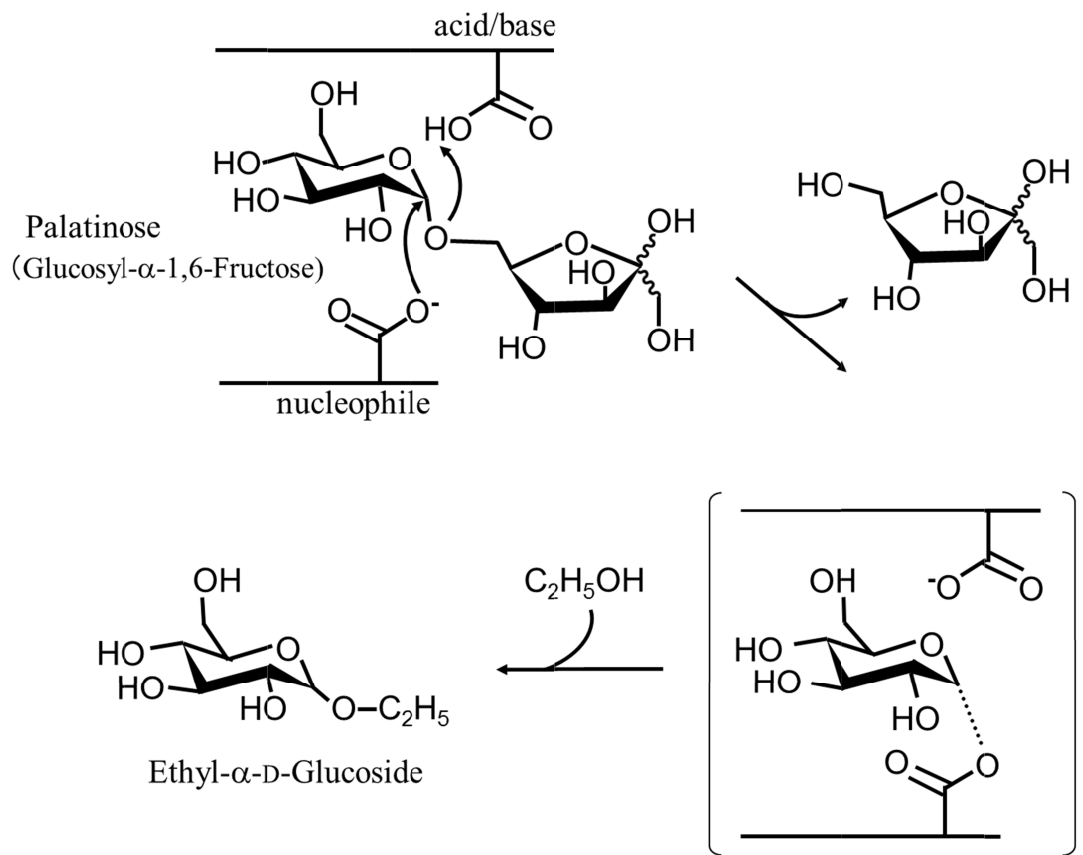


Fig. 32. Transglucosylation of α -glucosidase.

して用いた時、それぞれの反応生成物はグルコースやフルクトースよりも高い位置で検出され、また、エタノールへの転移生成物はエチル- α -D-グルコシドであると同定した。この結果は酵素 B1AglA1 と B1AglA2 が受容体のアルコールへグルコースを転移し、アルキル- α -D-グルコシドを生成することを示唆している。1-オクタノールを受容体とした時、TLC プレート上部に微かなスポットが見られたが、反応時間を3日間に延長してもスポットは大きくならなかった。グリセロールをグルコース受容体に用いたが、TLC によって生成物は検出されなかった。

3.5.6. α -グルコシダーゼの考察

B. longum subsp. *longum* JCM 7052 のアラビアガム培養による α -グルコシダーゼ活性の上昇は、一つまたは二つのオリゴ-1,6-グルコシダーゼでの比活性の変化によることが分かった。B1AglA1 と B1AglA2 の両酵素はオリゴ-1,6-グルコシダーゼであり、アミノ酸配列において74%の相同性を示し、酵素活性においても至適 pH、至適温度、基質特異性について類似した性質をもっていた。

しかし、二つの酵素はどちらもアミロペクチン、グリコーゲンからはグルコースを生成せず、糖鎖の内部に存在する α -1,6-グリコシド結合を加水分解しないことを示唆した。*B. longum* subsp. *longum* はデンプン、アミロペクチン、プルランでは増殖できない[85]が、マルトデキストリンはビフィズス菌にとって最も好ましい炭素源になることが示されている[86]。*B. longum* subsp. *longum* BBMN68 をマルトデキストリンのみの炭素源で増殖すると、 α -1,4-グリコシダーゼ遺伝子の近傍のオリゴ-1,6-グルコシダーゼ遺伝子が誘導される他、ABC タイプの糖輸送体の二つのタンパク質が増加することが観察されている。[87].

転写調節タンパク質に糖が結合することによって、その DNA 結合能が変化し、糖質の利用に働く酵素遺伝子をコントロールしていることが、ビフィズス菌でも知られている。[80, 88]。アラビアガムの加水分解によって生じたオリゴ糖が、そのような転写調節タンパク質に結合して、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼなどの酵素の遺伝子発現が引き起こされているのかもしれない。

オリゴ糖は食材料(低カロリー, 血糖値の上昇を抑える甘味料, 増粘剤), プレバイオティクス, 虫歯予防, 薬のコーティング剤等々, その有益な機能が注目されている。B1AglA1 と B1AglA2 は二糖類の合成だけでなく, より糖鎖の長いオリゴ糖(四糖類, 五糖類)を生成する糖転移活性を示した。両酵素は糖転移活性の基質として数種類の糖が示されたことから, 異なる糖を受容体として用いることによって様々なオリゴ糖を合成できると予想される。

アルコール類もまた B1AglA1 と B1AglA2 の糖転移反応におけるグルコース受容体として有効であった。アルキルグルコシドのうち, エチル- α -D-グルコシドは伝統的な日本酒の成分の一つとして知られている[89]。この化合物は経口摂取, 或いは皮膚への塗布で肌の保湿効果が得られることや[90], ガラクトサミンによって誘導されるマウスの肝障害に対する肝保護効果が知られている[91]。エチル- α -D-グルコシドの生成は, 米を原料とするアルコール発酵と糖転移活性を通して行われる他[92], *Mortierella alliacea* の α -グルコシダーゼでデンプンからグルコースを転移したり[93], *Leuconostoc mesenteroides* のデキストランスクラーゼはスクロースを基質としていることが知られており[94], エタノール以外の原料は何れも安価である。

本研究では, 二つのオリゴ-1,6-グルコシダーゼ B1AglA1 と B1AglA2 によるアルキルグルコシド合成をパラチノースのみを糖供与体として試験を行った。アルキルグルコシドのより簡便で効果的な生産方法を確立するには糖供与体の選択や, 反応条件のさらなる検討が必要である。

第四章 結論

近年、我が国の高齢化が進行する中、健康維持・増進に対する人々の関心はますます高まっている。食事で摂取した食物繊維がヒトの健康に有益な *Bifidobacterium* 属の増殖を促進するのは、食習慣と健康の維持が効果的に結びつけられることになり望ましいことである。食品添加物の増粘剤や安定化剤として用いられているアラビアガムはプレバイオティクスとしてヒト腸内の *Bifidobacterium* 増殖効果をもつことが知られている[95]。その効果は本研究で、*B. longum* subsp. *longum* の一部に限定されることを再確認し、特に *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 株と JCM 7053 株をアラビアガム分解株と同定した。

B. longum subsp. *longum* JCM 7052 をアラビアガムで培養すると、6種の糖質加水分解酵素の比活性が、グルコースで培養した時に比べて著しく高くなった。そのうち *B. longum* subsp. *longum* で殆ど研究報告がなかった α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼを精製し、これまでに報告されている酵素とは異なる新規な性質を見出した。

精製した二つの α -ガラクトシダーゼは末端に α -1,6 結合したガラクトースをもつラフィノースとスタキオースを基質とした。そのうち、 α -ガラクトシダーゼ X はこの菌株 JCM 7052 に特有な酵素であり、既報の *B. longum* 種のゲノム情報には見つかっていないものであった。

精製した β -ガラクトシダーゼは MALDI-TOF-MS の分析とゲノム情報と合わせて GH42 ファミリーであることが示され、オリゴ糖の β -1,3 ガラクトシド結合に作用する酵素であると推定された。このことはアラビアガムから生じる短鎖のガラクトオリゴ糖がこの β -ガラクトシダーゼの生理的な基質になることを示唆している。

精製した二つの α -グルコシダーゼはオリゴ-1,6-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.10) であり、糖質加水分解酵素ファミリー GH13 に属していると考えられた他、糖転移活性によってエチル- α -D-グルコシドを合成することが分かった。

以上のように、 α -ガラクトシダーゼと α -グルコシダーゼはアラビアガムに直接作用しないが、アラビアガム培養で比活性が上昇した。ゲノム分析はビフィズス菌の糖質加水分解に関与する遺伝子クラスターに転写調節因子の遺伝子を含んでいることを示しており、アラビアガムを加水分解して生じたオリゴ糖が、各酵素の遺伝子の転写調節タンパク質に結合して遺伝子発現を引き起こし、

α -ガラクトシダーゼ, β -ガラクトシダーゼ, α -グルコシダーゼなどの比活性が高くなったものと考えられる。

本研究で調べた酵素はいずれも新規な性質をもっている。 α -ガラクトシダーゼの加水分解活性は、砂糖に混在するラフィノースの除去や、B型赤血球からガラクトースを除去してH型とする酵素処理に用いられているが、ヒト腸内に優勢に生息するビフィズス菌の α -ガラクトシダーゼを遺伝子組換えによって大量に生産して利用することが考えられる。また、 α -ガラクトシダーゼの糖転移反応の基質に大豆オリゴ糖であるラフィノースを使用すると低コストのオリゴ糖生産が見込まれる。一方、精製した α -グルコシダーゼをエチル- α -D-グルコシドの合成に利用するために、グルコースそのものをエタノールに転移することを試みており、この方法でコストを低く抑えることが出来ると考えられる。

このように、*B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 から精製した酵素は糖鎖の改変の他、種々のオリゴ糖やエチル- α -D-グルコシドの生産に利用可能であり、ビフィズス菌の増殖や、ヒトや動物の健康増進への有益な利用効果が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬご指導、ご鞭撻を賜りました神戸女子大学家政学部食品微生物学研究室 山本 勇 教授に厚く御礼申し上げます。又、有益なご助言をいただき、精製酵素の MALDI-TOF-MAS 解析にご尽力賜りました吉田生物学研究所室長 和田 明 先生、吉田生物学研究所研究員 上田 雅美 先生に深く感謝いたします。欧文誌への論文投稿にあたり英文をご校閲いただきました神戸女子大学 林 マーシャ先生ならびに アン・ケリー先生に深く感謝いたします。

参考文献

1. Mitsuoka, T.: Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* 6, 263-268, 1990.
2. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bik, E. M., et al: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638, 2005.
3. Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., et al: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14, 169-181, 2007.
4. Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., et al: Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1303-1315, 2005.
5. Scardovi, V.: Genus *Bifidobacterium*. in “Bergey’s manual of Systematic Bacteriology” vol. 2. pp.1418-1434, 1986.
6. Biavati, B., Mattarelli, P.: The family *Bifidobacteriaceae* in “The Prokaryotes 3”, eds, Dworkin M, Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. Springer New York, pp.322-382, 2001.
7. Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Raangs, G. C., et al: Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30, 61-67, 2000.
8. Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., et al: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 219-226, 2002.
9. Hooper, L. V., Gordon, J. I.: Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292, 1115-1118, 2001.
10. Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., et al: Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52,

- 1945-1951, 2002.
11. Mattarelli, P., Bonaparte, C., Pot, B., et al: Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 767-772, 2008.
 12. 光岡知足:腸内菌の世界－嫌気性菌の分類と同定, 叢文社, 1980.
 13. Kligler, B., Cohressen, A.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378, 2008.
 14. Gibson, G. R., Roberfroid, M. B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412, 1995.
 15. Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., et al: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14422-14427, 2002.
 16. Lee, J.-H., Karamychev, V. N., Kozyavkin, S.A., et al: Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics* 9, 247, 2008.
 17. Hinz, S. W. A., Pastink, M. I., van den Broek, L. A. M., et al: *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberates galactotriose from type I galactans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5501-5510, 2005.
 18. Kitaoka, M., Tian, J., Nishimoto, M.: Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3158-3162, 2005.
 19. Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., et al: Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J. Biol. Chem.* 280,

- 37415-37422, 2005.
20. Nishimoto, M. Kitaoka, M.: Identification of N-acetylhexosamine-1-kinase in the complete lacto-N-biose/galacto-N-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6444-6449, 2007.
 21. Garro, M. S., de Giori, G. S., de Valdes, G. F., et al: α -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 16-19, 1994.
 22. Tochikura, A., Sakai, K., Fujiyoshi, T., et al: *p*-Nitrophenyl glycoside-hydrolyzing activities in bifidobacteria and characterization of β -galactosidase of *Bifidobacterium longum* 401. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2279-2286, 1986.
 23. Hsu, C.-A., Yu, R.-C., Chou C.-C.: Purification and characterization of a sodium-stimulated β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 355-361, 2005.
 24. Margolles, A., de los Reyes-Gavilán., C. G.: Purification and functional characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Bifido- bacterium longum* B667. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5096–5103, 2003.
 25. Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., et al: Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 199-210, 1994.
 26. Street, C. A. Anderson, D. M. W.: Refinement of the structures previously proposed for gum arabic and other Acacia gum exudates. *Talanta* 30, 887-893, 1983.
 27. 真田宏夫, 和田政裕, 早川享志 他: 食物繊維の種類と化学「食物繊維- 基礎と応用-」(日本食物繊維学会監修, 日本食物繊維学会委員会編集) pp. 35-71, 2008.
 28. Mille, G. L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428, 1959.
 29. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.

30. Tanaka, S., Sakai, A., Kimura, K., et al: Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int. J. Oncol.* 33, 361-370, 2008.
31. Saishin, N., Yamamoto, I.: α -Galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* JCM 7052 grown on gum arabic. *J. Biol. Macromol.* 9, 73-81, 2009.
32. Leder, S., Hartmeier, W., Marx, S. P.: α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr. Microbiol.* 38, 101-106, 1999.
33. van Laere, K. M. J., Abee, T., Schols, H. A., et al: Characterization of a novel β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1379-1384, 2000.
34. Hinz, S. W., van den Boek, L. A. M., Beldman, G., et al: β -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers $\beta(1,4)$ -galactosides over lactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 276-284, 2004.
35. van den Broek L. A., Struijs K., Verdoes J. C., et al: Cloning and characterization of two α -glucosidases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61, 55-60, 2003.
36. Dumortier, V., Brassart, C., Bouquelet, S.: Purification and properties of a β -D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19, 341-354, 1994.
37. Moller, P. L., Jorgensen, F., Hansen, O. C., et al: Intra- and extracellular β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2276-2283, 2001.
38. Jorgensen, F., Hansen, O. C., Stougaard, P.: Enzyme isolated from a *Bifidobacterium*, Patent US 6555348-A 2, 2003.

39. Sakai, K., Tachiki, T., Kumagai, H., et al: Hydrolysis of α -D-galactosyl oligosaccharides in soymilk by α -D-galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203, *Agric. Biol. Chem.* 51, 315-322, 1987.
40. Zhao, H., Lu, L., Xiao, M., et al: Cloning and characterization of a novel α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal- α -1,4 linkage. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 278-283, 2008.
41. Iino, T., Shimakawa, Y., Morishita, T.: DNA fragment containing beta-galactosidase gene and plasmid containing the same DNA fragment thereinto, JP 1993146296-A 1, 1993.
42. Pokusaeva K., O'Connell-Motherway M., Zomer A., Fitzgerald G. F., et al: Characterization of two novel α -glucosidases from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1135-1143, 2009.
43. Kelly E. D., Bottacini F., O'Callaghan J., et al: Glycoside hydrolase family 13 α -glucosidases encoded by *Bifidobacterium breve* UCC2003; A comparative analysis of function, structure and phylogeny. *Int. J. Food Microbiol.* 224, 55-65, 2016.
44. O'Connell K. J., O'Connell Motherway M., O'Callaghan J., et al: Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ Microbiol.* 79, 6280-6292, 2013.
45. Roy, D., Blanchette, L., Savoie, L., et al: α - and β -Galactosidase properties of *Bifidobacterium infantis*. *Milchwissenschaft* 47, 18-21, 1992.
46. Hung, M. N., Lee, B. H.: Cloning and expression of β -galactosidase gene from *Bifidobacterium infantis* into *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 20, 659-662, 1998.
47. Rossi, M., Altomare, L., Gonzalez Vara y Rodriguez, A., et al: Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Bifidobacterium longum* MB219 *lacZ* gene. *Arch. Microbiol.* 174, 74-80, 2000.
48. Saishin, N., Ueta, M., Wada, A., Yamamoto, I.: Purification and characterization of

- α -galactosidase I from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 7052. *J. Biol. Macromol.* 10, 13-22, 2010.
49. Saishin, N., Ueta, M., Wada, A., Yamamoto, I.: Properties of β -galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on gum arabic. *J. Biol. Macromol.* 10, 23-31, 2010.
50. Saishin, N., Ueta, M., Wada, A., Yamamoto, I.: Characterization of two α -glucosidases purified from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 7052. *J. Biol. Macromol.* 16, (in press), 2016.
51. Lambertus A. M. van den Broek, Sandra W. A. Hinz, Gerrit Beldman, et al: *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Mol. Nutr. Food Res* 52, 146-163, 2008.
52. Wyatt, G. M., Bayliss, C. E., Holcroft, J. D.: A change in human fecal flora in repose to inclusion of gum arabic in the diet. *Br. J. Nutr.* 55, 261-266, 1986.
53. Salyers, A. A., West, S. E. H., Vercellotti, J. R., et al: Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 529-533, 1977.
54. Rey M. W., Ramaiya P., Nelson B.A., et al: Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5, R77, 2004
55. Kotake, T., Dina, S., Konishi, T., et al: Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1-3)-and β -(1-6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein. *Plant Physiol.* 138, 1563-1576, 2005.
56. Kotake, T., Kaneko, S., Kubomoto, A., et al: Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo- β -(1 \rightarrow 6)-galactanase gene. *Biochem. J.* 377, 749-755, 2004.
57. Garman, S. C., Garboczi, D. N.: The molecular defect leading to Fabry disease:

- structure of human α -galactosidase. *J. Mol. Biol.* 337, 319-335, 2004.
58. Wu, G., Yan, B., Wang, X., et al: Decreased activities of lysosomal acid α -D-galactosidase A in the leukocytes of sporadic Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 271, 168-173, 2008.
59. Golubev, A. M., Nagem, R. A., Neto, J. R. B., et al: Crystal structure of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: implication for catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 339, 413-422, 2004.
60. Brouns, S. J. J., Smits, N., Wu, H., et al: Identification of a novel α -galactosidase from the hyperthermophile archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 188, 2392-2399, 2006.
61. Gao, Z., Schaffer, A. A.: A novel alkaline α -galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiol.* 119, 979-988, 1999.
62. Carmi, N., Zhang, G., Petreikov, M., et al: Cloning and functional expression of alkaline α -galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *Plant J.* 33, 97-106, 2003.
63. Lee, R. H., Lin, M. C., Chen, S. C.: A novel alkaline α -galactosidase genes is involved in rice leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 55, 281-295, 2004.
64. van Laere, K. M. J., Hartemink, R., Beldman, G., et al: Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 α -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 681-688, 1999.
65. Weignerova, L., Simerska, P., Kren, V.: α -Galactosidases and their applications in biotransformations. *Biocatal. Biotransform.* 27, 79-89, 2009
66. Goulas, T., Goulas, A., Tzortzis, G., et al: A novel α -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties: gene molecular cloning and heterologous expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 471-477, 2009.
67. Hinz, S. W. A., Doeswijk-Voragen, C. H. L., Schipperus, R., et al: Increasing the

- transglycosylation activity of α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 by site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Bioengin.* 93, 123-131, 2006.
68. Parche, S., Amon, J., Jankovic, I., Rezzonico, E., et al: Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12, 9-19, 2007.
69. Comfort, D. A., Bobrov, K. S., Ivanen, D. R., et al: Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36 α -galactosidase (TmGalA) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases. *Biochemistry* 46, 3319-3330, 2007.
70. Vasseur, M., Frange, R., Cauzac, M., et al: pH-dependent inhibitory effects of Tris and lithium ion on intestinal brush-border sucrase. *J. Enz. Inhibit. Med. Chem.* 4, 15-26, 1990.
71. Ghalanbor, Z., Ghaemi, N., Marashi, S.-A., et al: B. Binding of Tris to *Bacillus licheniformis* α -amylase can affect its starch hydrolysis activity. *Prot. Peptide Lett.* 15, 212-214, 2008.
72. Arakawa, T., Timasheff, S. N.: Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* 21, 6545-6552, 1982.
73. Rabiou, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R., et al: Synthesis and fermentation products of novel galacto-oligosaccharides by β -galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2526-2530, 2001.
74. Hung, M.-H., Xia, Z., Hu, N.-T., et al: Molecular and biochemical analysis of two β -galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4256-4263, 2001.
75. Hung, M. H., Lee, B. H.: Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 439-445, 2002.
76. Henrissat B.: A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence

- similarities. *Biochem. J.* 280, 309-316, 1991.
77. Henrissat B., Davies G. J.: Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7, 637-644, 1997.
78. Shipkowski, S., Brenchley, J. E.: Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolases family 42 β -galactosidase are arabinogalactan type I oligomer hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7730-7738, 2006.
79. Defaye, J., Wong, E.: Structural studies of gum arabic, the exudates polysaccharide from *Acacia senegal*. *Carbohydr. Res.* 150, 221-231, 1986.
80. Gonzalez, R., Klaassens, E. S., Malinen, E., et al: Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4686-4694, 2008.
81. Igaue K., Watabe H., Oda T., Oyamada K.: Isolation and purification of maltitol-hydrolyzing enzyme (α -glucosidase) from a strain *Bifidobacterium adolescentis*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 57, 985-994, 1983. (in Japanese)
82. Wei Y. X., Zhang Z. Y., Liu C., Zhu Y. Z., et al: Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* KACC 91563. *J. Bacteriol.* 193, 5044, 2011.
83. Duan K. J., Sheu D. C., Lin C. T.: Transglucosylation of a fungal α -glucosidase. The enzyme properties and correlation of isomaltooligosaccharide production. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 750, 325-328, 1995.
84. Mala S., Dvorakova H., Hrabal R., et al: Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of α -glucosidases with different substrate specificity. *Carbohydr. Res.* 322, 209-218, 1999.
85. Ryan S. M., Fitzgerald G. F., van Sinderen D.: Screening for identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5289-5296, 2006.
86. Watson D., O'Connell Motherway M., Schoterman M. H. C., et al: Selective

- carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1132-1146, 2012.
87. Liu S., Ren F., Zhao L., et al: Starch and starch hydrolysates are favorable carbon sources for Bifidobacteria in the human gut. *BMC Microbiol.* 15, 54, 2015.
88. Khoroshkin M. S., Leyn S. A., van Sinderen D., et al: Transcriptional regulation of carbohydrate utilization pathways in the *Bifidobacterium* genus. *Front. Microbiol.* 7, 120, 2016.
89. Imanari T., Tamura Z.: The identification of α -ethyl glucoside and sugar-alcohols in Sake. *Agr. Biol. Chem.* 35, 321-324, 1971.
90. Hirotsune M., Hatanaka A., Komiya A., et al: Effect of ingested concentrate and components of sake on epidermal permeability barrier disruption by UVB irradiation. *J. Agric. Food Chem.* 53, 948-952, 2005.
91. Izu H., Hizume K., Goto K., et al: Hepatoprotective effects of a concentrate and components of sake against galactosamine (GalN)-induced liver injury in mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 951-957, 2007.
92. Bogaki T., Ozeki K.: High-yield production of ethyl α -D-glucoside in shochu brewing and evaluation of its functionality. *J. Biol. Macromol.* 15, 41-50, 2015.
93. Tanaka Y., Aki T., Hidaka Y., et al: Purification and characterization of a novel fungal α -glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch-hydrolytic activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66, 2415-2423, 2002.
94. Kim Y. M., Kim B. H., Ahn J. S., et al: Enzymatic synthesis of alkyl glucosides using *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnol Lett.* 31, 1433-1438, 2009.
95. Calame W., Weseler A. R., Viebke C., et al: Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *Br. J. Nutr.* 100, 1269-1275, 2008.